

「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。本研究の特徴はヒトを対象とし、ヒトより得られた材料(血液、DNA、精子、精漿、ヒト細胞等)を用い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遺伝子発現への影響に関する研究、(2)内分泌かく乱物質のヒト生殖機能への影響に関する研究、(3)DJ-1 タンパク質の造精機能マーカーとしての可能性に関する研究、(4)内分泌攪乱物質が与える DNA への損傷及びタンパク動態の解析、(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)精子の形態や運動性に対する内分泌かく乱物質の影響、(7)ヒト精液所見における新規検査項目の開発を計画し、実施している。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遺伝子発現への影響に関する研究

内分泌攪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

内分泌攪乱物質の母体経路暴露の精巣内ホルモン環境への影響を遺伝子発現の変化を指標として明らかにするために、ビスフェノール A およびゼラノールを胎児期(受精時)から暴露された児(出生日から生後 52 日)における mRNA 発現の変化をディファレンシャル ディスプレイ法により検討中である。まず正常な精巣の発達各段階における mRNA 発現の変化を、精原細胞から成熟精子までの少なくとも 32 の精子細胞発達各段階について調べた。ディファレンシャル ディスプレイ法により特定した発達各段階に特異的に発現している遺伝子について、DNA アレイ用に 386 遺伝子を選択した。また 250 以上の遺伝子について発現細胞の同定を *in situ* hybridization 法によりおこなった。選択した遺伝子の1部についてビスフェノール A およびゼラノール胎児期暴露の影響をディファレンシャル ディスプレイ法により検討中であるが現在のところ暴露により発現が明ら

かに変化する遺伝子は検出されていない。

低用量植物エストロゲンのアロマターゼ活性に対する影響

内分泌攪乱物質は受容体を介するばかりでなく、例えばステロイドホルモンの生合成や代謝を介しても内分泌系を攪乱する。アロマターゼも内分泌攪乱物質の標的と考えられる。今回、植物エストロゲンのアロマターゼ活性に対する影響を検討した。MCF 細胞を用いたエストロゲン活性測定系にテストステロンを添加することによりアロマターゼ活性を同時に測定する系を開発した。両活性は pS2 mRNA の発現を指標とし、数種類の植物エストロゲンについて検討した。ゲニステイン以外の植物エストロゲンは $1\ \mu\text{M}$ 以下の低濃度でアロマターゼ阻害作用を $1\ \mu\text{M}$ 以上でエストロゲン作用を現わし、U字型の用量反応曲線を示した。合成アロマターゼ阻害薬ではU字型の用量反応曲線はみられなかった。植物エストロゲンの有する低用量でのアロマターゼ阻害作用は他のエストロゲン様物質とは異なる特徴である。アロマターゼ阻害作用は乳癌に対する植物エストロゲンの防御効果に重要な役割を有するかもしれない。

内分泌攪乱物質の脳内エストロゲン関連遺伝発現への影響

脳や生殖器の性分化は胎児精巣由来のテストステロンに依存している。ヒトでは胎齢 8 週頃、ラットでは胎齢 15 日頃から胎児精巣に形成されるライディヒ細胞から分泌されるテストステロンへの暴露によって雄型に誘導され、暴露されなければ雌型へ誘導される。またラット血清テストステロン濃度は出生直後にピークを示し、これは脳の性分化や生殖器の発達・分化に関わると考えられている。現在までにこのラット血清テストステロン濃度の出生直後のピークは胎児期ビスフェノール A 暴露により有意に低下することを示した。脳の性分化に関わるテストステロンは脳内でアロマターゼによってエストラジオールに転換されて作用する。現在低用量ビスフェノール A 胎児期暴露のマウス脳内エストロゲン関連遺伝発現への影響について PCR 法およびリアルタイム PCR 法により検討中であるが、胎齢 19 日および出生日(胎齢 20 日)における脳内アロマターゼ、エストロゲンレセプター(ER) α および ER β mRNA の発現への影響は検出されなかった。引き続き他の関連遺伝子の発現、経時的影響、用量の影響について検討中である。

(2) 内分泌かく乱物質のヒト生殖機能への影響に関する研究—精子形成への影響—

精細管基底膜の肥厚に関与する糖蛋白について

昨年までに spermatogenesis と基底膜の状態は深い因果関係にあることを示唆した。しかし、肥厚に伴い最も厚さの増加する基底膜の inner layer は PNA-lectin による強い染色性を示すがその物質の実体は不明である。今回、免疫組織化学的手法を用いて得られた精細管内の基底膜や細胞の性質を元に PNA-lectin により特異的に認識される糖蛋白質の分離を試みた。まず、2D 電気泳動で造精機能の正常な精巣と異常な精巣のサンプルを展開し、PNA-lectin を用いた affinity blot、CollagenIV 及び Vimentin V9 抗体に対する western blot を行った。基底膜の肥厚した精巣で PNA-lectin で染まり、Vimentin や CollagenIV 抗体で染まらない spot, MW 約 43kD に注目した。この spot は他の normal spermatogenesis を示す精巣では見られず、肥厚した基底膜を持つ精巣に共通している。この spot から抽出した蛋白を質量スペクトル分析することにより、thickened inner layer にのみ含まれ、PNA-lectin で認識される糖蛋白質が得られる可能性を考えており、現在解析

中である。

精子形成過程の異常と C₂₁ ステロイドホルモンについて

基底膜の肥厚と平行する変化や精巣全体の精子形成過程の異常の程度と対応する変化の一つとして新たに C₂₁ ホルモンの関与が示唆された。はじめに、Progesterone 抗体を用いてヒト精巣組織に対する免疫組織化学染色を行い、基底膜 inner layer が肥厚に伴い強く染色されることを示した。次に、造精機能の指標となる Jonsen's score count(JS)が低い精巣(JS<4)では高い精巣(JS>6)と比較して、多数の Sertoli Cell において Progesterone 抗体が陽性である事を示した。さらに精巣内の C₂₁ Steroid (Progesterone, 17 α OHP)、testosterone を ELISA 法及び RIA 法によって測定し、造精機能が低い精巣では高い精巣と比較して 17 α OHP の濃度が有為に高いことを明かにした。これらの結果は、精子形成過程に異常が見られるヒト精巣内では androgen 生成時に、通常主として使われていない Δ 4経路が活発に使用されている可能性を示唆している。

マウス精巣由来培養細胞株の確立の試み

spermatogenesis の過程を in vitro で再現するためには、精巣における各種細胞の純粋な細胞集団を単離し相互関係を調べるのが重要である。今回 C57BL/6J 6wk のマウス精巣を機械的、さらに酵素処理により分離し、継代培養後、飢餓状態を与えることにより、著しい増殖能を持つ接着細胞集団を得た。現在、形態的に異なる少なくとも6種類の細胞集団を得ており、細胞クローニングを行っている。

(3) DJ-1 タンパク質の造精機能マーカーとしての可能性に関する研究

[目的]

Ornidazole などの内分泌攪乱物質を経口投与したラット(精子数の減少と不妊)等で発現が減少することが知られている ras 関連癌遺伝子産物 DJ-1 タンパク質について内分泌攪乱物質による精子形成異常に関与するのではないかと考え、造精機能マーカーとしての導入を目的としてヒト精子、精巣及び精漿におけるこのタンパク質の動態と性質を明らかにする。なお本研究は北海道大学有賀教授との「内分泌攪乱物質」プロジェクト間の共同研究である。

[方法と結果]

- 1) 抗 DJ-1 抗体(monoclonal:3E8)を用いてヒト精漿、精子・精巣抽出物を Western blotting にて検討したところ分子量 21kDa の単一バンドが検出された。精子からの抽出では 0.1% Triton X-100 でほとんどが可溶化されることがわかった。また、イモビライズド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 21kDa で pI5.5~6.5 の4つのスポットをそれぞれから同様に検出することができた。
- 2) ヒト精巣内での分布についてはブアン固定と 10%ホルマリン固定で比較した結果、ブアン固定での染色像は抗原性が変化している疑いを示したので 10%ホルマリン固定で検討することにした。その結果、精巣ではライディヒ細胞と精細管内のセルトリ細胞、精粗細胞、精母細胞、精子細胞に存在し、精巣内精子では判別できなかった。射出精子での DJ-1 の局在について間接蛍光抗体法により検討した。4%パラホルムアルデヒド固定で DJ-1 は精子頭部後半と中片前半に局在していることが示された。

3) MBL 玉井博士らの協力により、予め抗 DJ-1 抗体を固相化したプレートを用いることで組み換え DJ-1 を測定できるようになった。これを精漿に適用したところ精漿中 DJ-1 を測定できることが明らかになった。精漿は 100 倍希釈で測定可能であり、サンプルは極少量で測定できるため非常に感度の良い系と言える。この ELISA で妊婦パートナーの精漿 356 例および非選択正常男性 28 例、不妊外来患者 98 例について測定し、運動率および精子数との関連を比較検討したが、精子濃度について弱い正の相関が見られた以外には、現在のところ顕著な相関は確認されていない。若年男性については TUNEL 陽性率との比較も行ったが有意な相関は認められなかった。精漿中 DJ-1 タンパク質量平均値は妊婦パートナー(83.9ng/ml)と比較して不妊外来患者(61.3ng/ml)で有意に($p < 0.0001$)低かった。

[考察と展望]

ヒト DJ-1 はヒト精巣内で発現しており、造精機能に関与している事が示唆された。今後はその作用機序解明が期待される。精子に存在する DJ-1 についてはラットで受精に関与しているという報告があるので、ヒトでも先体反応等に関与する可能性が考えられる。これまで得られたデータに関してより詳細な検討が必要ではあるが、傾向としては強い相関は見られなかったので DJ-1 を男性生殖機能評価に直接用いることはできないと考える。

(4) 内分泌攪乱物質が与える DNA への損傷及びタンパク動態の解析

内分泌かく乱物質暴露によるヒト男性生殖機能への影響を調べる目的で、ブルームヘリカーゼ (BLM) の発現調節の変化を解析する細胞系を構築した。その系を用い、ヒト培養細胞に内分泌かく乱物質を暴露することにより生じる BLM の発現調節の変化を解析した。ブルーム症候群は、若年で不妊症状を呈する RecQ 型 DNA ヘリカーゼ遺伝子の変異により発症する劣性遺伝病のひとつである。BLM は男性生殖器に発現が高く、ブルーム症候群患者ではその発現がみられず、かつ男性不妊の症状が顕著である。上記細胞系モデルを用いることにより、内分泌かく乱物質暴露による BLM の発現調節の変化を調べ、遺伝子の発現変化を介したヒト男性生殖機能への影響を推察できると考えた。

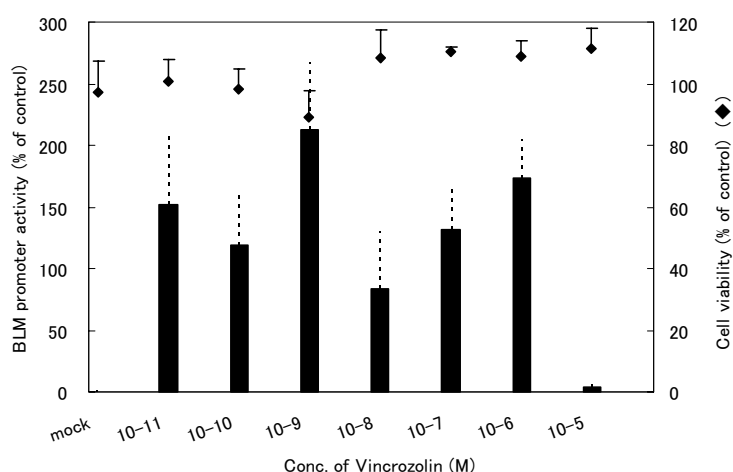
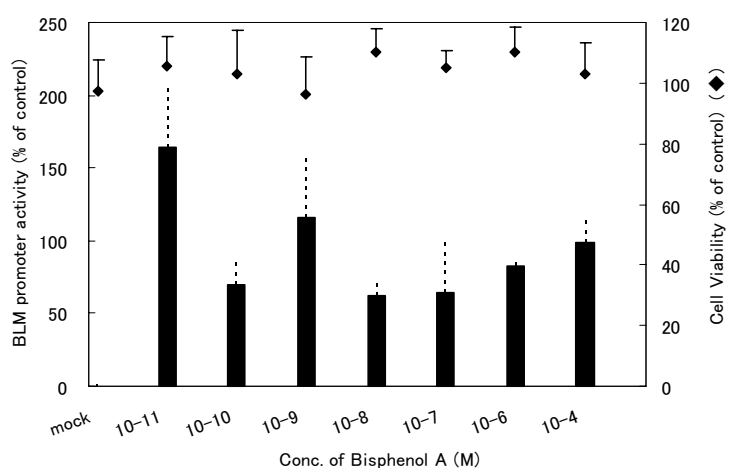
BLM のプロモーター活性測定系の構築

ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子 (pGL3-Basic Vector) を用いた BLM のプロモーター活性測定系の構築を行った。まず、Cap Site Hunting 法により BLM の転写開始点を決定し、次にこの転写開始点上流約 2.3kbp をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流にクローニングしたプラスミド (pGL3-BLM 2.3kbp) を作製した。BLM のプロモーター活性は、pGL3-BLM 2.3kbp を HeLa 細胞にトランスフェクトし HeLa 細胞内に産生されたホタルルシフェラーゼ発現量で調べた。ホタルルシフェラーゼ活性は、内部標準としてコトランスフェクトしたウミシイタケルシフェラーゼ発現量で標準化した。pGL3-BLM 2.3kbp のプロモーター活性を確認した後、pGL3-BLM 2.3kbp の種々 5' デリションミュータントを作製し、それらのプロモーター活性を比較することにより、BLM のプロモーター領域は、転写開始点から上流約 300bp に含まれていることが判った。

内分泌かく乱物質暴露による BLM のプロモーター活性への影響

pGL3-BLM 2.3kbp と pRL-TK (ウミシイタケ遺伝子) をコトランスフェクトした HeLa 細胞の培養液

中にビスフェノール A 及びビンクロゾリンを終濃度 10^{-11} ~ 10^{-4} M 及び 10^{-11} ~ 10^{-5} M で添加し、その 24 時間後の BLM のプロモーター活性を測定した(図1)。内分泌かく乱物質を添加していない細胞とビスフェノール A 及びビンクロゾリンを添加した細胞の増殖は、化合物添加後 24 時間で比較するかぎり大きな差はみられず、この条件下では細胞の増殖への影響は認められなかった。一方、BLM のプロモーター活性は、ビスフェノール A 10^{-11} M で暴露した細胞では亢進傾向が、 10^{-10} ~ 10^{-4} M の濃度範囲では逆に抑制傾向がみられた。ビンクロゾリンにおいては、 10^{-11} , 10^{-9} 及び 10^{-6} M で暴露した細胞ではプロモーター活性の亢進傾向が、 10^{-8} 及び 10^{-5} M で暴露した細胞では逆に抑制傾向がみられた。内分泌かく乱物質の作用には用量相関性が当てはまらず、低用量



Changes in the BLM promoter activity and cell viability of HeLa cells by the treatment with endocrine disruptors

Firefly Luciferase activity was normalized by Renilla Luciferase activity and protein concentration (n=4). The cell viability was determined by WST-8 method (n=4).

mock : transfected with pGL3-Basic vector and pRL-TK

control: transfected with pGL3-BLM 2.3kbp and pRL-TK

と高用量では異なった作用を示す例が報告されている。図に示すように HeLa 細胞での BLM のプロモーター活性を調べた時、内分泌かく乱物質は、その用量によって亢進的あるいは抑制的に作用すると推察され、この結果は low dose effect の面からも非常に興味深く、今後詳細に検討する予定である。

(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

[研究の目的]

精子濃度は遺伝的背景、年齢、生活形態、環境要因などからの影響を受けると考えられる。我々のグループでは、主として遺伝的背景(体質)の解析に重点を置いている。

Y染色体上には無精子症患者で欠失が報告されているDAZ遺伝子を始め、精子形成に関与が示唆されている種々の遺伝子が報告されている。これらの遺伝子は複数コピーをなして存在することも多く、様々な多型性をもっていると考えられる。このようなY染色体の特徴を踏まえて、Y染色体

上の SNPs やマイクロサテライト DNA マーカーを用いることで Y 染色体を詳細に分類し、最終的には Y 染色体のタイプをゲノム構造の特徴と対応させることで、Y 染色体系譜特異的な精子形成能の違いを明らかにする。さらに精子形成能に関する違いは内分泌攪乱物質に対する感受性の違いを反映しているとも考えられ、Y 染色体ハプロタイプごとの内分泌攪乱物質に対する感受性を *in vitro* で明らかにする。

[方法]

Y 染色体上の既知の SNPs および挿入欠失多型などの biallelic DNA マーカー (DXYS5Y, SRY, DYS287, UTY, 12f2) をタイピングするために PCR 法, PCR-SSCP 法, PCR-DHPLC 法を用いた。さらに Y 染色体上より新規に SNP を見出す目的で Y 染色体上の 10 種類以上の遺伝子のプロモーター領域を PCR-DHPLC 法によって解析した。

また我々が以前に報告した 4 種類の Y 染色体ハプロタイプ (I, II, III, IV) とマイクロサテライト DNA マーカーである Yfm1 の多型パターンの関連性について検索した。

[結果]

Y 染色体上の TB4Y 遺伝子プロモーターに新規に SNP を見出した。この SNP の意義を検討するためにルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを行う予定である。また既知の SNPs 及び挿入欠失多型などの biallelic DNA マーカーを組み合わせることで、現在までに Y 染色体を 7 種類のハプロタイプに分類した。今後これらのハプロタイプと精子数の関連について検索予定である。

Yfm1 は AZFc の領域に存在し、しかも複数コピーをなして存在することが判明した。またデータベースの検索より Yfm1 は DAZ 遺伝子の近傍に位置することが判明した。DAZ 遺伝子も複数コピー存在することが報告されているが、少なくとも現在データベース上に登録されている複数の DAZ 遺伝子の近傍には Yfm1 が存在している。Yfm1 座位の数は我々が以前報告した 4 種類の Y 染色体ハプロタイプおののくに特徴的であった。とくにハプロタイプ II の Yfm1 座位の数は 4 つのハプロタイプの中で最も少なかった。Yfm1 が DAZ 遺伝子の近傍に位置すること、およびハプロタイプ II が以前の解析結果で精子数が最も少なかったことを考え合わせると興味深い知見である。

(6) 精子の形態や運動性に対する内分泌かく乱物質の影響

[研究目的]

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を用い、現在国際的な規模での調査が行われているが、生殖機能との関係がより明らかな精子の形態や運動性を指標に調査することは、より重要な課題である。精子の形態や運動性を正確に解析する方法をまず確立し、次に、簡便な測定装置を開発する。

[方法]

- 1) 精子の形態解析: 基礎的なデータを集めるために、生殖能力のある男性と不妊症男性の精子の構造を、光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて調べ、異常精子の型、比率などを調査した。
- 2) 精子の運動解析: 生殖能力を有する男性精子を用いて、運動特性を解析し、さらに細胞膜を除去した精子を用いて、運動装置の生化学的特性を調べた。

[結果および考察]

- 1) 精子の形態解析:生殖能力を有する男性の精子では、光学顕微鏡で観察可能な形態の異常率は頭部・尾部ともに低下するが、不妊男性の精子で見られた形態異常のほとんどの型が確認された。この結果は、電子顕微鏡により観察される超微形態についても確認された。正常形態精子の割合が妊育性に重要であると考えられる。
- 2) 精子の運動解析:生殖能力を有する男性の精子の運動率は平均で約 55% であった。さらに、精子数が多い人では、運動する精子数も高くなる傾向があった。精子の運動装置の生化学的特性を除膜精子を用いて調べたところ、個々の精子で特性が異なることが明らかになった。精子の頭部をコンピュータを用いて自動追尾する方法によって、顕微鏡の視野内の 1000 個の精子の運動特性を数十秒で解析する装置を開発した。この装置を用いることにより、精液の運動特性を短時間で客観的に測定することが可能になる。

(7) ヒト精液所見における新規検査項目の開発

精子染色体断片化の組織化学的観察

TUNEL 法による染色体 nick の検出を試みた。はじめに染色体 nick の陰性標品を得るため、精液を 99% Percoll 攪拌密度勾配法、5.0%CO₂、5.0%O₂、90%N₂ 下に約 30 分間 swim up を行って運動精子を回収し、1.13g/ml 以上の密度を有する運動精子を分離した。陽性標品はあらかじめ調製した陰性標品を TritonX-100 にて除膜後、DNase 処理を行って調製した。常法に従い TUNEL 法による染色を行い、nick を FITC ラベル化し、PI で対比染色を行った。nick 陽性精子は緑色、陰性精子は赤色蛍光を発する。従来の報告では、FITC/PI2重フィルターを用いる観察が行われたが、この観察法では PI による赤色蛍光が FITC 緑色蛍光をマスクし、定量的観察が不可能であることが明らかとなった。定量的観察には、高感度 CCD カメラによる赤緑経口の個別観察後に画像合成することが不可欠であることが明らかとなった。精製標品の TUNEL 陽性比率は 1.0%以下であった。本法により、精子精製によって染色体断片化精子排除の可能性が示され、さらに精子精製条件を検討している。TUNEL 法により 129 精液標本の TUNEL 陽性率を観察し、精液所見との相関を検討した。WHO 基準で精液所見を分類した結果、normozoospermia (n=73)は 9.4±6.2%であったのに対し、oligo-asthenozoospermia (n=24)では 25.9±16.0%と有意に高値であった。

細胞電気泳動による精子染色体断片化の観察

精子を agarose に包埋し、界面活性剤、酵素処理後、電気泳動した。定量性の向上を目的として実験条件を検討した結果、既報の泳動条件(40V、5 分間)では長鎖 DNA も泳動され、疑陽性の結果が得られることが明らかとなった。上述した精製陽性、陰性標品を用いた対比観察により 5V、40 分間の泳動条件で定量的結果が得られることが明らかとなった。染色後、サイバーゴールドを用いて DNA 染色し、蛍光像を顕微鏡で観察した。精液中の精子の一部に染色体断片化に起因する comet 像を示す精子を認めた。100 症例の精液所見との相関を検討した結果、所見の低下に伴い c陽性像の増加を認めたが、TUNEL 陽性率とは相関しなかった。

ヒト精子 DNA 損傷の観察には、DNA2重鎖の切断および片側鎖の開裂を分別定量する方法の開発が不可欠であることが示された。予備的検討を行った結果、精子を高酸素分圧(大気中)下で

数時間 in vitro 操作すると、DNA2重鎖の切断は起こらないが、片側鎖の開裂が高頻度で起きることが明らかとなった。DNA の酸化的損傷が疑われ、さらに詳細な検討を要する。

3. 研究実施体制

研究分担グループ及びグループ長名	所属	役職	研究項目
岩本グループ 岩本 晃明	聖マリアンナ医科大学 泌尿器科教室	教授	EDs のヒト生殖機能への影響
古市グループ 古市 泰宏	(株)ジーンケア研究所	所長	EDs の影響としての DNA 損傷・タンパク動態の解析
中堀グループ 中堀 豊	徳島大学医学部 公衆衛生学教室	教授	遺伝的素因による環境影響に対する反応の差違に関する研究
石島グループ 石島 純夫	東京工業大学大学院 生命理工学研究科	助手	精子形態・運動性に関する研究
兼子グループ 兼子 智	東京歯科大学 市川総合病院	講師	ヒト精液所見の新規評価法の開発

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- 西田智保、兼子智、野澤資亜利、岩本晃明、：若年男性集団における精子 DNA 断片化と精子パラメーターとの関連、聖マリアンナ医科大学雑誌第 9 巻第 5 号、2001
- 佐藤陽子、馬場克幸、岩本晃明、：男性不妊症検査(精巣組織検査)医学書院“臨床医のための婦人科マニュアル”データの読み方から評価まで、159-162、2002
- Shinka T., Naroda T., Tamura T., Sasahara K., Nakahori Y.: A rapid and simple method for sex identification by analysis of a heteroduplex using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). J Hum Genet. 46:263-266,2001.
- M. Kubo-Irie , S. Ishijima , T. Noda, M.Irie , H. Mohri :Study of the centriole adjunct of stag beetle spermatozoa. Zoological Science 18, 85, 2001
- Ishijima S., Baba S. A., Mohri H., and Suarez S. S. : Quantitative analysis of flagellar movement in hyperactivated and acrosome-reactivated golden hamster spermatozoa. Mol. Reprod. Develop., 61, 376-384, 2002.

(2) 特許出願

なし