

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06397

研究課題名（和文）哺乳類胎子卵巣体細胞における遺伝子発現サブタイプ解析

研究課題名（英文）Gene expression analysis and subtype classification in the somatic cells of the mammalian ovary.

研究代表者

平松 竜司（Hiramatsu, Ryuji）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：70555284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、形態的特徴の乏しいマウスXX胎子卵巣体細胞の多様性（heterogeneity）を明らかにするため、胎齢13.5日胎子卵巣の一細胞トランスクリプトーム解析とin situ hybridizationによる発現パターン解析を行った。その結果、胎子卵巣の体細胞は遺伝子発現プロファイルから2つのクラスタに分けられること、卵胞上皮細胞に発現するFoxl2陽性細胞は両方のクラスタにまたがって存在することが明らかとなった。また、Foxl2陽性細胞においてクラスタ間で発現変動する遺伝子群のうち、卵巣髄質と中腎境界部に限局した発現パターンを示す遺伝子2つを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎子卵巣の分化過程は、その形態的变化が乏しいことから、特に体細胞分化のメカニズムについては未だ不明な点が多く存在する。一方、我々はこれまでに、胎子卵巣髄質領域に限局して、雄型の支持細胞になり得る性的未分化性を有するFOXL2陽性の特殊な支持細胞系列が存在することを示唆するなど、胎子卵巣体細胞の多様性（heterogeneity）が考えられてきた。今回の研究はそのheterogeneityを制御する候補遺伝子の同定を行った。これらの遺伝子のさらなる解析により、哺乳類胎子卵巣の分化機構の解明やフリーマーチンを含むXXの性分化異常症の発症機序解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to clarify the heterogeneity of mouse XX fetal ovarian somatic cells, which are morphologically poorly characterized, we performed a one-cell transcriptome analysis of 13.5-day-old fetal ovaries and expression pattern analysis by in situ hybridization. The results indicate that the somatic cells of the fetal ovary can be divided into two clusters based on gene expression profiles, and that Foxl2-positive cells expressed in follicular epithelial cells exist in both clusters. Moreover, we identified two genes whose expression patterns were restricted to the ovarian medullary and mesonephric-border region among a group of genes whose expression shows significantly different between clusters in Foxl2-positive cells. Further analysis of these genes is expected to elucidate the differentiation mechanism of the mammalian fetal ovary and to elucidate the pathogenesis of XX sex differentiation disorders, including freemartin syndrome.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウス 卵巣 支持細胞 性的未分化性 皮質髄質軸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

次世代の生命をつなぐ配偶子を形成する生殖腺は、配偶子に分化する生殖細胞と支持細胞やステロイド産生細胞などの体細胞から成る。配偶子形成において、生殖細胞と体細胞の相互作用は必須であることから、生殖腺の体細胞に関する理解は配偶子形成機構の解明において必要となる。哺乳類において、生殖腺体細胞の元となる細胞は、後腸背側の体腔上皮の肥厚により形成される生殖隆起に存在する。この時の生殖隆起は性的未分化の状態であり、生殖細胞と体細胞の前駆細胞が一次性索を形成している。哺乳類における生殖腺の分化において、支持細胞の性決定が精巣あるいは卵巣への運命決定を担っており、XY 個体の生殖隆起では、支持前駆細胞に Y 染色体上の性決定遺伝子 SRY が一過性に発現し、セルトリ細胞（精巣の支持細胞）への分化が誘導され、一次性索から精巣索（将来の精細管）の形成やライディッヒ細胞（精巣のステロイド産生細胞）の分化が誘導される。一方、SRY が発現しない卵巣の体細胞では、SRY の発現時期より少し遅れて、WNT4/CTNN-B、RSPO1、FOXL2、LGR5 などが支持細胞（卵胞上皮細胞）やステロイド産生細胞（内卵胞膜細胞）の前駆細胞といった体細胞に発現し、卵巣分化が開始される。また、胎生後期には卵巣表皮（分化した体腔上皮）から新たに体細胞が増殖され、二次性索を形成する。しかしながら、胎子精巣でみられるセルトリ細胞を中心とする精巣索形成のような体細胞の形態変化は、胎子卵巣では認められず、生後の卵胞形成まで待つこととなる。このような発生過程の違いにより、精巣の分化過程は、SRY を引き金とする分子カスケードや上記のダイナミックな形態変化ら多くの知見を得られている一方、卵巣の分化過程に関しては、ヒト XX 男性などの性分化異常症の原因遺伝子探索やノックアウトマウスでの卵巣化異常の報告等により、卵巣分化に重要な遺伝子が見いだされたことが主であり、特に胎子期における卵巣体細胞分化についていまだ不明な点が多い。我々はこれまでに、胎子卵巣髄質領域ならびに生後の卵胞顆粒層細胞において、SRY の強制発現により SOX9 発現を誘導できる、つまり雄型の支持細胞になり得る性的未分化性を有した FOXL2 陽性の特殊な支持細胞系譜が存在すること、これらはフリーマーチンを含む XX の性分化異常症の発症機序を説明しうることを示唆している (Harikae et al., J. Cell Sci., 2013)。これらのことから、体細胞個別の細胞系譜の多様性 (heterogeneity) を考慮することが、卵巣分化過程を解明するうえで強く求められる。

### 2. 研究の目的

上記のことを踏まえ、本研究では、マウス XX 胎子卵巣の一細胞トランスクリプトーム解析を行い、得られた遺伝子発現プロファイルの個別データを基に、胎子卵巣体細胞を遺伝子発現パターンからタイプ分類を行う。そして分類されたサブタイプ間の遺伝子発現の比較により、各サブタイプに特徴的発現を示す遺伝子を抽出する。さらにそれらの遺伝子の発現について in situ hybridization や免疫染色などにより解析し、雌雄差や発生ステージ、空間的パターン、発現細胞などの同定を行う。これらの方法により、これらにより、配偶子形成や生殖腺の運命決定に大きな役割を担う哺乳類卵巣体細胞サブタイプの分子基盤を明らかにし、哺乳類胎子卵巣の分化機構の解明やフリーマーチンを含む XX の性分化異常症の発症機序解明につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

卵巣体細胞の heterogeneity の分子基盤を明らかにするため、以下の実験を行った。

#### (1) マウス胎子卵巣体細胞のクラスタ解析によるサブタイプ分類

マウス胎齢 13 日の XX 胎子卵巣を単離し、トリプシン/EDTA 処理ならびに ICCELL8™ システムによりシングルセル化し、各シングル細胞につき、細胞識別のバーコードを付加し、次世代シーケンサーを用いてそれぞれに個々の細胞に発現しているおける遺伝子発現の定量解析（一細胞トランスクリプトーム解析）を実施し、一細胞での遺伝子発現プロファイルデータを獲得した。このデータから t-SNE 解析と k-NN 法によるクラスタ検出を行った。さらに *Lgr5*（主に胎子卵巣皮質領域の体腔上皮細胞に発現）、*Foxl2*（主に胎子卵巣髄質領域の卵胞上皮前駆細胞に発現）、*Wnt4*（一次性決定期前後から胎子卵巣体細胞に発現）、*Nr2f2*（主にステロイド産生を行う内卵胞膜様前駆細胞）といった胎子卵巣体細胞マーカーとして同定されている遺伝子の陽性細胞群、ならびに発現遺伝子のパターンにより複数のクラスタで分類した体細胞系譜のサブタイプ間で統計的に比較し（最大  $3 \times 3 = 9$  サブタイプ）、それぞれのサブタイプ特異的に有意に発現が変化している遺伝子を抽出した。

#### (2) 卵巣体細胞サブタイプ特異的遺伝子の発現パターン解析

(1)により抽出された遺伝子群から、これまでに公表されている卵巣体細胞のマイクロアレイ解析などの網羅的遺伝子発現解析のデータや、各種データベースを参考にして、卵巣体細胞の heterogeneity に関与する候補遺伝子の絞り込みを行った。また、我々が公表している生後すぐの最初の卵胞形成や卵巣髄質領域の卵巣間質腺の形成に関与している特殊な支持細胞系譜が卵巣髄質に局限して存在していることに注目し、これらの候補遺伝子の発現について、in situ hybridization や免疫染色により発生ステージや発現領域などの時空間的パターンを解析し、卵巣

の皮質-髄質軸に沿った発現パターンを示す遺伝子の抽出を行った。

#### 4. 研究成果

(1)FOXL2 陽性細胞は形態的特徴のない性分化初期においても、遺伝子発現レベルで多様性 (heterogeneity) を持つ。

胎齢 13.5 日の XX マウス胎子卵巣をシングルセル化し、各シングルセル細胞の遺伝子発現プロファイルを t-SNE 解析した結果、胎子卵巣細胞を体細胞の 2 クラスタ (Soma-1, Soma-2) および生殖細胞の 1 クラスタ (Germ) の 3 クラスタに分けられた。また、皮質側の卵胞上皮前駆細胞に発現する *Lgr5*、髄質側の卵胞上皮細胞に発現する *Foxl2* の陽性細胞はそれぞれ体細胞の 2 クラスタにまたがって分布していた (図.1)。このことは、性分化初期であり、形態的特徴が乏しい胎齢 13 日の卵巣支持細胞においても、遺伝子発現レベルではすでに細胞系譜の多様性 (heterogeneity) が存在することを強く示唆する。さらに、XX 胎子卵巣には性的未分化性を有する特殊な FOXL2 陽性細胞が存在することに着目し、卵胞上皮細胞マーカーである *Foxl2* 陽性細胞のうち、Soma-1 と Soma-2 のそれぞれのクラスタに分類された細胞間の発現変動遺伝子を解析した。その結果、Soma-1 に属する細胞群では 91 遺伝子、Soma-2 に属する細胞群では 22 遺伝子の発現が、それぞれ他方に比べて上昇していることが分かった。Soma-1 での高発現遺伝子には *Hmgb2*, *Hdac3*, *Hist1h1b*、Soma-2 での高発現遺伝子には *Hmgb1* といったエピジェネティック制御に関与する遺伝子が含まれていた。さらに、Soma-1 ではクロマチンバインディングや転写抑制に関与する遺伝子が含まれていた。

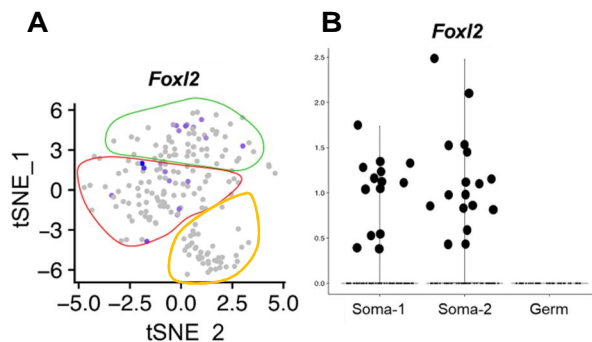


図.1 胎子卵巣細胞のクラスタ解析

A: 胎子卵巣細胞の tSNE 解析 . 緑の領域が Soma-1、赤の領域が Soma-2、黄の領域が Germ のクラスタを示す . 青の点が Foxl2 陽性細胞 . B: ヴァイオリンプロットによる Foxl2 陽性細胞における発現量と各クラスタへの分布

(2)FOXL2 陽性細胞の heterogeneity に関わる遺伝子群には、卵巣皮質髄質軸に沿った発現パターンを示すものが存在する。

我々はこれまでに、性的未分化性を有した FOXL2 陽性細胞が卵巣髄質に局限して存在することを示している。そこで、(1)にて同定した遺伝子群のうち、皮質髄質軸に沿った発現パターンを示す遺伝子が存在するか、in situ hybridization により解析した。解析する遺伝子については、Soma-1 もしくは Soma-2 に属する細胞で高発現する計 113 遺伝子のうち、これまでに報告されている胎子卵巣の遺伝子発現データベースを基に 23 遺伝子に絞り込んで解析した。その結果、生殖腺全領域に発現する遺伝子 (Type I) として 16 個、発現が認められなかった遺伝子 (Type III) として 5 個の他に、生殖腺髄質と隣接する中醫の境界領域に局限して発現する遺伝子 (Type II) を 2 個同定した。これらの遺伝子を Medullary-Specific Expressing Gene (MSEG) として、その発現像を図.2 に示す。

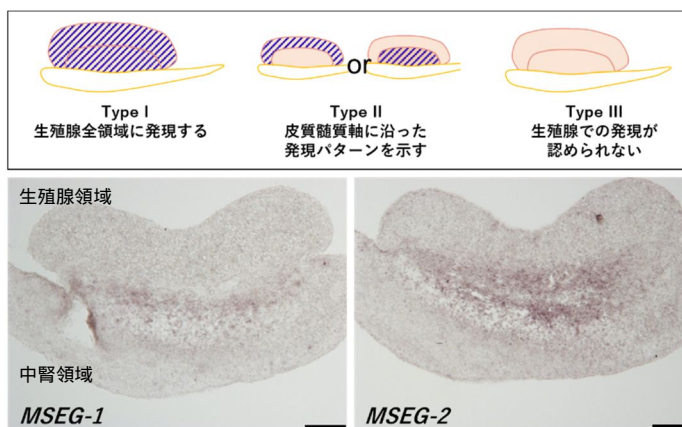


図.2 胎子卵巣髄質領域に限局的に発現する遺伝子群の同定  
上段: FOXL2 陽性細胞の heterogeneity に関わる遺伝子群の発現パターンの模式図 . 今回は生殖腺全体に発現 (Type I)、皮質髄質軸に沿った発現 (Type II)、発現なし (Type III) に区分する . 下段: 胎齢 13.5 日卵巣の髄質並びに中醫境界部に局限して発現する遺伝子 (MSEG) の in situ hybridization による発現解析 . Bar = 100mm .

今回の研究による同定された MSEG は、胎子卵巣髄質領域に存在する、性的未分化性を有した FOXL2 陽性の特殊な支持細胞系譜を制御する遺伝子の候補として考えられ、これらの遺伝子の機能をさらに詳細に解析することで、哺乳類胎子卵巣の分化機構の解明やフリーマーチンを含む XX の性分化異常症の発症機序解明につながる事が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Imaimatsu Kenya, Uchida Aya, Hiramatsu Ryuji, Kanai Yoshiakira	4. 巻 23
2. 論文標題 Gonadal Sex Differentiation and Ovarian Organogenesis along the Cortical?Medullary Axis in Mammals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13373 ~ 13373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232113373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoko, Kimura-Yoshida Chiharu, Mochida Kyoko, Tsume Mami, Kameo Yoshitaka, Adachi Taiji, Lefebvre Olivier, Hiramatsu Ryuji, Matsuo Isao	4. 巻 31
2. 論文標題 Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert 's Membrane Are Crucial for Early Mouse Morphogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107637 ~ 107637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Imura-Kishi Kasane, Uchida Aya, Tsunekawa Naoki, Suzuki Hitomi, Takase Hinako M., Hirate Yoshikazu, Kanai-Azuma Masami, Hiramatsu Ryuji, Kurohmaru Masamichi, Kanai Yoshiakira	4. 巻 11
2. 論文標題 Low retinoic acid levels mediate regionalization of the Sertoli valve in the terminal segment of mouse seminiferous tubules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79987-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井松 健也、村田 千晴、東山 大毅、三浦 健人、平手 良和、金井 正美、平松 竜司、金井 克晃
2. 発表標題 Amh欠損雄マウスにおける雄性環境下での遺残子宮の発達解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井松 健也、板橋 寛嗣、富田 絢子、平松 竜司、金井 克晃.
2. 発表標題 マウス胎子期精巣における性的可塑性とその卵巣化メカニズムの解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野 賢、今井松 健也、山田 竜一、平松 竜司、金井 克晃
2. 発表標題 マウス胎子期卵巣体細胞において発現に不均一性がみられる遺伝子の同定
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井松 健也、板橋 寛嗣、富田 絢子、平松 竜司、金井 克晃.
2. 発表標題 マウス性分化期におけるFGF9による生殖腺上皮の卵巣皮質の誘導制御
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井松 健也、板橋 寛嗣、富田 絢子、平松 竜司、金井 克晃.
2. 発表標題 マウス胎子期精巣の性転換系における卵巣化メカニズムの解析.
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井松 健也、板橋 寛嗣、富田 絢子、平松 竜司、金井 克晃.
2. 発表標題 マウス胎子期精巣における新規性転換系の樹立とその卵巣化メカニズムの解析.
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井松 健也、平松 竜司、平手 良和、金井 正美、金井 克晃
2. 発表標題 マウス胎子卵巣支持細胞における性的 2 型に関与する不均一性の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉垣 太聖、内田 あや、今井松 健也、平松 竜司、金井 克晃
2. 発表標題 精巣内圧の増加による精巣の大きさ及び精子発生への影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金井 克晃  (Kanai Yoshiakira)  (30260326)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授   (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------