

氏名	堀部 晃央
(ふりがな)	(ほりべ あきお)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成29年6月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Upregulated autophagy in Sertoli cells of ethanol-treated rats is associated with induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS), androgen receptor suppression and germ cell apoptosis
	(エタノール投与ラットのセルトリ細胞におけるオートファジーの亢進は iNOS 発現誘導、アンドロゲンレセプター発現抑制および生殖細胞のアポトーシスと関連する)
論文審査委員	(主) 教授 大 道 正 英 教授 前 村 憲 太 朗 教授 高 井 真 司

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背景および目的》

アルコール（エタノール）は最も身近な薬物であり、肝臓、脳、生殖機能等、体全体に影響を与えるといわれている。精巣においてもアルコール中毒モデルラットで、生殖細胞のアポトーシスを増加させ、精子形成を障害することが報告されている。しかしながら、支持細胞であるセルトリ細胞はアポトーシス抵抗性を有していることが報告されている。セルトリ細胞は、生殖細胞の発達や維持に重要な役割を担っており、何らかの防御機構を

有していることが推測される。オートファジーは不要な物質やダメージを受けた物質を選択的に隔離膜内に取り込んだ後（オートファゴソーム）、ライソソームと融合することで内容物を分解除去する（オートライソソーム）機構であり、セルトリ細胞においても重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで、本研究では、アルコールによる精巣障害にオートファジーがどのように関与しているのかを解明することとした。

《急性アルコール障害モデルラットの作製》

12週齢のWistar系ラットに5 g/kgの40%エタノールを腹腔内投与し、投与0、3、6、24時間後に麻酔下にて屠殺し精巣を摘出した。対照のラットには phosphate buffered saline（PBS）を投与した。

《病理組織学的検索・免疫組織化学染色》

摘出した精巣を4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色により病理組織学的検討、Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP-mediated nick-end labeling（TUNEL）染色によりアポトーシスの検出を行った。オートファジーの同定には microtubule-associated protein light chain 3（LC3）、transcription factor EB（TFEB）、pan cathepsin に対する免疫染色を用いた。また、セルトリ細胞のマーカーとして androgen receptor（AR）、酸化ストレスマーカーとして inducible nitric oxide synthase（iNOS）に対する抗体を用いて免疫組織化学染色および免疫蛍光染色を行った。

《Western blot によるタンパク質の量的解析》

摘出した精巣からタンパク質を抽出し、免疫組織化学染色で用いたものと同様の抗体を用いて量的解析を行った。

《電子顕微鏡観察》

摘出した精巣を 2%パラホルムアルデヒドと 2.5%グルタルアルデヒドの混合液で前固定し、2%四酸化オスミウムで後固定、脱水後エポン樹脂に包埋し超薄切片の作製を行った。酢酸ウランと鉛の二重染色を行い電子顕微鏡で観察を行った。

《セルトリ細胞株を用いた in vitro 研究》

TM4 (マウスセルトリ細胞株) を 5%ウマ血清、2.5%ウシ胎児血清含有の Dulbecco's modified eagle medium:nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) 培地で 5% CO₂ インキュベーターにて培養した。細胞は 50 あるいは 100 mM のエタノールで 24 時間処理し、実験に用いた。また、オートファジー阻害実験では 5 mM の 3-methyladenine (3-MA) をエタノール処理 1 時間前に添加した。生存率の測定は Cell Titer-Blue™ Cell Viability Assay で行い、オートファジーは LC3 抗体を用いて免疫蛍光染色で検出した。またエタノール処理後の細胞からタンパク質を抽出し、同様の抗体を用いて Western blot により LC3 の量的解析を行った。

《結果および考察》

PBS 投与群 (コントロール) と比べエタノール処理ラット (ETR) で生殖細胞の TUNEL 陽性のアポトーシスに陥った細胞が有意に増加していた。TUNEL 陽性の生殖細胞の数はエタノール処理後 3 時間で増加のピークを迎えその後緩やかに減少していた。これはセルトリ細胞の食作用の亢進によるものと考えられた。一方、セルトリ細胞には TUNEL 陽性像は見られなかった。このことは、TUNEL と AR (セルトリ細胞マーカー) の二重染色および電子顕微鏡下の観察により確認できた。生殖細胞のアポトーシスはセルトリ細胞の酸化ストレスおよび AR の発現抑制により起こることが考えられたため、iNOS と AR の発現解析を行った。コントロール精巣でセルトリ細胞や間質細胞の iNOS 発現は低レベルであったが、ETR では発現が上昇しており、過度の NO 産生を介し生殖細胞のアポトーシスを引き起こしていることが考えられた。また、AR はコントロールと比べ ETR でセル

トリ細胞の細胞質および核内の発現低下が観察され、アンドロゲンの抑制が起こっていることが推測された。これら発現量の変化は Western blot においても同様に確認され、それぞれエタノール処理後 24 時間で最も iNOS の現量の上昇および AR の発現量の低下がみられた。このことから、24 時間後に焦点を当て、さらに実験を行うこととした。近年、セルトリ細胞は毒物や酸化ストレスなどへの暴露から生き延びるためにオートファジーを利用しているという報告があることから、エタノール投与での過度の NO 産生およびアンドロゲン産生抑制によりオートファジーが亢進することで、セルトリ細胞をアポトーシスから守っている可能性が示唆された。実際、オートファジーマーカー LC3 の発現量は ETR で有意に上昇しており、さらにライソソームマーカー pan cathepsin の発現増加および LC3 と pan cathepsin の共局在が増加していることから、オートファジーが ETR セルトリ細胞で活性化していることが明らかとなった。電子顕微鏡下の観察ではセルトリ細胞内に多数のオートファゴソームおよびオートライソソームを認め、その数はコントロールと比べ ETR で有意に増加していた。また、ライソソームの生合成およびオートファジーの調節因子とされている TFEB の発現量増加および核内移行が認められた。以上より、エタノールによるセルトリ細胞のアポトーシスからの防御機構としてオートファジーが活性化しており、その調節に TFEB が関与していることが示された。我々は、オートファジーの細胞保護作用を直接的に解明する為に、TM4 培養細胞を用いた実験を行った。免疫蛍光染色および Western blot の結果より、100 mM のエタノール処理群で LC3 の発現量の有意な増加が認められた。また、3-MA を用いてオートファジーを阻害したところ細胞生存率が有意に低下し、オートファジーがセルトリ細胞に保護的に働くことを示した。

これらの結果より、本研究により、セルトリ細胞がアルコールに起因したストレスから細胞を守るために、TFEB による調節を介してオートファジーを亢進させており、これらはセルトリ細胞保護作用に必須の分子機構であることが示唆された。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

過度のアルコール摂取はヒトや実験動物において酸化ストレスやアンドロゲン抑制を介して精巣で生殖細胞のアポトーシスを増加させ、精子形成を障害することで男性不妊の原因になると報告されている。今回申請者は、急性アルコール中毒モデルラットの精巣において、生殖細胞はアポトーシスに至っていたが、セルトリ細胞はアポトーシス抵抗性を有していることに着目し、セルトリ細胞の細胞保護作用について検討した。その結果、セルトリ細胞では、アルコール投与により酸化ストレス増加およびアンドロゲン産生の抑制によりオートファジーが誘導されていることを示した。オートファジーはダメージを受けた物質を隔離膜内に取り込み分解する機構であり、これがセルトリ細胞の細胞保護作用として機能していると考えられ、さらにセルトリ細胞のオートファジー誘導には **transcription factor EB (TFEB)** が関与していることを明らかにした。また、申請者はセルトリ細胞の培養細胞を用いて、エタノール刺激によりセルトリ細胞でオートファジーが誘導されること、およびオートファジーを阻害するとセルトリ細胞の細胞生存率が低下することを示した。このことは、オートファジーがセルトリ細胞の細胞保護作用に寄与していることを強く支持する。

本研究により、セルトリ細胞はオートファジーを活性化させることによりアポトーシス抵抗性を獲得し、セルトリ細胞自身を守っているということが明らかとなった。これらは、精子形成過程の解明や、男性不妊治療の一助となる可能性があると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International Journal of Molecular Sciences
18(5): 1061, 2017 doi: 10.3390/ijms18051061 〈オンライン掲載〉