

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 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791793

研究課題名（和文） 精子発生における栄養代謝の役割の解明

研究課題名（英文） Energy metabolism of seminiferous epithelium in spermatogenesis

研究代表者

深澤 元晶（Fukasawa Motoaki）

藤田保健衛生大学医学部・助教

研究者番号：70387728

研究成果の概要（和文）：精上皮は、精巣内で精子産生のものであり、血液から隔離された特殊な環境である。そのため、ここで用いられる栄養は特殊であり、またその特殊性が精子の産生に重要な役割を担っている可能性がある。本研究は、精細胞を取り囲む Sertoli 細胞では解糖系以外の栄養代謝系は発現が低い、少なくとも脂肪酸代謝は機能していることを示した。精子の産生では、脂肪酸の代謝によるエネルギーあるいは代謝産物が重要である可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Seminiferous epithelium is the site of spermatogenesis and is a unique environment in energy metabolism because of its separation from the blood. Such characteristics may contribute to spermatogenesis in quality or quantity. Previous study shows that Sertoli cells that surround spermatogenic cells have less gene expression level of energy production pathways except glycolysis than liver, however, they can metabolize fatty acid as another energy source. Energy or metabolite by fatty acid oxidation of Sertoli cells may be important to spermatogenesis.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：アンドロロジー・精子発生・脂肪酸代謝

1. 研究開始当初の背景

精上皮は、Sertoli 細胞が形成する精巣血液関門により血液からの栄養物と直接には隔てられた特殊環境である。精上皮は、精子産生に多大なエネルギーを消費すると考えられるが、そこで行われる具体的な栄養代謝の知見は無いに等しい状態である。脂肪酸β酸化系酵素群の網羅的な解析（平成 19～20 年度科学研究費補助金による研究成果）により、Sertoli 細胞は脂肪酸をエネルギー産生に使用できるに足る酵素群を有することを示し、一方、精細胞は、直接は脂肪酸を代謝できないことを示した。精細胞が Sertoli 細胞からの物質転送により栄養されると想定するならば、

肝臓と肝外器官との栄養関係のように、精細胞は Sertoli 細胞における栄養代謝の代謝産物を受けて栄養されていることが考えられる。即ち、精細胞だけでは栄養代謝は不完全であるが、[微小環境]としての精上皮全体で捉えれば完結している栄養関係である。

最近、肥満や生活習慣病などの栄養代謝異常により精子の質的・量的異常を生じる可能性が指摘されているが、その発症機序、特に精子発生過程における機序は不明である。全身の栄養代謝異常により [精上皮微小環境] が栄養学的に破綻を来せば、結果として精子発生が異常となるという仮説が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 精子発生の各段階の精細胞と Sertoli 細胞における栄養代謝関連因子（酵素、基質結合蛋白質、転写調節因子）の局在と代謝活性を網羅的に検索する。

(2) 精子発生の各段階の精細胞と Sertoli 細胞における栄養代謝系の機能阻害が、精子発生に与える影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) 単離と初代培養：

① Sertoli 細胞：生後 20 日の Wistar ラットから精細管を採取し、酵素処理により表面から細胞を回収する。φ6cm シャーレに播き、48 時間毎に培地交換を行う。

② その他の細胞：peritubular cell および精細胞（精祖細胞、精母細胞、精子細胞）について、Sertoli 細胞精製過程の画分から回収する。

(2) 形態的観察：

① 脂肪滴の観察：位相差像、Sudan 黒染色、蛍光観察による。

② 電顕観察：

③ 蛍光抗体法：

i) 細胞骨格：チロシン化チューブリン、平滑筋アクチン、ファロイジン

ii) 脂肪酸β酸化系酵素：ミトコンドリア系（9種）、ペルオキシゾーム系（3種）

iii) ケトン体生合成酵素（1種）

iv) TCA サイクル酵素（1種）

(3) 生化学的解析：

① DNA マイクロアレイ法：ラット全ゲノムアレイ（44,000 配列、アジレントテクノロジー社製）を用いて 2 色法により行った。肝臓を 1 として相対値を求める。

② ウェスタンブロット法：ミトコンドリア系（9種）とペルオキシゾーム系（4種）の脂肪酸β酸化系酵素に対する抗体による。肝臓を 1 として相対値を求める。

③ in vitro probe assay 法：Sertoli 細胞の初代培養細胞を 4% 脂肪酸フリー BSA/MEM /0.4mL L-カルニチンの培地で培養する。脂肪酸β酸化系の基質としてパルミチン酸 (C16) およびオクタン酸 (C8) を加えて 24 時間培養し、培養上清中に含まれる脂肪酸炭素鎖長を質量分析により解析する。脂肪酸β酸化の阻害実験として、培地に CPT1 阻害剤である etomoxir の添加も行う。

(4) RNAi による栄養代謝系の改変とその影響評価：

① siRNA による脂肪酸β酸化系の阻害：リポフェクション法（フォワード法、Lipofectamine RNA Max、Life Tech 社製）による。脂肪酸β酸化系酵素に対する siRNA

（Silencer Select、Life Tech 社製）を用いた。発現抑制効果およびインターフェロン誘導効果の有無はリアルタイム PCR により検討する。

② shRNA による脂肪酸β酸化系の阻害：レンチウイルスベクターによる shRNA 発現プラスミドのトランスフェクションによる。理研バイオリソースセンターから系を導入し、siRNA で発現抑制効果のあった配列を元にベクタープラスミドを作製する。

4. 研究成果

[研究の主な成果]

(1) 純粋な Sertoli 細胞の初代培養：

純形態（位相差像、電顕像）、巨大な脂肪滴、チロシン化チューブリンの局在などの形態的特徴から、ほぼ純粋な Sertoli 細胞の初代培養細胞を得たことを確認した（図 1）。ごく稀に peritubular cell の混入を認めたが、精細胞などその他の細胞種は見られなかった。

(2) 初代培養 Sertoli 細胞における脂肪酸β酸化系酵素の局在：

DNA マイクロアレイ法により Sertoli 細胞における遺伝子発現を網羅的に調べ、栄養代謝系の指標である肝臓での発現と比較した。パスウェイ解析を行うと、栄養代謝関連では解糖系は肝臓と同程度に発現しているが、脂肪酸β酸化系、TCA 回路、電子伝達系が少ないことが示された（図 2）。脂肪酸β酸化系に注目すると、いずれの遺伝子発現も肝臓の 1/10~1/5 程度であった（図 3）。またこれらの酵素蛋白量をウェスタンブロット法により半定量的に求めると、いずれも同様に肝臓の 1/10~1/5 程度であった（図 3）。しかしながら、蛍光抗体法を行うと、Sertoli 細胞にミトコンドリアおよびペルオキシゾームの脂肪酸β酸化系酵素が確かに局在することが示された（図 4）。

一方、脂肪酸β酸化系と関連が深いケトン体生合成系については、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析では fibroblast と同様の遺伝子発現量であった。またその他のエネルギー代謝系についても、全体として特徴的な発現の強弱は見られなかった。

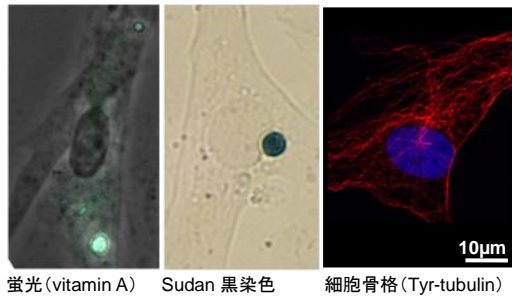
(3) 初代培養 Sertoli 細胞における脂肪酸β酸化能の存在：

in vitro probe assay 法により、Sertoli 細胞の脂肪酸β酸化能を解析した。C8 および C18 の直鎖脂肪酸を基質とした場合、培養 24 時間後における培養上清中のアシルカルニチンの組成は C2 即ちアセチルカルニチンが主であった（図 5）。これは、初代培養 Sertoli 細胞が正常な脂肪酸β酸化能を有することを示す。なお、CPT1 阻害薬の効果は不明瞭で、投与方法や別の薬剤の検討が必要である。

(4) RNAiによる脂肪酸代謝の抑制：

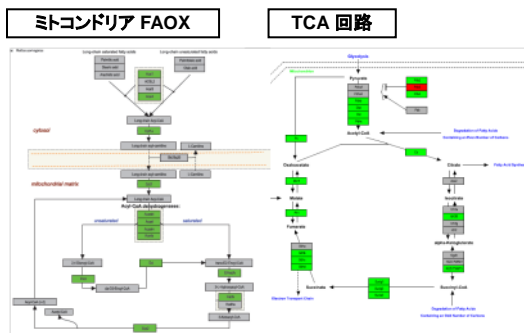
ミトコンドリア脂肪酸β酸化系の酵素で、一般的な脂肪酸である中鎖脂肪酸に基質特異性をもつデヒドロゲナーゼである MCAD を手始めの標的として siRNA による RNAi を複数種類で試みた。その結果、fibroblast においては遺伝子発現を 1/10 以下に抑制し、かつインターフェロン応答性ストレス遺伝子の発現を誘導しない配列を選定できた (図 6)。これを用いて、今後の Sertoli 細胞および精細胞における発現抑制を行いたい。

図 1) 初代培養 Sertoli 細胞の形態

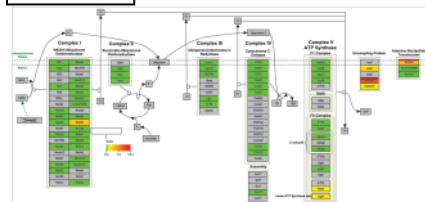


蛍光 (vitamin A) Sudan 黒染色 細胞骨格 (Tyr-tubulin)

図 2) DNA マイクロアレイによるパスウェイ解析



電子伝達系



肝臓との比：緑色に近いほど発現が相対的に少ない。

図 3) 脂肪酸β酸化系酵素の定量

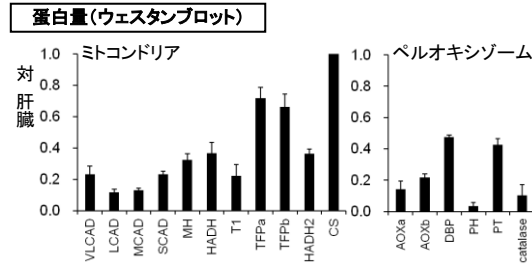
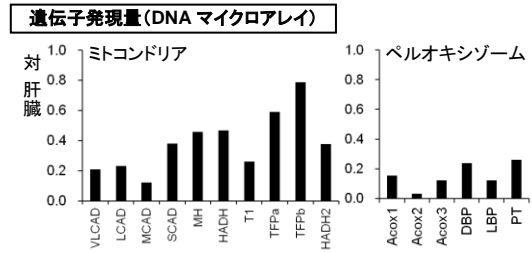
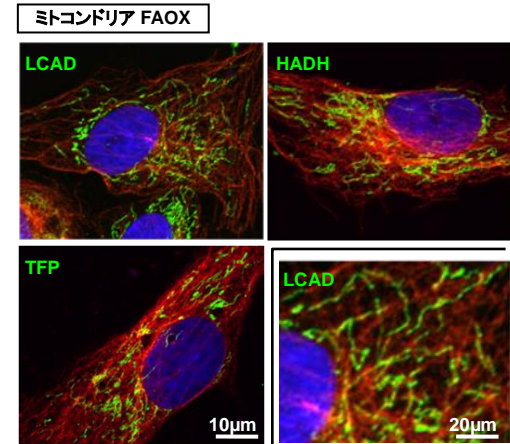
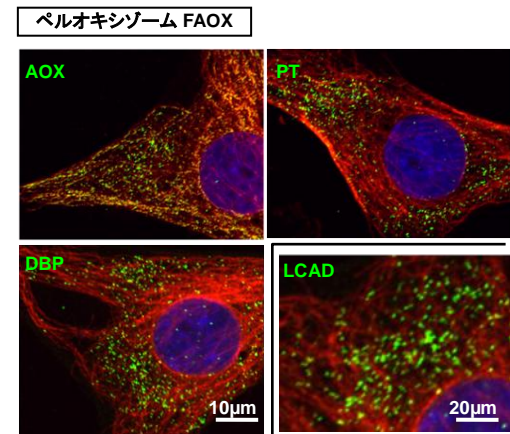


図 4) 脂肪酸β酸化系酵素の局在

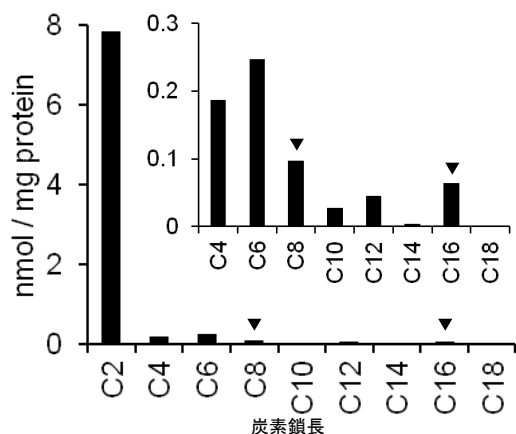


緑：酵素、青：核、赤：細胞骨格。線維状の局在(ミトコンドリア)が見られる(右下：強拡大)。



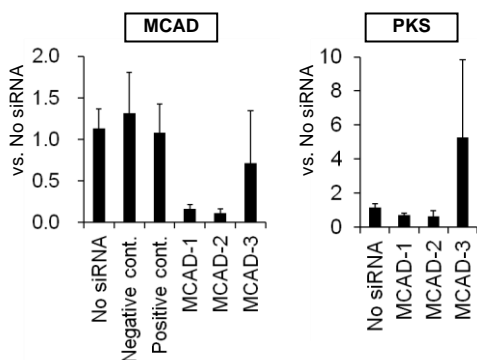
緑：酵素、青：核、赤：細胞骨格。顆粒状の局在(ペルオキシゾーム)が見られる(右下：強拡大)。

図 5) in vitro probe assay



培養 24 時間後の培養上清中における acylcarnitine の組成. 右上は縦軸の拡大図. 矢頭は基質の炭素鎖長を示す. ほとんどが C2 にまで代謝されている.

図 6) RNAi による MCAD の発現抑制



fibroblast に対する RNAi の効果. negative control, positive control (GAPD), MCAD (3 種) の siRNA をリポフェクションし、リアルタイム PCR で MCAD および PKS (インターフェロン応答性ストレス遺伝子) の発現を確認した. MCAD-1 および-2 は MCAD を有意に発現抑制し、またインターフェロン応答を誘導しなかった.

[国内外における位置づけ]

Sertoli 細胞の性状について、その栄養代謝についてはこれまで大きな関心は払われてこなかった。本研究において、Sertoli 細胞は解糖系以外の栄養代謝系は存在量が少ないが、しかしながら少なくとも脂肪酸β酸化系は機能を有して存在していることが示された。これは、Sertoli 細胞、ひいては精上皮全体における栄養代謝系について新たな知見である。

[今後の展望]

(1) Sertoli 細胞におけるエネルギー代謝の特異性の解明: Sertoli 細胞では遺伝子発現上は複数のエネルギー代謝系が抑制されているが、脂肪酸β酸化系のように代謝能は十分に存在している可能性がある。ここには転写後の活性調節が存在する可能性がある。また、発現が弱い酵素の機能を代替補完する未知のアイソザイムが存在する可能性がある。これらの存在を解明することにより、Sertoli 細胞における栄養代謝の調節に新たな視点を与えられる。

(2) 精上皮における脂肪酸β酸化系の意義の解明: 脂肪酸β酸化により産生されるエネルギーあるいは代謝産物が精子発生に重要であることが示せれば、精子発生の微小環境の解明の一端を担うことができる。これは、より質の高い精子産生による不妊症治療にも貢献しうる。

(3) 十分な結果が得られなかった課題:

① 精細胞における定量的解析: 遺伝子発現解析、酵素量定量および代謝能測定は精細胞においても行う計画であったが、精細胞を精子発生の各段階ごとに分離精製することが困難であり、現在も試行中である。

② 精上皮細胞の不活化: 代謝能測定のために精上皮の細胞の初代培養細胞を不活化することを計画した。現在、不活化後の細胞が元の細胞の性状をどれほど維持しているかの検討の途上である。

③ 精細胞における栄養代謝の阻害: 精細胞はリポフェクションによる RNAi が困難であることが知られており、レンチウイルスベクターによるトランスフェクションを計画していた。現在、siRNA での RNAi の結果から配列を決定してベクターを構築し、解析中である。

④ 精細管内 in vivo RNAi: 精細胞に対するレンチウイルスベクターの成績を見てから着手することとした。精細管内へのインジェクション手技については取得済みである。

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)

(1) Nakamoto M, Fukasawa M, 他 (9人中2番目). Expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (hsd3b), star and ad4bp/sf-1 during gonadal development in medaka (*Oryzias latipes*). Gen Comp Endocrinol. 176(2): 222-30, 2012. DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.01.019. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

① 深澤元晶. 細胞内微小環境栄養学: 精巣におけるミトコンドリア脂肪酸 β 酸化系酵素の免疫組織化学的局在. 第71回日本解剖学会中部支部学術集会. 2011年10月16日. 愛知県名古屋市.

② 深澤元晶. ミトコンドリアの組織化学—精巣—. 第117回日本解剖学会総会・学術集会 シンポジウム「新しく開かれるミトコンドリアの構造と機能」(招待講演). 2012年3月26日. 山梨県甲府市.

③ 深澤元晶. 培養 Sertoli 細胞の免疫組織化学. 第72回日本解剖学会中部支部学術集会. 2012年10月13日. 岐阜県岐阜市.

④ 厚沢季美江. ミトコンドリア脂肪酸 β 酸化系酵素の初代培養細胞における免疫組織化学と *in vitro* probe assay による解析. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2013年3月28日. 香川県高松市.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ:

藤田保健衛生大学医学部解剖学 II

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~hnagashi/KDB/open/100012.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

深澤 元晶 (Fukasawa Motoaki)

研究者番号: 70387728

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし