

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790386

研究課題名(和文) 哺乳類の性分化機構とその進化に関わる細胞特異的エピジェネティック修飾の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanism of mammalian sex differentiation and disorders of sex development

研究代表者

横山 俊史 (YOKOYAMA, Toshifumi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10380156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：性分化異常の発症原因となる性分化機構の検討を行った。性分化異常系統のマウスで同一遺伝背景から異なる表現型が生じる原因が、性分化関連因子の時空間特異的な性的二型性発現の破綻であることが示された。ターナーモザイク患者では、性分化関連遺伝子の発現が必ずしも左右で同じで無く、モザイク比率やタンパク質局在と一致しない遺伝子が存在した。加えて、培養条件下でのセルトリ細胞の特性維持には三次元構造および細胞接着の両方が必須であること、さらに発生中のニワトリ生殖腺ではGATA4がDMRT1の発現調節を行う事、DMRT1がミューラー管の退縮および生殖細胞の発生促進と減数分裂開始に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the relationships between regulation mechanisms of gonadal sex differentiation and disorders of sex development (DSD). In the DSD line mice (Ypos), inappropriate spatiotemporal expression of sex differentiation related factors in the developing gonad cause different phenotype from the same genetic background. In the Turner mosaic patient, the expression of sex differentiation related genes differed by gonads on both side, and the mRNA expression level was not consisting with mosaic ratio or protein expression. In addition, both three-dimensional structure and cell adherence were indispensable for the maintenance of the Sertoli cell characteristics under the culture condition. Furthermore, it became clear that GATA4 regulates expression of DMRT1 in the developing chicken gonads, and DMRT1 has various roles in the chicken embryo.

研究分野：人類遺伝学

科研費の分科・細目：エピジェネティクス

キーワード：性分化 性分化異常 ターナーモザイク

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の性の決定および分化の機構は、未分化性腺の精巢化がY染色体上の性決定遺伝子 *SRY* により誘導される事が明らかにされて以降、速やかに解明されると思われていた。しかしながら、性分化機構は単一の遺伝子によって制御されるほど簡単でなく、その転写調節や下流因子の発現制御については不明な点が多い。加えて、哺乳類では雌型が標準形で *SRY* により雄化するとされるが、成獣マウスの卵巣の雄性化が報告されるなど、より複雑な機構の存在が示唆されている。加えて、性分化時期における雌性化因子の積極的な関与が近年提唱されているが、その機能や発現調節機構についても不明な点が多い。

ヒトの性分化異常症においても、性の決定・分化の機構は *SRY* の組織限定的発現および時期に依存すること、性分化異常症の発症原因がY染色体以外にも存在することが示されている。加えて、性決定遺伝子と関連する組織限定モザイシズムが密接に関与することが明らかにされているが、その発生機序や多様な異常が生じる理由は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

(1) 性分化異常系統における遺伝子発現プロファイルの解析: 性分化異常系統(B6-Y^{pos})由来のマウスの真性半陰陽産出群を用い、性分化関連遺伝子群の発現量を検討すると共に、その発現制御機構について時間的・空間的に明らかにし、性分化異常症およびその多様性の原因を解明することを目的とする。特に、*Sry* 発現後の分化進行中の精巢型ならびに卵巢型の表現形を詳細に比較することで、分化異常の原因を明らかにする。

(2) 性分化異常の発症機構について知見を増やすため、下記の検討を行う。

- ・ターナーモザイク患者における遺伝子発現プロファイルの解析: ターナーモザイク患者性腺の詳細な遺伝子発現については明らかでなく、特に染色体モザイクとの関連について解明する事を目的とする。

- ・培養条件下でのセルトリ細胞の特性解析: 培養条件下でセルトリ細胞の維持を可能とするために、複数条件下で培養を行い細胞特性が保たれる条件の探索を行う事を目的とする。

- ・ニワトリ生殖腺における *GATA4* および *DMRT1* の発現解析: *GATA4* および *DMRT1* は広範な動物種に保存され雄性性腺分化に重要な機能を果たしている。しかしながら鳥類では哺乳類と異なり、*DMRT1* が性分化の過程でも機能するため、ニワトリ胚での機能解析を行い哺乳類での性分化機構の進化を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 性分化異常系統のマウスである B6-XY^{pos} 動物の新生子より性腺を摘出し、性分化関連因子の組織学的検索および mRNA 発現量の定量的解析を行った。

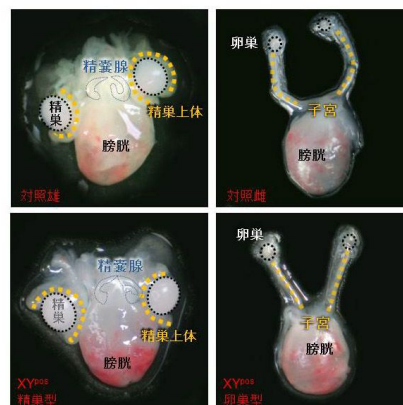
(2) ターナーモザイク症患者性腺を組織学的に検索し、また一部を培養することでモザイク比率ならびに性分化関連遺伝子の発現解析を行った。

(3) 胎齢 12.5 日の雄 Sox9-GFP マウスより FACS にてセルトリ細胞を分離し、凝集培養、単独培養、平板培養の各条件下で培養を行った後に、セルトリ細胞特異的遺伝子の発現解析を行った。

(4) 発生中のニワトリ受精卵を経時的に採取し、*GATA* および *DMRT1* の発現ならびに支持細胞および生殖細胞との関連を免疫組織学的に精査した。

4. 研究成果

(1) XY^{pos} 精巢における精巢化因子の発現量低下は、卵巢化抑制機構の破綻に寄ることが示唆された。一方、XY^{pos} 卵巢は精巢化カスケードの破綻もしくは、卵巢化因子の発現量調節機構の異常も示唆された。同一遺伝背景より、異なる性腺を生ずる原因が、胎子期における性分化関連因子の時空間特異的な性的二型性発現の破綻であることが明らかとなった。機能的な精巢・卵巢を生じる機構の一端を解明できたので、関連遺伝子の研究を進めることで、性分化破綻の機序解明に繋がることが期待される。

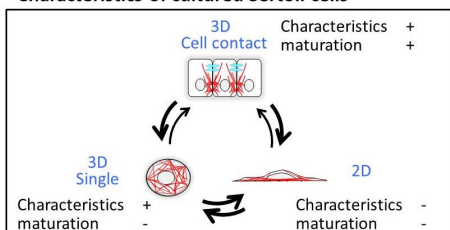


(2) ターナーモザイク患者では、性分化関連遺伝子の発現様式は必ずしも左右で同じで無く、モザイクの比率やタンパク質の局在と一致しない遺伝子が存在した。索状性腺では、雌雄性腺形成に関与する遺伝子が拮抗して発現するため、正常な性腺分化が行われないことが示唆された。ターナーモザイク患者性腺の詳細な遺伝子発現の初めての報告で、性分化異常解明の発展に重要な結果である。

(3) 雄性化はセルトリ前駆細胞における *Sry* 遺伝子の発現より開始させるが、培養条件下

のセルトリ細胞は、その細胞特性を急速に喪失する。異なる培養条件下で検討すると、三次元構造および細胞接着の両方がセルトリ細胞の特性維持に必須であることが明らかとなった。セルトリ細胞は雄性化のみならず精子形成過程にも大きく関与しており、培養条件下で細胞特性の維持に道を開いた本研究の意義は大きい。

Characteristics of cultured Sertoli cells



(4) 発生中のニワトリ生殖腺では GATA4 が DMRT1 の発現調節を行う事、DMRT1 はミュラー管の退縮および雌雄共に生殖細胞の発生促進ならびに減数分裂開始に関与することが明らかとなった。哺乳類における GATA4 および DMRT1 の機能と種を越えて同等に保存されている点、異なる点の両方が明らかとなり、関連分子の比較を続けることで性分化異常の解明に繋がること期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Omotehara T, Smith CA, Mantani Y, Kobayashi Y, Tatsumi A, Nagahara D, Hashimoto R, Hirano T, Umemura Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N.; Spatiotemporal expression patterns of doublesex and mab-3 related transcription factor 1 in the chicken developing gonads and Mullerian ducts. Poult Sci. 2014 Apr;93(4):953-958. doi: 10.3382/ps.2013-03672. [査読有]

[学会発表](計 7 件)

横山俊史, 金 聖民, Ferhat Ulu, 山崎由起子; セルトリ細胞の成熟に対する細胞接着の影響; 第 89 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2013.11/30, 奈良先端科学技術大学院大学。

横山俊史, 金 聖民, Ferhat Ulu, 山崎由起子; Effect of Cell-Cell contact on the maturation of Sertoli cells.; 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013.9/20-22, 岐阜大学。

表原拓也, 木下今日子, 長原大知, 段上めぐみ, 徳本順子, 小林泰丈, 辰巳敬哉, 橋本理恵, 平野哲史, 梅村ゆりあ, 横山俊史, 北川浩, 星信彦; 「性腺分化とその破綻メカニズムに関する分子形態学的研

究」; 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013.9/20-22, 岐阜大学。

Toshifumi Yokoyama, Sung-Min Kim, Ferhat Ulu, and Yukiko Yamazaki. Cell-Cell contact is essential for Sertoli cell maturation. Biomedical Sciences and Health Disparities Symposium, April 8-9, 2013. University of Hawaii, USA.

木下 今日子, 長原 大知, 段上 めぐみ, 徳本 順子, 表原 拓也, 小林 泰丈, 辰巳 敬哉, 横山 俊史, 北川 浩, 星 信彦; 性腺分化と性分化カスケードに関する分子形態学的研究; 第 88 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2012.12/1, 神戸大学。長原 大知, 森實 真由美, 蛭名 康彦, 木下 今日子, 段上 めぐみ, 徳本 順子, 安田 玲子, 表原 拓也, 小林 泰丈, 辰巳 敬哉, 横山 俊史, 北川 浩, 山田 秀人, 星 信彦; ターナーモザイク患者の性腺分化とその破綻機構の分子基盤の解明; 第 154 回日本獣医学会学術集会, 2012.9/14-16, 岩手大学。

表原拓也, 木下今日子, 長原大知, 段上めぐみ, 徳本順子, 小林泰丈, 辰巳敬哉, 橋本理恵, 平野哲史, 梅村ゆりあ, 横山俊史, 北川浩, 星信彦; ニワトリ胚における性分化関連遺伝子の時空間的発現に関する分子形態学的研究; 第 154 回日本獣医学会学術集会, 2012.9/14-16, 岩手大学。

[図書](計 0 件)

[産業財産権] 出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他] ホームページ等

6. 研究組織 (1) 研究代表者

横山俊史 (Yokoyam Toshifumi)
神戸大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：10380156

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：