

胞に直接には作用しないこと、精母細胞の減数分裂にも影響をおよぼさないことも明らかにした。これらの所見は、 β -estradiol 3-benzoate がステップ7精子細胞より幼若な生殖細胞に作用して、その影響が分化が進んだ精子細胞の形態形成の障害を誘導することを示している。エストロゲン受容体 β は精母細胞ならびに幼若な精子細胞に発現することが報告されており、この段階で β 受容体を介して作用した β -estradiol 3-benzoate の影響がステップ7精子細胞以降に現れると考えられる(図 29)。これとともに、セルトリ細胞の特殊接合装置の形成も異常を示し、DES のひきおこす障害とも共通性があり、 β -estradiol 3-benzoate は複数の作用点を持つことが示唆された。

3) 正常ラットの精巣発達過程における DES 曝露による精子形成障害の機構

ectoplasmic specialization はセルトリ細胞間およびセルトリ細胞と後期精子細胞間にみられる特殊な構造である。セルトリ細胞間の ectoplasmic specialization は、セルトリ細胞の細胞膜、その内側に存在するアクチン線維層、さらに内側の滑面小胞体から成る。セルトリ細胞と後期精子細胞間の ectoplasmic specialization では、セルトリ細胞側のみに上記の構造が存在する。セルトリ細胞間の ectoplasmic specialization には更に tight junction が存在し、これは血液-精巣関門 (blood-testis barrier) として働いている。この ectoplasmic specialization は精上皮を管腔領域 (adluminal compartment) と基底領域 (basal compartment) に分離し、生殖細胞が減数分裂を行うためにはこの adluminal compartment の存在が必須である。

セルトリ細胞の発達障害: 対照ラットでは 24 日齢で ectoplasmic specialization が完成し adluminal compartment が確立され、同じく 24 日齢では減数分裂像および step 1 精子細胞がみられた。これに対し DES 投与ラットでは 24 日齢から 49 日齢までは生殖細胞の分化が pachytene 精母細胞で留まっていた。

これとともに、DES 投与ラットでは生後 49 日まで ectoplasmic specialization の形成が未発達のみであり、対照ラットの 22 日齢の発達状態に留まっていた。したがって、24 日齢から 49 日齢の DES 投与ラットで、pachytene より後の減数分裂前期が進行しないのは、ectoplasmic specialization の発達が DES の作用によって遅滞し、adluminal compartment が確立されないためと考えられる。DES の新生仔ラットへの投与がセルトリ細胞の正常な増殖を抑制するという報告があるが、本研究の所見から、DES はセルトリ細胞の正常な分化発達をも障害すると考えられる。DES による精子形成障害が可逆的に修復可能であるのか、不可逆的変化であるかの検討が今後の課題である。

DES 投与 32 日齢から 49 日齢の精細管の内腔にセルトリ細胞の板状の突起がみられる。未発達な ectoplasmic specialization が内腔側のセルトリ細胞の板状の突起間にみられる理由として、対照群で精子細胞が出現している時期に一致することから、精子細胞を包むべきセルトリ細胞の葉状突起は発達したものの、本来支持すべき精子細胞が存在しないためと考えられる。これは、正常なラットでも生殖細胞の分化が進んでいない幼若な精巣の精細管や、生殖細胞の存在しないミュータントマウスの精細管にもみられており、DES の直接の作用による可能性は低い。

DES 投与 32 日齢から 49 日齢で精上皮の基底部に多数の B 型精祖細胞がみられたことは、B 型精祖細胞から preleptotene 精母細胞への分化が正常に行われなかったためと考えられる。これは、セルトリ細胞の分化、増殖が抑制され、セルトリ細胞に比して相対的に B 型精祖細胞が過剰となって、B 型精祖細胞の分化の進行が阻害された可能性が考えられる。

DES の作用機序: 本研究では DES の生殖細胞に対する作用について新たな知見が得られた。これまで、DES を新生仔雄ラットに過量投与した場合の作用機序として、DES が gonadotropin (FSH) 分泌を抑制すること

によりセルトリ細胞の正常な発育を抑制する可能性や、DES がエストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) を介してセルトリ細胞へ直接作用する可能性が考えられている。ER については ER α と ER β の 2 つのサブタイプがあることが報告されている。ER α は主に精巣網の上皮細胞の核に存在する。これに対し、最近発見された ER β は種々の組織に発現していて、なかでもセルトリ細胞と A 型精祖細胞の核に発現していることから、DES の作用点としての可能性を示すものと言える。これに対し、ER β 遺伝子ノックアウトマウス (β ERKO) の表現型には何の異常もみられず、受精能も正常であったため、ER β が内因性エストロゲンの作用発現にどう関与しているかは現時点では不明である。しかし、過量のエストロゲン化合物が投与された場合は、ER β と結合して障害作用を及ぼす可能性がある。さらに、ER α 遺伝子ノックアウトマウス (α ERKO) に DES を過量投与したときに、同様の処置をした正常マウスでみられるような精巣の異常がみられなかったことから、DES は ER β ではなく ER α を介して作用する可能性が示唆されている。ただし、ER α の局在が精細管内には認められず、DES の障害作用機序のすべてを説明できないことも確かである。

現時点では ER と DES との関係は不明であり、したがって DES がいずれの経路を介してセルトリ細胞の障害を引き起こすかについては、ノックアウトマウスを用いた ER の研究とともに、次項に述べる細胞内シグナル伝達系の検討が必要になってくる。

4) 遺伝子ノックアウトマウスの精巣発達過程における DES 曝露の影響の解析

エストロゲン化合物の作用機構として、細胞質内の受容体と結合して核内へ移行し、転写因子として遺伝子発現の制御に関わると考えられてきた。しかし、最近、エストロゲン受容体は細胞膜にも局在するものがあり、エストロゲン化合物が膜受容体と結合後、src ファミリーのチロシンキナーゼが関与する細

胞内情報伝達系を活性化することが示唆されるようになった (図 30)。代表的なエストロゲン化合物の一つである DES の精子形成障害作用の機序を解析する上でこの考え方を検討するために、src ファミリーのチロシンキナーゼの一つである *fyn* 遺伝子を欠失したマウスを用いて、このマウスにおいて DES 投与によって引き起こされる精子形成障害について調べた。その結果、*fyn* 遺伝子欠損マウスでは対照マウス精巣に比して DES による障害作用が軽度であった。この所見は、Fyn が DES による精子形成障害に関与することを示唆している。Fyn が細胞内骨格と共存し、セルトリ細胞の特殊接合装置でアクチンフィラメントと共存すること、DES による精子形成障害の機構の一つとしてセルトリ細胞の特殊接合装置の形成遅延が関与していることから、Fyn の活性制御機構が DES の作用点の一つであることが強く示唆される。

5) 神経系の形成における Fyn の機能と DES 曝露の影響

Fyn は精子形成におけるセルトリ細胞の接着構造形成と、これを介する生殖細胞の発達に関与するとともに神経細胞移動にも関与し、両者とも細胞骨格蛋白、とくに actin filament の制御を共通のメカニズムとすると考えられる (図 31)。本研究でも、*fyn* 欠損で生ずる扁桃体の形成障害に類似した異常が、DES 投与により引き起こされた。

以上の結果を総合的に考察すると、DES は下垂体からの FSH 分泌系に対する攪乱作用だけでなく、*fyn* が強く発現する精巣、扁桃体を含む大脳辺縁系、視床下部に直接作用して生殖機能障害を引き起こすとともに、高次脳機能障害を引き起こす可能性が考えられる (図 32)。

E. 結 論

内分泌攪乱化学物質の代表的な化合物であるエストロゲン化合物の diethylstilbestrol ならびに β -estradiol 3-benzoate の精子形成障害作用のメカニズムを光学顕微鏡、電子顕微鏡、

レーザー顕微鏡による形態学的解析ならびに生化学的解析により検討し、成体精巣においては生殖細胞に対する直接的障害、発達過程においては支持細胞であるセルトリ細胞の分化発達障害が重要な作用点であることを明らかにした。これとともに、分子細胞生物学的レベルでは、セルトリ細胞間の特殊接合装置の形成障害、発達遅延が生殖細胞分化の進行に重大な影響を与えていることを明らかにした。さらに、遺伝子ノックアウトマウスの形態学、生化学的解析、上記内分泌攪乱化学物質の投与効果の解析から、エストロゲン化合物はチロシンリン酸化酵素を介する細胞内シグナル伝達系を介してセルトリ細胞の機能調節に影響し、これが生殖細胞形成障害を引き起こす可能性を示唆した。fyn, presenilin-1, mel-18 のような細胞分化にかかわる遺伝子は生殖細胞の特定の発達段階に発現し、今後、その発現パターンと作用機序の解明は、エストロゲン化合物による生殖細胞障害とその可逆性、修復能の指標の開発に発展する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Igakura T, Kadomatsu K, Kaname T, Muramatsu H, Fan Q-W, Miyauchi T, Toyama Y, Kuno N, Yuasa S, Takahashi M, Senda T, Taguchi O, Yamamura K, Arimura K, Muramatsu T.
A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Developmental Biology* vol.194, 152-165, 1998
2. Maekawa M, Suzuki-Toyota F, Toyama Y, Kadomatsu K, Hagihara M, Kuno N, Muramatsu T, Dohmae K, Yuasa S.
Stage-specific localization of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, during mouse spermatogenesis.
Archives of Histology and Cytology vol.61,

No.5, 405-415, 1998

3. Suzuki-Toyota F, Ishibashi K, Yuasa S.
Immunohistochemical localization of a water channel protein, aquaporin 7 (AQP7), in the rat testis.
Cell and Tissue Research vol.295, No.2, 279-285, 1999
4. Toyama Y, Maekawa M, Kadomatsu K, Miyauchi T, Muramatsu T, Yuasa S.
Histological characterization of defective spermatogenesis in mice lacking the basigin gene.
Anat.Histol.Embryol. vol.28, No.3, 205-213, 1999
5. 湯浅茂樹、前川真見子、八木 健
Fyn 欠損マウスに neurogenesis と spermatogenesis の接点を探る
アニテックス vol.11, No.3, 138-145, 1999
6. Toyama Y, Iwamoto T, Yajima M, Baba K, Yuasa S.
Decapitated and decaudated spermatozoa in man and pathogenesis based on the ultrastructure.
International Journal of Andrology vol.23, 109-115, 2000
7. Toyama Y, Hosoi I, Ichikawa S, Maruoka M, Yashiro E, Ito H, Yuasa S.
 β -Estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse.
Journal of Molecular and Cellular Endocrinology, in press
8. Toyama Y, Maekawa M, Ohkawa M, Oku R, Yuasa S.
Neonatally administered diethylstilbestrol retards the development of ectoplasmic specialization in the rat testis.
Journal of Andrology, submitted

2. 学会発表

(シンポジウム)

1. 湯浅茂樹

分子細胞生物学からみた精子形成とその障害

第一回生殖毒性シンポジウム (1999 年 1 月 20 日)

講演記録「環境化学物質の生殖毒性」
p.40-45

2. 前川眞見子、湯浅茂樹

精子形成における Fyn tyrosine kinase の機能解析

第 104 回日本解剖学会全国学術集会 (1999 年 3 月 30 日)

解剖学雑誌 vol.74, No.1 p.36 (1999)

3. Shigeki Yuasa

Both spermatogenesis and neurogenesis are defective in the Fyn-deficient mice: a prospect on the possible common molecular mechanisms related to environmental endocrine disruptors.

International symposium on environmental endocrine disruptors '99 (1999.12.9)

Abstracts p.67-70

4. 湯浅茂樹

環境ホルモンの精子形成と神経発生への障害メカニズム: 遺伝子欠損マウスからの分子細胞生物学的アプローチ

日本獣医学会学術集会シンポジウム (2000 年 4 月 4 日)

講演要旨集 p.21

(一般発表)

1. 丸岡美貴、市川壮一郎、矢代英子、外山芳郎、湯浅茂樹

マウス精子形成に対する β -estradiol 3-benzoate の影響

第 104 回日本解剖学会全国学術集会 (1999 年 3 月 29 日)

解剖学雑誌 vol.74, No.1 p.71 (1999)

2. 奥 怜子、大川雅樹、前川眞見子、湯浅茂樹、外山芳郎

ラット新生仔への diethylstilbestrol (DES) 投与による精巣生後発達の障害メカニズム

第 105 回日本解剖学会全国学術集会 (2000 年 3 月 31 日)

解剖学雑誌 vol.75, No.1 p.63 (2000)

3. 外山芳郎、前川眞見子、湯浅茂樹

精細管内腔への細胞骨格毒注入によるセルトリ細胞の特殊接合装置の機能の解析

第 105 回日本解剖学会全国学術集会 (2000 年 3 月 30 日)

解剖学雑誌 vol.75, No.1 p.142 (2000)

4. 前川眞見子、湯浅茂樹

プレセニリン-1 の精巣内局在と精巣発達における機能

第 105 回日本解剖学会全国学術集会 (2000 年 3 月 30 日)

解剖学雑誌 vol.75, No.1 p.143 (2000)

5. Yuasa S, Maekawa M, Hosoi I, Ito H, Shirasawa T.

Immunolocalization and function of presenilin-1 in the mouse testis.

The Third Asian and Oceanic Congress of Andrology (24-27, May 2000)

International Journal of Urology vol.7 Suppl. S64 (2000)

6. Maekawa M, Yagi T, Hosoi I, Ito H, Yuasa S.

Fyn tyrosine kinase in the mouse testis: localization and possible function in the spermatogenesis.

The Third Asian and Oceanic Congress of Andrology (24-27, May 2000)

International Journal of Urology vol.7 Suppl. S64 (2000)

7. Toyama Y, Maekawa M, Hosoi I, Ito H, Yuasa S.
Effects of diethylstilbestrol to postnatal development of the rat testis.
The Third Asian and Oceanic Congress of Andrology (24-27, May 2000)
International Journal of Urology vol.7 Suppl. S65 (2000)

8. Hosoi I, Toyama Y, Yuasa S, Ito H.
Effects of β -estradiol 3-benzoate to spermatogenesis in the mouse.
The Third Asian and Oceanic Congress of Andrology (24-27, May 2000)
International Journal of Urology vol.7 Suppl. S65 (2000)

Molecular and cellular biological mechanisms of the defective spermatogenesis due to the exposure to the endocrine disruptors

Shigeki Yuasa

Chiba University School of Medicine, Department of Anatomy and Developmental Biology

Professor and Chairman

Key Words :

signal transduction, diethylstilbestrol, β -estradiol 3-benzoate, ectoplasmic specialization, spermatogenesis, tyrosine kinase, gene targeting, endocrine disruptors

Abstract:

It has been established that various estrogenic chemicals affect spermatogenesis as the endocrine disruptors. However, the mechanisms of harmful actions of such estrogenic endocrine disruptors are not clear at the level of cellular and molecular biology. It is necessary to elucidate the action mechanisms of the estrogenic chemicals for the detection of harmful chemicals and prevention of the hazards. Estrogenic chemicals exert the effects through the binding to the nuclear estrogen receptors and the regulation of gene transcription. Recently, another mechanisms of estrogen actions which exert the effects by binding to the membrane estrogen receptor and activating the tyrosine kinase-mediated intracellular signal transduction cascade have been proposed. In this project, we have examined biochemically and morphologically the mechanisms of the defective spermatogenesis in the Fyn tyrosine kinase-gene knockout mice, in combination with the analysis of the harmful actions of representative estrogenic chemicals such as β -estradiol 3-benzoate and diethylstilbestrol (DES). We have found that the affected development of the adhesion structures on the Sertoli cells, i.e. the ectoplasmic specialization should be involved both in the defective spermatogenesis due to Fyn tyrosine kinase deficiency and also due to the neonatal administration of DES. The possible involvement of Fyn tyrosine kinase in the formation of ectoplasmic specialization in the developmental process was also suggested. In addition to such developmental stage, it was also found that estrogenic chemicals affect the spermatogenesis of the adult testis by the action on the early stage of spermatid differentiation and defective formation of the ectoplasmic specialization is also involved. On the other hand, DES administration to the neonatal rodents elicited defective neural structure in the limbic system, and such defects were also found in the Fyn deficient mice. Above findings indicated that the crossover points between the Fyn tyrosine kinase-mediated signal transduction system and the cell adhesion-cytoskeletal system might be one of the new targets of harmful estrogenic compounds. Furthermore, DES might affect the neural development and induce defects in the higher brain function including memory and emotion.

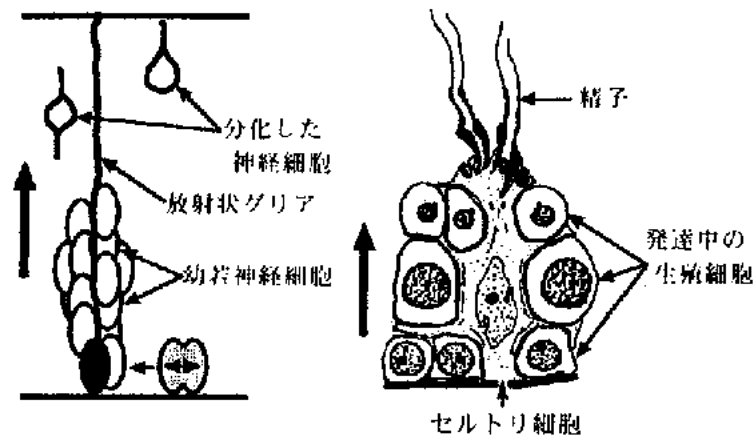


図 1 中枢神経発生過程における放射状グリアにガイドされた幼若神経細胞移動（左）と精子形成過程におけるセルトリ細胞に接して進行する生殖細胞分化（右）は細胞生物学的に多くの共通性を示す。

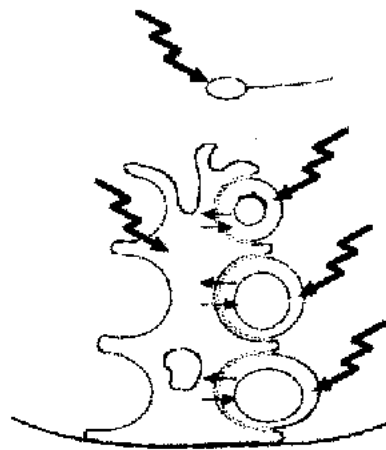


図 2 内分泌攪乱化学物質は下垂体を中心とする内分泌ホメオスターシスを障害するとともに、造精細胞あるいは支持細胞に直接作用する可能性がある。

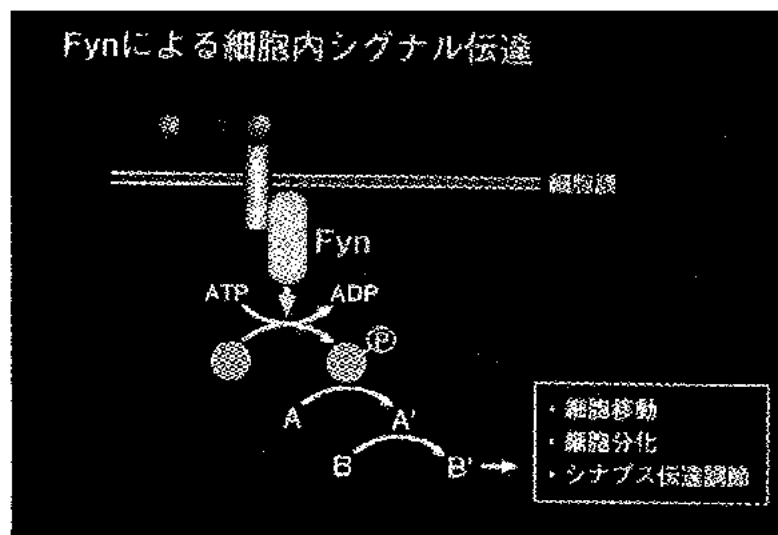


図 3 Fyn チロシンキナーゼを介する細胞内情報伝達システム。このシステムは脳、精巣、免疫系に強く発現している。

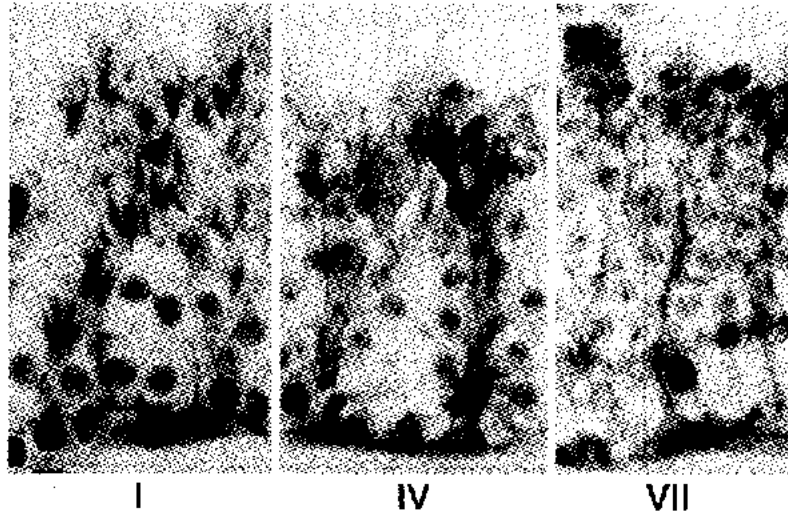


図 4 成体マウス精巣の抗 Fyn 抗体による免疫染色像。各ステージでセルトリ細胞に局在していることがわかる。

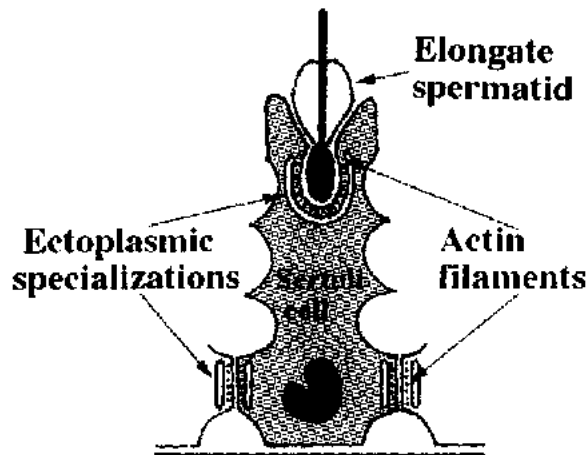


図 5 セルトリ細胞が形成する特殊接合装置 (ectoplasmic specialization) の模式図。精子細胞頭部-セルトリ細胞間、隣接するセルトリ細胞基部間に形成され、細胞膜直下にアクチンフィラメント、その直下に小胞体が局在する。

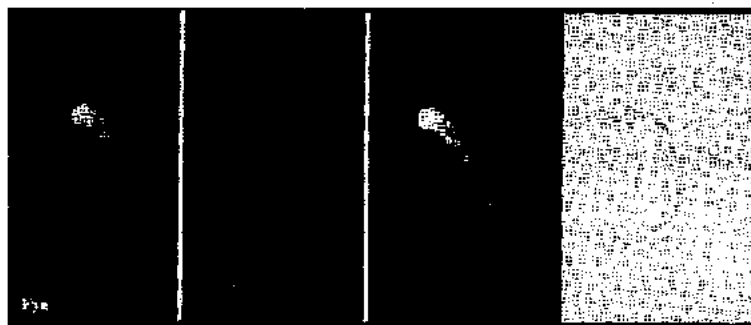


図 6 単離した精子細胞頭部-セルトリ細胞の結合部の FITC 標識抗 Fyn 抗体ならびに rhodamin 標識ファロイジンによる二重標識。両者が ectoplasmic specialization において共存することを示す。