



発生中のマウスにおける精巢から中腎領域へのAmhの移行経路に関する研究

加藤, 栞

(Degree)

博士（農学）

(Date of Degree)

2024-03-25

(Date of Publication)

2025-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8951号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490176>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

発生中のマウスにおける精巣から中腎領域への
Amh の移行経路に関する研究

令和 6 年 1 月

神戸大学大学院農学研究科

加 藤 栞

目 次

総 緒	1
第I章 ミュラー管退行開始時期の雄マウスにおける 精巣から中腎領域への Amh の移行経路の解析	7
I-1. 小 緒	8
I-2. 材料および方法	9
1. 供試動物および飼育方法	9
2. 採 材 方 法	9
3. 器 官 培 養	9
4. Recombinant human-AMH の注入	11
5. 組織標本作製	11
6. 免疫組織化学的解析	12
7. アニリンブルー染色	12
8. Hematoxylin-Eosin 染色	13
9. ミュラー管の管径の計測	13
10. ウェスタンブロッティング	13
I-3. 結 果	15
1. 12.5, 13.5 および 15.5 dpc の精巣中腎複合体における Amh の検出	15
2. 精巣と中腎間における結合組織の形成程度の評価	15
3. 精巣から中腎内への Amh の移行が可能な領域の探索	15
4. 培養開始時期の検討	16
5. 生理的な濃度における Amh の精巣から中腎内への 移行の検討	17
6. 生理的な濃度における Amh の精巣から中腎内への 移行経路の検討	18
I-4. 考 察	20
1. ミュラー管退行開始時期における Amh が移行可能な 領域について	20
2. ミュラー管退行開始時期における生理的濃度の Amh の 移行経路について	21
3. 15.5 dpc 付近における Amh の移行経路について	23
4. テストステロンの移行経路について	24
5. 器官培養法について	25

I-5. 小括	26
第II章 発生中のマウスミュラー管の構造を 維持可能な器官培養法の検討	27
II-1. 小緒	28
II-2. 材料および方法	29
1. 供試動物および飼育方法	29
2. 器官培養	29
3. 一般組織学的および免疫組織学的解析	30
4. ミュラー管の管径の計測	30
II-3. 結果	31
1. 培養後の性腺中腎複合体の形態に関する肉眼的所見	31
2. 性腺中腎複合体の組織学的解析	31
3. ミュラー管の管径の計測	31
II-4. 考察	33
II-5. 小括	35
総括	36
Abstract	40
謝辞	43
引用文献	44
付図および付図説明	53

総緒

哺乳類をはじめとする脊椎動物のほとんどは、種の維持のため有性生殖を行っている。有性生殖は遺伝的多様性の作出に有用な機構で、雌の卵子と雄の精子という2つの異なるゲノムを有する配偶子が接合して、次世代の個体を産出する。その過程では生殖器系が重要な機能を担っている。雌では、卵巢が卵子の産生場として機能し、雌性生殖道が受精、着床および胚発生場としての役割を果たしている。雄では、精巣が精子の産生場として機能し、雄性生殖道が精子の成熟、貯蔵および輸送場としての役割を果たしている。

精巣と卵巢は形態や機能が異なるものの、両者は共通の原基である未分化性腺から生じる [Wilhelm *et al.*, 2007]. その形成はマウスの場合、胎齢 9.5 日 (days post coitum, dpc) 頃に、中腎の腹内側に位置する体腔上皮の一部細胞が直下の間充織領域へと移行することで開始される [Piprek *et al.*, 2016]. また、中腎領域の間葉系細胞も同領域に集合することにより、体腔に突出した生殖巣堤が形成される [Piprek *et al.*, 2016]. 生殖巣堤の形成に関与する遺伝子は複数同定されており、例えば *Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1 (NR5A1/Ad4BP/SF-1)* は、中腎周囲の体腔上皮の増殖 [Kusaka *et al.*, 2010] や上皮間葉転換を介した上皮細胞の増殖 [Luo *et al.*, 1994] を促進する。また、*GATA Binding Protein 4 (Gata4)* や *LIM Homeobox 9 (Lhx9)*, *WT1 Transcription Factor (Wt1)*, *Empty Spiracles Homeobox 2 (Emx2)* などの発現も、生殖巣堤の形成と発達に必須とされている [Hu *et al.*, 2013]. 一方、精子や卵子の元となる始原生殖細胞は、尿膜に近い卵黄嚢壁の内胚葉細胞の間に出現後、後腸の背側腸間膜に沿ってアメーバ様に遊走して未分化性腺内に移入する。形成直後の生殖巣堤は体軸に沿って細長い形態をとるが、これは胚体外から移動してくる始原生殖細胞の性腺内への効率的な取り込みに有効と考えられている [Wainwright *et al.*, 2014]. このように形成された未分化性腺内で支持細胞の性決定が行われることで、未分化性腺は精巣もしくは卵巢へと分化する [Wilhelm *et al.*, 2007]. この発生運命の決定は、哺乳類においては一般に、XX/XY 型の遺伝的性決定システムによって行われる。すなわち、性染色体構成が XY であれば精巣、XX であれば卵巢となる

[Tjio and Levan, 1956; McLaren, 1988]. とくに, Y 染色体上に存在する性決定遺伝子 *Sex determining region of the Y chromosome* (*Sry*) の発現の有無が重要である [Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991]. *Sry* は精巢化に重要な *Sry-box9* (*Sox9*) を直接的に活性化することで, 未分化性腺内の支持細胞前駆細胞を精巢特異的なセルトリ細胞へと分化誘導する [Sekido *et al.*, 2004; Wilhelm *et al.*, 2007]. 一方で, *Sry* が発現しない場合は, *Wingless-type MMTV integration site family member 4* (*Wnt4*) や *Forkhead box L 2* (*Foxl2*) などの卵巣化関連遺伝子が発現し, 支持細胞前駆細胞は卵巣特異的な顆粒膜細胞へと分化する [Biason-Lauber, 2012]. 分化後の支持細胞は, 周囲の細胞と相互に影響しながら雌雄に特異的な性腺を形成させていく [Svingen and Koopman, 2013].

雄性生殖道および雌性生殖道は, 共通の原基から発生する性腺とは異なり, 各々の原基から発生する. *Wolffian duct* (ウォルフ管) と呼ばれる雄性生殖道の原基は, 18 世紀後半にドイツの生理学者 Kaspar Friedrich Wolff によって発見された [Eisner and Bloom, 2002]. 一方, *Müllerian duct* (ミュラー管) と呼ばれる雌性生殖道の原基は, 1830 年頃にドイツの生理学者 Johannes Peter Müller により発見された [Eisner and Bloom, 2002]. ウォルフ管およびミュラー管の発見後, 両生殖道原基の形成機構や分化機構, 発達機構について多くの研究が行われてきた. ウォルフ管およびミュラー管は, 雌雄ともに両側の中腎領域内に形成される (図 1) [Zhao and Yao, 2019; Schoenwolf *et al.*, 2008]. ウォルフ管の形成は, マウスでは 9.0 dpc 頃から 10.5 dpc 頃にかけて行われる [Jacob *et al.*, 1991; Obara-Ishihara *et al.*, 1999]. まず, 中間中胚葉から形成された前腎管が体節の外側に沿うようにして総排泄腔に向かって伸長する. 前腎はまもなく消失するものの, 前腎管の尾部側が残存してウォルフ管となる [Jacob *et al.*, 1991; Obara-Ishihara *et al.*, 1999]. この頭尾方向の管の伸長は, 尾芽により形成される *Fibroblast growth factor* (FGF) の濃度勾配に依存する. すなわち, FGF 濃度が高い領域では尾側方向への細胞移動が促進され, FGF 濃度の低い領域では細胞の上皮化が促進され管状構造が形成される [Jacob *et al.*, 1991]. 一方, ミュラー管の形成は, マウスでは 11.5 dpc 頃から 13.5 dpc 頃にかけて行われ, その形成過程は 3 段階に分類されている [Guioli *et al.*, 2007; Orvis and Behringer,

2007; Fujino *et al.*, 2009]. まず, 中腎頭側の体腔上皮の一部の細胞で *LIM homeobox 1 (Lhx1)* が発現することにより, ミュラー管前駆細胞が誘導される. 次いで, 中腎の間葉系細胞に *Wnt4* シグナルが発現し, 中腎頭部側の体腔上皮に存在する *Lhx1* 陽性ミュラー管前駆細胞が中腎領域へと侵入する. その際, ミュラー管の先端はウォルフ管へ向かうように陥入および伸長し, ミュラー管の先端はウォルフ管に接する. 最後に, ミュラー管はウォルフ管に沿うようにして中腎尾側方向へと伸長し, やがて総排泄腔へと到達する[Mullen and Behringer, 2014]. この一連のミュラー管の形成過程にはウォルフ管が必要とされており, ウォルフ管の形成を阻害した場合には, ミュラー管の形成にも異常が認められる[Miyamoto *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 2005]. また, ミュラー管の形成に関与するウォルフ管由来の因子の一つとして *Wingless-type MMTV integration site family, member 9B (Wnt9b)* が知られ, ウォルフ管における *Wnt9b* の発現を阻害すると, ウォルフ管は形成されるがミュラー管の伸長は阻害される[Carroll *et al.*, 2005].

雌雄ともに中腎内に形成されたミュラー管およびウォルフ管は, 分化後の性腺から分泌されるホルモンの影響によって片方が発達し, 他方が退行することで, 雌雄に特有の生殖道となる(図1). すなわち, 雄では精巣から分泌されるテストステロンの影響で, ウォルフ管は精巣上体, 精管, 精囊腺へと分化し[Zhao and Yao, 2019], Anti-Müllerian hormone (AMH/Amh, 抗ミュラー管ホルモン)の影響でミュラー管は退行する[Behringer *et al.*, 1994; Josso *et al.*, 1993; Lee and Donahoe, 1993; Ingraham *et al.*, 2000; Mullen and Behringer, 2014; Zhao and Yao, 2019]. 一方, これらのホルモンが分泌されない雌では, ウォルフ管は退行し, ミュラー管は卵管, 子宮, 膈上部へと分化する[Josso *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 2001; Zhao and Yao, 2019; Gonzalez *et al.*, 2021]. このミュラー管およびウォルフ管の分化機構については, 1940 年代に Jost によりはじめて提唱された. Jost(1947)は, 性分化前のウサギ胎子から両側の性腺を摘出すると, 遺伝子型が XX, XY のいずれの場合でもウォルフ管は退行し, ミュラー管が発達して表現型が雌となることを示した. また, ウサギの雌胎子の卵巢に隣接させる形で精巣を移植した場合, ウォルフ管が発達し, ミュラー管は退行して表現型が雄となることも示した. これらより, ミュラー管およびウォ

ルフ管の発生運命は雌型で、精巣由来の因子により雄型へと誘導されることが明らかとなった [Jost, 1947, 1953, 1959, 1970]. さらに, Jost(1947)は, この当時に精巣由来のホルモンとして同定されていたテストステロンをペレットとしてウサギ雌胎子の卵巢に移植することで, ウオルフ管の発達にテストステロンが関与することを明らかとした. 一方で, テストステロンによるミュラー管の退行は認められなかったことから, ミュラー管の退行を誘導する精巣由来の因子はテストステロンの他に存在することが示唆され [Jost, 1947], 当初は“l’hormone inhibitrice”と呼ばれていた [Jost, 1953; Josso, 2002]. その後, Josso により Mullerian-inhibiting substance [Josso, 1971, 1972] や, Amh [Josso, 1974; Blanchard and Josso, 1974] と名付けられた.

Amh の生物学的作用効果の同定と精製は, 生殖道の器官培養法が確立されたことで躍進した. Picon(1969)は, CMRL-1066 に 10%ウシ胎子血清 (Fetal bovine serum, FBS) および抗生物質を添加した培養液と寒天を塗布した金網を用いて 14.5 dpc のラット中腎を培養し, ミュラー管の退行程度を評価する方法を確立した. その後, 同器官培養法を利用して, ヒト胎子の精巣からも AMH が産生されることや [Josso, 1971], Amh が胎子期のセルトリ細胞から分泌されることが解明された [Josso, 1973; Blanchard and Josso, 1974]. さらに, この器官培養系を応用して Amh が精製された [Picard and Josso, 1984]. その後, AMH/Amh の構造 [Cate *et al.*, 1986] や アミノ酸配列 [ヒト: Cate *et al.*, 1986; マウス: Münsterberg and Lovell-Badge, 1991] も明らかにされた. AMH/Amh はヒトでは 19 番染色体 [Cohen-Haguenauer *et al.*, 1987], マウスでは 10 番染色体 [King *et al.*, 1991] 上にコードされた糖タンパク質で [Picard *et al.*, 1978], その構造から Transforming growth factor-beta (TGF- β) スーパーファミリーに分類されている [Cate *et al.*, 1986]. Amh は他の TGF- β スーパーファミリーと同様に, ホモ二量体タンパク質前駆体 (proAmh, 140 kDa) として合成後, 前駆タンパク質転移酵素サブチリシン/ケキシシンによってセルトリ細胞内で切断され, N 末端プロドメイン (Amh_N, 120 kDa) と, C 末端成熟ドメイン (Amh_C, 25 kDa) を生じる. Amh は, この Amh_C となつてはじめて特異的な受容体である Anti-Müllerian hormone receptor type2 (Amhr2) と結合可能になる [MacLaughlin *et al.*, 1992; Nachtigal and Ingraham, 1996; McLennan and Pankhurst, 2015]. Amhr2 はセリン・スレオニンキナーゼであり, 雌雄ともにミュラ

一管の側方の体腔上皮およびその直下の間充織内に発現する[Baarends *et al.*, 1994; di Clemente *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1996]. その後、この *Amhr2* の発現は、ミュー管上皮細胞に発現する *Wingless-type MMTV integration site family, member 7A (Wnt7a)* や、ミュー管周囲の間充織に発現する *Wt1* によって制御される[Zhao and Yao, 2019]. *Amhr2* の発現は、マウスでは 13.0 dpc 頃にミュー管頭部側から開始され、13.5 dpc までにミュー管尾部末端に到達する[Arango *et al.*, 2008]. また、ミュー管の側方に位置する体腔上皮において *Amhr2* を発現した細胞は、*Amh* シグナルを受けるとミュー管を囲むようにミュー管周囲へと移行する[Zhan *et al.*, 2006]. さらに、*Amhr2* に *Amh* が結合することで下流のシグナル系が活性化され、ミュー管が退行する[Mishina *et al.*, 1999]. 具体的には、*Amh* によって活性化された *Amhr2* は、*Amhr1 (ALK2/3)* をリン酸化して活性化させる. そして、このシグナルは、*Smad family member 1/5/8 (Smad1/5/8)* によって核内へ伝達される. その後、*Matrix metalloproteinases 2 (MMP2)* などの下流因子によりミュー管上皮細胞のアポトーシスや上皮間葉転換が誘導されることで、ミュー管は退行する[Allard *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2002; Xavier and Allard, 2003].

ミュー管の退行にはセルトリ細胞で産生された *Amh* がミュー管周囲の間充織に到達することが必要であるが、*Amh* の精巣から中腎への移行経路については不明な点が多い. 胎盤の血管に吻合が生じるウシにおいては、異性多胎時に雌胎子に生殖器異常を生じるフリーマーチンの現象が認められる[Jost *et al.*, 1972]. さらに、2000 年以降では *Amh* が成獣の卵巢の顆粒膜細胞から分泌されることが着目され、その血中濃度は卵巢機能の指標とされている[Moolhuijsen and Visser, 2020]. これらより、*Amh* は血液循環を介する内分泌様式で、ミュー管の退行を惹起すると考えられてきた[Skinner, 2004; Sharpe, 2006; Schoenwolf *et al.*, 2008]. 一方で、ウサギにおいて雄胎子の片側の精巣を摘出した場合、ミュー管の発達は摘出側でのみ認められ、非摘出側ではミュー管由来の組織は認められていない[Jost, 1953]. また、片側に卵巢、反対側に精巣を有する真性半陰陽(O/T)マウスにおいて、卵巢側ではミュー管由来の卵管が認められたのに対し、精巣側ではミュー管由来の器官は認められていない[Katoh-Fukui *et al.*, 1998; Kuroki *et al.*, 2013; Umemura *et al.*, 2015]. *Amh* が血液を介して作用する場

合, 片側の精巣から分泌された Amh は, 両側のミュラー管に等しく作用するはずである. ウシとマウスおよびウサギでは胎盤の構造が異なるが, 少なくとも後者においては, 血液循環を介さずにミュラー管周囲へと到達した Amh がミュラー管の発生運命に重要な役割を果たすことが考えられる. この血液循環を介さない Amh の中腎への移行経路について, 性分化疾患モデルマウスの O/T 個体の解析から, ミュラー管退行開始時期に精巣から分泌された Amh が同側のミュラー管の退行のみを惹起することが明らかとされている[Yamamoto *et al.*, 2018]. さらに, 13.5 および 14.5 dpc のマウス胎子の精巣中腎複合体を用いた解析から, Amh が精巣の頭側領域(精巣頭側部; 図 1)から浸潤性の中腎内へ移行することが示唆されている[Yamamoto *et al.*, 2018]. Amhr2 は 13.5 dpc ではミュラー管全長に発現していることから[Arango *et al.*, 2008], 精巣頭側部から中腎内へ浸潤性に移行した Amh がミュラー管の頭側部領域(ミュラー管頭部; 図 1)の退行を惹起することが推測された. しかしながら, Amh が精巣からミュラー管近傍まで到達する移行経路の詳細, とくにミュラー管の中央部領域(ミュラー管中央部; 図 1)以降に到達する機序は未だ明らかではない.

ここまで述べたように, ミュラー管に対する Amh の作用機序は長年にわたって研究が行われ, ミュラー管の退行には, 精巣のセルトリ細胞で産生される Amh が必要であることが示されている. しかしながら, 精巣内の Amh がミュラー管周囲まで到達する機序の詳細は未だ明らかではない. この点を明らかとするため, マウスをモデル動物として用い, 第 I 章ではミュラー管退行開始時期における Amh の精巣から中腎領域, とくにミュラー管中央部への移行経路を検討した. 第 II 章では, ミュラー管の尾側部領域(ミュラー管尾部)への Amh の移行経路を検討可能な器官培養法について検討した.

第 I 章

ミュラー管退行開始時期の雄マウスにおける
精巣から中腎領域への *Amh* の移行経路の解析

I-1. 小緒

発生初期の哺乳類では、雌性生殖道の原基であるミュラー管と雄性生殖道の原基であるウォルフ管の両者が雌雄ともに形成される。その後、雄では、精巣のセルトリ細胞から分泌される *Amh* の影響でミュラー管は退行し、テストステロンの影響でウォルフ管は精巣上体、精管、精嚢腺へと分化する。一方でこれらのホルモンが分泌されない雌では、ミュラー管は卵管、子宮、膈上部へと分化し、ウォルフ管は退行する[Zhao and Yao, 2019]。

Amh の受容体である *Amhr2* はミュラー管周囲の間充織およびミュラー管近傍の体腔上皮に発現し[Baarends *et al.*, 1994; di Clemente *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1996]、テストステロンの受容体であるアンドロゲン受容体はウォルフ管上皮およびウォルフ管周囲の間充織に発現する[Bentvelsen *et al.*, 1995; Murashima *et al.*, 2011, 2015]。すなわち、ミュラー管の退行には精巣で産生された *Amh* がミュラー管周囲の間充織へと到達する必要がある、ウォルフ管の発達には精巣で産生されたテストステロンがウォルフ管へと到達する必要がある。*Amh* およびテストステロンが精巣から中腎へと移行する経路として、血液を介する経路と、浸潤性に移行する経路が想定される。後者の経路について Tong ら(1996)は、テストステロンが *rete cord* および中腎細管を介してウォルフ管へと到達することを器官培養系で明らかとしている。

Amh についても、ミュラー管退行開始時期において精巣から同側の中腎内に浸潤性に移行することが解明され、その際に *Amh* が主に精巣頭側部から中腎内へ移行することが示唆されている[Yamamoto *et al.*, 2018]。ミュラー管退行開始時期であるマウスの 13.5 dpc の段階では、*Amhr2* はミュラー管全長に発現していることから[Arango *et al.*, 2008]、精巣頭側部から中腎内へ浸潤性に移行した *Amh* がミュラー管頭部の退行を惹起させることが推測された。しかしながら、*Amh* が精巣からミュラー管近傍まで到達する移行経路の詳細、とくにミュラー管中央部以降に到達する機序は未だ明らかではない。以上の背景から、第 I 章では、ミュラー管退行開始時期における精巣から中腎領域への *Amh* の移行経路を明らかとすることを目的とした。

I-2. 材料および方法

1. 供試動物および飼育方法

雌雄の ICR 系マウス(日本 SLC, 静岡)を用いて一晩同居法による交配を行い, 膣栓確認日の正午を 0.5 dpc とした. マウスの飼育は, 神戸大学ライフサイエンスラボラトリーの施設利用マニュアルに基づき, 明期 14 時間, 暗期 10 時間の人工照明および室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\pm 10\%$, ケージ内換気 75 回/h(室内換気 10 回/h)で行った. 飼育システムには, 個別換気ケージシステム, グリーンラインマウス(テクニプラストジャパン, 東京)を, 床敷には実験動物用床敷エコチップ(日本クレア, 東京)を使用した. 飼料としてクレア DC-8 固形飼料(日本クレア)を自由摂取させ, 水道水を給水瓶で自由飲水させた. 動物の飼育および実験は, 「神戸大学動物実験実施規則」(許可番号 29-05-02, 2022-07-01)に従った.

2. 採材方法

妊娠 12.5, 13.5 または 15.5 日付近の ICR マウスを過量のイソフルラン吸入麻酔により安楽死させ, 子宮を摘出した. 冷却した生理食塩水(大塚製薬, 徳島)中で羊膜, 尿膜および胎盤を切除して胎子を摘出し, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/L Glucose) with L-Gln and HEPES, without Sodium Pyruvate, liquid (08457-55; ナカライテクス, 京都)以下 HEPES 添加 DMEM 中で左右の性腺中腎複合体を別々に摘出した.

3. 器官培養

培養の手順は, 性腺の性質を保存可能な Yamamoto ら(2018)および Hasegawa ら(2020)の方法に準じた.

1) 培養液の調製

100 U/mL ペニシリンおよび 100 mg/mL ストレプトマイシン(各最終濃度: 0.50 U/mL, 0.50 mg/mL; 168-23191, 富士フィルム和光純薬工業, 大阪), 200 mM L-グルタミン(最終濃度: 3.48

mM: 富士フィルム和光純薬工業), 100 mM ピルビン酸(最終濃度: 1.87 mM; ナカライテクス), 10% KnockOut Serum Replacement (KSR; Gibco, Grand Island, U.S.A.)を添加した DMEM(4.5 g/L Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate, liquid (08458-45, ナカライテクス), 以下 KSR 添加 DMEM を器官培養用に使用した. 一般的に培養に用いられる FBS ではなく KSR を用いた理由は, FBS に含まれる可能性のあるウシ由来の Amh の影響を避けるためである.

2) アガロースゲルブロックの作製

21G の注射針(直径 0.8 mm; テルモ, 東京)6 本を置いた直径 50 mm のプラスチックシャーレに, 1.5%アガロース(Agarose S, ニッポンジーン, 富山)を添加した DMEM(08458-45) 5.59 mL を注ぎ, 厚さ 2.5 mm になるように固めた. 上下反転後に注射針を取り除いて溝を作製し, その溝を含むように 6×6 mm 角のブロック状に細切して培養に用いた.

3) ゲルシートの作製

両端に scotch tape (BK—12N, 3M Japan, 東京)を 2 枚重ねにして厚さ 90 μ m になるように貼り付けた 50×50×5 mm のガラス板上に, 4%アガロースを溶解させた DMEM(08458-45)を 300 μ L 滴下した. その後, 上から 50×50×5 mm のガラス板をのせることでゲルをシート状に伸ばした(図 2A). 氷上でゲルを固めた後, 直径 50 mm のプラスチックシャーレにゲルを移して, 40°C の乾燥庫内で 48 時間以上乾燥させた. これをメス刃 (No. 24; Feather Safety Razor, 大阪)を用いて 5×0.8 mm に細切し, ゲルシートとして培養に用いた(図 2A).

4) 培養方法

ミュー管頭部および中央部への Amh の移行経路を明らかにするため, 12.5 dpc の性腺中腎複合体を用いて次の条件を用意した(図 2B): 性腺中腎複合体をそのまま培養する群(対照), 性腺と中腎を離断する群(条件 1), 性腺中腎境界部の頭部側を切断する群(条件 2), 性腺中腎境界部の尾部側を切断する群(条件 3), ウォルフ管と接続する中腎細管を切断する群(条件

4). 組織の再接着を阻止するために、切断部にはゲルシートを挿入した(図 2B). その後、1.5%アガロースゲルブロックの溝内に性腺および中腎を設置し、器官の変形抑制のためのゲルシートを性腺および中腎上に積層した(図 2C). これを直径 15 mm の 24 ウェルプレート(92424; BM 機器, 東京)のウェル中央部に設置し(図 2C), 性腺および中腎が気相域に位置するように HEPES 添加 DMEM を 150 μ L 加え、培養開始時まで 4°C で保管した. 培養開始直前に同量の KSR 添加 DMEM に入れ換え、37°C, 5% CO₂ 条件下で 72 時間培養した. KSR 添加 DMEM は毎日、全量を交換した.

4. Recombinant human (rh)-AMH の注入

刺入用のマイクロガラスピペット(外径約 30-40 μ m)は、ガラスキャピラリー(Model G1; ナリシゲ, 東京)とマイクロピペットテンション(MPT-1, 島津製作所, 京都)を用いて作製した. マイクロインジェクション装置(IM-4B, ナリシゲ)を用いて、12.5, 13.5, 15.5 dpc の精巣頭側部、中央部または尾側部にマイクロガラスピペットを刺入することで、約 0.3-1.0 μ L の rh-AMH(100 μ g/mL; 1737-MS, R&D Systems, Minneapolis, U.S.A.)を注入した. 注入後、1.5%アガロースゲルブロックの溝内に性腺中腎複合体を設置してゲルシートを積層し、直径 15 mm の 24 ウェルプレートのウェル中央部に設置した. その後、性腺中腎複合体が気相域に位置するように HEPES 添加 DMEM を 150 μ L 加えて 4°C で 1 時間静置した.

5. 組織標本作製

生体より摘出後もしくは培養後の性腺中腎複合体を、4%PFA 含ザンボニ固定液を用いてローテーターで攪拌しながら 4°C で 24 時間浸漬固定した. エタノール脱水系列に振盪させながら室温で順次浸漬(70%, 80%, 90%, 99%: 各 20 分; 100%I, II, III: 各 1 時間)し、完全に脱水した. その後、キシレンに 3 回浸漬(各 20 分)して組織中のエタノールをキシレンに置換し、HISTOSEC(Merck, Darmstadt, D.E.U.)と純パラフィン(Merck)の等量混合パラフィンに 60°C で 3 回浸漬(各 20 分)後、同パラフィン内に包埋した. 滑走式マイクローム(SM2000R; Leica,

Wetzlar, D.E.U.)を用いて 5 μm 厚, 25 μm 間隔の間断連続横断切片を作製し, 2% 3'-aminopropyltriethoxysilane (信越化学工業, 東京)をコーティングしたスライドガラスに貼付して使用時まで-18°Cで保存した.

6. 免疫組織化学的解析

常法に従って脱パラフィンおよび再水和処理を施した後, 抗原の賦活化処理として 121°Cで 20 分, 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中でオートクレーブ処理を行った. 室温に戻し蒸留水で洗浄後, 内因性ペルオキシダーゼ活性除去のために 100%メタノールおよび 0.5%過酸化水素水に各 30 分間浸漬した. 蒸留水で洗浄後, ローテーターで攪拌しながら Blocking One Histo (ナカライテスク)と室温で 1 時間反応させ, 非特異的タンパク質の付着を阻止した. 0.05%Tween20 加 10 mM リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4, PBS-T)で洗浄後, 抗 Amh ヤギ抗体 (1:6,000-10,000; sc-6886; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.)と 4°Cで 18 時間反応させた. PBS-T で 3 回洗浄し, 二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ヤギ IgG ロバ抗体 (1:200; ab97112; Abcam, Cambridge, G.B.R)とローテーターで攪拌しながら室温で 1 時間 30 分反応させた. 再び PBS-T で 3 回洗浄後, 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6) で切片を洗浄し, DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution; Dako, Glostrup, D.N.K)によって陽性反応を検出した. マイヤーのヘマトキシリン染色液 (Merck) で対比染色を行った後, 脱水および透徹を行い, Eukitt (O. Kindler, Freiburg im Breisgau, D.E.U.)を用いて封入した.

7. アニリンブルー染色

常法に従って脱パラフィンおよび再水和処理を施した後, 2.5%リントングステン酸と 2.5%リンモリブデン酸の等量混合液で一晩媒染処理を行い, 1%酢酸で 10 秒間洗浄した. これを 0.4%アニリンブルー液に 2 時間浸漬して 1%酢酸で 10 秒間洗浄後, イソプロピルアルコールで分別処理を行った. その後, 透徹し, Eukitt (O. Kindler)を用いて封入した.

8. Hematoxylin-Eosin (HE) 染色

常法に従って脱パラフィンおよび再水和処理を施した後、マイヤーのヘマトキシリン染色液に 1 分間浸漬した。流水中で色出し処理を 20 分間行い、エオシン染色液に 1 分 30 秒間浸漬した。これをエタノール脱水系列 (70%, 80%, 90%, 99%: 各 1 分; 100% I, II, III: 各 3 分) に順次浸漬した。その後、透徹し、Eukitt (O. Kindler) を用いて封入した。

9. ミュラー管の管径の計測

光学顕微鏡下で接眼マイクロメーターを用い、HE 染色を施した切片上でミュラー管の短径を計測した。計測は、最頭側または最尾側の中腎細管の位置から尾側方向へ 25 μm 間隔の 4 枚の切片上で行い、各領域の平均値を算出した (図 3)。前者をミュラー管頭部の管径、後者をミュラー管中央部の管径とした。長径と短径の平均値ではなく、短辺の長さを管径とした理由は、ミュラー管が斜めに薄切されていた場合の計測誤差を最小限にするためである。また、性腺ではなく中腎細管の位置からミュラー管の計測位置を設定した理由は、培養操作により性腺と中腎との付着位置が不明となるためである。ミュラー管の退行程度は Kruskal–Wallis test および Steel Dwass test, もしくは Mann–Whitney *U* test (BellCurve for Excel, version 3.23; SSRI, 東京) を用いて評価し、有意水準は 5% 未満とした。

10. ウェスタンブロッティング

1) サンプル調製

12.5 dpc から 72 時間培養した性腺中腎複合体 (先述の 3-4) の対照と同条件または 12.5 dpc の性腺中腎複合体を性腺と中腎に離断し、培養後の雄の中腎 30 サンプル (15 個体分) および 12.5 dpc の雄の中腎 22 サンプル (11 個体分) を実験に使用した。また、72 時間培養後の精巣を *Amh* のポジティブコントロール、12.5 dpc の卵巣を *Amh* のネガティブコントロールとして用いた。採取したサンプルは液体窒素で急速凍結し、使用時まで -80°C で保存した。組織中のタンパク質を十分に抽出するため、10 μm Clear Tips (110-207C, 深江化成) の先端を加熱して丸め

た器具でサンプルを破碎した。サンプル当たり 0.2-0.4 μ L (中腎)もしくは 1 μ L (精巣および卵巣)の MQ を加えて冷却遠心 (13,000 G, 4°C, 3 分)した。上清を回収し, 2×Laemmli Sample buffer とメルカプトエタノールを 9:1 となるように調製した溶液を, 上清と同量加えて混合した。98°C で 5 分間加熱処理を行い, サンプル溶液とした。

2) ウェスタンブロッティング

ポリアクリルアミドゲル (Stacking gel: 5%, Running gel: 15%) を用いて, 泳動バッファー (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) 中で SDS-PAGE (200 V, 40 分)を行った。その後, メタノールに 30 分間浸漬したポアサイズ 0.45 μ m の Immobilon-P Transfer Membranes (Merck) を用いて, 転写バッファー (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol) 中でブロッティング (100 V, 1 時間)した。なお, SDS-PAGE およびブロッティングはパワーパック High Current パワーサプライ (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) を用いて実施した。Amhc (12.5 kDa) および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, 37 kDa) を検出するため, WIDE-VIEW Prestained Protein Size Marker III (#230-02461, 富士フイルム和光純薬工業) のバンドを目安に, 分子量 20-25 の間でメンブレンを 2 分割した。次に, 各メンブレンを Blocking One Histo と常温で 1 時間反応させ, 非特異的タンパク質の付着を阻止した。その後, それぞれを抗 Amh ヤギ抗体 (1:800; sc-6886) または, 抗 GAPDH マウス抗体 (1:4,000; 016-2552, 和光純薬工業) と振盪機で攪拌しながら 4°C で 2 時間反応させ, さらに静置条件下で 4°C, 12 時間反応させた。PBS-T で 6 回洗浄後, それぞれ HRP 標識抗ヤギ IgG ロバ抗体 (1:20,000; ab97112) または, HRP 標識抗マウス IgG ラット抗体 (1:20,000; 415-035-166; Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, U.S.A.) と振盪機で攪拌しながら 4°C で 1 時間反応させた。PBS-T で 6 回洗浄し, Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) と 20 秒間反応させた後, Lumino Graph I (ATTO, 東京) を用いてその化学発光シグナルを検出した。

I-3. 結果

1. 12.5, 13.5 および 15.5 dpc の精巢中腎複合体における Amh の検出

抗 Amh 抗体を用いて, 12.5, 13.5 および 15.5 dpc の雄の精巢中腎複合体内の Amh を検出した. いずれの胎齢においても, 精巢索内に Amh の陽性反応が認められるとともに, 精巢間質部に弱い陽性反応が認められた(図 4A-C). Rete cord が明瞭に認められる 13.5 dpc では, Yamamoto ら(2018)の報告のように, rete cord 内に弱い陽性反応が認められた(図 4B'). また, 15.5 dpc の rete cord 内にも弱い陽性反応が認められた(図 4C').

2. 精巢と中腎間における結合組織の形成程度の評価

12.5, 13.5 および 15.5 dpc の雄の精巢中腎複合体の切片を用いてアニリンブルー染色を行い, 精巢と中腎間の結合組織の形成程度を評価した. 12.5 および 13.5 dpc では, 精巢と中腎の境界領域における結合組織が菲薄であり, 精巢と中腎の間充織が連続している領域が精巢頭側部から尾側部にわたって認められた(図 5A-D). 15.5 dpc においても, 精巢頭側部で精巢と中腎の間充織が連続している領域が認められたが, 精巢と中腎の境界領域における結合組織の形成は 12.5 および 13.5 dpc (図 5A-D)より進行していた(図 5E-F). また, 精巢と中腎の接続領域は狭くなっていた(図 5E-F).

3. 精巢から中腎内への Amh の移行が可能な領域の探索

一般的に使用されている抗 Amh 抗体を高濃度で使用すると雌中腎内にも非特異反応が認められるため, 中腎の間充織内に拡散した低濃度の Amh を免疫組織化学的に検出することは困難である. そこで, 12.5, 13.5 および 15.5 dpc の雄の精巢中腎複合体の精巢内に rh-AMH を注入し, 中腎内の AMH/Amh 濃度を上昇させ得る条件下で免疫組織化学的に AMH/Amh を検出することで, 精巢から中腎内へ Amh が移行可能な領域を探索した. Rh-AMH はマウスのミューラー管を退行させ得ることが示されており, ミューラー管の退行機序に関する研究に多用されていることから[Tanwar *et al.*, 2010], 本実験にも利用可能と判断した. 12.5 dpc の精巢頭側部に

0.3-0.5 μ L の rh-AMH を注入すると、間質部を含む精巣全体、とくに頭側部の精巣内に AMH/Amh の強い陽性反応が認められた(図 6A)。Rh-AMH 注入部付近の中腎内にも AMH/Amh の陽性反応が認められ、精巣中腎境界部からミューラー管近傍にかけて連続的に AMH/Amh が検出された(図 6A')。一方で、頭側部の精巣中腎複合体の切片と同一スライドガラス上で反応させた尾側部の切片では、精巣内には AMH/Amh の陽性反応が認められたものの、精巣中腎境界部および中腎内に陽性反応は認められなかった(図 6B, B')。12.5 dpc の精巣尾側部に rh-AMH を注入した場合にも、頭側部の切片では精巣内に陽性反応が認められたものの、精巣中腎境界部および中腎内に陽性反応は認められなかった(図 6C, C')。一方、尾側部の切片では間質部を含む精巣全体に強い陽性反応が認められるとともに(図 6D)、精巣中腎境界部からミューラー管近傍にかけて連続的に AMH/Amh が検出された(図 6D')。13.5 dpc の精巣頭側部または尾側部に 0.3-0.5 μ L の rh-AMH を注入した場合にも、注入部付近の精巣からミューラー管近傍にかけて連続的に陽性反応が認められ(図 7A, A', D, D'), 注入部と反対極の切片では精巣中腎境界部の間質部および中腎内に陽性反応は認められなかった(図 7B, B', C, C')。15.5 dpc の精巣中腎複合体の精巣頭側部、中央部または尾側部に 0.8-1.0 μ L の rh-AMH を注入した場合には、間質部を含む精巣全体、とくに注入部付近の精巣内に強い陽性反応が認められた(図 8A-C)。処置を行っていない 15.5 dpc の所見(図 4C)と同様に、rete cord 内には弱い陽性反応が認められ(図 8A', B'), 精巣中腎境界部の間充織やミューラー管近傍に陽性反応は認められなかった(図 8A'-C')。

4. 培養開始時期の検討

生理的濃度に近い Amh が精巣から中腎内へ浸潤性に移行するか否かについて、器官培養法を用いた検討を企図した。そのために、まず、性腺中腎複合体の培養開始時期の検討を行った。ミューラー管の退行程度は、ミューラー管の管径、およびミューラー管退行時に認められることが知られているミューラー管周囲の間充織細胞の凝集程度[Dyche, 1979; Wartenberg, 1985]により評価した。既報の通り[Dyche, 1979], 12.5 dpc の雄ではミューラー管周囲に間充織細胞の凝集は認

められず(図 9A, B), 13.5 dpc ではミュー管頭部および中央部にミュー管周囲の間充細胞の凝集が認められた(図 9C, D). ミュー管の管径を検討すると, 12.5 dpc ではミュー管頭部, 中央部ともに雌雄間の有意な差は認められなかった(図 10A, B). 一方で, 13.5 dpc のミュー管頭部($P<0.001$, 図 10A), 中央部の管径($P=0.005$, 図 10B)はともに雌より雄の方が有意に小さかった. 12.5 dpc と 13.5 dpc のミュー管頭部の管径を比較すると, 雄では 12.5 dpc より 13.5 dpc の方がわずかに減少した一方で, 雌では 12.5 dpc より 13.5 dpc の方がわずかに増加した(図 10A). 12.5 dpc と 13.5 dpc のミュー管中央部の管径を比較した場合にも, 雄では 12.5 dpc より 13.5 dpc の方がわずかに減少した一方で, 雌では 12.5 dpc より 13.5 dpc の方がわずかに増加した(図 10B). 以上の結果から, 13.5 dpc では既にミュー管の退行が進んでいると考えられ, 12.5 dpc からの培養開始の方が適していることが明らかとなった.

5. 生理的な濃度における Amh の精巣から中腎内への移行の検討

生理的な濃度の Amh が精巣から中腎内へ浸潤性に移行するか否かを確認するため, 12.5 dpc の雄の中腎と 12.5 dpc から 72 時間培養後の雄の中腎とを用いてウェスタンブロッティング法で解析し, 中腎内の Amh を検出した. 内部標準とした GAPDH(37 kDa)のバンドは, すべての群で検出された(図 11A). 成熟型である Amh_c(12.5 kDa)のバンドは, ネガティブコントロールである 12.5 dpc の卵巣では認められず, ポジティブコントロールである 72 時間培養後の精巣では認められた(図 11A). さらに, 12.5 dpc の雄の中腎および培養後の雄の中腎でも Amh のバンドが検出された(図 11A). また, 培養後の雄中腎 1 サンプルあたりの Amh 量を輝度値から比較すると, 12.5 dpc の雄中腎の 1.35 倍であった. また, Amh の輝度値を GAPDH でノーマライズして雄の中腎内の Amh 量を比較すると, 培養後の中腎内の Amh 量は 12.5 dpc の中腎内の 2.2 倍であった(図 11B).

6. 生理的な濃度における Amh の精巣から中腎内への移行経路の検討

対照および条件 1-4 の条件(図 2B)で 12.5 dpc の性腺中腎複合体を 72 時間培養し、生理的な濃度における Amh の精巣から中腎内への移行経路を検討した。

1) 12.5 dpc から 72 時間培養した性腺および中腎の形態

すべての培養条件において、培養後の精巣内に精巣索が明瞭に認められた(図 12A)。また、性腺と接着している領域の中腎は培養後まで屈曲は認められず、形態が保存されていた(図 12A)。一方で、性腺の最尾側部より尾部側の中腎については培養中に形態を保存することが難しく、屈曲している個体が多数認められた(図 12A)。既報の通り[Orvis and Behringer, 2007], 中腎内のミューラー管については、培養開始時は精巣尾部付近まで伸長しており、培養後は中腎の最尾側部付近まで伸長していた(図 12A)。

2) 12.5 dpc から 72 時間培養した精巣内の Amh

培養後の対照および条件 1-4 の精巣中腎複合体を用いて Amh を検出したところ、すべての条件で精巣内に陽性反応が認められた(図 12B)。

3) 12.5 dpc から 72 時間培養したミューラー管およびウォルフ管の形態

雄では、ミューラー管頭部の周囲における間充織細胞の凝集は対照および条件 3 で認められた一方(図 13A, G), 条件 1 と 2 および 4 では認められなかった(図 13C, E, I)。ミューラー管中央部の周囲における間充織細胞の凝集は、対照および条件 2 と 3 および 4 で認められた一方(図 13B, F, H, J), 条件 1 では認められなかった(図 13D)。ウォルフ管の管腔は対照および条件 1-3 で認められ、ウォルフ管が発達していた(図 13A-H)。一方、条件 4 ではウォルフ管の管腔は形成されず(図 13I, J), ウォルフ管上皮細胞内に多数の空胞が認められ(図 13I', I''), ウォルフ管の退行が進行していた。雌では、すべての条件でミューラー管頭部および中央部の周囲における間充織細胞の凝集は認められず、ミューラー管の形態にも条件間の差は認められなかった(図 13K-T)。また、ウォルフ管については、すべての条件で上皮細胞内に空胞が認められると

ともに管径が縮小していた(図 13K-T). ウォルフ管の退行は, 中央部より頭部の方が進行しており, 頭部のウォルフ管が消失している標本も認められた(図 13M, O, S).

4) ミュラー管管径に基づくミュラー管退行程度の評価

培養後の雄のミュラー管頭部の管径は, 頭部側での Amh の移行を阻害した条件 1 ($P=0.030$) および条件 2 ($P=0.027$) では対照よりも有意に増加した(図 14A). 一方で, 尾部側での Amh の移行を阻害した条件 3 と対照との間に有意な差は認められなかった(図 14A). 培養後の雄のミュラー管中央部の管径は, 尾部側での Amh の移行を阻害した条件 1 では対照よりも有意に増加した ($P=0.024$, 図 14B). 一方で, 対照と条件 2 の間に有意な差は認められなかった(図 14B). 条件 3 については, ミュラー管中央部の管径の平均値が対照よりもわずかに高値を示したものの(図 14B), Kruskal–Wallis test を用いて 5 条件間の差の検出を試みた場合には統計的な有意差を検出することができなかった. しかしながら, Mann–Whitney U test を用いた場合には, 対照と条件 3 の間に有意差が認められた ($P=0.031$).

中腎細管を介する Amh の移行を阻害した条件 4 では, Kruskal–Wallis test を用いた場合にはミュラー管頭部の管径に対照との有意な差は検出されなかった(図 14A). 一方で, Mann–Whitney– U test を用いた場合には, 対照と条件 4 の間に有意差が認められた ($P=0.032$). また, 条件 4 ではミュラー管中央部に対照や条件 2 との有意な差は認められなかった(図 14B). 対照および条件 1-4 の雌のミュラー管管径を比較すると, ミュラー管頭部および中央部の管径に条件間の有意な差は認められなかった(図 14C, D).

I-4. 考察

1. ミュラー管退行開始時期における Amh が移行可能な領域について

13.5 および 14.5 dpc の雄の中腎を用いたウェスタンブロッティングにより, 14.5 dpc の中腎頭部における Amh 濃度がもっとも高いことが示されている[Yamamoto *et al.*, 2018]. また, rete cord および中腎細管がウォルフ管へと伸長する精巣頭側部の領域には白膜は形成されない[Pawlina and Ross, 2019]. 中腎における Amh 量と白膜の形成部位との間に相関があるようにみえることから, 結合組織が精巣から中腎への Amh の移行を阻害する可能性が考えられた. この点について, アニリンブルー染色により 12.5 と 13.5 および 15.5 dpc の精巣中腎複合体の結合組織の形成程度を評価した結果, いずれの胎齢でも精巣中腎境界領域の結合組織が菲薄な領域が存在し, とくに 12.5 および 13.5 dpc では精巣頭側部に加えて精巣尾側部にも精巣と中腎の間充織が連続している領域が認められた. このことから, Yamamoto ら(2018)が示唆した精巣頭側部だけでなく精巣尾側部の間質部からも Amh が中腎内へ浸潤する可能性が考えられた.

中腎の間充織内に存在する低濃度の Amh を, 一般的な抗 Amh 抗体を用いて免疫組織化学的に検出することは困難である. そこで, 精巣中腎複合体の精巣頭側部または尾側部に rh-AMH を注入して, Amh の検出を試みた. その結果, 12.5 および 13.5 dpc においては, Yamamoto ら(2018)が示唆した精巣頭側部に加えて尾側部からも Amh が間充織を浸潤する様式で中腎内へ移行可能であること, また中腎内へ移行した Amh がミュラー管近傍まで到達し得ることが直接的に示された. 一方で, 注入時の圧力で組織構造が壊れたことにより精巣から中腎内へ Amh が移行した可能性や, 生理的濃度よりも高濃度の Amh が精巣内に存在する場合にのみ濃度勾配依存的に中腎内へ Amh が浸潤する可能性も考えられた.

2. ミュラー管退行開始時期における生理的濃度の Amh の移行経路について

生理的濃度において Amh が精巣から中腎内へ移行するか否かの検討, および Amh が移行する場合は移行領域を検討するため, Amh 移行の候補領域を切断した性腺中腎複合体を用いてミュラー管頭部および中央部の退行程度を評価した. 12.5 および 13.5 dpc における雌雄のミュラー管の一般組織学的所見と管径の計測結果より, 12.5 dpc ではミュラー管の退行が開始されていないことが確認されたため, 培養開始時期は 12.5 dpc とした.

Amh の mRNA は 12.0 dpc 頃に精巣のセルトリ細胞内で合成が開始され, 中腎内では転写は起らない[Münsterberg and Lovell-Badge, 1991; Morrish and Sinclair, 2002]. ウェスタンブロットによる解析の結果, 血液循環を欠く器官培養系において 12.5 dpc から 72 時間培養後の中腎内の Amh 量が培養開始前である 12.5 dpc よりも増加したことから, 生理的濃度の Amh が精巣から中腎内に浸潤性に移行することが明らかとなった. 一方, 同解析により, 12.5 dpc の時点で中腎内に Amh が移行している(図 11A)ことも示されたが, 精巣と中腎を離断して培養した場合(条件 1)にミュラー管の退行が認められなかった(図 14A, B)ことから, ミュラー管の退行を惹起するためには 12.5 dpc の時点で中腎内に移行している Amh 量では不十分であり, 12.5 dpc 以降に中腎内へと移行する Amh が必要であると考えられた.

生理的濃度における Amh の精巣から中腎内への移行経路を検討するため, Amh 移行の候補領域を切断する操作を性腺中腎複合体に加えて培養した. 培養を開始した 12.5 dpc 時点では, 既報のとおり[Orvis and Behringer, 2007]ミュラー管は性腺尾部末端付近までしか伸長していなかったものの, いずれの培養条件でも培養後には中腎末端部付近まで伸長していた. また, 培養後の雌においては, 各条件のミュラー管に差は認められなかった. さらに, 雄において, いずれの培養条件でも精巣内に Amh が検出された. これらより, 条件 1-4 で加えた性腺中腎境界部や中腎への切断操作自体がミュラー管に及ぼす影響は小さく, Amh 移行の候補領域を切断して培養する操作は生理的濃度の Amh の精巣から中腎内への移行経路を検討するのに有効であると判断された.

Yamamoto ら(2018)の報告および rh-AMH の注入実験の結果より, Amh の移行経路の候補領域の一つとして, 精巣頭側部が考えられた. 本研究において精巣と中腎を離断する(条件 1), もしくは精巣中腎境界部の頭部側を切断(条件 2)して培養すると, ミュラー管頭部の管径は対照より有意に増加した. 一方で, 精巣中腎境界部の尾部側を切断(条件 3)して培養すると, ミュラー管頭部の管径は対照と同程度であった. また, ミュラー管周囲の間充細胞については, 精巣頭部側での移行を阻害しなかった条件(対照, 条件 3)ではミュラー管頭部において凝集が認められ, 阻害した条件(条件 1, 2, 4)では認められなかった. これらの結果より, 精巣頭側部から中腎内へ浸潤性に移行した Amh が, ミュラー管頭部の退行を惹起することが明らかとなった(図 15A).

Rh-AMH の注入実験の結果より, 精巣尾側部から中腎内へ移行した Amh がミュラー管中央部の退行を惹起する可能性が考えられた. 本研究において, Amh の精巣から中腎への移行を阻害(条件 1)して培養すると, ミュラー管中央部は対照より有意に増加した. 一方で, 精巣頭側部での移行を阻害(条件 2)して培養すると, ミュラー管中央部の管径は対照と同程度であった. また, 対照および条件 2 ではミュラー管中央部の周囲における間充細胞の凝集が認められ, 条件 1 では認められなかった. これらの結果より, 精巣尾側部から中腎内へ浸潤性に移行した Amh がミュラー管中央部の退行を惹起することが明らかとなった(図 15A). なお, 精巣尾側部での移行を阻害(条件 3)して培養すると, ミュラー管中央部の管径について対照との有意差が Mann-Whitney *U* test により認められている. そのため, 5 条件間の差の検出を試みた Kruskal-Wallis test で有意差が得られていない点を根拠として, 精巣尾側部から Amh が浸潤しないと考えることは, Type II エラーに当たると考えられた. 精巣尾側部には精巣からミュラー管周囲へ伸長する管構造は存在しない[Kulibin and Malolina, 2020; Omotehara *et al.*, 2020]. そのため, セルトリ細胞で産生された Amh は精巣の間質部へと放出され, その後精巣中腎境界領域の間充細胞を浸潤することが示唆された.

13.5 および 15.5 dpc において rete cord 内に Amh が免疫組織化学的に検出されたことから, 精巣索内の Amh が rete cord に移行することが再確認された. これより, rete cord に続く中腎細

管およびウォルフ管を介して中腎内へと移行する可能性が考えられた。また、ミュー管退行開始時期においては中腎細管の基底膜が非連続的であることから[Omotehara *et al.*, 2020], 中腎細管から中腎の間充織に Amh が漏出し, その Amh がミュー管周囲へ到達する可能性も考えられた。これらについて検証するため, 中腎細管およびウォルフ管を介する経路を阻害して(条件 4)培養すると, ミュー管頭部について対照との有意差が Mann-Whitney *U* test により認められた。このことから, rete cord と中腎細管およびウォルフ管を介して中腎内へと移行した Amh が, ミュー管頭部の退行を惹起することが推測された。一方で, rete cord および中腎細管のみならずその周囲の間充織が切断されたことにより, 切断領域周辺の間充織を浸潤して移行する Amh が, ミュー管頭部に到達しにくくなった可能性も考えられた。Rete cord および中腎細管を介して移行する Amh の, 初期のミュー管退行に対する影響程度を検討するためには, 器官培養系とウォルフ管の発達阻害を組み合わせた実験系等によるさらなる検証が必要である。

3. 15.5 dpc 付近における Amh の移行経路について

本研究において, 15.5 dpc では精巢中腎境界部における結合組織の形成が進行し, 精巢の白膜も肥厚していること, および精巢内に注入した rh-AMH が中腎内へ移行しにくいことを示した。加えて, 15.5 dpc の rete cord 内にも Amh が存在することを示した。以上より, 発生に伴い結合組織が発達すると, 精巢中腎境界部の尾部側からは中腎内へ Amh が移行しにくくなることが示唆された。また, Amh が rete cord および中腎細管を介して中腎内へ移行後, ミュー管周囲へ到達することが推測された(図 15B)。本経路により中腎内に移行した Amh がミュー管周囲まで到達する詳細な機序は不明であるが, rete cord と中腎細管およびウォルフ管はミュー管とは接続していないため, rete cord と中腎細管の接続部もしくは中腎細管とウォルフ管の接続部から Amh が中腎の間充織へ漏出する可能性や, rete cord および中腎細管を介してウォルフ管へと到達した Amh が中腎の間充織へと漏出して, ミュー管近傍へ到達する可能性も考えられた。一方で, 15.5 dpc の雄マウスにおいてミュー管のとくに尾部が断片的に残存する現象が認

められている[Kobayashi *et al.*, 2004]. このことから、発生が進行した段階では、Amh の局所的な濃度差を生じさせる何らかの経路が、ミュー管尾部の退行に重要となる可能性も考えられた。発生が進み結合組織が発達した時期における Amh の移行経路を解明するためには、さらなる研究が必要である。

4. テストステロンの移行経路について

テストステロンはステロイドホルモン的一种であり、胎子性ライディッヒ細胞で合成されたアンドロステンジオン等が最終的にセルトリ細胞内で 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (HSD17 β 3) の作用を受けることにより合成される[O'Shaughnessy *et al.*, 2000]. テストステロンの受容体は、核内受容体スーパーファミリーに属するアンドロゲン受容体であり、ホルモン誘導性転写因子として機能する。アンドロゲン受容体の発現はテストステロンによって誘導されるが[Bentvelsen *et al.*, 1995; Murashima *et al.*, 2011, 2015], その発現方向が rete cord と中腎細管およびウォルフ管の一連の管内を通過することにより形成されるテストステロンの濃度勾配と一致することから、管内を通過するテストステロンがウォルフ管の発達に重要であると考えられている[Bentvelsen *et al.*, 1995; Tong *et al.*, 1996]. 興味深いことに、本研究においてウォルフ管と接続する中腎細管を切断すると(条件 4), ウォルフ管は退行した。これより、本研究によっても、rete cord および中腎細管を介して直接的に同側のウォルフ管へと移行する高濃度のテストステロンが、ウォルフ管の発達に重要であることが再確認された。また、精巢中腎境界部の頭部側を切断して培養した場合には(条件 2), ウォルフ管が発達した。マウスにおいてテストステロンの合成は 12.5 dpc 頃から開始されることから[Murashima *et al.*, 2015], 培養開始前に rete cord および中腎細管内に移行したテストステロンが、ウォルフ管に作用した可能性が考えられた。テストステロンと Amh の移行経路について相違が認められた理由は不明であり、この点についてのさらなる研究が進められることが期待される。

5. 器官培養法について

器官培養系は性腺および生殖道の発達に関する研究に多用されてきた[Picon, 1969; Picard and Josso, 1984; Buehr *et al.*, 1993; Tong *et al.*, 1996; Matoba *et al.*, 2008; Hiramatsu *et al.*, 2009]. ミュラー管に関する研究においては, 培養液への rh-AMH の添加実験によりミュラー管退行への Amh の関与が解明された[Tsuji *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Tanwar *et al.*, 2010]. また, Yamamoto ら(2018)は Amh が精巣から中腎内へ浸潤することを示したが, これは血液循環が存在する *in vivo* では解明できなかったことである. 本研究では, 性腺中腎境界部を部分的に切断することにより Amh の移行経路の詳細を明らかとしたが, このような実験操作は *in vivo* では極めて難しく, これも器官培養系でのみ可能である. とくに, Amhr2 発現開始前である 12.5 dpc [Arango *et al.*, 2008]から培養を行いミュラー管の退行が誘導されたことから, 本実験の器官培養系は Amh の移行経路の検討に有効と考えられた. また, 本実験で使用したゲルシートは Hasegawa ら(2020)のゲル円柱よりも安定的に作製可能であることに加え, 厚さや大きさの制御も容易であることから, 性腺中腎複合体を用いた培養実験の安定化への一助となると考えられた. 一方で, 本章で用いた培養法では精巣より尾部側の中腎, とくに泌尿生殖洞付近の形態を保った状態で培養することは困難であり, 中腎尾部への Amh の移行経路については検討することはできなかった. 同領域の形態を保存可能な培養系を確立することにより, ミュラー管の退行機序をより詳細に解明可能と考えられた.

I-5. 小括

Amh が血液循環を介さない様式でミュー管に作用するという概念は, 1950 年頃には Jost により提唱されていた. しかしながらそれ以来, Amh がミュー管に到達する詳細な経路は未解明のままであるとともに, Amh がホルモンに分類されたことにより, ミュー管への Amh の移行は血液を介すると考えられてきた. その後, Yamamoto ら(2018)により浸潤性の Amh の移行が再発見されるとともに, Amh が精巣頭側部から中腎内へ浸潤することが示唆された. 本章では, ミュー管の退行開始時期において, Amh が精巣から中腎内へ浸潤性に移行することを直接的に示した. また, 精巣頭側部から移行した Amh がミュー管頭部の退行を惹起すること, および精巣尾側部から移行した Amh がミュー管中央部の退行を惹起することを明らかにした. さらに, ミュー管の退行開始時期におけるミュー管中央部の退行には, rete cord および中腎細管を介してミュー管近傍まで到達する Amh よりも, 間充織を介して浸潤性に中腎内へ移行した Amh の方が重要である可能性が示された.

本章の内容は, *Developmental Dynamics* 誌で公表している.

第Ⅱ章

発生中のマウスミュラー管の構造を 維持可能な器官培養法の検討

II-1. 小緒

哺乳類において生殖道の正常な発生は生殖に重要である。雄性生殖道は精子成熟, 精子貯蔵, 精子輸送の場として重要な役割を有しており, 雌性生殖道は受精, 着床, 胚発生の場合として重要な役割を有する[Zhao and Yao, 2019]。発生過程において, 雄でも雌性生殖道の原基であるミュー管が形成される。雄のミュー管は, 精巣内のセルトリ細胞から分泌される *Amh* がミュー管周囲間充織に発現する *Amhr2* に結合することで, 出生前に消失する[Zhao and Yao, 2019]。

生殖道に関する研究には, 器官培養系が大きく貢献してきた。中でもフィルターを用いた培養法は, ミュー管の退行機序の検討に関する研究に多用されてきた。例えば, フィルター方式で培養した XX 性腺中腎複合体に rh-AMH を添加することで, *Amh* がミュー管を退行させることが直接的に証明されている[Tsuji *et al.*, 1992; Wilson, *et al.*, 1993]。一方で, 性腺の形態の保存は悪く, 長期間培養した場合は性腺が扁平化する[Hasegawa *et al.*, 2020]。また, その性腺内のセルトリ細胞の性質は保存されていない[Hasegawa *et al.*, 2020]。第 I 章では, より生体に近い *Amh* 濃度で検討するため, 性腺の研究に汎用されているアガロースゲル法を採用して性腺の性状を保存した[Kato *et al.*, 2023]。これにより, 精巣頭側部から中腎内へ移行した *Amh* がミュー管頭部の退行を惹起することを直接的に明らかとするとともに, 精巣尾側部からも中腎内へ *Amh* が移行してミュー管中央部の退行を惹起することを示した[Kato *et al.*, 2023]。これらは, 器官培養系が血液中の *Amh* の影響を受けないことや, 胎子生体内では困難である組織の切断などの実験操作により解明が可能となった[Kato *et al.*, 2023]。しかしながら, この培養法では性腺と付着していない尾部側の中腎の形態を保存できず, ミュー管尾部の退行機序を含め, 尾部側の生殖道の解析を行うことは出来ていない[Kato *et al.*, 2023]。そこで第 II 章では, ミュー管尾部の形態を保存可能な器官培養法について検討した。

II-2. 材料および方法

1. 供試動物および飼育方法

雌雄の ICR 系マウス(日本 SLC)を用いて一晩同居法による交配を行い, 膣栓確認日の正午を 0.5 dpc として, 12.5 dpc 付近のマウス胎子を実験に用いた. 動物の飼育および実験は, 「神戸大学動物実験実施規則」(許可番号 29-05-02, 2022-07-01)に従った. 供試動物の飼育法については第 I 章と同様に行った.

2. 器官培養

1) アガロースゲルブロックおよびゲルシートの作製

アガロースゲルブロックおよびゲルシートの作製は, 第 I 章と同様に行った. アガロースゲルブロックは, 約 7×7×7 mm となるように作製した. アガロースゲルブロック上の溝の作製には, 19G の注射針(直径 1.1 mm, テルモ)の断片を用いた. ゲルシートは, 1×7 mm の大きさに作製した.

2) ゲル円柱の作製

マイクロインジェクション用のガラスキャピラリー (Model G1, 内径 0.6 mm)を用いて, 円柱状のゲルを作製した. ゲル円柱は培養組織片と同程度の長さに切断して, 実験に用いた.

3) 採材および器官培養

HEPES 添加 DMEM 中で, 12.5 dpc のマウス胎子の肝臓から頭部側を切除した(図 16A). 加えて, 性腺中腎複合体, 後腎および膀胱以外の腹腔内臓器を全て切除した(図 16A). 次に, 後肢の付け根より 3 somites 尾部側の位置で尻尾を切除し, 両側の後肢も切除した(図 16B). その後, 正中で左右に割断し(図 16C), 性腺の最頭部から頭側へ 2 somites の位置で体幹の頭部側を切除した(図 16C). さらに, 中腎より外側の体壁を切除し(図 16D), 神経管を含む背

側の領域を切除した(図 16E). これを, アガロースゲルブロックの溝内に背側が下となるように設置した(図 16F, F'). その後, 水平方向の屈曲を防ぐためのゲル円柱を, 胎子の正中側に設置した(図 16F, F'). さらに, 器官の変形を阻止するとともに, 組織への培養液の浸透性を高めるためにゲルシートを器官上に設置した(図 16F, F'). これを直径 15 mm の 24 ウェルプレート of the ウェル中央部に設置し(図 16F), 性腺および中腎が気相域に位置するように HEPES 添加 DMEM を 520 μ L 入れ, 培養開始時まで 4°C で保管した. 培養開始直前に同量の KSR 添加 DMEM に入れ換え, 37°C, 5% CO₂ 条件下で 72 時間培養した. KSR 添加 DMEM は毎日, 全量を交換した.

3. 一般組織学的および免疫組織学的解析

培養後は体幹部から性腺中腎複合体を離断し, 第 I 章と同様の方法で組織標本を作製して組織学的な解析に用いた.

4. ミュラー管の管径の計測

ミュラー管の管径の計測方法は, 第 I 章と同様の方法で行った. ただし, ミュラー管頭部として性腺の最頭側部付近, ミュラー管中央部として性腺の最尾側部付近, ミュラー管尾部として性腺の最尾側部から尾側へ 200 μ m 付近を計測した(図 17). 個体ごとに HE 染色をした切片上でミュラー管頭部, 中央部および尾部の短径を, それぞれ切片 4 枚分計測し, その平均値を算出した. また, 第 I 章でミュラー管頭部および中央部の管径の計測を行った 12.5, 13.5 dpc の雌雄マウス, および性腺中腎複合体のみで培養した標本について, 第 II 章の定義に従って再計測した. 第 II 章の方法で培養した雌雄のミュラー管の管径は Mann–Whitney *U* test (BellCurve for Excel, version 3.23; SSRI) で評価し, 有意水準は 5% 未満とした.

II-3. 結果

1. 培養後の性腺中腎複合体の形態に関する肉眼的所見

性腺と後腎の位置関係は、培養前後で大きな変化は認められなかった(図 18A, B). 性腺と付着している領域の中腎は性腺に沿うように伸長し、性腺尾側部末端付近の中腎はわずかに屈曲していた(図 18A', B'). 性腺と付着していない尾部側の中腎は体幹部に沿って伸長し(図 18A, B), 性腺中腎複合体のみで培養した場合(図 18C)と異なり、直線的に伸長していた。培養後の中腎内では、ミューラー管が中腎尾部末端まで伸長していることが確認された(図 18A', B'). 培養後の精巣は、培養開始時の 12.5 dpc(図 19)よりも肥厚していたが(図 18B), 15.5 dpc(図 19)ほどは肥厚していなかった。

2. 性腺中腎複合体の組織学的解析

培養後の精巣索内には Amh の陽性反応が検出され、Amh 強陽性を示す細胞も存在した(図 20A). 一方で、13.5 dpc の精巣(図 20B)よりも Amh の陽性程度は弱かった。精巣索は 15.5 dpc(図 22)ほどは発達していなかったが、培養後の雄の精巣内でも明瞭に認められた(図 21A, B). 培養後の雄では、ミューラー管に管腔が形成されていたものの、ミューラー管上皮細胞の変性が認められた(図 21A'-C'). さらに、ミューラー管周囲の間充細胞の凝集は 15.5 dpc(図 22)よりは弱いものの、培養開始時の 12.5 dpc(図 22)より凝集していた(図 21A'-C', A''-C''). 一方で、培養後の雌では、ミューラー管の管腔が形成されており、ミューラー管周囲の間充細胞の凝集は認められなかった(図 21D'-F', D''-F''). また、培養後のウォルフ管は、雄では管腔が形成され発達が進行していた(図 21A'-C'). 一方、雌では上皮細胞内に多数の空胞が認められ、退行が進行していた(図 21D'-F').

3. ミューラー管の管径の計測

培養後のミューラー管の管径については、性腺中腎複合体のみで培養した場合と異なり、本培

養法を用いて培養した標本ではミュー管頭部および中央部に加えてミュー管尾部についても計測可能であった。雄のミュー管の管径について比較すると(図 23), ミュー管中央部ではミュー管頭部よりも小さく, 13.5 dpc の精巢中腎複合体および 12.5 dpc から精巢中腎複合体のみで培養した場合と同様の傾向を示した。また, ミュー管尾部の管径はミュー管中央部よりも大きく, 13.5 dpc の精巢中腎複合体の場合と同様の傾向を示した。雌のミュー管の管径について比較すると(図 23), ミュー管中央部はミュー管頭部よりも小さく, 13.5 dpc の卵巢中腎複合体および卵巢中腎複合体のみで培養した場合と同様の傾向を示した。一方, ミュー管尾部の管径はミュー管中央部よりも大きく, 13.5 dpc の卵巢中腎複合体とは異なる傾向を示した。本章の培養法で培養した雌雄のミュー管の管径を比較すると, ミュー管頭部, 中央部, 尾部のいずれにおいても, 雌よりも雄の方が, 有意に小さかった($P<0.001$, 図 23)。

II-4. 考察

本章の器官培養法では、中腎尾部までの走行方向が保存され、ミュー管尾部まで管径を計測可能であった。発生が進むにつれて、精巣尾部末端付近の中腎は精巣に沿うように屈曲する(図 19)が、本章の培養法で培養した場合にも、精巣尾部付近の中腎の屈曲が認められた。一方で、15.5 dpc 付近になると、精巣尾部末端付近の中腎は精巣に沿うように屈曲後、それより尾部側の中腎は外側方向へと屈曲するが[McKey *et al.*, 2022], その形態は本章の培養法では認められなかった。ミュー管の正常な発生には、後腎(腎臓)および性腺と中腎との三次元的な位置関係、および周囲の線維(ligament)が重要である[McKey *et al.*, 2022]。今回、培養前後で後腎と性腺との位置関係はほとんど変わらず、精巣下降も認められなかったことや、体幹を直線的に伸長して培養したことが、中腎尾部の屈曲に影響したと考えられた。

発生が進むにつれて、雄ではミュー管周囲の間充細胞の凝集やミュー管上皮の変性が認められる[Dyche, 1979]。一方、雌では変性したミュー管上皮細胞が認められるものの、ミュー管周囲の間充細胞の凝集は認められない[Dyche, 1979]。さらに、第 I 章で、ミュー管の退行開始前の 12.5 dpc では雌雄のミュー管管径は同程度である一方、13.5 dpc になると雌より雄のミュー管の方が、管径が小さくなることを示した[Kato *et al.*, 2023]。本章の培養法を用いた場合にも、雄におけるミュー管周囲の間充細胞の凝集が認められたことに加え、雌よりも雄の方がミュー管の管径が有意に小さかった。以上から、本章の器官培養法では、ミュー管頭部および中央部に加えて尾部まで、浸潤性に移行した Amh が退行を惹起したことが示された。

従来の器官培養法では、ミュー管尾部の形態を保存することが困難であるため[Kato *et al.*, 2023], ミュー管尾部への Amh の移行機序については検討できていない。今回採用した、体幹部に性腺中腎複合体を付着させる器官培養法では、精巣索内に Amh が検出されたこと、ミュー管頭部および中央部の退行が惹起されたことに加えて、中腎尾部までの形態が保存され、さらにミュー管尾部まで浸潤性に移行した Amh による退行が惹起された。これより、本培養法は、生体内に近い Amh の濃度条件下でミュー管尾部までの退行を評価するのに適した系で

あると考えられた。一方で、雌の培養後のミュラー管尾部は 13.5 dpc の雌とは異なる傾向を示したため、雌のミュラー管尾部の解析に本培養法を用いる場合には注意が必要である。

ミュラー管の退行はミュラー管頭部側から開始される[Tsuji *et al.*, 1992]。これは、Amh の受容体である Amhr2 の発現がミュラー管頭部から発現が開始されるためとされている[Tsuji *et al.*, 1992]。雄マウスでは、Amhr2 の発現は 13.0 dpc 頃に開始され、その後ミュラー管尾部方向へと順に進行し、13.5 dpc までに最尾側部まで到達する[Arango *et al.*, 2008]。一方で、ミュラー管の退行は頭側から一様に進行するのではなく、退行が先行する部位が複数存在する。例えば、15.5 dpc の雄マウスでは、ミュラー管は断続的に残存し[Kobayashi and Behringer, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004]、その後 18.5 dpc までにミュラー管は消失する[Dyche, 1979]。この現象は、精巣から中腎内へ浸潤した Amh が中腎尾部方向へと一様に拡散する様式では説明できない。そのため、例えば血中 Amh など、発生が進むにつれて Amh の局所的な濃度差を生じさせる何らかの機序の存在が考えられた。ミュラー管の遺残は雄の有性生殖能力に影響するとされており[Jamin *et al.*, 2002; Orvis *et al.*, 2008; Migone *et al.*, 2017]、ミュラー管の退行機序の解明、中でもミュラー管への Amh の移行機序の理解は重要である。本培養法を用いたミュラー管尾部の解析が、その機序解明の一助となることが期待される。

II-5. 小括

器官培養系は性腺および中腎の発生に関する研究に多用され、ミュラー管の退行機序に関する研究にも貢献してきた。一方で、従来の器官培養法では、性腺の発達もしくは中腎の形態の保存が不十分であり、ミュラー管尾部の解析に用いることができなかった。今回採用した、体幹部に性腺中腎複合体を付着させる器官培養法では、中腎尾部まで形態が保存されたこと、精巢内に Amh が発現したこと、およびミュラー管頭部から尾部までの退行が惹起されたことから、ミュラー管尾部の退行の解析に利用可能であると考えられた。さらに、ミュラー管尾部の少なくとも頭部側においては、浸潤性に移行した Amh が退行に関与することが示された。ミュラー管の遺残は雄の有性生殖能力に影響するとされており、ミュラー管の退行機序の解明、中でもミュラー管への Amh の移行機序の理解は重要である。本章で示したミュラー管尾部まで解析可能な器官培養法は、Amh の移行機序を理解する上で重要な方法となることが期待される。

本章の内容は、*The Journal of Veterinary Medical Science* 誌で公表している。

総括

ヒトを含む哺乳類は有性生殖を行うが、胚発生初期においては雌性生殖道の原基であるミュラー管が雄においても形成され、精巣から分泌される抗ミュラー管ホルモン(Amh)の影響で出生前に消失する。ミュラー管の退行開始時期において、Amh が精巣から中腎内へ浸潤性に移行して同側のミュラー管を退行させることが近年明らかとなった[Yamamoto *et al.*, 2018]。しかしながら、Amh が精巣から中腎内へ移行し、ミュラー管周囲まで到達する詳細な経路は未だ不明である。そこで本研究では、マウスをモデル動物として採用し、血中 Amh の影響を受けない器官培養系を用いることで、ミュラー管頭部および中央部への Amh の移行経路について検討を行った。また、従来の器官培養法ではミュラー管の尾部の形態を維持することが難しく、同部位へ浸潤性の Amh の移行経路については検討できていない。そこで、ミュラー管尾部の形態を保存可能な器官培養法についても検討を行った。

第 I 章では、性腺の形態の保存を可能とする器官培養法を用いて、ミュラー管の退行開始時期における Amh の精巣から中腎領域、とくにミュラー管中央部への移行経路について検討した。その結果、精巣から中腎内へ浸潤した Amh がミュラー管の退行を惹起すること、とくにミュラー管退行開始時期においては、精巣中腎境界部の頭側部および尾側部から中腎内へ移行した Amh がミュラー管頭部および中央部の退行に関与することが示された。一方で、血液循環を介して中腎内へと移行した Amh の、ミュラー管退行に対する影響は未だ明らかではない。ウシにおけるフリーマーチンは異性多胎子の場合に認められ、子宮内における双子間の絨毛膜性の血管吻合によって、雄胎子の精巣で産生された Amh が血液を介して雌胎子のミュラー管に作用することが原因と考えられている。一方で、胎盤の構造上、マウスではフリーマーチンの現象は認められない。加えて、片側に精巣、反対側に卵巣を有する真性半陰陽マウスの場合、精巣側のミュラー管は退行し、卵巣側ではミュラー管由来の卵管および子宮が形成されることが報告されている[Katoh-Fukui *et al.*, 1998; Kuroki *et al.*, 2013; Umemura *et al.*, 2015]。また、Jost(1953)によるウサギ胎子を用いた実験では、去勢側でのみミュラー管の発達が認められた。

これらの点から、少なくともミュラー管の退行開始時期のマウスにおいては、血液循環を介して移行する Amh より浸潤性に移行した Amh の方が重要であると考えられた。ミュラー管の退行が進み完全に消失するに至るためには、Amhr2 の発現開始時期に Amh が必要であることが報告されている[Zhan *et al.*, 2006]。これより、ミュラー管の退行を誘導するためには、ミュラー管が形成された後の早い段階で Amh がミュラー管周囲へと到達する必要がある、本研究で示した Amh がミュラー管周囲に直接的に移行する経路がミュラー管退行に重要であることが推測された。Amh の浸潤を惹起する機序については不明であるが、ウォルフ管の発達時にテストステロンの濃度勾配が存在することから[Bentvelsen *et al.*, 1995]、セルトリ細胞から精巣間質部へと分泌された Amh についても同様に濃度勾配依存的に拡散すると推測された。また、単純な拡散のみならず、Amh を迅速に拡散させるための足場となるような因子の存在も考えられた。本研究では、発生が進み結合組織が発達すると、精巣中腎境界部の尾部側からは中腎内に Amh が移行しにくくなることも示唆した。さらに、15.5 dpc の rete cord 内に Amh が検出されたことから、Amh が rete cord および中腎細管を介して中腎内へ移行してミュラー管周囲へと到達することが推測された。一方で、15.5 dpc の雄マウスではミュラー管の断片的な残存が認められている[Kobayashi and Behringer, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004]。この現象は精巣から中腎へと浸潤性に移行した Amh が、中腎の頭部から尾部方向へ一様に浸潤する様式では説明できない。これより、結合組織が発達して精巣尾側部から中腎へ Amh が浸潤しにくくなる時期においては、精巣から中腎へ浸潤性に移行する Amh より、血中を含めた Amh の局所的な濃度を生じさせる未解明の移行経路の方がミュラー管の退行に重要となる可能性が考えられた。

第 II 章では、ミュラー管尾部の構造を維持可能な器官培養法について検討し、ミュラー管尾部の退行の解析に利用可能な器官培養法を確立した。器官培養系は性腺および生殖道の発達に関する研究に多用されてきた[Buehr *et al.*, 1993; Matoba *et al.*, 2008; Hiramatsu *et al.*, 2009]。そして、アガロースゲルブロック、フィルター、ドロップレット方式など様々な方法が汎用されているが、その中でも生殖道の研究には、フィルター方式が最も用いられてきた[Donahoe *et al.*, 1976, 1977; Fujino *et al.*, 2009]。一般に、器官培養系ではアンタゴニストもしくはアゴニス

トの添加[Gupta and Bentlejewski, 1993], 器官の部分的な切除[Fujino *et al.*, 2009], 他器官と組み合わせての培養などを含めて生体内では困難な実験が可能である[Donahoe *et al.*, 1976, 1977; Martineau *et al.*, 1997]. これまでに, 精巣への注入実験によってテストステロンが浸潤性にウォルフ管の発達に関与することが明らかとなった[Tong *et al.*, 1996]. ミュラー管においては, 培養液への rh-AMH の添加実験により, ミュラー管退行への Amh の関与が解明された[Tsuji *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Tanwar *et al.*, 2010]. また, Yamamoto ら(2018)は Amh が精巣から中腎内へ浸潤することを示したが, これは血液循環が存在する *in vivo* では解明できない. さらに, 本研究の第I章で, 性腺中腎境界部を部分的に切断することにより Amh の移行経路の詳細を明らかとしたが, これも器官培養系でのみ可能であった. 一方で, 従来の培養法では精巣より尾部側の中腎, とくに泌尿生殖洞付近の形態を保った状態で培養することは困難であり, 中腎尾部への Amh の移行経路については検討不能であった. 第II章で示した器官培養法は, 中腎尾部まで形態を維持可能であること, 精巣内での Amh の産生が確認されたこと, ミュラー管頭部から尾部の全域で退行が惹起されたことから, 今まで検討出来なかったミュラー管尾部への Amh の移行経路の検討に有効であると考えられた. さらに, ミュラー管尾部の少なくとも頭部側において, 浸潤性に移行した Amh が退行に関与することが示された.

ミュラー管の遺残は有性生殖能力に影響するとされている. 例えば, ミュラー管の遺残が認められたマウスにおいて, 精管が閉塞し, 精子の通過が妨げられる事例が報告されている[Jamin *et al.*, 2002; Orvis *et al.*, 2008; Migone *et al.*, 2017]. また, ヒトにおいてもミュラー管由来の器官が遺残する, ミュラー管遺残症候群が報告されている[Da Aw *et al.*, 2016; Picard *et al.*, 2017; Punjani and Lamb, 2020]. よって, その背景となるミュラー管退行機序の解明, 中でも Amh の移行機序の理解は重要であると考えている. 本研究では, ミュラー管退行開始時期において生体濃度の Amh が精巣から中腎へ浸潤性に移行し同側のミュラー管の退行を惹起することを明らかとした. さらに, 精巣頭側部から中腎内へ移行した Amh がミュラー管頭部の退行を惹起すること, および精巣尾側部から移行した Amh がミュラー管中央部の退行を惹起すること, ミュラー管尾部の少なくとも頭部側において浸潤性に移行した Amh が退行に関与することを直接的に

示し, Amh の移行機序について新たな知見を得ることができた. また, 今まで検討されてこなかったミュー管尾部の退行機序について解析可能な器官培養法を確立することができ, 本研究がミュー管退行機序のさらなる理解への一助となることが期待される.

Abstract

Müllerian ducts (MD), the primordium of the female reproductive tract, are also formed in males during early development, and are disappeared before birth under the influence of anti-Müllerian hormone (Amh) secreted by the testis. Yamamoto (2018) showed that Amh infiltrates from the testis into the mesonephros and induces regression of the ipsilateral MD at the start of MD regression in mice. However, the detailed pathway of Amh infiltration from the testis into the mesonephros remains unclear. In this study, it was investigated that the diffusion pathway of Amh to the cranial region of the MD (cranial MD) and the middle region of the MD (middle MD) at the start of the MD regression by using an organ culture system that is not affected by Amh in the blood. Furthermore, it is difficult to maintain structural integrity, such as the length and diameter and normal direction of elongation of the caudal region of the MD (caudal MD), in conventional organ culture systems. Therefore, the pathway of Amh to the caudal MD remains uncharted. In this study, it was also investigated that an organ culture method that can maintain the morphology of the caudal MD in mice to enable examination of the mechanisms underlying the caudal MD regression.

In Chapter I, the diffusion pathway of Amh from the testis to the mesonephros at the start of MD regression in mice was examined. To investigate the region where Amh may infiltrate from the testis to the mesonephros, Amh was detected on the sections of the testis-mesonephros complexes at 12.5, 13.5 and 15.5 dpc by using the anti-Amh antibody and aniline blue staining was used, which can evaluate the degree of connective tissue formation. In addition, after injection of recombinant human-AMH into the cranial or caudal region of the testes at 12.5, 13.5 and 15.5 dpc, AMH/Amh was detected on the sections by using the anti-Amh antibody. To investigate whether Amh at physiological concentrations can infiltrate from the candidate region considered from the results of these experiments, we used organ culture system. The amount of Amh in the mesonephros of the testis–mesonephros complexes cultured for 72 h from 12.5 dpc and at 12.5 dpc was analyzed by western-blotting. Furthermore, candidate regions for the diffusion pathway of Amh were incised in the gonad-mesonephros complexes at 12.5 dpc and incubated for 72 h. After incubation, the MD regression was evaluated by measuring the cranial and middle MD on transverse HE stained sections. The positive reaction of Amh was detected in the testis cords at 12.5, 13.5 and 15.5 dpc and in the rete cord at 13.5 and 15.5 dpc. Then it was reconfirmed that Amh infiltrates to the mesonephros through the rete cord. The region with less connective tissue and the connection between the testis and the mesonephros were noted in both the cranial and caudal region of the testes at 12.5 and 13.5 dpc. Furthermore, the positive reaction of AMH/Amh was continuously observed from the testis near the recombinant human-AMH injection site to the mesenchyme near the MD. On the other hand, the mesenchyme of the mesonephros was negative in the section at the opposite pole. These results suggested that Amh can infiltrate the cranial and caudal region of the testes at the start of the regression of the MD. It was shown that the amount of Amh in the cultured male mesonephros was higher than that in the male mesonephros at 12.5 dpc by western-blotting.

This result directly indicated that Amh at the physiological concentration infiltrates from the testis to the mesonephros. In the testis–mesonephros complex cultured by inhibiting the diffusion of Amh through the cranial region of the testis, the cranial MD diameter was significantly increased compared to the control. On the other hand, in the testis–mesonephros complex cultured by inhibiting the diffusion of Amh through the caudal region of the testes, the cranial MD diameter was not different from the control. These results indicated that Amh infiltrating from the cranial region of the testis induces the regression of the cranial MD. In the testis–mesonephros complex cultured by inhibiting the diffusion of Amh through the cranial region of the testis, the middle MD diameter was not different from the control. This result indicated that Amh also infiltrates from the caudal region of the testes and induced the regression of the middle MD. When the recombinant human-AMH was injected into the cranial, center or caudal region of the testis at 15.5 dpc, AMH/Amh was detected in the testis cords and in the portion of the interstitium near the injection site. However, in the boundary region between the testis and the mesonephros, AMH/Amh was only weakly detected in the rete cord and was not detected in the mesenchyme. In addition, at 15.5 dpc, the connective tissue formation at the boundary region between the testis and the mesonephros progressed and the boundary region was narrower compared with those at 12.5 and 13.5 dpc. These results suggested that as development progresses, Amh infiltration from the caudal region of the testis to the mesonephros becomes less likely. These collective results also suggested that it may become more important for Amh to reach the vicinity of the MD via the rete cords, mesonephric tubules, and Wolffian duct as development progresses.

In Chapter II, it was examined that organ culture methods that can maintain the morphology of the caudal MD. The gonad-mesonephros complex has been cultured alone in the conventional methods. In this study, the gonad–mesonephros complex, metanephros, and urinary bladder of mouse fetuses at 12.5 dpc attached to the body trunk were cultured on agarose gels for 72 h. Amh in the testis was then detected by immunohistochemistry on the sections. In addition, HE stained sections were used for general histology and measurement of MD diameter. The cultured caudal region of the mesonephros was elongated along the body trunk, and the course of the mesonephros was maintained in many individuals. In males, the cultured testes were thickened and Amh was detected in the cultured testis cords. Although a lumen of the cultured MD was formed, mesenchymal cells aggregated around the cranial, middle and even caudal MD and the MD epithelial cells degenerated, which are characteristics of MD regression. The morphology of the mesonephros was maintained up to the caudal region, allowing for the measurement of MD diameter in the caudal region. In males, the middle MD diameter was smaller than the cranial MD diameter, and the caudal MD diameter was larger than the middle MD diameter, similar to the MD at 13.5 dpc. Furthermore, the cultured male MD diameter was significantly smaller than that of the female. These results indicate that cranial, middle and even caudal MD regression advanced in males when the MD was cultured using the present culture system. Based on these results, it was concluded that the development of the MD was maintained in the present organ culture system.

Using this culture system, Amh infiltration to the caudal MD can be examined without the influence of Amh in the circulatory system. This culture system is useful for clarifying the regression mechanism of the caudal MD.

In summary, the present study directly revealed that Amh at physiological concentrations infiltrates from the testis to the ipsilateral mesonephros at the start of the MD regression. In addition, it was indicated that Amh infiltrating from the cranial region of the testis to the mesonephros induces regression of the cranial MD, and that Amh infiltrating from the caudal region of the testis induces regression of the middle MD at least at the start of the MD regression. Furthermore, the present study established the organ culture method that can maintain the morphology and development of the MD. The organ culture method is useful for studying the regression mechanism of the MD, including the caudal region. It is expected that the present study will contribute to a better understanding of the mechanisms of MD regression.

謝辞

本研究の遂行ならびに本稿の作成において、終始ご懇篤なるご指導とご高閲を賜りました本学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座 横山 俊史 助教ならびに同講座 星 信彦 教授に衷心より深謝の意と敬意を表します。

また、本文をご校閲下さいました本学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座 原山 洋 教授ならびに同講座 佐伯 圭一 准教授に深謝いたします。

さらに、本研究に有益なご指導およびご助言を賜りました本学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座 万谷 洋平 助教に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、ご協力くださいました動物分子形態学教育研究分野および組織生理学教育研究分野教室員の皆様、そして大変親切に実験手技等を指導してくださった先輩方に心より御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究の遂行にあたりその命を捧げてくれた動物に感謝するとともに、深い哀悼の意を表します。

引用文献

- Allard S, Adin P, Gouédard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC, Picard JY, Xavier F. 2000. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: Involvement of β -catenin. *Development* **127**: 3349–3360.
- Arango NA, Kobayashi A, Wang Y, Jamin SP, Lee HH, Orvis GD, Behringer RR. 2008. A mesenchymal perspective of Müllerian duct differentiation and regression in *Amhr2-lacZ* mice. *Mol Reprod Dev* **75**: 1154–1162.
- Baarends WM, van Helmond MJL, Post M, van der Schoot PJCM, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, Uilenbroek JTJ, Karels B, Wilming LG, Meijers JHC, Themmen APN, Grootegoed JA. 1994. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the Müllerian duct. *Development* **120**: 189–197.
- Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. 1994. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* **79**: 415–425.
- Bentvelsen FM, Brinkmann AO, van der Schoot P, van der Linden JETM, van der Kwast TH, Boersma WJA, Schröder FH, Nijman JM. 1995. Developmental pattern and regulation by androgens of androgen receptor expression in the urogenital tract of the rat. *Mol Cell Endocrinol* **113**: 245–253.
- Biason-Lauber A. 2012. Wnt4, Rspo1, and Foxl2 in sex development. *Semin. Reprod Med* **30**: 387–395.
- Blanchard MG, Josso N. 1974. Source of the anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediatr Res* **8**: 968–971.
- Buehr M, Gu S, McLaren A. 1993. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* **117**: 273–281.
- Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. 2005. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell* **9**: 283–292.

- Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, Fisher RA, Bertonis JM, Torres G, Wallner BP, Ramachandran KL, Ragin RC, Manganaro TF, MacLaughlin DT, Donahoe PK. 1986. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* **45**: 685–698.
- Cohen-Haguenaue O, Picard JY, Mattéi MG, Serero S, Nguyen VC, de Tand MF, Guerrier D, Hors-Cayla MC, Josso N, Frézal J. 1987. Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* **44**: 2–6.
- Da Aw L, Zain MM, Esteves SC, Humaidan P. 2016. Persistent Mullerian duct syndrome: a rare entity with a rare presentation in need of multidisciplinary management. *Int Braz J Urol* **42**: 1237-1243.
- di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R. 1994. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol* **8**: 1006–1020.
- Donahoe PK, Ito Y, Hendren WH. 1977. A graded organ culture assay for the detection of Mullerian inhibiting substance. *Surg Res* **23**: 141–148.
- Donahoe PK, Ito Y, Marfatia S, Hendren WH. 1976. The production of Mullerian inhibiting substance by the fetal, neonatal and adult rat. *Biol Reprod* **15**: 329–334.
- Dyche WJ. 1979. A comparative study of the differentiation and involution of the Mullerian duct and Wolffian duct in the male and female fetal mouse. *J Morphol* **162**: 175–209.
- Eisner BH, Bloom DA. 2002. Historical article Wolf and Müller: fundamental eponyms of embryology, nephrology and urology. *J Urol* **168**: 425–428.
- Fujino A, Arango NA, Zhan Y, Manganaro TF, Li X, MacLaughlin DT, Donahoe PK. 2009. Cell migration and activated PI3K/AKT-directed elongation in the developing rat Müllerian duct. *Dev Biol* **325**: 351–362.
- Gonzalez LS, Rota LA, Artibani M, Morotti M, Hu Z, Wietek N, Alsaadi A, Albukhari A, Sauka-Spengler T, Ahmed AA. 2021. Mechanistic drivers of Müllerian duct development and differentiation into the oviduct. *Front cell Dev Biol* **9**: 1–19.
- Guioli S, Sekido R, Lovell-Badge R. 2007. The origin of the Mullerian duct in chick and mouse. *Dev Biol* **302**: 389–398.
- Gupta C, Bentejewski CA. 1993. Role of prostaglandins in the testosterone dependent Wolffian duct differentiation of the fetal mouse. *Biol Reprod* **47**: 1151–1160.

- 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. 2020. Establishment of an organ culture system to induce Sertoli cell differentiation from undifferentiated mouse gonads. *J Vet Med Sci* **82**: 414–421.
- Hiramatsu R, Matoba S, Kanai-Azuma M, Tsunekawa N, Katoh-Fukui Y, Kurohmaru M, Morohashi K, Wilhelm D, Koopman P, Kanai Y. 2009. A critical time window of *Sry* action in gonadal sex determination in mice. *Development* **136**: 129–138.
- Hu YC, Okumura LM, Page DC. 2013. *Gata4* is required for formation of the genital ridge in mice. *Plos Genet* **9**: e1003629.
- Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, Visser JA. 2000. Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res* **55**: 53–67.
- Jacob M, Christ B, Jacob HJ, Poelmann RE. 1991. The role of fibronectin and laminin in development and migration of the avian Wolffian duct with reference to somitogenesis. *Anat Embryol (Berl)* **183**: 385–395.
- Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR. 2002. Requirement of *Bmpr1a* for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet* **32**: 408–410.
- Josso N. 1971. Interspecific character of the Müllerian-inhibiting substance: action of the human fetal testis, ovary and adrenal of the fetal rat Müllerian duct in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* **32**: 404–409.
- Josso N. 1972. Permeability of membranes to the Müllerian-inhibiting substance synthesized by the human fetal testis *in vitro*: a clue to its biochemical nature. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 265–270.
- Josso N. 1973. *In vitro* synthesis of Müllerian-inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. *Endocrinology* **93**: 829–834.
- Josso N. 1974. Effect of PGA2 and PGB1 on the rat foetal Müllerian duct "*in vitro*": absence of relationship to testicular anti-Müllerian hormone. *Biomedicine* **21**: 225–229.
- Josso N. 2002. Jost's hormone inhibitor comes of age. *Trends Endocrinol Metab* **13**: 412–413.
- Josso N, Lamarre I, Picard JY, Berta P, Davies N, Morichon N, Peschanski M, Jeny R. 1993. Anti-Müllerian hormone in early human development. *Early Hum Dev* **33**: 91–99.
- Jost A. 1947. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **36**: 271–315.

- Jost A. 1953. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* **8**: 379–418.
- Jost A. 1959. Sex differentiation and development. *Mem Soc Endor* **7**: 49–62.
- Jost A. 1970. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **259**: 119–130.
- Jost A, Vigier B, Prepin J. 1972. Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. *J Reprod Fertil* **29**: 349–379.
- Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Shiroishi T, Nakahara Y, Hashimoto N, Noguchi K, Higashinakagawa T. 1998. Male-to-female sex reversal in *M33* mutant mice. *Nature* **393**: 688–692.
- Kato S, Yokoyama T, Okunishi N, Narita H, Fujikawa T, Kirizuki Y, Mantani Y, Miki T, Hoshi N. 2023. Direct diffusion of anti-Müllerian hormone from both cranial and caudal regions of the testis during early gonadal development in mice. *Dev Dyn*. (in press) Doi: 10.1183/13993003.00763-2023.
- King TR, Lee BK, Behringer RR, Eicher EM. 1991. Mapping anti Müllerian hormone (*Amh*) and related sequences in the mouse: identification of a new region of homology between MMU10 and HSA19p. *Genomics* **11**: 273–283.
- Kobayashi A, Behringer RR. 2003. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet* **4**: 969–980.
- Kobayashi A, Kwan KM, Carroll TJ, McMahon AP, Mendelsohn CL, Behringer RR. 2005. Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* **132**: 2809–2823.
- Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. 2004. Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development* **131**: 539–549.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* **351**: 117–121.
- Kulibin AY, Malolina EA. 2020. Formation of the rete testis during mouse embryonic development. *Dev Dyn* **249**:1486–1499.
- Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, Tachibana M. 2013. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase *Jmjd1a*. *Science* **341**: 1106–1109.

- Kusaka M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Miyabayashi K, Baba T, Shima Y, Sugiyama N, Sugimoto Y, Okuno Y, Kodama R, Iizuka-Kogo A, Senda T, Sasaoka T, Kitamura K, Aizawa S, Morohashi KI. 2010. Abnormal epithelial cell polarity and ectopic epidermal growth factor receptor (EGFR) expression induced in *Emx2* KO embryonic gonads. *Endocrinology* **151**: 5893–5904.
- Lee MM, Donahoe PK. 1993. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev* **14**: 152–164.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77**: 481–490.
- MacLaughlin DT, Hudson PL, Graciano AL, Kenneally MK, Ragin RC, Manganaro TF. 1992. Mullerian duct regression and antiproliferative bioactivities of Mullerian inhibiting substance reside in its carboxy-terminal domain. *Endocrinology* **131**: 291–296.
- Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B. 1997. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol* **7**: 958–968.
- Matoba S, Hiramatsu R, Kanai-Azuma M, Tsunekawa N, Harikae K, Kawakami H, Kurohmaru M, Kanai Y. 2008. Establishment of testis specific SOX9 activation requires high-glucose metabolism in mouse sex differentiation. *Dev Biol* **324**: 76–87.
- McKey J, Anbarci DN, Bunce C, Ontiveros AE, Behringer RR, Capel B. 2022. Integration of mouse ovary morphogenesis with developmental dynamics of the oviduct, ovarian ligaments, and rete ovarii. *Elife* **27**: e81088.
- McLaren A. 1988. Sex determination in mammals. *Trends Genet* **4**: 153–157.
- McLennan IS, Pankhurst MW. 2015. Anti-Müllerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions. *J Endocrinol* **226**: R45–57.
- Migone FF, Hung PH, Cowan RG, Selvaraj V, Suarez SS, Quirk SM. 2017. Overactivation of hedgehog signaling in the developing Müllerian duct interferes with duct regression in males and causes subfertility. *Reproduction* **153**: 481–492.
- Mishina Y, Whitworth DJ, Racine C, Behringer RR. 1999. High specificity of Müllerian-inhibiting substance signaling *in vivo*. *Endocrinology* **140**: 2084–2088.
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. 1997. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* **124**: 1653–1664.
- Moolhuijsen LME, Visser JA. 2020. Anti-Müllerian hormone and ovarian reserve: update on assessing ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* **105**: 3361–3373.

- Morrish BC, Sinclair AH. 2002. Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* **124**:447–457.
- Mullen RD, Behringer RR. 2014. Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation. *Sex Dev* **8**: 281–296.
- Münsterberg A, Lovell-Badge R. 1991. Expression of the mouse anti Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* **113**: 613–624.
- Murashima A, Miyagawa S, Ogino Y, Nishida-Fukuda H, Araki K, Matsumoto T, Kaneko T, Yoshinaga K, Yamamura K, Kurita T, Kato S, Moon AM, Yamada G. 2011. Essential roles of androgen signaling in Wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. *Reprod Dev* **152**: 1640–1651.
- Murashima A, Xu B, Hinton BT. 2015. Understanding normal and abnormal development of the Wolffian/epididymal duct by using transgenic mice. *Asian J Androl* **17**: 749–755.
- Nachtigal MW, Ingraham HA. 1996. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7711–7716.
- Obara-Ishihara T, Kuhlman J, Niswander L, Herzlinger D. 1999. The surface ectoderm is essential for nephric duct formation in intermediate mesoderm. *Development* **126**: 1103–1108.
- Omotehara T, Wu X, Kuramasu M, Itoh M. 2020. Connection between seminiferous tubules and epididymal duct is originally induced before sex differentiation in a sex-independent manner. *Dev Dyn* **249**: 754–764.
- O’Shaughnessy PJ, Baker PJ, Heikkilä MB, Vainio S, McMahon AP. 2000. Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis — androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal Leydig cells. *Endocrinology* **141**: 2631–2637.
- Orvis GD, Behringer RR. 2007. Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse. *Dev Biol* **306**: 493–504.
- Orvis GD, Jamin SP, Kwan KM, Mishina Y, Kaartinen VM, Huang S, Roberts AB, Umans L, Huylebroeck D, Zwijsen A, Wang D, Martin JF, Behringer RR. 2008. Functional redundancy of TGF-beta family type I receptors and receptor-Smads in mediating anti-Mullerian hormone-induced Mullerian duct regression in the mouse. *Biol Reprod* **78**: 994–1001.
- Pawlina W, Ross MH. 2019. Male reproductive system. *In: Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*, 8th ed., Wolters Kluwer Health, Philadelphia.

- Picard JY, Josso N. 1984. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol* **34**: 23–29.
- Picard JY, Cate RL, Racine C, Josso N. 2017. The persistent Müllerian duct syndrome: an update based upon a personal experience of 157 cases. *Sex Dev* **11**: 109–125.
- Picard JY, Tran D, Josso N. 1978. Biosynthesis of labelled anti-Müllerian hormone by fetal testes: evidence for the glycoprotein nature of the hormone and for its disulfide-bonded structure. *Mol Cell Endocrinol* **12**: 17–30.
- Picon R. 1969. Action du testicule foetal sur le development *in vitro* des canaux de Muller chez le rat. *Archs Anat Microsc Morpho Exp* **58**: 1–19.
- Piprek RP, Kloc M, Kubiak JZ. 2016. Early development of the gonads: origin and differentiation of the somatic cells of the genital ridges. *Results Probl Cell Differ* **58**: 1–22.
- Punjani N, Lamb DJ. 2020. Male infertility and genitourinary birth defects: there is more than meets the eye. *Fertil Steril* **114**: 209–218.
- Roberts LM, Visser JA, Ingraham HA. 2002. Involvement of a matrix metalloproteinase in Mis-induced cell death during urogenital development. *Development* **129**: 1487–1496.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. 2008. Development of the urogenital system. *In*: Larsen's human embryology. 4th ed., Elsevier, Philadelphia.
- Sekido R, Bar I, Narváez V, Penny G, Lovell-Badge R. 2004. SOX9 is upregulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* **274**: 271–279.
- Sharpe RM. 2006. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **20**: 91–110.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischau A, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**: 240–244.
- Skinner MK. 2004. Sertoli cell secreted regulatory factors. *In*: Sertoli cell biology, Elsevier, Amsterdam.
- Svingen T, Koopman P. 2013. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev* **27**: 2409–2426.
- Tanwar PS, Zhang L, Tanaka Y, Taketo MM, Donahoe PK, Teixeira JM. 2010. Focal Müllerian duct retention in male mice with constitutively activated β -catenin expression in the Müllerian duct mesenchyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 16142–16147.

- Teixeira J, He WW, Shah PC, Morikawa N, Lee MM, Catlin EA, Hudson PL, Wing J, MacLaughlin DT, Donahoe PK. 1996. Developmental expression of a candidate Müllerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinology* **137**: 160–165.
- Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. 2001. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* **22**: 657–674.
- Tjio JH, Levan A. 1956. The chromosome number of men. *Hereditas* **42**: 1–6.
- Tong SYC, Hutson JM, Watts LM. 1996. Does testosterone diffuse down the Wolffian duct during sexual differentiation? *J Urol* **155**: 2057–2059.
- Torres M, Gómez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P. 1995. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* **121**: 4057–4065.
- Tsuji M, Shima H, Yonemura CY, Brody J, Donahoe PK, Cunha GR. 1992. Effect of human recombinant Mullerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during Mullerian duct regression in the rat. *Endocrinology* **131**: 1481–1488.
- 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. 2015. Ontogenic and morphological study of gonadal formation in genetically-modified sex reversal XY^{POS} mice. *J Vet Med Sci* **77**: 1587–1598.
- Wainwright EN, Svingen T, Ng ET, Wicking C, Koopman P. 2014. Primary cilia function regulates the length of the embryonic trunk axis and urogenital field in mice. *Dev Biol* **395**: 342–354.
- Wartenberg H. 1985. Morphological studies on the role of the periductal stroma in the regression of the human male Müllerian duct. *Anat Embryol (Berl)* **171**: 311–323.
- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* **87**: 1–28.
- Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, Cate RL. 1993. Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor- β superfamily. *Mol Endocrinol* **7**: 247–257.
- Xavier F, Allard S. 2003. Anti-Müllerian hormone, β -catenin and Müllerian duct regression. *Mol Cell Endocrinol* **211**: 115–121.

- Yamamoto A, Omotehara T, Miura Y, Takada T, Yoneda N, Hirano T, Mantani Y, Kitagawa H, Yokoyama T, Hoshi N. 2018. The mechanisms underlying the effects of AMH on Müllerian duct regression in male mice. *J Vet Med Sci* **80**: 557–567.
- Zhan Y, Fujino A, MacLaughlin DT, Manganaro TF, Szotek PP, Arango NA, Teixeira J, Donahoe PK. 2006. Mullerian inhibiting substance regulates its receptor/Smad signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Mullerian duct regression. *Development* **133**: 2359–2369.
- Zhao F, Yao HHC. 2019. A tale of two tracts: history, current advances, and future directions of research on sexual differentiation of reproductive tracts. *Biol Reprod* **101**: 602–616.

付図および付図説明

図1 発生中のマウスにおけるミュラー管（MD）およびウォルフ管（WD）の 発生のダイアグラム

MDおよびWDは，発生初期に雌雄ともに中腎領域内に形成される．精巣索内でAmh産生が開始される時期（12.5 dpc頃）になると，WD（青実線）は中腎尾部末端まで達する．一方，同時期のMD（ピンク実線）は性腺の尾部末端付近まで伸長している．泌尿生殖洞には達していなかったMDの尾側部（ピンク点線）は，MDの退行開始時期（13.5 dpc頃）までに伸長する．

発生が進むと，雄ではMDは退行し，WDが発達する．一方，雌ではMDが発達し，WDは退行する．

本研究では，おおよそ性腺の半分の位置より頭部側を性腺頭側部，尾部側を性腺尾側部と定義した．また，MDについては，性腺頭側部と同じ高さにあたる領域をMD頭部，性腺尾側部と同じ高さにあたる領域をMD中央部，それより尾部側の領域をMD尾部と定義した．

図1

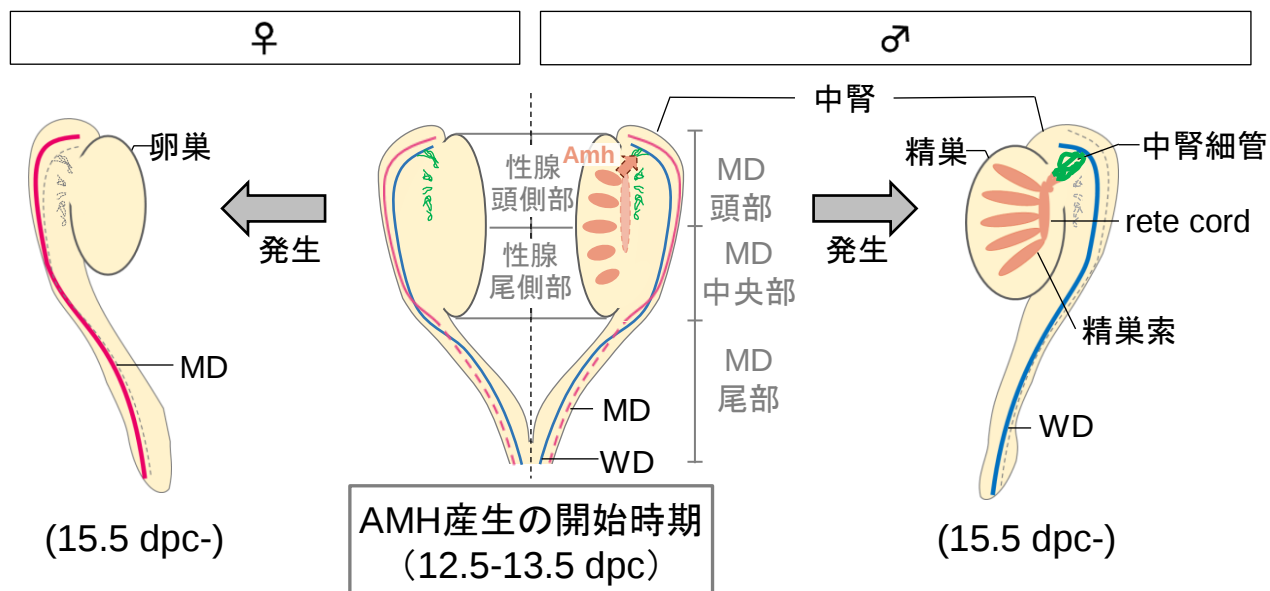


図2 器官培養法

A : ゲルシートの作製方法

50×50×5 mmのガラス板の両端に90 μm厚となるようにScotchテープを貼付し、その上にDMEMに溶解させたアガロースゲルを注いだ。その上にガラス板を置き、ゲルをシート状に伸ばして乾燥させた後、5×0.8 mmに細切した。

B : 培養条件

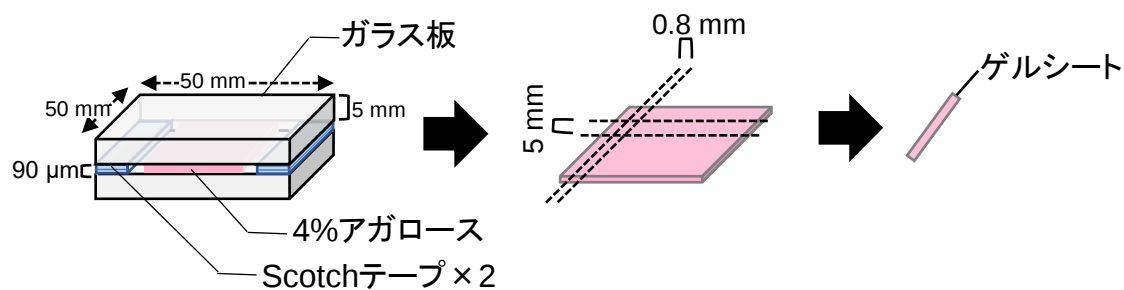
12.5 dpcの性腺中腎複合体に、次の操作を加えて72時間培養した。性腺中腎複合体をそのまま培養した群を対照とした。性腺と中腎を離断し、Amhの移行を阻害して培養した群を条件1とした。性腺中腎境界部の頭部側を切断し、頭部側でのAmhの移行を阻害して培養した群を条件2とした。性腺中腎境界部の尾部側を切断し、尾部側でのAmhの移行を阻害して培養した群を条件3とした。ウォルフ管（WD）と接続する中腎細管を切断し、中腎細管を介するAmhの移行を阻害して培養した群を条件4とした。条件1-4においては、組織の再接着阻止のため、ゲルシートを切断部位に挿入して培養した。なお、12.5 dpc時点でのミュラー管（MD）は、性腺の尾部末端付近まで伸長していた。

C : 培養方法

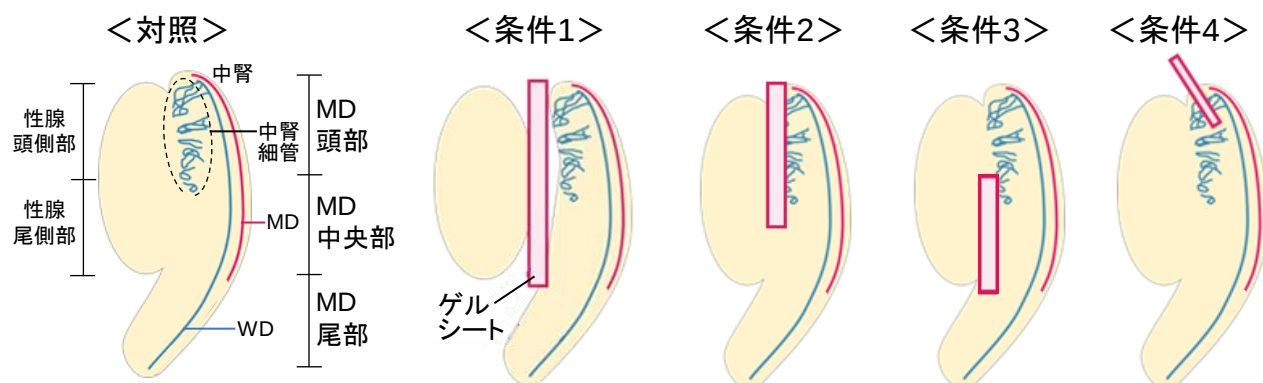
アガロースゲルブロック上に設けた直径約0.8 mmの溝内に、性腺および中腎を設置した。さらに、器官の変形を防ぐためのゲルシートを組織の上に積層した。これを24wellプレートの中央部あたりに設置し、KSR添加DMEM中で72時間培養した。

図2

A



B



C

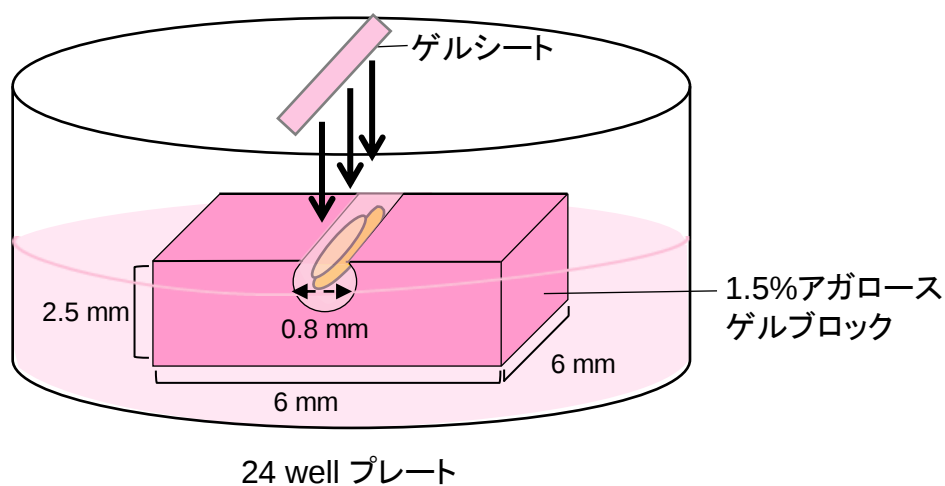


図3 ミュラー管（MD）管径の計測方法

MD頭部として最頭側の中腎細管付近，MD中央部として最尾側の中腎細管付近の管径を計測した．HE染色した25 μm の間断連続切片を各領域4枚用いてMDの短径を計測し，その平均値からMDの退行程度を評価した．

WD：ウォルフ管

図3

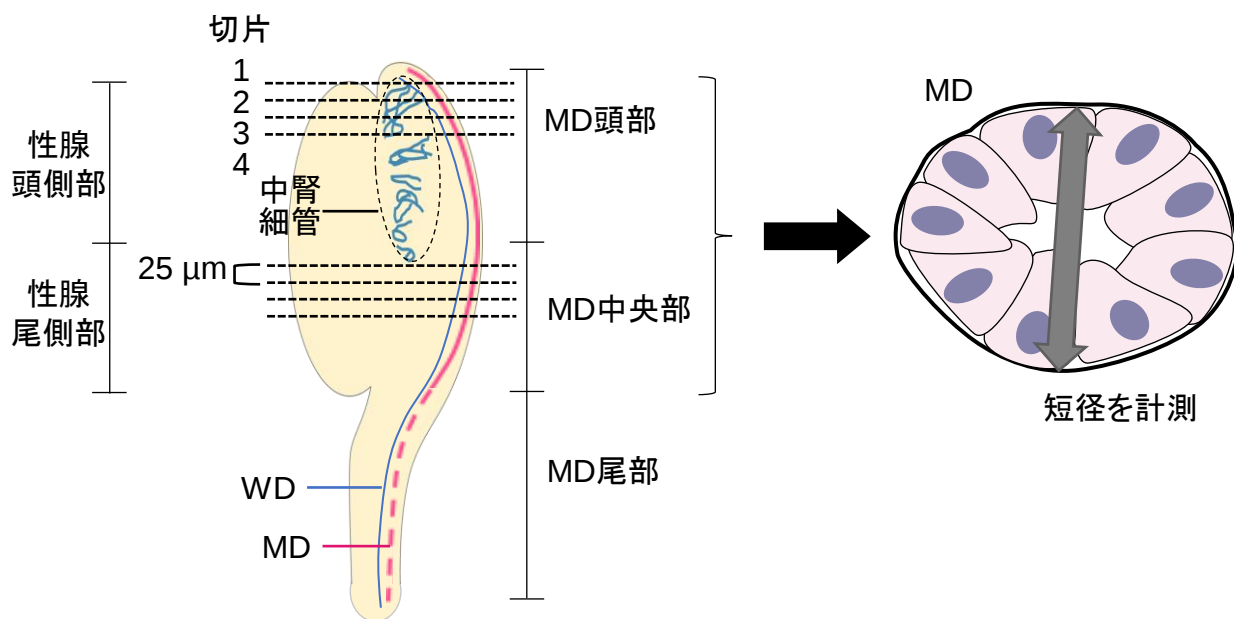


図4 12.5, 13.5および15.5 dpcの精巢中腎複合体におけるAmhの検出像

A : 12.5 dpcの精巢中腎複合体のAmh検出像

精巣索（testis cord : TC）内および精巣間質部にAmhの陽性反応が認められたが，中腎内には陽性反応は認められなかった（A'）．また，rete cord（RC）の形成は不明瞭であった．

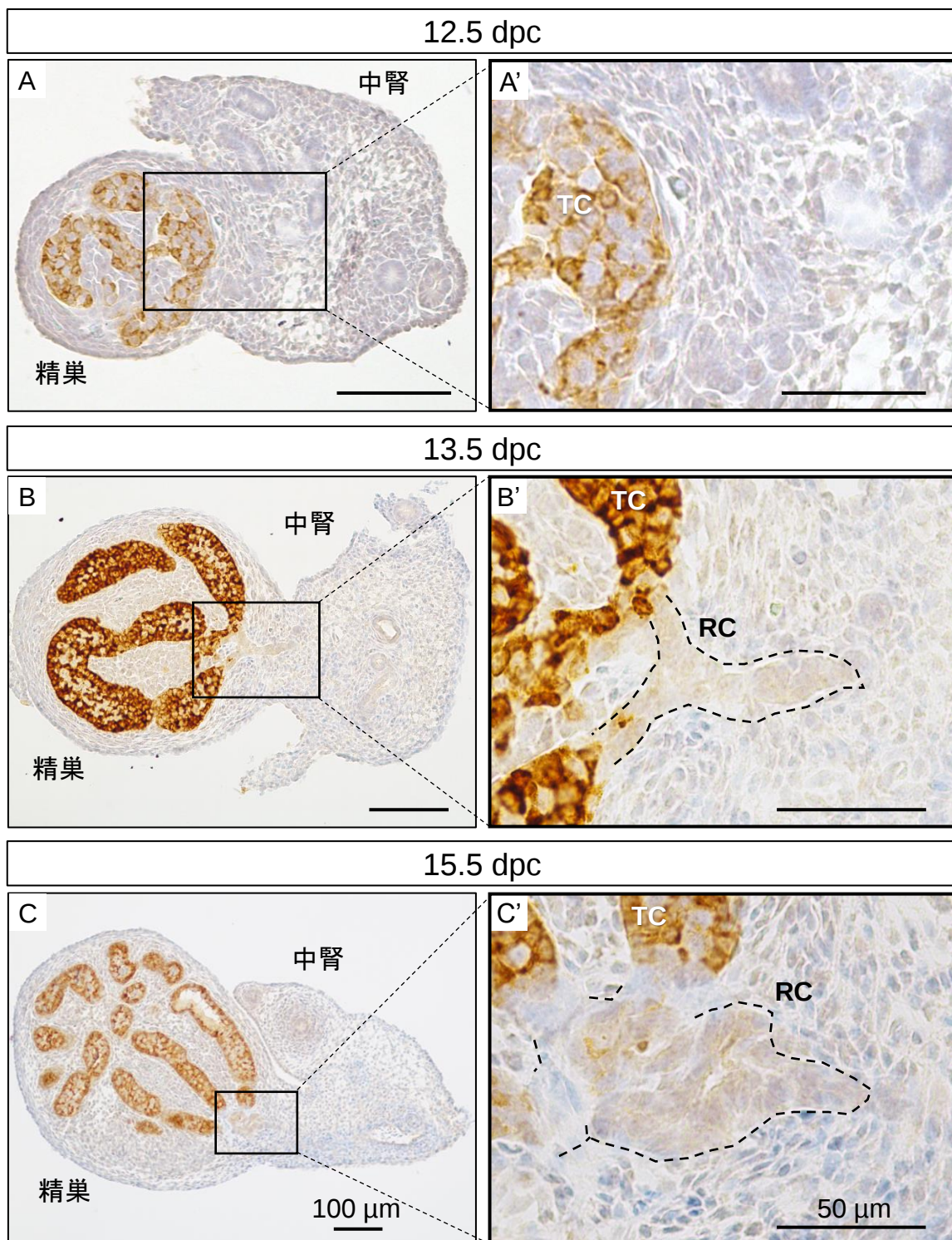
B : 13.5 dpcの精巢中腎複合体のAmh検出像

TC内にAmhの強い陽性反応が認められるとともに，精巣間質部にも陽性反応が認められた．また，精巣索と接続するRC内にもAmhが検出された（B'）．

C : 15.5 dpcの精巢中腎複合体のAmh検出像

13.5 dpcと同様に，TC内にAmhの強い陽性反応が認められ，精巣間質部にも陽性反応が認められた．精巣索と接続するRC内にもAmhが検出された（C'）．

図4



**図5 12.5, 13.5および15.5 dpcにおける頭側部および尾側部の精巢中腎複合体の
アニリンブルー染色像**

A, B : 12.5 dpcにおける精巢中腎複合体のアニリンブルー染色像

精巢頭側部 (A, A') および尾側部 (B, B') において, 精巢と中腎の間充織が連続している領域が認められた (同色の矢印間) .

C, D : 13.5 dpcにおける精巢中腎複合体のアニリンブルー染色像

精巢頭側部 (C, C') および尾側部 (D, D') において, 精巢と中腎の間充織が連続している領域が認められた (同色の矢印間) .

E, F : 15.5 dpcにおける精巢中腎複合体のアニリンブルー染色像

精巢頭側部 (E, E') において, 精巢と中腎の間充織が連続している領域が認められた (矢印間) . 精巢頭側部および尾側部 (E, E', F, F') では白膜 (赤色バー) が肥厚しており, 精巢と中腎の接続部が狭かった.

図5

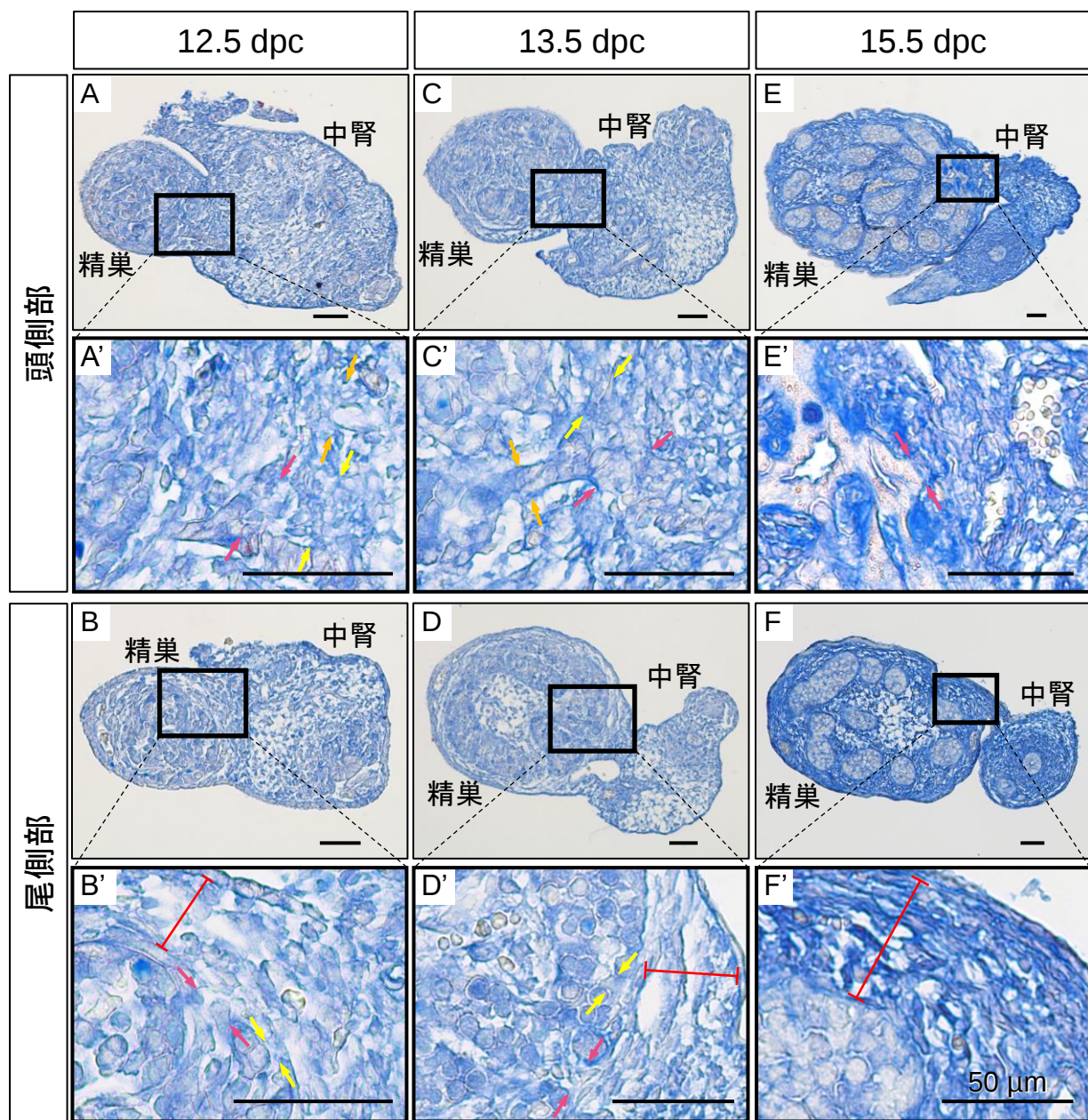


図6 12.5 dpcの精巣頭側部または尾側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体のAMH/Amh検出像

A：精巣頭側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の頭側部のAMH /Amh染色像
間質部を含む精巣全体にAMH/Amhの陽性反応が認められた。また，精巣中腎境界部からミューラー管（MD）近傍まで連続的に陽性反応が検出された（A'）。

B：精巣頭側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の尾側部のAMH /Amh染色像
頭側部の切片（A）と同一スライドガラス上で，抗Amhヤギ抗体と反応させた。
精巣索内にAMH/Amhの強い陽性反応が認められたが，精巣中腎境界部の間質部および中腎内に陽性反応は認められなかった（B'）。

C：精巣尾側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の頭側部のAMH /Amh染色像
尾側部の切片（D）と同一スライドガラス上で，抗Amhヤギ抗体と反応させた。
精巣索内にAMH/Amhの強い陽性反応が認められたが，精巣中腎境界部の間質部および中腎内に陽性反応は認められなかった（C'）。

D：精巣尾側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の尾側部のAMH /Amh染色像
間質部を含む精巣全体にAMH/Amhの強い陽性反応が認められた。また，精巣中腎境界部からMD近傍まで連続的に陽性反応が検出された（D'）。

WD：ウォルフ管

図6

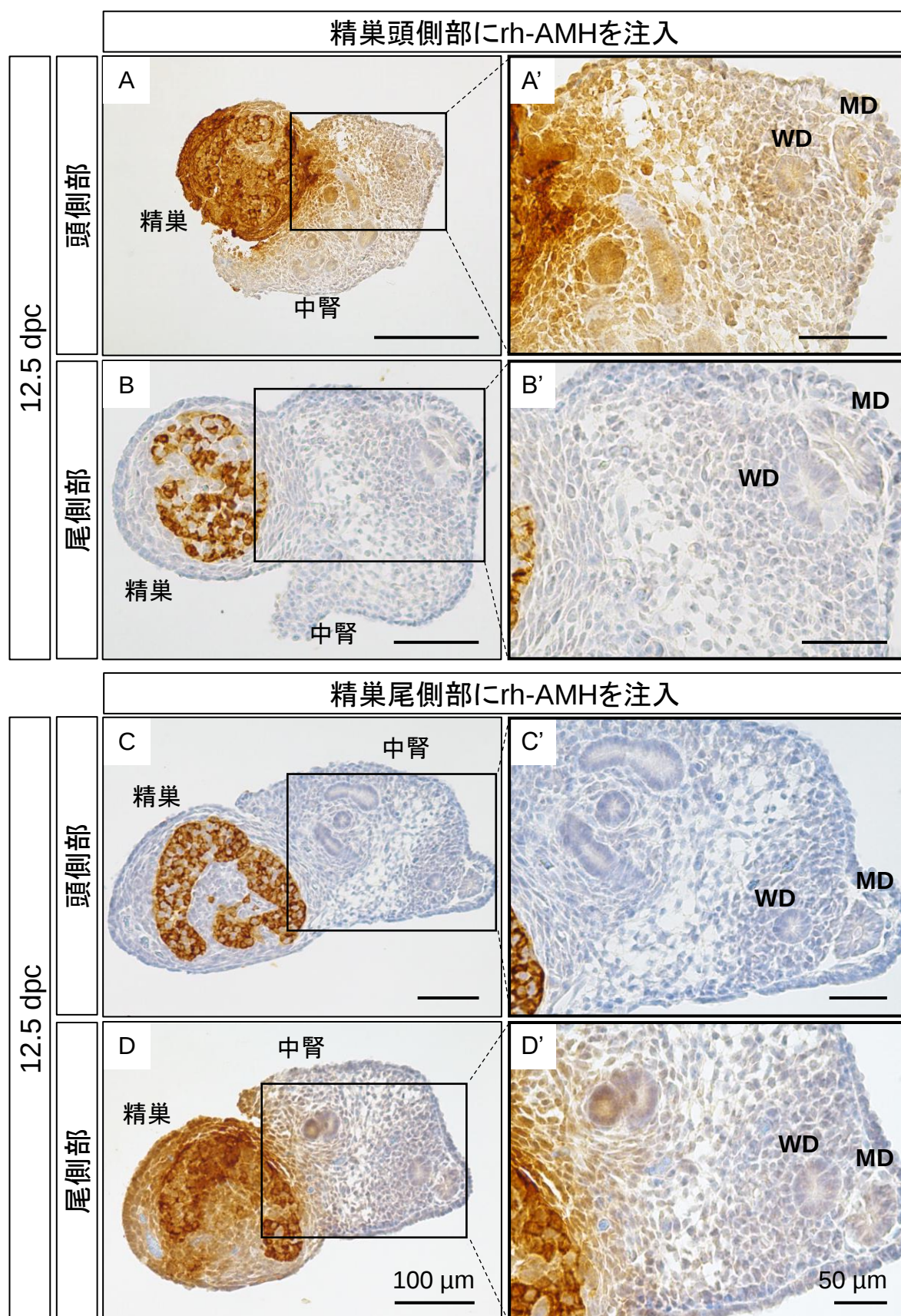
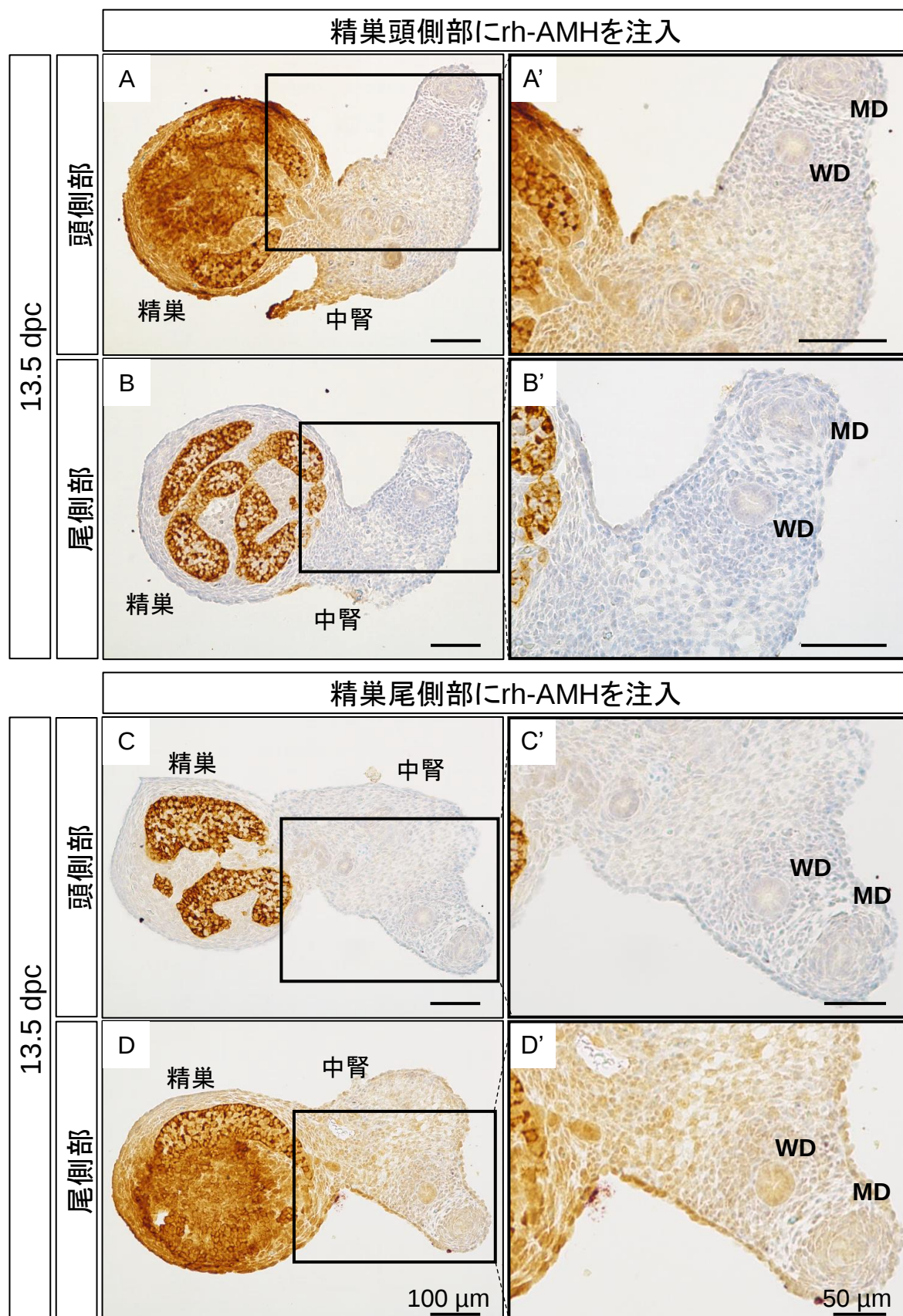


図7 13.5 dpcの精巣頭側部または尾側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体のAMH /Amh検出像

- A：精巣頭側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の頭側部のAMH /Amh検出像
間質部を含む精巣全体にAMH/Amhの強い陽性反応が認められた。また，精巣中腎境界部からミューラー管（MD）近傍まで連続的に陽性反応が検出された（A'）。
- B：精巣頭側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の尾側部のAMH /Amh検出像
頭側部の切片（A）と同一スライドガラス上で，抗Amhヤギ抗体と反応させた。精巣索内にAMH/Amhの強い陽性反応が認められたが，精巣中腎境界部の間質部および中腎内に陽性反応は認められなかった（B'）。
- C：精巣尾側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の頭側部のAMH /Amh検出像
尾側部の切片（D）と同一スライドガラス上で，抗Amhヤギ抗体と反応させた。精巣索内にAMH/Amhの強い陽性反応が認められたが，精巣中腎境界部の間質部および中腎内に陽性反応は認められなかった（C'）。
- D：精巣尾側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の尾側部のAMH /Amh検出像
間質部を含む精巣全体にAMH/Amhの強い陽性反応が認められた。また，精巣中腎境界部からMD近傍まで連続的に陽性反応が検出された（D'）。

WD：ウォルフ管

図7



**図8 15.5 dpcの精巣頭側部，中央部または尾側部にrh-AMHを注入した
精巣中腎複合体のAMH/Amh検出像**

A：精巣頭側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の頭側部のAMH/Amh検出像

間質部を含む精巣全体にAMH/Amhの強い陽性反応が認められ，注入部（矢印）付近の精巣内には間隙が認められた．Rete cord内にも弱い陽性反応（鏤）が認められたが，精巣中腎境界部の間充織および中腎内に陽性反応は認められなかった（A'）．

B：精巣中央部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の中央部のAMH /Amh検出像

間質部を含む精巣全体にAMH/Amhの強い陽性反応が認められ，注入部（矢印）付近の精巣内には間隙が認められた．また，精巣の上皮下にも陽性反応が認められた．Rete cord内にも弱い陽性反応（鏤）が認められたが，精巣中腎境界部の間充織および中腎内に陽性反応は認められなかった（B'）．

C：精巣尾側部にrh-AMHを注入した精巣中腎複合体の尾側部のAMH /Amh検出像

間質部を含む精巣全体にAMH/Amhの強い陽性反応が認められ，注入部（矢印）付近の精巣内には間隙が認められた．精巣中腎境界部の間充織および中腎内に陽性反応は認められなかった（C'）．

図8

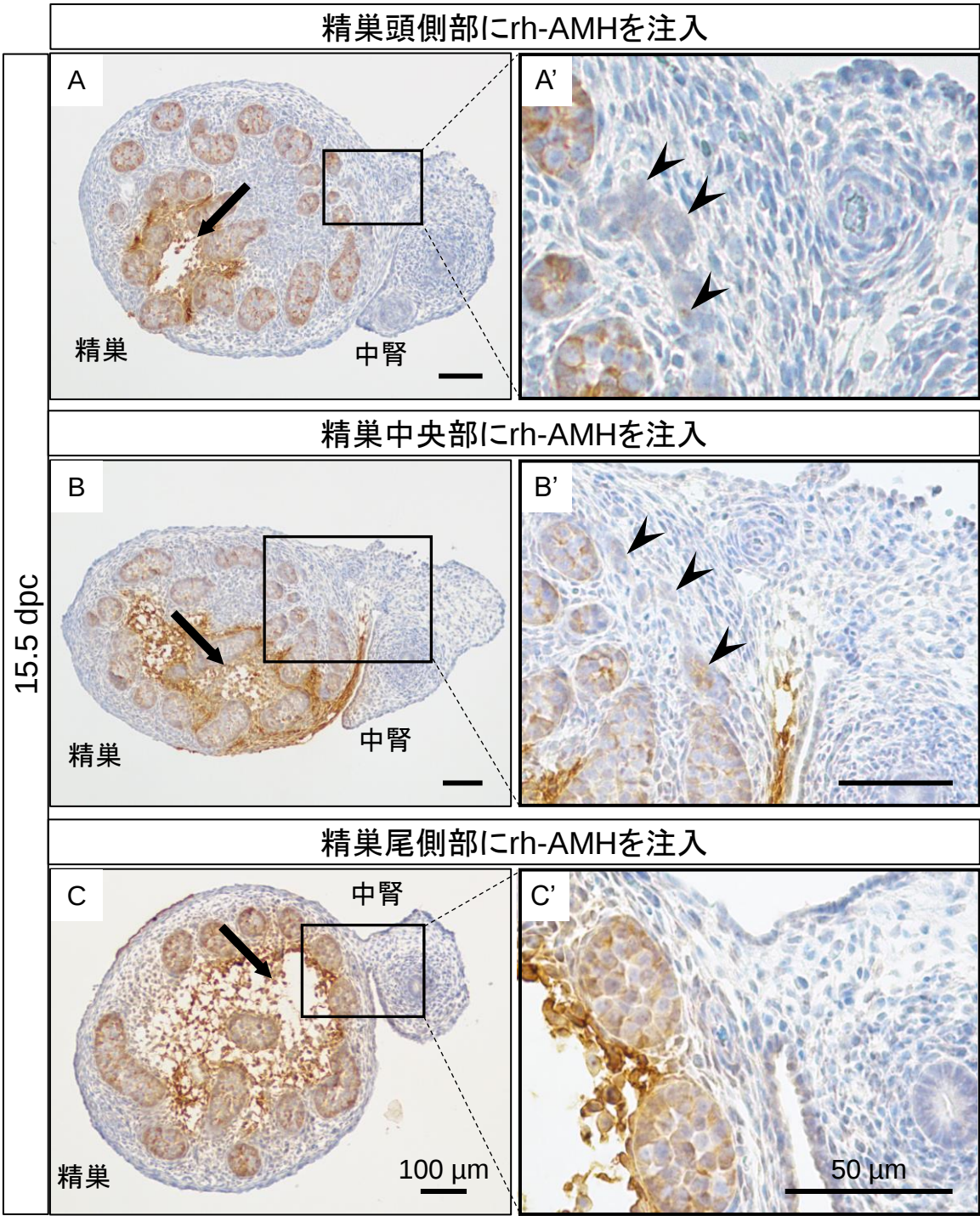


図9 12.5および13.5 dpcの雄のミュラー管（MD）のHE染色像

A : 12.5 dpcのMD頭部のHE染色像

MD周囲の間充織細胞に，凝集は認められなかった．

B : 12.5 dpcのMD中央部のHE染色像

MD周囲の間充織細胞に，凝集は認められなかった．

C : 13.5 dpcのMD頭部のHE染色像

MD周囲の間充織細胞に，凝集が認められた．

D : 13.5 dpcのMD中央部のHE染色像

MD周囲の間充織細胞に，凝集が認められた．

WD : ウォルフ管

図9

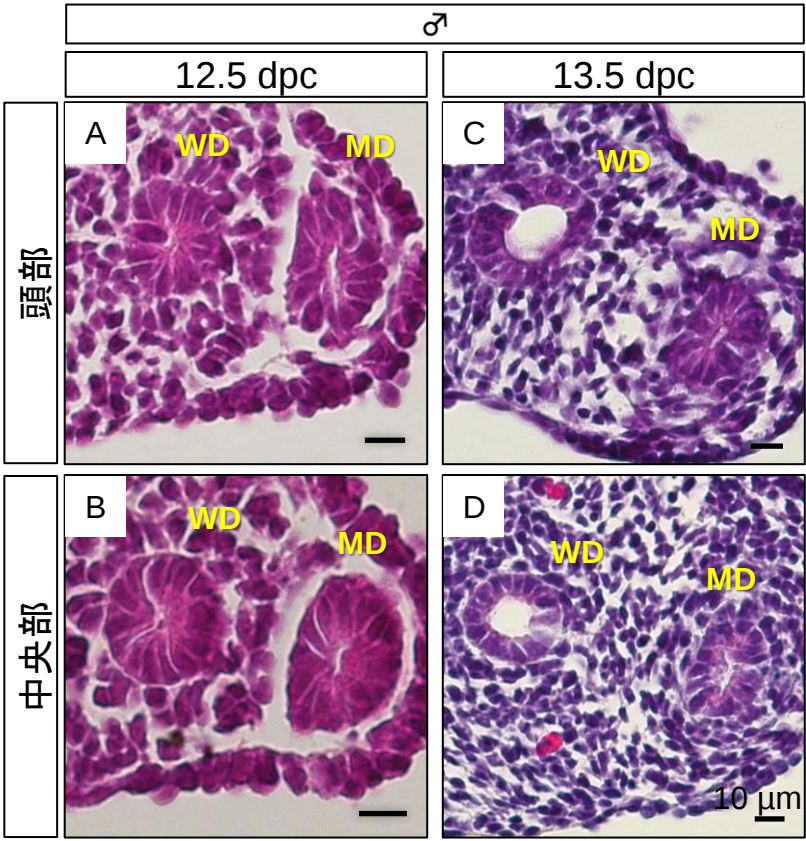


図10 12.5および13.5 dpcの雌雄のミューラー管（MD）頭部および中央部管径

A：12.5および13.5 dpcの雌雄のMD頭部管径

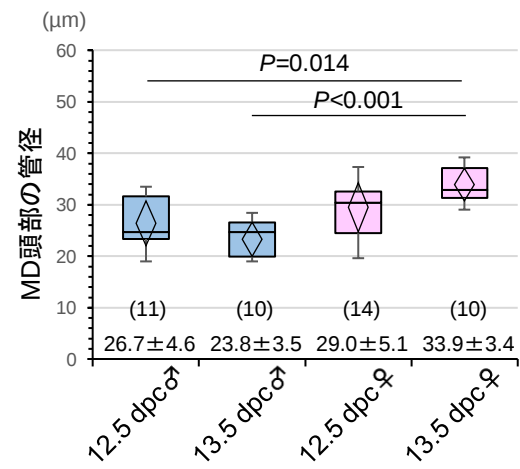
12.5 dpcでは，雌雄のMD頭部管径に，有意な差は認められなかった．13.5 dpcになると，雄では管径がわずかに減少し，雌では管径がわずかに増加した．13.5 dpcの雌雄のMD頭部管径には，有意な差が認められた（ $P<0.001$ ）．

B：12.5および13.5 dpcの雌雄のMD中央部管径

12.5 dpcでは，雌雄のMD中央部管径に，有意な差は認められなかった．13.5 dpcになると，雄では管径がわずかに減少し，雌では管径がわずかに増加した．13.5 dpcの雌雄のMD中央部管径には，有意な差が認められた（ $P=0.005$ ）．

図10

A



B

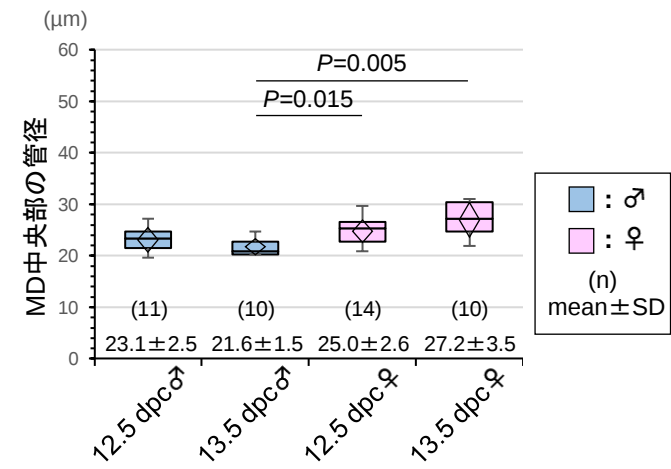


図11 ウェスタンブロッティングによる性腺および中腎内のAmhの検出

A : 12.5 dpcの中腎, および12.5 dpcから72時間培養した性腺中腎複合体の中腎内のAmhのウェスタンブロッティング像

Amhのバンド (12.5 kDa) は, 12.5 dpcの中腎, 72時間培養後の中腎, 72時間培養後の精巣 (ポジティブコントロール) で検出され, 12.5 dpcの卵巢 (ネガティブコントロール) では認められなかった. GAPDHのバンド (37 kDa) はすべてのサンプルで認められた.

B : 12.5 dpcおよび72時間培養後の中腎内のAmh量の比較

Amhのバンドの輝度をGAPDHのバンドの輝度を用いて補正した. 12.5 dpcの中腎内のAmh量を1とすると, 72時間培養後の中腎内のAmh量は2.2であった.

图11

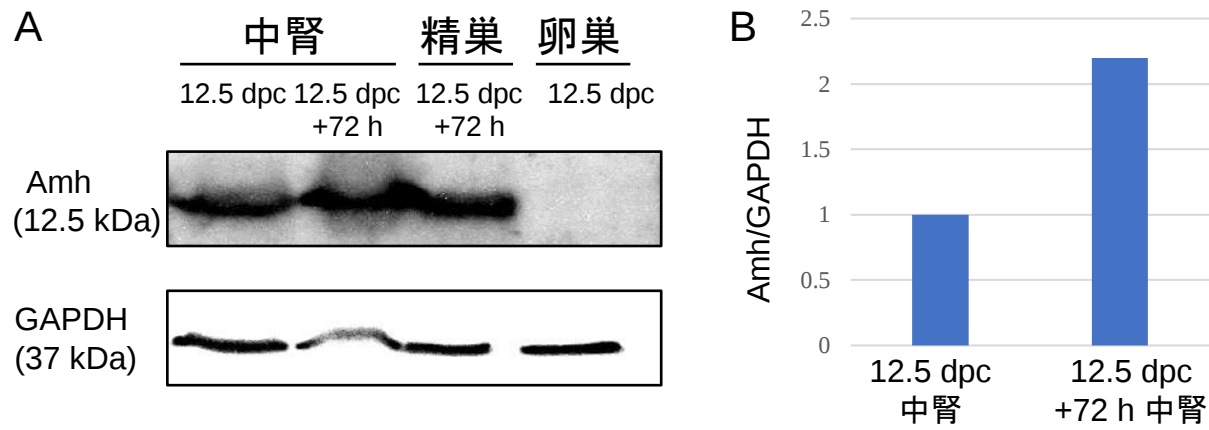


図12 12.5 dpcから72時間培養した対照および条件1-4の精巣および雄中腎の形態およびAmh検出像

A：対照および条件1-4の雄の精巣および中腎の形態

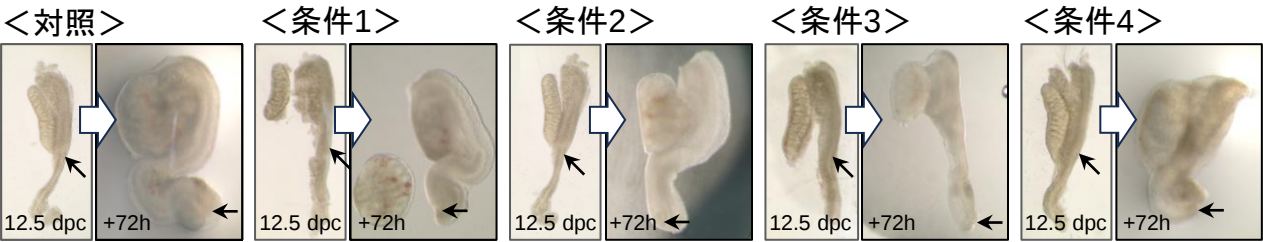
培養後の精巣は培養前より肥厚し，精巣索が明瞭に形成された．また，培養後の中腎は頭部から中央部まで精巣に沿って発達した．一方，中腎の尾側部は，屈曲している個体が多数認められた（対照，条件1，4）．矢印はミュラー管の尾部側末端部を示す．

B：対照および条件1-4の雄の精巣および中腎のAmh検出像

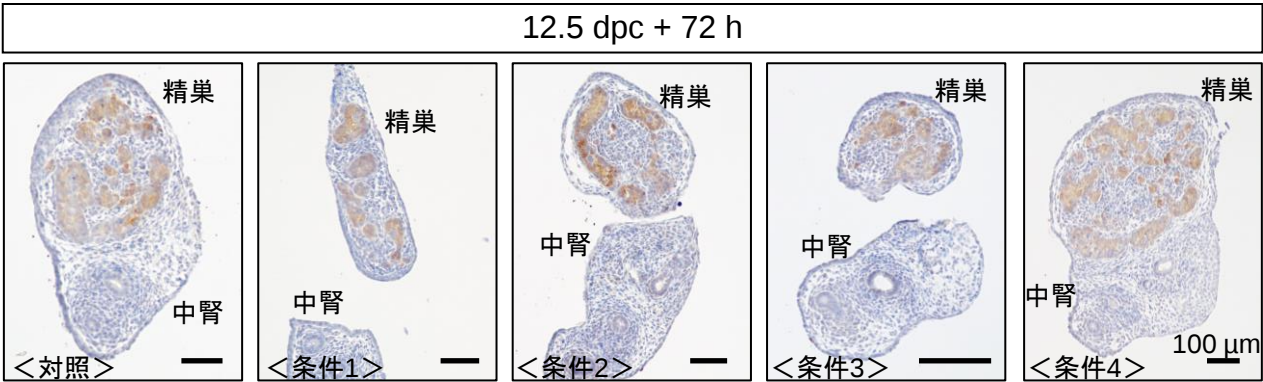
精巣中腎境界部の切断操作の有無にかかわらず，すべての条件で精巣索内にAmhの陽性反応が認められた．

図12

A



B



**図13 12.5 dpcから72時間培養した対照および条件1-4における
雌雄のミューラー管（MD）およびウォルフ管（WD）のHE染色像**

対照の雄では、MD頭部（A）および中央部（B）ともにMD周囲の間充織細胞の凝集が認められた。条件1の雄では、MD頭部（C）および中央部（D）ともにMD周囲の間充織細胞に凝集は認められなかった。条件2の雄のMD頭部（E）ではMD周囲の間充織細胞に凝集は認められなかった。MD中央部（F）では周囲間充織細胞の凝集が認められた。条件3の雄のMD頭部（G）および中央部（H）ではMD周囲の間充織細胞に凝集が認められた。条件4の雄のMD頭部（I）ではMD周囲の間充織細胞に凝集は認められなかった。MD中央部（J）ではMD周囲の間充織細胞に凝集が認められた。また、対照および条件1-3では、WDの管腔が形成されていた（A-H）。条件4では、WD上皮内に多数の空胞（矢印）が認められた（I', I''）。

対照および条件1-4の雌のMD頭部および中央部では、MD周囲の間充織細胞に凝集は認められなかった（K-T）。また、雌のすべての条件で、WD上皮内に多数の空胞が認められ（K, L, N, P, Q, R, T）、頭部のウォルフ管が消失している標本も認められた（M, O, S）。

図13

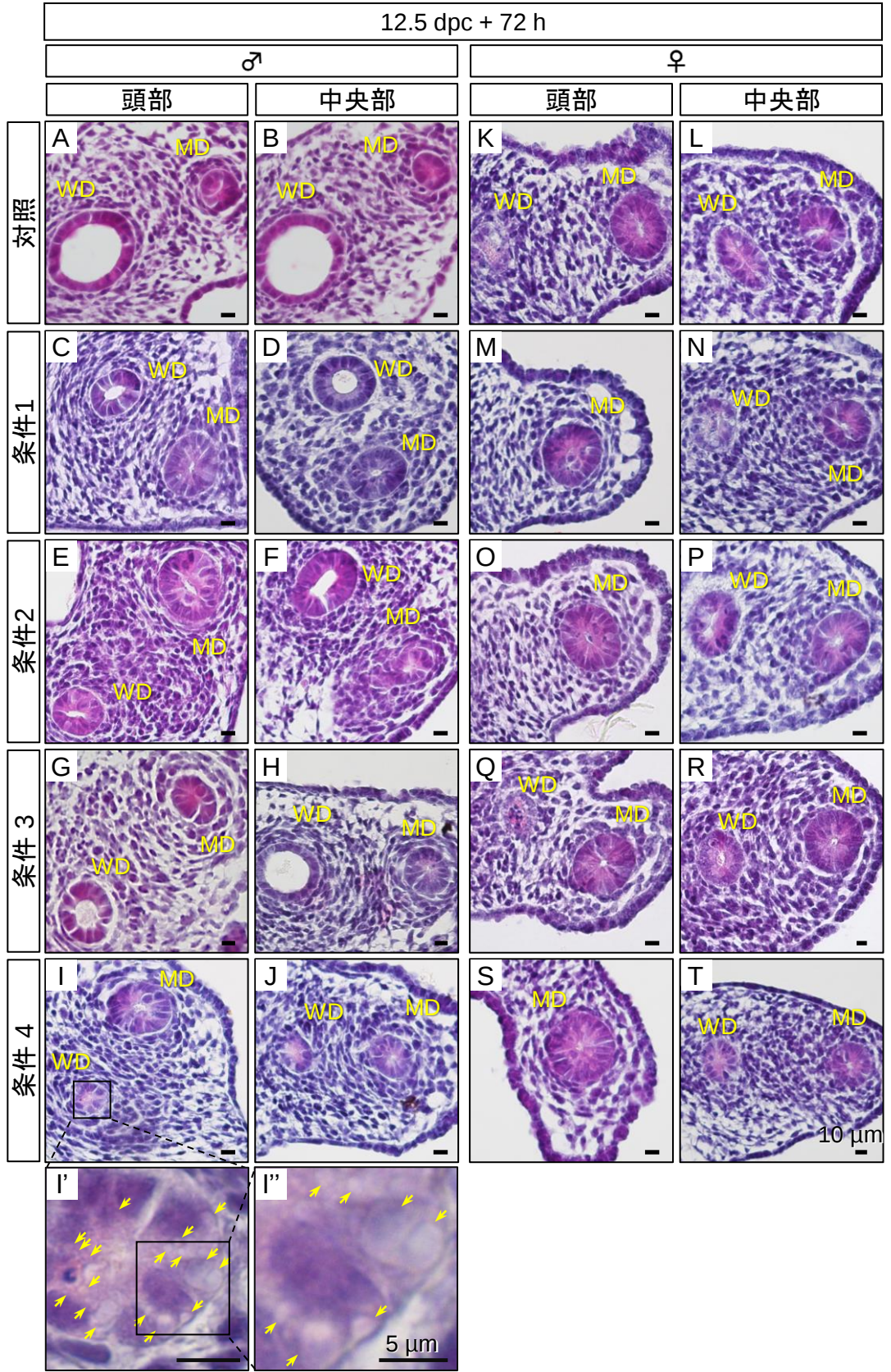


図14 12.5 dpcから72時間培養した各条件における雌雄のミュラー管（MD）頭部および中央部の管径

A：各条件の雄におけるMD頭部の管径

精巢中腎境界部の頭部側におけるAmhの移行を阻害した条件1（ $P=0.030$ ）および条件2（ $P=0.027$ ）では，対照よりMDの管径が有意に増加した．

B：各条件の雄におけるMD中央部の管径

Amhの移行を阻害した条件1では，対照よりMDの管径が有意に増加した（ $P=0.024$ ）．

C：各条件の雌におけるMD頭部の管径

MDの管径に有意な差は認められなかった．

D：各条件の雌におけるMD中央部の管径

MDの管径に有意な差は認められなかった．

図14

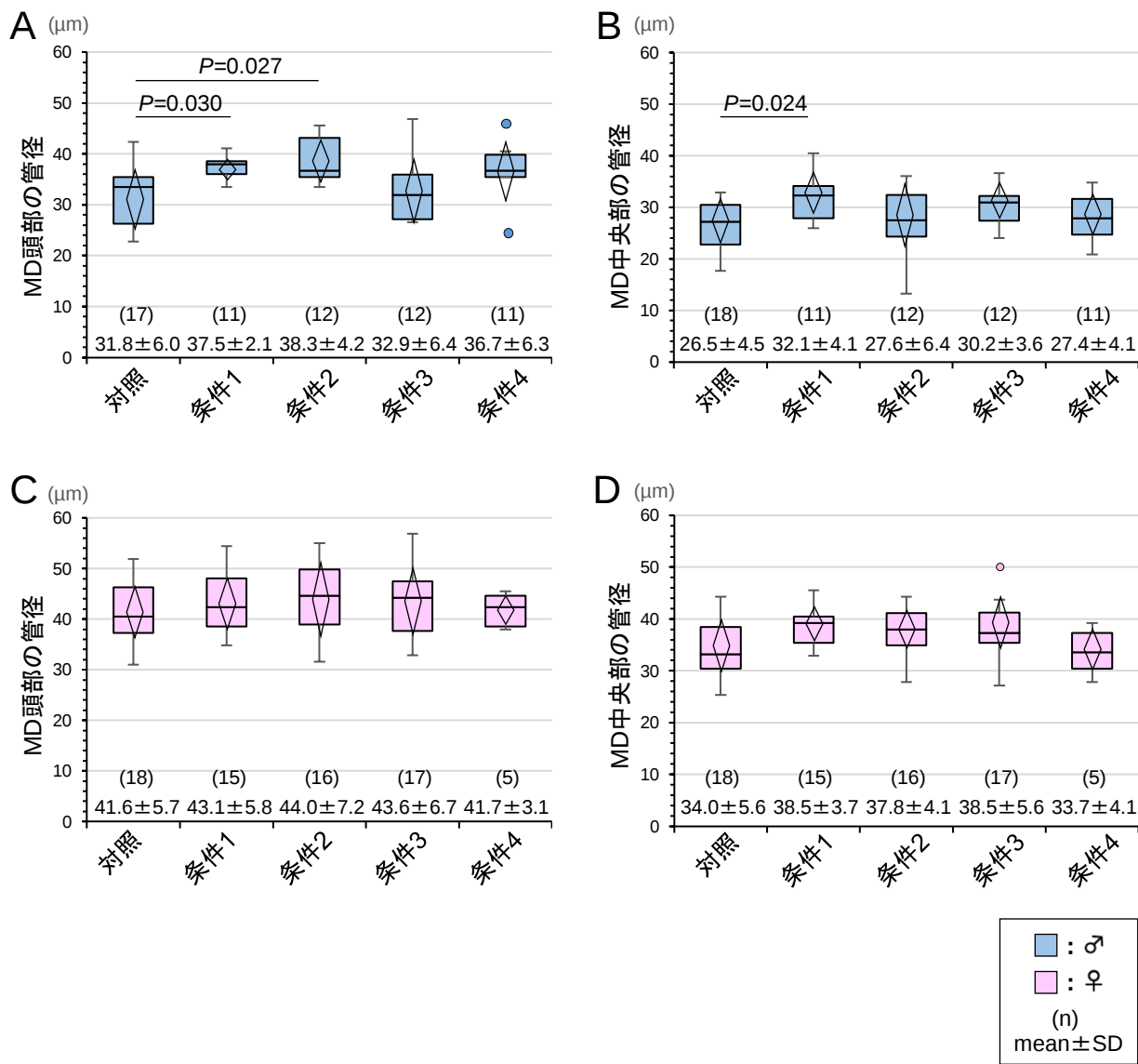


図15 発生中のマウスにおけるAmhの精巣から中腎内への移行経路

A：ミューラー管（MD）の退行開始時期付近では，Amhは精巣頭側部から中腎内へ浸潤性に移行し，MD頭部の退行を惹起する．また，Amhは精巣尾側部からも中腎内へ浸潤性に移行し，MD中央部の退行を惹起する．ピンク色の点線は，12.5 dpcから13.5 dpcにかけて形成されるMDを示す．

B：発生が進み精巣中腎間の結合組織（灰色実線）の形成が進行すると，精巣尾側部から中腎内へのAmhの浸潤は困難となる．灰色の点線は，MDの退行が進行していることを示す．

WD：ウォルフ管

図15

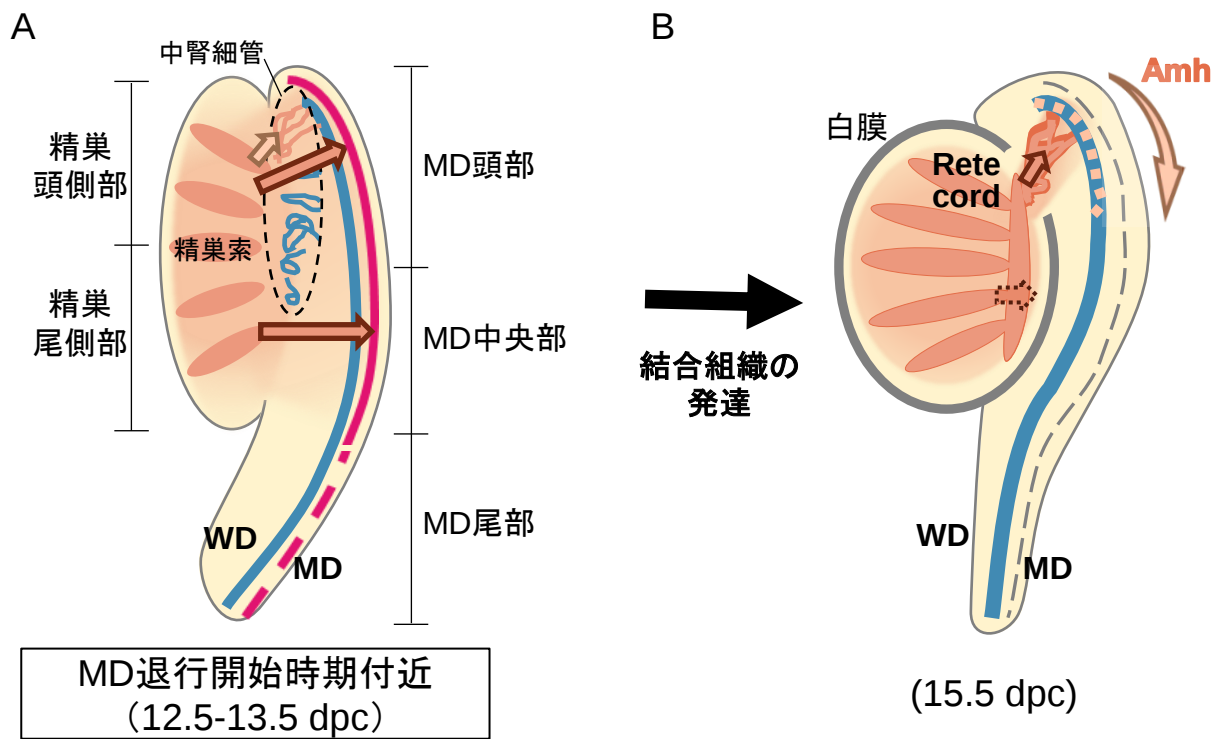


図16 採材方法および培養方法

A：マウス胎子の肝臓から頭部側と腸管を除去した．

B：①後肢の付け根より3 somites尾部側で尻尾を切除し，②両側の後肢も切除した．

C：①正中で左右を切断後，②性腺の最頭側部から2 somites頭側で体の頭部側を切除した．

D：中腎より外側の体壁を切除した．

E：神経管を含む背側の領域を切除した．

F, F'：整形した組織片を，アガロースゲルブロックの溝内に背側が下となるように設置し，ゲル円柱を胎子の正中側に設置した．さらに，ゲルシートを組織片上に設置した．

G：従来の培養方法．摘出した性腺中腎複合体をアガロースゲルブロックの溝内に設置し，その上にゲルシートを設置した．

図16

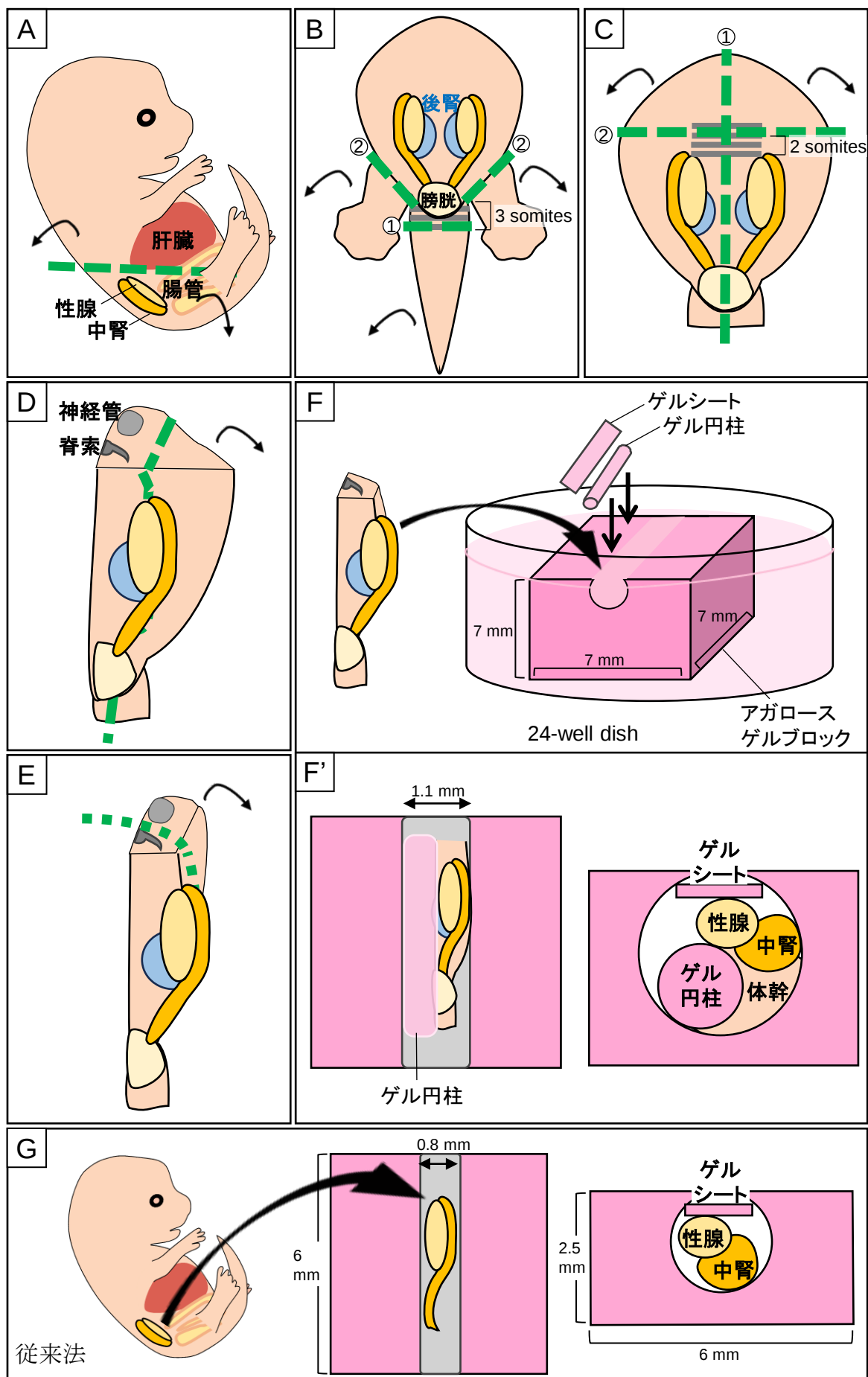


図17 ミュラー管 (MD) の管径の計測位置

MD頭部として性腺最頭側部付近，MD中央部として性腺最尾側部付近，MD尾部として性腺最尾側部から尾側へ200 μm 付近を計測した．HE染色をした切片上でMD頭部，中央部および尾部の短径を各切片4枚分計測し，その平均値でMDの退行程度を評価した．

図17

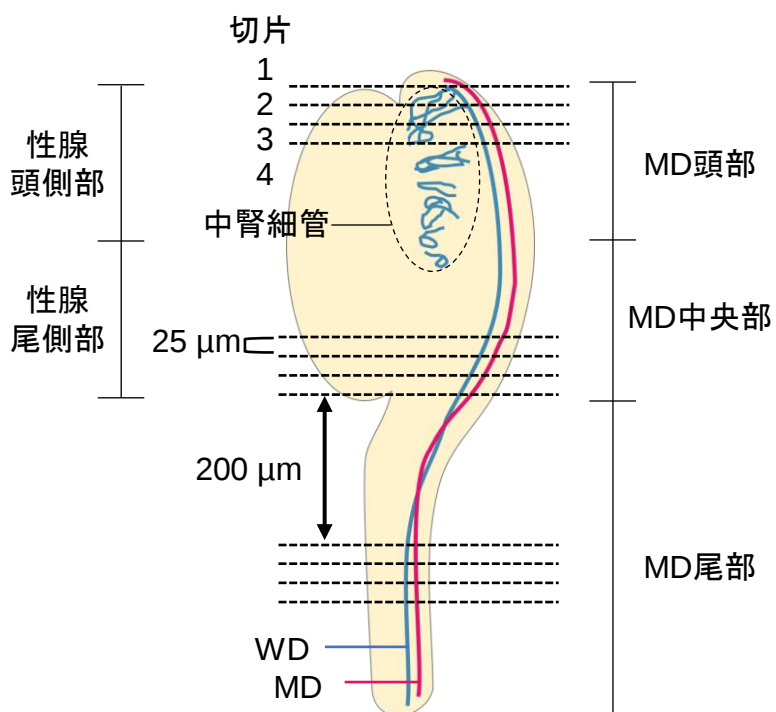


図18 72時間培養後の組織の肉眼的所見

A：72時間培養後の雌の性腺中腎複合体と体幹部および後腎

ゲルの溝内で体幹部は直線状に配置された。性腺中腎複合体は体幹部に沿うように伸長した。

A'：体幹部から離断した培養後の性腺中腎複合体

性腺の尾部末端付近の中腎は、性腺の尾側部に沿うように屈曲した（紫矢印）。それより尾部側の中腎は、直線状に伸長した。ミューラー管は中腎尾部末端部まで伸長していた（黒矢印）。

B：72時間培養後の雄の性腺中腎複合体と体幹部および後腎

ゲルの溝内で体幹部は直線状に配置された。性腺中腎複合体は体幹部に沿うように伸長した。

B'：体幹部から離断した培養後の性腺中腎複合体

性腺内には、精巣索が認められた。性腺の尾部末端付近の中腎は、性腺の尾側部に沿うように屈曲した（紫矢印）。それより尾部側の中腎は、直線状に伸長していた。ミューラー管は中腎尾部末端部まで伸長した（黒矢印）。

C：第I章と同じ方法で72時間培養後の性腺中腎複合体

性腺中腎複合体のみで培養した場合も、性腺内に精巣索が認められた。性腺と付着していない尾部側の中腎は、大きく屈曲した（C'）。ミューラー管は中腎尾部末端部まで伸長した（黒矢印）。

図18

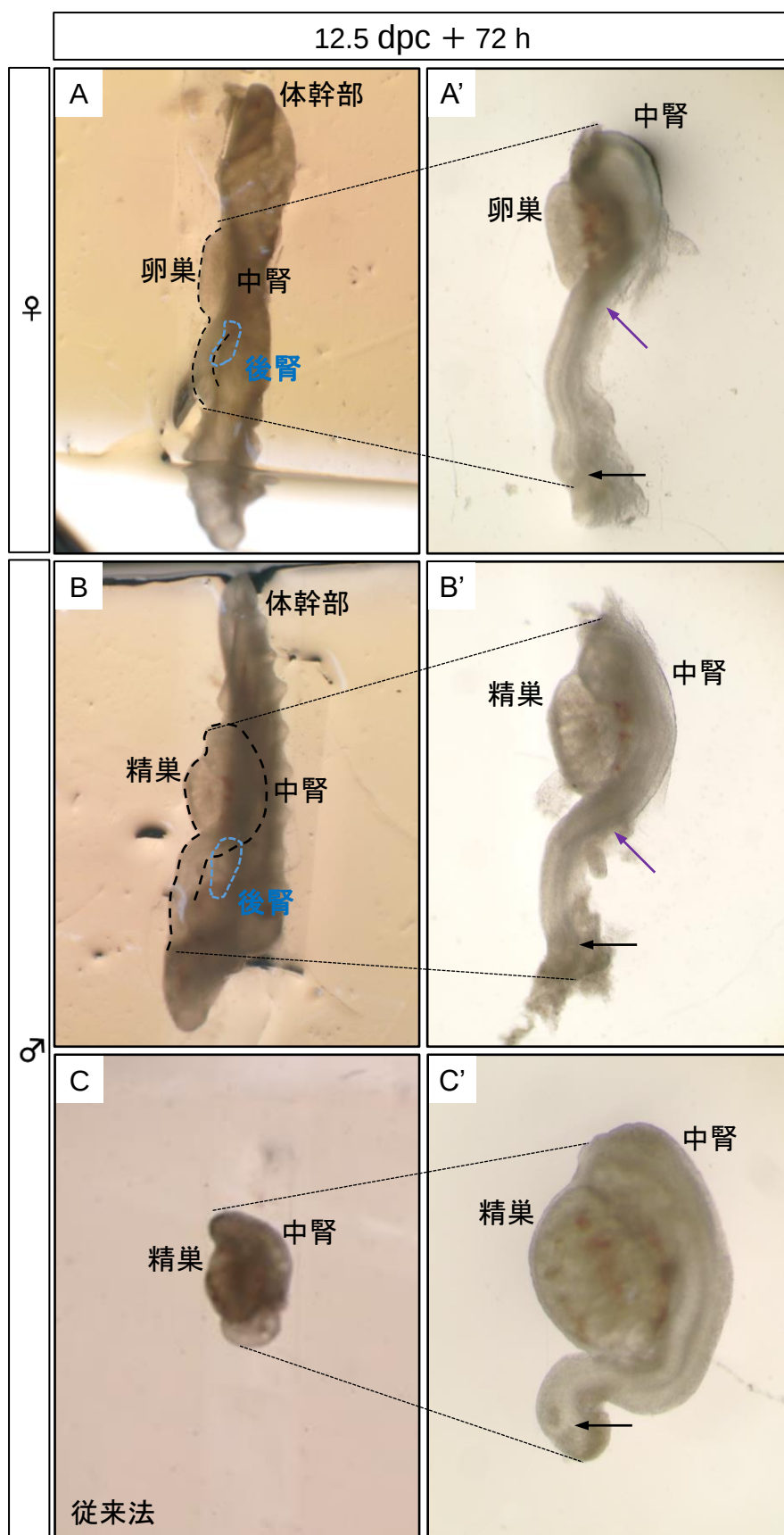


図19 12.5 dpc-15.5 dpcのICRマウスの精巢中腎複合体

精巢は12.5dpcから15.5 dpcにかけて大きく肥厚した。12.5 dpcの精巢内には精巢索が確認され、その構造は胎齢が進むとより明瞭となった。12.5と13.5および 14.5 dpcでは、精巢頭側部から尾側部までの中腎は精巢に沿うように伸長し、それより尾部側の中腎は尾部方向に直線上に伸長した。15.5 dpcでは、精巢頭側部から尾側部までの中腎は精巢に沿うように伸長した。精巢尾側部末端部付近では中腎が大きく屈曲し、それより尾部側の中腎は外側方向へ伸長した（矢印）。

図19

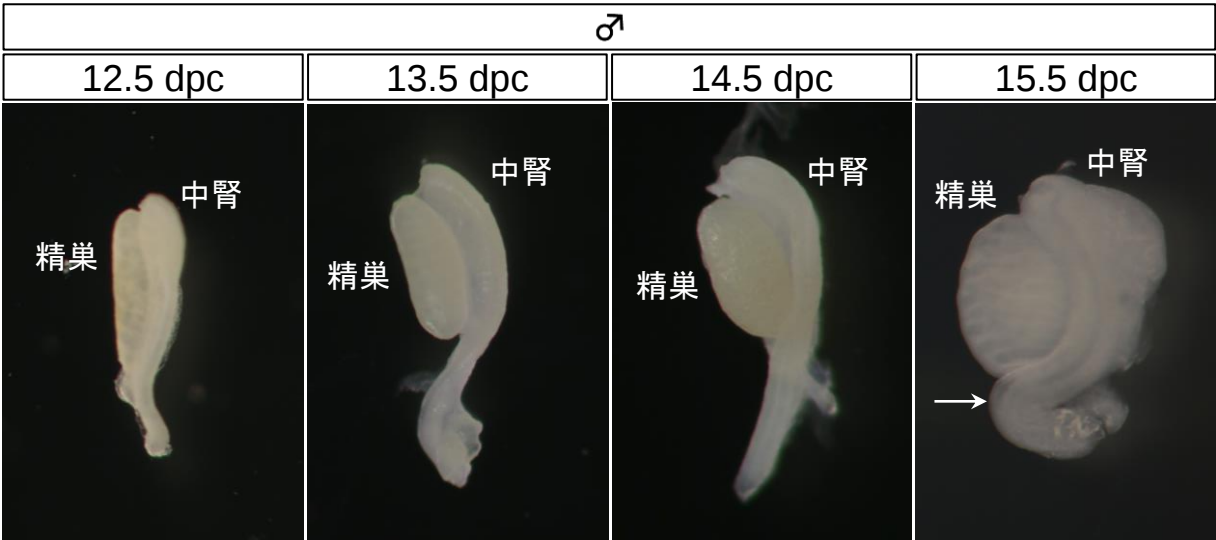


図20 培養後および13.5 dpcの精巢中腎複合体のAmh染色像

A : 72時間培養後の精巢中腎複合体

精巢索内にAmhの陽性反応が認められた．Amhの強陽性反応を示す細胞（矢印）も認められた（A'）．

B : 13.5 dpcのICRマウスの精巢中腎複合体

精巢索内にAmhの強陽性反応が認められ，ほとんどのセルトリ細胞がAmhの強陽性反応を示した（B'）．

図20

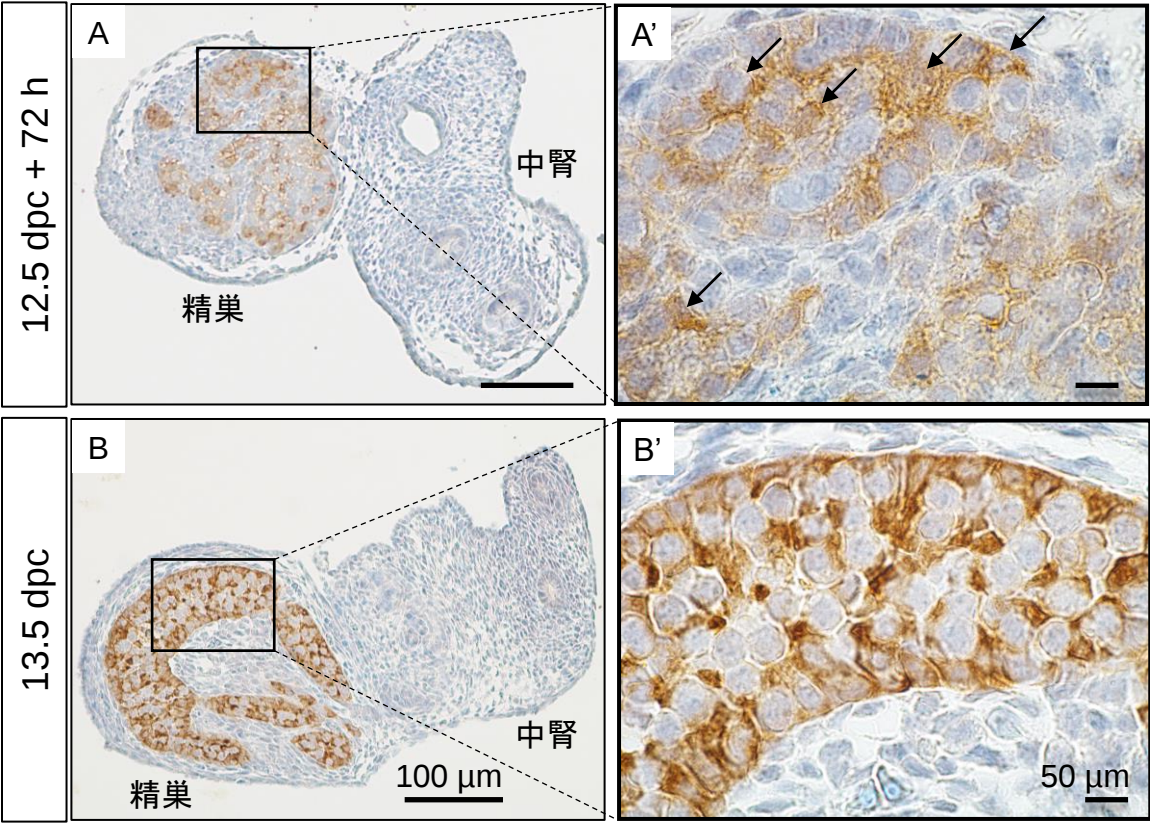


図21 72時間培養後の性腺中腎複合体のHE染色像

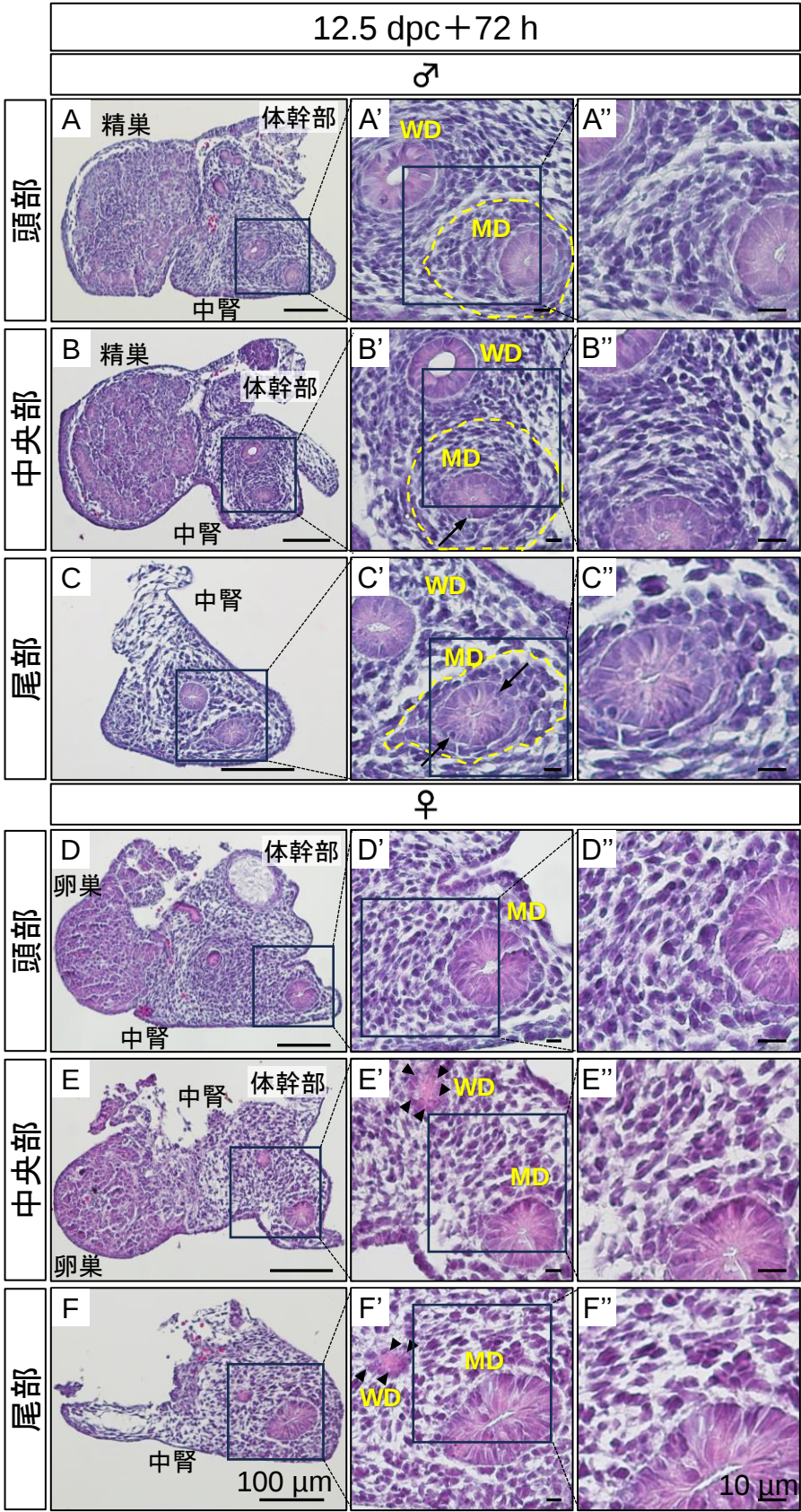
A-C : 雄の性腺中腎複合体の染色像

ミューラー管 (MD) の管腔が形成されていた。MD上皮細胞には変性している細胞 (矢印: B', C') が認められ、MD周囲の間充織 (黄点線) が凝集していた (A'-C', A''-C'')。ウォルフ管 (WD) の管腔は形成されていた (A'-C')。

D-F : 雌の性腺中腎複合体の染色像

MDの管腔は形成されていた。MD周囲の間充織に、凝集は認められなかった (D'-F', D''-F'')。WDを構成する上皮細胞内には多数の空胞 (鏟: E', F') が認められた。

図21



**図22 12.5-15.5 dpcのICR雄マウスにおける精巢中腎複合体の
HE染色像およびミューラー管（MD）頭部と中央部および尾部のHE染色像**

12.5 dpcのICR雄マウスの精巢内には精巣索が確認され、その構造は胎齢が進むとより明瞭となった。MD周囲の間充織の凝集は12.5 dpcでは認められず、13.5と14.5および15.5 dpcでは認められた。MD周囲の間充織の凝集の程度は、胎齢が進むと強くなっていた。

WD：ウォルフ管

図22

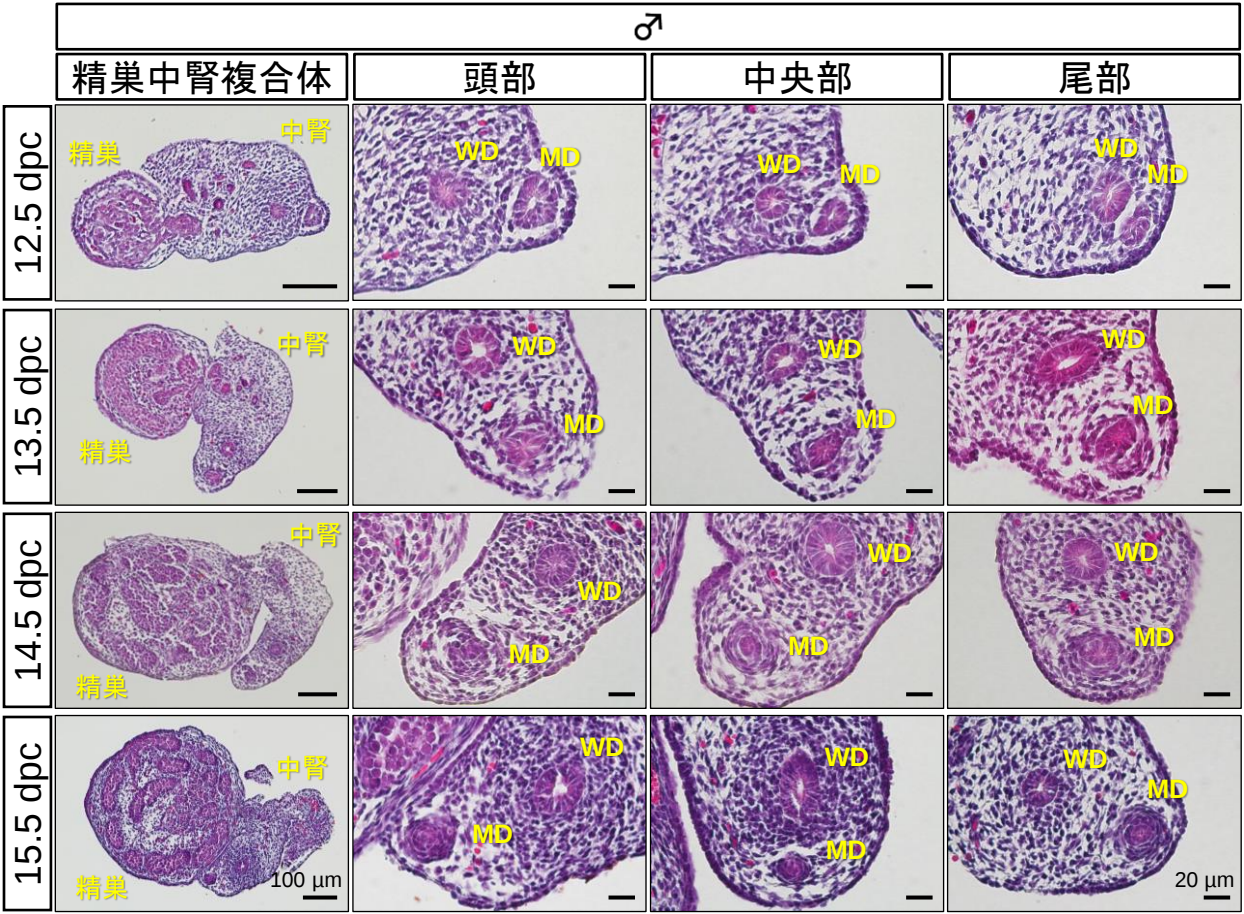


図23 12.5 dpcと 13.5 dpcのICRマウス, 性腺中腎複合体のみで72時間培養後, 体幹部に付着させて72時間培養後のミューラー管 (MD) 頭部, 中央部 および尾部の管径

12.5 dpcではMDが尾部まで伸長していないため, MD尾部の管径は計測できなかった. 性腺中腎複合体のみで72時間培養したMDは, MD尾部の形態が保てなかったため, 同部位の計測はできなかった.

雄では, 12.5 dpc, 13.5 dpc, 両培養法による72時間培養後のいずれにおいても, MD頭部よりMD中央部の管径の方が低値を示した. また, 13.5 dpcおよび体幹部に付着させて培養した場合, MD中央部よりもMD尾部の管径の方が高値を示した.

雌では, 12.5 dpc, 13.5 dpc, 両培養法による72時間培養後のいずれにおいても, MD頭部よりMD中央部の管径の方が低値を示した. MD尾部については, 13.5 dpcではMD中央部よりも低値を示した. 体幹部に付着させて培養した場合は, MD中央部よりもMD尾部の方が高値を示した.

体幹部に付着させて培養したMD頭部, 中央部, 尾部の管径を雌雄で比較すると, いずれの領域においても雄のMD管径は雌よりも有意に小さかった.

Gd : 性腺, M : 中腎, BT : 体幹部

図23

