

マウス生殖腺の時空間的性決定機構の解析

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医解剖学教室

平成 17 年度入学

獣医学専攻 博士課程 平松 竜司

指導教員 九郎丸 正道

目次

序章	1
第 1 章 精巢分化誘導における時間的な分化機構の解析	
緒言	14
材料と方法	16
結果	23
考察	31
図表およびその説明	34
第 2 章 精巢分化誘導における空間的な分化機構の解析	
緒言	57
材料と方法	59
結果	64
考察	75
図表およびその説明	79
総合考察	111
謝辞	115
引用文献	116

序 章

発生における遺伝子発現の制御

受精卵からどのようにして個体へと形作られていくのか。これは古代ギリシャの Aristotle から、人々が興味を抱き続けた発生学の最も基本的な問題であり、様々な材料、方法を用いて解析が進められてきた。後生動物において、受精卵は卵割により多細胞性を獲得するとともに、細胞は単独で、あるいは相互作用を及ぼし合いながら、細胞増殖、細胞移動、細胞再配列、分域、細胞死を繰り返し、一定の組織を構築し、器官としての形態を形成 (morphogenesis) する。また、細胞は運命決定の状態を経たのち、一定の形態と機能を持つよう分化 (differentiation) する。さらに、形成された諸器官はサイズの増加：成長 (growth) し、有機的に配列して系をつくるほか、体軸にそった極性化や相称性を示し、また、みごとなパターン形成 (pattern formation) を示す。個体の発生は、これらの過程を複雑に組み合わせながら、高次に進んでいく過程である。

こうした発生過程に遺伝子がどのように関わっているのかは、非常に重要な問題として興味を持たれてきた。まず、体細胞へと分化した細胞が全ての遺伝情報を維持しているのか、つまり「核は発生の間に変化するのか」を明らかにするため、1938年に Spemann が初めての核移植を行った (Spemann, 1938)。しかし、当時のテクニックと胚に関する知識では実験を完遂させることはできなかった。その答えとして最初に示されたのは、1952年に Briggs と King がヒョウガエルの胞胚の核を除核後の未受精卵に移植し、完全なオタマジャクシにまで成長させることに初めて成功した報告である (Briggs and King, 1952)。これはクローン技術の歴史の始まりであるとともに、核を取る胚の時期を遅くしていくと、急速にオタマジャクシが得られる確率が下がることを示しており、「発生過程でゲノムは変化する」ということを示唆するものであった。一方、Gurdon はアフリカツメガエルを用いて核移植を行う方法を独自に開発し、Briggs らとは異なる結果を示した。即ち、オタマジャクシの小腸上皮由来の細胞核を移植した

卵のうち、わずかであったがオタマジャクシの時期まで成長するものが現れ (Gurdon, 1962)、さらに移植によってできた胞胚から再び移植を繰り返していくと、いくつかのオタマジャクシが正常なカエルへと変態した (Gurdon and Uehlinger, 1966)。さらに、成体カエルの水掻きにある表皮細胞を培養し、抗ケラチン抗体により細胞が完全に分化していることを確認してから核移植実験を繰り返し行い、正常なオタマジャクシに発生させることができた (Gurdon *et al.*, 1975)。Gurdon らのこれらの実験は、細胞分化の過程で核の中の遺伝情報が不可逆的に変化してしまうことはない、つまり「核は発生の変化するのかわからない」という問いに対して「しない」と答えたものであった。この“ゲノムの不変性”はまた同時に、発生過程において「どの遺伝子がいつ、どこで発現するか」という遺伝子発現制御が最も重要な問題であることを示すものでもあった。なお、どの細胞がどの遺伝子群を発現するかは、かなり複雑な制御機構によることが多い。そのような制御機構を解明する場合、「どの遺伝子が、いつ、どこで発現することが正常な発生に必要なか、十分か」という時間的空間的な問題も重要となる。

20 世紀後半、分子生物学や遺伝子工学の発展、特に各遺伝子のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスにより、発生に関わる遺伝子が次々と発見されている。その中で、細胞分化、形態形成の方向を大きく決定する遺伝子が存在する。筋細胞分化を決定する *MyoD* (Davis *et al.*, 1987; Weintraub *et al.*, 1989) や眼の発生を誘導する *Pax6* (Gehring and Ikeo, 1999) などがその代表例であるが、こうした方向性を大きく決定する遺伝子は“マスター遺伝子”と呼ばれ、その遺伝子の機能や、その遺伝子を中心とした分子メカニズムを解析することで、発生過程の理解が大きく進むこととなった。この“マスター遺伝子”のもう一つの代表例が、生殖腺の性分化初期過程に発現する Y 染色体上の遺伝子 *Sry* である。

哺乳類の生殖腺の性分化

哺乳類の性は、受精の際の染色体の構成により決定され、XX であれば雌となり、XY であれば雄へと成長する。最初の雌雄の性分化は、胎生期の未分化生殖原基が精巣あるいは卵巣に分化することから始まり、分化した精巣 / 卵巣から分泌される各ホルモンの作用により、雌あるいは雄の生殖器へと誘導される。

胎生期の未分化生殖原基の形成は、中腎腹側の泌尿生殖堤の肥厚により始まり、その後生殖細胞が腸間膜を経て生殖腺に侵入し、体腔に突出した生殖原基が形成される。マウスの場合、胎齢 10.0-10.5 日頃、腸間膜両側の腹腔側に膨らみが認められるようになり、胎齢 10.5-11.0 日にかけて、始原生殖細胞が生殖腺に到着すると同時に、生殖原基は、中腎と明瞭に区別できるようになる。この時期はまだ形態的に雌雄を識別することはできないが、その後 XY 個体では、Y 染色体上にある精巣決定遺伝子 (*Sry* [Sex-determining region on Y chromosome]) がセルトリ前駆細胞に発現することで、未分化生殖原基は精巣への分化を開始する。セルトリ細胞は精巣分化で中心的な役割を担っていると考えられており (Burgoyne *et al.*, 1988)、*Sry* の発現後、*Sox9*、*Fgf9*、*Dhh*、*Mis* など、生殖腺における雄特異的遺伝子の多くを発現することで、生殖細胞、ライディッヒ細胞など、その他の細胞とともに精巣分化を進めていく (図 i-1; Brennan and Capel, 2004; Kanai *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2007a)。

一方、XX 個体では、胎齢 13.0 日頃から生殖細胞は減数分裂を開始し、卵母細胞へと分化するが、雄の場合と異なり形態的变化に乏しく、卵胞形成の開始は出生前後まで待たなければならない。

Sry と雄特異的遺伝子の発現

1959 年に哺乳類において染色体が雄型を決定していることが明らかになり (Ford *et*

al., 1959; Jacobs and Strong, 1959) その約 30 年後、Y 染色体短腕上の PAR (偽常染色体領域) に存在する *Sry* 遺伝子がヒト、およびマウスで報告された (Sinclair *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1990)。翌 1991 年に単一の *Sry* 遺伝子を含む 14kb のゲノム DNA を導入した XX マウスが雄の性転換を示したことから、精巣決定遺伝子であることが証明された (Koopman *et al.*, 1991)。ヒト *SRY*、マウス *Sry* はともにイントロンがなく、HMG (high mobility group) ボックスと呼ばれる DNA 結合領域を持つ。マウス *Sry* 遺伝子制御下にヒト *SRY* 翻訳領域を挿入したコンストラクトを導入した XX マウスは雄の性転換を示すことから、生殖腺の雄化には *Sry* の HMG ボックスのみが重要な役割を果たしていることが示唆されている (Lovell-Badge *et al.*, 2002)

マウス生殖腺における *Sry* の発現は非常に特徴的である。初めて *Sry* の発現が検出されるのは胎齢 11.0 日 (12 tail somite stage [ts]) で、生殖腺中央部に限局している。その後、胎齢 11.5 日頃 (17-18ts) までに生殖腺前端および後端に発現が波及する。このように *Sry* が中央から両端へのパターンを示しながら発現して間もなく、中央部から発現が消失し、胎齢 12.0 日 (約 24ts) には発現が認められなくなる (図 i-2; Bullejos and Koopman, 2001; Kidokoro *et al.*, 2005)。近年、*Sry* は *Sf1* と共同して *Sox9* の発現を誘導することが報告されているが (Sekido and Lovell-Badge, 2008) この発現期間内における *Sry* の機能は明らかになっていない。

Sox9 (*Sry*-related HMG box 9) 遺伝子は、*Sry* の HMG ボックスと 60%以上の相同性を示す *Sox* ファミリーに属する遺伝子である。ヒトにおける XY 女性の性転換を伴う骨形成不全症 (campomelic dysplasia) 患者の遺伝子解析から、雄性生殖腺の分化に重要な遺伝子であることが明らかとなり、また XX マウスに導入することで雄性化を引き起こすこと (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001) 逆にそのノックアウトマウスが XY 雌へと性転換を示すことから (Chaboissier *et al.*, 2004) マウスにおいても精巣決定因子として必要十分な機能を備えていると考えられる。また、*Sox9* が *Sry* によ

る精巣決定機能を完全に補完することも明らかになっている (Qin and Bishop, 2005)。胎仔期に一過性の発現を示す *Sry* に対し、*Sox9* の発現は成体精巣まで恒常的に維持されることから、SRY は雄性化への引き金として作用するのに対し、SOX9 はいわば実務担当として精巣の分化・維持に機能すると考えられる。

Fgf9 (Fibroblast growth factor 9) 遺伝子は、*Fgf9* ノックアウトマウスが XY 雌の性転換を示すことから、精巣分化に重要な役割を担っていることが示されている。未分化生殖原基が精巣に誘導されるプロセスでは、非常に短期間 (約 24 時間) にダイナミックな形態形成が引き起こされるが、そのうち体腔上皮細胞の増殖、中腎から生殖腺への細胞移入は FGF9 により制御されていることが示されている (Colvin *et al.*, 2001; Schmahl *et al.*, 2004)。さらに、卵巣分化を促進する *Wnt4* (Vainio *et al.*, 1999) と拮抗することで、*Sox9* の発現を維持し、精巣分化を進めていくことが報告されている (Kim *et al.*, 2006)。

その他、ライディッヒ細胞分化に関わる *Dhh* (Desert hedgehog; Yao *et al.*, 2002)、ミューラー管の発達を抑制する *Mixl* (Müllerian inhibiting substance; Behringer *et al.*, 1994)、*Sox9* 発現維持に関わる *Pgds* (Prostaglandin D synthase; Malki *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2005)、基底膜成分産生に関わる *Col2a1*、*Col9a3* (McClive and Sinclair, 2003) など、様々な雄特異的な遺伝子の発現が誘導され、精巣分化が進められていく。

本研究の目的

以上のように、XY では *Sry* を引き金として、様々な雄特異的な遺伝子が発現し、精巣分化がダイナミックに進められていく。一方、XX においては形態的变化も乏しく、まだ解析がほぼ成されていないのが現状である。しかしながら、*Dax1*、*Wnt4*、 *β -catenin*、*R-spondin1*、*Foxl2* などの雌特異的な遺伝子が卵巣分化に大きく関わっていることが示

されているほか、雌雄生殖腺体細胞でのマイクロアレイ解析により、胎齢 11.5 日には精巢特異的および卵巣特異的に発現が上昇している遺伝子が数多く存在していることが明らかになっている (Nef *et al.*, 2005; Beverdam and Koopman, 2006)。*Sry* を引き金とする精巢分化過程は、発生の方向性が遺伝子活性の制御により決定されていることを明確に示すものであり、卵巣分化過程とともに、その生殖腺性分化のメカニズムを解析することは自然が書き上げた壮大な発生のプログラム：発生のダイナミクスの理解に大きくつながる。そこで本研究では、*Sry* の機能解析のための新規の *in vitro* 実験系を確立するとともに、*Sry* の時間的空間的に特徴的な発現パターンに着目し、各性特異的遺伝子がどのように発現・作用することで性分化初期過程が進んでいくかについて解析を試みた。

図およびその説明

図 i-1 マウス生殖腺性分化初期過程の概略

中腎腹側に形成された未分化生殖原基は、XY では *Sry* の発現を引き金として精巣へと分化し、XX では卵巣へと分化する。胎齢 13.5 日頃の分化した精巣では、生殖細胞をセルトリ細胞、筋様細胞で取り囲んだ精巣索の形成が見られ、生殖腺間質にはステロイドホルモン産生細胞であるライディッヒ細胞が見られる。一方、胎齢 13.5 日頃の分化した卵巣では、生殖細胞が減数分裂に入るなどの特徴はあるものの、大きな形態的变化は認められない。

図 i-1

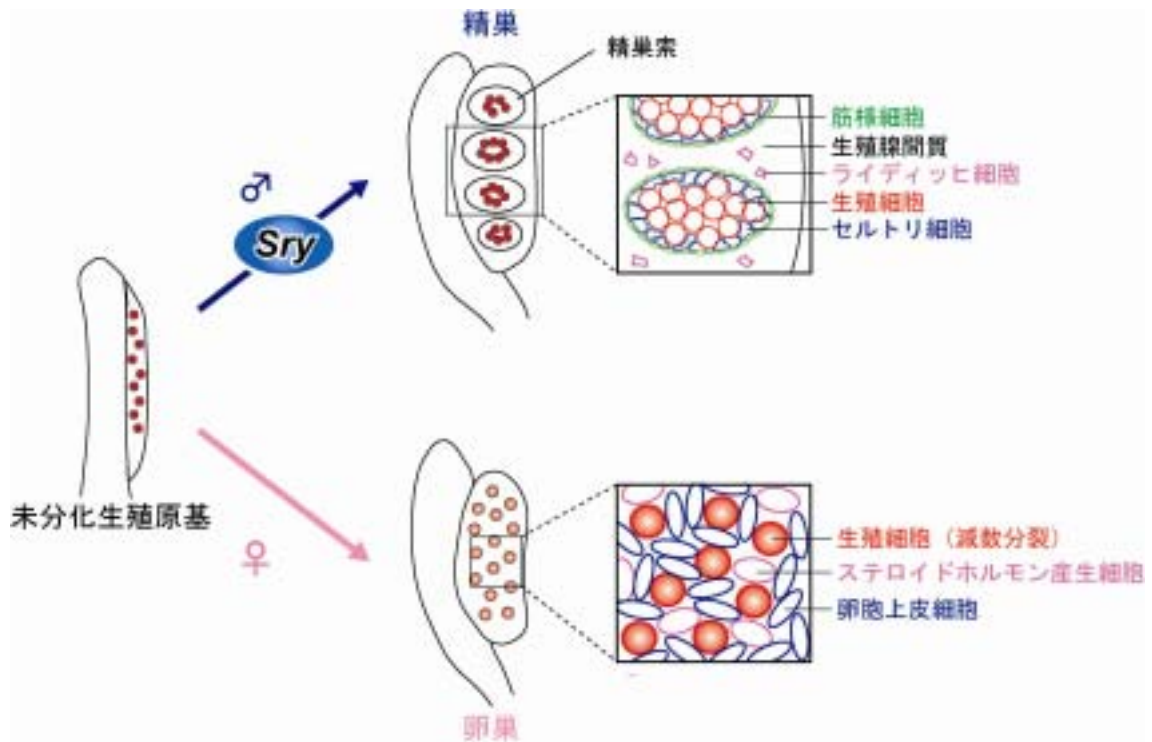
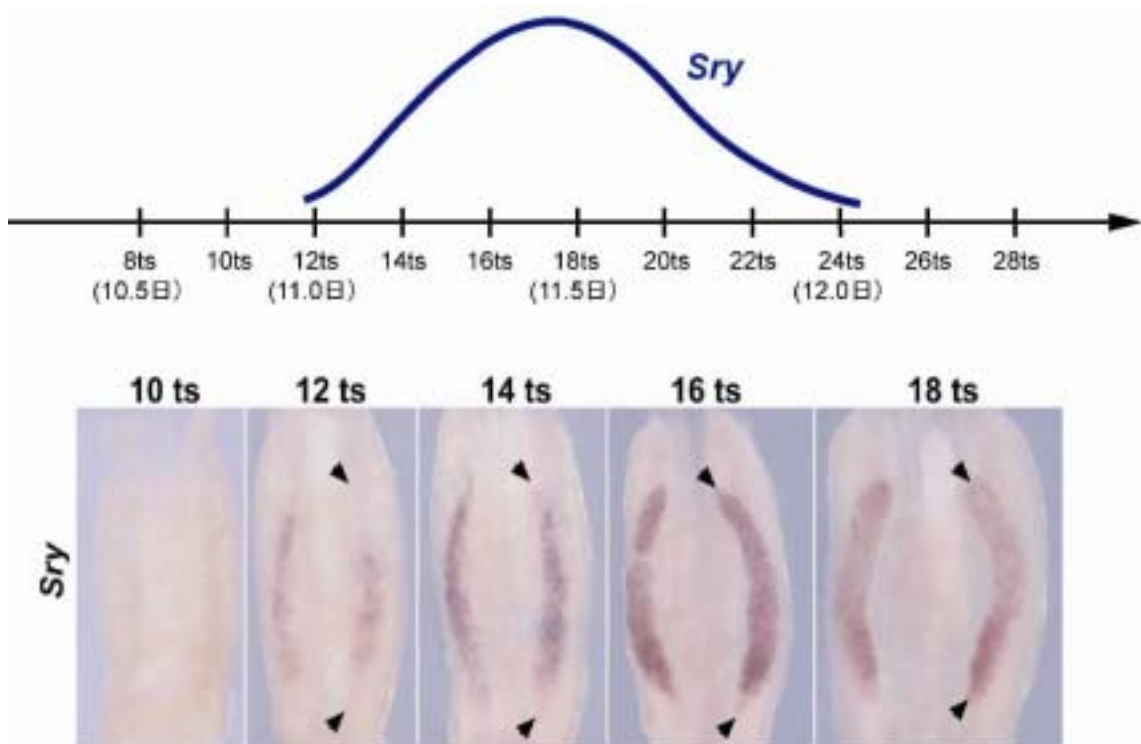


図 i-2 *Sry* は時間空間的に特徴的な発現パターンを示す

胎齢 11.0 日 (12 tail somite stage [ts]) で、生殖腺中央部に *Sry* の発現が認められるようになり、その後、胎齢 11.5 日頃 (17-18ts) までに生殖腺前端および後端に発現が波及する。*Sry* が中央から両端へのパターンを示しながら発現して間もなく、胎齢 12.0 日 (約 24ts) には発現が認められなくなる。

図 i-2



(Kidokoro *et al.*, 2005 より改変)

第 1 章

精巢分化誘導における 時間的な分化機構の解析

緒 言

生殖腺の発生は、1つの未分化の生殖原基から、精巣と卵巣という生理的にも代謝的にも異なる2つの組織へと分化していく、非常に興味深い器官形成のモデルである。哺乳類では、HMG box 型転写因子である *Sry* が、未分化の生殖腺支持細胞をセルトリ細胞へと分化させ、それにより精巣分化が始まる (Sinclair *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991)。 *Sry* が機能しない場合、未分化の生殖腺支持細胞は卵巣上皮細胞へと分化し、卵巣へと分化していく (Albrecht and Eicher, 2001)

マウスの発生において、*Sry* は 12 ~ 24ts (tail somite stage; 胎齢で 11.0 ~ 12.0 日) に一過性に、未分化の XY 生殖腺の中央部から両端部へと広がるパターンを示しながら、生殖腺支持細胞に発現する (Albrecht and Eicher, 2001; Bullejos and Koopman, 2001)。この *Sry* の作用により、常染色体上の遺伝子 *Sox9* が、*Sry* の発現開始直後から同様の中央部から両端部へと広がるパターンを示しながら、生殖腺支持細胞に発現する (Sekido *et al.*, 2004; Kidokoro *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2005; Sekido and Lovell-badge, 2008)。 *Sox9* は精巣分化に必須の遺伝子であり (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001; Chaboissier *et al.*, 2004; Barrionuevo *et al.*, 2006)。 *Sry* の一過性の発現と異なり、セルトリ細胞に成体精巣まで恒常的に発現し続ける (Moraris da Silva *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 1996)。この恒常的な *Sox9* の発現が精巣分化を推し進めていくと考えられている (Brennan and Capel, 2004; Kanai *et al.*, 2005; Polanco and Koopman, 2007)。

当研究室ではこれまでに、体腔上皮を含めた生殖腺全体に、生殖腺形成初期から、つまり野生型 XY の *Sry* の発現よりも早く *Sry* を恒常的に発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを樹立している。この XX Tg マウスは精巣へと分化する性転換を示すが、この性転換マウスにおいても、*Sox9* は野生型 XY と同じタイミングで発現する

(Kidokoro *et al.*, 2005)。つまり、*Sry*の発現を早めても*Sox9*の発現は早まらない。このことは、*Sry*が引き金となり開始する精巣分化のプログラムは厳密に制御されており、*Sox9*の発現には、生殖腺の支持細胞が*Sry*の機能に反応するだけの十分な状態に達していることが必要であることを意味している。しかしながら、SR γ が生殖腺支持細胞を雌化から雄化経路へと転換する分子メカニズムやそれが可能な期間(SR γ 機能の臨界期)は明らかにされていない。

これらの疑問を明らかにするため、本研究では熱処理により、*Sry*の発現を様々なタイミングで誘導し、かつXX生殖腺を精巣へと分化させることが可能な*Hsp-Sry*トランスジェニックマウス系を確立した。この*Sry*誘導系を用いることで、*Sry*が精巣への分化を決定できる臨界期は12-15ts(胎齢11.0~11.25日)の6時間であることを明らかにした。また、この臨界期を規定しているのはFgf9とWnt4の拮抗的作用によるものであることも明らかにした。この結果は、*Sry*が*Sox9*の発現を誘導し、さらに精巣形成を押し進めていくためには、*Sry*が非常に短い期間内に適切に作用することが必須であることを示すものである。

材料と方法

動物

Hsp70.3 (*Hsp68*) のプロモーター領域 [-617 - +70] に、マウス *Sry* の 5' 非翻訳領域 (UTR) の一部、翻訳領域、および 3' UTR [X67204: 8288 - 13780] を連結したものを作製した (Kidokoro *et al.*, 2005)。

作出した *Hsp-Sry* トランスジェニック (Tg) マウスライン (ICR 系統) のうち、ほとんどのラインで XX Tg マウスは通常の飼育下で XX 精巢の性転換を示した (#40 および #46; Kidokoro *et al.*, 2005)。一方、通常飼育下で全ての XX Tg マウスが、表現型として観察される異常は認められず、繁殖能を持ち、飼育行動も行う、正常の雌へと成長するライン (#44 : ICR 系統) を樹立することに成功した。本章では、この *Hsp-Sry* #44 を Tg として記載する。このラインでは、導入された *Hsp-Sry* 遺伝子はメンデルの法則に基づき、次世代へと受け継がれていく。

XY Tg (雄) × XX (野生型; 雌) でかけ合わせの場合 :

次世代 XY では、 *Hsp-Sry* vs 野生型 : 219 vs 245

次世代 XX では、 *Hsp-Sry* vs 野生型 : 252 vs 229

XY (野生型; 雄) × XX Tg (雌) でかけ合わせの場合 :

次世代 XY では、 *Hsp-Sry* vs 野生型 : 14 vs 13

次世代 XX では、 *Hsp-Sry* vs 野生型 : 11 vs 14

さらに、Jackson Laboratory (Bay Harbor, ME, USA) より *Wnt4* 遺伝子欠損 (*Wnt4* ko) マウスを導入し、*Hsp-Sry* Tg ラインとかけ合わせ、129/ICR の系統で維持した。

これらのマウスは東京大学動物実験実施規則に則り、飼育および実験を行った。

PCR による個体識別

それぞれの個体の性別判定、Tg および *Wnt4* ko の確認には PCR を用いた。使用したプライマーは下記の 7 種類である。

性別判定 (中馬ら, 2001): Ube1x [198bp] / Ube1y [217bp]

Ube1 forward 5'- TGG TCT GGA CCC AAA CGC TGT CCA CA -3'

Ube1 reverse 5'- GGC AGC AGC CAT CAC ATA ATC CAG ATG -3'

Tg 確認 (Kidokoro *et al.*, 2005): Hsp70.3-Sry [119bp]

Hsp70.3-promoter forward 5'- AAA GGC GCA GGG CGC CGA GCA GGC CAC -3'

transgene-specific Sry reverse 5'- GCC CTC CAT GCT CTC TAG ACA ATT CAC -3'

[X67204: 8312 - 8289, 3'側の 3 塩基 (下線部) は HSP-Sry 特異的配列]

Wnt4 ko 確認 (Stark *et al.*, 1994): wildtype [560bp] / PGK-Neo Band [342bp]

Wnt4E4U 5'- CTT CAC AAC AAC GAG GCT GGC AGG -3'

Wnt4E5L 5'- CAC CCG CAT GTG TGT CAA GAT GG -3'

Wnt4PGKNeoU 5'- GCA TTG TCT GAG TAG GTG TCA TTC -3'

熱処理 (Heat shock: HS) および器官培養法

アスピリン処理 (Fawcett *et al.*, 1997) を施した妊娠雌マウスより、胎齢 9.5 ~ 16.5 日の胎仔を採取した。胎齢 10.5 ~ 12.5 日の胎仔はそれぞれ尾節数を計測し、正確に発生ステージ (tail somite stage) を算出した。ts (tail somite stage) はそれぞれ、8ts が胎齢 10.5 日、12ts が胎齢 11.0 日、18ts が胎齢 11.5 日、24ts が胎齢 12.0 日、30ts が胎齢 12.5 日におおよそ相当する (Hacker *et al.*, 1995)。未分化生殖原基 (中腎含む) は冷 0.1 M リン酸緩衝液 (PBS、pH7.4) 内で単離した。全ての個体において、1 対の生殖原基のうち、左側のものは熱処理 (Heat shock: HS) を施し、もう一方 (右側) の

生殖原基は対照群（熱処理なし）として使用した。熱処理は、8連 PCR tube 中に 20 μ l 程度の DMEM とともに採取した生殖原基を入れ、43 $^{\circ}$ C、10 分間行った。なお、XY 生殖原基（野生型）に熱処理を施し器官培養により精巣分化を誘導し、熱処理の精巣形成への影響を確認したところ、委縮や精巣索形成の異常など精巣形成の異常が認められた個体は、12-14ts から採取した生殖原基では 37 個体中 4 個体、15-18ts から採取した生殖原基では 40 個体中 0 個体であった。このことから、今回の条件下での熱処理は、精巣分化を評価するにあたり特に問題はないと考えられる。また、胎仔全胚および他の様々な組織でも同様の方法で熱処理（43 $^{\circ}$ C、10 分）を行った。

胎仔全胚以外の組織は以下の方法により培養を行った。培地には 10% ウマ血清（GIBCO/BRL, CA, USA）およびペニシリン/ストレプトマイシン（GIBCO）を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM; Sigma-Aldrich, MO, USA）を用いた。24 well plate（SUMILON, 日本）に分注した培地に ISOPORE membrane filter（3.0 μ m TSTP; MILLIPORE, MA, USA）を載せ、そのフィルター上で各組織の培養を行った（Kanai *et al.*, 1991）。培養条件は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で 2 時間～4 日間行った。いくつかの培養実験においては 10% ウマ血清添加 DMEM に FGF9（100 ng/ml; Recombinant human fibroblast growth factor 9, Sigma）、sFRP2（1.5 μ g/ml ; Recombinant mouse secreted frizzled-related protein 2, R&D systems, MN, USA）を添加し培養を行った。この際、培地は 24 時間ごとに交換した。胎仔全胚は 50% ラット血清添加 DMEM を培地として、ボトル回転システムを用いて 37 $^{\circ}$ C で培養を行った。全ての培養組織は組織学、免疫組織化学、および RT-PCR により解析した。

組織学的解析および免疫染色

培養した組織はブアン固定液、4% パラホルムアルデヒド（PFA）、ないし 2% 酢酸

カルシウム加 10%ホルマリンにて固定し、常法に従いパラフィンに包埋した。4 μm の厚さで作製した切片は、脱パラフィン後、ヘマトキシリン エオジン (HE) 染色、過ヨウ素酸シッフ染色 (Periodic Acid Schiff [PAS] 染色) および免疫染色を行った。XX Tg 生殖原基の培養組織における精巣索形成について、ts (10 ~ 24ts) ごとに組織学的に評価した。

免疫染色は以下の方法で行った。切片は抗 Sry 抗体 (1/50 希釈; Wilhelm *et al.*, 2005; オーストラリア・クィーンズランド大学 Peter Koopman 博士および Dagmar Wilhelm 博士のご厚意により供与) 抗 Sox9 抗体 (1/250 希釈; Kent *et al.*, 1996; Kidokoro *et al.*, 2005; 当研究室において作製) 抗 Scp3 抗体 (1/250 希釈; Chuma and Nakatsuji, 2001; 京都大学中辻憲夫博士および中馬新一郎博士のご厚意により供与)、抗 Sf1/Ad4Bp 抗体、抗 βHsd 抗体 (それぞれ 1/1,000 希釈、1/2,000 希釈; Ikeda *et al.*, 2001; 九州大学諸橋憲一郎博士のご厚意により供与) 抗 laminin 抗体 (1/400 希釈; MP Biomedicals, OH, USA) ないし抗 Mis 抗体 (1/100 希釈; sc-6886; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を 4 ~ 12 時間反応させた。反応はビオチン標識 2 次抗体および Elite ABC Kit (Vector Laboratories, CA, USA) にて可視化した。

Sox9 陽性細胞数の定量的解析は、1 培養組織に対し 3 枚の矢状断切片について単位面積当たりの陽性細胞数 (陽性細胞数 / mm^2) を算出した。3 枚の平均値を各培養組織の単位面積当たりの陽性細胞数とし、各実験群につき 4 個体算出した。

Proliferation assay and immunofluorescence

生殖原基 1 対を胎齢 11.1 日 (13ts) および 11.5 日 (18ts) より採取し、一方は熱処理を施し、もう一方は対照群 (熱処理なし) とした。各個体における増殖の程度を明らかにするため、生殖原基を 10% ウマ血清添加 DMEM で 9 時間培養後、BrdU

(bromodeoxyuridine, 10 mM; Sigma) を添加した 10%ウマ血清添加 DMEM で 3 時間培養した。培養組織は PFA 固定、パラフィン包埋後に切片を作製し、BrdU および SF1/Ad4Bp の二重染色を行った。切片は抗 BrdU 抗体 (Dako, Denmark)、抗 SF1/Ad4Bp 抗体を反応させ、それぞれを抗マウス IgG-AF488、抗ウサギ IgG-AF594 (Molecular Probes, OR, USA) にて可視化した。DAPI による対比染色後、1 培養組織に対し 3 枚の矢状断切片について体腔上皮細胞における BrdU 陽性細胞の割合 (%) を算出した。3 枚の平均値を各培養組織の BrdU 陽性細胞の割合とし、各実験群につき 5 個体算出した。

Mesonephric cell migration assay

中腎から生殖腺への細胞移入について、Martineau らの方法に基づき解析を行った (Martineau *et al.*, 1997)。XX Tg および XY の生殖腺 1 対を胎齢 11.1 日 (13ts) および 11.5 日 (18ts) より採取し、一方は熱処理を施し、もう一方は対照群 (熱処理なし) とした。GFP 陽性中腎は胎齢 11.5 日の XY 胎仔 (Green mice; 日本 SLC, 浜松, 日本) より採取した。1.5% アガロースおよび 10% ウマ血清添加 DMEM のブロック上で、熱処理および非処理の生殖腺を GFP 陽性中腎と組み合わせ、37 °C、5% CO₂ 下で 48 時間培養した。

Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization は金井らの方法に従って行った (Kanai-Azuma *et al.*, 1999)。培養組織を 4% PFA-PBS にて 4 °C、4 時間固定し、メタノールで脱水した。自動 *in situ* hybridization 装置を用いて、再水和後、10 µg/ml Protease K-PBST

で60分処理し、各RNA probeとハイブリダイゼーションを行った。*Sry*、*Wnt4*は68、*Fgf9*は55で16時間行った。100 µg/ml RNase A 処理を37、30分行った後、50% formamide / 2x SSC で65、1時間洗浄した。シグナルはアルカリフォスタファアーゼ標識抗DIG抗体とnitro blue tetrazolium(NBT) 5-bromo4-chloro3-indolylphosphate (BCIP)を用いて可視化した。RNA probe には *Sry*(Bullejos and Koopman, 2001)、*Fgf9* (Colvin *et al.*, 1999)、*Wnt4* (Mizusaki *et al.*, 2003) を用いた。

定量的 RT-PCR

培養組織より Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) を用いて、total RNA を抽出した。DNaseI 処理を30分間行った後、SuperScript III cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用いてRNAを逆転写し、cDNAを合成した。プライマーには random primer を用いた。逆転写反応なしを対照群として用いた。

Sry および *Gapdh* の発現については、以下のプライマーを用いてPCRを行った。

Sry [744bp]

Sry forward 5'- CAG TTC CAC GAC CAG CAG CTT ACC TAC -3'

Sry reverse 5'- AGC CAG GCA TCT AGT AAG AGT CCT TGA CC -3'

Gapdh [983bp]

Gapdh forward 5'- TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC -3'

Gapdh reverse 5'- CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC C -3'

PCR 条件は 95 2分、[95 1分、58 1分、72 1分] × 30 サイクル、72 10分

Sox9、*Fgf9*、および *Wnt4* の発現には Taqman probe (*Sox9*: Mm00448840_01、*Fgf9*: Mm00442795_m1、*Wnt4*: Mm00437341_m1; Applied Biosystems, CA, USA) を、それに対する *Gapdh* の発現には Taqman Rodent GAPDH Control Reagents:

Applied Biosystems)を使用した。PCRはTaqman Universal Master Mixで調整し、ABI PRISM 7900HT(Applied Biosystems)で行った。PCR条件は下記の通りである。

50 2分、95 10分、[95 15秒、60 60秒] x 40 サイクル

各培養組織について、*Gapdh*の発現レベルに対するそれぞれの遺伝子の発現レベルの相対値を算出した。

統計解析

遺伝子発現および細胞数に関する定量データについてはStudent's *t*-testにより統計的に解析した。各発生ステージでのXX精巢の形成率については、StatView statistical programを用いて、Fisher exact test (two tailed)にて統計的に解析した。

結 果

1 . *Sry* 発現を誘導可能なトランスジェニックマウスラインの確立

Sry 発現開始のタイミングを実験的に制御可能にするため、本研究では 43 10 分間の熱処理により生殖原基に *Sry* の発現を誘導することができるトランスジェニック (Tg) マウス系を樹立した。通常の飼育条件では、この Tg ラインは性転換の表現系を示さず、全ての XX が繁殖能を持つ雌個体へと成長する。Whole-mount *in situ* hybridization による解析では、生殖原基を含めて XX Tg 胎仔に *Sry* の発現は確認できなかった (図 1-1A、左)。一方、胎仔胚、各組織に熱処理を行い、培養 2 時間後に発現を確認した結果、全ての胚および組織で *Sry* の発現が確認できた (図 1-1A、右)。抗 *Sry* 免疫染色においても、熱処理を行った組織の体細胞において、遍在的に導入遺伝子由来の *Sry* 蛋白が局在していることが確認された (図 1-1B)。なお、生殖細胞には *Sry* 蛋白のわずかなシグナルしか確認できなかった (図 1-1B、Ov および Ts; 矢頭)。

続いて、誘導された *Sry* の発現について、器官培養を用いて経時的に詳細に検討した。12ts (胎齢 11.0 日相当) に単離した XY (野生型) の生殖原基では、内因性の *Sry* の発現は生殖腺の中央部より開始し、培養開始後 12 時間には生殖腺全領域にその発現が広がり、培養開始後 24 時間までにはその発現は消失した (図 1-1C、XY)。この *in vitro* における *Sry* の発現パターンは、*in vivo* における中央から両端へ広がる *Sry* の発現パターンと一致する (Bullejos and Koopman, 2001)。同様に、12ts に単離した XX Tg 生殖原基に熱処理を行い、対照群 (熱処理なし) とともに、*Sry* の発現について経時的に解析した。熱処理なしの対照培養群では、解析した全ての時間 (培養開始後 3、6、および 12 時間) において *Sry* の発現は認められなかった。一方、熱処理を行った培養群では、培養開始後 3 時間で *Sry* の発現が確認され (図 1-1C、XX Tg 3h) 6 時間までにはその発現がほとんど確認できない程度に著しく低下した (図 1-1C、XX Tg 6h)。

Sry 発現の誘導による形態的な変化について検討するため、内因性の *Sry* が発現を開始するタイミングである 12ts の XX Tg 胎仔より 1 対の生殖原基を単離した。左の生殖原基に熱処理を行い、一方、右の生殖原基には熱処理を行わず、その後両方の生殖原基を 4 日間培養し、各生殖原基がどのように分化するか観察した (図 1-2A, B)。熱処理を行った XX Tg 生殖原基の培養生殖腺 (生殖腺領域および中腎領域から成る) のほとんどで、XY 生殖原基と同様に、生殖腺領域に明瞭な精巢索の形成が認められた (表 1-1; 図 1-2A、上段)。これら性転換を見せた培養生殖腺では、Sox9 (図 1-2B) および Mis (データは示さず) の発現が認められ、セルトリ細胞の分化が確認された。また、精巢間質に 3 β Hsd の発現が認められ (図 1-2B)、ライディッヒ細胞の分化が確認された。一方、対照群 (熱処理なし) の XX Tg 培養生殖腺では、形態的に正常な卵巣分化が確認され (図 1-2A 下段)、また、Scp3 の発現が認められ (図 1-2B、C)、卵巣特異的に観察される生殖細胞の減数分裂が確認された。

熱処理により誘導される *Sry* の発現は内因性の *Sry* の発現とは時間的にも空間的にも異なる発現パターンを示すが (図 1-1C)、これらの結果より、この Tg ラインでは熱処理により一過性の *Sry* 発現を誘導することで、器官培養下で XX Tg を精巢形成へと誘導できることが示された。この Tg ラインは熱処理により XX 卵巣から精巢形成を誘導することができる、哺乳類で初の *Sry* 誘導系である。

2 . SRY が精巢分化を誘導できる臨界期は約 6 時間に限られる

Sry の発現が精巢形成を誘導するのはどの発生ステージで可能なのか、その臨界期を決定するため、様々な発生ステージの XX Tg より生殖原基を単離、熱処理後 4 日間培養し、精巢分化能について検討した (表 1-1)。XY 生殖腺において内因性 *Sry* の発現が開始した直後の時期である 12-14ts に熱処理を行った XX Tg 生殖原基の培養生殖腺で

は、抗 laminin、抗 Sox9、および抗 Scp3 抗体の免疫染色により、約 80%の個体において精巢に分化していることが確認された。一方、XY 生殖腺において、内因性 *Sry* の発現が生殖腺両端部まで広がる時期である 15ts (Bullejos and Koopman, 2001; Kidokoro *et al.*, 2005) に熱処理を行った XX Tg 生殖原基の培養生殖腺では、XX 性転換の割合が約 25%まで有意に減少した ($P < 0.05$ 、two-tailed Fisher's exact test; 表 1-1)。このステージでは、半分の培養生殖腺で卵巢への分化が確認されたが、一部の培養生殖腺では、中央部が Sox9 陽性のセルトリ細胞が存在する精巢構造で、両端部が Scp3 陽性の生殖細胞が存在する卵巢構造である卵精巢に分化していることが確認された (図 1-3A、中央)。この形態は B6-Y^{DOM} 性転換モデルで観察される卵精巢と同様の構造である (Eisher *et al.*, 1982)。

16ts 以降に熱処理を行った培養生殖腺では、精巢索の形成が認められなかった (図 1-3A 右)。16ts 以降の生殖原基においても *Sry* の発現は生殖腺全体に誘導されていることは確認されており (図 1-3B) さらに抗 *Sry* 免疫染色でも 13ts で誘導された XX Tg と 18ts で誘導された XX Tg の生殖腺体細胞内で染色性の違いは認められなかった (図 1-3C、D)。以上の結果より、*Sry* の発現が精巢形成を誘導することができる臨界期は 12 ~ 15ts (胎齢 11.0 ~ 11.25 日相当)、つまり内因性 *Sry* の発現が開始してから約 6 時間に限られることが明らかとなった。

3 . 臨界期以降の *Sry* の発現は *Sox9* の発現を一過性に誘導できるも維持できない

Sry 発現が精巢分化へと誘導できる臨界期がなぜこれだけ狭いのか、それを規定しているのは何かを明らかにするため、まず臨界期内および臨界期以降のステージで *Sry* を誘導した XX Tg 生殖腺における Sox9 発現について、経時的に解析した (図 1-4)。12ts に *Sry* を誘導した生殖腺では、Sox9 陽性細胞は *Sry* 誘導後 6 時間で最初に観察さ

れ、誘導後 9 時間までにその数が一気に増加した。その数は *Sry* 誘導後 12 時間、24 時間でも維持され続けた (図 1-4A、左列)。24ts (内因性 *Sry* が発現を開始してから 24 時間以上) の生殖腺では、*Sox9* 陽性細胞はどの時間 (誘導後 6, 9, 12, および 24 時間) でもほとんど確認できなかった。これらの結果は、12ts では *Sry* 発現の誘導により精巢形成を誘導できるのに対し、臨界期以降では卵巣へと分化するこれまでの結果に合致する (表 1)。

驚くべきことに、18-21ts の生殖腺では、4 日間培養後は卵巣への分化を示すものの、*Sry* 誘導後 6 時間で *Sox9* 陽性細胞が確認され、誘導後 9 時間までにその数が一気に増加した (図 1-4A、中央列 18-20ts)。しかしながら、その後 *Sox9* 発現は確認できない程度まで一気に低下し、誘導後 24 時間では *Sox9* 陽性細胞が認められなかった。定量的リアルタイム PCR でも、*Sry* 誘導後 6 時間で *Sox9* が一過性に上昇していることが確認された ($P < 0.01$, Student's *t*-test; 図 1-4B)。熱処理による *Sry* 発現誘導と *Sox9* の発現開始の間の 6 時間の間隔は、熱処理によるストレスから回復するためにいくらかのタイムラグがあることを勘案すると、*in vivo* における *Sry* と *Sox9* の発現パターン (約 4 時間の間隔; Sekido *et al.*, 2004; Kidokoro *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2005) を反映している。免疫染色での観察により、*Sry* の発現は体細胞に遍在的に誘導されているのに対し、一過性の *Sox9* 発現は Sf1/Ad4Bp (Nr5a1) 陽性で生殖細胞に隣接した支持細胞と推測される細胞で認められた (図 1-4C)。これらの結果は、*Sox9* の発現を誘導するためには *Sry* の発現だけでは十分ではなく、その発現が維持される細胞環境が重要であることを示すものである。*Sox9* は 12 から 21ts の XX Tg の支持細胞でのみ *Sry* 発現で一過性に誘導されており、これは XY 生殖腺で *Sry* が発現する期間にほぼ一致している。*Sry* 発現を人為的に 6 時間以上遅らせると精巢分化に必要なレベルでの *Sox9* 発現を維持できず、卵巣へと分化することになる。

4 . *Sry* 発現を遅らせると、セルトリ細胞分化や精巣索形成に必要な精巣特異的形態変化は誘導されない。

これまでの結果で、*Sox9* 発現を確立するためには臨界期 (12-15ts) に *Sry* が機能することが重要であることを示した。現在までに、*Sox9* 以外の *Sry* の標的遺伝子など、この期間での雄特異的な遺伝子についての報告はほとんどない。しかしながら、セルトリ前駆細胞でのグリコーゲン蓄積 (14ts から; Matoba *et al.*, 2005)、中腎から生殖腺への細胞移入 (15ts から; Tilmann and Capel, 1999)、体腔上皮細胞の増殖 (14-15ts から; Schmahl *et al.*, 2000) といった *Sry* 下流の形態変化が臨界期直後に起こり、セルトリ前駆細胞における *Sox9* 発現の確立に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

まず、セルトリ前駆細胞で精巣特異的に起こるグリコーゲンの蓄積について、18ts (胎齢 11.5 日に相当) に *Sry* を誘導した XX Tg と誘導なしの XX Tg で検討した。PAS 染色と抗 *Sox9* 染色により、*Sry* を誘導した生殖腺において、*Sox9* 陽性の支持細胞にグリコーゲン蓄積が起きていることが確認された (図 1-5A)。

続いて、熱処理した XX Tg 生殖腺と GFP 陽性の XY 中腎との組み合わせで、中腎から生殖腺への細胞移入について検討した。18ts の XX Tg 生殖腺は、誘導の有無に関わらず、2 日間の培養後も生殖腺領域への GFP 陽性中腎細胞の移入は認められなかった (n=4; 図 1-5B、上段)。これは、XY 生殖腺および 13ts に *Sry* を誘導した XX Tg 生殖腺で見られる多くの GFP 陽性中腎細胞の移入とは明らかに対照的である (図 1-5B、下段)。

最後に、抗 BrdU 免疫染色により、体腔上皮での体細胞増殖について、18ts に *Sry* を誘導した XX Tg と誘導なしの XX Tg で検討した (図 1-5C、上段)。体腔上皮細胞の BrdU 陽性率はこれら 2 つの処理群で有意な差は認められなかった (図 1-5D、3,4 番目

のバー)。これらの陽性率は 12-13ts の誘導なし XX Tg 生殖腺のものとはほぼ同じであった(図 1-5C 左下; D、1 番目のバー)。一方、12-13ts に SRY を誘導した XX Tg 生殖腺では、体腔上皮細胞の BrdU 陽性率が有意に増加していた(図 1-5C 右下; D、2 番目のバー)。これらの結果より、*Sry* 発現を遅らせると、中腎から生殖腺への細胞移入や体腔上皮細胞の増殖など、初期の精巣分化に特異的な形態変化は誘導されないことが示された。

5 . *Sry* 発現を遅らせると、*Fgf9* と *Wnt4* シグナルのバランスが卵巣分化へ傾く

これまでに、*Fgf9* シグナルが中腎細胞の移入や細胞増殖の誘導に必須であり、加えてセルトリ細胞の分化や精巣索の形成に重要な役割を果たしていることが報告されている(Colvin *et al.*, 2001; Schmahl *et al.*, 2004)。さらに、最近の遺伝学的解析により、*Fgf9* と *Wnt4* が拮抗し合っており、その発現バランスが支持細胞における *Sox9* 発現の確立に影響することが示されている(Kim *et al.*, 2006)。*Fgf9* と *Wnt4* は性決定期初期では XX および XY 生殖腺で同様に発現しているが、18ts 頃には性特異的な発現(雄では *Fgf9* 高 / *Wnt4* 低、雌では *Fgf9* 低 / *Wnt4* 高)を示す(Mizusaki *et al.*, 2003; Schmahl *et al.*, 2004)。12-13ts に熱処理した XX Tg 生殖腺では、*Sry* の誘導により *Fgf9* と *Wnt4* の発現は雄特異的パターンを示した(図 1-6A、左列)。一方、18ts で *Sry* を誘導した XX Tg 生殖腺では、誘導していない対照生殖腺と比較して、*Fgf9* と *Wnt4* の発現パターンに特に変化は認められなかった(図 1-6A、右列)。定量的リアルタイム PCR においても、18ts で *Sry* を誘導した XX Tg 生殖腺と誘導なしの生殖腺に有意な差は認められなかった(図 1-6B)。これらの結果から、*Sry* の発現を遅らせると、XX 生殖腺での *Fgf9* と *Wnt4* の発現パターンを雌型から雄型へと変化させることができないことが示された。

6 . Fgf9 シグナルと Wnt4 シグナルのバランスを雌型から雄型のパターンに強制的に変えると、*Sry* 発現誘導を遅らせても Sox9 発現維持が可能になる

Fgf9/Wnt4 の雌型の発現パターンが *Sry* 機能の臨界期に対してどう影響しているのか明らかにするため、FGF9 および Wnt4 拮抗因子、sFRP2 (secreted frizzled-related protein; Lee *et al.*, 2000) を添加して、18ts に *Sry* 発現を誘導した XX Tg における Sox9 発現の維持について検討した (図 1-6C、D)。18ts の XY および XX (野生型) 生殖腺において、FGF9 および sFRP2 の添加は Sox9 発現パターンに特に影響は認められなかった (図 1-7)。また、18ts に *Sry* 発現を誘導した XX Tg 生殖腺において、培養後 9 時間では誘導の有無による Sox9 発現の変化は認められなかった (図 1-6C、D)。24 時間後において、Wnt4 拮抗因子 sFRP2 のみの添加では XX Tg 生殖腺での Sox9 発現維持の不全を回復させることはできず、FGF9 のみの添加では Sox9 陽性細胞をいくつか観察する程度であった (図 1-8)。一方、FGF9 と sFRP2 の両方の添加では、培養 72 時間後でも Sox9 の発現が維持されていた (図 1-6C)。なお、Sox9 陽性細胞数は 12-13ts に *Sry* を誘導した XX Tg 生殖腺に比べて約 1/3 程度であった (図 1-6D)。さらに、 β Hsd 陽性細胞も確認されたことから、18ts で *Sry* 発現を誘導した XX Tg 生殖腺において、Fgf9 と sFRP2 の添加によりライディッヒ細胞の分化が誘導できることが確認された。以上の結果から、Fgf9 シグナルと Wnt4 シグナルのバランスを雄型パターンに変化させると、*Sry* 発現の遅延による Sox9 発現維持不全が回復し、セルトリ細胞とライディッヒ細胞の分化が誘導されることが示された。

7 . XX *Wnt4*^{-/-} 生殖腺では、*Sry* 発現を遅らせてもセルトリ細胞の分化および精巢索形成が誘導される

最後に、*Sry* 機能の臨界期の規定に対する Wnt4 の直接的な影響を明確にするため、

18-19ts の XX Tg (*Hsp-Sry*); *Wnt4*^{-/-}生殖原基 1 対を単離し、左の生殖原基に熱処理を行い、右の生殖原基には熱処理をせず（対照群）72 時間培養した（図 1-9）。18-19ts の XX Tg; *Wnt4*^{-/-}生殖腺では、熱処理なしでは 18-19ts の XX Tg; *Wnt4*^{+/+}生殖腺同様、Sox9 発現も精巣索形成も培養 72 時間後には確認できなかった（図 1-9A、B）。一方、18-19ts の XX Tg; *Wnt4*^{-/-}生殖腺において、熱処理により *Sry* 発現を誘導すると、培養 72 時間後に Sox9 発現が維持されていた（n=3; 図 1-9A、右上）。これらの培養生殖腺では、明瞭な精巣索の形成も生殖腺領域に確認できた（図 1-9B、右上）。以上の結果より、*Wnt4* 遺伝子の 1 アレルを欠損させることで *Sry* 発現の遅延によるセルトリ細胞分化や精巣索形成の不全を回復できることが示された。また、XX 生殖腺を精巣分化へ誘導する *Sry* 機能の臨界期は、*Wnt4* 活性を下げることで延長できることが示唆された。

考 察

本研究では、Sry 機能について、以下の 2 つの異なる臨界期を初めて決定した: 1) セルトリ細胞分化の開始、2) 哺乳類の胎仔発生における精巢形成の誘導 (図 1-10、青および紫)。セルトリ細胞分化の開始 (すなわち Sox9 発現上昇の開始) における Sry 機能の臨界期は XY 生殖腺での内因性 Sry の発現期間 (約 24 時間) とおおよそ一致する。一方、精巢形成の誘導に対する Sry 機能の臨界期は、通常の Sry 発現の開始から約 6 時間の期間のみに限られている。この予想よりも短い臨界期は、セルトリ細胞分化や精巢形成に必須な初期の精巢特異的形態変化を誘導する (Colvin *et al.*, 2001; Schmahl *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006) FGF9 / WNT4 シグナルのバランスにより規定されている。つまり、初期の 6 時間における Sry の機能は、生殖腺内の Fgf9/Wnt4 シグナルのバランスを雌型から雄型へ変化させるのに必須であることを示している。XY 性転換を引き起こすことが報告されている B6 Y^{POS} において、Sry の発現開始が臨界期以降まで遅延しているという報告 (Bullejos and Koopman, 2005) も、この初期 (12 から 15ts) における Sry 機能の重要性を裏付けるものである。

本研究では、精巢分化に必須の Fgf9 シグナル (Colvin *et al.*, 2001; Schmahl *et al.*, 2004) と卵巣分化を推進する Wnt4 シグナル (Vainio *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006; Ottolenghi *et al.*, 2007) の拮抗作用が、この Sry の臨界期の決定に重要であることを示した。Sry の誘導のタイミングを遅らせると、Fgf9 と Wnt4 の発現バランスを雌型から雄型へ変化させることができない。一方、この 2 つのシグナルのバランスを雄型に強制的に変化させると、Sox9 発現の維持ができるようになり、セルトリ細胞の分化を確立させることができる。また、Wnt4 の活性を遺伝的に減らすことで、Sry 誘導の遅延によるセルトリ細胞の分化や精巢形成の不全を回復することができる。Fgf9 と Wnt4 は、胎齢 11.5 日には生殖腺領域で性特異的な発現パターンの差が明瞭となるた

め (Mizusaki *et al.*, 2003; Schmahl *et al.*, 2004; 本博士論文第 2 章 図 2-7、2-10) Fgf9/Wnt4 シグナルのバランスが卵巣分化へと傾いた状態となる時期と、Sry が XX 精巣形成を誘導できる臨界期の最後のステージはほぼ一致している。これらの結果は、マウス生殖腺発生における性決定が Fgf9 / Wnt4 シグナル相互の拮抗により制御されているという Kim らの仮説 (Kim *et al.*, 2006) を強く支持するものである。

精巣分化を誘導するための Sry 機能の臨界期が短い間に限られているのに対し、XX 生殖腺においてセルトリ細胞分化の開始を誘導する、Sry の細胞自律的な機能の臨界期はより長い期間であることも、本研究では示した (図 1 - 10、紫) 12 - 21ts (胎齢 11.0 日 ~ 11.75 日) の XX 生殖腺に Sry 発現を誘導すると、一過性ではあるが、支持細胞と推測される体細胞に Sox9 が発現する。12 - 21ts は XY 生殖腺において内因性の Sry が発現する時期とほぼ一致している (Bullejos and Koopman, 2001) これらの結果は、XY 生殖腺同様、XX 生殖腺にも性決定期に Sry の発現に依存して Sox9 発現が開始できる状態が保持されていることを示している。最近のマイクロアレイによる解析では、Wnt4 の高発現を含む雌特異的な遺伝子プログラムが、胎齢 11.5 日 (18ts) までには確実に開始されていることが報告している (Nef *et al.*, 2005; Beverdam and Koopman, 2006) 一方、卵巣上皮細胞の分化マーカーであり、卵巣分化に重要な *Foxl2* (Crisponi *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2004; Uda *et al.*, 2004; Ottolenghi *et al.*, 2005; 2007) は、胎齢 12.5 日 (30ts) 頃から雌特異的に発現が上昇を始める (Loffler *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004) これらの報告を合わせると、21ts までは XX 支持細胞の大部分が性的に未分化状態で保たれていることを、今回の結果は示唆している。また、Sry 依存的な Sox9 発現の活性化能力が 23 - 24ts あたりで急速に失われていくことが、XX 卵巣上皮細胞の分化における最も初期の細胞内イベントのひとつであることも示唆される。

本研究において、生殖腺支持細胞の分化を雌型から雄型へと転換することが可能な、新規の Sry 発現誘導系を確立した。この誘導系を用いることで、Sry が XX 生殖腺で精

巢分化を誘導することができるのはおおよそ 12 - 15ts の間、つまり XY 生殖腺で *Sry* 発現が開始してから約 6 時間の間に限られていることを初めて明らかにした。これらの結果は、XY 生殖腺で精巢分化プログラムが開始してから 6 時間後には、XX 生殖腺で卵巢分化が開始することを明確に示すものである。また、知る限りにおいて、本研究は哺乳類の形態形成の方向性を決定するマスター遺伝子の臨界期を決定した初めての報告である。

図表およびその説明

図 1-1 Sry 発現を誘導可能なトランスジェニックマウスラインの確立

A, B : 熱処理により誘導された、*Hsp-Sry* トランスジェニック (Tg) マウスでの *Sry* mRNA および Sry 蛋白。熱処理条件は 43 °C 10 分で、熱処理後 2 時間での解析。A, B ともに右側が熱処理あり (HS +)、左側が熱処理なし (HS -) の *Hsp-Sry*Tg マウス由来。

A) Whole-mount *in situ* hybridization による解析。熱処理により異所性の *Sry*mRNA の発現が認められた (右側)。embryo : 胎仔全胚、Ov : 卵巣、Ts : 精巣、Pc : 睪臓、Ad : 副腎、Kd : 腎臓。embryo のみ胎齢 10.5 日、その他の組織は胎齢 16.5 日。

B) 抗 SRY 免疫染色による解析。熱処理により Sry 蛋白が体細胞の核に遍在的に局在していることが確認された (右側)。熱処理なし (HS -) では全く陽性シグナルが確認できなかった (左側)。Ov : 卵巣、Ts : 精巣、Pc : 睪臓、Kd : 腎臓。全て胎齢 16.5 日。

Asterisks : 管腔、Arrow heads : 生殖細胞。Scale bar = 50 μm。

C : 12-13ts (胎齢 11.0 日相当) の XY 野生型 (上段) および XX Tg (下段) 生殖原基の、器官培養下での *Sry* の発現パターン (熱処理後 0 ~ 24 時間[h])。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。矢頭は生殖腺領域の前後端を示す。

图 1-1

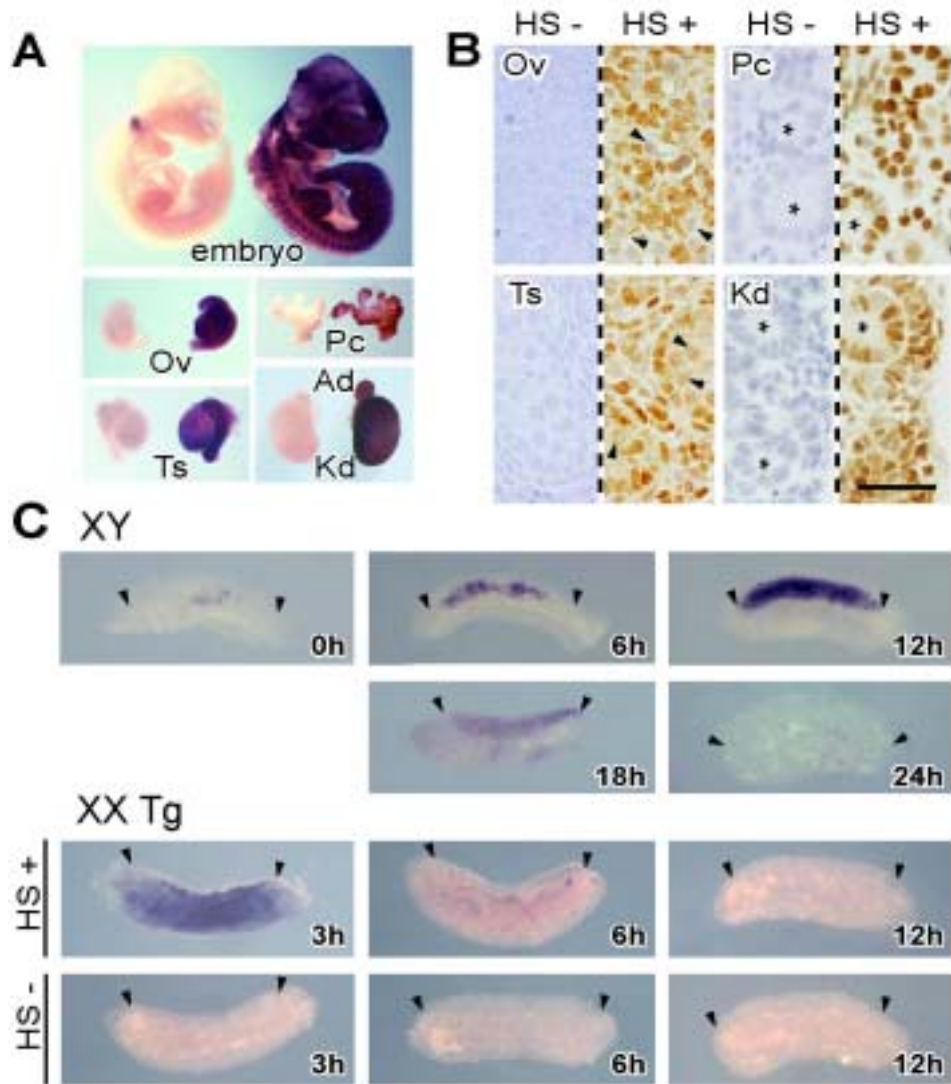


図 1-2 *Hsp-Sry* 誘導系における XX 精巢分化の誘導

A, B, C : 12-13ts の XY 野生型、XX 野生型 (A 左列、C) および XX Tg (A 右、B) の培養生殖腺 (培養 4 日)。点線は精巢索を示す。

A) HE 染色により、熱処理あり (HS +) XX Tg では精巢索の形成、熱処理なし (HS -) XX Tg では生殖細胞の減数分裂が確認できた。この 2 つは同じ XX Tg 胎仔から単離した生殖原基。矢印は生殖細胞を示す。Scale bars = 100 μm (右側は 10 μm)

B) 抗 Sox9、抗 βHsd 、および抗 Scp3 抗体の免疫染色により、HS + XX Tg において精巢のセルトリ細胞、ライディッヒ細胞の分化が確認できた。Scale bar = 100 μm 。

C) 13ts の XX 野生型および XY 野生型の生殖原基の培養生殖腺での Scp3 の局在。培養は 4 日。抗 Scp3 免疫染色による観察。XX 生殖腺 (左) では、生殖腺領域全体に Scp3 陽性生殖細胞が観察され、減数分裂に入っていることが示された。一方、XY 生殖腺 (右) では、ほとんどの生殖細胞が Scp3 陰性であった (但し、Scp3 陽性の生殖細胞も存在した)。 Scale bar = 100 μm

图 1-2

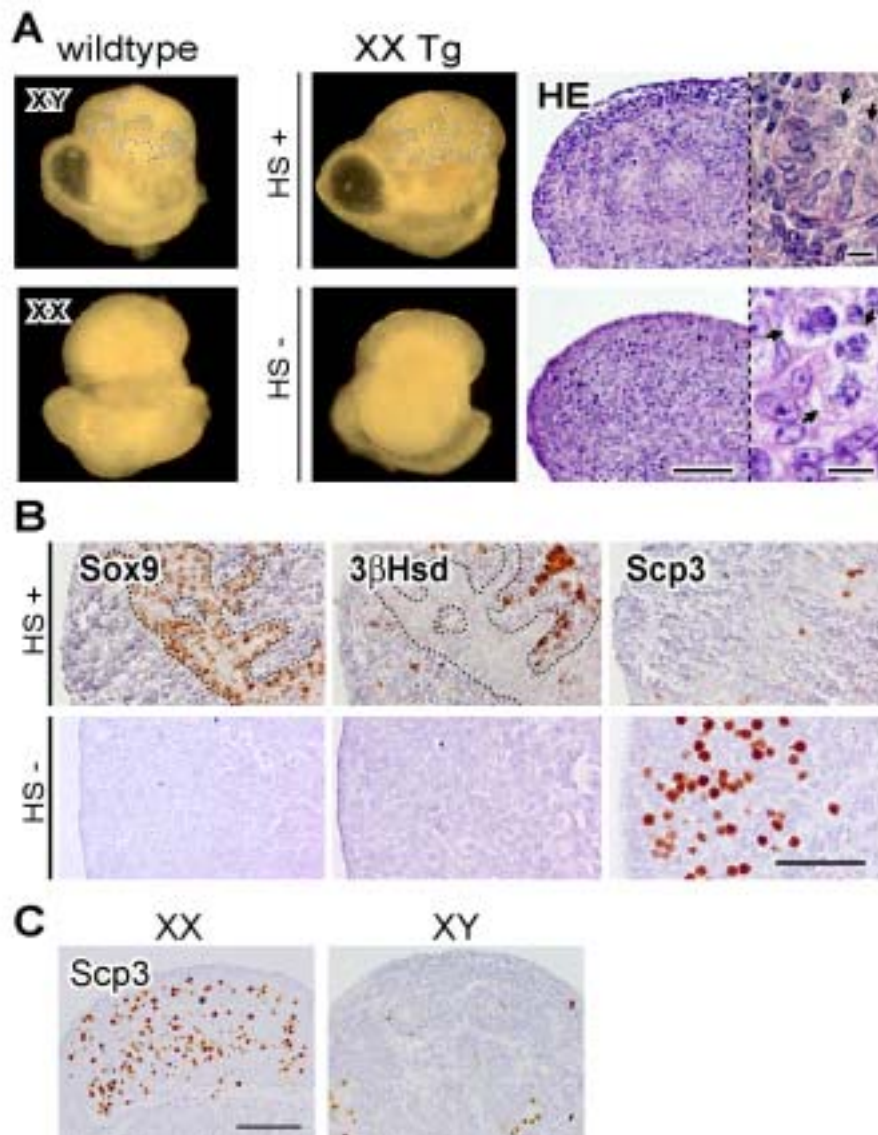


図 1-3 Sry 発現のタイミングを 6 時間遅らせると正常な精巢形成が阻害される

A: 13, 15, および 18ts XX Tg (熱処理あり) 培養生殖腺 (培養 4 日) での抗 laminin、抗 Sox9、および抗 Scp3 抗体の免疫染色像。13ts XX Tg 培養生殖腺では精巢索形成が観察されるのに対し、15ts XX Tg 培養生殖腺では中央部に精巢領域を持つ卵精巢が観察された。この発生ステージをさらに越えると、熱処理による XX 精巢性転換の誘導は見られなかった (18ts)。 Scale bar = 100 μ m。

B, C: 13ts および 18ts XX Tg 生殖原基における Sry mRNA および Sry 蛋白の誘導。A は whole-mount *in situ* hybridization、B は抗 Sry 抗体の免疫染色による解析 (熱処理後 3 時間)、mRNA、蛋白ともに、13ts と 18ts XX Tg 生殖原基の間に Sry 誘導の差は認められない。C 右側は高倍率像で、SRY 蛋白が生殖細胞 (asterisks) に隣接した、支持細胞と推測される体細胞の核に局在していることを示す。矢頭は生殖腺領域の前後端を示す。 Scale bar = 100 μ m。

D: 13ts および 18ts XX Tg 培養生殖腺での抗 Sry 抗体の免疫染色。解析に用いた培養生殖腺は熱処理、固定、および染色を同じ条件になるよう注意深く行った。熱処理後 9 時間 (9 h) および 12 時間 (12 h) において、Sry 陽性シグナルの強度は 13ts の培養生殖腺と 18ts の培養生殖腺で違いは見られなかった。右側は高倍率像であり、Sry 陽性の支持細胞と推測される体細胞が、生殖細胞 (asterisks) に隣接していることを示す。 Scale bar = 100 μ m。

图 1-3

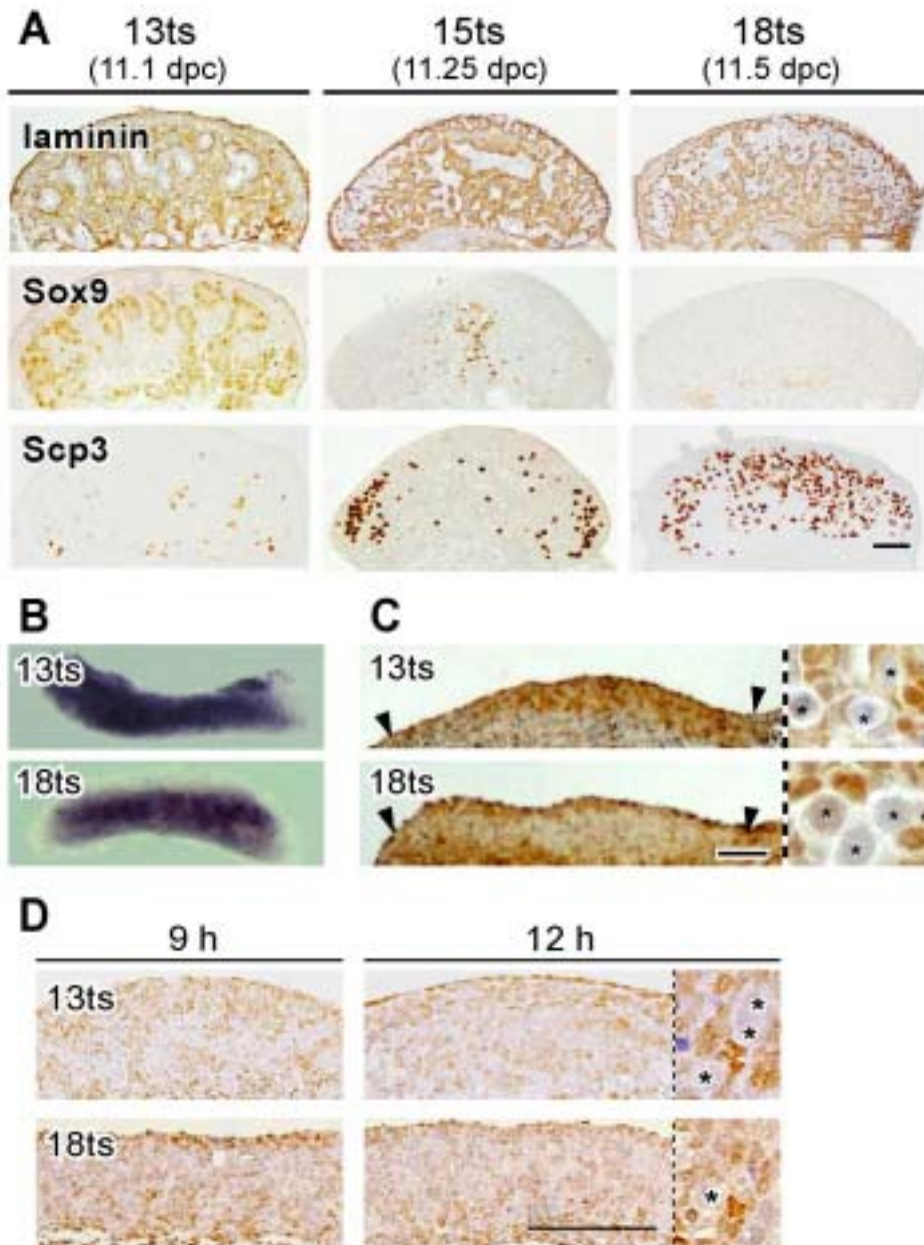


図 1-4 *Sry* 発現を誘導した XX Tg 生殖腺における Sox9 発現パターン

A : 12-13ts、18-20ts、および 23-24ts の XX Tg 培養生殖腺の矢状断切片像。 *Sry* 発現誘導後 6 時間 (6h)、9 時間 (9h)、12 時間 (12h)、および 24 時間 (24h) での Sox9 局在について、抗 Sox9 免疫染色にて解析。12-13ts XX Tg 培養生殖腺同様、18-20ts XX Tg 培養生殖腺でも誘導後 6 時間で Sox9 陽性細胞が観察され始め (矢頭)、9 時間ではその数は増加した。しかし、誘導後 12 時間では、12-13ts XX Tg 培養生殖腺での多くの Sox9 陽性細胞の存在と比べ、18-20ts XX Tg 培養生殖腺においては Sox9 陽性細胞が減少した。23-24ts XX Tg 培養生殖腺では、どの時間においても明瞭な陽性シグナルは観察されなかった。 Scale bar = 100 μ m。

B : 18-20ts XX Tg 培養生殖腺における Sox9 発現レベルの経時的変化 (誘導後 12 時間まで)。黒丸は熱処理あり、白丸は熱処理なし。リアルタイム RT-PCR にて解析。値は平均値 \pm SE (それぞれ n = 5)。縦軸は *Sox9* / *Gapdh*。横軸は熱処理後の培養時間。asterisk は、熱処理ありおよび熱処理なしの XX Tg 培養生殖腺の他の値に比べて、*Sox9* 発現が有意に高い (p < 0.01、Student's *t*-test) ことを表す。2 本の点線は 23-24ts の XX 野生型生殖原基 (0.36 \pm 0.04、下線) と XY 野生型生殖原基 (0.85 \pm 0.04、上線) での *Sox9* 発現レベルを示す。グラフ下の RT-PCR は、誘導後 3 時間での熱処理による *Sry* 発現を表す。

C : *Sry* 発現を誘導した XX Tg 培養生殖腺 (13ts および 18ts) の隣接切片を用いた Sox9 および Sf1/Ad4Bp 局在の解析。抗 Sox9 および抗 Sf1/Ad4Bp 免疫染色。誘導後 9 時間。13ts、18ts の培養生殖腺ともに、Sox9 陽性細胞は Sf1/Ad4Bp 陽性の支持細胞と推測される体細胞と一致していた (Arrowheads)。Asterisks : 生殖細胞。 Scale bar = 10 μ m。

图 1-4

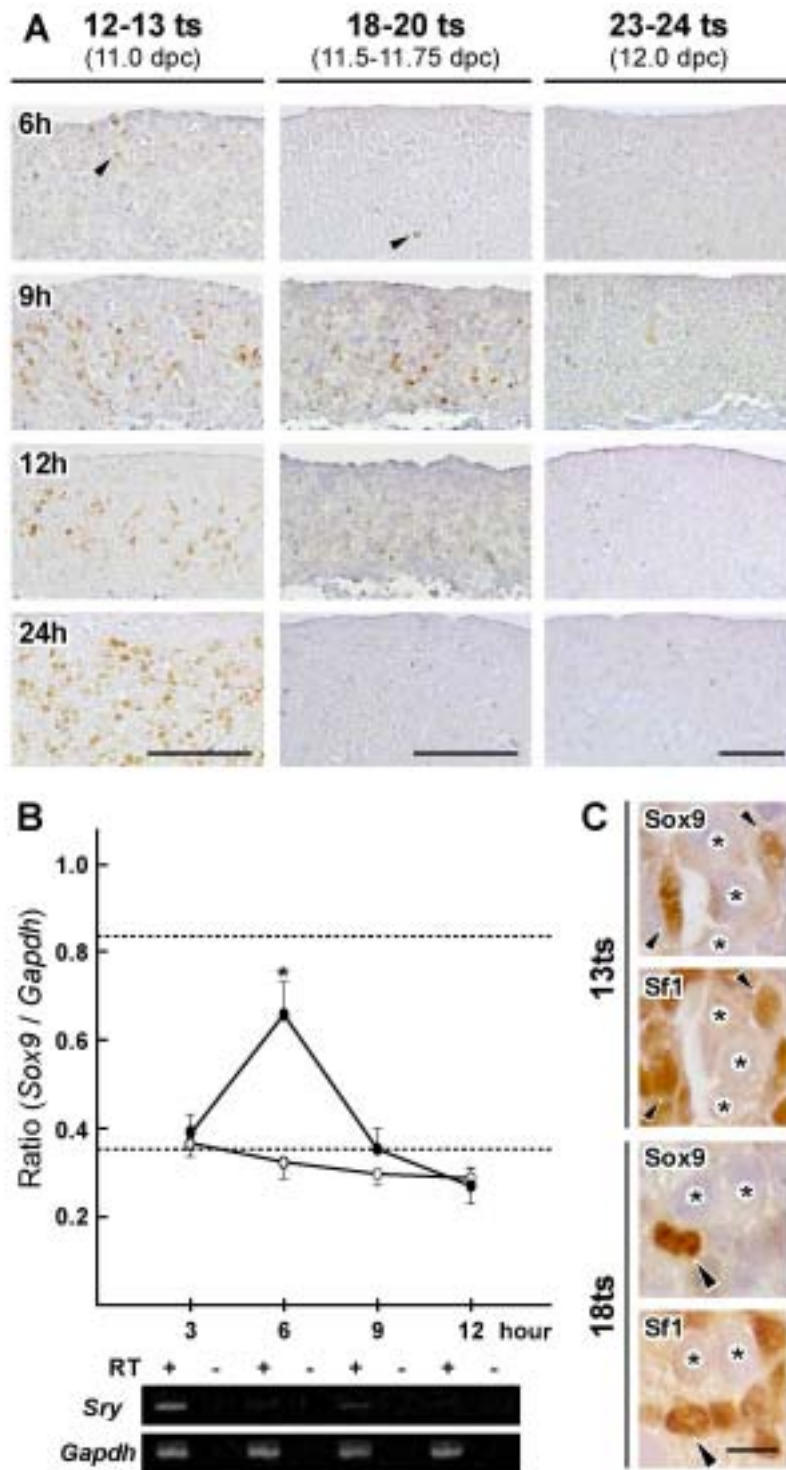


図 1-5 Sry 発現の遅延により、性分化初期の精巣特異的形態変化が阻害される

A : 18ts の XX Tg 培養生殖腺での PAS 染色および抗 Sox9 抗体の免疫染色 (12 時間培養)。PAS 染色および抗 Sox9 抗体の免疫染色は隣接切片で行った。HS + : 熱処理あり、HS - : 熱処理なし。HS + XX Tg 培養生殖腺において、精巣特異的なグリコーゲンの蓄積は Sox9 陽性細胞にて起きていた。Inset は陽性細胞の高倍率像。ms : 中腎。Scale bar = 100 μ m。

B : 13ts および 18ts の XX Tg 生殖腺と GFP 陽性 XY 中腎による mesonephric cell migration assay (中腎から生殖腺への細胞移入についての解析)。熱処理あり (HS +) および熱処理なし (HS -) の生殖腺を分離し、GFP 陽性の中腎と組み合わせ、48 時間培養した。HS + 13ts XX Tg (13ts HS +) および 18ts XY 野生型 (18ts XY wt) の培養生殖腺では、GFP 陽性の中腎細胞が生殖腺領域内に多く観察された。それに対し、18ts では、HS + および HS - の培養生殖腺ともに GFP 陽性の中腎細胞は生殖腺領域に認められなかった。点線は生殖腺領域を示す。ms : 中腎。

C, D : 12-13ts および 18-19ts XX Tg 培養生殖腺での Cell proliferation assay。熱処理あり (HS +) および熱処理なし (HS -) の生殖原基を 12 時間培養後に解析。抗 BrdU (緑) 抗体と抗 Sf1/Ad4Bp (赤) 抗体を用いた二重免疫染色。誘導後 9 時間培養 (BrdU なし) し、続けて BrdU 添加で 3 時間培養し、増殖細胞を標識した。全ての培養生殖腺で、生殖腺体腔上皮の Sf1 陽性細胞に BrdU 陽性細胞が多く認められた (C)。しかしながら、18-19ts の培養生殖腺では、HS + および HS - の間で BrdU 陽性率に有意な差はなかった (D; 体腔上皮細胞数に対する BrdU 陽性細胞数の割合。n=5 で、その平均値 \pm SE で表す)。12-13ts の HS + 培養生殖腺では、他の 3 つの条件と比べて、有意に陽性率が高かった (**p<0.01)。D 内の 2 本の点線は、12-13ts の XX 野生型 (43.3 \pm 1.0%、下線) と XY 野生型 (57.8 \pm 1.5%、上線) での体腔上皮細胞数に対する BrdU 陽性細胞数の割合。Scale bar = 100 μ m。

☒ 1-5

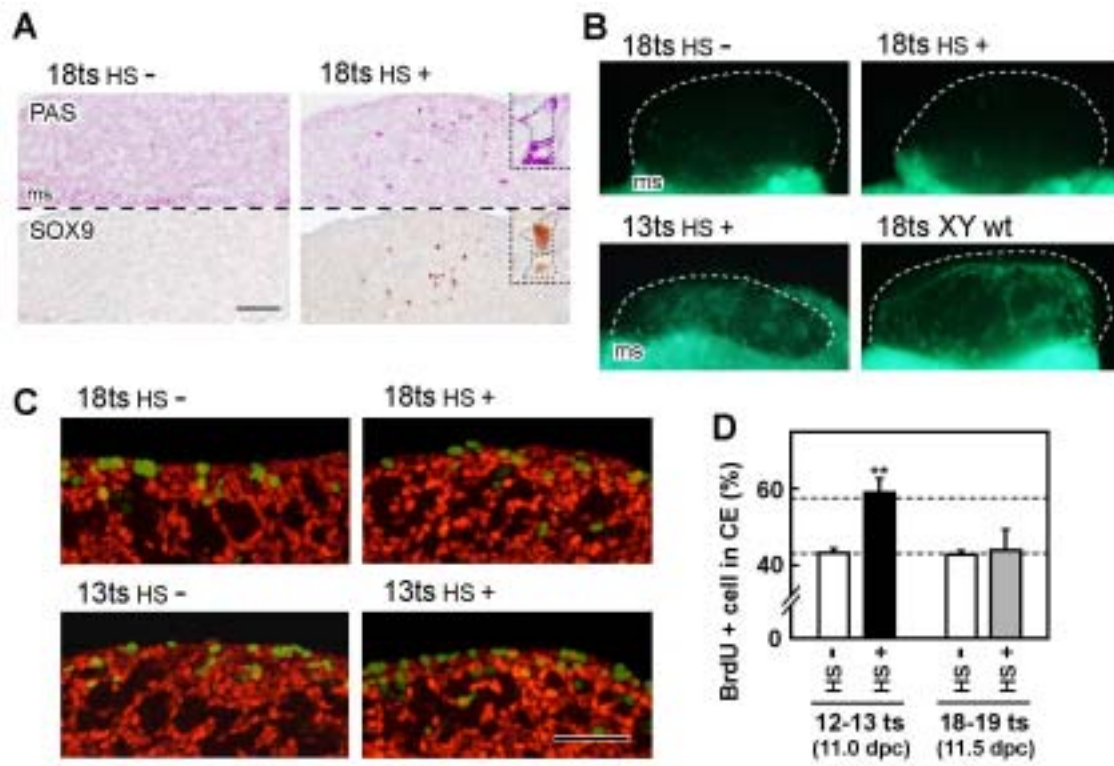


図 1-6 *Fgf9/Wnt4* の雌型発現パターンにより、*Sry* の発現遅延による精巢分化の障害が引き起こされる

A: 13ts および 18ts の XX Tg 培養生殖腺(培養 18 時間)における *Fgf9* および *Wnt4* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization にて解析。HS + : 熱処理あり、HS - : 熱処理なし。生殖腺領域は点線にて示す。

B: 13ts および 18ts の XX Tg 培養生殖腺(培養 18 時間)における *Fgf9* および *Wnt4* の発現。リアルタイム RT-PCR にて解析。HS + : 熱処理あり、HS - : 熱処理なし。XY 野生型(黒) および XX 野生型(白) は熱処理ありで、用いた XX Tg と同腹仔の発現レベルを示す。縦軸は *Gapdh* に対する *Fgf9* および *Wnt4* の発現レベル。値は平均値 \pm SE (n = 4)。

C-E: 18-19ts *Sry* 発現誘導 XX Tg 培養生殖腺での Sox9 発現開始(誘導後 9 時間 [9h]; C,D) および維持(誘導後 24 時間[24h] および 72 時間[72h]; C,D) とライディッヒ細胞の分化(誘導後 72 時間; E) に対する FGF9 (100 ng/ml) および sFRP2 (1.5 μ g/ml) 添加の効果。抗 Sox9 および抗 β Hsd 抗体の免疫染色による解析。

D) XX Tg 培養生殖腺の免疫染色切片(C)での単位面積当たりの Sox9 陽性細胞数。全 Sox9 陽性細胞数を生殖腺領域の面積で割って算出。黒丸: FGF9 と sFRP2 を添加、白丸: 添加なし。平均値 \pm SE (n = 4)。18-19ts XY 野生型(XX Tg と同腹仔)の培養後 72 時間における平均値 ($18.3 \pm 1.5 \times 10^3$ 細胞数/mm²) を 100% とする。Asterisk は 18-19ts の FGF9/sFRP2 添加の XX Tg 培養生殖腺に比べて有意な差 (** : p<0.01) が存在することを示す。12-13ts *Sry* 発現誘導 XX Tg 培養生殖腺での単位面積当たりの Sox9 陽性細胞数は白四角で示す。

E) 18-19ts *Sry* 発現誘導 XX Tg 培養生殖腺において、FGF9 と sFRP2 両方を添加(+ FGF9/sFRP2) すると、添加なし(None) および FGF9 のみの添加(+ FGF9) に比べて、 β Hsd 陽性細胞が増加する。Scale bar = 100 μ m。

图 1-6

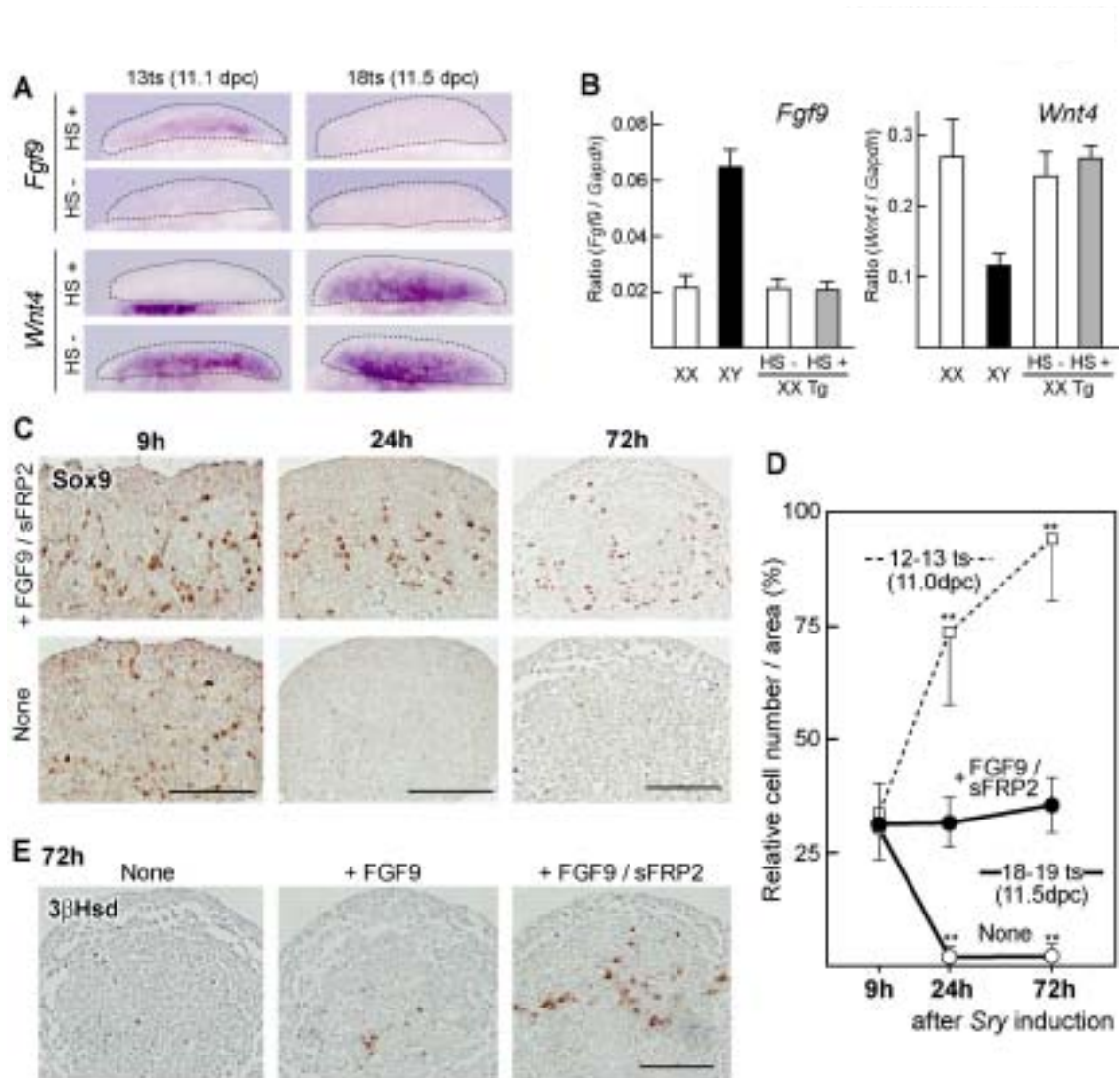


図 1-7 XX 野生型および XY 野生型の培養生殖腺では、FGF9 と sFRP2 両方を添加しても Sox9 発現に明らかな差は見られない

18-19ts の XX 野生型および XY 野生型の培養生殖腺での Sox9 発現 (培養 24 時間) に対する FGF9 (100 ng/ml) および sFRP2 (1.5 μ g/ml) 添加の効果。抗 Sox9 抗体の免疫染色による解析。+ FGF9 / sFRP2 : FGF9 および sFRP2 の添加、None : 添加なし。

Scale bar = 100 μ m。

图 1-7

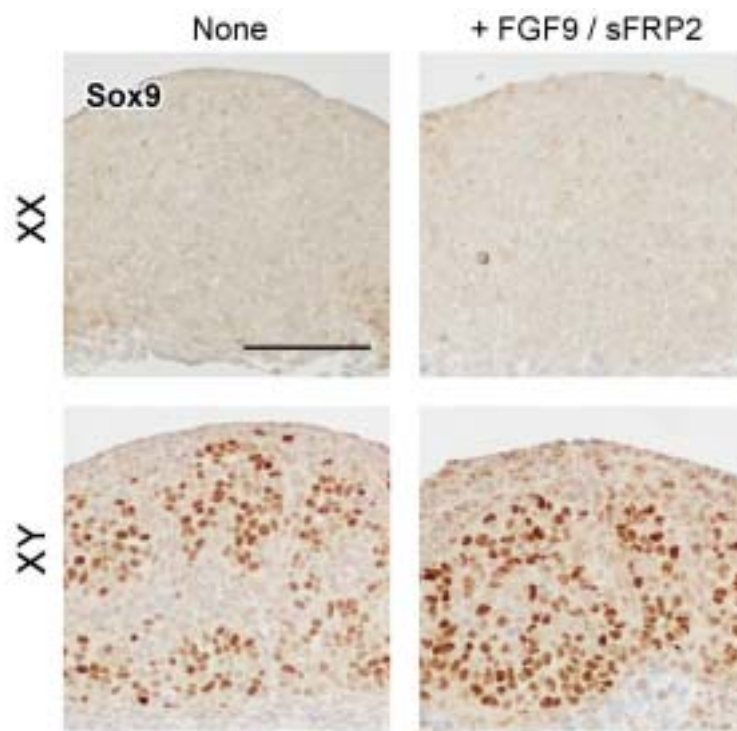


図 1-8 Sry 発現タイミングを遅らせた XX Tg 培養生殖腺の Sox9 発現維持に対する FGF9 もしくは sFRP2 添加の効果

18-19ts XX Tg の生殖原基 1 対 (熱処理あり) のうち、一方に sFRP (1.5 $\mu\text{g/ml}$) のみ添加 (+ sFRP2) 、 FGF9 (100 ng/ml) のみ添加 (+ FGF9) 、 ないし sFRP (1.5 $\mu\text{g/ml}$) と FGF9 (100 ng/ml) の添加 (+ FGF9 / sFRP2) で 24 時間培養。もう一方は添加なし (None) で培養。各 XX Tg 培養生殖腺を矢状断切片作製後、抗 Sox9 抗体の免疫染色により解析。

A : None および + sFRP2 の XX Tg 培養生殖腺では全く Sox9 陽性細胞は観察されず、 + FGF9 XX Tg 培養生殖腺ではわずかに Sox9 陽性細胞が観察された。対して、 + FGF9 / sFRP2 XX Tg 培養生殖腺では Sox9 陽性細胞の増加が明らかだった。 Scale bar = 100 μm 。

B : 誘導後 24 時間における生殖腺領域単位面積当たりの Sox9 陽性細胞数の定量。値は平均値 \pm SE (n = 4)。XX 野生型および XY 野生型は XX Tg と同腹仔を用いた。培養 72 時間での XY 野生型培養生殖腺における値を 100% とした (図 1-6D を参照)。 asterisk は + FGF9 / sFRP2 XX Tg 培養生殖腺に対して有意に差があることを示す (* : p < 0.05、 ** : p < 0.01)。

☒ 1-8

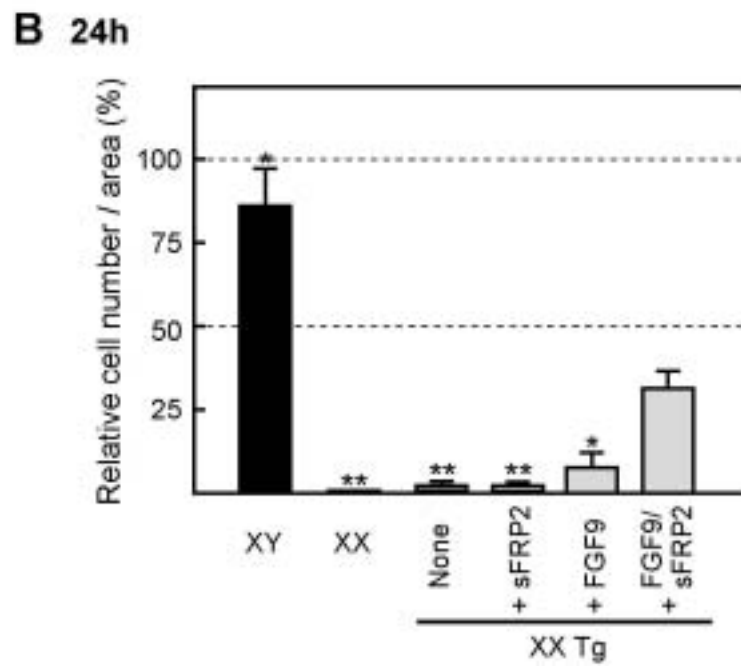
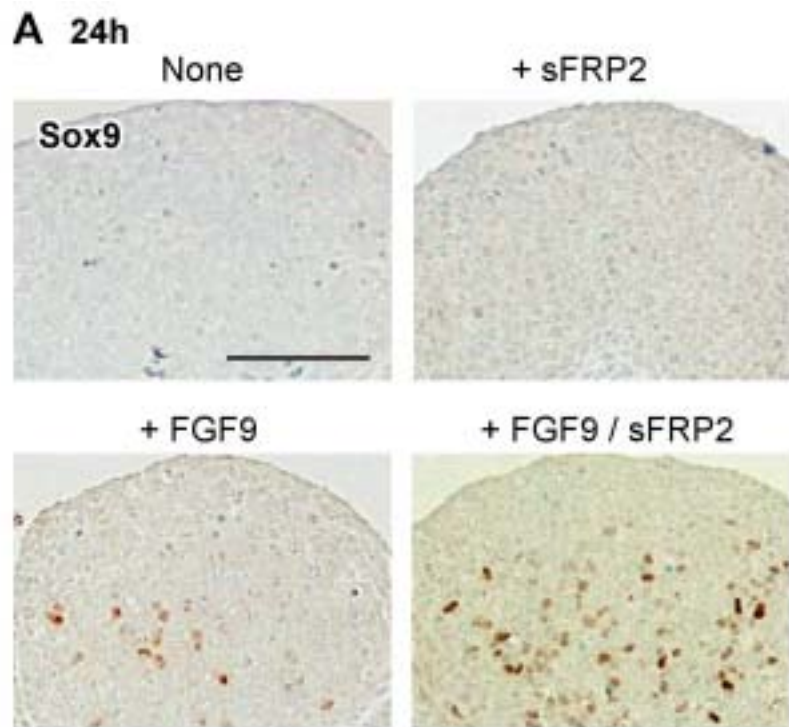


図 1-9 Sry 発現のタイミングを遅らせても、XX *Wnt4*^{+/-}生殖原基では精巢分化を誘導できる

A, B : 生殖原基は 18-19ts の XX Tg; *Wnt4*^{+/+}と XX Tg; *Wnt4*^{+/-}より単離。左生殖原基に熱処理を行い (HS +)、右生殖原基には行わなかった (HS -)。培養 72 時間後、これら XX Tg 培養生殖腺の矢状断切片を作製し、抗 Sox9 抗体 (A) および抗 laminin 抗体 (B) の免疫染色で解析した。Sox9 発現の維持および精巢索の形成ともに HS + の XX Tg; *Wnt4*^{+/-}培養生殖腺で誘導された (A, B 右上)。HS - の XX Tg; *Wnt4*^{+/-}培養生殖腺では、HS +/- の XX Tg; *Wnt4*^{+/+}培養生殖腺 (A, B 左) 同様、Sox9 発現の維持も精巢索の形成も認められなかった (A, B 右下)。Scale bars = 100 μm。

1-9

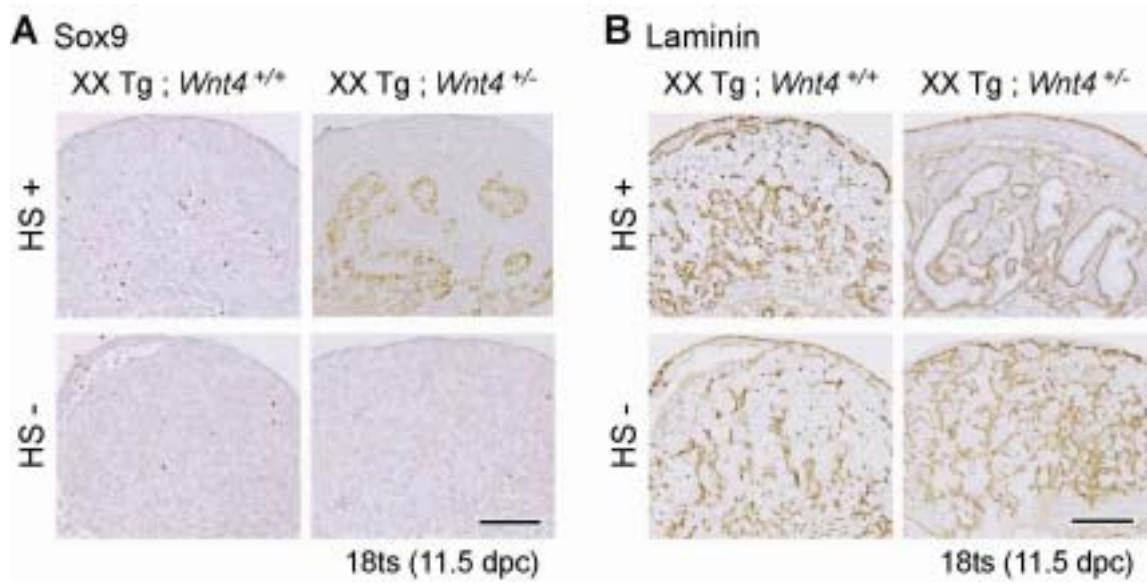


図 1-10 Sox9発現の開始および維持に対する Sry 機能の臨界期

横軸は XX 生殖腺における未分化期（青）、卵巣分化早期（紫）、卵巣分化後期（赤）を示す。それぞれの発生ステージにおける *Sry* 発現誘導による *Sox9* 発現の開始（initiation）および維持（maintenance）パターンは上部（XX Tg）に示す。XY 野生型での *Sry*、*Sox9*、および *Fgf9* 発現、ならびに XX 野生型での *Wnt4* 発現のタイミングを下部（XX および XY）に示す。12-14ts XX Tg 生殖腺では、*Sry* 発現の誘導により、セルトリ前駆細胞に *Sox9* 発現を開始する。この *Sry/Sox9* 発現が生殖腺領域の高 *Fgf9* / 低 *Wnt4* 発現バランスを導き、*Sox9* 発現を維持させ、精巣分化を誘導する。16 - 21ts XX Tg では、*Sry* 発現の誘導によりセルトリ前駆細胞での一過性の *Sox9* 発現は誘導できるが、雌特異的な *Wnt4* の高発現により、*Sox9/Fgf9* 発現の維持ができなくなる。22ts 以降の XX Tg では一過性の *Sox9* 発現も誘導できなくなる。

☒ 1-10

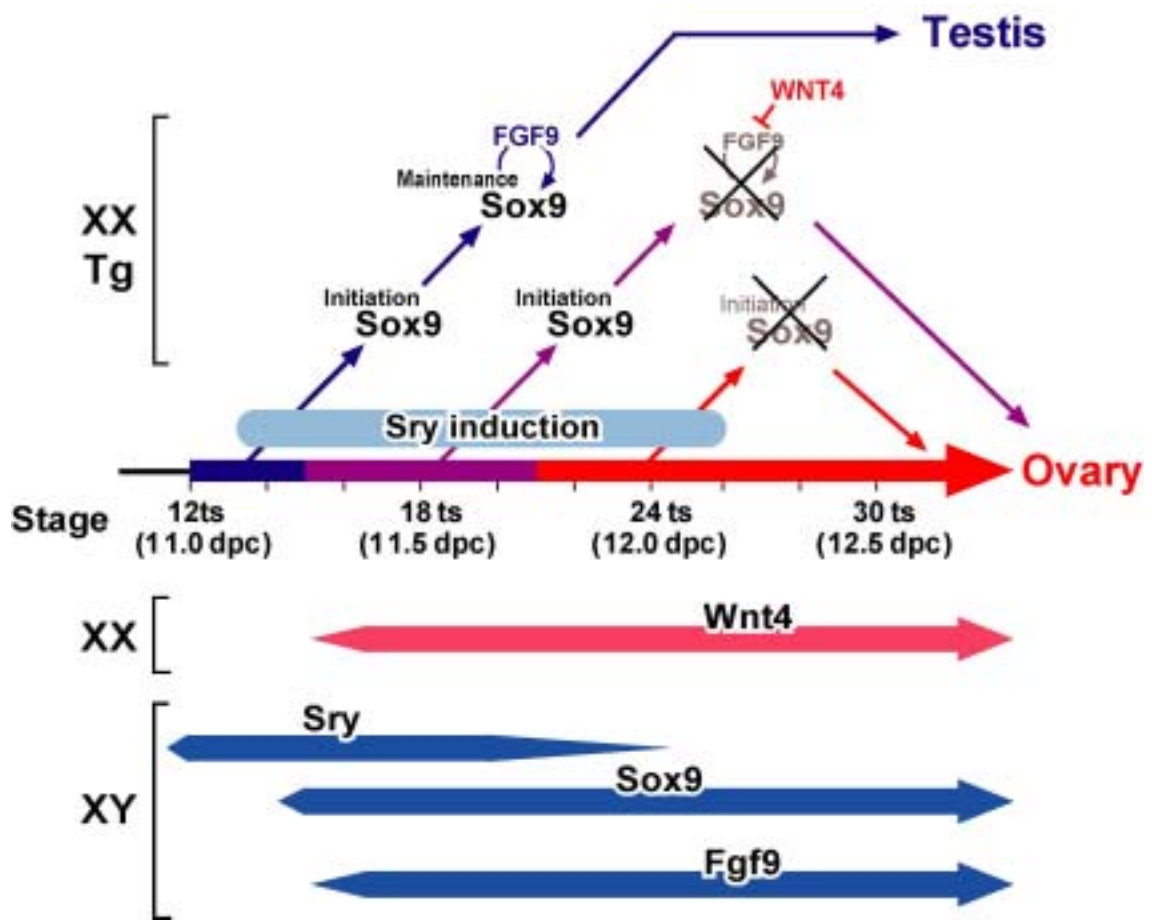


表 1-1 *Hsp-Sry* #44 XX Tg 生殖原基の、各発生ステージにおける XX 精巢誘導

	熱処理を行った Tail somite stage (ts)						
	10	11	12-13	14	15	16-17	18-21
XX 精巢形成数	0/8	1/10	19/23	9/11	3/11 [#]	0/15	0/12
/ 培養生殖腺数	(0%)	(10%)	(83%)	(82%)	(27%)	(0%)	(0%)

生殖原基は各 ts の XX Tg 胎仔より単離し、熱処理(43 10 分)を行い、4 日間培養後、組織学的に解析した。

12ts、15ts、および 18ts はそれぞれ胎齡 11.0 日、11.25 日および 11.5 日に相当。

[#]XX 精巢と判断されなかった培養生殖腺(8 個)のうち、2 個は卵精巢様構造を示した。

第 2 章

精巢分化誘導における 空間的な分化機構の解析

緒言

雌雄ともに、分化した卵巣あるいは精巣において、前後軸に沿った差異は形態的には認められない。しかし、性分化初期において、いくつかの性分化関連遺伝子が、前後軸に沿った発現パターンを示すことが明らかとなっている。一過性にセルトリ前駆細胞に発現する *Sry* は胎齢 11.0 日 (12 tail-somite stage [ts]) に XY 生殖腺の中央部より発現を開始し、その後前部、後部の両端に広がり、11.5 日 (17-18 ts) にピークを迎える (Hacker *et al.*, 1995; Jeske *et al.*, 1995; Albrecht and Eicher, 2001; Bullejos and Koopman, 2001)。 *Sry* 以外にも、前後軸に沿って異なる発現パターンを示す遺伝子がいくつか報告されている。性分化の初期過程において、 *Sox9* は、 *Sry* の発現直後である胎齢 11.1-11.2 日 (13-14 ts) に、XY 生殖腺の中央部より発現を開始する (Schepers *et al.*, 2003; Kidokoro *et al.*, 2005)。また、Ⅰ型コラーゲンをコードする *Col9A3* 遺伝子は、胎齢 11.5 日に、XY 生殖腺の中央部より発現を開始し、その後精巣索全体に発現を広げる (McClive and Sinclair, 2003)。

このような性分化初期の前後軸における発現パターンの存在は、性分化異常を示すマウス変異個体で見られる卵精巣において、精巣あるいは卵巣領域の出現頻度に、前後軸に沿って偏りがある事実と関連している可能性がある。例えば、正常よりも *Sry* の発現レベルが低いとされる B6-Y^{DOM} マウスにおいて (Eicher *et al.*, 1982)、生殖腺の分化異常による卵精巣がしばしば観察されるが、そのうち卵巣領域は中央部ではなく、前部、後部に偏って観察されることが報告されている (Eicher *et al.*, 1982; Taketo-Hosotani *et al.*, 1989; Taketo *et al.*, 1991)。この事実は、中央部と比べ、前後端領域が、卵巣に分化しやすいことを強く示唆する。

以上の報告から、性分化初期過程において、最初の精巣への分化が、生殖原基の中央部から始まり、両端へと広がることを強く示唆する。しかし、生殖原基の前後軸の領域

における機能的な差異がどの時期にどのように存在するのか、また、その分化パターンがどのようなメカニズムによるのかは明らかにされておらず、そのような空間的パターンの解明は、精巣分化のメカニズムの理解に大きくつながる。

そこで本章では、精巣分化における生殖腺前後軸に沿った分化誘導パターンについて検討するため、器官培養法を用いて詳細に解析した。その結果、セルトリ細胞分化および精巣索形成には中央から両端への分化誘導パターンが存在し、中央部による分化誘導が両端部の精巣分化に必要であること、その中央部からの分化誘導は Fgf9 シグナルを介して進められることを示した。

材料と方法

動物

妊娠 11.0-11.5 日の雌マウス(ICR; 日本 SLC より購入)よりマウス胎仔を採材した。分割培養における *Wnt4* 発現の解析においては、C57BL/6 の妊娠雌マウス(日本 SLC より購入)も使用した。また、恒常発現型 *Hsp-Sry* XX 性転換マウス(XX Tg; C57BL/6 x ICR hybrid mix; Kidokoro et al., 2005)、ROSA26 マウス(C57BL/6 x ICR hybrid mix)、および *Wnt4* 遺伝子欠損マウス(*Wnt4* ko; 129 x ICR hybrid mix)の胎仔も同様に妊娠 11.0-11.5 日の雌マウスより採取した。ts (tail-somite stage) を数えたのち、頭部を性判別および Tg、ko の確認用に、尾部を ROSA 判別用に単離した。さらに生殖原基(生殖腺および中腎)を単離し、以下の実験に用いた。頭部組織より genomic DNA を抽出後、PCR により性判別、Tg、ko の確認を行った。プライマーおよび PCR 条件は第 1 章の材料と方法に記載の通りである。

これらのマウスは東京大学動物実験実施規則に則り、飼育および実験を行った。

器官培養

生殖腺の前後軸に沿った精巣分化能を検討するため、生殖原基の分割培養を行った。妊娠 10.5 - 11.5 日のマウス(ICR および ICR と C57BL/6 もしくは 129 との hybrid mix)より子宮を取り出し、滅菌シャーレ(90×15mm EOG 滅菌済)にて冷 PBS で胎仔を単離した。各胎仔の tail-somite 数を数えた後、頭部組織を性判定用に、生殖原基(生殖腺と中腎)1 対を器官培養用に、ピンセットと注射針を用いて実体顕微鏡下で単離した。生殖原基は生殖腺前後軸に沿って 3 つ(前部、中央部および後部)に分割し(図 2-1A)、一部は分割せずに用いた。8ts 以前の胎仔から単離した生殖原基は左右を分け

ずに3つに分割して用いた。培地は10%ウマ血清とペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO)を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (SIGMA)を用いた (Kanai *et al.*, 1991)。あらかじめ24 well プレート (SUMILON) に培地 1.5ml ずつ分注しておき、ISOPORE membrane filter (3.0 μ m TSTP; MILLIPORE) をピンセットで各 well 内の培地上に浮かべた。フィルター上に、単離した未分化生殖原基を少量の培地 (約 30 μ l) とともにのせ、37℃、5%CO₂の条件下で3時間~4日間培養を行った (図 2-1B)。液性因子の精巣索形成への影響を検討する実験においては、培養液に FGF9 (100 ng/ml; Fibroblast Growth Factor; R&D Systems)、IGF1 (100 ng/ml; Insulin-like Growth Factor 1; Sigma)、PDGF BB (100 ng/ml; Platelet-derived Growth Factor BB; Sigma)、PGD2 (500 nM; Prostaglandin D2; Cayman Chemical, MI, USA) を添加し、培養を行った。Fgf シグナル阻害による Sox9 発現への影響を検討する実験においては、培養液に SU5402 (10 μ M; Calbiochem, CA, USA) を添加し、培養を行った。生殖腺前部・後部に対する中央部の精巣分化誘導能を検討するための実験では、分割した前部・中央部・後部を再度組み合わせて培養する、再構築培養を行った。この実験では妊娠 11.0 日 (12-14ts) の ICR 雌マウス (ICR と C57BL/6 との hybrid mix; ROSA26 雄マウスと交配) より胎仔を単離した。各胎仔の tail-somite 数を数えた後、頭部組織を性判定用に、尾部組織を ROSA 判定用に、生殖原基 (生殖腺と中腎) 1 対を器官培養用に、ピンセットと注射針を用いて実体顕微鏡下で単離した。生殖原基は生殖腺前後軸に沿って3つ (前部、中央部、および後部) に分割し、前部・後部に XY 野生型胎仔由来、中央部に XY ROSA26 胎仔由来のものを用いた。アガロースブロック (1.5% アガロース-DMEM; 約 10 x 5 x 5 mm) の上に、20 μ l 程度の培養液とともに分割した生殖原基を載せ、注射針を用いて各生殖原基片の位置を合わせた後、各生殖原基片の接着を強くするため、余分な培養液を取り除いた。生殖原基を載せたアガロースブロックを、

24well プレートに入れ、周囲に 300 ml の培養液を加えて 37 °C、5% CO₂ の条件下で 4 日間培養した。培養液は培養開始後 12 時間、およびその後 24 時間ごとに交換した。

X-gal 染色

培養生殖腺および ROSA 判別用の尾部組織を 0.2% グルタルアルデヒド / 1% PFA / 0.02% NP40 / PBS で、4 °C、30 分固定し、金井-東らの方法に従い、X-gal 染色を行った (Kanai-Azuma *et al.*, 2002)。染色後の培養生殖腺は実態顕微鏡下で写真を撮った後、4% PFA-PBS で後固定を行い、パラフィンに包埋した。組織学的解析用に 4 μm の厚さでパラフィン切片を作製した。

組織学解析および免疫染色

培養した組織は 4%PFA-PBS にて固定し、常法に従いパラフィンに包埋した。4 μm の厚さで作製した切片は免疫染色およびレクチン染色を行った。一部の培養組織については、2.5%グルタルアルデヒド-PBS で 4 °C、4 時間固定し、PBS で洗浄後、1%四酸化オスミウム-0.1M PBS で 4 °C、2 時間後固定を行った。その後、常法に従いアララルダイト樹脂に包埋し、準超薄切片 (約 1 μm) を作製後、1%トルイジンブルーで染色した。

免疫染色は以下の方法で行った。切片は抗 Sox9 抗体 (1/250 希釈; Kent *et al.*, 1996; Kidokoro *et al.*, 2005)、抗 laminin 抗体 (1/400 希釈; MP Biomedicals) を 4 °C、12 時間反応させた。反応はビオチン標識 2 次抗体および Elite ABC Kit (Vector Laboratories) にて可視化した。

レクチン染色は *Griffonia simplicifolia* agglutinin-I (GS-I; Porter *et al.*, 1990; Vector Laboratories) を血管内皮細胞のマーカーとして用いた。レクチン染色は金井ら

方法に従って行った (Kanai *et al.*, 1989)。

培養生殖腺における精巣索形成は以下のように判定した。

- ・精巣索が形成されていない： - (図 2-2 A, B, C)
- ・精巣索様の構造はみられるものの、正常な形状ではない： ± (図 2-2 D, F, I)
- ・正常に精巣索が形成されている： + (図 2-2 E, G, H)

SOX9 陽性細胞数の定量的解析は、1 培養組織に対し 3 枚の矢状断切片について単位面積当たりの陽性細胞数 (陽性細胞数 / mm²) を算出した。3 枚の平均値を各培養組織の単位面積当たりの陽性細胞数とし、各実験群につき 5 個体算出した。

Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization は金井-東らの方法に従って行った (Kanai-Azuma *et al.*, 1999)。培養組織を 4%PFA-PBS にて 4 、4 時間固定し、メタノールで脱水した。自動 *in situ* hybridization 装置を用いて、再水和後、10 μg/ml Protease K-PBST で 60 分処理し、各 RNA probe とハイブリダイゼーションを行った。*Sry*、*Sox9*、*Wnt4*、*Mfge8*、*3βHsd* は 68 、*Fgf9* は 55 で 16 時間行った。100 μg/ml RNase A 処理を 37 、30 分行った後、50% formamide / 2x SSC で 65 、1 時間洗浄した。シグナルはアルカリフォスタファアーゼ標識抗 DIG 抗体と nitro blue tetrazolium (NBT) 5-bromo4-chloro3-indolylphosphate(BCIP)を用いて可視化した。RNA probe には *Sry* (Bullejos and Koopman, 2001)、*Sox9* (Kent *et al.*, 1996)、*Fgf9* (Colvin *et al.*, 1999)、*Wnt4* (Mizusaki *et al.*, 2003)、*Mfge8* (Kanai *et al.*, 2000)、*3βHsd* (Nordqvist and Tohonen, 1997) を用いた。

定量的 RT-PCR

培養組織より Trizol reagent(Invitrogen)を用いて、total RNA を抽出した。DNaseI 処理を 30 分間行った後、SuperScript III cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)を用いて RNA を逆転写し、cDNA を合成した。プライマーには random primer を用いた。逆転写反応なしを対照群として用いた。

Fgf9、*Wnt4* の発現には Taqman probe (*Fgf9* : Mm00442795_m1、*Wnt4* : Mm00437341_m1; Applied Biosystems)を、それに対する *Gapdh* の発現には Taqman Rodent GAPDH Control Reagents(Applied Biosystems)を使用した。PCR は Taqman Universal Master Mix で調整し、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems)で行った。PCR 条件は下記の通りである。

50 2 分、95 10 分、[95 15 秒、60 60 秒] x 40 サイクル

各培養組織について、*Gapdh* の発現レベルに対するそれぞれの遺伝子の発現レベルの相対値を算出した。

統計解析

遺伝子発現および細胞数に関する定量データについては Student's *t*-test により統計的に解析した。各生殖腺領域での精巣索形成能については、 χ^2 検定にて統計的に解析した。

結 果

1 . 生殖腺の器官培養における精巢索形成

14ts (胎齡約 11.25 日) よりも若齡の胎仔から単離した ICR XY 生殖原基の器官培養では、正常な精巢索形成が起こらないという報告がなされている (Taketo and Koide, 1981; Tilmann and Capel, 1999)。今回の ICR マウス胎仔生殖原基の器官培養系においても、精巢索形成は 12ts 以後 (胎齡 11.0 日) の胎仔から単離した生殖腺でのみ観察された。精巢索形成が正常に確認された生殖腺の数は、12-14ts において 34 個中 23 個、9-11ts において 31 個中 1 個であった。(図 2-1C)。Whole-mount *in situ* hybridization により、12ts 以後のこれらの生殖腺には、セルトリ細胞のマーカである *Sox9* が発現していることを確認した (Kent *et al.*, 1996; 図 2-1D)。一方、ライディッヒ細胞の分化は、ライディッヒ細胞のマーカである *βHsd* (Nordqvist and Tohonen, 1997) の発現を調べた結果、7-11ts (胎齡約 10.5 日-11.0 日) で取り出した生殖腺において、約 70% で確認された (7-11ts においては 24 個中 19 個; 図 2-1D)。なお、4-6ts においては 6 個中 0 個であった。7-11ts で単離し、3 日間培養した生殖腺は、胎齡 11.5 日で単離し、培養した生殖腺と同様の形状と大きさであったが、*Sox9* の発現は全く認められなかった(図 2-1D)。一方、*βHsd* と *Mfge8* 生殖腺の間質細胞のマーカ遺伝子; Kanai *et al.*, 2000) はこれらの培養生殖腺において発現していた。これらのことから、7-9ts で単離した培養生殖腺において、生殖腺のステロイド産生細胞と間質細胞の分化は正常であるものの、支持細胞の形成は誘導されないことが推測された。よって、今回の培養系において、生殖原基のライディッヒ細胞の分化誘導能については 7ts 以降から、一方、精巢索形成能、およびセルトリ細胞の分化誘導能は、12ts 以降から単離した生殖原基の培養生殖腺で評価を行うことができることが示された。

2. 発生ステージにより、生殖原基の精巢分化能の領域差が存在する

精巢分化時における生殖原基の分化能について、領域間に差異があるかどうかを調べるため、7-17ts で単離した ICR XY 生殖原基を前部、中央部、および後部に分け、それぞれを別々に培養した (図 2-1A)。7-17ts (胎齢約 10.5 日-11.5 日) で単離した前部、中央部、および後部の培養生殖腺は全て、生殖腺 - 中腎構造を形成した (図 2-1B)。

XY 生殖原基のそれぞれの部位の培養生殖腺を組織学的に検討した結果、精巢索形成能において、領域特異性、およびステージ特異性が明らかとなった (表 1)。11ts 以前の培養群では、どの領域においても精巢索様の構造は形成されなかった (図 2-2 A-C)。これは、同じ ts の培養生殖腺 (生殖腺全領域、分割なし) も精巢索形成が起こらなかったことと合致している。しかし、12-14ts の培養群では、約 70% の前部および後部で精巢索が正常に形成されなかったのに対し、中央部では 70% 以上で明瞭に形成された精巢索が確認された (図 2-2 D-F)。図 2-2 の D, F は、13ts の培養群のうち、前部、後部の組織像で、細く小さい、不明瞭な精巢索様構造 (± と判定) が観察されたものを示す。15-17ts の培養群では、前部ではほとんどの個体で精巢索形成が誘導された (図 2-2G) のに対し、後部では約 50% の個体において精巢索形成が正常に誘導されなかった (図 2-2I)。

生殖腺培養における精巢索形成不全に、セルトリ細胞分化が影響しているかどうかを調べるため、各培養群をセルトリ細胞のマーカーである *Sox9* で whole-mount *in situ* hybridization を行った (図 2-3)。培養生殖腺における *Sox9* の発現は、上記の領域およびステージ特異的な精巢索形成パターンによく似ていた。11ts 以前の培養群では、どの領域でも *Sox9* の発現は認められなかった (図 2-3 A-C)。12-14ts の培養群では、前部、後部と比較して、中央部で強く生殖腺領域に *Sox9* の発現が確認された (図 2-3 D-F)。15-17ts の培養群では、すべての領域で *Sox9* の発現が確認されたが、後部は比較的発現が弱かった (図 2-3 G-I)。これらのことより、12-14ts の生殖原基において、前

部、後部に比べて中央部に高い精巣索形成能とセルトリ細胞分化誘導能があることが示された。

なお、ライディッヒ細胞は、細胞質に多数の脂肪滴を有する細胞として、形態学的に同定することができる(Pelliniemi *et al.*, 1996; 図 2-2 insets)。そこで、培養生殖腺の連続切片によりライディッヒ細胞の分化を観察した結果、11ts 以前の培養群においては、前部からのみ組織学的にライディッヒ細胞が確認された (n=4; 図 2-2A inset)。一方 12ts 以降の培養群では、後部の生殖腺間質領域からも確認することができた(図 2-2 D-F insets)。これらのことから、ライディッヒ細胞の分化誘導能は 7-11ts の生殖原基の前部から現れ始め、ステージが進むごとに分化能が後部へと広がっていき、15-17ts までには全領域に広がるものと推測された。

3. 前部および後部の精巣索形成は、中央部の存在により正常に誘導される

前節の生殖原基の三分割培養により推測された通り、実際に生殖原基の中央部から両端部へセルトリ細胞分化および精巣索形成誘導能が広がるか確認するため、12-14ts の XY 生殖原基を前部、中央部、および後部に分割し、分割した生殖原基片を再度組み合わせる再構築培養を行った。この再構築培養において、培養後に中央部由来の領域、細胞を同定するため、前部、後部に XY 野生型マウス胎仔 (LacZ 陰性) より単離した生殖原基の分割片を用い、中央部に XY ROSA26 マウス胎仔 (LacZ 陽性) より単離した生殖原基の分割片を用いた (図 2-4A、B)。再構築した生殖原基は 4 日間培養し、組織学的に解析を行った。再構築した培養生殖腺は、12-14ts の生殖原基を分割せずにそのまま培養した場合 (図 2-1B) と同様、生殖腺 - 中腎構造を形成し、精巣様の構造を示した (図 2-4C 上段)。Xgal 染色後、中央部由来の領域は LacZ 陽性領域として同定された (図 2-4C 下段)。

再構築培養における生殖原基前部および後部の精巣索形成能を解析するため、LacZ 染色後、抗 laminin 抗体の免疫染色を行い、組織学的に精巣索形成の程度を判定した。その結果、LacZ 陰性領域、つまり前部、後部の生殖原基片由来の領域においても + と判定される、明瞭に形成された精巣索が約 70% の再構築培養生殖腺で確認された (n=25; 図 2-4D; 表 2-2)。一方で、今回の再構築培養において用いたマウス胎仔と同腹の XY 野生型生殖原基 (12-14ts) を分割したまま培養した場合、前部、後部の培養生殖腺では約 20% しか明瞭な精巣索が確認されず (n=10; 表 2-2)。再構築培養における前部・後部の精巣索誘導能は、分割培養における前部・後部の精巣索形成能に比べ有意に上昇していた (χ^2 検定; $p < 0.05$; 図 2-4E)。以上より、前部および後部の精巣索形成は、中央部の存在により正常に誘導されることが明らかとなった。また、前節の結果と合わせ、精巣分化初期過程において、セルトリ細胞分化および精巣索形成誘導能は 12-14ts より生殖原基の中央部より始まり、15-17ts には生殖原基全体へと広がる、中央から両端へのパターンを示すことが明らかとなった。

4. 中央から両端へ広がる精巣分化パターンは細胞の移動によるものではない

精巣索形成誘導能が何を介して中央部から前部、後部へ広がるかを明らかにするため、Xgal 染色後の再構築培養生殖腺について詳細に観察を行った。再構築の際、中央部に XY ROSA26 マウス胎仔生殖原基を用いており、中央部由来の細胞は LacZ 陽性となる。そこで、再構築培養生殖腺前部、後部 (LacZ 陰性) 領域内の LacZ 陽性細胞を観察することで、中央部から前部、後部への細胞の動態について解析した。全ての再構築培養生殖腺において、生殖腺間質領域の GS-I 陽性細胞 (血管内皮細胞; Porter *et al.*, 1990) の近傍に LacZ 陽性細胞が観察された (図 2-4D)。しかしながら、精巣索内には LacZ 陽性細胞は全く観察されなかった (図 2-4D)。以上の結果より、セルトリ細胞を含む精

巢索を構成する細胞群は中央部から前部、後部へは移動しておらず、精巢索形成誘導能の中央から両端へのパターンには細胞の移動が直接関わっていないことが示された。また、以上の結果は、この誘導パターンに関わり、中央部から分泌される液性因子が存在していることを示唆している。

5 . *Sry*の中央から両端への発現パターンは、前部、後部の精巢索形成不全には直接関係していない

*Sry*の発現は、12ts(胎齢 11.0 日に相当)に XY 生殖原基の中央部より開始し、17-18ts(胎齢 11.5 日に相当)までに生殖腺の前端および後端へと広がる。つまり、12-14tsに XY 生殖原基の分割片が単離された時点では、前部および後部の分割片には *Sry*はまだ発現していない。そこで、12ts に単離・分割された、各領域の XY 培養生殖腺における *Sry*の発現パターンを whole-mount *in situ* hybridization により解析した。分割をしない 12ts XY 生殖原基の培養生殖腺において、*Sry*の発現は培養開始後 3 時間で生殖腺中央部に見られ、9 時間では、その発現は生殖腺全領域に広がった(図 2-11A)。この結果は、培養下での XY 生殖原基における *Sry*の発現パターンが、*in vivo*の *Sry*発現の中央から両端へのパターンと一致していることを示している(Bullejos and Koopman, 2001; 本博士論文第 1 章 図 1-1C)。この発現パターンと同様に、12ts XY 生殖原基の中央部片の培養生殖腺では、*Sry*の発現は培養開始後 3 時間および 9 時間で観察された。また、12ts XY 生殖原基の前部・後部片の培養生殖腺では、*Sry*の発現は培養開始後 9 時間で観察された(図 2-5A)。さらに、各領域の培養生殖腺で抗 *Sry* 抗体の免疫染色を行った結果、培養開始 12 時間後の全ての領域の培養生殖腺で *Sry* 蛋白の局在が確認された(図 2-5B)。以上の結果から、12ts XY 生殖原基の前部・後部片においても、*Sry*は正常に発現していることが示された。

さらに、*Sry* 発現の中央から両端へのパターンが、12ts の前部・後部片の培養生殖腺における精巣索形成不全に関係しているかを明確にするため、恒常発現型 *Sry* トランスジェニック (Tg) マウスを用いて、三分割培養を行った。この Tg ラインでは、導入された *Sry* が遅くとも生殖腺形成初期の 9ts (胎齢 10.5 日相当) 頃から生殖腺の全領域に発現し、XX 性転換 (XX 精巣) を誘導する。つまりこの Tg マウスでは、12-14ts に単離した XX 生殖原基の前部・後部片では、単離時に既に中央部同様に *Sry* が発現していることになる。そこで、12-14ts の XX Tg および XY 野生型 (wt) の生殖原基を単離、分割し、4 日間培養後の各領域の培養生殖腺における精巣索の形成程度について解析した。その結果、XY wt 同様、XX Tg においても前部 (+ = 5%; ± = 10%; n = 20)、後部 (+ = 10%; ± = 15%; n = 20) に比べ、中央部 (+ = 40%; ± = 35%; n = 20) では有意に高い頻度で精巣索の形成が観察された (χ^2 検定; $p < 0.05$; 図 2-5C、D; 表 2-3)。以上の結果より、*Sry* 発現の中央から両端へのパターンは、12-14ts XY の前部・後部の精巣索形成不全に直接関係していないことが示された。

6 . *Sox9* の発現は前部・後部で上昇しない

続いて、12ts に単離・分割された、各領域の XY 培養生殖腺における *Sox9* の発現パターンを whole-mount *in situ* hybridization により解析した。分割をしない 12ts XY 生殖原基の培養生殖腺において、*Sox9* の発現は培養開始後 6 時間で生殖腺中央部に認められ、12 時間では、その発現は生殖腺全領域に広がった (図 2-11B)。この発現パターンと同様に、12ts XY 生殖原基の中央部片の培養生殖腺では、*Sox9* の発現は培養開始後 6 時間で観察された。一方、ほとんどの 12ts XY 生殖原基の前部・後部片の培養生殖腺では、*Sox9* の発現は培養開始後 15 時間でもわずかにしか観察されなかった (図 2-6A)。各領域における *Sox9* 発現についてさらに詳細に解析するため、抗 *Sox9* 抗体の

免疫染色を行い、生殖腺領域の単位面積当たりの Sox9 陽性細胞数を算出した。この実験においては、培養開始後 30 時間での中央部培養生殖腺の単位面積当たりの Sox9 陽性細胞数の平均値 ($19.6 \pm 0.64 \times 10^3$ 細胞数 / mm^2) を 100%とした。12ts の前部・後部の培養生殖腺において、培養開始後 12 時間では Sox9 陽性細胞が観察され、その面積当たりの細胞数は中央部と有意な差はなかった (前部: 52.4 ± 5.8 %; 中央部: 63.6 ± 15.0 %; 後部: 53.1 ± 11.5 %; $n = 5$; Students' *t*-test; 図 2-6B、C)。一方、培養開始後 30 時間では、前部・後部の SOX9 細胞数は中央部に比べて有意に低かった (前部: 41.9 ± 8.0 %; 後部: 51.5 ± 12.8 %; $n = 5$; Students' *t*-test; 図 2-6B、C)。この結果から、12ts XY 生殖原基の前部・後部片の培養生殖腺では、*Sox9* の発現は開始されるものの、その発現が上昇しないことが示された。

7 . *Fgf9* は中央から両端へ、雄特異的な発現パターンを示す

これまでに *Fgf9* (Fibroblast growth factor 9) が *Sox9* 発現や精巣索形成に必須であることが報告されている (Colvin *et al.*, 2001; Schmahl *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006)。そこで、*Fgf9* の *in vivo* での発現パターンについて whole-mount *in situ* hybridization により解析した。XY 生殖腺において、*Fgf9* の発現は 15ts に生殖腺中央部に最初に確認され、その発現は 18ts には生殖腺全領域に広がる。一方、XX 生殖腺においては 18ts でも *Fgf9* の発現は確認できなかった (図 2-7A)。

続いて、12ts に単離・分割された、各領域の XY 培養生殖腺における *Fgf9* の発現を whole-mount *in situ* hybridization により解析した。分割をしない 12ts XY 生殖原基の培養生殖腺において、*Fgf9* の発現は培養開始後 16 時間で生殖腺全領域に確認された (図 2-11C)。この発現パターンと同様に、12ts XY 生殖原基の中央部片の培養生殖腺では、*Fgf9* の発現は培養開始後 16 時間で観察された。一方、ほとんどの 12ts XY 生殖

原基の前部・後部片の培養生殖腺では、*Sox9*の発現は培養開始後 16 時間でわずかにしか観察されなかった（図 2-7B）。また、定量的リアルタイム PCR 解析においても、培養開始後 18 時間で前部・後部の培養生殖腺の生殖腺領域では、中央部に比べ *Fgf9* の発現が有意に低下していた（Student *t*-test; $p < 0.01$; 図 2-7C）。以上より、*Fgf9* の発現は *Sox9* の発現開始からすぐに雄特異的な中央から両端へのパターンを示すこと、前部・後部の培養生殖腺では *Fgf9* は正常に発現しないことが明らかとなった。

8 . FGF9 添加により、前部・後部でも精巣索形成が誘導される

精巣索形成誘導能の中央から両端へのパターンに *Fgf9* シグナルが関与しているか検討するため、12-14ts に単離・分割した 1 対の XY 生殖原基片の一方を FGF9 添加で、もう一方を FGF9 添加なしで培養し、精巣索形成の程度について解析した。添加なしの培養生殖腺では、+ と判定される明瞭な精巣索が前部・後部では 10%程度であった（前部および後部: 10%; $n = 10$; 図 2-8A、C; 表 2-4）が、FGF9 添加での培養生殖腺では、+ と判定される明瞭な精巣索が前部・後部では 60%以上（前部: 62%; $n = 21$ 、後部: 67%; $n = 21$; 図 2-8A、C; 表 2-4）と、有意に高まった（ χ^2 検定; $p < 0.05$ ）。抗 *Sox9* 抗体の免疫染色の結果、中央部の培養生殖腺同様、FGF9 添加での前部・後部の培養生殖腺では精巣索構造を示す *Sox9* 陽性細胞群が確認された（図 2-8B）。なお、- と判定された精巣索構造なしの培養生殖腺（図 2-8B 左下[Ant, None]）および ± と判定された不明瞭な精巣索構造を示す培養生殖腺（図 2-8B 右下[Post, None]）でも、*Sox9* 陽性細胞が確認された。*Fgf9* 以外の精巣分化に関与することが報告されている液性因子である *Igf1*（Insulin like growth factor 1; Nef *et al.*, 2003）、*Pdgf BB*（Platelet-derived growth factor BB; Brennan *et al.*, 2003）ないし *PGD2*（Prostaglandin D2; Malki *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2005）の添加培養では、前部および後部の培養生殖腺での精

巢索形成は 10%以下であり (表 2-4) 精巢索形成を誘導することができなかった。以上より、12-14ts XY 生殖原基の前部・後部は、中央部なしでも FGF9 添加で精巢索形成が誘導されることが示された。

9 . FGF9 添加により、前部・後部でも *Sox9* 発現の上昇が誘導される

前部・後部の培養生殖腺でのセルトリ細胞分化に対する FGF9 添加の効果を検討するため、12-14ts に単離・分割した 1 対の XY 生殖原基片の一方を FGF9 添加で、もう一方を FGF9 添加なしで 18 時間培養し、whole-mount *in situ* hybridization で *Sox9* 発現を確認した。添加なしの条件において、前部・後部の培養生殖腺での *Sox9* 発現は中央部に比べて低いのに対し、FGF9 添加条件下では前部・後部においても中央部と同程度に発現が確認された (図 2-9A)。さらに FGF9 の効果を確認するため、12ts XY 生殖原基 (分割なし) を FGF シグナル阻害剤である SU5402 添加で 12 時間培養し、whole-mount *in situ* hybridization で *Sox9* の発現を解析した。添加なしで培養した場合に比べ、SU5402 添加では *Sox9* の発現が抑制されていた (図 2-9B)。さらに、前後軸に沿った生殖腺の長さに対する *Sox9* 発現領域の長さの割合を算出したところ、添加なし (0.911 ± 0.089 ; $n = 7$) に対して SU5402 添加 (0.416 ± 0.302 ; $n = 7$) では有意に小さくなっていた (Students' *t*-test; $p < 0.01$; 図 2-9C)。以上より、FGF9 添加により前部・後部での *Sox9* 発現の上昇が誘導されることが示された。

10 . *Wnt4* は前部・後部の精巢索形成不全に関与していない

これまでの解析で、精巢分化初期過程の、中央から両端への分化パターンが Fgf9 シグナルを介して誘導されていることを示した。しかしながら、*Wnt4* シグナルが Fgf9

シグナルに拮抗することで卵巣分化を促進することが報告されている (Kim *et al.*, 2006)。そこで、12-14ts XY の前部・後部の精巣索形成不全に、Wnt4 シグナルの抑制的作用が関与していないか検討を行った。

まず、Wnt4 の *in vivo* での発現パターンについて whole-mount *in situ* hybridization により解析した。XX 生殖腺において、13ts では生殖腺領域にわずかにシグナルが確認される程度であるが、15ts でそのシグナルが強まり始め、18ts では生殖腺全領域で強いシグナルが観察された。一方、XY 生殖腺において、13ts では XX 同様、生殖腺領域にわずかなシグナルが確認された。しかし、15ts では *Fgf9* の発現パターンと相反するように、中央部ではその発現が消失し、18ts ではほぼ全領域で Wnt4 の発現は確認できなかった (図 2-10A)。以上より、Wnt4 は胎齢 11.0 日頃 (12ts 相当) は XX、XY ともに生殖腺領域に弱く発現しているが、その後 XX では発現が強まり、XY では *Fgf9* の発現に相反するように中央部より消失することで、胎齢 11.5 日 (18ts 相当) には雌特異的な発現になることがわかった。

続いて、12ts に単離・分割された、各領域の XX および XY 培養生殖腺における Wnt4 の発現を whole-mount *in situ* hybridization により解析した。培養開始後 18 時間において、各領域の XX 培養生殖腺の生殖腺領域に Wnt4 の発現が確認された (図 2-10B 下段、点線領域)。この発現に対し、各領域の XY 培養生殖腺の生殖腺領域には Wnt4 の発現は確認できなかった (図 2-10B 上段、点線領域)。定量的リアルタイム PCR 解析においても、各領域の XY 培養生殖腺の生殖腺領域には Wnt4 発現の上昇は確認されなかった (図 2-10C)。なお、これまでの *Fgf9* ノックアウトマウスの解析では、XY;*Fgf9*^{-/-} における精巣形成不全の表現型は、CD1 x 129 の hybrid mix では完全な精巣形成不全から、卵精巣様構造、正常な精巣形成と幅があったのに対し、系統を C57BL/6 (B6) に変えていくと、生殖腺領域で Wnt4 発現が上昇し、完全な精巣形成不全になることが報告されている (Schmahl *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006)。本研究では、これまで ICR

もしくは ICR との hybrid-mix の系統を使用しているが、B6 における各領域の XY 培養生殖腺における *Wnt4* の発現も解析した。その結果、B6 系統では、中央部の培養生殖腺の生殖腺領域に *Wnt4* 発現が確認されないのに対し、前部・後部では生殖腺領域にもその発現が確認された (図 2-12)。

最後に、12-14ts の XY; *Wnt4*^{-/-} および XY; *Wnt4*^{+/+} の生殖原基を単離、分割し、4 日間培養後の各領域の培養生殖腺における精巢索の形成程度について解析した。解析には XY; *Wnt4*^{-/-} を用いたが、XY; *Wnt4*^{-/-} の生殖原基は精巢分化が正常に進まないこと (Jeays-Ward *et al.*, 2004) から解析に用いられない一方、*Wnt4*^{-/-} での *Wnt4* シグナル活性の減少は *Sry* による XX 精巢分化誘導に十分であること (本博士論文第 1 章図 1-10) から、*Wnt4* が前部・後部の精巢索形成を阻害しているとすれば、*Sry* が発現している XY; *Wnt4*^{-/-} の前部・後部では精巢索形成が見られると考えられる。その結果、前部・後部の培養生殖腺での精巢索形成は、XY; *Wnt4*^{-/-} と XY; *Wnt4*^{+/+} で有意な差は認められなかった (n = 10; χ^2 検定; 図 2-10D、E; 表 2-5)。以上の結果より、12-14ts XY の前部・後部における精巢索形成不全に、*Wnt4* は直接関与していないことが示唆された。

考 察

本研究では、生殖原基の分割培養法および再構築培養法を用いて、精巢分化初期過程における、生殖原基の前後軸に沿った分化誘導能パターンについて解析を行った。その結果、1) 生殖腺両端部(前部・後部)の精巢索形成には中央部からの分化誘導が必要であること、2) 中央部から両端部への精巢索形成誘導は Fgf9 シグナルを介して行われることが示された。これまでの報告において、*Mus musculus domesticus* の Y 染色体を C57BL/6 の系統に組み入れた B6-Y^{DOM} で生じる卵精巢において、中央部が精巢領域、両端部が卵巢領域になることから (Eicher *et al.*, 1982; Taketo-Hosotani *et al.*, 1989; Taketo *et al.*, 1991) 前後端に沿った精巢分化能に差異があることが推測されていた。本研究で示された中央から両端へのパターンは、*Sry* の発現パターン (Bullejos and Koopman, 2001; Albrecht and Eicher, 2001; Kidokoro *et al.*, 2005) と一致している。そして、精巢分化の開始期である 12-14ts の時期に中央部と両端部に精巢索形成能に差異が生ずることと見出し、また中央部からの分化誘導が両端部の精巢索形成に必要なことを示している。これらの結果は、精巢形成の中央から両端への分化誘導パターンの存在を実験的に示した初めての成果である。。

B6-Y^{DOM} の精巢分化異常は、*Mus musculus* の *Sry* を遺伝子導入することで回復すること (Eicher *et al.*, 1995) Y^{DOM} の SRY 蛋白は異なる isoform を持ち (Albrecht and Eicher, 1997; Carlisle *et al.*, 1996; Coward *et al.*, 1994; Nagamine *et al.*, 1999) その蛋白質の isoform が精巢分化異常に関わる可能性があること (Albrecht *et al.*, 2003) B6-Y^{DOM} では *Sry* の発現が遅れていること (Bullejos and Koopman, 2005) などから、*Sry* が原因であることが推測されていた。実際に、実験的に *Sry* の発現タイミングを遅らせることで、卵精巢が誘導されることを本研究でも示している (本博士論文 第 1 章 図 2-3)。しかしながら、今回解析した中央から両端への分化誘導パターンは *Sry* が直

接制御しているものではなかった。分割培養において、両端部で *Sry* および *Sox9* の発現は認められることから、両端部においてもセルトリ細胞は分化しており、それらの細胞では *Sry* の発現、および *Sry* の機能である *Sox9* の発現誘導 (Sekido and Lovell-Badge, 2008) は前後軸に関係なく、細胞自律的に起きていることが示唆される (図 2-13)。一方、中央部と両端部ではその後の *Sox9* および *Fgf9* の発現上昇において差異が生じており、それらの発現上昇には中央部から分泌される *Fgf9* が必要であること、つまり、中央部から分泌される *Fgf9* が中央から両端へのパターンを直接制御していることを本研究では示した (図 2-13A)。 *Fgf9* ノックアウトマウスでは、多くの個体が精巣分化異常を示すが、その一部で中央部のみの精巣索形成を示す卵精巣が生じること (Colvin *et al.*, 2001)、 *Fgfr2* (Fgf receptor 2) の生殖腺特異的ノックアウトマウスでは、中央部が精巣で両端部が卵巣の卵精巣を呈すること (Kim *et al.*, 2007; Bagheri-Fam *et al.*, 2008) が報告されており、この結果と符合する。

Fgf9 は精巣分化初期である胎齢 11.5 日頃にセルトリ細胞に発現し、*Sox9* とポジティブフィードバックを成すことで、精巣分化を推進することが示されている (Kim *et al.*, 2007)。それではなぜ *Sox9* の発現が一過性ながら、中央部と同程度まで誘導されている前部・後部で *Fgf9* 発現が正常に誘導されないか。そこで、*Fgf9* に拮抗的に作用し、卵巣分化を促進する *Wnt4* が前部・後部における精巣索形成不全に影響しているかについて、mRNA の発現解析や *Wnt4* ノックアウトマウスを用いた解析で検討を行った。しかしながら、今回の結果では、ICR 系統において、両端部の精巣分化不全と *Wnt4* との関わりを見出せなかった。精巣索形成が全く認められず、- と判定された培養生殖腺においても *Sox9* 陽性細胞が観察されたが (図 2-8)、*Wnt4* シグナルの下流である β -catenin を安定化させると、XY でも *Sox9* 陽性細胞が消失するという報告があり (Maatouk *et al.*, 2008)、これらのことから、前部、後部において、*Wnt4* は強く機能していないことが示唆される。このことはまた、前部・後部の精巣精巣索形成におけ

る、中央部からの *Fgf9* による誘導が重要であることを強調するものである。*Fgf9* は体腔上皮における細胞増殖 (Schmahl *et al.*, 2000; 2004) や中腎から生殖腺への細胞移入 (Martineau *et al.*, 1999; Colvin *et al.*, 2001) などを誘導することで、精巢体細胞の数を増加させていることが示唆されている。両端部においても *Fgf9* の発現は 21-22ts の XX 生殖腺に比べて有意に上昇しているが (図 2-7)、それでは精巢索形成には不十分であり、中央部から分泌される FGF9 により、体腔上皮細胞の増殖や *Sox9* と *Fgf9* のポジティブループによる発現上昇を積極的に誘導することが精巢索形成には必要であると考えられる (図 2-13A、B)。

ICR 系統での *Wnt4* の解析と異なり、C57BL/6 (B6) 系統では、前部・後部の培養生殖腺で *Wnt4* 発現が生殖腺領域に認められた。すなわち、B6 の寄与率が高くなることにより、精巢分化が正常に進まない場合に、生殖腺領域での *Wnt4* 発現が上昇しやすくなることが示唆される。近年報告された *Fgfr2* ノックアウトマウスの解析において、B6 x 129 hybrid mix の XY; *Fgfr2*^{-/-} 生殖腺における *Wnt4* の発現が、作製したグループごとによって異なっており、この結果からも B6 の寄与率と *Wnt4* 発現の関係が示唆されている (Kim *et al.*, 2007; Bagheri-Fam *et al.*, 2008)。これらことは、*Mus musculus domesticus* の Y 染色体: Y^{DOM} が B6 系統でのみ卵精巢を含む精巢分化異常を呈すること (B6-Y^{DOM}) に合致するものである。*Wnt4* は 13ts では XX、XY とともにわずかに発現しており、その発現が徐々に上昇することで卵巢特異的な発現を示す。*Wnt4* の発現が上昇した場合、*Sry* では精巢分化まで誘導できないことから (本博士論文第 1 章)、*Wnt4* よりも先に *Fgf9* の発現が優位になり、*Wnt4* を抑制することが精巢分化に必要であると考えられる。これらのことから、以下の卵精巢発生モデルを今回提示する。*Sry* の発現遅延を示す B6-Y^{DOM} および *Sry* 発現を人為的に遅らせた XX *Sry* Tg で生じる卵精巢では、どの領域でも細胞自律的に *Sry* および *Sox9* の発現は誘導される。一方、中央部でも *Fgf9* の発現上昇は遅延するが、まだ *Wnt4* の発現上昇の前であるた

め、精巣分化へ誘導されるのに対し、中央部からの誘導が必要である両端部は、*Fgf9* の発現が上昇する前に *Wnt4* の発現が上昇するため、精巣分化が阻害され、卵巣様構造へと分化する（図 2-13C）。B6-Y^{DOM} 個体で *Fgf9*、*Wnt4* がどのように発現しているかは報告されていないが、*Fgf9* により誘導される中腎から生殖腺への細胞移入が、B6-Y^{DOM} 個体の卵精巣において、中央部の精巣領域では観察され、両端部の卵巣領域では観察されないという報告（Albrecht *et al.*, 2000）はこのモデルを支持するものである。

本研究において、精巣索形成には精巣分化初期である胎齢 11.0 日から 11.5 日（12-18ts）にかけて中央から両端への分化誘導パターンが存在し、中央部による分化誘導が両端部の精巣分化に必要であること、その中央部からの分化誘導は *Fgf9* シグナルを介して進められることを示した。この結果は、*Sry* により開始される精巣分化が空間的にどのようなメカニズムで進行していくかを明確に示した報告であり、精巣分化異常である卵精巣の空間的な特徴が生じるメカニズムの解明に大きくつながると考えられる。

図表およびその説明

図 2-1 発生ステージおよび領域ごとの XY 生殖原基の培養生殖腺像

A : 16 tail-somite (ts) stage における XY 生殖原基 (whole) と、それを前部 (Ant)、中央部 (Mid)、後部 (Post) に分割した生殖原基片の実体顕微鏡像。写真はそれぞれ前方が左になるように配置している。

B : XY 生殖原基 (whole)、および前部 (Ant)、中央部 (Mid)、後部 (Post) の培養生殖腺像。上段が 13ts、下段が 16ts に単離した培養生殖腺。

C : 9ts (左) および 12ts(右)から単離した XY 培養生殖腺の準超薄切片像。g : 生殖腺体腔上皮、ms : 中腎、C : 精巣索、I : 生殖腺間質領域 scale bars = 100 μ m

D : XY 培養生殖腺におけるマーカー遺伝子の発現パターン。whole-mount *in situ* hybridization により、3日間培養したサンプルにおける *Sox9*、*3 β Hsd*、*Mfge8* の発現パターンを示した。上段が 8-9ts、下段が 13ts と 16ts に単離した培養生殖腺。g : 生殖腺体腔上皮、ms : 中腎、Asterisk : *3 β Hsd*陽性の副腎原基

Scale bars = 100 μ m

图 2-1

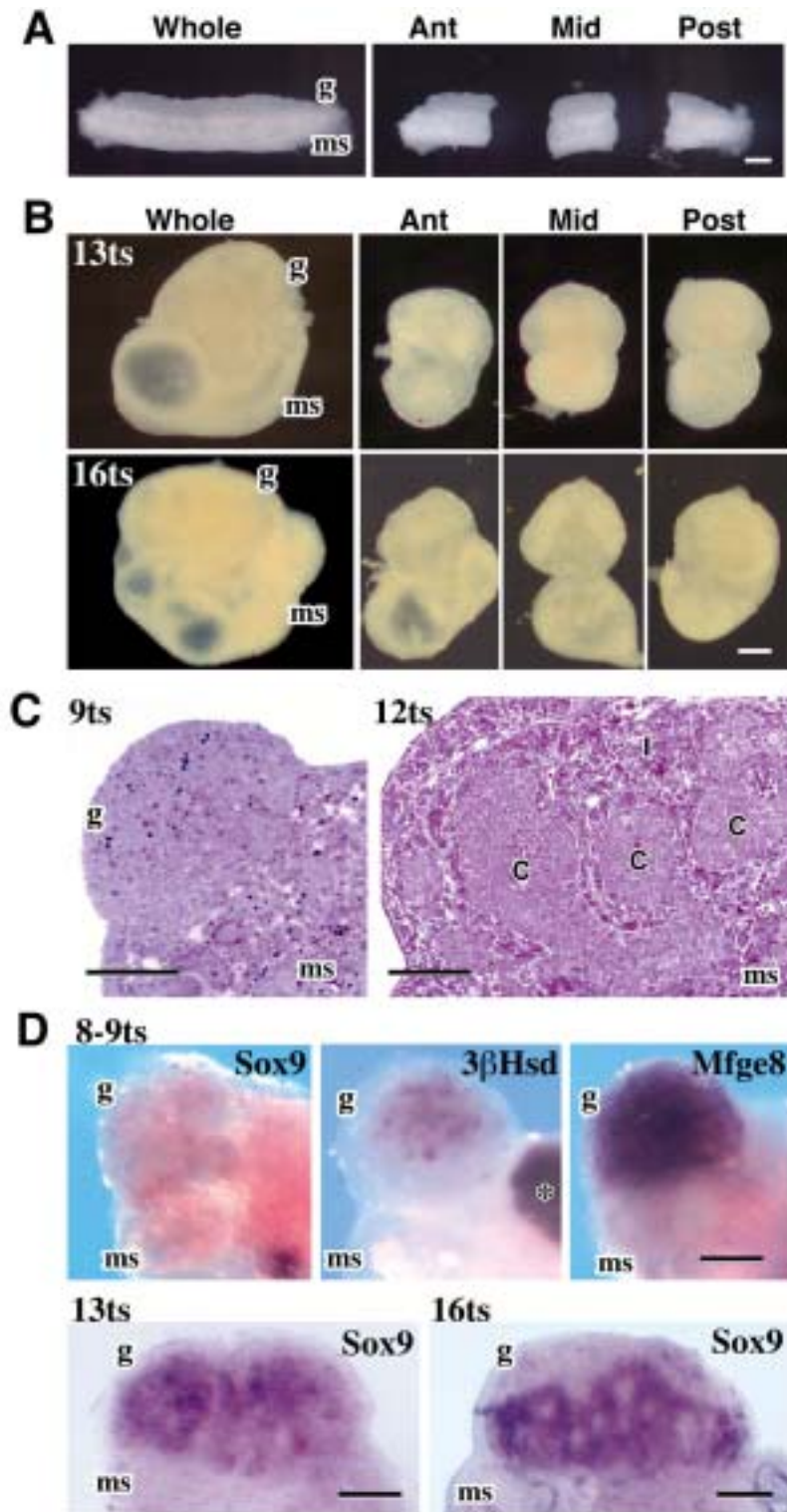


図 2-2 4 日間培養した、前部、中央部および後部の培養生殖腺の準超薄切片像

A,D,G : 前部 (Ant) B,E,H : 中央部 (Mid) C,F,I : 後部 (Post)

A,B,C : 11ts からの培養生殖腺 D,E,F : 13ts からの培養生殖腺 G,H,I : 16ts からの
培養生殖腺

A と D-F の insets はライディッヒ細胞の像 (細胞質内に多数の脂肪滴を含んだ、円形
の細胞; Pelliniemi *et al.*, 1996) C : 精巣索、I : 生殖腺間質領域 Scale bar = 100 μ m

图 2-2

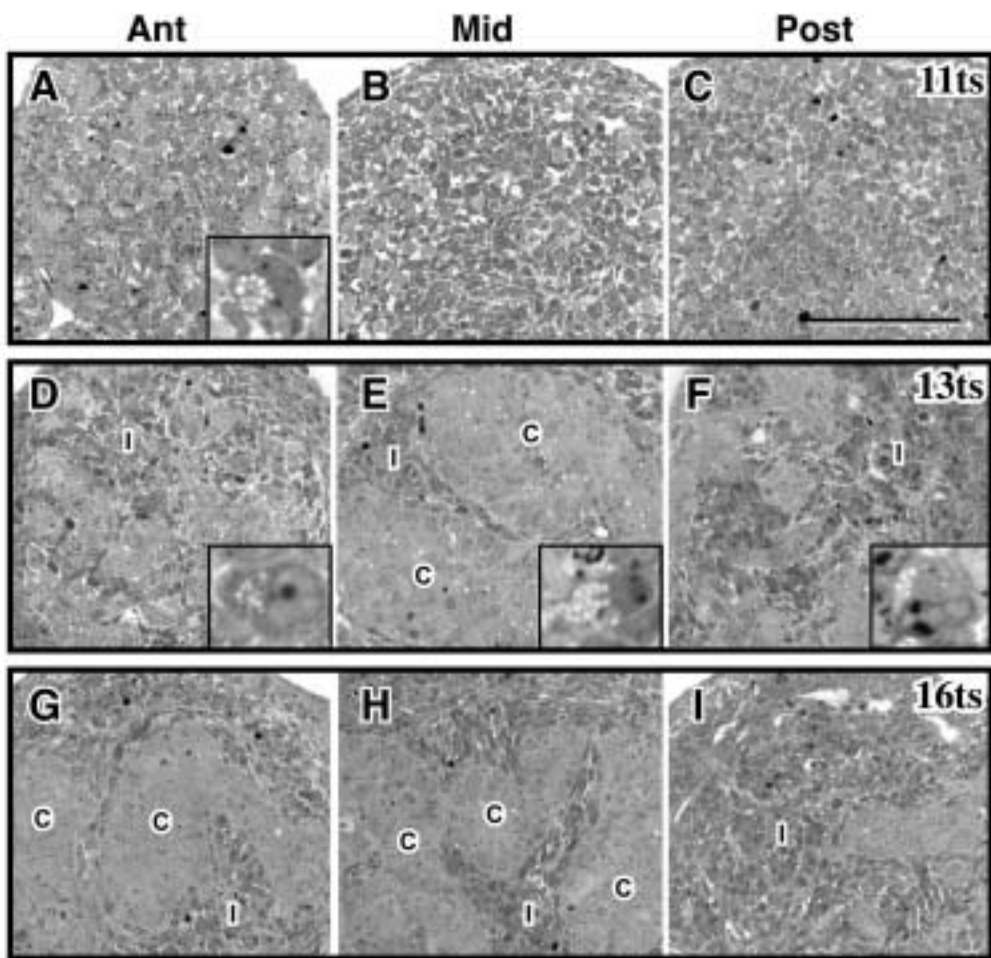


図 2-3 各領域の培養生殖腺における、*Sox9*での whole-mount *in situ* hybridization 像

A,D,G : 前部 B,E,H : 中央部 C,F,I : 後部

A,B,C : 11ts からの培養生殖腺 D,E,F : 12-14ts からの培養生殖腺 G,H,I : 15-17ts からの培養生殖腺。生殖腺領域はそれぞれ上方に位置。

Scale bars = 100 μ m (A のものは A-C に、 D のものは D-F に、 G のものは G-I にそれぞれ適合)

图 2-3

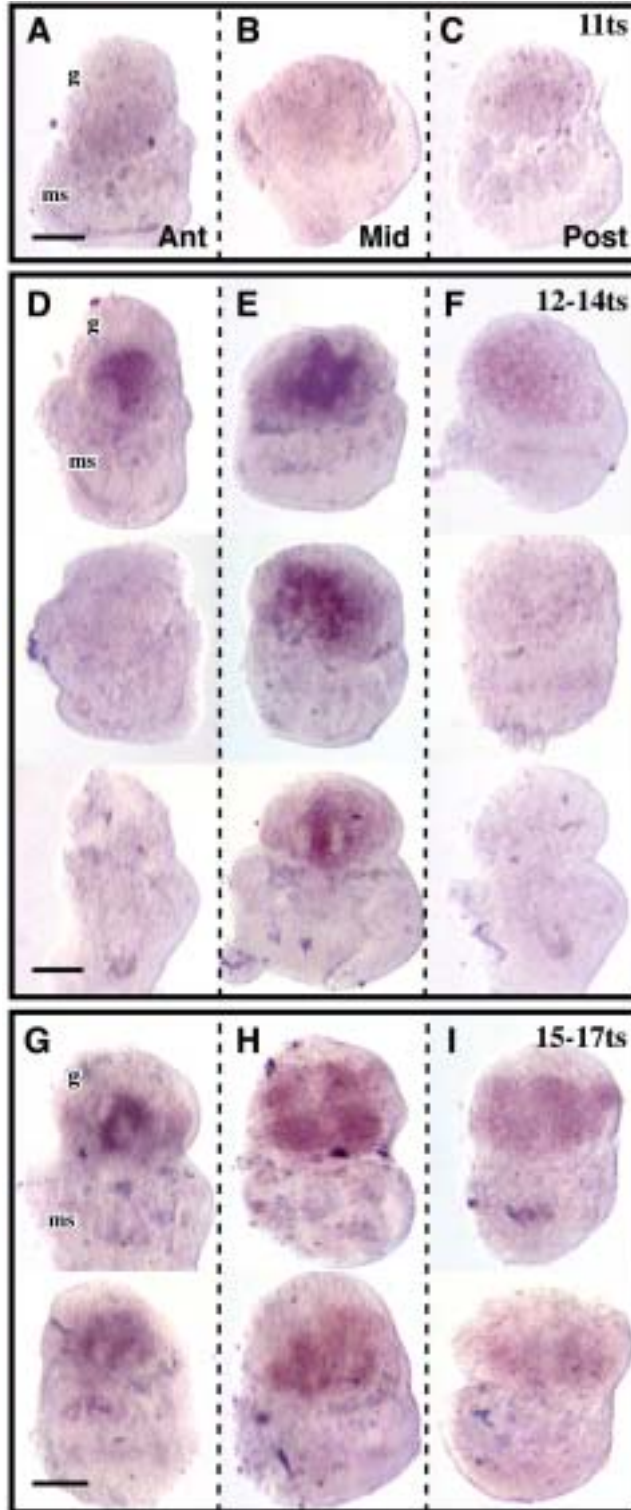


図 2-4 12-14ts XY 生殖原基の前部・中央部・後部の再構築培養

A : 野生型 (wildtype) および ROSA26 XY 生殖原基の組み合わせの概略図

B : 13ts に単離された XY 生殖原基 (上段) と、分割された前部・中央部・後部片 (中段) および再構築した生殖原基片 (下段)。Ant : 前部、Mid : 中央部、Post : 後部

g : 生殖腺体腔上皮、ms : 中腎、Scale bar = 100 μm

C : Xgal 染色前 (上段) および Xgal 染色後 (下段) の XY 生殖原基片の再構築培養生殖腺像。培養期間は 4 日。LacZ 陽性細胞は青色に可視化されている。

g : 生殖腺体腔上皮、ms : 中腎

D : Xgal 染色後の XY 生殖原基片の再構築培養生殖腺像。(左) 抗 laminin 抗体の免疫染色。再構築培養生殖腺では、前部および後部領域でも精巣索形成が認められる。前部および後部領域の精巣索内には LacZ 陽性細胞は認められなかった。Scale bar = 100 μm

(右) 血管内皮細胞マーカーである GS-I の Lectin 染色。前部・後部の生殖腺間質領域の中央部からの移入細胞と GS-I 陽性細胞の位置は重なっていた。矢印は中央部からの移入細胞 (LacZ 陽性) を示す。Scale bar = 50 μm

LacZ 陽性細胞は青色に可視化されている。

E : 再構築培養 (RC) および分割培養 (Se) における 12-14ts XY 生殖原基の前部 (Ant)・中央部 (Mid) 後部 (Post) での精巣索形成能の比較。前部・後部の精巣索形成能は、再構築培養により有意に上昇した。Asterisks : $p < 0.05$

图 2-4

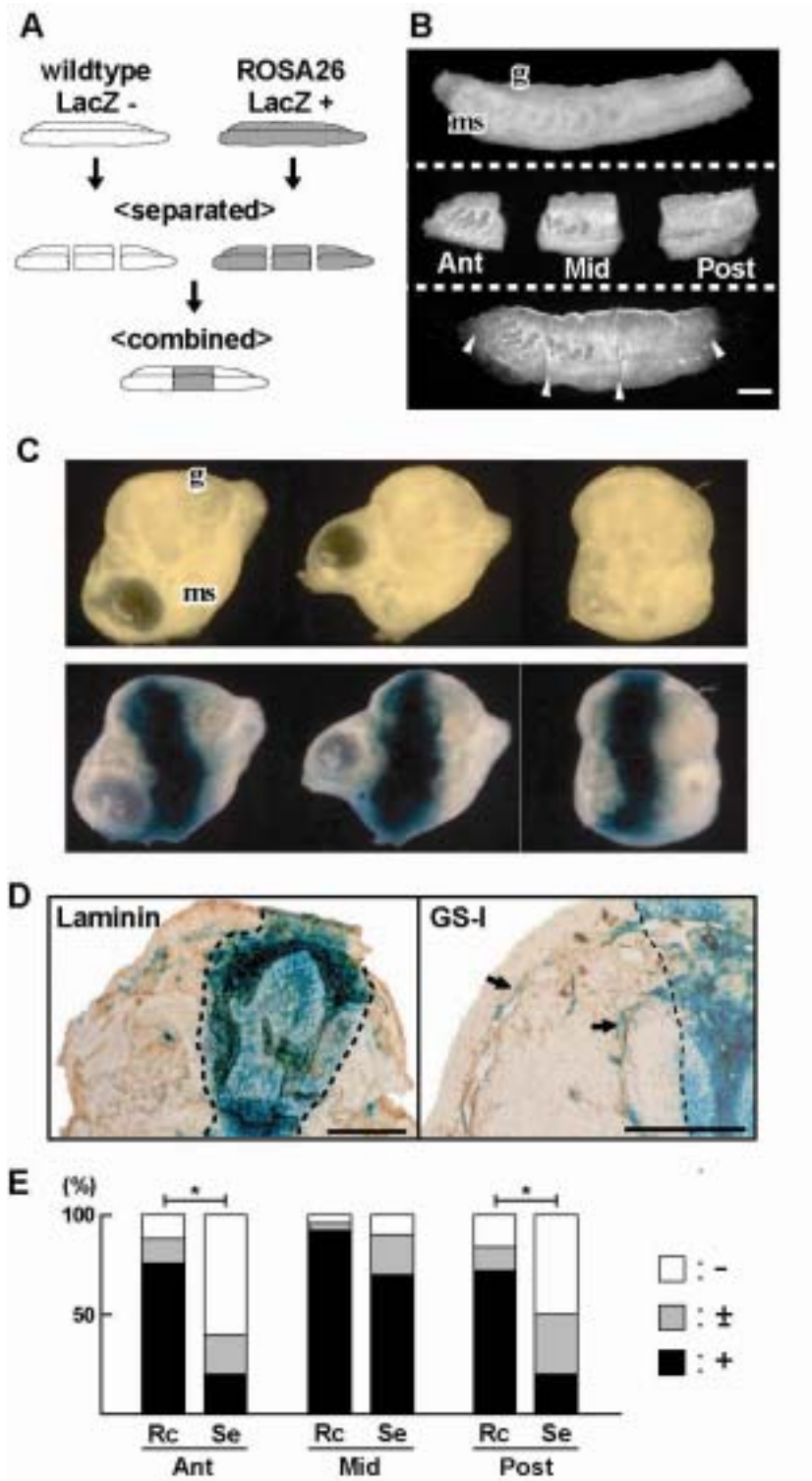


図 2-5 *Sry* の発現パターンと前部・後部での精巣索形成不全には関係はない

A : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 3 時間 (3h) および 9 時間 (9h) における *Sry* の発現。Whole-mount in situ hybridization による解析。培養開始後 3 時間では、*Sry* の発現は中央部で認められ、9 時間では前部・後部でも認められた。各写真において、生殖腺領域は上向きに配置している。g : 生殖腺体腔上皮、ms : 中腎

B : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 12 時間 (12h) における *Sry* の局在。抗 *Sry* 抗体の免疫染色による解析。全ての領域の培養生殖腺において、*Sry* 陽性細胞が強く認められた。Scale bar = 100 μ m

C : 4 日間培養した、前部 (Ant)、中央部 (Mid)、後部 (Post) の培養生殖腺の準超薄切片像。XX Tg : 恒常発現型 *Sry* トランスジェニック XX、XY wt : XY 野生型。12-14ts に各生殖原基を単離。XX Tg と XY wt とともに、中央部では精巣索形成が認められるのに対し、前部・後部では認められなかった。C : 精巣索、I : 生殖腺間質領域。Scale bar = 100 μ m

D : 12-14ts XX Tg および XY wt 生殖原基の前部 (Ant)・中央部 (Mid)、後部 (Post) での精巣索形成能の比較。XX Tg、XY wt とともに、前部・後部の精巣索形成能は、中央部に比べ有意に低かった。Asterisks : $p < 0.05$

图 2-5

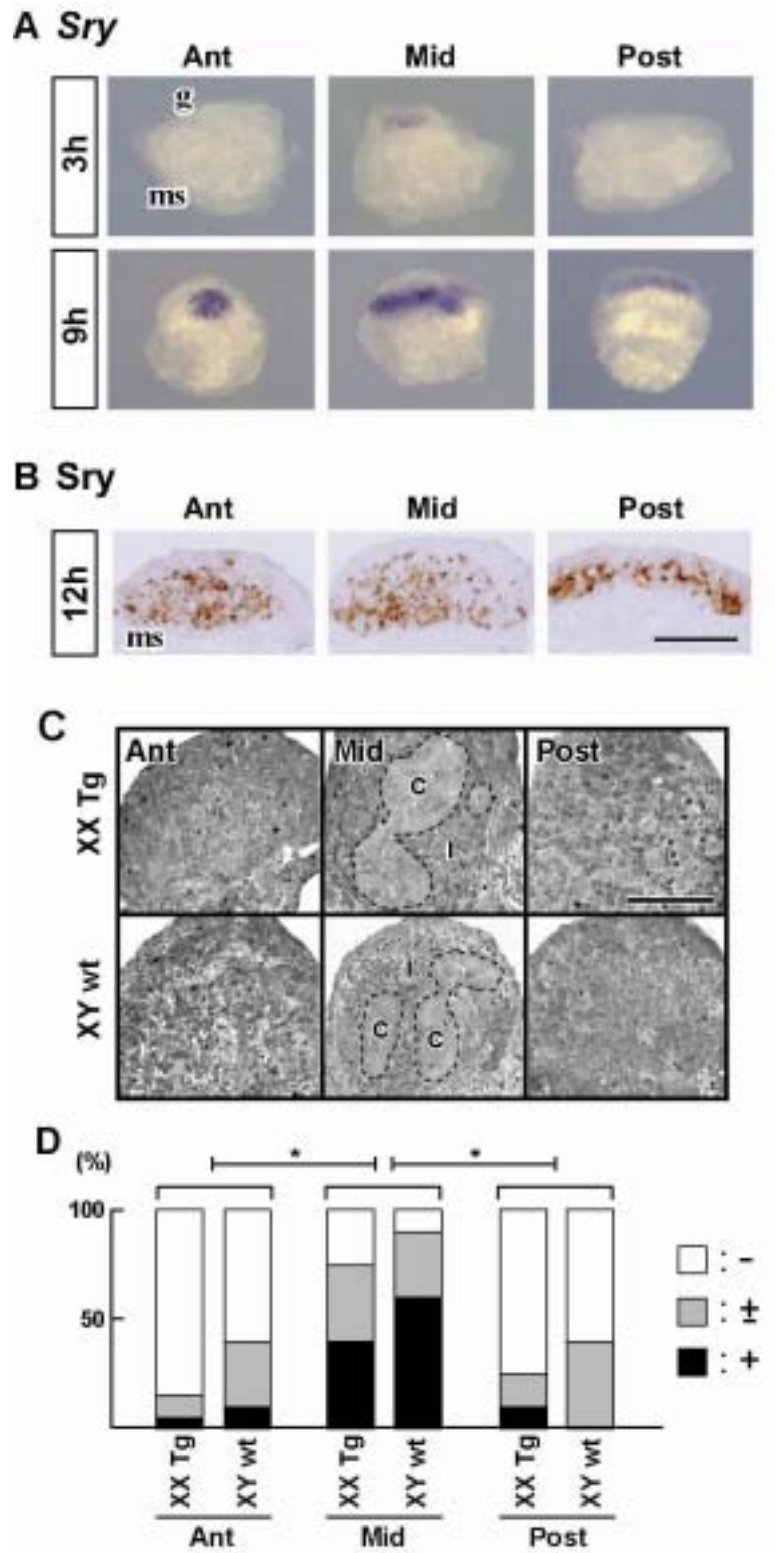


図 2-6 前部、中央部、および後部の培養生殖腺での *Sox9* の発現

A : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 6 時間 (6h) および 15 時間 (15h) における *Sox9* の発現。whole-mount *in situ* hybridization による解析。培養開始後 6 時間で、*Sox9* の発現は中央部で認められた。一方、前部・後部では培養開始後 15 時間でもわずかにしか認められなかった。

各写真において、生殖腺領域は上向きに配置している。g : 生殖腺体腔上皮、ms : 中腎

B : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 12 時間 (12h) および 30 時間 (30h) における *Sox9* の局在。抗 *Sox9* 抗体の免疫染色による解析。培養開始後 12 時間では、*Sox9* 陽性細胞が、中央部と同様に前部、後部でも認められた。培養開始後 30 時間では、前部、後部でも *Sox9* 陽性細胞は認められたが、中央部に比べてその数は少なかった。Scale bars = 100 μ m

C : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 12 時間 (12h) および 30 時間 (30h) における生殖腺領域単位面積当たりの *Sox9* 陽性細胞数。全 *Sox9* 陽性細胞数を生殖腺領域の面積で割って算出。平均値 \pm SE (n = 4)。培養開始後 30 時間の中央部の培養生殖腺の平均値 (19.6 \pm 0.6 $\times 10^3$ 細胞数/mm²) を 100% とする。30h での asterisk は中央部に比べて有意な差があることを示す (* : p<0.05、** : p<0.01)。

图 2-6

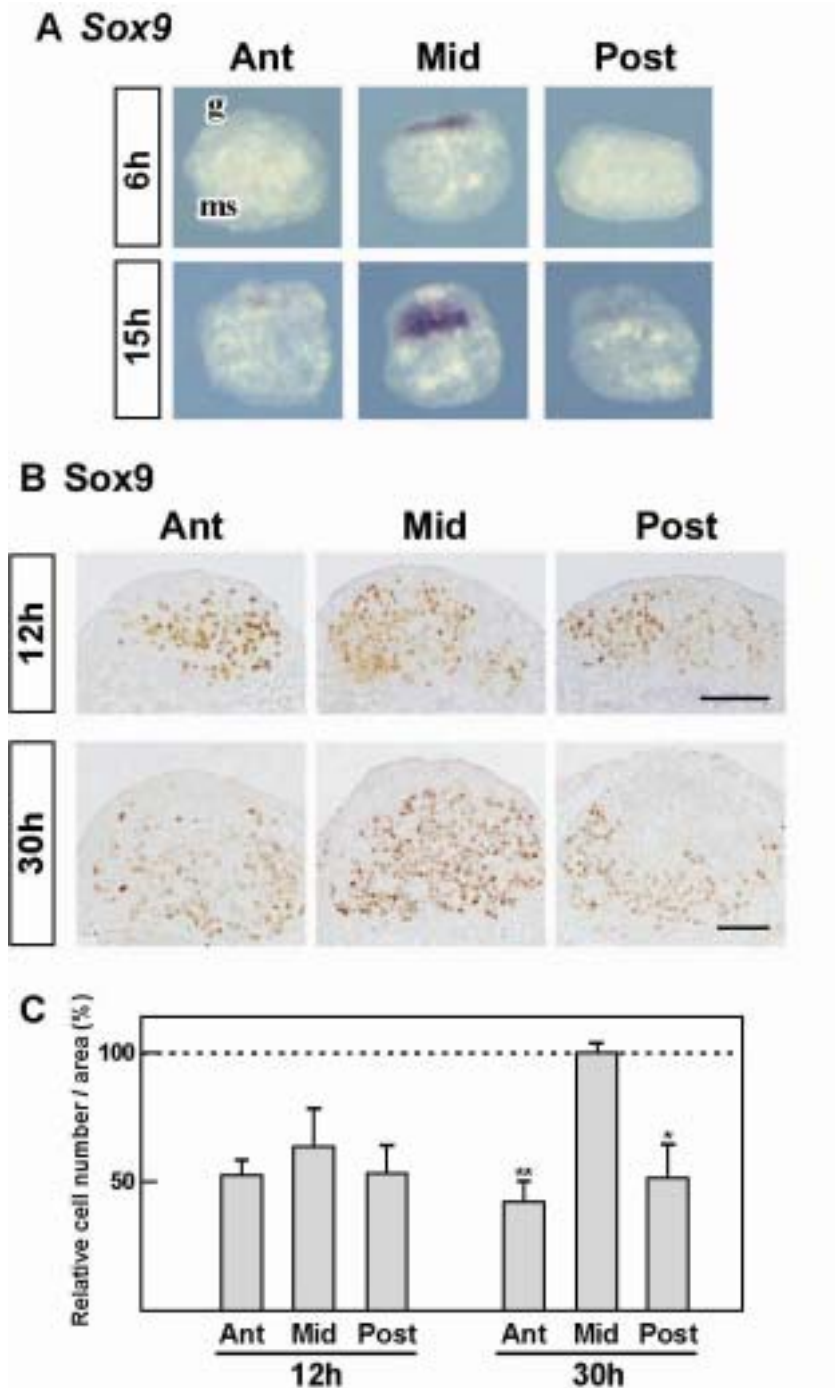


図 2-7 雄特異的に認められる *Fgf9* の発現パターン

A : 各発生ステージにおける *Fgf9* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。XY では、15ts に生殖腺中央部より発現が開始し、18ts には生殖腺全領域にその発現が広がる。XX では 18ts でも発現は認められない。

B : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 15 時間 (15h) における *Fgf9* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。*Fgf9* の発現は中央部で認められた一方、前部・後部ではわずかにしか認められなかった。各写真において、生殖腺領域は上向きに配置している。

C : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 18 時間 (18h) における *Fgf9* の発現。定量的リアルタイム PCR による解析。*Gapdh* に対する *Fgf9* の相対的発現量で示している。A : 前部、M : 中央部、P : 後部。それぞれ $n = 5$ で、平均値 \pm SE。2 本の点線は 21-22ts の XX 生殖腺 ($0.17 \pm 0.03 \times 10^{-2}$; 下線) および XY 生殖腺 ($2.60 \pm 0.40 \times 10^{-2}$; 上線) における *Fgf9* の相対的発現量を示す。Asterisks : $p < 0.01$

图 2-7

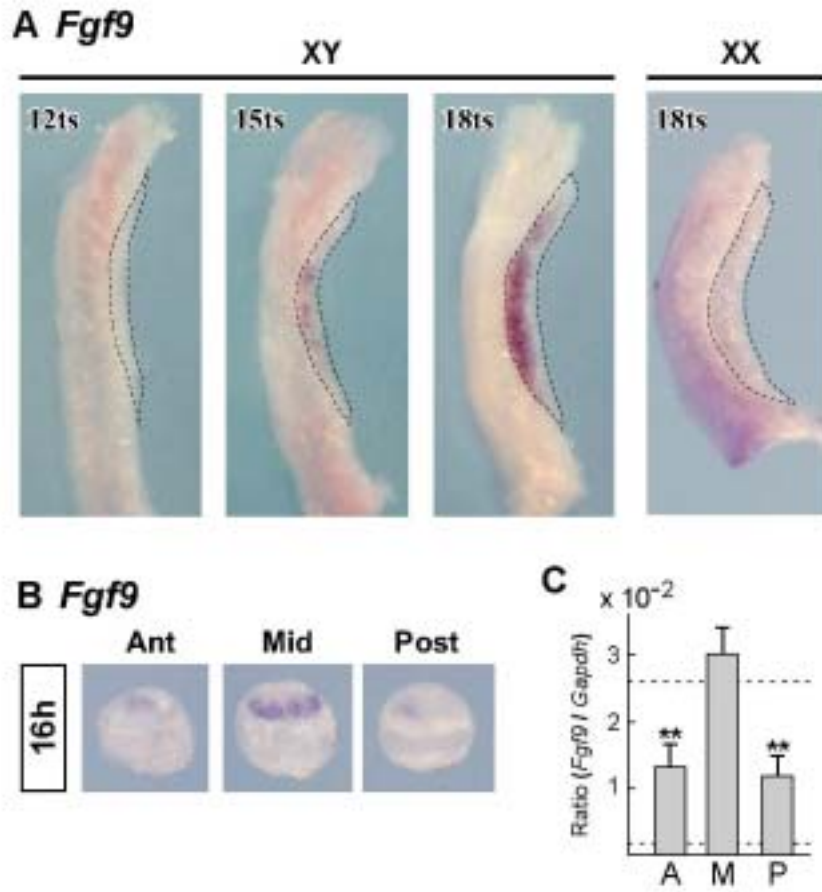


図 2-8 FGF9 添加による、前部・後部の培養生殖腺での精巣索形成の誘導

A : 12-14ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid) および後部 (Post) の培養生殖腺 (培養 4 日) での抗 laminin 抗体の免疫染色像。FGF9 添加 (+ FGF9) により、前部、後部の培養生殖腺の多くで精巣索形成が誘導された。None : FGF9 添加なし。

Scale bars = 100 μ m

B : 12-14ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid) および後部 (Post) の培養生殖腺 (培養 4 日) での抗 Sox9 抗体の免疫染色像。FGF9 添加 (+ FGF9) では、前部、後部でも精巣索様に Sox9 陽性細胞が観察された。添加なし (None) でも、前部、後部に Sox9 陽性細胞は観察された。Scale bar = 100 μ m

C : FGF9 添加培養 (+ FGF9) および添加なし培養 (None) における 12-14ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid) および後部 (Post) での精巣索形成能の比較。前部・後部の精巣索形成能は、FGF9 添加により有意に上昇した。Asterisk : $p < 0.05$

图 2-8

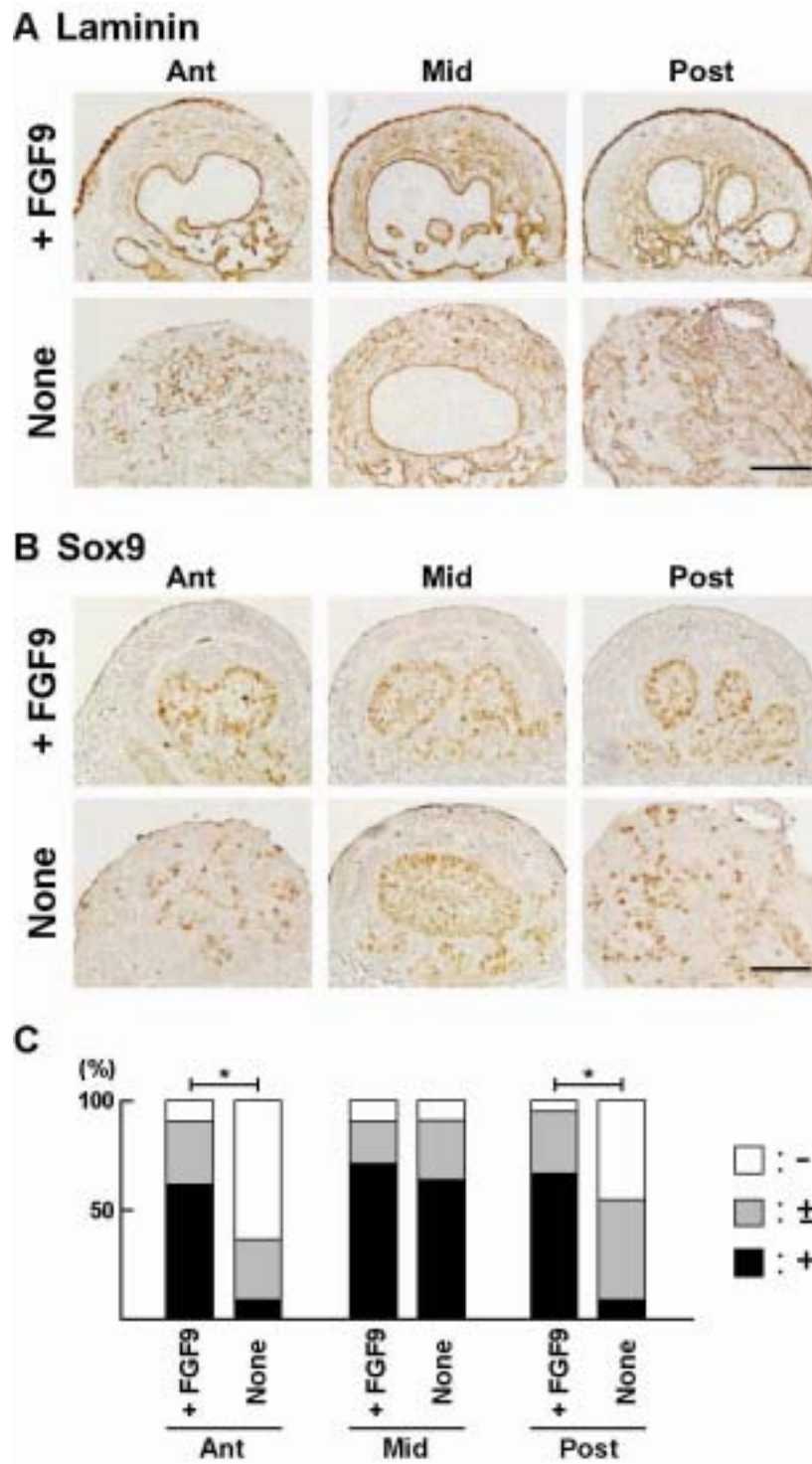


図 2-9 FGF9 添加による、前部・後部の培養生殖腺での *Sox9* 発現の誘導

A : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant) 中央部 (Mid) および後部 (Post) の、FGF9 添加培養開始後 15 時間 (15h) における *Sox9* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。+ FGF9 : FGF9 添加での培養、None : 添加なしでの培養。添加なしでは前部・後部で *Sox9* の発現がほとんど認められないのに対し、FGF9 添加でその発現は強く認められた。各写真において、生殖腺領域は上向きに配置している。

B : 12ts XY 生殖原基の、SU5402 添加培養開始後 15 時間 (15h) における *Sox9* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。+ SU5402 : SU5402 添加での培養、None : 添加なしでの培養。添加なしでは *Sox9* の発現は生殖腺全領域に認められたのに対し、SU5402 添加ではその発現が中央部に抑制された。黒矢頭 : 生殖腺の前後端、白矢頭 : *Sox9* 発現領域の前後端

C : 前後軸に沿った生殖腺の長さに対する *Sox9* 発現領域の長さの割合。+ SU5402 : SU5402 添加での培養、None : 添加なしでの培養。SU5402 添加により、その割合は有意に減少した (** : $p < 0.01$)。

图 2-9

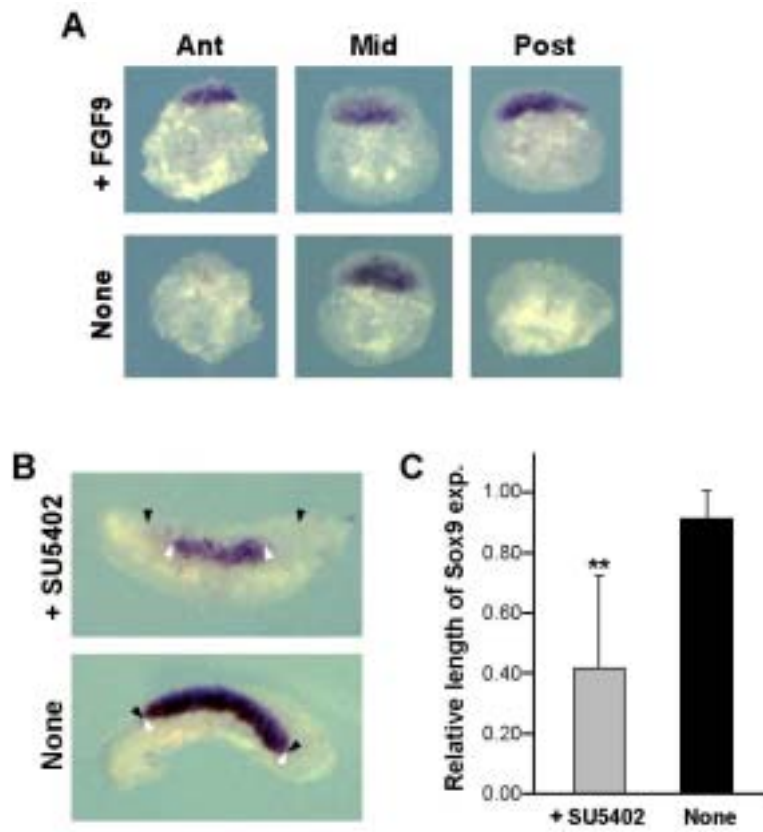


図 2-10 *Wnt4* は前部・後部の培養生殖腺での精巣索形成不全に関与しない

A : 各発生ステージにおける *Wnt4* の発現。whole-mount *in situ* hybridization による解析。13ts では XX、XY ともに、生殖腺領域にわずかに発現が認められた。XX では 15ts にその発現が上昇し始め、18ts では生殖腺全領域に強く発現が認められた。一方 XY では、15ts に中央部から発現が消失し、18ts ではほぼ全域で発現が認められなかった。右側は各生殖原基中央部の拡大像。各生殖原基の生殖腺領域縁を点線で示す。

B : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 18 時間 (18h) における *Wnt4* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。*Wnt4* の発現は XX の各領域の培養生殖腺で認められた。一方、XY ではどの領域でも認められなかった。各生殖原基の生殖腺領域を点線で示す。

C : 12ts XY 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 18 時間 (18h) における *Wnt4* の発現。定量的リアルタイム PCR による解析。*Gapdh* に対する *Wnt4* の相対的発現量で示している。A : 前部、M : 中央部、P : 後部。平均値 \pm SE (n = 4)。2 本の点線は 21-22ts の XX 生殖腺 ($5.34 \pm 0.32 \times 10^{-2}$; 上線) および XY 生殖腺 ($1.21 \pm 0.20 \times 10^{-2}$; 下線) における *Wnt4* の相対的発現量を示す。

D : 12-14ts XY; *Wnt4*^{+/-} および XY; *Wnt4*^{+/+} 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid) および後部 (Post) の培養生殖腺 (培養 4 日) での抗 laminin および抗 Sox9 抗体の免疫染色像。XY; *Wnt4*^{+/-} において、前部、後部培養生殖腺の多くで精巣索形成は認められなかった。Scale bar = 100 μ m

E : 12-14ts XY; *Wnt4*^{+/-} および XY; *Wnt4*^{+/+} 生殖原基の前部 (Ant)、中央部 (Mid) および後部 (Post) の培養生殖腺 (培養 4 日) での精巣索形成能の比較。XY; *Wnt4*^{+/-} と XY; *Wnt4*^{+/+} の間で、前部、後部の精巣索形成能に差は見られなかった。

图 2-10

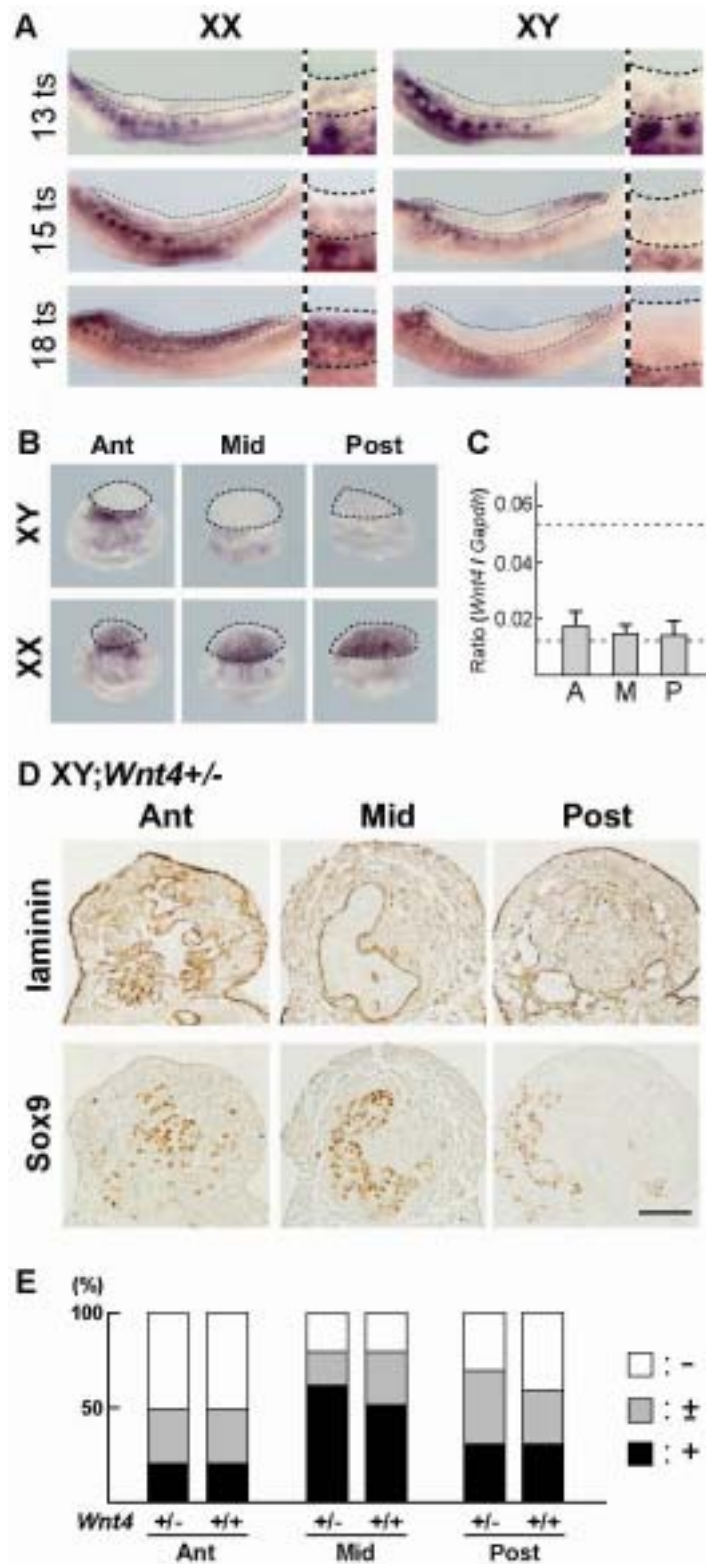


図 2-11 12ts XY 生殖原基の培養生殖腺における *Sry*、*Sox9*、および *Fgf9* の発現

A : 12ts XY 生殖原基の培養生殖腺の、培養開始後 3 時間 (3h) および 9 時間 (9h) における *Sry* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。*Sry* の発現は培養開始後 3 時間で生殖腺中央部に認められ始め、9 時間では生殖腺全領域に認められた。各写真において、生殖腺領域は上向きに配置している。

B : 12ts XY 生殖原基の培養生殖腺の、培養開始後 6 時間 (6h) および 12 時間 (12h) における *Sox9* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。*Sox9* の発現は培養開始後 6 時間で生殖腺中央部に認められ始め、12 時間では生殖腺全領域に認められた。各写真において、生殖腺領域は上向きに配置している。

C : 12ts XY 生殖原基の培養生殖腺の、培養開始後 16 時間 (16h) における *Fgf9* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。*Fgf9* の発現は培養開始後 15 時間では生殖腺全領域に認められた。生殖腺領域は上向きに配置している。

图 2-11

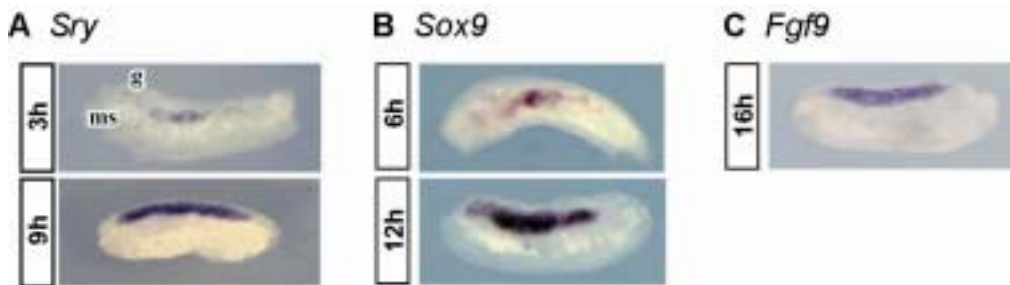


図 2-12 C57BL/6 XY 生殖原基の分割培養における *Wnt4* の発現

C57BL6 系統 XY 生殖原基 (12t) の前部 (Ant)、中央部 (Mid)、および後部 (Post) の培養生殖腺の、培養開始後 18 時間 (18h) における *Wnt4* の発現。Whole-mount *in situ* hybridization による解析。*Wnt4* の発現は中央部の培養生殖腺では生殖腺領域に認められなかった。一方、前部、後部の培養生殖腺では認められた。各生殖原基の生殖腺領域を点線で示す。

图 2-12

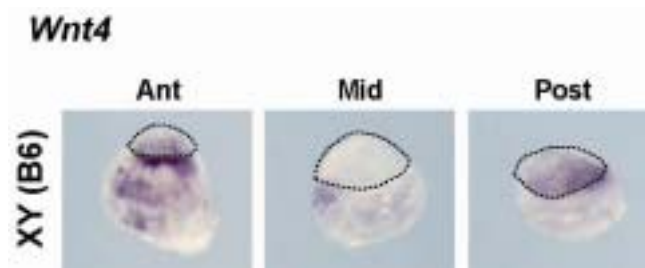


図 2-13 精巣分化初期過程における、空間的な精巣分化メカニズムのモデル

A: (XY whole) *Sry* は XY 生殖原基の中央部より発現を開始し、その後両端部へと広がる。そのパターンに続くように、*Sox9* の発現も同様に開始される。*Sry* *Sox9* に続いて、中央部で *Fgf9* の発現が上昇し、さらにその *Fgf9* が両端部へと作用することで、生殖腺全領域が精巣分化へと進行していく。

B: (XY segmental) 中央部と両端部 (前部・後部) に分割した場合、*Sox9* の発現までは誘導されるが、両端部は中央部からの *Fgf9* の作用を受けられず、正常に精巣分化を進行することができない。

C: (XY ovotestis) B6-Y^{DOM} など *Sry* の発現が遅延し、卵精巣を呈する個体においては、*Sox9* の発現までは誘導されるものの、両端部が中央部から *Fgf9* の作用を受ける前に *Wnt4* の発現が上昇してしまい、両端部は卵巣へと分化が進行する。

☒ 2-13

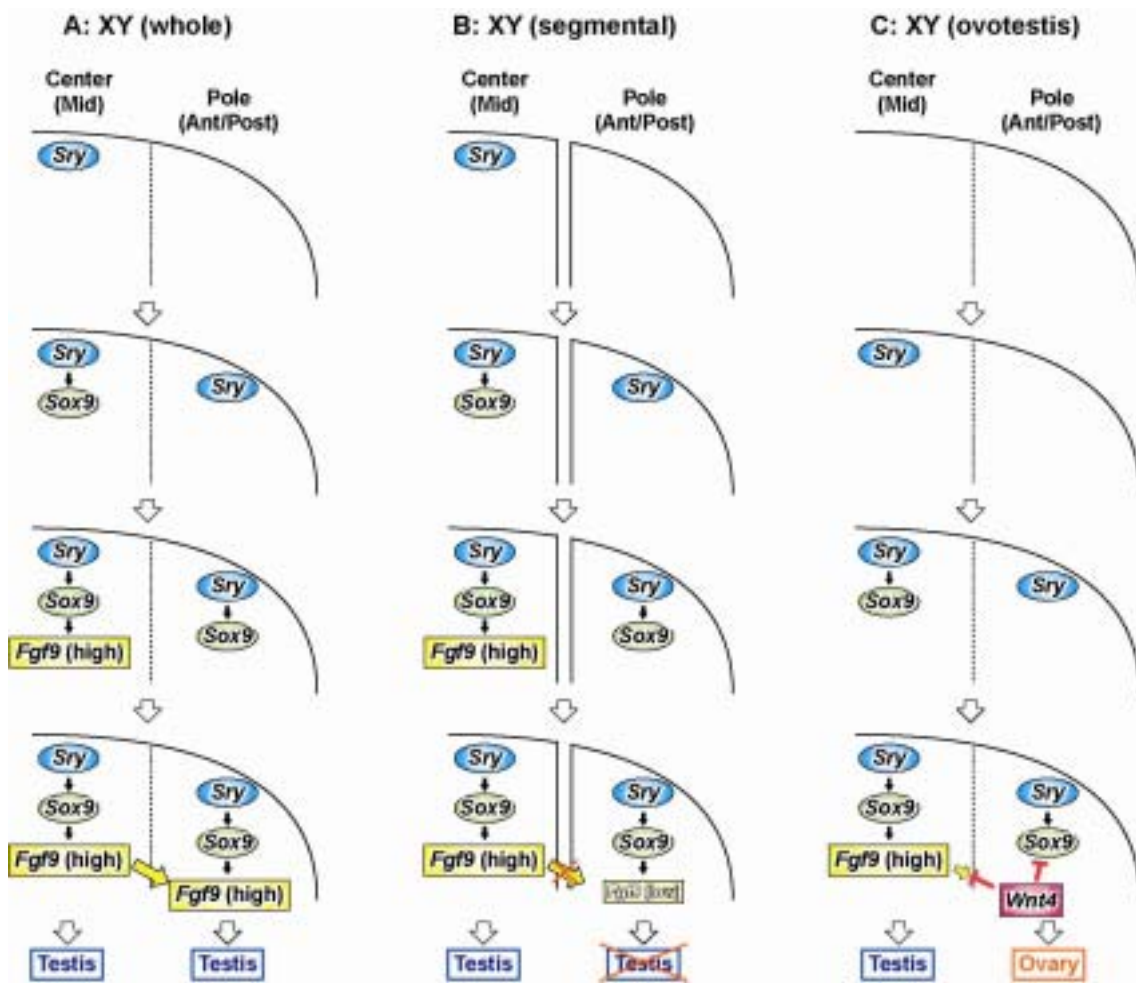


表 2-1 胎齡 10.5 日から 11.5 日の間の様々な発生ステージにおける、前部、中央部および後部の生殖腺片の培養群での精巢索形成能

領域	Stage								
	10-11ts			12-14ts			15-17ts		
	-	±	+	-	±	+	-	±	+
前部	9	0	0	12	9	9	0	2	16
中央部	9	0	0	0	7	20	0	2	15
後部	9	0	0	9	11	5	0	9	9

発生ステージ (Stage) は tail-somite stage (ts) による。

8ts は胎齡 10.5 日、12ts は胎齡 11.0 日、18ts は胎齡 11.5 日にそれぞれ相当。

- : 精巢索が形成されていない

± : 精巢索様の構造はみられるものの、正常な形状ではない

+ : 正常に精巢索が形成されている

表 2-2 再構築培養および分割培養における、XY 生殖原基 (12-14ts) の前部、中央部
および後部の培養生殖腺での精巣索形成能

領域	再構築培養			分割培養		
	-	±	+	-	±	+
前部	3	3	19	6	2	2
中央部	1	1	23	1	2	7
後部	5	3	17	5	3	2

- : 精巣索が形成されていない

± : 精巣索様の構造はみられるものの、正常な形状ではない

+ : 正常に精巣索が形成されている

表 2-3 XX Tg および XY wt 生殖原基 (12-14ts) の前部、中央部および後部の培養生殖腺での精巢索形成能

領域	XX Tg			XY wt		
	-	±	+	-	±	+
前部	17	2	1	6	3	1
中央部	5	7	8	1	3	6
後部	15	3	2	6	4	0

XX Tg : 恒常発現型 *Sry* トランスジェニック XX

XY wt : XY 野生型

- : 精巢索が形成されていない

± : 精巢索様の構造はみられるものの、正常な形状ではない

+ : 正常に精巢索が形成されている

表 2-4 各種液性因子の添加培養における、XY 生殖原基 (12-14ts) の前部、中央部および後部の培養生殖腺での精巣索形成能

領域	+ FGF9			+ IGF1			+ PDGF			+ PGD2			None		
	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+
前部	2	7	12	10	2	1	6	5	0	6	4	1	7	3	1
中央部	2	4	15	0	5	8	0	3	8	0	4	7	1	3	7
後部	1	6	14	7	5	1	4	6	1	5	5	1	5	5	1

+ FGF9 : FGF9 (Fibroblast growth factor 9) 添加での培養

+ IGF1 : IGF1 (Insulin like growth factor 1) 添加での培養

+ PDGF : PDGF BB (Platelet-derived growth factor BB) 添加での培養

+ PGD2 : PGD2 (Prostaglandin D2) 添加での培養

None : 添加なしでの培養

- : 精巣索が形成されていない

± : 精巣索様の構造はみられるものの、正常な形状ではない

+ : 正常に精巣索が形成されている

表 2-5 XY; *Wnt4*^{+/-} および XY; *Wnt4*^{+/+} 生殖原基 (12-14ts) の前部、中央部および後部の培養生殖腺での精巣索形成能

領域	XY; <i>Wnt4</i> ^{+/-}			XY; <i>Wnt4</i> ^{+/+}		
	-	±	+	-	±	+
前部	5	3	2	5	3	2
中央部	2	2	6	2	3	5
後部	3	4	3	4	3	3

- : 精巣索が形成されていない

± : 精巣索様の構造はみられるものの、正常な形状ではない

+ : 正常に精巣索が形成されている

総合考察

本研究では、新規の *Sry* 発現誘導および精巣分化誘導系と器官培養系を用いることで、マウス生殖腺性分化初期過程について詳細に解析した。その結果、以下のことを明らかにした。

- 1) 生殖腺支持細胞の分化を雌型から雄型へと転換することが可能な、新規の *Sry* 発現誘導系を確立した。この誘導系は、これまで着手することのできなかった転写因子の臨界期の特定を可能にした。*Sry* が XX 生殖腺で精巣分化を誘導することができるのはおよそ 12 - 15ts の間、つまり XY 生殖腺で *Sry* 発現が開始してから約 6 時間の間に限られていることを明らかにした。また、この臨界期を規定しているのは *Fgf9* と *Wnt4* の拮抗的作用によるものであることも明らかにした。(第 1 章 時間的制御機構)
- 2) 精巣索形成には精巣分化初期である胎齢 11.0 日から 11.5 日 (12-18ts) にかけて中央から両端への分化誘導パターンが存在し、中央部による分化誘導が両端部の精巣分化に必要であること、その中央部からの分化誘導は *Fgf9* シグナルを介して進められることを示した。(第 2 章 空間的制御機構)

Sry が精巣決定遺伝子として同定されて以来、数多くの遺伝子が性分化関連遺伝子として同定されてきた。その多くが、性分化異常症の原因遺伝子の探索の結果、また、ノックアウトマウスによる性分化異常症の発症により同定されてきたものである。しかしながら、それらの遺伝子がどのように *Sry* により雄特異的に発現が誘導されるか、または雌特異的に発現が誘導されるかの遺伝子間の関係はほとんど明らかにされていなかった。今後は性分化関連遺伝子群がどのようなネットワークを構成しているかを明らかにしていく必要があり、近年の、*Fgf9* と *Wnt4* の競合作用による精巣および卵巣分化の促進 (Kim *et al.*, 2006) や、*Sox9* が *Sry* の標的遺伝子であること (Sekido and Lovell-Badge, 2008) といった報告は、そのような点で重要なものである。本研究は、*Sry*、*Sox9*、*Fgf9*、*Wnt4* といった性分化における中心的因子 (key player) が、時間

的空間的にどのように作用することにより精巣・卵巣への分化が決定されるかを明確に提示したものであり、生殖腺性分化の分子メカニズムの解明に大きくつながるものであると考えている。

このように転写因子と液性因子が作用し合い、性を決定している過程はショウジョウバエでも報告されており (Defalco *et al.*, 2008)、遺伝的にプログラムされた性分化機構は、これまで考えられてきた転写因子の ON・OFF だけでなく、液性因子なども含んだ、より緻密なバランスによるプログラムであることを示唆している。それは同時に、それらのバランスが崩れることにより、様々な性分化異常を引き起こすことを意味している。その例の一つが *Mus musculus domesticus* の Y 染色体を C57BL/6 系統のマウスに交雑することにより発生する、B6-Y^{DOM} の精巣分化異常である (Eicher *et al.*, 1982)。本研究では、*Hsp* プロモーターを用いて時間的な制御機構を解析することで、B6-Y^{DOM} における *Sry* の発現遅延 (Bullejos and Koopman, 2005) がその後の性分化カスケードのバランスを崩し、精巣分化異常につながることを実験的に明確に示した。また、卵精巣における空間的な表現型の発生機序についてのモデルを提示した。これは、遺伝子の機能ドメインに変異がなくても、発現制御の変化により、性分化異常が引き起こされることを示している。卵精巣を含む性分化異常症はヒトや家畜など、哺乳類で広く報告されている。一方、XY 女性の性転換症例のうち、SRY 遺伝子やその他の性分化関連遺伝子の変異により原因が同定された症例は 20%程度に過ぎないなど、発症機序の多くはいまだ解明されていない (Pannetier *et al.*, 2004; Nikolova and Vilain, 2006; Camerino *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2006)。今後は *Sry* を含む性分化関連遺伝子の制御領域などの解析を行うことで、その病態の発生機序の解明に大きくつながると考えられる。

今回、時間的な制御機構を解析するにあたり、*hsp70.3* (*hsp68*) プロモーターを用いた新規の *Sry* 発現・精巣分化誘導系を確立した。この *hsp70.3* プロモーターによる遺伝子発現誘導系は、*hsp68-lacZ* 遺伝子を導入したマウスを作出し、熱処理により *lacZ* (β -galactosidase) の発現を誘導した報告 (Kothary *et al.*, 1989) を始めとして、遺伝子発現の人為的制御系として、確立に向け研究がなされてきた。しかしながら、ショウジョウバエや線虫といった無脊椎動物では *hsp* 誘導系が確立されているのに対し、脊椎動物、特に哺乳類では、熱による致死など多くの問題が障壁となり、発生過程を解析する系として未だ確立が成されていなかった。現在、*cre-loxP* システムや薬剤を用いた発現誘導系など、様々な遺伝子発現を制御する系が用いられているが、*hsp* 誘導系はそれらの系に比べて発現タイミングを人為的に正確に制御できるため、*Sry* などの転写因子が「いつ、どこで発現することが正常な発生に必要なか、十分か」という臨界期の決定を可能とする。本研究により *hsp* プロモーターを用いた器官形成の誘導が哺乳類でも可能であることが初めて示された。熱をどのように与えて発現を誘導するかなど、様々な問題点・改善点は残されているが、発生過程における遺伝子制御の解析に大きく寄与できると考えている。

本研究が示した結果は、転写因子と液性因子が時間的空間的に、互いに相互作用を奏しながら発生の方向性を決定していくという、発生のダイナミクスを明確に示したものである。生殖腺分化過程は、*Sry* などの key player により分化方向が決定された後も、様々な因子が作用することで、ダイナミックな形態形成が進行していく。今後はそれらの因子が時間空間的にどのように作用するかを解析することで、哺乳類の性分化機構が明らかになるとともに、自然が書き上げた壮大な発生のプログラムの理解に大きくつながっていくと期待したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医学専攻 獣医解剖学教室 教授 九郎丸 正道先生、同准教授 金井 克晃先生、助教 恒川 直樹先生、ならびに東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻 国際動物資源科学研究室 教授 林 良博先生に心より感謝の意を表します。また、本教室において多くの介助をいただいた次山 巖先生、八木橋 伊都子先生に厚く御礼申し上げます。

また、共同研究にあたり、多くの御助言と研究材料の提供を賜りましたオーストラリア・クィーンズランド大学 Peter Koopman 教授、Dagmar Wilhelm 博士、九州大学医学研究院 分子生命科学系部門 機能高分子設計学講座 諸橋 憲一郎教授、ならびに国立長寿医療センター研究所 福井 由宇子博士に厚く御礼申し上げます。

大学院進学にあたり、御指導、御鞭撻頂いた、国立感染症研究所 水上 拓郎博士をはじめ、石井 万幾博士、城所 知秀博士、防衛医科大学 松井 利康博士、崔 恩京博士ら諸先輩方、同級生として4年間に渡り研究室で共に研究を行い数々のご指導を頂いた、東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医解剖学教室 原 健士朗先生、的場 章悟先生ら、多くの学生の皆様に心から御礼申し上げます。

最後に、私の大学院生活を支援してくれた父母および妹に、心から感謝の念をあらわしたいと思います。

本研究にあたり命を捧げてくれた動物達に哀悼の意を表します。

引用文献

- Albrecht KH, Capel B, Washburn LL and Eicher EM.** (2000) Defective mesonephric cell migration is associated with abnormal testis cord development in C57BL/6J XY (*Mus domesticus*) mice. *Dev. Biol.* **225**, 26-36.
- Albrecht KH and Eicher EM.** (1997) DNA sequence analysis of Sry alleles (subgenus Mus) implicates misregulation as the cause of C57BL/6J-Y(POS) sex reversal and defines the SRY functional unit. *Genetics* **147**, 1267-1277.
- Albrecht KH and Eicher EM.** (2001) Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev. Biol.* **240**, 92-107.
- Bagheri-Fam S, Sim H, Bernard P, Jayakody I, Taketo MM, Scherer G and Harley VR.** (2008) Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Dev. Biol.* **314**, 71-83.
- Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C and Scherer G.** (2006) Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol. Reprod.* **74**, 195-201.
- Behringer RR, Finegold MJ and Cate RL.** (1994) Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* **79**, 415-425.
- Beverdam A and Koopman P.** (2006) Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 417-431.
- Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, AgoulNIK AI, AgoulNIK IU, Harrison WR, Behringer RR and Overbeek PA.** (2000) A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet.* **26**, 490-494.
- Brennan J and Capel B** (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 509-521.

- Brennan J, Tilmann C, Capel B.** (2003) Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev.* **17**, 800-810.
- Briggs R and King TJ.** (1959) Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **38**, 455-463.
- Bullejos M and Koopman P.** (2001) Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev. Dyn.* **221**, 201-205.
- Bullejos M and Koopman, P.** (2005) Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-Y (DOM) sex reversal. *Dev. Biol.* **278**, 473-481.
- Burgoyne PS, Buehr M, Koopman P, Rossant J and McLaren A.** (1989) Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX---XY chimaeric mouse testes. *Development* **102**, 443-450.
- Camerino G, Parma P, Radi O and Valentini S.** (2006) Sex determination and sex reversal. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 289-292.
- Carlisle C, Winking H, Weichenhan D and Nagamine CM.** (1996) Absence of correlation between Sry polymorphisms and XY sex reversal caused by the *M. m. domesticus* Y chromosome. *Genomics* **33**, 32-45.
- Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant VJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR and Schedl A.** (2004) Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* **131**, 1891-1901.
- Chuma S and Nakatsuji N.** (2001) Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Dev. Biol.* **229**, 468-479.
- Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B and Ornitz, D. M.** (2001) Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* **104**, 875-889.

- Coward P, Nagai K, Chen D, Thomas HD, Nagamine CM and Lau YF.** (1994) Polymorphism of a CAG trinucleotide repeat within Sry correlates with B6.YDom sex reversal. *Nat. Genet.* **6**, 245-250
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A and Pilia G.** (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.* **27**, 159-166.
- Davis RL, Weintraub H and Lassar AB.** (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.
- DeFalco T, Camara N, Le Bras S and Van Doren M.** (2008) Nonautonomous sex determination controls sexually dimorphic development of the Drosophila gonad. *Dev. Cell.* **14**, 275-286.
- Eicher EM, Shown EP and Washburn LL.** (1995) Sex reversal in C57BL/6J-YPOS mice corrected by a Sry transgene. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **350**, 263-268
- Eicher EM, Washburn LL, Whitney JB 3rd and Morrow KE.** (1982) Mus poschiavinus Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* **217**, 535-537.
- Fawcett TW, Qingbo X and Holbrook NJ.** (1997) Potentiation of heat stress-induced hsp70 expression in vivo by aspirin. *Cell Stress Chaperons* **2**, 104-109.
- Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida JC and Briggs JH.** (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* **1**, 711-713.
- Gehring WJ and Ikeo K.** (1999) Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* **15**, 371-377.

- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P and Lovell-Badge R.** (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**, 245-250.
- Gurdon JB.** (1962) The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **10**, 622-640.
- Gurdon JB, Laskey RA and Reeves OR.** (1975) The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morphol.* 1975 **34**, 93-112.
- Gurdon JB and Uehlinger V.** (1966) "Fertile" intestine nuclei. *Nature* **210**, 1240-1241.
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P and Lovell-Badge R.** (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* **121**, 1603-1614.
- Hughes IA, Houk C, Ahmed SF and Lee PA; LWPES Consensus Group; ESPE Consensus Group.** Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch. Dis. Child.* **91**, 554-563 (2006).
- Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S and Morohashi KI.** (2001) Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev. Dyn.* **220**, 363-376.
- Jacobs PA and Strong JA.** (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* **183**, 302-303.
- Jeske YW, Mishina Y, Cohen DR, Behringer RR, and Koopman P.** (1996) Analysis of the role of Amh and Fra1 in the Sry regulatory pathway. *Mol. Reprod. Dev.* **44**, 153-158.

- Kanai Y, Kanai-Azuma M, Tajima Y, Birk OS, Hayashi Y and Sanai Y.** (2000) Identification of a stromal cell type characterized by the secretion of a soluble integrin-binding protein, MFG-E8, in mouse early gonadogenesis. *Mech. Dev.* **96**, 223-227.
- Kanai Y, Kawakami H, Kurohmaru M, Hayashi Y, Nishida T and Hirano H.** (1989) Changes in lectin binding pattern of gonads of developing mice. *Histochemistry* **92**, 37-42.
- Kanai Y, Hayashi Y, Kawakami H, Takata K, Kurohmaru M, Hirano H and Nishida T.** (1991) Effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on testicular cord organization in fetal mouse gonadal explants in vitro. *Anat. Rec.* **230**, 199-208.
- Kanai Y, Hiramatsu R, Matoba S and Kidokoro T.** (2005) From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. *J. Biochem.* **138**, 13-19.
- Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, Sanai Y, Yonekawa H, Yazaki K, Tam PP and Hayashi Y.** (2002) Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* **129**, 2367-2379.
- Kanai-Azuma M, Kanai Y, Okamoto M, Hayashi Y, Yonekawa H and Yazaki K.** (1999) NrK: a murine X-linked NIK (Nck-interacting kinase)-related kinase gene expressed in skeletal muscle. *Mech. Dev.* **89**, 155-159.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH and Koopman, P.** (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* **122**, 2813-2822.
- Kidokoro T, Matoba S, Hiramatsu R, Fujisawa M, Kanai-Azuma M, Taya C, Kurohmaru M, Kawakami H, Hayashi Y, Kanai Y and Yonekawa, H.** (2005) Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice. *Dev. Biol.* **278**, 511-525.

- Kim Y, Bingham N, Sekido R, Parker KL, Lovell-Badge R and Capel B. (2007)** Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 16558-16563.
- Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R and Capel, B. (2006)** Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* **4**, e187.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P and Lovell-Badge, R. (1991)** Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* **351**, 117-121.
- Kothary R, Clapoff S, Darling S, Perry MD, Moran LA and Rossant J. (1989)** Inducible expression of an hsp68-lacZ hybrid gene in transgenic mice. *Development* **105**, 707-714.
- Lee CS, Buttitta LA, May NR, Kispert A and Fan CM. (2000)** SHH-N upregulates Sfrp2 to mediate its competitive interaction with WNT1 and WNT4 in the somitic mesoderm. *Development* **127**, 109-118.
- Loffler KA, Zarkower D and Koopman, P. (2003)** Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* **144**, 3237-3243.
- Lovell-Badge R, Canning C and Sekido R. (2002)** Sex-determining genes in mice: building pathways. *Novartis Found. Symp.* **244**, 4-18; discussion 18-22, 35-42, 253-7.
- Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM and Capel B. (2008)** Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2949-2955.

- Malki S, Nef S, Notarnicola C, Thevenet L, Gasca S, Méjean C, Berta P, Poulat F and Boizet-Bonhoure B.** (2005) Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J.* **24**, 1798-1809.
- Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R and Capel, B.** (1997) Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr. Biol.* **7**, 958-968.
- Matoba S, Kanai Y, Kidokoro T, Kanai-Azuma M, Kawakami H, Hayashi Y and Kurohmaru, M.** (2005) A novel Sry-downstream cellular event which preserves the readily available energy source of glycogen in mouse sex differentiation. *J. Cell Sci.* **118**, 1449-1459.
- McClive PJ and Sinclair AH.** (2003) Type II and IX collagen transcript isoforms are expressed during mouse testis development. *Biol. Reprod.* **68**, 1742-1747.
- Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A and Morohashi K.** (2003) Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol. Endocrinol.* **17**, 507-519.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A and Lovell-Badge, R.** (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* **14**, 62-68.
- Nagamine CM, Morohashi K, Carlisle C and Chang DK.** (1999) Sex reversal caused by *Mus musculus domesticus* Y chromosomes linked to variant expression of the testis-determining gene Sry. *Dev. Biol.* **216**, 182-194.
- Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, Schaer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Boizet-Bonhoure B, Descombes P, Parker KL and Vassalli JD.** (2005) Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev. Biol.* **287**, 361-377.

- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D and Parada LF.** (2003) Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* **426**, 291-295.
- Nikolova G and Vilain E.** Mechanisms of disease: Transcription factors in sex determination-relevance to human disorders of sex development. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2**, 231-238 (2006).
- Nordqvist K and Tohonen V.** (1997) An mRNA differential display strategy for cloning genes expressed during mouse gonad development. *Int. J Dev. Biol.* **41**, 627-638.
- Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, Pilia G and Schlessinger D.** (2005) Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2053-2062.
- Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T, Cao A, Forabosco A and Schlessinger D.** (2007) Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2795-2804.
- Pannetier M, Mandon-Pépin B, Copelli S and Fellous M.** (2004) Molecular aspects of female and male gonadal development in mammals. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* **1**, 274-287.
- Pelliniemi LJ, Kuopio T and Frojdman K.** (1996) The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD, editors. *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache River Press. pp. 143-158.
- Polanco JC and Koopman P.** (2007) Sry and the hesitant beginnings of male development. *Dev. Biol.* **302**, 13-24.
- Porter GA, Palade GE and Milici AJ.** (1990) Differential binding of the lectins Griffonia simplicifolia I and Lycopersicon esculentum to microvascular endothelium: organ-specific localization and partial glycoprotein characterization. *Eur. J. Cell Biol.* **51**, 85-95.

- Qin Y and Bishop CE.** (2005) Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1221-1229.
- Schepers G, Wilson M, Wilhelm D and Koopman P.** (2003) SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* **278**, 28101-28108.
- Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL and Capel, B.** (2000) Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* **127**, 65-73.
- Schmahl J, Kim Y, Colvin JS, Ornitz DM and Capel, B.** (2004) Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* **131**, 3627-3636.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC and Treier, M.** (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* **131**, 933-942.
- Sekido R, Bar I, Narvaez V, Penny G and Lovell-Badge, R.** (2004) SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.* **274**, 271-279
- Sekido R and Lovell-Badge R.** (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* **453**, 930-934.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R and Goodfellow PN.** (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240-244.
- Spemann H.** (1938) *Embryonic Development and Induction*. New York: Hafner
- Stark K, Vainio S, Vassileva G and McMahon AP.** (1994) Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* **372**, 679-683.

- Taketo T and Koide SS.** (1981) In vitro development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads. *Dev. Biol.* **84**, 61-66.
- Taketo T, Saeed J, Nishioka Y and Donahoe PK.** (1991) Delay of testicular differentiation in the B6.YDOM ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for mullerian inhibiting substance. *Dev. Biol.* **146**, 386-395.
- Taketo-Hosotani T, Nishioka Y, Nagamine CM, Villalpando I and Merchant-Larios H.** (1989) Development and fertility of ovaries in the B6.YDOM sex-reversed female mouse. *Development* **107**, 95-105
- Tilmann C and Capel B.** (1999) Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development* **126**, 2883-2890.
- Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D and Pilia, G.** (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1171-1181.
- Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N and McMahon AP.** (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **397**, 405-409.
- Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG and Schedl A.** (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* **28**, 216-217.
- Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB and Miller AD.** (1989) Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5434-5438
- Wilhelm D, Hiramatsu R, Mizusaki H, Widjaja L, Combes AN, Kanai Y and Koopman P.** (2007) SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *J. Biol. Chem.* **282**, 10553-10560.

Wilhelm D, Martinson F, Bradford S, Wilson MJ, Combes AN, Beverdam A, Bowles J, Mizusaki H and Koopman, P. (2005) Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev. Biol.* **287**, 111-124.

Wilhelm D, Palmer S and Koopman P. (2007a) Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* **87**, 1-28.

Yao HH, Whoriskey W and Capel B. (2002) Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* **16**, 1433-1440.

中馬新一郎. (2001) 始原生殖細胞の培養と減数分裂への移行, pp.33-41, In: 幹細胞・クローン研究プロトコール．中辻憲夫編 羊土社，東京．