

令和元年6月7日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11073

研究課題名(和文) アルコールは精巣の細胞にMitophagyを誘導する 男性不妊治療の基礎的研究

研究課題名(英文) Alcohol-induced mitophagy in testicular cells-a basic study related to male infertility treatment

研究代表者

Eid Nabil A. S. (Eid, Nabil)

大阪医科大学・医学部 Anatomy・講師 Lecturer

研究者番号：50570165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Wistarラットに5 mg/kg/bwのエタノールを単回腹腔内投与し、急性アルコール中毒モデルラット群とした。ラットは腹腔内投与後24時間以内の様々な精巣、組織固定を行い光学顕微鏡および電子顕微鏡を使用した研究に用いた。また、採取後の組織を凍結し、ウエスタンブロットに用いた。TM4セルトリはエタノール添加培養液で24時間処理した。オートファジー阻害剤3MA添加群と非添加群を比較した。ETR群のセルトリ細胞がアポトーシス抵抗性を有していることを示し、さらに、コントロール群と比べETR群においてオートファジーおよびマイトファジーの関連タンパク質(LC3, PINK1, Parkin)を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ETR群のセルトリ細胞におけるオートファジーとマイトファジーはエタノールの毒性による細胞死から細胞を守るメカニズムであることを明らかにした。これらは男性の生殖機能に重要であると考えられる。オートファジーとマイトファジーはETR群のセルトリ細胞において増加しており、エタノールの毒性から細胞が生存するための重要な役割を担っていることが明らかとなった。精巣でマイトファジーを誘導する薬品や天然の産物の開発および発見は、不妊症や脂肪肝などのアルコール摂取と関連した病気の治療のターゲットとなりえる。

研究成果の概要(英文)：Adult Wistar rats was given a single dose of ethanol intraperitoneally (5mg/kg/bw). The testes and other organs such as liver and spleen were removed and processed. Microscopy revealed enhanced germ cell apoptosis in testes of ethanol-treated rats (ETRs) compared to control group. we found that SCs of ETRs were resistant to apoptosis and showed enhanced expression of autophagy and mitophagy proteins LC3, TFEB, Pan cathepsin PINK1 and Parkin using IHC, IF, immunoelectron microscopy and WB. Enhanced mitophagy in SCs of ETRs was confirmed by electron microscopy and seems to be pro-survival as these cells appeared non-apoptotic. In addition, we observed enhanced mitophagy in liver cells of ETRs. In vitro study confirmed the pro-survival role of autophagy in cultured SCs exposed to ethanol because blocking autophagy BY 3-MA in these cells resulted in decreased cell viability. This indicates that autophagy could be cytoprotective for ETRscs and may have implications for fertility treatment.

研究分野：Autophagy

キーワード：Autophagy Mitophagy Alcohol Parkin Testis Sertoli cell

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過度のアルコール摂取は、ミトコンドリアのダメージや生殖細胞のアポトーシスを引き起こし、またアンドロゲン産生を抑制することにより不妊の原因となっていると考えられる。一方、精巣のセルトリ細胞は生殖細胞とは異なり、アポトーシス抵抗性を有していると考えられている。オートファジーは様々なストレス物質への暴露から細胞を守るためのメカニズムである。オートファジー（マイトファジー）によるダメージを受けたミトコンドリアの除去は、アポトーシスから細胞を守るメカニズムである。そこで、急性アルコール中毒モデルを用いて *in vivo* と *in vitro* の系においてセルトリ細胞でのオートファジーおよびマイトファジーについての研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究は、急性アルコール中毒モデルを用いて、オートファジーのコントロールによる男性不妊治療の基礎的研究を行うことが目的である。

3. 研究の方法

雄 Wistar ラットに 5 mg/kg/bw のエタノールを単回腹腔内投与し、急性アルコール中毒モデルラット群とした。コントロール群は PBS を同様に投与した。ラットは腹腔内投与後 24 時間以内の様々なタイムポイントで精巣、肝臓、脾臓を採取後、組織固定を行い光学顕微鏡および電子顕微鏡を使用した研究に用いた。また、採取後の組織を凍結し、ウエスタンブロットに用いた。*in vitro* の実験系において、セルトリ細胞培養株 TM4 はエタノール添加培養液で 24 時間処理した。オートファジー阻害剤 3MA 添加群と非添加群を比較し、オートファジー応答および細胞生存性の確認を行った。

4. 研究成果

光学顕微鏡および電子顕微鏡を使用した研究において、コントロール群と比べ、エタノール処理群 (ETR 群) では生殖細胞のアポトーシスが増加していることが明らかとなった。これは、セルトリ細胞におけるアンドロゲン受容体の発現抑制と iNOS の発現増加と関連したものである可能性が明らかとなった。我々は ETR 群のセルトリ細胞がアポトーシス抵抗性を有していることを示し、さらに、コントロール群と比べ ETR 群においてオートファジーおよびマイトファジーの関連タンパク質 (LC3、TFEB、Pan cathepsin、PINK1、Parkin) の発現量が増加していることを免疫組織染色法、免疫蛍光染色法、免疫電子顕微鏡法およびウエスタンブロット法を用いた研究で明らかにした。電子顕微鏡を使用した観察により、コントロール群と比べ ETR 群のセルトリ細胞においてマイトファジーが増加していることを明らかにし、また、ETR 群のセルトリ細胞がアポトーシスをおこしていなかったことから、マイトファジーにより細胞が細胞死から守られているということが示唆された。また、我々はコントロール群と比べ ETR 群の肝臓の細胞でもマイトファジーが増加していることを明らかにした。さらに、セルトリ細胞培養株を用いた *in vitro* の実験において、オートファジー阻害により細胞の生存性が低下することを明らかにし、オートファジーが ETR 群のセルトリ細胞で細胞を細胞死から守る機能を持っていることを示した。

以上より、ETR 群のセルトリ細胞におけるオートファジーとマイトファジーはエタノールの毒性による細胞死から細胞を守るメカニズムであることを明らかにした。これらは男性の生殖機能に重要であると考えられる。

重要性と今後の展望

オートファジーとマイトファジーは ETR 群のセルトリ細胞において増加しており、エタノールの毒性から細胞が生存するための重要な役割を担っていることが明らかとなった。精巣でマイトファジーを誘導する薬品や天然の産物の開発および発見は、不妊症や脂肪肝などのアルコール摂取と関連した病気の治療のターゲットとなりえる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Eid N Horibe A, Ito Y, Otsuki Y, Kondo Y (2019) Ethanol-Induced Mitochondrial Damage in Sertoli Cells is Associated with Parkin Overexpression and Activation of Mitophagy. *Cells* 2019, 8(3), 283; doi:10.3390/cells8030283 <https://doi.org/10.3390/cells8030283>

Horibe A, Eid N, Ito Y, Otsuki Y, Kondo Y (2019) Ethanol-Induced Autophagy in Sertoli Cells Is Specifically Marked at Androgen-Dependent Stages of the Spermatogenic Cycle: Potential Mechanisms and Implications. *Int J Mol Sci.* 20 (1). pii: E184. doi: 10.3390/ijms20010184

Eid N, Kondo Y (2018) Autophagy in Testes of Rats Treated with Bisphenol A and Nonylphenol: Specific Cellular Localization and Potential Implications. *Environ Pollut.* 243: 1615-1616.

Eid N, Ito Y, Horibe A, Hamaoka H, Kondo Y (2018). A Method for In Vivo Induction and Ultrastructural Detection of Mitophagy in Sertoli Cells. *Methods Mol Biol.* 1748:103-11

Eid N, Kondo Y (2018) Ethanol-induced Mitophagy in Rat Sertoli Cells: Implications for Male Fertility. *Andrologia.* 50:e12820. <https://doi.org/10.1111/and.12820>

Horibe A, Eid N, Ito Y, Hamaoka H, Tanaka Y, Kondo Y (2017) Upregulated Autophagy in Sertoli Cells of Ethanol-treated Rats is Associated with Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), Androgen Receptor Suppression and Germ Cell Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 18 (5).

Eid N, Kondo Y (2017) Parkin in cancer: Mitophagy-related/unrelated tasks. *World J Hepatol.* 9 (7):349-351. doi: 10.4254/wjh.v9.i7.349.

Betsuyaku T, Eid N, Ito Y, Tanaka Y, Otsuki Y, Kondo Y (2016) Ethanol enhances thymocyte apoptosis and autophagy in macrophages of rat thymi. *Histol Histopathol.* 32(9):963-975.

Eid N, Ito Y, Otsuki Y (2016) Triggering of Parkin Mitochondrial Translocation in Mitophagy: Implications for Liver Diseases. *Front Pharmacol.* Apr 29; 7:100.

Eid N, Ito Y, Horibe A, Otsuki Y (2016) Ethanol-induced mitophagy in liver is associated with activation of the PINK1-Parkin pathway triggered by oxidative DNA damage. *Histol Histopathol.* 31(10):1143-1155.

[学会発表](計6件)

Eid N, Ito Y, Horibe A, Otsuki Y, Kondo Y. Acute ethanol exposure upregulates autophagy in Sertoli cells: in vivo and in vitro studies. Conference of the Japanese Association of Anatomists 2019年

Eid N, Ito Y, Horibe A, Otsuki Y, Hamaoka H, Tanaka Y, Kondo Y. Upregulation of autophagy in Sertoli cells of ethanol-treated rats: evidences, mechanisms and implications. 19th International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA 2018) (招待講演) (国際学会) 2018年

Eid N, Ito Y, Horibe A, Otsuki Y, Hamaoka H, Tanaka Y, Kondo Y. Autophagy in alcohol-induced organ damage: lessons from animal models. The 5th International Anatomical Sciences And Cell Biology Conference (IASCBC) (招待講演)(国際学会) 2018年

Eid N, Ito Y, Hirata A, Otsuki Y, Kondo Y. Bilateral agenesis of facial artery: a rare case report. Conference of the Japanese Association of Anatomists 2018年

Eid Nabil, Yuko Ito, Yoshinori Otsuki, Yoichi Kondo. Ethanol-induced hepatic mitophagy is associated with activation of PINK1-Parkin pathway. 第122回解剖学会総会 2017年

Akio Horibe, Nabil Eid, Yuko Ito, Yoshihisa Tanaka, Yoshinori Otsuki, Yoichi Kondo. Ethanol-induced elevation of testicular germ cell apoptosis is associated with enhanced autophagy in Sertoli cells. 第93回解剖学会近畿地方会 2017年

Akio Horibe, Nabil Eid, Yuko Ito, Yoshihisa Tanaka, Yoshinori Otsuki, Yoichi Kondo. Enhanced autophagy in Sertoli cells of acute ethanol-treated rats. 日本免疫染色学会 2016年

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田中 義久

ローマ字氏名：Tanaka, Yoshihisa

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：20648703

研究分担者氏名：伊藤 裕子

ローマ字氏名：Ito, Yuko

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：

職名：功労教授

研究者番号（8桁）：40148432

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。