

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790153

研究課題名（和文）外生殖器（陰囊、陰唇、前庭部）形成メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis for Developmental Mechanisms of External Genitalia

研究代表者

宮川 信一（MIYAGAWA SHINICHI）

熊本大学・発生医学研究センター・COE リサーチアソシエイト

研究者番号：30404354

研究成果の概要：外生殖器形成メカニズムについて様々な遺伝子改変マウスを用いて解析を行った。その結果、マウス外生殖器形成過程において、ヘッジホッグや Wnt シグナルを中心とした細胞増殖因子群の寄与が極めて大切であることを明らかにした。

外生殖器形成過程における上皮、間葉の作用を調べるために、それぞれの組織で Cre 組み換え酵素を発現するマウスについて検討を行った。その結果、Shh-CreER マウスは内胚葉性上皮細胞、Gli1-CreER マウスは間葉で特異的な Cre 活性を示すことがわかった。これらのマウスが発現する Cre 組み換え酵素はタモキシフェン誘導型であるため、組織特異的な制御に加え、時期特異的な制御も可能となり、外生殖器形成過程を解析する上で有効である。これらのマウスの Cre 活性を利用して間葉特異的な beta-catenin の loss-of-function 実験を行ったところ、雄の外生殖器の包皮形成が阻害された。一方、beta-catenin の gain-of-function 実験では雌の外生殖器の包皮が厚くなり、雄の包皮に近い形態となった。したがって、間葉における beta-catenin を介する Wnt シグナルが外生殖器の雌雄それぞれの形態形成に極めて大切であるという結果が得られた。また、ヘッジホッグシグナルのエフェクターの一つである Gli2 遺伝子のノックアウトマウスは尿道下裂様の表現型を示し、さらに雌よりも雄の方がその表現型が重篤であった。したがって Gli2 を介した、ヘッジホッグシグナルの正の制御が、外生殖器・会陰部形成に必要であることが明らかとなった。このように本研究では、ヘッジホッグ及び Wnt シグナルが外生殖器の性的二型に関与することを初めて示した。尿道下裂をはじめとする外生殖器・会陰部の発生異常はヒトでも多いことが知られており、本研究で得られた結果は、そのようなヒト先天性疾患の発生メカニズム解析に大きく寄与するものと考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：外生殖器、尿道下裂、性分化、ヘッジホッグ、Wnt、細胞系譜

1. 研究開始当初の背景

外生殖器の発生生物学的由来は、ヒトで形態観察に基づいた推察から、総排泄腔領域に発生する生殖結節、総排泄腔ヒダ、陰唇陰囊ヒダから派生すると考えられている。また外生殖器の形態は明確な男女差があり、アンドロゲンの有無によって生殖隆起は陰茎亀頭(男)又は陰核(女)となり、総排泄腔ヒダは尿道陰茎部(男)又は小陰唇(女)、陰唇陰囊ヒダは陰囊(男)又は大陰唇(女)となる。さらに男性では尿道が陰茎に取り囲まれるのに対し、女性では囲まれずに腔前庭を形成する。現在のところ、このダイナミックな形態形成における分子生物学的な基盤は全くわかっていない。これは現在発生生物学的研究のモデル動物として多くの局面で解析されているマウスにおいて、外生殖器形成に関する記述が非常に少ないことにも起因する。マウスの外生殖器形成は本質的にヒトと相同であると考えられるが、陰茎/陰核、陰囊/陰唇を含む外生殖器の形態ですら未だ全く定義されておらず、このことは外生殖器系システム全体の構築への発生生物学的理解が全くされていないことを意味する。

2. 研究の目的

外生殖器の由来は総排泄腔を中心とした領域であり、そこから陰茎/陰唇、陰囊/陰唇、さらには会陰、肛門直腸を含むあらゆる組織が派生すると考えられる。その外生殖器分化は非常に複雑な形成過程であり、多くのシグナル因子が作用しているものと考えられるが、これまで報告されたノックアウトマウス解析等の文献から推察すると、ソニックヘッジホッグ(Shh)やbeta-cateninなどが最も大切なシグナル因子のひとつであると考えられる。そこでヘッジホッグシグナルやWntシグナルを念頭に置いて、それらのシグナルの外生殖器形成に対する寄与を明らかにすることで、外生殖器の分子発生的な基盤を明らかにする。特に本研究ではほとんど研究が行われていない後期の性的二型形成、すなわち外生殖器の性分化過程について、その詳細なメカニズムを明らかにする。これは下記に示す尿道下裂などの先天性疾患の原因の一部が、外生殖器の雄性化不全で説明されているためでもある。

泌尿生殖器系の先天性疾患はその頻度が非常に高い。その中でも外生殖器の形成異常の占める割合は高く、尿道下裂や、総排泄腔の分離不全は多く報告されている。また外生殖器はホルモンの標的器官の一つであり、内分泌攪乱物質などの環境因子によって、近年尿道下裂を含む外生殖器形成異常の発生頻度は増加傾向が顕著である。本研究は、外生殖器形成における増殖因子群シグナルカスケード解析により、ヘッジホッグシグナルや

Wntシグナルの新たな普遍的な作用メカニズムを提案するとともに、生殖器系に係わる診断技術や治療などの医療行為を実践するための基本的知識を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の特色は、マウス外生殖器形成メカニズムについて様々な遺伝子改変マウスを用いた解析を行う点である。そのためには、外生殖器の上皮や間葉など、組織特異的なCre活性を有するマウスが不可欠である。そこでShh-CreER、Gli1-CreERマウス(それぞれShhまたはGli1遺伝子座にタモキシフェン誘導型Cre組み換え酵素をノックインしたマウス)について、Rosa26レポーターマウス(Creが作用すると永続的にbeta-galactosidaseを発現する)により、タモキシフェン投与時にShhまたはGli1を発現している細胞を遺伝的に標識するシステムを用いた。これにより、LacZ染色によって容易に、タモキシフェン投与時にShhを発現していた細胞(Shh-CreER)またはShhのシグナルを受けていた細胞(Gli1-CreER)が将来どの領域に寄与するか、検出ができるため、Cre酵素の活性を調べるのみならず、複雑な外生殖器の細胞系譜地図を作製することができる。

また、外生殖器形成過程におけるヘッジホッグシグナルやWntシグナルの寄与を調べるために、様々な遺伝子改変マウス(ヘッジホッグシグナルやWntシグナルに対するgain-of-function型やloss-of-function型遺伝子改変マウス)の解析を行った。さらに外生殖器の性的二型形成に必要なアンドロゲンシグナルと、増殖因子群との相互作用を調べるために、アンドロゲン受容体コンドショナル遺伝子改変マウスも解析に供した。これらのマウスにおいて、遺伝子発現解析(免疫組織染色、in situ hybridizationや定量的RT-PCR)等の手法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1)細胞系譜解析

Shh-CreER、Gli1-CreERマウスを用い、初期にShhを発現する細胞と、Shhシグナルを受けた細胞(すなわちGli1を発現する細胞)など、特定の細胞集団を時期特異的に、遺伝的に標識することで細胞系譜地図を作製し、外生殖器がいかなる発生段階を経て形成されていくか、細胞系譜解析を行った。Shhは外生殖器の内胚葉性上皮に発現することが知られているが、本研究では内胚葉性上皮が将来の尿道・膀胱・直腸領域のみならず、会陰部の表皮にも寄与することを見出した内胚葉由来の組織が表皮の一部に寄与するこ

とはこれまで知られていなかったことである。また初期の Gli1 発現細胞は主に総排泄腔周辺間葉に全体的に発現するが、それらの細胞が将来外生殖器腹側(下側)の領域(主に尿道板両側間葉)に多く分布した。また Gli1 発現細胞は一部外胚葉性上皮にも寄与することがわかった。胎児付属肢器官において、ヘッジホッグシグナルが外胚葉性上皮に作用する点は四肢では一部報告されているが、外生殖器での発見はこれが初めての知見である。尿道下裂をはじめとする外生殖器・会陰部の発生異常はヒトでも多いことが知られている。本研究で得られた結果は、そのようなヒト先天性疾患の発生メカニズムを考えるうえで、その障害の原因が遡ってどの部位にあるのかを知るために、極めて大切な知見となると考えられる。



図1 ShhCreER; R26R マウスの LacZ 染色の結果。尿道板上皮及び陰部の表皮部において青い LacZ シグナルが見られる。

(2) 雄性化に対する AR の寄与

多くの器官形成は上皮-間葉相互作用を介して発生が進むことが知られている。特にアンドロゲン受容体(AR)を含むステロイドホルモン受容体を介する上皮-間葉相互作用は多くの泌尿生殖器の細胞増殖や細胞死などに関与する。上記の Shh-CreER (尿道上皮)、Gli1-CreER (間葉)マウスは細胞系譜解析だけでなく、コンドショナル遺伝子改変マウス解析にも有用である。そこでこれらの Cre 発現マウスを AR-floxed マウスとかけ合わせ、組織特異的 AR コンドショナル AR ノックアウトマウス解析を行った。その結果、間葉特異的 AR ノックアウトマウスの雄は完全な雌型の外生殖器を示す一方、上皮特異的 AR ノックアウトマウスは雌雄形成対する表現型異常は示さないことがわかった。したがって外生殖器の雄性化には間葉の AR を介したアンドロゲンシグナルがその形態形成に必要であることが明らかとなった。



図2 コンドショナル AR ノックアウトマウスの解析。左から野生型雄、野生型雌、ミュータント雄の外生殖器(胎生 18.5 日胚)。矢印は外生殖器の大きさを、点線の囲みは尿道の取り込みが不完全であるため、野生型雌と

ミュータント雄では正中上にスリットが見えることを示している。ミュータント雄の外生殖器の外観は雌型と極めて類似している。

(3) 雌雄外生殖器の遺伝子発現解析

これまで雌雄外生殖器の性分化に対して形態学的な解析はいくつか報告されていたが、遺伝子発現の相違を検討した研究は行われていない。そこで DNA マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現の面から解析を行った。その一部を上げると、雄では Fkbp51、Cyp11b1、Mafb の発現が高く、雌では Dkk2 などの Wnt インヒビターが高いことが明らかとなった。これらの知見は今後外生殖器の性分化過程を分子生物学的に記述するための基盤となると考えられる。

(3) Wnt 系(beta-catenin)遺伝子改変マウスの解析

上記のように雌では Dkk2 などの Wnt インヒビターの発現が雄よりも高いことが明らかとなった。したがって雄では Wnt シグナルが雌よりも強いことが予想された。そこで Wnt シグナルのインジケーターマウスである BatGAL マウスや beta-catenin の免疫組織染色を行い、雄では間葉の Wnt 活性化が雌よりも亢進していることを確かめた。

さらに beta-catenin の loss-of-function 型、gain-of-function 型の遺伝子改変マウスを行った。雌雄差の顕著な間葉を標的とするため、Gli1-CreER マウスを利用した。雄の beta-catenin の loss-of-function 型マウスでは包皮の形態は雌型を呈した。一方、雌の beta-catenin の gain-of-function 型マウスでは包皮の発達が顕著であった。さらにこのマウスを生後 5 週齢で観察したところ、ミュータント雌の外生殖器は野生型雄の外生殖器よりも大きく発達していた。包皮の発達は雄型の外生殖器形成に不可欠であり、雌外生殖器の一部雄性化といえる。これらの結果は、外生殖器雄性化過程においてアンドロゲンシグナルの下流に Wnt シグナルが位置すること、さらには Wnt シグナルが実際の性的二型を形成するために必要なエフェクターシグナルであることを示している。

これまで外生殖器の雄性化因子はアンドロゲンシグナル以外知られておらず、したがってアンドロゲンのようなホルモン性に雄性化因子を制御する因子のほか、ローカルな局所的な雄性化因子は全く分かっていなかった。また外生殖器の雄性化過程にアンドロゲンが十分か、必要か、それすらも記述されていなかった。本研究では Wnt シグナルを一部修飾することにより、Wnt が局所的な雄性化因子であり、さらにアンドロゲンは雄性化に十分でないことを世界で初めて明らかにした点で高いインパクトを持つ研究である

といえる。

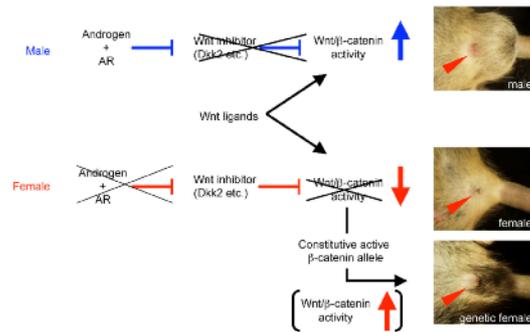


図3 外生殖器性的二型形成過程における Wnt シグナルについて予想されるシグナル経路を图示した。写真は生後5週齢の外生殖器(矢頭)である。

(4)ヘッジホッグ系遺伝子改変マウスの解析
ヘッジホッグシグナルは、初期の外生殖器形成に大切なシグナルであり、実際 Shh ノックアウトマウスは外生殖器が全く形成されない。ヘッジホッグシグナルは初期の外生殖器形成時には(後期において雄性化に關与する)間葉に作用することが知られているが、Shh ノックアウトマウスの重篤な表現型ゆえに、外生殖器形成後期(すなわち性的二型形成過程)におけるヘッジホッグシグナルの寄与は全く調べられていない。ヘッジホッグシグナルのエフェクターの一つである Gli2 遺伝子のノックアウトマウスは尿道下裂様の表現型を示し、さらに雌よりも雄の方がその表現型が重篤であった。しかし他の Gli 遺伝子、Gli1、Gli3 のノックアウトマウスは、外観からは外生殖器・会陰部の異常は顕著ではなかった。したがって Gli2 を介した、ヘッジホッグシグナルの正の制御が、外生殖器・会陰部形成に必要であり、雄性化にも關与することが明らかとなった。

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3件)
Miyagawa S, Satoh Y, Haraguchi R, Suzuki K, Iguchi T, Taketo MM, Nakagata N, Matsumoto T, Takeyama K, Kato S, Yamada G. Genetic Integrations of the Androgen and Wnt/b-catenin Pathways for the Masculinization of External Genitalia. *Molecular Endocrinology* 印刷中、査読有

Nishida H, Miyagawa S, Matsumaru D, Wada Y, Satoh Y, Ogino Y, Fukuda S, Iguchi T, Yamada G. Gene expression analyses on embryonic external genitalia:

identification of regulatory genes possibly involved in masculinization processes. *Congenital Anomaly (Kyoto)*. 48 巻、63-67ページ、2008年、査読有

Nishida H, Miyagawa S, Vieux-Rochas M, Morini M, Ogino Y, Suzuki K, Nakagata N, Choi HS, Levi G, Yamada G. Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression through the interaction between Dlx and GATA-4 for testicular steroidogenesis. *Endocrinology* 149巻、2090-2097ページ、2008年、査読有

[学会発表](計4件)
Miyagawa S, Identification of Genetic Cascade for External Genital Development. キーストンシンポジウム、2009年2月2日、サンタフェ(アメリカ ニューメキシコ州)

宮川信一, Identification of Genetic Cascade for Genital Primordium Formation. 第31回日本分子生物学会年会、2008年12月10日、神戸

Miyagawa S, Integration of Androgen and Growth Factor Signaling on Masculinization Processes of External Genitalia キーストンシンポジウム、2008年3月26日、スティムポートスプリングス(アメリカ コロラド州)

宮川信一, Contribution of hedgehog-responsive cells in testis. 第40回発生生物学会、2007年5月28日、福岡

6. 研究組織
(1)研究代表者
宮川 信一 (MIYAGAWA SHINICHI)
熊本大学・発生医学研究センター・COE リサーチ・アソシエイト
研究者番号：30404354

(2)研究分担者
()
研究者番号：

(3)連携研究者
()
研究者番号：