

1. 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明

研究者 森 千里 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 教授)

研究要旨

(1) Flutamide (FLUT)、 17β -estradiol (E2)、bisphenol A (BPA)、ICI182.780 (ICI) と diethylstilbestrol (DES) を ICR マウス成獣に 5 日間連続投与後、6 日目に精巣を取り出し、ウェスタンブロット法、免疫抗体染色法、免疫電子顕微鏡抗体染色法でコートアクチン (アクチン結合タンパク質の一種) の精巣内での発現量を対照群と比較したところ、どの薬剤投与群でもコートアクチンタンパク質量が対照群に比し有意に減少していることがわかった。コートアクチンタンパク質の精巣内発現量は、内分泌攪乱化学物質を始めとする外因性化学物質の精巣に与え影響を解析する上で、注目すべき重要なタンパク質であることが示唆された。現時点ではどのような機構でコートアクチンの発現が制御されているのかは明確でないが、この機構を分子的に解明することは内分泌かく乱化学物質の作用点の解明に重要であると考えられる。

(2) マイクロアレイ技術を適用することで迅速に、DEHP による成獣ラット精巣細胞のアポトーシス制御に、その投与量が 2000 mg/kg の時には Fas-FasL、FADD/Caspase-8/Caspase-3 および Apaf-1/Caspase-9/Caspase-2 のカスケードが働きアポトーシスを誘導するが、その投与量が 20 mg/kg 時には Bcl-2 系カスケードが働きアポトーシスを抑制していることを明らかとした。

研究協力者

深田 秀樹 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 助教授)

A. 研究目的

現在、環境中の内分泌攪乱作用を持つ化学物質による生物の生殖機能の障害が社会的に大きな問題となっており、生物環境ならびに人の健康に対する影響は、人における精子数の減少や野生生物に様々な生殖異変が既に生じている点からも懸念されている。これらの物質がなぜ有害であるのかを細胞、分子のレベルにおける作用機構の点から明らかにするとともに、有害性の予想される物質の作用を検証し、さらなる汚染拡大の合理的予防策を講ずる努力が、国民の不安に対処し安全な生活の確保を図る上で必要である。本研究では内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムについて、雄性生殖器に対する影響の機序を対象とし、分子生物学、細胞生物学的手法を用いて解明し、さらに内分泌攪乱化学物質による健康障害の分子細胞生物学的マーカーを見出すことを目的とする。本研究による代表的な内分泌攪乱化学物質の作用機序解明の成果は、内分泌攪乱作用の疑われる物質の客観的な体系的検索法の開発に寄与することが期待できる。

以下具体的に、実施事項ごとの目的を示す。

1. 齧歯類の雄生生殖器に影響を与える化学物質の作用メカニズムの解析

昨年度実施した GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子組み込みマウスを用いた移植実験から、DES の影響は生殖細胞そのものというよりも精子形成を支える体細胞系に現れると考えられたが、

それは同じく昨年度に研究したアクチン結合タンパク質との関連をさらに詳細に調べることで、精子形成異常の分子機構を解明できるものと期待される。そこで、精巣の形態変化のうち、特に特殊接合装置 (ES) に影響する化学物質、flutamide (FLUT、抗アンドロゲン作用を有する物質)、17 β -estradiol (E₂、天然エストロゲン)、bisphenol A (BPA、弱いエストロゲン作用を有する物質)、ICI182.780 (ICI、エストロゲンレセプターに特異的に結合しエストロゲンレセプターの働きを阻害する物質) と diethylstilbestrol (DES、合成エストロゲン) をそれぞれ ICR マウス成獣に 5 日間連続投与後、6 日目に精巣を取り出し、ウエスタンブロット法により精巣中のアクチン結合タンパク質の発現量を定量的に解析する。そして、免疫抗体染色法と免疫電子顕微鏡抗体染色法でアクチン結合タンパク質の精巣内での発現量を対照群と比較する。さらに、変化がみられた精細管については、精細管ステージ決定も行う。

2. 齧歯類成獣への di-(2-ethylhexyl) phthalate 投与による雄性生殖器で生じるアポトーシス誘発メカニズムの解析

生殖毒性のある化学物質を齧歯類成獣へ投与するとしばしば雄性生殖器で生殖細胞がアポトーシスを起こすが、その分子メカニズムを解析するため、種々の濃度で di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) を齧歯類成獣に投与し、アポトーシスを促進する Fas-FasL、カスパーゼ系、およびアポトーシスを抑制する Bcl 系に着目し、アポトーシス制御メカニズムを明らかにする。

B. 材料と方法

実施項目ごとに項を分けて記載した。

共通事項として、本研究は千葉大学大学院医学研究院の動物倫理委員会の承認を受けている。実験動物への各化学物質の投与時および灌流固定時には動物の苦痛を最小限にとどめるよう努め、その他の処置は麻酔下で行った。

1. 齧歯類の雄生生殖器に影響を与える化学物質の作用メカニズムの解析

a) 実験デザイン

ICR マウス (日本エスエルシー) 12 週齢のオスを用い、物質 E₂、FLUT、ICI、BPA および DES を DMSO 500 μ L に溶解した後、corn oil を溶媒として、それぞれの濃度に希釈し、マウスの皮下より 0.1ml/day として 5 日間連続投与を行い、6 日目に精巣を取り出した。対照群には DMSO と corn oil を同様に投与した。投与濃度は、E₂: 0.0012 μ g/g/day、FLUT: 0.012 μ g/g/day、ICI: 0.012 μ g/g/day、BPA: 0.0024 μ g/g/day、DES: 0.025 μ g/g/day とした。取り出した精巣は、タンパク質発現解析、免疫抗体染色観察を行った。さらに、FLUT 投与のマウス精巣については免疫電子顕微鏡観察法を用い、コートアクチンタンパク質の発現を確認した。動物の取り扱いについては、「千葉大学亥鼻地区動物実験指針」に基づいておこなっている。

b) ウエスタンブロット

取り出した精巣は精巣白膜を除去後、Lysis buffer と共にホモゲナイズし、15000 \times g 4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心した後、タンパク質を抽出した。タンパク質は 10 % アクリルアミドゲルで SDS-PAGE し、PVDF 膜にトランスファーし、TBS スキムミルクでブロッキング後、抗コートアクチン抗体を

HRP 標識抗体発現法 (ECL Plus: Amersham) で解析した。

c) 免疫抗体染色法

取り出した精巣を 10 % ホルマリンで固定し、パラフィン包埋して切片を作製した。切片は脱パラフィン後、正常山羊血清によりブロッキングを行った後、コートアクチンに抗マウスコートアクチン抗体を結合させ、ストレプト ABC ペルオキシダーゼキット (ナカライテスク) で検出した。

d) 免疫電子顕微鏡観察法

採取した精巣は、LR White により包埋後、超薄切片を作製し、正常山羊血清によりブロッキングを行い、コートアクチンに抗コートアクチン抗体を結合させ、金コロイド法で検出した。

2. 齧歯類成獣への di-(2-ethylhexyl) phthalate 投与による雄性生殖器で生じるアポトーシス誘発メカニズムの解析

6 週齢の Crj:CD(SD)IGS 系雄ラット(日本チャールス・リバー(株)) に DEHP (Aldrich Chemical Corp.) の 20 および 2000 mg/kg を単回強制経口投与し、投与後 3、6、24 および 72 時間に精巣を摘出した。左精巣は 4%パラホルムアルデヒド固定を行い、パラフィン包埋法により組織スライド標本を作製し、HE 染色ならびに TUNEL 解析を行った。右精巣は液体窒素を用いて凍結し、 -80°C で冷凍保存後、TRIZOL (Invitrogen Corp.) を用いて RNA の抽出を行った。抽出 RNA は cDNA の調製後、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) を用いて、SYBR Green 法によるリアルタイム RT-PCR 解析を行い、アポトーシス関連遺伝子の発現量を定量した。

C. 結果

1. 齧歯類の雄生生殖器に影響を与える化学物質の作用メカニズムの解析

a) 投与マウス精巣中のコートアクチンタンパク質発現量の解析

E_2 、FLUT、ICI、BPA、DES をそれぞれ投与したマウス精巣中のコートアクチンタンパク質量をウエスタンブロット法で定量したところ、全ての投与系 (E_2 、FLUT、ICI、BPA、DES) マウスで精巣中コートアクチンタンパク質量が対照群に比し有意に減少していることがわかった (図 1)。対照群のコートアクチンタンパク質発現量を 1 としてそれぞれの投与系の精巣での発現比 (発現比 \pm S.D.) をあらわすと、 E_2 で 0.6 ± 0.2 、FLUT で 0.4 ± 0.3 、ICI で 0.6 ± 0.1 、BPA で 0.6 ± 0.1 および DES で 0.8 ± 0.1 であった。

b) 免疫抗体染色法(光学顕微鏡)によるマウス精巣内コートアクチンタンパク質の発現部位と発現量の解析

コートアクチンタンパク質のマウス精巣内での発現部位と発現量を、抗コートアクチン抗体を用いた免疫抗体染色法を用い、光学顕微鏡で調べた。

対照群で、コートアクチンは apical ES、basal ES と精細管上皮細胞に存在しており (図 2A)、basal ES では精細管と隣接しているセルトリ細胞間に局在していた。apical ES では、精子頭部の背側に強い発現が認められた。 E_2 、FLUT、ICI、BPA 投与群では以前報告をした精子細胞の頭部形態異常に加え、apical ES が部分的欠損した精子細胞も観察された。また、コートアクチンの発

現量の変化は、特に精細管ステージ VI から IX においてよく観察された (図 2B から 2E)。DES 投与については、頭部異常などの精子細胞は認められず、basal ES でのコートアクチンの発現が弱いものがみられたが (図 2E)、その他の物質に比べると、発現量の変化が少なかった。

c) 免疫電子顕微鏡観察におけるコートアクチン発現部位と発現量の解析

Apical ES は、セルトリ細胞膜、アクチン層および滑面小胞体の三種類から構成されている。コートアクチンタンパク質の apical ES における発現を、免疫電子顕微鏡観察法を用い観察したところ、コートアクチンはアクチン層とセルトリ細胞の間に局在していた (図 3A のアローヘッド)。FLUT 投与マウスの精巣では、頭部異常が認められた部分と apical ES の欠損が認められた部分に、コートアクチンは認められなかった (図 3B の*部分で局在が認められない)。

2. 齧歯類成獣への di-(2-ethylhexyl) phthalate 投与による雄性生殖器で生じるアポトーシス誘発メカニズムの解析

HE 染色による病理組織像には DEHP 投与の影響はなかった。一方、DEHP の 2000 mg/kg 投与後 24 および 72 時間でアポトーシス細胞の有意な増加が TUNEL 法により観察された (図 4 および図 5)。リアルタイム RT-PCR 解析においては (図 6)、DEHP の 20 mg/kg 投与において、投与後 6 時間に、アポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 の発現上昇 (1.3 倍程度) が見られたが、その他の変化は見られなかった。また、DEHP の 2000 mg/kg 投与において、Apoptosis の誘導因子である Caspase-2、-3、-8、-9、Bax、Fas および FasL の有意な発現上昇 (1.5~3.8 倍) が見られた。一方、Apoptosis 抑制因子である Bcl-2 は有意な発現低下 (0.5 倍程度) を示した。これらの遺伝子は DEHP 投与の 3 時間後ですでに発現変化を示しており、3~6 時間後に変化のピークを示し、その後、経時的にコントロールレベルに収束していく傾向が観察された。

D. 考察

1. 齧歯類の雄生生殖器に影響を与える化学物質の作用メカニズムの解析

コートアクチンはアクチン結合タンパク質の一種で、精細管中の細胞-細胞間接着に関係しているその他のタンパク質と複合し、apical ES においては精子細胞の核の整形や保持に関連しているのではないかと考えられる。昨年度までに報告してきた精子細胞-セルトリ細胞間の特殊接合装置の欠損や頭部形態異常の変化と、今回解析を行ったコートアクチンの減少との間には関連が示された。興味深いことに、性質の異なる薬剤投与系すべて (E₂、FLUT、ICI、BPA、DES) で apical ES の欠損およびコートアクチンの消失が観察された。さらに、コートアクチンタンパク質の発現変化が認められた精細管ステージが、特殊接合装置が形成される時期および精子が精巣上体へ放出される時期に特徴的に認められた。これらの結果より、apical ES の重要性が示唆される。

コートアクチンは、apical、basal ES の両装置に存在することが確認されているが、薬剤の性質にかかわらず、それらの外因性の物質に敏感に反応するのは apical ES のコートアクチンであった。さらに、ES の構成内容の違いからみると、basal ES ではタイトジャンクションが存在しており、それが存在しない apical ES よりもより強固な装置として形成されているため、個体発生後、精子形成のサイクルが正常に動きはじめてしまえば、apical ES ほど外因性物質の影響が認められないのではないかと考察される。このことは、新生仔 DES 投与と成獣 DES 投与の影響のちがいかからも

推測される。そして、basal ES 中細胞間接着関連タンパク質の構成は、apical ES と異なっていることから、両者に存在するコートアクチンの役割も異なっているのではないかと考えられる。それ故、今後は basal と apical ES のコートアクチンの作用メカニズムの違いについても検討し、細胞間接着関連タンパク質とコートアクチンがどのように特殊接合装置の形成や維持に関与しているのかを解析する必要がある。

2. 齧歯類成獣への di-(2-ethylhexyl) phthalate 投与による雄性生殖器で生じるアポトーシス誘発メカニズムの解析

DEHP の 2000 mg/kg 単回経口投与により、精巣のアポトーシス細胞の増加が観察された。このアポトーシスには、アポトーシス誘導系の Fas-FasL、FADD/Caspase-8/Caspase-3 および Apaf-1/Caspase-9/Caspase-2 の各カスケードの遺伝子発現上昇ならびにアポトーシス抑制系の Bcl-2 の発現低下が関与していることが示唆された (図 7A)。また、DEHP の 20 mg/kg 単回経口投与では、精巣のアポトーシス細胞の増加は観察されなかった。この時、アポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 の発現増加が観察され、抑制系遺伝子の優位発現によるアポトーシス誘発の抑制が示唆された (図 7B)。また、これら遺伝子の発現調節はアポトーシス細胞の出現より早期に観察され、精巣におけるアポトーシス誘発マーカーとしての可能性が示唆された。

E. 結論

Flutamide (FLUT)、 17β -estradiol (E_2)、bisphenol A (BPA)、ICI182.780 (ICI) と diethylstilbestrol (DES) を ICR マウス成獣に 5 日間連続投与後、6 日目に精巣を取り出し、ウエスタンブロット法、免疫抗体染色法、免疫電子顕微鏡抗体染色法でコートアクチン (アクチン結合タンパク質の一種) の精巣内での発現量を対照群と比較したところ、どの薬剤投与群でもコートアクチンタンパク質量が対照群に比し有意に減少していることがわかった。コートアクチンタンパク質の精巣内発現量は、内分泌攪乱化学物質を始めとする外因性化学物質の精巣に与え影響を解析する上で、注目すべき重要なタンパク質であることが示唆された。現時点ではどのような機構でコートアクチンの発現が制御されているのかは明確でないが、この機構を分子的に解明することは内分泌かく乱化学物質の作用点の解明に重要であると考えられる。

マイクロアレイ技術を適用することで迅速に、DEHP による成獣ラット精巣細胞のアポトーシス制御に、その投与量が 2000 mg/kg の時には Fas-FasL、FADD/Caspase-8/Caspase-3 および Apaf-1/Caspase-9/Caspase-2 のカスケードが働きアポトーシスを誘導するが、その投与量が 20 mg/kg 時には Bcl-2 系カスケードが働きアポトーシスを抑制していることを明らかとした。

F. 引用文献

Anahara R, Toyama Y and Mori C (2004) Flutamide induces ultrastructural changes in spermatids and the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in mouse testes. *Reprod Toxicol* 18:589-596.

Toyama Y, Hosoi I, Ichikawa S, Maruoka M, Yashiro E, Ito H and Yuasa S (2001) β -estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse. *Mol Cell Endocrinol* 178:161-168.

Toyama Y, Maekawa M and Yuasa S (2003) Ectoplasmic specialization in the Sertoli cell: new vistas based on genetic defects and testicular toxicology. *Anat Sci Int* 78:1-16

穴原玲子、前川眞見子、外山芳郎、本間誠次郎、佐藤浩二、年森清隆、森千里. (2003) Flutamide 投与におけるマウス精巣内テストステロン濃度および核内受容体(AR、ER β)への影響. 第7回環境ホルモン学会研究発表会. 2003/12/14.

Toyama Y and Yuasa S (2004a) Effects of neonatal administration of 17 β -estradiol, β -estradiol 3-benzoate or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis *Reprod Toxicol* 19:181-188

Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C and Toshimori K (2004b) Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Arch Histol Cytol* 67:373-381.

Anahara R, Toyama Y, Mori C. (2004) Combined effects of flutamide and β -estradiol 3-benzoate on adult mouse testes. Society of Toxicology 43rd Annual meeting & TOXEXPO, Baltimore (U.S.A) (March 21-25, 2004).

Anahara R, Toyama Y, Mori C (2004) Morphological abnormality of the ectoplasmic specialization induced by estrogen or estrogen&androgen antagonist in mouse testes. Teratology Society 44rd Annual Meeting, Vancouver (CA) (Jun 26- Jul 1, 2004).

Kijima K, Toyosawa K, Yasuda M, Matsuoka N, Adachi T, Komiyama M and Mori C (2004) Gene expression analysis of the rat testis after treatment with di(2-ethylhexyl) phthalate using cDNA microarray and real-time RT-PCR. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200: 103-110.

穴原玲子、外山芳郎、前川眞見子、年森清隆、森千里 (2004) 抗アンドロゲン flutamide と抗エストロゲン ICI182.780 がマウス精子形成に及ぼす影響とその作用機構に関する考察. 日本アンドロロジー学会総会第23回学術大会, 2004/7/17.

Anahara R, Toyama Y, Maekawa M, Kai M, Ishino F, Toshimori K, Mori M. (2005) Analysis of cortactin expression in the ectoplasmic specialization of testes in flutamide treatment mouse. Society of Toxicology 44rd Annual meeting & TOXEXPO, New Orleans (U.S.A) (March 6-10, 2005)