

マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者 井口 泰泉 横浜市立大学・理学部・機能科学科教授

研究要旨

妊娠 10 日目から 9 日間、2  $\mu\text{g}$  のジエチルスチルベストール (DES) および 3 mg のビスフェノール-A (BA) を母親マウスにそれぞれ投与し、妊娠 19 日目の胎仔生殖器官を組織学的に解析したところ、雌マウスでは子宮、膣の上皮の丈の高さが DES、BA 投与群ともに有意に増加し、細胞分裂率は BA 投与群のみ有意に増加していた。雄マウスでの DES 投与により、潜伏精巣が発生し、精巣も小さく単位面積当たりの精細管の数も有意に減少していることが見いだされたが、BA による変化は、認められなかった。

A. 研究目的

マウス雌性生殖器官である子宮及び膣は、成熟後、性周期に伴う卵巣からの周期的なエストロゲン（女性ホルモン）分泌に依存した増殖・退行を示す。マウスやラットの性周期はそれぞれ発情前期、発情期、発情後期及び発情間期の 4 期に分けられる。発情期のマウス子宮は全体的に膨潤し、上皮細胞の丈が高くなると同時に上皮組織の一部である子宮腺が発達する。膣もエストロゲンに反応して上皮細胞が増殖・多層化し、最上層は角質化する。発情間期では最上層の角質化はなくなり、5～7層の上皮細胞となる。さらに、卵巣を摘出して体内にエストロゲンがない状態にすれば、膣上皮は2～3層の萎縮した立方上皮となる。すなわち、子宮及び膣の上皮組織はエストロゲンに対して可逆的な反応を示す。しかし、周生期にエストロゲンや、合成エストロゲンであるジエチルスチルベストール (DES) を投与されたマウスでは、視床下部、下垂体系の恒久的変化により無排卵になるとともに、膣上皮が恒久的に増殖、角質化する。さらに、成熟後に卵巣を摘出しても上皮細胞は退縮せずに増殖を続け、加齢に伴い前癌病変から腫瘍化へと進行する。周生期の性ホルモン投与によるこのような卵巣非依存の膣上皮の増殖を、正常マウスの可逆的な増殖に対して不可逆的増殖と呼ぶ。不可逆的増殖に関しては、これまでは主に形態学的な研究のみであり、その誘導機構につ

いての研究はほとんど行われていない。また、周生期のマウスへのエストロゲン投与は、生殖腺および生殖腺附属器官の腫瘍化、発生異常、ホルモンに対する反応異常のみならず、筋肉・骨の形成不全、免疫力の低下を引き起こすことも明らかとなっている。他にも子宮の hypoplasia や上皮の異形成、腫瘍化、輸卵管の癌化や多卵性卵胞の多発など、雄では精子形成の減少や前立腺、凝固腺、貯精囊の異常が引き起こされることなどが報告されている。このような周生期性ホルモン投与によるさまざまな異常には、成体での可逆的な反応と異なり、新生仔、胎仔期に限って不可逆的に反応する臨界期が存在する。出生前後のマウスはヒトの妊娠 3-4 カ月に相当するため、周生期のマウスへの性ホルモン処理は、ヒト胎児に対する性ホルモンの影響のモデルともなりうる。

一方、細胞は増殖・分化した後にやがて死滅（細胞死）していくことが知られている。細胞死には、ネクロシスとアポトーシスの 2 種類があり、前者は受動的・事故的な細胞死であり、後者は能動的・生理的な細胞死というように分類されている。アポトーシスには、DNA の断片化及び細胞内小器官を含む細胞片（アポトーシス小体）が生じること、最終的には周囲の細胞に貪食されること等の特徴が挙げられる。従って、これらの特徴を観察することによってネクロシスかアポトーシスかを判断することができる。また、アポト

ーシスのシグナルとなる因子は現在までにいくつか同定されており、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、Fas ligandなどが挙げられる。そこでまず、出生直後のDES処理による膈上皮の不可逆的増殖を、細胞増殖制御の異常、あるいは、細胞死の異常という2つの面から捉え、それぞれ正常マウスでの反応と比較することにより、その生化学的特徴を明らかにし、DESによる不可逆化誘導機構を解析することを試みた。

また、環境中に放出された化学物質のうち、体内に入ってホルモンの産生・分泌を乱したり、ホルモン受容体に結合してホルモン様作用を示したり、あるいはホルモンの作用を阻害したりして、個体の生殖・発生・成長に影響を及ぼす化学物質(外因性内分泌かく乱物質)の存在が近年問題となっている。とりわけ、内分泌かく乱物質の大半はエストロゲン様作用を持っており、これまでの研究結果から、ヒトを含めた動物の生殖への影響が懸念されている。したがって、内分泌かく乱化学物質の生物影響として最も危惧されている生殖への影響を、発生学的な観点から調べる必要がある。そこで、発生中のマウス胎仔の生殖腺に対するエストロゲン、および内分泌かく乱化学物質の影響を調べ、成体での精子・卵形成を評価することを試みた。

## B. 研究方法

1) 出生直後のDES処理マウスの膈における、卵巣摘出後の細胞増殖と細胞死の変動の解析

卵巣摘出後の細胞死関連因子 [Fas ligandなど] のmRNAの発現変化を、準定量化RT-PCR法を用いて検討した。

2) 胎仔期のDES投与により膈上皮の不可逆的増殖の検討

マウスの妊娠10日目から9日間、体重30 gあたり2  $\mu$ gのDESおよび3 mgのBPAをそれぞれ投与し、妊娠19日目に帝王切開により胎仔を取り出して生殖器官を組織学的に解析した。さらに、これらのマウスを生育し、30日齢における多卵性卵胞の発生頻度を検討した。

## C. 研究結果

1) 出生直後のDES処理マウスの膈における、卵巣摘出後の細胞増殖と細胞死の変動の解析

出生直後のDES処理群のマウスの膈では、卵巣の有無に関わらずDNA断片化が認められた。細胞分裂率及びアポトーシス細胞の割合には卵巣を摘出しても変化がなく、また膈の間質細胞においては正常マウスの発情期よりも高頻度にアポトーシス細胞が出現していた。Fas ligand及びTNF- $\alpha$ のmRNA発現に変化はなかった。周生期DES処理群のマウスでは、卵巣を摘出しても膈上皮細胞のアポトーシスが增加せず、また、細胞分裂率の低下も見られなかった。このエストロゲン非依存の細胞増殖には、正常マウスに比べてmRNAの発現が増加していたEGF及びTGF- $\alpha$ が関与していると考えられる。出生直後のDES処理によりエストロゲンレセプター(ER)の発現が誘導されることが明らかとなっているため、DESによって発現誘導されたERを介して、多量のシグナルが伝達されてEGF及びTGF- $\alpha$ が恒久的に発現し、エストロゲン非依存的に膈上皮細胞の増殖が引き起こされていると考えられる。

2) 胎仔期のDES投与により膈上皮の不可逆的増殖の検討

胎仔重量はDES投与により有意に減少し、BPA投与では対照群と差はなかった。雌マウスでは子宮、膈の上皮の丈の高さは対照群と差はなく、細胞分裂率は膈上皮においてBPA投与群では有意に増加し、DES投与群では有意に減少した。また、DES投与群の91%において子宮粘膜上皮の化生(metaplasia)が生じていた。30日齢における多卵性卵胞の発生頻度を調べたところ、対照群では10個体中2個体に見られたのに対し、DES投与群では9個体中5個体、BPA投与群では11個体中5個体で見られた。40日齢における膈上皮の層の数は、DES投与群では卵巣を摘出しても対照群よりも有意に増加していたが、BPA投与群では有意な差はなかった。

このことから、胎仔期のDES投与により膈上皮の不可逆的増殖が誘導されるが、BPA投与では卵

巢依存の細胞増殖のみが誘導されていることが明らかとなった。しかし、母親マウスに重水素ラベルしたBPAを投与すると、少なくとも3時間後には胎仔組織へ移行していることが確認されたことから、胎盤を通してBPAが胎仔へ直接作用し、膣上皮の細胞分裂の促進、および多卵性卵胞の発生を引き起こしていると考えられる。

一方、雄マウスではDES投与により潜伏精巣が発生し、精巣も小さく単位面積当たりの精細管の数も有意に減少していた。また、生殖細胞数はBPA投与群で有意に減少しており、セルトリ細胞数はDES投与群で有意に減少していた。雌マウスの時と同様に、これらのマウスを生育し、60日齢における精子形成率を調べたところ、DES投与群のみ有意に減少していた。

#### D. 考察

エストロゲン非依存の細胞増殖には、正常マウスに比べてmRNAの発現が増加しており、EGF及びTGF- $\alpha$ が関与していると考えられる。出生直後のDES処理によりエストロゲンレセプター(ER)の発現が誘導されることが明らかとなっているため、DESによって発現誘導されたERを介して、多量のシグナルが伝達されてEGF及びTGF- $\alpha$ が恒久的に発現し、エストロゲン非依存的に膣上皮細胞の増殖が引き起こされていると考えられる。

以上の研究より、出生直後のDES投与による膣上皮の不可逆的増殖には、細胞死の制御機構の異常、および、細胞増殖の制御機構の異常、特に、EGF及びTGF- $\alpha$ の恒久的な高発現を伴っていることが示唆された。また、妊娠マウスへのBPA投与により、胎仔生殖器官においてDES投与群と類似の影響が見られることが明らかとなった。しかし、成熟後もこの影響が残るというようないわゆる不可逆的な影響は、今回用いた濃度でのBPA投与では引き起こされなかった。

#### E. 結論

周生期DES処理群のマウスでは、卵巣を摘出しても膣上皮細胞のアポトーシスが增加せず、また、細胞分裂率の低下も見られなかった。

胎仔期のDES投与により膣上皮の不可逆的増殖が誘導されるが、BPA投与では卵巣依存の細胞増殖のみが誘導されていることが明らかとなった。胎仔期のDESおよびBPA投与は胎仔精巣に影響を及ぼすが、不可逆的な影響はDESのみであり、今回の濃度でのBPA投与では正常な精子形成が行われていることが明らかとなった。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Hirabayashi, H., T. Sato, S. Kohno, M. Tanaka, S. Kobayashi, Y. Ohta and T. Iguchi: Apoptotic cell death in artificially induced deciduoma of pseudopregnant mice. *Anat. Rec.*, 254:205-213, 1999.
2. Fukazawa, Y., Y. Yamamura, T. Sato, T. Iguchi and Y. Ohta: Mode of cell death in the rat metrial gland during peripartum regression. *Anat. Rec.*, 252: 369-377, 1998.
3. Yoshimura, K., Y. Sakurai, D. Nishimura, Y. Tsuruo, M. Nomura, S. Kawato, C. Seiwa, T. Iguchi, K. Itoh and H. Asou: Monoclonal antibody 14F7, which recognizes a stage-specific immature oligodendrocyte surface molecule, inhibits oligodendrocyte differentiation mediated in co-culture with astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 54: 79-96, 1998.
4. Yamanaka, S., K. Arizono, Y. Matsuda, K. Soyano, H. Urushitani, T. Iguchi and R. Sakakibara: Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62: 1196-1200, 1998.