

ラット視床下部-下垂体-精巣系の機能分化に関する研究
:胎生期 Diethylstilbestrol 曝露の影響

2008

麻布大学大学院獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程 動物応用医科学分野

DA0503 小林 徹央

学位申請論文

ラット視床下部-下垂体-精巣系の機能分化に関する研究

: 胎生期 Diethylstilbestrol 曝露の影響

2008

麻布大学 大学院 獣医学研究科

動物応用科学 専攻

小林 徹央

目次

緒言	1-5
----	-----

第一章

胎生期の DES 曝露がその子供の思春期及び成熟期の 視床下部に及ぼす影響

緒言	6-8
材料及び方法	9-11
結果	12-21
考察	22-29
小括	30-31

第二章

胎生期の DES 曝露がその子供の思春期及び成熟期の 下垂体に及ぼす影響

緒言	32-34
材料及び方法	35-36
結果	37-44
考察	45-50

小括	5 1-5 2
----	---------

第三章

胎生期の DES 曝露が胎子精巢の機能的分化に及ぼす影響

緒言	5 3-5 5
材料及び方法	5 6-5 7
結果	5 8-6 5
考察	6 6-6 9
小括	7 1-7 5

第四章

胎生期の DES 曝露がライディッヒ細胞の増殖並びに分化へ及ぼす影響

緒言	7 3-7 4
材料及び方法	7 5-7 7
結果	7 8-8 7
考察	8 8-9 1
小括	9 2-9 3

緒言

1960年にアメリカの生物学者である Rachel Louise Carson によって「Silent Spring」が発表された。またその後 Theo Colborn 等による「Our Stolen Future」など、ホルモン様作用を持つ化学物質の影響を危惧する著書が多く発刊され、世界中で多くのヒトがそれらの化学物質に関心を持つようになった。1991年にアメリカにおいて、これらの「生体内ホルモンの合成、分泌、体内輸送、結合、作用あるいは分解に介入することによって生体の恒常性の維持、生殖、発達あるいは行動に影響をあたえる外来物質」は「内分泌かく乱化学物質」と命名され、その中にはエストロゲン様の作用を持つ物質も多く挙げられている。

Diethylstilbestrol (DES) は英国において開発された合成エストロゲンであり、エストロゲン様作用を持つ多くの化学物質のうち、唯一実際にヒトに臨床応用されていた物質である。1900年代前半、妊娠に関する情報の不足から、切迫流産の原因はエストロジェンの欠乏および不足によるものであると考えられていた。しかし、当時の技術ではエストロゲンそのものを合成することが出来ず、また天然のエストロゲンを入手するのに莫大なコストがかかっていたため、合成エストロゲンとして開発された DES は安価なエストロゲンとして重宝され「奇跡の薬物」として奨励され、日本を含め世界中の妊婦に対して、DES の服用が推奨されていた。しかし、DES を服用した母親から産まれた子供の若齢期に様々な生殖機能障害が多く発生したことから、1971年に米国食品医薬局から使用が中止され、その後は家畜の肥育薬として使用されるのみとなった。現在は人に対する DES の臨床応用は行われなくなり、また家畜の肥育における使用もほとんど行われず、DES はほぼ完全に使用さ

れなくなった (Kinch, 1979)。その後 DES はエストロジェンの陽性対象物質として使用されることが多く、DES を用いた毒性実験は世界中で広く行われ、雄への投与が重篤な生殖機能障害を誘発することが発見された。妊娠中、母体は多量のエストロジェンを分泌し、このエストロジェンは胎盤を通過して胎子に移行し、胎子血管系によって胎子体内を循環する。しかし、齧歯類では、胎子肝臓で合成された α - Fetoprotein が母体由来のエストロジェンと結合し、エストロジェンが雄胎子体内で作用することを阻止している (Savu et al., 1979)。DES は α - Fetoprotein と結合せず (Savu et al., 1979)、エストロジェン・レセプターに結合すること、血液-脳関門を通過できることが明らかになっている (Olsen et al., 2005 ; Savu et al., 1980)。

雄の性分化は、ホルモンによって調節されており、特にアンドロジェンは性分化に不可欠な因子である。ラットの精巣は胎齢 15.5 日に間葉細胞から分化したライディッヒ細胞がステロイドホルモン合成を開始する。その後、胎齢 17.5 日には下垂体-精巣系が機能し始め、出生直前に視床下部-下垂体-精巣系が完成する。また胎子におけるテストステロン分泌の推移は、胎齢 15.5 日に間葉細胞から分化したライディッヒ細胞がステロイドホルモン合成を開始し、18.5 日頃精巣でのステロイドホルモン合成及び血中テストステロンレベルも最大となり、その後は思春期前まで徐々に減少する (Eguchi et al., 1978 ; Habert and Pikon, 1982 ; Tapanainen et al., 1984)。精巣で合成されたテストステロンは全身を循環する。合成されたテストステロンは血流に乗って各組織に入った後、局所的に 5α -Reductase や Aromatase の作用を受け、より強いアンドロジェン活性を持つジヒドロテストステロンやエストロジェン活性の高いエストラジオールへと転換され、性分化が促進される。

胎齡 17.5 日以降、精巢の機能は上位中枢、まず下垂体からのホルモンの影響を受ける。しかし視床下部を含む脳の性分化は出生直前から生後のある一定時期までの間に、エストロジェンの作用によって起こる。この時期の胎子の血中エストロジェンは、肝臓で合成された α -Fetoprotein と結合し、Estrogen Receptor に結合してその作用を発揮するが、血液-脳関門を通過出来ないため上位中枢に到着する事ができない。雄の上位中枢の性分化は、胎子精巢が分泌したアンドロジェンが血液-脳関門を通過し、上位中枢に局在する Aromatase によって、局所的にエストロジェンに変換され、神経細胞の ER に結合することによって初めて雄性化が起こる。一方、雌ではテストステロンが存在しないので神経細胞内に入り込めず、雌型の神経組織はそのまま発達し続ける。従って脳の性分化にはエストロジェンが非常に重要な因子であり、生体内のエストロジェン環境が乱れることにより、その後の異常な生殖機能や性行動の原因となる。前述した Rachel Louise Carson や Theo Colborn の著書ではこうした現象が野生動物において多発していることを危惧している。そして DES もまた同様に生体内に入り、エストロジェン環境を乱す物質として知られている。

DES が生体内に入ると α -Fetoprotein と結合できないため、無作為にエストロジェン・レセプターと結合し、生体内において本来であれば機能しないはずである時期や場所において、エストロジェン作用が誘発される。母体への DES 投与によって、母体よりも胎子の循環血中の DES 濃度の方が上昇すること、局所的に DES が蓄積することが報告されており (Miller et al., 1981)、母体への DES 投与が胎子に大きな影響を及ぼすことが推測される。このことについて検討した研究は、これまでにいくつか報告されており、新生子期における DES の投与はその後の

精子形成及びステロイドホルモン合成を阻害すること（McKinnell et al., 2001；Sharpe et al., 2003；Traina et al., 2003）、母体を介した胎生期の投与が胎子のテストステロン濃度を減少させること（Haavisto et al., 2003）など多くのことが報告されている。しかしこれらの研究のほとんどは高用量の DES を単回投与してその影響を検討している研究であり、低用量を長期間曝露した場合の DES の作用についての報告はほとんど見あたらない。そこで本研究室では、低用量から高用量まで(0.5, 1.5, 3.0, 4.5 及び 15 μ g/kg)の DES を妊娠 7 日から 21 日目までの間、妊娠ラットへと投与し、胎生期の DES 曝露による雌雄の産子の内分泌器官への影響を検討した(Yamamoto et al., 2003, 2005)。その結果、3.0 μ g/kg 以上の DES 投与量は妊娠を維持できず、DES の低用量・長期間投与実験は 0.5 と 1.5 μ g/kg が適当であることが判明した。また、DES の投与は、雄では血漿テストステロンを低下させ、雌では卵胞の成熟を促進することが証明された。

著者はこれらの実験結果を踏まえて、胎生期での長期間低用量 DES 投与が、雄産子の精巣機能およびその上位中枢に及ぼす影響について検討し、DES は生後の血漿テストステロン濃度を減少させ、精巣ステロイドホルモン合成系酵素の mRNA 発現は低レベルのテストステロンに起因するような変化は無いが、ホルモン合成系でのシグナル伝達が阻害されていることが示唆された。また精巣内の Androgen Receptor の発現が促進されることによって精子形成及び生殖能力は損なわれないこと、LH 濃度を指標とした場合、上位中枢は低レベルのテストステロンに対応しておらず、正常なフィードバック機構が作用していないことを明らかにしてきた(投稿中)。

そこで本研究は、胎生期に長期間低用量の DES を母体に投与し、器官形成期から出生直前まで慢性的にエストロジェンに曝露されている雄の

産子を用いて、第一章では胎生期の DES 曝露がその子供が思春期及び成熟期の視床下部に及ぼす影響、第二章では胎生期の DES 曝露がその子供が思春期及び成熟期の時の下垂体に及ぼす影響、第三章では DES 曝露を受けている胎生期に、DES 曝露が胎子精巣の機能的分化に及ぼす影響、第四章では DES 曝露がライディッヒ細胞の増殖並びに分化へ及ぼす影響を検討し、胎生期の低濃度 DES 曝露が視床下部・下垂体・精巣系のテストステロン調節メカニズムに与える作用を詳細に検討することを目的とした。

第一章

胎生期の DES 投与が生後の視床下部に及ぼす影響

雄の精巣によるテストステロン合成は、ライディッヒ細胞に存在する LH レセプターに LH が結合することによって、細胞内の cAMP 量が上昇し、ステロイドホルモン合成に関与する様々なタンパクが活性化されることによって開始される。LH は下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞（ゴナドトロフ）から分泌されており、さらにゴナドトロフの機能は視床下部の Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) ニューロンから分泌される GnRH が、ゴナドトロフでの LH 産生を調節している。従って、視床下部、下垂体及び精巣は、各々が分泌するホルモンによってその機能を調節していることから、視床下部-下垂体-精巣系と呼ばれている (Marsh, 1976)。

ラット精巣は胎齢 14.5 日頃からステロイドホルモン合成に関与する酵素が発現し、テストステロン合成を開始する (Majdic et al., 1998)。その後、胎齢 16 日頃にはまず下垂体が機能し、出生直前に視床下部が機能し始めることによって視床下部-下垂体-精巣系が確立し、精巣におけるテストステロン産生の調節が開始される。視床下部は血中のテストステロン濃度低下を感知すると、GnRH ニューロンが性腺刺激ホルモン放出ホルモンである GnRH を産生し、下垂体門脈へ分泌する。分泌された GnRH は、下垂体のゴナドトロフのレセプターに結合し、性腺刺激ホルモン (Gonadotropin) 放出が促進され、結果として精巣のステロイドホルモン合成が亢進される (Poletti and Martin, 1999)。血中テストステロンが減少した時、視床下部における GnRH 産生及び分泌は、GnRH ニューロンが単独で GnRH を産生・分泌するのではなく、GnRH ニューロンを含

む様々なニューロン間もしくはニューロンと神経膠細胞間にシグナル伝達が起こり、ニューロン間の神経伝達物質のカスケードが促進方向に機能することによって最終的に GnRH 産生に至る (Faletti et al., 1999 : Melcangi et al., 1997 : Karolczak et al., 1998)。この上位中枢のフィードバック機構は、出生直前から生後 10 日にかけてアンドロジェン及びエストロジェンに対して強く反応し、これらのホルモン作用によって著しく発達することが報告されている (Becü et al., 1997)。

視床下部-下垂体-精巣系が成立するほぼ同時期に、雄の視床下部では脳の雄性化が起こる。ラットの脳の性分化は出生直前から生後 1 週にかけて起こり、その分化にはエストロジェンが必須である (MacLusky and Naftolin, 1981)。血中のテストステロン濃度は妊娠 18.5 日頃をピークに徐々に減少していく (Warren et al., 1973 : Weiz and Ward, 1980)。周産期のラットでは胎齢 18-19 日 (Revskey et al., 1997) と生後 4-5 日 (McGivern et al., 1993) に 2 回のテストステロンサージが観察されており、この時期に視床下部の雄性化が起きると考えられている。テストステロンサージの時のテストステロンは血液-脳関門を通過後、脳内の神経細胞や神経膠細胞内に取り込まれ、細胞内に存在する Aromatase によって、エストロジェンに変換され、このエストロジェンが受容体に結合することが神経組織の雄性化につながる。その後、視床下部は雌特有の周期的な GnRH のパルス分泌が分泌機能を失う (MacLusky and Naftolin, 1981)。

本研究における合成エストロジェンである DES の妊娠母体ラットへの投与期間は妊娠 7 日から 21 日までであり、この時期はホルモン作用による視床下部の性分化及び機能分化が盛んに行われている時期に重なる。

妊娠母体への DES 投与は胎盤を介して胎子に移行し、胎子側の血中や組織において濃縮され、高レベルで蓄積することが報告されている (Miller et al., 1981)。従って母体に投与された DES は、子宮内に存在する胎子の視床下部機能分化に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで、第一章では胎生期の妊娠母体への DES 曝露が雄の産子の視床下部の機能分化にどのような影響を及ぼすか、特に思春期及び成熟期における視床下部のネガティブ・フィードバック機構に関連する因子の mRNA 発現量がどのように変化するか調べることによって検討した。

2. 材料と方法

胎生期に DES を投与した妊娠母体は、1973 年 10 月 1 日から 1974 年 10 月 31 日まで、大阪府立産科総合センター (Isotopy and Stereology Laboratory, Osaka Central Institute for Experimental and Clinical Medicine) にて、胎生期に DES を投与した妊娠母体から胎子を取り出し、胎子の視床下部を採取し、RNA を抽出した。DES 投与量は、胎生期に投与された DES の量は、胎生期に投与された DES の量の 1/100 程度であった。

3. 剖検

胎生期に投与された DES の量は、胎生期に投与された DES の量の 1/100 程度であった。剖検時には、胎子の視床下部を採取し、RNA を抽出した。

4. RNA の抽出

採取した視床下部は ISOGEN (ゴッポングレーン) を 2.0 ml 加えて抽出した後、クロロホルム (0.2 ml) を加えて 15 秒攪拌、室温に 2-3 分放置し、遠心分離した (12,000 g, 15 min, 4°C)。上清を移液し、イソプロパノール (0.5 ml) を加えて攪拌、室温に 5-10 分放置し、遠心分

材料及び方法

1. 実験動物

妊娠 3 日目の Sprague - Dawley rat を日本 SLC から入手して実験に用いた。ラットは一定の明暗周期（12 時間明期、12 時間暗期）、室温 22 ± 2 °C 及び湿度 55 ± 10 % に設定された、麻布大学附置生物科学総合研究所内の飼育室において餌（CE - 2, クレア）と水を自由に与えて飼育した。出生 4 日目に同腹子を雌雄 4 匹ずつに調節し、子は離乳後は雌雄別々に飼育した。

2. 投与方法

DES (Sigma Chemical Co., USA) は投与量が 1.5 あるいは 0.5 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{day}$ となるように Corn oil (Tocopherol Stripped Corn Oil; ICN Biomedical Inc., USA) に溶解し、妊娠 7 日から 21 日目に妊娠ラットの頸部皮下に連日単回投与した (DES 1.5 群及び DES 0.5 群と称する)。また Control 群は Corn oil のみを投与した。

3. 剖検

剖検は生後 6 及び 15 週齢に行った。剖検時に子の体重を測定後、視床下部を採取し、RNA 抽出用に -80 °C に保存した。

4. RNA の抽出

凍結した視床下部は ISOGEN (ニッポンジーン) を 2.0 ml 加えて抽出した後、クロロホルム (0.2ml) を加えて 15 秒攪拌、室温に 2-3 分放置し、遠心分離した ($12 \text{ K} \times \text{g}$, 15 min., 4°C)。上清を採取し、イソプロパノール (0.5 ml) を加え攪拌、室温に 5-10 分放置し、遠心分

離した (12 K × g, 10 min., 4°C)。上清を除去し、その沈殿に 70% エタノール (1.0 ml) を加え、遠心分離した (7.5 K × g, 5 min., 4°C)。70% エタノールを除去後、沈殿を風乾し、DNase & RNase-free water (MP Biomedicals Inc., USA) を加え、分光光度計 (SHIMADZU) を用いて、260 及び 280 nm での吸光度を測定し、RNA 濃度を算出した。

5. 半定量的 Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

逆転写反応には anti - sense Primer 法を用い、以下の遺伝子について Primer を作成して、PCR を行った : Gonadotropin Releasing hormone (GnRH)、Androgen Receptor (AR)、Estrogen Receptor β (ER β)、5 α -Reductase 1、Aromatase、 μ - Opioid Receptor、Proopiomelanocortin (POMC)、Thyrosine Hydroxylase (TH)、Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 及び β -actin。反応試薬には Super Script™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, USA) を用いた。RNA、sense 及び anti-sense Primer を含む反応液を調整・攪拌後、Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) を用いて mRNA の増幅を行った。

各 PCR 産物は 3%アガロースゲル / TAE buffer に泳動し、10 mg / ml の Ethidium Bromide Solution (BIO - RAD, USA) を用いて染色後、Mupid - Scope WD Transilluminator (Advance) を用いて紫外線照射のもと、デジタルカメラ (Power Shot A 630 : Canon Inc.) を用いて、ゲルを写真撮影した。撮影した画像はパーソナルコンピューターに取り込み、Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, USA) によって画像処理後、NIH image ver.1.63 を用いて、発現しているバンドの濃度を定量化した。得られた値は各個体の β - actin の値を内部標準として相対値を算出し、解析を行った。また RT - PCR は 1 個体につき 2 回行い、その平均値を算出した。

6. 統計学的解析法

得られたデータは Student's t - test を用いて統計学的に処理し、 $P < 0.05$ の場合を統計学的に有意差があると判定した。

結果

1. GnRH (Table 1, Fig. 1)

6 週齢の両 DES 投与群の GnRH mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に減少した。

2. 5 α - Reductase 1 (Table 1, Fig. 1)

6 週齢の DES 1.5 群の 5 α -Reductase 1 mRNA 発現量が、DES 0.5 群の発現量と比較して有意に増加した。また 15 週齢の両 DES 群の 5 α -Reductase 1 mRNA 発現量は、Control 群の発現量と比較して有意に減少した。

3. Aromatase (Table 1, Fig. 1)

15 週齢の DES 1.5 群の Aromatase mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に減少した。

4. AR (Table 2, Fig. 2)

DES 投与群の AR mRNA 発現量は、Control 群の発現量と比較して有意に変化しなかった。

5. ER β (Table 2, Fig. 2)

6 及び 15 週齢の DES 投与群の ER β mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に減少した。

6. TH (Table 3, Fig. 3)

15 週齢の DES 1.5 群の TH mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に減少した。

7. GFAP (Table 3, Fig. 3)

6 週齢の DES 1.5 群の GFAP mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に増加した。また 15 週齢の DES 0.5 群の mRNA 発現量

は、Control 群の発現量と比較して有意に増加した。

8. μ - Opioid Receptor (Table 4, Fig. 4)

15 週齢の両 DES 投与群の μ - Opioid Receptor mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に増加した。

9. POMC (Table 4, Fig. 4)

DES 投与群の POMC mRNA 発現量は、Control 群の発現量と比較して有意に変化しなかった。

	Control	DES 0.5	DES 1.5
β-Casein	283.6 ± 30.2 [5]	297.1 ± 21.4 [5]	281.8 ± 18.5 [5]
β-Lactoglobulin	59.9 ± 3.4 [5]	62.9 ± 3.7 [5]	62.7 ± 3.2 [5]
α₁-Milkcasein	55.1 ± 5.4 [5]	47.9 ± 3.8 [5]	57.1 ± 7.5 [5]
α₂-Milkcasein	68.3 ± 3.6 [5]	67.9 ± 3.7 [5]	67.8 ± 3.2 [5]
Albumin	70.1 ± 4.8 [5]	67.9 ± 5.6 [5]	70.4 ± 2.5 [5]
Amylase	18.4 ± 2.0 [5]	19.2 ± 4.7 [5]	22.8 ± 1.4 [5]

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

: DES 0.5 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

[] : 測定個体数

Table 1. mRNA levels of GnRH, 5 α -Reductase 1 and Aromatase in the hypothalamus.

group	6weeks	15weeks
GnRH		
Control	370.6 \pm 34.7 [5]	881.3 \pm 88.8 [5]
DES 0.5	217.6 \pm 25.5 [5]*	687.1 \pm 132.4 [5]
DES 1.5	201.5 \pm 25.8 [5]*	775.6 \pm 82.5 [5]
5α - Reductase 1		
Control	55.2 \pm 6.4 [5]	68.3 \pm 1.8 [5]
DES 0.5	44.0 \pm 5.8 [5]	51.9 \pm 5.2 [5]*
DES 1.5	77.1 \pm 7.5 [5] #	42.0 \pm 3.2 [5]*
Aromatase		
Control	70.1 \pm 9.8 [5]	16.4 \pm 3.0 [5]
DES 0.5	67.9 \pm 5.6 [5]	11.2 \pm 4.2 [5]
DES 1.5	70.4 \pm 2.5 [5]	7.9 \pm 1.4 [5]*

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

: DES 0.5 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

[] : 測定個体数

Table 2. mRNA levels of steroid hormone receptors in the hypothalamus

group	6weeks	15weeks
AR		
Control	86.1 ± 5.6 [5]	83.2 ± 6.8 [5]
DES 0.5	94.0 ± 9.6 [5]	67.8 ± 10.3 [5]
DES 1.5	97.0 ± 5.1 [5]	82.6 ± 11.6 [5]
ER β		
Control	110.6 ± 10.5 [5]	179.3 ± 12.8 [5]
DES 0.5	47.4 ± 6.6 [5]*	138.5 ± 7.4 [5]*
DES 1.5	70.4 ± 9.1 [5]*	144.2 ± 7.8 [5]*

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

[] : 測定個体数

Table 3. mRNA levels of TH and GFAP

group	6weeks	15weeks
TH		
Control	80.3 ± 9.0 [5]	99.5 ± 8.9 [5]
DES 0.	99.8 ± 10.4 [5]	96.5 ± 4.7 [5]
DES 1.5	89.1 ± 8.9 [5]	74.7 ± 4.5 [5]*
GFAP		
Control	10.7 ± 1.2 [5]	10.2 ± 1.7 [5]
DES 0.5	14.8 ± 2.6 [5]	20.8 ± 1.6 [5]*
DES 1.5	26.4 ± 4.6 [5]*	17.8 ± 3.8 [5]

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

[] : 測定個体数

Table 4. mRNA levels of μ - Opioid Receptor and POMC

group	6weeks	15weeks
μ- Opioid Receptor		
Control	126.2 \pm 29.0 [5]	13.4 \pm 1.9 [5]
DES 0.5	138.6 \pm 20.8 [5]	28.1 \pm 4.6 [5]*
DES 1.5	151.9 \pm 36.1 [5]	38.4 \pm 7.2 [5]*
POMC		
Control	20.8 \pm 2.0 [5]	
DES 0.5	16.3 \pm 5.0 [5]	
DES 1.5	15.5 \pm 1.7 [5]	

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

[] : 測定個体数

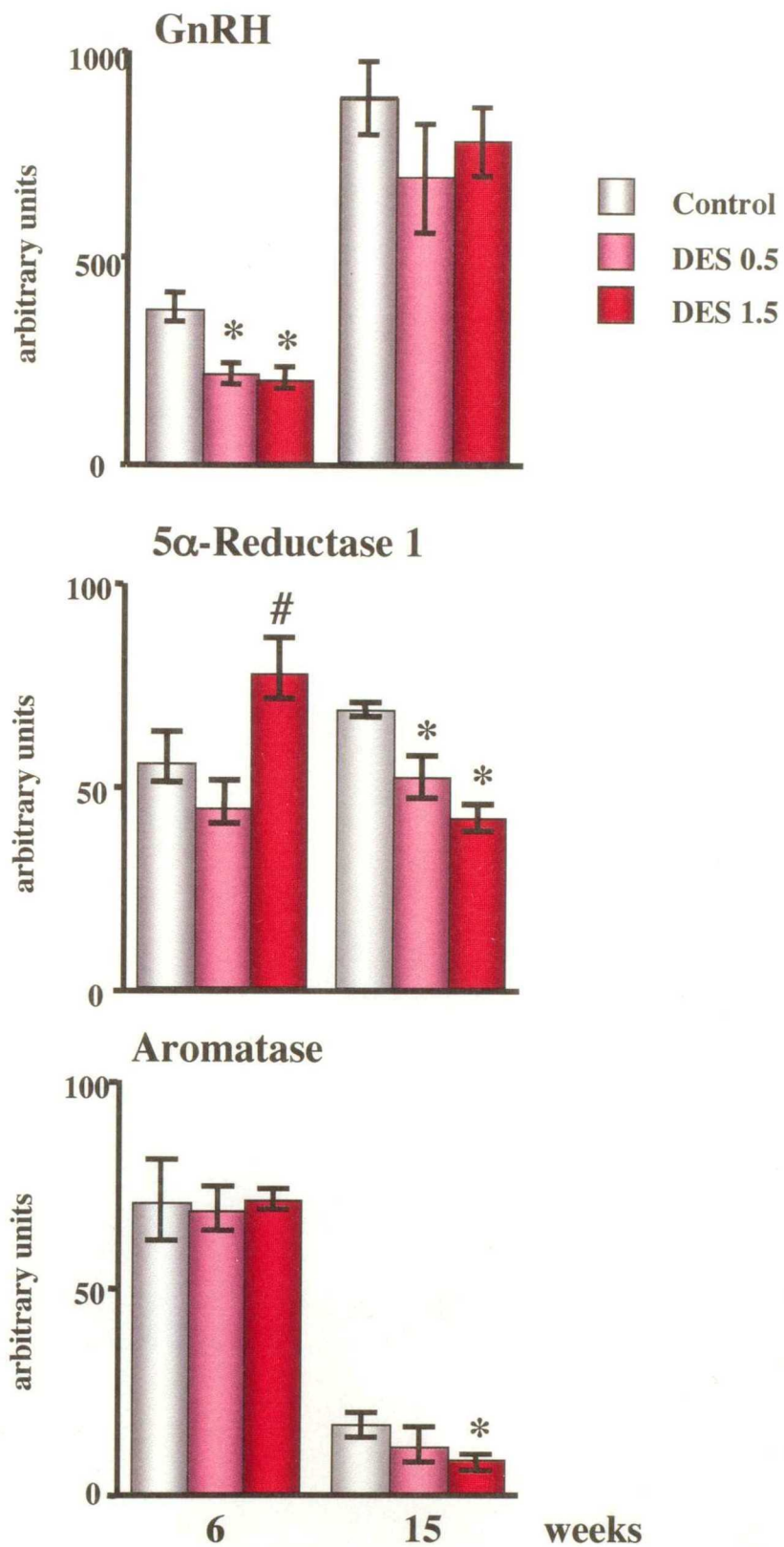


Fig.1 mRNA levels of GnRH, 5α-Reductase 1 and Aromatase in the hypothalamus.

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

: DES 0.5 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

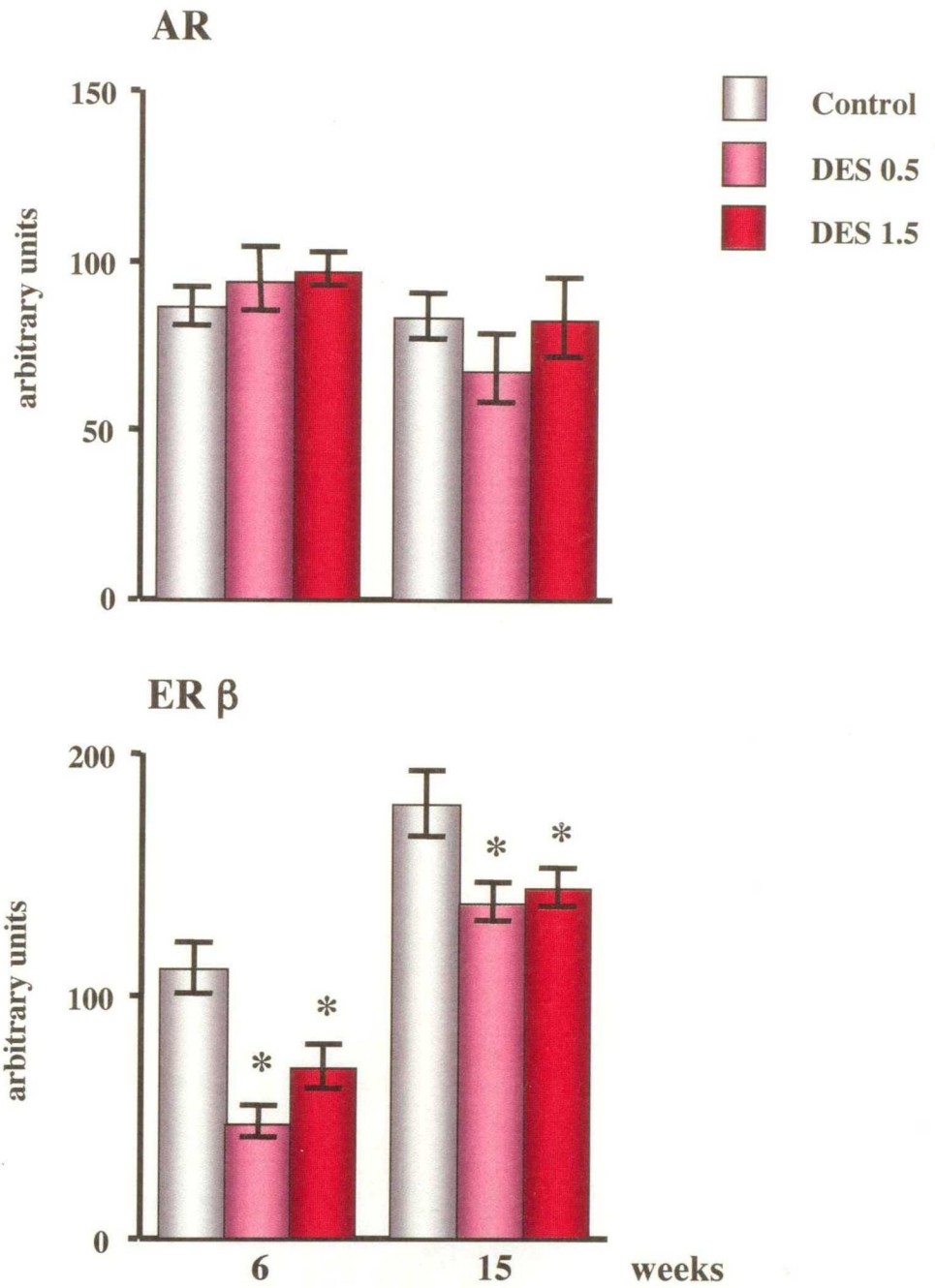


Fig. 2 mRNA levels of steroid hormone receptors in the hypothalamus.

* : Control 群と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

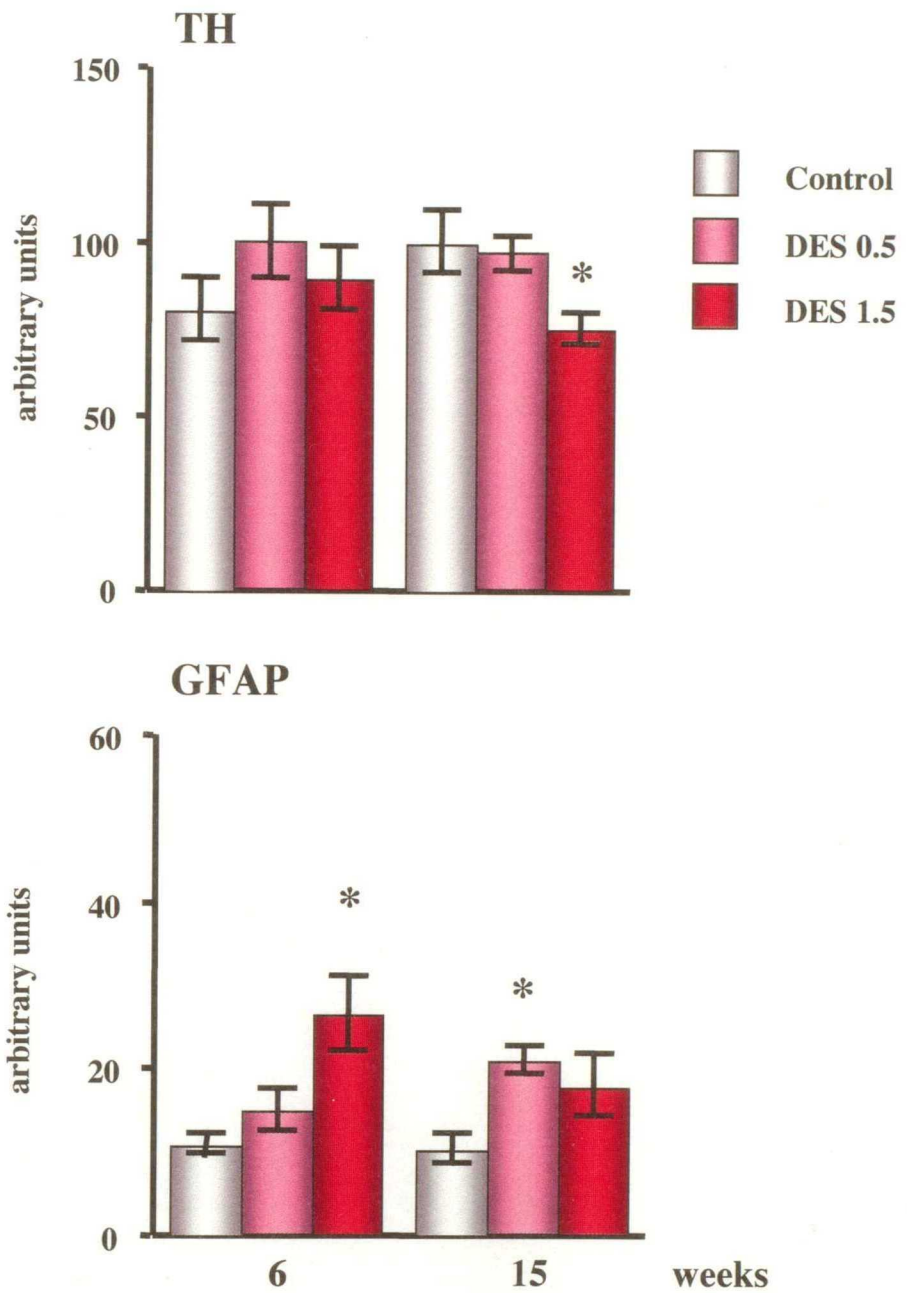


Fig. 3 mRNA levels of TH and GFAP in the hypothalamus.

* : Control 群と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

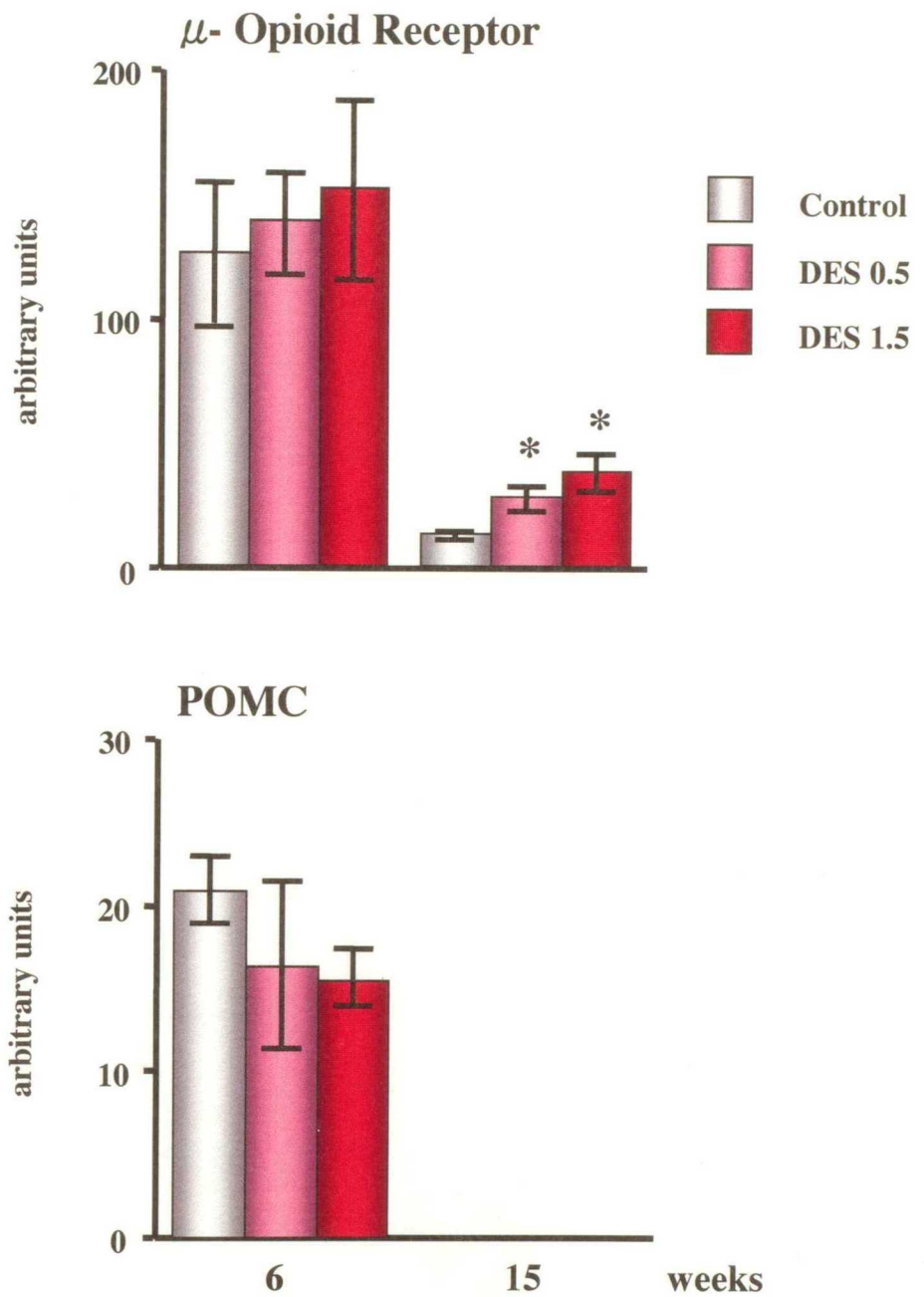


Fig. 4 mRNA levels of μ - Opioid Receptor and POMC in the hypothalamus.

* : Control 群と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

考察

本研究は6週齢を思春期、15週齢を成熟期に相当すると考えて実験を行った。視床下部の性分化及び機能分化は、共にエストロジェンの作用を強く受けており (MacLusky and Naftolin, 1981; Becü et al., 1997)、本研究における DES の投与時期がこれらの分化に関わる時期に一致していることから、DES 群の視床下部が通常よりも過剰にエストロジェンに曝露されており、生後の機能に何らかの影響があると仮定して検討を行った。

胎生期の DES 曝露は6週齢の DES 1.5 群及び15週齢の DES 0.5 群の血漿テストステロン濃度を有意に減少させた。視床下部の GnRH mRNA 発現量は6週齢の両 DES 投与群が有意に減少し、15週齢では変化が無かった。通常、血中テストステロン濃度低下を視床下部が感知すると、下垂体ゴナドトロフへの直接的な刺激因子である GnRH を増加させるため、GnRH mRNA 発現量が増加する (Richardson et al., 2004)。しかし、本研究における DES 投与群は低下した血漿テストステロン濃度と GnRH mRNA 発現に相関が見られず、正常なフィードバック機構が働いていない可能性が示唆された。そこでフィードバック反応に直接関与するであろうと考えられる、ステロイドホルモンに関連した因子を検討した。

視床下部におけるフィードバックは、血中ホルモン濃度が低下し、視床下部内のホルモンバランスが変化することがきっかけとなる。そこでまず、テストステロンに作用し、その活性を変化させる代表的な

因子を検討した。視床下部内に発現していることが知られている 5α -Reductase は、テストステロンをよりアンドロジェン活性の高いジハイドロテストステロン (DHT) に変換する。DHT を含むアンドロジェンは、GnRH 産生に対する抑制因子であることが知られており、ミエリン鞘形成に対してのみ促進的に作用している (Martini, 1922)。本研究において、6 週齢の DES 1.5 群の 5α -Reductase mRNA 発現量は DES 0.5 群の発現量と比較して有意に増加し、15 週齢の両 DES 投与群の発現量が Control 群と比較して有意に減少した。

テストステロンをエストロジェンに変化させる Aromatase も視床下部内に存在している (Abdelgadir et al., 1994)。エストロジェンはアンドロジェンとは逆に、GnRH 産生を促進し、エストロジェンに曝露されると、GnRH が増加することが報告されている (Matagne et al., 2004)。また視床下部内においてエストロジェンを産生する Aromatase の遺伝子を発現する neuron は、 5α -Reductase が作用して産生される DHT によって Aromatase の発現及び作用を促進することが報告されている (Roselli et al., 1984 ; Beyer et al., 1994)。本研究において 15 週齢の DES 1.5 群の Aromatase mRNA 発現量が Control 群の発現量と比較して有意に減少したが、GnRH mRNA が変化していた 6 週齢は DES 投与群の Aromatase 発現は変化していなかった。 5α -Reductase 及び Aromatase の結果から、視床下部において 5α -Reductase mRNA 発現の変化は、GnRH mRNA の発現に対応しておらず、Aromatase の発現パターンと逆の変化を示していることから、血漿テストステロン濃度の低下によるネガティブ・フィードバックに直接作用する変化ではなく、視床下部内のエストロジェン環境を変化させる為である可能性が示唆された。

しかし、血漿テストステロン濃度が減少していない DES 1.5 群の Aromatase mRNA 発現が減少し、一方テストステロン濃度が減少した DES 0.5 群の Aromatase が変化していないこと、さらに 15 週齢の DES 1.5 群は、GnRH 発現を促進する Aromatase mRNA 発現が減少したにも関わらず、GnRH mRNA 発現が変化していないことから、視床下部におけるアンドロジェン及びエストロジェン作用によるネガティブ・フィードバック機構は正常に機能していない可能性が示唆された。

アンドロジェン及びエストロジェンの作用は、各々のレセプターに結合し、シグナルが発生することによってその作用を発揮する。視床下部と海馬は血中のステロイドホルモンに対する感受性が高く、AR 及び ER を発現している neuron が多数存在する (Ozawa, 1984)。一方 GnRH を産生する GnRH neuron は AR 及び ER を発現しておらず、直接エストロジェンに感受性をもたない可能性があることが報告されている (Witkin et al., 1991)。従って血中の低テストステロンを感知し、Aromatase によって合成されたエストロジェンによるネガティブ・フィードバック反応を起こすのは、GnRH neuron 自身ではなく、その周囲の neuron である可能性が示唆されている (Witkin et al., 1991)。また、本研究の GnRH mRNA 発現の変化は 5 α -Reductase 及び Aromatase mRNA 発現の変化に対応していないことから、これらのステロイドホルモンに対する感受性の変化に着目し、ステロイドホルモンレセプターの mRNA 発現量を検討した。その結果、6 及び 15 週齢の DES 投与群の ER β mRNA 発現が Control 群と比較して有意に減少し、一方 AR mRNA 発現はどちらの週齢でも変化しなかった。AR mRNA の結果から、胎生期の DES 曝露は、視床下部におけるアンドロジェンの感受

性を変化させない可能性が示唆された。一方 6 及び 15 週齢の両 DES 投与群の ER β mRNA 発現が低下していることから、胎生期の DES 投与は、思春期以降のエストロジェンに対する感受性を低下させる可能性が示唆され、6 週齢の GnRH mRNA 発現が減少した原因として、エストロジェンからの十分なシグナルが得られなかった可能性が示唆された。しかし、ER β が 6 週齢と同様に減少していた 15 週齢の GnRH mRNA 発現が変化していなかった理由については、今回の結果からは説明することが出来ない。

視床下部における GnRH 分泌は、GnRH neuron 以外に Norepinephlin neuron、NOergic neuron、GABAergic neuron、Glutamergic neuron、Dopaminergic neuron 及び β -endorphin neuron が関与しており、これらのニューロンは AR 及び ER が発現していることが報告されている (Ozawa, 1984)。本研究において、ER β mRNA 発現が著しく低下していることから、視床下部内において ER を介してエストロジェンが十分に作用していない可能性が示唆された。そこで次に、GnRH 分泌に作用を及ぼす因子のうち、エストロジェンに強い感受性を持ち、その機能が調節されている因子の mRNA 発現量を検討した。

視床下部の Dopaminergic neuron は、エストロジェン刺激によって神経伝達物質であるドパミンを分泌する。分泌されたドパミンは GnRH neuron に作用して、細胞内の cAMP を上昇させ、GnRH 分泌が促進されることが報告されている (Martinez et al., 1992)。TH は Dopaminergic neuron のマーカーとして知られている (Dhamdapani and Brann, 2002)。そこで、Dopaminergic neuron の活性を TH mRNA 発現量を指標として調べた。15 週齢の DES 1.5 群の TH mRNA 発現量が Control 群と比較

して有意に減少したが、GnRH mRNA 発現量が減少していた 6 週齢の TH は変化していなかった。15 週齢の DES 1.5 群の Aromatase が減少していることから視床下部内のエストロジェン低下が予想され、結果として Dopaminergic neuron の GnRH 分泌能も減少した可能性が示唆された。しかし、最終的な GnRH mRNA 発現量に変化が無いことから、GnRH に関与する他の因子が上昇している可能性が示唆された。

視床下部において GnRH 産生には、neuron 同士のシグナル伝達の他に GnRH 産生に影響を及ぼす因子が存在する。星状膠細胞は神経組織内に広範囲に存在する神経膠細胞で、neuron 周囲を取り囲むようにして局在している (Segura et al., 1988 : Segura et al., 1999)。この細胞はテストステロンとエストロジェンに強い感受性を持ち、その作用によって自身の細胞分化や遺伝子発現を調節していることが知られている (Malcangi et al., 1997)。エストロジェン刺激を受けた星状膠細胞は TGF- α を産生し、GnRH に関与する NOergic neuron 数を増加させ NO 分泌量を増加させることによって、GnRH 産生を促進することが報告されている (Bhat et al., 1998)。そこで、そのマーカーである GFAP (Malcangi et al., 1997) を指標として星状膠細胞について検討した。6 週齢の DES 1.5 及び 15 週齢の DES 0.5 群の GFAP mRNA 発現量が、Control 群と比較して有意に増加した。この変化は DES による血漿テストステロン濃度減少と一致し、このことから、視床下部の星状膠細胞は 6 及び 15 週齢の DES 投与群の血漿テストステロン濃度の変化に対して、正常なフィードバックを起こしている可能性が示唆された。

POMC は β -endorphin などの Opioid と副腎皮質刺激ホルモンである

ACTH などの非 Opioid のホルモン先駆物質である (Wolleman and Benyhe, 2004)。NOergic neuron は μ Opioid receptor を発現し、 β -endorphin neuron からの Opioid を受け、NOergic neuron を介して GnRH 産生に対し抑制的に作用していることが報告されている (Stefano et al., 2000)。そこで DES 投与群の GnRH mRNA 発現パターンの変化の原因を、 β -endorphin neuron から NOergic neuron へのシグナル増加によるものと予測して、POMC 及びそのレセプターである μ Opioid receptor を調べた。15 週齢の両 DES 投与群の μ Opioid receptor mRNA 発現量が Control 群と比較して有意に増加した。一方 6 週齢の μ Opioid receptor 及び POMC mRNA 発現量は変化しなかった。従って β -endorphin neuron から NOergic neuron 間には、GnRH 減少の原因となるシグナルの変化がないことが示唆された。

以上の結果から、胎生期に DES 曝露すると、血漿テストステロン濃度が減少しているにも関わらず、思春期における視床下部の GnRH mRNA が減少するのは、ホルモン濃度の変化に対するフィードバックが正常に機能しておらず、アンドロジェンに関与する因子 (5α -Redctase, AR) 及びエストロジェンに関与する因子 (Aromatase, ER β) の mRNA が正常に発現していない可能性が示唆された。視床下部における GnRH neuron へと向かう neuron 間のシグナル伝達の模式図を示す (Fig. 5)。TH、POMC 及び μ -Opioid receptor mRNA の結果は GnRH mRNA の発現パターンと一致していなかった。従って Dopaminergic neuron - NOergic neuron 間及び β -Endorphine neuron - NOergic neuron 間のシグナル伝達は変化していない可能性が示唆された。また GFAP mRNA は血漿テストステロン濃度と逆に反応している

ことから、星状膠細胞は正常なネガティブ・フィードバックを起こしていた可能性が示唆された。本研究において、胎生期の DES 曝露により、視床下部のフィードバック機構が正常に機能しなかった直接的な原因を特定することは出来なかった。また、GnRH 産生に関わる Norepinephlin neuron、GABA neuron、NOergic neuron 及び Glutamergic neuron について調べておらず、これらの neuron に何らかの阻害作用が起きていた可能性も考えられる。しかし NOergic neuron へのシグナル伝達に関与する因子である、TH、POMC、 μ -Opioid receptor 及び GFAP のうち、星状膠細胞が正常に低いレベルのテストステロンに対応しているにも関わらず、その後の GnRH mRNA 発現は対応していないことから、Noergic neuron - GnRH neuron 間のシグナル伝達に強い阻害作用が起きており、結果として GnRH mRNA 発現が低下した可能性が大きいと思われる。

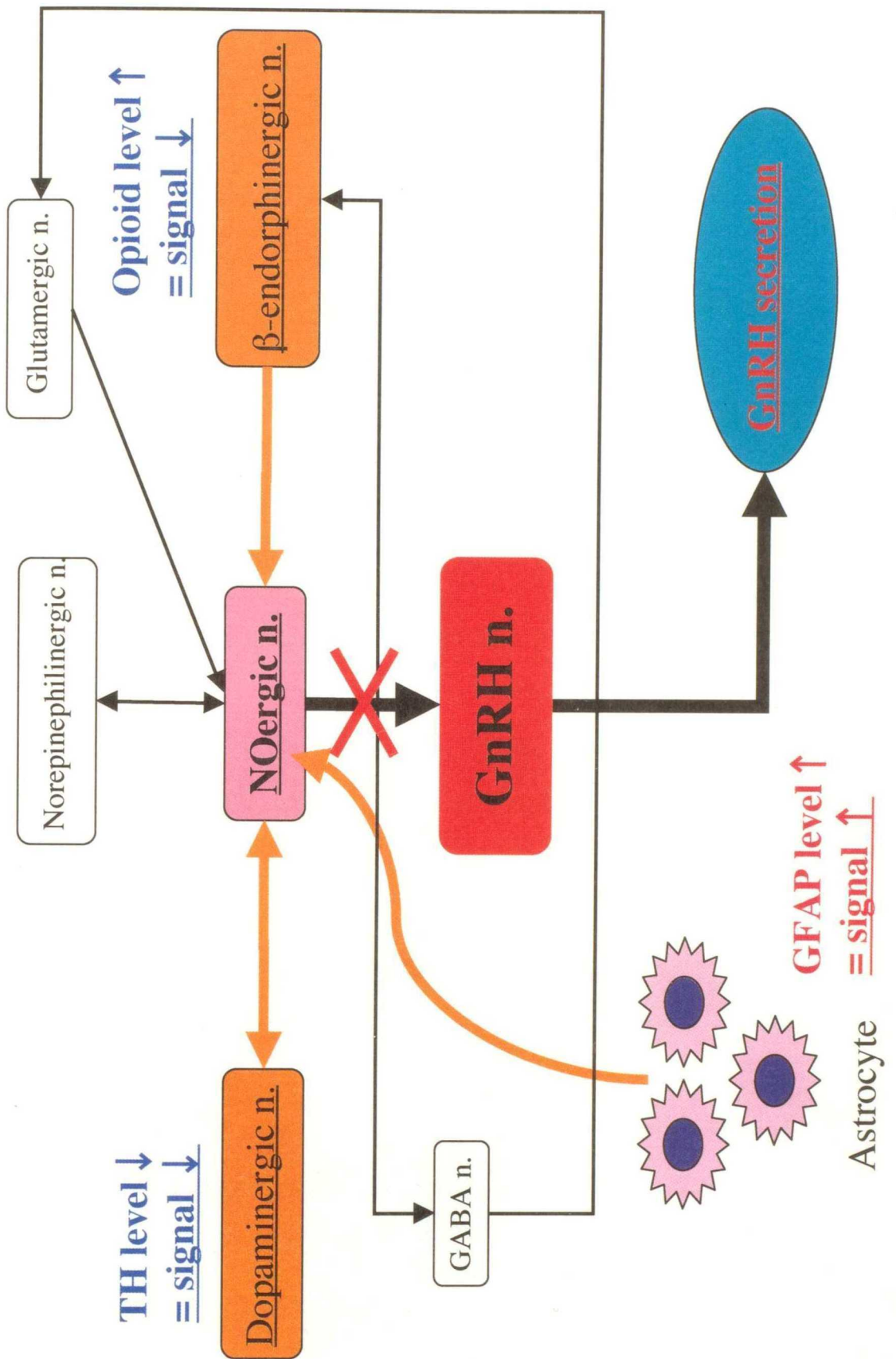


Fig. 5 視床下部のGnRH分泌におけるニューロン間のシグナル伝達

小括

精巣のステロイドホルモン合成は上位中枢の影響を強く受けており、主に視床下部-下垂体-精巣系として作用している。胎生期の DES 曝露は、思春期及び成熟期の血漿テストステロン濃度を減少させ、上位中枢が、低レベルのテストステロンに充分対応していないことを既に明らかにしている。そこで、第一章では、思春期及び成熟期における視床下部が、DES 曝露によってどのように変化するか検討した。

妊娠 SD ラットを用い、妊娠 7 日から 21 日目の期間、DES を 1.5 (DES 1.5 群) あるいは 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DES 0.5 群) 皮下に連日単回投与した。6 及び 15 週齢において雄産子を剖検し、視床下部を採取した。視床下部における、各種ホルモン合成および調節因子等の mRNA 発現量を半定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。

6 週齢において DES 1.5 群の GnRH、5 α -Reductase 1、ER β 及び GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)、DES 0.5 群の GnRH 及び ER β の mRNA 発現が変化した。

また 15 週齢において、DES 1.5 群の 5 α -Reductase 1、Aromatase、ER β 、TH (Thyrosine Hydroxylase) 及び μ -Opioid Receptor、DES 0.5 群の 5 α -Reductase 1、ER β 、GFAP 及び μ -Opioid Receptor の mRNA 発現が変化した。

血漿テストステロン濃度が低下していたにもかかわらず、GnRH が増加しなかったことから、DES 投与はフィードバック機

構における視床下部の反応性を変化させていること、星状膠細胞は血漿テストステロン濃度に対して正常な反応を起こしている可能性が示唆されたにも関わらず、ER β 、TH 及び μ - Opioid Receptor の結果から、GnRH が増加しなかったのは、ニューロン間のシグナル伝達に変化したことに起因したものである可能性が示唆された。

第二章

胎生期の DES 曝露が生後の下垂体に及ぼす影響

下垂体は、視床下部からの GnRH 刺激を受け、LH もしくは FSH を分泌し、ステロイドホルモン合成を含む精巣機能を調節する、視床下部-下垂体-精巣系を構成している組織である。血中テストステロン濃度が低下した時、ネガティブ・フィードバック反応により、まず視床下部の GnRH 産生が促進される。下垂体において LH 及び FSH を合成するのはゴナドトロフであり、視床下部からの GnRH が細胞膜上の GnRHr に結合することによって、ゴナドトロフ内の幾つかのシグナルを活性化し、ホルモン合成が促進される (Yu et al., 1997)。ゴナドトロフから分泌される LH 及び FSH は二量体からなり、共通の α - subunit と各々特有の β - subunit (LH β 、FSH β) が結合している (Lumpkin and McCann, 1984)。アンドロジェンは、フィードバック時に視床下部においても同様に LH β mRNA 発現を選択的に低下させる抑制因子として機能している (Kawakami and Winters, 1999)。

一方エストロジェンは LH β には直接影響を及ぼさないが、 α - subunit の発現を促進 (Kawakami and Winters, 1999)、もしくは GnRHr 及び LH β の発現を促進する (Shupnik, 1996 ; Kamel and Krey, 1982) というように促進的な作用が多いが、一方では GnRHr の発現を抑制している (Moore et al., 1980) とも報告されており、下垂体におけるエストロジェンの作用は現在でも不明な点が多い。

視床下部から分泌される GnRH は、下垂体ゴナドトロフの細胞増殖から機能調節まで広く影響し、ゴナドトロフ上の GnRH 数も調節している (Yasin et al., 2003)。しかし、GnRHr mRNA 発現は性ホルモン、Activin 及び nNOS によっても変化することが報告されており、GnRHr の発現は多くの因子の影響を受けていることが知られている (Yasin et al., 1995 : Cheng et al., 2003 : Moretti et al., 2003 : Garrelet et al., 1998 : An et al., 2005)。

性ホルモンは、下垂体機能に強く影響を及ぼしており、そのレセプターである AR 及び ER は胎齢 16 日頃から下垂体に発現し始め (Pasqualini et al., 1999 : Nishihara et al., 2000 : Gerge et al., 1997)、下垂体のゴナドトロフは胎生期から既に性ホルモンに対する感受性を有していることが知られている。また下垂体は、出生直前から生後 7 日にかけて、その機能分化促進の為にホルモンレセプターの発現が増加する。従ってこの時期の下垂体はアンドロジェン及びエストロジェンに対して強い感受性を持っており、この時期にステロイドホルモンを投与すると、その後の下垂体機能を半永久的に変化させることが報告されている (Pasqualini et al., 1999)。従って本研究の DES 投与時期は、下垂体の機能分化が開始し、盛んになって行く時期と重なっており、DES によって下垂体機能が変わっている可能性がある。

第一章で胎生期の DES 曝露が雄産子の視床下部の機能分化に及ぼす影響について検討し、低いテストステロン濃度にも関わらず、視床下部は正常なフィードバックが機能せず、下垂体へのシグナルとなる GnRH 産生が低下している可能性が示唆された。そこで、第二章では胎生期の妊娠母体への DES 曝露が雄産子の下垂体の機能分化にどのような影響を及ぼすか、特に思春期及び成熟期における下垂体ゴナドトロフの機能

がどのように変化するか調べることによって検討した。

本研究は、動物実験によるもので、動物実験の結果を人間に extrapolate することは、厳密には、科学的に正しくない。動物実験の結果を人間に extrapolate することは、厳密には、科学的に正しくない。

参考文献

1. 藤田 隆夫

2. 藤田 隆夫, et al. (2003) Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

3. 藤田 隆夫, et al. (2003) Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

4. 藤田 隆夫, et al. (2003) Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

5. 藤田 隆夫, et al. (2003) Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

6. 藤田 隆夫, et al. (2003) Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

7. 藤田 隆夫, et al. (2003) Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

8. 藤田 隆夫, et al. (2003) Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

材料及び方法

1. 実験動物

第一章に準ずる。

2. 投与方法

第一章に準ずる。

3. 剖検

剖検は生後 6 及び 15 週齢に行った。剖検時に子の体重を測定後、下垂体を採取し、RNA 抽出用に -80°C に保存した。

4. RNA の抽出

第一章に準ずる。

5. 半定量的 Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

逆転写反応には anti - sense Primer 法を用い、以下の Primer を作成して、PCR を行った : Gonadotropin Releasing hormone receptor (GnRHr)、Androgen Receptor (AR)、Estrogen Receptor α (ER α)、Estrogen Receptor β (ER β)、endothelial Nitric Oxide synthase (eNOS)、neuronal Nitric Oxide synthase (nNOS) 及び b-actin 。

反応試薬及び解析法は第一章に準ずる。

6. 統計学的解析法

第一章に準ずる。

6.1. 遺伝子発現解析

6.1.1. 遺伝子発現解析の概要 (Table 1, Fig. 1) 本論文では、RNA-seq 解析を用いて、DES 投与群と Control 群との遺伝子発現レベルを比較し、有意に発現が変化した遺伝子を同定した。

6.1.2. データの前処理 (Table 2, Fig. 2)

6.1.2.1. データの前処理 (Table 2, Fig. 2) 本論文では、RNA-seq 解析の結果得られた raw data を、品質管理とノイズ除去のために、FastQC と Trimmomatic を用いて前処理した。

6.1.3. 遺伝子発現量の算出 (Table 3, Fig. 3)

6.1.3.1. 遺伝子発現量の算出 (Table 3, Fig. 3) 本論文では、前処理された RNA-seq データを、STAR を用いてマッピングし、RSEM を用いて遺伝子発現量を算出した。

6.1.4. 遺伝子発現量の比較 (Table 4, Fig. 4)

6.1.4.1. 遺伝子発現量の比較 (Table 4, Fig. 4) 本論文では、DES 投与群と Control 群との遺伝子発現量を比較し、有意に発現が変化した遺伝子を同定した。

6.1.5. 遺伝子発現量の経時的変化 (Table 5, Fig. 5)

6.1.5.1. 遺伝子発現量の経時的変化 (Table 5, Fig. 5) 本論文では、DES 投与群の遺伝子発現量を、Control 群と比較し、経時的に発現が変化した遺伝子を同定した。

6.1.6. 遺伝子発現量の経時的変化 (Table 6, Fig. 6)

6.1.6.1. 遺伝子発現量の経時的変化 (Table 6, Fig. 6) 本論文では、DES 0.5 群の eNOS mRNA 発現量が、Control 群と比較して有意に増加した。15 週齢の DES 1.5 群の eNOS mRNA 発現量は、Control 群及び DES 0.5 群の mRNA 発現量と比較して有意に増加し

結果

1. GnRHr (Table 5, Fig. 6)

15 週齢の DES 0.5 群の GnRHr mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に減少した。

2. LH β (Table 5, Fig. 6)

6 週齢の DES 1.5 群の LH β mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に増加した。

3. AR (Table 6, Fig. 7)

6 週齢の両 DES 投与群の AR mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に増加した。

4. ER α (Table 6, Fig. 7)

6 週齢の両 DES 投与群の ER α mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に増加した。

5. ER β (Table 6, Fig. 7)

6 週齢の両 DES 投与群の ER β mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に増加した。

6. nNOS (Table 7, Fig. 8)

6 週齢の DES 0.5 群の nNOS mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に増加した。15 週齢の DES 1.5 群の nNOS mRNA 発現量が、Control 群及び DES 0.5 群の mRNA 発現量と比較して有意に増加し

た。

7. eNOS (Table 7, Fig. 8)

15 週齢の両 DES 投与群の eNOS mRNA 発現量が、Control 群の発現量と比較して有意に減少した。

Table 7

Group	Control	DES
15 weeks	19.1 ± 3.8 (8)	46.2 ± 4.1 (12)
21 weeks	23.2 ± 3.9 (7)	49.1 ± 3.2 (12)*
28 weeks	26.4 ± 3.1 (8)	42.4 ± 4.7 (8)
35 weeks	27.1 ± 3.4 (7)	44.7 ± 3.4 (8)
42 weeks	31.5 ± 3.1 (9)	30.2 ± 1.3 (12)
48 weeks	35.2 ± 4.0 (11)*	108.4 ± 4.7 (19)

* Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

||| 測定個体数

Table 5. mRNA levels of GnRHr and LH β in the pituitary.

group	6weeks	15weeks
GnRHr		
Control	19.1 \pm 2.5 [4]	40.7 \pm 6.9 [4]
DES 0.5	23.2 \pm 4.5 [5]	19.0 \pm 2.8 [4]*
DES 1.5	26.4 \pm 5.1 [4]	42.6 \pm 14.1 [5]
LH β		
Control	75.3 \pm 2.7 [4]	74.7 \pm 5.8 [4]
DES 0.5	67.3 \pm 4.5 [5]	80.6 \pm 11.4 [4]
DES 1.5	55.9 \pm 4.0 [4]*	108.4 \pm 12.4 [5]

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

[] : 測定個体数

Table 6. mRNA levels of Steroid hormone receptors in the pituitary.

group	6weeks	15weeks
AR		
Control	24.9 ± 4.4 [4]	59.5 ± 6.6 [4]
DES 0.5	50.1 ± 1.7 [5]*	51.8 ± 8.7 [4]
DES 1.5	42.5 ± 5.3 [4]*	41.8 ± 9.8 [5]
ER α		
Control	33.7 ± 10.9 [4]	64.9 ± 10.2 [4]
DES 0.5	114.8 ± 19.5 [5]*	113.3 ± 23.8 [4]
DES 1.5	120.6 ± 9.5 [4]*	92.4 ± 13.2 [5]
ER β		
Control	76.9 ± 6.1 [4]	65.3 ± 15.9 [4]
DES 0.5	145.9 ± 9.9 [5]*	40.5 ± 10.2 [4]
DES 1.5	158.2 ± 2.5 [4]*	28.1 ± 8.9 [5]

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

[] : 測定個体数

Table 7. mRNA levels of nNOS and eNOS in the pituitary.

group	6weeks	15weeks
nNOS		
Control	118.2 ± 3.9 [4]	38.4 ± 10.2 [4]
DES 0.5	139.3 ± 7.0 [5]*	30.4 ± 1.7 [4]
DES 1.5	121.1 ± 9.6 [4]	66.8 ± 5.0 [5]* #
eNOS		
Control	43.0 ± 13.1 [4]	39.6 ± 3.9 [4]
DES 0.5	69.0 ± 4.5 [5]	16.6 ± 4.6 [4]*
DES 1.5	64.1 ± 6.8 [4]	19.3 ± 2.1 [5]*

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

: DES 0.5 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

[] : 測定個体数

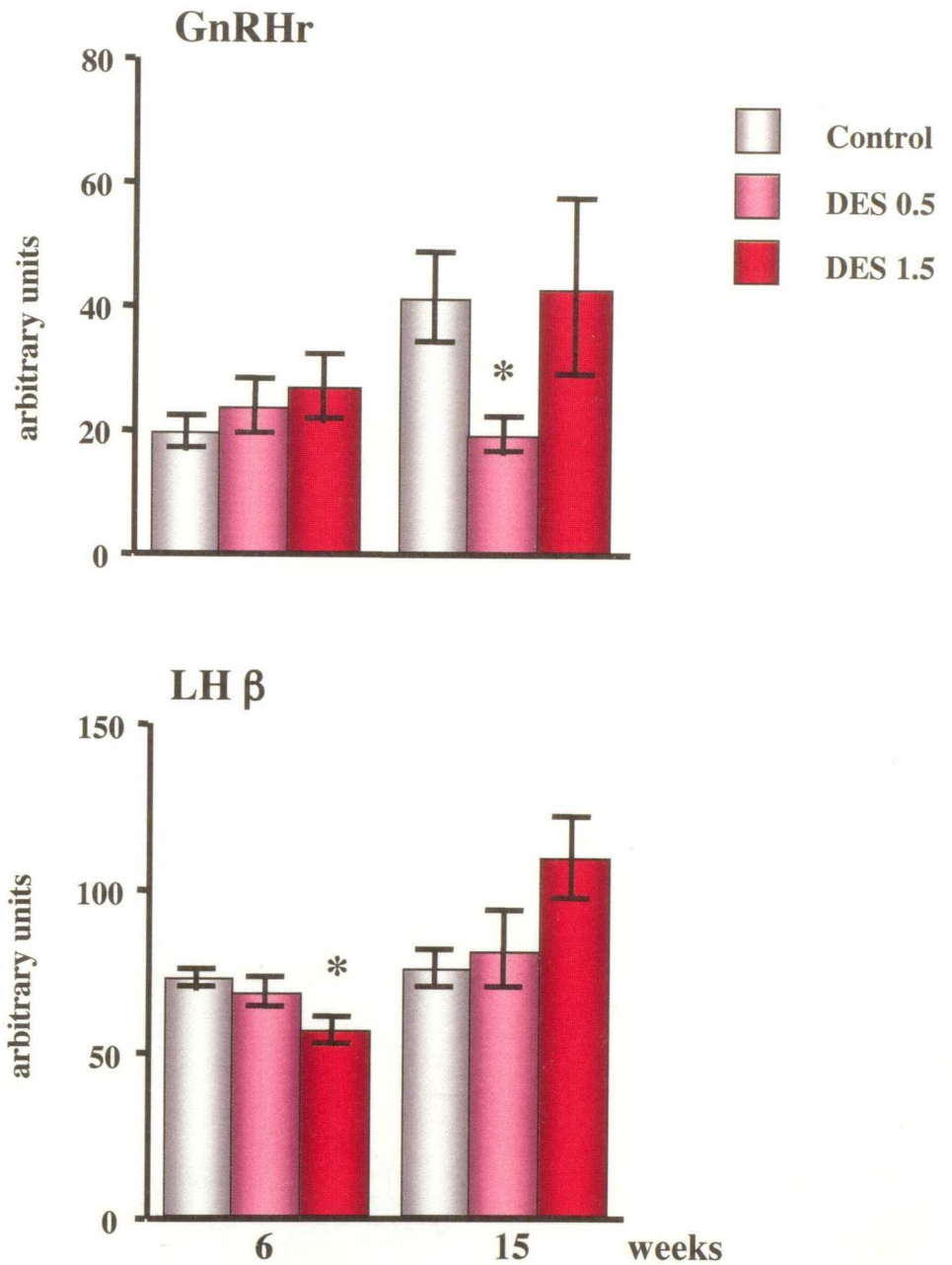


Fig. 6 mRNA levels of GnRHr and LHβ in the pituitary.

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

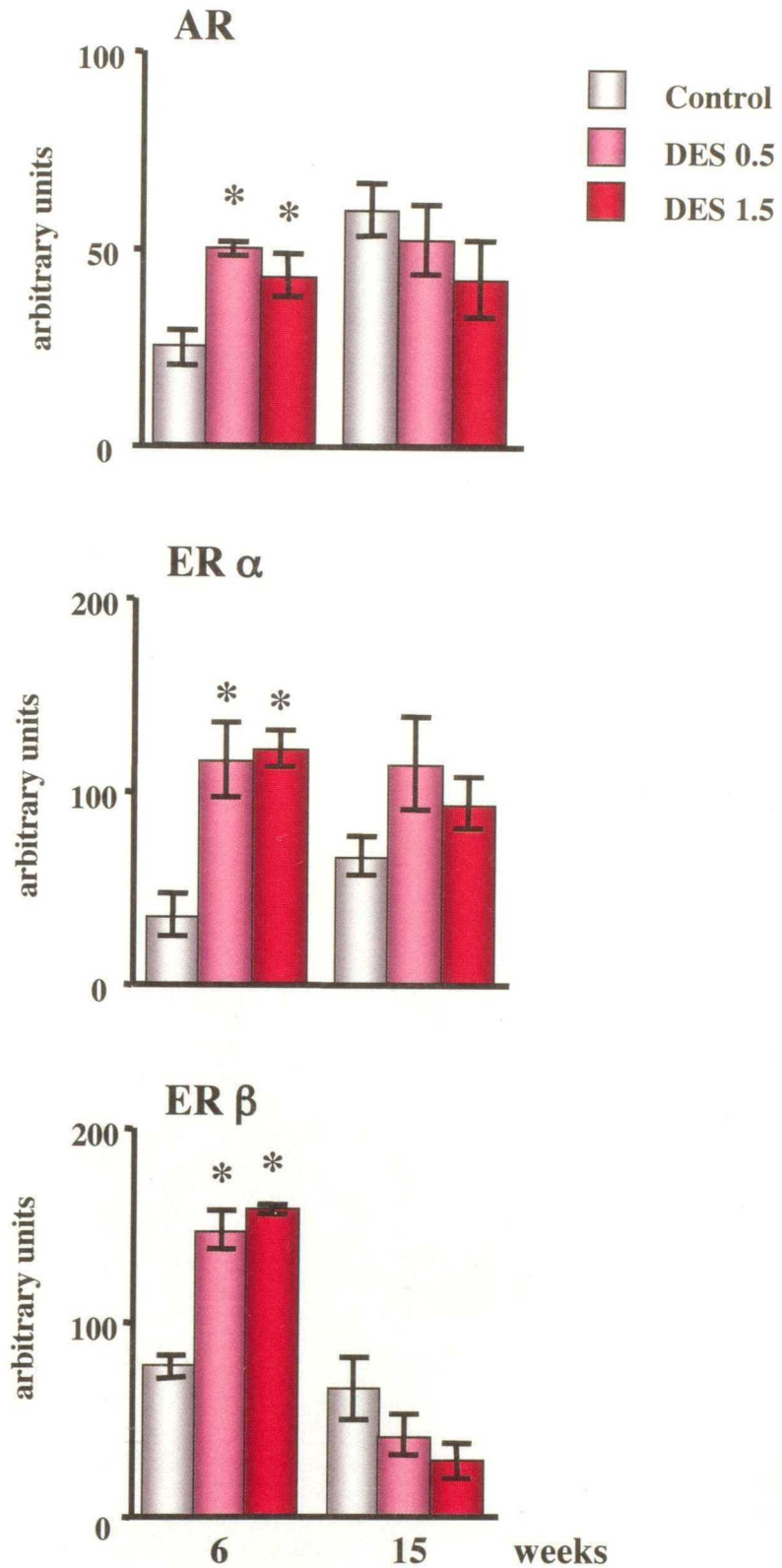


Fig. 7 mRNA levels of Steroid hormone receptors in the pituitary.

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

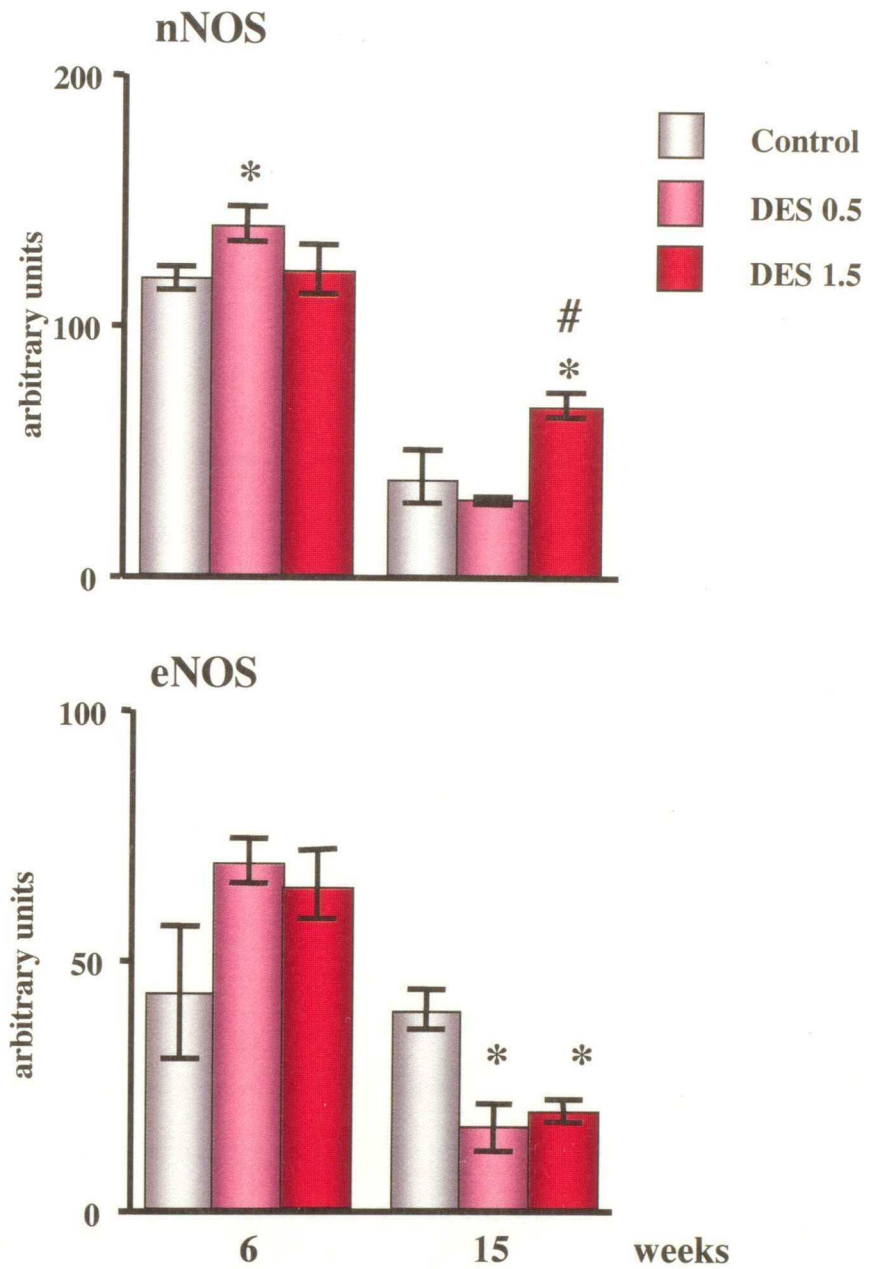


Fig. 8 mRNA levels of nNOS and eNOS in the pituitary.

* : Control 群と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

: DES 0.5 群と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

考察

本研究の第一章では、胎生期の DES 曝露が視床下部の機能分化に及ぼす影響を検討し、正常なネガティブ・フィードバック反応が機能していない可能性が示唆された。そこで、第二章では DES 投与が下垂体の機能分化に及ぼす影響を、下垂体 ゴナドトロフに主眼を置いて検討を行った。

下垂体ゴナドトロフにおけるフィードバック機構は妊娠末期から機能し始め、出生後 7 日頃に成熟する。この時期の下垂体はホルモン・レセプターの発現が増加するが、これはアンドロジェン及びエストロジェンの影響を強く受けて、その機能分化を発達させる為であると考えられている (Pasqualini et al., 1999)。合成女性ホルモンである DES が胎生期に存在すれば、ホルモンレセプターに結合し、下垂体の機能分化に何らかの作用を及ぼす可能性が考えられる。本研究では 6 週齢の DES 1.5 群及び 15 週齢の DES 0.5 群の血漿テストステロン濃度が減少し、さらに第一章の結果から 6 週齢の GnRH 産生が低下していた可能性が示唆された。

そこでまず、テストステロンレベルを調節する視床下部-下垂体-精巣系フィードバック機構に直接関わる因子である GnRHr 及びゴナドトロピンの LH 産生の指標となる LH β mRNA 発現を検討した。その結果、6 週齢の DES 1.5 群の LH β mRNA 発現が Control 群の発現量と比較して有意に減少した。6 週齢の GnRHr 及び 15 週齢の LH β mRNA 発現は変化しなかった。GnRH は、GnRHr の数に強く影響を及ぼす因子であり (Yasin et al., 1995)、6 週齢では両 DES 投与群の視床下部での GnRH 産生が低下していた可能性があるにも関わらず、GnRHr mRNA に変化が無いこと、また 15 週齢では視床下部の GnRH mRNA が変化していなかったことか

ら、GnRHに変化が無いと思われるにも関わらず、DES 0.5 群の GnRHr mRNA 発現が低下していたことから、本研究においては GnRHr は GnRH に対して、正常に対応していない可能性が示唆された。また GnRH 以外に性ステロイドホルモン及びアクチビンなどが GnRHr mRNA に影響を及ぼすことが報告されていることから (Cheng et al., 2003 : Limonta et al., 2003)、特に 6 週齢の DES 投与群において、GnRHr mRNA 発現に GnRH 以外の促進因子が作用し、結果として GnRHr mRNA 発現を正常レベルに保っていた可能性も考えられる。また GnRH は下垂体 ゴナドトロフの LH 分泌を促進するが (Kiesel and Catt, 1984)、本研究の GnRH 及び GnRHr mRNA 発現量は、LH β の発現パターンに一致していないことから、GnRHr が受けた作用が LH 合成に連動していない可能性が示唆された。

ゴナドトロフによる LH 合成は、血中テストステロンレベルの変化に対応した視床下部から GnRH 刺激による LH 産生だけでなく、ゴナドトロフ自体がテストステロンレベルに反応して LH 産生を調節するショートループ・フィードバック機序がある。従って本研究の下垂体 ゴナドトロフが、性ステロイドホルモンの直接的な作用により、変化していた可能性が考えられ、下垂体における AR 及び ER mRNA 発現を調べ、アンドロジェン及びエストロジェンに対する感受性を検討した。その結果、6 週齢の両 DES 投与群の AR、ER α 及び ER β の mRNA 発現量が Control 群の発現量と比較して有意に増加していた。一方 15 週齢ではどのレセプターも変化しなかった。

精巣を除去すると、GnRHr mRNA 発現は著しく増加するが、その後のテストステロンを投与すると、GnRH mRNA レベルが元に戻ることが報告されている (Kaiser et al., 1993 : Kakar et al., 1994)。また Caballero et al. (2003) によると、GnRHr 数は新生子期に増加し、30-35日にピークに

なるが、GnRHr mRNA発現は20〜35日頃から急激に低下し、この時期はちょうど精巣ステロイドホルモン合成が開始し、血中にテストステロンが出現し始める時期と重なっていることから (Caballero et al., 2003)、アンドロジェンはGnRHに対し、抑制因子として作用することを提唱している。一方エストロジェンはGnRHrに対して、促進的に作用することが多く報告されている (Crowder and Nett, 1984 : Moore et al., 1985)。従って、6週齢において、下垂体のGnRHr mRNA発現レベルが、低レベルであると思われるGnRHレベルとパラレルになっていないのは、両DES投与群のER発現が増加したことにより、低レベルのGnRHr発現がControlと同じレベルにまで増強されていた可能性が示唆された。一方15週齢は、GnRH、AR及びER mRNA発現に変化が無いにも関わらず、DES 0.5群のみGnRHrが減少していたが、今回の結果からはこの減少の理由について明らかにならなかった。しかし、15週齢におけるDES 0.5群の視床下部-下垂体-精巣系のフィード・バック反応のうち、下垂体のGnRHrの変化は、血漿テストステロン濃度の減少と対応していることから、性ステロイドホルモンはGnRHrの発現調節機構にあまり影響していない可能性も示唆される。

性ステロイドホルモンはLH産生に対しても直接影響を及ぼす。去勢したラットにGnRHのantagonistを投与してGnRH分泌を増加させると、LH β mRNA発現は増加するが、さらにテストステロンを投与するとLH β は減少する (Paul et al., 1990)。また、アンドロジェンによるLH β mRNA発現の抑制作用はARを介しているが、アンドロジェンからのシグナルはLH β 遺伝子のAndrogen Response elementに直接結合するのではなく、GnRHからのシグナル伝達に関与するタンパクである、Specificity Protein-1を阻害することによって、結果としてLH β mRNA発現を抑制していることが報告されている (Curtin et al., 2001)。一方エストロジェンは、

GnRHr 発現を促進することによって、GnRH の作用を増幅させ LH β mRNA 発現を促進するという報告と、エストロジェンは GnRH が GnRHr に結合することで起こる cAMP Response element binding protein リン酸化を阻害し、シグナル伝達を止めることによって LH β mRNA 発現を抑制するという報告がある (Colin et al., 1996 : Kawakami et al., 1999)。6 週齢の AR 及び ER mRNA 発現の増加は、血漿テストステロン濃度に対応していないことから、DES 投与群の下垂体は、血中性ステロイドホルモンの変化に対応出来ていない可能性が示唆された。AR 及び ER の増加の原因は確定出来なかったが、本研究において 3 週齢の両 DES 投与群の血漿 LH 濃度が有意に増加し、6 及び 15 週齢では変化してなかった。このことから、3 週齢の血中テストステロンレベルが低下していたことが推測され、6 週齢における AR mRNA 発現の増加は 3 週齢における血漿テストステロン濃度低下による up - regulation が起きた結果である可能性が考えられた。一方 ER mRNA 発現が増加したことは、胎生期の DES 投与により、下垂体は高濃度のエストロジェンに曝露された為、胎子下体内の高レベルエストロジェン濃度に対応した変化である ER が慢性的に up - regulation された為である可能性も無視出来ない。しかし DES 投与によって引き起こされたステロイドホルモン・レセプターが視床下部-下垂体-精巣系にどのような作用を及ぼすかについては不明であった。

ゴナドトロフにおける LH 産生には Ca^{2+} が強く関与している。LH が合成される際、幾つかのシグナル伝達経路が関与していると考えられているが、主な経路は下記の様である (Brown and McNeilly, 1999 : Lozach et al., 1998)。GnRHr は G Protein 型レセプターであり、GnRH が結合することによって、G Protein のサブユニットが外れ、Phospholipase C が活性化し、Diacylglycerol 及び inositol - 1, 4, 5 - triphosphate が活性化する。これ

らのセカンド・メッセンジャーは Protein Kinase C の活性化、細胞内の Ca^{2+} の増加を引き起こす。さらにこの Ca^{2+} の増加により、 K^+ channel が開口し、細胞膜が過分極する。この過分極によって Ca^{2+} channel が開き、細胞外から Ca^{2+} が流入する。ゴナドトロフ内で上昇した Ca^{2+} は calmodulin と結合し、NOS を活性化する。活性化された NOS によって産生された NO は、その後 guanylate cyclase を活性化して cGMP が産生されることによって、Protein Kinase G が機能し、最終的に LH β mRNA 発現を促進する (Tobin and Canny, 1996)。 Ca^{2+} 上昇以降に機能する NOS は 3 つの isoform が存在するが、 Ca^{2+} - calmodulin 複合体に感受性を示す NOS は nNOS 及び eNOS である (Brown and McNeilly, 1999)。雄ラットを去勢すると、血中テストステロン濃度は著しく低下すると同時に、下垂体の NOS 発現量が増加することが報告されている (Tsumori et al., 2002)。一方、nNOS は Ca^{2+} 及び Calmodulin に感受性を持ち、シグナル伝達に関与しているにも関わらず、LH β mRNA 発現に対し抑制的に作用するという報告も存在し、LH β に対する NOS の作用は不明な点が残されている (⑭Lozach et al., 1998)。そこで下垂体において nNOS 及び eNOS mRNA 発現を調べた。6 週齢において DES 0.5 群の nNOS mRNA 発現量が Control 群の発現量と比較して有意に増加した。15 週齢の DES 1.5 群の nNOS mRNA 発現量が Control 群及び DES 0.5 群と比較して有意に増加した。また 15 週齢の両 DES 投与群の eNOS mRNA 発現量が Control 群と比較して有意に減少した。本研究において、血漿テストステロン濃度が減少していない 6 週齢の DES 0.5 群及び 15 週齢の DES 1.5 群の nNOS 発現は増加し、逆にテストステロン濃度が減少した群の nNOS 発現は変化していなかった。6 週齢の結果に着目すると、DES 投与群のゴナドトロフのシグナル伝達は nNOS の増加により、GnRH - GnRHr からのシグナルの増加が確認されたが、15 週齢においては見られなかった。従って、低レベルの GnRH -

GnRHrによるシグナル伝達は、その途中過程を担っている NOS 発現が変化していることから、結果として下垂体ゴナドトロフ内のシグナル伝達機構がイレギュラーな状態であると考えられた。

以上の結果から、胎生期に DES 曝露すると、GnRH によって誘起された下垂体内のシグナル伝達は、正常に機能していない可能性が示唆された。また性ステロイドホルモンに対する感受性も変化していることから、DES 投与群の下垂体は血中の性ステロイドホルモン濃度の変化にも対応出来ていない可能性が示唆された。さらに GnRH・GnRHr によるシグナル伝達も変化していた可能性が示唆された。従って胎生期の DES 曝露は、下垂体の機能分化が正常に進行せず、正常なフィードバック機構を成立させないことが示唆された。

小括

第1章の結果から、DES曝露がフィードバック機構における視床下部の反応を変化させた可能性が示唆された。フィードバック機構の視床下部に続く組織である下垂体は、ゴナドトロフが視床下部由来のGnRHに反応して、LHもしくはFSHを合成する。そこで第2章では、精巣のステロイドホルモン合成を直接コントロールしている下垂体が、DES曝露によってどのように変化するか検討した。

DESの投与方法は第1章と同様である。6及び15週齢において雄産子を剖検し、下垂体を採取した。下垂体における、各種ホルモン合成および調節因子のmRNA発現量を半定量的RT-PCR法を用いて測定した。

6週齢において、DES 1.5群のLH β 、AR、ER α 及びER β 、DES 0.5群のAR、ER α 、ER β 及びnNOSのmRNA発現が変化した。

15週齢においてDES 1.5群のnNOS及びeNOS、DES 0.5群のGnRHr及びeNOSのmRNA発現が変化した。

以上の結果から、胎生期のDES曝露は、下垂体のゴナドトロフにおいて、GnRH-GnRHrによるシグナルが正常に伝達しないために、血漿テストステロン濃度の減少に対する正常なフィードバック反応が起こらず、この変化はNOを介したシグナル伝達の変化及び性ステロイドホルモンに対する感受性の変化に起因して

第3章

胎生期の DES 投与が胎子の精巣に及ぼす影響

精巣ライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン合成は、下垂体から分泌される LH 刺激によりコレステロールを基質に様々なタンパク及び酵素が作用して合成される。ラット精巣において、ステロイドホルモンを合成するライディッヒ細胞は、14.5 dpc に分化することが報告されており (Lejeune et al., 1998)、またコレステロールを輸送するタンパクである StAR 及びステロイドホルモン合成に関与する酵素である 3β -HSD 及びは、ほぼ同時期の 14.0 dpc にタンパクが存在することが Western blot を用いた研究によって報告されている (Mikkil et al., 2006)。従って精巣のステロイドホルモン合成を調節している上位中枢が分化する前に、既に精巣ライディッヒ細胞はステロイドホルモン合成能を持っている (Habert and Pikon, 1984)。精巣におけるテストステロン合成は、様々なエストロゲンによって抑制されることが知られている (Haavisto et al., 2003)。中でも DES によるステロイドホルモン合成への影響はこれまでに多く調べられており、DES の影響が ER を介していること (Sempere et al., 2000)、ステロイドホルモン合成過程に関与する酵素を選択的に阻害すること (Guyot et al., 2004; Cederroth et al., 2007; Mikkil et al., 2006)、またステロイドホルモン・レセプターの発現を変化させること (McKinnell et al., 2001; Goyalet al., 2003) が明らかになっている。

胎生期において雄ラットは、その雄性化の為に、18.5 日頃にテストステロンサージによって血中テストステロンレベルがピークとなり、出生後、2-3 日齢に 1 度上昇するが徐々に低下する。その後、思春期前にな

ると、二次性徴の為のサージが起こるまで、低レベルになっている。精巣においてテストステロンを合成するライディッヒ細胞は、間葉細胞由来の胎子型ライディッヒ細胞（FLC）と血管周皮細胞由来の成体型ライディッヒ細胞（ALC）の2種類が存在する。FLC及びALCは、共にステロイドホルモン合成能を持ち、FLCは妊娠18.5日頃に起こるテストステロンサージ、ALCは思春期前に起こるサージの際に盛んにテストステロン合成を行っている。しかし、FLCはALCと性質が異なり、ALCはLH存在下でホルモン合成が盛んに行われるのに対し、FLCのステロイドホルモン合成にLHが関与しないと報告されており、胎子の精巣におけるステロイド合成と思春期以降の精巣におけるステロイドホルモン合成は性質が異なることが考えられる（Gehani et al., 1998; Zhang et al 2004）。

本研究では、胎生期のDES曝露が産子が思春期及び成熟期を迎えた時、血漿テストステロン濃度を減少させること、精巣におけるステロイドホルモン合成に関連した因子及びステロイドホルモンレセプターのmRNA発現量を変化させること、精子形成や妊孕能は正常であることを解明し、DES曝露が雄産子の思春期及び成熟期の精巣に及ぼす影響を明らかにしている。胎生期の精巣に存在するライディッヒ細胞には既に Estrogen Receptor が発現しており、またセルトリ細胞にはアンドロジェンをエストロジェンへと変換する Aromatase も存在していて、精巣内のエストロジェン環境がライディッヒ細胞の発達に関与していることが報告されている（Williams et al., 2001; Fisher et al., 1997）。従って本研究において投与されたDESは、胎子精巣のライディッヒ細胞のERに結合してステロイドホルモン合成能に大きな影響を及ぼしている可能性が考えられる。

そこで、第3章では胎生期のDES曝露が胎子の精巣に及ぼす影響について、主にステロイドホルモン合成に関わる因子のmRNA発現を比較す

ることによって検討した。

材料と装置

実験に用いた細胞は、*Dictyostelium discoideum* (ATCC 30216) であり、細胞は 10% 胎児牛血清 (FBS) を含む DMEM (Gibco) に培養された。細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。

実験手順

細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。

RNA の抽出

細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。細胞は 10% FBS を含む DMEM (Gibco) に培養された。

材料及び方法

1. 使用動物

第一章に準ずる。

2. 投与方法

DES (Sigma Chemical Co., USA) は投与量が 1.5 あるいは 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ となるように Corn oil (Tocopherol Stripped Corn Oil; ICN Biomedical Inc., USA) に溶解し、妊娠 7 日から 20 日目に頸部皮下に連日単回投与した (DES 1.5 群及び DES 0.5 群と称する)。また Control 群は Corn oil のみを投与した。

3. 剖検

剖検は妊娠 20 日目に行った。剖検時に母体を断頭・放血後、帝王切開して子宮内の胎子を採取した。取り出した雄の胎子は体重測定後、精巣を採取した。採取した精巣は RNA 抽出用に -80°C に保存した。

4. RNA の抽出

凍結した精巣は ISOGEN (ニッポンジーン) を 1.0 ml 加えて抽出した後、クロロホルム (0.2ml) を加えて 15 秒攪拌、室温に 2-3 分放置し、遠心分離した ($12\text{K}\times\text{g}$, 15min., 4°C)。上清を採取し、再度同条件にて遠心を行い ($12\text{K}\times\text{g}$, 15min., 4°C)、得られた上清にイソプロパノール (0.8ml) 及び Ethachinmate (ニッポンジーン) を加え攪拌後、 4°C 下で一晩静置した。翌日、遠心分離後 ($12\text{K}\times\text{g}$, 10min., 4°C)、上清を除去し、その沈殿に 70% エタノール (1.0ml) を加え、遠心分離した ($7.5\text{K}\times\text{g}$, 5min., 4°C)。その後の手順及び RNA 濃度の測定方法は第

一章と同様である。

5. 半定量的 RT-PCR

逆転写反応には anti-sense Primer 法を用い、以下の Primer を作成して、PCR を行った : Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR)、P450 side chain cleavage (P450scc)、3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β -HSD)、17 α -Hydroxylase+C17-20 Lyase (P450_{17 α})、5 α -Reductase 1、Aromatase、Anti-Müllerian Hormone (AMH)、Androgen Receptor (AR)、Estrogen Receptor α (ER β)、Luteinizing Hormone Receptor (LHR)、Estrogen Sulfotransferase (EST) 及び β -actin 。反応試薬、PCR の手順、バンドの検出及び解析法は第一章と同様である。

結果

1. ステロイドホルモン合成系酵素 (StAR、P450scc、3 β -HSD、P45017 α 、5 α -Reductase 1、Aromatase : Tables 8 a-c, Figs. 9 a-c)

DES 0.5 群の P450scc mRNA 発現量が Control 群の発現量と比較して有意に減少した。両 DES 投与群の 5 α -Reductase 1 mRNA 発現量が Control 群の発現量と比較して有意に増加した。DES 投与群の StAR、3 β -HSD、P45017 α 及び Aromatase の mRNA 発現量は Control 群の発現量と比較して有意に変化していなかった。

2. 各種因子 (AMH、EST : Table 9, Fig. 10)

DES 投与群の AMH 及び EST mRNA 発現量は Control 群の発現量と比較して有意に変化していなかった。

3. ホルモン受容体 (LHR、AR、ER α : Table 10, Fig. 11)

DES 1.5 群の LHR mRNA 発現量が Control 群の発現量と比較して有意に増加した。DES 投与群の AR 及び ER α mRNA 発現量は Control 群と比較して有意に変化していなかった。

Table 8 a. mRNA levels of steroidogenic enzymes

group	StAR	P450 scc
Control	35.7 ± 4.1 [5]	84.8 ± 6.8 [5]
DES 0.5	31.2 ± 6.7 [5]	64.9 ± 4.0 [5] *
DES 1.5	42.3 ± 9.0 [5]	70.8 ± 4.3 [5]

Table 8 b. mRNA levels of steroidogenic enzymes in the fetal testis.

group	3β-HSD	P450 17α
Control	67.3 ± 8.9 [5]	24.4 ± 4.5 [5]
DES 0.5	72.7 ± 6.6 [5]	21.6 ± 6.6 [5]
DES 1.5	80.9 ± 9.0 [5]	33.6 ± 6.7 [5]

Table 8 c. mRNA levels of steroidogenic enzymes in the fetal testis.

group	5α-Reductase 1	Aromatase
Control	42.4 ± 2.8 [4]	16.4 ± 3.0 [4]
DES 0.5	57.3 ± 3.9 [5] *	16.8 ± 3.0 [5]
DES 1.5	63.2 ± 6.3 [5] *	20.0 ± 3.2 [5]

* : Control群と比較して有意差あり (P < 0.05)

[] : 測定個体数

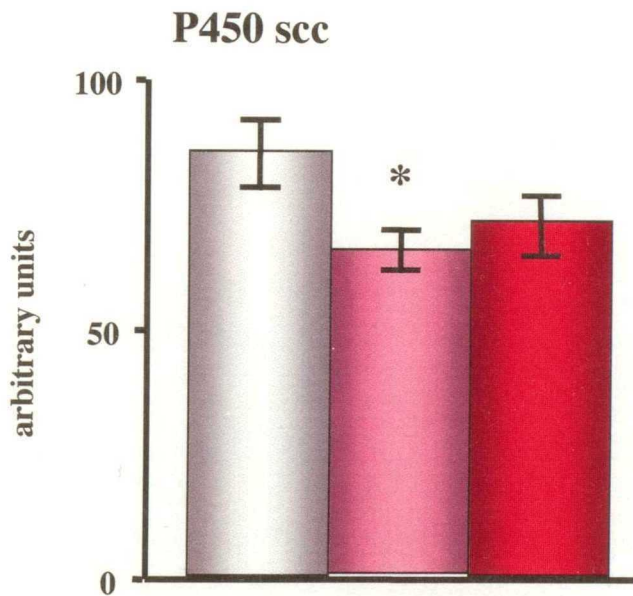
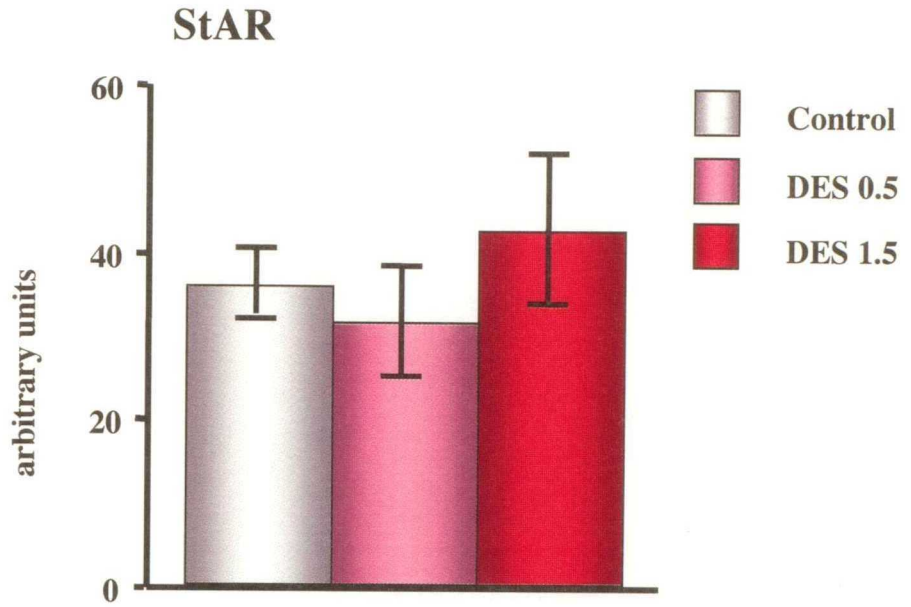


Fig. 9-a mRNA levels of steroidogenic enzymes in the fetal testis.

* : Control 群と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

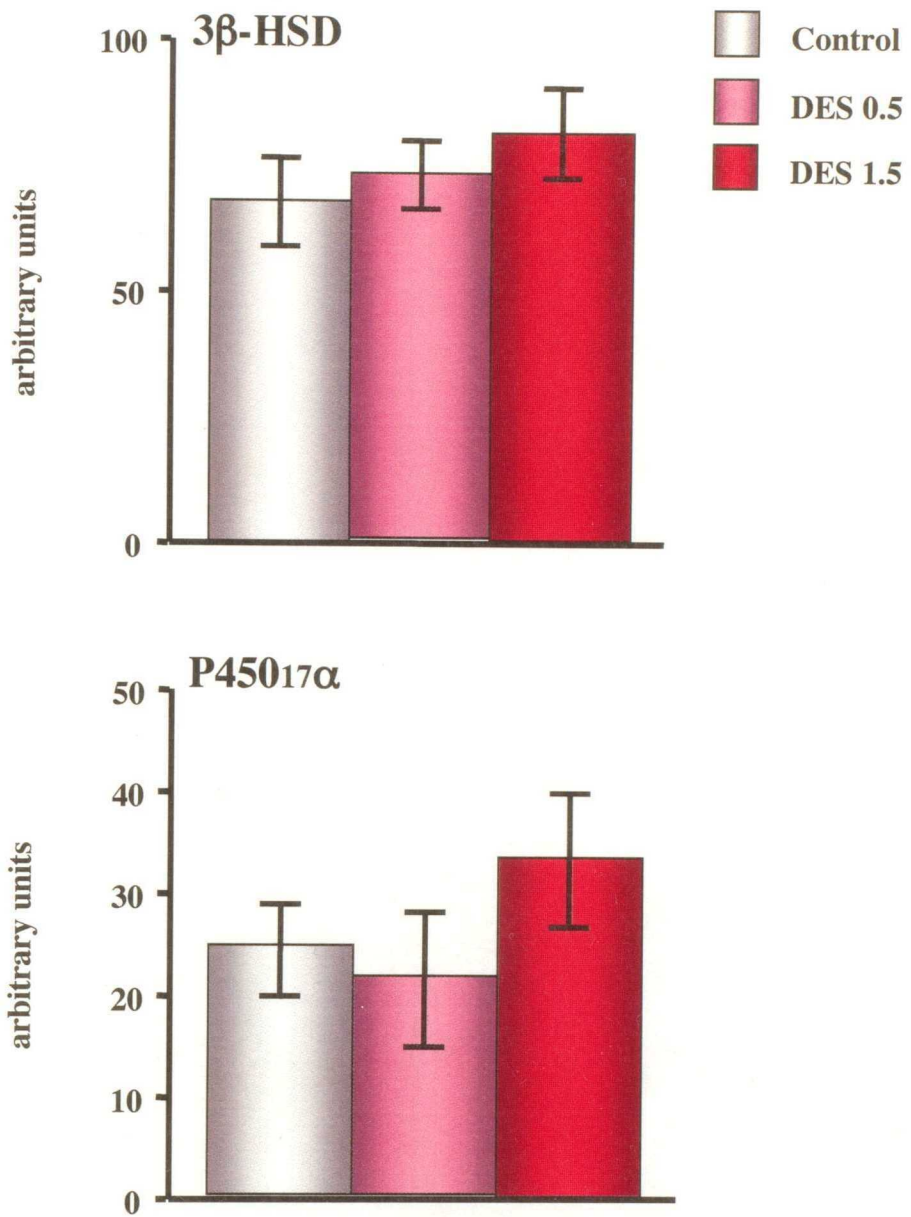


Fig. 9-b mRNA levels of steroidogenic enzymes in the fetal testis.

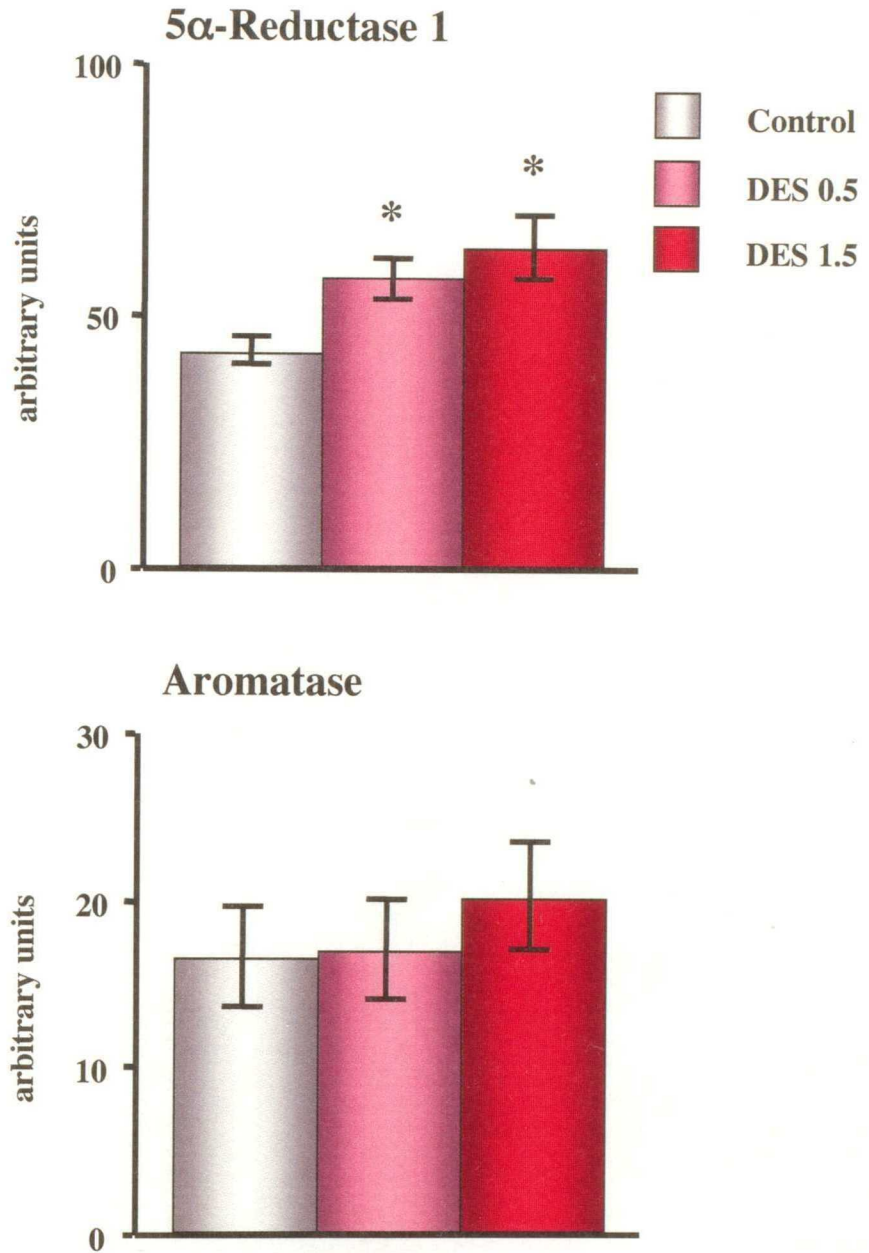


Fig. 9-c mRNA levels of steroidogenic enzymes in the fetal testis.

* : Control 群と比較して有意差あり ($P < 0.05$)

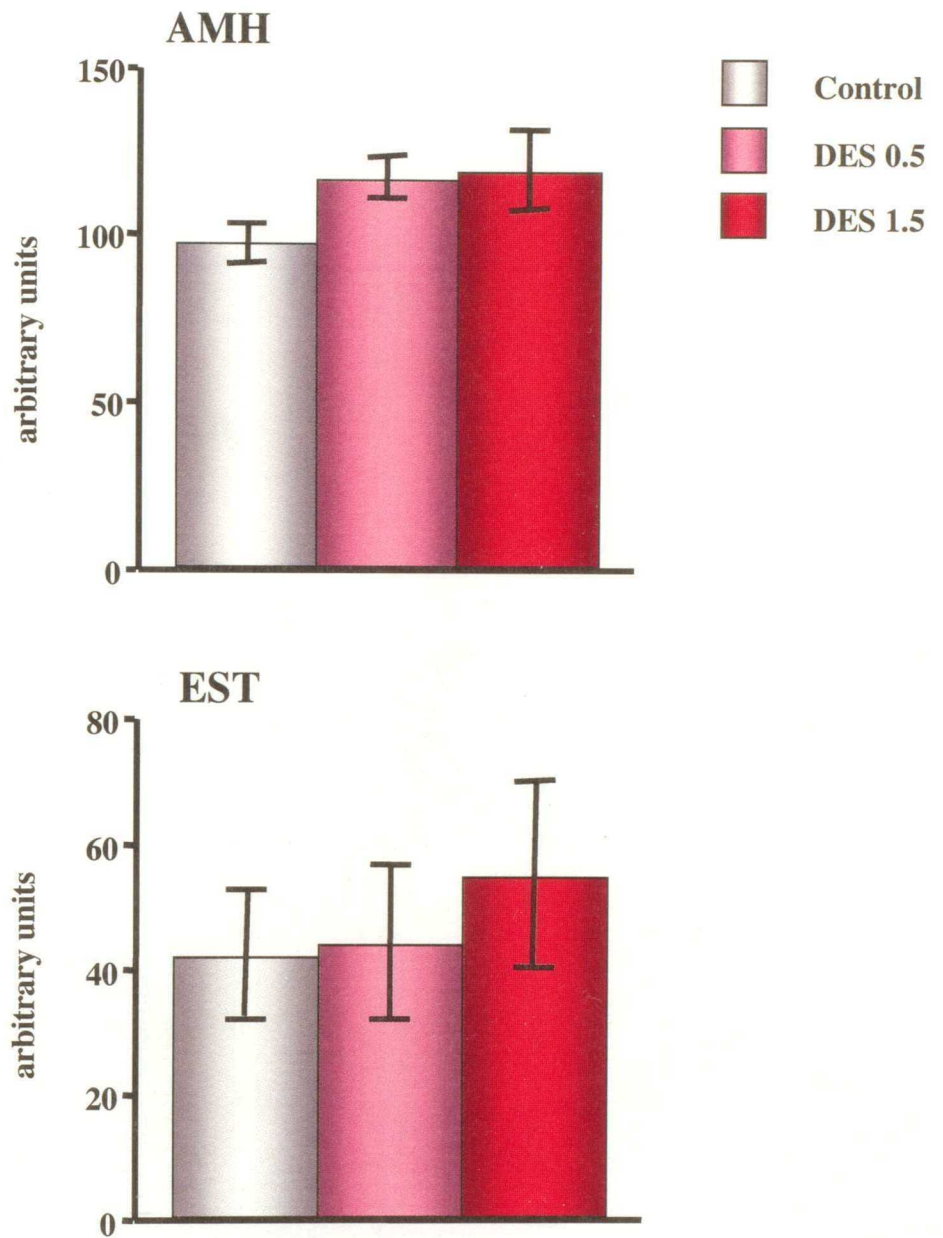


Fig.10 mRNA levels of AMH and EST in the fetal testis.

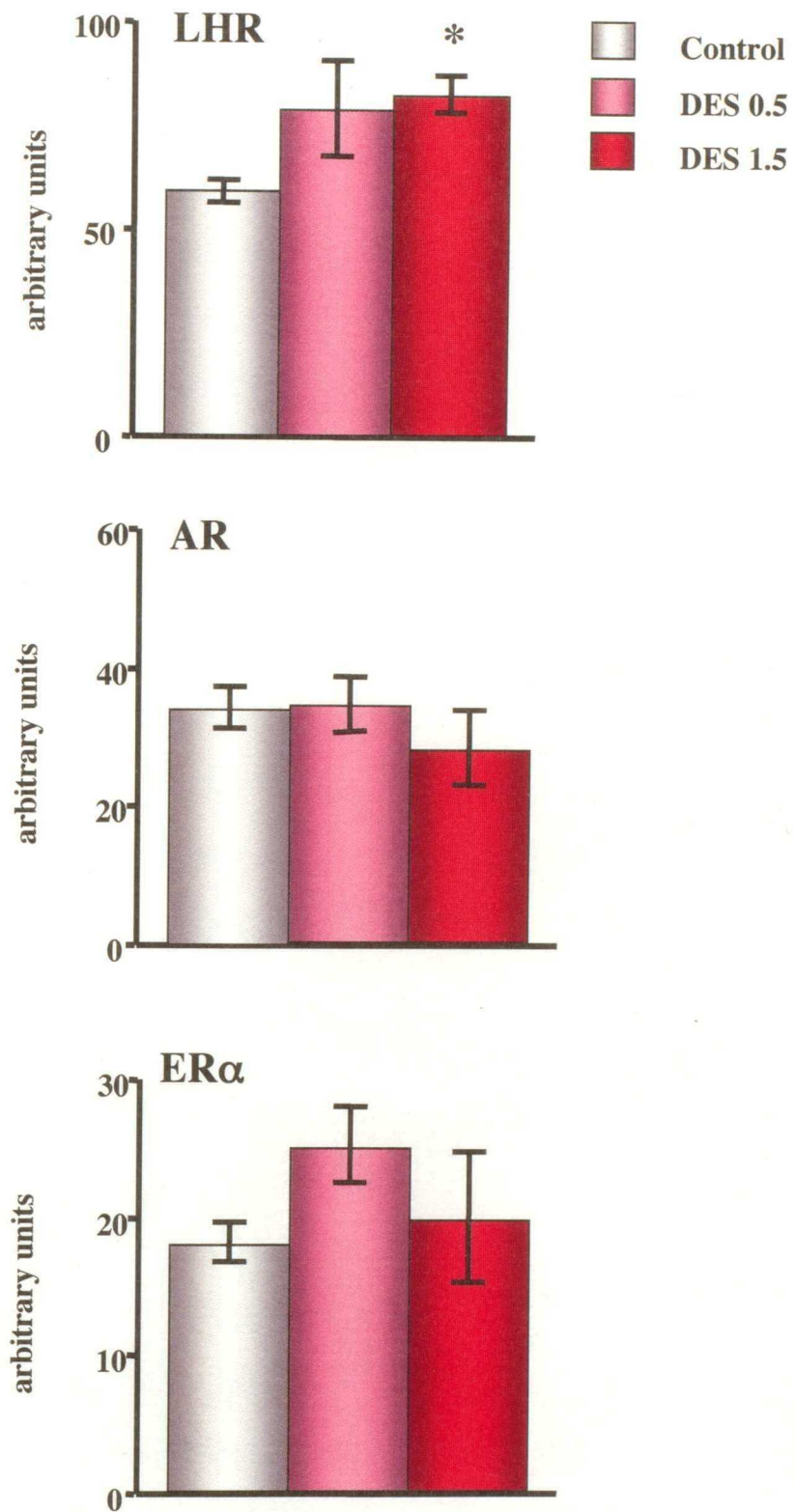


Fig. 11 mRNA levels of hormone receptors in the fetal testis.

* : Control 群と比較して有意差あり (P < 0.05)

考察

胎子精巣におけるステロイドホルモン合成は、ラットでは胎齢 14.5 日から開始され、15.5 日に初めて血中にテストステロンが分泌される

(Habert and Picon, 1984)。胎生期のステロイドホルモン合成を行う、胎子型ライディッヒ細胞は、出生直前まで増殖し、出生後に徐々に減少する (Delbès et al., 2007)。この時期の胎子型ライディッヒ細胞は ER を発現しており、胎子期及び新生子期のエストロジェン曝露がアンドロジェン合成を抑制することが報告されている (Sempere et al., 2000 : Morris et al., 1986)。本研究の第 3 章では合成女性ホルモンである DES を妊娠 7-20 日まで投与していることから、胎子型ライディッヒ細胞のステロイドホルモン合成に DES が直接作用し、何らかの変化を及ぼしている可能性が考えられ、この点について検討した。

精巣における、ステロイドホルモン合成は、まずステロイドホルモンの基質となる Cholesterol が、StAR によってミトコンドリアへと輸送され、P450_{scc} によって Pregnenorone へと変換される。その後 Pregnenorone は滑面小胞体に移動し、様々な酵素が作用することによって、テストステロンが合成される (Marsh, 1976)。妊娠 11.5 日と 15.5 日に高用量の DES(100 あるいは 500 μ g/kg)を母体に投与すると、胎子精巣ステロイドホルモン合成系酵素の 17 α -Hydroxylase を選択的に阻害することによって、ホルモン合成を抑制することが知られている (Majdic et al., 1996)。この実験と本研究の実験デザイン (投与量及び投与期間) が異なることもあり、本研究では P450 17 α mRNA 発現は変化しなかった。代わって、ホルモン合成過程において律速段階を担う P450_{scc} の発現が DES 0.5 群において減少したが、ここで得られたデータからその原因を探求することは困難であると思われる。

高用量の外因性エストロジェンは胎子ライディッヒ細胞の機能を変化させることが証明されている。例えば分離したラット胎子ライディッヒ細胞を培養する際にエストロジェンをテストステロン産生が阻害され (Tsai-Moris et al., 1986)、14.5 日のラット胎子精巣を器官培養する際にエストロジェンを添加すると、ライディッヒ細胞の数と分化する機能を減少させる (Lassurquere et al., 2003)。また、高用量の外因性エストロジェンを妊娠した齧歯類に投与すると、胎子ライディッヒ細胞の分化に作用するという報告がある (Perez-Martinez et al., 1996 : Majdic et al., 1996)。これら胎子精巣へのエストロジェンの作用は ER α を介している (Delbes et al., 2005)。本研究では、DES 曝露により高レベルのエストロジェンに曝されているにも関わらず、胎子精巣の ER α mRNA、加えて AR mRNA の発現は変化していないことから、胎子精巣におけるエストロジェン及びアンドロジェンに対する感受性、言い換えればホルモン受容体の量は変化していない可能性が示唆された。

両 DES 投与群の 5 α -Reductase mRNA が Control 群の mRNA 発現量と比較して有意に増加した。それ以外の因子は変化しなかった。血中テストステロンレベルが低下した時、テストステロンはより強いアンドロジェン活性を持つ DHT へと変換され、不足するアンドロジェン作用を補うことが報告されている (Pratis et al., 2003)。本研究において、両 DES 投与群の 5 α -Reductase mRNA 発現が増加していることから、DES 投与群において、血中テストステロンレベルが低下していた可能性が示唆された。

本実験と同じ実験デザインの生後 3 週において、両 DES 投与の血漿 LH 濃度は Control 群のホルモン濃度に比べて有意に減少していたことから、生後 3 週の血漿テストステロン濃度は減少しており、さらに下垂体は低

レベルのテストステロンに正常に反応している事が示唆されている (Yamamoto et al., 2005)。また、本章で胎子精巣において DES 1.5 群の LHR mRNA 発現が Control 群の mRNA 発現と比較して有意に増加しており、DES0.5 群の LHR は統計学的に有意差は無いものの、増加傾向にあった。前述したように、5 α -Reductase1 mRNA の変化から、血漿テストステロンの減少が示唆され、LHR mRNA の増加をあわせて考慮すると、胎子下垂体は、投与された DES の影響を受けてはおらず、低レベルのテストステロンに正常に反応して LH 分泌量を増加させた可能性が示唆された。また LHR が増加しているにもかかわらず、ステロイド合成系の StAR 及びステロイド合成系の酵素群の mRNA がほとんど変化していなかったことから、DES 投与により、LHR からのシグナル伝達に何らかの障害が引き起こされた可能性も考えられる (Fig. 12)。

一方、DES0.5 群の LHR は増加傾向にあるものの、有意に変化していなかった。AR 及び ER α mRNA 発現はどちらも変化していなかった。LHR mRNA 発現量の結果から、DES 0.5 群は下垂体 LH 刺激によるシグナル伝達が低レベルであった為、DES 0.5 群の P450 scc mRNA 発現が低下していた可能性が示唆された。精巣において胎子型ライディッヒ細胞が多く存在する新生子期にエストラジオールを投与すると AR 及び ER の発現が抑制されることが報告されている (Sempere et al., 2000)。エストラジオールに似た作用を持つ DES もまた、新生子期の投与が AR 及び ER の発現を抑制し、アンドロジェンもしくはエストロジェンに対する感受性を変化させる (Williams et al., 2001)。しかし、異常なホルモン環境に AR 及び ER α が対応していない原因は、分からなかった。

本研究の DES 投与によって、胎子精巣内はエストロジェンレベルが高

くなっていることが推察される。しかし、予想に反して精巣のエストロジェン合成に関与するAromatase及びエストロジェンの感受性に関与するER α は変化していないことから、精巣内のエストロジェン合成及び作用に関与する因子が変化していた可能性が考えられた。胎子の精巣において、主にセルトリ細胞に局在し、ライディッヒ細胞によって合成されたテストステロンがセルトリ細胞によってエストラジオールへと転換される (O'Donnell et al., 2001)。ミューラー管を退縮させる作用で知られているAMHもAromataseと同様にセルトリ細胞に局在し、Aromataseの作用を阻害することによってエストロジェン合成の抑制因子として機能している (Fabre et al., 1998)。また精巣において、ライディッヒ細胞に局在しているESTはEstrogenを不活化してERへの結合を阻害する作用を持つ (Tong et al., 2004)。従って、高エストロジェン環境下にあっても、精巣のAromatase及びER α が変化しなかった原因が、AMH発現の変化もしくはESTの変化によるものである可能性が考えられた。そこでこれらの因子のmRNA発現を検討したところ、両因子とも変化していなかった。Songら(1997)は胎子精巣にはESTは、存在しないと報告している (Song et al., 1997)。また胎生期の精巣Aromataseは成体のそれとは異なり活性が弱いとの報告もある。従って、本実験において、DES曝露により変化したと考えられる、エストロジェン環境に胎子精巣は反応していない可能性があり、そのためテストステロン合成がDESによって阻害を受けたとも考えられる。

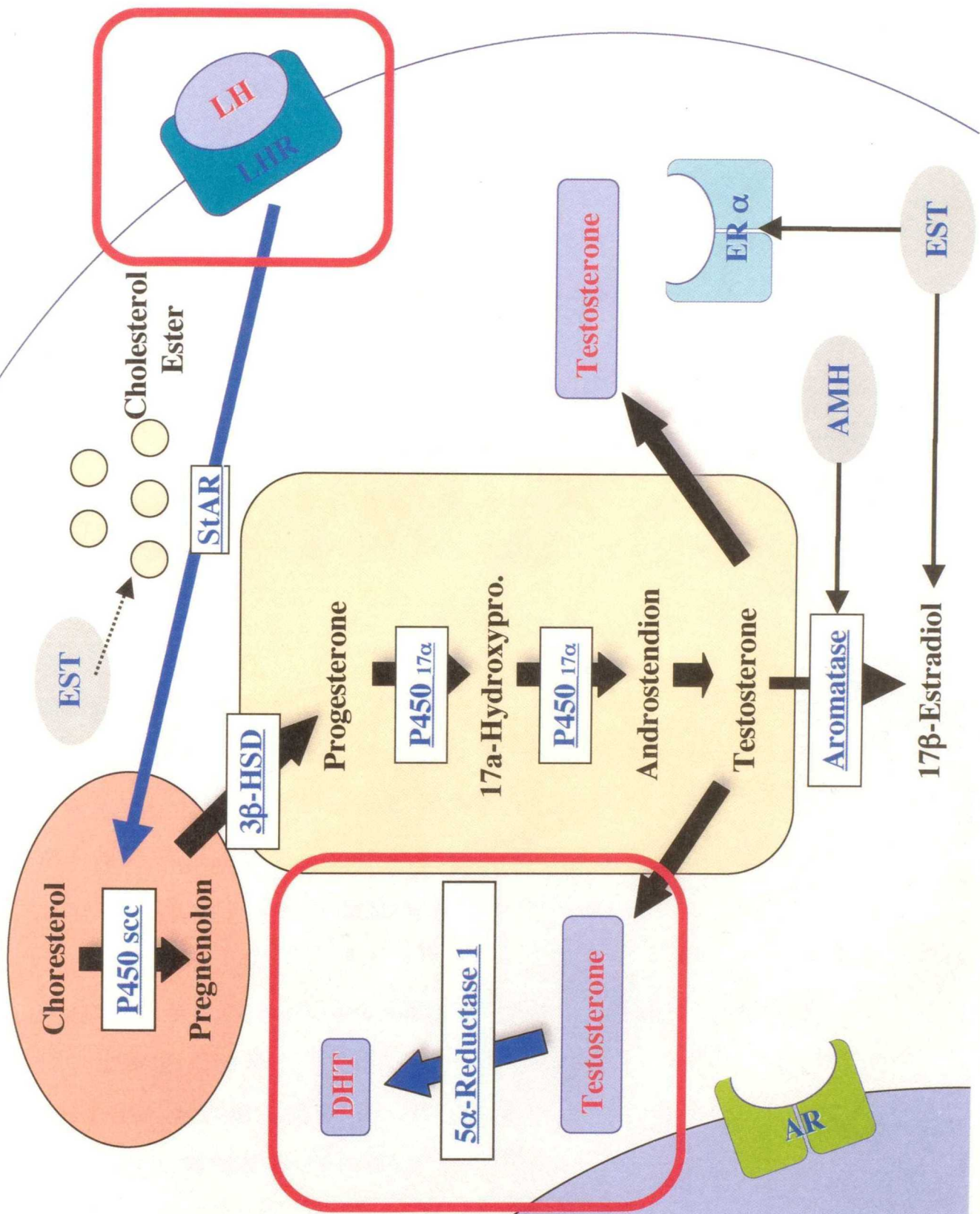


Fig. 12 胎児精巣のテストステロン合成におけるシグナル伝達経路

小括

これまでの実験から、胎生期の DES 曝露は思春期以降の視床下部-下垂体-精巣系の全体に影響を及ぼしている可能性が示唆された。本研究における DES 曝露は、器官形成期から出生までの長期間にわたっている。この時期は、精巣が機能分化し、ステロイドホルモン合成が開始される時期に相当し、胎子は DES という過剰なエストロゲンに曝露されていることになる。そのため DES はまず精巣機能に大きな影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで第 3 章では、DES 曝露が胎子の精巣に及ぼす影響を検討した。

妊娠 SD ラットを用い、妊娠 7 日から 20 日目の期間、DES を皮下に連日単回投与した。投与量は第 1 章及び第 2 章と同様である。胎齢 20 日に帝王切開によって取り出した雄胎子を剖検し、精巣を採取した。精巣における各種ホルモン合成および調節因子の mRNA 発現量を、半定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。

両 DES 投与群の 5α -Reductase 1 の mRNA 発現量が Control 群と比較して有意に増加した。DES 1.5 群の LHR の mRNA 発現量が Control 群の発現量と比較して有意に増加した。DES 0.5 群の P450 scc の mRNA 発現量が Control 群と比較して有意に減少した。

以上の結果から、 5α -Reductase 1 発現が増加していたのは、外生殖器の正常な雄性化を進行するために、よりホルモン活性の高い Dehydrotestosterone への変換が促進されたことを意味し、DES

曝露が胎子の精巣テストステロン合成能を低下させた可能性が示唆された。

第4章

胎生期の DES 曝露がライディッヒ細胞分化に及ぼす影響

精巣のステロイドホルモン合成は精巣の間質に局在するライディッヒ細胞によって行われる。ライディッヒ細胞は、細胞内に含まれる細胞内小器官の違いから、胎子型ライディッヒ細胞と成体型ライディッヒ細胞に分類される (Lording and Kretser, 1972)。胎子型ライディッヒ細胞は、受精後 14~15 日において分化を開始し、出生前まで増殖を繰り返す (Lejeune et al., 1998)。一方、成体型ライディッヒ細胞は生後 10 日から分化し始める (Handagama et al., 1998)。出生後、胎子型ライディッヒ細胞は細胞死が増加し分化が停止することにより、精巣における総ライディッヒ細胞の体積は減少する (Kuopio et al., 1989)。同時期において成体型ライディッヒ細胞は様々なホルモン作用により、分化・増殖が促進されるため、胎子型ライディッヒ細胞の減少と成体型ライディッヒ細胞の増加がほぼ同時に行われることが報告されている (Chamindrani et al., 2001)。器官培養を用いた実験系において、受精後 13.5~14.5 日の精巣に、エストラジオールもしくは DES を曝露させた時、精巣における胎子型ライディッヒ細胞数及びテストステロン産生が抑制されることから、胎子型ライディッヒ細胞の分化・増殖においてエストロジェンが抑制因子であることが報告されている (Delbès et al., 2006)。一方、マウスを用いた *in vivo* の実験系では、妊娠 9 及び 10 日に 150 μ g/kg の DES 曝露がライディッヒ細胞の分化を促進しており、胎子型ライディッヒ細胞の分化・増殖に対して促進因子として作用している (Perez-Martinez et al., 1996)。これらの実験系は共に、本研究と比較して高用量の DES を用い

ているが、胎生期の DES 曝露が胎子型ライディッヒ細胞の分化・増殖に対して、促進あるいは抑制の両方向に作用する可能性を持っていることは間違いない。一方、エストロジェンは成体型ライディッヒ細胞においては、分化・増殖の促進因子であり、ライディッヒ細胞が障害を受けた際に、精巣はエストロジェン合成を促進し、成体型ライディッヒ細胞の分化及び増殖を促進することが報告されている (Handagama et al., 2001)。第3章において、胎子精巣において血漿テストステロン濃度が減少した可能性が示唆されたが、その減少の原因となるような直接的な変化はデータとして得られなかった。また、以前に行った研究から、3週齢の血漿テストステロン濃度が減少した可能性が示唆されたが、同様に精巣のステロイドホルモン合成系に原因となるような明瞭な変化が見られなかった。従って、予測された血漿テストステロンの減少が、ライディッヒ細胞のステロイドホルモン合成能ではなく細胞数に関連している可能性も考えられる。成体型ライディッヒ細胞及び胎子型ライディッヒ細胞は、共にテストステロン合成能を持つため、ステロイドホルモン合成の律速段階を担っている P450 scc は、ライディッヒ細胞の共通のマーカーとして知られている (Ariyaratne et al., 2000)。また成体型ライディッヒ細胞は、主に精巣間質の血管壁を取り囲む周皮細胞から分化しており、ライディッヒ細胞へと分化する周皮細胞は、Nestin を発現することが報告されている (Davidoff et al., 2004)。また胎子型ライディッヒ細胞は Platelet-Derived Growth Factor Receptor α を特異的に発現することから、胎子型ライディッヒ細胞のマーカーとして知られている (Ge et al., 2006)。そこで、本章では、これらの因子を成体型ライディッヒ細胞及び胎子型ライディッヒ細胞のマーカーとし、免疫組織化学的に胎生期の DES 曝露がライディッヒ細胞の分化に及ぼす影響を検討した。

材料及び方法

1. 実験動物

第一章に準ずる。

2. 投与方法

第一章に準ずる。

3. 剖検

剖検は生後 1 及び 3 週齢に行った。剖検時に雄の体重を測定後、精巣を採取した。採取した精巣は片方を組織学的解析用にブアン液にて固定した。他方の精巣は RNA 抽出用に -80°C に保存した。

4. 組織学的解析

ブアン固定した精巣は、エタノール系列を用いて脱水後、定法に従ってパラフィン樹脂に包埋した。包埋した組織は回転式マイクロトームを用いて $4\ \mu\text{m}$ の連続切片を作成した。1 週齢の精巣組織切片は、抗 P450 scc 血清 (AB1294 ; Chemicon International, USA) を一次抗体、ウサギビオチン標識 Ig G (フナコシ) を二次抗体として切片上の抗原を標識し、ABC 法を用いて 3,3'- Diaminobenzidine tetrachloride (同仁化学研究所) により抗原を可視化した。対比染色にはヘマトキシリンを用いた。

3 週齢の精巣組織切片は抗 α - smooth muscle actin (α -SMA) 血清 - 抗 Nestin 血清及び抗 P450 scc 血清 - 抗 Platelet-derived Growth Factor Receptor α (PDGFR α) 血清を用いて二重染色した。まず抗 Nestin 血清 (ab6142 ; abcam, UK) を一次抗体とし、ヒストファイン・シンプルステインラット MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス) を用

いて切片上の抗原を標識し、3,3'- Diaminobenzidine tetrachloride により抗原を可視化した。発色後、反応液を洗い流し、次いで抗 α -smooth muscle actin 血清 (MAB1420 ; R&D Systems, USA) を一次抗体、マウスビオチン標識 IgG (フナコシ) を二次抗体として切片上の抗原を標識し、さらに Phosphatase-labeled Streptavidin (KPL, USA) を用いて抗原を Alkaline Phosphatase を標識し、4-Nitro blue tetrazolium chloride (Roche, USA) を用いて抗原を可視化した。

5. 胎子型ライディッヒの細胞の体積

免疫染色した 1 週齢の組織切片は、20 枚毎にデジタルカメラ (DP50-W98D ; OLYMPUS OPTICAL) を用いて組織写真を撮影後、画像解析ソフト Lumina Vision (三谷商事) を用いて切片上における P450^{scc} の陽性細胞の面積を計測した。その後、得られた値から精巣全体におけるライディッヒ細胞の体積を求め、その割合を算出した：精巣全体におけるライディッヒ細胞の総体積 (mm^3) = 陽性細胞の面積の合計 (mm^2) \times 100 mm (計測した切片間の距離)。

6. 成体型ライディッヒ細胞 前駆細胞の観察

抗 α -SMA 血清 - 抗 Nestin 血清を用いて免疫染色した 3 週齢の組織切片は、光学顕微鏡下で Nestin 陽性細胞の発現強度を観察し、陽性細胞が局在している精巣間質の血管数を計測した。

7. 成体型ライディッヒ細胞及び胎子型ライディッヒの 分布及び出現頻度

抗 P450^{scc} 血清 - 抗 PDGFR α 血清を用いて免疫染色した 3 週齢の組織切片を用いて、精巣における P450^{scc} のみ陽性の成体型ライディッヒ

細胞と P450 scc 及び PDGFR α 陽性の胎子型ライディツヒ細胞の分布及び各細胞の出現頻度を観察した。

8. RNA の抽出

第 3 章に準ずる。

9. 半定量的 RT-PCR

逆転写反応には anti-sense Primer 法を用い、以下の Primer を作成して、PCR を行った： Nestin 及び β -actin。反応試薬、PCR の手順、バンドの検出及び解析法は第一章と同様である。

生後 1 週齢における精巣組織の観察 (Fig. 13~15、Table 11)

1. 組織学的観察

抗 P450scc 血清を使って免疫染色した 1 週齢の精巣組織切片を用いて、各群の形態学的な観察を行った精巣間質には血管及び陽性反応を持つライディッヒ細胞が観察された。1 週齢の DES 投与群のライディッヒ細胞は Control 群の細胞と比較して顕著な違いは見られず、また 3 群全てにおいて正常な精巣組織像が観察された。

2. 胎子型ライディッヒ細胞の体積

同切片を用いて免疫組織化学的検討を行ったところ、その発現は精細管間質のライディッヒ細胞塊の細胞質にのみ強い陽性反応が観察された。ライディッヒ細胞は、球状から楕円状の形態を示しており、大型で細胞質が良く発達していることから胎子型ライディッヒ細胞であると考えられた。またライディッヒ細胞が間質に単独で局在していることは少なく、ほとんどが大きな細胞塊として精細管間質に局在していた。

P450scc 陽性の細胞を画像解析ソフトを用いて検出し、ライディッヒ細胞の総体積を調べたところ、DES 投与群の 1 週齢の精巣における胎子型ライディッヒ細胞の総体積は変化していなかった。

生後 3 週齢における精巣組織の観察 (Fig.16~20、Table 12)

1. 組織学的検討

精細管の間質には 1 週齢の精巣と比較して、精巣間質領域には P450 scc 陽性のライディッヒ細胞が多数観察され、また α -SMA 陽性の血管が多数観察された。また胎子型ライディッヒ細胞は、1 週齢では間質に大き

な細胞塊として観察されていたのに対し、3 週齢では細胞塊を形成しておらず、胎子型ライディッヒ細胞が単独で局在していた。また DES 投与群の精巣の形態は Control 群と比べ顕著な違いはなく、3 群全てにおいて正常な精巣組織像が観察された。

2. 成体型ライディッヒ細胞の分化

抗 Nestin 血清及び抗 α -SMA 血清を用いて、免疫組織化学的に検討を行った。 α -SMA は精細管間質の血管平滑筋に強く発現していた。また精細管周囲の筋様細胞にも弱く発現していた。一方 Nestin 陽性反応は精細管間質の血管周囲に局在する扁平な周皮細胞に強く発現していた。光学顕微鏡下の観察では、DES 投与群の α -SMA 及び Nestin の発現強度及び発現箇所は、Control 群との間に顕著な相違は見られなかった。

成体型ライディッヒ細胞の前駆細胞の割合を見る為、血管壁を構成する周皮細胞に Nestin が発現している血管の数を計測し、その血管数を比較した。その結果、DES 投与群と Control 群との間に有意な変化は見られなかった。

3. 成体型ライディッヒ細胞及び胎子型ライディッヒ細胞の発現

抗 P450 scc 血清及び抗 PDGFR α 血清を用いて、免疫組織化学的に検討を行った。胎子型ライディッヒ細胞において、PDGFR α 及び P450 scc 陽性の顆粒は、細胞質に混在して観察された。一方、成体型ライディッヒ細胞は P450 scc 陽性の顆粒のみが細胞質に観察された。多くは球状をしていたが、一部は細長い形態をしていた。

DES 投与群の P450scc 及び PDGFR α の発現強度及び発現箇所は、Control 群と比較して、顕著な違いは観察されなかった。また Control 群及び DES 1.5 群の精巣全体における、成体型ライディッヒ細胞及び胎子

型ライディッヒ細胞の出現頻度は同程度だった。しかし DES 0.5 群の精巣組織において成体型ライディッヒ細胞の出現頻度が高く、胎子型ライディッヒ細胞の出現頻度が低下していた。

4. 分子生物学的検討

各個体の精巣から RNA を抽出し、RT-PCR を用いて Nestin の mRNA 発現量を半定量的に比較した。DES 投与群と Control 群との間に有意な変化は見られなかった。

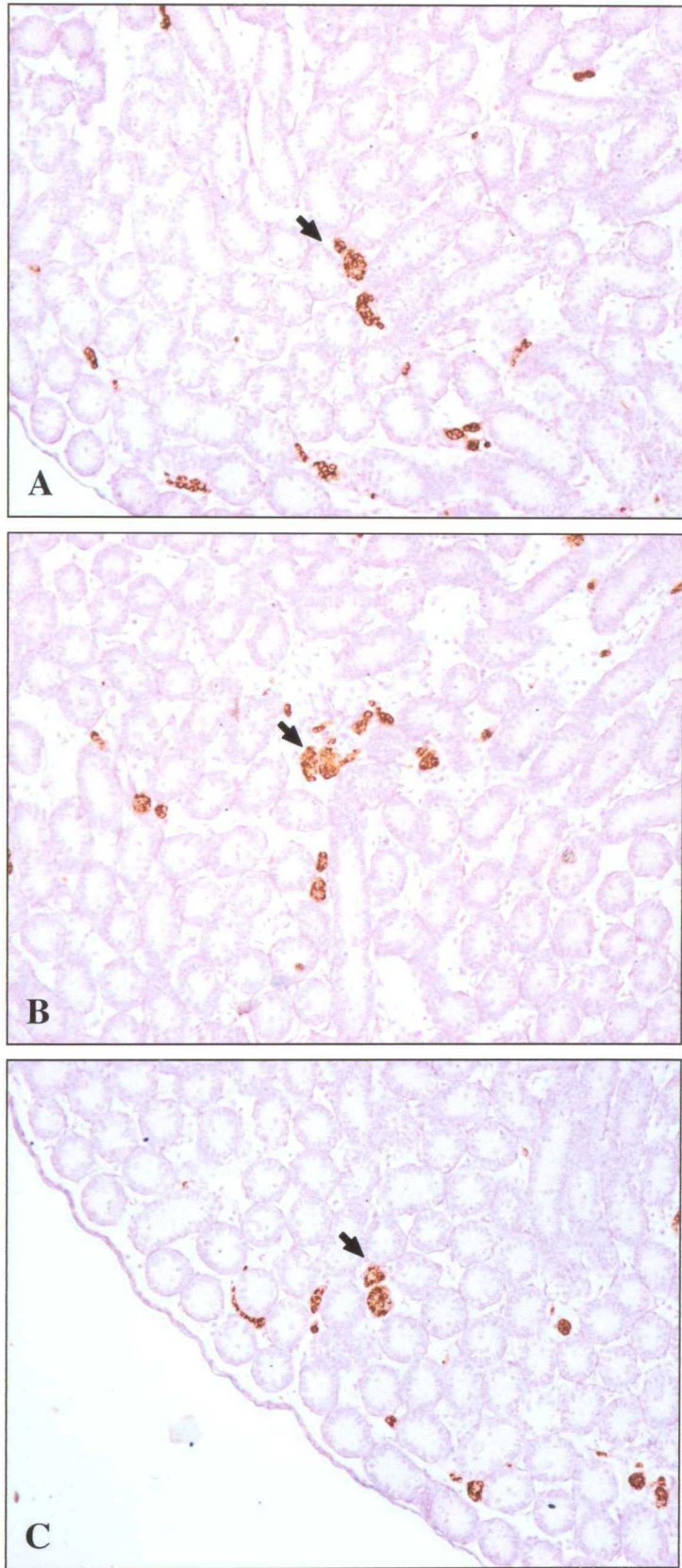


Fig. 13 1週齡の精巢；抗P450 scc免疫染色像（低倍率）

A：Control 群、**B**：0.5 群、**C**：DES 1.5 群

矢印：P450scc 陽性細胞塊

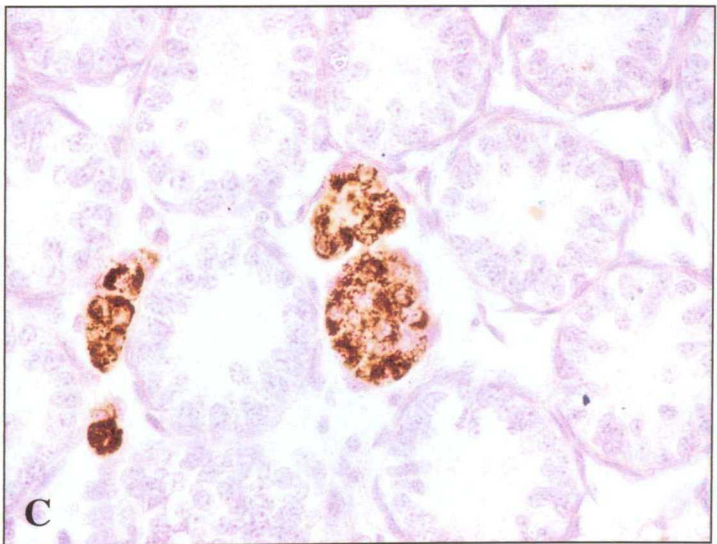
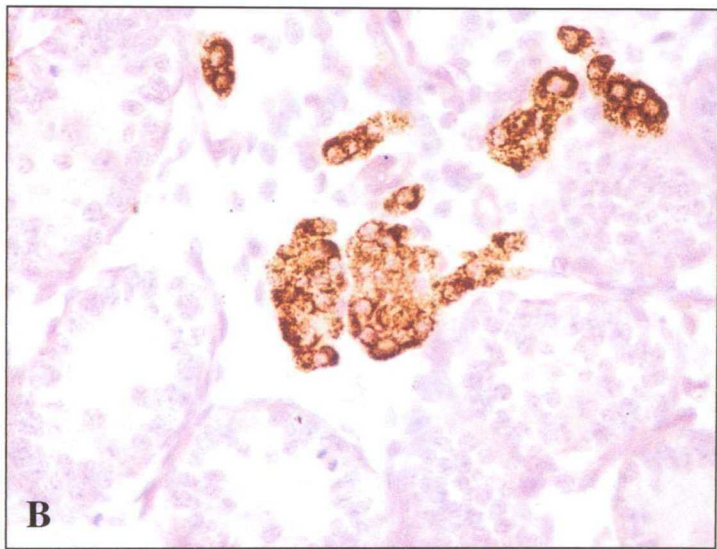
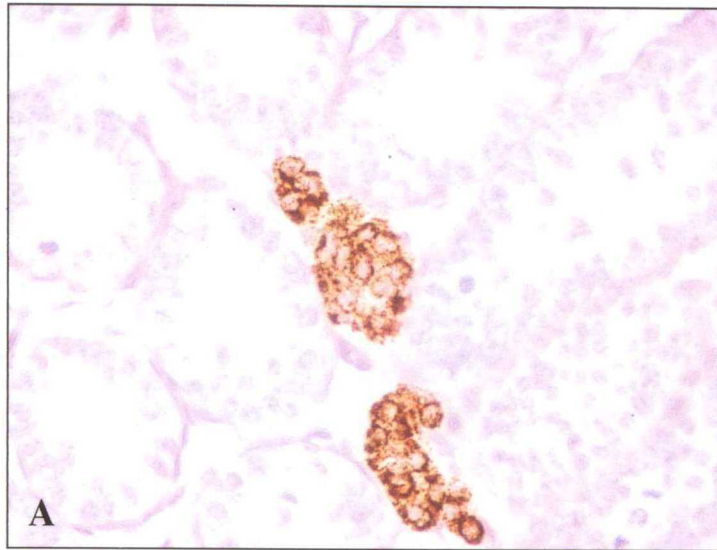
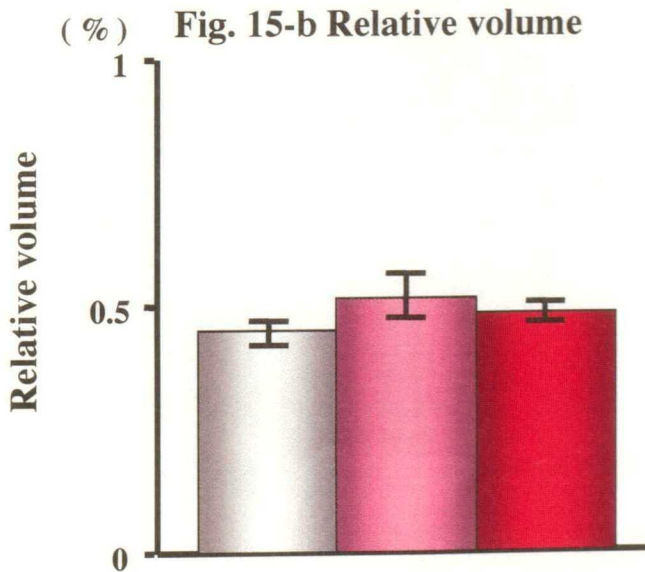
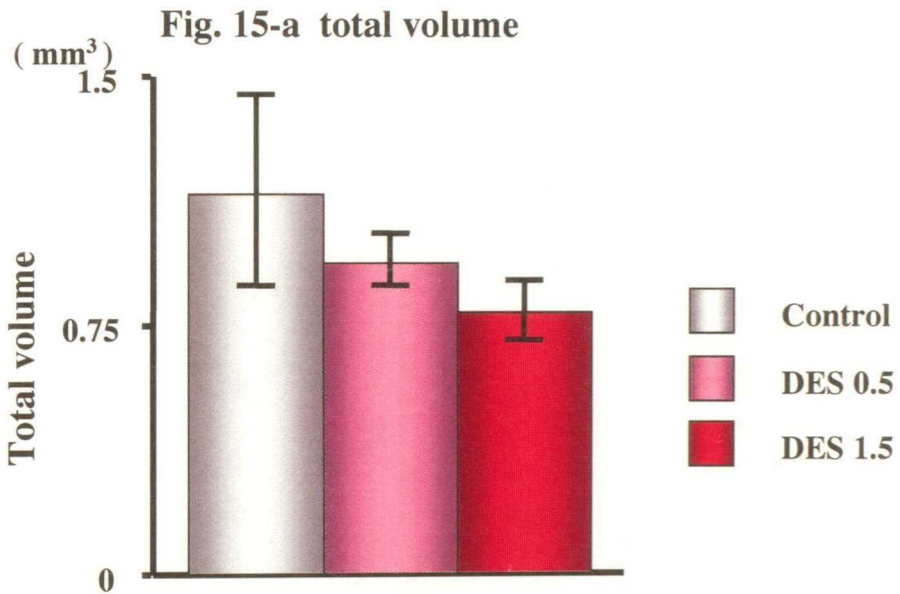


Fig. 14 1週齡の精巢；抗P450 scc免疫染色像（高倍率）

A : Control 群、 B : 0.5 群、 C : DES 1.5 群

Table 11 The total and relative volume of anti-P450scc positive cells in testis.

group	total volume (mm ³)	relative volume per testis (%)	
Control	1.15 ± 0.29	0.49 ± 0.02	[5]
DES 0.5	0.94 ± 0.08	0.52 ± 0.04	[5]
DES 1.5	0.79 ± 0.09	0.45 ± 0.02	[5]



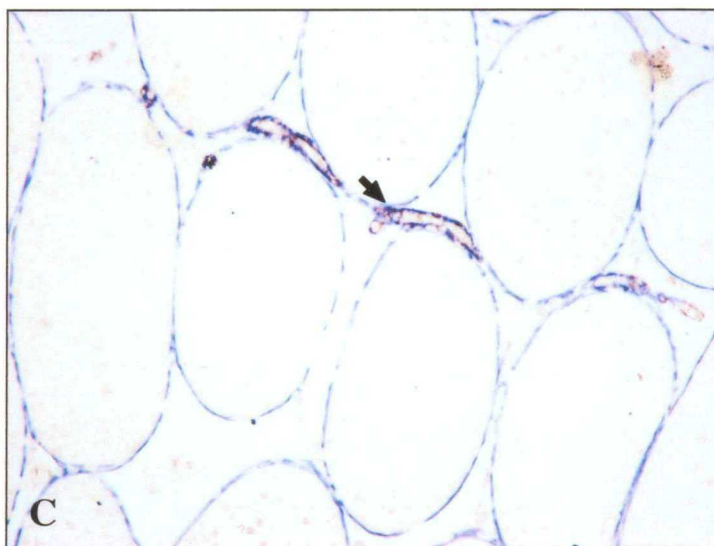
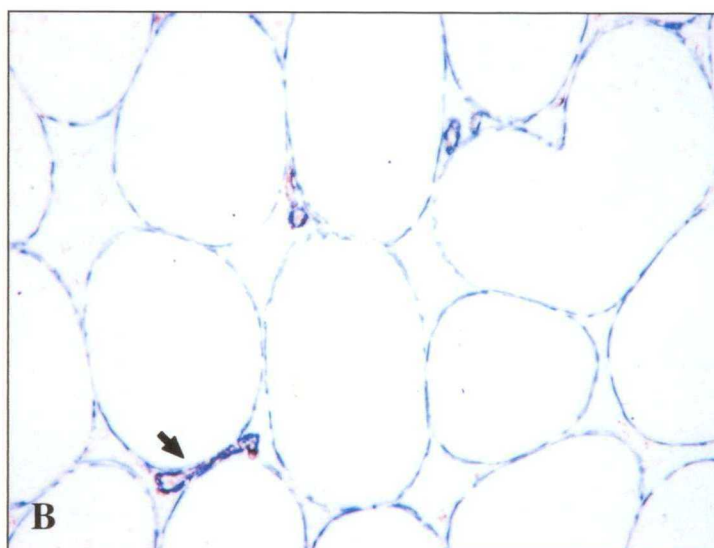
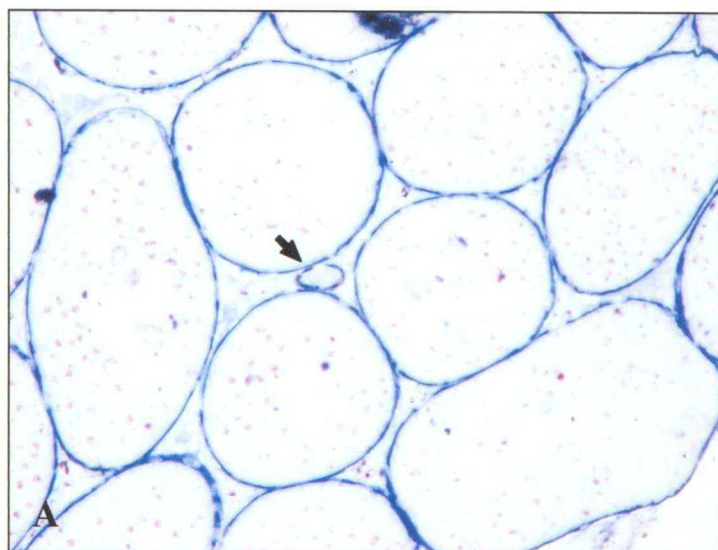


Fig. 16 3週齢の精巣 ; Nestin 及び α -SMA (低倍率)

A : Control 群、B : DES 0.5 群、C : DES 1.5 群

矢印 : Nestin 陽性細胞を持つ血管

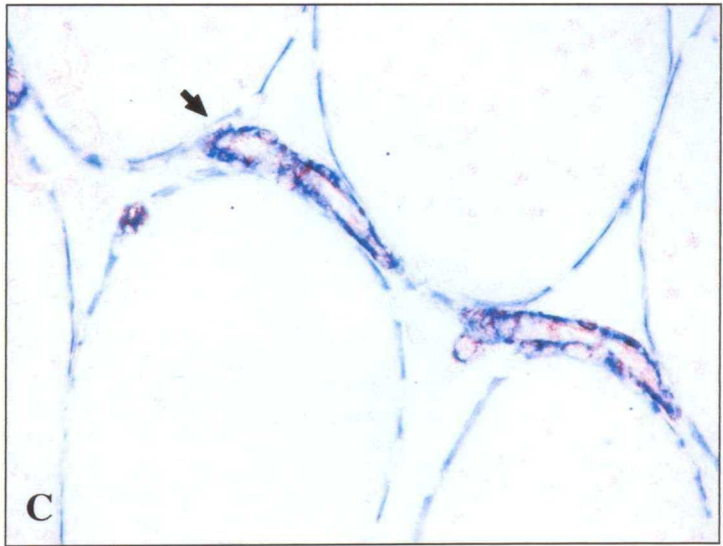
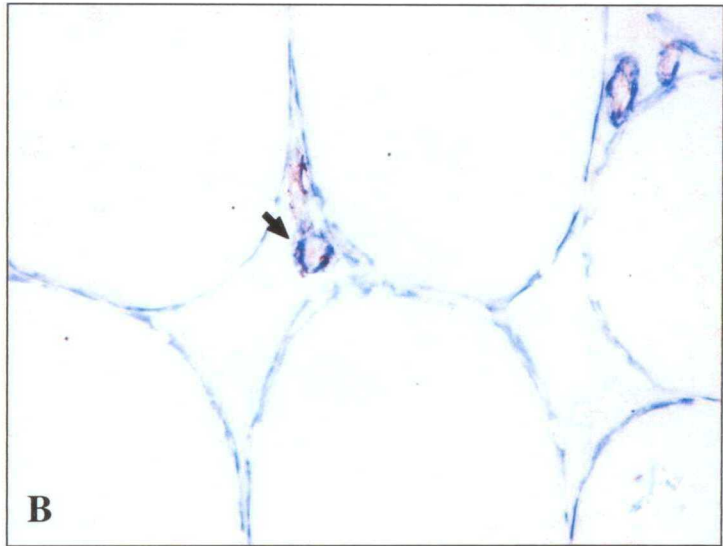
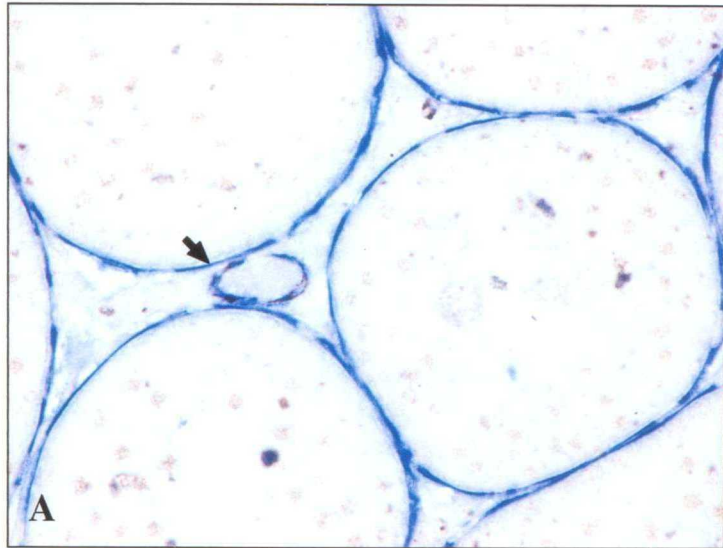


Fig. 17 3週齢の精巣 ; Nestin 及び α -SMA (高倍率)

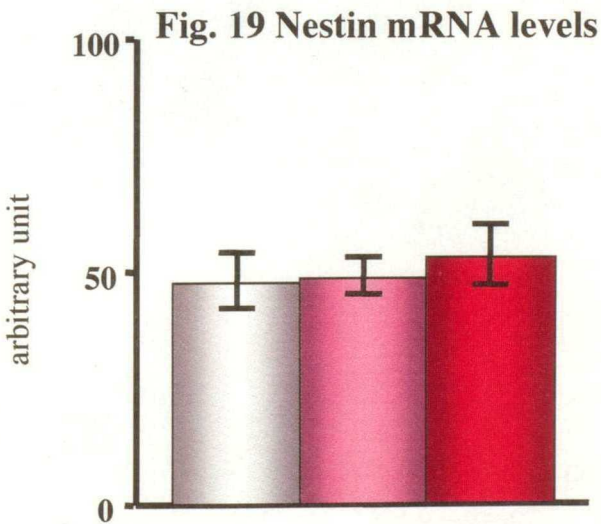
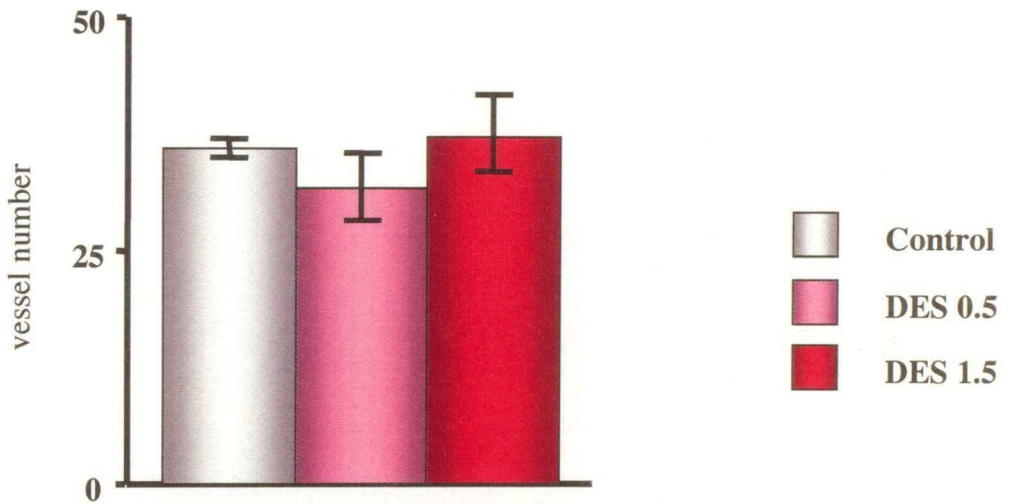
A : Control 群、B : DES 0.5 群、C : DES 1.5 群

矢印 : Nestin 陽性細胞を持つ血管

Table 12 Number of Nestin positive vessel and Nstin mRNA level

group	vessels number ($\times 10^3$ 本/精巢)	Nestin mRNA	
Control	144.0 \pm 4.5	47.6 \pm 6.1	[5]
DES 0.5	126.9 \pm 14.4	48.6 \pm 3.9	[5]
DES 1.5	149.1 \pm 17.1	52.9 \pm 6.4	[5]

Fig. 18 Number of nestin positive vessell



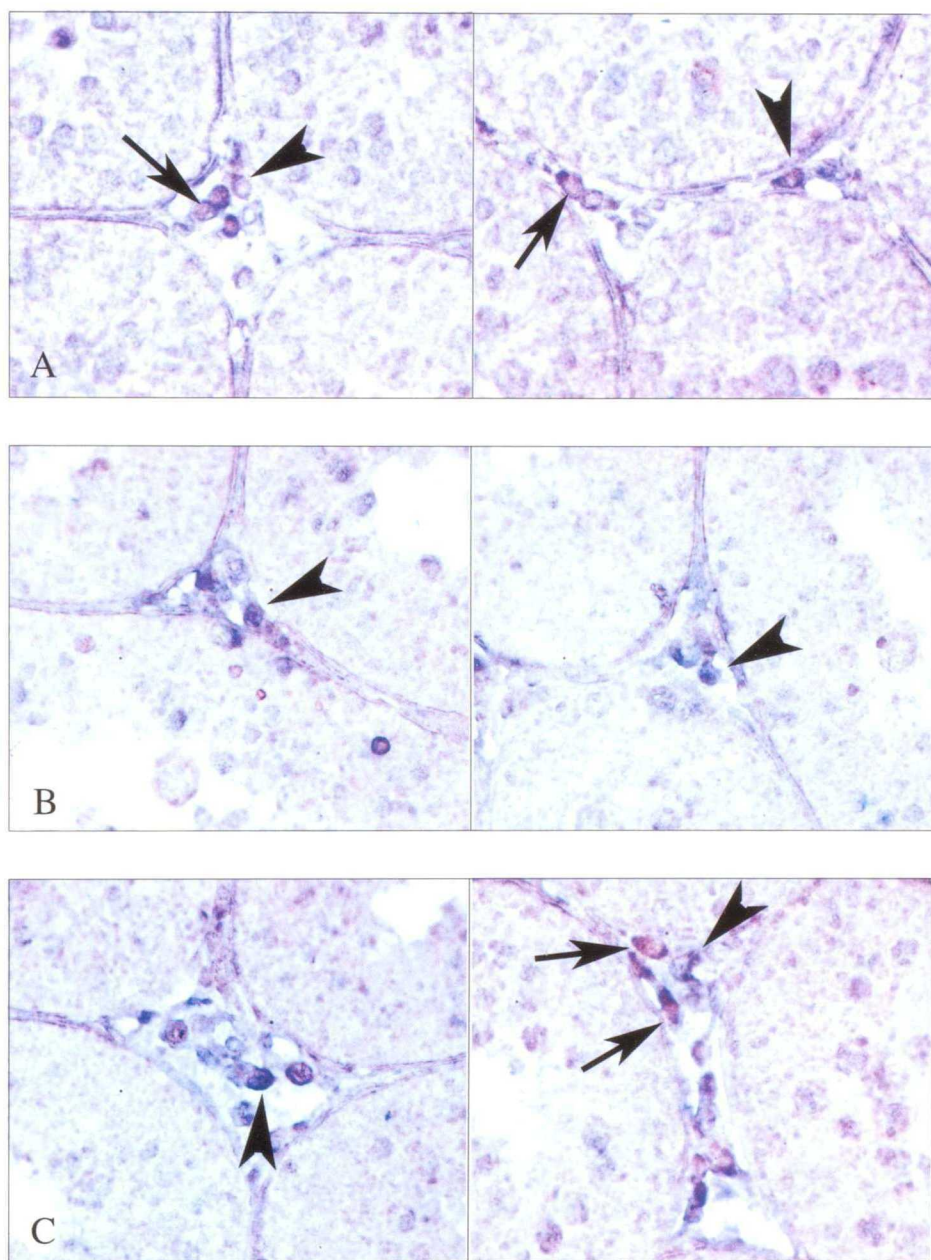


Fig.20 3週齡の精巢 ; P450scc及びPDGRRa (高倍率)

A : Control群、 B : DES 0.5群、 C : DES 1.5群

矢印 : 胎子型ライディッヒ細胞 矢頭 : 成体型ライディッヒ細胞

考察

本章では、胎生期の DES 曝露がライディッチ細胞の分化に及ぼす影響を、免疫組織化学的手法を用いて検討した。その結果、1 週齢の精巣における胎子型ライディッチ細胞の総体積は変化していなかった。胎生期において胎子型ライディッチ細胞の分化の由来についていくつかの説があるが、中腎・間質に局在する線維芽細胞が胎子型ライディッチ細胞の前駆細胞であるという説が最も有力で (Merchant-Larios et al., 1993 : Gautier et al., 1994 : Merchant-Larios and Moreno-Mendoza, 1998)、ラットでは胎齢 18~19 日に胎子型ライディッチ細胞の増殖がピークを迎える (Ziegler et al., 1983)。本研究の第 3 章において、胎生期の DES 曝露が胎子血中のテストステロン濃度を減少させ、またテストステロン減少に反応した下垂体は、LH 分泌を増加させる可能性が示唆された。さらに出産直前に母体に投与した DES は胎盤を通過し、胎子精巣に濃縮されるという報告 (Miller et al., 1982) から、本実験においても DES 群の精巣は通常よりも高いエストロジェンに曝されている可能性が示唆される。胎子型ライディッチ細胞は胎生期に既に LHR、AR、ER α 及び ER β を発現している (Majdic et al., 1996: Majdic et al., 1998: Delbès et al., 2006)。しかし、LH ノックアウト マウスを用いた実験系 (Zhang et al., 2004) 及び断頭した胎子を用いた実験系 (Migrenne et al., 2001) は、LH は胎子型ライディッチ細胞の分化・増殖に関係がないこと、その後の機能分化に関与していることを証明している。AR ノックアウト マウスを用いた実験系 (O'Shaughnessy et al., 2002) は胎子型ライディッチ細胞の増殖には AR が必須要因であることを証明している。また ER α ノックアウト及び ER β ノックアウト マウスを用いた実験系から、胎子型ライディッチ細胞の分化・増殖は ER α では無く ER β の作用を受ける (Migrenne et al.,

2001) ことが報告されているが、結果として胎子型ライディッヒ細胞の分化・増殖に対するホルモンの作用は不明な点が多い (Haider, 2004)。本研究において胎生期の DES 曝露は血中 LH レベルの増加、テストステロンレベルの減少及びエストロジェンレベルの増加を誘発したと考えられたが、これらのホルモンバランスの異常は、胎子型ライディッヒ細胞の増殖・分化を変化させる程ではない可能性が示唆された。

成体型ライディッヒ細胞の分化・増殖はまず前駆細胞が LHR、P450 scc、 3β -HSD 及び P450 17α のタンパクを発現することから開始する。その後扁平であった前駆細胞は小型で円形な形態の新生 (Newly Formed) 成体型ライディッヒ細胞、細胞質内に小滴を多数含む未成熟な成体型ライディッヒ細胞、ステロイドホルモン合成能を有する成体型ライディッヒ細胞へと順次分化し、テストステロン合成を行うことができるようになる (Shan et al., 1993)。Nestin はこの前駆細胞のマーカーとして知られており、これらの前駆細胞は主に精巣間質に局在する血管壁の周皮細胞から分化していると考えられている (Davidoff et al., 2004)。そこで、成体型ライディッヒ細胞の前駆細胞の発現を検討するため、生後 3 週 of 精巣を用いて、Nestin 陽性細胞を持つ血管数を計測し、さらには RT-PCR 法により Nestin mRNA 発現を調べた。その結果、DES 投与は形態学的にも分子生物学的にも前駆細胞の数及び機能を変化させていなかった。LHR 及び AR は前駆細胞から未成熟な成体型ライディッヒ細胞へと分化する過程で発現が増加し、ホルモンに対する感受性が增大することが報告されている (Shan et al., 1995)。さらに LH は新生成体型ライディッヒ細胞以降の分化過程を促進する (Teeds et al., 1989)。著者は本研究に先駆けて、同一の実験デザインでの DES 曝露は、3 週齢の DES 1.5 群の精巣における AR 及び ER α mRNA 発現を増加させ、また両 DES 投与群の血漿 LH

濃度が増加することを明らかにした（投稿中）。またこの血漿 LH 濃度の変化から、両 DES 投与群の血漿テストステロン濃度が低下している可能性が示唆された。従って増加した LH が、両 DES 投与群の成体型ライディッヒ細胞の分化を促進する可能性が存在するものの、テストステロンは減少していると推論されているので、AR を介してテストステロンがライディッヒ細胞の分化を促進することはない。この両者の作用が相殺される事によって、DES は成体型ライディッヒ細胞の分化の進行具合を変化させなかったかも知れない。さらに成体型ライディッヒ細胞の前駆細胞は胎子型ライディッヒ細胞の作用によって調節されていることが報告されている（Haider, 2004）ことから、本章において胎子型ライディッヒ細胞の体積を指標とした増殖・分化に変化がなかったことから、DES 投与は成体型ライディッヒ細胞の増殖・分化へも影響を与えないと考えられる。

以上の結果から、胎生期の DES 曝露は、体積を指標とした胎子型ライディッヒ細胞の増殖と分化を変化させないことが明らかとなった。また、生後 3 週の精巣には胎子型ライディッヒ細胞、及び種々の分化程度にある成体型ライディッヒ細胞（前駆細胞へ分化する血管周皮細胞からある未成熟な段階まで）が混在している。DES はこれらの細胞の比率に影響を与えなかったことから、成体型ライディッヒ細胞の増殖・分化は正常に進行していることが示唆された。本研究において、胎生期の DES 曝露が生後の血漿テストステロン濃度を減少させる要因として、上位中枢への阻害作用を考慮してきた。最後に本章においてライディッヒ細胞自身への DES の影響を検討し、結局 DES は精巣ライディッヒ細胞の増殖・分化へは阻害作用を及ぼさないことを示唆する結果が得られた。エストロゲン作用を有している PCB を本実験と同じ期間妊娠ラットに投与

小括

第3章において、DES曝露が胎子精巣のステロイドホルモン合成能を変化させた可能性が示唆された。精巣でのステロイドホルモン合成を担うライディッヒ細胞はまず、胎子型ライディッヒ細胞として胎齢14～15日頃に分化した後、出生前まで増殖を繰り返し、出生後は徐々に減少する。一方成体型ライディッヒ細胞が生後3週頃から分化し始め、思春期まで活発に増殖する。そこで第4章では、DES曝露が、胎子型ライディッヒ細胞及び成体型ライディッヒ細胞の増殖並びに分化に及ぼす影響を検討した。

DESの投与方法は第1章と同様である。1及び3週齢において雄産子を剖検し、精巣を採取した。精巣の組織切片を作成し、1週齢の精巣を用いて胎子型ライディッヒ細胞の総体積を測定し、3週齢の精巣を用いて成体型ライディッヒ細胞前駆細胞の出現頻度及び胎子型ライディッヒ細胞と成体型ライディッヒ細胞の割合を観察した。

DES曝露は、1週齢の精巣における胎子型ライディッヒ細胞の総体積及び3週齢の精巣における成体型ライディッヒ細胞前駆細胞の出現頻度に影響を及ぼさなかった。3週齢のDES 0.5群の精巣は、胎子型ライディッヒ細胞の割合が減少し、成体型ライディッヒ細胞の割合が増加している傾向が観察された。しかし、過去に行った研究によって3週齢の両DES投与群の血漿LH濃度は増加しており、血漿テストステロン濃度は減少している可能性があること、さらにDES 0.5群のAR mRNAに変化が無いことを明ら

かにしている。これらの変化と、本章の結果を併せて考察すると、DES 0.5 群において成体型ライディッヒ細胞への分化が促進されているとは考えにくい。従って、胎生期の DES 曝露は胎子型ライディッヒ細胞の分化・増殖、及び成体型ライディッヒ細胞への移行に影響を及ぼしていない可能性が示唆された。

総括

Diethylstilbestrol(DES)は英国において開発された合成女性ホルモンである。DES は主にマウスを用いた研究が盛んとなり、そのメカニズムが解明されてきたが、それら実験の多くは高濃度の DES を 1 回から数回投与する実験デザインであった。

著者はこれまでに胎生期の長期間低用量 DES 投与が、雄産子の精巣機能およびその上位中枢に及ぼす影響について検討し、DES は生後の血漿テストステロン濃度を減少させること、精巣ステロイドホルモン合成系酵素の mRNA 発現は低レベルのテストステロンに起因するような変化は無いが、ホルモン合成系でのシグナル伝達が阻害されていることが示唆された。また精巣内の AR 発現が促進されることによって精子形成及び生殖能力は損なわれないこと、LH 濃度の結果から、上位中枢はテストステロンの低下に対応しておらず、正常なフィードバック機構が作用していないことを明らかにした。

そこで本研究は胎生期の低濃度 DES 投与が視床下部-下垂体-精巣系のテストステロン調節メカニズムに与える作用を詳細に検討することを目的とした。

第 1 章

胎生期の DES 曝露がその子供の思春期及び成熟期の視床下部に及ぼす影響

精巣のステロイドホルモン合成は上位中枢の影響を強く受けており、主に視床下部-下垂体-精巣系として作用している。胎生期の DES 曝露は、

思春期及び成熟期の血漿テストステロンレベルを減少させ、上位中枢が、低レベルのテストステロンに充分対応していないことを既に明らかにしている。そこで、第一章では、思春期及び成熟期における視床下部が、DES 曝露によってどのように変化するか検討した。

妊娠 SD ラットを用い、妊娠 7 日から 21 日目の期間、DES を 1.5(DES 1.5 群)あるいは 0.5 μ g/kg(DES 0.5 群) で連続皮下投与した。6 及び 15 週齢において雄産子を剖検し、視床下部を採取した。視床下部における、各種ホルモン合成および調節因子等の mRNA 発現量を半定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。

6 週齢において DES 1.5 群の GnRH、5 α -Reductase 1、ER β 及び GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein)、DES 0.5 群の GnRH 及び ER β の mRNA 発現が変化した。

また 15 週齢において、DES 1.5 群の 5 α -Reductase 1、Aromatase、ER β 、TH(Thyrosine Hydroxylase) 及び μ - Opioid Receptor、DES 0.5 群の 5 α -Reductase 1、ER β 、GFAP 及び μ - Opioid Receptor の mRNA 発現が変化した。

血漿テストステロン濃度が低下していたにもかかわらず、GnRH が増加しなかったことから、DES 投与はフィードバック機構における視床下部の反応性を変化させていること、星状膠細胞は血漿テストステロン濃度に対して正常な反応を起こしている可能性が示唆されたにも関わらず、ER β 、TH 及び μ - Opioid Receptor の結果から、GnRH が増加しなかったのは、ニューロン間のシグナル伝達に変化したことに起因したものである可能性が示唆された。

第 2 章

胎生期の DES 曝露がその子供の思春期及び成熟期の下垂体に

及ぼす影響

第1章の結果から、DES曝露がフィードバック機構における視床下部の反応を変化させた可能性が示唆された。フィードバック機構の視床下部に続く組織である下垂体は、ゴナドトロフが視床下部由来のGnRHに反応して、LHもしくはFSH産生及び分泌を促進する。そこで第2章では、精巣のステロイドホルモン合成を直接コントロールしている下垂体が、DES曝露によってどのように変化するか検討した。

DESの投与方法は第1章と同様である。6及び15週齢において雄産子を剖検し、下垂体を採取した。下垂体における、各種ホルモン合成および調節因子のmRNA発現量を半定量的RT-PCR法を用いて測定した。

6週齢において、DES 1.5群のLH β 、AR、ER α 及びER β 、DES 0.5群のAR、ER α 、ER β 及びnNOSのmRNA発現が変化した。

15週齢においてDES 1.5群のnNOS及びeNOS、DES 0.5群のGnRHr及びeNOSのmRNA発現が変化した。

以上の結果から、胎生期のDES曝露は、下垂体のゴナドトロフにおいて、GnRH-GnRHrによるシグナルが正常に伝達しないために、血漿テストステロン濃度の減少に対する正常なフィードバック反応が起こらず、この変化はNOを介したシグナル伝達の変化及び性ステロイドホルモンに対する感受性の変化に起因している可能性が示唆された。

第3章

胎生期のDES曝露が胎子の精巣に及ぼす影響

これまでの実験から、胎生期のDES曝露は思春期以降の視床下部-下垂体-精巣系の全体に影響を及ぼしている可能性が示唆された。本研究におけるDES曝露は、器官形成期から出生までの長期間にわたっている。この時期は、精巣が機能分化し、ステロイドホルモン合成が開始される

時期に相当し、胎子は DES という過剰なエストロジェンに曝露されていることになる。そのため DES はまず精巣機能に大きな影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで第 3 章では、DES 曝露が胎子の精巣に及ぼす影響を検討した。

妊娠 SD ラットを用い、妊娠 7 日から 20 日目の期間、DES を皮下に連日単回投与した。投与量は第 1 章及び第 2 章と同様である。胎齢 20 日に帝王切開によって取り出した雄胎子を剖検し、精巣を採取した。精巣における各種ホルモン合成および調節因子の mRNA 発現量を、半定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。

両 DES 群の 5 α -Reductase 1 の mRNA 発現量が Control 群と比較して有意に増加した。DES 1.5 群の LHR の mRNA 発現量が Control 群の発現量と比較して有意に増加した。DES 0.5 群の P450 scc の mRNA 発現量が Control 群と比較して有意に減少した。

以上の結果から、5 α -Reductase 1 発現が増加していたのは、外生殖器の正常な雄性化を進行するために、よりホルモン活性の高い Dehydrotestosterone への変換が促進されたことを意味し、DES 曝露が胎子の精巣テストステロン合成能を低下させた可能性が示唆された。

第 4 章

胎生期 DES 曝露がライディッチ細胞の増殖並びに分化へ及ぼす影響

第 3 章において、DES 曝露が胎子精巣のステロイドホルモン合成能を変化させた可能性が示唆された。精巣でのステロイドホルモン合成を担うライディッチ細胞はまず、胎子型ライディッチ細胞として胎齢 14~15 日頃に分化した後、出生前まで増殖を繰り返し、出生後は徐々に減少する。一方成体型ライディッチ細胞が生後 3 週間頃から分化し始め、思春期

まで活発に増殖する。そこで第4章では、DES曝露が、胎子型ライディッヒ細胞及び成体型ライディッヒ細胞の増殖並びに分化に及ぼす影響を検討した。

DESの投与方法は第1章と同様である。1及び3週齢において雄産子を剖検し、精巣を採取した。精巣の組織切片を作成し、1週齢の精巣を用いて胎子型ライディッヒ細胞の総体積を測定し、3週齢の精巣を用いて成体型ライディッヒ細胞前駆細胞の出現頻度及び胎子型ライディッヒ細胞と成体型ライディッヒ細胞の割合を観察した。

DES曝露は、1週齢の精巣における胎子型ライディッヒ細胞の総体積及び3週齢の精巣における成体型ライディッヒ細胞前駆細胞の出現頻度に影響を及ぼさなかった。3週齢のDES 0.5群の精巣は、胎子型ライディッヒ細胞の割合が減少し、成体型ライディッヒ細胞の割合が増加している傾向が観察された。しかし、過去に行った研究によって3週齢の両DES投与群の血漿LH濃度は増加しており、血漿テストステロン濃度は減少している可能性があること、さらにDES 0.5群のAR mRNAに変化が無いことを明らかにしている。これらの変化と、本章の結果を併せて考察すると、DES 0.5群において成体型ライディッヒ細胞への分化が促進されているとは考えにくい。従って、胎生期のDES曝露は胎子型ライディッヒ細胞の分化・増殖、及び成体型ライディッヒ細胞への移行に影響を及ぼしていない可能性が示唆された。

以上本研究の結果から、胎生期のDES曝露は(1)視床下部のニューロン間のシグナル伝達を阻害することにより、フィードバック機構における視床下部の反応性を変化させていること、(2)下垂体のゴナドトロフにおいて、GnRH-GnRHrによるシグナルが正常に伝達しない為に、血漿テストステロン濃度減少に対する正常なフィードバック反応が起こらず、

この変化は NO を介したシグナル伝達の変化に起因していること、(3)胎
子精巣テストステロン合成能を低下させる、(4) 生後の胎子型ライディ
ッヒ細胞の発達及び成体型ライディッヒ細胞への移行には影響を及ぼし
ていないことなどが示唆された。従って、胎生期における低用量 DES
曝露は胎子精巣内分泌機能を阻害し、思春期にその上位中枢が変化し、
結果として視床下部-下垂体-精巣系フィードバック機構を抑制的に変化
させる経時的なメカニズムが明らかとなった。尚、本研究で実施した全
ての実験は、麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づい
て行った。

この論文は、麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

った。麻布大学動物実験指針（2007年6月20日制定）に基づいて行

謝辞

本研究の遂行及び本論文の作成にあたり、終始懇切丁寧なご指導 ご鞭撻を賜りました麻布大学 獣医学部 解剖学第二研究室 山本 雅子教授に深甚なる感謝の意を表します。

並びに本論文の作成にあたり、絶え間ざるご指導及び様々なご支援を賜りました、麻布大学 獣医学部 解剖学第二研究室 有嶋 和義 教授、同研究室 坂上 元栄 講師に心より感謝致します。

本研究の遂行に多大なご支援を頂きました、麻布大学 獣医学部 薬理学研究室 白井 明志 准教授に心より感謝致します。

本論文のとりまとめに関して、ご高閲及び貴重なご意見を頂きました麻布大学 獣医学部 介在動物学研究室 太田 光明 教授ならびに麻布大学 獣医学部 動物工学研究室 滝澤 達也 教授に心より感謝致します。

本研究の遂行及び本論文の作成にあたり、多大なるご支援及び良き話し相手として恩恵を賜りました、解剖学第二研究室 有嶋 貴義 先輩、橋本 知水 院生、多方 章吾 院生を始めとした研究室生 39 人に心より感謝致します。

長年私の学費を払い続け、帰省した際には一緒に酒を酌み交わし、研究の相談に乗ってくれた父 徹治、常に体調を気遣い連絡をくれた母 葉子に心より感謝致します。また良き晩酌相手の兄 治嘉、常に笑わせてくれた妹 美菜子、心を和ませてくれた花子・プーコをはじめとした小林家の動物達に感謝致します。

最後に本研究の遂行にあたり、使用されたラットに心から感謝致します。

Abdelgadir S.E., Resko J.A., Ojeda S.R., Lephart E.D., McPhaul M.J., Roselli C.E.

Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain.

Endocrinology. 135(1):395-401,1994

Almstrup K., Fernández M.F., Petersen J.H., Olea N., Skakkebaek N.E., Leffers H.

Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves.

Environ. Health. Perspect. 110(8) : 743-748, 2002

An B.S., Choi J.H., Choi K.C., Leung P.C.K.

Differential role of progesterone receptor isoform in the transcriptional regulation of human gonadotropin-releasing hormone (GnRH I) receptor, GnRH I, and GnRH II.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 90 ; 1106-1113,2005

Ariyaratne H.B.S., Handagama S.M.L.C.M., Hales D.B., Mason J.I.

Studies on the onset of leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis.

Biol. Reprod. 63 : 165-171, 2000

Becü V.D., González I.A., Díaz T.G., Hockl P., Libertun C.

Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat.

Cell. Mol. Neurobiol. 17(6) : 699-715,1997

Beyer C., Green S.J., Hutchison J.B.

Androgens influence sexual differentiation of embryonic mouse hypothalamic aromatase neurons in vitro.

Endocrinology. 135 : 1220-1226,1994.

Bhat G.K., Mahesh V.B., ping L., Chorich L., Wiedmeier V.T., Brann D.W.

Opioid - glutamate - nitric oxide connection in the regulation of luteinizing

hormone secretion in the rat.

Endocrinology. 139 : 955-960,1998

Brown P., McNeilly A.S.

Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes.

Rev. Reprod. 4 : 117 - 124, 1999

Caballero H.Z., Franco F.S., Perez N.G., Mendez C.F., Vazquez G.F.

Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene Expression During Pubertal developmental of female rats.

Biol. Reprod. 70(2) : 348-55, 2004.

Cederroth C.R., Schaad O., Descombes P., Chambon P., Vassalli J.D., Nef S.

Estrogen receptor alpha is a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism.

Endocrinology. 148 : 5507-19, 2007

Cheng C.K., Chow B.K.C., Leung P.C.K.

An activator protein 1-like motif mediates 17 β -estradiol repression of gonadotropin-releasing hormone receptor promoter via estrogen receptor α -dependent mechanism, in ovarian and breast cancer cells.

Mol. Endocrinol., 17 : 2613 - 2629, 2003

Dallies G., Lezacher C., Habert R.

Colin I.M., Dantoin A.C.B., Sundaresan S., Kopp P., Jameson J.L.

Sexually dimorphic transcriptional responses to gonadotropin-releasing hormone require chronic in vivo exposure to estradiol.

Endocrinology. 137 : 2300 - 2307, 1996

Estrogen and androgen interactions: implications for the brain

Crowder M.E., Nett T.M.

Pituitary content of gonadotropins and receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic content of GnRH during the periovulatory

period of the ewe.

Endocrinology. 114 : 234 - 239, 1984

Curtin D., Jenkins S., Farmer N., Anderson A.C., Haisenleder D.J., Rissman E., Elizabeth M. Wilson E.M., Margaret A. Shupnik M.A.

Androgen Suppression of GnRH-Stimulated Rat LH β Gene Transcription Occurs Through Sp1 Sites in the Distal GnRH-Responsive Promoter Region.

Mol. Endocrinol. 15(1) : 1906 - 1917, 2001

Davidoff M.S., Middendorff R., Enikolopov G., Riethmacher D., Holstein A.F., Iler D.M.

Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed.

J. Cell Biology 167(5) : 935-944, 2004

Delbès G., Duquenne C., Szenker J., Taccoen J., Habert R., Levacher C.

Developmental Changes in Testicular Sensitivity to Estrogens throughout Fetal and Neonatal Life.

Toxicol. Sci., 99 : 234 - 243, 2007

Delbès G., Levacher C., Duquenne C., Racine C., Pakarinen P., Habert R.

Endogenous Estrogens Inhibit Mouse Fetal Leydig Cell Development via Estrogen Receptor {alpha}.

Endocrinology. 146: : 2454 - 2461, 2005

Delbès G., Levacher C., Habert R.

Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development.

Reproduction, 132 : 527 - 538, 2006

Dhamdapani K.M., Brann D.W.

Estrogen - astrocyte interactions : Implications for neuroprotection.

BMC Neuroscience 3 : 6-9, 2002

Eguchi Y., Arishima K., Nasu T., Nasu T., Toda M., Moriyama Y., Hashimoto Y.

Development of the fetal pituitary - testicular system based on observation of leydig cells in enphalectomized hypophysectomized and control fetal rats.

Anat. Rec. 190 : 679-685, 1978

Fabre V.R., Carmona S., Merhi R.A., Cate R., Habert R., Vigier B.

Effect of Anti-Mullerian Hormone on sertoli and leydig cell functions in fetal and immature rats.

Endocrinology., 139 : 1213 - 1220, 1998

Faletti A.G., Mastronardi C.A., Lomniczi A., Seilicovich A., Gimeno M., McCann S.M., Rettori V.

β -endorphin blocks luteinizing hormone - releasing hormone release by inhibiting the nitricoxidergic pathway controlling its release.

Proc. Natl. Acad. Sci., 96 : 1722-1726,1999

Fisher J.S., Millar M.R., Majdic G., Saunders P.T., Fraser H.M., Sharpe R.M.
Immunolocalisation of oestrogen receptor - alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood.

J. Endocrinol. 153 : 485-495,1997

Garrel G., Lerrant Y., Sirostics C., Bérault A., Magre S., Bouchaud C., Counis R.

Evidence that gonadotropin - releasing hormones stimulates gene expression and levels of active nitric oxide synthase type 1 in pituitary gonadotroph, a process altered by desensitization and, indirectly, by gonadal steroids.

Endocrinology. 139 : 2163-2170, 1998

Gautier C., Levacher C., Avallet O., Vigier M., Rouiller-Fabre R., Lecerf L., Saez J., Habert R.

Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in the

fetal and neonatal rat testis.

Mol. Cell. Endocrinol. 99(1) : 55-61, 1994

Gaytan F., Bellido C., Aguilar R., Morales C., van Rooijen, N., Aguilar E.
Role of the testis in the response of the pituitary-testicular axis to nitric oxide-related agents.

Eur. J. Endocrinol. 137 : 301 - 308, 1997

Ge R.S., Dong Q., Sottas C.M., Papadopoulos V., Zirkin B.R., Hardy M.P.
In search of rat stem Leydig cells: Identification, isolation, and lineage-specific development.

Proc. Natl. Acad. Sci., 103(8) : 2719-2724, 2006

Gehami F.E., Zhang F.P., Pakarinen P., Rannikko A., Huhtaniemi I.
Gonadotropin - independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis.
Biol. Reprod. 58 : 116-123 1998

Gerge G., Kuiper M., Carlsson B.O., Grandien K., Enmark E., Hggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A.
Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor α and β .

Endocrinology, 138 : 863-870, 1997

Goetz R.M., Thatte H.S., Prabhakar P., Cho M.R., Michel T., Golan D.E.
Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase.

Proc. Natl. Acad. Sci., 96: 2788-2793, 1999

Gould M.L., Hurst P.R., Nicholson H.D.

The effects of oestrogen receptors α and β on testicular cell number and steroidogenesis in mice.

Reproduction 134 : 271 - 279., 2007

Goyal H.O., Robateau A., Braden B.D., Williams C.S., Srivastava K.K., Ali K.
Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at
adulthood.

Biol. Reprod. 68 : 2081 - 2091 2003

Guyot R., Odet F., Leduque P., forest M.G., Battistoni L.M.B.

Diethylstilbestrol inhibits the expression of the steroidogenic acute regulatory
protein in mouse fetal testis.

Mol. Cell. Endocrinol. 220(1-2) : 67-75, 2004

Haavisto T.E., Adamsson N., Myllymki S.A., Toppari J., Paranko J.

Effects of 4-tert-octylphenol, 4-tert-butylphenol, and diethylstilbestrol on
prenatal testosterone surge in the rat.

Reprod. Toxicol. 17(5) : 593-605, 2003

Habert R., Pikon R.

Control of testicular steroidogenesis in foetal rat : effect of decapitation on
testosterone and plasma luteinizing hormone - like activity.

Acta Endocrinol. 99 : 466-473, 1982

Habert R., Pikon R.

Testosterone, dihydrotestosterone and 17 β -estradiol in maternal and fetal
plasma and fetal testes in the rat.

J. Steroid. Biochem., 21(2) : 193-198 1984

Haider S.G.

Cell Biology of Leydig Cells in the Testis.

Int. Rev. Cytol. 233 : 181-241, 2004

Haider S.G., Passia D., Overmeyer G.

Studies on the fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3
beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity.

Acta Histochem. Suppl. 32 : 197-202, 1986

Handagama S.M.L.C.M., Ariyaratne H.B.S.

Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis.

Biol. Reprod. 65 : 660 - 671, 2001

Handagama S.M.L.C.M., Ariyaratne H.B.S., Manen K.R.T.V., Haupt R.L.

Differentiation of Adult Leydig Cells in the Neonatal Rat Testis Is Arrested by Hypothyroidism.

Biol. Reprod. 59 : 351 - 357, 1998

Hefnawy T.E., Huhtaniemi I.

Progesterone can participate in down-regulation of the luteinizing hormone receptor gene expression and function in cultured murine Leydig cells.

Mol. Cell. Endocrinol. 127(2) : 127-138 1998

Kaiser U.B., Jakubowiak A., Steinberger A., Chin W.W.

Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro.

Endocrinology 133 : 931 - 934, 1993

Kakar S.S., Grantham K., Musgrove L.C., Devor D., Sellers J.C., Ne J.D.

Rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: tissue expression and hormonal regulation of its mRNA.

Mol. Cell. Endocrinol. 101(1-2) : 151-157, 1994

Kamel F., Krey L.C.

Gonadal steroid modulation of LHRH - stimulated LH secretion by pituitary cell cultures.

Mol. Cell. Endocrinol. 26(1-2) : 151-164, 1982

Karolczak M., Kipper E., Beyer C.

Developmental expression and regulation of aromatase- and 5 α -reductase type

1 mRNA in the male and female mouse hypothalamus.

J. Neuro. Endocrinol., 10(4) : 267- 274, 1998

Kawakami S., Winters S.J.

Redulation of luteinizing hormone secretion and subunit messenger ribonucleic acid expression by gonadal steroids in perfused pituitary cells from male monkeys and rats.

Endocrinology 140 : 3587-3593, 1999

Kiesel L., Catt K.J.

Phosphatidic acid and the calcium - dependent actions of gonadotropin - releasing hormone in pituitary gonadotrophs.

Arch. Biochem. Biophys. 231(1) : 202-210, 1984

Kinch R.A.

Diethylstilbestrol:risks of malignant disease and congenital malformation.

Canad. Med. Association Journal, Rev. 120(12) : 1483-1484, 1979

Kuopio T., Tapanainen J., Pelliniemi L.J., Huhtaniemi I.

Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats.

Development 107 : 213-220, 1989

Lakkakorpi J.T., Rajaniemi H.J.

Regulation of intracellular free Ca²⁺ by the LH/CG receptor in an established cell line 293 expressing transfected rat receptor.

Mol. Cell. Endocrinol. 99(1) : 39-47, 1994

Lasserguere J., Liverra G., Habart R., Jogau B.,

Time- and Dose-Related Effects of Estradiol and Diethylstilbestrol on the Morphology and Function of the Fetal Rat Testis in Culture.

Toxicol. Sci. 73 : 160-169, 2003

Lejeune H., Habart R., Saez J.M.

Origin, proliferation, and differentiation of leydig cells.

J. Mol. Endocrinol. 20 : 1-25, 1998

Limonta P., Moretti P.M., Marelli M.M., Motta M.

The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans.

Front. Neuroendocrinol., 24(4) : 279-295, 2003

Lording D.W. and Kretser D.M.D.

Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development.

J. Reprod. Fertil. 29 : 261 - 269, 1972

Lozach A., Garrel G., Lerrant Y., Counis A.B.R.

GnRH-dependent up-regulation of nitric oxide synthase I level in pituitary gonadotrophs mediates cGMP elevation during rat proestrus.

Mol. Cell. Endocrinol. 143(1-2) : 43-51, 1998

Lumpkin M.D., McCann S.M.

Effect of destruction of the dorsal anterior hypothalamus on follicle-stimulating hormone secretion in the rat.

Endocrinology 115: 2473 - 2480, 1984

MacLusky E.D., Naftolin F.

Sexual differentiation of the central nervous systems.

Science 211 : 1294-1302, 1981

Majdic G., Millar, M.R., Saunders P.T.

Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts.

J. Endocrinol. 147 : 285 - 293, 1996

Majdic G., Saunders P.T., Teerds K.J.

Immunoexpressions of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 alpha- hydroxylase, C17, 20 lyase and receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of leydig cell steroid production is independent of LH action.

Biol. Reprod. 58(2) : 520-5, 1998

Majdic G., Sharpe R.M., O'Shaughnessy P.J., Saunders P.T.

Expression of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to exogenous estrogens.

Endocrinology 137 : 1063 - 1070, 1996

Marsh J.M.

The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis.

Biol. Reprod. 14 : 30-53, 1976

Martinez G., Galo F., Choi A.L., Weiner R.I.

Dopaminergic regulation of the GT1 gonadotropin - releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines : stimulation of GnRH release via D1 - receptors positively coupled to adenylylate cyclase.

Endocrinology. 131 : 2965-2,971,1992

Matagne V., Rasier G., Lebrethon M.C., Gérard A., Bourguignon J.P.

Estradiol Stimulation of Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion in Vitro: Correlation with Perinatal Exposure to Sex Steroids and Induction of Sexual Precocity in Vivo.

Endocrinology. 145: 2775 - 2783, 2004

McGivern R.F., Handa R.J, Redei E.

Decreased postnatal testosterone surge in male rats exposed to ethanol during the last week of gestation.

Alcohol. Clin. Exp.Res. 17(6) : 1215-1222, 1993

McKinnell C., Atanassova N., Williams K., Fisher J.S., Walker M., Turner

K.J., Saunders T.K., Sharpe R.M.

Suppression of androgen action and the induction of gross abnormalities of the reproductive tract in male rats treated neonatally with diethylstilbestrol.

J. Androl. 22(2) : 323-338 2001

Melcangi R.C., Galbiati M., Messi E., Magnaghi V., Cavarretta I., Riva M.A., Zanisi M.

Astrocyte - neuron interaction in vitro : role of growth factors and steroids on LHRH dynamics.

Brain Res. Bull. 44 (4) : 465-469, 1997

Merchant-Larios H., Moreno-Mendoza N.

Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis.

Exp. Cell. Res. 244(1) : 230-8., 1998

Merchant-Larios H., Moreno-Mendoza N., Buehr M.

The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis.

Int. J. Dev. Biol. 37 : 407 - 415, 1993

Mertinez P.C., Igrasias M.J.G., Estrada M.C.F., Moral A.M.B., Alvarez J.E., Díez A.E.

Effects of in-utero exposure to zeranol or diethylstilboestrol on morphological development of the fetal testis in mice.

J. Comp. Pathol. 114 : 407-418, 1996

Migrenne S., Pairault C., Racine C., Liveral G., Ge ´loso A., Habert R.

Luteinizing hormone-dependent activity and luteinizing hormone-independent differentiation of rat fetal Leydig cells.

Mol. Cell. Endocrinol. 172 : 193–202, 2001

Mikkil T.F., Toppari J., Paranko J.

Effects of neonatal exposure to 4- tert - octylphenol, diethylstilbestrol, and flutamide on steroidogenesis in infantile rat testis.

Toxicol. Sci. 91(2) : 456-66, 2006

Miller R.K., Heckmann M.E., McKenzie R.C.

Diethylstilbestrol : placental transfer, metabolism, covalent binding and fetal distribution in the wistar rat.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 220(2) : 358-365, 1982

Moore R.T.S., Schwartz N.B., Duncan J.A., Marshall J.C.

Pituitary gonadotropin - releasing hormone receptors during the rat estrous cycle.

Science 209 : 942-944, 1980

Moretti R.M., Marelli M.M., Motta M.

The biology of gonadotropin hormone - releasing hormone : role in the control of tumor growth and progression in humans.

Front. Neuroendocrinol. 24(4) : 279-295, 2003

Morris C.H.T., Knox G., Luna S., Dufau M.L.

Acquisition of estradiol-mediated regulatory mechanism of steroidogenesis in cultured fetal rat Leydig cells.

J. Biol. Chem. 261 : 3471 - 3474, 1986

Murphy L., Jeffcoate I.A., O'Shaughnessy P.J.

Abnormal Leydig cell development at puberty in the androgen-resistant Tfm mouse.

Endocrinology 135 : 1372 - 1377, 1994

Nishihara E., Nagayama Y., Inoue S., Hiroi H., Murakami., Yamashita S., Koji T.

Ontogenic changes in the expression of estrogen receptor α and β in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry.

Endocrinology. 141(2) ; 615-620,2000

O'Donnell L., Robertson K.M., Jones M.E., Simpson E.R.

Estrogen and Spermatogenesis.

Endocrine Rev. 22(3) : 289-318 2001

O'Shaughnessy P.J., Johnston H., Willerton L., Baker P.J.

Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice.

J. Cell. Sci. 115 : 3491-3496., 2002

Olsen C.M., Meussen-Elhorm E.T.M., Hong slo J.K., Stenersen J., Tollefsen K.E.

Estrogenic effects of environmental chemicals: An interspecies comparison.

Comp.Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.141 : 267-274, 2005

Ozawa H.

Steroid hormone their receptors and neuroendocrione system

J. Nippon Med. Sci. 72(6) : 316-325,2006

Pasqualini C., Guivarc'h D., Boxberg Y.V., Nothias F., Vincent J.D., Vernier P.

Stage- and Region- specific expression of estrogen receptor α isoform during ontogeny of the pituitary gland.

Endocrinology. 140 (6) ; 2781-2789, 1999

Paul S.J., Ortolano G.A., Haisenleder D.J., Stewart J.M., Shupnik M.A., Marshall J.C.

Gonadotropin subunit messenger RNA concentrations after blockade of gonadotropin-releasing hormone action: testosterone selectively increases follicle-stimulating hormone beta-subunit messenger RNA by posttranscriptional mechanisms.

Mol. Endocrinol. 4 : 1943 - 1955, 1990

Poletti A., Martin L.O

Androgen-activating enzymes in the central nervous systems.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. Rev. 69(1-6) : 117-122, 1999

Pratis K., O'Donnell L., Ooi G.T., Stanton P.G., McLachlan R.I., Robertson D.M.

Differential regulation of rat testicular 5 α -reductase type 1 and 2 isoforms by testosterone and FSH.

J. Endocrinol. 176 : 393 - 403, 2003

Revskey S., Halasz I., Redei E.

Corticotropin - releasing hormone and propiomelanocortin gene expression is altered selectively in the male rat fetal thymus by maternal alcohol consumption.

Endocrinology. 138 : 389-396, 1997

Richardson H,N,m Gore A.C., Venier J. Romeo R.D., Sisk C.L.

Increased expression of forebrain GnRH mRNA and change in testosterone negative feedback following pubertal maturation.

Mol. Cell. Endocrinol. 214 : 63-70, 2004

Roselli C.E. and Resko J.A.

Androgens regulate brain aromatase activity in adult male rats through a receptor mechanism.

Endocrinology. 114 : 2183-2189, 1984

Savu L, Benassayag C, Vallette G, Nunez EA.

Ligand properties of diethylstilbestrol: studies with purified native and fatty acid-free rat alpha 1-fetoprotein and albumin.

Steroids 1979 34(7):737-748.

Savu L., Benassayag C., Vallette G., Christeff N., Nuez E.
Mouse α_1 - Fetoprotein and Albumine.

J. Biol. Chem. 256(18) : 9414-9418, 1981

Segura L.M.G., Naftolin F., Hutchison J.B., Azcoitia i., Chowen J.A.
Role of astroglia in estrogenregulation of synaptic plasticity and brain repair.

J. Neuroendocrinol. 40(4) : 574-584, 1999

Segura L.M.G., Suarez I, Segovia S, Tranque P.A, Cales J.M, Aguilera P,
Olmos G, Guillamon A.

The distribution of glial fibrillary acidic protein in the adult rat brain is influenced by the neonatal levels of sex steroids.

Brain Res. 456 : 357-363, 1988

Sempere M.T., Navarro J., Pinilla L., Gonzalez L.C., Huhtaniemi I., E Aguilar E.

Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor alpha and beta mRNA expression in rat testis during postnatal development.

J. Endocrinol. 165: 345 - 357 2000

Shan L., Hardy D.O., Catterall J.F., Hardy M.P.

Effects of luteinizing hormone (LH) and androgen on steady state levels of messenger ribonucleic acid for LH receptors, androgen receptors, and steroidogenic enzymes in rat Leydig cell progenitors in vivo.

Endocrinology 136 : 1686 - 1693, 1995

Shan L.X., Phillips D.M., Bardin C.W., Hardy M.P.

Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells.

Endocrinology. 133 : 2277 - 2283, 1993

Sharpe R.M., Rivas A., Walker M., McKinnell C., Fisher J.S.

Effects of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental)

oestrigen, or with a GnRH antagonist, on leydig cell development and function through puberty into adulthood.

Int. J. Androl. 26 : 26-36, 2003

Shupnik M.A.

Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin - releasing hormone.

Biol. Reprod. 54 : 279-286, 1996

Song C.W., Qian Y., Sun X., Negishi M.

Cellular localization and regulation of expression of testicular estrogen sulfotransferase.

Endocrinology 138 : 5006-5012, 1997

Stefano B., Mitchell V., Beauvillain J.C.

μ -opioid receptor mRNA expression in neuronal nitric oxide synthase - immunopositive preoptic area neuron.

Mol. Brain Res. 80 : 46-52, 2000

Tapanainen J., Kupio L., Pelliniemi L.J., Huhtaniemi L.

Rat testicular endogenous steroids and number of leydig cells between the fetal period and sexual maturity.

Biol. Reprod. 31 : 1027-1035, 1984

Teeds K.J., Closser J., Rommers F.F.G., De Rooji D.G., Stocco D.M.,

Colenbrander B., Wensing C.J.G., Hennen G.

Effects of pure FSH and LH preparations on the number and function of leydig cells in immature hypophysectomized rats.

J. Endocrinol. 120 : 97-106, 1989

Tobin V.A., Canny B.J.

Testosterone regulates gonadotropin - releasing hormone - induced calcium signal in male rat gonadotrophs.

Endocrinology. 137(4) : 1299-1305, 1996

Tong M. H., Christenson L. K., and Song W.-C.

Aberrant Cholesterol Transport and Impaired Steroidogenesis in Leydig Cells Lacking Estrogen Sulfotransferase.

Endocrinology. 145 : 2487 - 2497, 2004

Traina M.E., Rescia M. Urbani E., Mantovani A., Marci C., Ricciadri C., Stazi A.V. Fazzi P., Cordelli E., Eleuteri P., Leter G., Spano M.

Long - lasting effects of lindane on mouse spermatogenesis induced by in utero exposure.

Reprod. Toxicol. 17 (1) : 25-35, 2003

Tsumori M., Murakami Y., Koshimura K., Kato Y.

Growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone stimulate nitric oxide production in 17 β -estradiol-primed rat anterior pituitary cells.

Endocrine. 17(3) : 215-218, 2002

Warren D.W., Haltmeyer G.C., Eik-nes K.B.

Testosterone in the fetal rat testis.

Biol. Reprod., 8 : 560-565,1973

Weissman B.A., Niu E., Ge R., Sottas C.M., Holmes M., Hutson J.C., Hardy M.P.

Paracrine Modulation of Androgen Synthesis in Rat Leydig Cells by Nitric Oxide.

J. Androl. 26(3) : 369-78, 2005

Weisz J. and Ward I.L.

Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring.

Endocrinology. 106 : 306-316, 1980

Williams K., McKinnell C., Saunders P.T.K., Walker M., Fisher J.S., Turner K.J., Atanassova N., Sharpe R.M.

Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat : evidence for importance of androgen - oestrogen balance and assesment of the relevance to man.

Hum. Reprod. Update 7 : 236-247, 2001

Witkin W., Ferin M., Popilskis S.J., Silverman A.J.

Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkeys : synaptic input and glial apposition.

Endocrinology. 129 : 1083-1092,1991

Wollemann M. and Benyhe S.

Non - opioid actions of opioid peptides.

Life Sciences 75(3) : 257-270, 2004

Wu X., Wan S., Lee M.M.

Key factors in the regulation of fetal and postnatal leydig cell development.

J. Cell. Physiol. 213 : 429-433, 2007

Yamamoto M.,Narita A., Kagohata M., Shirai M.,Akahori F., Arishima K.

Effects of maternal exposure to 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB126) or 3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB169) on testicular steroidogenesis and spermatogenesis in male offspring rats.

J.Androl. 26(2) : 205-214, 2005.

Yamamoto,M., Shirai,M., Sugita,K., Nagai,N., Miura,Y., Mogi,R., Yamamoto,K., Tamura,A., Arishima,K.

Effect of maternal exposure to diethylstilbestrol on the development of the reproductive system and thyroid function in male and female rat offspring.

J. Toxicol.Sci., 28(5):385-394, 2003.

Yamamoto,M., Shirai,M., Tamura,A., Kobayashi,T., Kohara,S, Murakami,M.
& Arishima,K.

Effects of maternal exposure to a low dose of diethylstilbestrol on sexual dimorphic nucleus volume and male reproductive system in rat offspring.

J. Toxicol.Sci., 30(1):7-18, 2005.

Yashwanth R., Rama S., Anbalagan M., Rao A.J.

Role of estrogen in regulation of cellular differentiation : A study using human placental and rat Leydig cells.

Mol. Cell. Endocrinol. 246(1-2) : 114-20, 2006

Yasin M., Dalkin A.C., Haisenleder D.J., Kerrigan J.R., Marshall J.C.

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse pattern regulates GnRH receptor gene expression: augmentation by estradiol.

Endocrinology., 136 ; 1559-1564, 1995

Yu W.H., Walczewska A., Karanth S., McCann S.M.

Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland.

Endocrinology. 138 : 5055-5058, 1997

Zhang F.P., Pakarainen T., Zhu F., Poutanen M., Huhtaniemi I.

Molecular Characterization of Postnatal Development of Testicular Steroidogenesis in Luteinizing Hormone Receptor Knockout Mice.

Endocrinology 145 : 1453 - 1463, 2004

Ziegler H.G., Haider S.G., Passia D., Hilscher W.

Enzymohistochemical and morphometrical studies on delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase during the fetal and neonatal development of rat Leydig cells.

Andrologia. 15(4) : 392-7, 1983