

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 24 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659784

研究課題名（和文） ヒューマニンによる精子前駆細胞死抑制機構

研究課題名（英文） Humanin-mediated rescue of testicular germ cell apoptosis

研究代表者

松岡 正明 (MATSUOKA MASAOKI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：70222297

研究成果の概要（和文）：

男性不妊症の詳細な機序は解明されていない。本研究は、男性ホルモンアンタゴニストによるマウス造精細胞死の系を確立すること、そして、この系を駆使して、アルツハイマー病関連の神経細胞死抑制因子ヒューマニン(HN)およびその類縁物質EHによる造精細胞死に対する抑制作用を解析することを目的として行った。研究成果として、LHRHのアンタゴニストcetorelixの投与によるマウスにおける造精細胞死のアッセイ系を確立し、EHのrecombinant proteinを大量に作製する技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：

One of the central mechanism underlying male infertility has been assumed to be the abnormal increase in testicular germ cell apoptosis. However, its detailed mechanism remains unknown and the development of therapy inhibiting testicular germ cell apoptosis has not been developed. In this study, to address the question as to whether and how the Humanin/EH-mediated signal is involved in inhibition of germ cell apoptosis, we have first succeeded in developing a mouse assay system by which the administration of an LHRH-antagonist Cetorelix induces apoptosis in mouse testicular germ cells in vivo. Second, we have found that EH plays a major role in vivo instead of Humanin and succeeded in purifying a large amount of recombinant EH in bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学／産婦人科学1

キーワード：ヒューマニン、男性不妊、造精細胞死

1. 研究開始当初の背景

男性不妊症の一つのメカニズムは造精細胞の細胞死の過剰な亢進であるが、その詳細な機序は解明されていない。その結果、研究開始の時点においては、造精細胞の細胞死を抑制する治療法は全く開発されていなかった。

研究代表者のグループは世界で最初にアルツハイマー病 (AD) 神経細胞死を抑制する生理的因子ヒューマニン (HN) を発見し、その後2009年にはHN受容体を世界で最初に同定して、HNがAD神経細胞死を抑制する生理的な内在性因子であることを確立した。さらにその後、HN作用をもつ新たな内在性AD防御因子EH (CLSP) や特異的なヒューマニン阻害因子及びEH阻害因子等一連の分子を同定して、その生物学的性質を解析してきた。

この研究の途上、HNの主たる産生部位が精巣であることから、HNの精巣に対する作用を検討した。その結果、精子の退行性変化と精子内のHNレベルに負の相関が存在することを発見した。さらに、共同研究により、驚くべきことにHNはAD神経細胞死に対するメカニズムと異なるメカニズムで造精細胞の細胞死を抑制して、精子形成に重要な役割を果たしている可能性が高いことを見いだした。

2. 研究の目的

本研究ではマウスを用いて睾丸の造精細胞の細胞死 *in vivo* モデルを確立し、このモデルを駆使してその細胞死にHN/EHが抑制的に関わっているかどうかを検討し、さらにそのメカニズム (関係する受容体の同定など) を解明し、最終的に、男性不妊に果たすHNの影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LHRH antagonist 投与により、睾丸の造精細胞死の *in vivo* モデルを確立する。具体的には、ラットあるいはマウスを用いて、製薬企業より入手したLHRH antagonistを睾丸に局部注射することにより、*in vivo* の造精細胞死アッセイ系を確立する。

(2) EHのリコンビナント蛋白質をCOS7 細胞や大腸菌を用いて大量に精製する技術を確立する。

(3) (1) で確立されたモデルを駆使して、HNあるいは精製したその類縁物質であるEHを用いて、造精細胞死抑制作用の有無を検討する。

(4) 以上のアッセイシステムを駆使して、さらにHN/EHによる造精細胞死抑制作用の分子メカニズムを総合的に解明する。

4. 研究成果

(1) <造精細胞の細胞死アッセイ系の確立>

当初、ラットを用いて、アッセイ系確立をめざしたが、ラットをモデル動物にすると、LHRHのアンタゴニストであるcetrorelixの必要量が、調達可能な量をはるかに超えていることが判明した。そのため、ラットの1/10の大きさのマウスを用いてアッセイ系を確立することに方針変更した。

アッセイ系を確立する為に、マウス精巣局所注射などの実験手技を高める必要があり、初期の段階では抗癌剤etoposideの睾丸局所注入による細胞死誘導実験を繰り返し行って、実験手技を向上させた。安定した結果が得られるようになった後、cetrorelix投与による細胞死アッセイ系確立に取り組んだ。

このようなステップを経た為に、プロジェクト全体の進捗は遅れた。しかし、最終的に、cetrorelix 1-10 mg/kgで有意な造精細胞 (stage 7, 8) の細胞死が誘導されるアッセイ系を確立した (TUNELアッセイ) (図1 およ

び図2参照)。

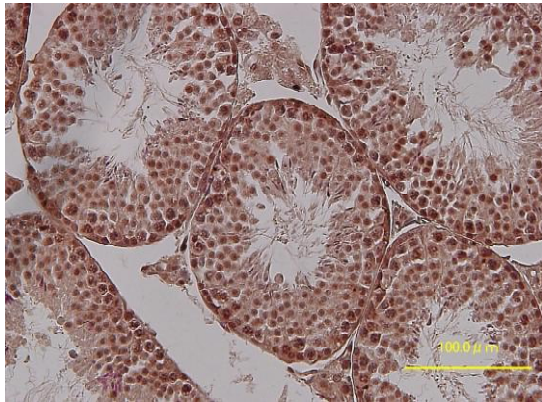


図1 コントロールマウスの睾丸の造精細胞のTUNEL染色。濃茶色に染まるTUNEL陽性細胞は殆どない。

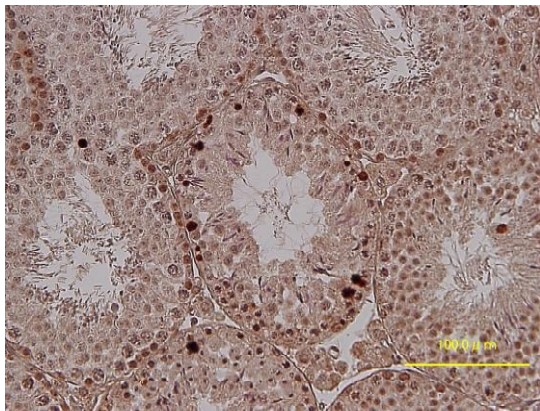


図2 cetorelix 10mg/kg投与後のマウスの睾丸の造精細胞のTUNEL染色。濃茶色に染まるTUNEL陽性細胞が散見される。

(2) <recombinant EH 蛋白質の産生技術の確立>

研究期間の前半に、研究代表者の別の研究で、生体内ではHNよりむしろEHの方が中心的な役割を果たしていることを見いだした。この結果、EHを検討対象の中心にする必要が生じた。そのため、EHのrecombinant proteinを大量に作製することが必須となったと判断し、COS7細胞を用いた系(図3)と大腸菌を用いた系(図4)でその産生技術を開発し

た。

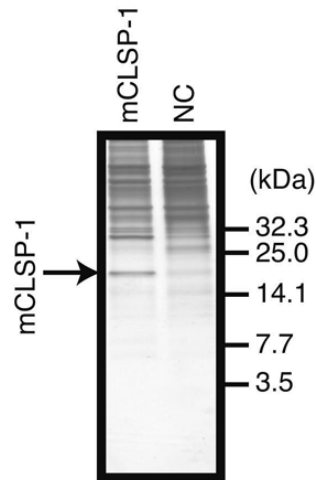


図3 マウスEH(mCLSP-1)蛋白質の精製。COS7細胞にEH1-MycHisをコードした発現ベクターをトランスフェクションし、培養上清に分泌された蛋白質を精製した。精製蛋白質をSDS-PAGEののちCoomassie blue染色した。

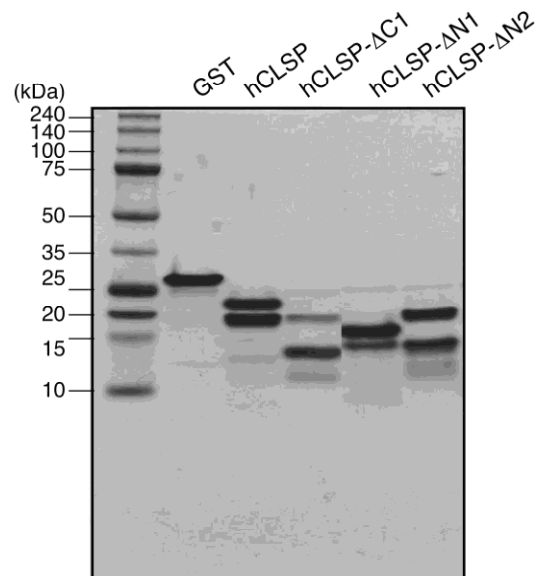


図4 大腸菌によるヒトEH(hCLSP)とその誘導体の精製。大腸菌の系で産生させ、精製したEHあるいはその誘導体の精製蛋白質をSDS-PAGEののちCoomassie Blue染色した。

(3) <今後予想される展開>現在、このアッセイ系を駆使してcetorelixの投与による

造精細胞の細胞死に対する、作製した組み替えEHと合成したHNの及ぼす効果を検証する実験を行っている。この研究の成就是今後男性不妊のメカニズム解明と新たな治療法に重要な知見をもたらすことが期待される。

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2件)

(1) Hayashi M, Tajima H, Hashimoto Y, Matsuoka M. Secreted calmodulin-like skin protein ameliorates scopolamine-induced memory impairment. NeuroReport (2013) in press
査読あり

(2) Hashimoto Y, Nawa M, Kurita M, Tokizawa M, Iwamatsu A, Matsuoka M. Secreted calmodulin-like skin protein inhibits neuronal death in cell-based Alzheimer's disease models via the heterotrimeric Humanin receptor. Cell Death Dis. 2013 Mar 21; 4:e555. doi: 10.1038/cddis.2013.80.
査読あり

[学会発表] (計1件)

- ① Takeshita Y, Hashimoto Y, Uchino H, Matsuoka M. SH3BP5 is essential for Humanin-mediated protection against Alzheimer's disease-relevant toxicity.
第86回日本薬理学会年会
2013年03月23日 福岡国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/pharmacol/results.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 正明 (MATSUOKA MASAAKI)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：70222297