



Oral Administration of Tetrahydrobiopterin Attenuates Testicular damage by Reducing Nitric Oxide Synthase Activity in a Cryptorchid Mouse Model

近藤, 有

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4129

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004129>

※ 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	近藤 有
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1880 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Oral Administration of Tetrahydrobiopterin Attenuates Testicular damage by Reducing Nitric
Oxide Synthase Activity in a Cryptorchid Mouse Model（停留精巣モデルマウスにおいてテトラヒド
ロビオプテリンは一酸化窒素合成酵素を減少させ精巣の傷害を軽減する）

審 査 委 員

主 査	教 授	丸尾 猛
	教 授	黒田 嘉和
	教 授	西尾 久英

【緒言】

一酸化窒素 (NO)は、多くの組織での細胞内、細胞間のメッセンジャーとしてよく知られたフリーラジカルであり、nitric oxide synthase (NOS)によって L-arginine から合成される。NOS には 3 種類のアイソフォーム (neural NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS))の存在が知られており、動物実験において①精巣捻転モデルでの精巣内 iNOS、NO 産生の増加、また、精巣の虚血再還流モデルで iNOS 阻害剤を使用することによって精巣の傷害が軽減されること、②手術的に停留精巣を作成することで精巣内のアポトーシスを起こす精細胞が増え、その細胞は免疫組織学的に eNOS に陽性を示すこと、③ eNOS トランスジェニックマウスにおいて停留精巣モデルを作成することで、wild-type マウスより精巣内でのアポトーシスを起こす精細胞が増えること、から精細胞のアポトーシスには NOS が関わっていることが考えられている。

テトラヒドロビオプテリン (BH₄)は NO 産生時における NOS の重要な補酵素であり、内因性には GTP cyclohydrolase I (GTPCH I) を律速段階の酵素として合成される。げっ歯類において免疫系を賦活させるとマクロファージ内で interferon- γ が産生され GTPCH I の活性が上昇し、細胞内の BH₄ 合成、BH₄ による NO 合成が進むと言われている。また、interferon- γ 刺激を受けたリンパ球、平滑筋細胞内で interleukin-1 β 刺激を受けたリンパ球、eNOS の活性を司っている血管内皮細胞内のサイトカインの刺激を受けたリンパ球において GTPCH I mRNA と BH₄ 合成が促進されるとされる。その他にも、ラットに lipopolysaccharide を投与した場合、脳、肝、脾、副腎で GTPCH I の活性と BH₄ 濃度が上昇するといわれている。

今回我々は、手術的に作成した停留精巣モデルマウスを使うことで、BH₄ を経口投与することによる精巣内の BH₄、GTPCH I、NOS、NO の変化、それに伴う精巣内の傷害の程度の変化について検討した。

【方法】

(1)停留精巣モデルマウスの作成

4 週齢の C57BL/6 マウスを①通常の餌を与える群(BH₄ 非投与群)、②通常の餌に塩酸サプロプテリン(BH₄)が 10 mg/kg/day となるように加えたものを与えた群(BH₄ 投与群)、の 2 群に分けた。10 週齢時に、全身麻酔下に腹部に小切開を加え、右精巣を腹壁にゆるく固定し、停留精巣を作成した。術後 0、3、5、7、10 日目に左右精巣を摘出し、重量を測定の上、以下の分析を行った。

(2)BH₄ならびに BH₄の酸化物であるジヒドロビオプテリン (BH₂)の測定

摘出精巣内の BH₄、BH₂ 濃度の測定は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法にて行い、2 群間での変化を比較検討した。

(3)NO 濃度の測定

NO 濃度の測定は Griess 法にて行い、2 群間での変化を比較検討した。

(4)NOS、Nitrotyrosine (NO、ONOO⁻での障害における産物) の測定

NOS、Nitrotyrosine の測定は精巣組織より蛋白を抽出し、western blot 法で行った。 β -actin を内部コントロールとし、Scion image を用いて定量化し、2 群間での変化を比較検討した。

(5)GTPCH I mRNA の測定

GTPCH I は mRNA を抽出し、RT-PCR 法で行った。 β -actin を内部コントロールとし、Scion image を用いて定量化し、2 群間での変化を比較検討した。

(6)精細管傷害の評価

精巣傷害の評価には H-E 染色、TUNEL 法を用い、1 精細管あたりの TUNEL 陽性細胞数を 2 群間で比較した。

(7)免疫組織学的検討

eNOS、iNOS のモノクローナル抗体、nNOS のポリクローナル抗体を用い、TUNEL 法で使用した切片と連続した切片を用いて免疫組織化学染色を行った。

【結果】

(1)精巣重量の変化

非手術側の精巣重量に変化は認めなかった。停留精巣作成側の精巣重量は 2 群ともに徐々に減少したが、BH₄ 投与群ではその減少が軽減され、10 日目で有意差を認めた。

(2)GTPCH I、BH₄ レベルの変化

GTPCH I レベルは BH₄ 非投与群で 0 日目の精巣と比較し、1.5 から 2 倍に増加しており、精巣内 BH₄ 濃度は 7 日目で有意な上昇を認め、停留精巣作成により精巣内で内因性に BH₄ が合成されることが考えられた。BH₄ 投与群では GTPCH I レベルは逆に有意な減少を認め、BH₄ 濃度の上昇も抑制されており、停留精巣作成時には BH₄ 投与することで精巣内での BH₄ の合成が抑制されることが示された。

(3)BH₂ レベルの変化

BH₂ 濃度は両群において 5 日目まで徐々に上昇した。BH₄ 非投与群では濃度は上昇し続けたが、BH₄ 投与群では 7 日目で減少した。

(4)NO 濃度の変化

非手術側の NO 濃度に変化は認めなかった。術後 5 日目より NO 濃度は両群において上昇した。7 日目より BH₄ 非投与群で NO の上昇が促進され、10 日目で BH₄ 投与群の 2.1 倍にまで上昇した。

(5)NOS、Nitrotyrosine の変化

iNOS、nNOS は手術側、非手術側どちらにおいても検出されなかった。eNOS は BH₄ 非投与群で徐々に上昇し、10 日目で 0 日目の 4.3 倍となった。一方 BH₄

投与群でも徐々に上昇したが、その程度は軽く、10日目でも0日目の2.3倍と抑制されており、2群間に有意な差を認めた。NitrotyrosineもNOと同様の変化を認め、10日目で2群間に有意な差を認めた。このことよりBH₄を投与することによってNOによる精巣の傷害の程度が軽減されたと考えられた。

(6)精細管傷害の評価、免疫組織化学的検討

両群において停留精巣作成側精巣で3日目より精細管上皮の破壊が起こり、巨細胞が精細管内に認められるようになった。BH₄非投与群で、TUNEL陽性細胞数は7日目まで増加したものの10日目には減少しており、これは10日目の多くの精細管の内腔が空になっていたためと考えられた。一方、BH₄投与群ではその傷害の程度は軽減されていた。

【考察】

停留精巣を作成することにより、精巣内で酸化ストレスが発生すること、スーパーオキシド、過酸化水素とNOが過剰に産生されることが知られており、精巣の傷害に関連することが示唆されている。また血管内皮細胞での実験により、通常の状態ではeNOSはその補酵素であるBH₄により2量体を形成し、NOを産生、血管拡張、血管内皮の保護等に関わっているといわれているが、傷害を加えることで、BH₄がBH₂へと酸化されeNOSが2量体を形成できなくなり、Reactive oxygen species (ROS)が発生し、さらに傷害がすすむといわれている。ROSの中でもスーパーオキシド、過酸化水素とNOが反応することで産生されるONOO[・]が細胞を最も傷害すること、過酸化水素がeNOSの発現を促進すること、ONOO[・]はGTPCH Iの活性を刺激し、内因性にBH₄の合成を促進する一方でBH₄を最も酸化する物質であること等も血管内皮細胞での実験により証明されている。以上のこと、また今回の研究より実験的に作成された停留精巣内ではROSをscavengeする目的でeNOS、BH₄の合成が進みNOの産生が促進されるが、このことによりさらに2量体となったeNOSからのNOと2量体となれなかったeNOSからのスーパーオキシド、過酸化水素の産生を加速させ、多量のONOO[・]が発生することで精細管傷害が加速することが考えられた。

停留精巣作成時におけるBH₄の投与は①GTPCH Iの活性化を制御すること、②eNOSが2量体を形成できるようになり、スーパーオキシド、過酸化水素さらにはONOO[・]の発生を抑制ことで先に述べた悪循環を断ち切り、精巣の傷害を軽減させると考えられた。

結論として、酸化ストレスによる精巣の傷害は加速度的に進行すること、またBH₄投与は酸化ストレスによる精巣の傷害に対する治療法となりえることが示された。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1878 号	氏 名	近 藤 有
論文題目 Title of Dissertation	Oral Administration of Tetrahydrobiopterin Attenuates Testicular damage by Reducing Nitric Oxide Synthase Activity in a Cryptorchid Mouse Model 停留精巣モデルマウスにおいて テトラヒドロbiopterinは一酸化窒素合成酵素を減少させ 精巣の傷害を軽減する		
審査委員 Examiner	主 査 丸 尾 猛 Chief Examiner 副 査 黒 田 嘉 和 Vice-examiner 副 査 西 尾 久 英 Vice-examiner		
常査終了日	平成 19 年 12 月 19 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【緒言】

一酸化窒素 (NO)は、多くの組織での細胞内、細胞間のメッセンジャーとしてよく知られたフリーラジカルであり、nitric oxide synthase (NOS)によって L-arginine から合成される。NOS には 3 種類のアイソフォーム (neural NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS))の存在が知られており、動物実験において①精巣捻転モデル、精巣の虚血再還流モデルでの iNOS、NO の関与②停留精巣作成モデルにおける eNOS の関与が報告されており、精細胞のアポトーシスには NOS が関わっていることが考えられている。また、申請者らは以前の研究で、eNOS トランスジェニックマウスにおける停留精巣作成モデルでアポトーシスを起こす精細胞が増えることを報告している。

テトラヒドロビオプテリン(BH₄)はNO産生時におけるNOSの重要な補酵素であり、内因性には GTP cyclohydrolase I (GTPCH I) を律速段階の酵素として合成される。また、フェニルケトン尿症の治療薬として実際の臨床現場にて使用されている薬剤である。これまでの研究により、サイトカインの刺激を受けたリンパ球において GTPCH I mRNA と BH₄ 合成が促進されるとの報告があり、ラットに lipopolysaccharide を投与した場合、脳、肝、脾、副腎で GTPCH I の活性と BH₄ 濃度が上昇するといわれている。

今回申請者らは、手術的に作成した停留精巣モデルマウスを使うことで、BH₄ を経口投与することによる精巣内の BH₄、GTPCH I、NOS、NO の変化、それに伴う精巣内の傷害の程度の変化について検討した。

【方法】

(1)停留精巣モデルマウスの作成

4 週齢の C57BL/6 マウスを①通常の餌を与える群(BH₄ 非投与群)、②通常の餌に塩酸サプロプテリン(BH₄)が 10 mg/kg/day となるように加えたものを与えた群(BH₄ 投与群)、の 2 群に分けた。10 週齢時に、全身麻酔下に腹部に小切開を加え、右精巣を腹壁にゆるく固定し、停留精巣を作成した。術後 0、3、5、7、10 日目に左右精巣を摘出し、重量を測定の上、以下の分析を行い、2 群間での変化を比較検討した。

(2)BH₄ならびに BH₂の酸化物であるジヒドロビオプテリン (BH₂)の測定

摘出精巣内の BH₄、BH₂ 濃度の測定は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法にて行った。

(3)NO 濃度の測定

NO 濃度の測定は Griess 法にて行った。

(4)NOS、Nitrotyrosine (NO、ONOO⁻での障害における産物) の測定

NOS、Nitrotyrosine の測定は精巣組織より蛋白を抽出し、western blot 法で行った。β-actin を内部コントロールとし、Scion image を用いて定量化した。

(5)GTPCH I mRNA の測定

GTPCH I は mRNA を抽出し、RT-PCR 法で行った。β-actin を内部コントロールとし、Scion image を用いて定量化した。

(6)精細管傷害の評価

精巣傷害の評価には H-E 染色、TUNEL 法を用い、1 精細管あたりの TUNEL 陽性細胞数で評価した。

(7)免疫組織学的検討

eNOS、iNOS のモノクローナル抗体、nNOS のポリクローナル抗体を用い、TUNEL 法で使用した切片と連続した切片を用いて免疫組織化学染色を行った。

【結果】

(1)精巣重量の変化

非手術側の精巣重量に変化は認めなかった。停留精巣作成側の精巣重量は 2 群ともに徐々に減少したが、BH₄ 投与群ではその減少が軽減され、10 日目で有意差を認めた。

(2)GTPCH I、BH₄ レベルの変化

GTPCH I レベルは BH₄ 非投与群で 0 日目の精巣と比較し、1.5 から 2 倍に増加しており、精巣内 BH₄ 濃度は 7 日目以降で有意な上昇を認め、停留精巣作成により精巣内で内因性に BH₄ が合成されることが考えられた。BH₄ 投与群では GTPCH I レベルは逆に有意な減少を認め、BH₄ 濃度の上昇も抑制されており、停留精巣作成時には BH₄ を投与することで精巣内での BH₄ の合成が抑制されることが示された。

(3)BH₂ レベルの変化

BH₂ 濃度は両群において 5 日目まで徐々に上昇した。BH₄ 非投与群では濃度は上昇し続けたが、BH₄ 投与群では 7 日目以降で減少した。

(4)NO 濃度の変化

非手術側の NO 濃度に変化は認めなかった。術後 5 日目より NO 濃度は両群において上昇した。7 日目より BH₄ 非投与群で NO の上昇が促進され、10 日目で BH₄ 投与群の 2.1 倍にまで上昇した。

(5)NOS、Nitrotyrosine の変化

iNOS、nNOS は手術側、非手術側どちらにおいても検出されなかった。eNOS は BH₄ 非投与群で徐々に上昇し、10 日目で 0 日目の 4.3 倍となった。一方 BH₄ 投与群でも徐々に上昇したが、その程度は軽く、10 日目でも 0 日目の 2.3 倍と抑制されており、2 群間に有意な差を認めた。Nitrotyrosine も NO と同様の変化を認め、10 日目で 2 群間に有意な差を認めた。このことより BH₄ を投与することによって NO による精巣の傷害の程度が軽減されると考えられた。

(6)精細管傷害の評価、免疫組織化学的検討

両群において停留精巣作成側精巣で 3 日目より精細管上皮の破壊が起こり、巨細胞が精細管内に認められるようになった。BH₄ 非投与群では 10 日目の精細管の多くは内腔が空になっていた。一方、BH₄ 投与群ではその傷害の程度は軽減されていた。

【考察】

停留精巣を作成することにより、精巣内で酸化ストレスが発生すること、スーパーオキシド、過酸化水素と NO が過剰に産生されることが知られており、精巣の傷害に関連することが示唆されている。また血管内皮細胞での実験により、通常の状態では eNOS はその補酵素である BH₄ により 2 量体を形成し、NO を産生し、血管拡張、血管内皮の保護等に関わっているといわれているが、傷害を加えることで、BH₄ が BH₂ へと酸化され eNOS が 2 量体を形成できなくなり、Reactive oxygen species (ROS) が発生、さらに傷害がすすむといわれている。ROS の中でもスーパーオキシド、過酸化水素と NO が反応することで産生される ONOO⁻ が細胞を最も傷害すること、過酸化水素が eNOS の発現を促進すること、ONOO⁻ は GTPCH I の活性を刺激し、内因性に BH₄ の合成を促進する一方で BH₄ を最も酸化する物質であること等も血管内皮細胞での実験により証明されている。以上のこと、また今回の研究より実験的に作成された停留精巣内では ROS を scavenge する目的で eNOS、BH₄ の合成が進み NO の産生が促進されるが、このことによりさらに 2 量体となった eNOS からの NO と 2 量体となれなかった eNOS からのスーパーオキシド、過酸化水素の産生を加速させ、多量の ONOO⁻ が発生することで精細管傷害が加速することが考えられた。

停留精巣作成時における BH₄ の投与は①GTPCH I の活性化を制御すること、②eNOS が 2 量体を形成できるようになり、スーパーオキシド、過酸化水素さらには ONOO⁻ の発生を抑制することで先に述べた悪循環を断ち切り、精巣の傷害を軽減させると考えられた。

結論として、酸化ストレスによる精巣の傷害は加速度的に進行すること、また BH₄ 投与は酸化ストレスによる精巣の傷害に対する治療法となりえることが示された。

以上のように、本研究は造精機能障害を起こすモデルとして確立された方法である停留精巣作成モデルマウスを用いて、酸化ストレスによる傷害発生の機序、ならびに BH₄ 投与による精巣内での酸化ストレスの変化について検討した研究であるが、従来ほとんど行われなかった NOS を介する精巣の傷害に対する BH₄ の治療効果を評価し、その臨床応用に際する重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。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。