

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860771

研究課題名(和文) 雄性化誘導の分子機構解析：細胞増殖因子の機能とアンドロゲンによる新規制御

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of masculinization: role of growth factor signaling and androgen regulation

研究代表者

村嶋 亜紀 (Murashima, Aki)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・特別研究員

研究者番号：50637105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウォルフ管発生は最も顕著な雄型形態形成を示す器官発生の一つであり、雄性形質誘導機構を解析するための良いモデルとなる。本研究は、雄性形質誘導の分子機構を解析するために、ウォルフ管発生に着目して細胞増殖因子の機能とアンドロゲンによる制御機構を解析した。遺伝子改変マウスを用いた解析の結果、Shh、Fgf、Wntシグナルがウォルフ管形態形成に必須の機能を担っていることが明らかとなった。特にWntシグナルは、アンドロゲンによるWntアンタゴニストの発現制御を介してウォルフ管の雄性化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wolffian duct (WD) development is one of the most prominent developmental processes which lead to masculinization of the reproductive tract. Androgen is the most important factor to promote masculinization processes including WD elongation. In this study, the functions of several growth factor signaling and molecular mechanisms of androgen regulation were analyzed during WD development. Conditional knockout studies revealed that Sonic hedgehog (Shh) and Fibroblast growth factor (Fgf) signaling pathways play pivotal roles in WD development. In vitro culture system revealed that Wnt signaling regulated WD masculinization. Further analyses revealed that androgen regulates Wnt signaling through the suppression of Wnt antagonist expression. This study demonstrated the function of growth factor signaling in WD development and identified Wnt signaling as a down-stream target of androgen signaling.

研究分野：発生生物学、内分泌学、分子生物学

キーワード：アンドロゲン受容体 細胞増殖因子 ウォルフ管 生殖内分泌学 遺伝子改変マウス アンドロゲン

### 1. 研究開始当初の背景

多くの生物において、雄と雌を創り出す仕組み(性分化)は生殖に不可欠であり、その確立は種の存続に直結する最重要課題の一つである。雄性ホルモン(アンドロゲン)は生殖器官や二次性徴における雄の形態形成を支配する最も重要な因子であり、核内レセプターであるアンドロゲン受容体(androge receptor: AR)を介してその作用を現す。細胞質でアンドロゲンと結合したARは核内へ移行し、転写因子として種々の共役因子とともに標的遺伝子の発現を制御する。野生型と自然発生型アンドロゲン不応(tfm)マウスを用いた古典的な組織組換え実験の結果から、アンドロゲン依存的な器官の性分化において、特に間葉に発現するARを介したアンドロゲンシグナルの重要性が示唆されており、分泌性因子を介して上皮細胞の増殖や形態形成などの制御が行われると考えられている。この間葉-上皮相互作用を担う分泌性因子については、EGF(上皮細胞増殖因子)を含むいくつかの細胞増殖因子シグナルの関与が示唆されているものの、それらの雄性化作用は不完全であり、更なる解析が期待されている。また、アンドロゲンシグナルによるこれら細胞増殖因子シグナルの制御機構は全く不明である。

本研究で着目するウォルフ管は、性的に未分化な雌雄両方の胎児において形成される。雌胎仔ではウォルフ管は退縮する。一方、雄の胎仔においては、生殖腺の性分化を受けて産生されるアンドロゲンの作用により、ウォルフ管は伸長し、精巣上体、輸精管、精嚢へと分化する。ウォルフ管はARの発現量が高く、アンドロゲンシグナルの解析対象として優れており、古典的組織組換え実験やアンドロゲン投与実験の対象として古くより着目されてきた。しかし、アンドロゲンによる雄性化誘導現象の作用機構や下流因子に関する分子遺伝学的解析はほとんど行われていない。更に、ウォルフ管の伸長をはじめとした雄性形質誘導に本質的に関わるARの下流標的遺伝子は同定されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、雄性生殖管原基であるウォルフ管の雄性化誘導における細胞増殖因子の機能を解析するとともに、アンドロゲンによって誘導される下流標的分子経路を同定し、その誘導機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

ウォルフ管雄性化におけるアンドロゲンシグナルの下流遺伝子シグナルネットワークの同定とその誘導機構を分子レベルで解明することを目的とし、以下の点に着目して解析を行った。

(1) ウォルフ管雄性化における細胞増殖因子の機能解析: 組織特異的遺伝子改変マウス群を駆使し、細胞増殖因子シグナル経路、特

に Wnt/  $\beta$ -catenin、Shh (ソニックヘッジホッグ)、FGF (線維芽細胞増殖因子) などに関する組織特異的遺伝子改変マウスを作製し、ウォルフ管発生におけるそれぞれの細胞増殖因子の機能を個体レベルで解析した。

(2) ウォルフ管雄性化における新規アンドロゲン標的因子の同定: 野生型雄マウス胚と AR KO (ノックアウト) 雄マウス胚のウォルフ管を用いた DNA マイクロアレイによる発現比較の結果から、特に発現変動の大きかった遺伝子群に関して、AR による発現制御解析とその雄性化における機能解析 (器官培養での阻害剤投与実験) を行った。

### 4. 研究成果

本研究では遺伝子改変マウスを用いた解析から、Shh、FGF、Wnt シグナルの雄性生殖管形成における機能を明らかにした。その中でも Wnt シグナルはアンドロゲンによるアンタゴニストの発現制御を介してその機能が調節されている可能性が示唆された。これはアンドロゲンによる雄性形質誘導と細胞増殖因子の機能を相互に結びつけうる新規の雄性化誘導制御機構である。本研究で得られた知見は、雄性生殖管系のアンドロゲン依存性/非依存性形態形成メカニズムを考察するうえで極めて重要な知見を与えると考えられる。

一方で、細胞増殖因子のアンドロゲン非依存性のウォルフ管発生における重要性の発見は、研究開始当初予期していなかった知見である。本研究における解析により、初期ウォルフ管形成異常が雄性生殖管の形態形成に与える影響が明らかになるとともに、ヒト先天性腎尿路異常(CAKUT)などの病態における細胞増殖因子関連遺伝子の関与を示唆する重要な知見が与えられたと考えられる。以下にそれぞれの具体的な研究成果の詳細を記す。

#### (1) ウォルフ管雄性化における細胞増殖因子の機能解析

Shh は精巣輸出管形成を制御する

Shh はウォルフ管上皮と、ウォルフ管に沿って形成される、精巣輸出管原基の中腎細管上皮に発現する。Shh KO マウス胚を解析した結果、中腎細管の過形成と精巣輸出管の形成異常を示すことがわかった。このことより、Shh は正常な精巣輸出管形成に必須であると考えられた。一方で、ウォルフ管上皮特異的・中腎細管上皮特異的 Shh KO マウス (*Hoxb7-Cre; Shh<sup>fllox/-</sup>*、*Sall1<sup>CreERT2</sup>; Shh<sup>fllox/-</sup>*) はともに、正常な精巣輸出管発生を示した。*Shh<sup>CreERT2/fllox</sup>* マウスを作製し、胎生 7.5 日齢 (E7.5) E8.5 または E9.5 において時期特異的に Shh 遺伝子をノックアウトし、解析を行った結果、E8.5 で遺伝子組換えを誘導した場合にのみ Shh KO マウスと同様の中腎細管の過形成が観察された(図1)。このときの Shh の発現様式から、正中構造(脊索、神経管)

に発現する Shh が正常な精巣輸出管発生を制御していることが示唆された。

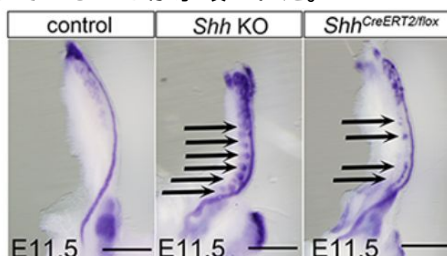


図1. *Shh* 遺伝子欠損による中腎細管過形成 (*Pax2*プロンプを用いたRNA *in situ* hybridization)。矢印:中腎細管の過形成。*Shh* KOマウスは中腎細管の過形成を示した。*ShhCreERT2/lox*による時期特異的*Shh* KOマウスではE8.5に組み換えを誘導した場合のみ中腎細管の過形成が見られ、これは正中領域に発現するShhの機能を示唆する。

Fgf シグナルはウォルフ管上皮の細胞増殖を部位特異的に制御する

ウォルフ管上皮特異的 *Fgfr2* (*Fgf receptor 2*) KO マウスを解析したところ、ウォルフ管発生初期 (E12.5) において上皮の退縮と管の途絶を示した (図2)。このとき、ウォルフ管上皮特異的 *Fgfr2* KO マウス胚ではコントロール胚に比べ、ウォルフ管尾部領域における細胞増殖が著しく低下していた。この細胞増殖の低下は他の領域では検出することができなかった。このことから、Fgf シグナルは管上皮の維持に必須であると考えられた。一方で、ウォルフ管上皮の Fgf シグナルが雄性化に直接関与することを示唆するデータは得られなかった。

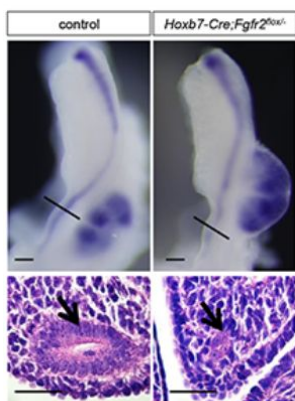


図2. *Fgfr2* 遺伝子欠損によるウォルフ管尾部領域の途絶 (*Pax2*プロンプを用いたRNA *in situ* hybridization、黒線部分のHE染色)。ウォルフ管上皮特異的*Fgfr2* KOマウスではウォルフ管尾部領域で上皮の退縮と管の途絶が認められた (矢印:管上皮)。コントロール胚と比較すると、ウォルフ管上皮特異的*Fgfr2* KO胚では尾部領域上皮においてのみ細胞増殖の低下が認められ、他の領域ではこれが認められなかった。このことからFgfシグナルはウォルフ管上皮の細胞増殖を部位特異的に制御する事が示唆された。

(2) ウォルフ管雄性化における新規アンドロゲン標的シグナル経路の同定と制御機構解析

野生型雄マウス胚と *AR* KO 雄マウス胚のウォルフ管における DNA マイクロアレイからウォルフ管雄性化に関与し得るシグナル経路候補を同定し、ウォルフ管の器官培養系にその阻害剤を添加し、雄性化 (ウォルフ管の伸長と屈曲) への影響をスクリーニングした。その結果 canonical または non-canonical Wnt シグナル経路の阻害はアンドロゲンによるウォルフ管の雄性化をいずれも顕著に抑制することがわかった (図3)。

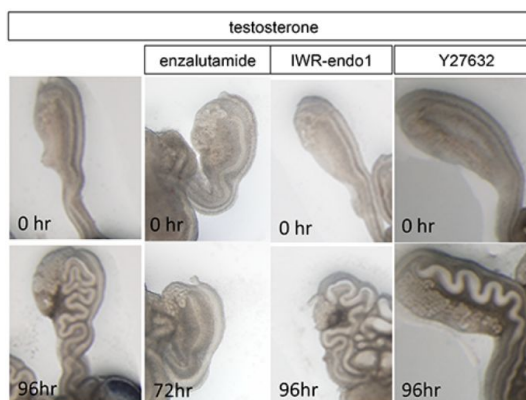


図3. ウォルフ管器官培養におけるWntシグナル阻害剤投与実験。テストステロン投与によりウォルフ管は伸長・屈曲し、アンドロゲン受容体阻害薬であるエンザルタミド投与によってこの伸長と屈曲は阻害される。アンドロゲン存在下でWntシグナル阻害剤を添加すると管の伸長が抑制された。(IWR-endo1: canonical Wntシグナル阻害剤、Y27632: non-canonical Wntシグナル阻害剤)

さらに、アンドロゲン受容体拮抗薬の母獣投与によって雄胎仔ウォルフ管間葉における Wnt アンタゴニスト *Sfrp* の発現上昇が確認された。また、器官培養系においてもアンドロゲンシグナルを阻害すると *Sfrp* の発現上昇が確認されたため、アンドロゲンは *Sfrp* の発現制御を介して Wnt シグナルを制御している可能性が示唆された。アンドロゲンによる *Sfrp* の発現制御機構を調べるために、*in silico* プロモーター解析を含む様々な解析を行ったが、AR による *Sfrp* の発現制御は直接では無い可能性が示唆された。

## 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 8件)

崎田佳嗣, 岡澤・坂井 美佳, 村嶋亜紀, 山田源. ウォルフ管上皮特異的  $\beta$ -catenin 遺伝子ノックアウトマウスの示す異所的尿管芽の病態解析. *和歌山医学*, in press (査読有)

\*Ipulan LA, \*Raga D, Suzuki K, Murashima A, Matsumaru D, Cunha G, Yamada G. Investigation of sexual dimorphisms through mouse models and hormone/hormone-disruptor treatments. *Differentiation*. 2015 Dec 1. pii: S0301-4681(15)30072-4 (査読無) doi: 10.1016/j.diff.2015.11.001. \*These authors contributed equally

Matsumaru D, Murashima A, Fukushima J, Senda S, Matsushita S, Nakagata N, Miyajima M, Yamada G. Systematic stereoscopic analyses for cloacal development: The origin of anorectal malformations. *Scientific Reports*, 2015 Sep 10;5:13943 (査読有) doi: 10.1038/srep13943.

Murashima A, Xu B, Hinton BT. Understanding normal and abnormal development of the Wolffian/epididymal duct using transgenic mice. **Asian Journal of Andrology**, 2015 Sep-Oct;17(5):749-55 (査読無) doi: 10.4103/1008-682X.155540.

\*Okazawa M, \*Murashima A, Harada M, Nakagata N, Noguchi M, Morimoto M, Kimura T, Ornitz DM, and Yamada G. Region-specific regulation of cell proliferation by Fgf receptor signaling during the Wolffian duct development **Developmental Biology**, 2015 Apr 1;400(1):139-47 (査読有) doi: 10.1016/j.ydbio.2015.01.023.  
\*These authors contributed equally

Murashima A, Kishigami S, Thomson A, Yamada G. Androgens and mammalian male reproductive tract development. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2015 Feb;1849(2):163-170 (査読有) doi: 10.1016/j.bbagr.2014.05.020.

Murashima A, Akita H, Okazawa M, Kishigami S, Nakagata N, Nishinakamura R, Yamada G. Midline-derived Shh regulates mesonephric tubule formation through the paraxial mesoderm. **Developmental Biology**, 2014 Feb 1;386(1):216-26 (査読有) doi: 10.1016/j.ydbio.2013.12.026.

Ipulan LA, Suzuki K, Sakamoto Y, Murashima A, Imai Y, Omori A, Nakagata N, Nishinakamura R, Valasek P, Yamada G. Nonmyocytic androgen receptor regulates the sexually dimorphic development of the embryonic bulbocavernosus muscle. **Endocrinology**, 2014 Jul;155(7):2467-79 (査読有) doi: 10.1210/en.2014-1008.

〔学会発表〕(計 6件)

Murashima A, Okazawa M, and Yamada G. The functions of growth factor signaling in the developing Wolffian duct and male reproductive tract. 7th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination (コナ、ハワイ州、アメリカ)2015年4月15日【ポスター発表】

Murashima A, The functions of growth factor signaling in developing Wolffian duct and male reproductive tract. International Conference of Epididymis VI (上海、中国)2014年11月3日【口頭発表】

村嶋亜紀, 山田源. ウォルフ管雄性化過程と精巢上体上皮分化過程におけるアンド

ロゲンシグナルの機能解析. 第32回日本アンドロロジー学会, (グランキューブ大阪、大阪)2013年7月26日【学術奨励賞講演】

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
村嶋 亜紀 (MURASHIMA AKI)  
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・特別  
研究員

研究者番号: 50637105

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: