

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590178

研究課題名 (和文) 雌性外生殖器のリモデリングにおけるセマフォリンの新規作用機構の  
解明研究課題名 (英文) The novel mode of action of axon guidance molecules, semaphorins in  
tissue remodeling of mouse female genital organ

研究代表者

湯川 和典 (YUKAWA KAZUNORI)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：20301434

研究成果の概要：マウスは5週齢の性ホルモン分泌急増に伴い皮膚近傍の膣末端部上皮細胞の細胞死（アポトーシス）が誘導され、膣腔が皮膚に貫通（膣開口）する組織リモデリング現象を経て生殖器発達が完成する。私共の解析から、セマフォリン分子群に属するセマフォリン4D (Sema4D) の遺伝子欠損マウスでは、膣開口が起こらず膣閉鎖を発症し、5週齢マウス膣末端部におけるアポトーシス細胞の顕著な減少が明らかになった。2007～2008年度科学研究費研究計画実施の結果、Sema4Dのマウス膣上皮細胞に対するアポトーシス誘導作用が証明され、Sema4Dによるアポトーシス誘導にはPlexin-B1受容体が関与することが判った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：発生学・形態形成学・組織リモデリング・セマフォリン・アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

(1)セマフォリン(Semas)は、神経成長円錐の伸長方向を決める軸索ガイダンス分子として同定されてきた分子群であるが、免疫機能の遂行ならびに骨形成や血管新生など多彩な作用を発揮する。私共の解析から、セマフォリン分子群に属するセマフォリン4D(Sema4D)の欠損マウスでは、膣閉鎖が発生することが判明した。

(2)マウスは5週齢で性ホルモン分泌の急増する内部環境変化に伴い皮膚近傍の膣末端部上皮にアポトーシスが誘導される結果、膣

腔が皮膚に貫通し（膣開口）、生殖器発達が完成する (Rodriguez I et al. Dev Biol 184, 115-121, 1997)。しかし性ホルモン作用からアポトーシスに至るメカニズムの詳細については不明のままであり Sema4D が何らかの関与をしている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

(1)マウスの膣開口という生後の組織リモデリング現象においてセマフォリンの Sema4D が性ホルモン作用のメディエーターとして生理機能を発揮することを証明するために、

Sema4D のマウス膣上皮細胞へのアポトーシス誘導作用を証明する。

(2) Sema4D のアポトーシス誘導作用に関与する受容体を同定する。さらに受容体からアポトーシスにいたる細胞内シグナル伝達経路の解明を目的とする。

(3) エストロジェン分泌増加に一致し Sema4D のシグナルが ON となりアポトーシスから膣開口に至るカスケードの詳細を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) Sema4D 欠損マウスの作製：ES 細胞を用いる相同組換え法によりキメラ・マウスを得て野生型 Balb/c マウスと 10 代以上の戻し交配を行いヘテロ・マウス間の交配により野生型と Sema4D 欠損マウスを得た。

(2) RNA 発現解析：マウス子宮、膣、卵巣より RNA を抽出し RT-PCR 法にて Sema4D mRNA の発現を解析した。次に P<sup>32</sup> 標識アンチセンス・オリゴヌクレオチドをプローブとして in situ hybridization を行った。

(3) ウェスタン・ブロット解析：野生型と Sema4D 欠損マウスの脳、膣（2週、3週、4週、5週、7週、8週、9週齢）、子宮、卵巣よりタンパク抽出し抗 Sema4D 抗体（ベクtonディキンソン社）と抗 Plexin-B1 抗体（H300, サンタクルズ社）にてウェスタン解析を行った。

(4) 免疫組織化学：5週齢マウス膣の凍結組織切片を作製し抗 Sema4D 抗体（ベクtonディキンソン社）と抗 Plexin-B1 抗体（H300, サンタクルズ社）にて免疫組織化学を行い Sema4D と Plexin-B1 の局在を解析した。

(5) アポトーシス・アッセイ（TUNEL）：5週齢マウス膣の凍結組織切片において terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 反応にて 3' OH DNA 末端に digoxigenin 標識ヌクレオチドを付加し peroxidase 標識抗 digoxigenin 抗体との反応により DNA 断片化を可視化、検出する。培養膣上皮細胞については TdT 反応にて 3' OH DNA 末端に FITC 標識オリゴヌクレオチドを付加し DNA 断片化を蛍光顕微鏡にて可視化、検出する。

(6) マウス膣上皮細胞培養：井口らの方法に従い (Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 80, 3743-3747, 1983)、4週齢マウス膣組織をコラゲナーゼ処理し膣上皮細胞シートを得る。ハサミで細切しトリプシン処理とピペッティングの後、遠心にて細胞を集めコラーゲン・コート dish 内で細胞培養を行う。Cell harvest の後、カバースリップ上に細胞を播種し組換え Sema4D タンパクを添加しアポトーシス誘導を行った。

(7) Plexin-B1 特異的 siRNA 発現レンチウイルスベクターは sigma 社委託にて作製した。また Plexin-B1、Plexin-B2、Plexin-B3 に対す

る各 siRNA は invitrogen 社にて作製した。siRNA 発現レンチウイルスベクターあるいは siRNA を膣上皮細胞に導入しターゲット遺伝子のノックダウンを行った。

### 4. 研究成果

(1) Sema4D 欠損マウスは膣閉鎖を発症する：10週齢を超える雌の Sema4D 欠損マウスの下腹部は腫脹し陰嚢様概観を呈した。視診では皮膚に膣口が無く膣閉鎖であることが判った。解剖により子宮が大きく膨張し内部に多量の血液性液体を含むことが判った。膣閉鎖発症の頻度は、野生型 (0%, n=80) と比較し Sema4D 欠損マウス (59.5%, n=279) において有意に高いことが判明した。そのため Sema4D 欠損マウスは Balb/c の遺伝的背景において膣閉鎖を高率に発症することが明らかとなった。

(2) マウス膣上皮内の Sema4D mRNA の発現：Sema4D mRNA のマウス膣内の発現を解析するために膣 RNA を用いて RT-PCR を行った。その結果、Sema4D 欠損マウス膣 RNA から増幅の起こらない条件下で野生型マウス膣において Sema4D mRNA が検出された。アンチセンス・オリゴヌクレオチドをプローブとした in situ hybridization 解析では Sema4D mRNA は野生型膣で検出され Sema4D 欠損マウス膣では検出されなかった。さらにエマルジョン・オートラジオグラフィの結果、Sema4D mRNA の膣上皮内局在が明らかになった。

(3) Sema4D と Plexin-B1 のマウス膣上皮内局在：マウス膣内の Sema4D タンパクの存在を確認するため、野生型マウス膣と Sema4D 欠損マウス膣からのタンパク抽出物を用いてウェスタン・ブロット解析を行った結果、Sema4D 欠損マウス膣に Sema4D は検出されず野生型マウスの膣において Sema4D タンパクが検出された。Sema4D 受容体のひとつとして知られる Plexin-B1 に対する抗体を用いたウェスタン・ブロット解析では、野生型膣と Sema4D 欠損マウス膣の両方で Plexin-B1 を検出した。マウス膣内の Sema4D と Plexin-B1 の局在を知るために、野生型膣と Sema4D 欠損マウス膣組織について免疫組織化学を行った。抗 Sema4D 抗体にて Sema4D 欠損マウス膣で陰性となり、野生型膣の基底上層に陽性シグナルを検出した。抗 Plexin-B1 抗体は野生型と Sema4D 欠損マウス両者の膣上皮全層にわたり陽性シグナルを示した。

(4) 組織リモデリングにおける Plexin-B1 受容体の再構成：膣組織のリモデリング過程において Sema4D と Plexin-B1 が何らかの変化を示すかどうかを確かめるために、各発達段階にある子宮、膣、卵巣から組織抽出物を得てウェスタン・ブロット解析を行った。Sema4D は 4-8 週齢の膣で検出されたが膣組織のリモデリング過程で大きな変化は認

めなかった。抗 Plexin-B1 抗体は陽性コントロールのマウス脳において前駆体と protease 切断の結果、小さくなった活性型の両型を検出した。興味深いことにマウス膣開口の直前から直後の間に一致する 4-6 週齢のマウス膣では活性型の Plexin-B1 のみが検出された。8 週齢の膣では、活性型が消失し前駆体が出現した。組織リモデリングを起こさない 4-8 週齢の子宮と卵巣では Plexin-B1 の前駆体のみが検出された。したがって組織リモデリングの起こる 4-6 週齢の膣では Plexin-B1 は活性型として存在し 8 週齢になると前駆体に戻ることが判明した。このように Sema4D の膣上皮における恒常的発現とマウスの膣開口時期に一致した Plexin-B1 受容体のシグナル増強型への変換は、エストロゲン分泌に応答し Plexin-B1 受容体を切断することにより Plexin-B1 受容体のシグナル増強型への変換から Sema4D のアポトーシス誘導作用を ON にする proprotein convertase の存在を示唆している。そのためエストロゲン急増によって誘導される膣開口という組織リモデリング機構とその鍵となる未知分子の実体を明らかにするためのシステムを構築できた意義は大きい。したがって、本実験結果は性ホルモン変化依存性組織リモデリング現象におけるセマフォリン分子群の作用という新たな研究分野の開拓に発展する可能性を見いだした。

(5) Sema4D 欠損膣上皮におけるアポトーシス細胞の減少：5 週齢の野生型と Sema4D 欠損マウスの膣上皮におけるアポトーシスの程度を比較・解析するために *in situ* でアポトーシスを検出する TUNEL 法を行った。野生型マウスの膣上皮ではアポトーシス細胞が検出されたが Sema4D 欠損マウスの膣上皮ではアポトーシス細胞はほとんど検出できなかった。統計解析により野生型と比較し Sema4D 欠損マウス膣上皮におけるアポトーシス細胞の有意な減少が明らかになった。そのため今まで不明のことが多かった性ホルモン分泌急増から膣末端部上皮細胞のアポトーシスを経て膣開口にいたるまでの過程に軸索ガイダンス分子の Sema4D が関与する事実を示したインパクトは大きく、この分野での注目が期待される。

(6) Sema4D は Sema4D 欠損マウス由来膣上皮細胞にアポトーシスを誘導する：Sema4D がマウス膣上皮細胞にアポトーシスを誘導するかどうかを直接的に検討するため、Sema4D 欠損マウス由来の初代培養膣上皮細胞にレコンビナント Sema4D タンパクを添加しアポトーシスが誘導されるかどうか解析した。その結果、Sema4D は TUNEL 陽性膣上皮細胞の有意な増加を誘導することが判明した。活性型 caspase 3 に対する抗体を用いる免疫組織化

学にて Sema4D 無しの培養と比較し Sema4D 添加の培養では活性型 caspase 3 陽性の膣上皮細胞が有意に増加することが示された。したがって Sema4D は培養下の Sema4D 欠損膣上皮細胞のアポトーシスを実際に誘導できることが明らかとなった。このように軸索ガイダンス分子である Sema4D が膣上皮細胞に直接働きかけてアポトーシスを誘導するという軸索ガイダンス作用以外の作用を証明したことはインパクトがあり高い評価が期待される。

(7) Sema4D で誘導される膣上皮細胞のアポトーシスは Plexin-B1 受容体を介して起こる：培養膣上皮細胞の Sema4D で誘導されるアポトーシスに Plexin-B1 受容体が関与するかどうかを検討するために、Plexin-B1 をノックダウンするための shRNA を有するレンチウイルスを培養下の Sema4D 欠損膣上皮細胞に接種し 2 日後に Sema4D を添加しアポトーシス誘導を行った。その結果、コントロールのレンチウイルス接種の培養と比較し Plexin-B1 のノックダウンされた膣上皮細胞では有意に TUNEL 陽性細胞が減少することが判明した。したがってマウス膣上皮細胞における Plexin-B1 受容体のノックダウンは Sema4D で誘導されるアポトーシスを抑制することが判り、膣上皮細胞のアポトーシスを完遂するために Sema4D は Plexin-B1 に結合し Plexin-B1 を介した細胞内情報伝達機構を用いることが示唆された。アポトーシスをとともなう膣の形態形成に作用する Sema4D の役割は、軸索ガイダンスの概念からは予想外のことであり、その作用メカニズムを探る研究は独創性を有する。軸索ガイダンスにおいては Plexin-B1 に Sema4D が結合すると Plexin-B1 の GTPase activating protein (R-Ras GAP) 活性が促進し R-Ras 機能低下からインテグリン活性が抑制される結果、成長円錐と細胞外マトリックスとの接着が弱まり軸索の反発作用が誘導される。Plexin-B1 の活性化に続く R-Ras 機能低下がアポトーシス誘導にも必要かという問いかけは、アポトーシス・シグナル経路への分岐点を探るための最重要課題であるが、予備的データでは R-Ras 機能低下はアポトーシス誘導に必須ではなく、Rho キナーゼの活性化が必要なことが示唆されている。そのため、同じ受容体でありながらアポトーシス誘導に特化したシグナル伝達経路の存在の可能性が高く、このアポトーシス誘導システムの詳細を解明する意義は大きくシグナル伝達研究の発展に大きく貢献することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

- ① Yukawa K, Tanaka T, Takeuchi N, Iso H, Li L, Kohsaka A, Waki H, Miyajima M, Maeda M, Kikutani H, Kumanogoh A: Sema4D/CD100 deficiency leads to superior performance in mouse motor behavior. *Can J Neurol Sci*, 36:349-355, 2009 査読有
- ② Li L, Tanaka T, Yukawa K, Akira S, Umesaki N: Irinotecan-induced ovarian follicular apoptosis is attenuated by deleting the kinase domain of death-associated protein kinase. *Int J Oncol*, 34:905-914, 2009 査読有
- ③ Yamazaki T, Waki H, Kohsaka A, Nakamura T, Cui H, Yukawa K, Maeda M: Microinjection of urocortin into the rat nucleus tractus solitarii decreases arterial blood pressure. *Auton Neurosci*, 142(1-2):51-4, 2008 査読有
- ④ Cui H, Kohsaka A, Waki H, Gouraud S, Nakamura T, Yukawa K, Hatada A, Bhuiyan ME, Maeda M: Adrenomedullin 2 microinjection into the nucleus tractus solitarius elevates arterial pressure and heart rate in rats. *Auton Neurosci*, 142(1-2):45-50, 2008 査読有
- ⑤ Tanaka T, Toujima S, Utsunomiya T, Yukawa K, Umesaki N: Experimental characterization of recurrent ovarian immature teratoma cells after optimal surgery. *Oncol Rep* 20(1):13-23, 2008 査読有
- ⑥ Yukawa K, Tanaka T, Takeuchi N, Waki H, Kohsaka A, Maeda M: Controlling death-associated protein kinase activity to protect kidney cell suicide in renal ischemia-reperfusion injury. Review paper. *Jpn J Clin Physiol*, 38(6):243-250, 2008 査読無
- ⑦ Maeda M, Waki H, Kohsaka A, Yukawa K, Nakamura T: The sympathoexcitatory pathway from the CVL to the RVL for controlling brain vessels. Review article. *Tzu Chi Medical J*, 20(4):243-7, 2008 査読無
- ⑧ Tanaka T, Yukawa K, Umesaki N: Radiation reduces carboplatin sensitivity and enhances nedaplatin sensitivity in cervical squamous cell carcinoma *in vitro*. *European Journal of Gynaecological Oncology* XXVIII, n. 5: 352-355, 2007 査読有

- ⑨ Tanaka T, Yukawa K, Umesaki N: Radiation reduces bleomycin sensitivity in cervical squamous cancer cells *in vitro*. *European Journal of Gynaecological Oncology* XXVIII, n. 4: 273-277, 2007 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 竹内典子、石神志浦、今村知紗、林 理紀、本多祐美、長井紀章、伊藤吉將、亀井 鑠、湯川和典：遺伝性白内障ラット (UPL) の白内障発症に伴うクリスタリン変化  
第81回日本生化学会大会 (神戸) 平成20年12月12日
- ② Li L, Yukawa K, Bai T, Tanaka T, Waki H, Kohsaka A, Ueyama T, Kumanogoh A, Kikutani H, Maeda M: Novel mode of action for axon guidance molecules, semaphorins in tissue remodeling of mouse genital organ  
第85回日本生理学会総会 (東京) 平成20年3月25日

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 湯川和典、向阪 彰、前田正信 (訳)、『第26章 視床と大脳皮質』『Essential Neuroscience』前田正信 監訳 (丸善発行)、p465~495, 2008 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯川 和典 (YUKAWA KAZUNORI)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号: 20301434

(2) 研究分担者

竹内 典子 (TAKEUCHI NORIKO)

名城大学・薬学部・助手

研究者番号: 80076728

(3) 連携研究者

田中 哲二 (TANAKA TETSUJI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 80275255

上山 敬司 (UEYAMA TAKASHI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50264875