



# Cisplatin Regulates Sertoli Cell Expression of Transferrin and Interleukins

山口, 耕平

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4336

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004336>

※ 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	山口 耕平
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1936 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 】

Cisplatin Regulates Sertoli Cell Expression of Transferrin and Interleukins(シスプラチンはセルトリ細胞のトランスフェリン及びインターロイキンの発現を制御する)

審 査 委 員

主 査	教 授	丸尾	猛
	教 授	西尾	久英
	教 授	平田	健一

## 【緒言】

精巣腫瘍は青壮年男子に好発する悪性腫瘍である。治療として cis-diaminedichloroplatinium (CDDP)を中心とした化学療法の進歩により、進行例の治療成績も着実に進歩し、手術療法などと組み合わせた集学的治療により、高率に治癒が可能となった。しかしながら、治癒後の妊孕性や、QOL が大きな問題となっている。

CDDP は、最も頻用される抗癌剤の一つであるが、その重要な副作用として精子形成障害を引き起こすことが知られており、実際、生殖年齢に好発する精巣腫瘍や白血病といった悪性腫瘍に対して、CDDP を含む抗癌化学療法が行われた場合、治療後一過性に、或いは永年にわたり不妊で苦しむ患者は多く存在している。

精子形成は、視床下部－下垂体－精巣軸における各種ホルモンや、精巣内の各細胞が産生する種々の分子による paracrine/autocrine 作用によって構成される複雑な分子調節機構によって進行すると考えられている。CDDP 投与によって生じる精巣内分子調節機構の変化の解明は、CDDP を含む抗癌化学療法後の精子形成障害を予防する治療法の確立に繋がる可能性があり、また、更に原発性精子形成障害に対しても、その発生機序の解明の一翼を担い、将来的には精子形成障害の根本的な治療法の確立にも繋がる可能性があるものと考えられているが、それらの障害発生に関与する分子機構の詳細はほとんど未解明のままである。

そのため、今回我々は、ラットより分離培養したセルトリ細胞に CDDP を添加することにより、CDDP によって引き起こされるセルトリ細胞内のシグナル伝達機構及び paracrine/autocrine 作用の変化を解明し、CDDP によって生じるセルトリ細胞の障害の機序について、評価、検討を行った。

## 【方法】

### (1)セルトリ細胞の分離・培養

18 日齢 SD ラット精巣より、既に確立されている方法にてセルトリ細胞を分離し、無血清培養液で 72 時間培養した。

### (2)CDDP 刺激によるセルトリ細胞への伝達機構の検討

培養セルトリ細胞内に CDDP を添加し(10 ng/ml)、下記に示す各時間軸に沿ってセルトリ細胞を回収した後、蛋白及び RNA を抽出した。蛋白は CDDP 刺激後 1、3、5、10、15、30 分、1、3、6、12、24 時間で抽出し、各々抗 phospho- extracellular signal-related kinases 1 and 2 (ERK1/2)、ERK、phospho-p38-、p-38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、phospho- cJun-N-terminal kinase (JNK)、JNK、cyclooxygenase (COX)-1、COX-2、inducible and endothelial nitric oxide synthase (i-NOS、eNOS)、protein kinase (PK)C、PKA 抗体を用いて Western blotting 法にて、それらの経時的

変化を測定した。また RNA は CDDP 刺激後 30 分、1、3、6、12、24、36、48 時間で抽出し、Real-time PCR 法にて interleukin (IL)-1 $\beta$  及び IL-6 の経時的変化を測定した。また CDDP 刺激後 30 分、1、3、6、12、24 時間の培養上清液を用いて、ELISA 法にて transferrin (TF)及び prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、PGD<sub>2</sub>、cPGI<sub>2</sub> analog の経時的変化を測定した。同様の時間軸にて CDDP 刺激後の培養上清液を用いて、Griess 法にて nitric oxide (NO)濃度の経時的変化を測定した。

### (3)阻害剤を用いた、CDDP 刺激によるセルトリ細胞への伝達機構の変化の検討

上記(2)の実験により関与が示唆された phospho-ERK1/2 の選択的阻害剤である PD98059(10  $\mu$ M)及び COX-2 の選択的阻害剤 NS398(10  $\mu$ M)を CDDP 刺激を加える 15 分前に添加し、(2)と同様の検討を行う事により、CDDP 刺激によって生じるセルトリ細胞の TF、IL の変化について検討を行った。

## 【結果】

### (1)MAPK、PKA、PKC レベルの変化

CDDP 添加後 5、10 分で、control(CDDP 無添加)群と比し、phospho-ERK1/2 レベルの有意な増加(2.6、2.9 倍)を認めた。ERK、phospho-p38、p38、phospho-JNK、JNK レベルの有意な変化は認めなかった。また PKC 及び PKC レベルの有意な変化は認めなかった。

### (2)COX レベルの変化

CDDP 添加後 24、36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、COX-2 レベルの有意な増加(2.5、2.4、3.0 倍)を認めた。COX-1 レベルの有意な変化は認めなかった。

### (3)NOS 及び NO 蛋白量の変化

iNOS、eNOS 及び NO レベルの有意な変化は認めなかった。

### (4)培養液中の TF 濃度と PG 濃度の変化

CDDP 添加後 15、30 分、1、3、6、24 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、TF レベルの有意な減少(0.7、0.5、0.4、0.2、0.3、0.7 倍)を認めた。一方 CDDP 添加後 24、36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、PGE<sub>2</sub> レベルの有意な増加(30、20、45 倍)を認めた。同様に CDDP 添加後 24、36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> レベルの有意な増加(10、40、99 倍)及び PGD<sub>2</sub> レベルの有意な増加(2、6、7 倍)を認めた。また CDDP 添加後 36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、cPGI<sub>2</sub> レベルの有意な増加(2.5、2.5 倍)を認めた。

### (5)ILmRNA の変化

CDDP 添加後 36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、IL-1 $\beta$  レベルの有意な増加(9.9、7.4 倍)及び IL-6 レベル有意な増加(5.8、3.1 倍)を認めた。

### (6)阻害剤添加後の CDDP 刺激によるセルトリ細胞への伝達機構の評価

Phospho-ERK 選択的阻害剤(PD98059)にて前処理した培養セルトリ細胞に CDDP を添加すると、(1)で示したような phospho-ERK1/2 レベルの有意な増加が阻害された。また(4)で示したような TF レベルの有意な減少も阻害され、これにより、CDDP は数分から十数分という比較的早期に、セルトリ細胞内の ERK1/2 経路を介し、セルトリ細胞の TF 産生を抑制することが確認された。一方 COX-2 選択的阻害剤 (NS398) にて前処理した場合、(4)、(5)で示したような PGs レベルの有意な増加及び ILs レベルの有意な増加が阻害された。これにより、CDDP は数十時間以上の比較的後期に、セルトリ細胞内の COX-2 経路を介し、セルトリ細胞の PGs 及び ILs の産生を促進することが確認された。

【考察】

CDDP 投与によって生じる細胞内分子調節機構の変化に関しては、肺癌や子宮癌など様々な cancer cell line において、MAPK family の一つである p38- MAPK や cJun-N-terminal kinase (JNK)の関与の報告がある。TF は鉄輸送に関与する蛋白で、paracrine 作用として精細胞の発達を促進し、更に autocrine 作用としてセルトリ細胞自身の発達も促進し、精子形成に重要な役割を果たしていると考えられており、セルトリ細胞からの TF の産生の減少は精子形成に悪影響を与えるものと推察される。今回我々が示した結果から、CDDP 投与によって生じるセルトリ細胞の TF 産生の抑制は、ERK1/2 経路を介していることが示された。その他 CDDP 以外のケミカルメディエーターにおいても分子調節機構の変化が報告されており、具体的には炎症性サイトカインの一つである IL-1 $\beta$  が、今回我々が示した、CDDP を用いた実験の結果と同様に、セルトリ細胞内の COX-2 経路を介して、PGs 及び ILs の産生を促進していることが報告されている。PGs が精細胞に直接どのような影響を与えるのかは現時点では不明であるが、ILs に関しては、paracrine/autocrine 作用により精細胞及びセルトリ細胞自身に悪影響を与える可能性が報告されている。また IL-1 $\beta$  は JNK 経路を介して iNOS、eNOS の活性化及び NO の産生を促進していることも報告されているが、今回の実験では phospho-JNK の活性化及び NOS、NO レベルの変化は認めなかった。

結論として、CDDP 投与によって生じるセルトリ細胞の障害は ERK1/2 及び COX-2 経路を介していることが示された。また、それらの選択的阻害剤を投与することにより、CDDP が引き起こすセルトリ細胞の障害を防ぐ、新たな治療法となり得ることが示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1937 号	氏 名	山口 耕平
論文題目 Title of Dissertation	<p>Cisplatin Regulates Sertoli Cell Expression of Transferrin and Interleukins</p> <p>シスプラチンはセルトリ細胞のトランスフェリン及びインターロイキンの発現を制御する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 丸 尾 猛 Chief Examiner</p> <p>副 査 平 田 健 一 Vice-examiner</p> <p>副 査 西 尾 久 英 Vice-examiner</p>		
審査終了日	平成 20 年 2 月 19 日		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

## 【緒言】

精巣腫瘍は青壮年男子に好発する悪性腫瘍である。治療として cis-diaminedichloroplatinium (CDDP)を中心とした化学療法の進歩により、進行例の治療成績も着実に進歩し、手術療法などと組み合わせた集学的治療により、高率に治癒が可能となった。しかしながら、治癒後の妊孕性や、QOL が大きな問題となっている。

CDDP は、最も頻用される抗癌剤の一つであるが、その重要な副作用として精子形成障害を引き起こすことが知られており、実際、生殖年齢に好発する精巣腫瘍や白血病といった悪性腫瘍に対して、CDDP を含む抗癌化学療法が行われた場合、治療後一過性に、或いは永年にわたり不妊で苦しむ患者は多く存在している。

精子形成は、視床下部－下垂体－精巣軸における各種ホルモンや、精巣内の各細胞が産生する種々の分子による paracrine/autocrine 作用によって構成される複雑な分子調節機構によって進行すると考えられている。CDDP 投与によって生じる精巣内分子調節機構の変化の解明は、CDDP を含む抗癌化学療法後の精子形成障害を予防する治療法の確立に繋がる可能性があり、また、更に原発性精子形成障害に対しても、その発生機序の解明の一翼を担い、将来的には精子形成障害の根本的な治療法の確立にも繋がる可能性があるものと考えられているが、それらの障害発生に関与する分子機構の詳細はほとんど未解明のままである。

そのため、今回我々は、ラットより分離培養したセルトリ細胞に CDDP を添加することにより、CDDP によって引き起こされるセルトリ細胞内のシグナル伝達機構及び paracrine/autocrine 作用の変化を解明し、CDDP によって生じるセルトリ細胞の障害の機序について、評価、検討を行った。

## 【方法】

### (1)セルトリ細胞の分離・培養

18 日齢 SD ラット精巣より、既に確立されている方法にてセルトリ細胞を分離し、無血清培養液で 72 時間培養した。

### (2)CDDP 刺激によるセルトリ細胞への伝達機構の検討

培養セルトリ細胞内に CDDP を添加し(10 ng/ml)、下記に示す各時間軸に沿ってセルトリ細胞を回収した後、蛋白及び RNA を抽出した。蛋白は CDDP 刺激後 1、3、5、10、15、30 分、1、3、6、12、24 時間で抽出し、各々抗 phospho- extracellular signal-related kinases 1 and 2 (ERK1/2)、ERK、phospho-p38-、p-38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、phospho- cJun-N-terminal kinase (JNK)、JNK、cyclooxygenase (COX)-1、COX-2、inducible and endothelial nitric oxide synthase (i-NOS、eNOS)、protein kinase (PK)C、PKA 抗体を用いて Western blotting 法にて、それらの経時的

変化を測定した。また RNA は CDDP 刺激後 30 分、1、3、6、12、24、36、48 時間で抽出し、Real-time PCR 法にて interleukin (IL)-1 $\beta$  及び IL-6 の経時的変化を測定した。また CDDP 刺激後 30 分、1、3、6、12、24 時間の培養上清液を用いて、ELISA 法にて transferrin (TF)及び prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、PGD<sub>2</sub>、cPGI<sub>2</sub> analog の経時的変化を測定した。同様の時間軸にて CDDP 刺激後の培養上清液を用いて、Griess 法にて nitric oxide (NO)濃度の経時的変化を測定した。

### (3)阻害剤を用いた、CDDP 刺激によるセルトリ細胞への伝達機構の変化の検討

上記(2)の実験により関与が示唆された phospho-ERK1/2 の選択的阻害剤である PD98059(10  $\mu$ M)及び COX-2 の選択的阻害剤 NS398(10  $\mu$ M)を CDDP 刺激を加える 15 分前に添加し、(2)と同様の検討を行う事により、CDDP 刺激によって生じるセルトリ細胞の TF、IL の変化について検討を行った。

## 【結果】

### (1)MAPK、PKA、PKC レベルの変化

CDDP 添加後 5、10 分で、control(CDDP 無添加)群と比し、phospho-ERK1/2 レベルの有意な増加(2.6、2.9 倍)を認めた。ERK、phospho-p38、p38、phospho-JNK、JNK レベルの有意な変化は認めなかった。また PKC 及び PKC レベルの有意な変化は認めなかった。

### (2)COX レベルの変化

CDDP 添加後 24、36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、COX-2 レベルの有意な増加(2.5、2.4、3.0 倍)を認めた。COX-1 レベルの有意な変化は認めなかった。

### (3)NOS 及び NO 蛋白量の変化

iNOS、eNOS 及び NO レベルの有意な変化は認めなかった。

### (4)培養液中の TF 濃度と PG 濃度の変化

CDDP 添加後 15、30 分、1、3、6、24 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、TF レベルの有意な減少(0.7、0.5、0.4、0.2、0.3、0.7 倍)を認めた。一方 CDDP 添加後 24、36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、PGE<sub>2</sub> レベルの有意な増加(30、20、45 倍)を認めた。同様に CDDP 添加後 24、36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> レベルの有意な増加(10、40、99 倍)及び PGD<sub>2</sub> レベルの有意な増加(2、6、7 倍)を認めた。また CDDP 添加後 36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、cPGI<sub>2</sub> レベルの有意な増加(2.5、2.5 倍)を認めた。

### (5)ILmRNA の変化

CDDP 添加後 36、48 時間で、control(CDDP 無添加)群と比し、IL-1 $\beta$  レベルの有意な増加(9.9、7.4 倍)及び IL-6 レベル有意な増加(5.8、3.1 倍)を認めた。

### (6)阻害剤添加後の CDDP 刺激によるセルトリ細胞への伝達機構の評価

Phospho-ERK 選択的阻害剤(PD98059)にて前処理した培養セルトリ細胞に CDDP を添加すると、(1)で示したような phospho-ERK1/2 レベルの有意な増加が阻害された。また(4)で示したような TF レベルの有意な減少も阻害され、これにより、CDDP は数分から十数分という比較的早期に、セルトリ細胞内の ERK1/2 経路を介し、セルトリ細胞の TF 産生を抑制することが確認された。一方 COX-2 選択的阻害剤 (NS398) にて前処理した場合、(4)、(5)で示したような PGs レベルの有意な増加及び ILs レベルの有意な増加が阻害された。これにより、CDDP は数十時間以上の比較的後期に、セルトリ細胞内の COX-2 経路を介し、セルトリ細胞の PGs 及び ILs の産生を促進することが確認された。

#### 【考察】

CDDP 投与によって生じる細胞内分子調節機構の変化に関しては、肺癌や子宮癌など様々な cancer cell line において、MAPK family の一つである p38- MAPK や cJun-N-terminal kinase (JNK)の関与の報告がある。TF は鉄輸送に関与する蛋白で、paracrine 作用として精細胞の発達を促進し、更に autocrine 作用としてセルトリ細胞自身の発達も促進し、精子形成に重要な役割を果たしていると考えられており、セルトリ細胞からの TF の産生の減少は精子形成に悪影響を与えるものと推察される。今回我々が示した結果から、CDDP 投与によって生じるセルトリ細胞の TF 産生の抑制は、ERK1/2 経路を介していることが示された。その他 CDDP 以外のケミカルメディエーターにおいても分子調節機構の変化が報告されており、具体的には炎症性サイトカインの一つである IL-1 $\beta$  が、今回我々が示した、CDDP を用いた実験の結果と同様に、セルトリ細胞内の COX-2 経路を介して、PGs 及び ILs の産生を促進していることが報告されている。PGs が精細胞に直接どのような影響を与えるのかは現時点では不明であるが、ILs に関しては、paracrine/autocrine 作用により精細胞及びセルトリ細胞自身に悪影響を与える可能性が報告されている。また IL-1 $\beta$  は JNK 経路を介して iNOS、eNOS の活性化及び NO の産生を促進していることも報告されているが、今回の実験では phospho-JNK の活性化及び NOS、NO レベルの変化は認めなかった。

結論として、CDDP 投与によって生じるセルトリ細胞の障害は ERK1/2 及び COX-2 経路を介していることが示された。また、それらの選択的阻害剤を投与することにより、CDDP が引き起こすセルトリ細胞の障害を防ぐ、新たな治療法となり得ることが示された。

本研究は CDDP 投与に伴うセルトリ細胞障害について研究したものであるが、従来不明であった CDDP 投与に伴うセルトリ細胞内のシグナル伝達機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。