

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16483

研究課題名（和文）精巣と精巣上体間の接続に関わる因子の探索 脊椎動物における精路形成戦略とは

研究課題名（英文）Morphogenesis in the connection between the testis and epididymis in vertebrates

研究代表者

表原 拓也 (Omotehara, Takuya)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：40800545

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物における精巣網細胞と中腎管の間での接続部位は、進化の過程で中腎表面における中腎細管の開口部（腎口）からボーマン嚢（中腎細管の先端）に移動したことが示唆された。加えて、哺乳類では形成されないとされていたlateral kidney canalが精巣網細胞の集団として発生すること、ならびに生後の精巣網はこのlateral kidney canalが精巣に取り込まれたものであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子を運ぶ経路（精路）の構造は脊椎動物種によって大きく異なり、各動物種の繁殖環境に適応した構造となっていることが考えられる。本研究課題では、両生類・鳥類・哺乳類において精細管から精巣上体に至る経路の形成過程を解析し、脊椎動物における精路形成機構の進化の一端を明らかにした。これらの成果は今後の分子学的解析の基盤となり、脊椎動物における精路形成機構に関する進化学研究がさらに発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：It is suggested that the site of connection between the rete cells and the mesonephric duct in vertebrates has shifted during evolution from the opening of the mesonephric tubules on the surface of the mesonephros (nephrostome) to Bowman's capsule (tip of mesonephric tubules). Additionally, this study revealed that the lateral kidney canal, which has been thought not to form in mammals, occurs as a population of rete cells. The lateral kidney canal is suggested to be incorporated into the testis and differentiate into the postnatal rete testis.

研究分野：発生生物学

キーワード：精巣輸出管 中腎細管 中腎 三次元再構築 比較形態学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類において、精子は精巢の曲精細管で形成された後、直精細管 精巢網 精巢輸出管 精巢上体管 精管と運ばれ(図1)、射精される際には尿道を通過して外界へと放出される。すなわち、この通路=精路が正しく形成されなければ、精子を外界へ導くことができない。一般に、これらの発生学的由来については「精巢網までは精巢、精巢上体管からは中腎管」とされる。しかしながら、精巢と中腎管は離れた位置に形成されるため、精路の完成にはその間を繋ぐ必要がある。しかしながら、生殖器系の論文でも「精巢網の細胞が移動して中腎細管に合流」「中腎細管が精巢に進入し精細管と接続」といった、意味が真逆の文言が Reference の提示もなく記載されている。すなわち、接続の向きすらも分かっておらず、その時期もはっきりとは分かっていない。

脊椎動物において、受精に必要な精子の能力は繁殖行為を行う環境によって大きく左右されるため、受精能の付与や精漿分泌を行う精路の形態・機能もその環境を反映したものになっていると考えられる。実際、精巢から出た管が中腎管と接続する高さは動物種で異なっている(図2)。すなわち、脊椎動物の進化の過程で、精巢 精巢上体間の接続機構の調節により接続場所を変えてきたことが想定されるが、その機構自体が明らかでないため、「環境に適応した精路がいかんして形成されるか？」について考察することは誰もできていない。

2. 研究の目的

以上のことから、本課題では「精路はいかんして接続するか?」「各動物種における精路形成機構の共通点とその意味とは?」といった問いに対してアプローチしていくことで、「繁殖」という種の保存に不可欠なシステムの形態形成機構の一端を明らかにすることを目的とした。具体的には、精巢 精巢上体間の接続に関して脊椎動物種間における精路形成機構の相同性の解析を行うことで、脊椎動物における精路形成機構の共通点=基本原理を明らかにすることを本課題の目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスにおける三次元解析

C57BL/6J マウスの各発生段階で性腺中腎複合体を採取し、連続パラフィン切片を作製した。それらにおいて、同一切片において異なるマーカーを繰り返し検出することのできる sequential immunohistochemistry 法により Ad4BP/Sf-1 (生殖腺体細胞マーカー)、Pax2 (中腎管・中腎細管マーカー)、基底膜マーカー (Collagen Type IV) を検出した。さらに、基底膜を検出した連続切片を用いて、Amira software により中腎細管・中腎管を三次元再構築した。

(2) 哺乳類・鳥類・両生類における比較形態学的解析

哺乳類・鳥類・両生類のモデル動物としてウサギ・ニワトリ・ネッタイツメガエルをそれぞれ

用い、発生段階における性腺中腎複合体を採取した。それらから連続パラフィン切片（ニワトリのみ 10 μm の間断連続切片）を作製し、sequential immunohistochemistry を行った。ウサギでは、Ad4BP/Sf-1（生殖腺体細胞および精巢網細胞 rete cell マーカー）、Sox9（セルトリ細胞および rete cell マーカー）、AMH（セルトリ細胞マーカー）、aSMA（平滑筋細胞マーカー）を検出した。ニワトリ・ネッタイツメガエルでは、Pax2（中腎管・中腎細管マーカー）、Collagen Type IV（基底膜マーカー）を検出した。その後、ウサギでは Ad4BP/Sf-1、ニワトリ・ネッタイツメガエルでは Pax2 を検出した連続切片を用いて Amira software により rete cell および中腎細管・中腎管を三次元再構築した。

4. 研究成果

(1) マウスにおける三次元解析

モデル動物であるマウスにおける rete cell-中腎細管の間で境界となるマーカー分子を探索するために、既に生殖腺体細胞やセルトリ細胞のマーカーとして知られていた分子と中腎細管マーカー分子の検出を行った。その結果、Ad4BP/Sf-1 が rete cell Pax2 が中腎細管で発現しており、その接続部位で発現の境界があることを見出した（図 1；

Omotehara et al., 2020）。実際、その部位では rete cell 周囲の基底膜が中腎細管周囲の基底膜と連続していた。また、接続の時期としては、精巢への分化が始まる胎齢 11.5 日（E11.5）以降を想定していたが、Ad4BP/Sf-1 陽性細胞と Pax2 陽性細胞の隣接は、生殖腺の発生が始まる E9.5 の時点で雌雄ともに観察された。このことから、rete cell と中腎細管の間の接続は雌雄に関係なく、生殖腺発生の初期から準備されていることが示唆された（図 2；Omotehara et al., 2020）。

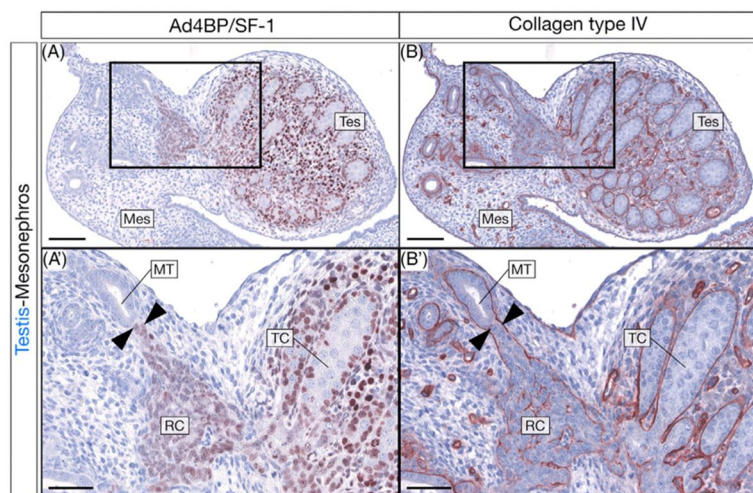


図1：マウスE15.5の精巢におけるrete cellと中腎細管の連結
Mes: 中腎, MT: 中腎細管, RC: rete cell, TC: 精巢索, Tes: 精巢

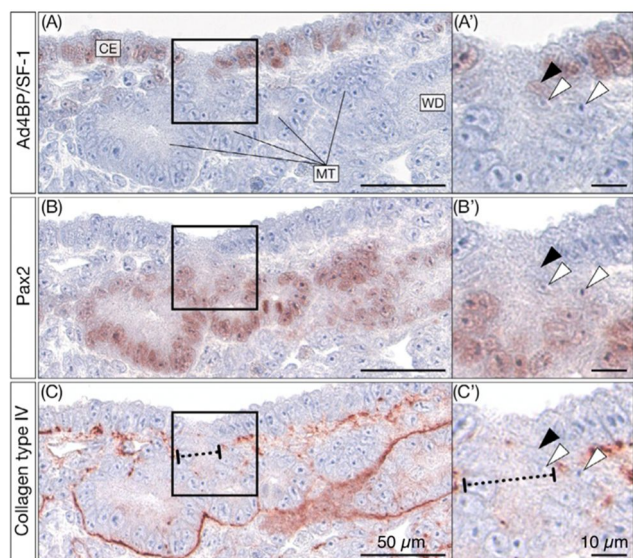


図2：マウスE9.5における各分子の局在
CE: 体腔上皮, MT: 中腎細管, WD: 中腎管

さらに、蛇行している中腎細管のどの部位に接続するのかを調べるために、rete cell および中腎細管の三次元再構築を行った。中腎内には中腎管に連結した頭側領域の中腎細管と、連結していない尾側領域の中腎細管とが観察されたが、rete cell との隣接は、頭側領域で中腎管に連結している 3~6 本の中腎細管の先端においてみられた。生後の精巣輸出管には細管が 2~5 本存在するとの報告があることから、胎仔期においてみられた rete cell と中腎細管先端との間の隣接が、生後の精巣網-精巣輸出管との間の接続として利用されることが示唆された(図 3; Omotehara et al., 2021)。加えて、E15.5 以降、中腎細管を分枝する頭側領域の中腎管が折れ曲がり、E18.5 では中腎細管と区別できない細さになっていた。このことから、マウスにおいて精巣輸出管の複数ある細管は中腎細管由来であるが、それらがまとまって1本の共通幹になり精巣上体管へと繋がる部分は中腎管頭側領域が折れ曲がったものであることが示唆された(図 4; Omotehara et al., 2021)。

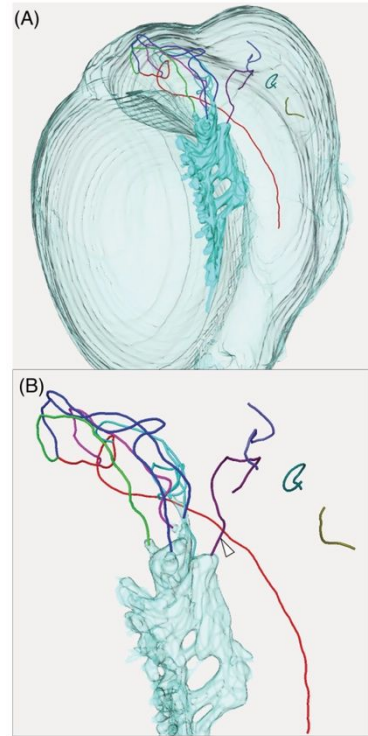


図3：マウスE15.5の精巣網領域および中腎管・中腎細管の三次元再構築

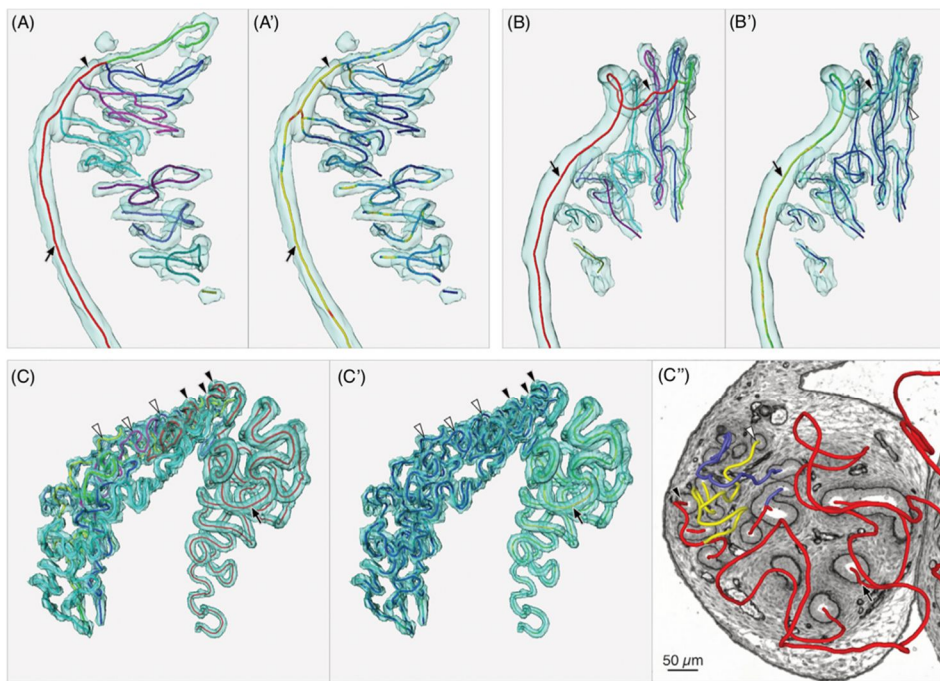


図4：マウス中腎管・中腎細管の三次元構造の変化
A-C：それぞれE13.5, E15.5, E18.5における中腎管（赤）と中腎細管（その他の色）
A'-C'：管の直径により色分けしたもので、濃い青ほど細く、濃い赤ほど太い
C''：E18.5で再構築した管を重ねた中腎の組織像

(2) 哺乳類・鳥類・両生類における比較形態学的解析

哺乳類や鳥類の腎臓は中腎ではなく後腎由来であり、実際マウスのような小型哺乳類では中腎に明瞭な腎小体は形成されない。ところが他の動物種に目を向けると、ヒトを含めた大型哺乳類や鳥類では中腎内に腎小体が形成される。また、両生類の中腎には腎小体が存在し、そのまま生後の腎臓として使われることに加え、腎口と呼ばれる中腎表面への中腎細管の開口も存在する。このように、脊椎動物間で中腎細管の先端領域に発生する構造が異なることから、これらの動物種における rete cell と中腎細管の接続過程を調べる必要がある。そこで、中腎に腎小体の形

成される哺乳類・鳥類・両生類のモデル動物としてそれぞれ、ウサギ・ニワトリ・ネッタイツメガエルを用いて、rete cell および中腎細管の三次元解析を行った。

ウサギでは、マウスと同様に Ad4BP/Sf-1 陽性の rete cell が中腎頭側領域に存在し、腎小体のない中腎細管の先端と隣接していた。加えて、より尾側の領域において腎小体を有する中腎細管に関しても、rete cell がボーマン嚢に隣接していた。一方、ニワトリでは rete cell は Pax2 陽性であり、精巣内の精巣索と接続していた。Pax2 陽性の rete cell は中腎内で頭尾方向および背腹方向に索状構造となり、中腎内のボーマン嚢に隣接していた。ネッタイツメガエルでは、ニワトリと同様に Pax2 陽性の rete cell が精巣内の精巣索と接していた。その rete cell は精巣と中腎の間の腹膜内で頭尾方向に伸びる索状構造となり、その索状構造からの分枝が中腎表面の腎口へとつながっていた (図 5; Omotehara et al., 2022)。これらのことから、rete cell の接続先は脊椎動物の中で腎口から中腎細管の先端 (ボーマン嚢) へと移動

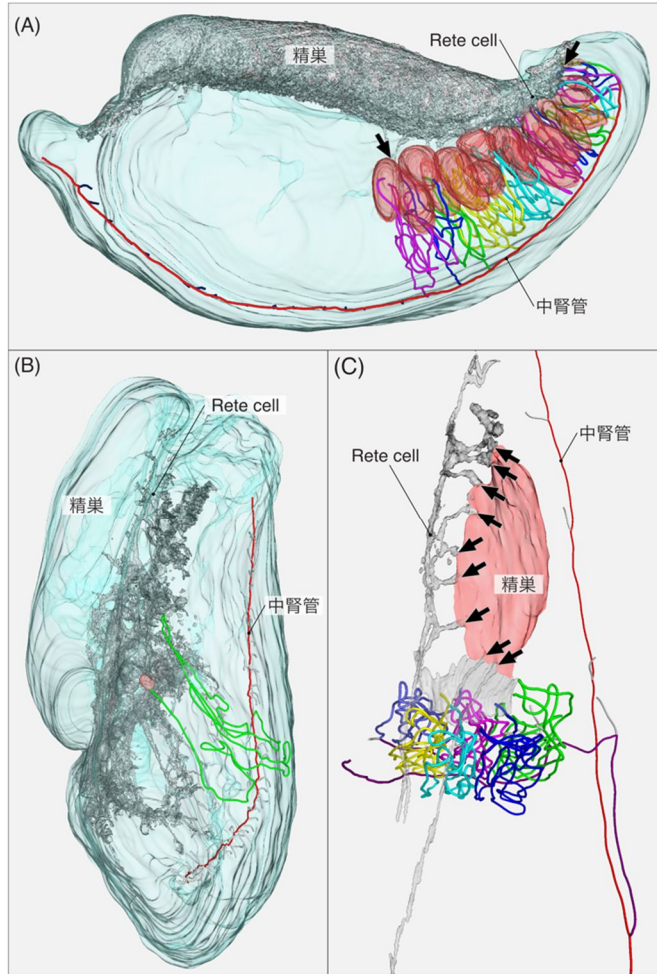


図5：脊椎動物の発生過程におけるrete cellおよび中腎管・中腎細管の三次元構造
A: ウサギ, B: ニワトリ, C: ネッタイツメガエル

したことが示唆された。加えて、これらの動物の精巣網領域における共通の発生過程として、精巣内の精巣索が中腎側で束ねられ、そこに連結する rete cell が複数の索状構造となって中腎に向かい、中腎または腹膜内で rete cell がクラスター (Lateral kidney canal) を形成し、そのクラスターからそれぞれの接続先へと分枝が出ることを見出した (図 6; Omotehara et al., 2022)。これらの結果から、動物種によって rete cell の発現する分子は異なるものの、形態形成原理は共通していることが示唆された。一方で、マウスにおいて束ねられた精巣索は発生が進むにつれて分離していくことから、生後のマウス精巣網は中腎内に形成される rete cell のクラスター (Lateral kidney canal) が精巣内に取り込まれたものであることが考えられる。両生類では精巣索を束ねる構造が残り精巣網と呼ばれることから、両生類と哺乳類で「精巣網」の由来が異なる可能性が考えられる。

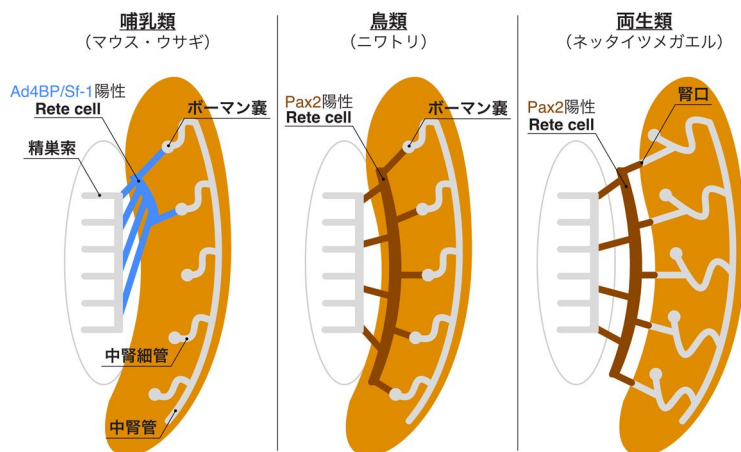


図6：哺乳類・鳥類・両生類における精巣索から中腎管までの接続様式の模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計22件（うち査読付論文 22件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakata Hiroki, Omotehara Takuya, Itoh Masahiro, Iseki Shoichi, Mizokami Atsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Three dimensional structure of testis cords in mice and rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 1911 ~ 1922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13069	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 Omotehara Takuya, Nakata Hiroki, Itoh Masahiro	4. 巻 251
2. 論文標題 Three dimensional analysis of mesonephric tubules remodeling into efferent tubules in the male mouse embryo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 513 ~ 524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.410	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 Omotehara Takuya, Nakata Hiroki, Nagahori Kenta, Itoh Masahiro	4. 巻 157
2. 論文標題 Comparative anatomy on the development of sperm transporting pathway between the testis and mesonephros	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-02057-x	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 Takuya Omotehara, Xi Wu, Miyuki Kuramasu, Masahiro Itoh	4. 巻 In press
2. 論文標題 Connection between seminiferous tubules and epididymal duct is originally induced before sex differentiation in a sex independent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.155	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 -

〔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 表原拓也、仲田浩規、伊藤正裕
2. 発表標題 精細管-中腎管間の連結に関する比較解剖学的解析
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 表原拓也、金澤優太、仲田浩規、平島剛志、伊藤正裕
2. 発表標題 マウス精細管内を流れる精子に関する三次元解析
3. 学会等名 第36回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 表原拓也、仲田浩規、永堀健太、伊藤正裕
2. 発表標題 精巢 - 精巢上体間の精路発生に関する比較解剖学的研究
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 表原拓也、仲田浩規、吳 曦、倉升三幸、伊藤正裕
2. 発表標題 マウス中腎細管の三次元再構築の検討
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 表原拓也, 仲田浩規, 伊藤正裕
2. 発表標題 マウス精巢輸出管形成における中腎管・中腎細管の再構築
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuya Omotehara, Xi Wu, Miyuki Kuramasu, Kenta Nagahori, Yuki Ogawa, Shinichi Kawata, Zhong-Lian Li, Hidenobu Miyaso, Masahiro Itoh
2. 発表標題 Connection between seminiferous tubules and epididymal duct is induced before the sex differentiation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 表原拓也, 倉升三幸, 吳曦, 永堀健太, 小川夕輝, 河田晋一, 李忠連, 宮宗秀伸, 伊藤正裕
2. 発表標題 Sequential immunohistochemistry法による精細管と精巢上体管の接続過程の検討
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 Takuya Omotehara, Miyuki Kuramasu, Kenta Nagahori, Xi Wu, Shinichi Kawata, Zhong-Lian Li, Hidenobu Miyaso, Masahiro Itoh
2. 発表標題 Immunohistological study for the connection between the testis and epididymis
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------