

網羅的遺伝子発現解析を用いた精巢毒性評価に関する研究

松山, 拓矢

<https://hdl.handle.net/2324/7329561>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士（農学）, 論文博士
バージョン :
権利関係 :



網羅的遺伝子発現解析を用いた精巣毒性評価に関する研究

松山 拓矢

2024

目次

序論	1
第一章 細胞特異的遺伝子セットによる精巣毒性評価：DNB 誘発精巣毒性モデルラットを用いた検討	4
第一節 小序	4
第二節 材料と方法	6
第三節 結果	9
第四節 考察	10
第二章 精母細胞特異的遺伝子セットによる精巣毒性評価：EGME 誘発精巣毒性モデルラットを用いた検討	31
第一節 小序	31
第二節 材料と方法	33
第三節 結果	35
第四節 考察	37
第三章 精巣毒性発現に関連する遺伝子発現変動の検討：DNB 誘発精巣毒性モデルラットを用いた解析	44
第一節 小序	44
第二節 材料と方法	45
第三節 結果	47
第四節 考察	49
第四章 精巣毒性発現に関連する遺伝子発現変動の検討：EGME 誘発精巣毒性モデルラットを用いた解析	60
第一節 小序	60
第二節 材料と方法	61
第三節 結果	62
第四節 考察	65
第五章 精巣毒性モデルラットにおける Tektin4 遺伝子発現変動解析	77
第一節 小序	77
第二節 材料と方法	79
第三節 結果	82
第四節 考察	83
総合考察	89
引用文献	94
謝辞	104

序論

精巣はしばしば医薬品の毒性標的となる臓器であり、対象患者の生殖機能へのリスクから精巣毒性は医薬品開発中止の要因となりうる。精巣は精細管とその間質から構成されており、精細管は様々な段階の精子形成細胞とそれらを囲むセルトリ細胞からなる精上皮が精子形成の場として機能している。また、間質にはライディッヒ細胞等の種々の細胞が存在し、アンドロゲン産生の場となっている。これら精細管と間質は種々の分泌因子によって互いに影響しあい、下垂体や視床下部からのホルモンの制御も受けている。一般に、精巣毒性は、医薬品開発で実施される非臨床安全性試験の中で病理組織学的に検査することによって、その器質的変化を鋭敏に検出することが可能である (Creasy 1997; Mangelsdorf et al. 2003)。しかし、精巣の構造と機能の複雑さから、非臨床安全性試験に用いられる通常の病理組織学的検査のみをもって毒性発現機序を含む詳細な毒性学的特性を明らかにすることは比較的困難である。

マイクロアレイや RNA-sequencing などのゲノミクス技術の進展にともない、その技術は医薬品の毒性評価においても活用され、トキシコゲノミクスと呼ばれる分野に発展した (Nuwaysir et al. 1999)。化合物曝露後の組織や細胞における網羅的な遺伝子発現変動は、器質的な毒性発現に先行又は並行して変動する分子イベントを包括的に検出する定量的パラメーターであり、毒性発現に関与する分子メカニズムを客観的に推定する上で重要な手掛かりとなる (Orphanides 2003)。

医薬品の研究開発における網羅的遺伝子発現解析の活用事例として、バイオマーカー遺伝子を用いた肝毒性評価が挙げられる (Kiyosawa et al. 2009a)。化合物を曝露させた後に取得した網羅的遺伝子発現変動データは、多くの生物学的パスウェイ間（ストレス応答、エネルギー代謝、細胞死制御など）の相互作用から生じる複雑な遺伝子発現変動が混在しており、この膨大なデータから個々の分子イベントを考察することは難しい。そこで、特定の毒性学的エンドポイントと密接に関連する遺伝子の発現変動をバイオマーカーとし、

個々の分子イベントの変化を考察する際の指標とする手法が用いられる。候補となるバイオマーカー遺伝子セットを同定する手法のひとつとして、毒性表現型や分子メカニズムが十分に研究されている毒性物質を用いて、既知の毒性エンドポイントと発現変動が関連する遺伝子セットを抽出する方法がある。例えば肝毒性の分野では、グルタチオン枯渇剤 L-buthionine (S, R)-sulfoximine を投与したラット肝臓を用いて、肝臓中グルタチオン量と mRNA 発現変動が逆相関する遺伝子を選別することで、肝臓中グルタチオン枯渇に関連するバイオマーカー候補遺伝子が同定されている (Kiyosawa et al. 2004; Kiyosawa et al. 2007)。肝毒性に関してはこのようなバイオマーカーが多数同定されており (Kiyosawa et al. 2009a)、医薬品候補化合物の肝毒性プロファイリングや化合物スクリーニングに広く利用されている。一方、精巣毒性に関する網羅的遺伝子発現解析の事例は肝毒性に比して限られており、また毒性評価に適用可能なバイオマーカーについての知見も十分でない。

このような背景のもと、本研究では精巣毒性評価に焦点をあて、網羅的遺伝子発現解析の有用性について検討を行った。まず第一章及び第二章では、精母細胞に高発現する遺伝子为新規バイオマーカー候補遺伝子として選別し、その有用性を検討する目的で精巣毒性モデルラットを用いて、その毒性エンドポイントの変化と新規バイオマーカーの挙動の相関を解析した。第一章では、1,3-dinitrobenzene (DNB) 誘発精巣毒性モデルラットを作製して精母細胞障害を惹起するとともに、精巣のマイクロアレイ解析を実施して精母細胞特異的遺伝子の発現変動との関連を検討した。続いて第二章では、精母細胞特異的遺伝子のバイオマーカーとしての有用性をさらに検証するため、DNB とは異なる精巣毒性発現機序が知られる ethylene glycol monomethyl ether (EGME) 誘発精巣毒性モデルラットを用いて精巣のマイクロアレイ解析を行い、バイオマーカー遺伝子の発現変動と精母細胞障害との関連を検討した。また、精母細胞特異的遺伝子の発現変動に対するテストステロンの影響を検討するため、アンドロゲン合成酵素阻害剤である ketoconazole (KET) を投与したテストステロン低下ラットを用いて精母細胞特異的遺伝子の発現変動を同様に評価した。第三章では、DNB 誘発精巣毒性モデルラットの精巣に対してマイクロアレイを用いた網

網羅的遺伝子発現解析を実施し、その毒性発現機序と関連する遺伝子発現変動について検討した。第四章では EGME 誘発精巣毒性モデルラットに対して網羅的遺伝子発現解析を実施し、その毒性発現機序に関連する変化について検討するとともに、EGME と KET によるテストステロン低下メカニズムの違いについて考察した。第五章では、精子の鞭毛を構成する Tektin ファミリー分子のひとつであるラット Tektin 4 に着目し、その発現プロファイルを解析するとともに化合物誘発精巣毒性における遺伝子発現変動について考察した。

第一章 細胞特異的遺伝子セットによる精巣毒性評価：DNB 誘発精巣毒性モデルラットを用いた検討

第一節 小序

精巣は、種々の発達段階の精子形成細胞（精祖細胞、精母細胞、円形精子細胞、及び伸長精子細胞）に加え、セルトリ細胞やライディッヒ細胞など多種多様な細胞が混在する臓器である。そのため、精巣ホモジネートから抽出した RNA には種々の細胞に由来する遺伝子発現変動情報が含まれることとなり、遺伝子発現解析により各細胞への影響を評価することは難しい。こうした課題への対応のひとつとして、発現細胞特異性の高い遺伝子を同定し、精巣毒性評価に際して、その発現変動を解析することは有用な評価指標となる可能性がある。先行研究において、ラット精巣の各精細管ステージや細胞毎の特徴的な遺伝子発現データが報告された（Johnston et al. 2008）。この先行研究では、精細管内の4つの細胞タイプ（セルトリ細胞、精祖細胞＋初期精母細胞、精母細胞、及び円形精子細胞）を遠心分離や酵素処理を用いて単離し、それぞれの細胞タイプ毎に実施したマイクロアレイデータが報告されている。そこで本研究では、報告された遺伝子発現データをもとに各細胞タイプで特異的に高発現する遺伝子を細胞特異的遺伝子セットとして選別し、精巣毒性評価のための新たなバイオマーカーとなるか検討した。

本章では毒性モデル動物として DNB 誘発精巣毒性モデルラットを作出して検討に用いた。Dinitrobenzene は染料中間体などに使用されるニトロ芳香族化合物であり、その異性体である DNB は精巣毒性を示すことが知られる（Blackburn et al. 1988）。DNB をラットに反復投与すると精巣萎縮が認められ、病理組織学的変化としては生殖細胞数の減少、変性／壊死、巨細胞形成、及び空胞化などがみられる（Cody et al. 1981; Irimura et al. 2000）。また、DNB はラットに単回投与することによって短期間で簡便に精巣毒性を惹起することができる（Blackburn et al. 1988; Hess et al. 1988; Strandgaard and Miller 1998）。DNB 誘発精巣毒性における標的細胞はセルトリ細胞であることが知られるとともに（Blackburn et al. 1988）、セルトリ細胞障害を介した二次的な影響として精母細胞の単細胞死が生じること

も報告されることから (Blackburn et al. 1988; Hess et al. 1988)、セルトリ細胞特異的遺伝子や精母細胞特異的遺伝子の発現変動を検討するに適した精巣毒性モデルと期待された。

本章では、細胞特異的遺伝子セットの新規バイオマーカーとしての可能性を検討する第一歩として、DNB 誘発精巣毒性モデルラットを作出して病理組織学的検査及びマイクロアレイ解析を実施し、惹起された精巣毒性と細胞特異的遺伝子セットの発現変動の関連について考察した。

第二節 材料と方法

動物

本章で実施した動物実験はすべて第一三共株式会社動物実験倫理審査委員会により承認されたものであり、動物の愛護及び管理に関する法律、及び第一三共株式会社の動物実験に関する標準操作手順書に準拠して行われた。

本実験には 9 週齢の雄性 F344/DuCrIj ラット（日本チャールス・リバー株式会社）を用いた。動物は温度 24 ± 2 °C、湿度 40%–70%、照明 12 時間／日の動物室にて自由摂餌及び自由飲水条件下で飼育した。動物（4 例／群）に 10、25、及び 50 mg/kg の DNB (Sigma-Aldrich) 又は溶媒（PEG 600、和光純薬工業株式会社）を経ロゾンデにより経口投与した。DNB の用量は既報（Blackburn et al. 1988; Hess et al. 1988）を参考にセルトリ細胞障害及び精母細胞障害を十分に惹起する用量として設定した。動物は投与 4 又は 24 時間後にイソフルラン麻酔下で安楽死させた後、解剖して精巣及び精巣上体を採材した。

病理組織学的検査

精巣（左）を formalin–sucrose–acetic acid 液で、精巣上体（左）を 10%(v/v)中性緩衝ホルマリンでそれぞれ固定した。固定した精巣及び精巣上体を常法に従ってパラフィンに包埋して病理組織学的標本作製し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。精巣の病理組織学的検査は、既報（Takahashi and Matsui 1993）と同様に、精細管を Stage I から VI、VII から VIII、IX から XI、及び XII から XIV の 4 つに分類して評価した（Figure 1）。また、観察された各組織学的所見については、障害がみられた精細管の範囲を基準に、score 1（軽微）：20%まで、score 2（軽度）：20-40%、score 3（中程度）：40-60%、score 4（重度）：ほぼすべて、としてスコア化した。精巣上体については、観察された細胞残渣の頻度を基準に、score 1（軽微）又は score 2（軽度）としてスコア化した。

RNA 抽出

精巢（右）を液体窒素で凍結し、遺伝子発現解析に使用するまで -80°C で保存した。精巢サンプルは TRIzol®試薬（Life Technologies Inc.）でホモジナイズし、標準プロトコールに従って Total RNA を単離した。

マイクロアレイ解析

抽出した RNA について、GeneChip® IVT Express kit（Affymetrix Inc.）を用い、標準プロトコールに従って tcDNA の合成、精製、ビオチン標識 cDNA の合成を行った。ビオチン標識した cRNA 標的サンプル（約 10 g）をそれぞれ GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array（Affymetrix Inc.）に 45°C で 16 時間ハイブリダイズさせ、その後 Fluidics Station 400（Affymetrix Inc.）を使用してストレプトアビジン-フィコエリトリンで洗浄・染色した。スキャンされた画像を GCOS software（Affymetrix, Inc.）を用いて MAS5 アルゴリズムで解析した。すべてのデータは global normalization によりスケールした。なお、マイクロアレイ解析は溶媒対照群、並びに DNB 25 及び 50 mg/kg 群に対して実施した。

細胞特異的遺伝子セット

先行研究（Johnston et al. 2008）で報告された精細管内の 4 つの細胞群（セルトリ細胞、精祖細胞＋初期精母細胞、精母細胞、及び円形精子細胞）のマイクロアレイデータをもとに、他の細胞群と比較して少なくとも 4 倍以上の発現レベルを有する遺伝子セットを抽出して、細胞特異的遺伝子セットと設定した（Tables 1-4）。それぞれの遺伝子セットのプローブ数は、セルトリ細胞特異的遺伝子で 56、精祖細胞＋初期精母細胞で 2、精母細胞で 41、円形精子細胞で 269 であった。

細胞特異的遺伝子セットの発現変動のスコア化

細胞特異的遺伝子セットの発現変動は、既報（Kiyosawa et al. 2009b） に準じて D-スコ

アを算出することでスコア化した。DNB 群の平均シグナル値を対照群のシグナル値で除することによって **signal log ratio** (SLR, base 2) を、DNB 群と対照群の両方の **Presence Call** の数を両群の動物の総数で除することによって **presence ratio** (PR) を算出した。遺伝子セット X が i 個のプローブセット ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_{i-1}, x_i$) から構成されるとき、計算された SLR を ($SLR_1, SLR_2, SLR_3, \dots, SLR_{i-1}, SLR_i$) とし、PR を ($PR_1, PR_2, PR_3, \dots, PR_{i-1}, PR_i$) とした。また、($SLR_1 \times PR_1, SLR_2 \times PR_2, SLR_3 \times PR_3, \dots, SLR_{i-1} \times PR_{i-1}, SLR_i \times PR_i$) の和を i で除したものを遺伝子セット X の遺伝子の「プローブセットごとの発現変動の全体的な方向」を示す指標、($[SLR_1 \times PR_1]^2, [SLR_2 \times PR_2]^2, [SLR_3 \times PR_3]^2, \dots, [SLR_{i-1} \times PR_{i-1}]^2, [SLR_i \times PR_i]^2$) の和を i で除したものを遺伝子セット X の遺伝子の「プローブセットごとの発現変動の全体的な程度」を示す指標とした。D-スコアは、これら 2 つの指標の積にスケーリングファクターとして 100 を乗じて算出した。

第三節 結果

DNB 誘発精巣毒性モデルラットの作出

病理組織学的検査結果を Table 5 に、精巣に生じた器質的障害の代表像を Figure 2 に示した。投与 4 時間後では、stage I から VI の精細管で軽微なセルトリ細胞の空胞化がみられたが、生殖細胞に変化はみられなかった。投与 24 時間後では、DNB 25 mg/kg 以上で精母細胞の単細胞死がみられ、50 mg/kg では増悪した。本所見は stage XII から XIV の精細管の精母細胞で顕著であった。また、25 mg/kg 以上で stage I から VI の精細管に軽微なセルトリ細胞の空胞化がみられた。精巣上体では、投与 24 時間後の 25 及び 50 mg/kg で生殖細胞の細胞残渣の増加がみられた。10 mg/kg では精巣及び精巣上体のいずれにも病理組織学的変化はみられなかった。

細胞特異的遺伝子セットの発現変動プロファイリング

各細胞特異的遺伝子セットの発現変動の全体的な方向性と程度について D スコアを用いて解析した (Figure 3)。投与 4 時間後では、各遺伝子セットの D スコアに顕著な変化はみられなかった。投与 24 時間後では、精母細胞特異的遺伝子セットの D スコアは 25 mg/kg 以上で用量の増加にともなって低下した。また、セルトリ細胞特異的遺伝子セットの D スコアは 50 mg/kg でわずかに増加した。精祖細胞＋初期精母細胞特異的遺伝子、及び円形精子細胞特異的遺伝子の D スコアには変動がみられなかった。

続いて、各細胞特異的遺伝子について個別の遺伝子発現変動をヒートマップで示した (Figure 4)。D スコアの低下がみられた精母細胞特異的遺伝子では、投与 24 時間後の 25 mg/kg 以上ではほぼすべての遺伝子で発現低下がみられた (Figure 4C)。一方、セルトリ細胞特異的遺伝子では、発現増加を示した遺伝子是一部であり、精母細胞特異的遺伝子でみられたような一様な発現変動はみられなかった (Figure 4A)。

第四節 考察

本章では、精巣毒性評価に適用可能な新規バイオマーカー遺伝子を探索することを目的に、遺伝子発現細胞の特異性の観点で細胞特異的遺伝子セットを選別し、DNB 誘発精巣毒性モデルラットでの発現変動を確認した。DNB 単回投与 24 時間後の病理組織学的検査では、25 及び 50 mg/kg で精母細胞の単細胞死及びセルトリ細胞の空胞化が観察された。これらの所見は、先行研究で報告された DNB の単回投与による精巣毒性の病理組織学的特徴と一致した (Blackburn et al. 1988; Hess et al. 1988)。この精巣毒性ラットモデルを用いて細胞特異的遺伝子セットの発現変動を解析した結果、精母細胞特異的遺伝子は精母細胞障害の増悪にともなって顕著に発現低下した。このことから、精母細胞特異的遺伝子の発現低下は精母細胞障害を反映した変化であることが示唆された。

DNB 誘発精巣毒性の最初の標的細胞はセルトリ細胞であることが知られ (Blackburn et al. 1988)、本研究においても病理組織学的検査でセルトリ細胞の空胞化がみられた。このことから、DNB 曝露はセルトリ細胞に対して何らかの毒性影響を与えたと考えられる。一方、セルトリ細胞特異的遺伝子には一部の遺伝子を除いて顕著な発現変動はみられなかった。詳細は不明であるが、本試験でみられたような軽微なセルトリ細胞障害では、セルトリ細胞特異的遺伝子の多くは発現変動しないことが示唆された。また、精祖細胞+初期精母細胞特異的遺伝子及び円形精子細胞特異的遺伝子の発現レベルは本条件下でほとんど変動しなかった。これは当該細胞に器質的障害が生じなかったためである可能性が考えられた。

本研究の限界として、上記の知見は単一の精巣毒性モデルラットでのみ検討されたものであることが挙げられる。精母細胞特異的遺伝子が精母細胞障害を検出する新規バイオマーカー候補となりうるか、DNB とは異なる機序の精母細胞障害モデルラットを用いてさらに検討することが重要である。また、セルトリ細胞特異的遺伝子、精祖細胞+初期精母細胞特異的遺伝子、及び円形精子細胞特異的遺伝子が、精母細胞特異的遺伝子と同様に当

該細胞の障害に際して発現変動を示すか否かを検討するためには、それぞれの発現細胞を高度に障害する精巣毒性モデルラットを用いた研究が必要と考えられた。

以上、本章の研究では、精母細胞特異的遺伝子の発現低下と精母細胞障害の関連が示唆され、精母細胞特異的遺伝子は精母細胞障害を検出するための新規バイオマーカーとなりうる可能性が示された。

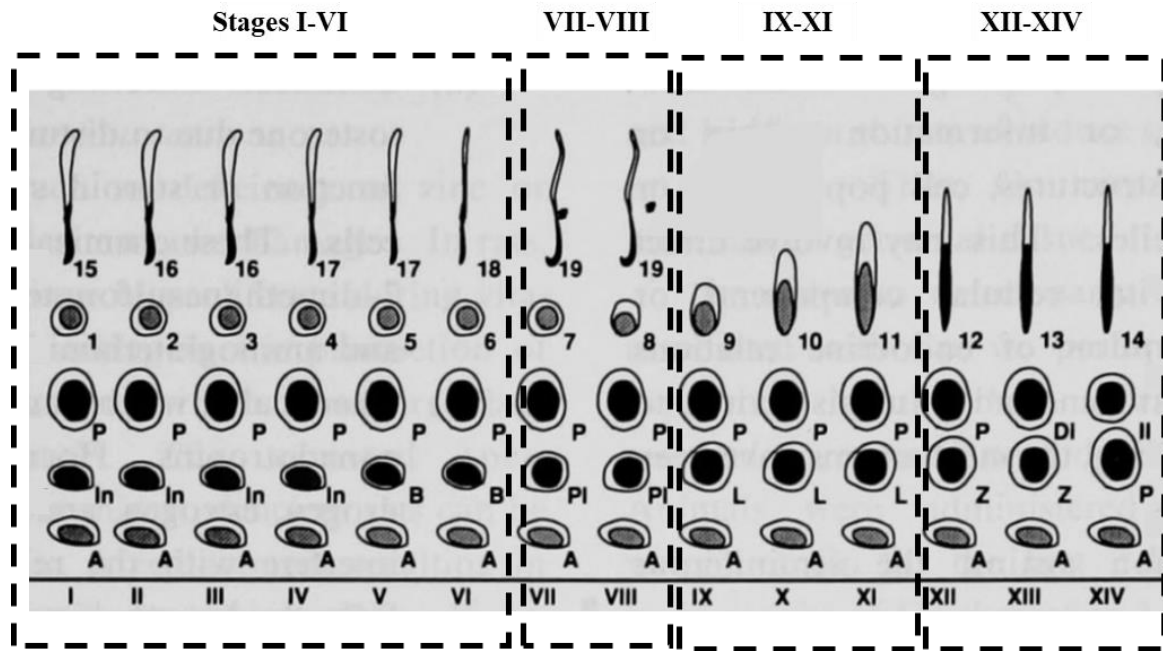


Figure 1: Classification of rat seminiferous epithelium stages for histopathological examination.

The stages of seminiferous tubule were classified into four groups as stages I–VI, VII–VIII, IX–XI and XII–XIV. A: type A spermatogonia, In: intermediate type spermatogonia, B: type B spermatogonia, Pl: preleptotene spermatocytes, L: leptotene spermatocytes, Z: zygotene spermatocytes, P: pachytene spermatocytes, D: diplotene spermatocytes, II: secondary spermatocytes, 1–19: spermatids (steps 1–19). Modified from (Takahashi and Matsui 1993).

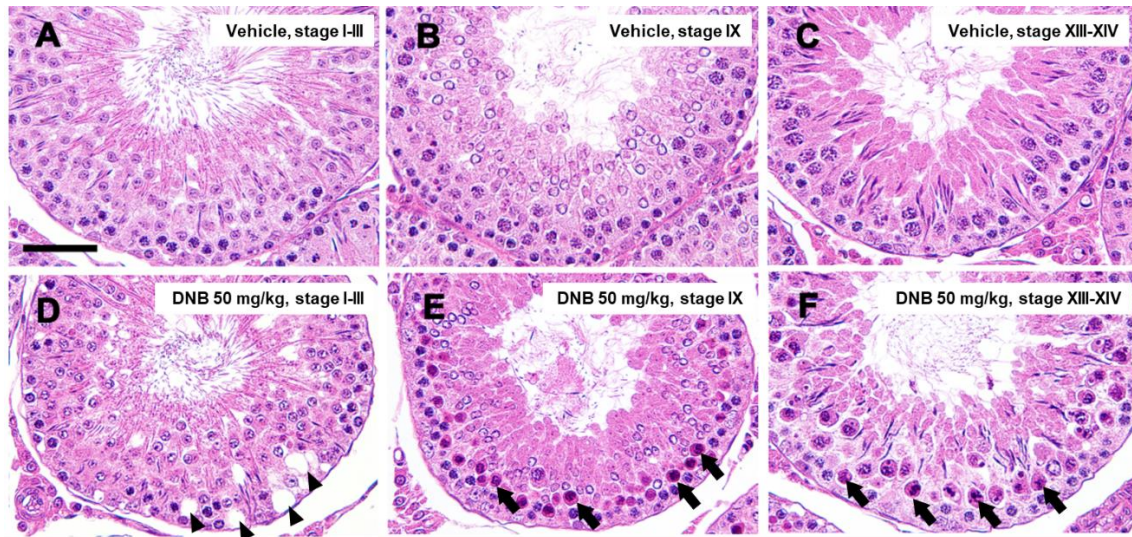


Figure 2. Representative light micrograph of histopathologic findings in the testis observed 24h after a single oral administration of vehicle or DNB at 50 mg/kg. (A) Vehicle, seminiferous tubule of stage I–III. (B) Vehicle, seminiferous tubule of stage IX. (C) Vehicle, seminiferous tubule of stage XIII–XIV. (D) DNB, seminiferous tubule of stage I–III. (E) DNB, seminiferous tubule of stage IX. (F) DNB, seminiferous tubule of stage XIII–XIV. Single cell death of spermatocytes (arrow) and vacuolation of Sertoli cells (arrowhead). The bar in the figure is 50 μ m and all figures are shown at the same magnification. H&E-stained sections.

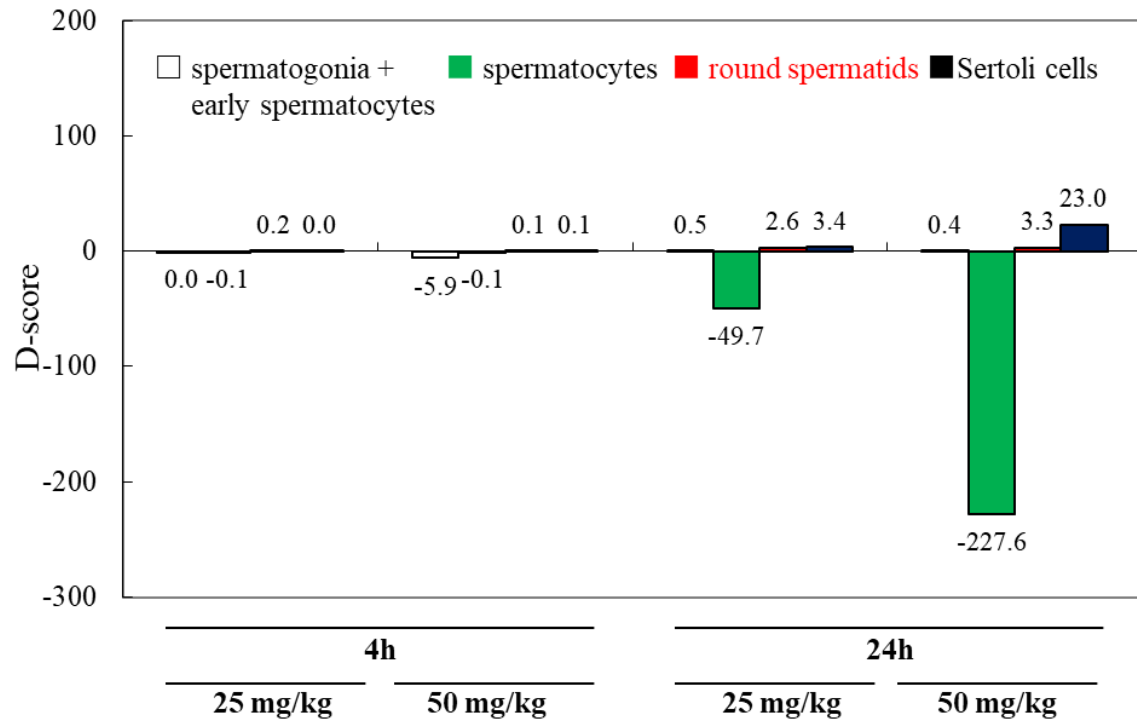


Figure. 3. D-score for the expression change of the cell type specific gene sets in testis at 4 or 24h after a single oral administration of DNB.

Table 1. Sertoli cell specific gene set

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1367794_at	A2M	alpha-2-macroglobulin
1371696_at	ADGRG1	adhesion G protein-coupled receptor G1
1367985_at	ALAS2	5'-aminolevulinate synthase 2
1368243_at	AMHR2	anti-Mullerian hormone receptor type 2
1382387_at	ANO1	anoctamin 1
1389651_at	APLN	apelin
1389107_at	CGNL1	cingulin like 1
1392948_at	CLIC6	chloride intracellular channel 6
1385763_at	CST9L	cystatin 9 like
1369947_at	CTSK	cathepsin K
1370097_a_at	CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
1373661_a_at	CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
1389244_x_at	CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
1374966_at	DCX	doublecortin
1371049_at	DPYSL4	dihydropyrimidinase like 4
1372306_at	ETHE1	ETHE1 persulfide dioxygenase
1373266_at	FAM107A	family with sequence similarity 107 member A
1379440_at	FSTL3	follistatin like 3
1370248_at	FXYP6	FXYP domain containing ion transport regulator 6
1371803_at	GM2A	ganglioside GM2 activator
1392888_at	GPC4	glypican 4
1371209_at	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
1388255_x_at	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
1384035_at	ILDR2	immunoglobulin like domain containing receptor 2
1387061_at	JUP	junction plakoglobin
1388433_at	KRT19	keratin 19
1387011_at	LCN2	lipocalin 2
1371875_at	MANBA	mannosidase beta

Table 1. Sertoli cell specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1373363_at	MAP1B	microtubule associated protein 1B
1374933_at	MCAM	melanoma cell adhesion molecule
1381575_at	NEB	nebulin
1375216_at	NECTIN2	nectin cell adhesion molecule 2
1393719_at	OSBPL3	oxysterol binding protein like 3
1369474_a_at	P2RX2	purinergic receptor P2X 2
1387578_a_at	P2RX2	purinergic receptor P2X 2
1369475_x_at	P2RX2	purinergic receptor P2X 2
1368940_at	P2RY2	purinergic receptor P2Y2
1387675_at	PLAU	plasminogen activator, urokinase
1377994_at	Pmaip1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
1384924_at	PRND	prion like protein doppel
1367851_at	PTGDS	prostaglandin D2 synthase
1367939_at	RBP1	retinol binding protein 1
1373886_at	REEP1	receptor accessory protein 1
1374892_at	SAT2	spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2
1382613_at	SHC4	SHC adaptor protein 4
1398660_at	Slc35f2	solute carrier family 35, member F2
1376709_at	SLC39A8	solute carrier family 39 member 8
1371568_at	SNCB	synuclein beta
1372626_at	TPD52L1	TPD52 like 1
1385899_at	TRIM16	tripartite motif containing 16
1386162_at	TXK	TXK tyrosine kinase
1371210_s_at		
1398600_at		
1394862_at		
1380206_at		
1386185_at		

Table 2. spermatogonia plus early spermatocytes specific gene set

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1382351_at	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
1383708_at	ITGBL1	integrin subunit beta like 1

Table 3. Spermatocytes specific gene set

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1376167_at	ASB1	ankyrin repeat and SOCS box containing 1
1374002_at	ATXN7L3B	ataxin 7 like 3B
1395600_at	CCDC117	coiled-coil domain containing 117
1393842_at	CCDC77	coiled-coil domain containing 77
1375910_at	CDC42EP3	CDC42 effector protein 3
1387956_s_at	CKLF	chemokine like factor
1379226_at	CRYBG2	crystallin beta-gamma domain containing 2
1385139_at	FAM221A	family with sequence similarity 221 member A
1370037_at	FBN2	fibrillin 2
1395370_at	GMCL1	germ cell-less 1, spermatogenesis associated
1378002_at	HSPA4L	heat shock protein family A (Hsp70) member 4 like
1396274_at	IQCC	IQ motif containing C
1383785_at	LEF1	lymphoid enhancer binding factor 1
1392779_at	LOC102548848	uncharacterized LOC102548848
1391181_at	LOC102554879	uncharacterized LOC102554879
1383790_at	LOC102555217	zinc finger protein 120-like
1373038_at	MLLT10	MLLT10 histone lysine methyltransferase DOT1L cofactor
1383512_at	MLLT10	MLLT10 histone lysine methyltransferase DOT1L cofactor
1380446_at	MLLT10	MLLT10 histone lysine methyltransferase DOT1L cofactor
1394723_at	MLLT10	MLLT10 histone lysine methyltransferase DOT1L cofactor
1379376_at	MREG	melanoregulin
1391985_at	NRIP3	nuclear receptor interacting protein 3
1376704_a_at	NSMCE3	NSE3 homolog, SMC5-SMC6 complex component
1368654_at	NUP50	nucleoporin 50

Table 3. Spermatocytes specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1397341_at	PBK	PDZ binding kinase
1387373_at	PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein
1389370_at	PHF1	PHD finger protein 1
1390103_at	PHF2	PHD finger protein 2
1369622_at	PROK2	prokineticin 2
1370476_at	STAMBP	STAM binding protein
1392889_at	SUGP2	SURP and G-patch domain containing 2
1372664_at	TRAF2	TNF receptor associated factor 2
1382099_at	VPS26A	VPS26 retromer complex component A
1395596_at	-	-
1380350_at	-	-
1389266_at	-	-
1380838_at	-	-
1394468_at	-	-
1377082_at	-	-
1391118_at	-	-
1379610_at	-	-

Table 4. Round spermatid specific gene set

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1384918_at	1700013D24Rik	RIKEN cDNA 1700013D24 gene
1396951_at	4930407I10Rik	RIKEN cDNA 4930407I10 gene
1379854_at	ABHD5	abhydrolase domain containing 5, lysophosphatidic acid acyltransferase
1370094_at	ACRV1	acrosomal vesicle protein 1
1386926_at	ACSL5	acyl-CoA synthetase long chain family member 5
1385244_at	Adam4/Gm4787	predicted gene 4787
1371067_at	Adam6	ADAM metallopeptidase domain 6A
1381311_at	ADGRE1	adhesion G protein-coupled receptor E1
1377145_at	ADGRV1	adhesion G protein-coupled receptor V1
1376296_at	ADIG	adipogenin
1379326_at	ADTRP	androgen dependent TFPI regulating protein
1381574_at	AGMO	alkylglycerol monooxygenase
1368558_s_at	AIF1	allograft inflammatory factor 1
1389185_at	AK1	adenylate kinase 1
1370011_at	AK1	adenylate kinase 1
1369470_at	AKAP14	A-kinase anchoring protein 14
1381783_at	AKAP3	A-kinase anchoring protein 3
1383176_at	AKIP1	A-kinase interacting protein 1
1383390_at	AMER2	APC membrane recruitment protein 2
1382488_at	ANKEF1	ankyrin repeat and EF-hand domain containing 1
1380166_at	Ankrd53	ankyrin repeat domain 53
1390253_at	ANKRD9	ankyrin repeat domain 9
1376900_at	APTX	aprataxin
1398408_at	ARMC3	armadillo repeat containing 3
1385361_at	ATP10A	ATPase phospholipid transporting 10A (putative)
1385549_at	BC048671	cDNA sequence BC048671
1381630_at	C11orf91	chromosome 11 open reading frame 91
1372598_at	C16orf74	chromosome 16 open reading frame 74
1381391_at	C17orf80	chromosome 17 open reading frame 80
1398650_at	C1orf185	chromosome 1 open reading frame 185
1377885_at	C2orf88	chromosome 2 open reading frame 88
1395391_at	C3orf84	chromosome 3 open reading frame 84

Table 4. Round spermatid specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1396499_at	C7h12orf54	similar to human chromosome 12 open reading frame 54
1371922_at	CA12	carbonic anhydrase 12
1398431_at	CA8	carbonic anhydrase 8
1390358_at	CACNA2D3	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 3
1369752_a_at	CAMK4	calcium/calmodulin dependent protein kinase IV
1368893_at	CAP2	cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 2
1369869_at	CAPZA3	capping actin protein of muscle Z-line subunit alpha 3
1396180_at	CARMIL1	capping protein regulator and myosin 1 linker 1
1369754_a_at	CAST	calpastatin
1377537_at	Ccdc179	coiled-coil domain containing 179
1383200_at	CCDC81	coiled-coil domain containing 81
1386755_at	CCDC91	coiled-coil domain containing 91
1382265_at	CCSER2	coiled-coil serine rich protein 2
1387610_at	CD46	CD46 molecule
1376474_at	CDRT4	CMT1A duplicated region transcript 4
1384365_at	CDYL	chromodomain Y like
1370352_at	Ces1f	carboxylesterase 1F
1397919_at	CFAP100	cilia and flagella associated protein 100
1396705_at	CFAP107	cilia and flagella associated protein 107
1373798_at	CFAP276	cilia and flagella associated protein 276
1375992_at	CFAP77	cilia and flagella associated protein 77
1376166_at	CFAP90	cilia and flagella associated protein 90
1368675_at	Chn2	chimerin 2
1385769_at	CIMAP1A	ciliary microtubule associated protein 1A
1391893_at	CLP1	cleavage factor polyribonucleotide kinase subunit 1
1373747_at	CNIH2	cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2
1368767_at	CST8	cystatin 8
1375001_at	CYTL1	cytokine like 1
1391045_at	DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2
1395572_at	DNAJA4	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A4
1385735_at	DNAJB7	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B7
1371982_at	DPY30	dpy-30 histone methyltransferase complex regulatory subunit
1388101_at	DPYSL3	dihydropyrimidinase like 3

Table 4. Round spermatid specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1381578_at	Dusp13b	dual specificity phosphatase 13B
1393137_at	DYNLT5	dynein light chain Tctex-type family member 5
1382356_at	EFHC2	EF-hand domain containing 2
1396450_at	ENAH	ENAH actin regulator
1379970_at	EPHA4	EPH receptor A4
1369096_at	EPHA7	EPH receptor A7
1376155_at	FAM151B	family with sequence similarity 151 member B
1398662_at	FAM167A	family with sequence similarity 167 member A
1395493_at	FAM209B	family with sequence similarity 209 member B
1397287_at	FANCD2OS	FANCD2 opposite strand
1377129_at	FBXO39	F-box protein 39
1396729_at	FER1L5	fer-1 like family member 5
1372086_at	FHDC1	FH2 domain containing 1
1387386_at	FOXJ1	forkhead box J1
1385421_at	FREY1	Frey regulator of sperm-oocyte fusion 1
1383657_at	FSCN3	fascin actin-bundling protein 3
1384753_at	GARIN4	golgi associated RAB2 interactor family member 4
1393818_s_at	GARIN5A	golgi associated RAB2 interactor 5A
1385302_at	GDPD1	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1
1380411_at	GOT1L1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1 like 1
1387670_at	GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2
1382062_at	GSTCD	glutathione S-transferase C-terminal domain containing
1384625_at	GTSF1L	gametocyte specific factor 1 like
1368974_at	GUCY1A2	guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2
1371959_at	H2AC18/H2AC19	H2A clustered histone 18
1390988_at	H2a12a (includes others)	H2A histone family member L2A
1385477_at	H2ap	H2A.P histone
1381168_at	HIPK4	homeodomain interacting protein kinase 4
1393986_at	HMGB4	high mobility group box 4
1377824_a_at	IGF2BP3	insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3
1388277_at	Ig1c1	immunoglobulin lambda constant 1
1391806_at	Itih2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2

Table 4. Round spermatid specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1387291_at	ITIH3	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3
1391618_at	KIFAP3	kinesin associated protein 3
1388068_at	KLC3	kinesin light chain 3
1368363_at	KLF5	KLF transcription factor 5
1391022_at	LAMB3	laminin subunit beta 3
1371094_at	LHX2	LIM homeobox 2
1398021_at	LOC100363883 (includes others)	similar to hypothetical protein 4930474N05
1386370_at	LOC100911251 (includes others)	disks large homolog 5-like
1380538_at	LOC100911489	uncharacterized LOC100911489
1381505_at	LOC100911574	uncharacterized LOC100911574
1395755_at	LOC100912617	uncharacterized LOC100912617
1382362_at	LOC102547287	zinc finger protein 728-like
1373177_x_at	LOC102547811 (includes others)	uncharacterized LOC120098581
1393884_at	LOC102548489	uncharacterized LOC102548489
1377460_at	LOC102552398	uncharacterized LOC102552398
1381405_at	LOC102553131	uncharacterized LOC102553131
1376453_at	LOC102555451	uncharacterized LOC102555451
1397537_at	LOC103690742 (includes others)	Spetex-2H protein
1377324_at	LOC689600	hypothetical protein LOC689600
1385168_at	LRIF1	ligand dependent nuclear receptor interacting factor 1
1381789_at	LYZL6	lysozyme like 6
1387324_at	MAK	male germ cell associated kinase
1368411_a_at	MAP2	microtubule associated protein 2
1396381_at	MATCAP1	microtubule associated tyrosine carboxypeptidase 1
1384696_at	MGC116197 (includes others)	similar to RIKEN cDNA 1700001E04
1384210_at	MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2
1384748_at	MMEL1	membrane metalloendopeptidase like 1

Table 4. Round spermatid specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1387368_at	MRAS	muscle RAS oncogene homolog
1373797_at	NAA80	N-alpha-acetyltransferase 80, NatH catalytic subunit
1384734_at	NCAM2	neural cell adhesion molecule 2
1393614_at	NECAB3	N-terminal EF-hand calcium binding protein 3
1369404_a_at	NRXN1	neurexin 1
1393753_at	NUCD1	NudC domain containing 1
1398093_at	Nup62cl	nucleoporin 62 C-terminal like
1368091_at	OPLAH	5-oxoprolinase, ATP-hydrolysing
1390923_a_at	OSBPL1A	oxysterol binding protein like 1A
1370336_at	OSGIN1	oxidative stress induced growth inhibitor 1
1385154_at	OTUB2	OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding 2
1397207_at	OTUD4	OTU deubiquitinase 4
1379190_at	Oxct2a	3-oxoacid CoA transferase 2A
1377566_at	P3r3urf	Pik3r3 upstream reading frame
1382569_at	PAQR9	progesterone and adipoQ receptor family member 9
1368209_at	PDZK1IP1	PDZK1 interacting protein 1
1370833_at	PEX5L	peroxisomal biogenesis factor 5 like
1393307_at	PHACTR3	phosphatase and actin regulator 3
1368262_at	PHLPP1	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1
1372640_at	PI16	peptidase inhibitor 16
1385602_at	PIERCE1	piercer of microtubule wall 1
1385629_at	PIERCE1	piercer of microtubule wall 1
1387065_at	PLCD4	phospholipase C delta 4
1391845_at	PLEKHH2	pleckstrin homology, MyTH4 and FERM domain containing H2
1385678_at	POLK	DNA polymerase kappa
1371059_at	PRKAR2A	protein kinase cAMP-dependent type II regulatory subunit alpha
1370039_at	PRM2	protamine 2
1385207_at	Prr27	proline rich 27
1398684_s_at	PRSS37	serine protease 37
1368090_at	PRX	periaxin
1389800_at	PWWP2B	PWWP domain containing 2B

Table 4. Round spermatid specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1384653_at	Pwwp4	PWWP domain containing 4
1387147_at	RAB3C	RAB3C, member RAS oncogene family
1369024_at	RABEP2	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2
1384528_at	RAI14	retinoic acid induced 14
1384324_at	RBM4	RNA binding motif protein 4
1375870_a_at	RBMS1	RNA binding motif single stranded interacting protein 1
1377152_at	RFX1	regulatory factor X1
1385498_at	RHBDD1	rhomboid domain containing 1
1376701_a_at	Rhno1	RAD9-HUS1-RAD1 interacting nuclear orphan 1
1389777_at	RIBC1	RIB43A domain with coiled-coils 1
1391865_at	RNF151	ring finger protein 151
1383454_a_at	RPS6KC1	ribosomal protein S6 kinase C1
1375073_at	SAMD11	sterile alpha motif domain containing 11
1368663_at	Samd13	sterile alpha motif domain containing 13
1385746_at	Samt3	spermatogenesis associated multipass transmembrane protein 3
1370486_a_at	SAXO4	stabilizer of axonemal microtubules 4
1385447_at	SCP2D1	SCP2 sterol binding domain containing 1
1387671_at	SCTR	secretin receptor
1372847_at	Sdhaf3	succinate dehydrogenase complex assembly factor 3
1370116_at	SEPTIN3	septin 3
1389448_at	Septin4	septin 4
1392714_at	SERPINB11	serpin family B member 11
1385511_at	SEZ6L	seizure related 6 homolog like
1393919_at	SGMS2	sphingomyelin synthase 2
1385351_at	SH3D21	SH3 domain containing 21
1370419_a_at	SH3KBP1	SH3 domain containing kinase binding protein 1
1384231_at	SHCBP1	SHC binding and spindle associated 1
1370609_a_at	SLC16A7	solute carrier family 16 member 7
1386274_at	SLC17A2	solute carrier family 17 member 2
1379805_at	SLC41A2	solute carrier family 41 member 2
1368778_at	SLC6A6	solute carrier family 6 member 6
1393892_at	SMIM23	small integral membrane protein 23
1386705_at	Smkr1	small lysine-rich protein 1

Table 4. Round spermatid specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1385036_at	SNCAIP	synuclein alpha interacting protein
1393376_at	SOX6	SRY-box transcription factor 6
1384843_at	SPACA3	sperm acrosome associated 3
1393489_at	SPACA9	sperm acrosome associated 9
1368620_at	SPAG4	sperm associated antigen 4
1387326_at	Spam1	sperm adhesion molecule 1
1368640_at	SPATA19	spermatogenesis associated 19
1381446_at	SPATA31A6 (includes others)	SPATA31 subfamily A member 6
1377567_at	SPATA46	spermatogenesis associated 46
1374168_at	SPHKAP	SPHK1 interactor, AKAP domain containing
1380536_at	Spmip11	sperm microtubule inner protein 11
1389142_at	SQOR	sulfide quinone oxidoreductase
1372770_at	SRI	sorcin
1397953_at	STAMBPL1	STAM binding protein like 1
1385042_at	SUFU	SUFU negative regulator of hedgehog signaling
1396339_at	Tafa1	TAFA chemokine like family member 1
1380936_at	TBATA	thymus, brain and testes associated
1385494_at	TBC1D23	TBC1 domain family member 23
1394309_at	TEKT5	tektin 5
1368748_at	TESK2	testis associated actin remodelling kinase 2
1392419_at	TEX46	testis expressed 46
1385179_at	TEX56P	testis expressed 56, pseudogene
1392944_at	TLN2	talin 2
1391115_at	TMEM81	transmembrane protein 81
1396365_at	TMEM89	transmembrane protein 89
1387370_at	TMOD1	tropomodulin 1
1371354_at	TNNC1	troponin C1, slow skeletal and cardiac type
1393981_at	TOGARAM1	TOG array regulator of axonemal microtubules 1
1397568_at	TP53INP2	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2
1378617_at	TRERF1	transcriptional regulating factor 1
1387576_at	TRIM17	tripartite motif containing 17
1377291_at	TRIM66	tripartite motif containing 66

Table 4. Round spermatid specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1382315_at	TSC22D4	TSC22 domain family member 4
1376668_at	Ttc39a	tetratricopeptide repeat domain 39A
1377420_at	TTLL3	tubulin tyrosine ligase like 3
1385623_at	TULP2	TUB like protein 2
1395360_at	USP30	ubiquitin specific peptidase 30
1385527_at	USP7	ubiquitin specific peptidase 7
1394393_at	USP7	ubiquitin specific peptidase 7
1398426_at	VASH2	vasohibin 2
1374776_at	VASH2	vasohibin 2
1374589_at	VEZT	vezatin, adherens junctions transmembrane protein
1385449_s_at	VPS37B	VPS37B subunit of ESCRT-I
1394935_at	Wasf2	WASP family member 2
1376256_at	Wdfy1	WD repeat and FYVE domain containing 1
1373263_at	WDR74	WD repeat domain 74
1395268_at	WWP1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
1396322_at	ZC2HC1B	zinc finger C2HC-type containing 1B
1395169_at	Zcchc8	zinc finger CCHC-type containing 8
1384881_at	ZDHHC19	zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 19
1376432_at	ZFAND3	zinc finger AN1-type containing 3
1386793_at	Zfp61	zinc finger protein 61
1398663_at	Zfp61	zinc finger protein 61
1396325_at	Zfp819	zinc finger protein 819
1378571_at	ZNF385B	zinc finger protein 385B
1393944_at	ZNF521	zinc finger protein 521
1391188_at	-	-
1375761_at	-	-
1390580_at	-	-
1396522_at	-	-
1393469_at	-	-
1378651_at	-	-
1373985_at	-	-
1396211_at	-	-
1394206_s_at	-	-

Table 4. Round spermatid specific gene set (continued)

ID	Symbol	Entrez Gene Name
1391296_at	-	-
1379038_at	-	-
1392776_at	-	-
1396210_at	-	-
1390680_at	-	-
1389637_at	-	-
1395196_at	-	-
1392395_at	-	-
1384605_at	-	-
1386416_at	-	-
1385726_at	-	-
1396006_at	-	-
1379135_at	-	-
1395806_at	-	-
1393311_at	-	-
1392193_at	-	-

Table 5 Histopathological findings in the rats following a single dose of DNB

	4 h						24 h								
	0	10	25	50		0	10	25			50				
Number of animals	4	4	4	4		4	4	4			4				
Histopathological grade	NA	NA	0	1	0	1	NA	NA	0	1	2	0	1	2	3
Testis															
Stage I–VI															
Single cell death, spermatocyte	—	—	—	—		—	—	—			0	4	0	0	
Giant cell formation	—	—	—	—		—	—	0	4	0	—				
Vacuolation, Sertoli cell	—	—	3 ^a	1	3	1	—	—	2	2	0	0	0	4	0
Stage VII–VIII															
Single cell death, spermatocyte	—	—	—	—		—	—	—			0	4	0	0	
Vacuolation, Sertoli cell	—	—	—	—		—	—	3	1	0	0	4	0	0	
Stage IX–XI															
Single cell death, spermatocyte	—	—	—	—		—	—	0	4	0	0	0	2	2	
Vacuolation, Sertoli cell	—	—	—	—		—	—	—			0	4	0	0	
Stage XII–XIV															
Single cell death, spermatocyte	—	—	—	—		—	—	0	1	3	0	0	1	3	
Giant cell formation	—	—	—	—		—	—	0	4	0	—				
Vacuolation, Sertoli cell	—	—	—	—		—	—	—			—				
Epididymis															
Increased debris, spermatogenic cell	—	—	—	—		—	—	3	1	0	0	4	0	0	

NA: Not available, — or 0: within normal limit, 1: minimal, 2: mild, 3: moderate

a: Number of animals showing the findings with each grade

第二章 精母細胞特異的遺伝子セットによる精巣毒性評価：EGME 誘発精巣毒性モデルラットを用いた検討

第一節 小序

前章の研究の結果、精母細胞特異的遺伝子の mRNA レベルの低下は DNB により誘発された精母細胞障害を反映する新規バイオマーカーとなる可能性が示唆された。一方、精母細胞特異的遺伝子の発現低下と精母細胞障害の関連を一般化し、バイオマーカーとして精巣毒性評価に用いるには、DNB 誘発精巣毒性モデルラットのみならず、他の精巣毒性モデル化合物を用いて惹起した精母細胞障害においても同様に精母細胞特異的遺伝子の発現低下がみられることが重要である。そこで本章では、精母細胞特異的遺伝子のさらなる検討事例として、EGME 誘発精巣毒性モデルラットを用いた。EGME は、塗料や水性洗剤などの工業溶剤として広く使用される一方で、EGME 及びその代謝物である methoxy acetic acid (MAA) は、マウス (Nagano et al. 1979)、ラット (Chapin et al. 1984; Foster et al. 1983)、ウサギ (Miller et al. 1983)、サル (Sakurai et al. 2015)、及びヒト (Ratcliffe et al. 1989; Veulemans et al. 1993; Welch et al. 1988) において精巣毒性を惹起する。DNB がセルトリ細胞への作用を介して二次的に精母細胞障害を惹起する (Blackburn et al. 1988) のに対し、EGME は精母細胞を直接的に標的とすることが知られており (Chapin et al. 1984; Foster et al. 1983)、DNB とは異なる毒性発現機序を有する精巣毒性物質である。本章では、EGME の単回投与により精母細胞毒性モデルラットを作成し、精母細胞障害と精母細胞特異的遺伝子の発現変動の関連について考察した。

精母細胞特異的遺伝子のバイオマーカーとしての頑健性を検討するためには、その発現減少と精母細胞障害の間に何らかの交絡因子が介在する可能性を考慮する必要がある。DNB 及び EGME 誘発精巣毒性モデルラットでは、毒性発現に対する寄与は不明であるものの、テストステロン低下が観察されている (Ludwig et al. 2012; Reader et al. 1991)。テストステロンシグナル経路は精子形成に重要な役割を果たしており (Sharpe 1994)、セルトリ細胞における多くの遺伝子発現の制御を通じて精子形成や生殖細胞の生存に影響する

(Petrusz et al. 2005; Sadate-Ngatchou et al. 2004)。また、アンドロゲンシグナルの抑制は、減数分裂期での精子形成不全 (De Gendt et al. 2004)、生殖細胞の精上皮からの脱落 (O'Donnell et al. 1996)、血液精巣関門の障害 (McCabe et al. 2010; Meng et al. 2011) などの機能異常を引き起こす。これらの知見を勘案すると、テストステロン低下は精母細胞の遺伝子発現に影響を与える可能性が考えられる。そこで本章では、潜在的な交絡因子としてテストステロンを想定し、その影響を検討するため、アンドロゲン合成酵素阻害剤である KET を単回投与することにより急性のテストステロン低下モデルラットを作出し、精巣中テストステロンの変動と精母細胞特異的遺伝子の発現変動の関連を検討した。

第二節 材料と方法

動物

本章で実施した動物実験はすべて第一三共株式会社動物実験倫理審査委員会により承認されたものであり、動物の愛護及び管理に関する法律、及び第一三共株式会社の動物実験に関する標準操作手順書に準拠して行われた。

本実験には 9 週齢の雄性 F344/DuCrIj ラット（日本チャールス・リバー株式会社）を用いた。動物は温度 24 ± 2 °C、湿度 40%–70%、照明 12 時間／日の動物室にて自由摂餌及び自由飲水条件下で飼育した。動物（4 例／群）に 200、600、及び 2000 mg/kg の EGME（Sigma-Aldrich Inc）、又は 30 及び 300 mg/kg の KET（LKT Laboratories Inc）を経口ゾンデで単回経口投与した。また、溶媒対照群として 0.5%メチルセルロース（EGME）及び 0.25N 塩酸（KET）を同様に投与した。EGME の最高用量（2000 mg/kg）は先行研究（Fukushima et al. 2011; Fukushima et al. 2005）を参考に精巣毒性を惹起する用量として設定した。KET の最高用量（300 mg/kg）は先行研究（Heckman et al. 1992; Wang et al. 1992）を参考にテストステロン低下を引き起こす用量として設定した。動物は投与 24 時間後にイソフルラン麻酔下で安楽死させた後に解剖して精巣を採材した。

病理組織学的検査

精巣（左）を formalin–sucrose–acetic acid 液で固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して病理組織学的標本作製し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。病理組織学的検査は、先行研究（Takahashi and Matsui 1993）と同様に、精細管を Stage I から VI、VII から VIII、IX から XI、及び XII から XIV の 4 つに分類して評価した。

細胞数計測による精母細胞障害の定量化

精母細胞障害について、先行研究（Matsui et al. 1995）の方法を参考に定量化した。各

stage 分類あたり計 5 個の精細管を無作為に選び、正常な精母細胞数 (unaffected)、変性又は壊死を呈した精母細胞数 (affected)、及びセルトリ細胞数を計測し、これらを用いてセルトリ細胞あたりの障害を受けた精母細胞数 (affected) 及び総精母細胞数 (unaffected + affected) を算出した。障害を受けた精母細胞数及び総精母細胞数は、SAS System Release 8.2 (SAS Institute) を用いて Dunnett 検定を実施し、有意水準は 0.05 未満とした。

精巣テストステロン測定

精巣テストステロン測定方法は既報 (Fijak et al. 2011) を参考にした。精巣 (右) は採材後直ちに液体窒素で凍結し、使用まで -80°C で保存した。各精巣の一部 (約 0.3–0.7 g) を蒸留水中でホモジナイズし、超音波処理した後に $850\times\text{g}$ で 15 分間遠心分離した。上清中のテストステロン濃度を、DELFIAR Testosterone reagents (PerkinElmer Inc.) を用いて測定した。測定データはサンプル重量で補正した。テストステロン値は、SAS System Release 8.2 を用いて Dunnett 検定を実施し、有意水準は 0.05 未満とした。

RNA 抽出

RNeasy Mini kit (Qiagen Inc.) を用いて、精巣 (右) サンプルの一部 (約 0.3 g) から、標準プロトコールに従って total RNA を抽出した。RNA 品質は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.) を用いて RNA integrity number が 9 以上であることを確認した。

マイクロアレイ解析及び精母細胞特異的遺伝子セットの解析

抽出した RNA について、第一章第二節に記載の方法でマイクロアレイ解析し、得られたデータを用いて精母細胞特異的遺伝子セットの解析を実施した。

第三節 結果

EGME 誘発精母細胞障害モデルラットの作出

精巣の病理組織学的検査の結果を Table 6 に、生じた器質的障害の代表像を Figure 5 に示した。EGME の 600 mg/kg 以上では stage VII から XIV の精細管に精母細胞の変性又は壊死がみられた。また、同群ではセルトリ細胞の空胞化が散発的にみられた。一方、KET 投与群では 300 mg/kg まで病理組織学的な変化はみられなかった。精母細胞障害について定量的に解析した結果、変性又は壊死を呈した精母細胞数は 600 mg/kg 以上で増加したが、その増加量に用量相関性はみられず、特に stage VII から VIII の精細管においては 600 mg/kg に比して 2000 mg/kg では増加量は小さかった。一方、精母細胞の総細胞数の変化は 600 mg/kg までみられず、2000 mg/kg の stage VII から VIII の精細管でのみ減少がみられた。

精巣テストステロン測定

精巣テストステロンの測定結果を Table 7 及び 8 に示す。EGME 投与ラットでは 200 mg/kg 以上で用量の増加にともなって精巣テストステロンの低下がみられた。また、KET 投与ラットでは 30 mg/kg 以上で用量の増加にともなった精巣テストステロン低下がみられた。それぞれの対照群に対する精巣テストステロンの低下率は、EGME の 2000 mg/kg で 79%、KET の 300 mg/kg で 97%であり、EGME 投与ラットに比して KET 投与ラットでより顕著な低下を示した。

精母細胞特異的遺伝子の発現変動解析

精母細胞特異的遺伝子の発現変動結果について Figure 6 に示す。病理組織学的検査で精母細胞の変性又は壊死がみられた EGME の 600 及び 2000 mg/kg では、ほぼすべての精母細胞特異的遺伝子に顕著な発現低下がみられた。一方、病理組織学的に変化がみられなか

った EGME の 200 mg/kg 及び KET の 30 及び 300 mg/kg では精母細胞特異的遺伝子に一定の共通した遺伝子発現パターンはみられず、発現変動の程度も小さかった (Figure 6A)。

D スコアを用いた解析においては、EGME の 600 及び 2000 mg/kg 投与群で用量の増加にともなうスコアの低下がみられた一方、EGME の 200 mg/kg 及び KET の 30 及び 300 mg/kg ではスコアの変動はみられなかった (Figure 6B)。

第四節 考察

本章では、EGME 誘発精母細胞毒性モデルラットを作出し、精母細胞障害と関連する精母細胞特異的遺伝子の発現減少がみられるか否か検討した。EGME をラットに単回投与して病理組織学的に解析したところ、stage VII から XIV の精細管で精母細胞の変性又は壊死がみられたとともに、この精母細胞障害は用量の増加にともなって増悪した。こうした病理組織学的な特徴は先行研究（Chapin et al. 1984; Creasy et al. 1985; Foster et al. 1983）と一致した。なお、病理組織学的検査の定量的解析において、変性又は壊死した精母細胞数の増加は stage VII から VIII の精細管において 600 mg/kg に比べて 2000 mg/kg で軽度であった。同精細管 stage では 2000 mg/kg で総精母細胞数の減少がみられたことを勘案すると、2000 mg/kg で強い障害を呈した精母細胞の一部が精細管管腔へ脱落又はセルトリ細胞へ貪食されて精上皮から消失し、結果として精母細胞の変性又は壊死が精上皮中で相対的に少なくなったと推測された。こうした EGME 誘発精母細胞障害ラットに対して細胞特異的遺伝子の発現変動を解析した結果、これらの遺伝子は精母細胞障害の増悪にともなって顕著な発現低下を呈し、両者の関連が示唆された。精母細胞障害の発現メカニズムが異なる DNB 及び EGME のいずれでも精母細胞特異的遺伝子の発現減少がみられたことを勘案すると、精母細胞特異的遺伝子の発現減少は毒性発現メカニズムとは無関係に精母細胞障害の程度を反映する可能性が示唆された。

本研究では、EGME 及び KET の用量の増加にともなって精巣中テストステロン濃度の低下がみられ、先行研究（Reader et al. 1991; Wang et al. 1992）と一致する結果であった。精巣中テストステロン低下は EGME に比して KET 投与ラットでより顕著であったが、KET 投与ラットでは精母細胞の器質的な障害や精母細胞特異的遺伝子の発現減少はみられなかった。したがって、少なくとも投与 24 時間後までにみられる短期間の精巣中テストステロン低下は、EGME 誘発精母細胞障害の毒性発現に対して寄与せず、また精母細胞特異的遺伝子の発現変動に影響を与える交絡因子ではないことが示唆された。

以上、DNB とは異なる毒性発現機序が知られる EGME 誘発精巣毒性モデルラットにおいても、精母細胞障害の増悪をともなう精母細胞特異的遺伝子の発現低下がみられた。また、KET を用いた急性のテストステロン低下モデルラットでは精母細胞特異的遺伝子の発現低下はみられず、短期間のテストステロン低下はこれら遺伝子の発現変動に影響しないことが示された。

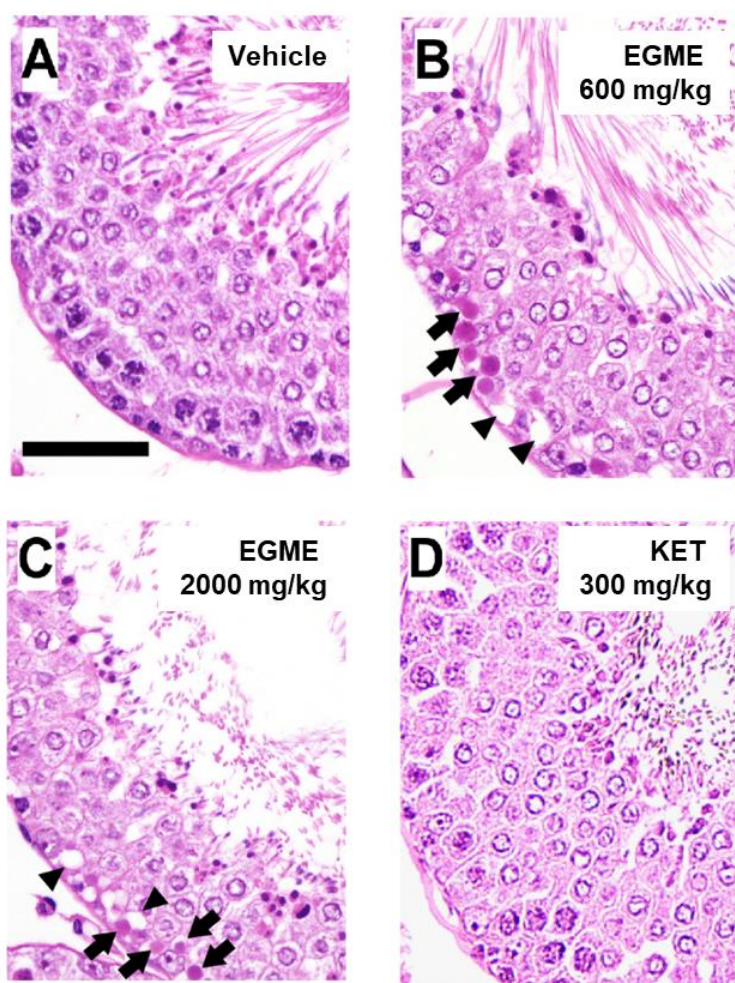


Figure 5. Representative light micrograph of histopathologic findings in the testis observed 24h after a single oral administration of vehicle, EGME, or KET. Histological sections of rat testis, stained with H&E, for vehicle control (A), 600 mg/kg of EGME (B), 2000 mg/kg of EGME (C), and 300 mg/kg of KET (D). Degeneration and necrosis of spermatocytes (arrow) and vacuolation of Sertoli cells (arrowhead) were observed at 600 mg/kg or more of EGME (B and C). All micrographs show the seminiferous tubules at stages VII–VIII. The scale bar in the figure is 50 μ m and all figures are shown at the same magnification.

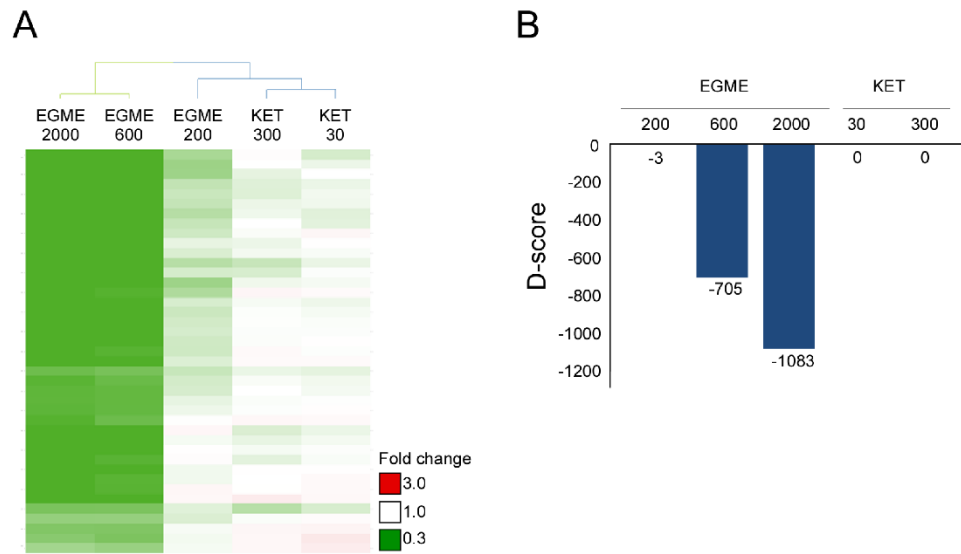


Figure 6. Gene expression profile of spermatocyte-specific genes in the testis of rats treated with EGME or KET. Heat maps of 41 spermatocyte-specific genes (A). Clustering is shown for the differentially expressed gene expression profile of 600 and 2000 mg/kg of EGME groups compared to that of 200 mg/kg of EGME group and 30 and 300 mg/kg of KET groups. Increased and decreased expressions are shown in red and green, respectively, while no change is shown in white. D-scores of the expression change of the spermatocyte-specific genes in rats treated with EGME or KET (B). All analysis was based on the mean value from 4 animals.

Table 6. Number of spermatocytes in seminiferous tubules at various stages of rats treated with EGME.

	EGME (mg/kg)			
	0	200	600	2000
Stage I–VI				
<u>affected spermatocytes</u>				
mean	0.0	NA	NA	NA
S.D.	0.0	NA	NA	NA
<u>total spermatocytes</u>				
mean	7.9	NA	NA	NA
S.D.	1.9	NA	NA	NA
Stage VII–VIII				
<u>affected spermatocytes</u>				
mean	0.0	0.0	5.1 **	2.8 **
S.D.	0.0	0.0	0.7	0.8
<u>total spermatocytes</u>				
mean	13.3	12.1	10.7	7.9 *
S.D.	3.7	2.5	0.7	1.5
Stage IX–XI				
<u>affected spermatocytes</u>				
mean	0.0	0.0	6.8 **	7.3 **
S.D.	0.0	0.0	1.1	0.5
<u>total spermatocytes</u>				
mean	13.6	11.9	12.1	13.2
S.D.	2.5	1.6	1.6	1.2
Stage XII–XIV				
<u>affected spermatocytes</u>				
mean	0.0	0.0	5.3 **	5.4 **
S.D.	0.0	0.0	0.6	0.5
<u>total spermatocytes</u>				
mean	10.7	10.5	12.0	11.2
S.D.	1.8	0.4	1.2	0.8

The numbers of normal spermatocytes (unaffected), degenerated/necrotic spermatocytes (affected), and Sertoli cells in 5 seminiferous tubules of each rat were counted and were expressed as the number of affected or total (affected and unaffected) spermatocytes per Sertoli cell. Data represents the mean and standard deviation (S.D.) of 4 animals. *P<0.05, **P<0.01: Significantly different from the control group by Dunnett's test. NA: not available due to no spermatocyte injury

Table 7. Testicular testosterone levels in rats treated with EGME

	EGME			
	0	200	600	2000
(ng/g tissue)				
mean	238.3	107.4*	97.5*	48.9**
S.D.	112.48	57.83	49.82	7.84
(% of control)	(100)	(45)	(41)	(21)

Data represents the mean and standard deviation (S.D.) of 4 animals.

*P<0.05, **P<0.01: Significantly different from the control group by Dunnett's test

Table 8. Testicular testosterone levels in rats treated with KET

	KET		
	0	30	300
(ng/g tissue)			
mean	107.3	43.0**	2.7**
S.D.	31.66	6.42	5.06
(% of control)	(100)	(40)	(3)

Data represents the mean and standard deviation (S.D.) of 4 animals.

*P<0.05, **P<0.01: Significantly different from the control group by Dunnett's test

第三章 精巣毒性発現に関連する遺伝子発現変動の検討：DNB 誘発精巣毒性モデルラットを用いた解析

第一節 小序

第一章及び第二章では、発現細胞の特異性の観点から選定した各バイオマーカー遺伝子セットについて発現解析を行い、当該細胞に対する障害を反映するかについて検討した。続いて本章では、精巣毒性発現に寄与する様々な分子イベントを転写レベルで検出できるか否かに焦点をあて、精巣毒性物質の投与によって生じる遺伝子発現変動について網羅的に解析した。

DNB 曝露に際して精巣で生じる急性の毒性反応としては、セルトリ細胞障害と生殖細胞のアポトーシスが報告されている (Blackburn et al. 1988; Hess et al. 1988; Strandgaard and Miller 1998)。DNB 誘発精巣毒性の特徴的な表現型として生殖細胞のセルトリ細胞から脱落が生じることが *in vivo* 及び *in vitro* で示されている (Foster et al. 1987; Hess et al. 1988)。セルトリ細胞の空胞化は生殖細胞の形態学的変化の前に生じることが超微細構造検査によって観察されたことから、DNB 誘発精巣毒性の標的細胞はセルトリ細胞であり、生殖細胞障害はセルトリ細胞障害の結果として二次的に生じるものと考えられている (Blackburn et al. 1988)。また、DNB を曝露させた精細管ではミトコンドリアの抗酸化能が低下すること、DNB のニトロ還元による酸化ストレスは精巣毒性発現に寄与することが示唆されている (Jacobson and Miller 1998; Reeve and Miller 2002)。加えて、アポトーシス関連遺伝子について RT-PCR 法を用いて発現変動解析を実施した結果、DNB 誘発精巣毒性でみられる生殖細胞のアポトーシスはミトコンドリア経路を介して惹起されることが示唆されている (Muguruma et al. 2005)。

本章では、DNB 誘発精巣毒性モデルラットの精巣マイクロアレイデータを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施し、酸化ストレス、アポトーシス、生殖細胞のセルトリ細胞からの脱落といった毒性エンドポイントについて転写レベルで検出できるか検討した。

第二節 材料と方法

マイクロアレイデータからの DNB 投与による遺伝子発現変動の抽出

本章の解析には第一章で取得したマイクロアレイデータを用いた。媒体対照群及び DNB 25 及び 50 mg/kg 群のマイクロアレイデータについて、1) 各プローブの detection call が 4 例中 3 例以上で Presence call であること、2) シグナル強度の平均値が媒体対処群に比して 1.5 倍より高い又は 0.67 倍より低いこと、3) 後述の統計学的解析で有意であること、の 3 条件を満たすものを DNB 投与により誘発された遺伝子発現変動 (differentially expressed genes, DEG) と定義した。

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) による upstream regulator 解析

商用解析ソフトウェア IPA (Ingenuity Systems; www.ingenuity.com) を用いて upstream regulator 解析を行った。upstream regulator 解析は、データセットの遺伝子発現変動を説明しうる upstream regulator (遺伝発現変動に影響を与える分子で、転写因子、タンパク質、低分子化合物などを含む) を統計学的に予測するものである。解析対象のデータセットの遺伝子発現変動の方向性と、upstream regulator がターゲット遺伝子の発現変動に与える影響の方向性 (論文情報をもとにした既知データ) から activation Z-score を算出して活性化状態 (活性化又は阻害) を予測した。upstream regulator の活性化状態の予測は既報に基づいて行い、activation Z-score が 2 以上の場合を upstream regulator の活性化、-2 以下の場合を upstream regulator の阻害とした (Krämer et al. 2014)。

Gene ontology (GO) 解析

DAVID6.7 (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて、DNB 投与による DEG の GO 解析を行った。DAVID を用いた GO 解析は Enrichment 解析の一種であり、DEG にどのような性質の遺伝子が濃縮

されているかを解析するものである (Huang et al. 2009)。GO 解析のアノテーションカテゴリーには、biological process のレベル 3 (GO term BP 3) を用いた。統計解析は DAVID システム上で modified Fisher Exact 検定を用いて実施し、有意水準は 0.05 未満とした。

リアルタイム定量 RT-PCR 解析

Testin (Entrez Gene ID: 286916) 及び *cadherin 2* (Cdh2、Entrez Gene ID: 83501) のプローブ及びプライマーは Taqman Gene Expression Assays (Cdh2 : Rn00580099 m1、Testin : Rn00597568 m1) を用いた。第二章第二節で抽出した Total RNA に対し 10mM dithiothreitol、0.5mM deoxyribonucleoside triphosphates、及び 40 U RNase inhibitor (東洋紡株式会社) を添加したバッファー中で DNase I (タカラバイオ株式会社) 処理した後、SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific Inc) を用いて標準プロトコールに従って cDNA 合成を行った。PCR は qPCR Mastermix Plus (Eurogentee) を用い、50°C で 2 分間、95°C で 10 分間、95°C で 15 秒間、60°C で 1 分間の 40 サイクルで実施した。内部コントロールには Rodent GAPDH control kit (Applied Biosystems Inc) を用いた。

統計学的解析

マイクロアレイ解析及びリアルタイム定量 RT-PCR 解析では、F 検定により等分散性の検定を行い、等分散の場合は Student t 検定を、非等分散の場合は Aspin-Welch t 検定を行った。すべての統計学的解析の有意水準は 0.05 未満とした。

第三節 結果

DNB 投与による DEG

DNB 投与による DEG 数を Figure 7 に示す。投与 4 時間後、25 mg/kg 群では 29 遺伝子の発現増加及び 41 遺伝子の発現減少が、50 mg/kg 群では 149 遺伝子の発現増加及び 71 遺伝子の発現減少がみられた。投与 24 時間後では、25 mg/kg 群で 262 遺伝子の発現増加及び 337 遺伝子の発現減少が、50 mg/kg 群では 1541 遺伝子の発現増加と 1414 遺伝子の発現減少がみられた。本研究では、器質的変化に裏付けられた DNB 誘発精巣毒性と関連の深い遺伝子発現変動を見出すため、第一章で病理組織学的変化がみられた投与 24 時間後の 25 及び 50 mg/kg 群で共通して発現増加（186 遺伝子）又は発現減少（304 遺伝子）した遺伝子を用いて以降の解析を行った。

酸化ストレス関連及びアポトーシス関連遺伝子

DNB 投与 24 時間後の 25 及び 50 mg/kg 群で共通して発現変動した遺伝子の中から、酸化ストレス関連及びアポトーシス関連遺伝子を抽出した（Figure 8）。酸化ストレス応答（*Hmox1* 及び *Pon2*）、酸化ストレスに対する細胞保護（*Gstp1*、*Akr7a3* 及び *Akr1b8*）、並びにアポトーシス（*Gadd45g*、*Ddit4* 及び *Nos3*）に関連する遺伝子の発現増加がみられた。

Upstream regulator 解析

投与 24 時間後の 25 及び 50 mg/kg 群の DEG を用いて upstream regulator 解析を実施したところ、多くの upstream regulator の活性化又は阻害が予測された。投与 24 時間後の 50 mg/kg 群での activation-z score（絶対値）を基準に上位 30 個の upstream regulator を抽出したところ、活性化が予測された upstream regulator として炎症誘発因子（lipopolysaccharide）、サイトカイン（IL1b、IFNG、TNF、Interferon alpha、IL1A、IL6）、キナーゼ（PI3K、P38MAPK）、hydrogen peroxide 及び転写因子（NFkB）等がみられた。ま

た、阻害が予測された upstream regulator としてキナーゼ阻害剤 (SB203580 及び PD98059) 等がみられた (Table 9)。

GO 解析

GO 解析を行った結果、DNB 投与 24 時間後に発現増加した遺伝子では細胞接着、発生、及び細胞分化に関連する遺伝子がみられた一方、発現減少した遺伝子では DNB 誘発精巣毒性発現メカニズムを特徴づけるアノテーションカテゴリーはみられなかった (Table 10 及び 11)。

精巣接着関連遺伝子の発現解析

GO 解析の結果、DNB 投与 24 時間後に発現増加した遺伝子に細胞接着関連遺伝子が多く含まれたことから、精巣での細胞接着関連遺伝子 (Mruk and Cheng 2004) として、Cdh2、catenin alpha (*Ctnna1*)、vinculin (*Vcl*)、zyxin (*Zyx*)、integrin beta 1 (*Itgb1*)、*Testin*、 laminin gamma 3 (*Lamc3*)、poliovirus receptor-related 2 (*Pvr12*)、及び gelsolin (*Gsn*)を選別し、これら遺伝子の発現解析を行った。その結果、これらの遺伝子はいずれも DNB 投与により発現増加した (Table 12)。さらに、*Testin* 及び *Cdh2* 遺伝子の発現増加は、リアルタイム RT-PCR 解析でも確認された (Figure 9)。

第四節 考察

DNB 25 及び 50 mg/kg を単回経口投与したラットの精巣では、投与 24 時間後の病理組織学的検査において精母細胞の単細胞死及びセルトリ細胞の空胞化がみられた (Figure 1 及び Table 5)。この時、25 及び 50 mg/kg 群に共通した遺伝子発現変動として、186 遺伝子の発現増加及び 304 遺伝子の発現減少がみられ、これらには DNB 誘発精巣毒性発現と関連が深い遺伝子発現変動が含まれると考えられた。

DNB 誘発精巣毒性では、酸化ストレス (Jacobson and Miller 1998; Reeve and Miller 2002) 及びミトコンドリア経路を介したアポトーシス (Muguruma et al. 2005) が生じると示唆されている。本研究では、酸化ストレス応答に関連する *Hmox1* 及び *Pon2* (Devarajan et al. 2011; Guo et al. 2001)、並びに酸化ストレスに対する保護的因子である *Gstp1*、*Acr7a3* 及び *Acr1b8* (Ahmed et al. 2011; Ikeda et al. 2004; Jin and Penning 2007) の発現増加がみられた (Figure 8)。また、upstream regulator 解析では hydrogen peroxide の活性化が予測された。これらの遺伝子発現変動は DNB 曝露により生じた酸化ストレスに関連した変化と考えられた。また、本研究ではアポトーシスと関連の深い DNA 損傷応答遺伝子 *Gadd45g* 及び *Ddit4* (Linschooten et al. 2011; Miyake et al. 2007) の発現増加、並びに NO 産生によるアポトーシス誘導との関連が深い *Nos3* (Taneli et al. 2005) の発現増加がみられた。これらの遺伝子発現変動は DNB 曝露で生じる生殖細胞のアポトーシスを示唆する遺伝子発現変動である可能性がある。以上を勘案すると、本研究でみられた酸化ストレス関連及びアポトーシス関連の遺伝子発現変動は、DNB 曝露の初期反応として生じる酸化ストレスと、これに続くアポトーシスを含む細胞死を反映するものと考えられた。

DNB 25 及び 50 mg/kg 群に共通して発現増加した 186 遺伝子について GO 解析を行った結果、これら遺伝子には細胞接着に関連するものが多く含まれることが示唆された。また、精巣で細胞接着に関連する遺伝子を個別に調べたところ多くの遺伝子の発現増加がみら

れ、*Cdh2* 及び *Testin* についてはリアルタイム RT-PCR 解析でも発現増加が確認された。*Cdh2* は N-cadherin としても知られ、セルトリ細胞間及びセルトリ-生殖細胞間の接合部に局在する (Johnson and Boekelheide 2002)。精巢中 *Cdh2* の遺伝子発現増加は、di-(2-ethylhexyl) phthalate 投与による生殖細胞のセルトリ細胞からの脱落 (Sobarzo et al. 2006)、あるいは避妊薬 AF-2364 投与によるセルトリ-生殖細胞間の adherens junction の障害をともなう精細管障害 (Lee et al. 2003) においても観察されている。したがって、本試験でみられた *Cdh2* の発現増加は、セルトリ-生殖細胞間接着の障害を示している可能性がある。*Testin* はセルトリ-生殖細胞間の apical ectoplasmic specialization のセルトリ細胞側に局在する分泌性タンパク質である (Cheng et al. 1989; Grima et al. 1998)。*Testin* の発現増加はセルトリ-生殖細胞間接着異常の指標となることが報告されており、セルトリ-生殖細胞間接着異常を引き起こす避妊薬ロニダミンは精巢中 *Testin* の発現増加を惹起する (Grima and Cheng 2000; Grima et al. 1997)。一般に、セルトリ-生殖細胞間接着異常が生じると生殖細胞の精上皮からの脱落がみられる (Richburg and Boekelheide 1997)。本研究の病理組織学的検査においても、DNB 投与 24 時間後の精巢上で生殖細胞の残渣がみられており (Table 5)、セルトリ-生殖細胞間接着に障害が生じたと考えられる。加えて、先行研究においても DNB が in vivo 及び in vitro で生殖細胞のセルトリ細胞からの脱落を惹起することが示されている (Foster et al. 1987; Hess et al. 1988)。以上より、本研究で観察された *Cdh2* 及び *Testin* を含む細胞接着関連遺伝子の発現上昇は、DNB によるセルトリ-生殖細胞間接着異常に対する応答を反映するものと考えられた。

Cdh2 や *Testin* のような細胞接着関連遺伝子の発現上昇は、DNB と類似の機序で惹起される細胞接着異常を評価する際のバイオマーカーになりうると期待された。さらに、マイクロアレイ解析における *Cdh2* と *Testin* の統計学的に有意な発現増加は、病理組織学的変化が観察されない投与 4 時間後においても検出された。これらの発現変動はわずかであり、リアルタイム RT-PCR 解析では確認できなかったものの、マイクロアレイ解析で検出されたこれらの発現変動は DNB によるセルトリ-生殖細胞間の細胞接着異常の初期徴候

を検出した可能性を示唆すると考えられた。

こうした酸化ストレス応答、アポトーシス、及びセルトリー生殖細胞間の細胞接着異常は、DNB 曝露による精巣毒性の発現に寄与すると考えられる分子イベントであり、本章の結果はこうした精巣毒性エンドポイントに繋がる変化を転写レベルで検出可能であることを示唆する。すなわち、これらの遺伝子発現変動は、精巣毒性発現の機序を推定し、転写レベルで毒性兆候を検出するための有用なバイオマーカーとなる可能性があると考えられた。

投与 24 時間後の 50 mg/kg 群の upstream regulator 解析では、炎症を示唆する変化が上位を占めた。一般に炎症は酸化ストレスと密接に関連することが知られており (Biswas 2016)、例えば炎症性サイトカインの発現に重要な転写因子 NF- κ B は酸化ストレスによって活性化される (Anderson et al. 1994; Wardyn et al. 2015)。したがって、本研究でみられた炎症を示唆する変化は DNB によって生じた酸化ストレスに対する二次的な反応と考えられた。一方で、炎症は精子形成に影響を与える可能性が示唆されており (Dutta et al. 2021; Theas 2018)、本研究で生じた炎症反応が DNB 誘発精巣毒性に対して結果的に何らかの影響を与えた可能性は否定できない。

結論として、DNB を単回経口投与したラットの精巣においてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現変動解析を実施したところ、酸化ストレス応答、アポトーシス、及びセルトリー生殖細胞間の細胞接着異常を反映したと考えられる遺伝子発現変動がみられた。

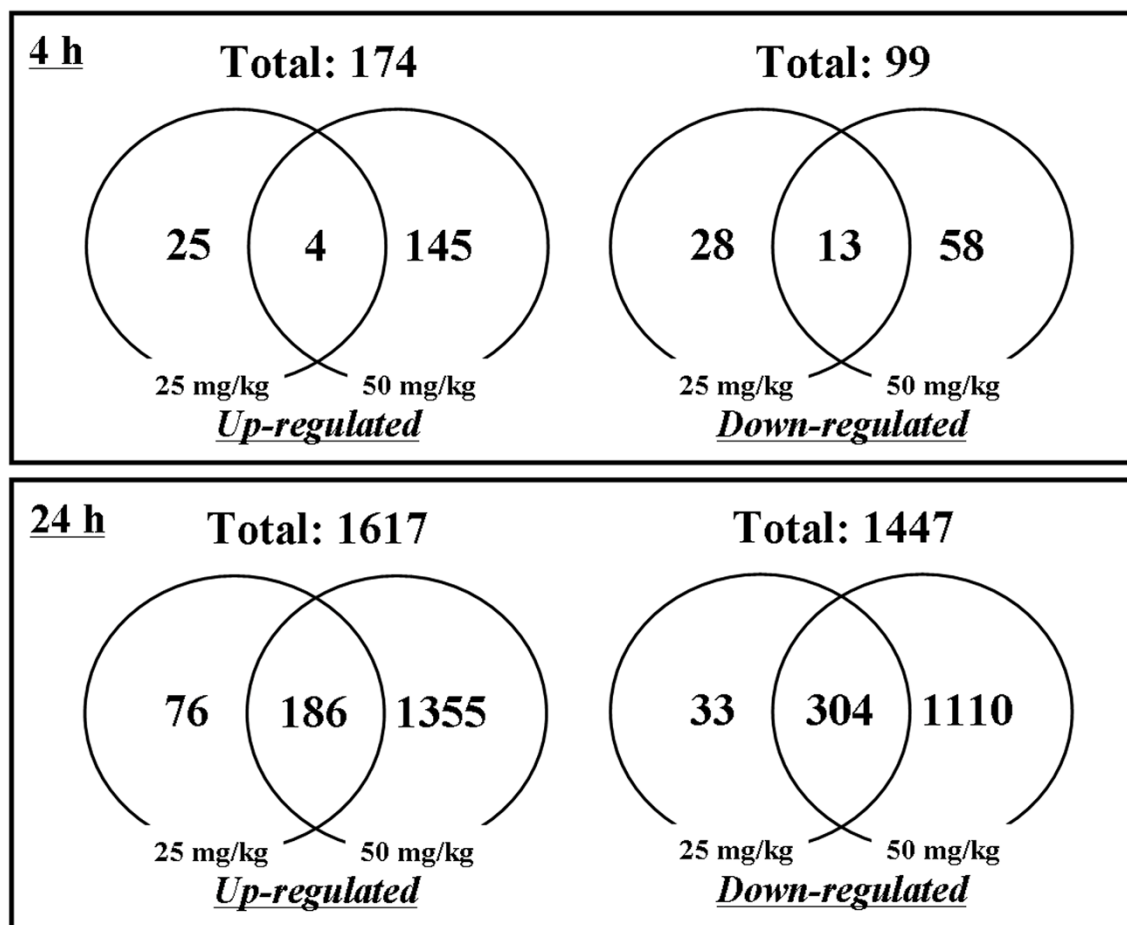
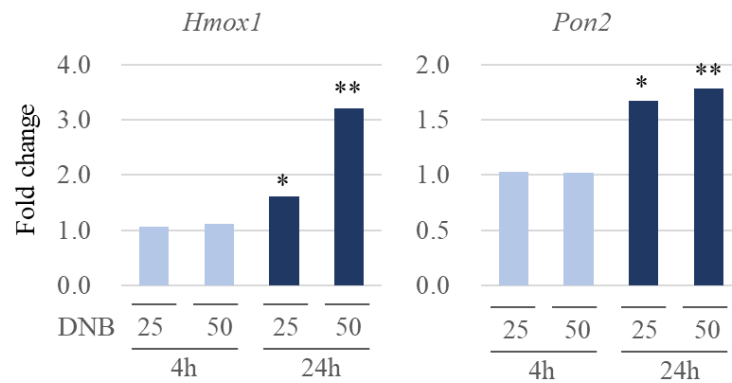
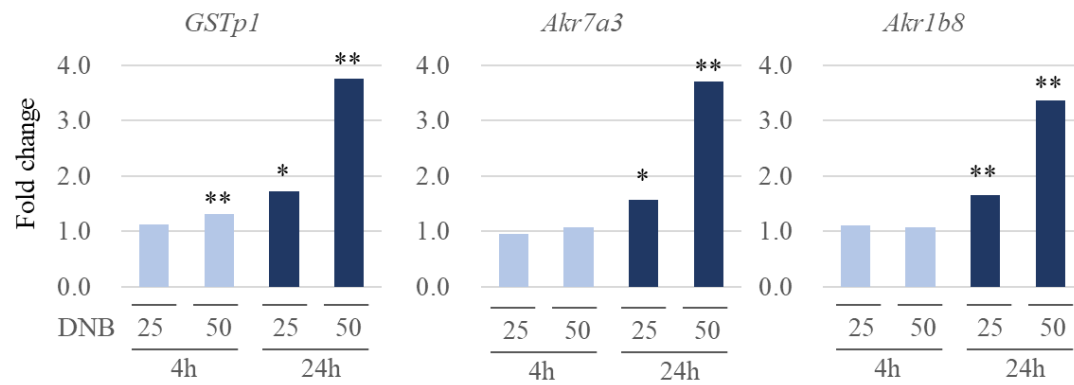


Figure 7. The number of differentially regulated gene probe sets following DNB treatment

Oxidative stress-responsive



Oxidative stress-protective



Apoptosis-related

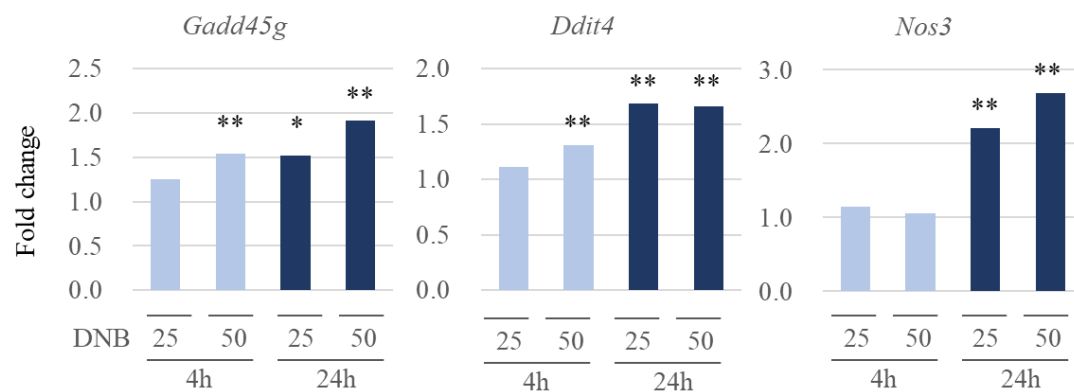


Figure 8. Oxidative stress- and apoptosis-related genes in the differentially regulated genes after DNB treatment.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from the control group by student's t-test.

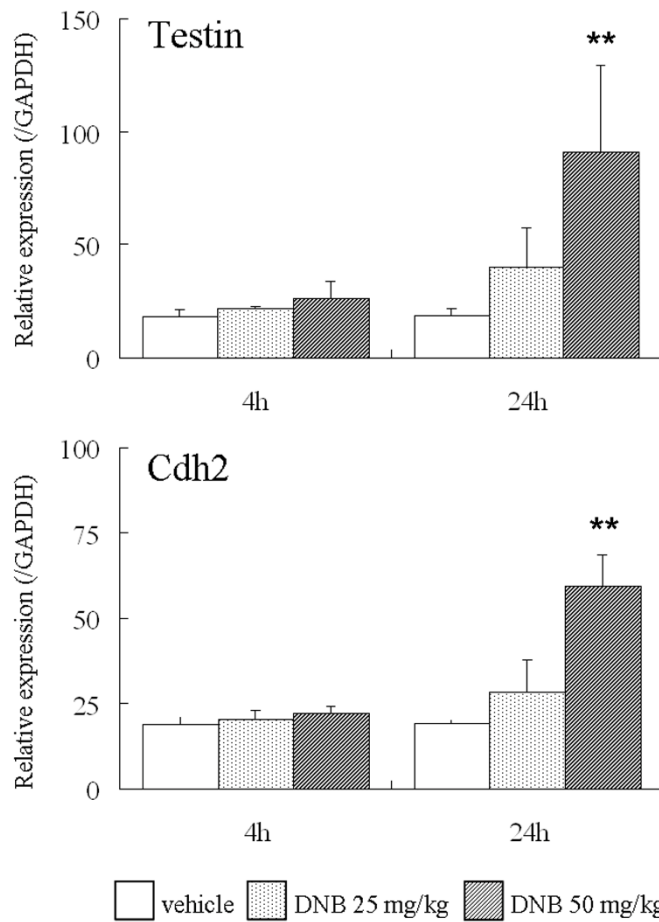


Figure 9. Testicular gene expression changes of Testin and Cdh2 by real-time quantitative RT-PCR at 4 or 24 h after a single oral administration of DNB. Data show the mean $\pm$ SD of 4 animals. ** $P < 0.01$: significantly different from the concurrent control group by Student's *t*-test.

Table 9. Top 30 upstream regulators predicted to be activated or inhibited in the testis of rats treated with DNB

Upstream Regulators	Molecule Type	Activation z-score	
		25	50 (mg/kg)
lipopolysaccharide	chemical drug	2.66	7.91
poly rI:rC-RNA	biologic drug	1.96	6.68
IL1B	cytokine	1.78	6.63
TGFB1	growth factor	2.08	6.43
IFNG	cytokine	2.52	6.34
TNF	cytokine	2.54	6.24
NFkB (complex)	complex	1.01	6.24
tetradecanoylphorbol acetate	chemical drug	3.40	6.20
TP53	transcription regulator	2.12	5.89
PRL	cytokine	1.31	5.74
doxorubicin	chemical drug	1.73	5.68
KLF6	transcription regulator	1.89	5.62
AGT	growth factor	1.22	5.59
BHLHE40	transcription regulator	2.18	5.53
forskolin	chemical toxicant	3.06	5.44
IgE	complex	2.53	5.40
Interferon alpha	group	2.10	5.31
PDGF-BB	complex	2.93	5.25
PI3K (complex)	complex	2.75	5.22
P38 MAPK	group	1.94	5.20
IL1A	cytokine	2.19	5.15
hydrogen peroxide	chemical - endogenous mammalian	1.02	5.14
IL6	cytokine	1.37	5.09
CG	complex	2.56	5.08
SB203580	chemical drug	-2.76	-5.25
TSC2	other	-1.67	-5.09
PD98059	chemical - kinase inhibitor	-2.57	-4.91
STAT3	transcription regulator	1.72	4.94
hexachlorobenzene	chemical toxicant	1.34	4.81
decitabine	chemical drug	2.04	4.79

The list was ordered by the absolute values of activation z-score for the 50 mg/kg group.

IL1B: interleukin 1 beta, TGFB1: transforming growth factor beta 1, IFNG: interferon gamma, TNF: tumour necrosis factor, NFkB: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, TP53: tumour protein p53, PRL: prolactin, KLF6: KLF transcription factor 6, AGT: angiotensinogen, IgE: Immunoglobulin E, PDGF-BB: platelet derived growth factor subunit B dimer, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, P38 MAPK: p38 mitogen-activated protein, IL1A: interleukin 1 alpha, IL6: interleukin 6, CG: choriogonadotropin, TSC2: TSC complex subunit 2, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3

Table 10 Functional annotation of the up-regulated genes in DNB treated rats

GO ID	GO term	P-value
GO:0031589	cell-substrate adhesion	4.98E-04
GO:0048513	organ development	9.86E-04
GO:0048731	system development	1.01E-03
GO:0030154	cell differentiation	2.60E-03
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	3.03E-03
GO:0006793	phosphorus metabolic process	3.82E-03
GO:0032879	regulation of localization	1.05E-02
GO:0050794	regulation of cellular process	1.47E-02
GO:0009725	response to hormone stimulus	1.65E-02
GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	1.75E-02
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	1.76E-02
GO:0048583	regulation of response to stimulus	1.84E-02
GO:0010033	response to organic substance	1.89E-02
GO:0030155	regulation of cell adhesion	2.30E-02
GO:0048518	positive regulation of biological process	2.44E-02
GO:0044057	regulation of system process	2.50E-02
GO:0042493	response to drug	2.82E-02
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	2.86E-02
GO:0001666	response to hypoxia	2.91E-02
GO:0010035	response to inorganic substance	3.40E-02
GO:0046483	heterocycle metabolic process	3.52E-02
GO:0070482	response to oxygen levels	3.64E-02
GO:0009611	response to wounding	3.74E-02
GO:0051051	negative regulation of transport	3.76E-02
GO:0050778	positive regulation of immune response	3.84E-02
GO:0050793	regulation of developmental process	4.56E-02
GO:0016337	cell-cell adhesion	4.77E-02
GO:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	4.80E-02
GO:0050776	regulation of immune response	4.85E-02

P-values were calculated using a modified Fisher Exact test in DAVID annotation system.

Table 11 Functional annotation of the down-regulated genes in DNB treated rats

GO ID	GO term	P-value
GO:0007626	locomotory behavior	7.79E-03
GO:0050794	regulation of cellular process	1.08E-02
GO:0048523	negative regulation of cellular process	1.52E-02
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	2.47E-02
GO:0042330	taxis	3.19E-02
GO:0006935	chemotaxis	3.19E-02
GO:0051172	negative regulation of nitrogen compound metabolic process	3.71E-02
GO:0030595	leukocyte chemotaxis	3.79E-02
GO:0048519	negative regulation of biological process	3.83E-02
GO:0021549	cerebellum development	3.98E-02
GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	4.31E-02
GO:0060326	cell chemotaxis	4.37E-02
GO:0022037	metencephalon development	4.98E-02

P-values were calculated using a modified Fisher Exact test in DAVID annotation system.

Table 12. Cell adhesion related genes in DNB treated rats

Probe ID	gene expression (/control)				Gene Title	Gene Symbol
	4h		24h			
	25	50	25	50		
	mpk	mpk	mpk	mpk		
1368642_at	1.01	1.32	1.70	2.88	cadherin 2	<i>Cdh2</i>
1387259_at	1.06	1.15	1.58	3.73	cadherin 2	<i>Cdh2</i>
1371921_at	0.96	0.96	1.41	1.72	catenin (cadherin associated protein), alpha 1	<i>Ctnna1</i>
1372905_at	0.96	0.90	1.23	1.75	vinculin	<i>Vcl</i>
1375538_at	1.08	1.07	1.28	1.95	vinculin	<i>Vcl</i>
1398476_at	0.91	0.85	1.09	1.77	vinculin	<i>Vcl</i>
1388130_at	1.08	1.09	1.32	1.76	zyxin	<i>Zyx</i>
1368819_at	0.98	1.05	1.48	2.11	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	<i>Itgb1</i>
1387346_at	0.99	0.99	1.36	2.08	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	<i>Itgb1</i>
1370457_at	1.25	1.42	2.22	5.47	testin gene	<i>Testin</i>
1393896_at	0.97	1.03	1.22	1.45	laminin gamma 3	<i>Lamc3</i>
1375216_at	1.01	1.07	1.55	1.60	poliovirus receptor-related 2	<i>Pvrl2</i>
1371414_at	0.84	0.89	1.15	1.37	gelsolin	<i>Gsn</i>

Bold indicates statistically significant changes (Student's t test, $P < 0.05$).

第四章 精巣毒性発現に関連する遺伝子発現変動の検討：EGME 誘発精巣毒性モデルラットを用いた解析

第一節 小序

第三章では、DNB 誘発精巣毒性モデルラットに対する網羅的遺伝子解析により、精巣毒性発現に寄与するいくつかの分子イベントを転写レベルで検出した。本章では、精巣毒性に対する網羅的遺伝子解析のさらなる事例として、DNB とは異なる毒性発現機序を有する EGME 誘発精巣モデルラットを用いて検討した。

EGME 誘発精巣毒性の最初の標的細胞は精母細胞であることが報告されている (Chapin et al. 1984; Foster et al. 1983)。また、その毒性発現に寄与するメカニズムとして、酸化ストレス (Rao and Shaha 2002)、プロテインキナーゼ活性化 (Jindo et al. 2001; Wang et al. 2000)、flavoprotein dehydrogenase 阻害 (Takei et al. 2010)、及びヒストンアセチル化 (Wade et al. 2008) の関与が示唆されている。本章では、こうした精母細胞障害機序が遺伝子発現変動レベルで検出できるか検討するため、EGME 誘発精巣毒性モデルラットの精巣を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。

さらに本章では、テストステロン応答に着目した遺伝子発現変動解析も実施した。テストステロンは精子形成に重要な役割を果たしており (Sharpe 1994)、テストステロン濃度の低下は重篤な精巣毒性リスクを示唆する。非臨床精巣毒性評価においても血中テストステロンは生化学的なバイオマーカーとして一般に用いられるが (Sasaki et al. 2011)、その一方でテストステロン濃度低下の発現メカニズムについて、通常の非臨床毒性評価で実施される病理組織学的検査や生化学的検査の結果から推測することは難しい。そこで本章では、精巣中テストステロン低下を示す EGME 及び KET 投与ラットの精巣マイクロアレイデータを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施し、テストステロン低下に関連する遺伝子発現変動プロファイルを明らかにするとともに、両化合物による遺伝子発現変動プロファイルの違いやテストステロン低下の機序について考察した。

第二節 材料と方法

EGME 又は KET 投与による遺伝子発現変動の抽出

本章の解析には第二章で取得したマイクロアレイデータを用いた。マイクロアレイデータについて、1) 各プローブの **detection call** が 4 例中 3 例以上で **Presence call** であること、2) シグナル強度の平均値が媒体対処群に比して 1.5 倍より高い又は 0.67 倍より低いこと、3) 統計学的解析で有意であること、の 3 条件を満たすものを EGME 又は KET 投与により発現変動が誘発された遺伝子 (DEG) と定義した。統計学的解析は、F 検定により等分散性の検定を行い、等分散の場合は Student t 検定を、非等分散の場合は Aspin-Welch t 検定を行った。すべての統計学的解析の有意水準は 0.05 未満とした。

GO 解析

第三章と同様の方法で GO 解析を実施した。

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) による upstream regulator 解析

EGME 又は KET を投与による DEG をデータセットとして第三章と同様の方法で実施した。

アンドロゲン合成関連遺伝子の発現解析

各アンドロゲン合成関連遺伝子のマイクロアレイデータを抽出した (Figure 10)。なお、*Hsb17b3* (ID: 1369553_at) については **detection call** が全例で **absence call** であったため解析対象としなかった。

第三節 結果

EGME 投与による DEG

EGME 投与による DEG の抽出を行った結果、発現増加した DEG は EGME の 200、600 及び 2000 mg/kg でそれぞれ 379、2152 及び 2523 遺伝子、発現減少した DEG はそれぞれ 36、1748 及び 2614 遺伝子であり、用量の増加にともなって DEG 数の増加がみられた。精巣で病理組織学的変化（精母細胞の変性又は壊死、並びにセルトリ細胞の空胞化）が確認された 600 及び 2000 mg/kg に着目すると、両群に共通する DEG は発現増加で 1707 遺伝子、発現減少で 1637 遺伝子であり、両群の DEG の多くは重複した（Figure 11）。

EGME 投与による DEG を用いた GO 解析

病理組織学的変化がみられた 600 及び 2000 mg/kg 群で共通して発現増加（1707 遺伝子）又は発現減少（1637 遺伝子）した DEG を用いて GO 解析を行った結果、多くのアノテーションカテゴリーが統計学的に有意に検出された。上位 30 個のアノテーションカテゴリーを抽出した結果、EGME 誘発精母細胞障害の毒性発現メカニズムを特徴づけるアノテーションカテゴリーはみられなかった（Table 13 及び 14）。

EGME 投与による DEG を用いた upstream regulator 解析

EGME 投与による DEG を用いて upstream regulator 解析を実施したところ、EGME の 600 及び 2000 mg/kg で多くの upstream regulator の活性化又は阻害が予測された。EGME 2000 mg/kg での activation-z score（絶対値）を基準に上位 30 個の upstream regulator を抽出したところ、活性化が予測された upstream regulator としてサイトカイン（IL1b、TNF、IL5、IL1a、IFNa、IFNc、IL4 及び IL2）、炎症誘発因子（lipopolysaccharide）、キナーゼ活性化因子（phorbol myristate acetate）、及び転写因子（NFkB）等がみられた。また、阻害が予測された upstream regulator としてキナーゼ阻害剤（SB203580 及び PD98059）等がみられ

た (Table 15)。

続いて、既報の EGME 誘発精母細胞障害発現メカニズムに着目して関連する upstream regulator の解析を実施した。病理組織学的に精母細胞障害が確認された 600 及び 2000 mg/kg では、酸化ストレス関連の upstream regulator として hydrogen peroxide 及び NFE2L2 (Nrf2) の活性化、及び抗酸化物質である N-acetyl-L-cystein の阻害が予測された。また、同群ではキナーゼに関連するものとしてキナーゼの活性化 (SRC 及び PKC) 及びキナーゼ阻害剤の阻害 (LY294002、wortmannin 及び bisindolylmaleimide I) が、ヒストンアセチル化に関するものとして histone deacetylase (Hdac) の阻害及び Hdac 阻害剤 (trichostatin A 及び butyric acid) の活性化が予測された (Table 16)。

EGME 投与によるヒストンアセチル化に関する追加解析

ヒストンアセチル化の活性化を反映するバイオマーカー遺伝子である histone H1 zero (*h1f0*) (Chabanas et al. 1985; Hochhuth and Doenecke 1992; Kypreou et al. 2004; Wade et al. 2008) の mRNA 発現レベルを調べたところ、EGME 投与群で用量の増加にともなった発現増加がみられた (Figure 12)。

EGME 又は KET 投与ラットにおけるアンドロゲン合成関連遺伝子の発現解析

アンドロゲン合成に関わる遺伝子の発現変動を EGME 及び KET 投与群で比較した (Table 17)。EGME 投与では *Hsd17b2* の発現増加、*Cyp11a* 及び *Cyp17a1* の発現減少がみられたが、*Hsd3b2* に変化はみられなかった。一方、KET 投与群では *Cyp11a* 及び *Cyp17a1* に変化はみられなかったが、*Hsd3b2* 及び *Hsd17b2* に発現増加傾向がみられた。

EGME 又は KET 投与ラットにおけるテストステロン応答に関連する遺伝子の発現解析

続いて EGME 又は KET 投与により発現変動した DEG を用いて解析を行った。KET 投与により発現増加した DEG は、30 及び 300 mg/kg でそれぞれ 41 及び 68 遺伝子、発現減

少しした DEG はそれぞれ 7 及び 220 遺伝子であった。これら DEG を用いて upstream regulator 解析を実施し、テストステロン応答に関連する upstream regulator について EGME 及び KET の結果を比較したところ、KET 投与では dihydrotestosterone 及び androgen receptor (AR) の阻害が予測されたのに対し、EGME 投与ではこれら upstream regulator の活性化が予測された (Table 16)。

EGME の 2000 mg/kg と KET の 300 mg/kg の両群で共通して発現変動した DEG に着目すると、両群で発現増加した DEG は 24 遺伝子、発現減少した DEG は 40 遺伝子であった。発現増加遺伝子には *Ccnd2* が、発現減少遺伝子には *Igf1*、*Cxcl12*、*Topbp1*、*Zfp318*、及び *Pde8a* が含まれていた。

第四節 考察

網羅的遺伝子発現解析を実施するため、EGME 投与ラットに対してマイクロアレイを実施し DEG を同定した。EGME の 600 mg/kg 以上では、精母細胞の変性又は壊死を中心とした器質的变化が用量の増加にともなって増悪したが、精母細胞数の減少は最も重篤な毒性を呈した 2000 mg/kg においても stage VII から VIII の精細管に局限してわずかにみられた程度であり、精巣全体の細胞構成の変化は限定的であった (Table 6)。したがって、本研究で同定した上記の DEG はこうした cellularity の変化を反映するものではなく、EGME 誘発精巣毒性発現と関連が深い遺伝子発現変動が含まれると考えられた。

EGME 投与による DEG をデータセットとして upstream regulator 解析を実施した結果、酸化ストレス応答の亢進、並びに SRC 及び PKC を含むプロテインキナーゼの活性化を示唆する遺伝子発現変動が検出された。EGME 曝露は酸化ストレスを惹起し (Syed and Hecht 1998)、抗酸化剤 N-アセチルシステインを事前投与したラットでは、EGME の代謝物である MAA によって誘発される生殖細胞障害は抑制される (Rao and Shaha 2002)。また、MAA 曝露は精母細胞障害に際して SRC 及び PKC を活性化させる (Jindo et al. 2001)。酸化ストレスは SRC キナーゼを活性化し (Abe et al. 1997; Sanguinetti et al. 2003)、2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin やカドミウム等の酸化ストレスを引き起こす化学物質は精巣での SRC シグナル伝達を活性化する (El-Sabeawy et al. 1998; Wong et al. 2004)。さらに、SRC 阻害剤はラットの EGME 誘発精母細胞障害を抑制する (Wang et al. 2000)。これらを勘案すると、本研究の upstream regulator 解析から示唆された変化は、EGME 誘発精巣毒性の発現に重要な酸化ストレス亢進とそれに続くプロテインキナーゼ活性化を示唆すると思われた。また、upstream regulator 解析でヒストンアセチル化の亢進が示唆されるとともに、ヒストンのアセチル化のバイオマーカーである *h1f0* mRNA の発現増加がみられた。ヒストンのアセチル化亢進は、減数分裂不全や精母細胞のアポトーシスに寄与することが報告されており (Fenic et al. 2008; Fenic et al. 2004; Webster et al. 2005)、本研究で示唆され

たヒストンアセチル化の亢進は EGME 曝露によって惹起される精母細胞障害の重要な毒性発現機序であると考えられた。なお、酸化ストレスはヒストンアセチル化に影響することが報告されているが (Kreuz and Fischle 2016)、SRC 活性化とヒストンアセチル化の関係は不明である。以上、EGME 誘発精巣毒性の発現に重要な酸化ストレス亢進、プロテインキナーゼ活性化、及びヒストンアセチル化を示唆する変化は精巣の網羅的遺伝子発現解析によって検出可能であることが示された。

精巣中テストステロン低下に関連する遺伝子発現変動として、EGME 投与で dihydrotestosterone 及び AR の活性化が upstream regulator として予測され、EGME による AR シグナル経路の活性化が示唆された。EGME の代謝物である MAA は、AR に直接作用することなくチロシンキナーゼシグナル経路を介して AR の転写活性を増強する hormone sensitizer であると報告されている (Bagchi et al. 2009; Jansen et al. 2004)。また、本研究の upstream regulator 解析では、EGME による phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の活性化 (PI3K 阻害剤である LY294002 及び wortmannin の阻害) が推定された。AR の転写活性は PI3K 経路を介して活性化することから (Bagchi et al. 2009)、本研究で示唆された PI3K 活性化は EGME による AR 活性化を裏付けるものと考えられた。また、EGME 投与では *Cyp11a* 及び *Cyp17a1* の発現減少がみられており、テストステロン合成の抑制を反映した変化と考えられた。以上を勘案すると、本研究でみられた EGME によるテストステロン低下は、EGME により活性化された AR 経路に対する負のフィードバックが働いた結果、テストステロン合成が抑制された可能性が示唆された。対照的に、KET 投与では dihydrotestosterone 及び AR の阻害が推定された。KET は *Cyp17a* 活性阻害によりテストステロン合成を阻害することから (Heckman et al. 1992)、KET による AR シグナル経路の活性低下は、精巣テストステロンレベルの低下に起因すると考えられた。また、KET 投与でみられた *Hsd3b2* の発現増加傾向はテストステロン合成が阻害されたことに対する代償的な増加である可能性が考えられた。以上のように、遺伝子発現変動プロファイルの違いから両化合物によるテストステロン低下の機序の違いが示唆された。なお、本研究におい

て、EGME と KET の両群で共通する遺伝子発現変動として、*Ccnd2* の発現増加並びに *Igf1*、*Cxcl12*、*Topbp1*、*Zfp318*、及び *Pde8a* の発現減少がみられた。*Ccnd2* の発現増加は、ethane dimethane sulfonat 投与によりテストステロン低下を呈したラット精巣においても観察されている (Tan et al. 2005)。また、*Igf1* 及び *Cxcl12* は、テストステロンにより AR を介して発現増加することが知られている (Wu et al. 2007; Yu et al. 2013)。加えて、*Topbp1* は AR シグナル経路との関連が (Li et al. 2014)、*Zfp318* 及び *Pde8a* はテストステロン合成との関連が (Shimizu-Albergine et al. 2012; Tao et al. 2006) それぞれ報告されている。したがって、EGME 及び KET で共通したこれらの遺伝子発現変動は、精巣テストステロンレベル低下に応答した変化である可能性が考えられた。

なお、EGME 投与の upstream regulator 解析においても炎症を示唆する変化が上位を占めた。前述の通り、炎症は酸化ストレスと密接に関連することが知られており、EGME 投与によってみられた炎症を示唆する変化は酸化ストレスに対する二次的な反応と考えられた。

以上、EGME 誘発精巣毒性モデルラットに対する網羅的遺伝子発現解析を実施した結果、毒性発現に重要な酸化ストレス応答亢進、プロテインキナーゼ活性化、及びヒストンアセチル化の亢進を示唆する変化を検出した。また、EGME 及び KET ではテストステロン低下に関連する遺伝子発現変動プロファイルに違いがみられ、両化合物によるテストステロン低下の機序の違いを示唆するものと考えられた。

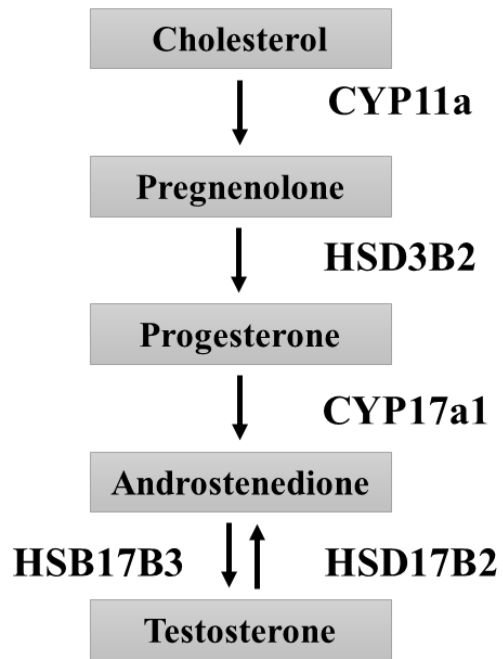


Figure 10. Androgen synthesis pathway and metabolizing enzymes.

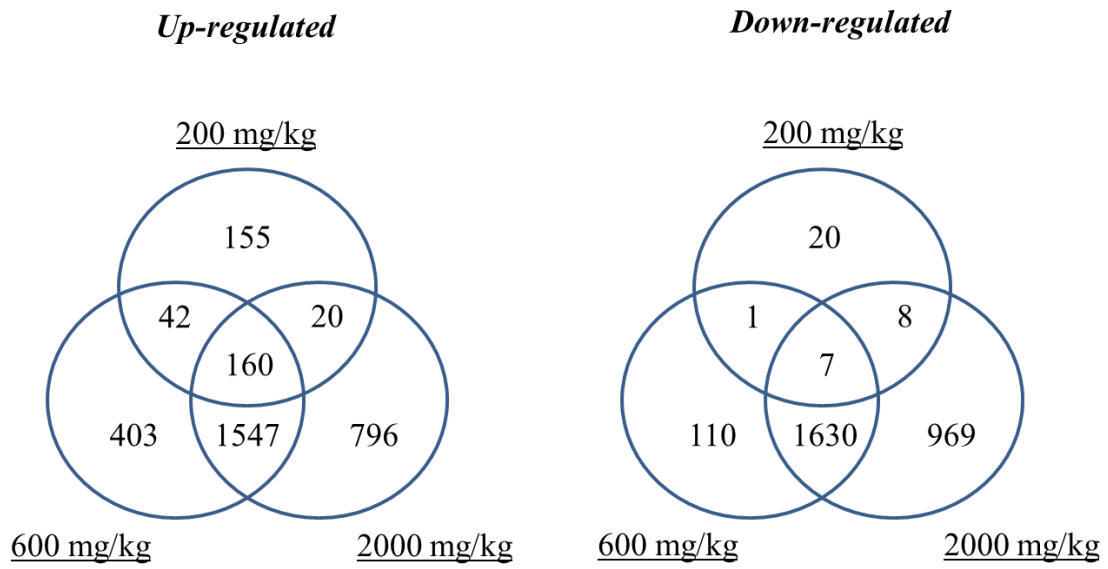


Figure 11. The number of differentially regulated gene probe sets following EGME treatment.

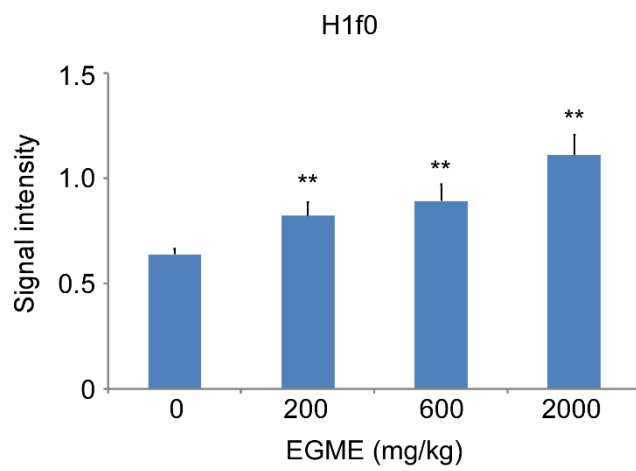


Figure 12. Histone H1 zero (*H1f0*) expression in the testis of rats treated with EGME. Data show the mean $\pm$ standard deviation of 4 animals. ** $P < 0.01$: Significantly different from the control group by student's t-test.

Table 13 Top 30 functional annotations of the up-regulated genes in EGME treated rats

GO ID	GO term	P-value
GO:0006810	Transport	1.55E-22
GO:0032879	regulation of localization	3.31E-18
GO:0023051	regulation of signaling	9.80E-16
GO:0007275	multicellular organism development	2.18E-15
GO:0051049	regulation of transport	2.31E-15
GO:0048522	positive regulation of cellular process	4.00E-15
GO:0048731	system development	5.02E-15
GO:0010646	regulation of cell communication	6.78E-15
GO:0048518	positive regulation of biological process	1.29E-14
GO:0009966	regulation of signal transduction	2.04E-14
GO:0010033	response to organic substance	4.38E-14
GO:0044802	single-organism membrane organization	4.69E-14
GO:0008219	cell death	1.28E-13
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	1.32E-13
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	2.31E-13
GO:0048869	cellular developmental process	3.03E-13
GO:0061024	membrane organization	1.59E-12
GO:0051128	regulation of cellular component organization	2.66E-12
GO:0010941	regulation of cell death	2.84E-12
GO:0048583	regulation of response to stimulus	3.19E-12
GO:0048523	negative regulation of cellular process	3.57E-12
GO:0051186	cofactor metabolic process	4.19E-12
GO:0070727	cellular macromolecule localization	4.26E-12
GO:0044281	small molecule metabolic process	9.23E-12
GO:0006793	phosphorus metabolic process	1.11E-11
GO:0016477	cell migration	1.26E-11
GO:0048468	cell development	1.46E-11
GO:0006928	movement of cell or subcellular component	1.67E-11
GO:0010256	endomembrane system organization	2.42E-11
GO:0009611	response to wounding	2.76E-11

P-values were calculated using a modified Fisher Exact test in DAVID annotation system. The list was ordered by the p-value.

Table 14 Top 30 functional annotations of the down-regulated genes in EGME treated rats

GO ID	GO term	P-value
GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process	4.29E-35
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	1.91E-33
GO:0046483	heterocycle metabolic process	3.40E-33
GO:0006996	organelle organization	1.56E-32
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	2.13E-32
GO:1901360	organic cyclic compound metabolic process	1.97E-30
GO:0043170	macromolecule metabolic process	1.30E-28
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	7.76E-24
GO:0006325	chromatin organization	6.12E-22
GO:0007049	cell cycle	7.18E-22
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	4.22E-18
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	2.18E-16
GO:0007059	chromosome segregation	4.68E-16
GO:0019222	regulation of metabolic process	5.61E-16
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	1.17E-15
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	4.65E-15
GO:0051726	regulation of cell cycle	1.09E-14
GO:0098813	nuclear chromosome segregation	4.55E-14
GO:1903047	mitotic cell cycle process	9.16E-13
GO:0033554	cellular response to stress	4.08E-12
GO:0070727	cellular macromolecule localization	1.10E-11
GO:0006403	RNA localization	1.27E-11
GO:0051236	establishment of RNA localization	2.23E-11
GO:1903046	meiotic cell cycle process	3.76E-11
GO:0010605	negative regulation of macromolecule metabolic process	4.08E-11
GO:0009892	negative regulation of metabolic process	1.02E-10
GO:0051321	meiotic cell cycle	1.15E-10
GO:0007126	meiotic nuclear division	2.77E-10
GO:2001022	positive regulation of response to DNA damage stimulus	3.98E-10
GO:0008104	protein localization	7.56E-10

P-values were calculated using a modified Fisher Exact test in DAVID annotation system. The list was ordered by the p-value.

Table 15. Top 30 upstream regulators predicted to be activated or inhibited in the testis of rats treated with EGME

Upstream Regulators	Molecule Type	Activation z-score		
		200	600	2000 (mg/kg)
lipopolysaccharide	chemical drug	-	6.82	7.16
IL1B	cytokine	-	6.23	6.25
phorbol myristate acetate	chemical drug	-	6.77	5.98
TNF	cytokine	2.54	6.52	5.92
doxorubicin	chemical drug	0.45	5.90	5.75
F2	peptidase	3.04	5.91	5.68
SB203580	chemical - kinase inhibitor	0.13	-5.98	-5.59
TGFB1	growth factor	-0.62	5.59	5.56
NFkB (complex)	complex	-	5.26	5.48
TP53	transcription regulator	0.41	5.47	5.36
tretinoin	chemical - endogenous	-	5.31	5.33
hydrogen peroxide	chemical - endogenous	0.88	5.07	5.30
P38 MAPK	group	2.09	5.47	5.25
forskolin	chemical toxicant	-	6.65	5.01
RELA	transcription regulator	-	4.71	4.75
RABL6	other	-	-3.87	-4.69
IL5	cytokine	2.36	4.97	4.52
IL1A	cytokine	1.21	5.12	4.48
IFNA	group	-	3.47	4.44
decitabine	chemical drug	1.59	4.83	4.40
IgG	complex	-	-2.75	-4.38
PD98059	chemical - kinase inhibitor	-2.37	-4.53	-4.31
IKBKB	kinase	-	4.27	4.30
IFNG	cytokine	0.28	3.37	4.29
IL4	cytokine	-	4.82	4.27
FGF2	growth factor	1.13	3.77	4.23
PGR	nuclear receptor	2.34	3.66	4.22
PLG	peptidase	-	3.77	4.20
IL2	cytokine	-	3.78	4.20
phenylbutazone	chemical drug	1.98	4.20	4.17

The list was ordered by the absolute values of activation z-score for the 2000 mg/kg group.

-.: no change, IL1B: interleukin 1 beta, TNF: tumor necrosis factor, F2: coagulation factor II thrombin, TGFB1: transforming growth factor beta 1, NFkB: nuclear factor of kappa light

polypeptide gene enhancer in B-cells, TP53: tumor protein p53, P38 MAPK: p38 mitogen-activated protein, RELA: v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, RABL6: member RAS oncogene family-like 6, IL5: interleukin 5, IL1A: interleukin 1 alpha, IFNA: interferon alpha, IgG: immunoglobulin G, IKBKB: inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta, IFNG: interferon gamma, IL4: interleukin 4, FGF2: fibroblast growth factor 2, PGR: progesterone receptor, PLG: plasminogen, IL2: interleukin 2

Table 16. Upstream regulator analysis using differentially expressed genes in the testis of rats treated with EGME or KET

Upstream Regulators	Activation Z-score				
	EGME			KET	
	200	600	2000	30	300
<u>Oxidative stress</u>					
hydrogen peroxide	0.88	5.07	5.30	-	-1.65
NFE2L2	-	2.75	2.99	-	-2.33
N-acetyl-L-cysteine	-	-3.52	-3.26	-	-0.06
<u>Kinases</u>					
SRC	-0.33	2.52	2.96	-	-0.28
Pkc(s)	1.25	3.28	2.77	-	-1.41
<u>Kinase inhibitors</u>					
LY294002	-2.94	-4.39	-3.57	-	1.12
wortmannin	-	-2.89	-2.97	-	0.68
bisindolylmaleimide I	-	-3.11	-2.37	-	0.07
<u>Histone acetylation</u>					
Hdac	-	-2.18	-2.14	-	-
<u>Hdac inhibitors</u>					
trichostatin A	-0.62	3.40	4.01	-	-0.94
butyric acid	-	1.54	2.04	-	0.22
<u>Androgen signaling</u>					
dihydrotestosterone	-	2.06	1.49	-	-2.68
androgen receptor	-	3.02	2.83	-	-2.40

-: no change, NFE2L2: nuclear factor erythroid 2 like 2, SRC: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, Pkc: protein kinase c, Hdc: Histone deacetyl transferase

Table 17. Androgen synthesis-related gene expression in the testis of rats treated with EGME or KET.

Affmetrix probe ID	Gene symbol	Fold change				
		EGME			KET	
		200	600	2000	30	300
1368468_at	<i>Cyp11a</i>	0.83	0.62**	0.18**	0.94	0.85
1387123_at	<i>Cyp17a1</i>	0.94	0.66*	0.09**	0.78	1.51
1387988_at	<i>Hsd3b2</i>	1.17	1.12	1.09	1.31	1.38*
1387156_at	<i>Hsd17b2</i>	1.06	2.24**	1.85*	1.39*	1.49

Data in bold indicate up- or down-regulated expression (the criteria are shown in section 4.2 materials and methods)

**P<0.01, *P<0.05: significantly different from the control group by Student's t-test

第五章 精巣毒性モデルラットにおける *Tektin4* 遺伝子発現変動解析

第一節 小序

精子形成は、精細管上皮の精祖細胞が精子として精細管管腔へ放出されるまでの一連の過程である。特に円形精子細胞から精子に至る段階は *spermiogenesis* と呼ばれ、核の凝縮、先体形成、ミトコンドリア鞘の構築、鞭毛の形成、細胞質の放出と言った劇的な形態学的変化を遂げる。精子形成には、多くの遺伝子発現変動が関与しており、その発現時期や発現細胞が厳密に制御された複雑な分子機構がこれに寄与する (Matzuk and Lamb 2008; Rabbani et al. 2022; Shima et al. 2004)。こうした精子形成関連遺伝子には、化合物曝露によりその発現変動に影響を受けるものも含まれることが考えられ、精巣毒性検出のためのバイオマーカーとなる可能性がある。

精子形成に関与する遺伝子群のひとつとして、精子鞭毛を構成する重要な因子である *Tektin* ファミリーがある。*Tektin* は繊毛、鞭毛、基底小体及び中心小体の微小管の構成タンパクであることが知られ、精子の鞭毛形成と機能に重要な役割を果たすと考えられている (Larsson et al. 2000; Norrander et al. 1998; Roy et al. 2007; Tanaka et al. 2004; Zuccarello et al. 2008)。ラット *Tektin4* は、精子鞭毛の中片に局在する *Spetex-1* (Iida et al. 2006a; Iida et al. 2004; Kaneko et al. 2010) とタンパク質間相互作用する可能性のある因子として見出された (Matsuyama et al. 2005)。*Tektin4* ノックアウトマウスでは、精子の形態に明らかな異常はみられない一方、精子の運動性に影響がみられると報告されている (Roy et al. 2007)。また、精液中精子のプロテオーム解析から、ウシやヒトにおいても *Tektin4* と精子運動能の関連が示唆されている (Shen et al. 2013; Thepparat et al. 2012)。

このような背景のもと、本章ではまずラット *Tektin4* mRNA の発現時期や発現組織／細胞を調べるとともに、*Tektin4* タンパク質のラット精子中での局在を明らかにした。加えて、ラット *Tektin4* が精巣毒性評価の新たなバイオマーカーとなりうるか検討するため、化合物誘発精巣毒性モデルラットにおける *Tektin4* の遺伝子発現変動を解析した。精巣毒

性モデル化合物として *in vivo* で精子の運動性に影響を与えることが知られる DNB (Linder et al. 1988; Linder et al. 1990; Peiris and Moore 2001) 及び EGME (Chapin et al. 1985; Stermer et al. 2019) を用いて検討を行った。また、精子の運動性に影響が無いことが報告される KET (Heckman et al. 1992) についても同様に検討した。

第二節 材料と方法

本章で実施した動物実験はすべて Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council) に従って実施した。

RNA 抽出

8 週齢の Wistar ラット (日本クレア株式会社) をエーテル麻酔下で安楽死させ、精巣、精巣上体、肺、腎臓、小腸、胃、肝臓、筋肉、脳、心臓、及び脾臓を採材した。加えて、1 から 7 週齢の Wistar ラットをエーテル麻酔下で安楽死させ、精巣を採材した。採材した各臓器は、溶解バッファー (25mM sodium citrate [pH 7.0], 4M guanidine thiocyanate, 0.5% *N*-lauroylsarcosine, 0.7% 2-mercaptoethanol) 中でホモジナイズした後に $5,000\times g$ で 10 分間遠心分離した。上清を 0.1M EDTA (pH 7.4) 中の 5.7M CsCl に重層した後に $12,000\times g$ で 16 時間遠心し、total RNA を沈殿させた。

RT-PCR

First-strand synthesis kit (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.) を用いて total RNA より cDNA を合成した。PCR には LA Taq DNA polymerase (タカラバイオ株式会社)、プライマー (forward: 5'-ATG GCA CAA GCC GAA GTG CTC CTG-3', reverse: 5'-TCA CTG GTA GCC AGC CAG CTG GAG-3') を用いた。また、内部コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) についてプライマー (forward: 5'-TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC-3', reverse: 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3') を用いて同様に PCR を実施した。PCR 産物についてアガロースゲルを用いて電気泳動した。

In Situ Hybridization

ラット *Tektin4* mRNA の発現細胞を特定するため、ラット精巣に対する in situ

hybridization を実施した。ラット精巢の凍結切片はハイブリダイゼーションバッファー (20mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.3M NaCl, 2mM EDTA, 50% formamide, 1 mg/ml BSA, 0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 1 mg/ml herring sperm DNA) を用いて 42°C で 30 分間ブレインキュベーションした。その後、DIG 標識センス又はアンチセンス RNA プローブを含むハイブリダイゼーションバッファー中で、42°C で 5 時間ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、切片は 50%formamide 含有の 2x SSC バッファーを用いて 42°C で 1 時間洗浄し、RNase A (20 mg/ml) を加えて 37°C で 30 分間インキュベートした。結合した cRNA は抗 DIG アルカリホスファターゼ標識抗体 (1 : 500 希釈、Roche Molecular Biochemicals Inc.) で検出し、nitro blue tetrazolium-5-bromocresyl-3-indolylphosphate (NTB-BCIP、Roche Molecular Biochemicals Inc.) で可視化した。

抗 Tektin4 抗体の作成

Tektin4 特異的配列である親水性領域の合成ペプチド (GLATAGFRTAK) を keyhole limpet hemocyanin (KLH、Pierce Biotechnology Inc.) に結合させた。KLH に結合したペプチド (計 1 mg) を 1 ml の生理食塩水に溶解させ、1 ml のフロイント完全アジュバントで乳化した後、ウサギの背部に皮下投与した。抗血清は 3 回目投与後 2 週間以内に回収した。

免疫組織化学

既報 (Doiguchi et al. 2002; Iida et al. 1999) に準じ、Wistar ラットの精巢上体より採取した精子をパーコール密度勾配遠心法により精製した。精製した精子について 4%パラホルムアルデヒドを含む PBS 中にて 48°C で 4 時間固定し、50mM NH₄Cl を含む PBS 中で 20 分間インキュベートした。その後、PBS で洗浄してポリ-L-リジンコートしたスライドガラスに接着させた。精子を 0.1% Triton X-100 を含む PBS で 5 分間洗浄し、抗 α tubulin モノクローナル抗体 (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.) と抗 Tektin4 抗体で二重標識した後、サンプルを FITC 標識抗マウス IgG と Cy3 標識抗ウサギ IgG (Amersham Pharmacia Biotech

Ltd.) でインキュベートした。抗 Tektin4 抗体とモノクローナル抗 α tubulin 抗体はブロッキングバッファーで 1: 100 に希釈した。対照として一次抗体を免疫前血清で置換した。その後、サンプルを PBS で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus LSM-GB 200) を用いて観察した。

DNB、EGME 及び KET 投与によるラット精巣での *Tektin4* の遺伝子発現変動

化合物誘発精巣毒性モデルラットでの遺伝子発現変動を調べるため、*Tektin4* (Affymetrix ID: 1384789_at) のマイクロアレイデータを抽出した。マイクロアレイデータには第一章及び第二章で取得したものを利用した。マイクロアレイデータの変動の基準は、1) プローブの detection call が 4 例中 3 例以上で Presence call であること、2) シグナル強度の平均値が媒体対処群に比して 1.5 倍より高い又は 0.67 倍より低いこと、3) 統計学的解析で有意であることのすべてを満たすこととした。統計学的解析は F 検定により等分散性の検定を行い、等分散の場合は Student t 検定を、非等分散の場合は Aspin-Welch t 検定を行った。有意水準は 0.05 未満とした。

第三節 結果

ラット *Tektin4* mRNA の発現解析

1 から 8 週齢のラット精巣に対して RT-PCR を実施した結果、4 週齢以降に *Tektin4* mRNA の発現がみられた (Figure 13A)。また、8 週齢のラットの全身諸臓器に対して同様に RT-PCR を実施した結果、精巣での高発現がみられた (Figure 13B)。さらに、ラット精巣に対し in situ hybridization を実施した結果、*Tektin4* mRNA の円形精子細胞への局在がみられた (Figure 14)。

ラット *Tektin4* タンパク質の発現解析

ラットの精子における *Tektin4* タンパク質の分布を調べるため、抗 *Tektin4* 抗体と抗 α -tubulin 抗体で二重標識して共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。その結果、精巣上体尾部より精製した精子では、*Tektin4* の局在は精子頸部から末端部までの鞭毛全体でみられた一方、精子頭部にはみられなかった (Figure 15)。

DNB、EGME 又は KET 投与ラットにおける精巣中 *Tektin4* の遺伝子発現変動

DNB (25 及び 50 mg/kg)、EGME (200、600、及び 2000 mg/kg) 又は KET (30 及び 300 mg/kg) をラットに単回経口投与し、投与 4 又は 24 時間後に精巣を採材して *Tektin4* mRNA の遺伝子発現を調べたところ、いずれの群においても既定の変動基準を満たす変化はみられなかった (Figure 16)。なお、DNB の 25 mg/kg 以上及び EGME の 600 mg/kg 以上では、投与 24 時間後に *Tektin4* mRNA の統計学的に有意に増加がみられたが、その変化の程度は基準 (1.5 倍) よりも小さかった。

第四節 考察

本章では、まず始めに、ラット *Tektin4* の無処置ラットでの発現プロファイル解析を行った。その結果、ラット *Tektin4* mRNA は他臓器に比して精巣で高発現し、その発現は生後 4 週齢以降にみられた。また、*Tektin4* mRNA は円形精子細胞で発現し、*Tektin4* タンパク質は精子鞭毛に局在することが明らかとなった。これらの結果から、*Tektin4* は精子鞭毛の形成や機能に寄与する可能性が示唆された。先行研究から、*Tektin4* はマウス、ウシ、及びヒトにおいて精子運動能との関連が示唆されている (Roy et al. 2007; Shen et al. 2013; Thepparat et al. 2012)。本研究で示された *Tektin4* タンパク質のラット精子鞭毛での局在は、ラットにおいても他動物種と同様に *Tektin4* が精子の運動性に寄与する可能性を示唆するものと考えられた。

DNB 又は EGME を投与したラット精巣において、既定の変動基準を満たさないものの統計学的に有意な *Tektin4* mRNA の増加がみられた。変化の程度は軽微ではあるが、その変化量は用量の増加にともなって増加傾向を示すことから、化合物投与に起因した変動であることが示唆される。一方、KET 投与ラットでは *Tektin4* mRNA に変化はみられなかった。DNB 及び EGME 投与ラットでは精子の運動性への影響が知られ、KET 投与ラットではこの影響がみられないことを勘案すると、精巣中 *Tektin4* mRNA の発現変動と化合物曝露によって誘発される精子運動能の低下に何らかの関連がある可能性がある。

Tektin4 mRNA は円形精子細胞で発現することから、DNB 又は EGME の投与でみられた *Tektin4* mRNA の増加傾向は円形精子細胞で生じたものと推測される。本研究の病理組織学的検査では円形精子細胞以降の生殖細胞に毒性変化はみられていないことから、円形精子細胞ではこれら化合物の曝露によって器質的变化をとまなわない何らかの潜在的な変化が生じ、それを反映する遺伝子発現変動の一部として *Tektin4* mRNA の増加傾向が生じたことが示唆される。先行研究において、DNB 投与による精巣上体中精子の鞭毛の変性や運動能低下は単回投与 16 日後以降に観察され、それ以前にはみられないことから、こ

これらの毒性は精巣上体中精子への DNB の直接作用ではなく、DNB 投与直後に生じた精巣中の生殖細胞への毒性の影響を受けたものと推測されている (Linder et al. 1988)。同様に、EGME によって誘発される精巣上体中精子の異常についても、EGME の最初の毒性標的部位は精巣であり、精子形成サイクルや精巣上体での輸送を経た後に精巣上体中精子の異常として顕在化したものと考察されている (Chapin et al. 1985)。したがって、本研究においても DNB 及び EGME の投与 24 時間後には精子鞭毛の形態形成や機能に関わる潜在的な毒性が精巣中の生殖細胞に生じたものと考えられる。一方、こうした潜在的な毒性が円形精子細胞における遺伝子変動に反映されるか否かは現時点で不明であり、*Tektin4* mRNA 発現変動と化合物曝露による精子運動性低下との関係を明らかにするにはさらなる研究が必要と思われる。

以上、ラット *Tektin4* の発現プロファイル解析を行った結果、*Tektin4* mRNA は円形精子細胞で発現し、*Tektin4* タンパク質は精子鞭毛に局在することが示された。さらに、精巣中 *Tektin4* mRNA は、精子運動能を低下させる DNB 又は EGME 投与ラットで発現増加傾向が示唆された一方で、精子運動能に影響しない KET 投与ラットでは発現変動がみられなかった。*Tektin4* のラット精子における機能や化合物曝露に起因する *Tektin4* mRNA 発現変動の意義についてはさらなる研究が必要であるが、本研究の結果は *Tektin4* mRNA 発現変動が化合物曝露による潜在的な精子運動能の低下を評価できるバイオマーカー候補となる可能性を示唆するものと思われた。

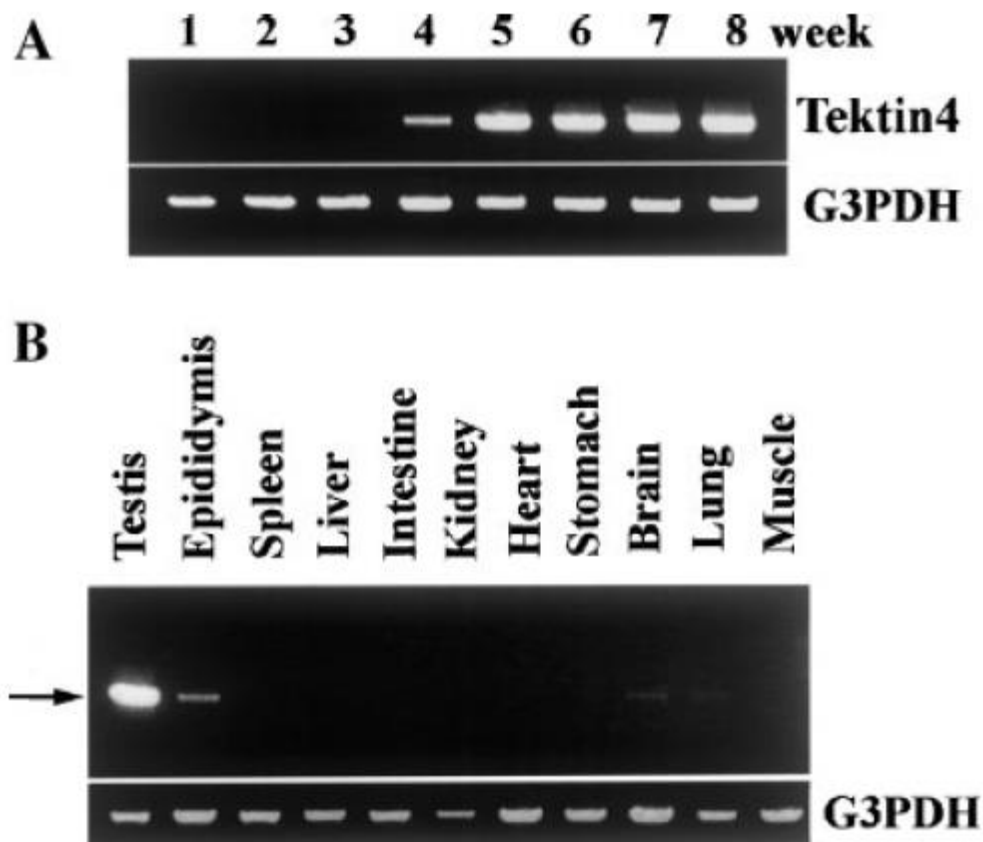


Figure 13. Expression analysis of Tektin4 mRNA. A: RT-PCR analysis was carried out to examine the expression levels of Tektin4 mRNA in testes of 1 to 8-week-old rats. A PCR product of 1,344 bp was first detected at 4 weeks of postnatal development and continued to be detected up to 8 weeks. The expression of G3PDH is displayed as a control for PCR amplification. B: RT-PCR analysis of the expression of Tektin4 mRNA in various organs of adult rats. The gene was highly expressed in testis (an arrow), weakly in epididymis, brain, and lung, but undetectable in other organs examined. The expression of G3PDH is displayed as a control for PCR amplification.

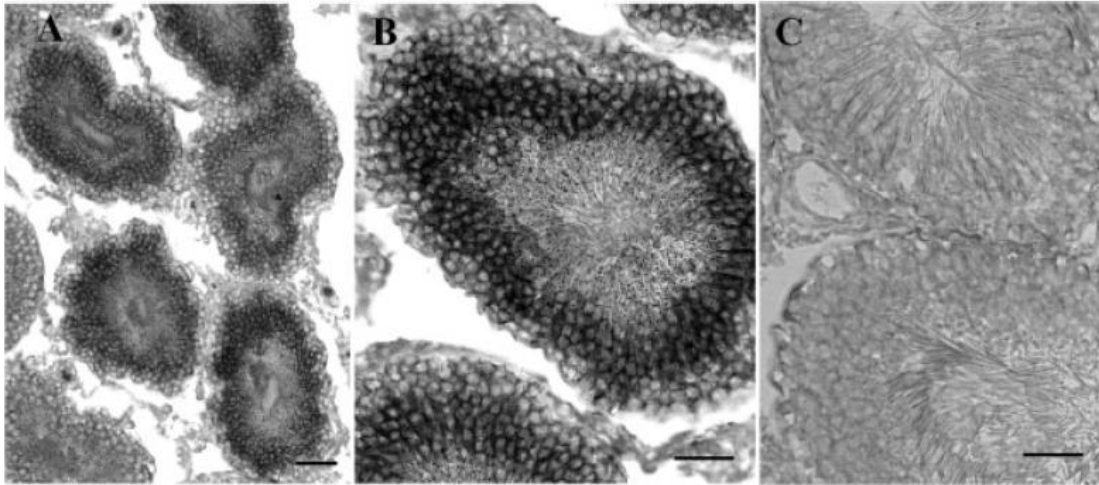


Figure 14. In situ localization of Tektin4 mRNA in the adult rat testis. Frozen sections were hybridized either with a DIG-labeled cRNA probe (A and B) or with a sense probe (C). Reaction product indicating the presence of Tektin4 mRNA was observed in round spermatids in the seminiferous epithelium (A and B). Hybridization with a sense probe gave no specific signal (C). Spermatogonia, spermatocytes, elongating spermatids as well as Sertoli cell were negative. Interstitial cells were also devoid of signal. Bars: 50 μ m (A), 25 μ m (B and C).

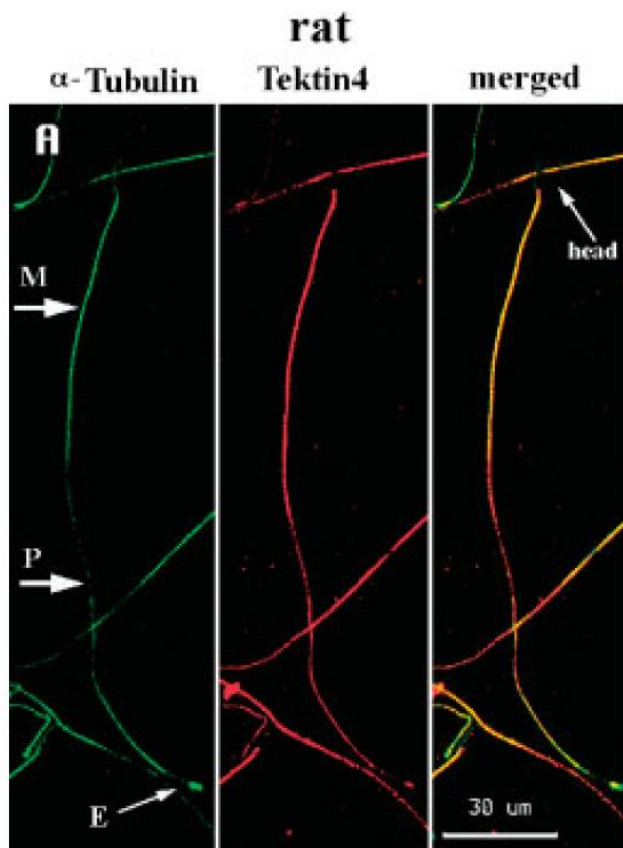


Figure 15 Double immunolabeling of rat spermatozoa. Spermatozoa were double immunostained with the anti-alpha tubulin monoclonal antibody and the anti-Tektin4 antibody. Confocal images produced by superposition of tubulin (left panel) and Tektin4 (center panel) are shown in right panel. M, P, and E indicate the middle piece, the principal piece, and the end piece of spermatozoa, respectively.

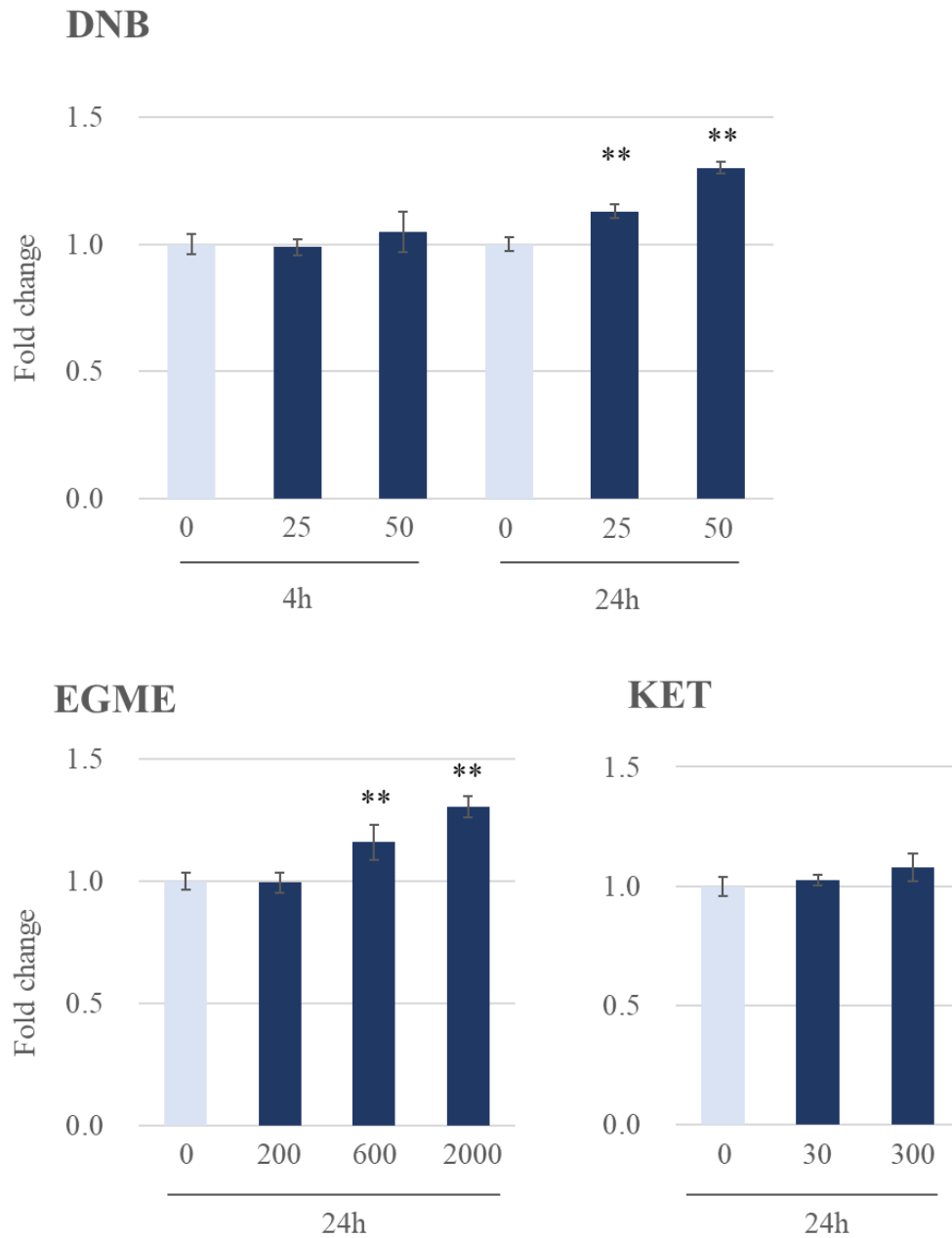


Figure 16. Testicular *Tektin4* mRNA expression in rats treated with DNB, EGME or KET. Data show the mean $\pm$ standard deviation of 4 animals. ** $P < 0.01$: Significantly different from the control group by student's t-test.

総合考察

本研究では網羅的遺伝子発現解析を用いた精巣毒性評価について検討し、以下の成果が得られた。

まず第一章では、精巣毒性評価のための新規バイオマーカー候補遺伝子として、発現細胞の特異性に着目した細胞特異的遺伝子セットを選別した。細胞特異的遺伝子セットの発現変動と各発現細胞の障害との関係を検討するため、DNB 誘発精巣毒性モデルラットを作製して病理組織学的検査及び細胞特異的遺伝子セットの発現変動解析を実施した。その結果、DNB 投与ラットの精巣では、精母細胞障害の増悪にともなって精母細胞特異的遺伝子の発現低下がみられた (Matsuyama et al. 2011)。このことから、精母細胞特異的遺伝子の発現変動が精母細胞障害を反映する新規バイオマーカー候補となる可能性が示唆された。続いて第二章では、精母細胞特異的遺伝子の発現低下と精母細胞障害との関係をさらに調べるため、DNB とは異なる毒性発現機序が知られる EGME 誘発精巣毒性モデルラットを作出して遺伝子発現変動を解析した。その結果、EGME 誘発精巣毒性モデルラットにおいても精母細胞障害の増悪にともなう精母細胞特異的遺伝子の発現低下がみられた (Matsuyama et al. 2018)。また、DNB 及び EGME 誘発精巣毒性モデルラットではいずれも精巣テストステロンの低下が報告されていたことから、精巣テストステロン低下が精母細胞特異的遺伝子の発現変動に与える影響を検討した。KET 誘発テストステロン低下モデルラットを作出して精母細胞特異的遺伝子の発現変動を解析した結果、KET 投与ラットでは精母細胞特異的遺伝子の発現低下はみられず、テストステロン低下はこれら遺伝子の発現変動に影響しないことが示唆された (Matsuyama et al. 2018)。以上の結果から、精母細胞特異的遺伝子の発現低下は化合物の毒性発現メカニズムに依存せず、精母細胞障害の程度を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された (Matsuyama et al. 2011; Matsuyama et al. 2018)。

第三章では、DNB 誘発精巣毒性モデルラットに対して網羅的遺伝子発現解析を実施し、

DNB 投与による毒性兆候が転写レベルで検出されるか検討した。その結果、DNB 投与 24 時間後では、DNB 誘発精巣毒性の発現に寄与すると考えられる酸化ストレス応答、アポトーシス、及びセルトリー生殖細胞間の細胞接着異常を反映すると思われる遺伝子発現変動がみられた (Matsuyama et al. 2011)。続いて第四章では EGME 誘発精巣毒性モデルラットに対する網羅的遺伝子発現解析を実施し、EGME 曝露による酸化ストレス応答亢進、プロテインキナーゼ活性化、及びヒストンアセチル化の亢進を示唆する変化を検出した (Matsuyama et al. 2018)。こうした転写レベルの変動は、各分子イベントを検出する際のバイオマーカーとなりうるものと考えられた。加えて、テストステロン応答に着目した遺伝子発現変動解析を実施し、テストステロン応答に関与する遺伝子発現変動プロファイルの違いから EGME 及び KET によるテストステロン低下メカニズムの違いを推定した (Matsuyama et al. 2018)。

第五章では精子の形態形成や機能に関与する遺伝子が精巣毒性バイオマーカー遺伝子となりうるかを検討する目的で、ラット *Tektin4* に着目して実験を行った。ラット精巣において mRNA は円形精子細胞で発現し、タンパク質は精子鞭毛に局在したことから、*Tektin4* は精子鞭毛の形成や機能に関与する可能性が考えられた (Iida et al. 2006b; Matsuyama et al. 2005)。さらに、精子運動能の低下を惹起することが知られる DNB 又は EGME 誘発精巣毒性モデルラットにおいて、精巣中 *Tektin4* mRNA の発現増加が示唆された。*Tektin4* のラット精子における機能や精巣毒性モデルラットでの精巣中 *Tektin4* mRNA 発現変動の意義については不明であるが、本研究の結果は *Tektin4* mRNA 発現変動が精子の鞭毛形成や運動機能に対する潜在的な毒性を反映する可能性を示唆するものと思われた。

以上の結果を踏まえ、精巣毒性評価における網羅的遺伝子発現解析の有用性について総合的に考察する。

本研究の結果、精母細胞特異的遺伝子の発現変動が精母細胞障害を検出するバイオマ-

カーとなることを見出した。精母細胞障害は、精母細胞への化合物の直接作用以外のメカニズムでも広く観察される毒性であり、セルトリ細胞障害 (Blackburn et al. 1988; Boekelheide 1988)、テストステロン欠乏 (Bakalska et al. 2004)、又は視床下部-下垂体-性腺軸の機能障害 (Sinha Hikim et al. 1997) により二次的に起こり得る。加えて、分化の上流にある精祖細胞に対する障害が生じた場合も、精子形成サイクルが進むことによって、結果的に精母細胞の喪失として観察される (Matsui et al. 1995; Russell and Russell 1991; Watanabe et al. 2000)。したがって、毒性発現メカニズムによらずに精母細胞障害を検出するバイオマーカーは、様々な毒性標的／メカニズムの精巣毒性に対して幅広く適用可能な評価ツールになりうると思われる。

精母細胞特異的遺伝子セットを構成する個々の遺伝子の発現変動に着目すると、精母細胞障害がみられた DNB 又は EGME の用量では、ほぼ全ての精母細胞特異的遺伝子で発現減少がみられた一方で、発現増加はみられなかった (Figure 4 及び 6)。したがって、精母細胞特異的遺伝子の精母細胞における生理的機能は不明であるものの、これら遺伝子は精母細胞障害に際して発現減少する性質を共通して有していると示唆される。こうした性質は、毒性発現メカニズム非依存的に精母細胞障害を反映するバイオマーカーとして機能することを支持するものと考えられる。また、本研究で用いた D スコアはバイオマーカー遺伝子セットを構成する各遺伝子の発現変動の方向と程度を加味してスコア化するものであることを勘案すると (Kiyosawa et al. 2009b)、精母細胞障害に対して一様に発現減少を示す精母細胞特異的遺伝子では D-スコアによる評価は鋭敏な指標となることが期待される。

非臨床安全性試験の一般的な精巣毒性評価において、精母細胞障害は病理組織学的検査によって評価されるが、本研究で実施したような定量的な病理組織学的解析を実施するには専門的な技術に加えて時間と手間を要する。また、障害を受けた生殖細胞はセルトリ細胞の貪食や精細管管腔への剥離により急速に消失することがあり (Creasy 1997)、障害の程度を精緻に定量評価することは難しい場合がある。一方、精母細胞特異的遺伝子を用い

た評価では、遺伝子発現変動をスコア化することによって比較的簡便に客観的かつ定量的な評価が可能となる。こうした特徴は、単に精母細胞障害を検出するバイオマーカーとなるだけではなく、複数の医薬品候補化合物間で精母細胞障害の程度を比較する際や、他の定量的なパラメーター（薬物濃度や生化学的検査値など）と精母細胞障害との相関解析を実施する場合に簡便に活用可能な評価指標になると期待される。

今回、酸化ストレス応答、セルトリー生殖細胞間細胞接着異常、プロテインキナーゼの活性化、ヒストンアセチル化の亢進といった分子イベントの変動を網羅的遺伝子発現解析によって評価可能であることが示唆された。こうした分子イベントは精巣毒性発現に寄与することが知られており、精巣毒性発現メカニズムを推定する際に有用な評価指標になると思われる。例えば精巣は酸化ストレスに対して脆弱であることが知られ、多くの精巣毒性物質は酸化ストレスを惹起することから、酸化ストレスは化合物曝露による精巣毒性発現に直結する分子イベントと考えられる（Conte da Frola et al. 2006; Ilbey et al. 2009; Peltola et al. 1994; Siu et al. 2009; Song et al. 2011; Urriola-Muñoz et al. 2014）。本研究では、DNB 又は EGME 誘発精巣毒性の増悪にともなって、酸化ストレス応答関連遺伝子の発現変動や upstream regulator 解析での関連 upstream regulator の activation z-score の変動は増悪しており、精巣内で発生した酸化ストレスを評価する際の有用なバイオマーカーになると期待される。また、DEG を用いた upstream regulator 解析によって、EGME 投与ラットでテストステロンシグナルの活性化が、KET 投与ラットでは同シグナルの抑制が生じていることが示唆され、こうした知見をもとにテストステロン低下に対する両化合物の作用機序の違いを推定した。このように、既知のバイオマーカー遺伝子の発現変動を個別に評価することに加えて、DEG の発現変動プロファイルについて GO 解析や upstream regulator 解析などの手法を用いた総合的な生物学的解釈を行うことは、特定の毒性エンドポイントの背景にある発現機序を推定する際に有用な手法と考えられる。

以上のように、本研究では精巣毒性モデルラットにおける精母細胞障害、酸化ストレス応答、セルトリー生殖細胞間細胞接着異常、プロテインキナーゼ活性化、ヒストンアセチ

ル化の亢進に関連する遺伝子発現変動を見出した。また、精巣テストステロン低下の作用機序が EGME と KET で異なることを遺伝子発現変動プロファイルから推定した。こうした研究成果は、精巣毒性発現に寄与するこれらの毒性学的エンドポイントが転写レベルで検出できる可能性を示すとともに、精巣における障害の検出や毒性発現メカニズムの推定に際して網羅的遺伝子発現解析が有用な手法であることを示すものである。

引用文献

- Abe, J., Takahashi, M., Ishida, M., Lee, J.D. and Berk, B.C. 1997. c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. *J Biol Chem* 272, 20389-20394.
- Ahmed, M.M., Wang, T., Luo, Y., Ye, S., Wu, Q., Guo, Z., Roebuck, B.D., Sutter, T.R. and Yang, J.Y. 2011. Aldo-keto reductase-7A protects liver cells and tissues from acetaminophen-induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Hepatology* 54, 1322-1332.
- Anderson, M.T., Staal, F.J., Gitler, C., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. 1994. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11527-11531.
- Bagchi, G., Hurst, C.H. and Waxman, D.J. 2009. Interactions of methoxyacetic acid with androgen receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 238, 101-110.
- Bakalska, M., Atanassova, N., Koeva, Y., Nikolov, B. and Davidoff, M. 2004. Induction of male germ cell apoptosis by testosterone withdrawal after ethane dimethanesulfonate treatment in adult rats. *Endocr Regul* 38, 103-110.
- Biswas, S.K. 2016. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016, 5698931.
- Blackburn, D.M., Gray, A.J., Lloyd, S.C., Sheard, C.M. and Foster, P.M. 1988. A comparison of the effects of the three isomers of dinitrobenzene on the testis in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 92, 54-64.
- Boekelheide, K. 1988. Rat testis during 2,5-hexanedione intoxication and recovery. I. Dose response and the reversibility of germ cell loss. *Toxicol Appl Pharmacol* 92, 18-27.
- Chabanas, A., Khoury, E., Goeltz, P., Froussard, P., Gjerset, R., Dod, B., Eisen, H. and Lawrence, J.J. 1985. Effects of butyric acid on cell cycle regulation and induction of histone H1(0) in mouse cells and tissue culture. Inducibility of H1 (0) in the late S-G2 phase of the cell cycle. *J Mol Biol* 183, 141-151.
- Chapin, R.E., Dutton, S.L., Ross, M.D. and Lamb, J.C.t. 1985. Effects of ethylene glycol monomethyl ether (EGME) on mating performance and epididymal sperm parameters in F344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 5, 182-189.
- Chapin, R.E., Dutton, S.L., Ross, M.D., Sumrell, B.M. and Lamb, J.C.t. 1984. The effects of ethylene glycol monomethyl ether on testicular histology in F344 rats. *J Androl* 5, 369-380.
- Cheng, C.Y., Grima, J., Stahler, M.S., Lockshin, R.A. and Bardin, C.W. 1989. Testins are structurally related Sertoli cell proteins whose secretion is tightly coupled to the presence of germ cells. *J Biol Chem* 264, 21386-21393.
- Cody, T.E., Witherup, S., Hastings, L., Stemmer, K. and Christian, R.T. 1981. 1,3-dinitrobenzene:

- toxic effects in vivo and in vitro. *J Toxicol Environ Health* 7, 829-847.
- Conte da Frota, M.L., Jr., Gomes da Silva, E., Behr, G.A., Roberto de Oliveira, M., Dal-Pizzol, F., Klamt, F. and Moreira, J.C. 2006. All-trans retinoic acid induces free radical generation and modulate antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells. *Mol Cell Biochem* 285, 173-179.
- Creasy, D.M. 1997. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol* 25, 119-131.
- Creasy, D.M., Flynn, J.C., Gray, T.J. and Butler, W.H. 1985. A quantitative study of stage-specific spermatocyte damage following administration of ethylene glycol monomethyl ether in the rat. *Exp Mol Pathol* 43, 321-336.
- De Gendt, K., Swinnen, J.V., Saunders, P.T., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lécureuil, C., Heyns, W., Carmeliet, P., Guillou, F., Sharpe, R.M. and Verhoeven, G. 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1327-1332.
- Devarajan, A., Bourquard, N., Hama, S., Navab, M., Grijalva, V.R., Morvardi, S., Clarke, C.F., Vergnes, L., Reue, K., Teiber, J.F. and Reddy, S.T. 2011. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 14, 341-351.
- Doiguchi, M., Mori, T., Toshimori, K., Shibata, Y. and Iida, H. 2002. Spergen-1 might be an adhesive molecule associated with mitochondria in the middle piece of spermatozoa. *Dev Biol* 252, 127-137.
- Dutta, S., Sengupta, P., Slama, P. and Roychoudhury, S. 2021. Oxidative Stress, Testicular Inflammatory Pathways, and Male Reproduction. *Int J Mol Sci* 22.
- El-Sabeawy, F., Wang, S., Overstreet, J., Miller, M., Lasley, B. and Enan, E. 1998. Treatment of rats during pubertal development with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters both signaling kinase activities and epidermal growth factor receptor binding in the testis and the motility and acrosomal reaction of sperm. *Toxicol Appl Pharmacol* 150, 427-442.
- Fenic, I., Hossain, H.M., Sonnack, V., Tchatalbachev, S., Thierer, F., Trapp, J., Failing, K., Edler, K.S., Bergmann, M., Jung, M., Chakraborty, T. and Steger, K. 2008. In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis. *J Androl* 29, 172-185.
- Fenic, I., Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M. and Steger, K. 2004. In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J Androl* 25, 811-818.
- Fijak, M., Schneider, E., Klug, J., Bhushan, S., Hackstein, H., Schuler, G., Wygrecka, M., Gromoll, J. and Meinhardt, A. 2011. Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion. *J Immunol* 186, 5162-5172.
- Foster, P.M., Creasy, D.M., Foster, J.R., Thomas, L.V., Cook, M.W. and Gangolli, S.D. 1983.

- Testicular toxicity of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 69, 385-399.
- Foster, P.M., Lloyd, S.C. and Prout, M.S. 1987. Toxicity and metabolism of 1,3-dinitrobenzene in rat testicular cell cultures. *Toxicol In Vitro* 1, 31-37.
- Fukushima, T., Taki, K., Ise, R., Horii, I. and Yoshida, T. 2011. MicroRNAs expression in the ethylene glycol monomethyl ether-induced testicular lesion. *J Toxicol Sci* 36, 601-611.
- Fukushima, T., Yamamoto, T., Kikkawa, R., Hamada, Y., Komiyama, M., Mori, C. and Horii, I. 2005. Effects of male reproductive toxicants on gene expression in rat testes. *J Toxicol Sci* 30, 195-206.
- Grima, J. and Cheng, C.Y. 2000. Testin induction: the role of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate/protein kinase A signaling in the regulation of basal and lonidamine-induced testin expression by rat sertoli cells. *Biol Reprod* 63, 1648-1660.
- Grima, J., Wong, C.C., Zhu, L.J., Zong, S.D. and Cheng, C.Y. 1998. Testin secreted by Sertoli cells is associated with the cell surface, and its expression correlates with the disruption of Sertoli-germ cell junctions but not the inter-Sertoli tight junction. *J Biol Chem* 273, 21040-21053.
- Grima, J., Zhu, L. and Cheng, C.Y. 1997. Testin is tightly associated with testicular cell membrane upon its secretion by sertoli cells whose steady-state mRNA level in the testis correlates with the turnover and integrity of inter-testicular cell junctions. *J Biol Chem* 272, 6499-6509.
- Guo, X., Shin, V.Y. and Cho, C.H. 2001. Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. *Life Sci* 69, 3113-3119.
- Heckman, W.R., Kane, B.R., Pakyz, R.E. and Cosentino, M.J. 1992. The effect of ketoconazole on endocrine and reproductive parameters in male mice and rats. *J Androl* 13, 191-198.
- Hess, R.A., Linder, R.E., Strader, L.F. and Perreault, S.D. 1988. Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat. II. Quantitative and qualitative histopathology of the testis. *J Androl* 9, 327-342.
- Hochhuth, C. and Doenecke, D. 1992. Differential expression of the histone H1 zero gene in U937 and HL-60 leukemia cell lines. *J Cell Biochem* 50, 316-323.
- Huang, W., Sherman, B.T. and Lempicki, R.A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57.
- Iida, H., Honda, Y., Matsuyama, T., Shibata, Y. and Inai, T. 2006a. Spetex-1: a new component in the middle piece of flagellum in rodent spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 73, 342-349.
- Iida, H., Honda, Y., Matsuyama, T., Shibata, Y. and Inai, T. 2006b. Tektin 4 is located on outer dense fibers, not associated with axonemal tubulins of flagella in rodent spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 73, 929-936.
- Iida, H., Ichinose, J., Kaneko, T., Mōri, T. and Shibata, Y. 2004. Complementary DNA cloning of rat spetex-1, a spermatid-expressing gene-1, encoding a 63 kDa cytoplasmic protein of elongate spermatids. *Mol Reprod Dev* 68, 385-393.

- Iida, H., Yoshinaga, Y., Tanaka, S., Toshimori, K. and Mori, T. 1999. Identification of Rab3A GTPase as an acrosome-associated small GTP-binding protein in rat sperm. *Dev Biol* 211, 144-155.
- Ikeda, H., Nishi, S. and Sakai, M. 2004. Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. *Biochem J* 380, 515-521.
- Ilbey, Y.O., Ozbek, E., Cekmen, M., Simsek, A., Otunctemur, A. and Somay, A. 2009. Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod* 24, 1717-1725.
- Irimura, K., Yamaguchi, M., Morinaga, H., Sugimoto, S., Kondou, Y. and Koida, M. 2000. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 26). Detection of 1,3-dinitrobenzene-induced histopathological changes in testes and epididymides of rats with 2-week daily repeated dosing. *J Toxicol Sci* 25 Spec No, 251-258.
- Jacobson, C.F. and Miller, M.G. 1998. Species difference in 1,3-dinitrobenzene testicular toxicity: in vitro correlation with glutathione status. *Reprod Toxicol* 12, 49-56.
- Jansen, M.S., Nagel, S.C., Miranda, P.J., Lobenhofer, E.K., Afshari, C.A. and McDonnell, D.P. 2004. Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7199-7204.
- Jin, Y. and Penning, T.M. 2007. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 263-292.
- Jindo, T., Wine, R.N., Li, L.H. and Chapin, R.E. 2001. Protein kinase activity is central to rat germ cell apoptosis induced by methoxyacetic acid. *Toxicol Pathol* 29, 607-616.
- Johnson, K.J. and Boekelheide, K. 2002. Dynamic testicular adhesion junctions are immunologically unique. II. Localization of classic cadherins in rat testis. *Biol Reprod* 66, 992-1000.
- Johnston, D.S., Wright, W.W., Dicaneloro, P., Wilson, E., Kopf, G.S. and Jelinsky, S.A. 2008. Stage-specific gene expression is a fundamental characteristic of rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8315-8320.
- Kaneko, T., Murayama, E., Kurio, H., Yamaguchi, A. and Iida, H. 2010. Characterization of Spetex-1, a new component of satellite fibrils associated with outer dense fibers in the middle piece of rodent sperm flagella. *Mol Reprod Dev* 77, 363-372.
- Kiyosawa, N., Ando, Y., Manabe, S. and Yamoto, T. 2009a. Toxicogenomic biomarkers for liver toxicity. *J Toxicol Pathol* 22, 35-52.
- Kiyosawa, N., Ando, Y., Watanabe, K., Niino, N., Manabe, S. and Yamoto, T. 2009b. Scoring multiple toxicological endpoints using a toxicogenomic database. *Toxicol Lett* 188, 91-97.
- Kiyosawa, N., Ito, K., Sakuma, K., Niino, N., Kanbori, M., Yamoto, T., Manabe, S. and Matsunuma, N. 2004. Evaluation of glutathione deficiency in rat livers by microarray analysis. *Biochem*

- Pharmacol 68, 1465-1475.
- Kiyosawa, N., Uehara, T., Gao, W., Omura, K., Hirode, M., Shimizu, T., Mizukawa, Y., Ono, A., Miyagishima, T., Nagao, T. and Urushidani, T. 2007. Identification of glutathione depletion-responsive genes using phorone-treated rat liver. *J Toxicol Sci* 32, 469-486.
- Krämer, A., Green, J., Pollard, J., Jr. and Tugendreich, S. 2014. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* 30, 523-530.
- Kreuz, S. and Fischle, W. 2016. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenomics* 8, 843-862.
- Kypreou, K.P., Sourlingas, T.G. and Sekeri-Pataryas, K.E. 2004. Age-dependent response of lymphocytes in the induction of the linker histone variant, H1 degrees and histone H4 acetylation after treatment with the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A. *Exp Gerontol* 39, 469-479.
- Larsson, M., Norrander, J., Gräslund, S., Brundell, E., Linck, R., Ståhl, S. and Höög, C. 2000. The spatial and temporal expression of Tekt1, a mouse tektin C homologue, during spermatogenesis suggest that it is involved in the development of the sperm tail basal body and axoneme. *Eur J Cell Biol* 79, 718-725.
- Lee, N.P., Mruk, D., Lee, W.M. and Cheng, C.Y. 2003. Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis? *Biol Reprod* 68, 489-508.
- Li, L., Chang, W., Yang, G., Ren, C., Park, S., Karantanos, T., Karanika, S., Wang, J., Yin, J., Shah, P.K., Takahiro, H., Dobashi, M., Zhang, W., Efstathiou, E., Maity, S.N., Aparicio, A.M., Li Ning Tapia, E.M., Troncoso, P., Broom, B., Xiao, L., Lee, H.S., Lee, J.S., Corn, P.G., Navone, N. and Thompson, T.C. 2014. Targeting poly(ADP-ribose) polymerase and the c-Myb-regulated DNA damage response pathway in castration-resistant prostate cancer. *Sci Signal* 7, ra47.
- Linder, R.E., Hess, R.A., Perreault, S.D., Strader, L.F. and Barbee, R.R. 1988. Acute effects and long-term sequelae of 1,3-dinitrobenzene on male reproduction in the rat. I. Sperm quality, quantity, and fertilizing ability. *J Androl* 9, 317-326.
- Linder, R.E., Strader, L.F., Barbee, R.R., Rehnberg, G.L. and Perreault, S.D. 1990. Reproductive toxicity of a single dose of 1,3-dinitrobenzene in two ages of young adult male rats. *Fundam Appl Toxicol* 14, 284-298.
- Linschooten, J.O., Laubenthal, J., Cemeli, E., Baumgartner, A., Anderson, D., Sipinen, V.E., Brunborg, G., Haenen, G.R., Fthenou, E., Briedé, J.J., van Schooten, F.J. and Godschalk, R.W. 2011. Incomplete protection of genetic integrity of mature spermatozoa against oxidative stress. *Reprod Toxicol* 32, 106-111.
- Ludwig, S., Tinwell, H., Rouquié, D., Schorsch, F., Pallardy, M. and Bars, R. 2012. Potential new targets involved in 1,3-dinitrobenzene induced testicular toxicity. *Toxicol Lett* 213, 275-284.
- Mangelsdorf, I., Buschmann, J. and Orthen, B. 2003. Some aspects relating to the evaluation of the

- effects of chemicals on male fertility. *Regul Toxicol Pharmacol* 37, 356-369.
- Matsui, H., Mitsumori, K., Yasuhara, K., Onodera, H., Shimo, T. and Takahashi, M. 1995. Morphological evaluation of cyclophosphamide testicular toxicity in rats using quantitative morphometry of spermatogenic cycle stages. *J Toxicol Sci* 20, 407-414.
- Matsuyama, T., Honda, Y., Doiguchi, M. and Iida, H. 2005. Molecular cloning of a new member of TEKTIN family, Tektin4, located to the flagella of rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 72, 120-128.
- Matsuyama, T., Niino, N., Kiyosawa, N., Kai, K., Teranishi, M. and Sanbuissho, A. 2011. Toxicogenomic investigation on rat testicular toxicity elicited by 1,3-dinitrobenzene. *Toxicology* 290, 169-177.
- Matsuyama, T., Yabe, K., Kuwata, C., Ito, K., Ando, Y., Iida, H. and Mori, K. 2018. Transcriptional profile of ethylene glycol monomethyl ether-induced testicular toxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 41, 105-112.
- Matzuk, M.M. and Lamb, D.J. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 14, 1197-1213.
- McCabe, M.J., Tarulli, G.A., Meachem, S.J., Robertson, D.M., Smooker, P.M. and Stanton, P.G. 2010. Gonadotropins regulate rat testicular tight junctions in vivo. *Endocrinology* 151, 2911-2922.
- Meng, J., Greenlee, A.R., Taub, C.J. and Braun, R.E. 2011. Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. *Biol Reprod* 85, 254-260.
- Miller, R.R., Ayres, J.A., Young, J.T. and McKenna, M.J. 1983. Ethylene glycol monomethyl ether. I. Subchronic vapor inhalation study with rats and rabbits. *Fundam Appl Toxicol* 3, 49-54.
- Miyake, Z., Takekawa, M., Ge, Q. and Saito, H. 2007. Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. *Mol Cell Biol* 27, 2765-2776.
- Mruk, D.D. and Cheng, C.Y. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 25, 747-806.
- Muguruma, M., Yamazaki, M., Okamura, M., Moto, M., Kashida, Y. and Mitsumori, K. 2005. Molecular mechanism on the testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene in Sprague-Dawley rats: preliminary study. *Arch Toxicol* 79, 729-736.
- Nagano, K., Nakayama, E., Koyano, M., Oobayashi, H., Adachi, H. and Yamada, T. 1979. [Testicular atrophy of mice induced by ethylene glycol mono alkyl ethers (author's transl)]. *Sangyo Igaku* 21, 29-35.
- Norlander, J., Larsson, M., Ståhl, S., Höög, C. and Linck, R. 1998. Expression of ciliary tektins in brain and sensory development. *J Neurosci* 18, 8912-8918.

- Nuwaysir, E.F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J.C. and Afshari, C.A. 1999. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol Carcinog* 24, 153-159.
- O'Donnell, L., McLachlan, R.I., Wreford, N.G., de Kretser, D.M. and Robertson, D.M. 1996. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 55, 895-901.
- Orphanides, G. 2003. Toxicogenomics: challenges and opportunities. *Toxicol Lett* 140-141, 145-148.
- Peiris, L.D. and Moore, H.D. 2001. Evaluation of effects of 1,3-dinitrobenzene on sperm motility of hamster using computer assisted semen analysis (CASA). *Asian J Androl* 3, 109-114.
- Peltola, V., Mäntylä, E., Huhtaniemi, I. and Ahotupa, M. 1994. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. *J Androl* 15, 353-361.
- Petrusz, P., Jeyaraj, D.A. and Grossman, G. 2005. Microarray analysis of androgen-regulated gene expression in testis: the use of the androgen-binding protein (ABP)-transgenic mouse as a model. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 70.
- Rabbani, M., Zheng, X., Manske, G.L., Vargo, A., Shami, A.N., Li, J.Z. and Hammoud, S.S. 2022. Decoding the Spermatogenesis Program: New Insights from Transcriptomic Analyses. *Annu Rev Genet* 56, 339-368.
- Rao, A.V. and Shaha, C. 2002. N-acetylcysteine prevents MAA induced male germ cell apoptosis: role of glutathione and cytochrome c. *FEBS Lett* 527, 133-137.
- Ratcliffe, J.M., Schrader, S.M., Clapp, D.E., Halperin, W.E., Turner, T.W. and Hornung, R.W. 1989. Semen quality in workers exposed to 2-ethoxyethanol. *Br J Ind Med* 46, 399-406.
- Reader, S.C., Shingles, C. and Stonard, M.D. 1991. Acute testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene and ethylene glycol monomethyl ether in the rat: evaluation of biochemical effect markers and hormonal responses. *Fundam Appl Toxicol* 16, 61-70.
- Reeve, I.T. and Miller, M.G. 2002. 1,3-Dinitrobenzene metabolism and protein binding. *Chem Res Toxicol* 15, 352-360.
- Richburg, J.H. and Boekelheide, K. 1997. The sertoli cell as a target for toxicants. *Comprehensive Toxicology*, Pergamon, New York, pp. 127-138.
- Roy, A., Lin, Y.N., Agno, J.E., DeMayo, F.J. and Matzuk, M.M. 2007. Absence of tektin 4 causes asthenozoospermia and subfertility in male mice. *Faseb j* 21, 1013-1025.
- Russell, L.D. and Russell, J.A. 1991. Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *Am J Anat* 192, 142-168.
- Sadate-Ngatchou, P.I., Pouchnik, D.J. and Griswold, M.D. 2004. Identification of testosterone-regulated genes in testes of hypogonadal mice using oligonucleotide microarray. *Mol Endocrinol* 18, 422-433.
- Sakurai, K., Mikamoto, K., Shirai, M., Iguchi, T., Ito, K., Takasaki, W. and Mori, K. 2015.

- MicroRNA profiling in ethylene glycol monomethyl ether-induced monkey testicular toxicity model. *J Toxicol Sci* 40, 375-382.
- Sanguinetti, A.R., Cao, H. and Corley Mastick, C. 2003. Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem J* 376, 159-168.
- Sasaki, J.C., Chapin, R.E., Hall, D.G., Breslin, W., Moffit, J., Saldutti, L., Enright, B., Seger, M., Jarvi, K., Hixon, M., Mitchard, T. and Kim, J.H. 2011. Incidence and nature of testicular toxicity findings in pharmaceutical development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 92, 511-525.
- Sharpe, R. 1994. Regulation of spermatogenesis. *The physiology of reproduction*. Raven Press. New York 1, 1363-1434.
- Shen, S., Wang, J., Liang, J. and He, D. 2013. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World J Urol* 31, 1395-1401.
- Shima, J.E., McLean, D.J., McCarrey, J.R. and Griswold, M.D. 2004. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod* 71, 319-330.
- Shimizu-Albergine, M., Tsai, L.C., Patrucco, E. and Beavo, J.A. 2012. cAMP-specific phosphodiesterases 8A and 8B, essential regulators of Leydig cell steroidogenesis. *Mol Pharmacol* 81, 556-566.
- Sinha Hikim, A.P., Rajavashisth, T.B., Sinha Hikim, I., Lue, Y., Bonavera, J.J., Leung, A., Wang, C. and Swerdloff, R.S. 1997. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod* 57, 1193-1201.
- Siu, E.R., Mruk, D.D., Porto, C.S. and Cheng, C.Y. 2009. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 238, 240-249.
- Sobarzo, C.M., Lustig, L., Ponzio, R. and Denduchis, B. 2006. Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate on N-cadherin and catenin protein expression in rat testis. *Reprod Toxicol* 22, 77-86.
- Song, Y., Shi, Y., Yu, H., Hu, Y., Wang, Y. and Yang, K. 2011. p,p'-Dichlorodiphenoxydichloroethylene induced apoptosis of Sertoli cells through oxidative stress-mediated p38 MAPK and mitochondrial pathway. *Toxicol Lett* 202, 55-60.
- Stermer, A.R., Reyes, G., Hall, S.J. and Boekelheide, K. 2019. Small RNAs in Rat Sperm Are a Predictive and Sensitive Biomarker of Exposure to the Testicular Toxicant Ethylene Glycol Monomethyl Ether. *Toxicol Sci* 169, 399-408.
- Strandgaard, C. and Miller, M.G. 1998. Germ cell apoptosis in rat testis after administration of 1,3-dinitrobenzene. *Reprod Toxicol* 12, 97-103.
- Syed, V. and Hecht, N.B. 1998. Rat pachytene spermatocytes down-regulate a polo-like kinase and up-regulate a thiol-specific antioxidant protein, whereas sertoli cells down-regulate a phosphodiesterase and up-regulate an oxidative stress protein after exposure to

- methoxyethanol and methoxyacetic acid. *Endocrinology* 139, 3503-3511.
- Takahashi, M. and Matsui, H. 1993. Mechanisms of testicular toxicity. *Journal of Toxicologic Pathology* 6, 161-174.
- Takei, M., Ando, Y., Saitoh, W., Tanimoto, T., Kiyosawa, N., Manabe, S., Sanbuissho, A., Okazaki, O., Iwabuchi, H., Yamoto, T., Adam, K.P., Weiel, J.E., Ryals, J.A., Milburn, M.V. and Guo, L. 2010. Ethylene glycol monomethyl ether-induced toxicity is mediated through the inhibition of flavoprotein dehydrogenase enzyme family. *Toxicol Sci* 118, 643-652.
- Tan, K.A., Turner, K.J., Saunders, P.T., Verhoeven, G., De Gendt, K., Atanassova, N. and Sharpe, R.M. 2005. Androgen regulation of stage-dependent cyclin D2 expression in Sertoli cells suggests a role in modulating androgen action on spermatogenesis. *Biol Reprod* 72, 1151-1160.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Toyama, Y., Kitamura, K., Takahashi, T., Kaseda, K., Maekawa, M. and Nishimune, Y. 2004. Mice deficient in the axonemal protein Tektin-t exhibit male infertility and immotile-cilium syndrome due to impaired inner arm dynein function. *Mol Cell Biol* 24, 7958-7964.
- Taneli, F., Vatansever, S., Ulman, C., Yilmaz, O., Giray, G., Genç, A. and Taneli, C. 2005. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell-specific apoptosis in rat testis. *Acta Histochem* 106, 459-466.
- Tao, R.H., Kawate, H., Ohnaka, K., Ishizuka, M., Hagiwara, H. and Takayanagi, R. 2006. Opposite effects of alternative TZF spliced variants on androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 515-521.
- Theas, M.S. 2018. Germ cell apoptosis and survival in testicular inflammation. *Andrologia* 50, e13083.
- Thepparat, T., Katawatin, S., Vongpralub, T., Duangjinda, M., Thammasirirak, S. and Utha, A. 2012. Separation of bovine spermatozoa proteins using 2D-PAGE revealed the relationship between tektin-4 expression patterns and spermatozoa motility. *Theriogenology* 77, 1816-1821.
- Urriola-Muñoz, P., Lagos-Cabré, R. and Moreno, R.D. 2014. A mechanism of male germ cell apoptosis induced by bisphenol-A and nonylphenol involving ADAM17 and p38 MAPK activation. *PLoS One* 9, e113793.
- Veulemans, H., Steeno, O., Masschelein, R. and Groeseneken, D. 1993. Exposure to ethylene glycol ethers and spermatogenic disorders in man: a case-control study. *Br J Ind Med* 50, 71-78.
- Wade, M.G., Kawata, A., Williams, A. and Yauk, C. 2008. Methoxyacetic acid-induced spermatocyte death is associated with histone hyperacetylation in rats. *Biol Reprod* 78, 822-831.
- Wang, J.M., Wu, X.L., You, W., Ling, L.X., Wu, J. and Zhang, G.Y. 1992. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of the effect of ketoconazole on reproductive function in male

- rats. *Int J Androl* 15, 376-384.
- Wang, W., Wine, R.N. and Chapin, R.E. 2000. Rat testicular Src: normal distribution and involvement in ethylene glycol monomethyl ether-induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 163, 125-134.
- Wardyn, J.D., Ponsford, A.H. and Sanderson, C.M. 2015. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans* 43, 621-626.
- Watanabe, T., Yamaguchi, N., Akiba, T., Tanaka, M. and Takimoto, M. 2000. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 12). Effects of cyclophosphamide on spermatogenesis. *J Toxicol Sci* 25 Spec No, 129-137.
- Webster, K.E., O'Bryan, M.K., Fletcher, S., Crewther, P.E., Aapola, U., Craig, J., Harrison, D.K., Aung, H., Phutikanit, N., Lyle, R., Meachem, S.J., Antonarakis, S.E., de Kretser, D.M., Hedger, M.P., Peterson, P., Carroll, B.J. and Scott, H.S. 2005. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4068-4073.
- Welch, L.S., Schrader, S.M., Turner, T.W. and Cullen, M.R. 1988. Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: II. Male reproduction. *Am J Ind Med* 14, 509-526.
- Wong, C.H., Mruk, D.D., Lui, W.Y. and Cheng, C.Y. 2004. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. *J Cell Sci* 117, 783-798.
- Wu, Y., Zhao, W., Zhao, J., Pan, J., Wu, Q., Zhang, Y., Bauman, W.A. and Cardozo, C.P. 2007. Identification of androgen response elements in the insulin-like growth factor I upstream promoter. *Endocrinology* 148, 2984-2993.
- Yu, S., Xia, S., Yang, D., Wang, K., Yeh, S., Gao, Z. and Chang, C. 2013. Androgen receptor in human prostate cancer-associated fibroblasts promotes prostate cancer epithelial cell growth and invasion. *Med Oncol* 30, 674.
- Zuccarello, D., Ferlin, A., Garolla, A., Pati, M.A., Moretti, A., Cazzadore, C., Francavilla, S. and Foresta, C. 2008. A possible association of a human tektin-t gene mutation (A229V) with isolated non-syndromic asthenozoospermia: case report. *Hum Reprod* 23, 996-1001.

謝辞

稿を終えるにあたり、本論文の作成に終始温かいご指導とご教示を賜りました九州大学大学院農学研究院動物学分野 岩森巨樹准教授に深謝の意を表します。また、本論文の作成にあたりご助言を賜りました九州大学 飯田弘名誉教授、九州大学大学院農学研究院海洋生物学分野 太田耕平教授に謹んでお礼申し上げます。

本研究の機会を与えていただくとともに暖かいご支援とご指導を賜りました三分一所厚司博士、第一三共株式会社 高崎渉博士、森和彦博士、土屋由美博士、寺西宗広博士、谷吉朗博士、安藤洋介博士、西矢剛淑博士に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の細部にいたるまで多大なるご指導をいただきました第一三共株式会社 清澤直樹博士、伊藤和美博士に深謝いたします。さらに、本研究の遂行にご協力いただきました第一三共株式会社 甲斐清徳博士、矢部光一博士、桑田千春博士、新野訓代氏、寺田仁美氏、片岡広子氏ならびに高田早苗氏をはじめとする第一三共株式会社安全性研究所の方々に心からの感謝の意を表します。