

# 胎児期の女性生殖管原基異常がもたらす男性不妊の機序解明

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科臨床解剖学分野

原田 理代

## 【背景と目的】

雄性生殖管原基である中腎管と雌性生殖管原基である中腎傍管は、胎児期に雌雄同様に形成される。性分化に伴い、雄では中腎管が精巣上体、精管、精囊、精管膨大部腺に分化して、中腎傍管が消失する。雌では中腎傍管が卵管、子宮、膣に分化して、中腎管が消失する（図1）。過去の研究で、中腎傍管の伸長には先に形成される中腎管からの伸長誘導が必要であることは証明されてきたが、（Kobayashi and Behringer. Nat Rev Genet. 4, 969-980, 2003）、中腎傍管が中腎管の分化に影響を与えるかどうかについては報告が無い。

CXXC5はCXXC Zinc finger モチーフを持つタンパク質で、細胞を用いた研究により、クロマチン脱アセチル化、p53の活性化、筋細胞分化等に関与すると報告されている（Xiong et al., J. Cell. Mol. Med., 2019）。また、*Cxxc5*欠損マウスを用いた解析により、CXXC5が骨芽細胞分化を抑制すること（Kim et al., Cell Death Diff., 2015）、皮膚創傷治癒を負に制御すること（Lee et al., J. Exp. Med., 2015）が報告されている。我々は、CXXC5が中腎管と中腎傍管で強く発現していることを見だし、*Cxxc5*欠損マウスを作成したところ、雄マウス、雌マウス共に不妊になることが判明した。*Cxxc5*欠損雄マウスの精巣上体から採取した精子は正常であったことから、不妊の原因は精子の輸送経路にあると考えられた。更に、予想に反して、将来精子の輸送経路になる中腎管で特異的に*Cxxc5*を欠損させた雄マウスは生殖可能で、雄では消失する中腎傍管で特異的に*Cxxc5*を欠損させた雄マウスは不妊になることがわかった（表1）。この結果は、これまで明らかにされてこなかった、中腎傍管が中腎管の分化に影響を与えている可能性を示唆している。

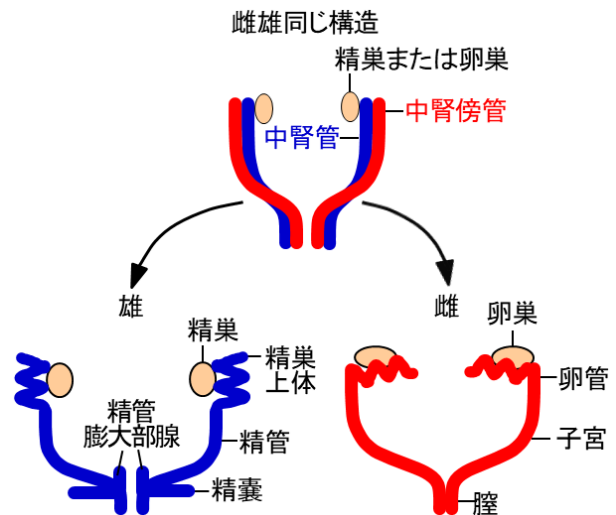


図1 中腎管と中腎傍管の分化

表1 全身*Cxxc5*欠損、中腎管特異的*Cxxc5*欠損、中腎傍管特異的*Cxxc5*欠損マウスの生殖能

	全身 <i>Cxxc5</i> 欠損	中腎管特異的 <i>Cxxc5</i> 欠損	中腎傍管特異的 <i>Cxxc5</i> 欠損
雄マウス	不妊（精巣上体の精子正常）	生殖可能	不妊
雌マウス	不妊（鎖膣）	生殖可能	不妊

本研究では、中腎傍管特異的*Cxxc5*欠損雄マウスの雄性生殖管の形態形成異常と不妊の分子機構を解明することで、雄性生殖管形成に対する雌性生殖管の協調的な発生機構を明らかにすることを目的とした。本研究は、雄性不妊が将来消えゆくはずの雌性生殖管の発生異常によりもたらされるという新機構を提唱するもので、中腎傍管が残存する男性不妊症である中腎傍管嚢胞の発症機序解明を目指した。

## 【結果と考察】

### (1) 中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの生殖管形態異常解析

中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄成獣マウスでは、精管下部から精囊と精管膨大部腺が分岐する部位の形態異常が観察された (図2)。また、精囊への異所的な精子の流入が見られた (図2)。中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄成獣マウスは、精管と精囊の分岐部の形態異常により、精子が通常は通らない精囊を迂回している間に受精能が欠われて不妊になると考えられた。

次に、より早い発生段階を解析した。生後3日目では、中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスでは、中腎傍管先端部が高位で残存して嚢胞化し、精管が残存中腎傍管の方向へ屈曲し、精管膨大部腺を含む精管下部構造が変形していた (図3)。組織切片で確認すると、正常雄マウスでも中腎傍管下端部は残存していた (図4)。中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスでは、中腎傍管が高位で残存して嚢胞化していた (図4)。

これらの結果から、中腎傍管において CXXC5 の機能が失われると、中腎傍管の先端がより高い位置で残存し、雄マウスの中腎管遠位部の形態に異常が生じることが明らかになった。また、正常雄マウスでも中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスでも、残存中腎傍管の近くに精管が配列する特徴がみられ、中腎傍管と中腎管の相互作用があるのではないかと推察された。

### (2) 中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの中腎傍管伸長停止の機構説明

組織学的解析により、胎齢14.5日目の中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスでは、中腎傍管が途中で伸長停止していた (図5)。生後3日目に、中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスでは、野生型に比べてより高い位置により大きな嚢胞状の中腎傍管が残存し、精管が中腎傍管嚢胞方向に屈曲していたことから (図3, 4)、中腎傍管特異的 *Cxxc5* 欠損雄マウスの不妊の大きな原因は中腎傍管伸長途中停止であると考えられた。

そこで、中腎傍管の伸長停止について、原因を分子レベルで解析した。中腎傍管が伸長停止する直前の胎齢13.0~13.5日目の中腎傍管先端部をレーザーマイクロダイセクションで採取し、RNA-シーケンスを実施した。全転写産物の定量結果を正常雄マウスと比較し、CXXC5の標的分子を抽出した。発現が減少

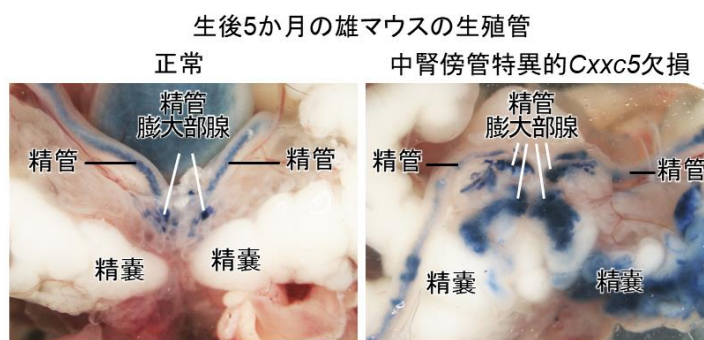


図2 精管から青白色素を注入し精子の通路を可視化



図3 Anti-E-Cadherin 染色で生殖管を可視化

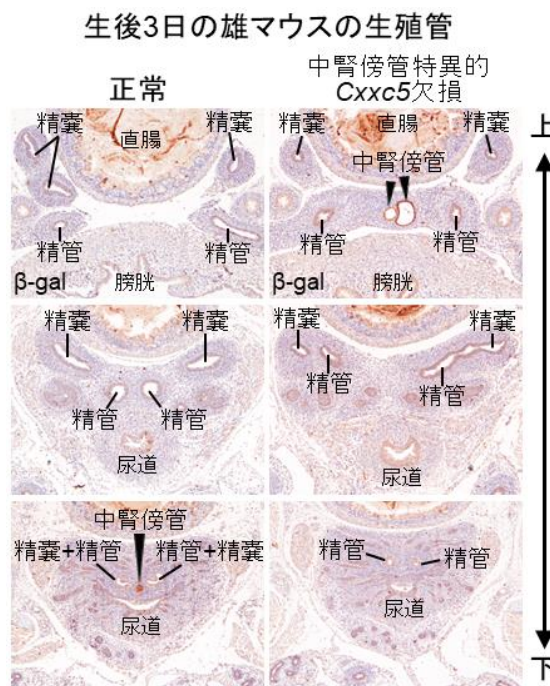


図4 Anti-β-galactosidase 染色で中腎傍管を同定

した遺伝子には、*Cxcr5*, *Msx2*, *Aldh1a3*, *Id3*, *Smad9*, *Cux1*, *Syk*, *Cdon*, *Flk1*, *Bcam*が含まれていた。発現が増加した遺伝子には*Uncx*, *Spp1*, *Cr1f1*が含まれていた。抽出された分子の中には、CXXC5 のターゲット分子であることが報告されているものも含まれていた。中腎傍管伸長停止の詳細な分子機構については、今後の解明課題となった。

**(3) 正常雄マウスでの中腎管から精管と精囊への分化機構解析**

中腎管分化における中腎傍管の役割を形態学的に解析した。胎齢17.5日で、中腎管上部は精管と精囊に分離し中腎傍管は消失するが、中腎管下部は精管と精囊に分離しておらず、中腎傍管が残存していた(図6)。生後0日も同様に、最下端で精管と精囊が分離しておらず、中腎傍管が残存していた(図6)。これらの結果から、中腎傍管が消失すると一本の中腎管が精管と精囊に分かれると考えられた(図7)。今後は、中腎管から精管、精囊が形成される際の中腎傍管との相互作用について分子機構を探索する。

**胎齢14.5日の雄マウス胚の生殖管**

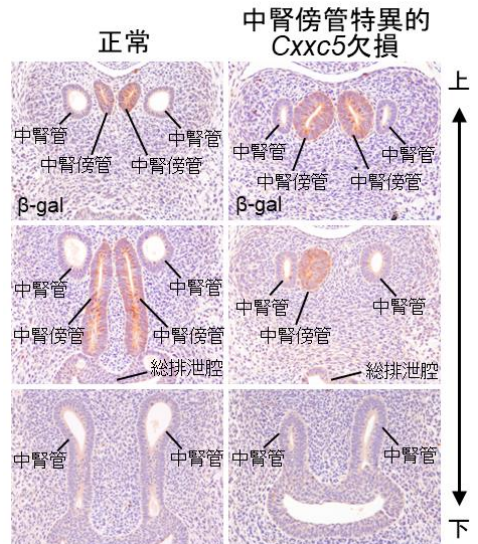


図5 Anti-β-galactosidase 染色で中腎傍管を同定

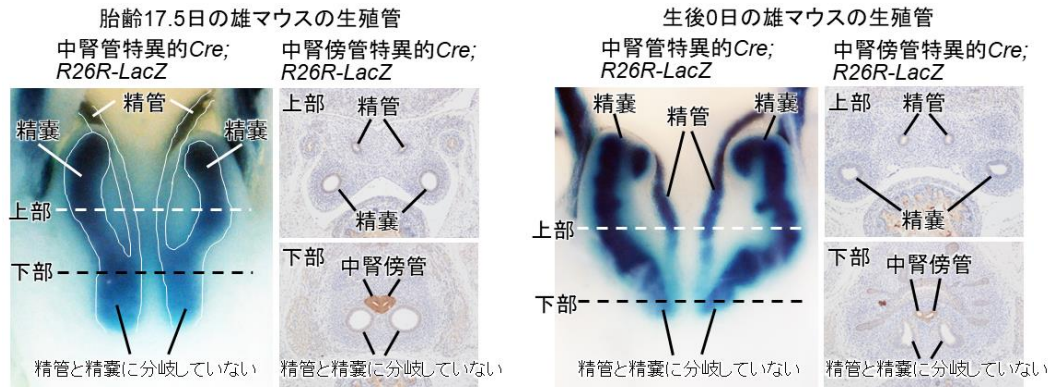


図6 雄マウスにおける、中腎管から精管と精囊への分化仮説

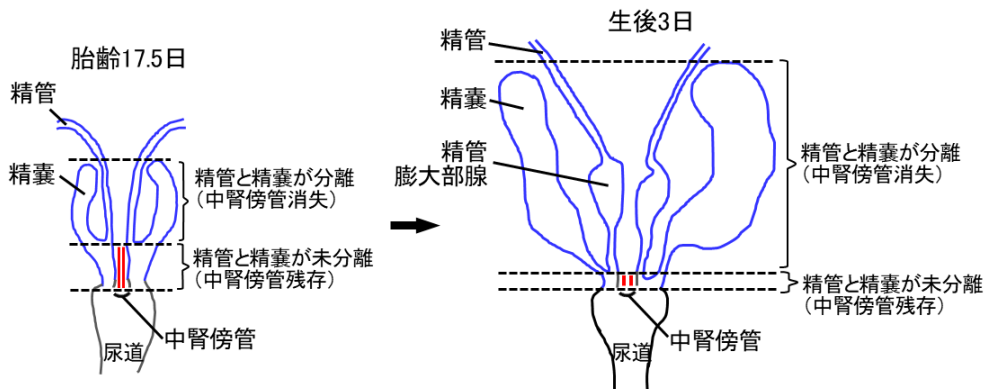


図7 雄マウスの中腎管分化における中腎傍管の役割

**【結論】** 本研究により、中腎傍管特異的*Cxcr5* 欠損雄マウスは、胎生期に中腎傍管が伸長停止し高い位置で先端部が残存することが発端となり、精管から精囊と精管膨大部腺が分岐する部位の構造が異常になり、精子が異所的に迂回し質が低下して不妊になると考えられた。本研究により、中腎傍管が中腎管の分化に影響を与えるため、女性生殖管の発生異常が男性不妊の原因になりうる事が明らかになった。

**【成果発表】**

Mouse vaginal development with lateral enlargement at late embryonic stages and caudal elongation after birth. Harada M, Akita K. Congenit Anom (Kyoto). 2023; 63: 30-39.