

| | |
|------------|---|
| 氏名 | 宮戸 真美 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (理学) |
| 学位記号番号 | 博理工乙第 208 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 25 年 9 月 20 日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 |
| 学位論文題目 | 雄性生殖器の形成・発育の分子基盤と疾患発症におけるその破綻 |
| 論文審査委員 | 委員長 教授 坂井 貴文 委員 教授 西垣 功一 委員 教授 弥益 恭 委員 准教授 足立 明人 委員 准教授 塚原 伸治 |

論文の内容の要旨

外生殖器は生物にとって、効率的な交配による体内受精を成し遂げるために必須な器官である。生物が様々な環境に適応して種を維持する過程で、外生殖器の形態を多様化させてきたものと推測される。しかし、これまで外生殖器の発生過程における研究についての報告例は少ない。この約 15 年の間に、遺伝子改変マウスを用いた解析から、外生殖器の発生過程が分子レベルで解明されつつあるが、他の動物種との比較解析が行われておらず、マウスに限定された分子メカニズムである可能性を否定できていない。そのため、多様な形態をもつ雄性外生殖器の形態形成について、生物種を越えて共通して働く分子メカニズムを解明するためには、げっ歯目を用いた解析だけでは不十分である。したがって、げっ歯目以外の動物の外生殖器を解析することにより、初めて哺乳類の雄性外生殖器の形態形成におけるメカニズムの共通性を明らかにし、種特異的な部分を特定することが可能になると考えられる。

本研究では、哺乳類に共通した雄性生殖器の形成・発育の分子基盤と疾患発症におけるその破綻について解明することを目的とし、雄性外生殖器形成に関わる段階を男性ホルモン非依存的ステージと依存的ステージに分けて遺伝子発現解析および形態学的解析を試みた。前半では、マウスにおいてすでに関与が報告されている遺伝子群を手がかりにして、スunks外生殖器原基における遺伝子局在を検討し、後半では、ヒト先天性疾患から変異が同定された遺伝子の男性ホルモン産生における役割について、遺伝子改変マウスを用いて解析を行った。

マウス外生殖器原基の伸長過程で機能していることが報告されている *Fgf8* 遺伝子と、尿道形成過程で機能していることが報告されている *Shh* 遺伝子について、スunks外生殖器原基における発現領域を調べ、外生殖器原基の発生過程における細胞増殖因子群の役割について解析した。その結果、スunks外生殖器原基におけるこれら遺伝子の発現様式とマウスで報告されている遺伝子の発現様式は極めて類似していることが明らかになった。このことから、マウスとスunksで共通した複数の遺伝子は、生物種を超えて外生殖器原基の形態形成を制御していることが推測される。続いて、成獣スunksの雄性外生殖器について形態学的に詳細な解析を行った。その結果、スunks雄性外生殖器の背側には骨格筋が存在すること、これまでスunksのように骨格筋が陰茎内を通過している生物種の報告はないこと、陰茎は角化した数多くのとげで覆われて

いることを見出した。外生殖器におけるこれら形態学的特徴から、その形成には男性ホルモンの関与が示唆される。

つぎに、男性ホルモンの雄性外生殖器における役割に着目して研究を行った。従来の研究から、胎生期において男性ホルモンは外生殖器原基の形態の雌雄差および尿道形成に関与することが推測されており、男性ホルモン産生量および分泌量の減少は外生殖器の女性化や尿道形成異常（尿道下裂）を引き起こすと考えられている。*Mastermind-like domain containing 1 (MAMLD1)* は、ヒトにおいて尿道下裂責任遺伝子として発見された遺伝子である。*MAMLD1* 変異が尿道下裂を招く機序は不明であり、*MAMLD1* の生体内機能はわかっていない。我々は、胎生中期から後期のマウス胎仔精巣で *Mamld1* 遺伝子の mRNA 発現量が経時的に増加することを見出し、この発現量の上昇が男性ホルモン合成増加と一致することを明らかにした。そこで、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスを作製し、胎生期精巣のステロイドホルモン産生における *Mamld1* の役割の解明を試みた。その結果、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子 (*Cyp17a1*、*Hsd3b1* など) の mRNA 発現量が有意に低下していることを明らかにした。しかし、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣の形態および胎仔精巣内のテストステロン量は野生型マウスと比べて違いがなく、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスは尿道下裂を示さなかった。ただし、これまでに培養細胞を用いたノックダウン実験の解析から、*Mamld1* 遺伝子の発現量低下は男性ホルモン産生細胞においてテストステロン産生量の減少とホルモン産生関連酵素である *Cyp17a1* 遺伝子の発現量低下を招くことを明らかにしている。以上の結果を総合すると、*MAMLD1/Mamld1* は、マウスやヒトに共通して、胎生期精巣におけるライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の発現調節を介して、ステロイドホルモン産生に関与することが推測される。

本研究により、男性ホルモン非依存的な時期では、*Fgf8* や *Shh* などのサイトカインがマウスおよびシマリスの外生殖器原基の発生過程に共通して機能していることが示唆される。さらに、男性ホルモン依存的な時期では、*Mamld1* が胎生期精巣において男性ホルモン産生酵素遺伝子群の発現を制御することを見出し、男性ホルモン産生に関与する新たな分子機構が明らかになった。

論文の審査結果の要旨

宮戸真美氏（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成 25 年 7 月 30 日に理学部 9 番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って内容を審査した。以下に、審査結果の概要を示す。

外生殖器は、多くの生物種において、生殖のために極めて重要な器官である。哺乳類は、脊椎動物の中でも形態的に複雑な構造をした外生殖器を有しており、種を維持する過程で効率的に子宮内へ精子を運搬する道具として外生殖器の形態を多様化させてきたと考えられている。外生殖器の研究は、外生殖器と四肢発生における共通点を出発点としており、哺乳類の外生殖器の発生過程は、男性ホルモン依存的ステージと男性ホルモン非依存的ステージに分類される。しかしながら、これまで外生殖器の発生過程に関する研究についての報告例は少ない。このような背景を踏まえ、本研究は雌性外生殖器形成に関わる段階を男性ホルモン非依存的ステージと依存的ステージに分けて、遺伝子発現解析および形態学的解析により検討を行っている。本論文によって述べられている主要な研究成果は以下の通りである。

第一章では、男性ホルモン非依存的ステージでの外生殖器形成メカニズムを解明するために、スunks外生殖器原基の発生過程に関与する遺伝子の局在を検討し、さらに成獣スunksの雄性外生殖器について形態学的および組織学的な解析結果を記述している。これまでに、マウス外生殖器原基において、*Fgf8* 遺伝子とその伸長過程で、*Shh* 遺伝子が尿道形成過程で機能していることが報告されているのを踏まえ、スunks外生殖器原基におけるこれらの遺伝子の発現様式について解析している。その結果、*Fgf8* 遺伝子の発現は、隆起前の外生殖器原基の腹側正中線上に認められ、その後の原基の伸長にともない、遠位尿道板上皮に出現することが明らかになった。一方、*Shh* 遺伝子は、外生殖器原基の隆起前の腹側正中線上に発現が認められ、その後の原基の伸長にともない、尿道板上皮の遠位 - 近位にかけて発現することが見出された。これらの結果から、スunks外生殖器原基におけるこれら遺伝子の発現様式は、マウス外生殖器原基の伸長過程および尿道形成過程における *Fgf8* 遺伝子と *Shh* 遺伝子の発現様式と類似していることが示された。続いて、スunks雄性外生殖器の解剖学的解析を行い、スunks雄性外生殖器の背側に骨格筋が存在することを見出した。外生殖器の背側に骨格筋が存在することは他の動物種では報告されておらず、今回の研究が初めての報告である。申請者は、スunks外生殖器背側の骨格筋が坐骨結節の内側に起始を持ち、陰茎龜頭の後方の陰茎海綿体に停止することから、この骨格筋を「背側坐骨海綿体筋」と命名している。背側坐骨海綿体筋は、雄ではスunksの系統に依存せずに発達しているが、雌では系統によりほとんど観察されないか、あるいは発生が非常に乏しいことを明らかにした。この結果は、スunks外生殖器の背側坐骨海綿体筋が男性ホルモン依存的に形成されることを示唆する。

第二章では、男性ホルモン依存的ステージでの外生殖器形成メカニズムを解明するために、*Mamld1* (*Mastermind-like domain containing 1*) 遺伝子欠損マウスを用いて男性ホルモン産生経路におけるその役割について検討している。*MAMLD1* は、2006 年にヒトの尿道下裂責任遺伝子として報告され、*MAMLD1* 変異はテストステロン産生障害に起因する 46,XY 性分化疾患を引き起こすと考えられている。しかし、*MAMLD1* 変異が尿道下裂を招く機序は不明のままであり、症例からは *MAMLD1* の機能を突き止めることができない。そこで、申請者は、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスを作製し、胎生期と出生当日の精巣および外生殖器を用いて解析を行った。その結果、胎生期および出生当日の *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣および外生殖器の形態

は、野生型マウスと区別できず、正常であることが見出された。また、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスは正常な妊よう性を有していた。さらに、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッチ細胞特異的に発現する遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*, *Ins13*) の mRNA 発現量が有意に低下していることを明らかにした。

以上、本論文により示された新たな知見は、(1) スンクス外生殖器原基における細胞増殖因子 (*Fgf8*, *Shh*) の発現様式は、マウス外生殖器原基におけるこれら遺伝子の発現様式と類似していること、(2) 成獣スンクス雄性外生殖器の背側には骨格筋が存在すること、(3) *Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスは尿道下裂を示さず、正常な妊よう性を有していること、さらに、(4) *Mamld1* は胎仔精巣のライディッチ細胞特異的に男性ホルモン産生酵素遺伝子群の発現を制御する因子であることを明らかにした。これらの結果は、哺乳類雄性外生殖器の形態に関する共通性および多様性を明らかにし、*Mamld1* の男性ホルモン産生経路への関与を示す新しい知見として高い意義を有すると言える。また、宮戸氏は本論文の内容を第一著者として査読付英語論文 2 編に発表している。なお、本論文の内容の一部は、第 43 回日本小児内分泌学会学術集会にて発表し、優秀演題賞を受賞したことを付記しておく。以上の成果から、本審査委員会は、本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値するものと判断した。