

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590175

研究課題名（和文） 生殖系細胞・器官で発現するユニークな機能分子の発生形態学的研究

研究課題名（英文） Developmental and morphological study on unique molecules expressed in the reproductive cells and organs.

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・教授

研究者番号：50136719

研究成果の概要（和文）：生殖系細胞・器官の形成・分化メカニズムを解明する目的で、胎生期～幼若期～成熟期マウスの生殖器における遺伝子及び分子の発現様式を解析した。その結果、レクチン結合パターンが精巣上皮の分化時期、領域あるいは細胞種で異なることを明らかにし、糖鎖構造の違いが精巣上皮の機能分化を生み出す可能性を示した。また、ある増殖因子系の遺伝子やいくつかの転写因子群の発現が雌雄で異なることを明らかにし、これらが外生殖器の形態形成で機能している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanism of morphogenesis and differentiation of reproductive organs, we examined the expression of the genes and molecules on the reproductive tissues during fetal and postnatal development of mice. The results indicate that differences in lectin-binding patterns among regions or cell types of the epididymal epithelium may be related to functional differentiation of the epididymis, and also indicate that differences in gene expressions of several growth factors and transcription factors between male and female fetuses may be related to functional formation of the external genitalia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生殖医学生物学

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：細胞・組織、発生・分化、生殖器

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞と生殖器は種族を維持し、新しい個体を生み出すための重要な細胞と器官である。生殖器はまた、不妊症や前立腺がん、先天異常など疾患の起こりやすい場所として

医学的に大きな関心が持たれている。一方、生殖器のなかでも外生殖器は、雌雄の形態の違いが顕著に見られるユニークな器官である。こうした医学生物学的特徴をもつ生殖系細胞・器官の形成・分化のプロセスが時間的、

空間的に厳密性を保ちながら進行するためには、生殖細胞自身の遺伝子発現や周囲細胞との相互作用あるいは近接未分化間葉細胞同士のコミュニケーションが重要と考えられる。

このような観点から、我々は過去に、受容体チロシンキナーゼ c-Kit 及びそのリガンドが精子形成細胞の増殖・分化に必須の分子であることを個体レベルで初めて明らかにした。さらに最近、我々は細胞同士の情報交換の場としてクローズアップされている糖鎖と結合するレクチンが精子形成細胞や生殖器で特異的に発現することを見いだした。一方、本研究分担者の鈴木らは近年、胎仔外生殖器で発現する細胞増殖因子とその受容体の協調が外生殖器形成に重要であることを発見した。しかし、生殖系細胞・器官の形成・分化を担う分子機構の全容は現在まで明らかにされていない。

本研究では生殖医学生物学観点から、生殖系細胞・器官の形成・分化メカニズムを探る目的で、そこで発現するユニークな分子／遺伝子に着目して研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記した我々の研究成果をさらに発展させ、生殖系細胞・器官の形成・分化過程で発現する糖鎖、細胞表面受容体、細胞増殖因子系遺伝子、転写因子群等に着目し、最新の発生形態学的研究テクニックを用いて細胞組織～個体レベルで解析する目的を持つ。そのために、「生殖系細胞・器官の形成・分化における機能分子の生理的役割解明」を目指して、上記したユニークな分子／遺伝子のマウス胎生期～生後発育期～成熟期における発現・局在動態解析と遺伝子改変マウスを用いた機能解析を行うことで、以下の事柄を生殖医学生物学観点から解明する。

(1) 精巣上皮が精子の機能的成熟に重要な役割を演じていることは分かっている。しかし、その分子メカニズムに関してはほとんど分かっていない。そこで、

①目的とする分子が胎生期～幼若期～成熟期マウスにおける生殖系細胞・器官形成過程のいつ、どこで、どのように発現・局在するのか、それらの細胞組織内動態を遺伝子・タンパク質レベルで明らかにする。

②標的分子が細胞表面受容体の場合、受容体を認識する特異抗体の生体内局所投与によ

る機能阻害実験を行い、標的分子が実際の生体内で機能を発揮する場所と時期を明らかにする。

(2) 外生殖器における雌雄の形態的相違を生み出すには、男性ホルモンであるアンドロゲンの作用が必須であることは分かっている。しかし、その下流でどのような因子が機能しているのかは全く分かっていない。そこで、

①目的とする因子が胎生期～幼若期～成熟期マウスにおける生殖系細胞・器官形成過程のいつ、どこで、どのように発現・局在するのか、それらの細胞組織内動態を遺伝子・タンパク質レベルで明らかにする。

②各種ノックアウトマウスやコンディショナルノックアウトマウスにおける生殖系細胞・器官形成過程の、いつ、どこで、どのような異常が起こるのかを光顕および電顕レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 幼若～成熟期マウスの精巣上皮分化における糖鎖発現

精巣上皮管上皮で発現する糖鎖構造を同定するため、幼若期～成熟期マウスの精巣上皮の灌流固定・パラフィン包埋試料を用いてレクチン組織化学法で検索した。陽性反応を示したレクチンの糖結合特異性を検証する対照実験として、至適濃度に希釈調整した標識レクチンに糖結合特異性に応じて単糖を添加して染色を行った。次に、レクチン組織化学とマーカー抗体とを組み合わせた蛍光多重染色を施し、レクチン陽性反応を示した上皮細胞種を同定した。

(2) 胎生期マウスの外生殖器形成における遺伝子発現

雌雄で発現が異なる遺伝子を同定するため、マウス胎仔の外生殖器原基を用いてマイクロアレイで検索した。次に、外生殖器形成に重要な機能があると考えられる増殖因子や転写因子群の発現について、その発現に雌雄差がないか調べた。マイクロアレイにより同定された雌雄で発現が異なるいくつかの因子について、その発現様式を *in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫組織化学法を用いて詳しく調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 幼若～成熟期マウスの精巣上体分化における糖鎖発現

レクチン組織化学と免疫組織化学を組み合わせた新しい形態学的手法を駆使して解析した結果、精巣上体管上皮の細胞化学的特性と精巣上体の機能分化とを明らかにすることができた。

①精巣上体の分化時期、領域あるいは精巣上体管上皮は細胞種で異なるレクチン結合パターンを示した。この結果、糖鎖構造の違いが精巣上体の機能を生み出す可能性が示唆された。

②幼若期マウスの精巣上体管上皮におけるレクチン反応性は、生後 3～4週頃に成熟期と同様なパターンを示した。この結果、精巣上体の機能分化は、精子が精巣上体に到達する以前に完了していることが示された。

③UEA-I、MAL-I、BS-Iレクチンはそれぞれ、主細胞、明細胞、基底細胞に特異的に結合することを明らかにした。このことから、これらレクチン及び各レクチンが認識する糖鎖構造は、精巣上体管上皮細胞の分化マーカーとして細胞動態や機能分化に関する基礎研究や男性不妊症の診断等に活用できる可能性が示された。

##### (2) 胎生期マウスの外生殖器形成における遺伝子発現

マイクロアレーや *in situ* ハイブリダイゼーション法を駆使して解析した結果、胎生期の外生殖器における遺伝子発現が雌雄で異なることを明らかにすることができた。

①ある増殖因子のアンタゴニストの発現が雌で高いことが分かった。このことから、この増殖因子シグナルの活性化のバランスが外生殖器形成の雌雄差を生み出す可能性が示唆された。

②ある増殖因子系の遺伝子やいくつかの転写因子群の発現が雌に比べ雄で高いことが分かった。この結果、これらの遺伝子群が雄特有の形態形成、すなわちアンドロゲンシグナルの下流で機能している可能性が示唆された。

③ある転写因子が外生殖器形成過程において雄でのみ強く発現し、雌では発現が弱いことを見いだした。この結果、この転写因子が新規アンドロゲン下流因子として機能している

可能性が示唆された。

##### (3) 今後の展望

上述した分子や遺伝子について、今後さらに解析を進めていくことで、生殖系細胞・器官の形成・分化メカニズムの全容を明らかにしていきたい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① 福井達也、村上加奈、吉永一也: 精巣におけるアクアポリンの分布と機能. 形態・機能、査読有、11 巻 80-85、2013
- ② Villacorte M, Suzuki K (他 11 名、2 番目):  $\beta$ -Catenin signaling regulates Foxa2 expression during endometrial hyperplasia formation. *Oncogene*, 査読有、2013, in press
- ③ Tajiri S, Fukui T, Sawaguchi A and Yoshinaga K: Cell- and region-specific expression of sugar chains in the mouse epididymal epithelium using lectin histochemistry combined with immunohistochemistry. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 査読有、88: 141-146, 2012
- ④ Tajiri S, Fukui T, Sawaguchi A and Yoshinaga K: Changes in lectin-binding sites on epididymal cells during postnatal development of the mouse. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 査読有、88: 153-157, 2012
- ⑤ Suzuki K, (他 11 名、1 番目): Reduced BMP signaling results in hindlimb fusion with lethal pelvic/urogenital organ aplasia: a new mouse model of sirenomelia. *PLoS One*, 査読有、7: e43453, 2012
- ⑥ Suzuki K (他 6 名、1 番目): Wakayama symposium: epithelial-mesenchymal interaction regulates tissue formation and characteristics: insights for corneal development. *Ocul Surf*, 査読有、10: 217-220, 2012
- ⑦ 田尻翔太、福井達也、吉永一也: 精巣上体のアクアポリン. 形態・機能、査読有、10: 60-64, 2012
- ⑧ Liu L, Suzuki K (他 10 名、2 番目): Retinoic acid signaling regulates Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein signalings during genital tubercle development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 査読有、95: 79-88, 2012
- ⑨ Murashima A, Miyagawa S, Ogino Y, Nishida-Fukuda H, Araki K, Matsumoto T, Kaneko T, Yoshinaga K (他 5 名、8 番目): Essential roles of androgen signaling in

Wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. *Endocrinology*, 査読有、152: 1640-1651, 2011

- ⑩ Omori A, Harada M, Ohta S, Villacorte M, Sugimura Y, Shiraishi T, Suzuki K, Nakagata N, Ito T, Yamada G: Epithelial Bmp (Bone morphogenetic protein) signaling for bulbourethral gland development; A mouse model for the congenital syndromes of cystic dilation. *Congenital Anomalies*, 査読有、51: 102-109, 2011
- ⑪ Ohta S., Ohta S, Yukiko O, Suzuki K, Kamimura M, Tachibana K, Yamada G: Sonoporation for gene transfer into embryos. *Cold Spring Harb Protoc.* 査読無、2011: prot5581, 2011

〔学会発表〕(計9件)

- ① 吉永一也, 福井達也, 村上加奈: 精巣・精巣上体におけるサイトケラチン発現の意義. 第118回日本解剖学会全国学術集会、2013. 3. 28、かがわ国際会議場(香川)
- ② Fukui T, Murakami K, Ishibashi K, Yoshinaga K: Spermatogenic cell death in aquaporin-11 knockout mouse testes. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012. 8.26, Kyoto International Conference Center (Japan)
- ③ Murakami K, Tajiri S, Fukui T, Sawaguchi A, Yoshinaga K: Glycohistochemical and immunohistochemical markers for mouse epididymal cells. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012. 8.26, Kyoto International Conference Center (Japan)
- ④ Tajiri S, Fukui T, Yoshinaga K: Characterization of lectin-binding sites in epithelial cells of the mouse epididymis. The 13th Biennial Meeting of the Asia Pacific Society for Sexual Medicine, 2011. 11. 17, The Splendor Kaohsiung (Taiwan)
- ⑤ 田尻翔太、福井達也、吉永一也: マウス精巣上体における糖鎖マーカーの探索、コ・メディカル形態機能学会第10回学術集会、2011. 9. 17、中部大学(愛知)
- ⑥ 福井達也、田尻翔太、吉永一也: マウス精巣上体におけるアクアポリン分子の発現解析、コ・メディカル形態機能学会第10回学術集会、2011. 9. 17、中部大学(愛知)
- ⑦ 田尻翔太、澤口 朗、吉永一也: 精巣上体管上皮細胞の機能分化に関するレクチン組織化学的解析、日本顕微鏡学会第67回学術講演会、2011. 5. 16-18、福岡国際会議場(福岡)

- ⑧ Suzuki K: Antagonistic regulation of Wnt/beta-catenin signaling by *Dkk1* during caudal embryogenesis, GT (Genital Tubercle) development. WNT2010, 2010.10.28, Karolinska Institutet (Sweden)
- ⑨ 田尻翔太、吉永一也: レクチン染色によるマウス精巣上体管上皮における糖鎖発現の解析、コ・メディカル形態機能学会第9回学術集会、2010. 9. 11、新潟大学(新潟)

〔図書〕(計1件)

- ① 鈴木堅太郎、山田源: 羊土社、完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック、2011、15頁

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉永 一也 (YOSHINAGA KAZUYA)  
熊本大学・大学院生命科学研究所・教授  
研究者番号: 50136719

### (2) 研究分担者

鈴木 堅太郎 (SUZUKI KENTARO)  
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師  
研究者番号: 20404345

### (3) 研究協力者

田尻 翔太 (TAJIRI SHOTA)  
熊本大学・大学院保健学教育部・大学院生  
研究者番号: なし

福井 達也 (FUKUI TATSUYA)  
熊本大学・大学院保健学教育部・大学院生  
研究者番号: なし

村上 加奈 (MURAKAMI KANA)  
熊本大学・大学院保健学教育部・大学院生  
研究者番号: なし