

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 17 年度博士課程 入学

氏 名 平松 竜司

指導教員名 九郎丸 正道

論文題目 マウス生殖腺の時空間的性決定機構の解析

受精卵がどのようにして個体へと形作られていくのか。その発生過程は大きく分けて以下の4つの相、1:成長 (growth)、2:分化 (differentiation)、3:形態形成 (morphogenesis)、4:パターン形成 (pattern formation) に分けられる。これらの過程を高次に進んでいくことにより個体へと発生して行くが、個体においても各種の細胞は全て完全な遺伝子セットを有しており、このことは遺伝子活性の制御こそが上記の過程において重要であることを意味している。これまでに発生過程における多くの遺伝子の機能が報告されてきたが、中には自身の発現制御が器官形成の方向を大きく決定する遺伝子も存在する。その遺伝子の1つの例が、Y染色体上の性決定遺伝子 Sry である。マウスにおいて、Sry は胎齢 11.0 日から 12.0 日まで、一過性に、生殖腺の中央部から両端部へという特徴的なパターンを示しながら発現し、未分化生殖腺を精巣へと分化誘導する。この Sry の発現を引き金として、Sox9、Fgf9、Dhh、Mis など多くの精巣特異的遺伝子の発現が誘導され、また、生殖腺体腔上皮の増殖、中腎細胞の移入、血管の形成、グリコーゲン顆粒の蓄積、精巣索の形成など様々な精巣特異的な形態変化が一気に進んでいく。この Sry を引き金とする精巣分化過程は、発生の方向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、そのメカニズムを解析することは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* 実験系を開発するとともに、時間的空間的に特徴的な精巣分化パターンに着目し、性分化初期過程のメカニズムについて解析を試みた。

第1章 精巣分化誘導における時間的な分化機構の解析

①Sry 誘導可能な新規 *in vitro* 実験系の確立と Sry が精巣分化を誘導することができる臨界期の決定。

現在までに Sry による精巣誘導可能な *in vitro* の実験系は報告されていない。そこで本研究では、熱ショック蛋白 *Hsp70.3* をプロモーターに用いた、*Hsp70.3-Sry* トランスジェニック (SryTg) マウスを作成し、Sry 解析のための新規の *in vitro* の実験系を確立した (図1)。このマウスラインの XX/SryTg は通常飼育下において妊性を持つ正常な卵巣に成熟するが、生殖腺が未分化な時期 (胎齢 11.0 日頃) に熱処理により Sry の一過性発現を可能にし、器官培養により精巣へと分化誘導することができる。この実験系は *in vitro* で Sry による性転換 (XX 精巣) 誘導系として、また哺乳類における *Hsp* プロモーターを用いた形態形成誘導モデルとして初めての実験系である。

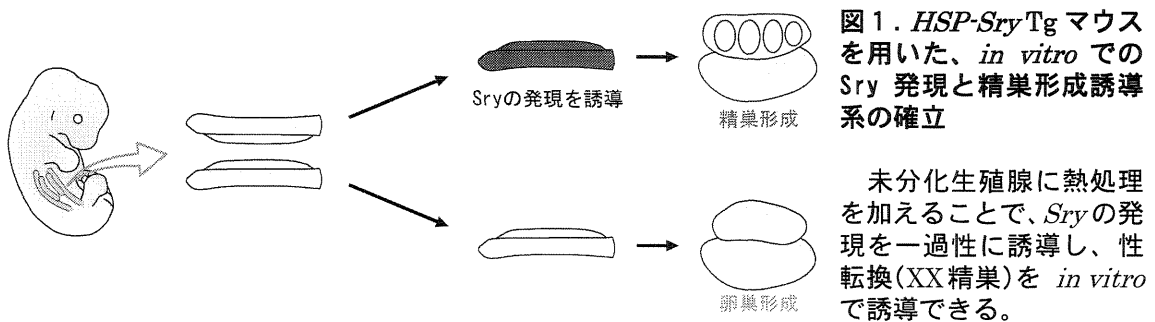


図1. *HSP-SryTg* マウスを用いた、*in vitro* で Sry 発現と精巣形成誘導系の確立

未分化生殖腺に熱処理を加えることで、Sryの発現を一過性に誘導し、性転換(XX精巣)を *in vitro* で誘導できる。

Sry は胎齢 11.0~12.0 日に一過性に XY 生殖腺に発現するステージ特異的なパターンを示す。そこで、①の熱処理による Sry 発現誘導系を用いて、Sry を本来の発現ステージ (胎齢 11.0~12.0 日) から時期をずらして発現を誘導し、Sry の精巣分化誘導がどの時期で機能するか検討した。その結果、Sry 発現初期の 12-14ts (tail somite stage、尾節数から算出; 胎齢 11.0-11.2 日) では Sry は正常に機能し、XX 生殖腺を精巣へ分化させるが、15-16ts (胎齢 11.25-11.4 日) ではその機能が著しく低下し、一部個体が卵精巣 (中央部のみ精巣様構造) に分化、さらに後期のステージである 17ts (胎齢約 11.5 日) 以降では、Sry は機能せず、卵巣へと分化した (表1)。このことから、未分化生殖腺から精巣への分化に関わる Sry の機能は 12-14ts、すなわち性分化期初期の 6 時間に限られていること (臨界期) が明らかとなった (図2)。

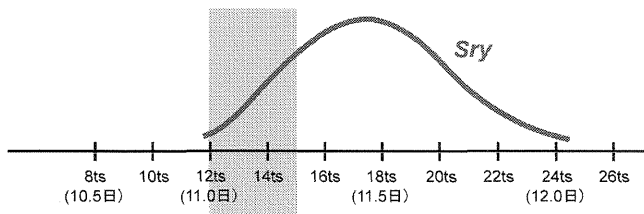


図2. Sry が精巣分化を誘導できる臨界期は 12-14ts

XY での Sry の発現は 12-24ts (胎齢 11.0-12.0 日) であり、発現初期 (灰色の部分) が重要であることが示された。

表1. 各発生ステージにおける、Sry による精巣分化誘導率

12-14ts に Sry の発現を誘導した XX 生殖腺においてのみ、高率に精巣分化を誘導できた。

ts (日齢)	10 ts	11ts	12-13 ts (11.0 日)	14 ts	15 ts (11.25 日)	16-17 ts	18-21 ts (11.5 日)
XX 精巣	0% (0/8)	10% (1/10)	83% (19/23)	82% (9/11)	27% (3/11)	0% (0/15)	0% (0/12)

②Sry の精巣形成誘導能の臨界期は *Fgf9/Wnt4* の発現バランスにより決定される。

Sry が精巣分化誘導能を持つ臨界期が 12-14ts に限局している要因を詳細に検討した。その結果、i) 臨界期以降において Sry 発現を誘導すると、21ts (胎齢 11.75 日) までは Sox9 の発現を誘導できることが明らかとなった。しかし、その Sox9 の発現は一過性にとどまり、その後の発現は維持されなかった。また、精巣分化の初期過程に特異的に起こる中腎から生殖腺への細胞移入や体腔上皮の増殖形態変化も認められなかった。

ii) 臨界期以降における Sry 発現では、*Fgf9/Wnt4* の発現レベルのバランスが雌型 (*Fgf9* 低/*Wnt4* 高) のままであり、雄型 (*Fgf9* 高/*Wnt4* 低) に変化できなかった。このことから、*Fgf9/Wnt4* の発現レベルのバランスは Sry により直接制御されないことが示された。

iii) FGF9 と sFRP2 (Wnt シグナル拮抗因子) の添加および *Wnt4* ノックアウトマウスでの解析により、*Fgf9/Wnt4* の発現バランスを雄型 (*Fgf9* 高/*Wnt4* 低) に変えると、臨界期以降における Sry 発現でも、セルトリ細胞およびライディッヒ細胞の分化、精巣索の形成を誘導できることから、Sry の精巣形成誘導能の臨界期は *Fgf9/Wnt4* の発現バランスにより決定されることが明らかとなった。

以上のことは、XX で *Wnt4* の発現が 15ts より上昇することとも一致しており、XY での Sry による精巣分化の決定から直ぐに、XX においても *Wnt4* により卵巣分化の決定がなされることを示すものである。(図 3)

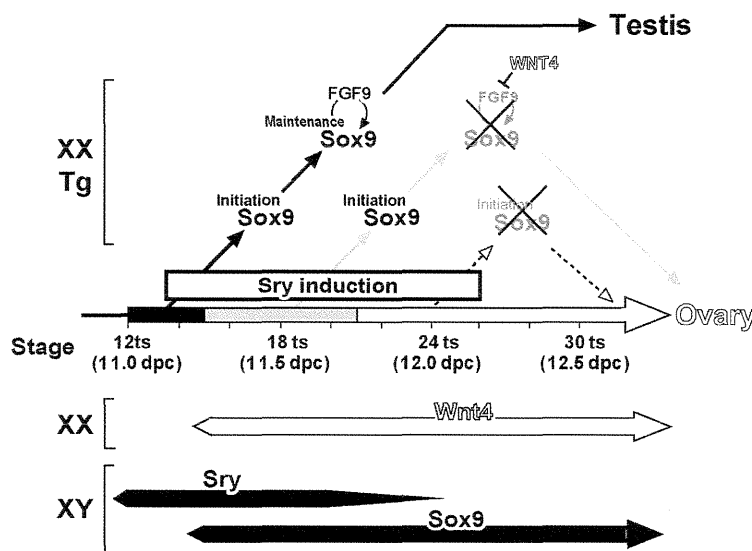


図 3. SRY の機能と臨界期

12-14ts (胎齢 11.0-11.2 日) での Sry 発現により、Sox9 の発現および FGF9 シグナルの上昇による Sox9 発現の維持、精巣形成が誘導される。*Wnt4* が発現を開始する 15ts 以降では、Sry 発現により Sox9 の一過性の発現は誘導できるものの、FGF9 シグナルの上昇は誘導できず、精巣分化は誘導できない。

第 2 章 精巣分化誘導における空間的な分化機構の解析

①精巣の分化は、生殖腺中央部から開始し、生殖腺全体へと広がって行く。

様々なステージで取り出したマウス XY 生殖原基を前部、中央部および後部の 3 つの領域に分割し、培養を行った。その結果、12-14ts (胎齢 11.0-11.25 日) から取り出した生殖原基では、中央部の培養片は高い精巣分化能を示すのに対し、前部と後部の培養片は、その約 70% で精巣形成が阻害されていた (図 4 A)。15ts 以降から取り出した生殖原基では、前部と後部でも高い精巣分化能を示した。一方、三分割した 12-14ts の前部、中央部、後部の生殖腺断片を、再び 1 つの生殖腺に構築して培養した結果、前部と後部でも中央部と同様に精巣形成が誘導された (図 4 B)。以上、精巣分化は中央部に始まり、前部と後部へと誘

導能が広がること、すなわち中央部が XY 生殖腺全体の精巢分化を誘導していることが判明した。

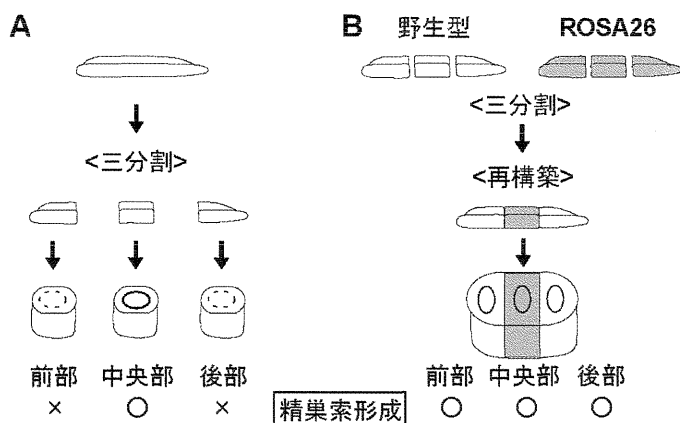


図4. 精巢分化は中央部により誘導される。

A : 12-14 ts の XY 生殖原基を前部・中央部・後部の3つに分割し培養すると、中央部のみ高い精巢分化能が観察された。

B : 一度分割した生殖原基片を再び1つの生殖原基に構築し培養すると、前部・後部でも高い精巢分化能が確認された。再構築の際、中央部に ROSA26 マウスより取り出した生殖原基を使用し、標識した。

②中央部からの FGF9 シグナルにより、生殖腺全体が精巢分化へと進行する。

中央部から前/後部へ広がる精巢分化パターンを制御する因子を検討した結果、

- i) 細胞の移動や細胞間相互作用によるものではなかった。
- ii) 前部と後部でも Sry および Sox9 の発現は誘導されるが、その後の Sox9 の発現は中央部と比べて低いレベルのままであった。
- iii) FGF9 添加により前部と後部の精巢分化誘導能が中央部と同等のレベルに回復した。一方、FGF シグナル阻害により、中央部から前/後部への誘導能の広がりが抑制された。
- iv) *Fgf9* は中央部から発現を開始し、前/後部へと広がる。

これらの結果から、中央部から分泌された FGF9 が、前/後部の精巢分化誘導能を高めることにより、生殖腺全体が精巢分化へと進行することが明らかとなった (図5)。

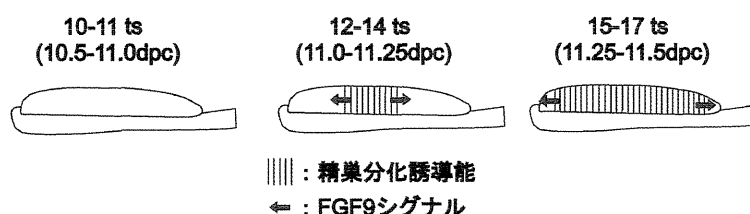


図5. 精巢分化は生殖腺中央部から開始し、FGF9 により分化能が前/後部へ広がる。

以上の結果は、Sry が正常な精巢分化を誘導するためには、その発現時期、発現部位の制御が正しく行われる必要があることを意味している。このことは発生過程における遺伝子活性制御の重要性を改めて強調するものであるとともに、今後の生殖腺性分化の研究において、Sry の特徴的な発現パターンがどのように制御されているのか、その同定が最重要課題の1つであると考えられる。