

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791111
 研究課題名（和文） 造精機能障害における精巣内細胞間調節機構因子としての NO の役割と新たな治療戦略
 研究課題名（英文） Specific components of NO pathways may provide novel therapeutic targets for interventional use to prevent testicular dysfunction
 研究代表者
 石川 智基 (ISHIKAWA TOMOMOTO)
 神戸大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：00432576

研究成果の概要：

精巣内でのいくつかの病態において proinflammatory cytokine である IL-1 β が上昇する。セルトリ細胞においてその IL-1 β は phosphorylated JNK を活性化したが、活性酸素は増加させなかった。IL-1 β 刺激により NO 濃度が 6 時間以内に増加を示したが、これらの NO 濃度増加は SP600125 (JNK 阻害剤) 添加により阻害された。また IL-1 β 刺激によりセルトリ細胞内の iNOS 蛋白、mRNA 量は有意に増加し、この増加は SP600125 の添加により有意に阻害された。FSH 刺激では NO 濃度の上昇は見られなかった。セルトリ細胞において IL-1 β は JNK 経路を活性化し、NO 濃度が上昇する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	330,000	2,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：精子形成、セルトリ細胞、NO、サイトカイン、

1. 研究開始当初の背景

男性不妊の原因はその多くが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。NO に関してはさまざまな細胞においての作用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。

2. 研究の目的

精子形成過程の中で、精巣内に存在する細胞間でさまざまな情報伝達が行われ、造精機能を保っていると考えられる。その機能調節には、視床下部-下垂体-精巣軸からの調節とは別に、精巣局所での

paracrine/autocrine機構が存在すると考えられ、精子形成までの分化機構は、支持細胞である体細胞のセルトリ細胞が非常に重要な役割を果たしている。この細胞からのエストロジオール、乳酸、トランスフェリンなどの分泌物は、精細胞の分化調節に影響を与える。それらの分泌物の産生調節には、インターロイキン(IL)を含むサイトカインや成長因子、バクテリアエンドトキシン(LPS)などが関与する。このうちIL-1 β はセルトリ細胞自身からも分泌されており、その分泌は、卵胞刺激ホルモン(FSH)による刺激、また精巣内の急性炎症が関与していることがわかっている。IL-1 β に関してはさまざまな細胞において分泌物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この理由として挙げられる。

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とアポトーシスの関連が報告されており、精細胞においてもNOがアポトーシスに強く関与している可能性がある。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。

今回我々は、精製分離したラットセルトリ細胞を用い、NOならびにNOSの発現について解析し、シグナル伝達の経路について検討を加えた。免疫応答のバランスが崩れることによる精巣内の障害を、酸化ストレスと活性酸素、活性窒素、フリーラジカルとの関与を通して、分子細胞、組織及び個体レベルで明らかにすることを主眼としている。本研究の最終的な目的は、精巣局所でのparacrine/autocrine機構の制御因子の一つとしてNOに注目し、IL-1 β によるセルトリ細胞の機能調節機構を解明することにより、造精機能障害に対する治療法確立を目指すことである。

3. 研究の方法

in vitro での検討：分画培養精細胞へのNOの影響

1) セルトリ細胞の分離、培養

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する。

2) ホルモン、cAMP、Growth factor およびサイトカイン刺激におけるセルトリ細胞からのNOの分泌

各種ホルモン(FSH, hCG)、cAMP inducer (Forskolin)、Growth Factor (TNF α など)やサイトカイン(IL-1 α , IL-1 β , IL-6など)

の刺激により、セルトリ細胞から産生されるNO量(培養上清中のNitrite+Nitrate)をGriess法にて測定する。

3) NO増加およびNOS阻害剤の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Growth factor およびサイトカイン刺激に加え、NOS阻害剤(L-NMMA)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レベルでの発現について検討する。またセルトリ細胞において乳酸、トランスフェリンの産生能についても検討を加える。

セルトリ細胞においては、乳酸、トランスフェリンの産生能をELISA法により測定する。これらは精細胞の分化に大きく関わっていると考えられている。またセルトリ細胞においてNO増加を引き起こしたGrowth factor およびサイトカイン刺激後の、iNOS, eNOSの各細胞内の局在を明らかにするため、それぞれの抗体を用いて蛍光染色を行う。

4) フローサイトメトリーを用い、各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する(この方法は近年開発されたもので、以前は細胞外(培養液中)の濃度の同定のみしか出来なかった)。

4. 研究成果

リン酸化JNK、COX-2の活性化

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 β (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 β 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 β 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 β 刺激と同時にJNK活性阻害剤であるSP600125 (10 μ M)を添加し、比較を行った。SP600125はIL-1 β 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 β 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 β 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H₂O₂刺激と比較した。さまざまな細胞においてIL-1 β 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)。

セルトリ細胞における IL-1 β 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 β 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 β 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。IL-1 β 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 μ 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。

セルトリ細胞において IL-1 β 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 β 刺激によりNO濃度の増加が見られたが、IL-1 β 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 β 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)。

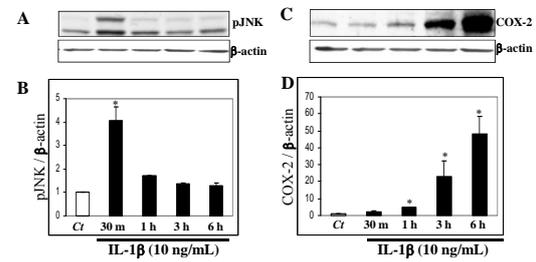


図1

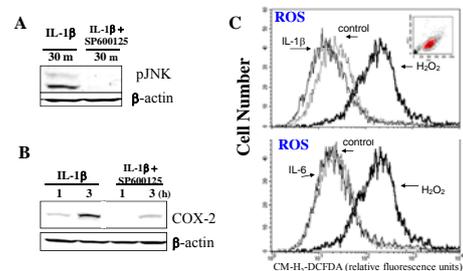


図2

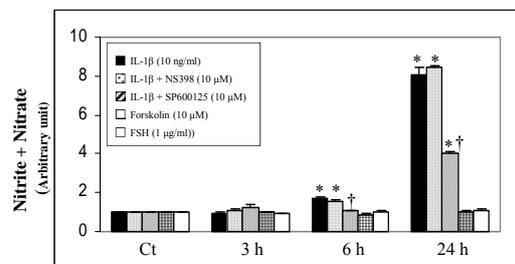


図3

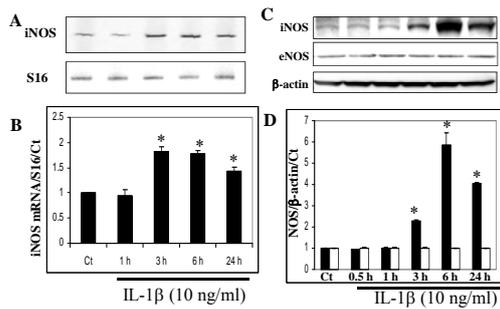


図4

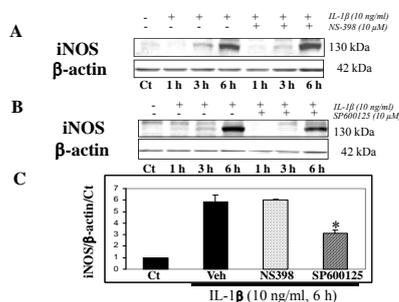


図5

まとめ

セルトリ細胞において IL-1β 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。

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 3 件)

1. Kondo Y, Ishikawa T, Yamaguchi K, Yada T, Fujisawa M 2008 Oral Administration of Tetrahydrobiopterin Attenuates Testicular damage by Reducing Nitric Oxide Synthase Activity in a Cryptorchid Mouse Model. *J Androl* 29: 153-63. 査読有り
2. Yamaguchi K, Ishikawa T, Kondo Y, Fujisawa M 2008 Cisplatin Regulates Sertoli Cell Expression of Transferrin

and Interleukins. *Mol Cell Endocrinol* 283: 68-75. 査読有り

3. 研究フロンティア セルトリ細胞において IL-1β 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雑誌 12; 21-25, 2007 石川智基, PATRICIA L. MORRIS、藤澤正人 査読無し

[学会発表] (計 5 件)

1. 2007/2/24 福岡市 第 16 回泌尿器科分子・細胞研究会 [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] 石川智基, Patricia L. Morris, 藤澤正人

2. 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 山口耕平、石川智基、近藤有、阪本祐一、原口貴裕、武中篤、藤澤正人 第 12 回日本生殖内分泌学会学術集会 (2007. 10. 24-26 東京)

3. セルトリ細胞におけるプロスタグランジンの paracrine/autocrine 作用 石川智基、山口耕平、近藤有、阪本祐一、原口貴裕、武中篤、藤澤正人 第 26 回日本アンドロロジー学会総会 (2007. 7. 5-6 浦安)

4. Ishikawa T, Morris PL. [Interleukin-1β Signals Through a cJun-N-terminal kinase (JNK)-dependent Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Production Pathway in Sertoli Epithelial Cells] 2008/May 17-22 AUA annual meeting in Anaheim USA

5. Yamaguchi K, Ishikawa T, Kondo Y, Sakamoto Y, Takenaka A, Fujisawa M [Cisplatin induces interleukin (IL)-1β and IL-6 expression through a cyclooxygenase 2 regulation of prostaglandin (PG)E2, PGF2α, PGD2, and PGI2 production pathway in rat Sertoli cells] 2007/Oct 13-17 ASRM annual meeting USA

〔図書〕（計 1 件）

「産婦人科治療」 精巣内の局所調節機構
Regulation of Testicular Function:
Signaling Molecules and Cell-Cell
Communication 2008 年 4 月 P1648

石川智基、藤澤正人

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川智基 (ISHIKAWA TOMOMOTO)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00432576

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者