

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 25 年度博士課程進学

氏名 : 三浦 健人

指導教員名 : 九郎丸 正道

論文題目 : **Studies on Partial Masculinization
in Mouse Embryonic Ovaries Grafted into Male Nude Mice**
(雄ヌードマウスに移植したマウス胎子卵巢の
雄性化機構に関する研究)

多くの哺乳類で、生殖腺の精巣または卵巢への性分化は、出生前に母体の子宮内で進行する。マウス XY 生殖腺では、Y 染色体上の遺伝子 *Sry* が、性的に未分化な支持細胞で *Sox9* の発現を誘導する。その後、*Sox8* や *Amh*、*Fgf9*、*Gdnf* 等の精巣化因子の発現上昇を伴って、セルトリ細胞分化及び精巣形成が進行する。Y 染色体を持たず *Sry* が発現しない XX 生殖腺では、ほとんどの支持細胞が胎齢 12 日目までに **SDSI** 依存性 **SOX9** 誘導能 (**SDSI**) を指標とする性的未分化性を失い、顆粒層細胞分化及び卵巢形成が進行する。一部の XX 支持細胞は、顆粒層細胞への分化後も **SDSI** を維持し、卵巢の髄質で生後すぐに起こる卵胞発育 (**first wave**) に寄与する。

ホストである雄ヌードマウスに胎齢 13 日のマウス胎子卵巢を移植し発生させると、移植 10 日目 (生後 4 日相当) までに顆粒層細胞における **SDSI** の再獲得が起こる。その後、卵胞の退行や卵子の消失を伴いながら、移植 20 日目 (生後 14 日相当) までに精細管様管状構造の形成及びセルトリ細胞様細胞の出現を特徴とする、胎子卵巢の雄性化が進行する。

移植 10–20 日に相当する日齢では、マウス卵巢において **first wave** の卵胞が発育することから、**first wave** の顆粒層細胞がマウス胎子卵巢の雄性化機構に関与していると考えられる。しかし、**first wave** の生物学的意義には不明な点が多く、特に **first wave** の顆粒層細胞分化に注目した研究はほとんどない。また、ホストの雄性環境下で引き起こされる、移植マウス胎子卵巢の顆粒層細胞の性的未分化性の再獲得や雄性化機構に関する分子基盤についても、不明な点が多い。本研究では、これらの問題を明らかにするため、下記の解析を行った。

【第1章】

新生子マウス卵巣において、個体の性成熟前に起こる最初の卵胞発育 (first wave) は卵巣髄質領域で観察される。一方、卵巣皮質領域では原始卵胞プールが形成され、その原始卵胞は月経周期に伴った周期的な卵胞発育に関与する。卵巣髄質領域で起こる first wave は、皮質領域で起こる周期的な卵胞発育と異なる性質を持つと考えられていたが、それらの違いに関する詳細な報告はなかった。第1章では、ヒトのターナー症候群のモデルとして知られている X 染色体を1本しか持たない XO 雌マウスが、first wave の異常を呈することを明らかにし、XO マウスを用いた first wave の機能解析を行った。

免疫組織化学の結果、生後4日目の XX マウス卵巣では、顆粒層細胞の分化マーカーである AMH 陽性の顆粒層細胞を有する first wave 卵胞が、髄質領域に観察されたのに対して、XO マウス卵巣の髄質領域では、AMH 陽性の卵胞が全く観察されなかった。XO 卵巣の髄質には、XX 卵巣の first wave 卵胞で観察されるような SDSI 陽性かつ FOXL2 陽性の顆粒層細胞が観察されたが、first wave に寄与するはずの卵子が全く観察されなかった。XO 卵巣の皮質領域では、XX 卵巣と同様の原始卵胞プールが観察された。生後7日目の XO 卵巣では、皮質から供給された卵胞が髄質付近で発育している様子が観察され、生後14-22日目には XX と同程度まで卵胞発育が回復した。

これらのデータから、XO マウスにおける first wave の異常と、皮質領域の原始卵胞による卵胞発育の回復が示された。本研究は、first wave の解析における XO マウスの有用性を示すのみならず、first wave における顆粒層細胞の未分化性維持及び分化について、新たな知見をもたらすものである。

【第2章】

雄のヌードマウスに SDSI を消失したマウス胎子卵巣を移植すると、胎子卵巣の顆粒層細胞は、SDSI の再獲得を伴った雄性化を示す。この SDSI の再獲得は、雄性化過程における性的未分化性の再獲得を示唆していると考えられるが、移植卵巣が性的未分化性をどの程度再獲得しているかは明らかになっていない。これを明らかにするため、第2章では移植卵巣に異所的な SRY 発現を誘導し、発現が上昇した遺伝子をマイクロアレイ及び RT-qPCR を用いて解析した。さらに、発現が上昇した転写因子に関して、野生型 XY、野生型 XX、及び SRY 恒常発現型 XX 生殖腺での発現を調べた。

マイクロアレイ解析の結果、移植卵巣への異所的 SRY 誘導により、*Sox9*、*Fgf9*、及び *Gdnf* 等の精巣化因子を含めた 1505 の遺伝子の発現上昇が明らかとなった。発現が上昇した遺伝

子の中には、胎生期セルトリ細胞特異的に発現している5つの転写因子が含まれていた。これらの転写因子の中で、*Lmo4*、*Zfp532*、及び *Mamald1* の遺伝子発現が、異所的に **SRY** を誘導した移植卵巢において、*Sox9* 発現と高い正の相関を示した。また、これら3つの転写因子は、胎生期の野生型 XY または **SRY** 恒常発現型 XX 生殖腺において、野生型 XX 生殖腺と比べて高い発現を示し、胎生期の精巣決定においても **SRY** 標的遺伝子として機能している可能性が示された。

これらの結果により、移植卵巢はその雄性化過程において、**SDSI** のみならず、代表的な精巣化因子や新規 **SRY** 標的遺伝子の **SRY** 依存的誘導能をも再獲得しており、胎生期の未分化生殖腺に近い性的未分化性が再獲得されていることが示唆された。

【第3章】

成熟した雄ヌードマウスをホストとして胎子 XX 卵巢を移植すると、*Sry* 発現がない XX 卵巢が雄性化を示すことが知られており、移植後 15–20 日目には異所的な **SOX9** 陽性のセルトリ細胞様細胞を含む卵精巣様の構造を形成する。しかし、移植先の雄マウスの雄性環境が、胎子卵巢の雄性化に与える影響について、詳細に調べられたことはなかった。第3章では、胎子卵巢の雄性化に対してホスト雄の環境が与える影響を調べるために、胎子卵巢を成熟した雄マウス、雌マウス、去勢雄マウス、及びテストステロンを投与した去勢雄マウスの腎臓被膜下にそれぞれ移植し、組織学的な解析を行った。

移植 20 日目には、雌マウスに移植した胎子卵巢で正常な卵胞発育が観察された。一方で、雄マウス及びテストステロンを投与した去勢雄マウスに移植した胎子卵巢では、雌マウス及び去勢マウスに移植した卵巢と比較して、**SOX9** 陽性のセルトリ細胞様細胞数が有意に増加していた。

これらの結果は、ホストの雄由来のテストステロンが、雄マウスに移植したマウス胎子卵巢の雄性化における **SOX9** 陽性細胞の出現に関与していることを示すものである。

【4章】

胎子 XX 卵巢を雄ヌードマウスの腎臓被膜下に移植すると、卵胞の退行、管状構造の形成、及び **SOX9** 陽性のセルトリ細胞様細胞の出現を特徴とする雄性化を示す。移植卵巢において、複数のセルトリ細胞特異的な遺伝子の発現上昇が報告されているが、どの遺伝子がどのような機構で移植卵巢の雄性化に関与しているかは、依然として明らかになっていない。第4章では、移植卵巢において発現が上昇しているセルトリ細胞特異的転写因子を、**RT-qPCR** にて明らかにした。それらの転写因子の中で、*Sox8* の移植卵巢での時空間的発現を、

in situ hybridization にて明らかにした。また、移植卵巢の雄性化における *Sox8* や *Amh* の機能を明らかにするため、*Sox8* ノックアウトマウス及び *Amh* ノックアウトマウスの胎子卵巢を雄ヌードマウスに移植し、組織学的解析を行った。

RT-qPCR により、移植卵巢における *Sox8*、*Egr1/2*、*Nr4a1/2*、*Zc3h12c* 等のセルトリ細胞特異的な転写因子の発現上昇が明らかとなった。*in situ hybridization* により、*Sox8* シグナルが、移植 10 日目では AMH 陰性の原始卵胞及び AMH 陽性の卵胞に、移植 20 目には髄質領域付近に観察される SOX9 陽性のセルトリ細胞様細胞を含む管状構造に、それぞれ観察された。*Sox8* ノックアウトマウス及び *Amh* ノックアウトマウスの移植卵巢では、野生型の移植卵巢と比較して、SOX9 陽性のセルトリ細胞様細胞数に違いは認められなかったが、いずれの移植卵巢でも退行中の卵胞数が有意に増加していた。

これらの結果から、*Sox8* と *Amh* はいずれも移植卵巢で見られる SOX9 陽性のセルトリ細胞様細胞の出現には直接的に関与はしていないが、移植卵巢の雄性化過程における卵胞の維持に関与していることを明らかにした。

本研究により、「(1) first wave における支持細胞の未分化性維持と分化機構」、「(2) マウス移植卵巢の雄性化過程における性的未分化性の再獲得」、及び「(3) 雄性化機構における移植卵巢由来の *Sox8* や *Amh*、雄ヌードマウス由来のテストステロンの機能」に関する新たな知見が得られた。本研究の結果は、ヒトの多嚢胞性卵巢症候群やウシのフリーマーチン症のように、子宮内でのホルモン異常により引き起こされる、哺乳類胎子卵巢の不妊・雄性化機構の解明につながる事が期待される。

マウス胎子生殖腺の性決定と胎子卵巢の雄性化の概略図

