



# Nitric Oxide Production by Cultured Rat Leydig Cells

龍見, 昇

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1749

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001749>

※ 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)	たつ 龍 見 のぼる (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1144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10年3月31日
学位論文題目	Nitric Oxide Production by Cultured Rat Leydig Cells (ラットライディッヒ細胞におけるNitric oxideの生産について)

審査委員 主査 教授 守 殿 貞 夫  
教授 岡 田 昌 義 教授 河 野 通 雄

## 論文内容の要旨

### 【緒 言】

精巣は、精細管と間質から成り、精細管には精祖細胞から精子に至る各段階の精細胞とセルトリ細胞が、間質にはライディッヒ細胞が存在する。精子形成に関わるセルトリ細胞の分泌機能は、卵巣刺激ホルモン(FSH)により調節されている。ライディッヒ細胞におけるテストステロンの産生は、下垂体から分泌される黄体刺激ホルモン(LH)の刺激により促進される。最近、精巣内には、これらLH、FSHによる間脳-下垂体-精巣系調節とは別の細胞間機能調節機構の存在が明らかになってきている。その調節において中心的薬理をなす細胞間伝達物質として、interleukin1 (IL-1), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) をはじめとするサイトカインが報告されている。

本研究において我々は、nitric oxide synthase (NOS) によりL-arginineから生成されるフリーラジカルであるnitric oxide (NO) が、精巣内でどのように発現しているか、サイトカインを介した実験系で検討した。NOは、その発見の契機となった血管平滑筋の収縮作用のみならず、生体内の多くの臓器において、多様な働きを担っていることが明らかになってきている。前述のNOSには、neuronal NOS (nNOS), endothelialNOS (eNOS), inducibleNOS (iNOS) の3種類のアイソフォームが存在する。最初にマクロファージで見い出されたiNOSはカルシウム/カルモジュリン非依存性であり、主としてサイトカインやエンドトキシンの刺激で誘導される。iNOSは、多くの場合細胞障害的に、もしくは生体防御因子として機能するNOを産生している。例えば、細菌感染が起こるとLPS、インターフェロンなどの刺激でマクロファージにおけるNO生成が促進され、NOまたはその誘導体が直接細菌作用を示し、腫瘍細胞に対してはミトコンドリア呼吸系やDNA合成を阻害する。血管においてはLPSの刺激で産生されたNOが血管平滑筋の弛緩を引き起こす。

本研究では、このような様々な機能を持つNOが、精巣細胞でも存在するのかを検討するため、ラットのライディッヒ細胞の培養系を用い、サイトカインの添加刺激によるNOの産生とiNOSの発現を定量的に検討し、その精巣機能調節因子としての役割について解析した。

## 【方 法】

### (1) ライディッヒ細胞の分離と培養

幼若ライディッヒ細胞は、20日齢のSprague-Dawley (SD) ラットからコラゲナーゼ/ディスパーゼ処理にて、また、成熟ライディッヒ細胞は、8週齢のSDラットからコラゲナーゼ処理の後、elutriationを用いた遠心分離法にて、各々採取した。これらライディッヒ細胞を無血清培地にて48時間培養した後、培養液を交換し、IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , forskolin の各種サイトカイン, あるいはhCGをそれぞれ添加した。

### (2) NOの測定

培養上清中のNOは、半減期が数秒と短いため、その安定した最終代謝産物であるnitriteをグリース法を用いて測定した。分離した幼若ライディッヒ細胞を、無血清培地にて48時間培養した後、培養液を交換し、IL-1 $\beta$  (0.01~100ng/ml), TNF $\alpha$  (0.01~100ng/ml), forskolin (0.01~100mM), hCG (0.01~100ng/ml)を各々添加し、24時間後の培養上清中のnitriteを測定した。また、IL-1 $\beta$  (1ng/ml)とともに、NOSの阻害剤であるN<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)を1nMの濃度でライディッヒ細胞に添加し、6, 12, 4時間後にnitriteを測定した。また、成熟ライディッヒ細胞にIL-1 $\beta$ を0.01~100ng/mlの濃度で添加し、24時間培養した後、培養上清中のnitriteを測定した。

### (3) iNOS mRNA発現の検討

iNOS mRNA 発現量は、各ライディッヒ細胞によりRNAを抽出し、iNOS cDNAプローブをもちいたNorthern blot法にて定量的に検討した。IL-1 $\beta$ を添加した場合のみ培養上清中nitriteの増加が認められたため、iNOS mRNAの発現の検討は、IL-1 $\beta$ についてのみ行った。幼若ライディッヒ細胞にIL-1 $\beta$ を1ng/mlの濃度で添加し、3, 6, 12, 24時間後の上記発現を、またIL-1 $\beta$ を0.01~100ng/mlの異なる濃度で添加し、12時間後の発現を観察した。成熟ライディッヒ細胞にIL-1 $\beta$ を1ng/mlの濃度で添加し、6, 12時間培養しiNOS mRNAの発現をみた。

### (4) 免疫組織学的検討

ライディッヒ細胞におけるiNOS蛋白の局在を検討する目的で、抗iNOSポリクローナル抗体を用い、Avidin-Biotin Complex (ABC) 法にて免疫染色を行った。

## 【結 果】

### (1) 幼若ライディッヒ細胞におけるNO産生とiNOS mRNAの発現

培養液交換6時間後より、IL-1 $\beta$ 非添加の幼若ライディッヒ細胞の培養上清中に、NOの最終代謝産物であるnitriteの存在を認めた。培養上清中のnitrite量は、IL-1 $\beta$ の添加により0.01~100ng/mlで濃度依存性に増加した。一方、TNF $\alpha$ , forskolin, hCGを添加したライディッヒ細胞の培養上清中のnitrite量は、controlと差を認めなかった。IL-1 $\beta$  (1ng/ml)で刺激した幼若いライディッヒ細胞の培養上清には、経時的にnitriteの増加を認めたが、IL-1 $\beta$ に加え、NOSの阻害剤であるL-NMMA (1nM)を添加したものでは、controlとほぼ同じレベルまで抑制された。また幼若ライディッヒ細胞にIL-1 $\beta$ を0.01~100ng/mlの濃度で添加後12時間培養すると、iNOS mRNAの発現は、非添加ではほとんど認められないのに対し、IL-1 $\beta$ の濃度0.01~10ng/mlの範囲で濃度依存性に増加した。IL-1 $\beta$ を1ng/mlの濃度で添加し、3, 6, 12, 24時間と培養時間を変えてみると、iNOS mRNAの発現は6時間でピークに達し、その発現は24時間までほぼ同程度認められた。

### (2) 成熟ライディッヒ細胞におけるNO産生とiNOS mRNAの発現

成熟ライディッヒ細胞にIL-1 $\beta$ を0.01~100ng/mlの濃度で添加後、24時間培養すると、培養上清中の nitrite は濃度依存性に増加した。また、成熟ライディッヒ細胞にIL-1 $\beta$  (1ng/ml) を添加後 0, 6, 12 時間培養したところ、iNOS mRNAの発現は6時間後に明らかに認められ、12時間でもほぼ同程度に認められた。

### (3) 免疫組織学的検討

幼若および成熟ライディッヒ細胞の細胞質中にiNOSポリクローナル抗体で染色される部位を認め、iNOS蛋白の存在が確認された。

## 【考 察】

精巣機能は、主に、間脳-下垂体-精巣系によって調節されている。しかし、下垂体機能不全症のなかには、ゴナドトロピンの投与により発生した精子形成が、ゴナドトロピン中止後も持続する例があることから、精巣機能を上位中枢支配のみで一元的に説明できない可能性が報告されてきた。一方、近年の細胞分離法と培養技術の進歩により、上位中枢とは別の精巣内細胞間機能調節機構の存在が明らかにされてきている。精巣機能の一部をつかさどるライディッヒ細胞は、主にテストステロンを産生しており、その産生機能は精巣内で分泌される物質のうち、IL-1, TNF $\alpha$ などのサイトカインや insulin like growth factor-1 などの成長因子によっても調節を受けている。これらの調節因子のうち、IL-1 は精巣内ではマクロファージ、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞から産生されている。中でも精巣間質に比較的多く存在するマクロファージは、ライディッヒ細胞の成長過程から、成熟した後の機能調節に至るまで密接に関係しており、IL-1 を介した細胞間相互作用が想定され、精巣内細胞間調節機構のひとつとして理解されている。

我々は、本研究においてラットの幼若および成熟ライディッヒ細胞に iNOS が存在し、これらが NO を産生していることをはじめて示し、IL-1 $\beta$  がライディッヒ細胞の NO の産生と iNOS mRNA の発現の調節因子であることを明らかにした。この NO の作用については多くの報告があり、男性生殖器においても精子運動の抑制などいくつかの報告が散見される。ラットに NOS の阻害剤を投与すると血清テストステロン値が増加し、NO のドナーである sodium nitroprusside を投与すると血清テストステロン値は減少することから、NO は in vivo におけるテストステロンの調節因子であることがうかがえる。in vitro 系でも、ラットより分離したライディッヒ細胞を NO のドナーと培養することにより、培養上清中のテストステロンが減少するとの報告もある。これは NO が直接的に steroidogenesis を抑制することを示すものである。本研究で、ライディッヒ細胞における NO 産生が認められたことにより、ライディッヒ細胞が自らの steroidogenesis を調節する可能性も想定される。また、今回 NO の産生を調節していることが明らかとなった IL-1 $\beta$  は、生理的な状態でライディッヒ細胞の steroidogenesis を抑制している。IL-1 $\beta$  が NO の産生を亢進させることと、NO が steroidogenesis を抑制することを考慮すると、IL-1 $\beta$  の steroidogenesis の抑制効果は NO を介している可能が示唆される。

NO の拡散係数は  $0.992\text{cm}^2/\text{s}$  で、1 秒間で 2 cm もの距離を移動でき、その半減期は 4~5 秒である。また、気体であることから生体隔壁を自由に通過することができる。このような性質を考慮すると、基底膜で隔絶されているとはいえ、ライディッヒ細胞により産生された NO が、精子形成の各段階の精細胞にも直接接触している可能性が考えられる。卵巣において、卵胞のアポトーシスに NO が関与しているように、精巣でも NO が精子形成に何らかの影響をもっていることが考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

従来、精巣の構成細胞は、下垂体から分泌されるLH、FSHによって機能調節を受けているとされてきたが、細菌、精巣内には、これら間脳-下垂体-精巣系調節とは別の細胞間機能調節機構の存在が明らかになってきている。その調節において中心的役割をなす細胞間伝達物質として、IL-1 $\beta$ をはじめとする種々のサイトカインが報告されている。一方、nitric oxide (NO) は様々な臓器において多種多様な働きをしていることが判ってきている。NOの精巣における存在意義を研究するため、本研究者はラットのライディッヒ細胞の培養系を用い、サイトカインの添加刺激によるNOの産生とiNOSの発現についてはじめて検討し、以下の知見を得た。

幼若ライディッヒ細胞は、20日齢のSprague-Dawley (SD) ラットからコラゲナーゼ/ ディスパーゼ処理にて、成熟ライディッヒ細胞は、8週齢のSDラットからコラゲナーゼ処理の後、elutriationを用いた遠心分離法にて、各々採取した。これらライディッヒ細胞を無血清培地にて48時間培養した後、培養液を交換し、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、forskolinの各種サイトカイン、NOSの阻害剤、あるいはhCGをそれぞれ添加し、実験を行った。

ライディッヒ細胞が培養液中に放出したNOは、その半減期が数秒と短いため、NOの測定は、その安定した最終代謝産物であるnitriteをグリース法にて測定し、nitrite量として示した。

iNOS mRNA発現量は、各条件下で培養したライディッヒ細胞よりRNAを抽出し、iNOS cDNAプローブを用いたNorthern blot法にて定量的に検討した。

ライディッヒ細胞におけるiNOS蛋白の局在は、抗iNOSポリクローナル抗体を用いたAvidin-Biotin Complex (ABC) 法にて検討した。

培養液交換6時間後より、無刺激の幼若ライディッヒ細胞の培養上清中にnitriteの存在を認めた。培養上清中のnitrite量は、IL-1 $\beta$ を0.01~100ng/mlで添加することにより濃度依存性に増加した。一方、TNF $\alpha$ 、forskolin、hCGを添加したライディッヒ細胞の培養上清中のnitrite量は、controlと差を認めなかった。IL-1 $\beta$ (1ng/ml)で刺激した幼若ライディッヒ細胞の培養上清には、経時的にnitriteの増加を認めたが、NOSの阻害剤であるL-NMMA (1 nM)をIL-1 $\beta$ に続いて添加したものではcontrolとほぼ同じレベルに抑制された。また、幼若ライディッヒ細胞にIL-1 $\beta$ を0.01~100ng/mlの濃度で添加し、12時間培養すると、iNOS mRNAの発現は非添加ではほとんど認められないのに対し、IL-1 $\beta$ 添加群では濃度依存性に増加した。IL-1 $\beta$ を1ng/mlの濃度で添加し、経時変化を見てみると、iNOS mRNAの発現は6時間でピークに達し、24時間までほぼ持続していた。

成熟ライディッヒ細胞に、IL-1 $\beta$ を0.01~100ng/mlの濃度で添加し、24時間培養すると、培養上清中のnitriteは濃度依存性に増加した。また、iNOS mRNAの発現は6時間後に明らかに認められ、12時間後でもほぼ同程度に維持されていた。

iNOS ポリクローナル抗体を用いた免疫染色では、幼若および成熟ライディッヒ細胞の細胞質中にiNOS蛋白の存在が確認された。

NOの男性生殖器における意義については、ライディッヒ細胞のsteroidogenesisを抑制するという報告があるが、そのNOの由来については不明であった。本研究で、ライディッヒ細胞におけるNO産生が認められたことにより、ライディッヒ細胞が自らのsteroidogenesisを調節する可能性が想

定される。また、IL-1 $\beta$ は、生理的な状態ではライディッヒ細胞の steroidogenesis を抑制しているので、IL-1 $\beta$ がNOの産生を亢進させることと、NOが steroidogenesis を抑制することを考慮すると、IL-1 $\beta$ の steroidogenesis に対する抑制効果はNOを介している可能性が示唆された。

本研究は、ラットのライディッヒ細胞におけるNOの産生とiNOSの発現ならびにその調節機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった精巣におけるNOの意義について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。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。