

マウス胚尿生殖洞上皮を用いた初期前立腺発生に
おける FGF10、WNT、レチノイン酸シグナルの機
能解析

宇野 亘

目次

要旨	2
序論	4
材料と方法	14
結果	22
考察	54
引用文献	68
謝辞	76

要旨

前立腺は哺乳類の生殖能力向上に寄与する前立腺液を分泌する雄性生殖器官であり、胚発生においては膀胱直下の尿生殖洞(UGS)に由来する。前立腺発生は精巣由来テストステロンを受容した UGS 間充織 (UGM)から分泌された二次シグナルが UGS 上皮 (UGE)において受容され、UGE で *Nkx3.1* に代表される前立腺遺伝子の発現上昇が起こる事によって開始される。その後上皮と間充織の間でシグナルの相互作用が起こり、前立腺芽が形成される。先行研究において UGS を用いた組織培養により、複数のシグナル因子が前立腺の発生に重要である事が示されているが、UGM 由来シグナル因子の種類が膨大であるため、前立腺芽形成に必要なかつ十分な因子はこれまで明瞭には判明していなかった。加えて、出芽が起きる前の“pre-budding 期”の時点において遺伝子発現に雌雄間で差異が生じている事が近年判明しているが、pre-budding 期の前立腺分化に関してはこれまでほとんど調べられていなかった。

本研究では、Embryonic day 13.5 のオス pre-budding UGS から酵素処理によって UGE を単離し、候補因子下で組織培養を行って pre-budding 期における遺伝子発現の解析並びに前立腺芽形成の評価を

行った。その結果、FGF10 存在下においてテストステロンは上皮の前立腺への分化に大きな寄与をせず、低濃度 FGF10 存在下でのカノニカル WNT シグナルが pre-budding 期の前立腺遺伝子の発現向上に寄与する事が示された。更に、budding 期においては高濃度 FGF10 が出芽に必要であり、レチノイン酸が bud における前立腺遺伝子の発現上昇に必要である事が示された。加えて、本研究で用いられた誘導因子の組み合わせはメス UGE に対しても前立腺芽の誘導が可能であり、更にオス UGE から誘導された前立腺芽を間充織と組み合わせて生体内に移植する事により、前立腺上皮の成熟が起こる事が示された。

本研究から、UGM を除いた UGE の培養によって、胚性前立腺の分化における FGF10、カノニカル WNT シグナル、レチノイン酸の時期特異的な機能の解明が可能となった。

序論

1-1: 前立腺の構造と機能

前立腺は哺乳類の雄個体において膀胱直下に存在する生殖器官である。前立腺の外部構造はヒトとマウスで大きく異なっており、ヒトの前立腺がクルミ大の単一器官である一方で、マウスの前立腺は anterior, dorsolateral, ventral の三対の前立腺葉から構成される。しかしながら、ヒトにおいてもマウスにおいても、前立腺が分岐する管構造を示し、偽重層上皮とその周囲の間質から構成され、上皮が主として前立腺管腔細胞と前立腺基底細胞から成る点は共通している (Toivanen and Shen, 2017)。ヒトでは前立腺管腔細胞は *NKX3.1*、*PSA(KLK3)*、*KRT8* を、前立腺基底細胞は *KRT5*、*P63*、*KRT14* を発現する (図 1A, Toivanen and Shen, 2017)。

前立腺の機能は主として前立腺管腔細胞において合成される前立腺液の分泌である。前立腺液の主な構成成分は亜鉛イオン、クエン酸並びにセリンプロテアーゼの一種であるカリクレイン (PSA) であり (Verze et al., 2016)、上記の構成成分が精子への栄養の供給、および精子の保護を担っている。亜鉛イオンは前立腺管腔細胞のクレブス回路を阻害する事によって精子の栄養となるクエン酸の蓄積を引

き起こす(Franklin et al., 2005)事に加えて、カリクレインとの結合によるカリクレインの活性阻害も引き起こす。このため、前立腺液内ではカリクレインは不活性であるが、射精の際に前立腺液が精嚢液と混合すると、亜鉛イオンがカリクレインから分離して精嚢液中のセミノジェリンと結合し、カリクレインの再活性化が起こる。この現象はセミノジェリンがカリクレインと比べて亜鉛イオンとの親和性が高いため起こる(Pampalakis and Sotiropoulou G. 2007)。亜鉛イオンとセミノジェリンの結合は精液の凝固を引き起こし、これにより精子が保護される。一方で、カリクレインが再活性化されると、そのプロテアーゼ活性によってセミノジェリンが分解される事により、凝固した精液の流動性が回復し、体内受精において精子が移動できるようになる(Verze et al., 2016)。以上の過程によって、精子の保護と体内受精の円滑化が両立される事から、前立腺液の分泌は体内受精の円滑化に大きな役割を担っている事が示される。

1-2: 胚発生における前立腺の分化

胚発生における前立腺の起源は膀胱と尿道の中間に生じる尿生殖洞(Urogenital sinus, UGS)である。UGS は膀胱、尿道と同様に腹側

の総排泄腔が大腸および直腸と分離する事によって形成される。前立腺の発生は、精巢のライディッヒ細胞から分泌されたテストステロンが尿生殖洞間充織(Urogenital mesenchyme, UGM)に発現するアンドロゲン受容体(Androgen receptor, AR)で受容される事によって開始される。テストステロンが UGM 中の AR で受容されると、AR は細胞核内に移行して転写因子として機能し、尿生殖洞上皮(Urogenital epithelium, UGE)に作用する分泌因子の合成を活性化させる。UGM から放出された分泌因子が UGE に作用すると、UGE において前立腺前駆細胞への分化および前立腺芽の形成が誘導される(図 1B)。

胚性前立腺の分化は、前立腺の出芽が起きる前の“pre-budding 期”(マウスでは Embryonic day 13.5(E13.5)から E15.5、ヒトでは受精後 8-9 週)と、出芽が起きた後の“budding 期”(マウスでは E16.5 から E18.5、ヒトでは受精後 10-11 週)に分ける事ができる(Cunha et al., 2018)。Pre-budding 期において、UGE は *Upk1b* を発現する尿道管腔細胞と、*Krt14* を発現する尿道基底細胞に分化する(Abler et al., 2011)。Pre-budding 期においては、オスおよびメスの胚どちらの UGE においても、*Upk1b* を発現する尿道管腔細胞と、*Krt14* 陽

性の尿道基底細胞への分化は見られ、似た形態を示す。しかしながら、オス胚において血漿中のテストステロンは E13.5 以降上昇し、E14.5 までにオス胚の血漿テストステロンの濃度がメス胚の 3 倍近くに上昇する (Pointis et al., 1979) 事から、オス胚 UGE では前立腺遺伝子の発現が pre-budding 期の時点から始まり、メス胚と異なる分化様式を示す事が示唆される。一例として、前立腺芽に発現する *Wif1* は、オス胚の UGE では前立腺芽形成前の E16.5 の時点でメス胚より高い発現を示す事が報告されている (Keil et al., 2012b)。

Budding 期においては、pre-budding 期で尿道管腔細胞と尿道基底細胞の分化が起きた後、上皮-間充織間相互作用によって *Krt14* 陽性の尿道基底細胞から *Nkx3.1* 陽性の前立腺芽が形成される (Bhatia-Gaur et al., 1999)。形成された前立腺芽は出芽時点において前立腺管腔細胞、前立腺基底細胞には分化していないが、出芽後に間充織とのシグナル伝達の相互作用によって前立腺芽の伸長、分岐、管腔の形成を経て、前立腺管腔細胞と前立腺基底細胞への分化が起こる (図 1B)。

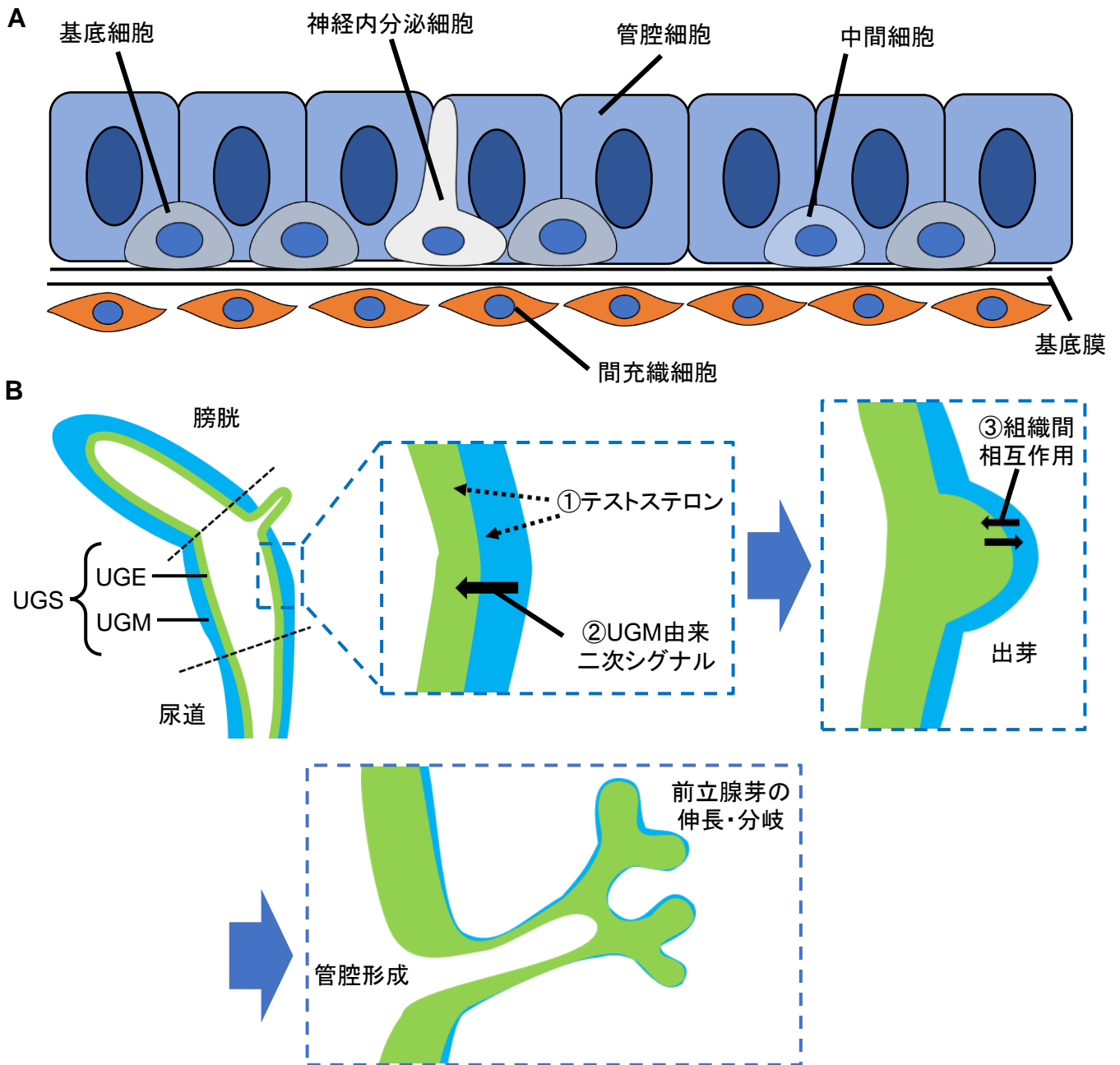


図1: 前立腺の構造並びに前立腺発生の概略図

(A) 成体前立腺の主要な細胞の名称並びに位置を示す概略図。成体前立腺上皮は主として管腔細胞と基底細胞で構成される。図の上部は管腔側を示す。(B) 胚発生における前立腺誘導過程の概略図。精巣から分泌されたテストステロンがUGSに作用すると、UGMから二次シグナルが分泌され、前立腺前駆細胞への分化、および前立腺芽の形成が起こる。その後上皮—間充織間相互作用によって前立腺芽の伸長・分岐、管腔形成並びに前立腺管腔細胞・前立腺基底細胞の分化によって前立腺の成熟が起こる。

1-3: 初期前立腺発生に寄与するシグナル因子

先行研究において前立腺芽の形成に必要な因子として複数のシグナル因子が特定されており、テストステロンもその一種である。テストステロンの受容体である AR のノックアウトマウスでは矮小化されるものの精巣は形成されるが、前立腺が形成されなくなる事から、前立腺の発生に必要な因子である事が示唆される(Yeh et al., 2002)。線維芽細胞増殖因子(FGF)シグナルの一種である FGF10 は、FGF10 ノックアウトマウスにおいて前立腺芽が形成されない事から、前立腺発生に必須な因子であるとされている(Donjacour et al., 2003)。テストステロンと FGF10 はともに前立腺の形成に必要な事に加えて、UGS の組織培養においてテストステロンの添加が FGF10 の発現を上昇させる報告(Kuslak and Marker, 2007)がある事から、前立腺芽の形成において FGF10 とアンドロゲンシグナルに関連がある事が示唆される。しかしながら、*Fgf10* 遺伝子の発現が新生児ラットの UGS において雌雄共に観察されること(Thomson and Cunha, 1999)、UGS の組織培養において FGF10 のみを添加した場合では前立腺芽の形成を誘導する事ができないこと(Donjacour et al., 2003)から、テストステロンシグナルの下流には FGF10 が位

置づけられず、他種のシグナル因子の関与も前立腺芽の形成に必要であると考えられる。

上記のシグナル因子に加え、 β カテニンを介したカノニカル WNT シグナルやレチノイン酸シグナルもまた、初期の前立腺分化および前立腺芽形成に重要とされるシグナル因子である。前立腺のマーカー遺伝子である *Nkx3.1* は WNT によって発現が上昇し、NKX3.1 タンパク質自体もカノニカル WNT シグナルの維持に寄与するとされる (Kruithof-de Julio et al., 2013)。また、メス UGS の組織培養における β カテニンのタモキシフェン処理によるコンディショナルロックアウトは、ジヒドロテストステロン(DHT)の添加による *in vitro* での前立腺芽の形成および NKX3.1 タンパク質の発現を抑制する事が報告されている (Simons et al., 2012)。加えて、 β カテニンは pre-budding 期において UGE の KRT14 陽性尿道基底細胞の分化に寄与する事も報告されており (Mehta et al., 2013)、pre-budding 期と budding 期のいずれの時期でも前立腺分化においてカノニカル WNT シグナルが重要な役割を担っている事が示唆される。レチノイン酸シグナルに関して、レチノイン酸合成酵素遺伝子の一種である *Aldh1a1* がオスの UGM でメスと比べてより強い発現を示

す事に加えて、メス UGS を用いた組織培養において、DHT 存在下でのレチノイン酸シグナルの阻害が前立腺芽の形成を抑制する事が示されている(Bryant et al., 2014)。また、E14.5 オス UGS の組織培養において DHT に加えてレチノイン酸を添加すると前立腺芽の数が増加する事も報告されている (Vezina et al., 2008)。上述の先行事例から、レチノイン酸シグナルが前立腺芽の形成促進に重要である事が示唆される。

一方で、UGM からは前立腺芽の形成を抑制して調節するシグナル因子も分泌されると考えられている。例えば、TGF- β ファミリーのリガンドであるアクチビンの、 βA サブユニットであるインヒビン βA (INHBA)は E16.5 のオス UGM ではメスよりも発現が低く、メス UGS の組織培養において DHT 処理によって発現が低下する事が報告されている(Bryant et al., 2014)。加えて、INHBA の変異マウスのメス UGS では E18.5 において異所的に出芽が生じた事、およびメス UGS の組織培養においてトランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)の I 型受容体阻害剤である SB431542 の添加によって、DHT 不含条件でも *Nkx3.1* 陽性 bud が誘導された事(Bryant et al., 2014)から、INHBA には出芽抑制効果がある可能性が推測される。

また、UGM に発現する骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein, BMP)の一種である BMP4 は、UGS の組織培養において出芽を抑制する効果がある事が報告されている(Lamm et al., 2001)。

なお、budding 期においてカノニカル WNT シグナルの過剰発現が BMP の発現を異所的に増大させ、前立腺芽の形成を抑制するという研究報告があり(Mehta et al., 2013)、budding 期においてはカノニカル WNT シグナルが BMP を介して前立腺芽の形成を調節する事が示唆される。一方で、前述のように pre-budding 期ではカノニカル WNT シグナルは UGE の尿道基底細胞への分化に寄与する(Mehta et al., 2013)事から、少なくともカノニカル WNT シグナルでは pre-budding 期と budding 期でシグナルの役割に変化が生じている事が考えられる。

1-4: 本研究の目的

上述のように、前立腺形成において様々なシグナル因子が関与する事が示されているが、これまでの研究は上皮と間充織をともに含有した UGS が主として用いられているため、シグナル因子の具体的な役割に関しては不明な点も見られる。一例として、UGM で発

現する INHBA は前立腺芽の形成を抑制する事が示唆されており (Bryant et al., 2014)、UGM から分泌されるシグナル因子に抑制因子が含まれている可能性を無視できない。このため、前立腺芽誘導におけるシグナル因子の役割の解明には、UGM からの UGE の分離、および分離した UGE の単独培養が必要となる。なお、E15.5 の UGE を単離し DHT, FGF7, FGF10 で処理して前立腺芽を誘導したとする報告は一報存在する (Ghosh et al., 2011) が、E15.5 以前の pre-budding 期において前立腺前駆細胞への分化に雌雄差が生じている事から、pre-budding 期における分化の解明も前立腺発生の解析には必要となる。本研究では、E13.5 UGE を酵素処理によって UGM から分離し、様々な配合および濃度の増殖因子で処理する事により、初期前立腺上皮の分化におけるシグナル因子の直接的な機能を解明する事を目的とする。また、初期前立腺上皮の分化を pre-budding 期と budding 期とで区分して解析する事によって、シグナル因子の単離 UGE に対する誘導様式の変化を解明する事を目的とする。

材料と方法

2-1: UGS/UGE の組織培養

実験動物として用いたマウスは 12 時間の明暗サイクルで、気温 18-23°C、湿度 40-60%の環境で飼育された。妊娠マウスとしては ICR マウス(JAX stock #009122, The Jackson Laboratory)を使用した。マウスの妊娠時期は交配翌日の午前中に plug を観察し、plug 確認日の正午を Embryonic day 0.5(E0.5)と定義した。培養実験には E13.5 の胚を用い、E13.5 胚は 5-10%ウシ胎児血清(FBS, Gibco, #26140-079)を含有したリン酸緩衝生理食塩水(PBS, Merck, #P4417)に回収した。なお、pre-budding 期、初期 budding 期のコントロールサンプルとしてはそれぞれ E15.5, E17.5 のオス胚を使用し、E15.5, E17.5 胚は FBS を含有しない PBS 中に回収した。いずれの発生ステージにおいても、胚から分離した UGS は Nowotschin et al., 2010 に従って調製した M2 培地に回収した。

腎被膜下移植実験に際して、オス NOD-SCID マウスはオリエンタル酵母工業から購入した。すべての動物実験は理化学研究所生命機能科学研究センターの動物実験取扱規則(A2016-03-10)に準拠して実行した。

UGS の組織培養に関して、E13.5 オス UGS は 0.4 μm カルチャーインサート (Corning, #3450) に気液界面条件下で培養した。培養の際に組織は 0.5x Antibiotic-Antimycotic (Gibco, #15240096)、2% PFHM (Thermo Fisher Scientific, #12040077)、10 nM testosterone (Sigma, #T1500-1G) を含有した APEL2 培地で培養し、培地は 2 日に 1 回交換した。

UGE の組織培養に関して、オス E13.5 胚 UGS は DPBS (Gibco, #14190) で 2 回洗浄した後、上皮細胞の保護のために 10 μM Y-27632 (富士フィルム和光純薬, 034-24024) を、組織の分離の円滑化のために 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase I (Roche, #11284932001) を添加した dispase (Corning, #354235) 中に 1 分間 37°C で処理した。dispase 処理後、処理前の洗浄に用いた DPBS で 2 回洗浄した後、10 μM Y-27632、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase I を含有した M2 培地中で UGE を周囲の UGM から分離した。単離した UGE は一時的に 0.5x Antibiotic-Antimycotic、2% PFHM、10 μM Y-27632 を含有した APEL2 培地に保管した。その後 UGE は pre-budding 期誘導用増殖因子を含有した、APEL2 培地混合 25% グロースファクターリデュースドマトリゲル (Corning, #354230 or #356230) に移し、8.0 μm カルチャーイ

ンサート (Falcon, #353097)内において 1 時間 37°Cで静置してゲルを凝固させた。なお、単離した UGE を移す前に 25%マトリゲルをカルチャーインサート内に添加して 1 時間以上 37°Cで静置した。続いて、pre-budding 期誘導用培地をマトリゲルと UGE を含有したインサートの上下に添加した。なお、25%マトリゲルと誘導用培地には Y-27632 と DNase I は含有されていない。Pre-budding 期誘導用培地で培養してから 2 日後、マトリゲルを除去せずに pre-budding 期誘導用培地を除去して budding 期誘導用培地に交換した。なお、本研究において pre-budding 期誘導用培地は、0.5x Antibiotic-Antimycotic、2% PFHM、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ヘパリン(Sigma, #H4784-250MG)、10 ng/mL FGF10(R&D Systems, #345-FG)、3 μM CHIR99021(Tocris, #4423)を含有した APEL2 培地で構成され、budding 期誘導用培地は、0.5x Antibiotic-Antimycotic、2% PFHM、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ヘパリン、100 ng/mL FGF10、1 nM オールトランスレチノイン酸(ATRA, Sigma, #302-79-4)を含有した APEL2 培地で構成される。

2-2: 定量的逆転写 PCR(qRT-PCR)

組織培養 2 日後または 4 日後の UGS は 10 μ M Y-27632、1 μ g/mL DNase I を含有した dispase 中において 10 分間 37°C で処理の後、UGM から UGE を分離して回収した。回収された UGE のトータル RNA は液体窒素中で凍結の後 RNeasy micro kit (Qiagen, #74004) を用いて抽出した。移植実験に関して、回収された移植片のトータル RNA は NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, #740955) を用いて抽出した。cDNA は 32 ng 以上のトータル RNA から PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ, #RR036A) を用いて合成した。合成された cDNA は TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ, RR820) を用いて Quantstudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) による qRT-PCR 解析を行った。得られたデータは *Hprt* をハウスキーピング遺伝子として ΔC_t 法を用いて補正し、各条件 3 個体の平均値 \pm 標準誤差で提示した。2 群間の比較は Prism v9.2.0 ソフトウェア (GraphPad) を用いた unpaired *t*-test で評価した。以下にプライマーの塩基配列を示す。

遺伝子名	Forward	Reverse
<i>Hprt</i>	AGTCCCAGCGTCGTG ATTAG	TCTCGAGCAAGTCTTTC AGTCC
<i>Fgf10</i>	TGCGGAGCTACAATCA CCTC	GTTATCTCCAGGACACT GTACG

<i>Nkx3.1</i>	TCCGGAGGACCCACC AAGTA	AAGTCTCAAAATGTGCA TCAGACTC
<i>Ar</i>	TTATGGGGACATGCGT TTGG	CCACAAGTGAGAGCTCC GTA
<i>Wif1</i>	TCTGATTGTCTCGGAG GGGA	GAAGTATTCTGCCTGCC CCG
<i>Krt14</i>	GCAGCAGAACCAGGA GTACAA	GGAAGATGAAAGGTGG GCGTC
<i>Upk2</i>	GTTCCCAGCGCAGTAT GG	GAGAGGCTTGAGATGTT GAAGTC
<i>Sox9</i>	AAGAACGGACAAGCG GAGG	CTGAGATTGCCAGAGT GC
<i>Krt4</i>	TGCTGTGAGCATCTCG GTAG	GAACCGCCATAAATGCC ACC
<i>Etv4</i>	GGGTACCTTGGTGAG CACAG	CCCTGAGGAGATGTGAA GGA
<i>Etv5</i>	TGAGCAGTTTGTCCCA GATTT	AGCTCCCGTTTGATCTT GG
<i>Pbsn</i>	GTGGGAGGAGATGCA ACCAAG	GCTATGCTCCCTTCATA CTGTGC
<i>Tgm4</i>	GGACTCCAGGAATGT GCTTATC	GGTCTGGTACTCGGATG TGTG
<i>Msmb</i>	GTCCTGCTTTGTCACC ATGGAAG	ACATACTGCTTTGGATG CTATCAC
<i>Sbp</i>	TCCAAGGCATAGTAAG AGTGTCA	ATGGCTCCTGAGGGTTT GTG

2-3: 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色用サンプルは 4%パラホルムアルデヒド(PFA, Sigma, #158127 またはナカライテスク, #09154-85) in PBS を用いて 4°C中で固定し、段階的なスクロース置換の後 OCT コンパウンド(サクラフアインテックジャパン, #4583)中に包埋した。4日間培養された UGE

は 4°Cで一晩、腎被膜下に移植された移植片は 4°Cで 2 日間固定した。包埋した組織ブロックは-80°C中で凍結保存し、CryoStar NX70 cryostat を用いて厚さ 7 μm の切片を作製し、クレストコートスライドグラス(松浪硝子工業, SCRE-01)の上に静置した。免疫染色の際に、組織切片は 10%ロバ血清(Merck, S30-100ML)、0.3% Triton X-100 (ナカライテスク, #35501) in PBS を用いて 1 時間室温でブロッキングを行い、続いてブロッキングバッファー中に希釈した一次抗体を添加して 4°Cで一晩静置した。なお、NKX3.1、RUNX1、P63 に対する免疫染色では、ブロッキング前に切片を HistoVT One(ナカライテスク, #06380-05)中に 90°Cで 40 分間処理し、抗原の賦活化を行った。一次抗体処理の翌日に PBS で 3 回洗浄した後、PBS に希釈した Alexa Fluor®蛍光標識二次抗体(Thermo Fisher Scientific, 1:400)を標本に添加し、4°Cで一晩静置した。細胞核は DAPI を用いて染色した。以下に使用された一次抗体と希釈濃度を示す。

抗原名	希釈濃度	由来種	販売元、製品番号
SOX9	1:100	ウサギ	Millipore、#AB5535
KRT8	1:100	ラット	Developmental Studies Hybridoma Bank
KRT5	1:100	ニワトリ	Biolegend、#905903
NKX3.1	1:200	ウサギ	Athena ES、#0315
P63	1:100	ウサギ	Cell Signaling、#67825

RUNX1 | 1:100 ウサギ Cell Signaling、#8529

2-4: 組織組み換えおよび腎被膜下移植

組織組み換え実験および腎被膜下移植実験は先行研究で提示されている方法の一部修正を加えて実施した(Cunha et al., 1983)。UGM は E17.5 オス UGS から 10 μ M Y-27632、1 μ g/mL DNase I を含有した dispase 中で 10 分間 37°C 処理後、酵素処理前の 2 回の洗浄で使用した DPBS で再洗浄し、10 μ M Y-27632、1 μ g/mL DNase I を含有した M2 培地中で分離を行った。単離された E17.5 オス UGM およびコントロールとして用いる E17.5 オス UGE は一時的に 0.5x Antibiotic-Antimycotic、2% PFHM、10 μ M Y-27632 を含有した APEL2 培地に保管した。単離された UGM は続いて 10% FBS (Sigma, #173012)、7.5% NaHCO₃ (Sigma, #S8761)、1x Glutamax (Thermo Fisher Scientific, #35050061)、0.5x Antibiotic-Antimycotic、0.4% 寒天(Bacto-Difco, #214010)含有 DMEM(Sigma, #D2429 の 10x DMEM を用いて調製)上に静置した。4 日間培養した UGE 組織はピンセットを用いて UGM に相当する大きさに断片化して UGM 上に静置し、一晩 37°C で培養した。なお、コントロールとして UGM 上に E17.5 オス UGE を静置したサンプルも用意した。組織を一晩培養した後、イソフルラ

ン(Abbvie, #B506)で麻酔した 6 週齢オス NOD-SCID マウスの腎被膜下にピンセットを用いて挿入し、3 週間後に移植後組織を回収した。回収された組織は 4% PFA 中で固定後免疫蛍光染色、あるいは RNA 抽出後 qRT-PCR を用いた遺伝子発現解析に使用した。

2-5: 培養組織の表現型評価、統計処理

培養組織の明視野画像は Olympus DP73, DP74 カメラ搭載の Olympus CKX53 培養顕微鏡で撮影し、組織の表現型は形態、成長並びに出芽の有無、程度を基にして評価を行った。Day 2 における表現型評価は主として上皮の形態と成長を基に、Day 4 における表現型評価は主として出芽の有無、程度を基にして行った。

4 日間培養後 UGE の Bud の長さの測定は Zeiss LSM900 共焦点顕微鏡で撮影された切片画像を用いて、Zeiss Zen ソフトウェア上で行われた。Bud の長さは組織の管腔から Bud 先端の長さを測定する事で算出した。データは平均値±標準偏差で示し、2 群以上の非パラメトリック比較は Kruskal-Wallis 検定とそれに続く Dunn 検定を Prism v9.2.0 ソフトウェア(GraphPad)上で行った。

結果

3-1: FGF10 は UGE において bud の形成に必要である。

先行研究において、*Fgf10* ノックアウトマウスの E15.5 UGS がテストステロンに応答する事ができず、その結果前立腺芽が形成されない事が示されており (Donjacour et al., 2003)、FGF10 が初期前立腺発生に必要な因子である事が示唆される。Pre-budding 期において *Fgf10* 遺伝子がどのように発現するかを調べるために、pre-budding 期の E13.5 と E15.5 の UGM と UGE を酵素処理によって分離し、定量的逆転写 PCR(qRT-PCR)を用いて *Fgf10* 遺伝子の発現解析を行った。その結果、*Fgf10* は E13.5 および E15.5 の UGM において同程度の発現を示したのに対し、UGE における発現は極めて低い程度にとどまった(図 2)。

続いて、前立腺誘導に必要な因子を解明するために、E13.5 のオス UGS および UGE の組織培養を行った。先行研究においては UGS の組織培養には E14.5-E15.5 の UGS が主に使用される (Lamm et al., 2001, Donjacour et al., 2003, Cook et al., 2007, Allgeier et al., 2008, Kuslak and Marker, 2007, Ghosh et al., 2011, Simons et al., 2012, Keil et al., 2012b, Mehta et al., 2013, Kruithof-de Julio et al., 2013, Bryant

et al., 2014)が、E13.5 の UGS においてもテストステロンの添加によって出芽が促進された事から、E13.5 時点で UGS のテストステロンに対する応答能がある事が示された(図 3)。テストステロン受容体である AR が E12.5-14.5 において UGE にも UGM にも発現する事 (Crocoll et al., 1998; Keil et al., 2014)、および *Fgf10* のノックアウトによって前立腺芽形成が阻害される事 (Donjacour et al., 2003) から、テストステロンが UGE に対して出芽を特異的に制御しているか、あるいはテストステロンによらずに FGF10 の存在で制御が可能であるかを調べた。調査にあたり、UGM の影響を除くために UGS から UGE を分離した後、UGE をマトリゲル中で培養して FGF10 およびテストステロンの効果を調べた(図 4A)。その結果、FGF10 の存在が出芽には十分である一方で、テストステロンの有無によらず FGF10 不含条件では出芽が生じない事が示された(図 4B)。続いて、テストステロンの添加が初期前立腺の遺伝子発現に影響するかどうかを調べるために、FGF10 存在下において UGE を様々な濃度のテストステロンで 2 日間処理した際の遺伝子発現を定量的逆転写 PCR で解析した。解析の際、前立腺遺伝子としては前立腺マーカーである *Nkx3.1* (Bhatia-Gaur et al., 1999)、アンドロゲン受容体遺伝子であ

る *Ar*、および E16.5 UGE においてオスでメスよりも高い発現を示す *Wif1* (Keil et al., 2012b) の発現を調べた。その結果、テストステロンの濃度によって各遺伝子の発現に大きな増加は生じなかった(図 5A) 事から、pre-budding 期の UGE においてテストステロンが前立腺遺伝子の発現増加に大きな作用を示さない事が示唆された。更に、単離した UGE の培養における前立腺遺伝子の発現の経時的变化を調べるために、単離後に培養された UGE を E15.5 と E17.5 のオス胚から単離された UGE、および UGM から分離せずに培養後に単離された E13.5 UGE とで、3 点の時間(E13.5, E15.5, E17.5)で遺伝子発現の比較を行った。その結果、FGF10, テストステロン含有培地で UGE を 4 日間培養しても、E15.5, E17.5 の胚 UGE およびテストステロン下で UGM を含んで培養された E13.5 UGE と比べて *Nkx3.1*, *Wif1* の発現の増加が弱い事が示された。また、E15.5 と E17.5 の UGE および UGM を含んで培養された E13.5 UGE では *Ar* の発現は維持されたのに対して、単離後培養された UGE では *Ar* の発現に減少が見られた。なお、*Nkx3.1* は E15.5 と E17.5 の UGE および UGM を含んで培養された E13.5 UGE で同程度の発現を示したが、*Wif1* の発現は UGM を含んで培養された E13.5 UGE の培養 4 日目において、上昇は見られるも

の E17.5 の UGE と比べると低くなっていた(図 5B)。これらの結果から、FGF10 とテストステロンは単離 UGE に前立腺遺伝子の発現を増加させるためには十分でない事が示唆された。

続いて、FGF10 の UGE に対する役割を調べるために、UGE を様々な濃度の FGF10 で 2 日間培養し、pre-budding 期における前立腺遺伝子の発現を解析した。培養の結果、10 ng/mL 未満の FGF10 では UGE の維持が出来なくなる場合が生じ、10 ng/mL 以上の濃度が UGE の維持に至適である事が示された(図 6A)。また、*Nkx3.1* が FGF10 の濃度が上昇するにつれて発現が増大する一方で、0 ng/mL と 100 ng/mL では尿道管腔細胞並びに尿路上皮のマーカー遺伝子である *Upk2* (Habuka et al., 2015) の発現が上昇した(図 6B)。膀胱の発生とは異なり、*Fgf10* は尿道板上皮に隣接する間充織に多く発現し、生殖結節の発生に必要である事(Haraguchi et al., 2000; Perriton et al., 2002)からも、UGE を用いた前立腺の誘導には適切な FGF10 の濃度条件の調節が必要である事が示唆された。一方で、*Wif1* の発現は FGF10 の濃度を向上させても上昇が見られなかった。以上の結果から、FGF10 は UGE の維持に重要であるものの、単離 UGE の前立腺への分化には不十分であり、テストステロンとは異なる他種のシグナル因子による刺激

が必要である事が示唆された。なお、10 ng/mL FGF10 の条件では、単離 UGE に対して *Nkx3.1* の発現増加が部分的に見られ、尿道管腔細胞並びに尿路上皮のマーカー遺伝子である *Upk2* の発現増加が抑制されることから、以降の pre-budding 期における単離 UGE の培養実験では FGF10 の濃度を 10 ng/mL に固定して解析を行った。

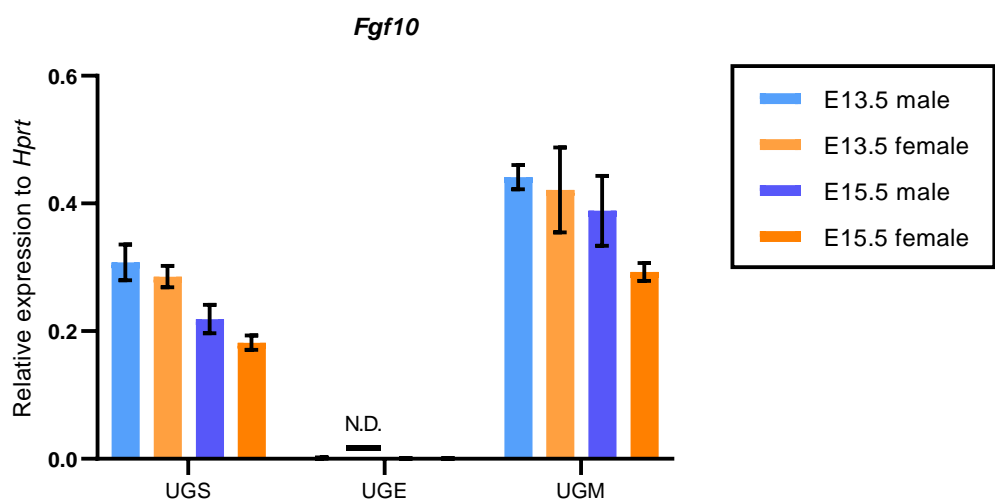


図2: Pre-budding期のマウスUGS・UGE・UGMにおける*Fgf10*の遺伝子発現
 E13.5およびE15.5のマウスUGS・UGE・UGMからRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて*Fgf10*の遺伝子発現を解析した。それぞれ3個体の組織を使用し、*Fgf10*の発現量は*Hprt*の発現量を用いた正規化を行った。エラーバーは平均値±標準誤差を、N.D.は未検出のサンプルを示す。

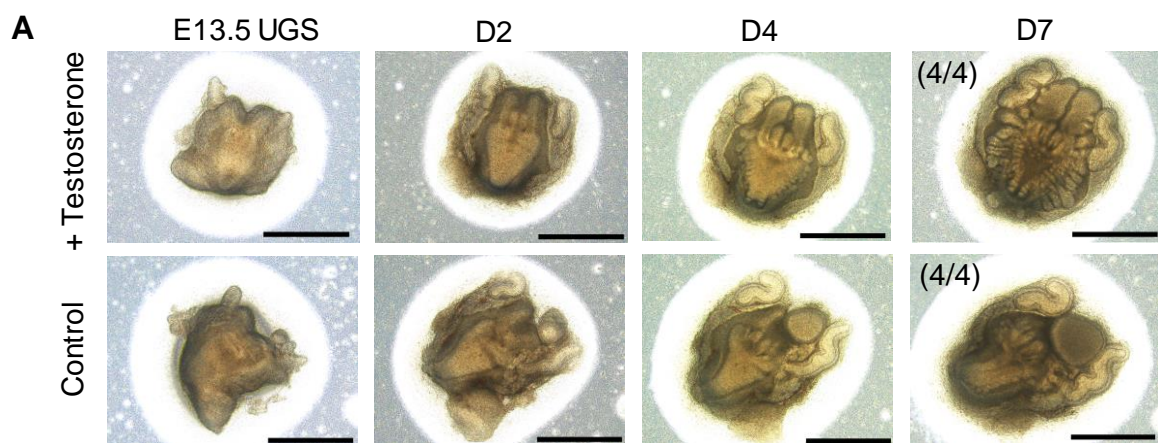


図3: UGSに対するテストステロンの出芽への寄与

E13.5のオスマウスUGSを7日間培養し、10 nM テストステロンの有無に関して比較を行った。Controlはテストステロン不含の条件を示す。写真左上の数字は提示された形態と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは1 mmを示す。

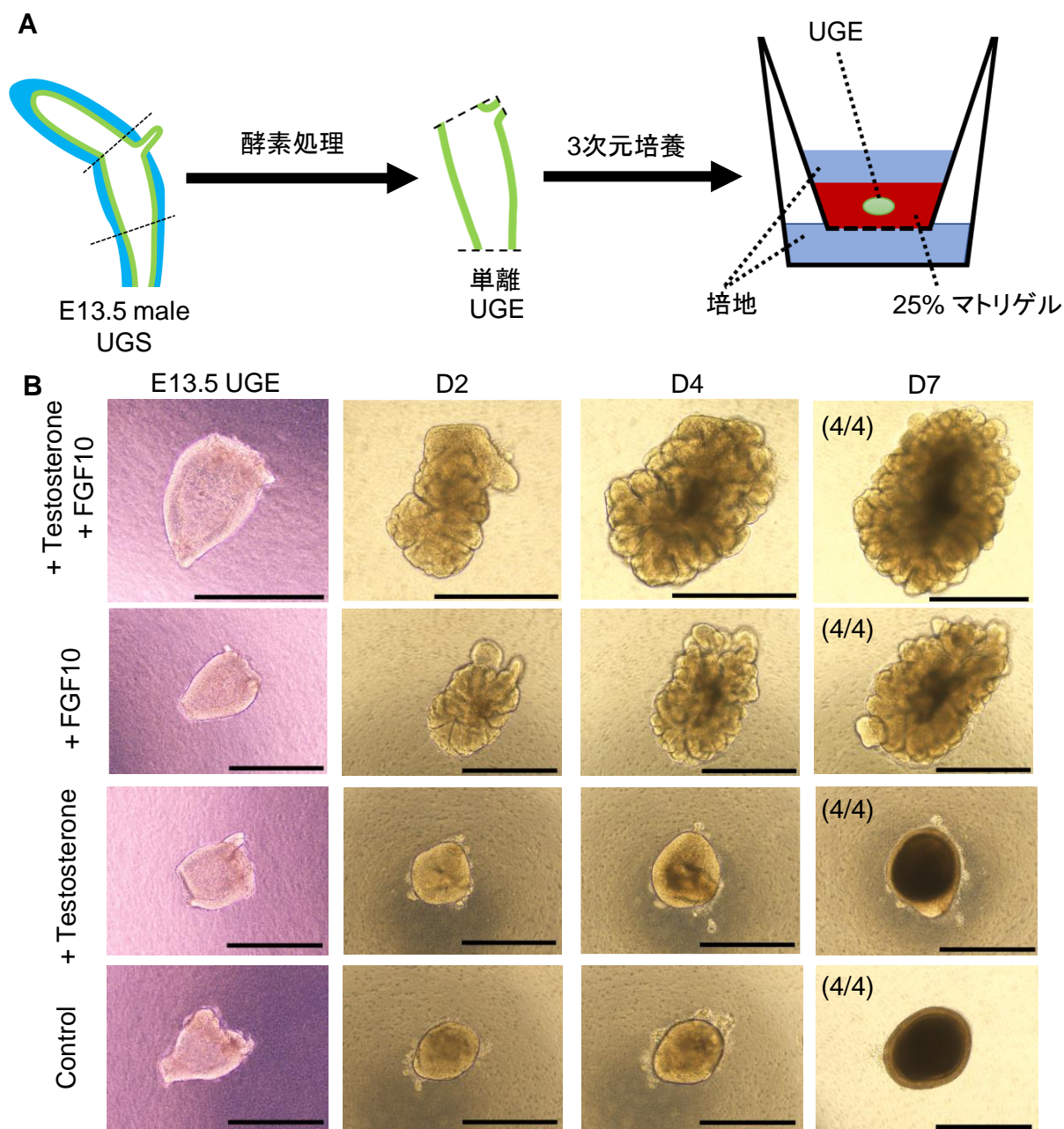


図4: UGEに対するテストステロン・FGF10の出芽への寄与

(A) E13.5オスUGEを用いた3次元培養の概略図。E13.5オスUGEは酵素処理によって周囲の間充織から単離され、25%マトリゲル中で3次元培養された。(B) E13.5のオスマウスUGEを7日間培養し、10 nM テストステロン、100 ng/mL FGF10の有無に関して比較を行った。FGF10を含有する条件では、1 μg/mL ヘパリンを含有した。Controlはテストステロン、FGF10、ヘパリン不含の条件を示す。写真左上の数字は提示された表現型の割合を示す。スケールバーは500 μmを示す。

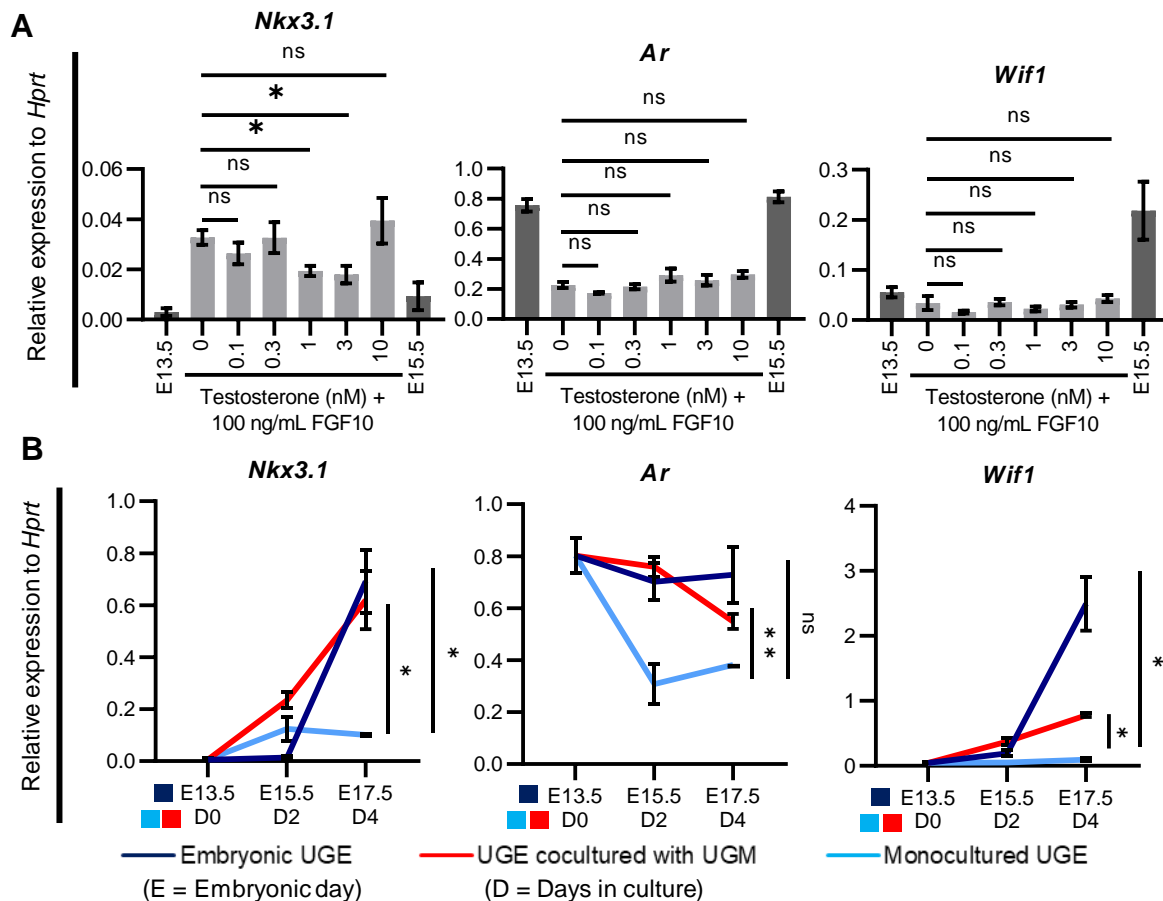


図5: テストステロン・FGF10は前立腺遺伝子の発現上昇に不十分である。
 (A) E13.5のオスマウスUGEを2日間100 ng/mL FGF10存在下で培養し、テストステロンの濃度を変動させた。培養後組織からRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて前立腺遺伝子の発現を解析した。各条件3個体の組織を使用し、標的遺伝子の発現量はHprtの発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値±標準誤差を示す。*はP<0.05、nsはP>0.05を示す。(B) オスマウスUGEをUGM含有(赤)またはUGM除去(青)の条件で培養し、定量的逆転写PCRで遺伝子発現を解析した。UGM含有条件ではUGSを10 nM テストステロンで、UGM除去条件ではUGEを100 ng/mL FGF10、1 µg/mL ヘパリンと10 nM テストステロンで培養した。組織はE13.5 (D0)オス胚から回収し、2日間または4日間(それぞれD2、D4)培養後E15.5、E17.5のオス胚UGE(濃紺)と遺伝子発現を比較した。各条件3個体の組織を使用し、標的遺伝子の発現量はHprtの発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値±標準誤差を示す。*はP<0.05、**はP<0.01、nsはP>0.05を示す。

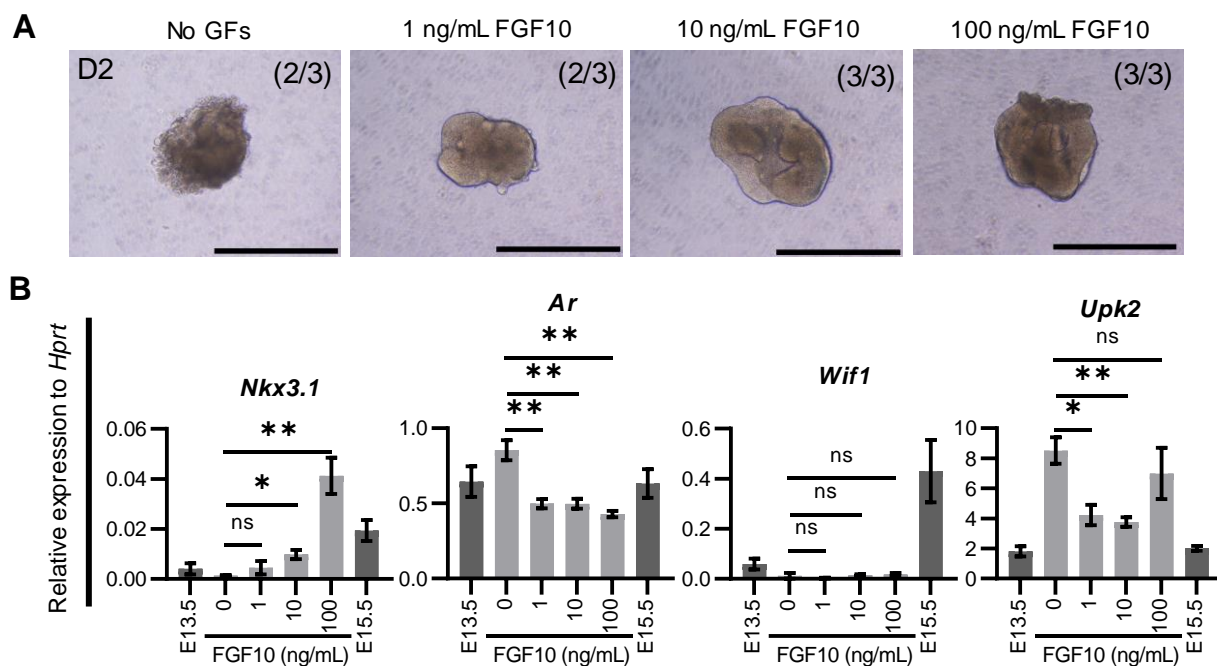


図6: FGF10濃度の前立腺遺伝子の発現に対する影響

(A) E13.5のオスマウスUGEをFGF10の濃度を変動させて2日間培養した。UGEは濃度を変動させたFGF10と1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ヘパリンで培養した。“No GFs”条件では、組織はFGF10とヘパリンを含有せずに培養した。写真右上の数字は提示された形態と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは500 μm を示す。(B) 培養後組織からRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて前立腺遺伝子、および尿管腔細胞並びに尿路上皮マーカー遺伝子である*Upk2*の発現を解析した。各条件3個体の組織を使用し、標的遺伝子の発現量は*Hprt*の発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値 \pm 標準誤差を示す。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、nsは $P > 0.05$ を示す。

3-2: Pre-budding 期の UGE の発生において WNT とレチノイン酸はそれぞれ前立腺前駆細胞と尿路上皮への分化に寄与する。

上述の通り、FGF10 は UGE の維持に重要であるが、テストステロンと FGF10 では前立腺への分化は不十分である事から、UGE を前立腺に分化させるためには、テストステロン以外のシグナル因子が必要となる事が考えられる。Pre-budding 期の UGE では、E13.5 から E15.5 にかけて UGE が尿道管腔細胞と尿道基底細胞に分化し、前者はその後の発生で尿路上皮に、後者はオス胚において前立腺芽に分化する。先行研究では、 β カテニンを介したカノニカル WNT シグナルが尿道基底細胞に由来する前立腺芽の発生に関与する事が報告されている (Mehta et al., 2013) が、カノニカル WNT シグナルの pre-budding 期における分化に対する役割については依然不明瞭である。レチノイン酸シグナルは出芽を促進する上に、*Nkx3.1* 陽性の前立腺芽の形成において必要とされるシグナルであり (Vezina et al., 2008, Bryant et al., 2014)、レチノイン酸もまた前立腺の分化に寄与するシグナル因子の一種といえる。しかしながら、レチノイン酸にはマウス胚性幹細胞に対して尿路上皮の誘導を引き起こす効果がある事が指摘されている (Mauney et al., 2010)。UGE の発生では尿路上

皮の分化も生じる事から、レチノイン酸シグナルが pre-budding 期と budding 期とで異なる役割を担っている可能性が考えられる。そこで初めに、WNT とレチノイン酸の pre-budding 期での分化における役割を解析した。

WNT とレチノイン酸の pre-budding 期における役割を調べるために、E13.5 オス UGE を FGF10 と WNT シグナルのアゴニストである CHIR99021、FGF10 とオールトランスレチノイン酸(ATRA)、または FGF10 のみで 2 日間処理した(図 7)。その結果、FGF10 と CHIR99021 で培養した UGE は、FGF10 と ATRA、あるいは FGF10 のみで培養した UGE と比べてより大きくなっていった(図 8A)。続いて、定量的逆転写 PCR を用いて前立腺前駆細胞、尿道基底細胞および尿道管腔細胞のマーカー遺伝子の発現を解析したところ、CHIR99021 を添加した場合でのみ、前立腺前駆細胞のマーカー遺伝子である *Nkx3.1* と *Wif1* は発現が増加し、*Ar* の発現は維持された(図 8B)。尿道基底細胞に発現する *Krt14* は、CHIR99021 を添加した場合には、発現は上昇するものの FGF10 で培養した UGE と比べると低い上昇であったが、ATRA を添加した場合には、発現に上昇は見られなかった。加えて、尿道管腔細胞並びに尿路上皮のマーカー

一遺伝子である *Krt4*(Joseph et al., 2020)と *Upk2*の発現は、ATRA の添加によって上昇が認められたのに対し、CHIR99021 の添加では上昇が抑制された(図 8B)。上述の解析の結果から、pre-budding 期においては、レチノイン酸は UGE の尿路上皮への分化を促進する一方で、カノニカル WNT シグナルは UGE の尿路上皮への分化を抑制する事が示唆された。

カノニカル WNT シグナルの UGE 組織培養に対する影響を調べるために低濃度 FGF10 の存在下で CHIR99021 の濃度を変動させたところ、2 日間の培養後に 3 μ M 以上の濃度で *Upk2*と *Krt4*の発現上昇が抑制され、*Wif1* の発現が上昇する事が示された。一方で、5 μ M の濃度では *Nkx3.1*、*Ar* および *Krt14* の発現に減少が生じた(図 9A)。加えて、CHIR99021 の濃度を変動させたサンプルに関してその後 2 日間、後述の図 12、図 13 で示す実験で最適化された budding 期で用いる培養条件で培養を継続したところ、3 μ M の濃度に由来するサンプルで最も出芽が活性化する事が示された(図 9B)。更に CHIR99021 処理下での FGF10 の影響を調べるために、3 μ M の CHIR99021 存在下で FGF10 の濃度を変動させたところ、*Nkx3.1* は FGF10 の濃度が上昇するにつれて発現が上昇した一方で、*Ar* と

*Krt14*の発現は 10 ng/mL から 100 ng/mL にかけて減少する事が示された(図 10A)。なお、FGF10 の濃度を変動させたサンプルに関してその後 2 日間、後述の図 12、図 13 で示す実験で最適化された budding 期で用いる条件で培養を継続したところ、pre-budding 期における FGF10 の濃度によらず、組織に出芽が見られた(図 10B)。これらの結果から、pre-budding 期の単離 UGE における前立腺前駆細胞の分化は主として WNT シグナルの影響が大きいものの、適切な FGF10 の条件(10 ng/mL)によって遺伝子発現を適切に上昇および維持できる事が示唆された。

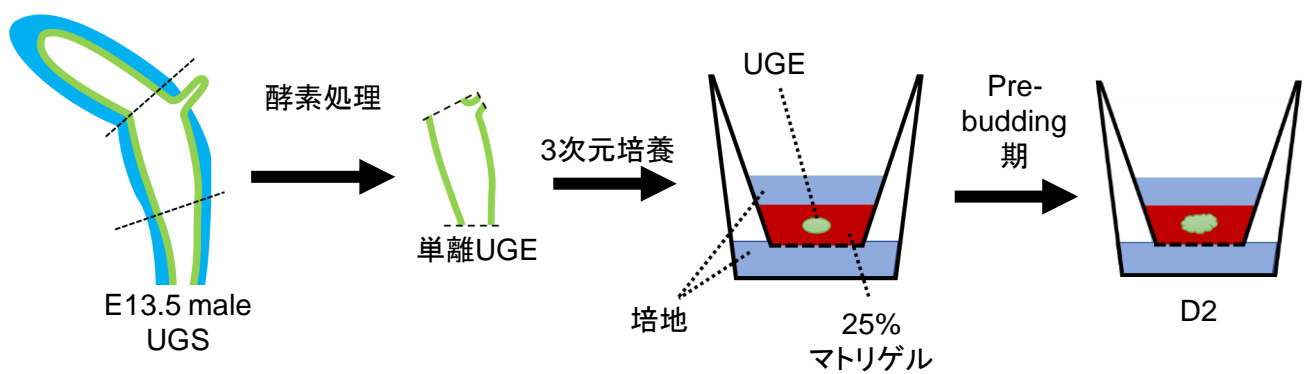


図7: E13.5オスUGEを用いた3次元培養によるpre-budding期前立腺誘導の概略図
 E13.5オスUGEは酵素処理によって周囲の間充織から単離され、25%マトリゲル中で3次元培養された。単離されたUGEに対して、増殖因子の組み合わせおよび濃度を変動させて2日間培養を行った。

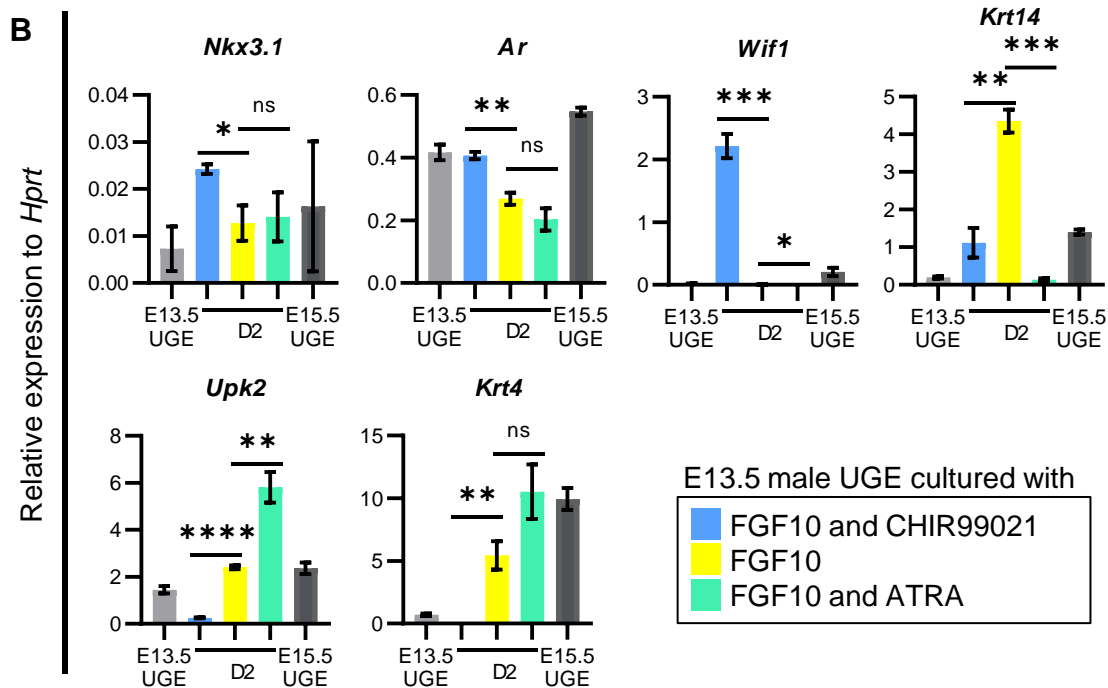
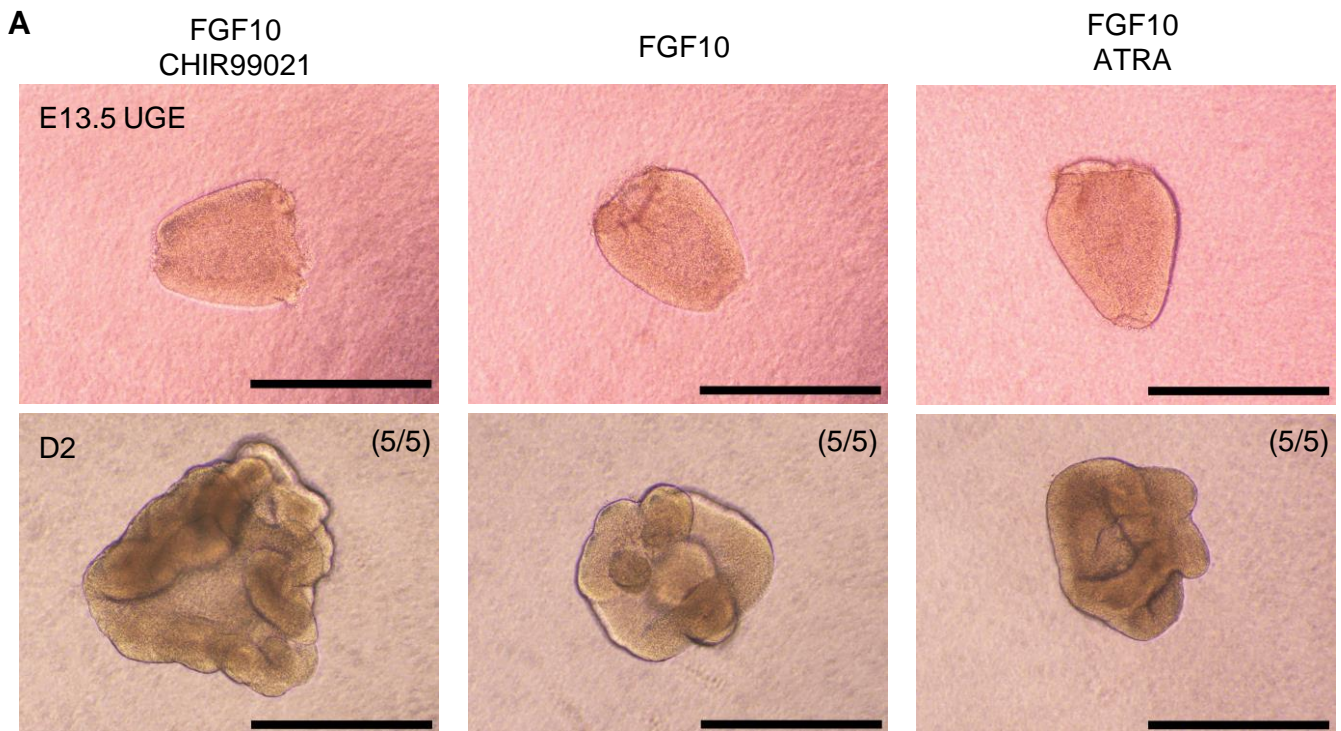


図8: Pre-budding期におけるカノニカルWNT・レチノイン酸とUGEの分化の関係

(A) E13.5のオスマウスUGEを10 ng/mL FGF10、1 μ g/mL ヘパリン存在下において3 μ M CHIR99021または1 nM オールトランスレチノイン酸(ATRA)で処理し、2日間培養を行った。写真右上の数字は提示された形態と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは500 μ mを示す。(B) FGF10とCHIR99021(青)、FGF10のみ(黄)またはFGF10とATRA(緑)で2日間培養したUGEからRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて前立腺遺伝子、尿道基底マーカー遺伝子並びに尿道管腔マーカー遺伝子の発現を解析した。各条件3個体の組織を使用し、標的遺伝子の発現量は*Hprt*の発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値 \pm 標準誤差を示す。*はP<0.05、**はP<0.01、***はP<0.001、****はP<0.0001、nsはP>0.05を示す。

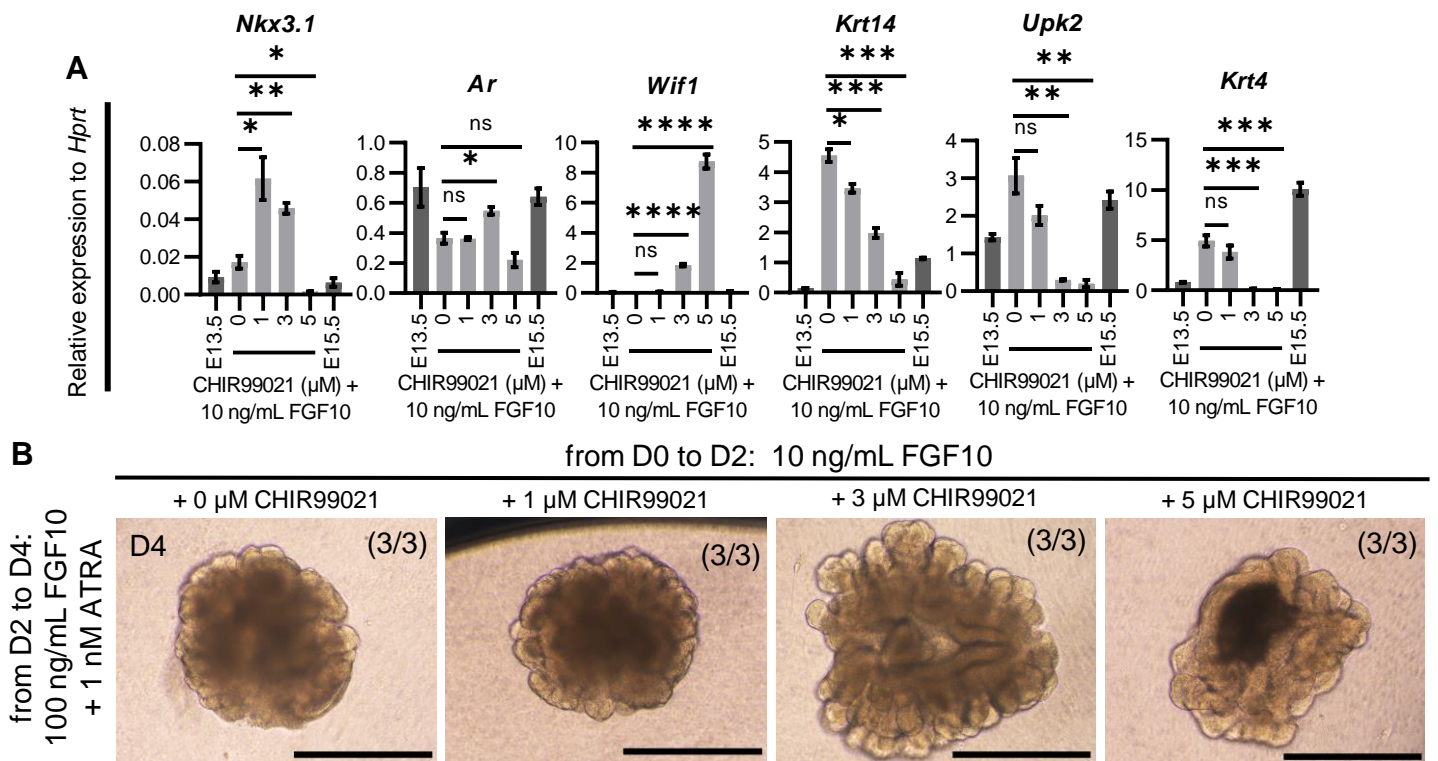


図9: Pre-budding期におけるCHIR99021の濃度と前立腺誘導の関係

(A) E13.5のオスマウスUGEを濃度を変動させたCHIR99021と10 ng/mL FGF10、1 μg/mL ヘパリンで2日間培養し、組織からRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて前立腺遺伝子、尿道基底マーカー遺伝子並びに尿道管腔マーカー遺伝子の発現を解析した。各条件3個体の組織を使用し、標的遺伝子の発現量は*Hprt*の発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値±標準誤差を示す。*はP<0.05、**はP<0.01、***はP<0.001、****はP<0.0001、nsはP>0.05を示す。(B) E13.5のオスマウスUGEを濃度を変動させたCHIR99021と10 ng/mL FGF10、1 μg/mLヘパリンで2日間培養し、その後100 ng/mL FGF10、1 μg/mL ヘパリン、1 nM ATRAで2日間培養した。写真右上の数字は提示された形態と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは500 μmを示す。

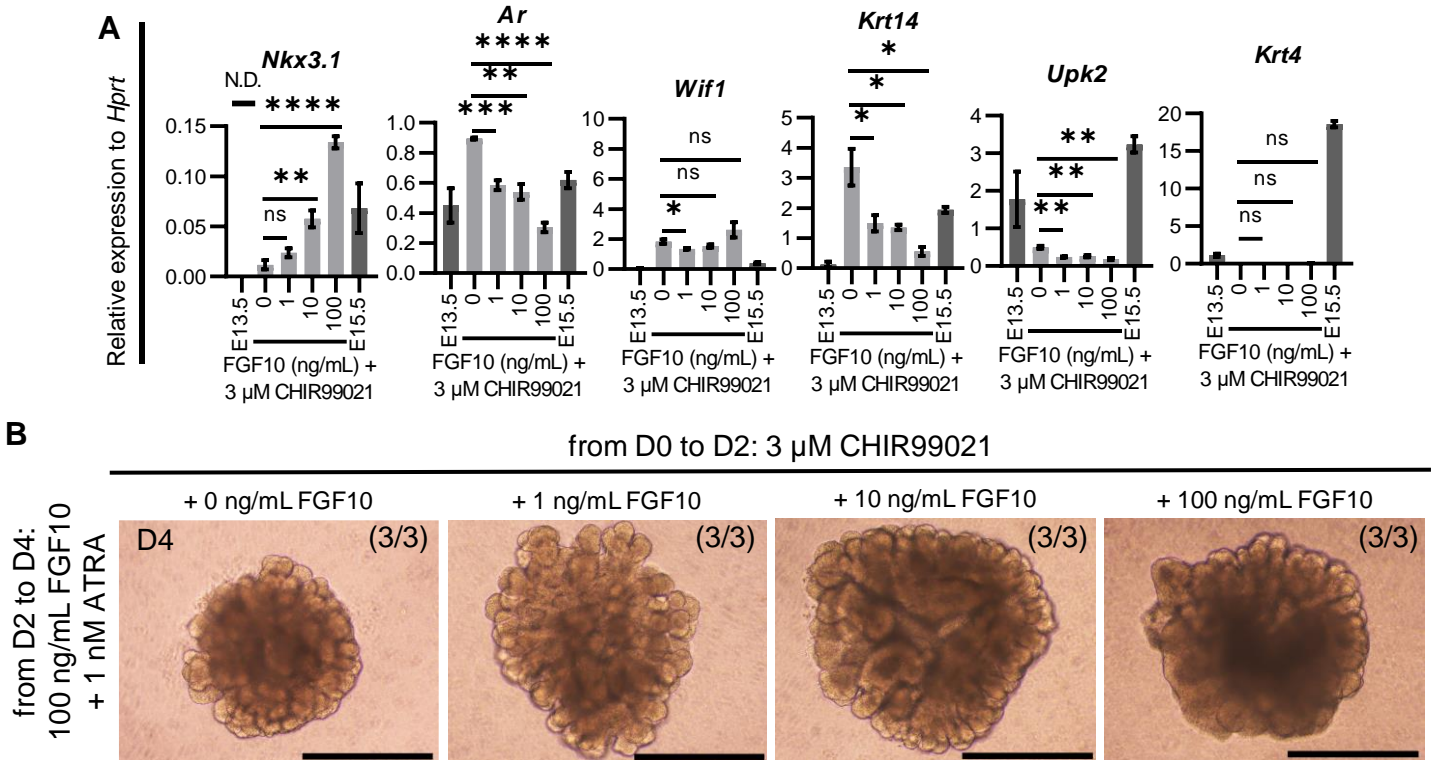


図10: Pre-budding期におけるCHIR99021存在下でのFGF10の濃度と前立腺誘導の関係

(A) E13.5のオスマウスUGEを濃度を変動させたFGF10と3 μ M CHIR99021で2日間培養し、組織からRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて前立腺遺伝子、尿道基底マーカー遺伝子並びに尿道管腔マーカー遺伝子の発現を解析した。FGF10を含む条件では、1 μ g/mL ヘパリンを含有した。各条件3個体の組織を使用し、標的遺伝子の発現量は*Hprt*の発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値±標準誤差を、N.D.は未検出のサンプルを示す。*はP<0.05、**はP<0.01、***はP<0.001、****はP<0.0001、nsはP>0.05を示す。(B) E13.5のオスマウスUGEを濃度を変動させたFGF10と3 μ M CHIR99021で2日間培養し、その後100 ng/mL FGF10、1 μ g/mL ヘパリン、1 nM ATRAで2日間培養した。写真右上の数字は提示された形態と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは500 μ mを示す。

3-3:FGF10 とレチノイン酸のバランスは前立腺芽のパターニングを調節する。

カノニカル WNT シグナルの役割が pre-budding 期では UGE の尿道基底細胞への分化に、budding 期では前立腺芽形成の調節に変化する (Mehta et al., 2013) ように、FGF10 およびレチノイン酸に関しても pre-budding 期以降で分化への役割に変化が生じる可能性が考えられる。この点に関して検証するために、E13.5 オス UGE を 2 日間 10 ng/mL FGF10 と 3 μ M CHIR99021 で培養した後に ATRA と FGF10 を含む培地に変更し、ATRA あるいは FGF10 の濃度を変動させて 2 日間培養を行った (図 11)。

初めに FGF10 の濃度を 100 ng/mL に固定して ATRA の濃度を変動させたところ、出芽は ATRA の存在に関係なく生じていた (図 12A)。しかしながら、定量的逆転写 PCR を用いて遺伝子発現の解析を行ったところ、*Nkx3.1* および前立腺芽のマーカー遺伝子である *Sox9* (Thomsen et al., 2008, Huang et al., 2012) の発現は ATRA を添加した条件では ATRA 無添加の条件と比べて上昇する事が示された (図 12B)。ATRA の濃度を変動させたサンプルを用いて免疫蛍光染色を行ったところ、bud のマーカーである SOX9 は ATRA の添加に

よらず bud 領域に発現が認められた(図 12C)一方で、ATRA の添加によって bud の長さが大きくなる事が示された(図 12D)。更に、遠位前立腺のマーカである NKX3.1、および近位前立腺と尿路上皮のマーカである RUNX1 (Mevel et al., 2020)について免疫蛍光染色を行ったところ、NKX3.1 は ATRA 添加サンプルの bud 末端にのみ発現が見られた(図 12E)一方で、RUNX1 はいずれのサンプルにおいても発現が見られたが、その発現は ATRA 無添加のサンプルの管腔側の細胞で高くなっていた(図 12F)。これらの結果から、レチノイン酸シグナルは出芽には必要でないが bud のパターンニングに重要である事が示唆された。なお、遺伝子発現の上昇および bud の長さに関して、ATRA の濃度の条件間でほとんど見られなかった事から、ATRA の濃度は 1 nM で十分であると考えられた。

続いて ATRA 処理下での FGF10 の役割を調べるため、budding 期の培地の FGF10 の濃度を変動させて出芽の様子と遺伝子発現を解析した。その結果、2 日目から 4 日目の FGF10 の濃度が上昇するにつれて、UGE の出芽が促進される事が示された(図 13A)。更に、定量的逆転写 PCR を用いた遺伝子発現の解析により、FGF10 の濃度が上昇するにつれて *Nkx3.1* と *Sox9*、並びに前立腺芽のマーカ

である *Etv4*、*Etv5* および *Wif1* (Lee et al., 2021) の発現が上昇する事が示された (図 13B)。*Etv4* と *Etv5* はともに FGF シグナルによって調節される事が報告されており (Mao et al., 2009; Brent and Tabin, 2004)、FGF10 が前立腺芽のパターニングの上流で機能する事を支持する結果を示した。以上の結果から、budding 期の培養において高濃度の FGF10 (100 ng/mL) とレチノイン酸が単離 UGE から前立腺芽を分化誘導するために重要である事が示唆された。

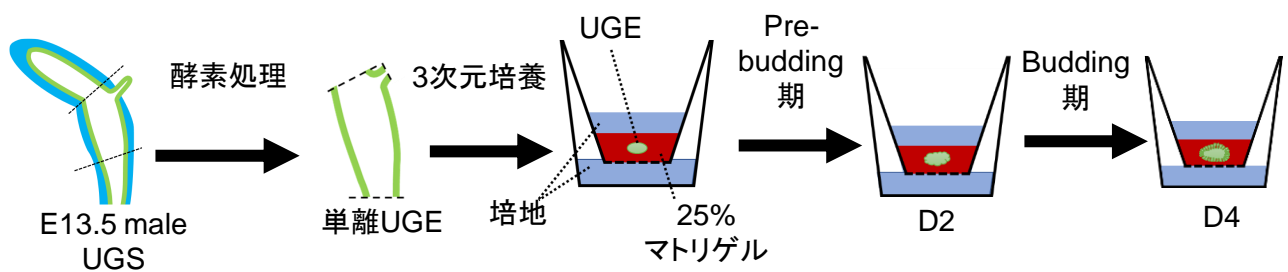


図11: E13.5オスUGEを用いた3次元培養による前立腺芽誘導の概略図

E13.5オスUGEは酵素処理によって周囲の間充織から単離され、25%マトリゲル中で3次元培養された。組織は初めの2日間はpre-budding期用培地(10 ng/mL FGF10、1 μg/mL ヘパリン、3 μM CHIR99021)で培養し、増殖因子の濃度を変動させてbudding条件で2日間培養を行った。培養後組織は4日目(D4)に回収した。

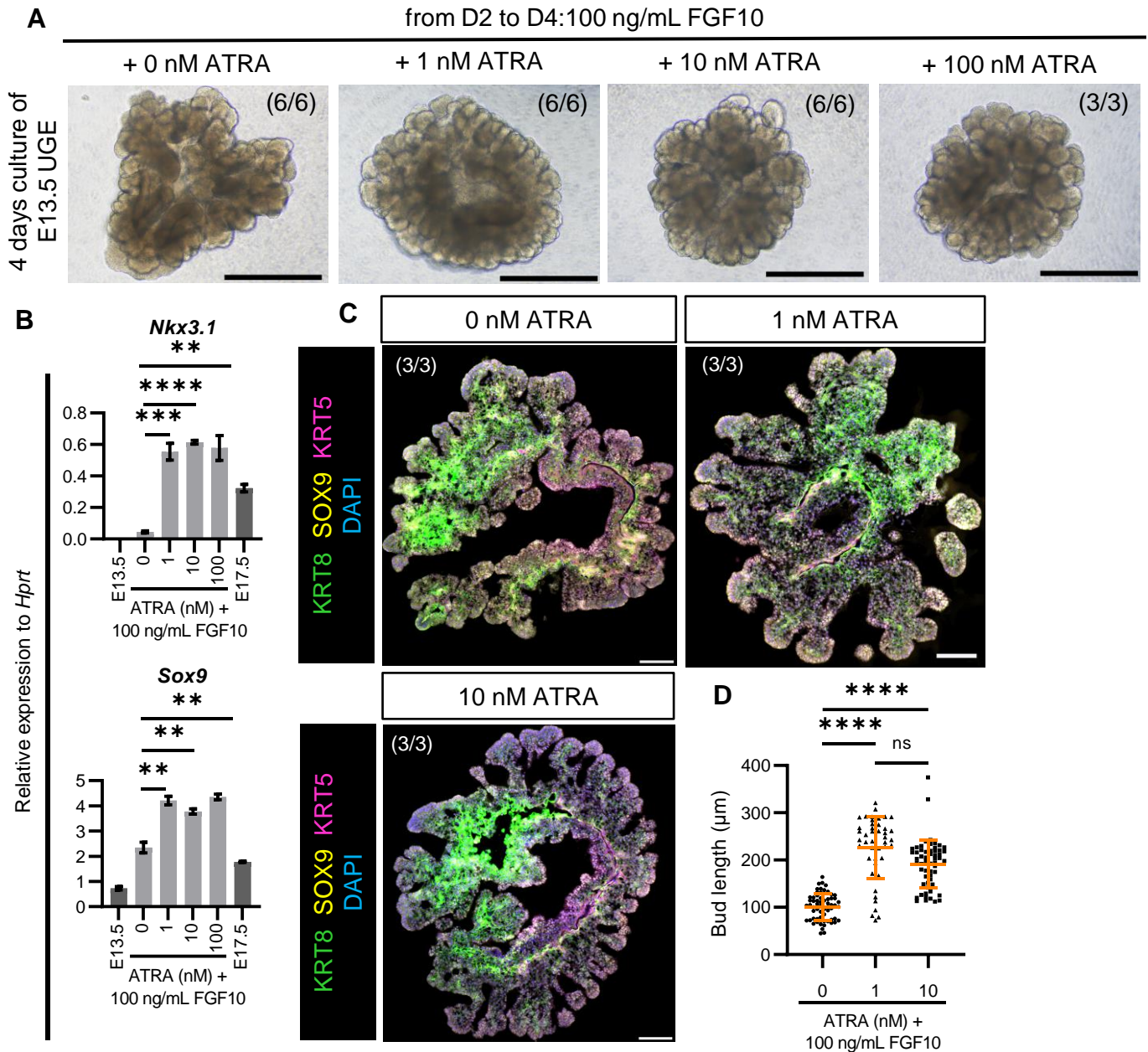


図12: Budding期におけるATRAの濃度と前立腺芽誘導の関係

(A) E13.5のオスマウスUGEを3 μM CHIR99021と10 ng/mL FGF10、1 $\mu\text{g/mL}$ ヘパリンで2日間培養し、その後100 ng/mL FGF10、1 $\mu\text{g/mL}$ ヘパリン存在下でATRA濃度を変動させて2日間培養した。写真右上の数字は提示された形態と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは500 μm を示す。(B) 培養後組織からRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて前立腺芽マーカー遺伝子の発現を解析した。各条件3個体の組織を使用し、標的遺伝子の発現量は*Hprt*の発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値 \pm 標準誤差を示す。**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ 、****は $P < 0.0001$ 、nsは $P > 0.05$ を示す。(C) Budding期においてATRAの濃度を変動させて培養した組織を用いた免疫蛍光染色から、上皮マーカーのKRT5(マゼンタ)、尿道管腔上皮マーカーのKRT8(緑)、budマーカーのSOX9(黄)の発現が示された。写真左上の数字は提示された染色像と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは100 μm を示す。(D) 免疫蛍光染色の結果をもとに、各条件3個体の組織を用いてbudの長さの測定を行った。エラーバーは平均値 \pm 標準偏差を、****は $P < 0.0001$ 、nsは $P > 0.05$ を示す。次ページに続く。

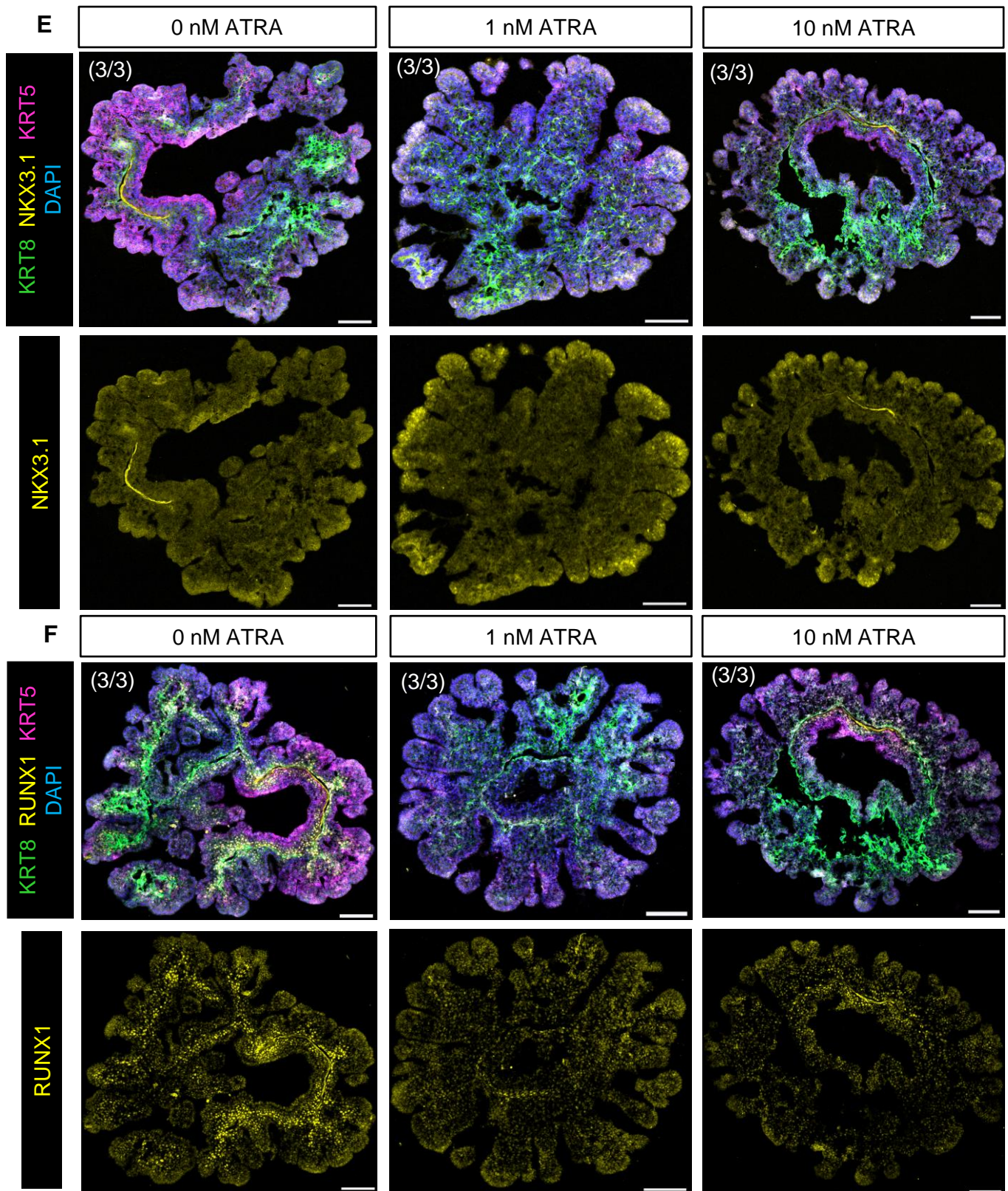


図12 続き

(E-F) 免疫蛍光染色から、ATRAの添加によって前立腺芽末端のマーカであるNKX3.1(図11E、黄)の発現がbud末端において高くなる事が示された。一方で、近位前立腺および尿道のマーカであるRUNX1 (図11F、黄)は、ATRA不含条件の管腔側細胞において高い発現を示した。写真左上の数字は提示された染色像と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは100 μ mを示す。

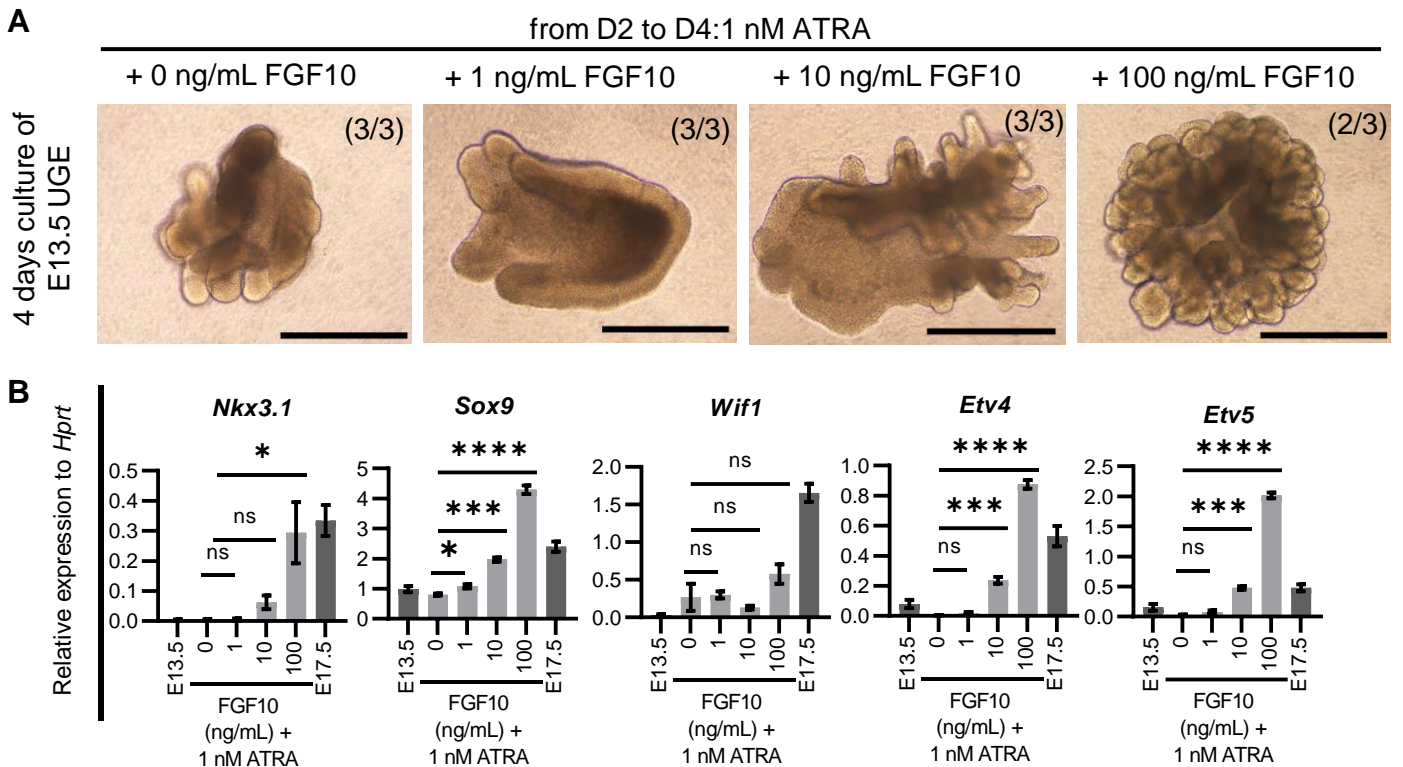


図13: Budding期におけるATRA存在下でのFGF10の濃度と前立腺芽誘導の関係
 (A) E13.5のオスマウスUGEを10 ng/mL FGF10、1 μ g/mLヘパリン、3 μ M CHIR99021で2日間培養し、その後1 nM ATRAと濃度を変動させたFGF10で2日間培養した。FGF10を含む条件では、1 μ g/mLヘパリンを含有した。写真右上の数字は提示された形態と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは500 μ mを示す。
 (B) 培養後組織からRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて前立腺芽マーカー遺伝子の発現を解析した。各条件3個体の組織を使用し、標的遺伝子の発現量は*Hprt*の発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値 \pm 標準誤差を示す。*はP<0.05、***はP<0.001、****はP<0.0001、nsはP>0.05を示す。

3-4:FGF10、カノニカル WNT シグナルおよびレチノイン酸シグナルはメス UGE に対しても前立腺の誘導能を有する。

Pre-budding 期の低濃度 FGF10 とカノニカル WNT シグナル、並びに budding 期の高濃度 FGF10 とレチノイン酸シグナルがオス UGE に対して前立腺芽を効率よく誘導できる事から、メス UGE を用いて前立腺芽の誘導を試行した。UGS を用いた先行研究では、E14.5 のメス UGS をテストステロン処理した際に *Nkx3.1* 陽性 bud の割合がオスと比べて低くなるとする報告がある(Keil et al., 2012a) ため、本研究ではより早期の E13.5 の UGE を使用し、オスとメスの UGE を同条件で培養して発生の様子を比較した。その結果、オスでもメスでも pre-budding 期並びに budding 期の誘導を経て効率よく出芽を誘導する事ができた(図 14A)。

続いて Pre-budding 期並びに budding 期を経たサンプルの遺伝子発現を解析するために、それぞれ培養 2 日目または 4 日目で組織を回収して RNA を抽出し、定量的逆転写 PCR を行った。Pre-budding 期の誘導に関しては、オス由来、メス由来の培養組織のどちらでも pre-budding 期用因子によって *Nkx3.1* と *Wif1* は発現が上昇し、*Krt4* は発現が低下した(図 14B)。なお、*Nkx3.1* と *Wif1* の発現は性

別によらず E15.5 オス UGE よりも高く、*Upk2* と *Krt4* の発現は E15.5 オス UGE よりも低い事から、pre-budding 用因子が性別によらず UGE を高効率で前立腺前駆細胞に誘導しつつ尿路上皮への分化を高効率で抑制する事が示唆された。Budding 期の誘導に関して、メス UGE 由来の培養組織においても *Nkx3.1*、*Sox9*、*Etv4*、*Etv5* の発現に上昇が認められた(図 14C)。*Wif1* の発現はオス由来、メス由来の培養組織のどちらでも E17.5 のオス UGE と比べると低い増加を示したが、その他の遺伝子に関しては性別によらず E17.5 のオス UGE の発現よりも高い発現を示しており、生体内では特定の 3次元環境が欠けているか前立腺発生を引き起こすシグナルが抑制されているかによって前駆状態が維持されている事が示唆される。以上の結果から、pre-budding 期における低濃度 FGF10 とカノニカル WNT、および budding 期における高濃度 FGF10 とレチノイン酸は、生体内で UGM が分泌するシグナル因子のように、UGE に前立腺芽を誘導する主たる因子である事が示唆された。

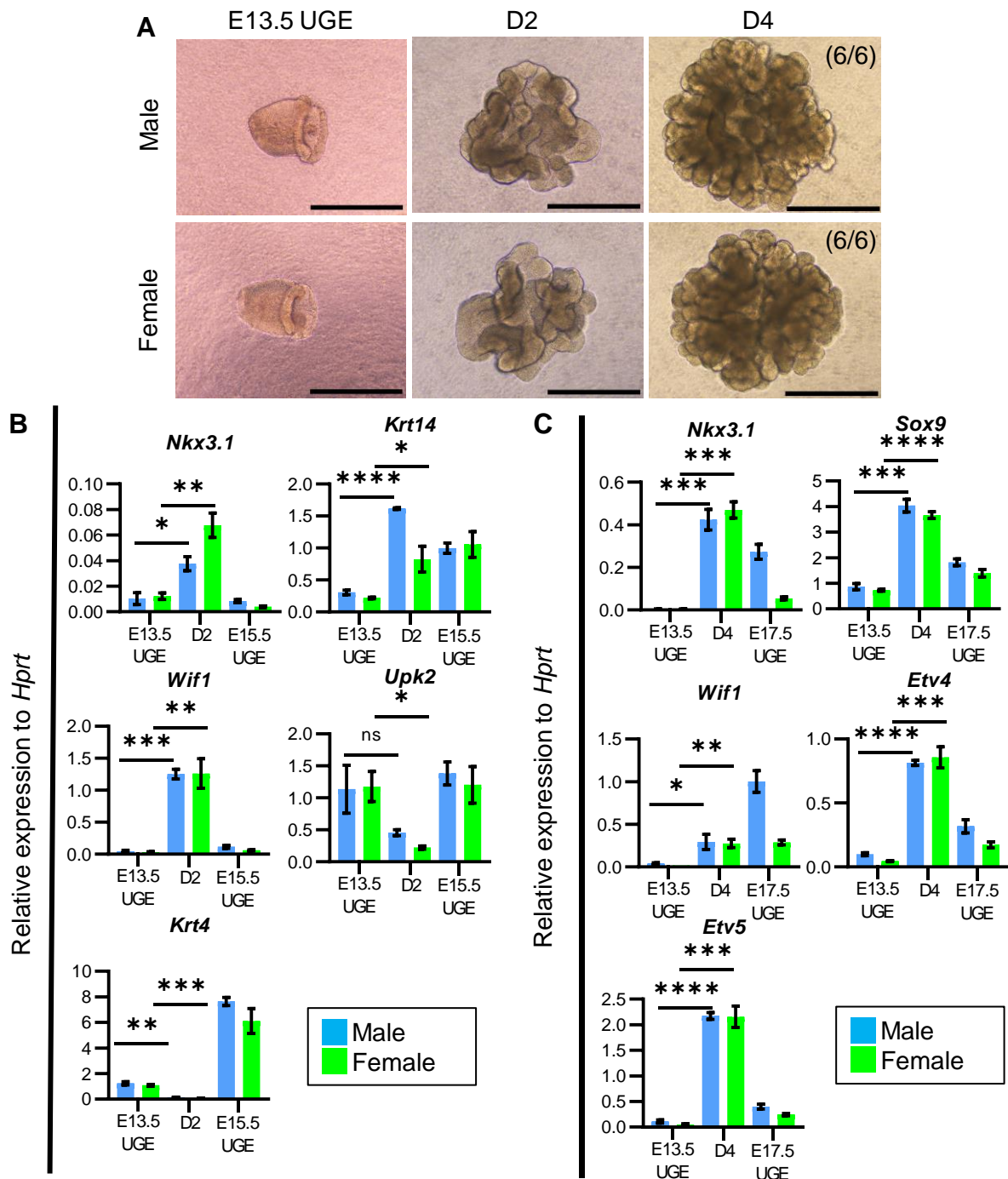


図14: FGF10、カノニカルWNTシグナル、レチノイン酸はメスUGEに対する前立腺芽誘導能を有する。

(A) E13.5のマウスUGEを10 ng/mL FGF10、1 µg/mLヘパリン、3 µM CHIR99021で2日間培養し、その後1 nM ATRA、100 ng/mL FGF10、1 µg/mLヘパリンで2日間培養した。写真右上の数字は提示された形態と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは500 µmを示す。(B-C) 培養後組織からRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて遺伝子発現の解析を行った。雌雄の培養組織をD2(Pre-budding期、図13B)、D4 (Budding期、図13C)で回収し、E13.5、E15.5およびE17.5の胚由来UGEと比較を行った。各条件3個体の組織を使用し、標的遺伝子の発現量はHprtの発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値±標準誤差を示す。*はP<0.05、**はP<0.01、***はP<0.001、****はP<0.0001、nsはP>0.05を示す。

3-5:誘導された前立腺芽は成熟した前立腺上皮に分化する能力を保持する。

E13.5 オス UGE の培養で得られた前立腺芽が成熟して腺構造を形成する事が出来るかどうかを調べるため、オス免疫不全マウスの腎被膜下への移植を行った。先行研究から、凝固した寒天培地上で様々な上皮を UGM と組み合わせて腎被膜下に移植する方法は確立しており (Cunha and Lung, 1978, Cunha et al., 1983, Boutin et al., 1991, Donjacour and Cunha, 1993)、その方法をもとに本研究では 2 日間低濃度 FGF10 と CHIR99021 で培養し、更に 2 日間 ATRA と高濃度 FGF10 で培養された UGE を E17.5 オス UGM と 0.4%寒天培地上で組み合わせて NOD-SCID マウスの腎被膜下に移植を行った(図 15)。なお、UGM は酵素処理によって単離するため、実験操作のコントロールとして E17.5 オス UGE を UGM と組み合わせるサンプルも併せて移植した。また、UGE は増殖因子を添加せずに pre-budding 期の培養を行うと成育が不良となる(図 4B, 6A)ため、pre-budding 期の条件間の比較として、4 日間培養の内 pre-budding 期において FGF10 または CHIR99021 のどちらかで培養された UGE も UGM と組み合わせて移植した。移植から 3 週間後に移植片を回

収して免疫蛍光染色を行ったところ、UGE の組織培養で誘導された前立腺芽は KRT8、NKX3.1 陽性の前立腺管腔細胞および KRT5、P63 陽性の前立腺基底細胞に分化できる事が示された (図 16A; F10, C)。また、移植片を用いた定量的逆転写 PCR による遺伝子発現の解析から、成熟した前立腺管腔細胞のマーカ遺伝子でもある *Nkx3.1*、およびマウス前立腺の分泌タンパク質の遺伝子である *Pbsn* (Matuo et al., 1985)、*Tgm4*、*Msemb*、*Sbp*(Thielen et al., 2007)の発現が移植後増加する事が示された(図 16B)。しかしながら免疫蛍光染色の結果から、FGF10(図 16A; F10)または CHIR99021(図 16A; C)のいずれかで pre-budding 期に培養された UGE からも前立腺管腔細胞および前立腺基底細胞の成熟が示されており、UGE から前立腺芽を誘導する条件を必要最低限なものとする事は出来なかった。しかしながら、培養によって誘導された前立腺芽が移植により成熟できた事から、本研究で示された条件が UGM からの作用に応答して成熟する能力を維持するために十分な条件である事が示された。

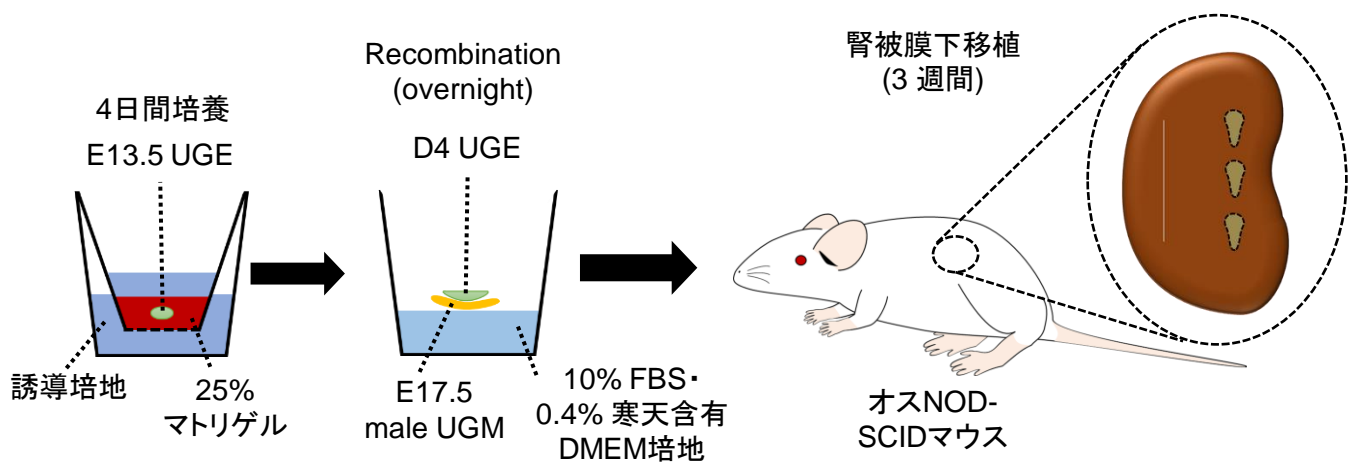


図15: 培養組織とUGMの組み合わせおよび腎被膜下移植実験の概略図

Pre-budding用、budding用培地で合計4日間培養されたE13.5オスUGE(D4 UGE)はE17.5 オスUGMと10% FBS・0.4% 寒天含有DMEM培地上で一晩組み合わせ、翌日オスNOD-SCIDマウスの腎被膜下に移植を行った。E17.5 オスUGEとUGMの分離および組み合わせは移植のコントロール条件として採集した。

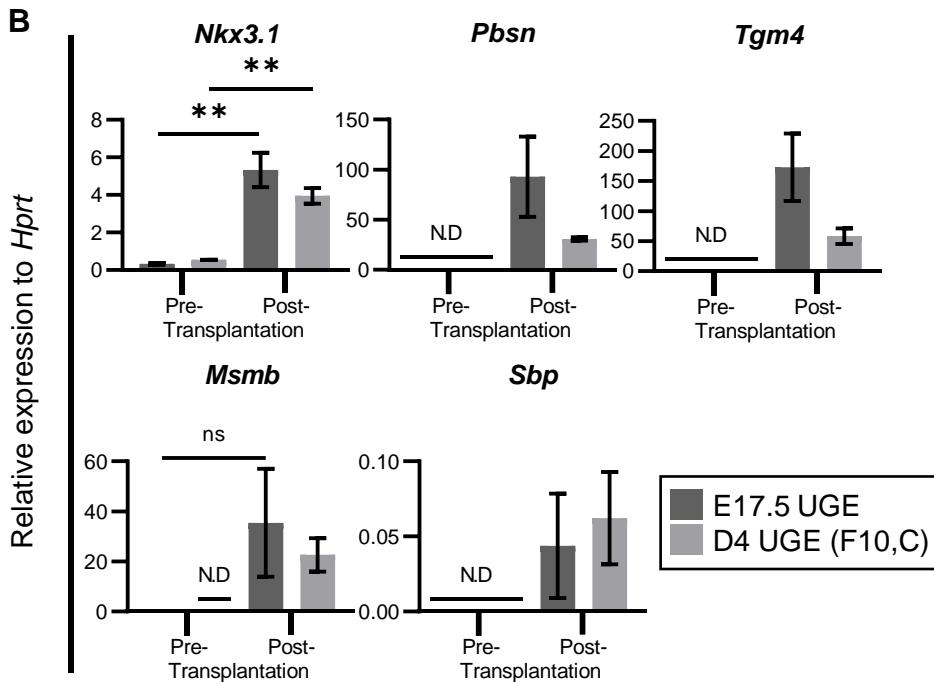
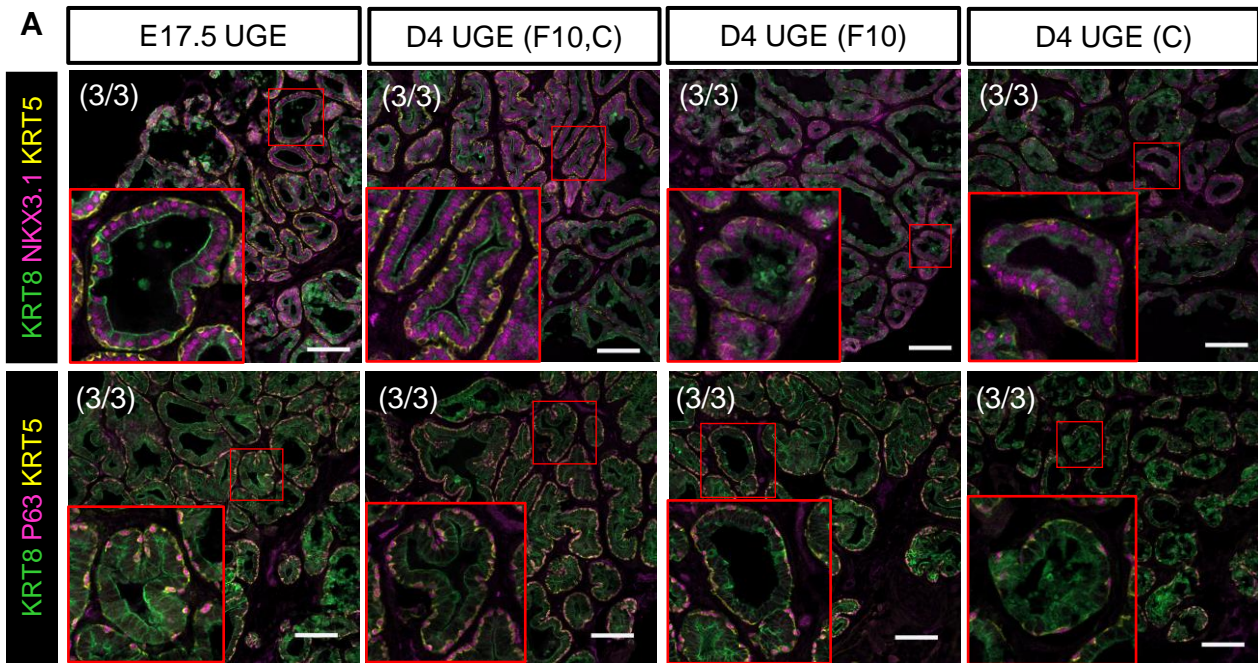


図16: *In vitro*で誘導された前立腺芽は成熟した前立腺への分化能を有する。

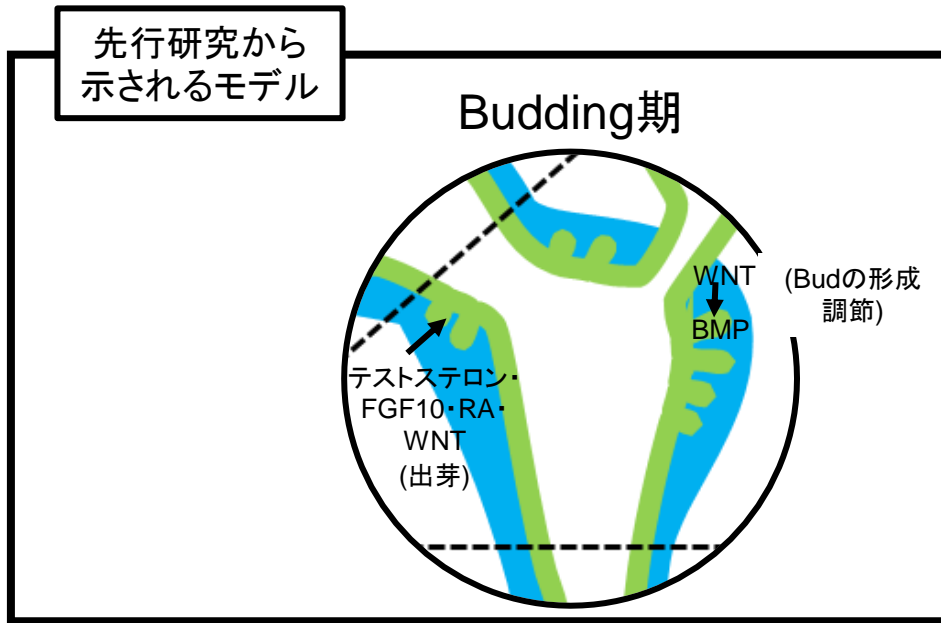
(A) 移植片の免疫蛍光染色から、*In vitro*で誘導された前立腺芽並びにE17.5オスUGEをE17.5オスUGMと組み合わせると前立腺管腔細胞マーカーのNKX3.1(上図マゼンタ)とKRT8(緑)、前立腺基底細胞マーカーのP63(下図マゼンタ)とKRT5(黄)の発現が検出される事が示された。"F10,C"はpre-budding期にFGF10(+ヘパリン)とCHIR99021で、"F10"および"C"はpre-budding期にそれぞれFGF10(+ヘパリン)、CHIR99021で培養された事を示す。写真左上の数字は提示された染色像と同様の表現型の割合を示す。スケールバーは100 μ mを示す。(B) 4日間培養後組織並びに移植片からRNAを抽出し、定量的逆転写PCRを用いて*Nkx3.1*および前立腺分泌マーカー遺伝子の発現を解析した。各条件3移植片を使用し、標的遺伝子の発現量は*Hprt*の発現量を用いて正規化を行った。エラーバーは平均値 \pm 標準誤差を、N.D.は未検出のサンプルを示す。**は $P < 0.01$ 、nsは $P > 0.05$ を示す。

考察

UGS の組織培養はこれまで前立腺発生における上皮-間充織間相互作用の研究に多く用いられており、それらの先行研究によって前立腺芽の形成に寄与する様々な因子が特定されてきた。例として、EGF, KGF, TGF- α はアンドロゲン不応マウス(Tfm マウス)UGS に対して(Mizuno and Saito, 1996)、EGF, TGF- α はラット UGS に対して(Saito and Mizuno, 1997)、アンドロゲン不含培地における前立腺芽の誘導能を有すると報告されている。しかしながら、UGM から分泌されるシグナル因子は多様であり、上述のような UGS の組織培養においては、UGE に対する別のシグナルの間接的影響を無視できない。このため、シグナル因子の UGE に対する直接的作用を解析するためには、UGM からの UGE の分離が必要となる。これまで、マウス UGE の単離培養による出芽の誘導は一報のみ報告されており、その報告では E15.5 UGE において DHT、FGF7、FGF10 によって出芽が誘導されたと記述されている(Ghosh et al., 2011)。しかしながら、E16.5 の出芽前の UGE において雌雄間で *Wif1* の発現に差異が生じている(Keil et al., 2012b)ように、オスの胚発生において出芽前の時点で既に UGE の前立腺前駆細胞への分

化が進行しているため、出芽前の上皮の分化に関してもより詳細に解析する必要がある。本研究では、UGE を単離培養する事によって UGE の分化に対するシグナル因子の直接的影響の解明、並びに早期の pre-budding 期である E13.5 の UGE を使用する事によって pre-budding 期における分化制御機構の解明が可能となった。その結果、単離 UGE を前立腺芽に分化させるためにはテストステロンは不要であり、pre-budding 期の分化にはカノニカル WNT と低濃度 FGF10 が、その後の budding 期の分化には ATRA と高濃度 FGF10 が必要である事が判明した(図 17)。

先行研究から
示されるモデル



本研究での解析を
基にしたモデル

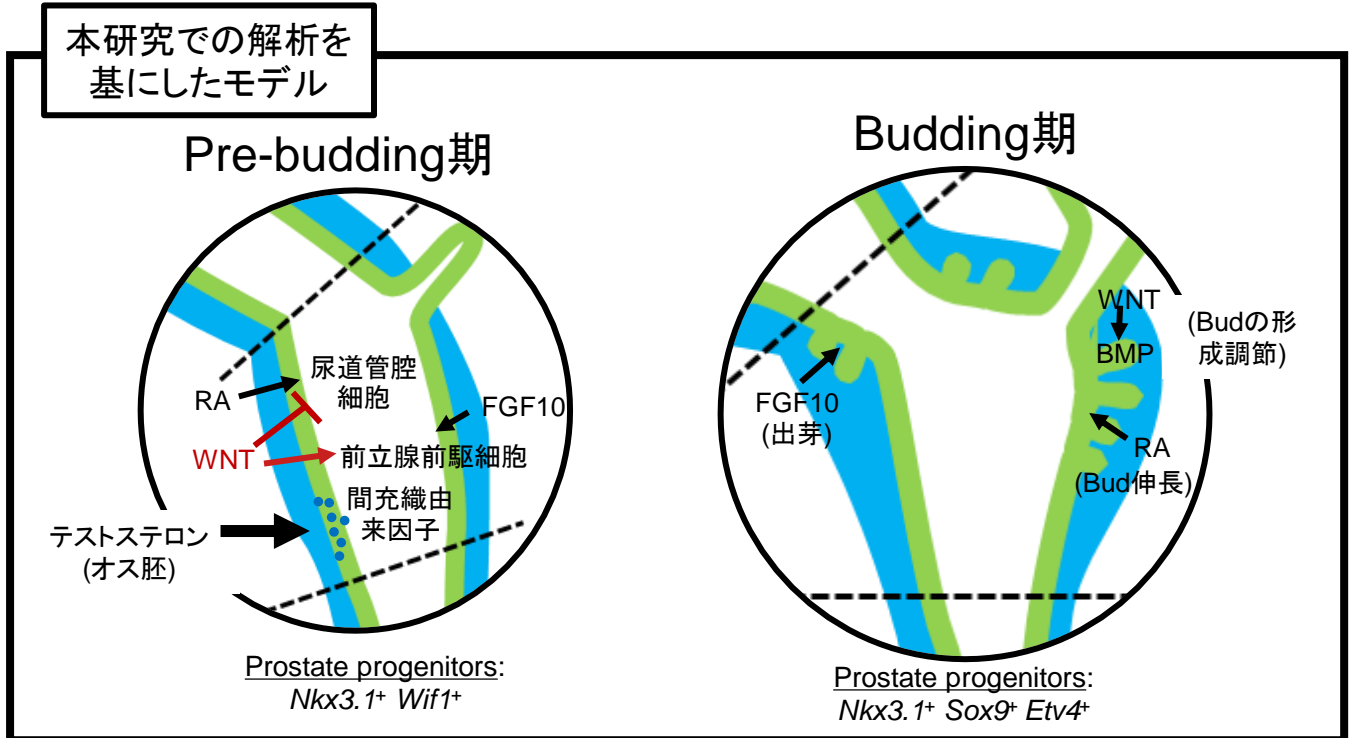


図17: マウス胚発生における前立腺分化のモデル図

これまでの先行研究からは、テストステロン、FGF10、レチノイン酸(RA)、WNTシグナルにより前立腺芽の形成が誘導され、BMP分泌を介したカノニカルWNTシグナルのbudding制御までが判明していた。本研究から、Pre-budding期(E13.5-15.5)において、テストステロンがUGMにUGEの前立腺前駆細胞への分化(*Nkx3.1*, *Wif1*の発現上昇)を誘発する因子の分泌を誘導し、レチノイン酸(RA)とカノニカルWNTシグナルはそれぞれ尿道管腔細胞の分化、前立腺前駆細胞の分化の促進に寄与する事、低発現のFGF10はカノニカルWNTシグナルによる前立腺前駆細胞の分化を補助する事が判明した。また、Budding期(E15.5-17.5)においては、FGF10は*Nkx3.1*, *Sox9*, *Etv4*陽性前立腺芽を誘導し、RAは前立腺芽の伸長および前立腺芽遺伝子の発現上昇を誘因する事が判明した

4-1:テストステロンは UGM が分泌するシグナル因子を介して間接的に前立腺芽を UGE に誘導する。

テストステロン並びにその誘導体である DHT は UGS の組織培養において前立腺芽の誘導に用いられており (Lamm et al., 2001, Donjacour et al., 2003, Cook et al., 2007, Kuslak and Marker, 2007, Ghosh et al., 2011, Simons et al., 2012, Bryant et al., 2014)、本研究で紹介した E13.5 UGS を用いた組織培養(図 3)でも、テストステロンが出芽に必要である事が示された。しかしながら、UGE の組織培養ではテストステロンの存在は初期前立腺遺伝子の発現に影響せず、CHIR99021、ATRA および FGF10 によって前立腺前駆細胞、および前立腺芽のマーカー遺伝子発現が上昇した。この点に関して先行研究で、野生型 UGM とアンドロゲン不応マウス(Tfm マウス)UGE を組み合わせて前立腺様の腺構造を誘導できる事が示されており (Cunha and Lung, 1978)、少なくとも腺構造の誘導には UGE に発現する *Ar* は不要である事が示唆される。一方で、野生型ラット UGM と組み合わせた Tfm マウスの膀胱および尿道の上皮組織からは、腺構造の誘導能が低下し、分泌タンパク質である mDLP が産生されないという報告(Donjacour and Cunha. 1993)もあり、UGE の

Ar は分泌タンパク質遺伝子の発現に示される前立腺の成熟に必要である事が示唆される。先行研究と本研究の結果から、前立腺芽の誘導においてテストステロンは UGM からのシグナル因子の分泌を活性化させる事により、前立腺芽を間接的に誘導する事が推測される。また、UGE に対するアンドロゲンシグナルは少なくとも前立腺の出芽並びに前立腺遺伝子の発現増加には必要ではない事が示された。

4-2: UGE 分化におけるレチノイン酸、WNT シグナル、FGF10 の役割

マウスの胚発生では、管腔側の UGE 細胞は *Upk* や *Krt4* を高く発現する尿道管腔細胞に分化し、尿道管腔細胞は更に尿路上皮に分化する (Abler et al., 2011, Habuka et al., 2015, Joseph et al., 2020)。尿道と同様に尿路上皮を有する膀胱においても、レチノイン酸シグナルは尿路上皮で活性化しており、レチノイン酸受容体 α (*Rara*) のドミナントネガティブ変異によって *Upk* の発現および尿路上皮の再生が阻害される事が報告されている (Gandhi et al., 2013)。加えてマウス胚性幹細胞においても、ATRA が *Upk* 遺伝子の発現を濃度依存的に上昇させる事 (Mauney et al., 2010) が報告されている。別種の上皮細胞

に関しても、E13.5 マウス胚由来顎下唾液腺においてレチノイン酸シグナルを受容体の阻害剤である BMS493 を用いて阻害すると、基底細胞のマーカ遺伝子である *Krt5* および *Krt14* の発現が上昇する事が報告されている (Abashev et al., 2017)。本研究においても、pre-budding 期での ATRA 処理は尿道管腔細胞並びに尿路上皮のマーカ遺伝子である *Upk2*、*Krt4* の発現を向上させる一方で、尿道基底細胞のマーカである *Krt14* の発現を抑制した事から、レチノイン酸シグナルを介した UGE の尿道管腔細胞への分化は顎下唾液腺を含む他の種類の細胞においても用いられる分子制御機構によって制御されている事が示唆される。

管腔側の UGE 細胞とは異なり、基底側の UGE 細胞層は *Krt14*, *Trp63* 陽性の尿道基底細胞に分化する (Abler et al., 2011, Mehta et al., 2013)。Pre-budding 期の発生において、膀胱上皮、UGE に発現する *Shh* 陽性細胞における β カテニンのノックアウトは *Krt14* 陽性尿道基底細胞の発現を著しく損なった。一方で E13.5 から E14.5 にタモキシフェン処理によって *Shh* 陽性細胞において β カテニンのノックアウトを行うと、*Krt14* 陽性尿道基底細胞の分化および維持が部分的に抑制される事 (Mehta et al., 2013) から、カノニカル WNT シ

グナルが *Krt14* 陽性尿道基底細胞の発生に寄与する事が示唆される。一方で、 β カテニンの過剰発現は *Nkx3.1* 陽性前立腺の出芽を抑制させる(Mehta et al., 2013)ため、適切なカノニカル WNT シグナル強度が前立腺発生に重要である事が示唆される。本研究では、単離 UGE に対するカノニカル WNT シグナルの活性化は尿道管腔細胞並びに尿路上皮のマーカー遺伝子の発現を著しく低下させる一方で *Krt14* の発現を維持し、前立腺前駆細胞のマーカー遺伝子の発現を増加させた。一方で、CHIR99021 の濃度が高濃度の場合では pre-budding 期において *Nkx3.1* の発現が減少し、budding 期において出芽が抑制されるという結果が得られ、先行研究で示された、適切なカノニカル WNT シグナル強度が前立腺前駆細胞の分化に重要であるという報告を支持するものとなった。加えて、単離 UGE を用いた Pre-budding 期での誘導においては、*Wif1*、*Upk2*、*Krt4* の発現に関しては FGF10 の作用より CHIR99021 の作用がより大きく影響した一方で、*Nkx3.1*、*Krt14* の発現は FGF10 の作用と CHIR99021 の作用の双方によって大きく影響した。この事から、単離 UGE において尿道管腔細胞および尿路上皮への分化の抑制には主にカノニカル WNT シグナルが寄与する一方で、尿道基底細胞および前立腺前

駆細胞への分化の促進にはカノニカル WNT シグナルと FGF10 が共に重要である事が推測される。

上述の結果から、pre-budding 期の UGE の発生において尿道管腔細胞と尿道基底細胞のパターニングがそれぞれレチノイン酸とカノニカル WNT シグナルによって制御される事が示唆された。また、増殖因子を含まない条件で UGE を培養しても前立腺芽の形成が起こらない事から、UGE の分化を促すシグナル因子が周囲の間充織から分泌されている事が支持された。

FGF10 は E17.5 マウス UGM (Abler et al., 2011) およびラット新生児の前立腺周辺の間充織(Thomson and Cunha, 1999)に発現する増殖因子であり、前立腺芽の形成に不可欠とされる (Donjacour et al., 2003)。また野生型マウス UGS の組織培養では、テストステロン処理によって *Fgf10* の発現が上昇する事が示されている (Kuslak and Marker, 2007)。本研究では、pre-budding 期並びに budding 期において、FGF10 の濃度が単離 UGE の前立腺芽への分化に重要である事が示された。しかしながら、UGS の組織培養においてテストステロン無添加で FGF10 を添加した場合には前立腺芽の形成が生じなかったとする報告がある (Donjacour et al., 2003)。この結果に関しては、UGM から分泌され

る、INHBAのような抑制因子による阻害が原因として考えられる。INHBAに関しては、メス UGM においてはオスと比較して *Inhba* の発現が高く、DHT をメス UGS に添加すると *Inhba* の発現が低下する事が報告されている (Bryant et al., 2014)。更に、*Inhba* 変異マウスのメス UGE では異所的な出芽が生じる事から、INHBA のような抑制因子がアンドロゲンシグナル不在状態で出芽を強く抑制し、アンドロゲンシグナル存在下で抑制因子の分泌が低下する事により出芽が生じるという機構が存在する事が推測される。本研究では、UGE の単離培養によって INHBA のような間充織由来の出芽阻害因子の効果が除去された事により、テストステロン不在下での出芽誘導が可能となった事が推測される。

レチノイン酸シグナルに関して、レチノイン酸合成酵素の一種である *Aldh1a1* の発現は E15.5 UGM においてオスでメスよりも高く、ALDH 阻害剤の DEAB、あるいはレチノイン酸受容体阻害剤である BMS493 でメス UGS を処理すると、DHT 存在下にもかかわらず *Nkx3.1* 陽性前立腺芽の形成が阻害される事が報告されている (Bryant et al., 2014)。加えて、bud の数および大きさは DHT 存在下で培養されたメス UGS から誘導された場合よりも小さいものの、レチノイン

酸処理によって DHT 非存在下でメス UGS に *Nkx3.1* 陽性 bud を誘導できる事(Bryant et al., 2014)から、レチノイン酸は不十分ではあるものの、*Nkx3.1* 陽性 bud に対する誘導能を保有する事が示唆される。本研究から、UGE の単独培養においてレチノイン酸が出芽には不要である一方で前立腺芽における前立腺遺伝子の発現上昇に必要である事が示された。上述の結果から、FGF10 が出芽に必要であり、レチノイン酸が前立腺芽遺伝子の *Nkx3.1* と *Sox9* の発現上昇および前立腺芽の伸長に重要である事が示された。加えて、出芽を誘導するためには、高濃度の FGF10 が必要となる事が示された。

更に、本研究では UGE を UGM から分離して培養する事により、前立腺芽形成に十分な因子の特定も可能となった。UGS を用いた組織培養では、EGF, KGF, TGF- α がアンドロゲン不含条件で前立腺の出芽を誘導したとする報告は存在する(Mizuno and Saito, 1996, Saito and Mizuno, 1997)が、UGM を含んだ培養では間充織由来の BMP シグナル(Lamm et al., 2001, Cook et al., 2007)、カノニカル WNT シグナル(Simons et al., 2012, Kruithof-de Julio et al., 2013)、ノンカノニカル WNT シグナル(Allgeier et al., 2008)およびアクチビンシグナル(Bryant et al., 2014)の影響を除外できない。本研究では、UGE の単離によっ

て上述の因子の影響を除去し、投与した因子の影響のみを評価する事が可能となった。なお、本研究で使用したマトリゲルは増殖因子を低減させたものであるが、マトリゲル中に前立腺の分化に作用する因子が残存している可能性も考えられる。しかしながら、増殖因子の添加が行われていない条件では UGE は出芽できないため(図4B)、マトリゲル中に残存する因子は前立腺の分化に大きな影響を与えないと推測される。以上の結果から、FGF10、レチノイン酸、カノニカル WNT シグナルが UGE を前立腺芽に誘導するために十分な因子である事が示唆された。

4-3: 確立された前立腺誘導条件は bud の成熟前立腺への分化保持に十分な条件である。

組織の前立腺への分化能を評価するための方法として、UGM と組み合わせて免疫不全マウス内で成熟させる方法が確立されており (Cunha and Lung, 1978, Cunha et al., 1983, Boutin et al., 1991, Donjacour and Cunha, 1993)、本研究においても誘導された前立腺芽の成熟能評価のために UGM との組み合わせとそれに続く腎被膜下移植が行われた。移植実験の結果から、低濃度 FGF10 と CHIR99021 で 2 日間

培養後、高濃度 FGF10 と ATRA で更に 2 日間培養して得られた前立腺芽が NKX3.1、KRT8 陽性の前立腺管腔細胞、並びに P63、KRT5 陽性の前立腺基底細胞に分化する事が示された。しかしながら、pre-budding 期において FGF10 あるいは CHIR99021 のいずれかで培養された組織を用いた実験から、上皮の成熟は pre-budding 期の誘導条件によらずに起きる事が観察された。得られた結果の原因としては、UGE が成熟能を強固に保持する事と、UGM が強力な前立腺誘導能を保持する事が考えられる。先行研究から、UGM と組み合わせたマウス膀胱上皮は少なくとも生後 10 日目由来までは前立腺への分化転換能力を保持する事が考えられる (Cunha. 1975)、UGE が本研究における各条件によらずに、使用された発生ステージ内では成熟能を保持していた事が示唆される。また、UGM の誘導能に関して、UGM が成体膀胱上皮を含めた非前立腺上皮に対して前立腺への分化転換を誘導した事(Cunha. 1983)から、UGM 自体の強力な誘導能が推測される。そのため、本研究からは誘導因子の前立腺成熟に対する必要性を示す事は出来なかった。しかしながら本研究からは、誘導された bud が成熟前立腺に分化する能力は失われていなかった為、特定された誘導因子が前立腺に分化する能力を

保持する為に十分である事が示唆された。

4-4: 結論

本研究により、UGE の前立腺芽への分化誘導に十分なシグナル因子を pre-budding 期、および budding 期の各段階で解明する事ができた。本研究で得られた知見は、ヒト多能性幹細胞を使用した前立腺組織の人工合成といった、将来の再生医療に応用される事が期待される。近年の研究で前立腺管腔細胞には *Sca-1*、*Runx1* を発現する近位前立腺管腔細胞と *Nkx3.1* 陽性の遠位前立腺管腔細胞に分かれ(Kwon et al., 2016, Mevel et al., 2020)、このうち遠位前立腺管腔細胞が前立腺の分泌に主として寄与する事が示唆されている(Kwon et al., 2020)。この事から、前立腺に関する再生医療において、誘導される組織が遠位であるかを評価する必要性が生じる事が予想される。本研究から、遠位前立腺のマーカー遺伝子である *Nkx3.1* の発現上昇にレチノイン酸が寄与する事が示された事から、本研究で得られた知見が遠位、近位の発生機構の更なる解明につながる事が期待される。加えて、UGE の単離培養を用いた *in vitro* 前立腺芽誘導方法は、前立腺芽の伸長、前立腺芽内における管腔構造の形成お

よび思春期における前立腺管腔細胞、前立腺基底細胞の分化に関わる分子機構の解明につながる事も期待される。

引用文献

Abashev, T.M., Metzler, M.A., Wright, D.M. and Sandell, L.L. (2017) Retinoic acid signaling regulates *Krt5* and *Krt14* independently of stem cell markers in submandibular salivary gland epithelium. *Developmental Dynamics*. 246. 135-147.

Abler, L.L., Keil, K.P., Mehta, V., Joshi, P.S., Schmitz, C.T. and Vezina, C.M. (2011) A high-resolution molecular atlas of the fetal mouse lower urogenital tract. *Developmental Dynamics*. 240. 2364-2377.

Allgeier, S.H., Lin, T.M., Vezina, C.M., Moore, R.W., Fritz, W.A., Chiu, S.Y., Zhang, C. and Peterson, R.E. (2008) WNT5A selectively inhibits mouse ventral prostate development. *Developmental Biology*. 324. 10-17.

Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A.A., Sciavolino, P.J., Kim, M., Desai, N., Young, P., Norton, C.R., Gridley, T., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., Abate-Shen, C. and Shen, M.M. (1999) Roles for *Nkx3.1* in prostate development and cancer. *Genes & Development*. 13. 966-977.

Boutin, E.L., Battle, E. and Cunha, G.R. (1991) The response of female urogenital tract epithelia to mesenchymal inductors is restricted by the germ layer origin of the epithelium: prostatic inductions. *Differentiation*. 48. 99-105.

Brent, A.E. and Tabin, C.J. (2004) FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors *Pea3* and *Erm* to regulate scleraxis expression. *Developmental*. 131. 3885-3896.

Bryant, S. L., Francis, J. C., Lokody, I. B., Wang, H., Risbridger, G. P., Loveland, K. L. and Swain, A. (2014) Sex specific retinoic acid signaling is required for the initiation of urogenital sinus bud development. *Developmental Biology*. 395. 209-217.

Cook, C., Vezina, C.M., Allgeier, S.H., Shaw, A., Yu, M., Peterson, R.E. and Bushman, W. (2007) Noggin is required for normal lobe patterning and ductal budding in the mouse prostate. *Developmental Biology*. 312. 217-230.

Crocoll, A., Zhu, C.C., Cato, A.C.B. and Blum, M. (1998) Expression of androgen receptor mRNA during mouse embryogenesis. *Mech Dev*. 72. 175–178.

Cunha, G.R. (1975) Age-Dependent Loss of Sensitivity of Female Urogenital Sinus to Androgenic Conditions as a Function of the Epithelial-Stromal Interaction in Mice. *Endocrinology*. 97. 665-673.

Cunha, G.R. and Lung, B. (1978) The possible influence of temporal factors in androgenic responsiveness of urogenital tissue recombinants from wild-type and androgen-insensitive (Tfm) mice. *Journal of Experimental Zoology*. 205. 181-193.

Cunha, G.R., Fujii, H., Neubauner, B.L., Shannon, J.M., Sawyer, L. and Reese, B.A. (1983) Epithelial-mesenchymal interactions in prostatic development. I. Morphological observations of prostatic induction by urogenital sinus mesenchyme in epithelium of the adult rodent urinary bladder. *Journal of Cell Biology*. 96. 1662-1670.

Cunha, G.R., Vezina, C.M., Isaacson, D., Ricke, W.A., Timms, B.G., Cao, M., Franco, O. and Baskin, L.S. (2018) Development of the human prostate. *Differentiation*. 103. 24-45.

Donjacour, A.A. and Cunha, G.R. (1993) Assessment of prostatic protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. *Endocrinology*. 132. 2342-2350.

Donjacour, A.A., Thomson, A.A. and Cunha, G.R. (2003) FGF-10

plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Developmental Biology*. 261, 39-54.

Franklin, R. B., Milon, B., Feng, P. and Costello, L. C. (2005) Zinc and zinc transporters in normal prostate and the pathogenesis of prostate cancer. *Frontiers in Bioscience*. 10. 2230–2239.

Gandhi, D., Molotkov, A., Batourina, E., Schneider, K., Dan, H., Reiley, M., Laufer, E., Metzger, D., Liang, F., Liao, Y., Sun, T.T., Aronow, B., Rosen, R., Mauney, J., Adam, R., Rosselot, C., Van Batavia, J., McMahan, A., McMahan, J., Guo, J.J. and Mendelsohn, C. (2013) Retinoid signaling in progenitors controls specification and regeneration of the urothelium. *Developmental Cell*. 26. 469-482.

Georgas, K.M., Armstrong, J., Keast, J.R., Larkins, C.E., McHugh, K.M., Southard-Smith, E.M., Cohn, M.J., Batourina, E., Dan, H., Schneider, K., Buehler, D.P., Wiese, C.B., Brennan, J., Davies, J.A., Harding, S.D., Baldock, R.A., Little, M.H., Vezina, C.M. and Mendelsohn, C. (2015) An illustrated anatomical ontology of the developing mouse lower urogenital tract. *Development (Cambridge)*. 142. 1893–1908.

Ghosh, S., Lau, H., Simons, B. W., Powell, J. D., Meyers, D. J., De Marzo, A. M., Berman, D. M. and Lotan, T. L. (2011) PI3K/mTOR signaling regulates prostatic branching morphogenesis. *Developmental Biology*. 360. 329-342.

Habuka, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Pontén, F., Yamamoto, T. and Uhlen, M. (2015) The urinary bladder transcriptome and proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *PLoS ONE*. 10. e0145301.

Haraguchi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M., Sekine, K., Kawano, H., Kato, S., Ueno, N. and Yamada, G. (2000) Molecular analysis of external genitalia

formation: the role of fibroblast growth factor (*Fgf*) genes during genital tubercle formation. *Development*. 127. 2471–2479.

Huang, Y.C., Chen, F. and Li, X. (2016) Clarification of mammalian cloacal morphogenesis using high-resolution episcopic microscopy. *Developmental Biology*. 409. 106–113.

Huang, Z., Hurley, P.J., Simons, B.W., Marchionni, L., Berman, D.M., Ross, A.E. and Schaeffer, E.M. (2012) *Sox9* is required for prostate development and prostate cancer initiation. *Oncotarget*. 3. 651–663.

Joseph, D.B., Henry, G.H., Malewska, A., Iqbal, N.S., Ruetten, H.M., Turco, A.E., Abler, L.L., Sandhu, S.K., Cadena, M.T., Malladi, V.S., Reese, J.C., Mauck, R.J., Gahan, J.C., Hutchinson, R.C., Roehrborn, C.G., Baker, L.A., Vezina, C.M. and Strand, D.W. (2020) Urethral luminal epithelia are castration-insensitive cells of the proximal prostate. *Prostate*. 80. 872-884.

Keil, K.P., Mehta, V., Abler, L.L., Joshi, P.S., Schmitz, C.T. and Vezina, C.M. (2012a) Visualization and quantification of mouse prostate development by in situ hybridization. *Differentiation*. 84. 232-239.

Keil K.P., Mehta, V., Branam, A.M., Abler, L.L., Buresh-Stiemke, R.A., Joshi, P.S., Schmitz, C.T., Marker, P.C. and Vezina, C.M. (2012b) Wnt inhibitory factor 1 (*Wif1*) is regulated by androgens and enhances androgen-dependent prostate development. *Endocrinology*. 153. 6091-6103.

Keil, K.P., Abler, L.L., Laporta, J., Altmann, H.M., Yang, B., Jarrard, D.F., Hernandez, L.L. and Vezina, C.M. (2014) Androgen receptor DNA methylation regulates the timing and androgen sensitivity of mouse prostate ductal development. *Developmental Biology*. 396. 237–245

Kruithof-de Julio, M., Shibata, M., Desai, N., Reynon, M., Halili, M.V., Hu, Y.P., Price, S.M., Abate-Shen, C. and Shen, M.M. (2013). Canonical Wnt signaling regulates Nkx3.1 expression and luminal epithelial differentiation during prostate organogenesis. *Developmental Dynamics*. 242. 1160–1171.

Kuslak, S.L. and Marker, P.C. (2007) Fibroblast growth factor receptor signaling through MEK-ERK is required for prostate bud induction. *Differentiation*. 75. 638-651.

Kwon, O.J., Zhang, L. and Xin, L. (2016) Stem Cell Antigen-1 Identifies a Distinct Androgen-Independent Murine Prostatic Luminal Cell Lineage with Bipotent Potential. *Stem Cells* 34. 191–202.

Kwon, O.J., Choi, J.M., Zhang, L., Jia, D., Li, Z., Zhang, Y., Jung, S.Y., Creighton, C.J. and Xin, L. (2020) The Sca-1+ and Sca-1– mouse prostatic luminal cell lineages are independently sustained. *Stem Cells*. 38. 1479–1491.

Lamm, M.L., Podlasek, C.A., Barnett, D.H., Lee, J., Clemens, J.Q., Hebner, C.M. and Bushman, W. (2001) Mesenchymal factor bone morphogenetic protein 4 restricts ductal budding and branching morphogenesis in the developing prostate. *Developmental Biology*. 232. 301–314.

Lee, D.H., Olson, A.W., Wang, J., Kim, W.K., Mi, J., Zeng, H., Le, V., Aldahl, J., Hiroto, A., Wu, X. and Sun, Z. (2021) Androgen action in cell fate and communication during prostate development at single-cell resolution. *Development*. 148. dev196048

Mao, J., McGlinn, E., Huang, P., Tabin, C.J. and McMahon, A.P. (2009) Fgf-dependent *Etv4/5* activity is required for posterior restriction of Sonic Hedgehog and promoting outgrowth of the vertebrate limb. *Developmental Cell*. 16. 600-606.

Matuo, Y., Nishi, N., Muguruma, Y., Yoshitake, Y., Kurata, N. and Wada, F. (1985) Localization of prostatic basic protein (“probasin”) in the rat prostates by use of monoclonal antibody. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 130. 293–300.

Mauney, J.R., Ramachandran, A., Yu, R.N., Daley, G.Q., Adam, R.M. and Estrada, C.R. (2010) All-trans retinoic acid directs urothelial specification of murine embryonic stem cells via GATA4/6 signaling mechanisms. *PLoS ONE*. 5. e11513.

Mehta, V., Schmitz, C.T., Keil, K.P., Joshi, P.S., Abler, L.L., Lin, T., Taketo, M.M., Sun, X. and Vezina, C.M. (2013) Beta-catenin (CTNNB1) induces Bmp expression in urogenital sinus epithelium and participates in prostatic bud initiation and patterning. *Developmental Biology*. 376. 125–135.

Mevel, R., Steiner, I., Mason, S., Galbraith, L.C.A., Patel, R., Fadlullah, M.Z.H., Ahmad, I., Leung, H.Y., Oliveira, P., Blyth, K., Baena, E. and Lacaud, G. (2020) *Runx1* marks a luminal castration-resistant lineage established at the onset of prostate development. *Elife* 9, 1–27.

Mizuno, T and Saito, M. (1996) Induction of prostatic buds in the urogenital sinus in Tfm mouse embryos without androgen receptors. *C R Seances Soc Biol Fil*. 190. 497-501

Nowotschin, S., Ferrer-Vaquer, A. and Hadjantonakis, A.K. (2010) Imaging mouse development with confocal time-lapse microscopy. *Methods in Enzymology*. 476. 351–377.

Pampalakis G. and Sotiropoulou G. (2007) Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 1776. 22–31.

Perriton, C.L., Powles, N., Chiang, C., Maconochie, M.K. and Cohn,

M.J. (2002) Sonic hedgehog signaling from the urethral epithelium controls external genital development. *Developmental Biology*. 247. 26–46.

Pointis, G., Latreille, M.T., Mignot, T.M., Janssens, Y. and Cedard, L. (1979) Regulation of testosterone synthesis in the fetal mouse testis. *Journal of Steroid Biochemistry*. 11. 1609-1612.

Roux, M., Bouchard, M. and Kmita, M. (2019) Multifaceted *Hoxa13* function in urogenital development underlies the Hand-Foot-Genital Syndrome. *Hum Mol Genet*. 28. 1671–1681.

Saito, M and Mizuno, T. (1997) Prostatic bud induction by brief treatment with growth factors. *C R Seances Soc Biol Fil*. 191. 261-265

Seifert, A.W., Harfe, B.D. and Cohn, M.J. (2008) Cell lineage analysis demonstrates an endodermal origin of the distal urethra and perineum. *Developmental Biology*. 318. 143–152.

Simons, B.W., Hurley, P.J., Huang, Z., Ross, A.E., Miller, R., Marchionni, L., Berman, D.M. and Schaeffer, E.M. (2012) Wnt signaling through beta-catenin is required for prostate lineage specification. *Developmental Biology*. 371. 246–255.

Thielen, J.L., Volzing, K.G., Collier, L.S., Green, L.E., Largaespada, D.A. and Marker, P.C. (2007) Markers of prostate region-specific epithelial identity define anatomical locations in the mouse prostate that are molecularly similar to human prostate cancers. *Differentiation*. 75. 49-61.

Thomsen, M. K., Butler, C. M., Shen, M. M. and Swain, A. (2008) *Sox9* is required for prostate development. *Developmental Biology*. 316. 302–311.

Thomson, A.A. and Cunha, G.R. (1999) Prostatic growth and

development are regulated by FGF10. *Development*. 126. 3693-3701.

Toivanen, R. and Shen, M.M. (2017) Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*. 144. 1382-1398.

Verze, P., Cai, T and Lorenzetti, S. (2016) The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*. 13. 379-386.

Vezina C.M., Allgeier S.H., Fritz W.A., Moore, R. W., Strerath, M., Bushman, W. and Peterson, R. E. (2008) Retinoic acid induces prostatic bud formation. *Developmental Dynamics*. 237. 1321–1333.

Yeh, S., Tsai, M.Y., Xu, Q., Mu, X.M., Lardy, H., Huang, K.E., Lin, H., Yeh, S.D., Altuwaijri, S., Zhou, X., Xing, L., Boyce, B. F., Hung, M. C., Zhang, S., Gan, L. and Chang, C. (2002) Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99. 13498-13503.

謝辞

本研究の遂行および論文の執筆にあたり、終始厚いご指導を賜りました京都大学大学院 生命科学研究科 高次生命科学専攻 分子病態学分野 高里 実 准教授に厚く御礼申し上げます。実験に際し、理化学研究所 生命機能科学研究センター ヒト器官形成研究チーム 研究員の Filip Wymeersch 博士、リサーチ・アソシエイトの尾藤 和浩さんをはじめとするヒト器官形成研究チームの皆様には、研究に対する姿勢、実験データに対する解釈および考察の方法等に関し、多大なご助言、ご協力をいただきました。また、藪内 研佑さんには腎被膜下移植の方法等に関し、丁寧なご指導をいただきました。ここに感謝の意を表します。

最後に、本研究にあたり多大な支援をいただきました家族に心から感謝を申し上げます。

本研究は理研の大学院生リサーチ・アソシエイト制度の下での成果です。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Wataru Uno, Kazuhiro Ofuji, Filip J. Wymeersch and Minoru Takasato

In vitro induction of prostate buds from murine urogenital

epithelium in the absence of mesenchymal cells

Developmental Biology, 498, 49 – 60, 2023