

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18371

研究課題名（和文）全身性急性炎症後の男性生殖機能改善を目的とした基礎検討

研究課題名（英文）Fundamental Study on Improving Male Reproductive Function After Systemic Acute Inflammation

研究代表者

井上 岳人（Inoue, Taketo）

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30772652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：セルトリ細胞は外因性炎症刺激物質（Lipopolysaccharide）および内因性炎症刺激物質（高濃度リコンビナントインターロイキン-18）刺激により炎症反応は惹起されるものの、両刺激によるアポトーシスは誘導されなかった。また、アポトーシスシグナル伝達経路関連因子の発現解析の結果、炎症刺激物質の種類によりデスレセプター経路関連因子の発現が異なり、アポトーシスを回避する機構が異なることが明らかとなった。従って、セルトリ細胞は炎症刺激に耐性があり、精巣の他の構成細胞よりも精巣の恒常性を維持する上で大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、セルトリ細胞は、感染による炎症刺激やサイトカイン刺激によるアポトーシスに対し、ある程度の耐性を持つ可能性が示唆された。我々のこれまでの研究結果と合わせると、Lipopolysaccharideや高濃度のインターロイキン-18のような炎症刺激物質に対する感受性とアポトーシスへの反応は、精巣体細胞（セルトリ細胞とライディッヒ細胞）の間に違いがあることが明らかとなった。故に、セルトリ細胞は炎症刺激に耐性があり、精巣の他の構成細胞よりも精巣の恒常性を維持する上で大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that Lipopolysaccharide (LPS) induced an inflammatory response in TM4 Sertoli cells, potentially increasing their sensitivity to apoptotic signals. However, LPS treatment did not stimulate the production of apoptosis-inducing ligands in the TM4 Sertoli cells, and as a result, apoptosis was not induced in response to LPS treatment. Additionally, our study showed that recombinant IL-18 did not induce apoptosis in Sertoli cells. This study suggests that Sertoli cells may have some tolerance to apoptosis in response to infectious inflammatory stimulation (tested using LPS) and inflammasome-mediated cytokine stimulation (tested using IL-18). These results suggested that Sertoli cells do not easily undergo apoptosis despite strong inflammatory stimuli. Additionally, Sertoli cells may resist inflammation and play a larger role in protecting testicular homeostasis than other component cells of the testis.

研究分野：生殖免疫学

キーワード：セルトリ細胞 急性炎症 エンドトキシン IL-18 アポトーシス デスレセプター経路 精巣 感受性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Post-intensive care syndrome は ICU での集中治療後、身体障害や認知機能のみならず精神障害も生じる可能性がある (①)。重症感染症である敗血症に注目すると、2017 年、世界で推定 4890 万人が罹患し、男性患者では生殖適齢期を含む 18~45 歳が約 20% を占める (②)。しかし、重症病態治療後の生殖機能および性腺機能に対する影響については不明な点も多い。故に、重症感染症後の生殖機能および性腺機能を調べることは回復後の QOL の観点からも重要と考えられる。我々はこれまでにエンドトキシンに起因する急性炎症期では内因性 interleukin-18 (IL-18) が精巣生殖細胞のアポトーシスを誘導することを見出した (③)。また、男性ホルモン産生細胞であるライディッヒ細胞に対し、高濃度の IL-18 はアポトーシスを促進することを明らかにした (④)。しかし、精子形成・分化に関与し、血液精巣関門を形成するセルトリ細胞のアポトーシスと IL-18 との関係について解明には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究ではセルトリ細胞を lipopolysaccharide (LPS) および recombinant IL-18 (rIL-18) で刺激し、アポトーシスシグナル伝達経路関連因子の発現を検証した。

### 3. 研究の方法

マウスセルトリ細胞由来 TM4 細胞を LPS (0、200 および 1000 ng/mL) にて 0、1、6、12、18 および 24 時間刺激した。また、TM4 細胞を rIL-18 (0、0.1、1、10 および 100 ng/mL) にて 18 時間刺激した。各刺激濃度はライディッヒ細胞のアポトーシスを誘導した我々の既報を基準とした (④)。刺激後、細胞を回収し、リアルタイム RT-PCR 法にて IL-6、IL-18、IL-18 receptor 1 (IL-18r1)、tumor necrosis factor (Tnf) - $\alpha$ 、tumor necrosis factor receptor (Tnfr) 1、Fas、Fas ligand (FasL) および Fas associated death domain protein (Fadd) の発現を確認した。内部標準として Transferrin receptor (Tfrc) を用い、 $\Delta\Delta$ CT 法にて遺伝子発現量を算出した。western blotting 法にてアポトーシスの指標である cleaved caspase-3 の発現を確認した。細胞の viability は trypan blue 染色にて確認した。統計学的解析は Student's t-test もしくは Welch's t-test を用いた。統計学的有意水準は 5% 未満とした。

### 4. 研究成果

#### (1) LPS 刺激下でのセルトリ細胞のアポトーシス

セルトリ細胞の炎症に対する耐性を調べるため、TM4 細胞を LPS 刺激し、アポトーシスの誘導を調べた。LPS 刺激濃度にかかわらず、TM4 細胞の cleaved caspase-3 の発現は刺激後 24 時間経過しても増加せず (図 1A)、生存率も変わらなかった。アポトーシスシグナル伝達経路の一つであるデスレセプター経路関連因子の発現は LPS 刺激にて Fas mRNA の発現が増加し、刺激 24 時間後も高発現を維持した (図 1B)。FasL mRNA の発現は LPS 刺激 6 時間後または 24 時間後に有意に低下したが、他の時点ではサンプル間のバラツキが大きかった (図 1C)。Tnfr1 mRNA の発現は LPS 刺激によりほとんど影響を受けなかった (図 1D)。Fadd mRNA の発現は 200 ng/mL LPS 投与 1 時間後に有意に上昇し、LPS 投与後 6 時間以内にベースラインまで低下したが、1000 ng/mL LPS 刺激では 24 時間後に有意に高い値を示した (図 1E)。

次に LPS 刺激による TM4 細胞の炎症反応を確認した。LPS 刺激により IL-6 mRNA の発現は刺激 1 時間で増加し、24 時間経過するも高値を維持した (図 2A)。Tnf- $\alpha$  mRNA の発現は 200 ng/mL LPS 刺激 1 時間で上昇するも 18 時間以内にベースラインまで戻った (図 2B)。1000 ng/mL LPS 刺激では Tnf- $\alpha$  mRNA の発現は増加せず、刺激 12 時間および 18 時間では対照群よりも低下した (図 2B)。IL-18 mRNA の発現は LPS 刺激にて増加せず (図 2C)、IL-18r1 mRNA の発現は LPS 濃度依存的に低下した (図 2D)。

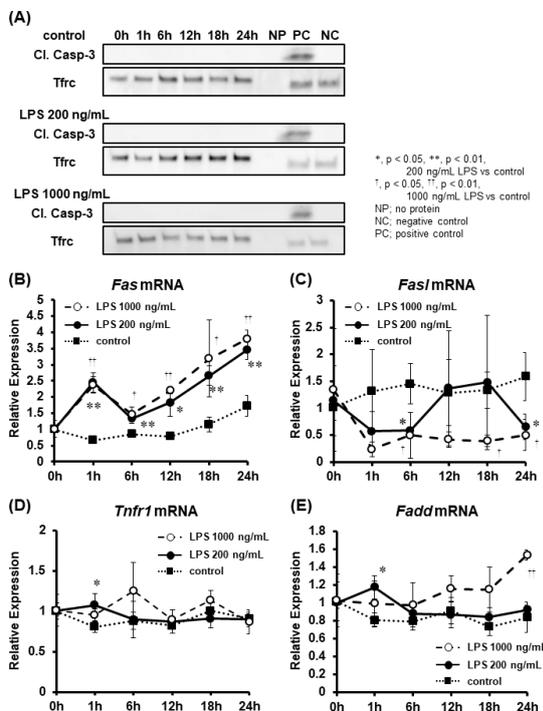
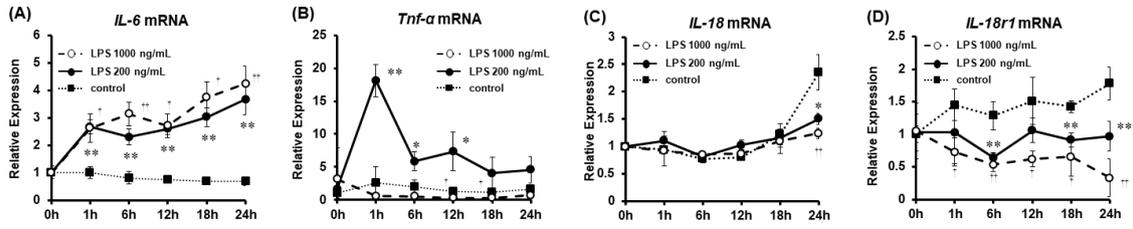


図1. LPS刺激下におけるセルトリ細胞のアポトーシス



\*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01, 200 ng/mL LPS vs control, †, p < 0.05, ††, p < 0.01, 1000 ng/mL LPS vs control

図2. LPS刺激下におけるセルトリ細胞の炎症反応

## (2) IL-18 刺激下でのセルトリ細胞のアポトーシス

セルトリ細胞のアポトーシスに対する IL-18 の役割を調べた。IL-18r1 mRNA の発現は 1、10 および 100 ng/mL rIL-18 刺激で増加した (図 3A)。IL-6 mRNA の発現は rIL-18 刺激にて増加した (図 3B)。rIL-18 にて刺激するも Tnf- $\alpha$  mRNA の発現は対照群と差はなく (図 3C)、Tnfr1 mRNA の発現は低下した (図 3D)。高濃度の rIL-18 (100 ng/mL) 刺激では FasL mRNA の発現が増加したが (図 3E)、Fas mRNA および Fadd mRNA の発現に変化はなかった (図 3F, G)。rIL-18 刺激では cleaved caspase-3 の発現は増加せず、アポトーシスは誘導されなかった (図 3H)。また、生存率にも変化はなかった。図 1~3 は我々の既報 (5) より引用した。

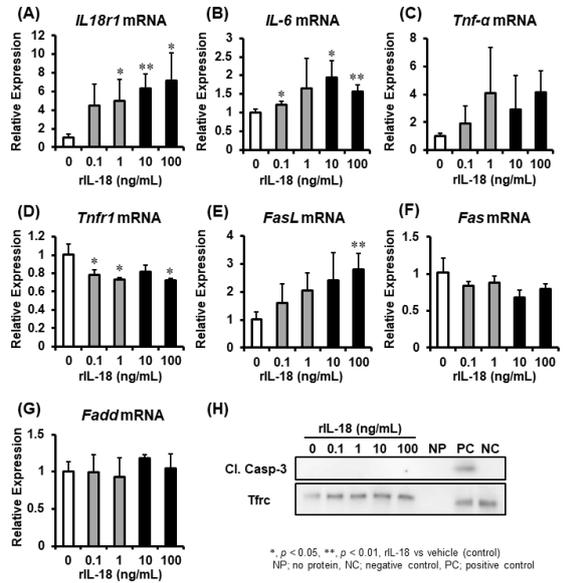


図3. rIL-18刺激下におけるセルトリ細胞のアポトーシス

## (3) 考察

本研究では LPS 刺激が TM4 細胞の炎症反応を誘起し、アポトーシスに対する感受性を高める可能性が示された。しかし、LPS 刺激ではアポトーシスを誘導するリガンドの産生を誘起せず、その結果、LPS 刺激による TM4 細胞のアポトーシスが誘導されなかった。さらに、本研究では rIL-18 が Tnfr1 の発現を低下させ、TM4 細胞のアポトーシスを誘導しないことが明らかとなった。我々は既報にて急性炎症時に精巣内で発現が上昇する過剰な IL-18 により生殖細胞およびライディッヒ細胞のアポトーシスが誘起される可能性を示してきた (3、4)。本研究ではセルトリ細胞はライディッヒ細胞や生殖細胞に比べ、外因性炎症刺激物質 (LPS) および内因性炎症刺激物質 (高濃度 rIL-18) の刺激に対し感受性が低く、いずれの刺激に対してもアポトーシスは誘導されなかった。このことは、FasL および Tnfr1 の発現低下と関連しており、刺激因子の種類によりアポトーシスを回避する機構が異なることが明らかとなった。本研究結果はライディッヒ細胞のアポトーシスが LPS と rIL-18 刺激により Fas/FasL/caspase-8 依存的および Tnf/Tnfr1/caspase-8 依存的経路を介して誘導されることを示した我々の既報 (4) と対照的であった。以上のことから、セルトリ細胞は、感染による炎症刺激やサイトカイン刺激によるアポトーシスに対し、ある程度の耐性を持つ可能性が示唆された。我々のこれまでの研究結果と合わせると、LPS や高濃度の IL-18 のような炎症刺激物質に対する感受性とアポトーシスへの反応は、精巣体細胞 (セルトリ細胞とライディッヒ細胞) の間に違いがあることが明らかとなった。故に、セルトリ細胞は炎症刺激に耐性があり、精巣の他の構成細胞よりも精巣の恒常性を維持する上で大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

### <引用文献>

- ① Needham DM, Davidson J, Cohen H, et al. Improving long-term outcomes after discharge from intensive care unit: report from a stakeholders' conference. Crit Care Med. 2012;40:502-09.
- ② Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet. 2020;395:200-11.

- ③ Inoue T, Aoyama-Ishikawa M, Kamoshida S, et al. Endogenous interleukin 18 regulates testicular germ cell apoptosis during endotoxemia. *Reproduction*. 2015;150:105–14.
- ④ Inoue T, Aoyama-Ishikawa M, Uemura M, et al. Interleukin-18 levels and mouse Leydig cell apoptosis during lipopolysaccharide-induced acute inflammatory conditions. *J Reprod Immunol*. 2020;141:103167.
- ⑤ Inoue T, Aoyama-Ishikawa M, Uemura M, et al. The role of death receptor signaling pathways in mouse Sertoli cell avoidance of apoptosis during LPS- and IL-18-induced inflammatory conditions. *J Reprod Immunol*. 2023;158:103970.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Taketo, Aoyama-Ishikawa Michiko, Uemura Mikiko, Kohama Keisuke, Fujisaki Noritomo, Murakami Hiromoto, Yamada Taihei, Hirata Junichi	4. 巻 158
2. 論文標題 The role of death receptor signaling pathways in mouse Sertoli cell avoidance of apoptosis during LPS- and IL-18-induced inflammatory conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103970 ~ 103970
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2023.103970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taketo Inoue, Michiko Aoyama-Ishikawa, Mikiko Uemura, Keisuke Kohama, Noritomo Fujisaki, Hiromoto Murakami, Taihei Yamada, Junichi Hirata.
2. 発表標題 The Role of Death Receptor Signaling Pathways in TM4 Sertoli Cell Avoidance of Apoptosis During Lipopolysaccharide- and Interleukin-18-induced Inflammatory Conditions.
3. 学会等名 21st World Congress on In Vitro Fertilization (ISIVF2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------