

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592762

研究課題名(和文)軟骨由来多機能因子カートデュージンによる骨代謝に関わるアンドロゲンの産生調節機構

研究課題名(英文)Cartducin, a cartilage-derived multifunctional factor, regulates testosterone production

研究代表者

前田 隆史(MAEDA, TAKASHI)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：80324789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス精巣ライディッヒ細胞において、カートデュージンの発現が生後3週齢より開始し、生後6～8週齢では最も強いことが分かった。マウス精巣由来ライディッヒ細胞株を用いてカートデュージンの作用を解析した結果、ライディッヒ細胞に対してテストステロンの産生促進作用が認められ、StARやP450sccなどのステロイド合成に関わる蛋白の発現も誘導されることが確認された。さらに、カートデュージンのテストステロンの産生促進作用にはcAMP/PKAシグナル伝達経路が関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We showed that Cartducin is expressed in testicular Leydig cells. Moreover, our results are the first evidence for a direct role of Cartducin in the control of testicular testosterone production. The stimulatory effect of Cartducin on testosterone production is linked to increase in key steroidogenic molecules through the cAMP/PKA signaling pathway. Our results demonstrate a physiological role for Cartducin in testicular steroidogenesis and provide novel insights in the intracellular mechanisms activated by this protein.

研究分野：医歯薬学-歯学-病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：カートデュージン 精巣 ライディッヒ細胞 アンドロゲン テストステロン

1. 研究開始当初の背景

(1) 自然免疫における補体系の最初の分子である C1q の C 末端部球状ドメインや腫瘍壊死因子 (TNF) と同様の構造をもつ一連の分子群が「C1q/TNF スーパーファミリー」として総称されるようになり注目されていた。これらの分子は多量体構造をとる分泌蛋白質であり、細胞外に分泌されることにより細胞間シグナルを伝達する分子として多彩な機能をもつことが知られていた。軟骨細胞分化誘導時に発現する新規遺伝子として研究代表者らが同定した分子は分子量 26-kDa の機能未知の分泌蛋白質をコードしており、その蛋白質を「軟骨から産生される分泌蛋白質」という意味で「Cartducin (カートデュエシン)」と名付けていた。カートデュエシンは、メタボリックシンドロームとの深い関わりを指摘されているアディポネクチンと構造上高いホモロジーをもち、アディポネクチンなどとともに「C1q/TNF スーパーファミリー」に属することが明らかになっていった。

(2) 研究代表者らは、カートデュエシンが局所的には骨形成促進因子として骨格の成長発育において重要な役割を果たしていることを主に明らかにしていたが、当時、例えば動物モデルで動脈硬化の進行と血液中のカートデュエシン濃度との逆相関が報告されるなど、血液中にも存在するサイトカインとしてその多様な作用が注目されていた。これらのことからカートデュエシンは、単に軟骨細胞から産生・分泌される局所的な骨格形成促進因子としてだけではなく、血液中にも存在し多様な生理的・病理的作用を持つ新たなサイトカインとしての機能があることが予想された。しかしながら、軟骨組織は無血管であることから、血液中のカートデュエシンが軟骨細胞から分泌されたものとは考えられなかった。そこで、マウスの主要な非骨格系器官・組織におけるカートデュエシン蛋白質の発現を免疫組織化学的に調べたところ (予備実験)、精巣間質に特異的な発現があることが判明した。

(3) 精巣間質は血管が豊富で、間質細胞 (ライディッチ細胞とよばれる) は性ホルモンのアンドロゲン (テストステロン) を産生することが分かっていた。アンドロゲンやエストロゲンといった性ホルモンは骨代謝に重要な役割を果たしていることが知られており、アンドロゲン (テストステロン) は主に精巣のライディッチ細胞から分泌されるが、近年注目されつつある男性骨粗鬆症は、加齢に伴うアンドロゲンの低下が病因のひとつではないかと考えられていた。骨組織に対するアンドロゲンの直接作用は不明な点が多かったが、骨芽細胞特異的なアンドロゲン受容体ノックアウトマウスの解析等の研究の進展から、アンドロゲンそのものに骨量維持作用

があることが明らかになってきていた。また、アンドロゲンの低下は、骨量の低下のみならずメタボリックシンドローム、糖尿病、動脈硬化、心血管病の発症リスクとしても重要であることが明らかになっていった。

(4) アンドロゲン (テストステロン) は骨の成熟と骨量の維持に重要であるが、ライディッチ細胞におけるカートデュエシンの役割の詳細については不明であった。しかしながら、「C1q/TNF スーパーファミリー」のメンバーのひとつでカートデュエシンとホモロジーがある分泌蛋白質 CTRP1 (C1q/TNF-Related Protein 1) が、副腎皮質のアルドステロン産生細胞に発現しており、アルドステロンの産生を促進することが報告されていたので、研究代表者らはカートデュエシンが精巣ライディッチ細胞において、テストステロンの産生を促進し、骨の成熟と骨量の維持に間接的にも関わっているのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

ライディッチ細胞におけるカートデュエシンのテストステロン産生促進作用については不明である。そこで本研究では、テストステロンの産生に対するカートデュエシンの役割を詳細に解明することを試みた。具体的には、(1)ライディッチ細胞のテストステロン産生に対するカートデュエシンの作用とセカンドメッセンジャー、(2)カートデュエシンのテストステロン産生促進作用に関わる分子群、(3)ライディッチ細胞におけるカートデュエシン遺伝子の発現調節機構、の各項目を明らかにして、骨代謝に重要なアンドロゲンの産生に関するカートデュエシンの新たな病態生理学的意義の理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試薬：マウス組換えカートデュエシン蛋白質は、HEK293 細胞を用いて C 末端に FLAG を付加した蛋白質として作製した。抗マウスカートデュエシン抗体は R&D 社から購入した。抗 StAR 抗体は Santa Cruz 社から購入した。抗 P450scc 抗体は Millipore 社から購入した。抗 CREB 抗体および抗リン酸化型 CREB 抗体は Cell Signaling 社から購入した。Protein Kinase A (PKA) の阻害剤である H89 は Calbiochem 社から購入した。

(2) 細胞株および細胞培養：マウス精巣ライディッチ細胞由来細胞株 TM3 は European Collection of Cell Cultures (ECACC) より供与された。TM3 細胞は 5% horse serum と 2.5% fetal bovine serum (FBS) を含む DMEM/F12 培地で 37℃ で培養した。シグナル伝達経路の活性化を調べる実験では、TM3 細胞

胞を血清使用量低減培地（1% horse serum と 0.5% FBS を含む Advanced DMEM/F12 培地）で 24 時間培養した後、10 µg/ml のカートデュエシン蛋白を添加し、5-60 分後に細胞を溶解して蛋白を回収した。PKA 阻害剤を用いた実験では、カートデュエシン蛋白を添加する 1 時間前に TM3 細胞を阻害剤で前処理した。

(3) RT-PCR：TM3 細胞および生後 8 週齢マウス精巣より QIAGEN 社の RNeasy キットを用いて total RNA を抽出した。ヒト精巣の total RNA は Ambion 社から購入した。2 µg の total RNA を QIAGEN 社の Omniscript キットを用いて逆転写して cDNA を合成した。カートデュエシン、StAR および P450scc の各遺伝子に対して特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。

(4) ウェスタンブロット：プロテアーゼ阻害剤とフォスファターゼ阻害剤を含む細胞溶解バッファーで TM3 細胞から蛋白を回収した。生後 8 週齢マウス精巣の蛋白は BioChain 社から購入した。各蛋白を SDS-PAGE にて分離後 PVDF 膜に転写し、室温で 120 分ブロッキングした。上記の抗体を 1 次抗体として用いて 4 時間で一晚反応させた。2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗 IgG 抗体を用い、シグナルの検出は化学発色法にて行った。

(5) 免疫組織化学染色：生後 0, 1, 3, 4, 6, 8 週齢のマウスから精巣を摘出し、各組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定後にパラフィン包埋した。パラフィン包埋組織を薄切したパラフィン切片を通常法にて脱パラフィン処理および親水処理を行った。続いてオートクレーブを用いて抗原賦活化処理と過酸化水素/メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの失活処理を行い、室温で 30 分ブロッキングした。抗マウスカートデュエシン抗体を 1 次抗体として用いて 4 時間で一晚反応させた。2 次抗体としてビオチン標識抗 IgG 抗体を用い、シグナルの検出は HRP 標識アビジン・ビオチンシステムを用いた化学発色法にて行った。

(6) DNA 合成能の測定：増殖期にある TM3 細胞を飢餓培地（0.3% FBS を含む Advanced DMEM/F12 培地）で 24 時間培養後、各濃度の組換えカートデュエシン蛋白を添加してさらに 24 時間培養した。培養終了 3 時間前に BrdU を添加し、細胞への取り込み量を測定した。

(7) テストステロンの測定：ほぼコンフルエントになった TM3 細胞を血清使用量低減培地（1% horse serum と 0.5% FBS を含む Advanced DMEM/F12 培地）で 24 時間培養した後、各濃度の組換えカートデュエシン蛋白を添加してさらに 24 時間培養した。培養終了後、培養上清を回収し、上清内のテストステ

ロン量を ELISA キットで測定した。

(8) 細胞内 cAMP の測定：ほぼコンフルエントになった TM3 細胞を無血清培地で 6 時間培養した。次に、0.5 mM IBMX を添加して 30 分間培養後、各濃度の組換えカートデュエシン蛋白を添加して TM3 細胞を刺激した。0.1 M HCl で細胞層を溶解し、回収した溶液上清内の cAMP 量を ELISA キットで測定した。

(9) 統計解析：Student's *t*-test を用いて、 $P < 0.05$ を有意とみなした。

4. 研究成果

(1) 精巣ライディッヒ細胞におけるカートデュエシンの発現：マウスの主要な非骨格系器官・組織におけるカートデュエシン遺伝子の発現を RT-PCR 法で調べたところ、生後 8 週齢マウス精巣に発現が認められた。成人のヒト精巣においてもマウスと同様にカートデュエシン遺伝子の発現が認められた。また、カートデュエシン蛋白の発現をウェスタンブロット法で調べたところ、生後 8 週齢マウス精巣で発現していることが明らかになった。精巣におけるカートデュエシンの発現が遺伝子レベルおよび蛋白レベルで確認できたため、次に生後 8 週齢のマウス精巣組織の切片を用いて免疫組織化学染色を行いカートデュエシンの局在を詳細に調べた結果、カートデュエシンは精巣組織間質にあるライディッヒ細胞の細胞質に局在が認められた。一方、精巣実質である生殖細胞、セルトリ細胞には認められなかった（図 1）。

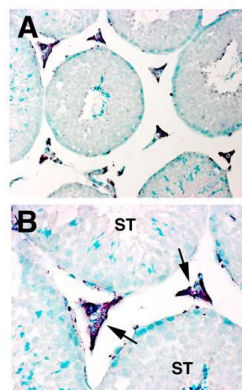


図 1 マウス精巣組織の免疫組織化学染色

さらに、生後 0, 1, 3, 4, 6 週齢のマウス精巣組織切片を用いてカートデュエシンの発現時期を調べた結果、生後 3 週齢（前思春期に相当）からカートデュエシンの発現が開始し、以降 4, 6 週齢（思春期に相当）を経て 8 週齢（成体期）までその発現が継続していることが明らかになった。

(2) ライディッヒ細胞の増殖に対するカートデュエシンの影響：カートデュエシンの生理作用として、軟骨細胞などの増殖を促進す

ることが知られている。そこで、TM3 ライディッヒ細胞に対してカートデューシンが増殖作用を持つかどうかを細胞培養系で調べた。しかしながら、カートデューシンはライディッヒ細胞に対して増殖促進作用を持たないことが判明した。

(3) ライディッヒ細胞に対するカートデューシンのテストステロン産生促進作用：哺乳類では男性ホルモンであるテストステロンは主に精巣ライディッヒ細胞で産生されている。カートデューシンが思春期以降に精巣のテストステロン産生細胞（ライディッヒ細胞）に発現していることから、カートデューシンがライディッヒ細胞に対してテストステロン産生促進作用を持つ可能性が考えられた。TM3 細胞培養系で調べた結果、カートデューシンはライディッヒ細胞におけるテストステロンの産生を濃度依存的に促進する作用を持つことが明らかになり、その効果は産生量が最大で約3倍になることが分かった（図2）。

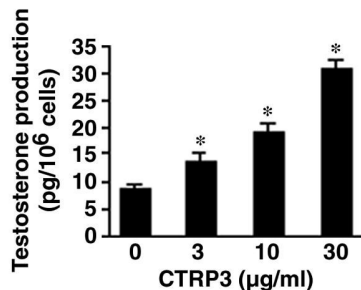


図2 カートデューシンのテストステロン産生促進作用

(4) カートデューシンのテストステロン産生促進作用に関わる分子群：ステロイド産生急性調節蛋白質（StAR）とシトクロム P450 コレステロール側鎖切断酵素（P450scc）はテストステロンなどのステロイドホルモン合成の律速段階の反応に関わる因子として知られている。ステロイドホルモンの材料となるコレステロールは、StAR によってライディッヒ細胞内のミトコンドリア外膜から内膜へと移行する。また、内膜へと移行したコレステロールは P450scc の酵素反応によりプレグネノロンに変換され、さらなる酵素反応を経てテストステロンが合成される。カートデューシンがライディッヒ細胞におけるテストステロン産生を促進したことから、細胞内でこれらの分子が実際に関わっているかどうかを遺伝子レベルおよび蛋白レベルで調べた。その結果、StAR および P450scc 遺伝子はカートデューシンの刺激後3時間で強い発現のピークを示し、以降は経時的に発現が減少することが明らかになった（図3A）。また、StAR および P450scc 蛋白はカートデューシンの刺激後3時間から発現の増加を示し、12時間から24時間の間でピークを示すこと

が明らかになった（図3B）。

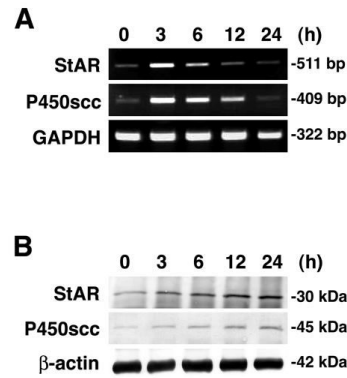


図3 カートデューシンによるライディッヒ細胞内の StAR と P450scc の発現誘導 (A) RT-PCR 法 (B) ウェスタンブロット法

これらの結果より、カートデューシンはステロイド合成に関わる StAR や P450scc などの蛋白質の発現をライディッヒ細胞内で誘導し、テストステロンの産生を促進することが判明した。

(5) カートデューシンのテストステロン産生促進作用に関わるセカンドメッセンジャーとシグナル伝達経路：サイクリック AMP (cAMP) / プロテインキナーゼ A (PKA) シグナル伝達経路はステロイドホルモンの合成や StAR の発現調節に関わる重要なシグナル伝達経路として知られている。したがって、カートデューシンのテストステロン産生促進作用に応答するライディッヒ細胞内のシグナル伝達経路として、この cAMP/PKA シグナル伝達経路が関わっている可能性が予想された。そこでまず始めに、TM3 ライディッヒ細胞を用いてカートデューシンの刺激に応答して細胞内の cAMP が上昇するかどうかを調べた。その結果、カートデューシンの培養系への添加によってライディッヒ細胞内の cAMP 量の増加が濃度依存的に認められた。また、細胞内 cAMP 量の経時変化についても同様に調べたところ、cAMP 量はカートデューシンの刺激後短時間で一過性に上昇し、その後減少を示した（図4）。

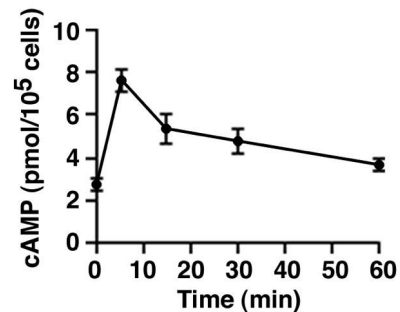


図4 カートデューシンによるライディッヒ細胞内の cAMP 量の経時変化

細胞内の cAMP 濃度が上昇すると、cAMP 依存性 PKA が活性化される。PKA は細胞内の物質代謝に関わる酵素や核内に存在する遺伝子の転写などに関わる蛋白質をリン酸化することでそのそれらの機能を発現させる。一般的にステロイドホルモン産生細胞では、リン酸化された cAMP 応答配列結合蛋白質 (CREB) が StAR や P450scc などのステロイドホルモン合成に関わる遺伝子の転写を促進する蛋白質として cAMP/PKA シグナル伝達経路の下流に存在することが知られている。実際、カートデューションがライディッヒ細胞内における StAR や P450scc 遺伝子の発現を著しく誘導することが本研究の実験で明らかになっていたので (図 3) カートデューションの刺激が cAMP 依存性 PKA を活性化して、続いてその下流の CREB がリン酸化されるのではないかと考えた。そこで、TM3 ライディッヒ細胞を用いてカートデューションの刺激に応答して細胞内の CREB がリン酸化されるかどうかをウェスタンブロット法で調べた結果、カートデューションの培養系への添加によって 5 分後からリン酸化された CREB の増加が検出され、1 時間後には元のレベルまで減少することが判明した (図 5)。

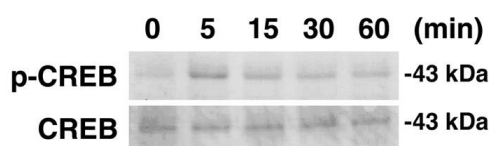


図 5 カートデューションによるライディッヒ細胞内のリン酸化された CREB の発現

さらに、PKA の特異的阻害剤である H89 を用いて PKA の活性化を阻害すると、カートデューションによるテストステロン産生促進作用がほぼ完全に抑制されることを見いだした。この結果から、カートデューションの刺激は PKA を介してライディッヒ細胞内に伝達されていることが明らかになった。

以上の結果より、カートデューションの刺激に応答してテストステロン産生促進に関わるライディッヒ細胞内のシグナル伝達経路が、cAMP/PKA 経路である可能性が強く示唆された。

(6) 総括：カートデューションはオートクリン/パラクリンの作用様式で精巣ライディッヒ細胞における思春期以降のテストステロン産生に対して cAMP/PKA シグナル伝達経路を介してポジティブに関わっている可能性

が示唆された。

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 8 件)

Akiyama, H., Otani, M., Sato, S., Toyosawa, S., Furukawa, S., Wakisaka, S. and Maeda, T. (2013) A novel adipokine C1q/TNF-related protein 1 (CTRP1) regulates chondrocyte proliferation and maturation through the ERK1/2 signaling pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 369: 63-71. (査読有)
DOI:10.1016/j.mce.2013.01.002

Kakimoto, N., Chindasombatjaroen, J., Tomita, S., Shimamoto, H., Uchiyama, Y., Hasegawa, Y., Kishino, M., Murakami, S. and Furukawa, S. (2013) Contrast-enhanced multidetector computerized tomography for odontogenic cysts and cystic-appearing tumors of the jaws: is it useful? *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 369: 63-71. (査読有)
DOI:10.1016/j.oooo.2012.09.082

Yamazaki, H., Yoshida, K., Yoshioka, Y., Shimizutani, K., Furukawa, S., Koizumi M. and Ogawa, K. (2013) High dose rate brachytherapy for oral cancer. *J. Radiat. Res.*, 54: 1-17. (査読有)
DOI:10.1093/jrr/rrs103

Otani, M. Kogo, M., Furukawa, S., Wakisaka, S. and Maeda, T. (2012) The adiponectin paralog C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) stimulates testosterone production through the cAMP/PKA signaling pathway. *Cytokine*, 58: 238-244. (査読有)
DOI:10.1016/j.cyto.2012.01.018

Akiyama, H., Yoshida, K., Shimizutani, K., Yamazaki, H., Koizumi, M., Yoshioka, Y., Kakimoto, N., Murakami, S., Furukawa, S. and Ogawa, K. (2012) Dose reduction trial from 60 Gy in 10 fractions to 54 Gy in 9 fractions schedule in high-dose-rate interstitial brachytherapy for early oral tongue cancer. *J. Radiat. Res.*, 53: 722-726. (査読有)
DOI:10.1093/jrr/rrs027

Kakimoto, N., Murakami, S., Nakatani, A., Yoshioka, Y., Shimizutani, K. and Furukawa, S. (2012) Electron beam

radiotherapy for tongue cancer using an intra-oral cone. *Oral Oncol.*, 48: 463-468. (査読有)
DOI:10.1016/j.oraloncology.2011.12.008

Yokohama-Tamaki, T., Maeda, T. and Shibata, S. (2011) Function of CTRP3/cartducin to Meckel's cartilage and developing condylar cartilage in fetal mouse mandible. *J. Anat.*, 218: 517-533. (査読有)
DOI:10.1111/j.1469-7580.2011.01354.x

Shimamoto, H., Kishino, M., Okura, M., Chindasombatjaroen, J., Kakimoto, N., Murakami, S. and Furukawa, S. (2011) Radiographic features of a patient with both cemento-ossifying fibroma and keratocystic odontogenic tumor in the mandible: a case report and review of literature. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 112: 798-802. (査読有)
DOI:10.1016/j.tripleo.2011.06.025

〔学会発表〕(計3件)

應谷昌隆、前田隆史、脇坂 聡、古郷幹彦：精巢ライディッヒ細胞における C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) の発現とテストステロン産生促進作用、第 67 回日本口腔科学会(栃木)、2013 年 5 月 23 日

應谷昌隆、前田隆史、脇坂 聡、古郷幹彦：精巢ライディッヒ細胞における C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) の発現とテストステロン産生促進作用、第 114 回大阪大学歯学会(大阪)、2012 年 7 月 5 日

前田隆史、脇坂 聡：血管平滑筋細胞における C1q/TNF ファミリー分泌蛋白 CTRP3/cartducin の TGF-beta1 による発現誘導と増殖促進作用、第 53 回歯科基礎医学会(岐阜)、2011 年 10 月 2 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/list.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 隆史 (MAEDA, Takashi)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：8 0 3 2 4 7 8 9

(2)研究分担者

古川 惣平 (FURUKAWA, Souhei)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：8 0 1 7 3 5 2 4