



# Expression and Regulation of Neuropeptide Y Messenger Ribonucleic Acid in Cultured Immature Rat Leydig and Sertoli Cells

神崎, 正徳

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1558

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001558>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	かん ざき まさ のり 神 崎 正 徳	（大分県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1043号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	Expression and Regulation of Neuropeptide Y Messenger Ribonucleic Acid in Cultured Immature Rat Leydig and Sertoli cells. (培養幼若ラットライディッヒ及びセルトリ細胞における Neuropeptide Y mRNAの発現制御)	
審査委員	主査 教授 守 殿 貞 夫 教授 望 月 眞 人 教授 岡 田 昌 義	

### 論文内容の要旨

#### <緒言>

精子形成は、下垂体からのLHやFSHによるendocrine及び精巣内でのautocrine, paracrine機構により調節を受けている。近年、オピオイド等の神経伝達物質が精巣の各種細胞に発現し、細胞間相互作用を営んでいることが明らかになってきた。Neuropeptide Y (NPY) は36鎖のアミノ酸よりなる蛋白で、主に哺乳類の神経系に広く存在する神経伝達物質の一種である。ラット下垂体において、NPYはGnRHの刺激に対するLH及びFSHの放出を促進し、また、雄ラット弓状核でのNPYの発現はテストステロンにより調節されている。これらのことから、中枢神経系におけるNPYはゴナドトロピンの分泌調節と関連しており、NPYと生殖機能との関わりが示唆される。本研究では、精巣でのNPY発現の有無とその局在、及び調節様式を知る目的で、ラット精巣の各種細胞の分離培養系を用いて、RT-PCR法、Northern blot法、及び免疫染色法により検討した。その結果、ラット精巣では、ライディッヒ細胞及びセルトリ細胞にNPYの発現を認め、その発現がLH、FSHによるendocrine機構、及び精巣内細胞間相互作用により調節されていることが明らかとなったので報告する。

#### <方法>

##### (1) 精巣細胞の分離

ライディッヒ細胞及びセルトリ細胞は18日齢Sprague-Dawley (SD) ラットからコラゲナーゼ処理にて、また、精細胞は250～270gのSDラットから、遠心分離法にて精母細胞 (pachytene spermatocyte; PS) と精子細胞 (round spermatid; RSd) の2つの分画を採取した。

##### (2) RT-PCR法

既にクローニングされているラットNPYに特異的な塩基配列をもつプライマーを合成した。分離したライディッヒ細胞、セルトリ細胞、及び精細胞、また、250～270gのSDラットから摘出した精巣上体、精管、精嚢及び前立腺からAGPC法にてtotal RNAを抽出。RNAを逆転写反応後、PCR法に

よりNPY mRNAの発現の有無を検討した。

### (3) Northern blot法

ライディッヒ細胞は、無血清培地にて48時間培養後、各種薬物 (LH, interleukin (IL) -1, forskolin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 又は細胞培養上清 (セルトリ細胞, 精細胞) を添加した。セルトリ細胞は、無血清培地にて72時間培養後、FSHを添加した。一定時間培養した後、AGPC法にてRNAを抽出し、Northern blot法にてNPY mRNA発現量の変化を定量的に評価した。プローブは、(2)で得られたPCR産物をシーケンス後サブクローニングし作製した。

### (4) 免疫染色法

NPY蛋白の局在を検討する目的で、抗NPYポリクローナル抗体を用い、Avidin-Biotin Complex (ABC) 法および間接蛍光抗体法にて、分離したライディッヒ細胞およびセルトリ細胞を染色した。

## <結果>

### (I) ラット精巣および精路器官におけるNPY mRNAの発現

RT-PCR法にて、精巣のライディッヒ細胞、セルトリ細胞にNPY mRNAの発現を認めた。精巣以外の精路器官では、精巣上体及び精管にNPY mRNAの発現を認めた。一方、精細胞、精嚢、前立腺には発現を認めなかった。

### (II) Northern blot 法によるNPY mRNA発現調節様式の検討

#### (1) ライディッヒ細胞での成績

ライディッヒ細胞におけるNPY mRNA発現量は、①ゴナドトロピン (LH) 及びサイトカイン (IL-1 $\alpha$ 又は $\beta$ ) の添加、②セルトリ細胞培養上清 (FSHで刺激したもの又は無刺激のもの) の添加、③精細胞 (PS又はRSd) 培養上清の添加により増加した。これらのことから、ライディッヒ細胞のNPY mRNA発現は、LH及びIL-1による調節を受けていること、及びライディッヒ細胞とセルトリ細胞間、ライディッヒ細胞と精細胞間とのそれぞれのparacrine short loopの存在が示唆された。

一方、adenylate cyclase賦活剤であるforskolin、又はproteinkinase C賦活剤であるPMAの添加によってもライディッヒ細胞のNPY mRNA発現量は増加した。このことから、ライディッヒ細胞におけるNPY mRNA発現調節の細胞内情報伝達経路として、これら2つのsecond messenger pathwayが関与していることが示唆された。

#### (2) セルトリ細胞での成績

セルトリ細胞におけるNPY mRNA発現量は、ゴナドトロピン (FSH) の添加により増加した。このことから同細胞におけるNPY mRNAの発現は、FSHにより調節されていることが示唆された。

### (III) 免疫染色法

ABC法により、ライディッヒ細胞の細胞質にNPY蛋白の強い染色を認め、セルトリ細胞でも細胞質に淡い染色を認めた。一方、間接蛍光抗体法では、ライディッヒ細胞にNPY蛋白の染色を認めたが、セルトリ細胞には明らかな染色を認めなかった。NPY蛋白は、ライディッヒ、セルトリ両細胞に発現しているものの、その発現量はライディッヒ細胞でより多いと考えられた。

## <考察>

本研究により、ラット精巣のライディッヒ細胞及びセルトリ細胞にNPY mRNAが発現し、その発現量はゴナドトロピンにより調節されていることがはじめて明らかにされた。また、ライディッヒ細胞でのNPY mRNA発現は、セルトリ細胞及び精細胞分泌物質により調節されていることが示さ

れた。

ライディッヒ細胞でのNPY mRNAの発現は、LHによるendocrine調節を受けていることが示唆された。このLHは精巣のライディッヒ細胞に特異的に作用し、テストステロンの産生を促す。また、このテストステロンは、ラットの視床下部では、NPYの分泌を調節していることが知られている。精巣では、ライディッヒ細胞自身にもテストステロンレセプターの存在が報告されていることから、ライディッヒ細胞におけるNPYの発現は、LHの直接作用のほかに、LHの刺激により産生されたテストステロンを介した調節もを受けている可能性が考えられる。

一方、本研究では、LHに加えてIL-1がライディッヒ細胞のNPY mRNA発現量の調節因子であることが示された。精子形成は、従来から良く知られているゴナドトロピンによるendocrine調節以外に、精巣内の細胞間相互作用による調節もを受けている。この後者の調節機構へのアプローチの1つとして、IL-1のライディッヒ細胞に対する作用を検討した。IL-1は精巣ではライディッヒ細胞、セルトリ細胞、マクロファージから分泌されている。さらに、ライディッヒ細胞にはIL-1レセプターが存在することが報告されている。今回の結果より、ライディッヒ細胞、セルトリ細胞、マクロファージから分泌されたIL-1が、autocrineあるいはparacrine機構を介してライディッヒ細胞のNPY mRNA発現を調節することが推定される。

ライディッヒ細胞とセルトリ細胞間、及びライディッヒ細胞と精細胞間の相互作用を検討する目的で、セルトリ細胞および精細胞培養上清をライディッヒ細胞に添加し、ライディッヒ細胞のNPY mRNA発現量の変化を調べた。無血清培地で培養したセルトリ細胞培養上清およびFSH存在下で培養したセルトリ細胞培養上清は、共にライディッヒ細胞のNPY mRNA発現量を増加させたが、後者の方が増加作用が強かった。このことは、FSH刺激により増加する何らかのセルトリ細胞分泌物質がライディッヒ細胞のNPY mRNAの発現量を増加させる作用があることを示すもので、ライディッヒ細胞とセルトリ細胞との間に細胞間相互作用の存在が明らかとなった。また、精細胞培養上清が、PS、RSd共に、ライディッヒ細胞のNPY mRNA発現量を増加させたことから、ライディッヒ細胞と精細胞間にも相互作用が存在すると考えられる。つまり、セルトリ細胞及び精細胞からライディッヒ細胞のNPY mRNA発現を調節する何らかの物質が分泌されており、それらの分泌物質によるライディッヒ細胞機能調節機構、すなわち精巣内のparacrine制御機構の存在が示唆された。

薬物添加によるライディッヒ細胞のNPY mRNA発現量の変化として、forskolinとPMAの両者も増加作用を示した。このことは、これらの物質が同細胞内の情報伝達のmessengerとなっている可能性を強く示唆しており、臨床薬理上興味ある成績と考える。

セルトリ細胞にも、ライディッヒ細胞と比較するとその発現量は少ないものの、NPY mRNA及びNPY蛋白の発現を認めた。FSHは精巣内でセルトリ細胞に特異的に作用するホルモンであり、本研究でもFSH添加によりセルトリ細胞のNPY mRNA発現量の増加を認めたことから、ゴナドトロピンによるendocrine調節を受けていることが示唆された。

本研究により、ライディッヒ細胞のNPY mRNA発現は、ゴナドトロピンによるendocrine調節に加えて、ライディッヒ細胞－セルトリ細胞、及びライディッヒ細胞－精細胞の細胞間相互作用により調節を受けていることが想定される。今後、精子形成異常の病態解明に、精巣内での細胞機能調節機構をさらに明らかにしていくことが重要と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

Neuropeptide Y (NPY) は神経伝達物質の一種で、中枢神経系においてゴナドトロピンの分泌調節と関連しており、NPYと生殖機能との関わりが示唆される。申請者は、ラット精巣の各種細胞の分離培養系を用いて、RT-PCR法、Northern blot法、及び免疫染色法により、精巣でのNPY発現の有無とその局在、及び調節様式を検討した。

ライディッヒ細胞及びセルトリ細胞は幼若ラットからコラゲナーゼ処理にて、また、精細胞は250～270gのラットから、遠心分離法にて分離した。まず、RT-PCR法にてNPY mRNAの発現の有無を検討した。その結果、精巣のライディッヒ細胞及びセルトリ細胞に、また、精巣以外の精路器官では、精巣上体及び精管に発現を認めた。次に、Northern blot法によりライディッヒ、セルトリ両細胞でのNPY mRNA発現調節様式について検討した。ライディッヒ細胞におけるNPY mRNA発現量は、①LH及びIL-1の添加、②セルトリ細胞培養上清の添加、③精細胞培養上清の添加、④forskolin及びPMAの添加により増加した。一方、セルトリ細胞におけるNPY mRNA発現量は、FSHの添加により増加した。NPY蛋白の局在を調べるために行った免疫染色法では、NPY蛋白はライディッヒ、セルトリ両細胞の細胞質に発現しているものの、その発現量はライディッヒ細胞でより多かった。

本研究により、ラット精巣のライディッヒ細胞及びセルトリ細胞にNPY mRNAが発現していることがはじめて明らかにされた。ライディッヒ細胞では、LH及びIL-1がNPY mRNA発現量の調節因子であることが示された。IL-1は精巣では、ライディッヒ細胞、セルトリ細胞、マクロファージから分泌されている。さらにライディッヒ細胞にはIL-1レセプターが存在する。つまり、ライディッヒ細胞のNPY mRNA発現は、LHによるendocrine調節に加えて、IL-1によるautocrineあるいはparacrine機構を介した調節を受けていることが推定される。また、セルトリ細胞及び精細胞から、ライディッヒ細胞のNPY mRNA発現を調節する何らかの物質が分泌されており、それらの分泌物質によるライディッヒ細胞機能調節機構の存在が示唆された。一方adenylate cyclase賦活剤、protein kinase C賦活剤の添加によってもライディッヒ細胞のNPY mRNA発現量は増加したことから、細胞内情報伝達経路として、これら2つのsecond messenger pathwayの関与が考えられる。セルトリ細胞においては、ライディッヒ細胞と比較するとその発現量は少ないものの、FSH添加によりNPY mRNA発現量の増加を認めたことから、ゴナドトロピンによるendocrine調節を受けていることが示唆された。

本研究は、神経伝達物質Neuropeptide Yと生殖機能の関係について、精巣細胞におけるNPY mRNAの発現制御を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったライディッヒ細胞及びセルトリ細胞におけるNPY mRNAについて重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。