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 :

氏 名 : 松山 拓矢

論文題名 : 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

区 分 : 乙

論 文 内 容 の 要 旨

精巣はしばしば医薬品の毒性標的となる臓器であり、化合物曝露による雄性生殖機能への影響は慎重に評価される必要がある。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病理組織学的検査によって器質的变化として検出される。一方、精巣毒性の発現メカニズムを推定し、毒性学的特性をより詳細に明らかにするためには、器質的な毒性変化に先行又は並行して変動する分子イベントを評価することが有用と思われる。そこで本研究では、精巣毒性を惹起させたラットの精巣に対して網羅的遺伝子発現解析を実施し、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することで、化合物曝露に起因する個々の分子イベントの変化を転写レベルで検出できるか検討した。

はじめに、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、精巣での発現細胞の特異性をもとに遺伝子群を選別した(細胞特異的遺伝子セット)。各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、1,3-dinitrobenzene (DNB) 誘発精巣毒性モデルラットを作出し、マイクロアレイを用いて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う精母細胞特異的遺伝子の発現低下がみられた。このことから、精母細胞特異的遺伝子の発現変動は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ことが示唆された。続いて、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 ethylene glycol monomethyl ether (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。さらに、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。Ketoconazole (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。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ことが示唆された。

次に、DNB 誘発精巣毒性モデルラットに対してマイクロアレイを用いた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、アポトーシス、及びセルトリ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。続いて、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、及びヒストンのアセチル化の亢進を示唆する変化を検出した。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連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。

さらに、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。加えて、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。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ものの、**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、本研究を通じて、精巣毒性発現に寄与する細胞障害や分子イベントについて転写レベルで検出できる可能性を明らかにした。こうした研究成果は、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と思われた。