

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390436  
 研究課題名（和文） eNOS トランスジェニックマウスを用いた男性不妊に対する新たな治療法の開発  
 研究課題名（英文） The challenge for a useful therapeutic strategy for infertile male using eNOS-Tg mice.  
 研究代表者  
 藤澤 正人 (FUJISAWA MASATO)  
 神戸大学・医学系研究科・教授  
 研究者番号：30243314

## 研究成果の概要：

セルトリ細胞において IL-1 $\beta$  刺激は JNK 経路を介して iNOS 発現を亢進させ、NO を生成する。これらの経路の概念は精巣内病態における新たな治療戦略上において重要な一部であり、セルトリ細胞におけるサイトカイン制御機構の解明は精子形成障害の治療に貴重な情報を与えることが期待される。また停留精巣モデルによる精細胞のアポトーシスは血管内皮型一酸化窒素合成酵素強発現マウスにおいて増加したことより、熱ストレスや酸化ストレスに関連する精子形成障害において eNOS を制御することが有効な治療法になりうる可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：精子形成、精細胞、NO

## 1. 研究開始当初の背景

男性不妊の原因として pretesticular, testicular, posttesticular の 3 つに大きく分けられる。その多くは testicular に属する精子形成障害であり、その機序は未だ明らかではなく、基礎的および臨床的の両面から精子形成機序についての総合的な研究が望まれている。精巣内細胞間の機能調節には視床下部-下垂体-精巣軸からのゴナドトロ

ピンによる調節とは別に、精巣局所での paracrine/autocrine 機構が考えられる。その制御因子の一つとして Nitric oxide (NO) は注目されている。NO に関してはさまざまな細胞において産生対象とその経路が解明されているが、精巣内において経路とその役割は未知の部分が多く解明が急がれている。特に精巣炎などの急性炎症後の精子形成障害にはさまざまな説があることが理由として

挙げられる。

## 2. 研究の目的

精巣には主な細胞として精子形成に関わる精細胞、その支持細胞であるセルトリ細胞、テストステロン産生細胞であるライディヒ細胞が存在する。組織学的にセルトリ細胞と精細胞は精細管内に存在し、精細胞はさらに精粗細胞、精母細胞、精子細胞に分かれる。これらの精細胞はセルトリ細胞と密に接しており、情報伝達のしやすい形で存在し、精子形成に適した環境を整えていると考えられる。一方、ライディヒ細胞は間質に存在し、基底膜を隔てているが、セルトリ細胞、精細胞と密接な関係を持つと考えられる。これらの細胞間の機能調節には視床下部-下垂体-精巣軸からのFSH、LHによる調節とは別に、精巣局所でのparacrine/autocrine機構が考えられる。本研究では、その制御因子の一つとしてNitric oxide (NO) に注目し、精巣での機能について明らかにし、精子形成障害に対する新たな治療法確立を主眼としている。

NOは、フリーラジカルであり、いろいろな臓器においてさまざまな生物学的作用をもたらす情報伝達物質である。そのNO合成酵素であるNitric Oxide Synthase (NOS)には3つのアイソフォーム(iNOS, eNOS, nNOS)が存在し、それぞれ異なったシグナル伝達系を介してその発現が調整されている。近年、NOは勃起能をはじめ、生殖機能において深く関わっていることが報告されている。しかしながら、精巣における具体的な機能については明らかでない部分が多い。我々の研究では、NOがセルトリ細胞やライディヒ細胞において発現していること、これらの両細胞の培養実験ではサイトカインの誘導によりNOが合成されることを報告している。また、セルトリ細胞やライディヒ細胞におけるNO産生が円形精子細胞からの分泌因子により増加することも解明している。また、諸家の報告では、eNOSの発現が変性をきたした精細胞に強く発現していることから、eNOSとアポトーシスの関連性が報告されている。神経細胞、軟骨細胞、マクロファージなど数多くの細胞においてもNOがアポトーシスに関与していることが報告されており、精細胞においてもNOがそのアポトーシスに強く関与していることが示唆されている。このような結果は、NOならびにNOSが精巣機能に重要な関わりがあることを示唆している。

本研究の目的はNOの精細胞における影響をin vivoとin vitroの両面から探り、NOの精子形成機構における役割を解明することである。具体的にはin vitroでは、すでに我々が確立している精細胞の培養系を利用し、in vivoではeNOSトランスジェニックマウスを用いて、eNOSおよびNOの

精細胞への影響を検討する。

## 3. 研究の方法。

### (1) in vitroでの検討

#### ① 精細胞、セルトリ細胞の分離、培養

8週齢のラット精巣よりElutriatorによる分画法を用い、Pachytene spermatocyte (精母細胞の初期段階)とRound spermatid (円形精子細胞)を分離、また18日齢のラットよりセルトリ細胞を分離し、無血清培養液で培養した。

#### ② FSH, cAMP, サイトカイン刺激における精細胞、セルトリ細胞からのNOの分泌

それぞれの細胞にFSH, cAMP inducer (Forskolin)やサイトカイン(IL-1 $\beta$ , IL-6など)の刺激により、各細胞から産生されるNO量(培養上清中のNitrite+Nitrate)をGriess法にて測定した。

#### ③ NO増加およびNOS阻害剤の精細胞、セルトリ細胞への影響の検討

NO generatorとしてSodium nitroprussideあるいはNO増加を引き起こしたサイトカイン刺激に加え、阻害剤を添加し、セルトリ細胞における各Synthase (iNOS, eNOS, nNOS)の蛋白レベル、mRNAレベルでの発現、増減を検討した。

#### ④ フローサイトメトリーを用い、セルトリ細胞内のサイトカイン刺激によるNO濃度の変化についても測定した。

### (2) in vivoでの検討

#### ① トランスジェニックマウスの作成

C57BL/6雄マウスにendothelium-specific preproendothelin-1プロモーターを用いて、内皮細胞にbovine eNOSの発現を亢進させたheterozygousトランスジェニックマウスとwild typeマウスをそれぞれeNOS-Tg群、WT群とした。

#### ② 精子形成障害モデルの作成

WT群で停留精巣モデルを作成した。その間の精子形成障害過程を観察し、本実験系において精子形成障害過程を比較検討する上で適切と考えられる観察ポイントを決定した。具体的には、停留精巣作成後数日ごとにマウスを屠殺し精巣を摘出し、精子形成状態について病理組織学的検討を行った。

#### ③ eNOS-Tg群とWT群の比較検討

eNOS-Tg群(8週齢)とWT群(8週齢)の両群共に右側のみに停留精巣を作成し、左側は放置した。

##### i) 病理組織学的検討

精細管内の病理分析に関しては光学顕微鏡を用い、HE染色にて、精細胞の段階による(spermatogonia, spermatocytes, spermatids)数を数えた。ランダムに選んだ20 cross sectionの中から1セルトリ細胞当たりの精細胞の数とした。停留精巣モデルに

おける経時変化をみることにより、各分化段階におけるアポトーシスなどの変化を確認出来た。

ii) 精細胞中のアポトーシスの検出

組織切片上でDNA断片化を検出するTUNEL法によって行う。アポトーシスの評価はランダムに選んだ20 cross sectionの中から1セルトリ細胞当たりの精細胞におけるアポトーシスの数によって行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) In Vitroにおける結果精細胞におけるNO障害

精細胞においてspermatocytes, spermatids共にサイトカイン刺激にてはNO levelの上昇を認めなかった。ただしNOS inducerであるsodium nitroprussideを加えたところ、NOレベルの上昇を認めた。ここでセルトリ細胞からのparacrine effectに着目し、セルトリ細胞を中心に実験を行った。

##### ① リン酸化JNK、COX-2の活性化

The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) グループは重要な細胞内伝達分子であり、extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK), そしてp38 MAPKが含まれる。さまざまな細胞においてNOのシグナリングにはこれらのキナーゼが関与していることが知られている。近年Petersonらは増殖期である8日齢のラットセルトリ細胞においてIL-1 $\beta$ はp38 MAPKを活性化させることを示した。また睪頭細胞、心筋細胞、精子やグリア細胞においてNOはCOX-2の活性化、アラキドン酸カスケードによるプロスタグランジンにより調節されることが示されている。

我々は18日齢SD雄ラットより精巣を摘出し、セルトリ細胞を精製分離、培養の後、3日目にIL-1 $\beta$  (10 ng/ml)刺激を加えた。刺激されたセルトリ細胞より蛋白を抽出し、Western Blotting法を用いて分析した。セルトリ細胞においてIL-1 $\beta$ は30分以内にリン酸化JNKを活性化したが、同じMAP kinaseグループであるリン酸化p44/42-(ERK)、リン酸化p38MAPKを活性化させなかった(図1A, B)。またリン酸化Akt、リン酸化JAK2なども活性化を示さなかった。同様に抗COX-2抗体を用い、Western Blottingを行ったところ、COX-2蛋白量はIL-1 $\beta$ 刺激後1時間から有意な上昇を認め、6時間で50倍の増加を認めた(図1C, D)。しかしながらCOX-1は活性化を示さなかった。

JNKがCOX-2を誘導するか否かについて検討すべく、IL-1 $\beta$ 刺激と同時にJNK活性阻害剤であるSP600125 (10  $\mu$ M)を添加し、比較を行った。SP600125はIL-1 $\beta$ 刺激により増加し

たリン酸化JNKとCOX-2蛋白レベルを有意に阻害した(図2A, B)。

NOがprotectiveに働くか、それともdestructiveに働くかはNOとROSのバランスによることがさまざまな細胞において示唆されている。

IL-1 $\beta$ 刺激が活性酸素を増やすかを検討する目的にて、活性酸素のバランスをフローサイトメトリー法にて測定した。IL-1 $\beta$ 刺激による活性酸素反応をIL-6刺激、そしてポジティブコントロールとしてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激と比較した。さまざまな細胞においてIL-1 $\beta$ は活性酸素を増加させることが報告されているが、セルトリ細胞においては増加しなかった。それどころか、活性酸素量に関して、逆に抗炎症の役割を示していることが示唆された。IL-6刺激にても活性酸素の量は増加しなかった(図2C)。

##### ② セルトリ細胞におけるIL-1 $\beta$ 刺激によるNO生成はJNK経路を介する

セルトリ細胞におけるIL-1 $\beta$ 刺激によるNO生成を測定するために、セルトリ細胞培養液をGriess法により評価した。リン酸化JNKの活性化はIL-1 $\beta$ 刺激後30分以内に起こりこの時間に一致して細胞内のNO濃度の有意な上昇が見られた(data not shown)。IL-1 $\beta$ 刺激により培養液内のNO濃度が24時間以内に8倍と増加を示した。NO生成と細胞外への分泌はCOX-2阻害剤であるNS-398 (10  $\mu$ M)添加では阻害されなかったが、SP600125添加にて有意にNO濃度の上昇が阻害された。なおFSH, forskolinにてはNO生成の増加は見られなかった(図3)。セルトリ細胞は主に内分泌的にゴナドトロピンのFSHによる調節を受けているが、本実験系においてはFSHあるいはforskolin刺激にてiNOS, NO生成は増加しなかった。

##### ③ セルトリ細胞においてIL-1 $\beta$ 刺激によりiNOS発現が亢進する

正常な状態において精巣内にiNOSは発現しており、このことはNOが生理的に産生されていることを示している。精子形成における複雑な過程において、iNOS活性化によるNO産生はサイトカインやgrowth factorの生成、伝達に影響を及ぼしていることが示唆されている。精細管内においてLPSによる精細胞の損傷、アポトーシスに伴いiNOSとNO発現レベルの上昇が認められている。

我々の実験において、セルトリ細胞においてIL-1 $\beta$ 刺激によりNO濃度の増加が見られたが、IL-1 $\beta$ 刺激によるiNOS mRNAレベルの変化をRT-PCR法、iNOS, eNOSの蛋白量の変化をWestern blotting法にて定量した。IL-1 $\beta$ 刺激によりiNOS蛋白、mRNA量は有意に増加したが、eNOSに関して増加は見られなかった(図4)。iNOS蛋白量の増加はNS-398添加で

は阻害されなかったが、SP600125 添加にて有意に上昇が阻害された(図 5)。

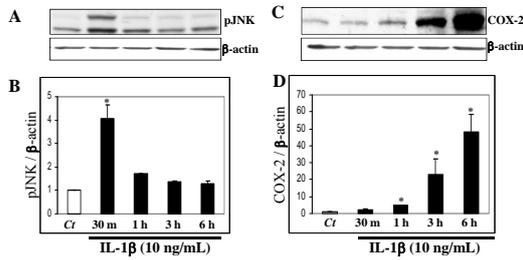


図1

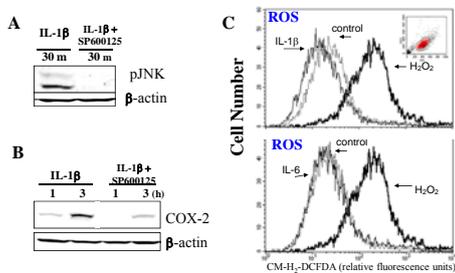


図2

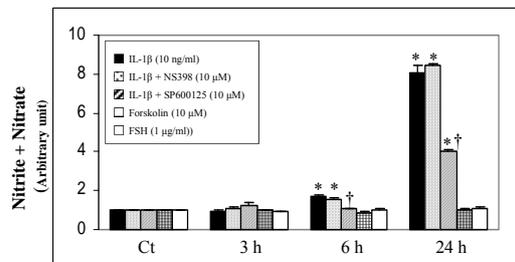


図3

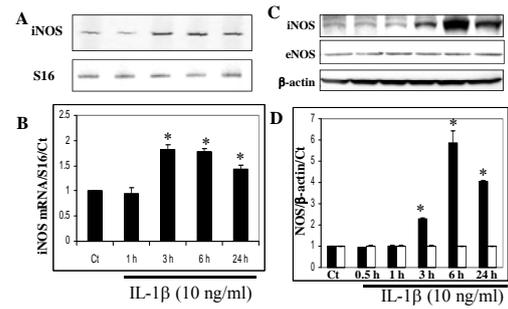


図4

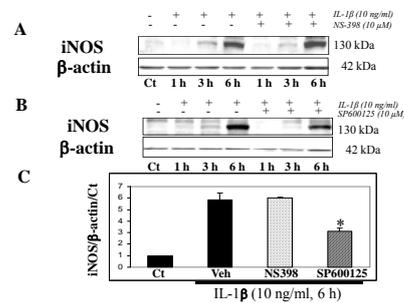


図5

## (2) In Vivoにおける結果eNOS-Tgの精巢においてeNOSは強発現する

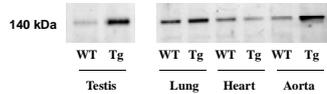
eNOS-Tg 群、WT 群より肺、心臓、大動脈、精巢を摘出し、Western blotting 法にて蛋白量を定量したところ、他の臓器と同様に eNOS-Tg 群の精巢において eNOS は WT 群に比し、明らかな強発現を認めた (Figure A)。

### ① eNOS-Tgの停留精巢において造精機能は低下する

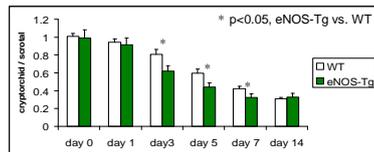
術後 3、5、7 日目での精巢重量比(停留精巢側/陰囊側)の平均値はそれぞれ WT 群で 0.81、0.59、0.42、eNOS Tg 群では 0.62、0.44、0.33 と eNOS-Tg 群で有意に減少が見られた (Figure B)。精細胞数は、精粗細胞において、術後観察期間を通して、両群における有意な差は認めなかった。一方、精母細胞においては術後 3 日目より 14 日後まで eNOS-Tg 群で有意に細胞数の減少が見られ、精子細胞に関しても術後 3 日目より 7 日目まで eNOS-Tg 群で有意に細胞数の減少が見られた (Figure C)。精細胞のアポトーシス数は、eNOS-Tg 群で術後 3 日目において有意に増加し、その有意な増加は術後 7 日目まで続いた (Figure D)。

これらの結果より、停留精巣モデルにおいて eNOS がアポトーシスを促進させ、NO 産生増加によると考えられる精子形成過程での障害は meiosis の段階で起こることが示唆された。

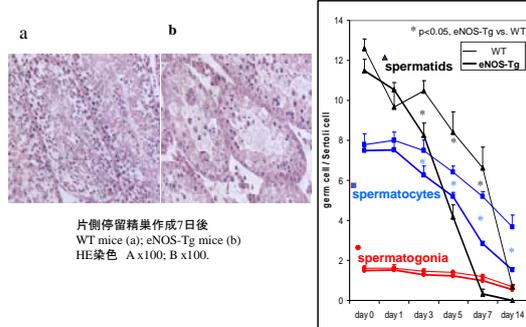
#### A Western Blotting



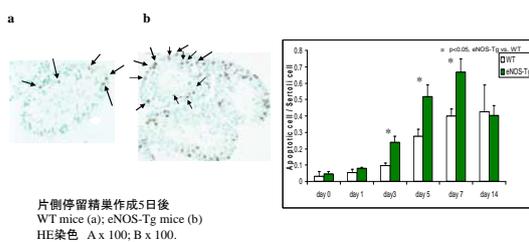
#### B 精巣重量測定



#### C 組織学的評価



#### D アポトーシスの評価



## ② まとめ

セルトリ細胞において IL-1 $\beta$  刺激は JNK 経路を介して iNOS 発現を亢進させ、NO を生成する。これらの経路の概念は精巣内病態における新たな治療戦略上において重要な一部であり、セルトリ細胞におけるサイトカイン制御機構の解明は将来的に精子形成障害の治療に貴重な情報を与えることが期待される。また停留精巣モデルによる精細胞のアポトーシスは血管内皮型一酸化窒素合成酵素強発現マウスにおいて増加したことより、熱ストレスや酸化ストレスに関連する精子形成障害において eNOS を制御することが有効

な治療法になりうる可能性が示唆された。

本研究は熱ストレスや酸化ストレスに関連する精子形成障害についてその精細胞のアポトーシスの機序について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった血管内皮型一酸化窒素合成酵素との関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kondo Y, Ishikawa T, Yamaguchi K, Yada T, Fujisawa M, Oral Administration of Tetrahydrobiopterin Attenuates Testicular damage by Reducing Nitric Oxide Synthase Activity in a Cryptorchid Mouse Model, *J Androl*, 査読有、29:153-63、2008
- ② Yamaguchi K, Ishikawa T, Kondo Y, Fujisawa M, Cisplatin Regulates Sertoli Cell Expression of Transferrin and Interleukins, *Mol Cell Endocrinol*, 査読有、283:68-75、2008
- ③ 石川智基, PATRICIA L. MORRIS, 藤澤正人, 研究フロンティア セルトリ細胞において IL-1 $\beta$  は JNK 経路を活性化し、一酸化窒素 (NO) 発現を亢進させる、*日本生殖内分泌学会誌*, 査読有、12:21-25、2007
- ④ Ishikawa T, Morris PL, A Multi-Step Kinase-Based Sertoli Cell Autocrine-Amplifying Loop Regulates Prostaglandins (PG), their Receptors, and Cytokines, *Endocrinology*, 査読有、147:1706-16、2006
- ⑤ Ishikawa T, Morris PL, Interleukin-1 $\beta$  Signals Through a cJun-N-terminal kinase (JNK)-dependent Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Production Pathway in Sertoli Epithelial Cells, *Endocrinology*, 査読有、147:5424-30、2006

[学会発表] (計 15 件)

- ① 石川智基, セルトリ細胞において FSH は PKA, PKB, PKC 経路を介し Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) を調節する、第 12 回日本生殖内分泌学会学術集会、2007/10/24-26、東京
- ② Yamaguchi K, Cisplatin induces interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 expression through a cyclooxygenase 2 regulation of prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGD<sub>2</sub>, and PGI<sub>2</sub> production pathway in rat Sertoli cells, *American*

- Society for Reproductive Medicine, 63rd Annual Meeting, 2007/10/13-17, Washington D.C
- ③ 石川智基、セルトリ細胞におけるプロスタグランディンの paracrine/autocrine 作用、2007/7/5-6 第 26 回日本アンドロロジー学会、浦安
  - ④ 山口耕平、セルトリ細胞においてシスプラチンは COX-2 経路を活性化し、プロスタグランジンおよびインターロイキンの産生を誘導する、2007/7/5、第 26 回日本アンドロロジー学会、浦安
  - ⑤ Ishikawa T、Interleukin-1 $\beta$  Signals Through a cJun-N-terminal kinase (JNK)-dependent Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Production Pathway in Sertoli Epithelial Cells, 2007/5/19-24, AUA annual meeting, Anaheim
  - ⑥ 石川智基、セルトリ細胞における proinflammatory cytokine の autocrine loop, 2006/12/2, 第 21 回日本生殖免疫学会、東京
  - ⑦ 石川智基、セルトリ細胞において IL-1 $\beta$  は JNK 経路を活性化し、一酸化窒素 (NO) 発現を亢進させる、2006/11/25、第 11 回日本生殖内分泌学会、東京
  - ⑧ Ishikawa T、Multiple protein kinases mediate follicle stimulating hormone (FSH) regulation of steroidogenic acute regulatory (STAR)-related lipid transfer proteins in Sertoli cell, 2006/10/19-23, 2<sup>nd</sup> Asia Pacific Forum on Andrology meeting, Shanghai
  - ⑨ 石川智基、セルトリ細胞における proinflammatory cytokine の paracrine/autocrine 機構、2006/7/15-16、第 26 回日本アンドロロジー学会、金沢
  - ⑩ Ishikawa T、A multi-step kinase-based Sertoli cell autocrine-amplifying loop regulates prostaglandins, their receptors, and cytokines, 2006/5/20-25, AUA annual meeting, Atlanta
  - ⑪ Ishikawa T、Follicle stimulation hormone (FSH) regulates Sertoli cell expression of steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer (STAR-domain) proteins by activation of protein kinase A (PKA) and C (PKC)、2006/5/20-25, AUA annual meeting, Atlanta
  - ⑫ Ishikawa T、Multiple protein kinases mediate follicle stimulation hormone (FSH) regulation of Sertoli cell steroidogenic acute regulatory

(StAR)-related lipid transfer (STAR-domain-containing) proteins, 2006/Apr, 31<sup>st</sup> ASA annual meeting, Chicago

- ⑬ 石川智基、精子形成障害：間質細胞からのアプローチ、2006/4/12-15、第 94 回日本泌尿器科学会、福岡
- ⑭ 石川智基、セルトリ細胞における IL-1 $\beta$  の paracrine/autocrine 機構、2006/3/4、第 32 回関西アンドロロジーカンファレンス、大阪
- ⑮ 石川智基、セルトリ細胞においてインターロイキン 1 $\beta$  は JNK, COX-2 経路を介しサイトカインを誘導する、2006/2/25、第 15 回泌尿器科分子・細胞研究会、京都

[図書] (計 1 件)

- ① 石川智基、藤澤正人、永井書店、産婦人科治療、2008 年、P. 352-356

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤澤 正人 (FUJISAWA MASATO)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30243314

### (2) 研究分担者

田中 一志 (TANAKA KAZUSHI)  
医学部附属病院・講師  
研究者番号：20335433  
石川 智基 (ISHIKAWA TOMOMOTO)  
医学部附属病院・医員  
研究者番号：00432576  
山口 耕平 (YAMAGUCHI KOUHEI)  
神戸大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：50457107  
合田 上政 (GOUDA KAZUMASA)  
神戸大学・医学(系)研究科・医学研究員  
研究者番号：80403278

### (3) 連携研究者