

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K18623
研究課題名(和文) アルコールとニコチンの同時曝露による精巣内微細環境の変化と精子形成障害の解析

研究課題名(英文) The effect of alcohol and nicotine co-exposure on testicular microenvironment and spermatogenesis

研究代表者
倉升 三幸(北岡三幸)(KURAMASU, MIYUKI)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：70468643
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生活の身近に存在する薬物であるアルコールおよびニコチンの同時曝露による精巣内微小環境の変化を解析するために組織学的および分子生物学的解析を行った。本研究の成果として1) 同時曝露によりセルトリ細胞障害が生じること 2) 同時曝露は精巣内免疫環境に影響を与えることが明らかになった。しかしながら、これは同時曝露による影響の一部であり、今後さらに検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに環境物質の単独曝露による研究は多くの物質がなされてきたが、複数の物質による同時曝露の解析検討は海外も含め報告が少ない。その一方で、次世代の保護という観点において生殖能力を形成する思春期における環境物質の曝露を防ぐことは重要な課題の一つである。本研究はアルコール、ニコチンのように一般的に同時曝露されている物質による思春期の生殖機能への影響を評価することで重要な基礎的知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand the effects of co-exposure to alcohol and nicotine on the microenvironment in the testis. The outline of this study result is as follows: 1) Co-exposure to alcohol and nicotine causes sertoli cell dysfunction. As a result, it induces changes in testicular macrophage and autoantibody production, and 2) co-exposure affects the testicular immune environment. However, this is part of the effects of co-exposure to alcohol and nicotine and needs further investigation.

研究分野：泌尿生殖器

キーワード：精巣 アルコール ニコチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不妊症及び少子化の増加が深刻な問題となっており、男性不妊が増加している原因として生活環境中に存在する化学物質の影響による精子形成障害が注目されている。飲酒(アルコール)と喫煙(ニコチン)は生活習慣病を悪化させる危険因子であり、生殖毒性との関連性が検討されてきた。アルコールとニコチンは同時摂取されやすい薬物であるが、同時曝露による精巣内微細環境の変化および精子形成障害の機序についての詳細な報告はいまだない。本研究では、同時曝露による精巣内微細環境の変化もしくは免疫性精子形成障害の感受性への影響を検討し、男性不妊症の機序の一端を解明することを目指す。

2. 研究の目的

本研究ではアルコールとニコチンの同時曝露による精巣内微細環境の変化の解明と、精巣内の免疫学的抑制機構の形成や維持に影響を与える可能性について解明することを目的とし、特に同時曝露における精巣マクロファージ動態の変化や炎症性サイトカイン分泌、セルトリ細胞への影響に着目し解析を行った。

3. 研究の方法

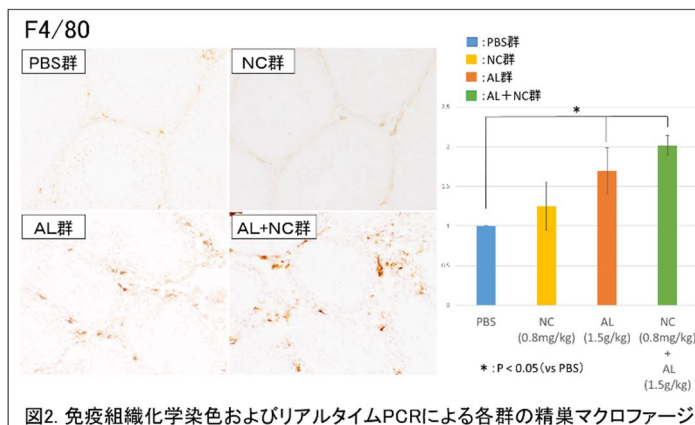
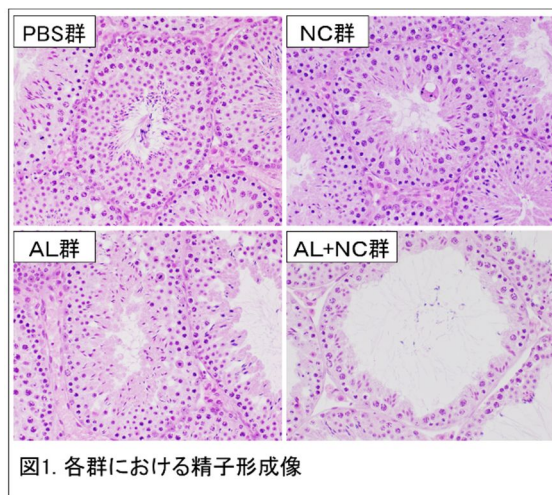
実験動物は、4週齢(思春期)のDBA/2系マウスを用い、正常群(リン酸緩衝生理食塩水(PBS)腹腔内投与群: PBS群)、アルコール群(アルコール1g/kg、1.5g/kg、2.0g/kg腹腔内投与群: AL群)、ニコチン群(ニコチン0.2mg/kg、0.4mg/kg、0.6mg/kg腹腔内投与群: NC群)、アルコール+ニコチン群(上記濃度のアルコール、ニコチンの組み合わせ腹腔内投与群: AL+NC群)の4群を作成した。ニコチンは0.2mIPBSに溶解し、アルコールは濃度20%になるようにPBSで調整する。これらの溶液を腹腔内に1日1回毎日投与を行い、35日後にマウス体重を測定後、精巣、精巣上体及び脾臓等を摘出し重量測定を行う。摘出した臓器はmodified Davidson's fluid (mDF)にて固定後、テクノビット包埋を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて形態観察を行った。また、同時に凍結切片の作成およびmRNA抽出を行い、免疫組織化学染色およびリアルタイムPCRを用いて解析を行った。

4. 研究成果

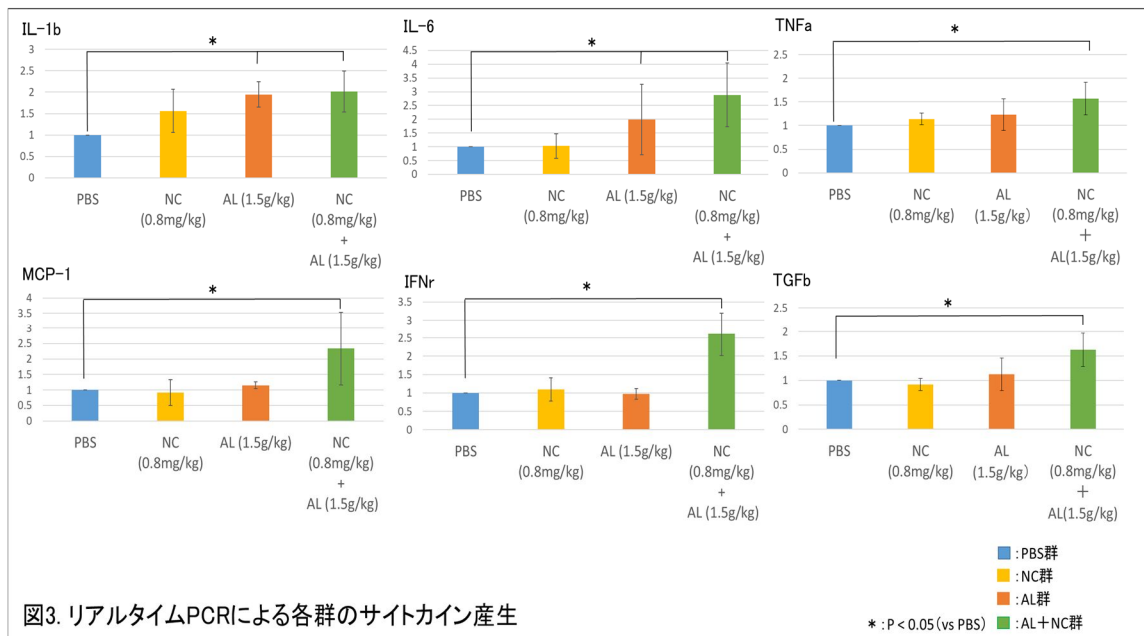
同時曝露における精子形成障害の機序

PBS群に比べAL群およびNC群の精巣重量は有意に減少し($P<0.05$)、AL+NC群においてはその傾向が顕著に認められた($P<0.01$)。また、AL群、NC群においては精上皮に多少の乱れが生じたものの精子形成障害は認められなかった。しかしながら、AL+NC群においては精細管上皮が脱落している精細管が観察されるなど精子形成障害が認められた(図1)。また、生殖細胞マーカーの変化についてリアルタイムPCRを用いて解析したところStra8(Spermatogonia)では各群の有意な変化は認められなかったが、Spo11(Spermatocyte)およびTnp1(Spermatid)においてAL+NC群では他群に比べ有意に低下していた($P<0.05$)。

また、ライディッヒ細胞が萎縮し精細管隙が広がることから、精細管周囲に多く存在している免疫細胞である精巣マクロファージの分布・動態に変化を生じている可能性が考えられることから精巣マクロファージ(F4/80、CD68、CD163)を調べたところ、AL群、AL+NC群では精細管の周囲にマクロファージが増加したが、NC群ではマクロファージ浸潤は認められなかった(図2)。さらに、リアルタイムPCRを用いてF4/80の発現量を解析したところPBS群に比べAL群およびAL+NC群は有意に増加していたが($P<0.05$)、NC群では有意な変



化は認められなかった。これらの精巣内免疫細胞の変化に伴い各種サイトカイン産生(IL-1b、IL-6、TNFa、MCP-1、IFNr、TGFb など)についてリアルタイム PCR にて解析したところ PBS 群に比べ、NC 群のサイトカイン産生変化は認められなかったが、AL 群では IL-1b、IL-6 が有意に増加し(P<0.05)、AL+NC 群では IL-1b、IL-6、TNFa、MCP-1、IFNr、TGFb など様々なサイトカイン産生について大きく変化していた。



これらのことから AL+NC 群は各単独投与の条件に比べ、精巣マクロファージが増加し、これに伴う精巣内炎症性サイトカインの変化により精巣内の免疫環境に影響を与え精子形成（特に精母細胞および精子細胞）に悪影響を与える可能性がある。しかしながら、これは同時曝露による影響の一つであり、今後さらに検討が必要である。

同時曝露における精巣内微小環境の変化

近年、化学物質の影響による精子形成障害も多くの研究成果が発表されている。その中で極低用量でも精巣の免疫抑制機構に対し重要な役割を果たしているセルトリ細胞の微細構造に影響し、セルトリ関門（血液 精巣関門）の変化が生じることが分かってきた(Fiorini et al. Reprod Toxicol, 2004)。従って本研究ではセルトリ細胞に注目し解析を行った。

その結果として、セルトリ細胞機能因子である Aqp8、IL-1a、Transferrin、Testin などの mRNA 発現を調べたところ、AL 群および NC 群では発現変化が認められなかったが、AL+NC 群では有意に発現が変化していた。特に血液 - 精巣関門関連タンパク質（ZO-1、ZO-2、Occludin、Claudin11、TJP1 など）の発現はAL+NC 群において低下しており(図 4) 血液 精巣関門における精巣の保護機能が低下している可能性がある。これまでの報告によるとアルコールの投与ではセルトリ細胞にミトファジーなどの保護機能が働き、セルトリ細胞障害が誘発されなかったが、ニコチンと同時曝露によりこの保護機能に影響を与えセルトリ細胞障害を生じさせることが示唆された。

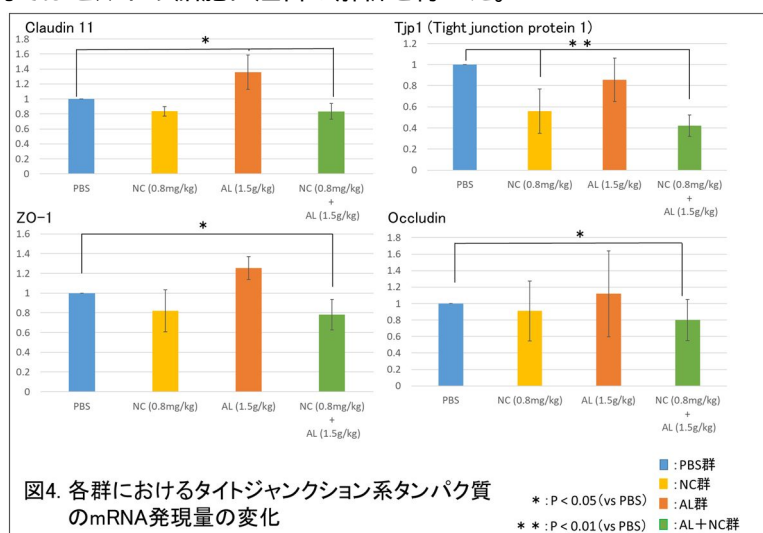


図4. 各群におけるタイトジャンクション系タンパク質のmRNA発現量の変化

また、PBS 群、AL 群および NC 群において自己抗体の産生は認められなかったが、AL + NC 群において精子細胞・精子に対する自己抗体が認められた。これは、セルトリ細胞機能因子および血液 - 精巣関門関連タンパク質の変化によりセルトリ細胞の機能が低下し、精巣の保護機能が低下した結果、自己抗体が認められるようになったと考えられる

以上の結果から、アルコールとニコチンにおける同時曝露は精巣においてアルコール、ニコチンの両薬物の影響を相加的に受けているおり、精巣の免疫環境にも影響を与えることが明らかになった。

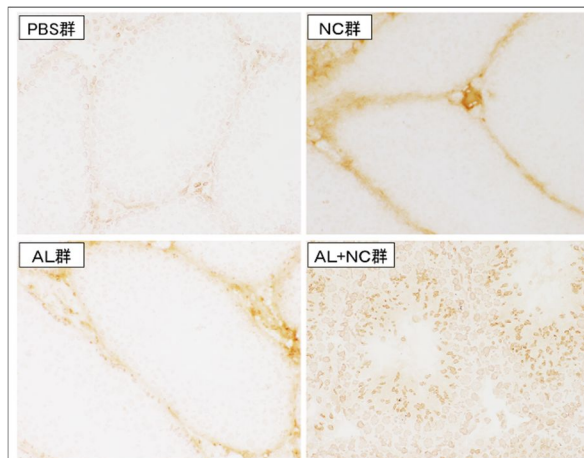


図5. 同時曝露による自己抗体産生

結果として、思春期におけるアルコールとニコチンへの同時曝露はセルトリ細胞の機能

不全を引き起こし、精巣マクロファージの動態変化や自己抗体産生などの多様な影響を与えることにより精巣免疫環境を悪化させる。しかしながら、これはアルコールとニコチンの同時曝露の影響の一部であり、さらに調査する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahashi Kumpei, Nagahori Kenta, Qu Ning, Kuramasu Miyuki, Hirayanagi Yoshie, Hayashi Shogo, Ogawa Yuki, Hatayama Naoyuki, Terayama Hayato, Suyama Kaori, Hirai Shuichi, Sakabe Kou, Itoh Masahiro	4. 巻 19
2. 論文標題 The effectiveness of traditional Japanese medicine Goshajinkigan in irradiation-induced aspermatogenesis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12906-019-2786-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Qu Ning, Ogawa Yuki, Kuramasu Miyuki, Nagahori Kenta, Sakabe Kou, Itoh Masahiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Immunological microenvironment in the testis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 24 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 永堀 健太、平井 宗一、倉升 三幸、表原 拓也、宮宗 秀伸、李 忠連、小川 夕輝、伊藤 正裕	4. 巻 34
2. 論文標題 免疫寛容を受けていない精巣抗原遺伝子の同定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本生殖免疫学会誌	6. 最初と最後の頁 27 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Qu Ning, Kuramasu Miyuki, Nagahori Kenta, Ogawa Yuki, Hayashi Shogo, Hirayanagi Yoshie, Terayama Hayato, Suyama Kaori, Sakabe Kou, Itoh Masahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Co-Administration of the Traditional Medicines Hachimi-Jio-Gan and Hochu-Ekki-To Can Reverse Busulfan-Induced Aspermatogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1716 ~ 1716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051716	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Qu Ning, Nagahori Kenta, Kuramasu Miyuki, Ogawa Yuki, Suyama Kaori, Hayashi Shogo, Sakabe Kou, Itoh Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of Gosha-Jinki-Gan on Levels of Specific mRNA Transcripts in Mouse Testes after Busulfan Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 432 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8100432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Omotehara Takuya, Wu Xi, Kuramasu Miyuki, Itoh Masahiro	4. 巻 249
2. 論文標題 Connection between seminiferous tubules and epididymal duct is originally induced before sex differentiation in a sex independent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 754 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyaso Hidenobu, Nagahori Kenta, Takano Kaiya, Omotehara Takuya, Kawata Shinichi, Li Zhong-Lian, Kuramasu Miyuki, Wu Xi, Ogawa Yuki, Itoh Masahiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Neonatal maternal separation causes decreased numbers of sertoli cell, spermatogenic cells, and sperm in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology Mechanisms and Methods	6. 最初と最後の頁 116 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15376516.2020.1841865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagahori Kenta, Hirai Shuichi, Hatayama Naoyuki, Kuramasu Miyuki, Omotehara Takuya, Kawata Shinichi, Li Zhonglian, Miyaso Hidenobu, Ogawa Yuki, Qu Ning, Terayama Hayato, Hayashi Shogo, Yi Shuang-Qin, Naito Munekazu, Itoh Masahiro	4. 巻 145
2. 論文標題 Heat shock protein A4L is a potent autoantigen for testicular autoimmunity in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103318 ~ 103318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jri.2021.103318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyaso Hidenobu, Takano Kaiya, Nagahori Kenta, Kawata Shinichi, Li Zhong-Lian, Kuramasu Miyuki, Wu Xi, Ogawa Yuki, Itoh Masahiro	4. 巻 102
2. 論文標題 Neonatal maternal separation increases the number of p27-positive Sertoli cells in prepuberty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive Toxicology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reprotox.2021.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永堀 健太、表原 拓也、宮宗 秀伸、河田 晋一、李 忠連、倉升 三幸、小川 夕輝、伊藤 正裕
2. 発表標題 精巢の自己抗原性と免疫学的組織環境
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Qu Ning, Kuramasu Miyuki, Nagahori Kenta, Ogawa Yuki, Umemoto Kanae, Terayama Hayato, Itoh Masahiro, Sakabe Kou
2. 発表標題 The different effect of administration of traditional Japanese medicines alone or in combination on busulfan-induced aspermatogenesis.
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮宗 秀伸、永堀 健太、表原 拓也、河田 晋一、李 忠連、高野 海哉、倉升 三幸、小川 夕輝、伊藤 正裕
2. 発表標題 幼少期ストレスが引き起こすマウス雄性生殖系への影響
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	宮宗 秀伸、高野 海哉、永堀 健太、表原 拓也、河田 晋一、李 忠連、倉升 三幸、小川 夕輝、伊藤 正裕
2. 発表標題	幼少期ストレスが幼若期マウス精巢のセルトリ細胞におよぼす影響
3. 学会等名	日本アンドロロジー学会第38回学術大会および第28回精子形成・精巢毒性研究会 共同開催学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	曲 寧、倉升 三幸、永堀 健太、小川 夕輝、寺山 隼人、伊藤 正裕
2. 発表標題	The different effect of administration of traditional Japanese medicines alone or in combination on busulfan-induced aspermatogenesis.
3. 学会等名	日本アンドロロジー学会第38回学術大会および第28回精子形成・精巢毒性研究会 共同開催学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Omotehara Takuya, Kuramasu Miyuki, Nagahori Kenta, Wu Xi, Kawata Shinichi, Li Zhong-Lian, Miyaso Hidenobu, Itoh Masahiro
2. 発表標題	Immunohistological study for the connection between the testis and epididymis
3. 学会等名	第59回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	表原 拓也、倉升 三幸、呉 曦、永堀 健太、小川 夕輝、河田 晋一、李 忠連、宮宗 秀伸、伊藤 正裕
2. 発表標題	Sequential immunohistochemistry法による精細管と精巢上体管の接続過程の検討
3. 学会等名	第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 Omotehara Takuya、Wu Xi、Kuramasu Miyuki、Nagahori Kenta、Ogawa Yuki、Kawata Shinichi、Li Zhong-Lian、Miyaso Hidenobu、Itoh Masahiro
2. 発表標題 Connection between seminiferous tubules and epididymal duct is induced before the sex differentiation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮宗 秀伸, 高野 海哉, 永堀 健太, 表原 拓也, 河田 晋一, 吳 曦, 倉升 三幸, 小川 夕輝, 李 忠連, 伊藤 正裕
2. 発表標題 母児分離ストレスはマウス精巢においてp27/kip1遺伝子の発現亢進を引き起こす
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 希来, 表原 拓也, 倉升 三幸, 吳 曦, 金澤 優太, 小川 夕輝, 永堀 健太, 河田 晋一, 宮宗 秀伸, 李 忠連, 伊藤 正裕
2. 発表標題 精巢輸出管切断による精巢内の組織学的変化の検討
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 表原 拓也, 吳 曦, 仲田 浩規, 倉升 三幸, 小川 夕輝, 永堀 健太, 河田 晋一, 宮宗 秀伸, 李 忠連, 伊藤 正裕
2. 発表標題 精細管 - 精巢上体管の接続は性依存的に誘導される
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 達彦, 永堀 健太, 呉 曦, 倉升 三幸, 表原 拓也, 宮宗 秀伸, 李 忠連, 河田 晋一, 小川 夕輝, 伊藤 正裕
2. 発表標題 異性間骨髄移植による雄性生殖器への影響
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 表原 拓也, 仲田 浩規, 呉 曦, 倉升 三幸, 伊藤 正裕
2. 発表標題 マウス中腎細管の三次元再構築の検討
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永堀 健太, 平井 宗一, 倉升 三幸, 表原 拓也, 河田 晋一, 小川 夕輝, 宮宗 秀伸, 李 忠連, 伊藤 正裕
2. 発表標題 熱ショックタンパク質(HSP)免疫によるマウス自己免疫精巢
3. 学会等名 第35回日本生殖免疫学会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曲 寧, 伊藤 正裕, 倉升 三幸, 永堀 健太, 小川 夕輝, 隅山 香織, 林 省吾, 坂部 貢
2. 発表標題 ブスルファン処置後の精子形成障害における漢方薬の単独または併用投与における治療効果の差違
3. 学会等名 第35回日本生殖免疫学会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤 正裕, 曲 寧, 永堀 健太, 小川 夕輝, 倉升 三幸
2. 発表標題 特発性?精子形成障害の予防 免疫の立場から
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第39回学術大会・第30回日本性機能学会中部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曲 寧, 伊藤 正裕, 倉升 三幸, 永堀 健太, 小川 夕輝, 坂部 貢
2. 発表標題 Co-administration of traditional medicines Hachimi-jio-gan and Hochu--ekki-to can reverse busulfan-induced aspermatogenesis
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第39回学術大会・第30回日本性機能学会中部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮宗 秀伸, 高野 海哉, 永堀 健太, 李 忠連, 表原 拓也, 河田 晋一, 倉升 三幸, 吳 曦, 小川 夕輝, 伊藤 正裕
2. 発表標題 Early life stressと雄性生殖器系の発育—Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) から見た生殖毒性
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永堀 健太, 倉升 三幸, 平井 宗一, 表原 拓也, 李 忠連, 小川 夕輝, 伊藤 正裕
2. 発表標題 GTPase活性化タンパク質 (GIT1) 免疫によるマウス自己免疫精巣炎
3. 学会等名 第36回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------