

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460410

研究課題名(和文)生殖腺の性特異的分化に関わる細胞特異的エピジェネティック修飾の時空間的变化

研究課題名(英文) Relationships between the regulation mechanisms of sex differentiation and the epigenetic status in the developing gonad

研究代表者

横山 俊史 (YOKOYAMA, TOSHOFUMI)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：性分化疾患の発症原因となる性分化機構の検討を行った。性分化疾患系統のマウス(YPOS)の未分化生殖腺は、同一遺伝子型から多様な表現型を産出するが、その原因が性決定遺伝子Sryおよび下流因子のわずかな発現遅延である事を明らかとした。また、哺乳類の性分化過程で機能するDmrt1の調節に対するNon-coding領域の関与および同領域によるシス調節を明らかとし、さらに、同領域が精巣・卵巣ともに非メチル化状態であることも明らかとした。加えて、ニワトリでは、dmrt1の発現に一過性の左右差が認められ、セルトリ細胞の分化過程にも左右差が存在することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We examined the relationship between regulation mechanisms of gonadal sex differentiation and disorders of sex development (DSD). In the DSD line mice (YPOS), inappropriate spatiotemporal expression of sex determine gene Sry and sex differentiation related genes in the developing gonad cause different phenotype from the same genetic background. We found new regulatory mechanism about sex differentiation related gene dmrt1 using non-coding region of dmrt1 gene. The epigenetic status of this region was non-methylated both in the testis and ovary in adult mice. Furthermore, it became clear that, there were asymmetries in the expression patterns of dmrt1 and differentiation process of Sertoli cells in the developing chick gonad.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：性分化 性分化疾患 エピジェネティクス SRY DMRT1

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の性決定機構や性分化の過程に不明な点が多く、その背景となる制御機構の複雑さが再認識されている。すなわち、性決定因子 Sry の発現のみで制御されるわけ無く、体軸決定因子を含む多数の因子の時空間的な発現制御の関与が解明され始めている。申請者の所属研究グループでも、XY 女性において SR Y のヒストンアセチル化異常を伴う性逆転症例を報告し、また、同一遺伝子型から真性半陰陽個体を含む複数の表現型を産出する動物実験系を確立しており、エピジェネティックな制御の関与も示唆している。

一方、性決定・性分化の関連因子群時は脊椎動物間で保存された機構が多数存在しており、例えば DM ドメインを含む遺伝子は広く性決定因子として機能しているが、SR Y を獲得した哺乳類においても性分化およびその維持に関与し続けている。加えて、未分化生殖腺内の細胞は相互に作用しながら、分化過程を進めていくことが示されている。

そこで本研究では、生殖腺の個体発生に関わる各種因子の発現様式と細胞特異的エピジェネティック機構について時間・空間的に解析し、生殖腺の発生・分化の多様性に関わる因子とそのゲノムの修飾を明らかとすることを目的としている。

2. 研究の目的

A. 性分化疾患の発症に関与する、遺伝子座におけるエピゲノム状態を検討する。

(1) 同一遺伝的背景から多様な表現型を産出する原因の背景にはエピジェネティックな制御を想定しているが、その解明の為に標的とすべき時期・領域を限定する必要がある。そのため、多様な表現型について発生ステージや遺伝子発現を詳細に検討し、性分化疾患の発現原因を特定する。

(2) Dmrt1 遺伝子座近傍のエピゲノム修飾状態を解析することで新規の転写制御領域について探索し、さらに塩基配列の詳細な解析を行い Dmrt1 の転写制御を担う上流転写因子について推定する。

B. 性分化疾患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。

(3) 哺乳類で生殖腺の分化および維持に関与する d m r t 1 は、鳥類であるニワトリにおいて性決定(雄性化)に関与している。その過程を詳細に検討することにより、DM ドメインが性決定・性分化に関与する機構と遺伝子発現制御機構の保存性を検討する。

(4) 始原生殖細胞(PGC)の運命決定は生殖内の支持細胞に影響されるが、その過程には FGF9 が関与している。FGF9 は性決定後の支持細胞系譜より分泌され、その後の未分化生殖腺の分化過程と関連しているため、生殖細胞の性決定機構について詳細に検討し、その

制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 性分化疾患系統である B6XY^{POS} マウスを用い、性分化前から性成熟後までの各段階の生殖腺の性分化関連因子の発現等を免疫組織学的、遺伝子発現量の定量、遺伝子配列に検討した。

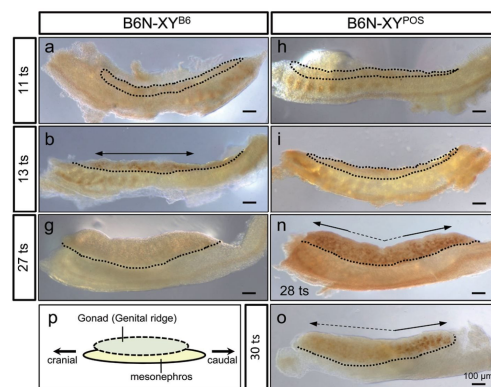
(2) 性分化期および成獣の B6 マウスの DNA を用い、Dmrt1 遺伝子座近傍のエピゲノム修飾状態を解析するとともに、塩基配列の詳細な解析から転写制御に関与する上流転写因子の推定を行った。

(3) 発生中のニワトリ受精卵を経時的に採材し、d m r t 1 発現細胞の分布の詳細を免疫組織化学的に精査するとともに、器官培養法による検証を行った。

(4) FACS により分離した PGC を Fgf9 添加条件下で、細胞内シグナル伝達系の阻害剤も添加して培養し、分化・増殖マーカーの発現量を定量的 PCR で検出した。

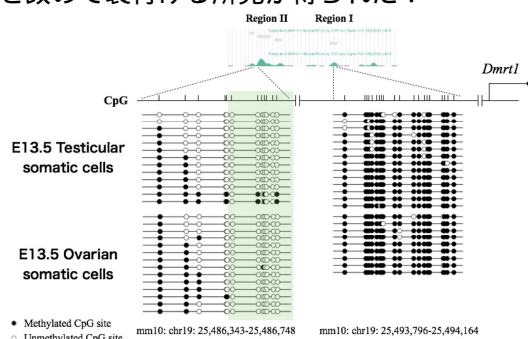
4. 研究成果

(1) B6XY^{POS} 動物の未分化生殖腺は、同一遺伝子型から多様な表現型を産出するが、その原因が性決定遺伝子 Sry のわずか 4-6 時間程度の発現遅延である事を明らかとした。その影響は Sox9 発現の誘導不全と Sry の退行遅延を惹起し、未分化生殖腺からの分化過程を攪乱していた。さらに、同一遺伝子型から妊孕能を有する機能的な精巣、および成熟卵胞を含む卵巣が産出されており、生殖腺分化の可塑性が示されると共に、エピゲノム的な制御が行われていることが強く示唆された。

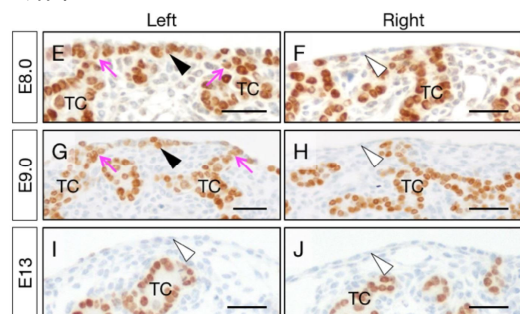


(2) 哺乳類の性分化過程で機能する Dmrt1 の調節に対する Non-coding 領域の関与、および同領域によるシス調節を明らかとした。有胎盤類から獲得した領域では、精巣分化に必須の Sry 等の結合モチーフが認められ、真獣類における雄性化への関与が推測された。さらに生殖細胞の転写調節に関与するレンチニン酸レセプター等の結合モチーフも存在する点、加えて、エピジェネティック修飾

状況は精巣・卵巣ともに非メチル化状態である点から、哺乳類の性分化調節機構の複雑さを改めて裏付ける所見が得られた。



(3) ニワトリの雄性生殖腺分化の過程では、性決定の有力因子である *dmrt1* の発現に一過性の左右差が生じること、また、同過程で形成される皮質部のセルトリ細胞様の細胞が、髄質部に移行して機能的なセルトリ細胞に分化することを明らかとした。この一過性の左右差は雌性生殖腺形成の影響による事を推測しているが、*dmrt1* の進化的な保存性から、哺乳類においても性分化疾患の潜在的な要因である可能性を想定させる重要な結果である。



(4) PGC の雄性化制御を行う FGF9 による制御機構が、濃度依存的に細胞増殖と分化の運命を調整していることを明らかとした。すなわち、高濃度下では ERK1/2 を介する細胞増殖、低濃度下では p38 を介した分化制御が認められたが、同機構は生殖腺内のセルトリ細胞の分化およびその後の FGF9 の分泌と密接に関連していた。同所見は未分化生殖腺の分化調節機構が、細胞種毎に独立して制御されているのではなく、密接に関連している事を示す重要な結果である。

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 3 件)

1. 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. Ontogenetic and morphological study of gonadal formation in

genetically-modified sex reversal XYPOS mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 77 1587-1598, 2015.

2. OMOTEHARA T., MINAMI K., MANTANI Y., UMEMURA Y., NISHIDA M., HIRANO T., YOSHIOKA H., KITAGAWA H., YOKOYAMA T., HOSHI N. Contribution of the coelomic epithelial cells specific to the left testis in the chicken embryo. *Dev. Dyn.*, 246 148-156, 2017.
3. ULU F., KIM S.M., YOKOYAMA T., YAMAZAKI Y. Dose-Dependent Functions of FGF9 Regulate the Fate of Murine XY Primordial Germ Cells. *Biol. Reprod.*, accepted, 2017.

[学会発表](計 20 件)

1. 発生中のマウス胎子生殖腺における内部標準遺伝子の検討；横山俊史，橋本理恵，梅村ゆりあ，表原拓也，長原大知，平野哲史，久保田直人，南貴一，湯浅秀人，柳井翔吾，万谷洋平，北川浩，星信彦；第 157 回日本獣医学会学術集会，平成 26 年 9 月 9 日～9 月 12 日，北海道大学
2. マウス胎子生殖腺における性分化関連遺伝子発現の左右差に関する分子形態学的研究；橋本理恵，梅村ゆりあ，表原拓也，平野哲史，長原大知，湯浅秀人，久保田直人，南貴一，柳井翔吾，万谷洋平，横山俊史，北川浩，星信彦；第 157 回日本獣医学会学術集会，平成 26 年 9 月 9 日～9 月 12 日，北海道大学
3. ニワトリ胚における性腺の形成機構とその左右差；表原拓也，橋本理恵，梅村ゆりあ，平野哲史，南貴一，長原大知，湯浅秀人，久保田直人，柳井翔吾，万谷洋平，横山俊史，北川浩，星信彦；第 157 回日本獣医学会学術集会，平成 26 年 9 月 9 日～9 月 12 日，北海道大学
4. ニワトリ胚における性腺の形成メカニズムと左右差；表原拓也，橋本理恵，梅村ゆりあ，平野哲史，南貴一，長原大知，湯浅秀人，万谷洋平，横山俊史，北川浩，星信彦；日本家禽学会 2014 年度秋季大会・総会，平成 26 年 9 月 28 日，鹿児島大学
5. Selection of stable reference genes for quantitative RT-PCR analyses in developing mouse gonads. 横山俊史，橋本理恵，梅村ゆりあ，表原拓也，平野哲史，長原大知，柳井翔吾，南貴一，久保田直人，万谷洋平，北川浩，星信彦；第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会，平成 27 年 3 月 21 日～23 日，神戸国際会議場・展示場
6. Sex-related genes' asymmetric expression in early mouse gonads. 梅村ゆりあ，橋本理恵，表原拓也，平野哲史，長原大知，湯浅秀人，久保田直人，南貴一，柳井翔吾，万谷洋平，横山俊史，北川浩，星信彦；第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会，平成 27 年 3 月 21 日～23 日，神

戸国際会議場・展示場

7. Left-right asymmetry of testicular formation in the chicken embryo; 表原拓也, 橋本理恵, 梅村ゆりあ, 平野哲史, 南貴一, 長原大知, 湯浅秀人, 久保田直人, 柳井翔吾, 万谷洋平, 横山俊史, 北川浩, 星信彦; 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 27 年 3 月 21 日~23 日, 神戸国際会議場・展示場
8. C57BL/6 マウスの不可思議さ: その遺伝的背景に潜む Sry-HMG box & Q-rich 領域と性決定; 梅村ゆりあ, 橋本理恵, 表原拓也, 長原大知, 平野哲史, 久保田直人, 南貴一, 柳井翔吾, 万谷洋平, 横山俊史, 北川浩, 星信彦; 第 62 回日本実験動物学会, 平成 27 年 5 月 28 日~5 月 30 日, 京都テルサ
9. ニワトリ胚における左精巣特異的な発生メカニズム; 表原拓也, 万谷洋平, 南貴一, 梅村ゆりあ, 平野哲史, 横山俊史, 北川浩, 星信彦; 日本家禽学会 2015 年度秋季大会, 平成 27 年 9 月 9 日~10 日, 酪農学園大学
10. ニワトリ性腺の左右差形成メカニズムに関する網羅的遺伝子発現解析; 南貴一, 表原拓也, 田淵圭章, 梅村ゆりあ, 平野哲史, 北川浩, 横山俊史, 星信彦; 日本家禽学会 2015 年度秋季大会, 平成 27 年 9 月 9 日~10 日, 酪農学園大学
11. 性逆転系統 (B6-XYPOS) マウスにおける性腺分化と遺伝的背景; 梅村ゆりあ, 表原拓也, 平野哲史, 久保田直人, 柳井翔吾, 増田なつみ, 湯浅秀人, 万谷洋平, 北川浩, 横山俊史, 星信彦; 第 91 回日本解剖学会・近畿支部学術集会, 平成 27 年 11 月 28 日, 京都工芸繊維大学
12. ニワトリ胚の左性腺に特異的な細胞運命の追跡; 表原拓也, 南貴一, 万谷洋平, 梅村ゆりあ, 西田美穂, 平野哲史, 吉岡秀文, 横山俊史, 北川浩, 星信彦; 第 91 回日本解剖学会・近畿支部学術集会, 平成 27 年 11 月 28 日, 京都工芸繊維大学
13. ニワトリの性腺形態における左右差形成メカニズムの解明; 南貴一, 表原拓也, 田淵圭章, 梅村ゆりあ, 平野哲史, 横山俊史, 北川浩, 星信彦; 第 91 回日本解剖学会・近畿支部学術集会, 平成 27 年 11 月 28 日, 京都工芸繊維大学
14. ニワトリ胚の左精巣に特異的なセルトリ細胞の起源; 表原拓也, 万谷洋平, 南貴一, 梅村ゆりあ, 平野哲史, 横山俊史, 北川浩, 星信彦; 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 平成 27 年 12 月 1 日~4 日, 神戸国際会議場・展示場
15. ニワトリ胚の性腺発生における左右差; 表原拓也, 南貴一, 万谷洋平, 梅村ゆりあ, 西田美穂, 平野哲史, 吉岡秀文, 北川浩, 横山俊史, 星信彦; 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 28 年 3 月 27 日~30 日, ビッグパレットふくしま
16. マウス真性半陰陽個体における AMH の作

用様式に関する組織学的解析; 山本杏, 表原拓也, 久保田直人, 南貴一, 広川千英, 平野哲史, 磯江美智子, 柳井翔吾, 高田匡, 米田直起, 三浦由佳, 岩本遥, 万谷洋平, 北川浩, 横山俊史, 星信彦; 第 159 回日本獣医学会学術集会, 平成 28 年 9 月 6 日~8 日, 日本大学

17. マウス真性半陰陽個体のミュラー管退化と AMH の作用様式; 山本杏, 表原拓也, 久保田直人, 南貴一, 平野哲史, 万谷洋平, 北川浩, 横山俊史, 星信彦; 第 92 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 平成 28 年 11 月 27 日, 近畿大学
18. ニワトリ雌右性腺退縮メカニズムの解明; 南貴一, 表原拓也, 田淵圭章, 平野哲史, 横山俊史, 万谷洋平, 北川浩, 星信彦; 第 92 回日本解剖学会近畿支部学術集会, 平成 28 年 11 月 27 日, 近畿大学
19. マウス胎子性腺における性分化関連遺伝子転写調節領域の DNA メチル化状態; 久保田直人, 表原拓也, 山本杏, 三浦由佳, 平野哲史, 南貴一, 柳井翔吾, 高田匡, 米田直起, 岩本遥, 万谷洋平, 横山俊史, 北川浩, 星信彦; 第 39 回日本分子生物学会年会, 平成 28 年 11 月 30 日~12 月 2 日, パシフィコ横浜
20. ニワトリの発生過程に特徴的な生殖腺の左右差; 表原拓也, 南貴一, 万谷洋平, 朝克吉楽, 梅村ゆりあ, 西田美穂, 平野哲史, 青山裕彦, 吉岡秀文, 北川浩, 横山俊史, 星信彦; 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 29 年 3 月 28 日~30 日, 長崎大学

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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
<http://morfunc.main.jp/>

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

星 信彦 (Hoshi Nobuhiko)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：10209223

三木 崇範 (Miki Takanori)

香川大学・医学部・教授
研究者番号：30274294

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()