

平成21年6月3日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590128
 研究課題名（和文） アリル炭化水素受容体のアゴニストが精子産生機能に及ぼす影響の
 in vivo 解析
 研究課題名（英文） In vivo analysis of the effect of AhR agonists on spermatogenesis

研究代表者
 木津 良一（KIZU RYOICHI）
 同志社女子大学・薬学部・教授
 研究者番号：80143915

研究成果の概要：

3-methylcholanthrene (3MC) などのアリル炭化水素受容体を活性化する化合物（アゴニスト）がマウスの精子産生機能に影響を及ぼすか、研究を行った。その結果、3MC によるマウスの精子産生機能障害は観察されなかったが、培養細胞において 3MC による遺伝子転写の活性化を男性ホルモン 5 α -dihydrotestosterone (DHT) が抑制することを明らかにした。以上の結果から、本研究条件下、DHT は 3MC の作用に対し防御的に働く可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：内分泌攪乱物質、ダイオキシン類、AhR、男性ホルモン、精子産生

1. 研究開始当初の背景

外因性の化学物質でヒトや動物の内分泌機能に影響を与える内分泌攪乱化学物質が重要な環境問題になっている。ごく最近、血液 - 精巣関門が精子産生のある段階で一時的に消失することが明らかになり、外因性化合物が雄性生殖機能に及ぼす影響を分子レベルで解明することが益々重要になった。ダイオキシンや多環芳香族炭化水素 (PAH) などのアリル炭化水素受容体 (AhR) アゴニストによる内分泌攪乱作用が注目される中、従来の研究のほとんどは女性ホルモンに関するものであり、男性ホルモンの作用に及ぼす

研究はほとんどなかったが、我々は、培養細胞において AhR アゴニストが男性ホルモン依存性遺伝子の転写活性化を阻害する（抗男性ホルモン作用）ことを世界に先駆けて見出した。AhR と男性ホルモン受容体 (AR) はいずれもリガンド依存性転写制御因子であり、AhR は PAH が、AR には DHT が結合すると活性化され、標的遺伝子の上流にあるシスエレメント (AhR は XRE、AR は ARE) に特異的に結合することにより下流の遺伝子の発現を制御する。AhR アゴニストの抗男性ホルモン作用には AhR と AR のシグナル伝達経路間クロストークの関与が示唆されているが、

雄性生殖機能に及ぼす影響とその作用機構を *in vivo* で評価・解析する研究はいまだ行われていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、生きたマウスの精巣の精細管内に試験化合物を直接マイクロインジェクションした後に精子数を計測し、外因性化合物の精子産性機能に及ぼす影響を評価する *in vivo* アッセイ法を開発した。このアッセイ法では、精子数の計測はセルトリ細胞と精子細胞を顕微鏡下において観察して行うので、試験化合物が細胞毒性を示す場合は測定時に検知できる。そこで我々は、*in vitro* で抗男性ホルモン作用を示した AhR アゴニスト (3-methylcholanthrene; 3MC) が *in vivo* で精子産生機能阻害作用を示すか否か、示すとすれば AhR と AR のシグナル伝達経路間クロストークが関与するかなど、AhR の作用機構を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 試験化合物

本研究では、PAH として 3MC を、男性ホルモンとして 5 α -dihydrotestosterone (DHT) を、抗男性ホルモンとして vinclozolin を使用した。

(2) 精子産生機能の測定

試験化合物をマウス精巣の精細管内に直接注入し、3、4 または 5 週間処置した後、顕微鏡を用いて精子細胞とセルトリ細胞を観察し、精子数を計測した。試験化合物をマウス精細管内に注入する前に、抗がん剤ブスルファンを腹腔内投与し 8 週間処置した。

(3) 免疫組織染色

精巣の摘出、エタノール固定、パラフィン包埋を経て作製した組織切片を、抗マウス CYP1A1 抗体及び Alexa Fluor555 蛍光標識抗マウス IgG 抗体を用いて免疫染色を行った。

(4) Real-time PCR

ヒト前立腺がん由来培養細胞 LNCaP から cDNA を調製し、シトクロム P450 (CYP) 1A1、CYP1A2 遺伝子または内部標準 RPLP0 遺伝子に特異的なプライマーを用いて real-time PCR を行った。

(5) レポーターアッセイ

LNCaP 細胞にホタルルシフェラーゼ発現プラスミド pGL3-XRE \times 3 及びウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド pRL-SV40 を Lipofectamine を用いて導入し、デュアルルシフェラーゼ・レポーターアッセイを行った。

(6) 共免疫沈降法

LNCaP 細胞から抽出した核抽出液について、プロテイン G 結合セファロースビーズ及

び抗ヒト AhR 抗体を用いて免疫沈降を行った。得られた沈降物について、抗ヒト AR 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

本研究によって得られた結果は以下の通りである。

(1) PAH の精子産生機能に及ぼす影響

In vitro で AhR に作用し抗男性ホルモン作用を示す化合物 (3MC) が *in vivo* において精子産生機能を阻害するか否か、野生型雄性 ddY マウスを用いて検討した。その結果、3MC を 3、4 または 5 週間処置したいずれのマウスにおいても、対照群のマウスと同程度の精子産生機能が観察された。また、精細管内のセルトリ細胞および精子細胞における CYP1A1 タンパク質発現を組織免疫染色によって検討したところ、3MC を処置したマウスと対照群のマウスのいずれにおいても、同程度の CYP1A1 タンパク質の発現が観察された。以上の結果から、本研究の投与条件において 3MC は精子産生機能を阻害せず、CYP1A1 タンパク質の発現を誘導しないことが示唆された。

また、3MC と同様に抗男性ホルモン vinclozolin をマウスに投与し、精子産生機能障害を起こすか検討したところ、vinclozolin を処置したマウスではいずれの処置日数においても、対照群に比べ著名な精子産生阻害が観察された。

(2) PAH による精子産生機能障害における AhR の必要性

野生型マウス及び AhR ノックアウトマウスにおいて、3MC の精子産生機能に対する影響を検討したところ、野生型マウス及び AhR ノックアウトマウスのいずれにおいても、同程度の精子産生機能を示した。また、精細管内のセルトリ細胞および精子細胞における CYP1A1 タンパク質発現を組織免疫染色によって検討したところ、野生型マウス及び AhR ノックアウトマウスのいずれにおいても、対照群と 3MC 処置群の CYP1A1 タンパク質の発現は同程度であった。以上の結果から、本研究の投与条件では、3MC は精子産生機能阻害及び CYP1A1 タンパク質発現の誘導を示さないことが示唆され、3MC による精子産生機能障害に AhR が関与しているか否かは明らかにならなかった。

(3) PAH による精子産生機能障害における AhR と AR のシグナル伝達経路間クロストークの役割

① 3MC により活性化された遺伝子発現に対する DHT の効果

代表的な AhR 標的遺伝子に薬物代謝酵素である CYP1A1 や CYP1A2 がある。3MC に

よって誘導されるこれら遺伝子の発現が DHT による影響を受けるか否かを検討するため、LNCaP 細胞を 3MC で単独、または 3MC と DHT で共処置し、CYP1A1 または CYP1A2 mRNA について real-time PCR を行った。その結果、3MC 処置により CYP1A1 および CYP1A2 mRNA 発現の誘導が観察され、この誘導は DHT との共処置により有意に減弱した。

また、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に AhR 結合 DNA 配列 XRE を挿入した 3MC 応答ルシフェラーゼ発現プラスミド pGL3-XRE×3 を LNCaP 細胞に導入し、3MC によって誘導されるルシフェラーゼ活性に対する DHT の影響をレポーターアッセイにより検討した。その結果、3MC によってルシフェラーゼ活性の上昇が観察され、この上昇は DHT との共処置によって減弱された。以上の結果から、3MC によって活性化された遺伝子の転写を DHT が抑制することが示唆された。

② DHT の抑制効果における AR の必要性

DHT は AR のアゴニストであることから、DHT による抑制効果に AR が関与している可能性が考えられる。そこで、siRNA による AR のノックダウンが DHT の抑制効果に及ぼす影響について検討した。その結果、siRNA を処置し十分な AR タンパク質のノックダウンが観察された LNCaP 細胞において、3MC 処置により CYP1A1 mRNA 発現の誘導が観察された。また、この誘導は DHT の共処置によって減弱されなかった。以上の結果から、DHT の抑制効果に AR が重要な役割を果たすことが示唆された。

③ AhR と AR の複合体形成

DHT による抑制効果に AhR と AR の複合体形成が関与しているか否かを検討するため、LNCaP 細胞の核抽出液について抗 AhR 抗体を用いた免疫沈降を行った。その結果、3MC 単独、または 3MC と DHT を共処置した細胞の核抽出液から抗 AhR 抗体を用いて分取した免疫沈降物中に AR が検出され、その検出された AR 量は、3MC 単独処置の細胞に比べ 3MC と DHT を共処置した細胞の方がより大きかった。以上の結果から、3MC 処置により AhR と AR の複合体が形成されるが、DHT との共処置によってさらに複合体形成が促進されることが示唆された。

以上の結果から、本研究の条件 (PAH や飼育日数など) では、3MC は精子産生機能障害を示さないことが明らかになった。そのため研究当初に計画していた gene tip 法は行わなかった。3MC が精子産生機能障害を発現しない原因として、DHT が 3MC によって誘導された CYP1A1 や CYP1A2 遺伝子の発現を抑制することから、DHT が AhR シグナル伝達経

路を抑制していることが考えられる。この DHT による抑制作用において、AhR と AR の複合体形成が重要な役割を果たしていることは、今までにない新しい知見である。しかしながら、組織免疫染色により 3MC が CYP1A1 タンパク質の発現を誘導しないことが示されたことから、本研究の投与条件では、マウスに投与した 3MC が AhR を活性化していない可能性も考えられる。近年、ヒトの精子産生機能障害や精子の質の低下が提唱されているなど、環境汚染物質による精子産生機能障害の可能性はまだ十分に考えられることから、実験の条件を再検討し、再度、環境汚染物質による精子産生機能障害を検証する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① 木津良一、嶋澤るみ子、男性ホルモンの作用を阻害するダイオキシン類の作用機序、同志社女子大学総合文化研究所紀要、印刷中、査読無
- ② Noriko Sanada, Yuka Gotoh, Rumiko Shimazawa, Carolyn Klinge, Ryoichi Kizu, Repression of activated aryl hydrocarbon receptor-induced transcriptional activation by 5 α -dihydrotestosterone in human prostate cancer LNCaP and human breast cancer T47D cells, Journal of pharmacological sciences, 380, 2009, 380-387, 査読有
- ③ Sang Woon Chung, Akira Toriba, Hae Young Chung, Byung Pal Yu, Takayuki Kameda, Ning Tang, Ryoichi Kizu, Kazuichi Hayakawa, Activation of 5-lipoxygenase and NF- κ B in the activation of acenaphthenequinone by modulation of oxidative stress, Toxicological sciences, 101, 2008, 152-158, 査読有
- ④ Keiko Noguchi, Akira Toriba, Sang Woon Chung, Ryoichi Kizu, Kazuichi Hayakawa, Identification of estrogenic/anti-estrogenic compounds in diesel exhaust particulate extract, Biomedical chromatography, 21, 2007, 1135-1142, 査読有
- ⑤ Wasana K. Sumanasekera, Margarita M. Ivanova, Benjamin J. Johnston, Susan M. Dougherty, Gamini U. Sumanasekera, Steven R. Myers, Yeakub Ali, Ryoichi Kizu, Carolyn M. Klinge, 174, 2007, 61-73, 査読有
- ⑥ Sang Woon Chung, Hae Young Chung, Akira Toriba, Takayuki Kameda, Ning Tang, Ryoichi Kizu, Kazuichi Hayakawa, An

environmental quinoid polycyclic aromatic hydrocarbon, acenaphthenequinone, modulates cyclooxygenase-2 expression through reactive oxygen species generation and nuclear factor kappa B activation in A549 cells, Toxicological sciences, 95, 2007, 348-355, 査読有

- ⑦ Kaz Nagaosa, Atsushi Kishimoto, Ryoichi Kizu, Akihisa Nakagawa, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi, Perturbation of spermatogenesis by androgen antagonists directly injected into seminiferous tubules of liver mice, 133, 2007, 21-27, 査読有

〔学会発表〕（計4件）

- ① 後藤由佳, アリル炭化水素受容体アゴニストによる男性ホルモン依存性遺伝子の転写活性化, 日本薬学会第129年会, 2009年3月26日, 国立京都国際会館(京都市)
- ② 後藤由佳, Transcriptional activation of androgen-regulated genes by aryl hydrocarbon receptor agonist in androgen-responsive cell lines, Society of toxicology 2009, 2009年3月16日, Convention center (Baltimore, USA)
- ③ 眞田法子, アンドロゲンによるアリル炭化水素受容体シグナルの抑制作用に関する研究, フォーラム 2008年10月18日, 熊本市民会館(熊本市)
- ④ 眞田法子, アリル炭化水素受容体依存性転写活性化に対する男性ホルモンの抑制効果, 日本薬学会第128年会, 2008年3月27日, パシフィコ横浜(横浜市)

〔図書〕（計2件）

- ① 薬学教育研究会, CBT 対策と演習 衛生薬学 II, 廣川書店, 2009年, 3-47
- ② 武田健, 環境, 環境, 化学同人, 2008年, 133-279

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木津 良一 (KIZU RYOICHI)
同志社女子大学・薬学部・教授
研究者番号: 80143915

(2) 研究分担者

眞田 法子 (SANADA NORIKO)
同志社女子大学・薬学部・助手
研究者番号: 60411089

後藤由佳 (GOTOH YUKA)
同志社女子大学・薬学部・助手
研究者番号: 90509259