

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。

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Sertoli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、本研究におけるERアンタゴニストを用いたDES作用の研究が必要となる。

DES曝露によるSertoli細胞障害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Sertoli細胞の形態と機能の異常、とくに特殊接合装置の形成障害と血液-精巣関門の機能障害が、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明らかにするために、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)を投与した。その結果、TamにはDESによるSertoli細胞障害を防止あるいは軽減する効果が認められなかった。したがって、DESはエストロゲン受容体と直接反応しない別の作用機序を介する可能性が示唆された。

さらに、Tamのみの投与によっても、Sertoli細胞の発達障害と精子形成異常が一過性に生じること、DESとTamの同時投与により、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の形成異常が生じたことは、これらの分子の作用機序がin vitroで観察されたアゴニスト

アンタゴニストの関係だけでは説明できないことを示している。In vivoではむしろ両者は協同的に作用して新たな効果を生じている可能性があり、今後、内分泌攪乱化学物質の複合作用のモデルとなりうる。

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

DNAマイクロアレイによるDNAチップを用いた遺伝子発現解析により、胎生期のDES曝露により発現が増大あるいは低下する遺伝子を同定した。今後、これらの遺伝子の組織内発現様式や変動パターンの解析を行うとともに、変動する遺伝

子群の間で細胞内シグナル伝達系のような共通の機能的連関についての系統的解析を行ってゆく必要がある。

(2)DESの培養Sertoli細胞株に対する作用機序

二次元電気泳動により検出された、DES曝露によりTM4で特異的に減少する蛋白DES-responsive proteins of Sertoli cell (DREPS)は線維芽細胞株には検出されず、Sertoli細胞に特異的な蛋白である可能性がある。電顕的に観察された小胞体の異常は、小胞体が特殊接合装置(ectoplasmic specialization)の構成要素であることから、特殊接合装置のin vivoにおける形成障害をin vitroで反映している可能性がある。したがって、DREPSは特殊接合装置の構成分子の可能性も考えられ、DESによる発現抑制とin vivoで認められる特殊接合装置の発達障害を結びつける機能をもつことが期待される。

一方、DES曝露によりTM4で特異的に亢進するチロシンリン酸化 DES-induced tyrosine phosphorylation in Sertoli cell (DITYPS)については、DESの細胞膜への作用から引き起こされるSrcファミリーチロシンキナーゼの活性化と、これを介する特殊接合装置の形成制御システムとして機能している可能性がある。マウス精巣においてFynチロシンキナーゼ基質分子の80kDa蛋白のリン酸化がDES投与で亢進することも見出しており、このリン酸化反応がDESによる精子形成障害の指標となることが強く示唆される。現在、これらの蛋白の精製、部分アミノ酸配列の決定からcDNAクローニング、遺伝子構造の決定、ノックアウトマウスの作成をめざしたプロジェクトの実現が必要とされている。

さらに、DES非処理とDES処理を行ったTM4 cell lineからRNAを抽出し、DNAチップによりDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現頻度解析を行って、DES投与によりSertoli細胞特異的に発現が変動する遺伝子の検出、同定のプロジェクトを開始している。

(3)生殖細胞特異的制御分子のDES曝露による変動の解析

PS-1、Notch-1 は精子形成細胞の特定の分化発達段階に発現する。DES 曝露により精子形成細胞の発達障害が起こった精巣におけるこれらの分子の発現様式は、各生殖細胞を形態学的に分類同定した結果とよく対応し、今後、精子形成障害の程度とパターンを容易に同定するための分子マーカーとなることがわかった。

一方、Sertoli 細胞のマーカーとして新たに TuJ1(neuron specific tubulin)が有用であることを見いだした。これを用いることにより、これまで顕微鏡所見と F-actin 標識の組み合わせから Sertoli 細胞の全体像を類推していたが、このマーカーにより、DES 曝露マウス精巣の Sertoli 細胞の構築が明瞭となった。

また、新たにアクチン制御分子 WAVE1、3 の cDNA クローニングにより、これらの遺伝子発現が精粗細胞にみとめられることが明らかとなり、今後、幹細胞の動態も解析可能と考えられる。これとともに、精巣特異的 PS-1 アイソフォームおよび Fyn チロシンキナーゼ基質分子(80kDa 蛋白)の cDNA のクローニングが進行中であり、今後、新たな分化発達段階のマーカーや DES 反応性蛋白の局在と機能が明らかになると考えられる。

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様化合物 diethylstilbestrol(DES)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、分子生物学的解析により検討した。

その結果、発達過程において、支持細胞である Sertoli 細胞が重要な作用点であり、その分化発達障害が主たる作用機構であることが示唆された。これとともに、細胞生物学的レベルでは、Sertoli 細胞間に形成される特殊接合装置(ectoplasmic specialization)の形成障害、発達遅延が生殖細胞の減数分裂の進行に重大な影響を与えていることを明らかにした。DNA チップを用いた遺伝子発現解析からも、DES 投与で変動する遺伝子群が検出できた。さらに、Sertoli 細胞株 TM4 の DES 曝露による形態学的ならびに生化学的反

応から、この細胞株が Sertoli 細胞特有の性質を保持し、DES により特異的な蛋白発現ならびにチロシンリン酸化反応をしめすことが明らかとなった。また、DES の作用はエストロゲン受容体アンタゴニストではほとんど拮抗できないことも明らかにになった。

以上の解析から、DES 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 Sertoli 細胞の遺伝子発現に影響し、これが Sertoli 細胞間の接着構造の形成異常、ひいては生殖細胞の減数分裂の障害を引き起こすことが強く示唆された。今後、DES に反応して変動する Sertoli 細胞特異的分子の構造、機能の解明は、エストロゲン化合物による生殖細胞障害とその可逆性の機構解明、障害とその修復能の分子マーカー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

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

湯浅茂樹

ノックアウトマウスリスト 精巣：精子形成
生体の科学 vol.51, 478, 2000

Kojima S, Hatano M, Okada S, Fukuda T, Toyama Y, Yuasa S, Ito H, Tokuhisa T.
Testicular germ cell apoptosis in Bcl-6-deficient mice.
Development vol.128, 57-65, 2001

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

Toyama Y, Ohkawa M, Oku R, Maekawa M, Yuasa S.
Neonatally administered diethylstilbestrol (DES)
retards the development of the blood-testis barrier in
the rat.

Journal of Andrology, in press

Yuasa J, Toyama Y, Miyauchi T, Maekawa M, Yuasa S,
Ito H.

Specific localization of the basigin protein in human
testes from normal adults, normal juveniles, and
patients with azoospermia.

Andrologia, in press

Yuasa J, Ito H, Toyama Y, Yuasa S, Masai M.

Postnatal development of the testis in Japanese
children.

International Journal of Urology, in press

2.学会発表

(シンポジウム)

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

Maekawa, M

Fyn tyrosine kinase in the mouse testis:
Morphological and biochemical abnormalities in the
fyn-deficient mouse

XV International Symposium on Morphological
Sciences

(September 18-21, 2000; Kyoto, Japan)

Abstract, p18

前川眞見子

精巣における Fyn チロシンキナーゼの機能 シグ
ナル伝達の観点から

第5回 Wako つくばフォーラム 精子形成の最先

端(2000年9月29日)

要旨集 p6

外山芳郎

生殖細胞 セルトリ細胞間特殊接合装置:環境ホ
ルモンおよび遺伝子ノックアウトからの新局面
生理学研究所「生殖細胞の構造と機能発現に関す
る研究会」(2000年11月24日)

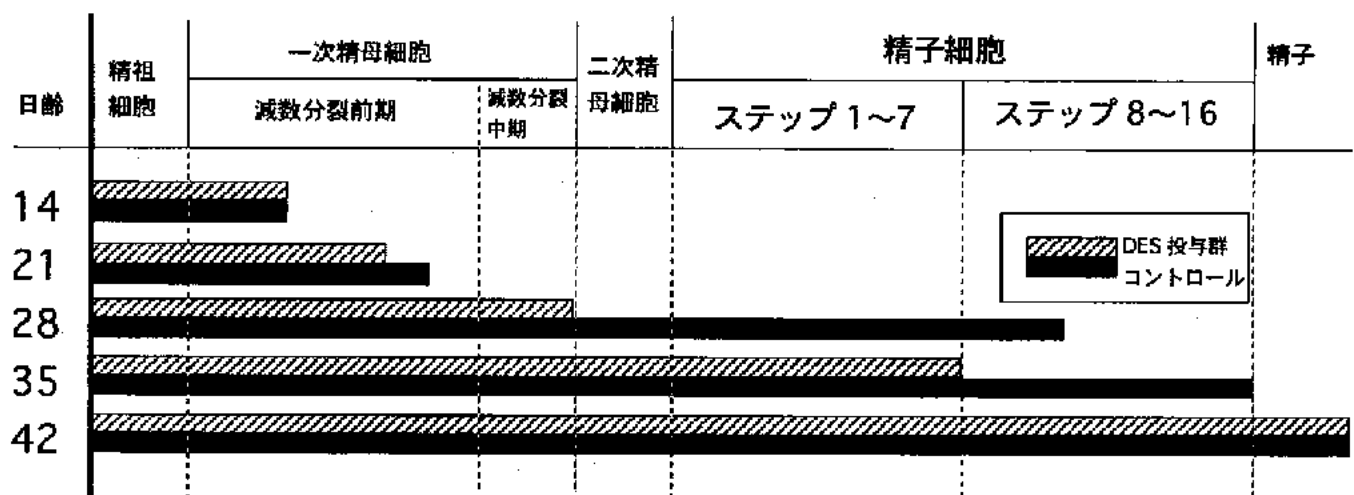
外山芳郎

女性ホルモンと精巣

千葉大学市民公開講座「我々をとりまく内分泌攪
乱化学物質(環境ホルモン)」(2000年12
月20日)

要旨集 p.9-11

図1 新生仔期 DES 投与によるマウス生殖細胞分化の遅延



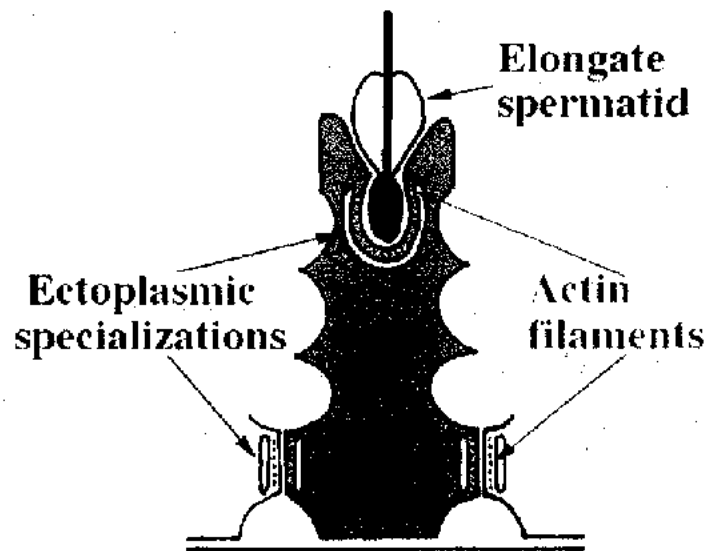
14 日齢までは DES 投与マウスと対照マウスの精上皮の発達段階に差がなかった。21 日齢対照マウスでは一次精母細胞がみられた。DES 投与マウスでは変性した精母細胞が多数みられた。28 日齢対照マウスでは step11 精子細胞まで分化が進んでいるのに対し、DES 投与マウスでは一次精母細胞の分化が減数分裂中期でとどまっていた。35 日齢対照マウスでは分化は step16 精子細胞まで進んでいたが、DES 投与マウスでは step6 精子細胞までしか進んでいなかった。そして、42 日齢以降は両群とも精子形成が認められた。すなわち、DES 投与マウスでは1週間遅れて 35 日齢になって初めて減数分裂の進行、精子細胞の出現が認められ、DES 投与マウスにおける発達の遅延は部分的に回復可能なものであった。

表1 雄ラット新生仔への DES、Tamoxifen (Tam)および DES-Tam 複合投与の作用の比較

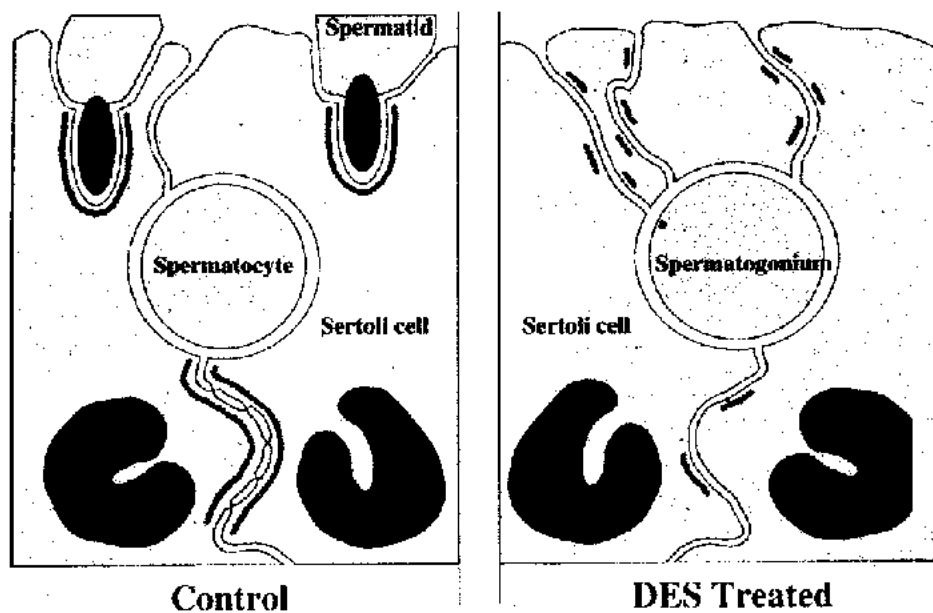
	減数分裂の 阻止	血液・精巣関門の 形成遅延	ライディッヒ細胞の 発生阻害	筋様細胞の 変性
DES 単独	++	++	—	—
Tam 単独	+	+	—	—
DES + Tam	++	++	+	++

DES、Tam 単独投与では生殖細胞分化、Sertoli 細胞発達の遅延が生じるが、両者の複合投与で新たに Leydig 細胞、筋様細胞の形成異常が生じる。DES による精子形成障害に対する Tam の拮抗作用は認められなかった。

図 2 Sertoli 細胞特殊接合装置 (ectoplasmic specialization) の構成と DES 曝露による形成障害

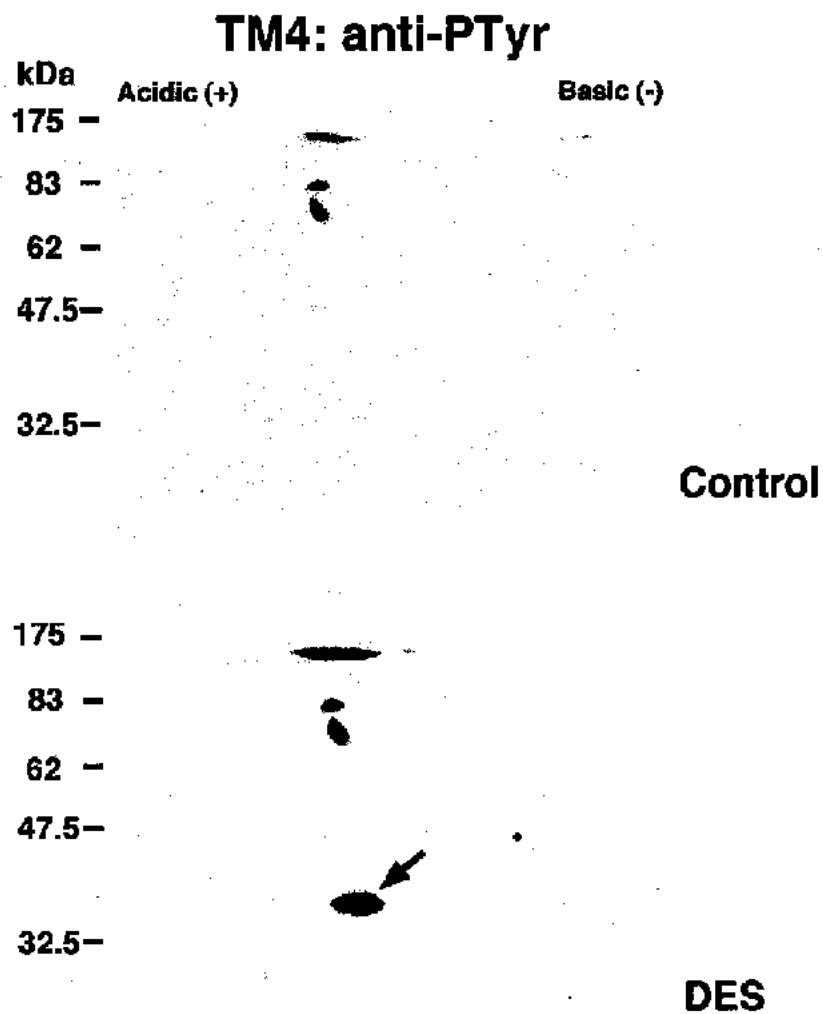


Sertoli 細胞が形成する特殊接合装置(ectoplasmic specialization)の模式図。精子細胞頭部-Sertoli 細胞間、隣接する Sertoli 細胞基底部間に形成され、細胞膜直下にアクチンフィラメント、その直下に小胞体が局在する。



対照ならびに DES 投与マウス精巣における特殊接合装置 (ectoplasmic specialization) の形成と分布。DES 投与精巣では Sertoli 細胞間の特殊接合装置の形成遅延が起こる。また、精子細胞への分化も著明に遅れるため、精細管内腔に面した Sertoli 細胞突起間に異所性の接着構造が形成される。

図 3 DES 処理 TM4 細胞株における特異的蛋白のチロシンリン酸化の亢進



二次元電気泳動—Western blotting により DES 曝露した TM4 で分子量 38kD, 等電点 5.9 の蛋白(矢印)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 line (DITYPS)と命名した。

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

Shigeki Yuasa

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

Professor and Chairman

Key Words:

diethylstilbestrol, ectoplasmic specialization, blood-testis barrier, estrogen receptor antagonist, tamoxifen, spermatogenesis, tyrosine phosphorylation, signal transduction, endocrine disruptors, Sertoli cell.

Abstract:

It has been established that various estrogenic chemicals affect spermatogenesis as the endocrine disruptors. However, the precise cellular and molecular-biological mechanisms of harmful effects elicited by these endocrine disruptors are not clear at present. It is needed to elucidate the action mechanisms of the endocrine disruptors for the prospective detection of harmful chemicals and prevention of the hazards caused by these chemicals.

In this study, the mechanisms of defective spermatogenesis caused by the neonatal exposure to a typical estrogenic compound, diethylstilbestrol (DES), were investigated morphologically and molecular biologically by using both in vivo and in vitro systems. Consequently, it has been elucidated that DES-induced defective spermatogenesis, especially the arrested meiosis is based on the disruption of blood-testis barrier due to the defective development of ectoplasmic specialization between the Sertoli cells. This DES-induced defect has been revealed to be reversible and not to be prevented by the simultaneous administration of estrogen receptor antagonist, Tamoxifen. Furthermore, the simultaneous administration of DES and Tamoxifen caused the dysgenesis of Leydig and myoid cells, and it has been suggested that the combination of estrogen receptor-related molecules might cause unexpected severe defects. In combination with this result, the profile of the

changed pattern of testicular gene expression following DES exposure at the neonatal stage was examined by DNA microarray.

Subsequently, DES-induced changes in the Sertoli cells were morphologically and biochemically analysed by using Sertoli cell-derived cell line TM4. Electron-microscopically, the enlargement and dilatation of rough endoplasmic reticulum was induced in TM4 cell line. By the two-dimensional electrophoresis and Western blotting analysis of the proteins of Sertoli cell line, DES-induced reduction of specific proteins and DES-induced enhancement of tyrosine phosphorylation of specific protein was revealed. These changes were specific for the TM4 cell line and were not observed in the fibroblast-derived cell line NIH3T3. Thus, these molecular changes should be applied as the molecular markers for DES exposure.

On the other hand, new molecular markers for germ cells and Sertoli cells were developed. Notch-1 and presenilin-1 as the markers for specific stage of germ cell development and TuJ1(neuron-specific tubulin) as the marker for Sertoli cells were applied to examine the effect of DES exposure at the neonatal stage. The mode of expression of these markers correlated well to the degree of defects in the spermatogenesis as judged by the morphological examination.

Estrogenic molecules have been considered to 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 receptors and activating the tyrosine kinase-mediated intracellular signal transduction cascade have been proposed. The findings in this project suggest that the crossover points between the tyrosine kinase-mediated signal transduction system and the cell adhesion-cytoskeletal system (i.e. ectoplasmic specialization between Sertoli cells) might be one of the new targets of harmful estrogenic compounds.

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

研究者 那須 民江 (信州大学医学部衛生学講師)

研究要旨

- 1) フタル酸エステル類 (ジエチルフタル酸: DEP、ジブチルフタル酸, DBP、ブチルベンジルフタル酸, BBP、ジシクロヘキシルフタル酸, DCP、ジ-2-エチルヘキシルフタル酸, DEHP) およびアジピン酸 (ジ-2-エチルヘキシルアジピン酸, DEHA) による PPAR α の誘導について、SV/129 雄マウスを用いて、PPAR α -mRNA と標的遺伝子産物の発現から検討した。DEP による誘導は殆どみられなかった。誘導は分子量が大きい程強く、最も誘導が強かったのは DEHP であった。DEHA も PPAR α の誘導剤であることが判明した。その強さは DEHP と同じか、あるいは若干弱かった。
- 2) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-DA) およびそのメチルエステル (2,4-DE) とノニルフェノール (NP) による PPAR α の誘導と生殖障害性について、ddY 雄マウスを用いて検討した。2,4-DA と 2,4-DE は量-反応的に PPAR α を誘導したが、これに比べると、NP による誘導は無視できる程度であった。高投与量の血清 2,4-DE はテストステロン濃度を低下させたが、精巣の量-反応的病理変化は認められなかった。
- 3) 検討した PPAR α 誘導剤は酸化ストレス消去酵素 (カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ) を誘導せず、むしろ低下させた。これらの結果により肝は PPAR α 誘導剤投与後、より強い酸化ストレスにさらされることを示した。
- 4) トータルダイエツトスタディ方式によりフタル酸エステル類 (DEP, DPP, DBP, BBP, DEHP) の食品群中の濃度を測定し、一日摂取量の推定を行った。最も濃度が高く検出されたのは DEHP で、その他のフタル酸エステル類はわずかに検出されたのみであった。

研究者協力者

青山 俊文 (信州大学医学部教授)
福嶋 義光 (信州大学医学部教授)
大村 実 (九州大学大学院医学系研究科助手)
佐々木 一敏 (長野県衛生公害研究所主任研究員)
畑 由紀子 (信州大学医学部大学院生)
山ノ下 理 (信州大学医学部研究生)

1. 研究目的

昨年度の研究において、0.05% の di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP, CAS-No. 117-81-7) は野生型マウスの繁殖を低下させるが、PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor) ノックアウトマウスの繁殖には影響を与えないことを明らかにした。この結果は DEHP のマウス繁殖に与える影響が PPAR α に依存していることを示唆する。こ

のような結果を踏まえて、12 年度は以下の研究を行った。

- 1) リスク評価の知見を得るために、DEHP による繁殖影響の量-反応関係を検討
- 2) 一連のフタル酸エステル類による PPAR α の誘導
- 3) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-DA) の生殖毒性と PPAR α との関連性およびノニルフェノール (NP) の生殖毒性との比較
- 4) 食事中的フタル酸エステル類の濃度を測定し、一日の摂取量を推定 (昨年度からの継続)

2. 研究方法

- 1) 実験動物