

令和4年度 分担研究報告書

Vimentin抗体を用いた免疫組織化学によるセルトリ細胞の機能評価法の検討

研究分担者 齊藤 洋克

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 研究員

研究要旨

これまでの研究報告により、哺乳類における正常な精子形成過程において、精細管内に存在する精子細胞とセルトリ細胞との密接な相互作用が重要であることが分かっている。本分担研究では、昨年度に引き続き、化学物質曝露によって生じる、セルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、セルトリ細胞マーカーである vimentin に着目した機能評価法の確立を試みた。

今年度は、昨年度報告したデータに追加するかたちで、先行研究において精巣・精子への影響が認められているビタミンE欠乏(VEE)およびビタミンA欠乏(VAD)・過剰(VAE)マウス精巣組織切片をサンプルとして使用した。精細管横断面の表面積に対して、vimentin 陽性領域が占める面積の割合(%)を算出した結果、コントロール群と比較して、VEE 群の精巣組織切片において、その割合が有意に増加した。VAD 群においても同様に、コントロール群と比較して、その割合は有意に増加した。一方、VAE 群においては、コントロール群と比較して、vimentin 陽性領域が占める面積比に有意な差は認められなかった。なお、本解析において、固定方法の違いによる明らかな染色性への影響は認められなかった。

追加したデータをふまえ、観察された vimentin 陽性領域の割合の変化は、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害と関連した変化を示すものであると考えられ、本解析手法によってセルトリ細胞の機能的変化を検出できる可能性を示した。今後は、本研究における解析手法を、造精機能障害を引き起こすモデル化学物質に適用し、vimentin の発現パターンに変化がみられるか否か、その適用限界を含めて検討することが重要であると考えられる。

A. 研究目的

本研究では、食をとりまく環境変化に対応するため、食品のリスク評価・管理体制の迅速化・高度化に資することを見据え、食品成分により生じる造精機能障害を高感度・高精度に検出するハザード評価体系の基盤構築を行うことを目的とする。

これまでの研究報告により、哺乳類における正常な精子形成過程において、精細管内に存在している精子細胞とセルトリ細胞の密接な相互作用が重要であることが分かっている。セルトリ細胞は精細胞の支持、栄養供給、精子離脱の補助、食作用、免疫学的障壁など精巣内環境を維持するた

めの様々な機能を有する。Vimentin は、間葉細胞がもつ細胞骨格中間径フィラメントの一種であり、主として機械的支持を担い、細胞骨格としての細胞の形の維持、核の位置の固定などの役割を持ち、セルトリ細胞を検出するマーカーの1つとしても用いられる。セルトリ細胞の細胞骨格系と造精機能障害がどのように関わるのか、その機能的変化については不明な点が多いが、精子細胞とセルトリ細胞の相互作用の重要性を考えると、造精機能障害が顕在化する際、あるいはその前段階として、細胞骨格系への影響として現れることも十分に考えられる。

今年度は、昨年度に引き続き、化学物質曝露によって生じるセルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、セルトリ細胞マーカーである vimentin を用いた機能評価法の確立を試みる。

B. 研究方法

サンプル

昨年度報告したデータに追加するかたちで、先行研究 (Saito et al., 2020; Yokota et al., 2021) の過程で採取したビタミン E 欠乏 (VED) およびビタミン A 欠乏 (VAD)・過剰 (VAE) マウス精巣組織切片を使用した。なお、VAD マウスは精子形成不全のモデルとして確立されており、VED および VAE マウスも上記先行研究による解析において、精巣・精子への影響が認められているため、本解析手法を適用するモデルとして有用である。

精巣組織切片の免疫組織化学

メタカン液 (メタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1) (VED 群) および modified ダビッドソン固定液 (VAD・VAE 群) にて固定した精巣組織について、パラフィン切片 (7 μ m) を作製し、セルトリ細胞マーカーとして、細胞骨格タンパク質である vimentin 抗体を用いて免疫組織化学を行った。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノール (100、95、90、80、70%) にて段階的に再水和した。HistoVT One (ナカライテスク、京都、日本) により 90 $^{\circ}$ C、30 分で抗原賦活化処理し、Blocking One (ナカライテスク) と共に 4 $^{\circ}$ C で 1 時間ブロッキング処理した後、一次抗体処理を行い、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。一次抗体には以下のものを用いた: rabbit monoclonal anti-Vimentin (Abcam; ab92547; 500 倍希釈)。PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗体 (Invitrogen; 1,000 倍希釈) を用い、4 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。核は Hoechst 33342 (ナカライテスク; 5,000 倍希釈)

で染色した。一次抗体および二次抗体、Hoechst 33342 は、Blocking One および PBS の混合溶液で希釈して用いた。染色像は、BX51 蛍光顕微鏡および付属の cellSens ソフトウェア (オリンパス、東京、日本) で取得した。

取得した染色像の画像解析

画像の解析には、Image J Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いた。同一条件にて染色・撮影した原画像をグレースケールに変換後、二値化の設定値を調整し、Binary 画像を作成 (二値化処理) することにより、vimentin 陽性領域を抽出した。その後、各精細管横断面の表面積 (μm^2) に対して、vimentin 陽性領域 (μm^2) が占める面積の割合 (%) を算出した。精細管横断面は 1 個体あたり 200 個 (VED 群およびそのコントロール群) または 110 個 (VAD・VAE 群およびそのコントロール群) 以上観察し、各群 3 個体の平均値を算出した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程」を遵守した。

C. 研究結果

精細管横断面の表面積に対して、vimentin 陽性領域が占める面積の割合 (%) を算出した結果、コントロール群と比較して、VED 群の精巣組織切片において、その割合が有意に増加した (Control 群: $7.8 \pm 0.3\%$ 、VED 群: $12.7 \pm 0.2\%$, $p < 0.01$; 図2)。VAD 群においても同様に、コントロール群と比較して、その割合は有意に増加した (Control 群: $10.9 \pm 0.1\%$ 、VAD 群: $32.3 \pm 3.4\%$, $p < 0.01$; 図3)。一方で、VAE 群においては、コントロール群と比較して、vimentin 陽性領域が占める面積比に有意な差

は認められなかった (Control 群:10.9±0.1%、VAE 群:11.6±0.9%; 図4)。なお、本解析において、固定方法の違いによる明らかな染色性への影響は認められなかった。

D. 考察

今回の解析により、VED および VAD 群において、精細管に対するvimentin の占有面積の割合が有意に亢進することが明らかとなった。この vimentin 陽性領域の割合の変化は、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害(精上皮の剥脱、精子形成不全等)と関連した変化を示すものであると考えられた。興味深いことに、VED 群では、多くの精細管が正常な形態で観察されており、明らかな精子形成障害が認められない精細管においてもその割合が増加していた。したがって、vimentin の発現パターンの変化は、形態的に捉えることが困難な精子形成不全の初期徴候となりうることが示唆された。また、VED および VAD 群においては、コントロール群では観察されなかったそれぞれに特有のビメンチンの伸張や集積が認められ、精細管におけるビメンチン陽性領域の割合の増加にも大きく関与していると考えられた。

一方、VAE 群においては、精細管に対するvimentinの占有面積の割合に有意な差は認められなかった。VAE 群のように、今回の解析方法において顕著な差が認められないものに対しては、精子形成サイクルのステージ依存的なvimentin の面積比の変化が存在するか否か解析することで、特定のステージに対する影響を検討する必要がある。

また、Vimentin 抗体の染色性については、いずれの固定液においても良好であったため、切片の厚みや固定液の種類に応じて条件を微修正することにより、今回の解析方法が適応可能であると考えられる。

今後、造精機能障害を引き起こすモデル化

学物質を用いた投与実験を行い、形態的な異常が認められない投与用量を含め、vimentin の発現パターンに変化がみられるか否か、本解析手法の適用限界を含めて検討することが重要である。

E. 結論

本分担研究では、昨年度に引き続き、化学物質曝露によって生じるセルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、セルトリ細胞マーカーである vimentin を用いた機能評価法の確立を試みた。特に、VED および VAD のような、精子形成障害を誘発したマウス精巣組織切片に適応した結果、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害を、精細管に占める vimentin の面積比の変化というかたちで検出することができた。今後、造精機能障害を引き起こすモデル化学物質を用いた投与実験を行い、本評価手法の有用性を示すことができれば、将来的には、健康被害を未然に防ぐための食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する食品安全行政施策の提案にも貢献することが期待される。

【参考文献】

- Saito, H., Hara, K., Kitajima, S., Tanemura, K., 2020. Effect of vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. *Reprod Toxicol* 98, 225-232.
- Yokota, S., Sekine, N., Wakayama, T., Oshio, S., 2021. Impact of chronic vitamin A excess on sperm morphogenesis in mice. *Andrology* 9(5), 1579-1592.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez,

J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7), 676-682.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

高橋 祐次、齊藤 洋克、栗形 麻樹子、北嶋 聡:加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, *Jpn J Clin Toxicol.* 35, 255-59, 2022

Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 48(4), 203-10, 2023

Takahiro Sasaki*, Hirokatsu Saito*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (*co-first author): Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci.* 48(4), 211-19, 2023

Hirokatsu Saito, Satoshi Yokota, Satoshi Kitajima: Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem.* 2023, in press.

2. 学会発表

齊藤 洋克、種村 健太郎、菅野 純、北嶋

聡:アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析-化学物質曝露影響から考える神経発達障害-,第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1、札幌)

五十嵐 智女、松村 万里、小川 いづみ、矢川 千織、早川 孝彦、越智 美代子、齊藤 洋克、栗形 麻樹子、北嶋 聡:「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較、第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1、札幌)

横田 理、齊藤 洋克、若山 友彦、北嶋 聡:ビタミン A 過剰マウス精上皮周期に着目した精巢毒性評価法の開発、第62回日本先天異常学会学術集会(2022.7.29、金沢)

齊藤 洋克、菅 康佑、横田 理、阿部 裕、片岡 洋平、六鹿 元雄、種村 健太郎、北嶋 聡:キシレンの吸入曝露によるマウス行動影響解析、第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2022.8.26、東京)

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

免疫染色 (Vimentinの定量) : ImageJ Fiji

元データの画像 (×20対物レンズ)

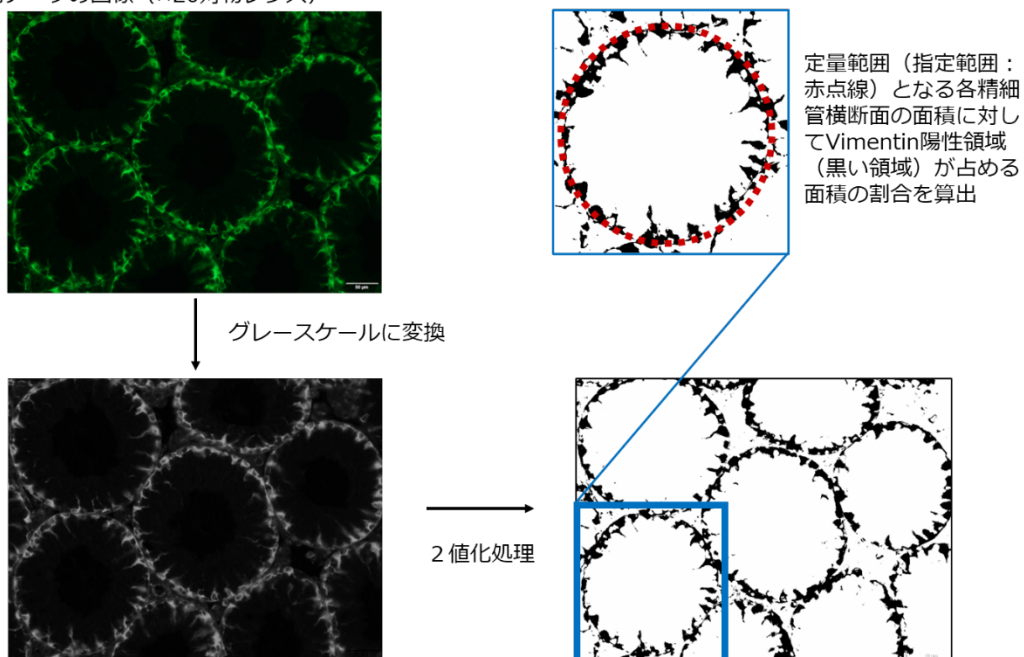


図 1. 二値化処理による vimentin 陽性領域の画像解析

VED群

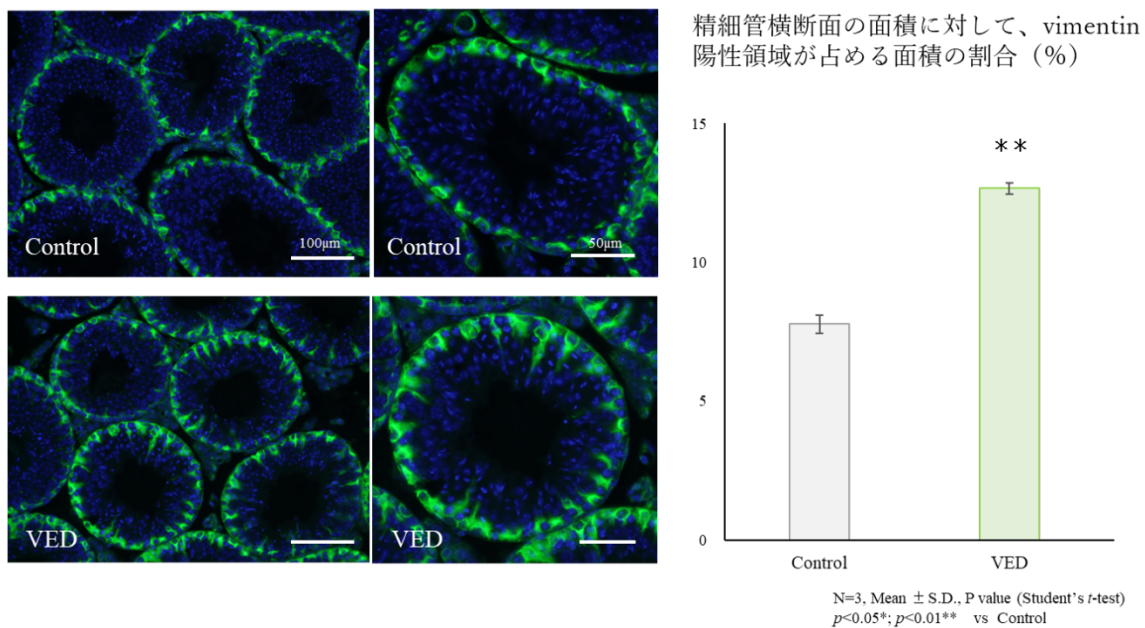


図 2. VED 群における、精細管に対する vimentin の占有面積

VAD群

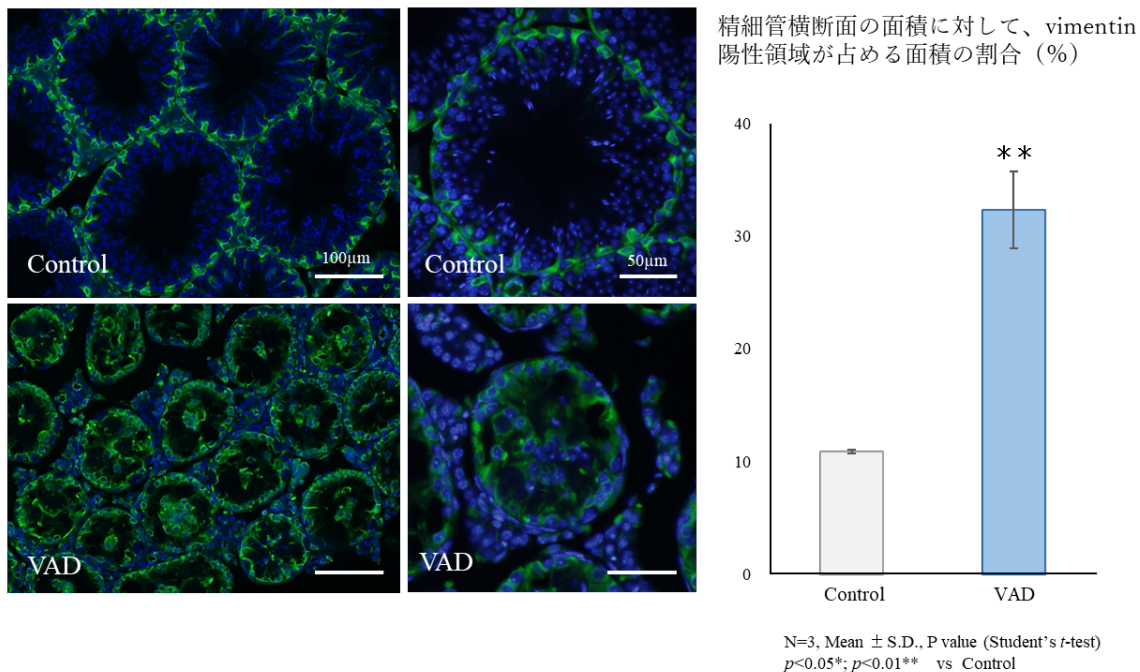


図 3. VAD 群における、精細管に対する vimentin の占有面積

VAE群

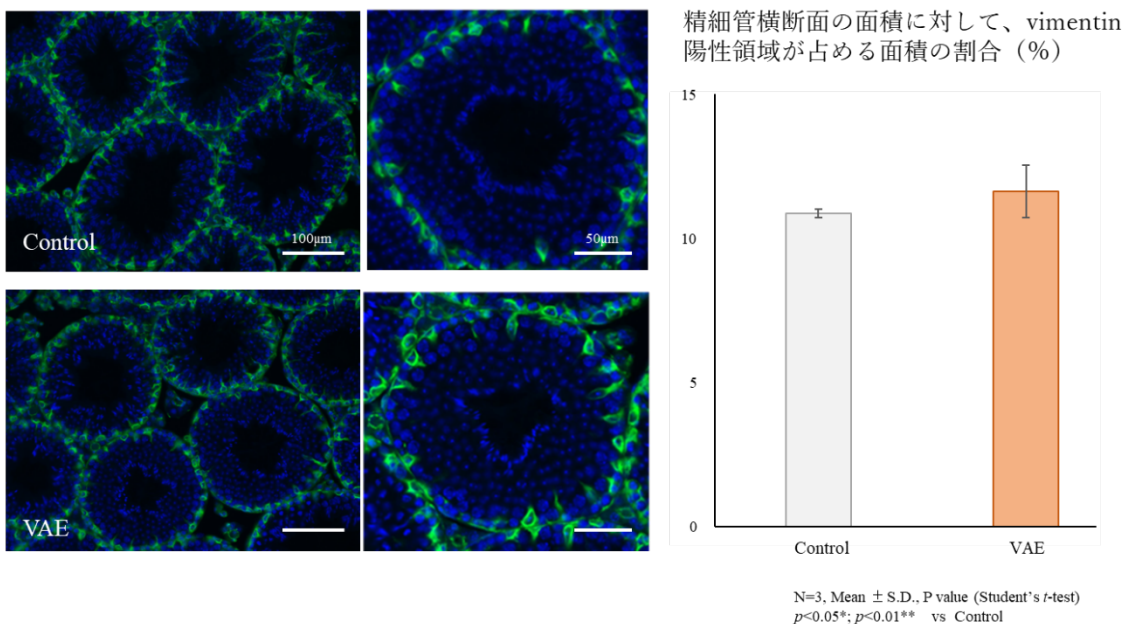


図 4. VAE 群における、精細管に対する vimentin の占有面積