

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08495

研究課題名(和文)アンドロゲン依存的形態形成における血管形成の意義の解明

研究課題名(英文)Analyses for vascular formation during androgen dependent sexual development

研究代表者

村嶋 亜紀(Murashima, Aki)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：50637105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではホルモン依存的性分化過程における血管形成の性差獲得プロセスの解剖学的基盤を明らかにし、さらにその意義の解明を目指した。マウス胚を用いて、アンドロゲン依存的雄性化を示す中腎領域における血管形成を3次元かつ継時的解析にした結果、E12.5の中腎領域の血管形成に性的二型を認められた。薬剤誘導型血管内皮細胞特異的遺伝子組換えマウスを用いた細胞系譜解析の結果、形態の性差を構築する血管形成に部位特異的な傾向があり、これらの血管において血管内皮細胞が異なるアンドロゲン応答性を示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管形成は胚発生において基盤を担うと考えられ、Sry遺伝子依存的に性的二型を示すマウス生殖腺においては、雄特有、あるいは雌特有の血管構造が構築されることがその形態形成に必要な不可欠である。一方で生殖腺に隣接し、アンドロゲン依存的雄性化を示す中腎領域における血管構造の性差の有無、そしてその機能については、ほとんど報告されていなかった。本研究によって、中腎領域における初期の性的二型とその起源が明らかになるとともに、二次的な雄性化に必要なアンドロゲンの伝達(循環)経路の血管形成における特性についても明らかとなりつつあり、解剖学、発生学分野に貢献するものであると考える。

研究成果の概要(英文)：This study tried to clarify the anatomical basis of vascular development during hormone-dependent sexual differentiation. Spatio-temporal analysis of vascular development demonstrated sexual dimorphic patterns of venous return during early sexual differentiation of the mesonephros. Cell lineage analyses further suggested vascular endothelial cells showing dimorphic pattern possess site-specific origin and different androgen responsiveness. These results are revealing novel insights into the early sexual dimorphism in vascular development and signal pathway of androgen required for the secondary masculinization of the reproductive organs.

研究分野：解剖学、発生生物学

キーワード：性分化 血管形成 アンドロゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の雌雄にそれぞれ特徴的な形態を性的二型といい、生殖器官を含め、この固有形態こそ、生殖において必須の機能を担う。一般的に、生殖腺の性的二型獲得は一次性分化と呼ばれ、哺乳類では精巣決定因子 (Sex-determining region Y: *Sry*) によってその運命が決定される。一方、生殖腺以外の器官における性的二型獲得は二次性分化と呼ばれ、性ホルモンがその中心を担う。特に胎仔期においては雄の形質を誘導するホルモン：アンドロゲンが精巣より産生されることで、生殖輸管系や外生殖器の形態が雄型へと分化する。近年、多くの研究が、性ホルモン依存的な性的二型形態形成において標的となりうる遺伝子や細胞挙動について報告を蓄積させてきた。しかし、いずれの標的メカニズムも雌雄それぞれに特有の形態形成を完全には説明できていない。血管形成は胚発生に必須であり、胚の生存を保つのみならず、正常な形態形成において重要な機能を果たす。マウス生殖腺において、雄特有の血管形成は正常な精細管形成に必須であることが知られており、その形成も精巣決定因子 (*Sry*) によって制御されることが知られている。すなわち、雄の生殖腺性分化過程において、中腎生殖腺中間領域に血管網 (mesonephric vascular plexus: MVP) が形成され、生殖腺体腔側に向けて血管が伸長する。体腔側に達した血管内皮細胞は体腔血管 (coelomic vessel) を形成し、これが精巣動脈に連絡するといわれている。一方で雌は MVP からの血管内皮細胞の遊走はほとんど見られず、体腔血管の形成も見られない。このように生殖腺の性分化において血管形成は有意な性的二型を示す。特に精巣形成において血管形成を阻害すると、精細管構造の正常な構築が阻害されることが報告されている。一方で生殖腺に隣接し、アンドロゲン依存的雄性化を示す中腎領域における血管の性差の有無やその機能については、ほとんど報告されていない。血管形成は一般的に血管内皮細胞が既存の血管から分枝伸長する血管新生と *de novo* に分化する脈管形成に大別され、どちらも胚発生に必須であり、正常な形態形成において重要な機能を果たす。現在まで、アンドロゲン依存的雄性化を示す中腎領域における血管の性差の有無やその機能については、ほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

本研究ではホルモン依存的性分化過程における血管形成の性差獲得プロセスの解剖学的基盤を明らかにしたうえで、その分子細胞学的メカニズムと意義の解明を行う。具体的には、アンドロゲン-細胞増殖因子-血管形成の相関関係を明らかにすることで、ホルモン依存的性的二型形態形成の分子細胞メカニズムが明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、ホルモン依存的性分化過程における血管形成を解析した。研究の方法として、Flk-BAC Tg マウスや CD31 (血管内皮マーカー) の Whole mount immunofluorescence を行い、共焦点顕微鏡を用いてデータを収集し、Amira を用いて 3 次元構築を行った。また、妊娠マウスへのアンドロゲン阻害薬 (フルタミド、エンザルタミド) や、アンドロゲン依存性の細胞増殖因子の阻害剤投与による *in vivo* 阻害実験を行った。

4. 研究成果

本研究は、アンドロゲン依存的雄性化を示す中腎領域における血管形成プロセスを明らかにすることを目的としていたため、まず、発生に雌雄差を示す血管とその形成開始時期の同定を行った。Flk-BAC Tg マウスや CD31 (血管内皮マーカー) の Whole mount immunofluorescence と共焦点顕微鏡を用いてデータを収集し、Amira を用いて 3 次元構築を行った結果、E12.5 の中腎領域の血管形成に性的二型を認めた。具体的には、中腎血管叢 (MVP) から中腎周辺組織への血管走行、MVP と大動脈との連絡様式に性差が認められた。詳細に解析した結果、雌の MVP は傍大動脈隆起 (para-aortic ridge: PAR) に見られる血管叢に連絡するのに対し、雄ではこの連絡が見られなかった。胎生後期のマウス胚の解析より、この MVP-PAR 連絡血管は後主静脈 (後の腸骨静脈) へ連絡することがわかり、後の子宮静脈や子宮腔静脈叢の形成に寄与する可能性も示唆された。

血管内皮細胞の機能解析について、血管内皮特異的遺伝子組換えマウスを用いて *in vivo* 解析を行った。Cdh5Cre-ERT2 マウスを Cre レポーターラインである ROSA-tdTomato と交配し、中腎管雄性形態形成における血管内皮細胞の機能を解析するのに適切な組換え誘導時期の検討を行った。中腎領域血管構造の性差獲得プロセスの解剖学的解析においては、性分化のごく初期において中腎血管叢 (MVP) と傍大動脈隆起 (PAR) に形成される血管叢との連絡様式に性差が見られ、後の静脈形成に関わる可能性が示唆される等、正常発生における解剖学的基盤が明らかになりつつあるため、特に性差が見られた MVP から中腎周辺組織への血管走行について、アンドロゲンの作用を検討する為に免疫組織化学法を用いて CD34 (血管内皮) とアンドロゲン受容体 (Androgen receptor: AR) の多重染色を行った。その結果、中腎管周辺間葉の内側において一部共染色を認めたが、MVP や中腎傍管側の間葉における発現の顕著な関連性は見られなかった。さらに血管形成におけるアンドロゲンシグナルの機能を解析するため、性的二型を示す血管におけるアンドロゲン受容体の発現を解析した結果、血管内皮細胞は位置によってその性質 (アンドロゲン応答能) を変化させる可能性が示唆された。生殖輸管系の性的両能期に形成されている血管の内皮細胞の寄与が大きい血管と、*de novo* に分化してくる内皮細胞からなる血管が明確に区別される可能性が示唆された。これらの結果から、ウォルフ管 (Wolffian duct: WD) 直下の間葉における AR シグナルが血管内皮細胞の WD 周囲への分布に影響を与えている可能性が考えられた。

加えて、中腎管の雄性形態形成における血管形成の機能解析のため、Cre/loxP システムを応用した血管内皮細胞を遺伝的に除去することができるマウス系統 (Cdh5-CreERT2 マウスと ROSA-DTA マウス) を導入し、血管走行に生じる影響を解析した。性差形成初期に性差を呈することが確認されていた MVP から PAR に連絡する血管について、後主静脈に連絡していたことから、生殖輸管を含めた付属器を還流する静脈への寄与を念頭に解析を進めていたが、本来の合流部である内腸骨動脈に連絡する様子が確認できなかった。代わりに PAR 領域に発生する血管叢への連絡が後期になるに従い主流となり、これが性腺静脈となる可能性が示唆された。これは性腺静脈が主下静脈の中腎における吻合部から発生するという既存の認識とは異なる結果である。

本研究は、血管形成プロセスにおける初期の性的二型について、性腺静脈の元となる血管叢の

存在可能性を示唆し、二次的な雄化に必要なアンドロゲンの血管形成における伝達（循環）経路
に関しても新たな知見を与えうる重要な研究結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsushita Shoko, Suzuki Kentaro, Murashima Aki, Kajiooka Daiki, Acebedo Alvin Resultay, Miyagawa Shinichi, Haraguchi Ryuma, Ogino Yukiko, Yamada Gen	4. 巻 15
2. 論文標題 Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Reviews Urology	6. 最初と最後の頁 358 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41585-018-0008-y	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 清野太郎, 木村英二, 村嶋亜紀, 黒坂大次郎	4. 巻 69(5)
2. 論文標題 マウス初期胚の眼球形成領域の血管形成	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌	6. 最初と最後の頁 243 ~ 253
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 無
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 Liu Liqing, Suzuki Kentaro, Chun Eunice, Murashima Aki, Sato Yuki, Nakagata Naomi, Fujimori Toshihiko, Yonemura Shigenobu, He Wanzhong, Yamada Gen	4. 巻 11
2. 論文標題 Androgen Regulates Dimorphic F-Actin Assemblies in the Genital Organogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sexual Development	6. 最初と最後の頁 190 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000477452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Haraguchi Ryuma, Kitazawa Riko, Murashima Aki, Yamada Gen, Kitazawa Sohei	4. 巻 50(4)
2. 論文標題 Developmental Contribution of Wnt-signal-responsive Cells to Mouse Reproductive Tract Formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Histochemica et Cytochemica	6. 最初と最後の頁 127 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.17017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsushita Shoko, Suzuki Kentaro, Murashima Aki, Kajioka Daiki, Acebedo Alvin Resultay, Miyagawa Shinichi, Haraguchi Ryuma, Ogino Yukiko, Yamada Gen	4. 巻 15(6)
2. 論文標題 Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Reviews Urology	6. 最初と最後の頁 358-368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41585-018-0008-y	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 Haraguchi Ryuma, Yamada Gen, Murashima Aki, Matsumaru Daisuke, Kitazawa Riko, Kitazawa Sohei	4. 巻 22
2. 論文標題 New Insights into Development of Female Reproductive Tract?Hedgehog-Signal Response in Wolffian Tissues Directly Contributes to Uterus Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1211 ~ 1211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Daiki, Colet Jose Gabriel R., Murashima Aki, Fujimoto Kota, Ueda Yuko, Suzuki Kentaro, Hyuga Taiju, Hemmi Hiroaki, Kaisho Tsuneyasu, Takahashi Satoru, Takahama Yousuke, Yamada Gen	4. 巻 11
2. 論文標題 Radiation inducible MafB gene is required for thymic regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89836-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村嶋亜紀、及川里百合、木村英二、人見次郎
2. 発表標題 薬剤誘導型遺伝子改変マウスを用いた頭部血管発生機構の解析
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 大須賀 穰、藤井知行	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 330
3. 書名 生殖生理 第7章 性分化	

1. 著者名 大須賀 穰、藤井知行 (編集)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 330
3. 書名 生殖生理 (分担執筆)	

1. 著者名 日本小児泌尿器科学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 368
3. 書名 小児泌尿器科学 (分担執筆)	

〔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
連携研究者	人見 次郎 (Hitomi Jiro) (00218728)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------