

「内分泌かく乱物質」
平成11年度採択研究代表者

岩本 晃明

(聖マリアンナ医科大学 教授)

「内分泌かく乱物質のヒト生殖機能への影響」

1. 研究実施の概要

内分泌かく乱化学物質による男性生殖機能への影響が危惧される中で、我々のチームは男子不妊症原因究明の基礎的臨床的研究の実績と正常男性生殖機能の調査研究の経験を踏まえて、内分泌かく乱化学物質のヒト生殖機能への影響に対する包括的な戦略を立てた。

本研究の特徴は主としてヒトを対象とし、ヒトより得られた血液、DNA、精漿、精子、臍帯・臍帯血およびヒト細胞等を材料として内分泌かく乱物質の影響を評価する方法を確立すること、およびその基盤となる基礎研究を実施することである。その目的のために、(1)内分泌かく乱物質の精巣内ホルモン環境への影響と応答遺伝子に関する研究、(2)精漿内DNA断片およびアデニルプリンを指標とした新規造精機能評価モデルの開発、(3)精子の形態や運動性に関する内分泌かく乱物質の影響、(4)内分泌かく乱物質の高感度測定法の開発、(5)遺伝的素因による環境影響に対する反応性の差異に関する研究、(6)内分泌かく乱物質が与える遺伝子DNAへの損傷及びタンパク動態の解析の各研究を計画し、実施している。さらに平成11年度中に、同じ「内分泌かく乱物質」プロジェクトの有賀チームとの共同研究が実現し、(7) DJ-1タンパク質の新規造精機能マーカーとしての可能性に関する研究として発足した。以上の研究から内分泌かく乱化学物質のヒトへの影響を評価する方法の開発をめざし、男性不妊をはじめとするさまざまな生殖機能異常の原因を明らかにしたい。さらに将来的には臨床の場にフィードバックし治療法の開発にも役立てたい。

2. 研究実施内容

(1) 内分泌かく乱物質の精巣内ホルモン環境への影響と応答遺伝子に関する研究

内分泌かく乱物質の母体経路暴露による精巣のテストステロン産生とその関連調節因子への影響を検討する目的で、平成11年度はビスフェノールA (BisA) の母体経路暴露によるラット周産期の血清テストステロン濃度への影響および精巣における応答遺伝子の解析を行った。

S D系ラットにBisA 0.2, 2, 20および200 μ g/mlを妊娠1日より23日(出生日)まで母体に飲水投与し、出生2時間後に雄仔の血液と精巣を採取した。BisA 200

μg/ml投与群で血清テストステロン濃度が有意に低下したことから、高用量のBisAが性分化や生殖器系の発達・分化に重要な周産期の内分泌環境をかく乱する可能性が示された。DDRT-PCR法による応答遺伝子の解析からはBisAによって精巣での発現が変動する可能性のある反応産物（応答遺伝子）のバンドを7つ発見した。現在これらのバンドのシーケンシングを進めるとともに、これらがBisAあるいはエストロゲン様内分泌かく乱物質の生体への暴露及びかく乱物質に対する生体の応答を評価分析するためのマーカー遺伝子として使用できるかを明らかにするために、再現性と他のエストロゲン剤による影響を検討する予定である。

(2) 精漿内DNA断片およびアデニルプリンを指標とした新規造精機能評価モデルの開発

従来、精子数の減少は単に精子産生が低下した状態とみなされてきたが、本研究では、精子は精巣で形成される一方で分解・消去される過程もあると考え、精子の形成と消去の動的バランスから造精機能を解析する新しい計量モデルの構築を目的とした。本モデルは射出精子量と消去精子量を比較することによって真の造精機能障害の診断を可能とし、また環境中の内分泌かく乱物質の精子形成能への毒性に関しても、その作用点が形成抑制なのか消去亢進なのかを明らかにすることができる。具体的には、精漿内物質として、アポトーシスによりラダー状の断片を生じる染色体（DNA）ならびに2次性ネクローシスによる細胞融解により漏出するアデニルプリン（ATP等）に着目し、精子形成過程におけるそれら精細胞遺残物を精漿中から検出・定量することにより、非侵襲的に精巣における精子の形成と消去に関する情報を得ることを目的とする。

これまでに、高速液体クロマトグラフィを用い、蛍光法によるアデニルプリン（ATP、ADP、AMP、アデノシン、cAMP）の高感度測定法ならびにプリンの代謝産物であるヒポキサンチン、キサンチンのUV法による測定法を確立した。本法により精子、精漿、血漿中の上記物質の測定を行った結果、血漿中ではATP、ADPがアデニルプリンのほとんどを占めるのに対し、精漿中では50-70%がアデノシンであることを見いだした。また、精漿からDNAを抽出し、アガロース電気泳動を行った結果、精漿中にDNAが存在することを認めた。DNAの分子量分布は検体毎に大きく異なり、10Kbから100Kbの断片を認めるとともにアポトーシスに特有なラダー状DNA断片も見出された。精漿中のDNA量から消去精子量を算出するためには、精子1個あたりのDNA量を定量する必要があるが、本年度はその基礎研究として他の細胞成分、精漿を含まない高純度精子調製法の確立を試みた。現在、Percoll密度勾配遠心分離法、swim down法により成熟した運動精子を分離した標品を用いて精子DNAの定量を検討している。

(3) 精子の形態や運動性に関する内分泌かく乱物質の影響

内分泌かく乱物質の生殖機能への影響を調べるための指標として精子数がよく用いられるが、生殖機能により密接に関係する精子の形態や運動性を調べることはさらに重要な課題である。これまでに、精子の運動およびその基本的な機構についてはほぼ解明したので、これらの知見をもとに精子の形態や運動性を正確に解析する方法を確立する。精子形態の解析法：高解像度のデジタルカメラをノマルスキー微分干渉顕微鏡に装着し、生きたままの精子像を撮影し、デジタルフォトリンタで印刷し、頭部の形態や鞭毛の長さなどを解析した。さらにコンピュータのハードディスクに取り込み、画像解析ソフトを用いてフォトリンタで印刷した写真から得た数値と比較した。デジタルカメラの高解像度化によって、フィルムに記録する従来の方法にかなり近い画質の像が容易に得られるようになった。デジタル画像処理では、これまで広く使われてきたビデオテープに記録する方法とは異なり、画質の劣化や走査線による画像の不均一さなどもなくなり、画像解析ソフトを用いてかなりの精度の解析が効率良く行えるなどの利点がある。さらに、デジタル画像をそのままインターネットで全世界に瞬時に転送できるなど、データ処理の高精度化と効率化が期待できる。従来、世界規模での調査の大きな妨げとなっていたビデオテープレコーダの違いによるデータの互換性の問題もデジタル画像では問題にならず、世界規模での調査・研究を進める基礎が築かれた。精子運動の解析法：簡便でかつ精度の高い精子運動の解析法を確立するために、精子の運動特性を明らかにし、その特性にもとづいた観察法と解析法を検討した。ヒト精子鞭毛運動の頻度を正確に測定するためには、少なくとも毎秒60枚以上の画像を撮影できる記録装置か、ストロボ装置などを使用する必要があるが、毎秒30枚しか記録できない家庭用ビデオテープレコーダでは高い頻度で運動する精子を正確に記録することはできない。この点、ストロボ装置は非常に有用で、短時間に測定が行えるだけでなく、通常の光源に比べて非常に短い時間の露光のために、光による試料の損傷が少ないと思われる。市販の自動精子運動解析装置では、精子の像を2値化し、精子の頭のみを追尾するものがほとんどである。対物レンズによって作られた像を正確に2値化できるよう、2値化のレベルを変えられる必要があり、読み落としのないよう、また2重に数えないよう画像解析ソフトのパラメータを適切に設定する必要がある。このためには、顕微鏡により鮮明な像が得られることがきわめて重要で、暗視野顕微鏡はこの目的には向かない。位相差顕微鏡のネガティブとポジティブの二つの方法ではわずかに差があり、画像解析ソフトによってはこの違いを補正することができず、大きな違いを生じることがある。

(4) 内分泌かく乱物質の高感度測定法の開発

内分泌かく乱物質の人体への暴露量とその影響を把握するうえで、微量の内分泌かく乱物質を測定する方法が求められている。我々は、フェノール性水酸基に選択的に反応する蛍光プレラベル化剤を用いることにより、女性ホルモン類を従来の液体クロマトグラフィー（HPLC）の2000倍以上、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー（GC-MS）の10倍以上高感度に検出できる方法を開発した。本研究では、ビスフェノールA（BisA）、アルキルフェノールなどの内分泌かく乱物質がフェノール性水酸基を有していることに着目し、この方法および内分泌かく乱物質の自然蛍光を利用した蛍光HPLC法を内分泌かく乱物質の測定に応用する。さらに臨床材料や疫学調査で得られた検体の試料等を用いて内分泌かく乱物質の測定ならびに同定を試みる。

平成11年度は予備的検討として、BisAを投与したマウスおよびラットから採取した血液中のBisAを測定し、マウスでは母体の血中濃度、ラットでは母体から胎児への移行を調べた。ICR/MCHマウスおよびSDラットを用い、妊娠1日目よりBisA 0.2、2.0、20及び200 mg/mlに調製したものを飲水として与えた。マウスでは妊娠19日目の母体から、ラットでは妊娠22日目の母体および帝王切開により取り出した胎子の血液を採取し、血清中のBisA濃度を測定した。マウスにおいては、0.2 mg/ml投与群ではBisAは母体の血中から検出されなかった（検出限界以下）が、それ以外の投与群においては微量（850pg/m - 160ng/lml）ではあるが母体に吸収され、ラットにおいて胎児へも移行することが示された。蛍光検出HPLC法によりBisAは300 pg/mlまで検出でき、5 mg/mlまで直線性が得られた。さらに蛍光プレラベル化を行うことにより1 pg/mlまで検出できるようになり、簡便なHPLC装置で、BisAの高精度な測定が可能となった。今後はBisAの母体及び胎児への移行を数量化する目的で、BisAのラット体内におけるバイオアベイラビリティを求め、ヒトにおけるBisAの影響を調査する上での参考とする予定である。

(5) 遺伝的素因による環境影響に対する反応性の差異に関する研究

これまでに我々は、日本人男性の4種類のY染色体ハプロタイプ（I, II, III, IV）の違いによって、精子数の平均値に差があることを明らかにした。次の段階として、本研究では、さらに詳細にY染色体を分類すること、ハプロタイプごとにY染色体上に存在する遺伝子のコピー数の違いや構造上の多様性をパターン化し、ヒト精子数との関連を調べることを目的とした。Y染色体をさらに詳細なハプロタイプに分類するためには、Y染色体上のDNA配列よりSNPs（single nucleotide polymorphisms）を多数収集することが有用である。まず、4種類のY染色体ハプロタイプをもつ各個人由来のゲノムDNAを鋳型としたPCR法によって、Y染色体上のDNA断片を増幅し、DNA断片をdHPLC（denaturing high performance liquid

chromatography) システムによって解析することでSNPsを検索する。dHPLCシステムはPCR法で増幅したDNA断片を用いてhetero duplexを形成した後に、特殊なカラムを用いてDNA断片を分離することにより、SNPsの有無が解析できる有用な装置である。平成11年度はdHPLCのセットアップを終え、Y染色体上に設定されているSTS (sequence tagged site) を用いたSNPの探索のための条件検討を開始した。またY染色体上に複数コピーをなして存在する遺伝子群の構造や、コピー数の違いをハプロタイプごとに分類するために、FISH (Fluorecent in situ hybridization) 解析の準備を開始した。

(6) 内分泌かく乱物質が与える遺伝子DNAへの損傷及びタンパク動態の解析

ゲノム維持機構の破綻は、癌を含む種々の一般病の原因になると共に、精子形成能の欠失による男性不妊症の大きな原因になることが想像される。我々は、唯一種類の遺伝子が働かないために、ゲノム不安定化を生じ、その結果癌多発症、早老症、男性不妊症等の顕著な症状を示す3種類の遺伝病、すなわち早老症として知られるウエルナー症(WRN)、癌多発と男性不妊を伴うブルーム症(BLM)、若年期に於いて皮膚疾患とsarcomaを発症するロスムンド・トムソン症(RTS)について研究を進めてきた。

これら3種の病気の原因となる遺伝子はいずれもDNAヘリカーゼをコードするRecQ型ヘリカーゼ遺伝子ファミリーに含まれ、ゲノム維持という重要な役割を果たしている。これらの遺伝子の各臓器に於ける発現パターンを調べたところ、それがブルーム症原因遺伝子BLMの発現に似る「精巣で高発現/卵巣で弱発現」(北尾らGenomics151: 1027-1039,1999)であることから男性患者の生殖機能不全は不可避と考えられる。特にブルーム症とロスムンド・トムソン症は、稀な遺伝病ではあるが、このように1種類の遺伝子変異により生殖機能(特に男性)に悪影響を与える代表的遺伝子病であることから、本研究ではこれらの患者細胞を陽性コントロールとして使用し内分泌かく乱化学物質が与えるDNAへの損傷を解析する。

平成11年度は、BLM症遺伝子について、BLMタンパク質の核移行シグナル活性を明らかにするとともに、RTS症遺伝子のゲノム構造を明らかにし、今後の変異解析を容易にした。今後はこれらの遺伝子の発現や機能及び変異について、内分泌かく乱物質がどのような影響を与えるかについて調べる予定である。

(7) DJ-1タンパク質の新規造精機能マーカーとしての可能性に関する研究

内分泌かく乱物質の作用メカニズムに関与していると考えられているras関連癌遺伝子産物DJ-1タンパク質を研究している北海道大学有賀教授より抗DJ-1抗体を頂き、「内分泌かく乱物質」プロジェクト間の共同研究が実現した。DJ-1が精子形成異常に関与するのではないかと考え、その抗体を用いてヒト精漿をWestern

blottingにて検討したところ分子量28kDaの単一バンドが検出された。また、イモビライズドライストリップを用いた2次元電気泳動でもWestern blottingにより、精漿、精子ともに分子量28kDaで等電点の異なる4つのスポットを検出することができた。今後は、凍結保存してある男子不妊症方患者、妊孕性を有する男性および若年男性の精漿中のこのタンパク質の挙動と精子濃度、精子運動能などのパラメーターとの関連を検討中し、DJ-1が造精機能評価のための新規マーカーとなりえるかを明らかにしたい。

3 . 主な研究成果の発表

Seiro Hayakawa, Hideo Kaneko, Toshiyuki Fukao, Kimiko Kasahara, Takehisa Matsumoto, Yasuhiro Furuichi and Naomi Kaneko. Characterization of the nuclear localization signal in the DNA helicase responsible for Bloom syndrome. International Journal of Molecular Medicine 5: 477-484, 2000.