

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29日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791478

研究課題名（和文） 尿道下裂発症に関わる責任遺伝子の同定と遺伝子治療への応用

研究課題名（英文） The identification of the genes correlated with the hypospadias development and the application to a future gene therapy.

研究代表者

黒川 覚史（KUROKAWA SATOSHI）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50468253

研究成果の概要（和文）：

尿道下裂のより深い理解と新しい治療法の開発のため、以下の2つの研究を行った。

(1) モデル動物を用いた尿道形成時期の遺伝子解析による候補遺伝子の同定：

11週齢の妊娠Sprague-Dawleyラットに対し非ステロイド性抗アンドロゲン剤flutamide 7.5mgを妊娠15日目から連日3日間腹腔内投与し、尿道下裂モデルラットを作成した。尿道下裂モデルラットとコントロールである正常ラットの双方から、妊娠17日目に胎仔からペニスを採取した。採取した胎仔のペニスからtotal RNAを抽出し、マイクロアレイにより20,500遺伝子を解析した。マイクロアレイ解析で発現差の認められた候補遺伝子は、SYBR greenを用いた定量RT-PCR法により実際の発現に有意差があるかどうか確認した。候補遺伝子の中でも、*Prolactin-induced protein (Pip)* 遺伝子に着目した。

(2) 同定した遺伝子の発現部位についてモデル動物とヒトにおいて確認：

Pip 遺伝子の発現部位を確認するために、ラット組織切片の免疫染色を行い、組織学的に確認した。陰茎包皮の表皮に発現を認めた。さらにPIPタンパクの定量的評価としてWestern blotを行い、尿道下裂ラットのペニスで有意に発現低下していることを確認した。ヒトにおける検討では、尿道下裂患者と包茎などのコントロール患者の手術検体においてもPipの発現を免疫染色で検討し、ラットと同様であることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

(1) We have developed a rat model of hypospadias by *in utero* exposure to flutamide, demonstrating proximal hypospadias in 100% of offspring. We analyzed 20,500 genes of fetal penis from a rat model, using the oligonucleotide microarray. The results of microarray analysis were confirmed by quantitative real-time PCR. We identified one gene, *prolactin-induced protein (Pip)*. This gene had never been reported about the correlation with penile development.

(2) The distribution of the *Pip* gene were histologically examined in the samples from rats and human. Immunohistochemical analysis revealed PIP expression in the prepuces of the genital tubercles of the control and hypospadiac rat. PIP was also expressed

in the human prepuces of the patients with hypospadias and phimosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：尿道下裂、遺伝子、発現制御、マイクロアレイ、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、尿道下裂発生に関わる様々な遺伝子が報告されてきた。それらは三種に大別でき、①性差が生じる前の外性器形成に関わる遺伝子群 (*Hedgehog family, Fgf, Bmp, Hox, Wnt/beta-catenin*)、②性差が生じた後の外性器形成に関わる遺伝子群 (*AR, SRD5A2, HSD17B3, FKBP52, MAMLD1/CXorf6, ERs, ATF3*)、③尿道下裂を含む先天異常症候群の原因遺伝子 (*MIDI*) である。最近注目されている *MAMLD1/CXorf6* や *ATF3* は、尿道下裂という表現型を示している患者検体から同定された遺伝子であり、尿道下裂発生の一側面を解明したものである。しかし、実際の尿道下裂発生時期である胎児期の検体をもとにした解析ではないため、発生メカニズムの解明には至っていない。これまで報告のあった遺伝子群と疾患をつなぐ解析は十分とはいえ、尿道下裂発生時期の網羅的遺伝子解析による包括的な病態把握が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、尿道下裂のより深い理解と新しい治療法の開発のため、以下の3つを目的とした。

- (1) モデル動物を用いた尿道形成時期の遺伝子解析を行い、疾患の発症に関わる候補遺伝子を同定すること。
- (2) 同定した遺伝子のヒトにおける発現を確認し、ヒトへの応用が可能かどうか検討すること。
- (3) 尿道下裂モデル動物に候補遺伝子を補填することにより、将来の遺伝子治療への発展を目指した研究を行うこと。

3. 研究の方法

本研究では、尿道下裂発生の候補遺伝子を探索し遺伝子治療へ発展させることを目標に、以下の5つを行った。

(1) 尿道下裂モデルラットの作成

11週齢の妊娠 Sprague-Dawley ラットに対し非ステロイド性抗アンドロゲン剤 flutamide 7.5mg を妊娠15日目から連日3日間腹腔内投与することにより、尿道下裂モデルラットを作成した。

(2) 尿道形成期における胎仔ペニスの採取

尿道下裂モデルラットとコントロールである正常ラットの双方から、尿道下裂発生の臨界期である妊娠17日目に胎仔を取り出し、実体顕微鏡下に、胎仔の性腺を確認

し雌雄を識別後、雄仔からペニスを採取した。

(3) 正常ラットと尿道下裂モデルラットの胎仔ペニスにおける遺伝子発現の比較

採取した胎仔のペニスから total RNA を抽出し、逆転写によって cDNA を合成した。cDNA は、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析にて発現差の認められた候補遺伝子は、SYBR™ green を用いた定量 RT-PCR 法により実際の発現に有意差があるかどうか確認した。

(4) 尿道下裂に関わる候補遺伝子の、胎仔ペニスにおける発現局在

定量 RT-PCR 法で発現に有意差の認められた候補遺伝子の発現部位を確認するために、組織切片の免疫染色を行い、組織学的に検討した。タンパクレベルでの発現差を比較するために western blot も行った。

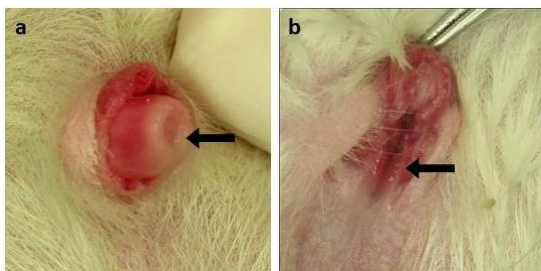
(5) ヒトにおける候補遺伝子の発現確認

候補遺伝子のヒトにおける相同遺伝子があるかどうかは、Entrez-Genome などのゲノム配列データベースにて確認した。尿道下裂患者とコントロール患者(包茎)の手術検体を用いて免疫染色を行い組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 尿道下裂モデルラットを開発した。正常ラットのペニス(図 1a)に対して、尿道下裂モデルラットのペニス(図 1b)は外尿道口が変位している。

(図 1)



(2) 尿道形成期における胎仔ペニスの採取をした。実体顕微鏡下に、性腺を観察し雌雄を判定した。氷冷した PBS 内において全操作を行った(図 2)。



(図 2)

(3) 正常ラットと尿道下裂モデルラットの胎仔ペニスにおける遺伝子発現の比較により *Prolactin-induced protein (Pip)* 遺伝子を同定した。

(4) ラット胎仔のペニスにおける *Pip* 遺伝子の発現局在は、包皮の表皮層で認められた。PIP タンパクは尿道下裂モデルラットで有意に低下していた。

(5) ヒトにおける *Pip* 遺伝子の発現局在も包皮の表皮層であった。

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 1 件)

① Association of prolactin-induced protein with preputial development of hypospadias.

Kurokawa S, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Tozawa K, Kohri K, Hayashi Y. BJU Int. 109(6):926-32, 2012 (査読有り)

doi:

10.1111/j.1464-410X.2011.10467.x.

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒川 覚史 (KUROKAWA SATOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研
究員

研究者番号：50468253