

〔別紙 2〕

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 的場 章悟

「器官形成」とは未分化な細胞群がその運命を決定され、分化し、さらにダイナミックな形態形成を伴って、特定の器官へ分化する過程を指す。ここ 20 年ほどの遺伝子解析技術の発達により、器官形成に関わる遺伝子が次々に明らかになってきた。しかし一方で、遺伝子以外にも、温度や圧力など遺伝子と相互作用をする「環境的因子」が器官形成を含む個体発生に関与することが近年示唆されている。申請者はこれら環境的因子の一つとして「エネルギー代謝」に着目した。ダイナミックな器官形成過程ではエネルギー代謝も厳密に制御されていることが想像されるが、器官形成とエネルギー代謝との関連性についてはほとんど明らかになっていない。

生殖腺は唯一、一つの未分化な原基が二つの異なる器官、すなわち精巣か卵巣に分化するという非常に特殊な過程を経る。哺乳類において転写因子 *Sry* とその直接標的因子 *Sox9* はどちらも精巣決定に必要なかつ十分な機能を持つ。マウスの *Sry* は未分化生殖腺のセルトリ前駆細胞においてのみ胎齢 11.0 日(*days post coitus* [dpc])から 12.0dpc の一過性発現を示す一方、*Sox9* の発現は同じくセルトリ前駆細胞において 11.2dpc から始まり生後まで維持されることから、*Sox9* の発現が維持されることで精巣分化に必要な様々な因子が誘導されると考えられる。*Sry* の発現以降、体腔上皮細胞の増殖、中腎細胞の生殖腺への移入、血管形成が促され、12.5dpc までに精巣索形成を伴う精巣への形態形成が引き起こされる。一方で卵巣では形態的な変化は起こらない。このような精巣／卵巣の初期分化における形態形成の顕著な性差から、卵巣と比べ、精巣への初期分化にはより多くのエネルギー供給を必要とすると推測されるが、これまで性分化過程でエネルギー代謝の雌雄差等については全く不明であった。そこで、本研究はマウスの生殖腺の性分化過程をモデルに、器官形成とエネルギー代謝の関係について遺伝子レベルで解析したものである。

第一章では、エネルギー供給を検討した。11.5dpc の生殖腺を組織学的に観察したところ、二次的なバックアップエネルギー源として知られるグリコーゲンが XY 特異的に蓄積していた。グリコーゲンの蓄積は *Sox9* 陽性のセルトリ前駆細胞においてのみ 11.2dpc から開始するという *Sox9* と同じパターンを示した。また、XX*sry* 性転換雄マウスにおいてグリコーゲン蓄積が誘導されたことから、*Sry* の直下でグ

リコーゲンの蓄積が制御されていることが示唆された。さらに、器官培養系に、各種シグナル伝達因子阻害剤を添加した結果、Insulin およびその下流因子である PI3K の阻害剤が特異的にグリコーゲン蓄積を抑制した。また、Insulin receptor の強制活性化[bpv(phen)]や PI3K の下流因子 Akt の強制活性化により、XX 生殖腺でもグリコーゲンの蓄積が誘導された。以上の結果から、Sry はセルトリ前駆細胞において Insulin-PI3K-AKT 経路を雄特異的に活性化させることでグリコーゲン蓄積を誘導していることが強く示唆された。

第二章では、グルコース飢餓培養系 (Glucose Deprived: GD) を用いて、性分化期の性/細胞/イベント特異的なエネルギー要求性を比較検討した。未分化生殖腺を GD 条件にて器官培養したところ、XY の精巣索形成が特異的に阻害されており、セルトリ前駆細胞特異的に GD に応じた小胞体の拡張が起きていた。セルトリ前駆細胞において、GD 条件でも Sry および Sox9 の初期発現誘導は正常に行われるものの、その後 Sox9 発現が維持出来ないため精巣索形成が異常になることが明らかになった。Sox9 下流の Col9a3 や Laminin などの細胞外基質 (ECM) の発現が GD で著しく低下していたことから、Matrigel を GD に加えると Sox9 の発現及び精巣索形成が劇的に回復した。以上の結果から、性分化期の生殖腺においてセルトリ前駆細胞での「ECM を介した Sox9 の発現維持機構の確立」が最もエネルギー要求性の高い molecular event であることが示唆された。

以上の結果から、精巣決定遺伝子 Sry はエネルギー要求性の高い「ECM を介した Sox9 発現維持」を促して精巣索形成を誘導する一方で、事前に Insulin-PI3K-AKT 経路を介して「グリコーゲン蓄積」を誘導することでエネルギー供給をも同時に制御することが明らかになった。本研究は哺乳類の器官形成とエネルギー代謝の関係を遺伝子レベルで結び付けた新しい視点を提供しており、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のあるものと認めた。