

「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

内分泌かく乱物質の男性生殖機能への影響に関する研究では、動物実験や野生生物の事例で示されている健康影響がヒトで確認できていないこと、ヒトで影響が示唆されているのは医療事故や職業性曝露などの特殊な高用量曝露事例のみであること、一般環境下でヒトへの影響を示す証拠がないことから、ヒトへの健康影響を検証することが大きな課題となっている。ヒトを対象とした研究では曝露実験のようなin vivo実験が不可能であるため、常にその代替手段(疫学的アプローチ、病理学アプローチ、in vitro 実験系でのアプローチ、遺伝子工学的アプローチなど)が求められる。しかしながらそれらの代替手段ですら、試料入手の困難さから、ヒト材料を用いての検討は進展していないのが現状である。この問題に対して岩本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疫学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。基本方針を、ヒトを対象とした研究を実施すること、特に精巣に関連した事象に焦点を当てることとし、ヒト材料を用いてヒト研究のための新しい方法を開発することを目指した。平成14年度は、男子不妊症患者および疫学調査に参加した正常男性から得られたヒト試料(血清、DNA、精漿、尿、患者の精巣組織等)を用いて、内分泌かく乱化学物質のヒト生殖機能への影響を評価するための方法の開発とその基盤となる基礎研究を実施した。これまでに新たな知見として、造精機能の低下した精巣に起こる精細管基底膜の肥厚は造精機能障害に先立って起こる変化であること、ras関連遺伝子産物DJ-1タンパク質が造精機能の評価パラメータとして有用であること、Y染色体の遺伝的背景の違いがヒト精子数に影響を与えていることを明らかにした。また、妊孕能の重要なパラメータとなる精子運動を正確かつ簡便に評価できる解析装置を独自に開発した。これらの研究から我々のプロジェクトは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と考えている。

2. 研究実施内容

精子形成のメカニズムを探る

造精機能におけるヒトに特徴的なメカニズムを探ることにより、内分泌攪乱物質の精巣機能への影響の正確な評価系の開発と、その仕組みの解明をめざす。また、in vitroでの実験を可能にするため、精細胞培養系の確立を目指す。

1) ヒト特異的な精細管基底膜の肥厚に関与する糖タンパク質の解析

【目的】精子形成が異常なヒト精細管では、特徴的な精細管基底膜の肥厚が見られる。昨年までに精子形成と基底膜の状態は深い因果関係にあり、精子形成過程が異常な時、肥厚した基底膜inner layerに存在し、PNA-lectinに対して特異的な結合を示す糖タンパク質があることを示した。この糖タンパク質は、ヒトに特異的な造精機能障害を示すマーカーになることが考えられ、また、造精機能障害への関与を考える上で非常に重要であると考え、解析を行った。

【方法】造精機能障害を持つ精巣と造精機能の高い精巣からサンプルを調整し、基底膜肥厚に伴い基底膜で増減する糖蛋白のスポットを2次元電気泳動によって分離し、lectin affinity blotting、western blottingを用いて確定し、これらの糖タンパク質のスポットを質量分析にかけ解析する。

【結果と考察】これらのスポットの一つは分子量約43kDa, pI5 - 6の糖蛋白であり、質量分析の結果、ペプチドの一部がヒトアルブミンと一致した。しかし、免疫組織化学でも、western blottingでもヒトアルブミン抗体とはクロスしなかったことから、アルブミン様の新規蛋白ではないかと考えている。現在、さらなるdifferential screeningを行い、基底膜肥厚に関与するPNA-lectinで認識される他の糖タンパクを探索中である。

2) ヒト精子形成過程の異常とC₂₁ステロイドホルモンについて

【目的】精子形成過程にはホルモンなどの液性因子による精巣内環境が重要であると考えられるがその詳細については不明である。我々は既にヒト精巣において、肥厚した基底膜がprogesterone抗体による強い染色性を示すことや、造精機能不良な精巣で17 α OHPの増加が見られたことから、造精機能障害を示すヒト精巣内ではandrogen生成時にC₂₁steroidを中間代謝物とする通常は使用されない Δ 4経路を主として使用している可能性があると考えている。この仮説を確かめるため、精子形成が良好な精巣と異常な精巣において代謝酵素の発現量の比較を行った。

【方法】比較的正常な精子形成を示す精巣断片 (Mean JS. 7.4-8.93)、無精子症または乏精子症の精巣生検の検体 (Mean JS. 1.75-4.25) を材料とした。検体の一部をブアン固定しパラフィン切片を作成し、検体の造精機能を判定した。また、一部はホルマリン固定後パラフィン切片を作成、抗3 β -HSD抗体を用いて免疫染色を試み、また検体の一部からRNAを抽出し、それぞれの代謝酵素のプロンプを用いてRT-PCRを行い、酵素群の発現量を、造精機能が不良な精巣と良好な精巣において比較した。

【結果と考察】造精機能が不良な精巣と良好な精巣と比較して、3 β -HSD mRNAの発現量は増加し、17 α -OHと17-20lyase活性の律速段階を決定するP45017 α のmRNA発現量は変化し

ていないことが明らかとなった。また、 17β -HSDのmRNAの発現量は、期待されていたサイズの増幅物とそれとは異なるサイズの増幅物の二つが見られ、それぞれ、造精機能が不良な精巣と良好な精巣と比較して、発現レベルが異なることが明らかとなった。 17β -HSDについては、様々なisoformが報告されており、今回得られた二つの増幅物についてさらなる解析を進める予定である。さらに 3β -HSD抗体を用いて免疫組織染色では、mRNAの発現レベルの変化を支持する結果を得た。以上の結果は、造精機能不良な精巣において、酵素活性に変化が起きており、 $\Delta 4$ 経路の代謝物が生成されやすい状態であることを示唆している。現在、造精機能不良な精巣での実際の代謝経路を明らかにするため、基質のtracer実験を行っている。

3) マウス精巣由来培養細胞株の確立の試み

【目的】精子形成過程を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。しかし、精巣内の総ての細胞に対して細胞株があるわけではなく、また、既存の細胞株では、精巣内のオリジナルな同種の細胞に比べてその機能は一部に限られている。そこで、我々は、機能をなるべく多く維持した細胞株を総ての細胞種に対して作成することを試みている。

【方法】昨年までに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、著しい増殖能を持つ接着細胞集団を得た。今年度、ペニシリンカップ法にて2段階のサブクローニングを行い、得られたクローンの性質を1) 形態、2) progesterone receptor, androgen receptor, estrogen receptor, aryl hydrocarbon receptorなどの抗体を用いた免疫染色、western blottingによる発現量の比較、3) 染色体分析、4) FITC-beadsを用いた貪食能分析、の4点から比較、クローン集団の絞り込みを行った。

【結果と考察】

上記の方法により最終的に6つのクローン集団を得たので、現在、最終段階のクローニングにとりかかっているところであり、実験上有効な性質を持つ新たな細胞株が得られると確信している。今後、最終的に得られた細胞株を組み合わせ、精巣内の細胞間相互作用を調べることができると考えている。

4) Y染色体に存在する熱ショック転写因子、HSFYのヒト精巣における局在と、精子形成、精子成熟への役割について

【目的】HSFYはヒトY染色体上に存在する新規熱ショック転写因子(HSF)で、ヒト精巣特異的に発現する。しかしHSFYのヒト精巣における局在や、機能、役割については未だ不明である。本研究では、ヒト精巣内でまず、個々の細胞についてHSFYの発現を詳細に観察し、精原細胞の分化、減数分裂、精子成熟の過程に関連した発現の制御の有無について検討した。また、造精機能障害を示す精巣と成熟精子形成を示す精巣において、HSFYの発現を比較検討し、HSFYの発現の抑制と精子形成及び成熟に与える影響について推察した。

【対象と方法】比較的正常な精子形成を示す精巣断片 (Mean JS. 7.4-8.93)、無精子症または乏精子症の精巣生検の検体 (Mean JS. 1.75-4.25) を材料とした。検体の一部をブア

ン固定し、パラフィン切片を作成、抗原の賦活化を行った後、抗HSFY抗体を用いて免疫染色を試み、また検体の残りの部分から蛋白を抽出し、SDS-PAGE後、抗HSFY抗体を用いてwestern blottingを行った。陰性対照として、抗原吸収を行った抗HSFY抗体を用いた。

【結果】比較的正常な精子形成を示す精巣の場合、HSFYの局在は時期及び細胞特異的に見られた。まずDark A精原細胞では核内でのみ発現が見られ、Pale A精原細胞では核周辺部位にのみ発現が見られた。Type A精原細胞での発現は一部の細胞に限られた。分化したType B精原細胞から第一減数分裂前期のレプトテン精母細胞までは発現が見られなかった。ザイゴテン精母細胞になると、核内の染色体上で強い発現が見られるようになり、パキテン精母細胞ではその発現は核内の対合複合体にはじめ強く広がり、その後核周辺部位に強く見られ、パキテン期終期には発現が消失した。次に第一減数分裂後に2次精母細胞が形成されると、HSFYの発現は核から細胞質へと一時的に見られ、第二減数分裂後、核と細胞質に見られたHSFYの発現は核の周辺部位に移行した。精子成熟期にはHSFYは始め伸長精子細胞の核に見られ、その後発現は核から細胞質へと移行し消失した。Leydig細胞やmyoid細胞、基底膜においてHSFYの発現は見られなかった。しかし約半数のSertoli細胞では、細胞質においてHSFYの発現が見られた。次に造精機能障害を示す精巣についてHSFYの局在を検討したところ、対合複合体を形成するザイゴテン精母細胞や、第二次精母細胞でHSFYの発現が障害されていた。さらに、精細管により、片寄ったHSFYの発現や、HSFYを発現しているSertoli cellの数に変化が見られた。また、western blottingの結果から精巣全体においても、HSFYのタンパク量は精子形成が正常なものと比較すると変化していた。これらのことは、造精機能障害の精巣において、時期特異的、また、細胞特異的にHSFYの発現に変化が起きていることを示している。

【考察】HSFYの時期細胞特異的な発現の解析より、精原細胞の分化、減数分裂、精子成熟の過程に平行した発現の制御が明らかとなった。さらに、造精機能障害を示す精巣において、減数分裂期の発現異常や、Sertoli cellにおける発現異常がみられたことから、時期、細胞特異的なHSFYの発現は、HSFYが転写因子であることを考えあわせると、精子形成、成熟過程、特に減数分裂の機構に対し、重要な役割をになっていることが示唆された。

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

【研究目的】内分泌かく乱物質曝露の雄性生殖機能への影響を特に分化・発達期の精巣内ホルモン環境への影響の面から明らかにすることを目的とした。また、内分泌かく乱物質の多くは転写因子であるエストロゲンレセプターに結合して作用することから内分泌かく乱物質曝露による有害作用は発達期の遺伝子発現への影響に起因することが考えられ、我々は精巣において内分泌かく乱物質曝露によりその発現が影響を受ける遺伝子の検索を試みた。

【方法】ビスフェノールA(BPA)母体経由胎児期曝露の周産期におけるテストステロン濃度への影響についてラットを用い検討した。さらに、胎児精巣由来のテストステロンに依存する脳の性分化への内分泌かく乱物質曝露の影響を明らかにするために視床下部における性分化関連因子のmRNA発現に対するBPA母体経由胎児期曝露の影響についてRT-

PCR法、リアルタイムPCR法により検討した。さらに精巣において内分泌かく乱物質曝露によりその発現が影響を受ける遺伝子を検索するために胎児期および授乳期にゼラノールを母体経由で曝露されたマウスにおける遺伝子発現への影響についてディファレンシャルディスプレイ法を用い出生時から52日齢の精巣について正常マウスと比較し解析した。

【結果と考察】BPA 0.2、2、20、200 μ g/mlを飲料水として妊娠日(GD1)より母体に投与し、妊娠22日齢(出生前日、GD22)の胎児および出生2時間後の新生児の血清と精巣を採取した。GD22の血清BPA濃度は母体へ曝露濃度に相関して増加した。BPA曝露後の血清テストステロン濃度は妊娠22日齢の胎児では差がなかったが、出生直後の新生児ではビスフェノールAの投与濃度に相関して低下する傾向を示し、200 μ g/mlの曝露で有意に低下した。一方、GD22における精巣LH受容体のmRNAの発現、血清テストステロン濃度に差はなかった。これらから高用量のBPAの胎児期における曝露は生殖器系の分化・発達に重要な出生直後のテストステロン作用を抑制することが示唆され、周産期の内分泌環境を攪乱することが推定された。また正常マウスにおいて出生後の特定の時期にアップレギュレートされる精巣関連既知および未知遺伝子をディファレンシャルディスプレイ法により検索し現在までに、出生後の特定の時期にアップレギュレートされる精巣関連既知および未知遺伝子を数個見出した。しかしこれら遺伝子発現にゼラノール曝露の影響はみられなかった。本研究に関連して内分泌かく乱物質のひとつと考えられる植物エストロゲンのアロマターゼ活性に対する効果についてMCF7細胞を用い検討した。調べた植物エストロゲンのうちの数種で低濃度ではアロマターゼ阻害作用を、高濃度ではエストロゲン作用を示すことを見出した。植物エストロゲンの摂取には乳癌発症のリスクを下げる効果があるとの報告があるが、植物エストロゲンのアロマターゼ阻害作用がこれに関与している可能性がある。

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

【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24kDa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・精巣抽出物全てから分子量24kDaでpI5.5~6.7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、精子細胞に存在した。また、精巣上体においては上皮細胞と、管内の精子に存在することが確認できた。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おり、冷メタノール固定では尾部にも存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で妊婦パートナー精漿について356例、不妊外来患者98例について測定し、運動率、精子数について比較検討したが現在のところこれらに顕著な相関は確認されていないが、精子濃度については弱い正の相関が見られた。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。また、妊婦パートナーについては血漿中の各種ホルモン値を測定し、これらとの相関も検討したが顕著な相関は見られなかった。しかし、現在のところ精巣機能を評価するのに良いパラメーターとされているInhibin Bが精子濃度に対して相関係数0.238 ($p < 0.0001$)であったのに比べ、DJ-1は相関係数0.298 ($p < 0.0001$)でこの集団に関してはInhibin Bに遜色無いマーカーであることが明らかになった。

【考察】 ヒトDJ-1はヒト精巣、精巣上体内および射出精子で発現しており、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。男性生殖機能を評価するパラメータとしてはInhibin Bと同程度のマーカーであることが示されしかもInhibin Bや他のホルモン系とは独立した新規のマーカーであることが本研究で示された。現在のところ精子濃度の測定精度が低く、相関係数が低くなる原因となっていると考えられる。従って、さらに検討が必要ではあるがDJ-1は造精機能評価しかも内分泌かく乱による影響を含んだ評価マーカーとして有用であると考える。

水晶発振子マイクロバランス装置による内分泌かく乱物質微量測定法の開発

【研究目的】 内分泌かく乱物質による男性生殖機能系への影響をより確実に把握するために疫学調査で得た検体(精漿、血清)中の水晶発振子マイクロバランス装置による内分泌かく乱物質微量測定法の開発を行う。

【方法と結果】 各種の内分泌かく乱物質(主にダイオキシン類)がarylhydrocarbon(AH)受容体と結合、その結果、AH受容体nuclear translocator(ARNT)のrecruit(AH受容体とARNTとの2量体の形成)、そしてプロモーター領域内のエンハンサー配列(代表的な配列としてDREがあげられる)との結合がプロモーターの下流にある遺伝子の転写を促進させる事を利用する。上記原理を利用したELISA法が既に市販されている(Ah-IA)ので

ダイオキシンに限定しない上記作用を起こさせる内分泌かく乱物質を全て検出することにより従来の検出限界以下での汚染の実態を明らかにする試みを行った。このAh-IA ELISAキットを用いてダイオキシン類を検出するための精製を行わない抽出操作のみの血液検体での検出感度を検討したが血清では十分な感度が得られなかった。上記複合体を形成するためにAh-IA ELISAキットでは肝臓のcrude extractを使用している。水晶発振子マイクロバランス装置に応用し検出感度を上げるための基礎実験ではこの肝臓のcrude extractが非特異的な結合を引き起こしてしまうため使用できないことが判明し、すぐに各因子の組み換えタンパク質の利用に切り替えた。AhR, p23, ZAP2, HSP90の組み換えタンパク質を精製し、各組あわせて検討したところAhRとZAP2とHSP90を用いた場合に測定できることが解ったが、感度は肝臓のcrude extractを用いた場合にいたらなかった。

【考察】水晶発振子マイクロバランス装置は非常に感度の良い分子間相互作用検出系ではあるが、これにAh-IA ELISAキットの原理を適用するにはまだいくつが解決しなければならない問題があることが判明した。AH-DRE複合体形成の全ての因子が明らかにされておらず、肝臓のcrude extractの完全な再構成系を確立するには時期早尚であったと考えられる。従って、この研究は断念し、CALUX法の適用を検討することにした（「内分泌攪乱物質」プロジェクト内、自治医科大学・香山教授と共同研究）。我々が保存している血清、精しょうは数ml単位であり、このレベルでのダイオキシン類の測定はまだ実現していない。この程度までの血清での測定が可能になればダイオキシン類によるヒト汚染の実体が明らかに出来ると考えられるが、現時点では検出限界以下でしかない。そこで本研究に着手したが現段階では実現不可能であることが判明した。

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

【目的】ゲノム維持機構のために働く酵素群のひとつにRecQヘリカーゼファミリーがある。ヒトでは、このうちブルームヘリカーゼ及びウェルナーヘリカーゼが変異により失われると遺伝性早老症（ブルーム症候群、ウェルナー症候群）が発症し、若年での老化、不妊、ガンの多発等が臨床症状として現れる。健常人では、これらヘリカーゼは特に生殖組織に高発現しており、生殖機能における重要性が推察される。実際、遺伝性早老症の患者は不妊症状を呈する。本研究では、ブルームヘリカーゼ遺伝子(BLM)及びウェルナーヘリカーゼ遺伝子(WRN)の転写をヒト由来の細胞(MCF7)を用いて測定する系を構築し、内分泌かく乱物質の暴露によるこれら遺伝子の発現への影響を検討した。

【方法】BLM及びWRNの転写反応は、ルシフェラーゼアッセイによって測定した。ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の5'上流にBLMあるいはWRNのプロモーター領域をつないだプラスミド、pGL3-BLM及びpGL3-WRNを構築し、実験に供した。内分泌かく乱物質はエストロゲンレセプター(ER)を介して作用すると考えられていることから、ERを発現しているヒト乳癌由来MCF7細胞に上記プラスミドをトランスフェクトし、転写レベルへの影響を測定した。一方、内在性(endogenous)のBLM及びWRNmRNAの発現レベルは、MCF7細胞の培養液にエストロゲン及び内分泌かく乱物質を添加後48時間でtotalRNAを抽出し、TaqMan法で定量的PCRを行い測定した。

【結果】ルシフェラーゼアッセイ系に添加したエストロゲン（E2：17β-エストラジオール）及び合成エストロゲン（DES：ジエチルスチルベステロール）は、BLM及びWRNのプロモーター活性を 10^{-11} ～ 10^{-8} Mの範囲で濃度依存的に高め、BLMのプロモーター活性はコントロールの約3倍、WRNでは約2倍まで上昇した。エストロゲンレセプターに結合することで内分泌かく乱作用を示すと報告のあるビスフェノールA（BPA）は、 10^{-7} ～ 10^{-5} Mの範囲で濃度依存的にプロモーター活性をE2及びDESと同様に高めた。なお、これら化合物処理による生細胞率への影響はほとんど認められなかった。また、BPAの他にノニルフェノール（NP）、フタル酸ジブチル（DBP）及びビクロゾリン（VIN）について 10^{-10} ～ 10^{-7} Mの濃度範囲でルシフェラーゼアッセイを同様に行ったが、E2、DES及びBPAで得られた結果と異なり、BLM及びWRNの転写に及ぼす影響はほとんど認められなかった。E2（ 10^{-9} M）、BPA（ 10^{-6} M）で暴露した細胞の内在性BLM及びWRNmRNAの発現レベルを定量的PCRで測定したところ、E2添加によりBLMではコントロールの約2倍、WRNでは約1.5倍に上昇していた。一方、BPA 10^{-6} M添加ではコントロールに比べ、わずかに上昇することが示された。

以上の結果より、BPA、DES等の内分泌かく乱物質はE2と同様BLM及びWRNのプロモーターを活性化し、遺伝子の発現を上昇させることが判った。

【考察】BLM及びWRNの転写は、細胞分裂に伴い上昇することが知られている。E2によるBLM及びWRNのプロモーター活性の上昇は、エストロゲンレセプター（ERα及びERβ）の阻害剤であるICI182780で抑制されるので、E2のBLM及びWRNへの作用にはERとERによる細胞分裂促進が関与していると考えられる。BPAのERへの結合能は、E2より弱く、1/100～1/1000と報告されているが、ルシフェラーゼアッセイで得られたE2、BPAの作用濃度は、ERへの結合能の差とほぼ一致していた。E2応答性のMCF7細胞では、BPAはE2と同じようにBLM及びWRNの発現に促進的に働くことが示されたが、E2の約1000倍の高濃度が必要であった。しかし、BPAが歯科用材料等に含まれていることを考えると、局所で一時的には 10^{-4} M程度のBPAで暴露される状況もあり、その場合はBLM及びWRNの発現に作用するかもしれない。今後、内分泌かく乱物質暴露と細胞周期との関連及びBLM及びWRNの発現タンパク量の変化等をウエスタンブロット及び蛍光免疫染色等により調べ、さらにDNA損傷剤（カンプトテシン等）に対する感受性変化を検討し、内分泌かく乱物質暴露がRecQヘリカーゼなどを含むDNA修復機構に及ぼす影響について検討を行う。

遺伝的素因による環境影響に対する反応性の差異に対する研究

【目的】

1) Y染色体のタイプと精子数との関連

我々は以前の研究でY染色体の人による遺伝的違いが、精子形成能に影響を及ぼすという予備的な結果を得ている。これについて更に解析例数を増やして検討する。

2) Y染色体上の無精子症候補領域AZFbに存在する遺伝子HSFYの解析

Y染色体上には複数の無精子症候補遺伝子が存在していると考えられるが、今回新規にY染色体上にマップされたHSFYは、他のHSF（heat shock transcription factor）ファミリーであるHSF2やHSF1が精子形成に関連することから、精子形成に何らかの役割を担って

いるものと期待される。今回HSFYが実際に精巣で発現しているかどうか、無精子症患者でどのような発現パターンとなっているか検討する。

【方法と結果】

1) 今までに精子数が判明している775人の健常人男性のY染色体について、Y染色体上に存在するSRY, DXYS5Y, YAP, UTY intron4, 12f2の各biallelic DNAマーカーを用いて6種のハプログループに分類した (I α 104名、I β 203名、II α 114名、II β 132名、III 70名、IV 152名)。さらに不妊症とY染色体との関連を検索するために、367人の聖マリアンナ医科大学泌尿器科外来を受診した不妊男性を対象として、4種類の染色体のハプログループについてタイピングを行った (II 136人、III 139名、IV 26名、IV 66名)。これらのデータについて疫学的なデータの確認終了後、統計学的な解析を行う予定である。

Y染色体の遺伝的な多様性と精子形成能を解析するためには、Y染色体上のハプログループ特異的なY染色体の特徴を見出す必要がある。この目的のために、Y染色体のハプログループ特異的なSNPsを系統的に収集している。Y染色体上に存在するTBL1Y (エクソン14個分)、E1FA1Y (エクソン6個分) 及びTIG2LY遺伝子 (エクソン1個分) の各エクソンを増幅するようにプライマーを設定し、PCR反応後DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) 解析を行った。その結果、TBL1Y遺伝子において新規のDNA多型がY染色体のハプログループIをもつ特定のY染色体で見出された。解析の結果、この多型はイントロン7のドナー部位に存在することが判明し、スプライシング異常を引き起こすことが予想された。この遺伝子産物はNcoR転写抑制複合体やSMRT転写抑制複合体の構成要素の一つであり、遺伝子発現調節に深く関わっていると考えられる。現在この多型の意義について検討している。

2) HSFYはノーザンブロット解析の結果精巣に特異的に発現していた。またwestern blot解析でも精巣特異的に発現が認められた。無精子症患者の精巣組織ではHSFYの遺伝子発現は著しく減少していた。このことからHSFYは精子形成細胞に多く発現していることが示唆された。

HSFYの細胞内局在をHSFY過剰発現ベクターを用いてNT2/D1細胞で検討したところ、細胞質内に局在することがわかった。HSFYファミリーは転写因子であると考えられ、実際HSFYにも核移行シグナルと考えられる配列が存在する。したがって本来の精子形成細胞では核に移行すると予想した。HSFYが核に移行するためには精子形成細胞において他のタンパク質との相互作用や、翻訳後修飾が関与している可能性がある。

【考察】

1) Y染色体のタイプと精子数との関連

疫学的データクリーニング終了後、統計学的な解析に入る必要がある。

2) Y染色体上の無精子症候補領域AZFbに存在する遺伝子HSFYの解析

HSFYと相互作用するタンパク質について現在yeast two-hybrid Systemでスクリーニングを進めている。HSFYの機能を解明し、精子形成能との関連を探るためにはまずHSFYの機能ドメインを同定することが重要であると考えられる。

精子の形態や運動性に対する内分泌かく乱物質の影響

【方法】

1) 妊婦配偶者精子の形態解析

内分泌かく乱物質などの精子形態への影響を調べるためには、基準となるべき正常な精子の形態特性を明らかにする必要がある。このために、妊婦配偶者の精子の形態を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて調べ、特に精子異常に注目して解析した

2) 自動ヒト精子運動解析装置の開発と改良

既に、アメリカやイギリス製のCASA(Computer-Aided Sperm Analysis)方式の装置が市販されているが、独自に自動ヒト精子運動解析装置を開発し、改良している。

【結論】

1) 妊婦配偶者精子の形態解析

妊孕能を有する男性から得た精液でも、患者の精液に比べ割合としてはかなり低いものの、光学顕微鏡で患者の精液中に観察されたほとんどのタイプの精子形態異常が観察された。この結果は、電子顕微鏡で観察される超微形態でも確認された。頭部、中片部、尾部に異常を持つ精子の割合に相関は無く、さらに、それぞれの部位での異常の出現率にタイプ間での相関は無かった。

光学顕微鏡によって観察される精子異常と、電子顕微鏡で観察された超微形態上の異常の関係を明らかにするために、活発に運動する精子だけを集めその形態を調べたところ、光学顕微鏡では見落としていた頭部異常が明らかになった。精子形態を明らかにするには光学顕微鏡による観察だけでは十分ではなく、精子全体からほぼ生体分子一つまで観察可能な電子顕微鏡を用いた解析の重要性が明らかになった。

2) 自動ヒト精子運動解析装置の開発と改良

従来精子の観察のためには位相差顕微鏡が用いられ、特に観察する精子が背景より明るく見える位相差装置がCASAのために推奨されてきたが、内外の大手顕微鏡メーカーによるこの種の位相差装置と対物レンズの製造中止により、今後利用する事が難しくなった。そこで、精子が背景より暗く見える位相差装置や暗視野顕微鏡にも対応できるよう精子運動解析装置の改良を行った。

原理的にCASAでは、精子だけを正確に区別することはできない。そこで、精子でないものをどの程度精子と数えるかの測定誤差を正確に評価する必要がある。このために、撮影するカメラの解像度を高め、顕微鏡からの像の上に、コンピュータによって停止精子と判断されたものを重ね合わせ、コンピュータの判断の真偽を一枚の画像上で判断できるような改良を行った。

ヒト精液DNA損傷観察法の定量的観察法の開発

ヒト精液所見の低下は、精子濃度、運動率、形態等顕微鏡観察による判定が可能な項目を指標としてきた。われわれは一般精液所見の低下に先立ち精子DNA損傷率が上昇することを見いだした。本研究はDNA 2重鎖の切断および片側鎖の開裂を分別定量法の開発を行った。具体的には前者についてはcomet細胞電気泳動法を用い、後者についてはTdT反応

を用いた。成熟運動精子を精製してDNA損傷陰性対照とし、これをDNase処理して陽性対照を作成した。両者を用いて測定条件の標準化を行った。comet細胞電気泳動法については、細胞融解法、標本作製法、電気泳動条件（ゲル濃度、泳動電圧）の標準化が必要であった。TdT反応（TUNEL法）においては、細胞融解法、フィルターとラップ法による細胞固定法が定量的観察に不可欠であった。

1) 修正TUNEL法によるヒト精子核DNA損傷の組織化学的検出

【目的】精子核DNA損傷観察法（TUNEL法を用いたDNA断端の組織化学的検出法）の定量性向上を試みた。

【方法】精液はインフォームドコンセントを得て採取した。精子は99%Percoll密度勾配遠心分離法、swim up法により運動精子を分離した。これをDNase処理してDNA断片化陽性対照とした。精子は孔径2.0 μ mのフィルターに吸引、固定して標本作製した。細胞膜、細胞質の可溶化には0.1%Triton X-100、0.8 MNaI、1.0mMDTT、1.0mMEDTAを用いた。DNA断端は常法に従いTdT反応によりビオチン-dUTP・FITC-アビジンをラベルし、さらにPIを用いて対比染色した。精子頭部に緑色蛍光を認めるものをDNA断片化陽性、PIによる赤色蛍光のみを認めるものを陰性とした。

【結果】ProteinaseKに代えてNaIを用いる化学的蛋白質可溶化により、再現性が向上した。スミア法では染色過程で半数以上の精子が失われたが、フィルター法では精子の喪失を防止できた。FITC/PI 2重フィルターを用いて観察する従来法に比して、PI用フィルターにより精子位置を確認した後、FITC用フィルターに切り替えて観察することにより感度が向上した。Swim up後の精子はほぼ赤色蛍光のみを認め、精子精製によりDNA断片化精子を排除し得る可能性が示された。DNase処理により緑色蛍光は経時的に増加し、本法によりDNA断端を半定量的に観察し得ることを認めた。本研究で確立した修正TUNEL法により100精液標本（精子濃度 $55 \pm 40 \times 10^6$ /ml、運動率 $28.4 \pm 19.1\%$ ）のTUNEL陰性率を測定した結果、 $74.4 \pm 12.6\%$ であった。精子濃度、運動率、正常形態率の低下に伴い陰性率の低下傾向を認めたが、これらのパラメータとの相関は低く、一般精液所見からDNA断片化精子比率を推定することは困難であった。

【考察】今後、画像解析装置等を用いて個々の精子のFITC蛍光量を定量し、DNA断片化程度を推定する必要がある。

2) 修正コメット電気泳動法によるヒト精子核DNA2重鎖切断の観察

【目的】ヒトにおいても減数分裂前期以降、アポトーシスによる精母細胞死が知られている。射出精子の一部にも精子核DNA2重鎖切断を認める。本研究はコメット電気泳動法を用いたヒト精子核DNA2重鎖切断の観察における定量性向上を目的とした。

【方法】精子は99%Percoll密度勾配遠心分離法、swim up法により運動精子を分離した。これをDNase処理してDNA断片化陽性対照とした。精子はproteinase K(0.1mg/ml)を添加した0.7%トレビゲルに懸濁し、スライドガラス上に作成した2枚の0.4mm厚0.7%トレビゲル間に充填して薄膜状の精子層を形成した。0.05%SDS、0.1%Triton X-100、1.0mMDTT、1.0mMEDTA溶液中で56 $^{\circ}$ C、30分間細胞を溶解した。5.0V、40分間電気泳動後、Syber Gold

でDNA染色して泳動像を蛍光顕微鏡観察した。

【結果】従来の懸濁法に代えて、サンドイッチ法により同一平面上に精子を播種することにより、観察が容易になった。泳動後、精製精子は原点にとどまった（陰性対照）が、陽性対照は原点から彗星状の泳動像を示した。一方、従来用いられてきた電気泳動条件（20V、10分間）では、陰性、陽性対照とも彗星状の泳動像を示し、疑陽性が生じることが明らかとなった。本研究で確立したコメット電気泳動法により100精液標本（精子濃度 $55 \pm 40 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 $28.4 \pm 19.1\%$ ）のコメット陰性率を測定した結果、 $80.0 \pm 10.3\%$ であった。精子濃度、運動率、正常形態率の低下に伴い陰性率の低下傾向を認めたが、これらのパラメータとの相関は低く、一般精液所見からDNA2重鎖切断精子比率を推定することは困難であった。

【結論】今後、画像解析装置等を用いて個々の精子の彗星状泳動像を解析し、DNA断片量ならびに断片長を推定する必要がある。

3) 精子調製によるDNA損傷精子の排除と培養環境におけるDNA保護

【目的】本研究は、精製によるDNA損傷精子の排除と培養環境におけるDNA保護、とくに高酸素環境下におけるDNA損傷防止法を検討した。

【方法】精液はインフォームドコンセントを得て採取した。精子は98%Percoll密度勾配遠心法、次いでswim up法により運動精子を分離した。Swim upにはHTF培養液を用い、 $5.0\% \text{CO}_2$ -air（高酸素下）または $5.0\% \text{CO}_2$ - $95\% \text{N}_2$ （低酸素下）で行った。精子核DNA損傷は、TUNEL法、COMET電気泳動法を用いて観察した。

【結果】5精液標本（精子濃度 $37 \pm 17 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 $29 \pm 14\%$ ）のTUNEL陰性率、COMET陰性率は $74 \pm 8.2\%$ 、 $75 \pm 14\%$ であった。Percoll密度勾配遠心分離後に高酸素下または低酸素下でswim upした場合、COMET陰性率は各々 $96 \pm 2.4\%$ 、 $97 \pm 2.0\%$ に上昇した。一方、低酸素下ではTUNEL陰性率が $95 \pm 1.5\%$ に上昇したが、高酸素下では $27 \pm 11\%$ と原精液に比して有意($p < 0.01$)に低下した。【考察】TUNEL法はDNA断端を組織化学的に、COMET電気泳動法は2重鎖切断によるDNA断片化を検出する。体外受精・胚移植に汎用されるPercoll密度勾配遠心法、swim up法はDNA損傷精子の排除に有用であった。高酸素下での精子取扱は、DNA2重鎖切断を伴うことなくTUNEL陽性精子を増加させた。一方、低酸素下ではTUNEL陽性率の増加を認めず、 $5.0\% \text{CO}_2$ -air下では酸化的損傷によるDNA鎖の片側開裂が誘起される可能性が示唆された。今後、射精前における精子DNA損傷に関しては精製による排除を行うとともに、射精後（in vitro環境）における精子取扱に際しては酸素濃度制御を含めたDNA保護が必要となると考えられる。

3. 研究実施体制

岩本グループ

- ① 研究分担グループ長：岩本 晃明（聖マリアンナ医科大学泌尿器科、教授）
- ② 研究項目：精子形成のメカニズムを探る／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／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／水晶発振子マイクロバランス装置による内分泌かく乱物質微量測定法の開発

古市グループ

- ① 研究分担グループ長：古市 泰宏（株ジーンケア研究所、所長）
- ② 研究項目：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

中堀グループ

- ① 研究分担グループ長：中堀 豊（徳島大学大学院医学研究科プロテオミクス医科学専攻、生体制御医学講座分子予防医学分野、教授）
- ② 研究項目：遺伝的素因による環境影響に対する反応の差異に関する研究

石島グループ

- ① 研究分担グループ長：石島 純夫（東京工業大学大学院生命理工学研究科生物プロセス専攻生物機能工学講座、助手）
- ② 研究項目：精子の形態や運動性に対する内分泌かく乱物質の影響

兼子グループ

- ① 研究分担グループ長：兼子 智（東京歯科大学市川総合病院産婦人科、講師）
- ② 研究項目：ヒト精液DNA損傷観察法の定量的観察法の開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Teruaki Iwamoto, Shiari Nozawa and Yoko Sato
Male reproductive health and effects of endocrine disruptors.
Environmental Sciences, Vol.10, suppl, 1-12, 2003
- Yoko Sato, Takayasu Nishida, Satetsu Miyano, Tomohiko Matsushita, Katsuyuki Baba, Masaru Nakano, Yuko Sato, Shiari Nozawa and Teruaki Iwamoto
Spermatogenesis and the thickness of lamina propria in human seminiferous tubules. Biology of Reproduction, 66, suppl, 298-299, 2002
- Kristian Almstrup, Mariana F. Fernández, Jørgen H. Petersen, Nicolas Olea, Niels E. Skakkebaek and Henrik Leffers. Dept. of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen: Dual Effects of Phytoestrogens Result in U-Shaped Dose-Response Curves. Environmental Health Perspectives 110: 743-748, 2002
- Sumio Ishijima, Teruaki Iwamoto, Shiari Nozawa and Kozuhiko Matsushita: Motor apparatus in human spermatozoa that lack central pair microtubules. Molecular Reproduction and Development 63, 459-463, 2002.
- Kaoru Yoshida, Miki Yoshiike, Shiari Nozawa, Katsuyuki Tamai, Hiroyoshi Ariga, and Teruaki Iwamoto : Measurement of DJ-1 Protein in Human Seminal Plasma
Environmental Sciences Vol. 9-2&3, 101, 2002

(2) 特許出願

なし