

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12193

研究課題名（和文）次世代に引き継がれるストレス由来雄性生殖障害の分子基盤解析-エピゲノムの観点から

研究課題名（英文）The molecular basis of the transgenerational male reproductive disorder with early life stress

研究代表者

宮宗 秀伸（Miyaso, Hidenobu）

国際医療福祉大学・医学部・講師

研究者番号：80422252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本課題はEarly Life Stress（ELS，発達早期におけるストレス）として知られる新生児期母児分離ストレスが雄性生殖系へおよぼす影響を評価した。新生児期母児分離ストレスは思春期以降のマウスにおいて、精巣重量、造精細胞数、セルトリ細胞数、および血中テストステロン濃度の減少を引き起こした。生後10日齢において、コルチコステロンの血中濃度の上昇と、セルトリ細胞増殖停止因子として知られる「p27」陽性セルトリ細胞数の増加を生じた。12週齢における成熟精子のゲノムDNAについて行った網羅的メチル化解析は、新生児期母児分離ストレスによりメチル化状態が有意に変動する遺伝子群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去数十年の間に、日本を含む先進諸国において男性の精子数減少が進行している。過去に様々な先行研究が行われてきたが、根本原因は明らかになっていない。本研究はELSが児の精子数を減少させる原因となること、およびその機序の一端を明らかにした。さらにELSは成熟精子のゲノムDNAメチル化状態に影響をおよぼした。データはELSによる影響は次の世代に引き継がれる可能性を示唆している。これらは男性の精子数減少を食い止めるのみならず、ELSが生じる精子におけるエピゲノム毒性の評価、経代的な影響の評価、という観点からも、重要な知見を提供するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：This study evaluated the male reproductive toxicity with neonatal maternal separation (NMS). NMS is an experimental model for early life stress, physical or mental stress at early life stages. NMS brought about the decreases of testicular weight, germ cell number, Sertoli cell number, and serum testosterone level at postpubertal stage. At postnatal day 10, NMS caused the elevation of serum corticosterone level and the increase in p27-positive Sertoli cell number, meanwhile the elevation of p27 triggers the termination of Sertoli cell proliferation. At 12 weeks of age, the comprehensive methylation analysis in sperm exhibited several gene groups with significant increase or decrease in methylation levels following NMS.

研究分野：Reproductive toxicology

キーワード：Early life stress 新生児期母児分離 雄性生殖系 セルトリ細胞 p27 コルチコステロン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過去数十年の間に、日本を含む先進諸国において男性(雄性)の精子数減少が進行している。過去に様々な先行研究が行われてきたが、根本原因は明らかになっていない。これまで研究代表者は、胎生期や新生児期における児の環境要因が精子数減少に関係すると仮定し、評価を行ってきた。ここで最近研究代表者は、児における Early Life Stress (発達早期の保育環境の変化によって児に生じるストレスの総称)が、雄性生殖系に影響をおよぼすことを見出した。すなわち研究代表者はこれまでに、新生児期母児分離ストレス(Early Life Stress の一種で、新生児期に母児を隔離することで児に生じるストレス)を受けた児マウスにおいて、思春期以降に雄性生殖系において精巣重量の減少、さらに精子数の減少などが生じることを同定している。近年、ライフスタイルの変化などによる保育環境の変化(およびそれに伴って生じる Early Life Stress)が、思春期以降の様々な疾病と関連することが示唆されている。ヒトの場合、発達早期の不適切な母児分離によるストレスが、近年急増している「うつ」や「自閉症」などの精神疾患の発症リスクとなることが示されている。これを裏付ける実験モデルとして、新生児期母児分離を受けたマウスは、その後精神疾患と同様の症状を呈することが明らかになっている。さらに Early Life Stress が将来的に児の健康に影響を引き起こす分子基盤として、Early Life Stress が児において、ゲノム DNA のメチル化をはじめとするエピゲノム(遺伝子発現制御機構の総称)状態に変化を引き起こすこと、それによって長期的な遺伝子発現異常が生じ、結果として児に健康リスクを生じることが報告されている。

新生児期母児分離による Early Life Stress は脳神経系、循環器系、消化器系、泌尿器系など広範な健康影響を生じることが報告されているが、雄性生殖系における影響は十分に評価されていない。

2. 研究の目的

本課題では新生児期母児分離ストレスが、思春期以降の雄性生殖系におよぼす影響の評価、その分子基盤解析、精巣あるいは精子のエピゲノム状態におよぼす影響の評価を行う。また研究代表者は、新生児期母児分離ストレスを経験した雄マウスと正常雌マウスを交配させた場合、生まれてきた次世代の雄マウスの精巣において、重量の有意な低下、組織の形態形成異常などの影響が生じることを見出している。～の結果をもって、新生児期母児分離ストレスが「次世代の」雄性生殖系におよぼす影響の評価、その原因となる精子エピゲノム異常の解析につなげたい。

3. 研究の方法

本研究課題は新生児期母児分離による雄性生殖系における影響を以下のように評価する。

新生児期母児分離モデルマウスの作成

新生児期 ICR マウスについて、生後 1 日目から 10 日目まで母児分離を行う(一日当たり 0.5、1、2、4、8 時間)。その後通常飼育し、各日齢および週齢において、以下の評価を行った。

思春期以降の雄性生殖系におよぼす影響の評価

これまでに研究代表者は新生児期母児分離によるストレスが、思春期以降の雄性生殖系において精巣重量の減少やセルトリ細胞数の減少、精子数の減少などの健康影響を引き起こすことを同定してきた。本項目ではこれらについて引き続き評価を行う。

思春期以降の雄性生殖系に影響をおよぼす分子基盤の解析

げっ歯類のセルトリ細胞は生後 15 日目まで増殖する。一方研究代表者は、新生児期母児分離ストレスを受けた児では生後 10 日齢の精巣で、既に p27 タンパク(セルトリ細胞増殖停止因子)の発現が亢進していることを見出している。本項目では、特に新生児期母児分離ストレスがセルトリ細胞数を減少させる分子機構を明らかにする。具体的には生後 10 日齢の時点で児マウスの血清を用いて、p27 の発現誘導因子として知られるコルチコステロンや甲状腺ホルモンの血中濃度を、ELISA 法によって評価する。同時にそれ以外の未知因子の探索のため、血漿を用いたメタボローム解析を実施する。新生児期母児分離による p27 発現亢進の原因となるホルモンあるいは代謝物同定後それらを新生児マウスに直接投与し、雄性生殖系への影響評価を行うことで、新生児期母児分離ストレスが雄性生殖系に影響を引き起こす分子基盤の一端を明らかにする。

精子のエピゲノム状態におよぼす影響の評価

母児分離ストレスは、児にエピゲノム状態の変動を誘導することが報告されている。本項目では新生児期母児分離を受けた個体における、成熟精子のエピゲノム状態の評価のため、ゲノム DNA のメチル化レベルの網羅的解析を行う。具体的にはメチル化レベルの解析は、精巣上体中の成熟精子からゲノム DNA を抽出精製し、Bisulfite sequence 法あるいは Reduced representation

of bisulfite sequencing 法によって行う。これにより、新生児期母児分離ストレスが成熟精子のゲノムにおいて引き起こすメチル化レベルの変動を評価する。

4. 研究成果

新生児期母児分離モデルマウスについて、一日当たり 2 時間の分離モデルの結果を中心に示す。

(1) 新生児期母児分離ストレスが思春期以降の雄性生殖系におよぼす影響の評価

本研究ではまず、新生児期母児分離ストレスを受けた児について、10 週齢時で雄性生殖系における評価が行われた。新生児母児分離ストレスを受けたマウスでは対照マウスと比較して、精巣重量の減少、造精細胞数の減少、セルトリ細胞数の減少、精細管直径の減少、成熟精子細胞数の減少、および血中テストステロン濃度の減少が生じることを見出した(図 1)。

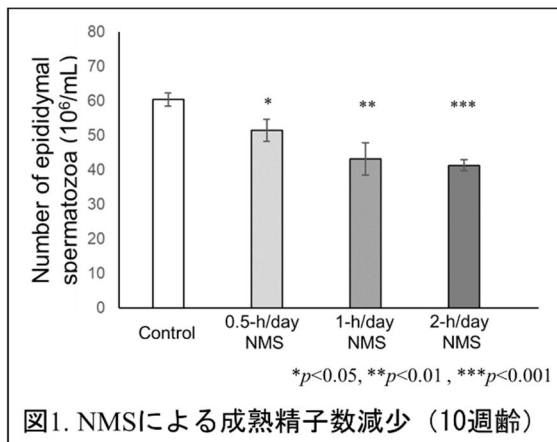


図1. NMSによる成熟精子数減少 (10週齢)

(2) 新生児期母児分離ストレスが思春期以降の雄性生殖系に影響をおよぼす分子基盤の解析

次に、新生児期母児分離ストレスが思春期以降のマウス雄性生殖系に影響をおよぼす機序を明らかにするため、生後 10 日齢および 16 日齢において評価が行われた。生後 10 日齢において血中コルチコステロン濃度を評価したところ、新生児母児分離ストレスを受けたマウスでは対照マウスと比較して有意な上昇が認められた。セルトリ細胞数とサイクリン依存性キナーゼインヒビター p27 (セルトリ細胞増殖停止因子) を発現しているセルトリ細胞数を評価したところ、生後 10 日齢においては p27 陽性セルトリ細胞数の有意な増加、その

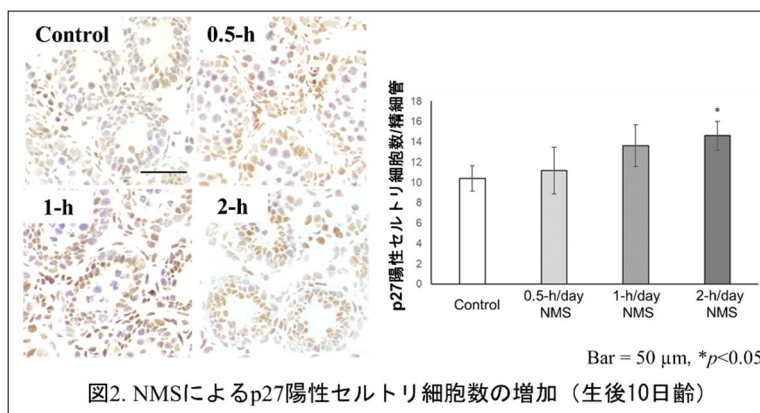


図2. NMSによるp27陽性セルトリ細胞数の増加 (生後10日齢)

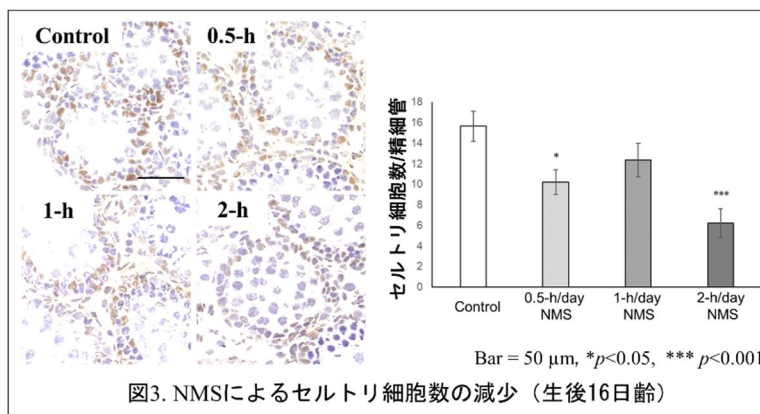
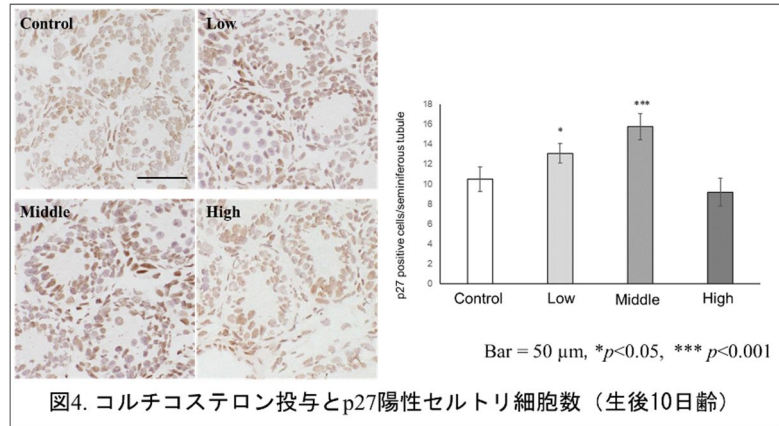


図3. NMSによるセルトリ細胞数の減少 (生後16日齢)

後生後 16 日齢においてはセルトリ細胞数の有意な減少が認められた(図 2 および 3)。コルチコステロンは抗ストレスホルモンであり、In vitro の実験系ではコルチコステロンの添加が TM10 細胞における p27 発現量を亢進することが報告されている。すなわち、新生児期母児分離ストレスは発達早期に血中コルチコステロン濃度の上昇とそれに伴いセルトリ細胞における p27 の発現量を亢進することによって、セルトリ細胞の早期増殖停止を誘導すること、結果として思春期以降のライフステージにおいてセルトリ細胞数を減少させることが示唆された。

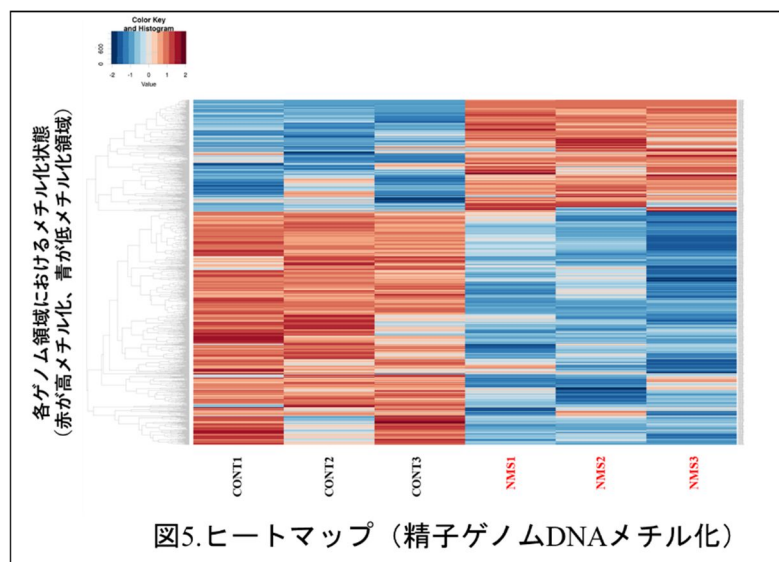
(3) 新生児期コルチコステロン投与が雄性生殖系におよぼす影響

(2)の結果を受けて、コルチコステロンの血中濃度とp27陽性セルトリ細胞数の関係性を評価するため、発達早期におけるコルチコステロン投与の影響について評価を行った。新生児期 ICR マウスについて、セサミオイルに溶解したコルチコステロンを生後 1 日目 から 10 日目まで、一日当たり 0.36、3.6 および 36 mg/kg body weight の量で、皮下注射によって投与した。0.36 および 3.6 mg/kg body weight の投与マウスについて生後 10 日齢および 16 日目齢において評価したところ、血中コルチコステロン濃度の上昇、p27 陽性セルトリ細胞数の増加、およびセルトリ細胞数の減少が確認され、これらはいずれも有意であった(図 4)。一方で、36 mg/kg body weight の投与マウスについてはこれらの影響は認められなかった。



(4) 新生児期母児分離ストレスが精子のエピゲノム状態におよぼす影響の評価

本項目では精子ゲノムのエピゲノム状態への影響を評価するため、網羅的メチル化解析が行われた。12 週齢時において精巣上体尾部から成熟精子を回収、DNA 抽出、バイサルファイト処理後、Reduced Representation of Bisulfite Sequencing 解析が行われた。Reduced representation of bisulfite sequencing 解析の結果は、新生児母児分離ストレスを受けたマウスにおいて対照マウスと比較して、DNA メチル化状態が有意に亢進あるいは抑制された遺伝子群が同定された。また、ヒートマップおよび主成分分析による評価は、ストレスマウスと対照マウスから得られた精子が、異なるメチル化状態を保持していることを明らかにした(図 5)。これらのことから、新生児期母児分離による ELS は児の精子が有するゲノム DNA のエピゲノム状態に変動を引き起こし、次世代の雄性生殖系に影響をおよぼす可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyaso Hidenobu, Takano Kaiya, Nagahori Kenta, Li Zhong-Lian, Kawata Shinichi, Kuramasu Miyuki, Ogawa Yuki, Yoshioka Hirotaka, Matsuno Yoshiharu, Yokota Satoshi, Itoh Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Neonatal corticosterone administration increases p27-positive Sertoli cell number and decreases Sertoli cell number in the testes of mice at prepuberty	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-23695-8	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, Ogawa Yuki, Itoh Masahiro	4. 巻 157
2. 論文標題 Microenvironment for spermatogenesis and sperm maturation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 273 ~ 285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-021-02071-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 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 -
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮宗秀伸、吉岡広陽、高野海哉、永堀健太、李忠連、松野義晴、倉升三幸、呉曦、小川夕輝、伊藤正裕
2. 発表標題 Early Life Stressによる精巢毒性誘導とトリガーとなる要因の解析
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第41回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮宗秀伸、吉岡広陽、高野海哉、永堀健太、李忠連、倉升三幸、小川夕輝、松野義晴、伊藤正裕
2. 発表標題 発達早期のストレスの雄性生殖器系および次世代への影響
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮宗秀伸、松野義晴、吉岡広陽
2. 発表標題 発達早期のストレスホルモン投与が雄性生殖器系へおよぼす影響の評価解析
3. 学会等名 第12回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮宗秀伸、高野海哉、吉岡広陽、松野義晴、河田晋一、李忠連、倉升三幸、小川夕輝、伊藤正裕
2. 発表標題 新生児期コルチコステロン投与がマウスセルトリ細胞double-layer rosette pattern形成におよぼす影響
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮宗秀伸 高野海哉 永堀健太 李忠連 吉岡広陽 松野義晴 倉升三幸 吳曦 小川夕輝 伊藤正裕
2. 発表標題 Early Life Stress と加齢がマウス成熟精子細胞数におよぼす影響の評価
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022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 吳曦 小川夕輝 松野義晴 伊藤正裕
2. 発表標題 Early Life Stressがマウス精巢の加齢変化にもたらす影響の解析
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第40回学術大会
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 と雄性生殖系系の発育 - Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) から見た生殖毒性 Effects of Early Life Stress on growth and development of male reproductive system - from the viewpoint of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021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 吳 曦 小川 夕輝 伊藤 正裕
2. 発表標題 Early Life Stressがマウス精巢セルトリ細胞数を減少させる分子機構に関する解析
3. 学会等名 第39回日本アンドロロジー学会
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
研究分担者	伊藤 正裕 (Itoh Masahiro) (00232471)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究分担者	小川 夕輝 (Ogawa Yuki) (20529250)	東京医科大学・医学部・助手 (32645)	
研究分担者	表原 拓也 (Omotehara Takuya) (40800545)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	永堀 健太 (Nagahori Kenta) (50759561)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	
研究分担者	倉升 三幸(北岡三幸) (Kuramasu Miyuki) (70468643)	東京医科大学・医学部・助手 (32645)	
研究分担者	高野 海哉 (Takano Kaiya) (70620475)	東京医療保健大学・医療保健学部・講師 (32809)	
研究分担者	松野 義晴 (Matsuno Yoshiharu) (00376378)	国際医療福祉大学・成田保健医療学部・教授 (32206)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	吉岡 広陽 (Yoshioka Hirotaka) (50523411)	国際医療福祉大学・医学部・講師 (32206)	
研究分担者	横田 理 (Yokota Satoshi) (70706605)	国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官 (82601)	

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