

平成 12 年度
内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムの
解明等基礎的研究

研 究 報 告 書

平成 13 年 3 月

財団法人日本公衆衛生協会

目 次

1. 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子生物学的機構の解明
千葉大学医学部解剖学第二講座 湯浅 茂樹 ----- 1
2. 核内転写調節 (PPAR) を介した内分泌攪乱化学物質の
生殖毒性作用の機構及び安全性の研究
信州大学医学部衛生学 那須 民江 ----- 14
3. マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機能の解析
長崎大学医学部解剖学第三講座 小路 武彦 ----- 23
4. 新たな核内内分泌攪乱化学物質レセプターの同定及びレポーター
遺伝子を導入した細胞の培養
東京大学分子細胞生物学研究所 加藤 茂明 ----- 44
5. 重金属化合物による内分泌攪乱作用の機序に関する研究
北里大学薬学部公衆衛生学 姫野誠一郎 ----- 50
6. ヒト生殖細胞の形成・維持に及ぼす内分泌攪乱化学物質の影響に
ついての研究
徳島大学医学部公衆衛生学 中堀 豊 ----- 58
7. PPAR γ を介した内分泌攪乱化学物質の毒性発現メカニズムの解明
名古屋市立大学薬学部微生物薬品学 今川 正良 ----- 64
8. 生殖毒性の早期マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に
関する研究
北海道大学大学院医学研究科 岸 怜子 ----- 71
9. 内分泌攪乱化学物質を始めとする環境汚染物質の野生生物に対する
影響と環境評価
北海道大学大学院獣医学研究科 藤田 正一 ----- 81
10. 生殖発達毒性に関する研究
日本獣医畜産大学獣医畜産学部 鈴木 勝士 ----- 98

11. 塩素化芳香族による生殖機能への影響評価
九州大学大学院医学研究院 大村 実----- 104
12. メダカに対する内分泌攪乱化学物質の短期曝露に関する研究
東京都環境科学研究所基盤研究部 若林 明子----- 117
13. 環境生物の免疫影響に関する研究
国立環境研究所環境健康部 小林 隆弘----- 125
14. 絶滅が危惧される両生類の国内実態調査と情報ネットワークの
作成及び環境汚染モニター動物の作製に関する研究
早稲田大学教育学部生物学 中村 正久----- 155

1. 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子生物学的機構の解明

研究者 湯浅 茂樹 (千葉大学医学部解剖学第二講座教授)

研究要旨

エストロゲン様作用を示す分子が内分泌攪乱化学物質として精子形成障害を引き起こす分子細胞生物学的レベルでのメカニズムは不明である。有害物質の検索、障害予防の基盤構築にはこれらの分子の作用機構を解明する必要がある。

本研究では代表的なエストロゲン様作用分子である diethylstilbestrol(DES)の精子形成障害作用の機構を、in vivo、in vitro の両系において形態学ならびに生化学・分子生物学の両面から解析した。その結果、in vivo の精巣発達過程における生殖細胞の形成障害、特に減数分裂の障害には、支持細胞である Sertoli 細胞間の接着構造(ectoplasmic specialization)の形成異常による血液-精巣関門の破綻が基盤となっていることを明らかにした。この障害は可逆的であり、また、エストロゲン受容体アンタゴニストの Tamoxifen 同時投与では予防できないことも明らかになった。さらに、意外なことに、DES と Tamoxifen 同時投与によって、各々の単独投与では生じない Leydig 細胞ならびに筋様細胞の形成異常が引き起こされ、エストロゲン関連分子の複合により新たな障害が発生することが示唆された。これとともに、DNA チップを用いた遺伝子発現解析により、DES により変動する遺伝子のプロフィールも明らかになった。

ついで DES の精巣内作用点として Sertoli 細胞に注目し、in vitro で Sertoli 細胞株 TM4 の DES 曝露による分子細胞生物学的変動を解析した。電顕的には粗面小胞体の拡大が認められ、この変化は可逆的であった。これとともに、二次元電気泳動により、DES 曝露で特定の蛋白が著明に減少すること (DES-responsive proteins of Sertoli cell: DREPS と命名)、また特定蛋白のチロシンリン酸化が著明に亢進すること(DES-induced tyrosine phosphorylation in Sertoli cell: DITYPS と命名)を見いだした。これらの変化は細胞株 TM4 に特有であり、線維芽細胞系の NIH3T3 では認められず、DES 関連分子の検出系となりうる。

さらに、生殖細胞ならびに Sertoli 細胞分化の新たな分子マーカーとして、Notch-1、presenilin-1、TuJ1 を用いて DES 曝露精巣における発現様式を解析し、精子形成障害、Sertoli 細胞障害と分子発現動態がよく相関することを明らかにした。また、新たなマーカーとして、精巣特異的 presenilin-1、actin 制御分子 WAVE1、3 の cDNA クローニングを行い、精巣内での発現様式を検討し、特定細胞群の分化の新たな分子マーカーとなりうることを明らかにした。

エストロゲン様作用分子はエストロゲン受容体に結合後、転写制御に関わるだけでなく、チロシンリン酸化酵素を介する細胞内情報伝達系にも作用する可能性が示されるようになった。本研究の知見は、精巣内の細胞内情報伝達系と細胞接着構造 細胞骨格システムの接点で、新たにエストロゲン様作用物質の標的の一つとなりうることを示しており、精子形成障害の分子機構と分子マーカーの開発への新たな局面を示唆するものと考えられる。

研究協力者

外山芳郎（千葉大学医学部解剖学第二講座 講師）、前川眞見子（千葉大学医学部解剖学第二講座 助手）、関 直彦（ヘリックス研究所 主任研究員）、古関明彦（千葉大学医学部発生生物学講座 教授）、白澤 浩（千葉大学医学部微生物学第一講座 教授）、八木 健（大阪大学細胞工学センター 教授）

A.研究目的

現在、内分泌攪乱化学物質に関しては生物環境ならびに人の健康に対する脅威が、主に精子数の減少と環境生物の生殖障害の観点から注目されている。今後、これらの物質がなぜ有害であるのかをその作用機構の点から明らかにする努力が、国民の不安を解消し安全な生活の確保を図る上で必要である。

本研究では代表的なエストロゲン様物質で、人体に対する影響も明らかにされている diethylstilbestrol (DES) の精子形成障害作用の機構を、*in vivo*、*in vitro* の両系において形態学ならびに生化学・分子生物学の手法を用いて解明することを目的とする。そして、その成果をもとにして内分泌攪乱化学物質の健康障害に関する分子生物学的マーカーならびに障害の分子細胞生物学的レベルでのメカニズムを解明することを目指す。

内分泌攪乱化学物質は内分泌系のホメオスタシスを乱すとともに、精子形成過程で生殖細胞分化の種々の段階、支持細胞への直接的効果も考慮する必要がある。本研究は代表的な内分泌攪乱化学物質の作用の分子レベルでの解明の糸口を作るものとして、作用の本態にもとづいた客観的な体系的検索方法、ひいては障害の予防あるいは治療法の開発に貢献することが期待できる。

B.研究方法

(1) マウス生後発達過程における DES 曝露による精子形成障害とその可逆性

ICR 系の雄新生仔マウスに diethylstilbestrol (DES) 1 μ g を生後 2, 4, 6, 8, 10, 12 日齢に投与した。生後 14 日齢以降、DES 投与マウスとそれに対応する対照群のマウスの光学顕微鏡および電子顕微鏡用試料を作製した。また、一部の標本については凍結切片を作成し、蛍光標識ファロイジンを用いてアクチンフィラメントの標識を行ない、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) ラット生後発達過程における DES 曝露に対するエストロゲン受容体アンタゴニスト投与の効果

DES 投与によって引き起こされる精子形成障害が、DES のエストロゲン様作用によるものか、あるいは DES 特有の直接作用によるものかを検討した。このために、DES とともにエストロゲン受容体アンタゴニストである 4-OH-Tamoxifen (Tam) を投与し、Sertoli 細胞障害を防止あるいは軽減する効果があるかどうかを検討した。

グループ 1 の Wistar 系雄ラット新生仔に 1 匹あたり、DES 10 μ g を投与した。グループ 2 の雄ラット新生仔には 1 匹あたり、Tam 20 μ g を投与した。また、グループ 3 には 1 匹あたり、Tam 20 μ g + DES 10 μ g を投与した。各グループについて、生後 14 日齢以降で光学顕微鏡および電子顕微鏡用試料を作成した。

(3) マウス精巣発達過程における DES 曝露による遺伝子発現の変動の解析

胎生期マウス（妊娠 11~16 日）を DES に曝露し、生後 2 ヶ月において DES 曝露精巣と対照マウス精巣からそれぞれの mRNA を調製した。これを逆転写反応によりそれぞれ Cy5、Cy3 で標識し、DNA チップ（胎生 14.5 日マウスの cDNA クローン 2,300 個をのせた cDNA マイクロアレイ）を用いて遺伝子発現頻度解析を行って、DES 投与により発現が変動（増大あるいは減少）する遺伝子の検出を試みた。なお、生後 2 ヶ月において、DES 曝露精巣では組織学的に精子形成障害が認められた。

(4) DES の培養 Sertoli 細胞株に対する分子細胞生物学的作用機序の解析

Sertoli 細胞の cell line である TM4 を用いて、培養

液にDES (10ng/ml)を加えた際にどのような形態変化が起こるか、またその変化の可逆性を電子顕微鏡を用いて観察した。また、対照として、線維芽細胞株NIH3T3にDESを添加した際の形態学的変化の有無も検討した。

さらに、DES添加によって変動する蛋白質を二次元電気泳動により検出した。そして、著明な変動を示すスポットについて蛋白質のアミノ末端のアミノ酸塩基配列の検討を行った。これとともに、DES添加による蛋白質のチロシンリン酸化の変動を二次元電気泳動-Western blottingにより検討した。

(5) DES 曝露による精子形成障害における presenilin-1、Notch-1、TuJ1 の発現変動の解析

上記のマウス生後発達過程での DES 曝露後、精巣の凍結組織切片を作成し、免疫組織化学的に presenilin-1、Notch-1、TuJ1 の発現様式を検討した。

(6) 精巣特異的制御分子の cDNA クローニング

(a) 精巣特異的 presenilin-1 の cDNA クローニングと発現様式

精巣特異的 presenilin-1 分子種は DES 曝露後の生殖細胞の分化能回復の指標となると考えられるため、その cDNA クローニングを行った。

(b) 精巣特異的 actin 制御分子 WAVE 1 および 3 の cDNA クローニングと発現様式

マウス精巣で精粗細胞に発現し、生殖幹細胞の障害の程度を検討するための分子マーカーとして WAVE 1 および 3 の cDNA クローニングを行った。

(c) 新たな Sertoli 細胞マーカーの開発

幼若神経細胞に特異的に発現する細胞骨格蛋白 TuJ1 の精巣における発現を検討した。

(7) 倫理面への配慮

マウス、ラットを用いる動物実験で、灌流固定ならびに組織標本採取に際してはエーテルあるいはネブタールによる深麻酔下で苦痛のない状態で、かつ短時間のうちに操作を行なった。なお、この動物実験手技は千葉大学亥鼻地区動物福祉特別委員会で承認されている。

C. 研究結果

(1) 正常マウス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

(a) 形態学的変化 --- ectoplasmic specialization と blood-testis barrier の形成障害ならびに障害の可逆的回復

精巣重量は DES 投与マウスの 14 日齢以降で、各々の対照に比べて小さく、差が最も大きい時 (35 日齢) では対照の 10% であった。

精子形成の異常 (図 1) : 14 日齢までの DES 投与マウスと対照マウスの精上皮の発達段階は同じであり、精祖細胞および合糸期 (zygotene) までの精母細胞がみられた。21 日齢対照マウスでは複糸期 (diplotene) 精母細胞まで発達した一次精母細胞がみられた。しかし、DES 投与マウスの精上皮には多くの変性した太糸期 (pachytene) 精母細胞がみられた。28 日齢対照マウスでは step11 精子細胞まで分化が進んでいるのに対し、DES 投与マウスでは一次精母細胞の分化が減数分裂中期 (metaphase) でとどまっていた。35 日齢対照マウスでは分化は step16 精子細胞まで進んでいた。これに対し、DES 投与マウスでは step6 精子細胞までしか進んでいなかった。そして、42 日齢以降は両群とも精子形成が認められた。すなわち、対照ラットでは 28 日齢までには減数分裂像およびそれに続く step11 までの精子細胞が現れたのに対し、DES 投与マウスでは 1 週間遅れて 35 日齢になって初めて減数分裂像と step 6 までの精子細胞が現れた。そして、DES 投与マウスにおける発達の遅延は可逆的に回復可能なものであった。

精細管内腔の異常 : 対照マウスでは 18 日齢以降で精細管の内腔が形成されているのに対し、DES 投与マウスでは 32 日齢以降で内腔が形成されていたが、その内腔には正常には認められない絨毛状の Sertoli 細胞突起が無数にみられた。

特殊接合装置 (ectoplasmic specialization) の異常

(図 2) : 対照マウス 14 日齢では ectoplasmic specialization は未発達であるが、21 日齢以降では発達した接合装置が Sertoli 細胞間で Sertoli 細胞の核の高さに認められた。DES 投与マウス 21 日齢から 28 日齢では、未発達で不完全な ectoplasmic

specialization が Sertoli 細胞間で Sertoli 細胞の核の高さにみられた。すなわち、短いもの、片側だけが形成されたもの、actin filament のないものなどである。

この未発達な ectoplasmic specialization が機能的に血液-精巣関門の機能を果たしているかどうかを、血管内投与されたチトクローム C の精細管内腔への移行の有無で調べたところ、血液-精巣関門の機能が破綻していることが明らかになった。DES 投与マウスでは 35 日齢になると、発達した ectoplasmic specialization が Sertoli 細胞間で Sertoli 細胞の核の高さに多数認められるようになった。

(b)マウス精巣発達過程における DES 曝露による遺伝子発現の変動の DNA チップを用いた解析

胎生期に DES に曝露したマウスの生後 2 ヶ月における精巣と対照マウス精巣からそれぞれ調製した mRNA を用いて、DNA チップにより遺伝子発現頻度解析を行った。検索した 2,300 個の遺伝子のうち、DES 曝露により著明に増加するもの 8 個、著明に減少するもの 20 個が検出された。現在、各遺伝子のノザンブロット解析、RT-PCR 解析を開始している。

(2) ラット雄新生仔の DES 曝露による精巣障害に対するエストロゲン受容体アンタゴニスト Tamoxifen (Tam) 投与の効果 (表 1)

ラット雄新生仔に Tam を単独投与した場合、DES 投与と同様に Sertoli 細胞間の特殊接合装置の形成遅延とともに、生殖細胞の減数分裂の進行は対照群に比べると約 10 日間遅延した。Tam 単独投与の場合は、これらの障害は DES 投与の場合と比較して早期に回復し、生後 8 週には対照とほとんど差がなくなった。

Tam と DES の同時投与では、予測された両者の拮抗作用、すなわち DES による精子形成障害の Tam による防止・軽減は認められず、Sertoli 細胞間の特殊接合装置の形成の遅延ならびに生殖細胞の減数分裂の進行の遅延が DES 単独投与と同様に認められた。

さらに意外なことに、Tam と DES の同時投与では、各々の単独投与では認められなかった Leydig

細胞の発達障害と筋様細胞 (myoid cell) の変性が生じた。Leydig 細胞の減少は生後 8 週においても回復しなかった。

(3) DES の Sertoli 細胞株に対する分子細胞生物学的作用の解析 (図 3)

形態学的変化: 細胞株 TM4 を DES 曝露した場合、粗面小胞体内腔の拡大が認められた。この変化は、DES を培養系から除くと可逆的に消失した。線維芽細胞株 NIH3T3 では DES 曝露によってもこのような変化は認められなかった。

生化学的変化: 二次元電気泳動を行うと、DES 曝露した TM4 で分子量 65kD、等電点 6.4 の蛋白群の著明で特異的な減少が認められ、DES-responsive proteins of Sertoli cell (DREPS) と命名した。DREPS は Sertoli 細胞株特異的で NIH3T3 では検出されなかった。この蛋白を二次元電気泳動で単離し N 末端アミノ酸配列の解析を行ったところ D-T-H-K-S-E-I と同定された。さらに、DES 曝露した TM4 で分子量 38kD、等電点 5.9 の蛋白のチロシンリン酸化の著明で特異的な亢進が認められ、DES-induced tyrosine phosphorylation in Sertoli cell (DITYPS) と命名した。このチロシンリン酸化の亢進は NIH3T3 の DES 曝露では認められなかった。

(4) DES 曝露による精子形成障害における精巣分化マーカー presenilin-1 (PS-1)、Notch-1、TuJ1 の発現変動の解析

正常精巣組織では、PS-1 は精子細胞 (step4~8) に発現し、Notch-1 は精母細胞 (pachytene) から精子細胞 (step1~7) に発現していた。また、TuJ1 は早期から Sertoli 細胞の細胞体から突起全体に発現していた。

対照マウス精巣を生後 19 日に免疫組織化学的にしらべると、PS-1、Notch-1 とともに発現が認められ減数分裂が進行していることが明らかに示された。これに対し、新生仔期に DES 曝露された群では PS-1 の発現は認められず、Notch-1 も少数の spermatocyte における発現が認められるのみで、減数分裂の進行に障害のあることが明瞭に示された。また、TuJ1 陽性の Sertoli 細胞は対照群では

突起を放射状に伸長し生殖細胞と全長にわたって接していたが、DES 投与群では生殖細胞の発達障害と対応して、内腔面に多数の Sertoli 細胞由来の葉状突起が充満していた。

(5)生殖細胞特異的制御分子の cDNA クローニング

(a)WAVE-1, 3 cDNA のクローニング

クローニングした cDNA の in situ hybridization より、本分子は脳辺縁系および神経発生過程に発現するとともに、生殖細胞系列においても精祖細胞・精母細胞に特異的に発現することがわかった。

(b)精巣特異的 prcsenilin-1cDNA のクローニング

マウス精巣 cDNA ライブラリーのスクリーニングにより単離したクローンの構造解析が現在進行中である。

D.考察

(I)マウス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

Sertoli 細胞間接着構造の発達障害と精子形成障害の相関: ectoplasmic specialization は Sertoli 細胞間および Sertoli 細胞と後期精子細胞間にみられる特殊な構造である。Sertoli 細胞間の ectoplasmic specialization は、Sertoli 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。Sertoli 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。

本研究では DES の Sertoli 細胞に対する作用について新たな知見が得られた。対照マウスでは 21 日齢で ectoplasmic specialization が完成し adluminal compartment が確立され、21~28 日齢の間に減数分裂と精子細胞への分化の進行がみとめられた。これに対し DES 投与マウスでは 21 日齢から 35 日

までは精母細胞の分化が減数分裂中期で留まっていた。これとともに、DES 投与マウスでは生後 35 日まで ectoplasmic specialization の形成が未発達のままであった。したがって、28 日齢から 35 日齢の DES 投与マウスで、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 の新生仔マウスへの投与が Sertoli 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 Sertoli 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ことも明らかになったが、この知見は Sertoli 細胞分化の遅延が可逆的に回復することと良く相関しており、DES 作用の分子機構解明への重要な基盤となる。

DES の作用機序とエストロゲン受容体: これまで、DES を齧歯類雄新生仔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 Sertoli 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 Sertoli 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。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 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。

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 Sertoli 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。しかし、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