

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592386

研究課題名(和文) アルコールはセルトリ細胞のオートファジーを増加させる

研究課題名(英文) Enhanced mitophagy in Sertoli cells of ethanol-treated rats

研究代表者

Eid Nabil A. S. (Eid, Nabil)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：50570165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：慢性アルコール中毒により胚細胞である精細胞はアポトーシスで死滅する。一方、体細胞であり支持細胞であるセルトリ細胞には空胞変性と脂肪滴の蓄積が起こるが細胞死には陥らない。すなわち、セルトリ細胞は活性酸素によりダメージを受けたミトコンドリアをミトファジーで積極的に処理し、蓄積された脂肪滴をオートファジーで処理し生存に必要な栄養分とすることで生き延びている。

研究成果の概要(英文)：Although chronic ethanol consumption results in Sertoli cell vacuolization and augmented testicular germ cell apoptosis, Sertoli cells are resistant to apoptosis. Electron microscopy revealed the presence of large numbers of autophagic vacuoles (AVs) in Sertoli cells of ethanol-treated rats (ETR) compared to few AVs in control testes. Most of the AVs in Sertoli cells of ETR enveloped and sequestered damaged and abnormally shaped mitochondria, without cytoplasm, indicating mitochondrial autophagy (mitophagy). Immunohistochemical staining of LC3 and LAMP-2 (marker of AVs) were mainly observed in Sertoli cells of ETR, with weaker expression in control testes. Via the deletion of pro-apoptotic damaged mitochondria, enhanced Sertoli cell mitophagy in ETR may be an anti-apoptotic mechanism that is essential for spermatogenesis.

研究分野：医歯薬

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：精巣 セルトリ細胞 慢性アルコール中毒 オートファジー アポトーシス ミトファジー 脂肪滴

1. 研究開始当初の背景

(1) アルコールの過剰摂取により性交不能症、精巣萎縮、不妊症になることは慢性的アルコール中毒症の男性で知られている (Van Thiel, 1983, J Lab Clin Med 101: 21-33)。われわれは慢性的アルコール摂取により ROS (活性酸素) 産生が増加、セルトリ細胞に空胞変性と脂肪滴の蓄積を引き起こし、その結果、精細胞のアポトーシス増加をまねく。しかし、セルトリ細胞自体はアポトーシスから逃れていることを報告している (Eid N., et al 2002, Int J Androl 25:159-167)。

(2) オートファジーは細胞小器官や不良タンパク質の分解のための主な代謝経路で、分解されるものは隔離膜から形成されたオートファゴソームと呼ばれる大きな vesicle に取り込まれ、lysosome の融合により加水分解酵素によって消化される (Uchiyama Y et al 2008, Histochem Cell Biol, 129, 407-420)。現在、オートファジーの同定は電顕での微細形態またはオートファジー関連遺伝子 LC3 と lysosome 関連遺伝子 LAMP2 の発現で行われている (Shibata, M. et al., Biochem Biophys Res Commun, 382: 419-23, 2009, Saftig, P. et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 10: 623-35)。

(3) 最近 Ding et. al (Gastroenterology. 2010 Jul 23. [Epub ahead of print]) は実験的にマウスに誘導したアルコール性脂肪肝において LC3 と LAMP2 が発現し、ダメージを受けたミトコンドリアと過剰な脂質を除去することで生存する、すなわちアポトーシスが減少し、細胞死を逃れていると報告した。

2. 研究の目的

(1) アルコール依存症、アルコール中毒症は男性不妊にとって大きな問題である。アルコールの過剰摂取は精巣に障害を与え、精子形成不全を引き起こすと考えられる。近年、細胞にとって一種の自己防御機構であるオートファジーが細胞死に関与すると注目されている。そこで本研究は実験的にアルコール性傷害精巣モデルを作製して、精子形成不全にオートファジーがどのように関与しているかを検討する。

(2) オートファジーのコントロールによる男性不妊治療の基礎的研究を行うことを目

的とする。

3. 研究の方法

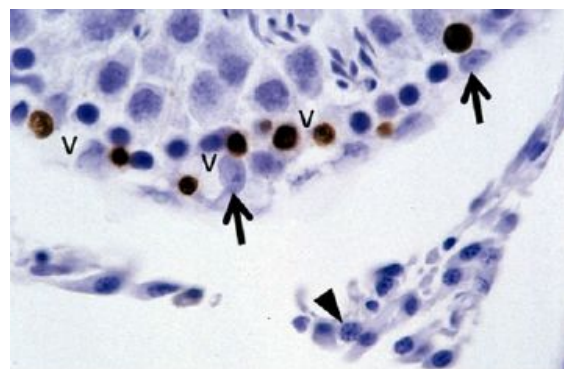
(1) 慢性アルコール障害ラットモデルの作製は 10 匹の雄性 Wistar ラットを Lieber-DeCarli alcohol 餌で 12 週間飼育した。対照の 10 匹のラットには Lieber-DeCarli alcohol 餌のアルコールを同等の炭水化物と置き換えたコントロール餌で飼育した。1 週毎に体重、精巣の長径を測定する。12 週後、体重、精巣の長径、重量を測定の後、麻酔下、屠殺し以下の実験に供した。

(2) 病理組織学的検索・免疫組織化学染色を行った。摘出した精巣を 4%ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作製する。病理組織学的検索には H.E 染色を行う。免疫染色は蛍光抗体法、酵素抗体法で行う。用いる抗体はセルトリ細胞の同定には Androgen receptor, オートファジー関連遺伝子 Beclin-1, LC-3, lysosome の同定には LAMP-2 の各抗体を用いる。

(3) 電子顕微鏡観察と免疫電顕法を行った。摘出した精巣を 2%paraformaldehyde と 2.5%glutaraldehyde の混合液で前固定し、2%OsO₄ で後固定、脱水の後エポン樹脂に包埋、超薄切片を作製した。酢酸ウランと鉛の二重染色ののち電顕観察する。セルトリ細胞の微細構造変化、autophagosome, autolysosome、脂肪滴、隔離膜を同定した。エポン樹脂切片を用いて、LC-3 の免疫電顕を post-embedding 法で行った。

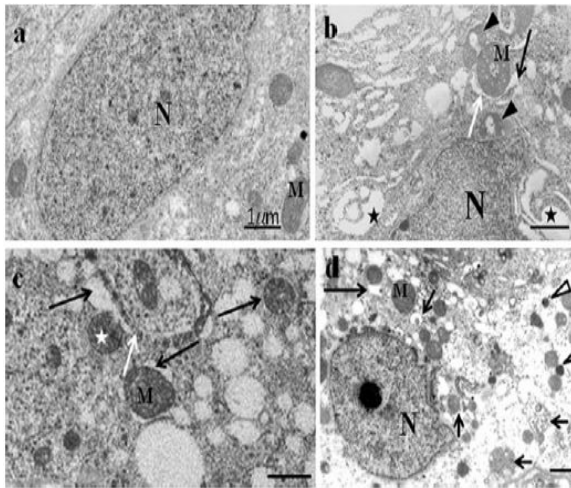
4. 研究成果

(1) 慢性アルコール中毒の精巣では、精細胞のアポトーシスは多数観察されるが、アポトーシスに陥ったセルトリ細胞は認められない (図 1)。



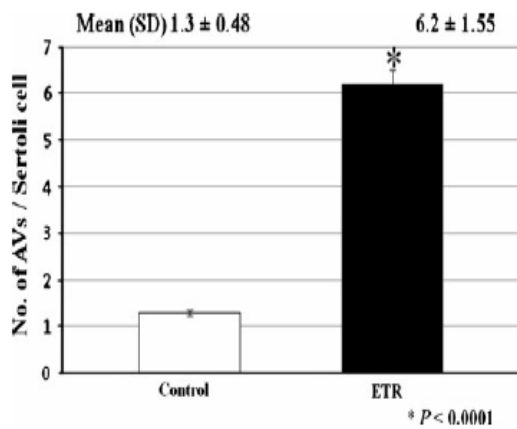
矢印は TUNEL 陰性のセルトリ細胞。茶色が陽性の精細胞の核。矢頭は間細胞。

(2) 慢性アルコール中毒の精巣のセルトリ細胞ではオートファジーとくにダメージを受けたミトコンドリアを処理するために、ミトファジーが多数認められた(図2)。



a, コントロールのセルトリ細胞。ミトファジーは認められない。b~d, 慢性アルコール中毒のセルトリ細胞。矢頭はダメージを受けたミトコンドリア。矢印はミトファジーが起きている。オープン矢頭はライソソーム。黒星印はオートファゴソーム。Nは核。

(3) オートファゴソームの数を統計学的処理を行うと、慢性アルコール中毒のセルトリ細胞ではコントロールと比較して有意に増加していた(図3)。



ETR: 慢性アルコール中毒のセルトリ細胞
コントロールと比較して有意に増加している (P < 0.0001)。

(4) 免疫電顕法で検討すると、LC3 はオートファゴソーム膜に局在していた(図4)。

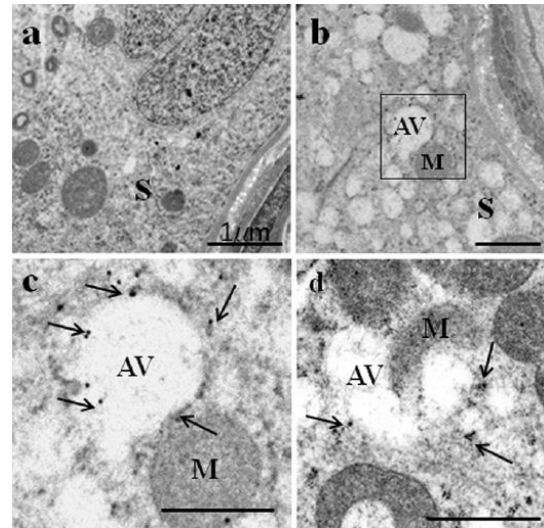


図4 a, コントロールではLC3は認められない。b~d, 慢性アルコール中毒のセルトリ細胞ではオートファゴソームとミトコンドリアが接している他、オートファゴソーム膜にLC3が認められる()。

(5) LC3 は慢性アルコール中毒のセルトリ細胞で認められた(図5)。

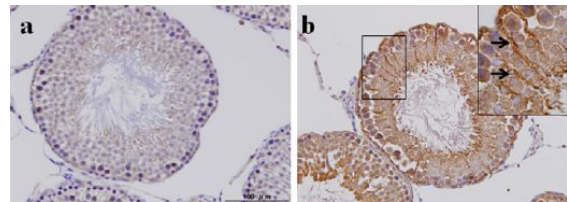
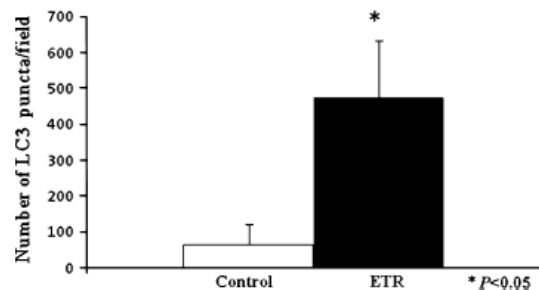


図5 LC3の免疫染色。a, コントロールでは認められない。b, 慢性アルコール中毒セルトリ細胞に強い陽性反応が認められる()。

(6) LC3 は慢性アルコール中毒のセルトリ細胞で増加していた(図6)。

LC3の免疫染色についてImageJを用いて画像解析を行い、統計学的に処理を行うと、有意差 (P < 0.05) をもって慢性アルコール中毒のセルトリ細胞で増加していた。



(7) LAMP2 慢性アルコール中毒のセルトリ細胞で認められた(図7)

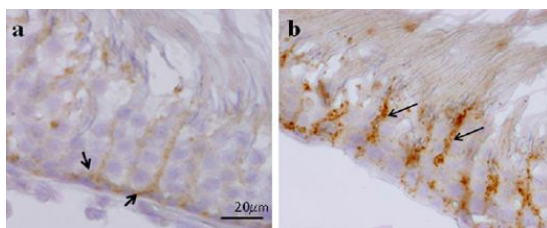


図7 LAMP2 の免疫染色。a, コントロールでは認められない。b, 慢性アルコール中毒セルトリ細胞に強い陽性反応が認められる()

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- ① Eid, N, Ito Y, Otsuki, Y The autophagic response to alcohol toxicity: The missing layer, *Journal of Hepatology*, 査読有 vol.59, No.2, 398, 2013.

Eid N, Ito Y, Maemura K, Otsuki Y Elevated autophagic sequestration of mitochondria and lipid droplets in steatotic hepatocytes of chronic ethanol-treated rats: an immunohistochemical and electron microscopic study. *J Mol Histol*, 査読有, vol.44, 311-326, 2013.

- ③ Eid, N, Ito, Y, Otsuki, Y Enhanced mitophagy in Sertoli cells of ethanol-treated rats: morphological evidence and clinical relevance. *J Mol Histol*, 査読有, 43:71-80, 2012.

〔学会発表〕(計 14 件)

- ① Eid Nabil, Selective autophagy in steatotic hepatocytes of ethanol-treated rats. 第45回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2013.9.13, 福岡.

Eid Nabil, Enhanced mitophagy in sertoli cells of alcoholic rats: An antiapoptotic mechanism essential for spermatogenesis. 11thACU2012, 2012.8.23, 札幌.

- ③ Eid Nabil, Ethanol-induced testicular germ cell apoptosis is associated with enhanced autophagy in Sertoli

cells. 第43回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2011.9.10, 大阪.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/an1/results.html>

<https://athena.osaka-med.ac.jp/rdb2007/e-search.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

イード・ナビル・エー・エス (Eid Nabil A.S)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50570165

(2) 研究分担者

大槻 勝紀 (Otsuki, Yoshinori)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50140166

伊藤 裕子 (Ito, Yuko)

大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40148432

神原 清人 (Kanbara, Kiyoto)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 40298758