

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20391

研究課題名(和文) IL-18は全身性急性炎症に起因する精巣炎治療ターゲットとなりうるか

研究課題名(英文) Interleukin-18: a novel therapeutic target to prevent orchitis during endotoxemia

研究代表者

井上 岳人 (Inoue, Taketo)

兵庫医科大学・医学部・研究生(研究員)

研究者番号：30772652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：IL-18が全身性の急性炎症期と炎症後の回復期において、精巣生殖細胞のアポトーシスシグナル伝達経路関連因子の発現を制御し、アポトーシスの誘導と抑制を調整する働きを明らかにした。また、急性炎症下にてライディッヒ細胞のIL-18発現は増加せず、マクロファージのIL-18発現が増加することが明らかとなり、急性炎症後、精巣に浸潤した免疫細胞から産生される過剰な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唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性の急性炎症後、精巣に浸潤した免疫細胞から産生される過剰な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唆される結果が得られた。従って、急性炎症時の体内のIL-18の動態をモニタリングすることで、生殖機能不全ならびに性腺機能不全のリスクを回避するための治療方針を決定する重要なツールとなる可能性がある。故に、高度生殖医療や重症病態後のQOL改善に貢献できるのではと考えている。

研究成果の概要(英文)：The role of endogenous IL-18 in testicular germ cell apoptosis may shift from pro-apoptotic to anti-apoptotic depending on the inflammatory stage by regulating expression of apoptotic mediators and controlling activation of caspase-3, caspase-8, and caspase-9. Leydig cells do not actively synthesize and activate IL-18 despite induction of the immune response under inflammatory conditions. In contrast, a macrophage cell line produced large amounts of IL-18 after LPS stimulation. Our findings support the hypothesis that inflammation leads to an increase in immune-cell-derived IL-18 in the testes and suggest that overproduction of IL-18 during acute inflammatory conditions in vivo may harmful to germ cells and Leydig cells.

研究分野：生殖免疫学、生殖医学

キーワード：生殖細胞 ライディッヒ細胞 アポトーシス インターロイキン 18 急性炎症 デスレセプター経路
ミトコンドリア経路 精巣

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症病態治療後の認知能力や身体機能(呼吸障害や神経筋障害など)の低下は長期のアウトカムに関連する post-intensive care syndrome (PICS) として認識されている(①、②)が、生殖機能および性腺機能に対する影響は不明である。雄性生殖器への病原菌の感染や炎症は精子の機能不全や形成不全を引き起こし(③)、男性不妊の原因の15%を占める(④)と言われている。また、エンドトキシンで誘起された全身性炎症下では精巣でのステロイドホルモンの合成や精子形成が阻害されることが報告されている(⑤)。男性敗血症患者の19.2%(⑥)を18-45歳(本邦における男性の第一子出生時平均年齢:32.3歳)(⑦)が占めており、精巣炎に起因する生殖細胞のアポトーシスの機序を解明することは男性不妊症や精子形成障害の予防や軽減、改善といった観点から重要である。我々はエンドトキシンに起因する急性炎症期では内因性 IL-18 が精巣生殖細胞のアポトーシスを誘導するものの、急性炎症後の回復期では内因性 IL-18 が精巣生殖細胞のアポトーシスを抑止することを明らかにしてきた(⑧)。

2. 研究の目的

<全体の構想>本研究は IL-18 の急性炎症下における生殖細胞ならびに精巣内の各細胞に対する役割を明らかにし、生殖機能不全および性腺機能不全の治療応用へと展開するための研究基盤を確立する。

<本研究の具体的な研究目的>

- 精巣生殖細胞およびライディッヒ細胞のアポトーシスシグナル伝達経路への IL-18 の役割を解析する。
- 精巣ライディッヒ細胞のステロイドホルモン産生能と IL-18 との関係性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 雄性9-10週齢 C57BL/6J (wild type; WT) および B6.129P2-Il18^{tm1Aki/J} (IL-18 knock out; IL-18KO) マウスに lipopolysaccharide (LPS) を投与した。LPS 投与後1時間毎のマウスの行動観察をし、昏睡状態やその後の回復状態を確認した。投与12時間後(急性炎症期モデル)および48時間後(回復期モデル)に精巣を採取し、デスレセプター経路およびミトコンドリア経路に関与する因子の発現を確認し、IL-18のアポトーシスシグナル伝達経路に対する関係性を解析した(リアルタイム RT-PCR、western blotting 法、免疫組織化学染色法)。

(2) マウスライディッヒ細胞由来 TM3 細胞を LPS および recombinant IL-18 (rIL-18) で刺激し、IL-18 がライディッヒ細胞のアポトーシスとその関連因子およびステロイドホルモン産生能への影響を解析した (LPS 濃度: 0, 200, 1000 ng/mL、刺激時間: 0, 1, 6, 12, 24, 48 時間、rIL-18 濃度: 0, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL、刺激時間: 12 時間)。また、LPS 刺激下でのライディッヒ細胞およびマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞のサイトカイン産生能を確認した。

4. 研究成果

(1) 急性炎症期における精巣生殖細胞に対する IL-18 の働き

WT マウス及び IL-18KO マウスに LPS を腹腔内投与し全身性の急性炎症モデルを作製し精巣を解析した。炎症期、回復期の判断はマウスの行動や状態、血漿 TNF- α 及び IL-6 値で確認した。我々の既報では急性炎症期では WT/LPS 群で精原細胞や精母細胞にて cleaved caspase (CC) -3 陽性細胞率は増加したが、KO/LPS 群では陽性細胞率は増加せずアポトーシスが抑制された(⑧)。デスレセプター経路関連因子の発現は KO/LPS 群の精巣では TNF- α /TNFR1、Fas/FasL、FADD の発現が抑制されており、CC8 陽性かつ CC3 陽性細胞率も増加しなかった(図1)。従って、炎症期において内因性 IL-18 がデスレセプター経路に関連する TNF- α /TNFR1、Fas/FasL、FADD の発現を促進し、caspase-8 を介し生殖細胞のアポトーシスを誘導することが示された。

ミトコンドリア経路関連因子の発現は KO/LPS 群の精巣にて tBid タンパク質の発現が抑制されており、CC9 陽性かつ CC3 陽性細胞率も増加しなかった(図1)。従って、炎症期において、内因性 IL-18 は pro-apoptotic に作用する tBid の発現を促進し、caspase-9 経路を介し精巣生殖細胞のアポトーシスを誘導することが示された。tBid の発現増加は IL-18 によって発現が亢進した Fas/FasL-caspase-8 が Bid の活性化を促進させたことに起因すると示唆された。

また、内因性 IL-18 は iNOS の発現を誘起したことから(図1)、我々は iNOS の増加が精巣における過剰な NO 産生を誘導

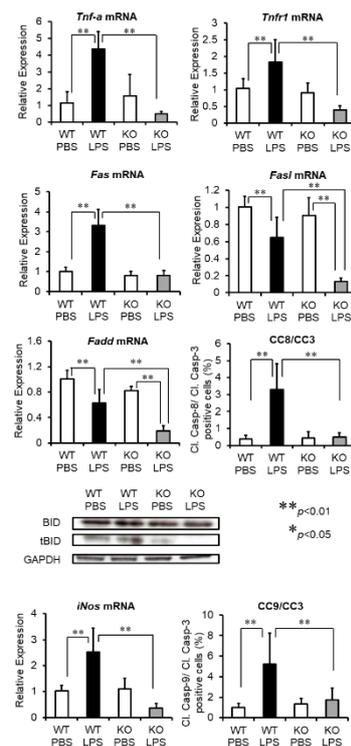


図1. 急性炎症期における精巣生殖細胞のアポトーシス

すると考えた。過剰な NO はミトコンドリアの細胞膜を破綻させ、その結果 caspase-9 経路を介し生殖細胞のアポトーシスを誘起した可能性が示唆された。以上のことより炎症期において、内因性 IL-18 は caspase-8 及び caspase-9 依存経路を介し生殖細胞のアポトーシスを促進することが示唆された。

(2) 急性炎症後の回復期における精巣生殖細胞に対する IL-18 の働き

一方、急性炎症後の回復期において内因性 IL-18 が Fas、FADD 及び TNFR1 の発現を抑制することにより caspase-8 依存経路を介し生殖細胞のアポトーシスを抑制した (図 2)。IL-18 は caspase-9 依存経路に関与する iNOS および Bid の発現には影響しなかった。生殖細胞のアポトーシスは WT/LPS 群で増加しなかったが KO/LPS 群では増加し、精原細胞や精母細胞、精子細胞の欠落が見られた。マウス精巣において IL-18 は生殖細胞、ライディッヒ細胞および常在型マクロファージで高発現しており、オートクライン/パラクラインに精巣細胞に働きかけ、精巣機能を調整していると考えられている。また、精巣細胞由来の IL-18 は感染や炎症による精子形成への悪影響を軽減させる可能性が報告されている (9)。KO/LPS 群では回復期に内因性 IL-18 による精巣の恒常性維持が正常に機能せず、生殖細胞のアポトーシスが増加したと推察した。回復期の結果は内因性 IL-18 が炎症期にて生殖細胞のアポトーシスを促進した結果と対称的であり、内因性 IL-18 が炎症のステージに依存し、アポトーシスを調整していると考えられた。

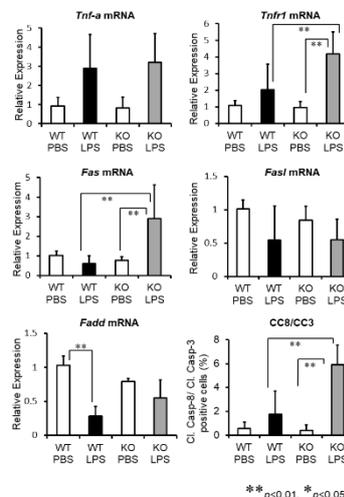


図2. 急性炎症期後の回復期における精巣生殖細胞のアポトーシス

(3) 炎症刺激下でのマウスライディッヒ細胞のアポトーシスと IL-18 産生能

マウスライディッヒ細胞由来 TM3 細胞を LPS で刺激し、ライディッヒ細胞のアポトーシスと炎症反応を経時的に解析した。ライディッヒ細胞の CC3 の発現は刺激 12 時間以降、発現が増加しアポトーシスが誘導された。デスレセプター経路関連因子の発現は LPS 刺激 12 時間後 TNFR1、Fas 及び CC8 の発現が増加した。FasL、FADD の発現は非刺激群と差はなかった (図 3)。従って、LPS 刺激により Fas、TNF- α 、TNFR1、CC8 の発現が増加し、caspase-3 を活性化し、ライディッヒ細胞のアポトーシスが誘導された可能性が示唆された。ライディッヒ細胞の主な役割であるステロイドホルモン (テストステロン) 合成に関与する StAR の発現は CC3 の発現が増加する 12 時間以降で低下した (図 3)。従って、炎症刺激下においてライディッヒ細胞のアポトーシスが生じステロイドホルモンの産生能が低下している可能性が示唆された。

LPS によるライディッヒ細胞の炎症反応を確認すると LPS 刺激後 1 時間にてライディッヒ細胞の TNF- α および IL-6 の発現は一過性に上昇した。一方で、IL-18 の発現は非刺激群と比較し、LPS 群で低値を示し、刺激 12 時間で統計学的に有意に低値を示した (図 3)。従って、ライディッヒ細胞では炎症時に積極的に IL-18 を産生する機能は無いと考えられた。

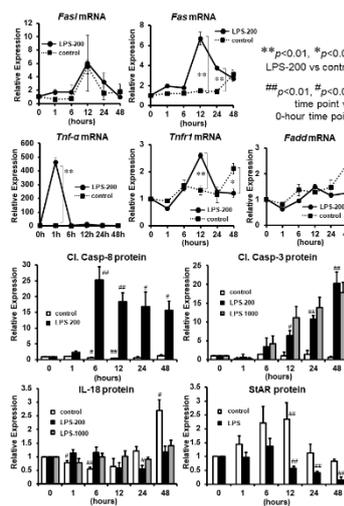


図3. 炎症期刺激下におけるライディッヒ細胞のアポトーシス

(4) ライディッヒ細胞と IL-18 刺激

そこで、急性炎症時に精巣内で上昇する IL-18 を想定して (10、11)、rIL-18 にてライディッヒ細胞を刺激した。ライディッヒ細胞を低濃度 (0.1 および 1 ng/mL) ならびに高濃度 (10 および 100 ng/mL) の rIL-18 で 12 時間刺激し、その影響を解析した。高濃度の rIL-18 はライディッヒ細胞のデスレセプター経路関連因子の Fas、TNF- α 、FADD、CC8 の発現を増加させ、CC3 の発現を活性化し、アポトーシスを誘起した。同時に高濃度の rIL-18 刺激によってライディッヒ細胞の StAR の発現が低下することが明らかとなった。以上のことより、急性炎症下における精巣内の過剰な IL-18 は生殖細胞のアポトーシスと同様に精巣の間質細胞に対してもアポトーシスを誘導し、ステロイドホルモン合成を低下させるのではないかと考えられた。

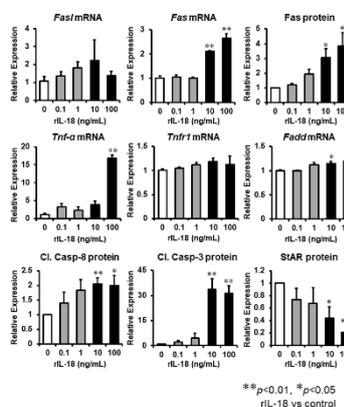


図4. rIL-18 に対するライディッヒ細胞のアポトーシス

(5) マクロファージと IL-18

急性炎症下における精巣では免疫細胞の浸潤が認められる (12)。マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を LPS にて刺激し、サイトカイン産生能を解析した。LPS 刺激 6 時間後よりマ

クロファージの IL-18 発現が増加した。従って、炎症刺激下の精巣内の IL-18 の増加は、精巣内に浸潤するマクロファージなど免疫細胞に由来することが示唆された。

(6) まとめ

内因性 IL-18 は全身炎症のステージにより pro-apoptotic から anti-apoptotic にシフトする可能性が示唆された。IL-18 の役割は産生細胞により異なっており、急性炎症下の精巣においても内因性 IL-18 は産生細胞により作用が異なると推察した。

つまり、急性炎症期において精巣への免疫系の細胞が浸潤し、浸潤した免疫細胞由来の IL-18 が pro-apoptotic に作用し生殖細胞やライディッヒ細胞のアポトーシスを誘導する可能性が考えられた。急性炎症後の回復期では、侵襲反応が減衰し、浸潤していた免疫細胞が減少し、それに伴い浸潤した免疫細胞由来の IL-18 も低下する。精巣において、IL-18 は恒常的に発現しているため、精巣由来の IL-18 が anti-apoptotic に働き生殖細胞のアポトーシスを抑制した可能性が示唆された。このことより精巣に浸潤する免疫細胞由来の過剰な IL-18 を抑制することは全身性炎症下に起因する精巣炎の新たな治療ターゲットになりうるのではないかと考えている。つまり、急性炎症時の体内の IL-18 の動態をモニタリングすることで、生殖機能不全ならびに性腺機能不全のリスクを回避するための治療方針を決定する重要なツールとなる可能性がある。故に、高度生殖医療や重症病態後の QOL 改善に貢献できるのではと考えている。

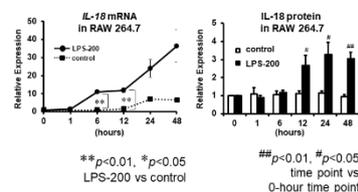


図5. 炎症期刺激下におけるマクロファージのIL-18産生

<引用文献>

- ① Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, et al. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:683-93.
- ② Stevens RD, Dowdy DW, Michaels RK, et al. Neuromuscular dysfunction acquired in critical illness: a systematic review. *Intensive Care Med.* 2007;33:1876-91.
- ③ Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, et al. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol.* 2005;48:703-11.
- ④ Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, et al. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia.* 2008;40:84-91.
- ⑤ Reddy MM, Mahipal SV, Subhashini J, et al. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod Toxicol.* 2006;22:493-500.
- ⑥ Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection.* 2009;37:222-32.
- ⑦ 厚生労働省大臣官房統計情報部. 平成 26 年 我が国の人口動態 平成 24 年までの動向. 2014. 1-59,
- ⑧ Inoue T, Aoyama-Ishikawa M, Kamoshida S, et al. Endogenous interleukin 18 regulates testicular germ cell apoptosis during endotoxemia. *Reproduction.* 2015;150:105-14.
- ⑨ Strand ML, Wahlgren A, Svechnikov K, et al. Interleukin-18 is expressed in rat testis and may promote germ cell growth. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;240:64-73.
- ⑩ Abu Elhija M, Lunenfeld E, Eldar-Geva T, et al. Lipopolysaccharide increased the expression levels of IL-18, ICE and IL-18 R in murine Leydig cells. *Am J Reprod Immunol.* 2008;60:151-9.
- ⑪ Abu Elhija M, Lunenfeld E, Huleihel M. LPS increases the expression levels of IL-18, ICE and IL-18 R in mouse testes. *Am J Reprod Immunol.* 2008;60:361-71.
- ⑫ Gerdprasert O, O'Bryan MK, Muir JA, et al. The response of testicular leukocytes to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population. *Cell Tissue Res.* 2002;308:277-85.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 井上岳人、石川倫子、植村弥希子、山下勇人、古賀由華、宇佐美眞、小谷穰治.	4. 巻 20
2. 論文標題 精巣男性ホルモン産生細胞におけるアポトーシスへのエンドトキシン及びIL-18の関与	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 エンドトキシン・自然免疫研究	6. 最初と最後の頁 31-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 井上岳人
2. 発表標題 全身性急性炎症後の雄性不妊からいかに妊娠・出産へつなげるか～基礎研究・臨床研究の知見をまじえて～
3. 学会等名 第22回神戸MARE研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taketo Inoue, Michiko Aoyama-Ishikawa, Mikiko Uemura, Hayato Yamashita, Yuka Koga, Makoto Usami, Joji Kotani
2. 発表標題 High concentrations of interleukin-18 induce Leydig cell apoptosis and steroidogenesis disorder
3. 学会等名 32nd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上岳人、石川倫子、鴨志田伸吾、植村弥希子、宇佐美眞、小谷穰治.
2. 発表標題 interleukin-18の動態から見るマウス全身性炎症後の雄性不妊
3. 学会等名 第45回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taketo Inoue, Michiko Ishikawa, Mikiko Uemura, Hayato Yamashita, Yuka Koga, Makoto Usami, Joji Kotani.
2. 発表標題 High-dose interleukin-18 induces mice Leydig cell apoptosis and reduces steroidogenesis.
3. 学会等名 The 11th Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine (PSRM2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上岳人、石川倫子、植村弥希子、山下勇人、古賀由華、宇佐美眞、小谷穰治
2. 発表標題 精巣男性ホルモン産生細胞におけるアポトーシスへのエンドトキシン及びIL-18の関与
3. 学会等名 第22回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Taketo Inoue, Michiko Ishikawa, Mikiko Uemura, Hayato Yamashita, Yuka Koga, Makoto Usami, Joji Kotani
2. 発表標題 High-dose interleukin-18 induces mice Leydig cell apoptosis via the death receptor pathway
3. 学会等名 The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 井上岳人、石川倫子、植村弥希子、山下勇人、古賀由華、小谷穰治、宇佐美眞
2. 発表標題 高濃度のinterleukin-18はデスレセプター経路を介しライディッヒ細胞アポトーシスを誘導する
3. 学会等名 第34回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 井上岳人、石川倫子、植村弥希子、山下勇人、古賀由華、小谷穰治、宇佐美眞
2. 発表標題 高濃度のinterleukin-18はライディッヒ細胞のアポトーシスを誘起する
3. 学会等名 第23回外科侵襲とサイトカイン研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Taketo Inoue, Michiko Ishikawa, Mikiko Uemura, Hayato Yamashita, Yuka Koga, Atsunori Nakao, Joji Kotani, Makoto Usami
2. 発表標題 Interleukin-18 and apoptosis of mice Leydig cell during lipopolysaccharide-induced acute inflammatory condition
3. 学会等名 32nd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 井上岳人、石川倫子、植村弥希子、山下勇人、古賀由華、小谷穰治、宇佐美眞
2. 発表標題 interleukin-18はデスレセプター経路を活性化し、ライディッヒ細胞のアポトーシスを誘導する
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会 第35回学術大会
4. 発表年 2016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
---------------------------	-----------------------	----