

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590140

研究課題名（和文） アリル炭化水素受容体を介した精子産生機能障害の in vivo 機構解析

研究課題名（英文） The inhibitory effect of aryl hydrocarbon receptor on spermatogenesis in vivo

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（和文）：In vivo でマウス精子産生機能を障害する環境汚染物質の作用機構の解明を目的とし、本研究を行った。その結果、高いアリル炭化水素受容体（AhR）アゴニスト活性を示した benzo [a] pyrene (BaP) は弱いながらも精子産生機能を阻害した。また、この BaP による精子産生機能障害は AhR アンタゴニストによって減弱した。以上の結果から、BaP による精子産生機能障害に AhR が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism for the inhibitory effect of AhR agonist (BaP) on spermatogenesis in vivo. BaP showed high AhR agonist activity and weak inhibitory effect on spermatogenesis in vivo analysis. The inhibitory effect of BaP on spermatogenesis was abolished by co-treatment with an AhR antagonist,  $\alpha$ -naphthoflavone. These results suggest that AhR is involved in the inhibition of spermatogenesis by BaP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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、アリル炭化水素受容体、多環芳香族炭化水素、精子産生機能

## 1. 研究開始当初の背景

外因性の化学物質がヒトや動物の内分泌機能に障害を与える内分泌攪乱作用は重要な環境問題である。従来から環境化学物質が男性ホルモン受容体（AR）のアンタゴニストとして作用すること、AR アンタゴニストのあるものは精子産生能を低下させることが明らかになってきた。更にごく最近、幾つかの AR アンタゴニストが世代を超えて子

孫にまで雄性不妊を引き起こすこと、血液 - 精巣関門が精子産生のある段階では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、アリル炭化水素受容体（AhR）アゴニストの内分泌攪乱作用が注目される中、従来の内分泌攪乱物質に関する研究のほ

とんども女性ホルモン(卵胞ホルモン、エストロゲン)に関連するものであり、男性ホルモンの作用を攪乱する化学物質及びその作用機構に関する研究はほとんどなかった。

AR はリガンド依存性転写制御因子であり、5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone (DHT) などの男性ホルモンが結合すると活性化され、標的遺伝子の発現を制御する。我々は培養細胞を用いた研究で、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。更に我々は、生きたマウスの精巣の精細管に試験化合物をマイクロインジェクションした後に精子数を計測することにより、外因性化合物が精子産生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。

## 2. 研究の目的

ハーシュバガー法など、従来の男性ホルモン様作用/抗男性ホルモン作用の *in vivo* アッセイ法では、去勢手術が必要、男性ホルモンの枯渇により他の生理機能が影響を受ける、作用判定の指標は臓器重量であり、正確さに欠ける、試験化合物を全身投与するので代謝の影響が避けられない、などの問題点があった。我々が開発した *in vivo* アッセイ法は、試験化合物を精巣の精細管に直接注入して精子数を計測する方法であり、従来の *in vivo* アッセイ法の欠点を持たず、少量の試験化合物量で正確に作用をアッセイできる優れた方法である。

大気・水・土壌・食品など身の回りの環境中には、ダイオキシン類や PAH など AhR アゴニストとして作用する化合物が普遍的に存在する。一方、血液 - 精巣閉門が精子産生過程の中で一時的に消失する時期があること、多くの AhR アゴニストは脂溶性が高い化合物であり単純拡散により容易に血液 - 精巣閉門を透過し得ることを考えれば、AhR アゴニストが雄性生殖機能に及ぼす影響の解明は極めて重要な課題である。

そこで我々は、*in vivo* で精子産生機能を障害する作用が認められた化合物を用いて、障害作用の機構、特に AhR の作用機構、を明らかにすることを目的とし、雄性マウスおよびヒト腫瘍由来細胞を用いた本研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 試験化合物

PAH として Benzo [a] pyrene (BaP)、Chrysene (Chr)、Anthracene (Ant)、Pyrene (Pyr) を、AhR アンタゴニストとして  $\alpha$ -Naphthoflavone ( $\alpha$ -NF) を、男性ホルモンとして DHT を使用した。

### (2) 細胞培養

PC3/AR 細胞、マウス精巣由来 TM4 細胞を使用した。PC3/AR 細胞はヒト前立腺がん由来 PC3 細胞にヒト野生型 AR 発現プラスミドを導入し、樹立した安定発現株である。

### (3) 精子産生機能の測定

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。試験化合物 (1 mg/kg) を 0.5% (v/v) DMSO-リン酸緩衝整理食塩液 (PBS) に溶解または懸濁する。10-12 週齢の雄性 ddY マウス精巣の精細管内に直接注入し、5 週間後に屠殺して精巣を摘出した。秤量した後、エタノール固定、パラフィン包埋を経て、5 mm 厚の切片を作成した。ヘマトキシリン染色を行い顕微鏡下で観察し、精子数を計測した。精巣内に存在する種々の細胞は核の大きさや形から分別した。

### (4) 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 CYP11A1 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。

### (5) Real-time PCR

化合物を処置後、PBS で細胞を 2 回洗浄し、total RNA を抽出した。得られた total RNA について逆転写を行い cDNA を調製した。各遺伝子に特異的なプライマーを用いて real-time PCR を行った。PCR 生成物量を補正する内部標準に、RPLP0 遺伝子を用いた。

### (6) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

2 mM BaP (EtOH に溶解) を最終濃度が 100  $\mu$ M になるよう各溶媒 (0.5% DMSO-PBS、0.02% TPGS-PBS、5% EtOH-5% クレモフォル-PBS) で希釈した後、遠心分離し、上清を得た。上清中の BaP 濃度は HPLC 法で分析した。HPLC 分析条件は以下の通りである。カラム: Cosmosil 5C18 L4.6 mm.i.d. x 15 cm、室温)、溶離液: H<sub>2</sub>O-アセトニトリル (1:1)、流速: 1 mL/min、検出: UV 280 nm。

### (7) ウェスタンブロット

精巣を摘出した後、全細胞溶解液を調製した。SDS-PAGE を行い、poly vinylidene fluoride 膜に転写した後、抗体を用いて標的タンパク質を特異的に検出した。

### (8) ディファレンシャル・ディスプレイ法

試験化合物で処置した TM4 細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を調製した。得られた cDNA についてディファレンシャル・ディスプレイキットを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物はポリアクリルアミド電気泳動を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) PAH の精子産生能に及ぼす影響と AhR 活性

まず、PAH による精子産生機能障害を評価した。PAH として、BaP、Chr、Ant、Pyr を用いた。その結果、BaP または Chr を投与したマウスでは、対照群のマウスに比べ、統計学的な有意差がなく非常に弱い程度であるが精子数の減少が観察された (図 1)。一方、Ant または Pyr を投与したマウスでは、精子数の減少は観察されなかった。以上の結果から、BaP や Chr によって精子産生機能が障害されることが示唆された。

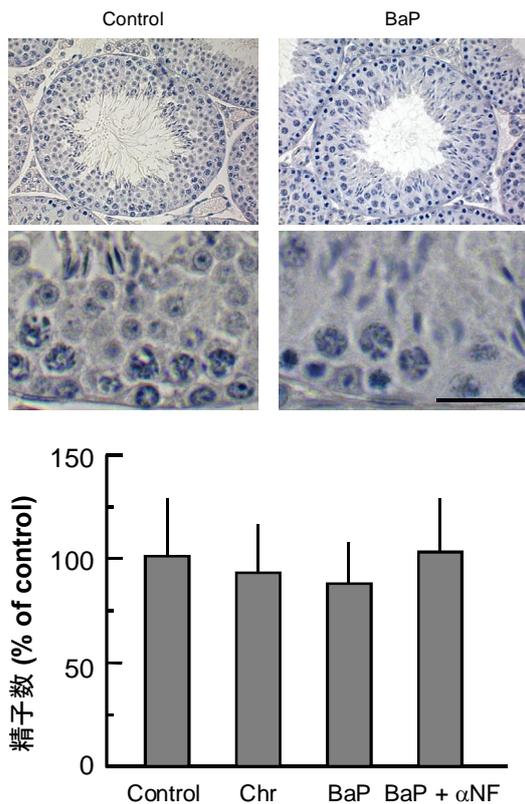


図 1 精子産生機能に対する BaP の効果  
(上) ヘマトキシリン染色。Scal bar; 20  $\mu$ m  
(下) 精子数産生機能障害

AhR は転写制御因子であり、CYP1A1 遺伝子の転写を活性化することが知られている。障害作用と AhR アゴニスト活性に関連があるか否かを明らかにするため、精巣組織切片について CYP1A1 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、BaP または Chr を投与したマウスでは、対照群にくらべ CYP1A1 発現の非常に弱いながらも誘導が観察された。また、マウス精巣における CYP1A1 mRNA の発現レベルを real-time PCR で検討した。その結果、BaP や Chr を処置したマウスの精巣では CYP1A1 mRNA 発現の誘導が観察されたが、Ant や Pyr を処置したマウスでは観察されなかった (図 2)。

以上の結果から、AhR アゴニスト活性を示す BaP や Chr は、非常に弱いマウス精子産生機能障害を示すことが考えられた。

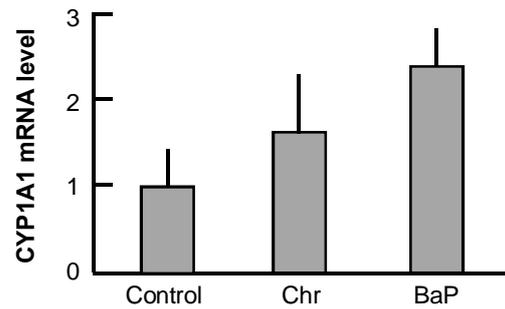


図 2 CYP1A1 mRNA 発現に対する PAH の影響

##### (2) 投与条件の検討

更に強い PAH の精子産生機能障害を観察するため、PAH を投与する際に用いる溶媒の組成を検討した。精子産生機能障害を検討する際に用いた PAH の溶媒は 0.5% DMSO-PBS である。そこで、5% エタノール (EtOH)-5% クレモフォル-PBS、0.02% Tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS)-PBS に対する 100  $\mu$ M BaP の溶解度を HPLC によって検出、比較した。その結果、100  $\mu$ M BaP は 5% EtOH-5% クレモフォル-PBS に対し 98.5%、0.02% TPGS-PBS に対し 0.1%、0.5% DMSO-PBS に対し 0.1% の溶解性を示した (表 1)。

表 1 各溶媒に対する 100  $\mu$ M BaP の溶解度

溶媒	溶解度
0.5% DMSO - PBS	0.1
0.02% TPGS - PBS	0.1
5% EtOH - 5% クレモフォル - PBS	98.5

そこで、最も高い溶解性を示した 5% EtOH-5% クレモフォル-PBS と 0.5% DMSO-PBS に BaP を溶解したものをマウスにそれぞれ投与し、24 時間後のマウス精巣における CYP1A1 mRNA 発現レベルを real-time PCR を用いて検討した。その結果、CYP1A1 mRNA レベルは対照群にくらべ、5% EtOH-5% クレモフォル-PBS を用いた場合は約 10 倍、0.5% DMSO-PBS を用いた場合は約 2 倍に増加した (図 3)。次に 5% EtOH-5% クレモフォル-PBS に BaP を溶解したものをマウスに投与し、精子産生機能に対する効果を検討した。その結果、投与したマウスは 2、3 日後に死亡した。精巣を摘出し、 $\alpha$ -fodrin 及び活性型 caspase-3 に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、死亡したマウスの精巣では細胞死が

起こっていることが示唆された。以上の結果から、5% EtOH-5% クレモフォル-PBS に BaP を溶解し使用した場合はマウスに対し致命的毒性を示すことから、今後の実験の使用には適さないと考えられた。検討した他の溶媒は溶解性が同程度であったことから、これ以降の実験は当初に使用した 0.5% DMSO-PBS を用いることにした。

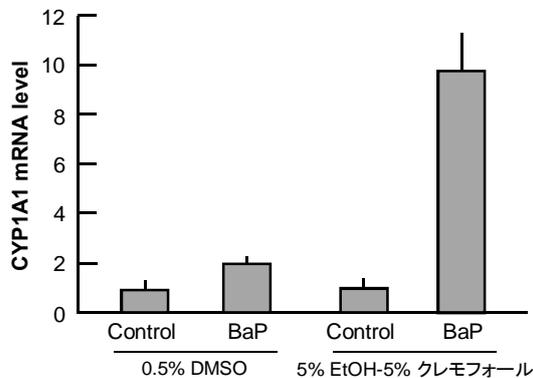


図3 CYP1A1 mRNA 発現に対する BaP の影響

(3) PAH による精子産生機能障害における AhR の必要性

PAH による精子産生機能障害に AhR が関与するか否かを検討するため、マウスに BaP と AhR アゴニストである  $\alpha$ -NF を併用投与し、精子数を計測した。その結果、BaP を単独投与したマウスに比べ、 $\alpha$ -NF を併用投与したマウスでは精子数が増大し (図 1)、 $\alpha$ -NF が BaP の精子産生機能障害を減弱することが示唆された。このことから、BaP の精子産生機能障害に AhR が関与している可能性が考えられた。

(4) PAH の投与が精巢の遺伝子発現に及ぼす影響

マウス精巢由来 TM4 細胞において BaP により発現が増強または減弱する遺伝子を特定することにした。BaP で処置した細胞から total RNA を抽出した後 cDNA を調製し、ディファレンシャル・ディスプレイキットを用いて PCR を行った。ポリアクリルアミド電気泳動の結果、対照に比べ発現が増強または減弱したバンドがいくつか観察された (図 4)。

次に、マウス精巢においても、TM4 細胞と同様に BaP により発現が増強または減弱する遺伝子を特定することにした。BaP を投与した ddY マウスから精巢を摘出し、total RNA を抽出した後 cDNA を調製し、ディファレンシャル・ディスプレイキットを用いて PCR を行った。PCR では、TM4 細胞の時と同様のプライマーを使用した。その結果、対照と比べ発現が増強または減弱するバンド

がいくつか観察されたが、その強弱のパターン、バンドの位置等は TM4 細胞の結果とは異なっていた (図 4)。

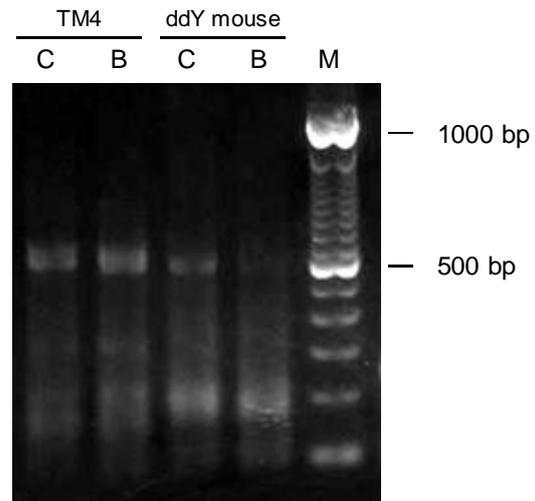


図4 BaP で発現が増強または減弱する遺伝子のスクリーニング  
C; Control, B; BaP, M; DNA marker

以上の結果から、今回使用したプライマーの組み合わせでは、BaP によって発現が増強または減弱する遺伝子が TM4 細胞と ddY マウス精巢では一致しないことが示唆された。他のプライマーセットを用いて、再度ディファレンシャル・ディスプレイを行う必要が考えられる。

以上の結果をまとめると、本研究において BaP や Chr で非常に弱い精子産生機能障害が観察された。また、この BaP による精子産生機能障害には AhR が関与していることが示唆された。BaP による精子産生機能障害の機構を解析するため、BaP によって発現が増強または減弱する遺伝子を特定しようとしたが、本研究では明らかにならなかった。これまでの報告で高い AhR アゴニスト活性を示すことが知られているにも関わらず、BaP や Chr の精子産生機能障害の効果が弱かった原因として、溶媒 (0.5% DMSO-PBS) に対する BaP の溶解度の低さなどが考えられる。近年、精子の質の低下や精子産生機能障害が提唱されているなど、環境中に普遍的に存在する AhR アゴニストなどの環境汚染物質による精子産生機能障害の可能性が十分に考えられる。溶媒を含め、マウスの投与条件など実験の条件を再検討し、PAH による精子産生機能障害について再度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)

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・助教  
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

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：