

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5月31日現在

機関番号：14501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791757
 研究課題名（和文）ヒトセルトリ細胞株の樹立と抗癌剤がおよぼす造精機能障害の分子メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Establishment of human Sertoli cell line and analysis of molecular mechanism of testicular dysfunction induced by anticancer drug
 研究代表者
 山口 耕平 (YAMAGUCHI KOHEI)
 神戸大学・医学研究科・助教
 研究者番号：50457107

研究成果の概要（和文）：ヒトセルトリ細胞株樹立のための予備実験として、ラット培養セルトリ細胞に最も効率よく遺伝子導入が可能になる条件選定を行った。結果 pCMV-GP プラスミドを使用して方形波エレクトロポレーション法で、電圧 250V、波長 20 μ m、プラスミド DNA 濃度 20 μ g/ml という条件遺伝子導入を行うと、最も導入効率が良かった。今後はこの条件下で hTERT 遺伝子導入を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we described an optimized protocol for electroporation-based transfection of Sertoli cells and compared its efficiency with conventional lipofection. Sertoli cells were transfected with pCMV-GFP plasmid by square-wave electroporation in different conditions. According for both cell survival and the percentage expressing EGFP, 250 V was determined to produce the greatest number of transiently transfected cells. Keeping voltage consistent (250 V), the pulse length of 20 μ m was observed relatively higher cell survival ($76.5 \pm 3.4\%$) and transfection efficiency ($30.6 \pm 5.6\%$). The yield of positive cells increased with increasing concentrations of plasmid DNA (range 10–50 μ g/ml) from $14.0 \pm 2.8\%$ to $35.0 \pm 6.3\%$ respectively, but cells viability steadily decreased following 20 μ g/ml plasmid DNA from $73.1 \pm 4.9\%$ to $57.0 \pm 6.6\%$. We described the process of optimizing electroporation conditions, and the successful electroporation of plasmid DNA into primarily cultured Sertoli cells. Our results indicated that the method of electroporation is more suitable for transfection of Sertoli cells.

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	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：男性生殖医療

科研費の分科・細目：若手研究(B)

キーワード：セルトリ細胞、エレクトロポレーション、トランスフェクション、EGFP

1. 研究開始当初の背景

精子形成に重要な役割を果たすセルトリ細胞の機能をより詳細に解明するために、当科ではラット精巣からセルトリ細胞を分離培養する手技を確立し、これまでも実験に供してきたが、培養できる日数に限界があることや、実験ごとに多くのラットの屠殺を要する

こと等の問題があり、セルトリ細胞の継代培養の手技確立が望まれる。セルトリ細胞の継代培養としては、これまでにマウス、ラットの精巣を用いて TM4、93RS2、RTS3-3 等の種々のセルトリ細胞株が樹立されている。しかしながらこれらの継代細胞では FSH レセプター、アンドロゲンレセプターの欠如や FSH 刺激に

対する反応の欠如といった細胞形質の変化が報告されており、より生理的な機能をもつセルトリ細胞株の樹立が望まれる。さらに、現在のところヒトの精巣から作成されたセルトリ細胞株は存在せず、多くの Sertoli 細胞に関する実験研究は動物モデルを使用したものであり、ヒトのセルトリ細胞に関する研究においては未解明な部分も多い。Telomerase は真核生物の染色体末端(テロメア)の特異的反復配列を伸長させる酵素である。Telomerase 活性が低い細胞は一般的に細胞分裂ごとにテロメアの短縮が進み、やがて細胞分裂を停止する。Telomerase は細胞が分裂を継続できる性質に関与しているとされ、活性を抑制することによる癌の治療、あるいは活性を高めることによる細胞分裂寿命の延長、その両面から注目されている。Telomerase はテロメア配列の鋳型となる RNA (Telomere RNA Component, TERC) と逆転写酵素活性をもつ触媒サブユニット (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT) を主とする複合体であり、培養細胞に TERT を導入することにより種々の細胞の不死化を得ることが報告されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究の第一の目的は、これまで樹立が困難であった、完全な機能を有するヒトセルトリ細胞株を樹立することである。精子形成に極めて重要な役割を果たしているセルトリ細胞の機能解析が、容易に、正確に行えるようになれば、更なる精子形成過程の詳細な解明に繋がるものと考えられる。

(2) そこで第二の目的として、完全な機能を有するヒトセルトリ細胞株を樹立できた後、それを用いて抗癌剤が精子形成障害を引き起こす分子メカニズムをの一端を詳細に解明し、精巣癌患者の、化学療法に伴ってほぼ必発する妊孕能の低下に対して、抗腫瘍効果を損なわずに安全かつ効果的な、新たな予防法ないし治療法の開発・確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ウィルスベクターの作成

- ① hTERT cDNA 全長を Pci-neo-hTERT から抽出し、それを pLNCX2-neo レトロウィルスベクターにクローンする。
 - ② クローン化したレトロウィルスをパッケージ細胞 (RetroPack PT 67) にトランスフェクションする。トランスフェクションされたウィルス産生細胞を G418 (300 μ g/ml) を用いて選別する。ウィルス産生細胞株から産生される、レトロウィルスを含んだ上清を 24 時間後に回収してフィルタリング (0.45 μ m フィルター) し、ディープフリーザー (-80 度) にて保存する。
- (2) 未成熟ラットセルトリ細胞株の樹立

① 20 日齢 SD ラット精巣より、既に確立されている方法にてセルトリ細胞分離し、無血清培養液で培養する。

② 培養セルトリ細胞はコントロール群と hTERT トランスフェクション群に分離し、コントロール群はディープフリーザーに凍結保存し、後に樹立したセルトリ細胞株との機能比較に用いる。Polybrene (4 μ g/ml) を添加したウィルス上清を加え 24 時間培養した後、ウィルス上清を除く。その 24 時間後に G418 (300 μ g/ml) を用いて、2-3 週間かけてトランスフェクションされたセルトリ細胞を選別する。

(3) 未成熟ラットセルトリ細胞株の機能評価

- ① 位相差顕微鏡による形態評価
- ② 細胞成長曲線、倍加時間の検討
- ③ サザンブロット法による telomere DNA 断片長の測定と、telomeric repeat amplification protocol (TRAP) 分析による telomerase 活性の測定。
- ④ 蛋白及び RNA を抽出した後、ウェスタンブロット法ないし RT-PCR 法を用いて stem cell factor や androgen receptor 等の存在の確認と定量を行う。またそれらをコントロール群と比較する。
- ⑤ サザンブロット法による telomere DNA 断片長の測定と、telomeric repeat amplification protocol (TRAP) 分析による telomerase 活性の測定。
- ⑥ ノードマウスを用いた腫瘍形成性の検討。
- ⑦ 同ラット精巣から分離した type A 精粗細胞と、少なくとも 1 週間共培養し、精粗細胞の生存や分化の有無を確認する。

(4) 成熟ラットセルトリ細胞株の樹立と機能評価

(2) -1, 2 と同様の方法で成熟ラットセルトリ細胞株を樹立する。また上記 III-1-7 と同様の方法で成熟ラットセルトリ細胞株の機能評価を行う。

(5) ヒトセルトリ細胞株の樹立と機能評価
(4) と同様の方法でヒトセルトリ細胞株を樹立し、かつ機能評価を行う。

(6) In vitro での検討

- ① CDDP 刺激によるヒトセルトリ細胞のシグナル伝達機構の検討として樹立したヒトセルトリ細胞株内に CDDP を添加し (10 ng/ml)、下記に示す各 time course に沿ってセルトリ細胞及びライディッシュ細胞を回収した後、そこから蛋白及び RNA を抽出する。蛋白は CDDP 刺激後 1、3、5、10、15、30 分、1、3、6、12、24 時間で抽出し、各々抗 phospho-extracellular signal-related kinases 1 and 2 (ERK1/2)、ERK、phospho-p38-

p-38 MAPK、phospho-JNK、JNK、COX-1、-2、i-、eNOS、PKC、PKA、caspase3等のapoptosis関連抗体を用いてWestern blotting法にて、それらの経時的変化を測定する。またRNAはCDDP刺激後30分、1、3、6、12、24、36、48時間で抽出し、Quantitative real-time PCR法にてIL-1 β 及びIL-6の経時的変化を測定する。

またCDDP刺激後30分、1、3、6、12、24時間の培養上澄み液を用いて、ELISA法にてtransferrin及びPGE₂、PGF₂、PGD₂、cPGI₂ analogの経時的変化を測定する。同様のtime courseにてCDDP刺激後の培養上澄み液を用いて、Griess法にてNO濃度の経時的変化を測定する。またTUNEL法などを用いて、セルトリ細胞、ライディヒ細胞の細胞死の程度を測定する。

② Inhibitorを用いたCDDP刺激によるヒトセルトリ細胞のシグナル伝達機構の変化の検討

上記の実験で関与が示唆された分子の阻害剤を用いて1.と同様の検討を行う事により、CDDP刺激によって生じるヒトセルトリ細胞の分子調節機構を解明する。また実際に生じるセルトリ細胞への障害程度の変化を測定、検討する。

(7) In vitroでの検討：精細胞とヒトセルトリ細胞の共培養における検討

① ヒトセルトリ細胞へのCDDP刺激

(6)-①と同様の方法及びtime courseに沿ってヒトセルトリ細胞にCDDP刺激を加える。

② ヒト精細胞の分離

ヒトセルトリ細胞株樹立に供した精巣組織の一部を用いて、既に我々が確立したElutriatorによる分画法を用い、pachytene spermatocyte及びround spermatocyteを分離する。

③ ヒト精細胞とヒトセルトリ細胞の共培養

(7)-①で各time courseに沿ってCDDP刺激を加えたヒトセルトリ細胞を、VII-2.で分離した精細胞と混合し、既に確立された方法で共培養する。

④ CDDP刺激によるセルトリ細胞のparacrine作用による、精細胞へのシグナル伝達機構の検討

(7)-③で共培養された精細胞とセルトリ細胞から既に確立された方法を用いて精細胞のみを分離・回収し、そこから蛋白及びRNAを抽出する。VI-1, 2で解明された、CDDP刺激によって生じるヒトセルトリ細胞の分子調節機構に関与する分子のreceptorやtransporterの変化について、Western blotting法やQuantitative real-time PCR法にて検討

し、CDDP刺激によるセルトリ細胞のparacrine作用による、精細胞へのシグナル伝達機構を解明する。

⑤ Inhibitorを用いた精細胞とセルトリ細胞の共培養系における精細胞障害程度の変化の検討

(6)-②.で関与が示唆された分子の阻害剤を用いて同様の検討を行う事により、CDDP刺激によって生じる精細胞の障害程度の変化を測定、検討する。

4. 研究成果

実施計画に沿ってウィルスベクターを作成し、まず未成熟ラット培養セルトリ細胞に遺伝子導入実験を行うも、ほとんど遺伝子導入を認めず、わずかに得られた分離細胞の培養を継続したが増殖を得られなかった。そのためまず前段階の実験として、最も効率良くセルトリ細胞への遺伝子導入が可能になる条件設定を行った。

実験はラット培養セルトリ細胞を用いて、さまざまな異なる条件のもと、pCMV-GFPプラスミドを使用して、方形波エレクトロポレーション法で遺伝子導入を行った。セルトリ細胞の細胞生存率とEGFP表出率から算定した遺伝子導入効率を測定した結果、電圧250V、波長250 μ mの条件において、遺伝子導入効率が最も良かった。さらにプラスミドDNA濃度を増加すると遺伝子導入率は上昇する傾向が、逆に細胞生存率は減少する傾向があり、プラスミドDNA濃度20 μ g/mlの条件において遺伝子導入効率が最も良好であった。さらにこの条件による遺伝子導入方法は、Lipofetamine 2000やEffecteneという2種類の主要な陽イオン性脂質を用いた遺伝子導入法と比較しても、遺伝子導入効率が有意に良好であった。これらの実験から得られた結果を参照に、今後は最適な条件下でhTERT遺伝子導入を行っていく予定である。

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1件)

Li Fuping, Yamaguchi Kohei, Okada Keisuke, Matsushita Kei, Enatsu Noritoshi, Chiba Koji, Yue Huanxun, Fujisawa Masato. Efficient transfection of DNA into primarily cultured rat sertoli cells by electroporation, *Biology of Reproduction*, 査読有、88巻、2013、1-6

[学会発表] (計2件)

① Li Fuping, Efficient transfection of DNA

into primarily cultured rat sertoli cells by electroporation、第 45 回関西アンドロロジーカンファレンス、2013 年 3 月 2 日、大阪

②Li Fuping、Efficient transfection of DNA into primarily cultured rat sertoli cells by electroporation、American Society of Andrology 38th Annual Conference、2013 年 4 月 13 日～4 月 16 日、Texas, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 耕平 (YAMAGUCHI KOHEI)
神戸大学・大学院医学研究科腎泌尿器科学分野・助教
研究者番号：50457107

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

研究協力者

Li Fuping (Li Fuping)
神戸大学・大学院医学研究科腎泌尿器科学分野・大学院生
研究者番号：