様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：１４５０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０８６８６

研究課題名（和文）哺乳類の未分化生殖腺の雄性化を制御するY染色体のエピジェネティック修飾の解明

研究課題名（英文）The epigenetic status of Y chromosome in mammalian undifferentiated gonad

研究代表者
横山　俊史（YOKOYAMA, TOSHIFUMI）

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：１０３８０１５６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：Y染色体上に存在する性決定遺伝子Sryの修飾状況並びに性分化関連因子の発現状況について解析を行い，①汎用されるマウスの亜系統差によりSry発現が異なること，②健常雄個体のSry発現にも時空間的な相違や左右差がある事を明らかとした．さらに，③Sryの発現検証に必要な器官培養系および④内部標準遺伝子を確立するとともに，⑤AMHが精巣から中腎方向に組織内を浸潤する様式でミュラー管を退行させることを明らかとした．

研究成果の学術的意義や社会的意義
性差の確立には性決定遺伝子SRYおよび下流因子の適切な発現が重要で，その調節機構の解明には実験動物による検証が大きく貢献している．本研究の結果，Sry発現に個体差が大きいことや，従来大きく考慮されていなかった亜系統差の重要性が明らかとなった．ヒト疾患においては遺伝子座内のみならず発現制御領域内の小さな変異が原因となることが示されており，性分化機構並びにその破綻機序の解明に重要な知見が提供された．

研究成果の概要（英文）：The relationship between the modification status of the sex-determining gene Sry on the Y chromosome and the expression of sex-differentiation-related factors was investigated. As a result, it was revealed that Sry expression was different among the commonly used mouse sublines, and that there were spatiotemporal and lateral differences in Sry expression in healthy male individuals. The organ culture system and internal normalizing genes required for validation of Sry expression were also established. Moreover, it was revealed that Amh acts on the Mullerian duct by infiltrating the tissue from the testis toward the mesonephros.

研究分野：分子形態学

キーワード：性決定　性分化　Sry　未分化性腺　系統差　エピジェネティクス　AMH　性特異的遺伝子発現

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

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，近年の分子遺伝学的解析により急速に解明されてきている．とくに，未分化生殖腺の精巣化がY染色体上の性決定遺伝子 *SRY* により誘導される事が1990 年に明らかにされて以降，性の決定・分化の機構は速やかに解明されると思われていた［Koopman *et al*. 2001］．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，その複雑さが再認識されている［Svingen & Koopman 2013，She & Yang 2017］．すなわち，哺乳類では雌型が標準形で *SRY* 発現により雄化するとされていたが，成獣マウスの卵巣内の支持細胞系譜の雄性化が報告され［Uhlenhaut *et al*. 2009］，逆に精巣内の支持細胞系譜の雌性化も報告される［Matson *et al*. 2011］など，より複雑な制御が想定されている．

申請者らは同一遺伝子背景から真性半陰陽を含む複数の表現型を産出するマウスを確立したが，その未分化生殖腺からは精巣，卵精巣，卵巣が発生する．組織学的検索では，Y染色体上の雄性化のマスター遺伝子である *Sry* のわずかな発現遅延が，雄性化実行因子である *Sox9* の発現量低下を惹起していたが［Umemura *et al*, 2015］，*Sry* 発現遅延の原因は明らかでない．同時期の野生型を用いた網羅的解析では，既知の性分化関連因子に差異は認められず（未発表データ），関連する登録済みのマイクロアレイデータ（GSE27715，GSE3463，GSE4818）も併せて検討したが，発現調節機序は不明であった．一方，ChIP-seq のデータベース｛クロマチン免疫沈降後に次世代シークエンサー（NGS）で配列を解析｝を検索すると［ChIP-Atlas, http://chip-atlas.org/］，既報の T-DMR に加えて複数のメチル化サイトが存在していた．遺伝的背景が同一である事等を併せ考えると，*Sry* の発現量調節の過程に対する，Y染色体へのエピジェネティックな遺伝子修飾の関与が想定された．この点を解明することは，単に実験動物の知見を増やすに留まらず，ヒトの性決定・性分化の機序の解明に重要である．

２．研究の目的

これまで我々は，性分化機構の破綻には性分化関連因子の発現量が関係することを示し，同一遺伝子型であっても生殖腺の表現型が異なるマウス系統を確立して解析してきた．その中で，Y染色体上に存在する性決定遺伝子 *Sry* の発現が異なる可能性が想定されたため，通常の動物および性分化が攪乱されている動物を確立し，その遺伝子の修飾状態を解明する事を企図した．

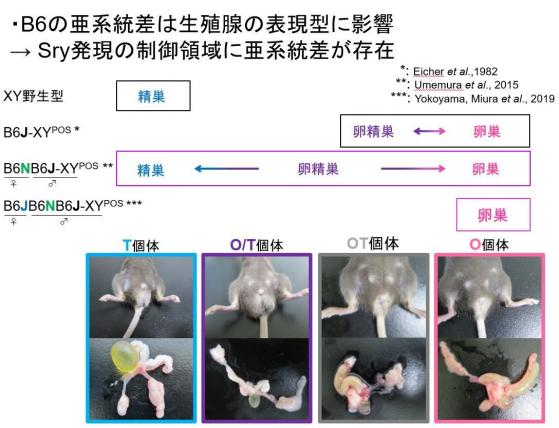
３．研究の方法

性染色体であるY染色体の修飾状況は，*Sry* 発現の前後で大きく変化することが想定されるため，正常に発生する動物，*Sry* 発現量が変動している動物を確立する．さらに遺伝子配列が微妙に異なるマウス系統を用いて，*Sry* の発現変動差を生じさせる．その *Sry* 発現量の正確な定量と時空間的な発現分布と，その修飾状況との関連解析を行う．さらに，*Sry* 発現に関連する上流の制御因子，下流因子の発現を検証するため，*Sry* 発現を検証可能な器官培養系を確立して，実験的な検証を行うとともに，バイオインフォマティック解析を行う．

４．研究成果

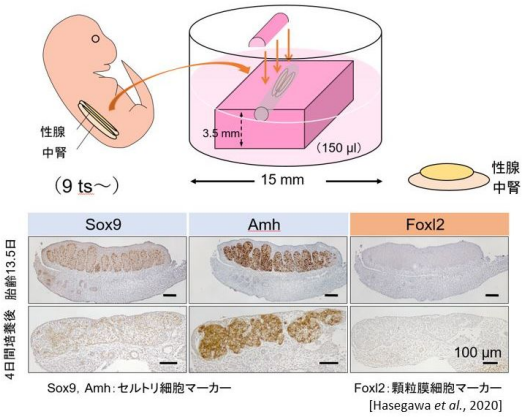
Y染色体上に存在する *Sry* の遺伝子修飾状況並びに性分化関連因子の発現状況について解析を行い，下記の点を明らかとした．その他の取得済みデータについては，解析が終了次第発表する．

（1）C57BL/6J（B6J）に *Poschiavinus* 種由来のY染色体を導入したマウス B6J-XY^{POS} は *Sry* を有するにもかかわらず，正常な精巣を形成しないが，B6N 背景に置換した場合は両側に精巣を有する個体を含む性スペクトラムの表現型を呈している［Umemura *et al*.，2015］．すなわち，Y染色体の遺伝子発現制御に遺伝的背景差異が影響する可能性が想定されたため B6J 背景に再置換すると，精巣を有する個体が出現しなくなり，B6J と B6N の遺伝的背景の差が，Y 染色体の遺伝子発現制御及び生殖腺の表現型に影響を及ぼすこと，さらには B6J 亜系統間の差異についても生殖腺表現型に影響することを明らかとした［Yokoyama *et al*., 2019］．



（2）性分化関連因子の mRNA 発現解析を行う中で既報の内部標準遺伝子の変動が認められたため，性分化開始初期段階から成獣に至るまでの，雌雄個体の各段階で使用可能な内部標準遺伝子の探索を行った．15 本の内部標準候補の安定性について複数のアルゴリズムを組み合わせて検討した結果，胎子期から成獣までの雌雄について使用可能な内部標準遺伝子候補を選定することが出来た．加えて，対象とする実験条件により適切な内部標準遺伝子が変動することも合わせて解明し，時期特異的な内部標準遺伝子リストを選定した［Yokoyama *et al*. 2018］．

（3）性分化関連遺伝子の修飾状況および発現状況の解析には，発生中に多種の実験操作が可能な「器官培養法」が有用であるが，胎齢 11.2 日（尾体節数 15）未満の性腺を用いた場合は精巣化が進行しないとされていた［Hiramatsu *et al*. 2009］．適切な培養条件を探索することで，性決定前（胎齢 10.5 日：尾体節数 8）のマウス未分化 XY 性腺内の広範な領域に精巣化が誘導され，より幼弱な個体（尾体節数 6）からの部分的な精巣化も認められた［Hasegawa *et al*. 2020］．本培養法により *Sry* 発現開始前からの器官培養が可能となり，その発現制御機構の解明に有効な実験系を提供できた．



Sry発現前の未分化性腺を培養すると，雄性生殖線特異的細胞である，セルトリ細胞マーカー発現細胞が多数出現した．

（4）成果（1）などに示した性分化撹乱動物の表現型から，未分化性腺の雄性化に重要な胎齢 11.0 日付近における性決定遺伝子 *Sry* の発現に差異があることが想定された．健常雄個体における *Sry* 発現を時空間的に詳細に検討すると，*Sry* 発現の時期や分布には系統差が存在し，性腺の頭尾方向および腹背方向に加えて，内外側方向にも差異が存在すること，加えて，B6N 系統では左性腺における *Sry* 発現が先行するが ICR 系統ではそのような特異性が存在しないことが明らかとなった［The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan で発表済み；投稿中］．性決定・性分化機構の解明にはマウスが大きく寄与しているが，その遺伝的背景を考慮すべき重要性が示された．加えて，健常雄個体間においても *Sry* の発現差が大きいことから，遺伝的配列の差異のみならず，その制御因子まで含めた広汎なエピジェネティクな影響が推測された．

（5）発生中の雄生殖腺で産生される抗ミュラー管ホルモン（AMH）は，雄動物のミュラー管を退行させるが，真性半陰陽動物では卵巣側のミュラー管は退行しない．AMH が血液を介して作用する場合，両側のミュラー管が退行するため，精巣側のミュラー管にのみ作用する詳細な作用機序について，特異的な遺伝子発現制御がなされているかを含めて詳細に解析した．その結果，AMH は血液による全身循環ではなく精巣の頭側部から中腎領域まで組織内を浸潤する様式で移行し，ミュラー管を退行させることを明らかとした［Yamamoto *et al*. 2018］．長い間，Amh は血液を介する古典的なホルモンとして作用するとされてきたが，性腺分化の過程においてはその作用様式が異なることが示され，医臨床的にも重要な知見が得られた．

（6）発生中の雄生殖腺で *Sry* の下流で発現する *Dmrt1* は雄動物の生殖腺維持に必須で，その欠失により性腺支持細胞の分化転換が起きる．その発現制御領域近傍のメチル化程度を詳細に検討すると，修飾状態が異なる領域を発見した．エピジェネティック状態と進化保存性に基づくバイオインフォマティック解析から，非痙攣性脳性麻痺（CP）患者の非コード領域内に機能的なゲノム欠失を見いだした．マウスにおける機能的検索および染色体立体構造の解析から，レチノイン酸受容体/レチノイド X 受容体複合体結合モチーフが存在し，その下流の *Dmrt3* 遺伝子プロモーターと空間的に相互作用することを示した．*Dmrt3* は、発達中のマウスの前脳と脊髄の介在ニューロンで検出され、ウマとマウスの運動調節に機能することから，ヒトの *DMRT3* のシス調節領域の欠失が前脳の発達障害と歩行異常を引き起こし，痙性 CP を惹起する可能性を示した［Kubota *et al*. 2018］．

＜引用文献＞

Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for *Sry*. *Nature* 351: 117-121, 1991.

Svingen T., Koopman P. Building the Mammalian Testis: Origins, Differentiation, and Assembly of the Component Cell Populations. *Genes Dev* 27: 2409-2426, 2013.

She Z.Y., Yang W.X. *Sry* and *SoxE* Genes: How They Participate in Mammalian Sex Determination and Gonadal Development? *Semin Cell Dev Biol*. 63: 13-22, 2017.

Uhlenhaut N., Jakob S.., Anlag K., Eisenberger T., Sekido R., Kress J., Treier A..C, Klugmann C., Klasen C, Holter N., Riethmacher D., Schütz G., Cooney A., Lovell-Badge R., Treier M Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* 139: 1130-1142, 2009.

Matson C., Murphy M., Sarver A., Griswold M., Bardwell V., Zarkower D. DMRT1 Prevents Female Reprogramming in the Postnatal Mammalian Testis. *Nature* 476: 101-104, 2011.

Umemura Y., Miyamoto R., Hashimoto R., Kinoshita K., Omotehara T., Nagahara D., Hirano T., Kubota N., Minami K., Yanai S., Masuda N., Yuasa H., Mantani Y., Matsuo E., Yokoyama T., Kitagawa H., Hoshi N. Ontogenic and morphological study of gonadal formation in genetically-modified sex reversal XY(^{POS}) mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 77: 1587-1598, 2015.

Yokoyama T., Miura Y., Yamamoto A., Umemura Y., Hasegawa C., Kawanishi K., Takada N., Omotehara T., Hirano T., Mantani Y., Miki T., Hoshi N. Genetic differences between C57BL/6 substrains affect the process of testis differentiation in Y^{POS} mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 81: 608-611, 2019.

Yokoyama T., Omotehara T., Hirano T., Kubota N., Yanai S., Hasegawa C., Takada T., Mantani Y., Hoshi N. Identification of reference genes for quantitative PCR analyses in developing mouse gonads. *J. Vet. Med. Sci.*, 80: 1534-1539, 2018.

Hiramatsu R., Matoba S., Kanai-Azuma M., Tsunekawa M., Katoh-Fukui Y., Kurohmaru M., Morohashi K., Wilhelm D., Koopman P., Kanai Y. A Critical Time Window of Sry Action in Gonadal Sex Determination in Mice. Development 136: 129-138, 2009.

Hasegawa C., Yokoyama T., Umemura Y., Kawanishi K., Miura Y., Takada N., Ohno S., Onaru K., Omotehara T., Hirano T., Mantani Y., Miki T., Hoshi N. Establishment of an organ culture system to induce Sertoli cell differentiation from undifferentiated mouse gonads. *J. Vet. Med. Sci.*, 82: 414-421, 2020.

Yamamoto A., Omotehara T., Miura Y., Takada T., Yoneda N., Hirano T., Mantani Y., Kitagawa H., Yokoyama T., Hoshi N. The mechanisms underlying the effects of AMH on Müllerian duct regression in male mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 80: 557-567, 2018.

Kubota N. Yokoyama T., Hoshi N., Suyama M. Identification of a candidate enhancer for DMRT3 involved in spastic cerebral palsy pathogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 496: 133-139, 2018.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　4件）

１．著者名 YOKOYAMA Toshifumi、MIURA Yuuka、YAMAMOTO Anzu、HASEGAWA Chinatsu、KAWANISHI Kohei、TAKADA Nanako、OMOTEHARA Takuya、HIRANO Tetsushi、MANTANI Yohei、MIKI Takanori、HOSHI Nobuhiko	４．巻 81
２．論文標題 Genetic differences between C57BL/6 substrains affect the process of testis differentiation in Y^{POS} mice	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	６．最初と最後の頁 608～611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0621	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 YOKOYAMA Toshifumi、OMOTEHARA Takuya、HIRANO Tetsushi、KUBOTA Naoto、YANAI Shogo、HASEGAWA Chinatsu、TAKADA Tadashi、MANTANI Yohei、HOSHI Nobuhiko	４．巻 80
２．論文標題 Identification of reference genes for quantitative PCR analyses in developing mouse gonads	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	６．最初と最後の頁 1534～1539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0417	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 KUBOTA N; YOKOYAMA T; HOSHI N; SUYAMA M	４．巻 496
２．論文標題 Identification of a candidate enhancer for DMRT3 involved in spastic cerebral palsy pathogenesis.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	６．最初と最後の頁 133-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 YAMAMOTO A; OMOTEHARA T; MIURA Y; TAKADA T; YONEDA N; HIRANO T; MANTANI Y; KITAGAWA H; YOKOYAMA T; HOSHI N	４．巻 80
２．論文標題 The mechanisms underlying the effects of AMH on Müllerian duct regression in male mice.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	６．最初と最後の頁 557-567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.18-0023	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 HASEGAWA Chinatsu、YOKOYAMA Toshifumi、UMEMURA Yuria、KAWANISHI Kohei、MIURA Yuuka、TAKADA Nanako、OHNO Shuji、ONARU Kanoko、OMOTEHARA Takuya、HIRANO Tetsushi、MANTANI Yohei、Miki Takanori、HOSHI Nobuhiko	4．巻 82
2．論文標題 Establishment of an organ culture system to induce Sertoli cell differentiation from undifferentiated mouse gonads	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6．最初と最後の頁 414～421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0036	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11件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

1．発表者名 三浦由佳；山本杏；川西航平；長谷川千夏；高田菜々子；高田匡；万谷洋平；横山 俊史；星 信彦
2．発表標題 生殖腺の表現型に及ぼすマウス亜系統差の影響に関する遺伝学的研究
3．学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4．発表年 2018年

1．発表者名 長谷川千夏；梅村ゆりあ；三浦由佳；川西航平；高田菜々子；大野周嗣；万谷洋平；横山 俊史；星 信彦
2．発表標題 性決定前のマウス未分化 XY 性腺の精巣化を誘導する器官培養法の確立とその組織学的評価.
3．学会等名 第94回日本解剖学会近畿支部学術集会
4．発表年 2018年

1．発表者名 長谷川千夏；梅村ゆりあ；三浦由佳；川西航平；高田菜々子；大野周嗣；万谷洋平；横山 俊史；星 信彦
2．発表標題 性決定遺伝子発現前のマウス未分化XY性腺の精巣化を誘導する器官培養法
3．学会等名 関西実験動物研究会第140回研究会
4．発表年 2018年

１．発表者名
山本杏；表原拓也；三浦由佳；川西航平；長谷川千夏；万谷洋平；北川 浩；横山 俊史；星 信彦

２．発表標題
マウスのミュラー管退行におけるAMH作用様式

３．学会等名
第93回日本解剖学会近畿支部学術集会

４．発表年
2017年

１．発表者名
三浦由佳；山本 杏；川西航平；長谷川千夏；横山 俊史；星 信彦

２．発表標題
マウスの亜系統差が生殖腺に及ぼす影響の遺伝学的研究

３．学会等名
第136回関西実験動物研究会

４．発表年
2017年

１．発表者名
Kohei KAWANISHI, Chinatsu HASEGAWA, Taiga NAKAMURA, Shiori KATOH, Yohei MANTANI, Toshifumi YOKOYAMA, Nobuhiko HOSHI

２．発表標題
Left-right asymmetry of Sry expression in the developing gonad of C57BL/6N mouse.

３．学会等名
The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Toshifumi YOKOYAMA, Yuuka MIURA, Anzu YAMAMOTO, Chinatsu HASEGAWA, Kohei KAWANISHI, Nanako TAKADA, Takuya OMOTEHARA, Tetsushi HIRANO, Yohei MANTANI, Takanori MIKI, Nobuhiko HOSHI

２．発表標題
Testis differentiation process of YPOS mice with fragile Sry is affected by genetic differences in C57BL/6 substrains.

３．学会等名
The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
川西 航平，長谷川 千夏，中村 大河，加藤 栞，万谷 洋平，横山 俊史，星 信彦

２．発表標題
マウス健常雄個体の性腺におけるSry 発現の左右差に関する定量組織学的研究

３．学会等名
第95回日本解剖学会近畿支部学術集会

４．発表年
2019年

１．発表者名
川西 航平，長谷川 千夏，中村 大河，加藤 栞，万谷 洋平，横山 俊史，星 信彦

２．発表標題
性決定期のマウス性腺におけるSry発現の時空間的解析-健常雄個体におけるSry発現の左右差

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
長谷川 千夏，梅村 ゆりあ，川西 航平，中村 大河，加藤 栞，万谷 洋平，横山 俊史，星 信彦

２．発表標題
性決定前のマウス未分化XY性腺の精巣化を誘導する器官培養法の確立とその組織学的評価

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
三浦由佳，横山 俊史，山本杏，川西航平，長谷川千夏，高田菜々子，万谷洋平，星 信彦

２．発表標題
C57BL/6マウスの亜系統差による生殖腺表現型の変化

３．学会等名
第32回モロシヌス研究会

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	星　信彦 (HOSHI NOBUHIKO) (10209223)	神戸大学・先端融合研究環・教授 (14501)	
研究分担者	三木　崇範 (MIKI TAKANORI) (30274294)	香川大学・医学部・教授 (16201)	