

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 三浦 健人

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* の発現を誘導し、複数の精巢化因子の発現上昇を伴って、セルトリ細胞分化が進行する。XX 生殖腺では、殆どの支持細胞が胎生期に SRY 依存的 SOX9 誘導能 (SDSI) を指標とする性的未分化性を失い、顆粒層細胞分化が進行する。一部の XX 支持細胞は、生後まで SDSI を維持し、生後すぐに起こる卵胞発育 (first wave) に寄与する。雄マウスに胎子卵巣を移植すると、SDSI の再獲得が起こり、卵胞の退行を伴いながら、精細管様管状構造及びセルトリ細胞様細胞の出現を特徴とする、雄性化が進行する。胎子卵巣の雄性化が起こる時期から考えて、first wave の顆粒層細胞が雄性化機構に関与していると考えられる。しかし、first wave の生物学的意義や、移植マウス胎子卵巣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は、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 章では、X 染色体を 1 本しか持たない XO 雌マウスを用いた first wave の機能解析を行った。免疫組織化学法による観察の結果、新生子 XO マウス卵巣の髄質領域では、first wave の卵胞が観察されなかったが、SDSI 陽性かつ FOXL2 陽性の顆粒層細胞は観察された。日齢が進んだ 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、性成熟までに 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 の生物学的意義について、新たな知見をもたらすものである。

第 2 章では、移植卵巣の性的未分化性を評価するため、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解析した。移植卵巣への異所的 SRY 誘導により *Sox9*、*Fgf9*、及び *Gdnf* 等の精巢化因子の発現上昇が明らかとなった。発現が上昇した転写因子の中で、*Lmo4*、*Zfp532*、及び *Mamald1* の発

現が、*Sox9*発現と高い正の相関を示した。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 生殖腺と比べ高い発現を示した。以上の結果より、移植卵巢は代表的な精巢化因子や新規 SRY 標的遺伝子の SRY 依存的誘導能を有しており、胎生期の未分化生殖腺に近い性的未分化性を有していることが示唆された。

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にそれぞれ移植し、組織学的な解析を行った。雌マウスに移植した胎子卵巢では、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 陽性細胞数が有意に多かった。これらの結果は、ホストの雄由来のテストステロンが、移植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。

第4章では、移植卵巢において発現が上昇するセルトリ細胞特異的転写因子を明らかにした。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示した。また、移植卵巢の雄性化における *Sox8*や *Amh*の機能を検討するため、ノックアウトマウスの移植卵巢の組織学的解析を行った。移植卵巢の雄性化の過程で、セルトリ細胞特異的な転写因子の発現が上昇することが明らかとなった。野生型移植卵巢における *Sox8*シグナルは、AMH 陰性の原始卵胞、AMH 陽性の卵胞及び SOX9 陽性細胞を含む管状構造において観察された。*Sox8* または *Amh* をノックアウトした移植卵巢では、野生型の移植卵巢と比較して、SOX9 陽性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、移植卵巢における卵胞退行の制御に関与していることを明らかになった。

以上の結果は、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。これらの研究成果は、獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。