

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08493

研究課題名(和文) 精巣上体・前立腺の上皮細胞間クロストークの解明と雄性不妊マウスの解析

研究課題名(英文) Analysis of crosstalk between epididymal and prostatic epithelial cells in male infertile mice

研究代表者

吉永 一也 (YOSHINAGA, Kazuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・教授

研究者番号：50136719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内シグナル伝達に關与する受容体LGR4の発現を著しく低下させた変異マウスでは、胎生後期～幼若期に雄性生殖管の伸長と屈曲の障害が起ることが判明した。また、LGR4の発現は主に管周囲の間葉細胞に認め、変異マウスの雄性生殖管を構成する上皮細胞および周囲間葉細胞の増殖は胎齡14.5日目から減少していた。この時期、間葉細胞のアポトーシスが増加していた。本研究は、LGR4および上皮-間葉間相互作用が雄性生殖管の発生・分化に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精巣上体や前立腺を構成する細胞の発生・分化や細胞間調節機構の仕組みはよく分かっていない。本研究は、細胞内シグナル伝達に關与する受容体LGR4が雄性生殖管の形態形成期における細胞増殖を促進することを示し、その発生・分化を制御する分子メカニズムの一端を明らかにした。この成果は今後、男性不妊症の原因解明や診断・治療法の開発のみならず、さまざまな上皮性器官の形態形成異常を伴う疾患の原因解明にも繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study showed that in LGR4 hypomorphic mutant mice, the elongation and bending of the male reproductive tract were impaired during the late embryonic and juvenile periods. In addition, LGR4 expression was mainly observed in peritubular mesenchymal cells, and the proliferation of epithelial cells and peripheral mesenchymal cells that compose the male reproductive tract of mutant mice was decreased from embryonic day 14.5. During this period, apoptosis of mesenchymal cells was increased. These results indicate that LGR4 and epithelial-mesenchymal interactions are important for the development and differentiation of the male reproductive tract.

研究分野：生殖生物学

キーワード：細胞・組織 発生・分化 上皮・間葉間相互作用 男性生殖器 雄性生殖管 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精巣上体や前立腺は精子の成熟・運動能獲得や活性化を担い、雌雄の形態と機能の違いが顕著に見られるユニークな男性特有の器官である。しかし、精巣上体は特定の疾患の原因臓器ではなく、また前立腺は個体の生命維持に直接関与する臓器ではないこともあり、国内外における基礎研究は少ない。一方、男性不妊症や前立腺がんの患者数は年々増加しており、その発症機序の解明が急務となっている。精巣上体や前立腺の発生・分化は精巣で産生される男性ホルモンのアンドロゲンに依存していることは古くから知られている。しかし、その基盤となる正常な上皮細胞の発生・分化や細胞間調節の分子メカニズムはほとんど知られておらず、これらを解明するための基礎的研究が強く求められている。

このような背景のなか、我々は最近、精巣上体や前立腺で発現する機能分子が各器官の領域や構成細胞種さらに上皮の分化過程で明瞭な違いを示すことを明らかにし、分化マーカーとして有用であることを示した (Sakuda et al., 2016 ほか)。一方、R-spondins と結合し Wnt/beta-カテニンシグナルを活性化する G タンパク質共役型受容体 Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4 (LGR4; Carmon et al., 2011) の発現を低下させた Lgr4 遺伝子改変マウスが精巣上体の形態異常を伴う雄性不妊の症状を示すことが報告されている (Hoshii et al., 2007)。本研究では、こうした変異マウスの詳細な形態学的解析を行うことで、精巣上体や前立腺における上皮・間葉間の相互作用 (クロストーク) を制御するメカニズムを追究する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、男性不妊症や前立腺がんの基盤となる精巣上体や前立腺を構成する上皮細胞の発生・分化や細胞間調節 (クロストーク) の仕組みを明らかにし、上皮細胞の分化動態や生理機能など未解決の基礎的な問題を細胞・組織～個体レベルで解決することである。そのために、精巣上体や前立腺を構成する上皮細胞の分化マーカーを用いて、両器官で発現する細胞表面受容体や細胞間シグナル分子の分布・局在について主に免疫組織学的解析を行う。ならびに、雄性生殖管の低形成を示す変異マウスを用いて LGR4 の発現・局在解析およびその機能解析を行うことで、精巣上体や前立腺の発生・分化における LGR4 の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの作製と遺伝型の同定:

遺伝子トラップ法を用いて作製された Lgr4 遺伝子改変マウスは、精巣上体の形態異常を伴う雄性不妊の症状を示すことが知られている (Hoshii et al., 2007)。この変異マウスの凍結胚を融解後、レシピエントマウスの卵管内に移植して個体復元を行った。復元した変異マウス系列に C57BL/6 系マウスを 3 世代バッククロスすることで、Lgr4 の発現をさらに低下させた変異マウス系列を作製した。ヘテロマウス (Lgr4^{+/-}) 同士を交配して得られたマウスの遺伝型: 野生型 (+/+), ヘテロ (+/-), ホモ (Gt/Gt) の判定は、genotyping PCR 法により行った。

(2) 雄性生殖管の発生形態学的および免疫組織学的解析:

材料には胎齢 14 日目から生後 56 日齢までの雄マウスを使用した。摘出した組織は 4% パラホルムアルデヒド液で固定後、パラフィン包埋切片を作成した。脱パラした切片は抗原賦活化処理後、市販の各種抗体を用いて酵素抗体法や蛍光抗体法に従い免疫組織化学染色を行い、またはヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡レベルで解析した。

(3) TUNEL 法によるアポトーシス解析:

脱パラした切片はメーカー (Millipore 社) のマニュアルに従い、Proteinase K 処理後、ラベリング反応液を 37 90 分間反応させ、蛍光顕微鏡にて観察した。

(4) LGR4 の発現解析:

ヘテロマウスの雄性生殖系器官 (精巣・精巣上体・前立腺等) をホルマウントにて固定、1% Triton-X 処理後、X-Gal 染色液にて一晚反応させた。陽性反応の有無は実体顕微鏡下で確認し、陽性部位の同定 (LGR4 の発現) はパラフィン包埋切片を作成後、光学顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

当初の計画では、精巣上体および前立腺を解析対象の器官としていたが、Lgr4 変異マウスにおける形態異常は主に雄性生殖管（精巣輸出管・精巣上体管・精管）で観察されたため、解析対象を雄性生殖管に絞って研究を進めた。

(1) 変異マウスにおける雄性生殖管の発生・分化（形態形成）:

胎齢 16 日目までは、野生型マウスとホモマウス双方に形態学的な違いは認められなかった。胎齢 18 日目以降に精巣上体管の横断面数が減少し、出生直後にはその減少が顕著となり、管周囲に間葉細胞が多層をなして凝集していた。その後、野生型マウスでは生後 21 日目までの幼若期に精巣上体管の著しい伸長・屈曲がみられ、形態分化（区画化）が進んでいた。これに対し、ホモマウスでは生後 7 日目の精巣上体管の断面数が著しく減少し、管周囲に間葉細胞が層をなして凝集しており、精巣上体頭部の区画化が進行していなかった。成熟期においては、ホモマウスの雄性生殖管は全長に亘って低形成を示した。とくに、近位部（頭部）の精巣上体管は短く拡張し、管腔内には精子が充満していた。一方、遠位部（尾部）の精巣上体管腔は狭く、精子は観察されなかった。また、ホモマウスでは、精巣上体管上皮に特徴的な背の高い不動毛（微絨毛）が欠損していた。

(2) 胎生期～幼若期における精巣上体管の伸長・分化と細胞増殖との関連:

ホモマウスの精巣上体管の伸長・屈曲の低形成は胎生後期～幼若期に引き起こされることが明らかとなったので、この時期の解析をさらに進めた結果、LGR4 の強いシグナルは出生直後～幼若期の精巣上体近位部の間葉に認められた。こうした LGR4 の発現パターンとホモマウスの形態異常が起る時期と場所は一致しており、LGR4 が精巣上体頭部の形態形成に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、増殖マーカー Ki67 を用いた解析と TUNEL 法による解析から、胎生後期～幼若期のホモマウスでは、精巣上体管周囲の間葉細胞の増殖低下と共にアポトーシスが増加することが判明した。LGR4 の発現が主に管周囲の間葉細胞に認められたことから、ホモマウスで観察された精巣上体管の伸長・屈曲の低形成は、上皮-間葉相互作用により間葉細胞数の減少に伴って上皮細胞の増殖が低下することに起因することが示唆された。

(3) 男性生殖管における水吸収に関与する分子の発現解析:

精巣上体近位部の管腔拡張の原因を明らかにするために、水分吸収に関与するエストロゲン受容体の発現パターンを調べた結果、野生型マウスでは出生時～成熟期に強い発現を認めた。これに対し、ホモマウスでは出生時にすでに発現低下しており、その後減弱・消失することが判明した。一方、アンドロゲン受容体の発現は、野生型とホモマウス双方で同じ強さで認められた。また、ナトリウム-プロトン交換体 (SLC9A3) は精巣輸出管上皮で検出されたが、ホモマウスの輸出管の遠位部では発現が減少していた。なお、ホモマウスの血中エストロジオール量とテストステロン量が正常であることはすでに報告されている (Hoshii et al., 2007)。これらの結果から、LGR4 の減少が精巣分泌液の吸収を制御する重要な因子（エストロゲン受容体など）の発現に影響を与え、またホモマウスで観察された精巣上体管の拡張は、精巣分泌液の再吸収阻害に起因することが示唆された。

引用文献

Hoshii T, Takeo T, Nakagata N, Takeya M, Araki K, et al.: LGR4 regulates the postnatal development and integrity of male reproductive tracts in mice. *Biol Reprod*; 76:303-313, 2007.

Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q: R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:11452-11457, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 川畑遊星、吉永一也	4. 巻 16
2. 論文標題 血液 - 精巢上体閥門の構造と機能	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 形態・機能	6. 最初と最後の頁 62-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 奥野知世、石坂駿行、川畑遊星、竹田直樹、吉信公美子、荒木喜美、吉永一也	4. 巻 16
2. 論文標題 精巢上体の発生・分化：遺伝子改変マウスを用いたアプローチ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 熊本大学医学部保健学科紀要	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomoyo Okuno, Toshiyuki Ishizaka, Kazuya Yoshinaga
2. 発表標題 Localization of cytokeratins and differentiation of basal cells in the mouse prostate.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第74回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥野知世、石坂駿行、川畑遊星、吉永一也
2. 発表標題 雄性生殖管におけるLGR4受容体の発現と機能解析
3. 学会等名 コ・メディカル形態機能学会第17回学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹田 直樹 (TAKEDA Naoki) (90304998)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教 (17401)	
研究協力者	石坂 駿行 (ISHIZAKA Toshiyuki)		
研究協力者	奥野 知世 (OKUNO Tomoyo)		