

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06938

研究課題名(和文) 海綿体形成過程の解明と再生に向けたフロンティア研究

研究課題名(英文) Molecular developmental analysis on erectile tissue formation

研究代表者

山田 源 (Gen, Yamada)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授

研究者番号：80174712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：海綿体組織の研究は生理学的な実験が主体であった。本研究はin vitroにおいてマウス海綿体組織をexplantとして摘出培養し、収縮/弛緩の制御因子；Norepinephrine, NOドナーを加え、海綿体応答の再現に成功した。(BOR 2021, RMB 2021)。この系を応用して老化マウスなどの海綿体変性に関連した遺伝子発現、Sox9, RBPJなどの発現も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

勃起不全(ED)は、高齢化から増加している。海綿体の研究は、生理学的実験等が主体であり、その構造と動態に関する研究は希少であった。本研究ではマウスexplant(組織片)による新規な培養を行い、海綿体発生や機能に関する制御因子群の解明、男性ホルモン系との関連を解明した。その結果PEやSNPによる収縮/弛緩反応の誘導が可能となり、バイアグラなどの薬剤添加により弛緩機能の変化を直接評価することができた。これらはシヌソイドを含む、微細で高度な血管系を基盤とする疾患の理解に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the upper (dorsal) part of penis, corpus cavernosum (CC) plays fundamental roles for erection. The basis of ED by penile abnormality is poorly understood. To analyze the 3D structure of murine CC sinusoid, 3D reconstruction was performed. Sinusoids prominently developed adjacent to tunica albuginea. As for pathogenic signaling, aged samples contained ectopic chondrocytes and the expression of SOX9, chondrogenic regulator, was upregulated and the expression of RBPJ, the Notch signal regulator, was downregulated. Furthermore, a novel in vitro explant system to analyze the dynamic erectile contraction/relaxation was established. The data show regulatory contraction/relaxation processes by phenylephrine (PE) and nitric oxide (NO) donor. Two photon excitation microscopy (TPEM) observation shows the synchronous movement of sinusoidal space and the CC. The model enables to directly analyze various stressed conditions.

研究分野：医科学、生殖医学、アンドロロジー、泌尿生殖医学、内分泌発生医学

キーワード：海綿体 男性ホルモン シヌソイド 勃起 平滑筋 二光子顕微鏡 培養系 ストレス応答

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、世界に先駆けてマウス外生殖器発生研究を遂行してきた。その過程において間葉組織の男性ホルモン感受性の基盤や、細胞増殖因子信号系などの機能が明らかとなった。

海綿体発生とその異常についての解析は、男性ホルモンによる内分泌学、血管内皮・平滑筋を含む組織形成、加齢-男性医学などの多角的視点で重要である。海綿体組織は、微細な血管構造を含む洞様血管(シヌソイド)を含み、血液の充満により交接のための収縮/弛緩を可能とする。シヌソイド海綿体は、収縮/弛緩による血液の貯留、非勃起状態における虚血状態に対応したストレス及び損傷修復を示すと推察されるが、その詳細はほとんど未解明であった。

本研究では、間葉組織の男性ホルモン感受性の解析などをもとに海綿体組織での加齢や内皮細胞、平滑筋、血管周辺細胞等が障害されるメカニズム、未分化間葉細胞からの適切な組織修復に向けた研究を起案した。新規の海綿体培養系の樹立等を背景として、海綿体の恒常性、洞様血管(シヌソイド)についての解析を行い、海綿体組織の障害後の再生に向けて研究を行う。

## 2. 研究の目的

海綿体(CC; corpus cavernosum)は、洞様血管(シヌソイド)を含み、血液の充満により交接のための収縮/弛緩を可能とする。海綿体のシヌソイド構造に対して未分化(幹)細胞がその損傷修復に關与するのか、その恒常性に關与する細胞の存在や性状については、細胞マーカーやニッチ環境を含めて不明である。マウス海綿体における未分化(幹)細胞や、同細胞群の存在領域について、海綿体機能の解析系の開発を含め解析を行う。この様に海綿体発生の形成、洞様血管発生の解析を行い、海綿体組織の再建に向けて挑戦する。

## 3. 研究の方法

以下の項目に対する研究を相互に関連させながら、プロジェクトを進行する。

- (1) マウス海綿体由来の微小组織片(explant)を用いた新規培養系の開発。それらを用いた発生再生医学研究と海綿体障害時における未分化間葉細胞(幹細胞)の出現と特長の解析。それらの候補としてのCD133陽性細胞の性状の解析。
- (2) 勃起の収縮/弛緩制御を可能とする海綿体-内部構造(シヌソイド)の運動制御解析の為にin vitro 器官培養系の開発。

## 4. 研究成果

海綿体の勃起に関しては大動物のモデル系で主に生理学的実験しか遂行されず、本研究では、新規のin vitroの収縮/弛緩を解析する系を樹立した。In vitroにおいてマウス海綿体組織をexplantとして摘出して培養し、各種の因子群(収縮/弛緩の制御因子; Norepinephrine, NOドナー)を加え、海綿体組織応答の再現に成功した。(Biol of Reproduction 2021, RMB 2021)。さらにシヌソイドとexplantの関連した収縮/弛緩について京大医学研究科 平島講師(松田研)との二光子顕微鏡解析を開始した。この様なタイムラプス、二光子顕微鏡解析により、シヌソイドが勃起時に主に収縮/弛緩する事が判明しつつある(未発表)。この系により各種の状態におけるシヌソイドの収縮/弛緩の解析がライブでの内部観察として可能となる。従ってin vitroで反

復した海綿体組織の収縮/弛緩反応のサイクルの後、誘導される種々の障害応答も解明し、一部のストレス系遺伝子発現亢進を見出しつつある(未発表)。早期応答性ストレス系の遺伝子群として、酸化ストレスの遺伝子(Hif1, Hsp 等)や収縮/弛緩によるシェアストレスのマーカ―や転写因子群などについても検討する。

さらにこの新規の系を応用して老化マウスなどの海綿体組織変性に関連した遺伝子発現、Sox9, Notch 信号系の重要因子である RBPJ などの遺伝子発現も示されつつある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hyuga Taiju, Hashimoto Daiki, Matsumaru Daisuke, Kumegawa Shinji, Asamura Shinichi, Suzuki Kentaro, Katayama Kei-ichi, Nakamura Shigeru, Nakai Hideo, Yamada Gen	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of surgical procedures of mouse urethra by visualization and the formation of fistula	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75184-5	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, Kajimoto Mizuki, Ueda Yuko, Hyuga Taiju, Fujimoto Kota, Inoue Saaya, Suzuki Kentaro, Kataoka Tomoya, Kimura Kazunori, Yamada Gen	4. 巻 20
2. 論文標題 3D reconstruction and histopathological analyses on murine corporal body	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 199 ~ 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12369	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 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, Hirashima Tsuyoshi, Yamamura Hisao, Kataoka Tomoya, Fujimoto Kota, Hyuga Taiju, Yoshiaki Atsushi, Kimura Kazunori, Kuroki Shunsuke, Tachibana Makoto, Suzuki Kentaro, Yamamoto Nobuhiko, Morioka Shin, Sasaki Takehiko, Yamada Gen	4. 巻 104
2. 論文標題 Dynamic erectile responses of a novel penile organ model utilizing TPEN†	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 875 ~ 886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioab011	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 -
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 該当する

1. 著者名 Kajioka Daiki, Suzuki Kentaro, Matsushita Shoko, Hino Shinjiro, Sato Tetsuya, Takada Shuji, Isono Kyoichi, Takeo Toru, Kajimoto Mizuki, Nakagata Naomi, Nakao Mitsuyoshi, Suyama Mikita, DeFalco Tony, Miyagawa Shinichi, Yamada Gen	4. 巻 118
2. 論文標題 Sexual fate of murine external genitalia development: Conserved transcriptional competency for male-biased genes in both sexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e118 ~ e118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2024067118	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 Acebedo AR, Suzuki K, Hino S, Alcantara MC, Sato Y, Haga H, Matsumoto KI, Nakao M, Shimamura K, Takeo T, Nakagata N, Miyagawa S, Nishinakamura R, Adelstein RS9, Yamada G.	4. 巻 2
2. 論文標題 Mesenchymal actomyosin contractility is required for androgen-driven urethral masculinization in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0336-3.	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 Kajioka D, Suzuki K, Nakada S, Matsushita S, Miyagawa S, Takeo T, Nakagata N, Yamada G.	4. 巻 0
2. 論文標題 Bmp4 is an essential growth factor for the initiation of genital tubercle (GT) outgrowth.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Congenit Anom (Kyoto).	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12326.	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 Hyuga T, Suzuki K, Acebedo AR, Hashimoto D, Kajimoto M, Miyagawa S, Enmi J, Yoshioka Y and Yamada G	4. 巻 110
2. 論文標題 Regulatory roles of epithelial-mesenchymal interaction (EMI) during early and androgen dependent external genitalia development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Differentiation	6. 最初と最後の頁 20-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diff.2019.08.004.	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 Taiju Hyuga, Mellissa Alcantara, Daiki Kajioka, Ryuma Haraguchi, Kentaro Suzuki, Shinichi Miyagawa, Yoshiyuki Kojima, Yutaro Hayashi, and Gen Yamada	4. 巻 21(1)
2. 論文標題 Hedgehog signaling for urogenital organogenesis and prostate cancer: an implication for the epithelial-mesenchyme interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21010058.	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 Ogino Y, Tohyama S, Kohno S, Toyota K, Yamada G, Yatsu R, Kobayashi T, Tatarazako N, Sato T, Matsubara H, Lange A, Tyler CR, Katsu Y, Iguchi T, Miyagawa S.	4. 巻 184
2. 論文標題 Functional distinctions associated with the diversity of sex steroid hormone receptors ESR and AR.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Steroid Biochem Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 38-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2018.06.002.	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 Hashimoto D, Hyuga T, Acebedo AR, Alcantara MC, Suzuki K1 Yamada G.	4. 巻 0
2. 論文標題 Developmental mutant mouse models for external genitalia formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Congenit Anom (Kyoto).	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12319.	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 Matsushita S, Suzuki K, Murashima A, Kajioka D, Acebedo AR, Miyagawa S, Haraguchi R, Ogino Y, Yamada G.	4. 巻 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 Nat Rev Urol.	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山田 源
2. 発表標題 外生殖器の分子発生メカニズムの解明
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 源
2. 発表標題 Molecular mechanisms of external genitalia formation
3. 学会等名 米ハーバード大 Prof Sean lee Lab (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 源
2. 発表標題 遺伝子改変動物を用いた外生殖器の分子発生メカニズムの解明
3. 学会等名 第107回 日本泌尿器科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 源
2. 発表標題 "Molecular mechanism of reproductive oregon formation"
3. 学会等名 中国 Shang dong- Wakayama Medical Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 源
2. 発表標題 「マウスモデルを用いた生殖器官の発生メカニズムの解析；男性ホルモン依存性の発生制御機構」
3. 学会等名 第2回細胞内シグナル応答研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 源
2. 発表標題 「マウス外部生殖器官のアンドロゲンによる発生制御機構；新しい器官培養系によるアッセイ系について」
3. 学会等名 第42回関西生殖発生毒性フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 源
2. 発表標題 "Molecular mechanisms of ext. genitalia formation; An attractive model for Epi-mesenchymal interaction and androgen-driven organogenesis"
3. 学会等名 Biocenter Oulu, Laboratory of Developmental Biology, Oulu University, Finland (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 源
2. 発表標題 "The molecular mechanisms of genital development; Candidate signal to cytoskeletal components in male-type organogenesis"
3. 学会等名 Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Department of Developmental Genetics, WMU <a href="http://www.wakayama-med.ac.jp/english/undergraduate/medicine/160904/index.html">http://www.wakayama-med.ac.jp/english/undergraduate/medicine/160904/index.html</a> Gen Yamada, Research Gate <a href="https://www.researchgate.net/profile/Gen_Yamada">https://www.researchgate.net/profile/Gen_Yamada</a>
--

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

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
---------	---------