

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440043

研究課題名(和文)生理活性脂質リゾホスファチジン酸の雄性生殖における機能解明

研究課題名(英文)A role of lysophosphatidic acid signaling in male organ

研究代表者

井上 飛鳥 (Asuka, Inoue)

東北大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50525813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リゾホスファチジン酸(LPA)は脂質メディエーターとして、様々な細胞応答を制御する。本研究では、LPA産生酵素PA-PLA1の遺伝子欠損(KO)マウスが精巣や精嚢の形成不全を生じるという知見を元に、関与するLPA受容体やLPAシグナルの機能する細胞種の同定を目的とした。LPA6受容体KOマウスにおいて一部のマウスで精巣が小さくなる異常を示すこと、組織形態学的には精原細胞の脱落が生じることを見出した。LPA6受容体のmRNAは、新生仔マウスのセルトリ細胞とライディッヒ細胞に局在していた。本研究の結果、既報のLPA1-3受容体とは異なる雄性生殖器におけるLPAの機能が示された。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) is a lipid mediator and regulates various cellular responses via acting on LPA-specific G protein-coupled receptors (LPA1-6). We have previously found that mice deficient for PA-PLA1, an LPA-producing enzyme, show abnormal structures in male organs including testes and vesicular glands. In this study, we aimed at identifying a LPA receptor that is involved in the PA-PLA1-LPA axis in the male organogenesis. We also examined defects at a cellular level in the LPA-regulated male organs. We identified approximately a half of LPA6-deficient mice has smaller testes. We also found that mRNA for LPA6 is localized to the spermatogonium, Sertoli cells and Leydig cells in juvenile mice and that the expression decreases as mice become aged. Since the phenotype of PA-PLA1-deficient mice and LPA6-deficient mice is different from a reported triple LPA1-3-deficient mice, LPA signal has at least two distinct roles in development of male organs.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リゾホスファチジン酸 Lysosphatidic acid (LPA) 雄性生殖器

1. 研究開始当初の背景

雄性生殖器官は主に精巣、精巣上体、精管、精嚢から構成されており、精子形成や雄性ホルモンの分泌を担う(図1)。これまでの解析から、雄性生殖器官に参与する多数のホルモン様分子とその受容体が明らかにされている。この分子実態として核内受容体群 (AR, AHR, RAR $\gamma$ ) が著名であるが、細胞膜上の受容体である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) も重要な役割を担う。GPCR の例として、LH Receptor, Prolactin Receptor, Kiss1 Receptor,  $\alpha$ 1b Adrenoceptor, Gprc6a の各遺伝子欠損 (KO) マウスは雄性生殖器官の形成・機能に異常を示すことが報告されている。しかし、雄性生殖器官にはこれら受容体以外にも多くの GPCR が発現しており、雄性生殖器官形成を制御する細胞外因子の全容はいまだ未解明である。

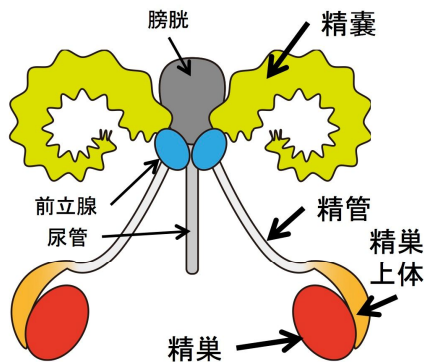


図1 マウス雄性生殖器官の模式図  
精巣は精子形成や雄性ホルモンの産生、精巣上体は精子成熟、精嚢は精液産生にそれぞれ関与する

GPCR に作用する一群に脂質メディエーターが存在する。本研究者は脂質メディエーターの中でも特にリゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid, LPA) に着目して研究してきた。本研究者の所属する研究室を中心とした研究により、これまでに LPA の 3 種類の産生酵素 (オートタキシン (ATX)、ホスファチジン酸選択的ホスホリパーゼ A $_{1\alpha}$  (PA-PLA $_{1\alpha}$ )、PA-PLA $_{1\beta}$ ) と 6 種類の LPA 特異的受容体 (LPA $_1$ , LPA $_2$ , LPA $_3$ , LPA $_4$ , LPA $_5$ , LPA $_6$ ) が同定されている。これら LPA 産生酵素や LPA 受容体の遺伝子の KO マウスの解析から、例えば、毛髪形成において PA-PLA $_{1\alpha}$  が産生する LPA が LPA $_6$  受容体を活性化して毛包上皮層の正常な増殖・分化を制御すること (Inoue et al. EMBO J. 2011. 30:4248)、子宮内膜において ATX が産生する LPA が LPA $_3$  受容体を活性化することでの適切な脱落膜化を引き起こすこと (Aikawa et al. EMBO J. in press) が明らかになってきている。雄性生殖器官における LPA の役割については、LPA $_1$ , LPA $_2$ , LPA $_3$  のトリプル KO マウスにおいて加齢とともに精子形成不全と不妊率の増加が報告され、LPA は精巣の機能維持に重要であると考えられている (Ye et

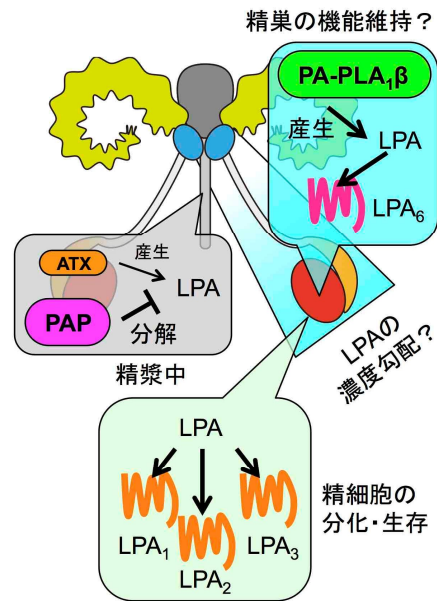


図2 LPAと雄性生殖器官のこれまでの知見と新たな知見  
PA-PLA $_{1\beta}$ は精子産生の上流側で発現が高い。PAPは精漿中に高濃度存在し、LPA産生を強力に抑制する。LPA $_1$ , LPA $_2$ , LPA $_3$ は精細胞の適切な分化と生存に寄与する。本研究の結果、PA-PLA $_{1\beta}$ -LPA-LPA $_6$ が精巣の機能維持に関与することが明らかとなった。KOマウスの表現型からPA-PLA $_{1\beta}$ はそれ以外の機能もあるが、詳細は不明である。

al. Biol Reprod. 2008, 79:328)。また、前立腺酸性ホスファターゼ (PAP) は精漿に豊富に存在する酵素であり、その基質や機能は不明であったが、本研究者の所属する研究室で PAP の基質の 1 つが LPA であることを見出されており、LPA は前立腺より上流側で機能し、前立腺から分泌される PAP が不要となった LPA の機能を抑制するものと想定されている (Tanaka et al. FEBS Lett. 2004, 571:197)(図2)。一方、上記の現象において細胞外 LPA がどのような酵素により産生されるかや、LPA $_1$ , LPA $_2$ , LPA $_3$  受容体以外の LPA 受容体を介した雄性生殖器官の LPA の機能は不明であった。

本研究者は PA-PLA $_{1\beta}$  KO マウスを作製し、このマウスが雄性生殖器官の形成異常を示すことを見出した(図2、図3)。このマウスにおける生殖器官異常の表現型は LPA $_1$ , LPA $_2$ , LPA $_3$  受容体トリプル KO マウスとは異なっていたことから、既存とは異なる LPA の雄性生殖器官の役割を明らかにすべく研究を開始した。

2. 研究の目的

前述の知見を踏まえ、PA-PLA $_{1\beta}$ によって産生される LPA がどの LPA 受容体を介して雄性生殖器官の形成に関与するかを明らかにすることを目的とする。また、これら LPA シグナル欠損マウスの雄性生殖器官の組織形態を詳細に解析するとともに、LPA シグナルが動

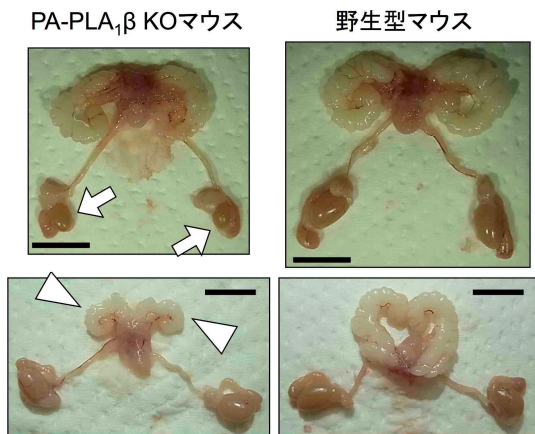


図3 PA-PLA<sub>1</sub>β KOマウスの雄性生殖器形成不全  
矢頭は精巣形成不全、矢印は精嚢形成不全、スケールバーは1cmを示す。

く細胞を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ・マウス

実験には4週齢、8週齢、16週齢のオスマウスを用いた。各KOマウスはC57BL/6J系統へバッククロスを行い、KOマウスに対するコントロールは、同腹の野生型またはヘテロKOマウスを用いた。

#### ・精巣の組織学的評価

マウスから精巣を取り出し、Modified Davidson's fluid (mDF) に浸して4°Cで24時間以上固定した。事前検討の結果、パラホルムアルデヒド、ブアン固定よりもmDF固定が最も精巣の形態をよく保持できた。固定した精巣を定法に従ってパラフィンに包埋し、厚さ5~10μmのパラフィン切片を作成し、再水和後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

#### ・精原細胞の免疫染色

上記の方法で作成した精巣パラフィン切片に対し、0.01 M クエン酸バッファーを用いて抗原の賦活化処理を行った。このサンプルに対し、血清によるブロッキング処理、anti-PCNA 抗体 (Proliferating Cell Nuclear Antigen、精原細胞マーカー) による一次抗体標識、DAB kit (Vector 社製) による発色を行った。

#### ・in situ mRNA ハイブリダーゼーション

上記の方法で作成した精巣パラフィン切片に対し、RNA scope® 2.5 シングルプレックス発色アッセイキット (Advanced Cell Diagnostics 社製) を用いて定法に従い、in situ hybridization を行った。次のプローブを使用し、受容体の mRNA を検出した。LPA<sub>1</sub> 受容体 (Mm-Lpar1, No.318591)、LPA<sub>2</sub> 受容体 (Mm-Lpar2, No.442691)、LPA<sub>3</sub> 受容体 (Mm-Lpar3, No.432591)、LPA<sub>6</sub> 受容体 (Mm-Lpar6, No.318341)。

### 4. 研究成果

PA-PLA<sub>1</sub>β KO マウスの生殖能力を調べたところ、約半数のオス KO マウスが不妊であ

った。精嚢・精巣の形成不全が出現する頻度も約半数であり、雄性生殖器異常の表現型の浸透率は50%程度であった。

PA-PLA<sub>1</sub>β KO マウスの雄性生殖器の表現型が約半数にしか現れない理由として、他のLPA 産生経路が重複して機能している可能性を想定し、LPA 産生酵素 PA-PLA<sub>1</sub>α に着目した。PA-PLA<sub>1</sub>α KO はアミノ酸配列上で PA-PLA<sub>1</sub>β と最も相同性が高く、マウス精巣で mRNA の高い発現が見られた。各 LPA 産生酵素の KO マウスを交配して両酵素のダブルヘテロ KO マウスを作成し、このダブルヘテロマウスを交配させて PA-PLA<sub>1</sub>α と PA-PLA<sub>1</sub>β のダブル KO マウスを作製した。しかし、ダブル KO マウスは PA-PLA<sub>1</sub>β シングル KO マウスと比べて顕著な雄性生殖器の異常頻度や形態は認められなかった。従って、PA-PLA<sub>1</sub>α と PA-PLA<sub>1</sub>β が冗長的に機能する可能性は低いものと結論づけた。

次に本研究者の所有する5種類のLPA受容体 (LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub>, LPA<sub>4</sub>, LPA<sub>6</sub>) の各シングル KO マウスの雄性生殖器を調べた。その結果、LPA<sub>6</sub> KO マウスのみにおいて、約半数の雄において精巣が小さくなる表現型を見出した。LPA<sub>6</sub> KO マウスの精巣を摘出したところ、およそ7割のホモ KO マウスにおいて精巣重量が野生型と比較して顕著に減少していた (図4)。ヘテロ KO マウスではこのような精巣の萎縮は生じていなかった。この精巣重量の減少は8週齢の個体より、4週齢または16週齢の個体において顕著に認められ、特に16週齢のKOマウスでは観察した全ての個体において、重量がコントロールの3分の1以下に低下していた。一方、これまでに調べたLPA<sub>6</sub> KO マウスにおいては精嚢の形成不全を生じる個体は見られなかった。従って少なくとも精巣においてはPA-PLA<sub>1</sub>βにより産生されたLPAがLPA<sub>6</sub>の活性化を介して器官形成に関与することが強く示唆された。

ヘマトキシリン・エオジン染色による精巣の病理組織学的解析を行った。以下、解析個体数が十分確保できたLPA<sub>6</sub> KO マウスの結果を示す。LPA<sub>6</sub> KO マウスでは精巣を構成する精細管の一部では精細胞が脱落し、細胞質が変形した異常な形のセルトリ細胞のみが残

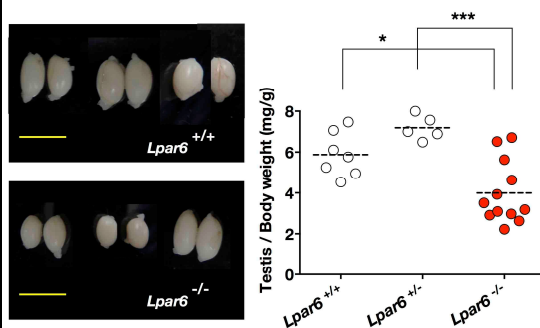


図4 LPA<sub>6</sub> KOマウスの精巣形成不全  
8週齢マウスのLPA<sub>6</sub>遺伝子 (Lpar6) 型の精巣 (左) 及び体重重量比 (右)。スケールバーは1cm。\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。



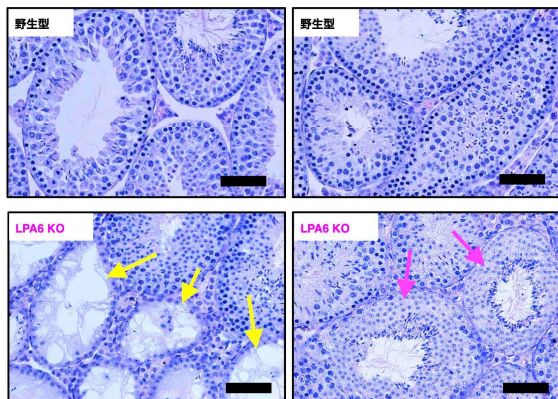


図5 LPA<sub>6</sub> KOマウスの精巣組織形態異常  
LPA<sub>6</sub> KOマウスの精細管の一部では、精細胞の脱落や変形したセルトリ細胞が観察された(黄色矢印)。また、精細胞の中にも精原細胞のみが脱落した精細管も認められた(赤矢印)。スケールバーは50 μmを示す。

されていた(図5)。また、一見正常に見える精細管についても、精細胞の前駆体である精原細胞のみが脱落している様子が認められた。そこで、精原細胞のマーカとして知られる PCNA を免疫染色によって検出した結果、LPA<sub>6</sub> KO マウスの精細管では精原細胞が顕著に減少していることが確認された。すなわち、LPA<sub>6</sub> の欠損によって精巣では精原細胞が維持できず、結果としてそれから分化する精細胞も徐々に脱落してくものと考えられる。この考えと一致するように、16 週齢の LPA<sub>6</sub> KO マウスでは精巣の表現型がシビアになり、ほとんどの精細管で精細胞の脱落が認められるようになった。この LPA<sub>6</sub> KO マウスの精巣における表現型は、少なくとも 4 週齢のまだ性成熟が完全に終了していない段階から生じていた。また、興味深いことに、この週齢の LPA<sub>6</sub> KO マウス精巣では、精原細胞の脱落に加えて、一部の精細管の構造が新生仔の精巣と類似した未成熟(精原細胞が中心に存在)な構造を示すことも明らかとなった。すなわち、LPA<sub>6</sub> の欠損は精巣の発達にも何らかの役割を果たしている可能性も示唆された。

精巣で発現している LPA<sub>6</sub> 受容体を介して精原細胞の維持が行われていると仮定し、精巣における各 LPA 受容体の発現解析を行った。まず成体マウスの精巣を用いて定量 PCR を行ったところ、LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub> の mRNA は比較的高く発現していることが認められ、LPA<sub>4</sub>, LPA<sub>5</sub>, LPA<sub>6</sub> はそれと比較すると発現レベルは低かった(図6)。in situ hybridization により、成体マウスの精巣における各 LPA 受容体の mRNA の組織局在を調べると、LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub> は過去の報告(Ye et al. Biol Reprod. 2008, 79:328)と一致する部位に明瞭なシグナルが認められるのに対し、LPA<sub>6</sub> のシグナルは極めて弱かった。そこで、LPA<sub>6</sub> KO マウスが 4 週齢の幼若段階で精巣に表現型が生じることから、新生仔のマウス精巣での mRNA 局在解析を行ったところ、LPA<sub>6</sub> は精原細胞、セルトリ細胞、ラ

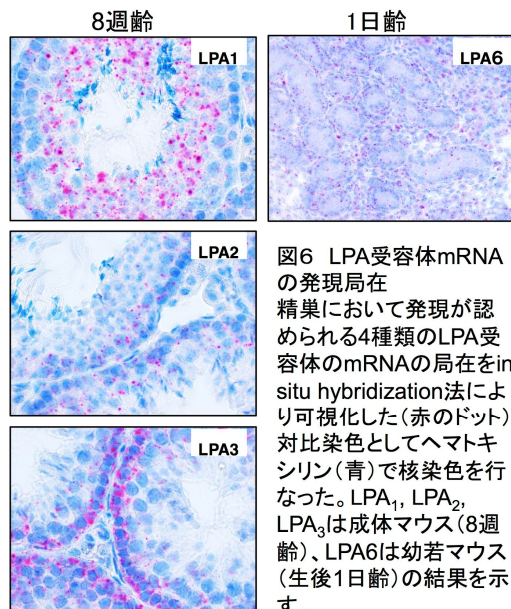


図6 LPA受容体mRNAの発現局在  
精巣において発現が認められる4種類のLPA受容体のmRNAの局在をin situ hybridization法により可視化した(赤のドット)。対比染色としてヘマトキシリン(青)で核染色を行った。LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub>は成体マウス(8週齢)、LPA<sub>6</sub>は幼若マウス(生後1日齢)の結果を示す。

イディッヒ細胞に発現が認められることがわかった(図6)。この発現は週齢を経るにつれて低下していき、おおよそ3週齢を過ぎると、mRNAのシグナルがほとんど検出されなかった。以上の結果は、精巣においてLPA<sub>6</sub>シグナルは早い時期に機能しており、このシグナルの欠損がのちの精巣の発達・精原細胞の維持に影響を与える可能性を示唆している。

本研究によって、PA-PLA<sub>1β</sub>-LPA-LPA<sub>6</sub> 受容体を介した精巣における新たな機能を見出した。この LPA シグナルの役割機能は既報の重複した LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub> 受容体と異なる。PA-PLA<sub>1β</sub>-LPA-LPA<sub>6</sub> 受容体のシグナルは精巣機能の形成よりもその維持に重要な役割を担うものと推察される。精巣のどの細胞で、どの時期の LPA シグナルがその機能を発揮するのかについて、今後の詳細な解析が必要である。また、実際に PA-PLA<sub>1β</sub> が精巣を始めとする雄性生殖器官でどのような LPA の濃度勾配を形成しているのかを捉えることも重要な今後の課題の1つである。

## 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)

[学会発表](計2件)

1. 岸田真輝、可野邦行、井上飛鳥、青木淳賢、「LPA<sub>6</sub> の欠損は精原細胞の減少を引き起こす」、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 09 月 25 日~2016 年 09 月 27 日、 仙台国際センター(仙台市)

2. 岸田真輝、可野邦行、井上飛鳥、青木淳賢、「LPA<sub>6</sub> 欠損マウスにおける精巣の形成不全の解析」、第 54 回日本薬学会東北支部大会、2015 年 09 月 26 日、岩手医科大学(盛岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H28/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 飛鳥 (INOUE, Asuka)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50525813

(4)研究協力者

可野 邦行 (KANO, Kuniyuki)

東北大学・大学院薬学研究科・助教