

「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15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。以下にその概要を示す。

- 1) 精機能障害を示すヒト精巣で、特異的な精細管基底膜肥厚に関与する糖蛋白質は、progesterone (P) をトラップすることができ精細胞に存在するものとは異なること、P代謝を促す酵素活性の変化はLeydig cellの過形成とSertoli cell機能変化によること、代謝実験の結果 $\Delta 4$ 経路の代謝物が正常より多く作られさらに異なる代謝物が作られている可能性があることを示した。in vitroでのヒト精子形成維持実験系作成を試み、免疫不全動物体内に成熟したマウス及びヒト精巣移植片を生着させ、従来の培養系より長期に維持させることが可能になった。
- 2) 内分泌かく乱化学物質のヒト男性生殖機能への影響を評価する方法として、ヒトの精漿・精子・精巣のプロテオーム解析を導入し、妊婦配偶者の精漿より正常標準タンパク質スポットマップを作成するとともに、無精子症患者における精漿のスポッ

トマップとの比較から、患者での特異スポットを抽出した。

- 3) 植物エストロゲンである大豆イソフラボン摂取によって発現が変動する血液(白血球)中の遺伝子をディファレンシャルディスプレイ法で検索し、testican-3とcofilin isoformの2つの遺伝子に変動が認められた。これらの遺伝子は、若年男性ボランティアの白血球において、精子数と精子運動率がともに低下している群で発現が低下していたこと、および出生直後にDESを投与したマウスにおいて精巣中での発現が有意に低下したことなどから、精巣機能の低下にともなって変動する遺伝子であることが示唆された。
- 4) 17 β -エストラジオール (E2) 及びビスフェノールA (BPA)によってMCF-7細胞のゲノムDNAが損傷を受けることをコメットアッセイにより証明した。これらの化合物を添加した細胞では、ブルームヘリカーゼの発現が顕著に上昇し、細胞内のDNA損傷部位とブルームヘリカーゼの分布が一部で重なっていること、培養液からE2及びBPAを抜去すると損傷が修復されたことなどから、ブルームヘリカーゼがE2及びBPAにより生じたDNA損傷の修復に関与していることが示唆された。
- 5) Y染色体の遺伝的な背景の違いと精子数や男性表現型との関連を解析する目的で、長崎において収集された精子数が判明している300名の若年男性由来のDNAサンプルについて、Y染色体ハプログループ頻度を決定した。ハプロタイプIからIVはそれぞれ、36%、30%、11%および23%で、現在までに解析を行った他の地域と概ね同様な結果であった。
- 6) 生殖能力のある男性(妊婦配偶者)から得た精子の運動解析から、精子無力症などの不妊症患者の精子に見られるような回転しながら前進する精子や非対称な鞭毛運動をする精子など、さまざまな運動を示す精子が観察された。また、精子膜を界面活性剤で除去し、ATPを含む溶液中で運動を再開させると、カルシウムイオン濃度の高い状態では、非対称な鞭毛運動になるだけでなく、精子全体の回転運動が頻繁に見られ、鞭毛運動がより三次元的になることが観察された。これらの異常な精子運動は精子内のカルシウムイオン濃度と関連があることが示唆された。
- 7) 内分泌かく乱物質の造精機能への影響評価法のひとつとして、個々の精子の非特異的DNA損傷を簡易かつ定量的に検出する方法の確立を目指した。修正コメット電気泳動法によりヒト精子DNA 2重鎖断片化を観察した結果、断片化の程度によって、多様な泳動像が認められることが示された。

2. 研究実施内容

ヒト精子形成のメカニズムを探る

- 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とprogesteroneとの相互関係
【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に存在する糖タンパク質 (PNA-lectinに対して特異的な結合を示

す)の解析を行ってきた。また、肥厚した基底膜inner layerは、progesterone抗体に対して陽性であったことから、この糖タンパク質とprogesteroneの相互関係について検討する。

【方法】①造精機能障害を持つ精巣と造精機能の高い精巣からそれぞれほぐした精細管を切り出し、両端をポリアミド合成縫合糸で結び、精細管内を外液と隔絶する。FITC-progesterone-BSAまたは、FITC-BSAを含む外液中でincubationした後、洗浄し、物質の取込み状況を画像解析した。②造精機能が不良な精巣の未固定凍結切片を用いて、FITC-progesterone-BSAの結合性を確認する。その後、過剰なprogesteroneを含む溶液中、またはprogesteroneを含まない溶液でincubationし、洗浄後、肥厚した基底膜inner layerへのPNA-lectinの結合性を比較した。③造精機能障害を持つ精巣と造精機能の高い精巣において、精巣の基底膜以外の構造または細胞の糖タンパク質に対するPNA-lectinの結合性が、progesterone, BSAによって阻害されるか、細胞によってその性質が異なるかを検討した。

【結果と考察】①造精機能障害を持つ精巣の肥厚した基底膜は、FITC-BSAを取り込まず、FITC-progesterone-BSAを取り込んだ。造精機能の高い精巣を持つ精巣の基底膜は、FITC-BSA, FITC-progesterone-BSAの両方を取り込まなかった。結果より、肥厚した基底膜は、少なくとも精細管の外からprogesteroneを取り込み、トラップできることが明らかとなった。②造精機能が不良な精巣の未固定凍結切片においてFITC-progesterone-BSAは、生の精細管同様、肥厚した基底膜に対して結合能を示した。肥厚した基底膜にはPNA-lectinにより認識される糖蛋白が多く存在するが、progesteroneを過剰に結合させた基底膜では、PNA-lectinの染色性が阻害されることが明らかとなった。以上の結果は、肥厚した基底膜に存在する糖タンパク質にprogesteroneが結合している可能性を示唆している。③PNA-lectinは、生殖細胞に結合するが、その結合は、progesteroneや、BSAによって阻害されず、肥厚した基底膜への結合のみ阻害された。このことから、同じPNA-lectinにより認識される糖タンパク質でも、生殖細胞に存在するものと、肥厚した基底膜に存在するものでは、性質が異なることが示唆された。

2) ヒト精巣におけるprogesterone生成に関わる酵素量の変化の原因を探る

【目的】ヒト精巣で、アンドロゲン生成過程にprogesteroneを代謝物としてたくさん生成するためには、 3β HSDが豊富にあることが必要であり、昨年度までに造精機能不良な精巣で酵素活性に変化が起きていることを示した。この酵素量の調節が精巣のどの細胞由来なのかを明らかにする。

【方法】比較的正常な精子形成を示す精巣断片、無精子症または乏精子症の精巣生検の検体を材料とし、 β HSDに対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、画像解析を行った。

【結果と考察】抗体の染色結果から、間質では造精機能不良な精巣において、比較的正常な精子形成を示す精巣より β HSD生成が多いことがわかった。しかし、Leydig cellが造精機能不良な精巣において過形成されており、個々のLeydig cellの酵素生成能力におきか

えると差がなかったことから、造精機能不良な精巣において、 β HSDがたくさん生成される原因の一つは、Leydig cellの過形成のためであることが示唆された。また、 β HSD抗体陽性のSertoli cell数は、造精機能不良な精巣において、比較的正常な精子形成を示す精巣より多かった。Sertoli cellの数は、生後一定であるという報告があること、また、progesterone抗体陽性のSertoli cellでも β HSD抗体陽性のSertoli cell数と同様の傾向を示したことから、造精機能障害を示す精巣で β HSDがたくさん作られる原因の一つはSertoli cellの機能の変化であることが示唆された。

3) ヒト精子形成過程の異常と C_{21} ステロイドホルモンについて

【目的】精子形成過程に重要であると考えられるアンドロゲン生成について、昨年までに、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 17α -OHPの増加が見られたこと、アンドロゲン生成過程の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した。これらのことから、造精機能不良な精巣において、通常あまり使われないと考えられる $\Delta 4$ 経路を使用していることが考えられたので、tracer実験を行い、総ての代謝物の同定を行うことにより、代謝経路の確定を行う。

【方法】比較的正常な精子形成を示す精巣断片、無精子症または乏精子症の精巣生検の検体を材料とした。検体の一部は組織切片を作成し造精機能を判定した。残りの各々の検体について、 ^{14}C -pregnenoloneまたは、 ^{14}C -progesteroneを基質として、代謝実験を行った。代謝産物は、それぞれ数段階のTLC各種溶媒系の組み合わせにより分離し、標品の移動度から代謝物の推定を行った後、それぞれ、酸化、アセチル化、再結晶法を用いて同定を行った。各々の代謝物への転換率は、TLCをオートラジオグラムした後、放射活性のスポットをプレートからかきとり、抽出した後、一部を用いて放射活性のカウントを行い、確定した。

【結果と考察】代謝実験の結果、造精機能が不良な精巣は良好な精巣と比較して、 $\Delta 4$ 経路の代謝物であるprogesterone, 17α -OHPが代謝物として多く作られることを示した。しかし、progesteroneは $\Delta 4$ 経路経由ですぐにアンドロゲンの代謝経路にない別の代謝物に転換されている可能性が実験から示唆され、現在、その代謝物の同定を試みているところである。さらに、造精機能が不良な精巣において、 $\Delta 5$ 経路経由で転換されていると考えられる未同定の代謝産物が、造精機能が良好な精巣と比較して多く作られていることが示唆され、代謝実験において作られた残り総ての代謝物とともに同定を試みている。以上の結果は、造精機能不良な精巣において、 $\Delta 4$ 経路の代謝物が生成されること、造精機能が良好な精巣と異なる代謝物が作られていることを示唆している。

4) 免疫不全動物を用いたヒト精子形成維持系開発の試み

【目的】ヒト精巣組織移植による、in vitroでの精子形成維持系の開発を目的とする。また、この実験系を用いて今まで不可能であった、ヒト精巣を実際に用いた精子形成、造精機能障害を再現した実験を可能にする。

【方法】①Aly, Nude, Scid 3種の免疫不全マウスをhostとして精巣を除去した後、未熟

なマウス精巣の移植を行い、移植片を一定期間動物体内で保持した後、動物を処分し、ホルモンの測定、移植片の組織学的検討を行い、最適なhost動物を選択した。②移植片として、同種動物未熟精巣、成熟精巣、造精機能障害を示す停留精巣、ヒト成熟精巣について組織学的検討、hostの血中ホルモンの測定をEIAにて行った。

【結果と考察】①移植片の生着率及び精子形成はNude, Scidが良好な結果を示したので以降の実験へ使用した。②マウス成熟精巣を移植した結果、移植片生着率はNude58.33%、Scid77.83%を示し、精子形成はNudeは精原細胞まで、Scidは一部の移植片で残存精子や精母細胞が見られた。マウス停留精巣を移植した結果、移植片生着率はNude96.88%、Scid91.67%を示し、精子形成はNudeは精原細胞まで、Scidは一部が精母細胞まで分化した。精巣腫瘍患者の摘出精巣の正常部位をNudeに移植した結果80%が生着し、セルトリ細胞と精原細胞を持つ精細管構造を維持することを確認した。生着移植片は基底膜の肥厚などヒトの高度造精機能障害を示す精巣に特異的な特徴も示した。host血中ホルモン値をEIAで測定した結果、精子形成が不良な例は良好な例と比較し、Tが低く(停留精巣は高く)、LH, FSHが高かった。

以上の結果、成熟したマウス及びヒト精巣移植片は免疫不全動物に生着し、精細管構造を保ちセルトリ細胞と精原細胞を今までの培養系と比べ長期に維持できること、さらに精子形成能力を一部回復できることが明らかとなった。今後、正常な精子形成維持を可能にするため、内分泌環境の調整も含めhostの状態の改善を検討する予定である。

5) マウス精巣由来培養細胞株の確立とヒト精巣由来培養細胞株作成の試み

【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ことが重要である。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】①C57BL/6J 6wkのマウス精巣由来で著しい増殖能を持つ接着細胞集団から、2段階のサブクロニング後、形態、receptorの発現量、発現場所の比較、染色体分析、食能分析から細胞集団を絞り込み最終クロニングを行った。②teromerase 遺伝子を比較的増殖能のよいヒト精巣由来の初代培養細胞に導入し、細胞株を確立するため、EGFP遺伝子をマーカーとして遺伝子導入方法の検討を行った。

【結果と考察】①マウス精巣由来培養細胞株は最終的に2系統のクローン集団から77系統のクローンを得た。現在、各種receptorの発現量、染色体数などのチェックを行っている。②①で得たマウス精巣由来株と、ヒト精巣由来初代培養細胞にEGFP遺伝子を様々な方法で導入を試みたところ、マウス精巣由来株では、非ウイルス系のトランスフェクション法が有効であったが、ヒト精巣由来初代培養細胞では効率が著しく悪かった。今後、他の方法を検討したい。

ヒト精漿・精子および精巣についてのプロテオーム解析

【目的】内分泌かく乱物質のヒト男性生殖機能への影響を評価する方法を探索する一環として、プロテオミクスを導入する。

【方法と現在の進捗状況】まず第一に網羅的解析を行い、正常のヒト精漿・精子および精巣に存在するタンパク質をそれぞれ決定する。これらの情報を用いて将来的には抗体ライブラリーを作成し、プロテインチップに応用する事が期待できる。これは徳島大学分子酵素学研究所センター酵素分子生理学部門の谷口寿章教授との共同研究で行う。サンプルの前処理、結果の解析等は吉田が行い、質量分析については谷口教授が徳島大学分子酵素学研究所センターに既存の機材で行う。現在までに妊婦パートナー精漿10名分および精子無力症精漿10名分の解析が完了している。次に、精子での解析に取り掛かるべくサンプルの収集および処理法について検討している。第二に疾患との関連として当研究グループが保持している各種男性生殖機能障害のサンプルについて二次元電気泳動を用いたタンパク質スポットの解析を行い、男性生殖機能障害マーカーとなり得るタンパク質を検索する。注目すべきタンパク質スポットは質量分析によって同定する。こちらについては聖マリアンナ医科大学の既存の施設で吉田が中心になって行う。現在までに、妊婦パートナー精漿10名分の解析が完了し、正常標準タンパク質のスポットマップが示され、このうちの存在量の多いものから順次同定している。無精子症患者精漿10名分の解析が完了し、スポットマップが示された。

【結果】網羅的解析では、妊婦パートナーそれぞれの精漿中に平均約130のタンパク質を同定することができた。現在このリストの機能的グルーピングを行っている。また、妊婦パートナー10名分混合精漿と精子無力症10名分混合精漿での網羅的解析と同様なSDS-PAGEバンドからのLC/MS/MSでの解析も行い、存在量に大きく差のあるたんぱく質が同定された。男性生殖機能障害マーカーの探索では正常標準タンパク質のスポットマップより、10名分全員に検出されるスポット63を示した。これらのスポットを含め存在量の多いものから順次質量分析により同定を進めている。無精子症患者精漿10名分のスポットマップを作成し、正常標準たんぱく質との比較によりそれぞれの患者での特異スポットを抽出済みであり、これらについても順次質量分析により同定を進めている。

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

【目的】内分泌攪乱物質(環境ホルモン)への曝露は生殖器官の発達を変化させて性機能の障害を引き起こすのではないかという指摘がなされている。本研究は近年増加がみられる精巣腫瘍、停留精巣、尿道下裂および懸念される精子数の減少など雄性生殖機能の低下が、飲水、食物あるいは環境中に存在する内分泌攪乱化学物質への曝露によるものであるとする仮説を検討するものであり、今回は精巣機能への影響を遺伝子発現の変化を指標としてヒトおよびマウスを対象として検討した。

【方法】植物エストロゲンである大豆イソフラボン摂取によって発現が変動する血液(白血球)中遺伝子をディファレンシャルディスプレイ法で検索した。これにより変動が認め

られたtestican-3とcofilin isoformの2つの遺伝子についてヒトおよびマウスにおける白血球中でのmRNAの発現をリアルタイムPCR法により検討した。323人の健常若年成人ボランティアのうち精子濃度が $156.3 \times 10^6/\text{ml}$ 以上かつ運動率が50%以上の7人(High-quality-group)と精子濃度が $22.4 \times 10^6/\text{ml}$ 以下かつ運動率が50%以下の11人(Low-quality-group)について発現を調べた。さらにマウスを用いて①～④の精巣障害モデルを作製し同じく白血球中と一部精巣中における発現を調べた。

- ① Bisphenol A(BPA)200・g/mlを出生日より10日間母体経由(飲水)で投与し、120日齢時の血液を採取した。
- ② Diethylstilbestrol (DES) 3・g/rat/dayを出生日より5日間皮下に投与し、120日齢時の血液と精巣を採取した。
- ③ 2ヶ月齢で両側精巣に停留精巣術を施行し、施術60日後に血液を採取した。
- ④ 2ヶ月齢で両側精巣部位に1.0GyのX線照射をおこない、照射60日後に血液を採取した。

【結果と考察】健常若年成人のLow-quality-groupではHigh-quality-groupに比べcofilin isoformとtestican-3 mRNAの発現がともに有意に低下し、精子数と精子運動率がともに大きく低下している群では白血球中のcofilin isoformとtestican-3のどくにtestican-3の遺伝子発現が低下していることが示された。BPA200・g/mlを胎児期と授乳期に母体経由で曝露されたマウスでは対照に比べcofilin isoformとtestican-3 mRNAの発現がともに有意に低下した。DESを出生直後の5日間投与されたマウスでは対照に比べcofilin isoform mRNAの発現が有意に低下したがtestican-3 mRNAの発現は低下したものの有意な変化ではなかった。停留精巣術を施行されたマウスのcofilin isoformとtestican-3 mRNAの発現はともに対照と差はなかった。1.0GyのX線を精巣に照射されたマウスのcofilin isoformとtestican-3 mRNAの発現はともに対照と差はなかった。DESを出生直後の5日間投与されたマウスでは対照に比べ精巣のcofilin isoform mRNAの発現とtestican-3 mRNAの発現がともに有意に低下し、DESの新生児期投与により白血球中と同様に精巣でもcofilin isoformの遺伝子発現が低下していることが示された。本研究において内分泌攪乱物質曝露により血液および精巣において発現が変化する遺伝子を見出した。またこれらは精巣機能低下にもなって変動することが示唆された。今後、これら遺伝子の発現変化が内分泌攪乱物質曝露による精巣機能異常を反映するものであるか、さらに脳、性腺付属器官および雌性腺での発現変化を明らかにしていきたい。また、これら遺伝子の血液における発現が内分泌攪乱のバイオマーカーとなるかを検討したい。

内分泌かく乱物質が与えるゲノムDNAへの損傷及びタンパク動態の解析

【目的】内分泌かく乱物質が与えるゲノムDNAへの損傷及びタンパク動態の解析

【方法】①単一細胞電気泳動法(コメットアッセイ):コメットアッセイは、軽微なDNA損傷を高感度に検出できる手法である。この手法を用いて 17β -エストラジオール(E2)及びビスフェノールA(BPA)のゲノムDNAに対する傷害性を検討した。MCF-7細胞の培養系へE2及びBPAを添加し、一定時間培養した後、トリプシン処理ではがした細胞を1%アガロース

ゲルと混合し、スライドガラス上で固めた。溶解液で処理することによって核を露出させ、アルカリ性条件下で電気泳動後（4℃、20V、20分）、サイバーグリーンで核を染色し、常法に従いDNA損傷の指標となるTail length（細胞の全長から核の直径を除いた距離）を計測した。②抗ブルームヘリカーゼ抗体及び抗H2AX抗体を用いた細胞の二重染色:MCF-7細胞をE2 10^{-10} M、BPA 10^{-5} Mを添加24時間後に抗ブルームヘリカーゼ抗体及び抗H2AX抗体を用いて細胞内のブルームヘリカーゼタンパク及びDNA二重鎖切断部位の染色を行った。

【結果】E2及びBPAの添加によって、濃度依存的にTail lengthの長い細胞数が増加し、E2及びBPAがMCF-7細胞のDNAに損傷を与えることが示された（図1）。次に抗ブルームヘリカーゼ抗体を用いてブルームヘリカーゼ（緑）を、並びに抗H2AX抗体を用いて二重鎖切断部位（赤）の細胞内分布を調べた。この結果、E2及びBPA処理により顕著にブルームヘリカーゼタンパクの発現は上昇し、またDNA損傷によるDNA二重鎖切断部位が増加していることがわかった。ブルームヘリカーゼタンパクは核質全体に発現していたが、DNA二重鎖切断部位とも一部重なっていた（図2）。また、E2及びBPAで24時間処理したMCF-7細胞の培養液を、化合物不含の培養液に替え、さらに24時間培養を行った後にコメットアッセイを行うと、Tail lengthはほぼコントロールレベルにまで回復し（図3）、損傷部位の修復が行われたことが示唆された。

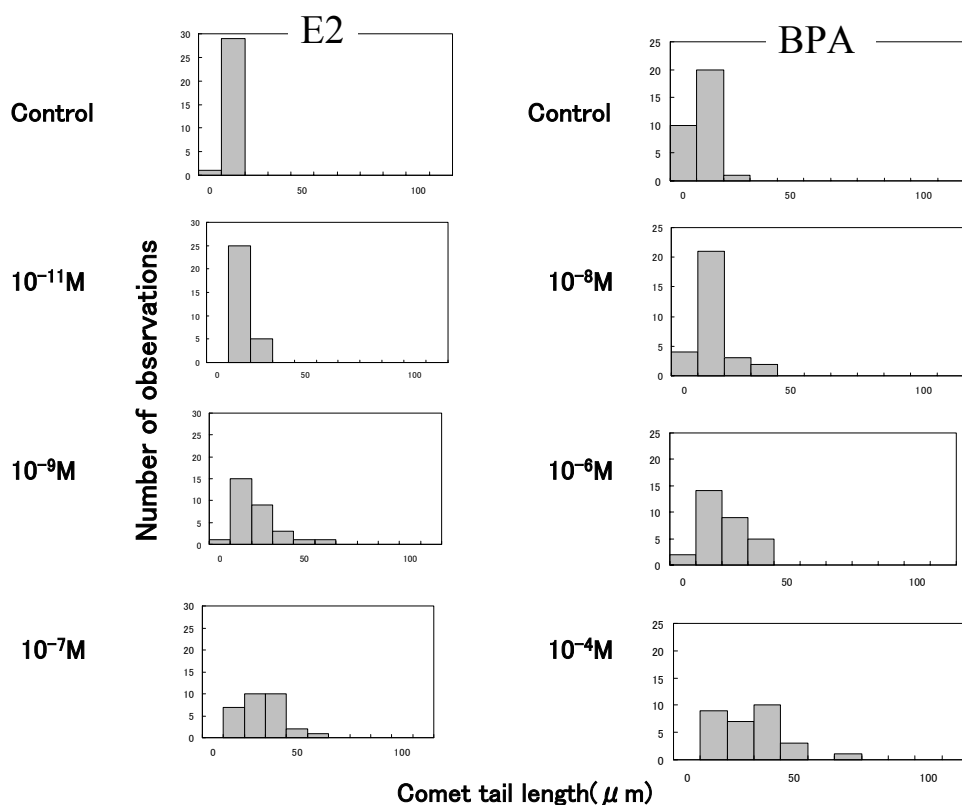


図1. E2及びBPAによるDNA損傷 E2 10^{-11} ~ 10^{-7} M及びBPA 10^{-8} ~ 10^{-4} Mを添加後3時間でコメットアッセイを行った。1回の実験で30細胞についてTail Lengthの計測を行い、同様な実験を3回繰り返して、再現性を確認した。

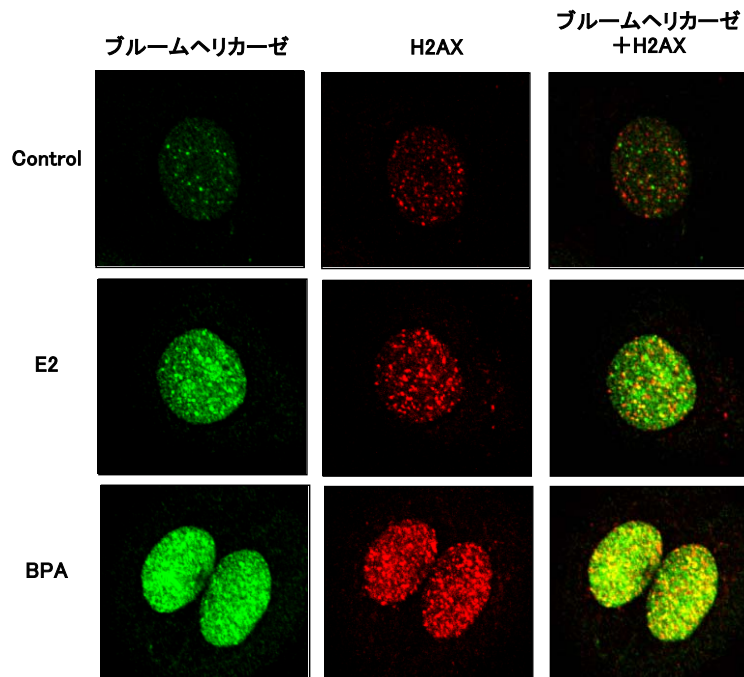


図2. ブルームヘリカーゼ及びDNA損傷部位の細胞内分布 抗ブルームヘリカーゼ抗体 (緑) 及び抗H2AX抗体 (赤) による二重染色像

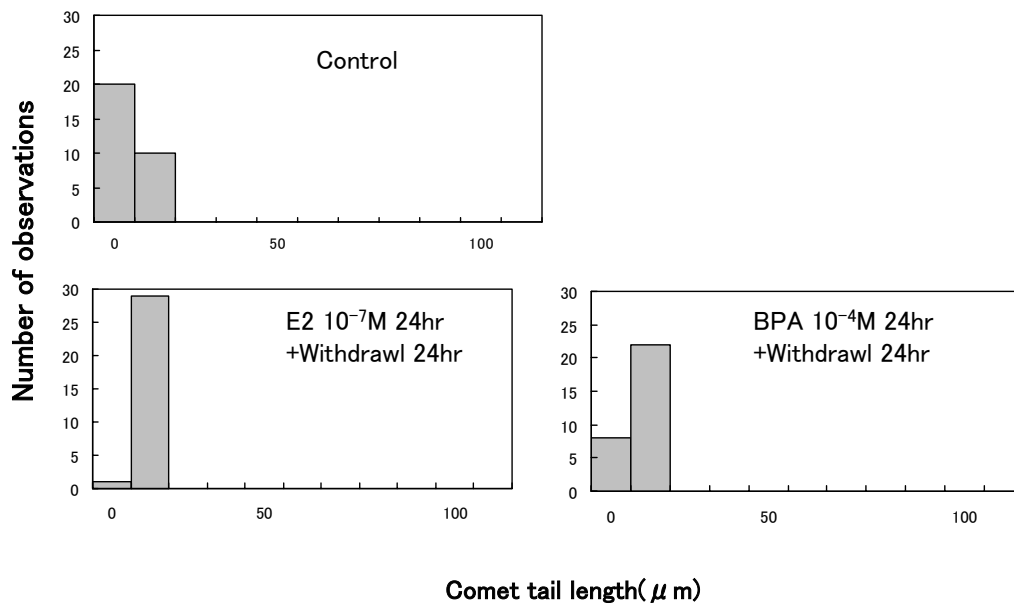


図3. E2及びBPAによるDNA損傷の回復 MCF-7細胞をE2 10⁻⁷M及びBPA10⁻⁴M存在下に24時間培養した。次に、化合物抜去の培養液中で更に24時間培養した後、コメットアッセイを行った。

【考察】E2及びBPAによってMCF-7細胞のゲノムDNAが損傷を受けることをコメットアッセイにより証明した。前年度までの検討で、これらの化合物を添加した細胞では、DNAの修復に関わるRecQヘリカーゼファミリーのひとつであるブルームヘリカーゼの発現が顕著に

上昇することを見出している。細胞内のDNA損傷部位とブルームヘリカーゼの分布は一部で重なっており、培養液からE2及びBPAを抜去すると損傷が修復されたことなどを考え合わせると、ブルームヘリカーゼがE2及びBPAにより生じたDNA損傷の修復に関与していることが推察される。

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染色体ハプログループと精子数との関連

Y染色体の遺伝的な背景の違いと精子数や男性表現型との関連を解析する。

2) Y染色体長腕上の無精子症候補領域AZFbに存在する遺伝子HSFYの機能解析

HSFYの精子形成過程における役割、男性表現型に及ぼす影響について解析する。

【方法と結果】

1) 長崎において収集された精子数が判明している300名の若年男性由来のDNAサンプルについて、Y染色体ハプログループ頻度を決定した。ハプログループの決定はY染色体コンソールシウム (YCC) 分類に沿って行った。本研究ではY染色体上の10種類のDNAマーカー (YAP、12f2、M213、M9、LLY22g、M122、SRY465、M95、47z、M134) を用いて解析を行った。その結果Y染色体ハプログループ頻度は表1のようであった。旧ハプロタイプ分類ではハプロタイプIからIVはそれぞれ、36%、30%、11%および23%であり、現在まで我々が解析を行った日本の他の地域と概ね同様な結果であった。

表1. 長崎地区におけるY染色体ハプログループ頻度

Final Haplogroups	Numbers	Percentage (%)
A+B	0	0
C	26	8.67
D2	56	18.67
D(xD2)+E	34	11.33
F(xK)	1	0.33
N	4	1.33
O2a	3	1.00
O2b1	70	23.33
O2b*	32	10.67
O3(xO3e)	33	11.00
O3e	39	13.00
K(xN,O2a,O2b,O3)	2	0.67
Total	300	100.00

2) HSFYの機能を解析するためにHSFYをbaitとして、酵母ツーハイブリッド法によってヒト胎児脳及び成人精巣に由来するcDNAを用いてHSFYと相互作用するタンパク質のスクリー

ニングを行った。得られたクローンにはfocal adhesionの形成に関わる分子や核内タンパク質分子をコードするものが含まれていた。現在、これらの分子とHSFYの関わりについて解析中である。

【考察】

1) Y染色体のタイプと精子数との関連

今回解析した長崎地区における男性のY染色体ハプログループ頻度は、他の地区における解析結果と含めて、Y染色体の遺伝的背景の違いと精子数や男性表現型との関連を解析するための基礎となる。今後データクリーニング後に相関解析を行う。

2) Y染色体長腕上の無精子症候補領域AZFbに存在する遺伝子HSFYの機能解析

HSFY遺伝子はHSF遺伝子ファミリー遺伝子の一部類似した構造をもっているが、その機能が異なっていることが予想された。

精子の形態や運動性に対する内分泌かく乱物質の影響

1) 妊婦配偶者精子の運動解析

妊婦配偶者から得た精液でも、回転しながら前進する精子のほか、非対称な鞭毛運動をする精子など、患者の精液で頻繁に見られたようなさまざまな運動を示す精子が見られた。さらに、運動する精子の割合は約半分で、これまでの世界保健機関の報告と比べても、良い精子の割合が減少していることが示唆された。前進速度についても、患者の精子に比べると平均値が比較的高いが、遅いものからかなり速いものまでさまざまであった。

2) 精子の生化学的特性

精子膜を界面活性剤で除去し、ATPを含む溶液中で運動を再開させると、溶液の組成に応じて精子の鞭毛運動が変わる。カルシウムイオン濃度の高い状態では、非対称な鞭毛運動になるだけでなく、精子全体の回転運動が頻繁に見られ、鞭毛運動がより三次元的になることが観察された。これらの運動は、精子無力症等の不妊患者の精子でよく見られる運動で、不良な精子運動と精子内のカルシウムイオン濃度の関係が示唆された。この高いカルシウムイオン濃度下で精子運動はかなり三次元的になり、さらに左右の屈曲が非対称になるだけでなく、左右の屈曲を作る際に三次元的な特性が変化して繊毛運動に似た形で運動することが明らかになった。また、この高いカルシウムイオン濃度は、精子が卵に入るための受精能獲得初期に見られる比較的三次元的な運動にも関与していると考えられることから、細胞内のカルシウムイオンの重要性が明らかになった。

DNAのdouble strand break、single strand break分別定量法の開発

1) ヒト精子DNAのdouble strand breakの観察

【目的】内分泌攪乱物質の造精機能への影響を検討する一端として、射精精液中の精子濃度、運動率などが、量的な指標として検討されてきた。本研究は、精子の質的指標として染色体損傷を観察することを目的とする。

精子染色体の評価に際しては、染色体（核型）、遺伝子、DNA構造の各レベルにおける

詳細な研究が必要とされる。われわれは、個々の精子の非特異的DNA損傷を簡易かつ定量的に検出する方法の確立がまず必要であると考えた。DNA損傷の様式は多様であり、DNA2重鎖のdouble strand break (DSB)、single strand break (SSB) 分別定量法の開発を行った。

開発した修正コメット電気泳動法によりヒト精子DNA 2重鎖断片化 (DSB) を観察した結果、泳動像は極めて多様であることを認めた。そこで断片化様式の分類を試みるとともにアポトーシスの関与を検討した。

【方法】精製リンパ球をDNA損傷陰性対照として用いた。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密度勾配遠心分離法、swim up法により運動精子を精製した。精液および精製細胞 (リンパ球、精子) は0.7%アガロース、0.7%シーナゲル混合物に懸濁して表面処理スライドガラス上に薄膜を形成し、さらに保護層を層積した。ゲル中の細胞は2.0M NaCl加融解液 (0.2%ラウリルサルコシルNa、0.2%Triton X-100、5.0mM EDTA、20mM アスコルビン酸、20mM DTT、0.1 M Tris-HCl、pH8.0)、次いで60mg/ml 精製トリプシン加融解液中で処理した。DNAの酸化を防ぐため、Tris-アスコルビン酸-EDTA泳動緩衝液中で新たに開発したsingle cell pulse field electrophoresis (SCPFE)を用いて2.0V/cm電位勾配 (電極位相差90度、switching time 3秒間) で10分間電気泳動後、Syber GoldでDNA染色してDSBによるDNA断片化像を蛍光観察した。リンパ球は2.0mg/mlアクチノマイシンD存在下に24時間培養し、化学的にアポトーシスを誘導した。

【結果】精製細胞はほとんどが原点からファイバー状DNAが伸展する泳動像を示したが (図4)、精液では多様な泳動像が観察された。1.断片化が最も軽度なものでは、原点から伸展する連続したファイバー状DNAの先に数本の分離した長いDNAファイバー、2.ファイバー状DNAの先に1ないし2群の粒子状の短鎖DNA、3.原点から直接短鎖DNAが長く伸びたもの、4.最も断片化が進行したものでは原点部分が消失し、泳動度が速い断片のみ、などに分類された (図5)。化学的にアポトーシスを誘導したリンパ球では精子における3.に相

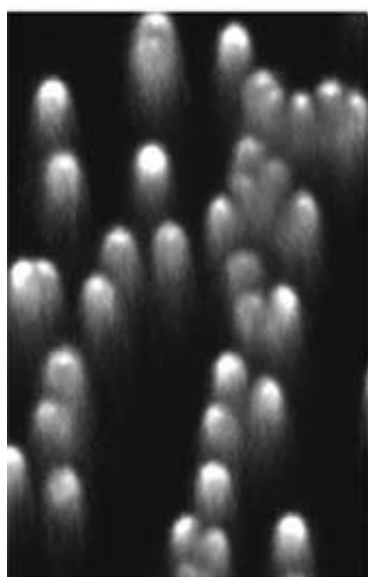


図4. 精製リンパ球の修正コメット電気泳動像

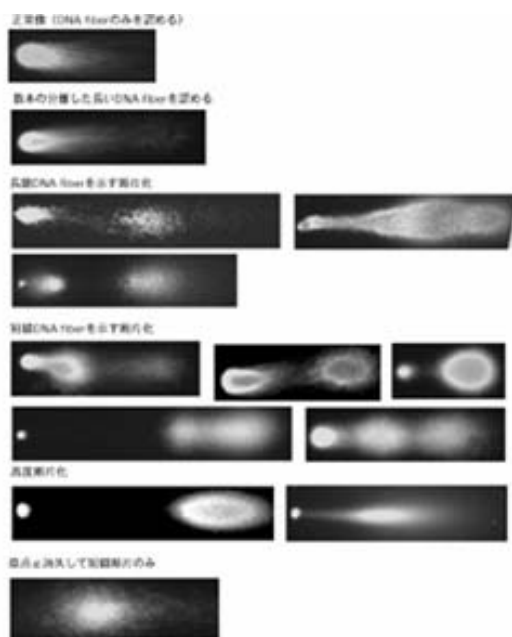


図5. 精液における修正コメット電気泳動によって観察された精子DNA断片化の多様性

当する泳動像が大部分であった(図6)。

【考察】ヒト精子DNAにおけるDSBを修正コメット電気泳動法で観察した結果、個々の精子における断片化の程度は多様であった。すでに精子核断片化へのアポトーシスの関与が報告されているが、本研究において化学誘導アポトーシスの泳動像と必ずしも一致せず、さらに詳細な検討を要する。

2) ヒト精子DNAのsingle strand breakの観察

【目的】項目1でヒト精子DNAのDSB定量法を開発した。さらにDNA fiber中に存在するSSB定量法の開発を試みた。

【方法】項目1で開発したSCPFEを用いる修正コメット電気泳動条件を変化させてDNA fiberを超伸展させ、ゲル中でTdT反応によるDNA断端のラベルを行い、DNA fiber中のSSBの検出を試みた。

【結果】図7に個々の精子のDNA超伸展像(Syber Gold染色像)を示した。各染色糸が伸展、展開しているのが観察される。現在、ゲル内TdT反応の至適条件を検討している。

【考察】本法は、DNAのSSB観察用に開発しているが、今後、超伸展DNA fiberを用いたin situ hybridizationへの展開が考えられ、詳細に条件検討を行いたい。

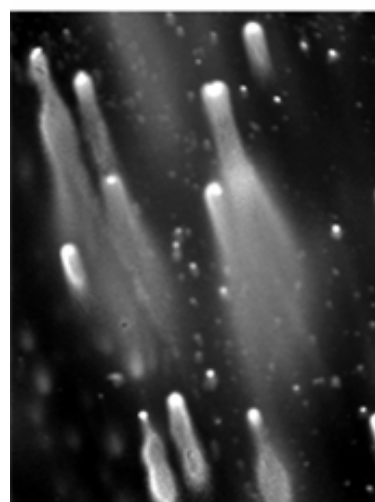


図6. 化学的にアポトーシスを誘導したリンパ球の修正コメット電気泳動像

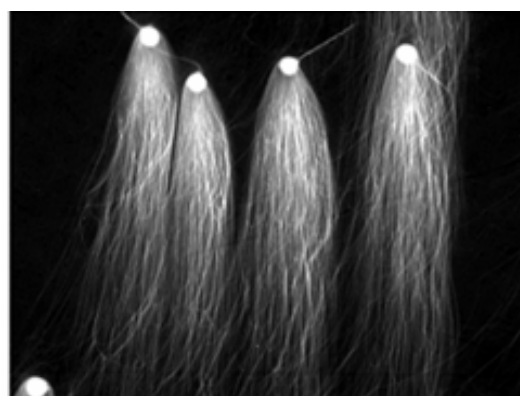


図7. Syber Gold染色による個々の精子のDNA超伸展像

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：ヒト精子形成のメカニズムを探る／ヒト精漿・精子および精巣についてのプロテオーム解析／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

古市グループ

- ① 研究分担グループ長：古市 泰宏（㈱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ゲノム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性の差異に対する研究

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、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：DNAのdouble strand break、single strand break分別定量法の開発

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

- Nielsen JE, Hansen MA, Jørgensen M, Tanaka M, Almstrup K, Skakkebak NE, Leffers H. :Germ cell differentiation-dependent and stage-specific expression of LANCL1 in rodent testis. *European Journal of Histochemistry* 47 (3) 215-222, 2003
- Almstrup K, Nielsen JE, Hansen MA, Tanaka M, Skakkebak NE, Leffers H. : Analysis of cell-type-specific gene expression during mouse spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 70 (6) 1751-1761, 2004
- Jabasini M, Xu F, Dang F, Shinka T, Nakahori Y, Baba Y: Range of separation of potential tool for bioseparation, Microchip electrophoresis system, for DNA polymorphisms on the Y chromosome. *Analytical Sciences*.19: 175-6, 2003.
- Han Jun Jin, Kyoung, Don Kwak, Michael F Hammer, Yutaka Nakahori, Toshikatsu Shinka, Ju Won Lee, Feng Jin, Xuming Jia, Chris Tyler Smith Wook Kim : Y-chromosomal DNA haplogroups and their implications for the dual origins of the Koreans. *Hum Genet*.114: 27-35, 2003
- Xin-Jun Yang, Hong-Tao Yan, Yutaka Nakahori: Evaluation of the effectiveness of laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy for myopia: A meta-analysis. *J. Med. Invest.*, 50:180-187, 2003
- Gang Chen, Toshikatsu Shinka, Keigo Kinoshita, Hong-Tao Yan, Teruaki Iwamoto, and Yutaka Nakahori: Roles of estrogen receptor α (ER α) in the regulation of the human Mullerian inhibitory substance (MIS) promoter. *J. Med. Invest.* 50: 192-198, 2003.
- Shinka T, Sato Y, Chen G, Naroda T, Kinoshita K, Unemi Y, Tsuji K, Toida K, Iwamoto T, Nakahori Y. : Molecular Characterization of Heat Shock-like Factor Encoded on the Human Y Chromosome, and Implications for Male Infertility. *Biol Reprod.* 2004 Mar 24 Epub ahead
- Yoshida K, Sato Y, Yoshiike M, Nozawa S, Ariga H & Iwamoto T. Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue.

Mol Reprod Dev. 2003 Dec;66(4): 391-7 PMID: 14579415

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件