



Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress-induced apoptosis in the rat testis

Matsushita, Kei

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6386号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006386>

※ 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。



Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress-induced apoptosis in the rat testis

ラット精巣においてセルトリ細胞の産生するクラスタリンは
熱ストレスにより誘導されるアポトーシスを抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

腎泌尿器科学

(指導教員：藤澤正人教授)

松下 経

【緒言】

近年、晩婚化が進む社会背景や内分泌攪乱物質の影響などにより不妊症のカップルが増加している。また男性不妊症の原因となる造精機能障害の原因は不明のものが多くその治療法も確立されていないのが現状である。停留精巣や精索静脈瘤は造精機能障害の原因疾患として古くから知られておりいずれも精巣への熱ストレスが影響しているとされる。

今回われわれは精巣への熱ストレス動物実験モデルを作成しアポトーシスに陥っている組織においてその発現が著明に亢進することが知られているクラスタリンに着目してその精巣での発現およびアンチアポトーシス活性について検討した。

【目的】

精巣でのクラスタリンの発現レベルを定量し、熱ストレスによって誘導される精巣組織のアポトーシスとの関連を検討する。

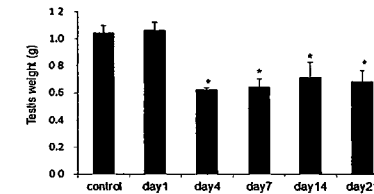
【方法 1】

成熟した雄の S-D ラットを使用した。43℃サーモスタット制御水槽中にラットの陰嚢を完全に浸漬させ、15 分間の熱ストレスを加え injury model を作製した。対照群は、37℃の水槽中に 15 分間同様に浸漬した。30 匹のラットを 5 匹ずつ、37℃の水槽中に浸漬した対照群と、熱ストレス後それぞれ 1、4、7、14、21 日目の 5 群の計 6 群に分け検討した。

【結果 1】

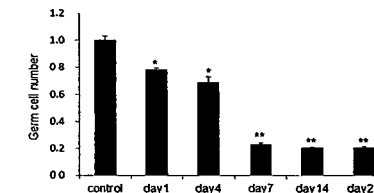
精巣重量は熱ストレス後 4 日目に減少し 21 日目まで改善は見られなかった。

Fig 1A

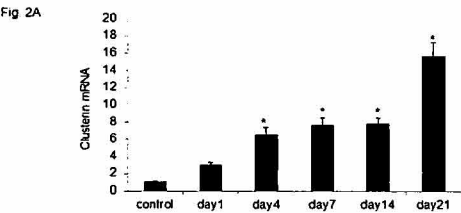


精細胞数は熱ストレス後 1 日目より日毎に減少した。

Fig 1B

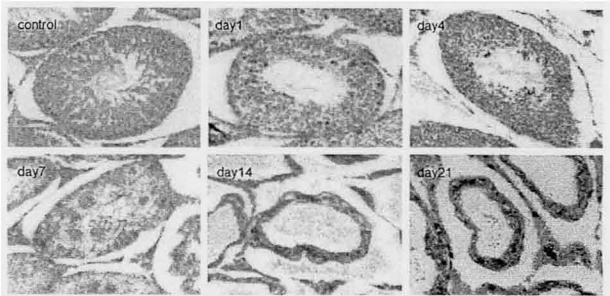


精巣でのクラスタリン mRNA の発現は RT-PCR で評価した。熱ストレス後 1 日目からクラスタリン mRNA の上昇が見られ 21 日目まで上昇が続いた。

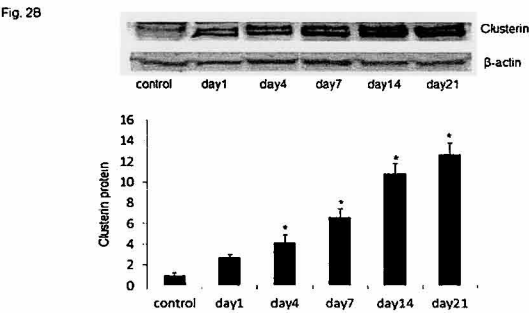


免疫染色においても熱ストレス後クラスタリンタンパク発現の上昇が見られた。

Fig 2C



Western blotting では RT-PCR の結果と同様に熱ストレス後クラスタリンタンパクの発現は日毎に上昇した。



TUNEL 染色でのアポトーシス指数（全細胞数中の TUNEL 染色陽性細胞の割合）は 1 日目が高くその後減少した。

Fig 3A

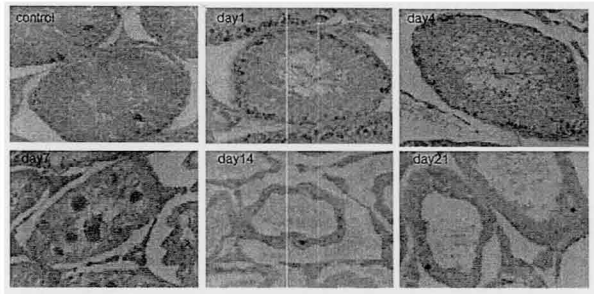
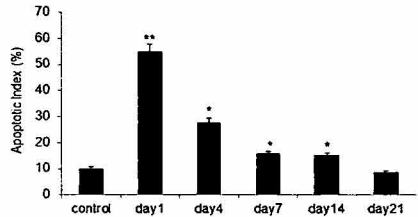


Fig 3B



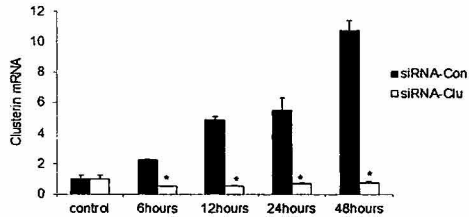
【方法 2】

19 日齢の雄の S-D ラットの精巣組織よりセルトリ細胞を培養した。続いて培養セルトリ細胞にクラスタリンを標的とした siRNA を導入してクラスタリン発現を抑制した細胞と、control vector を導入した細胞とを作成し 41℃で 12 時間の熱ストレスを加えその影響を比較検討した。

【結果 2】

クラスタリンを標的とした siRNA の導入により培養セルトリ細胞におけるクラスタリン mRNA の発現は control vector を導入した培養セルトリ細胞と比較して約 30%に抑制された。control vector を導入した培養セルトリ細胞では熱ストレス後にクラスタリン mRNA の発現が著明に亢進したのに対して siRNA を導入した培養セルトリ細胞におけるクラスタリン mRNA の発現は熱ストレス後も抑制された。

Fig 4A



TUNEL 染色による評価ではクラスタリンの発現を抑制した培養セルトリ細胞において熱ストレス後のアポトーシス誘導が顕著に見られ、アポトーシス指数は 24 時間以内では control と比較して有意に高値であった。

Fig. 4B

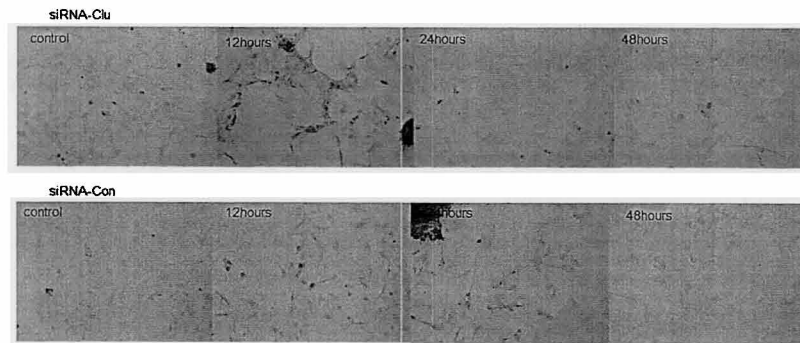
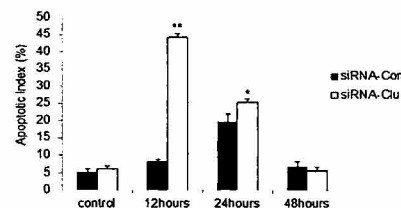


Fig. 4C



【考察】

ほとんどの哺乳動物において陰嚢内の温度は体温に比して 2-8 度低く精巣周囲の低温状態は、生殖細胞からの分化および精子形成に必須である。精子形成が熱ストレスによって障害されることは多くの論文で報告されている。しかし熱ストレスによって誘導される精巣におけるアポトーシス細胞の増加およびその分子メカニズムについてはまだ詳細には解明されていない。生物は環境に応じてタンパク質の折り畳み、組み立て、そして解体を促すための分子シャペロンとして作用することができるタンパク質を合成することにより、熱ストレスを含む環境ストレスに応答することが知られている。クラスタリンは様々な組織において各種のストレス条件に対応して発現が亢進し分子シャペロン様活性を示すことが報告されている。しかし、クラスタリンの発現が精子形成に対する熱ストレスのもたらす障害に対してどのような機能的役割を持っているかはこれまで解明されていない。本研究では、ラットを 15 分間 43℃ の水浴中に浸漬することにより精巣重量と生殖細胞数は有意に減少が見られたがクラスタリン発現は著明に亢進した。アポトーシス指数は急激に増加し熱ストレス後 1 日目にピークに達した。これらの結果は、以前の研究の結果と一致している。例えば 2009 年 Paul らは 42℃ で 30 分間のマウス精巣に対する熱ストレス後、caspase3 陽性細胞の数の有意な増加を認め 1 日目にピークに達したことを報告している。また Clark らは 1997 年、熱ストレス後 2 日間の限定された期間ではあるがラットのセルトリ細胞におけるクラスタリン mRNA の継続的な発現亢進を報告している。まとめるとこれらの知見は、熱ストレスによる生殖細胞のアポトーシスは陰嚢の熱曝露後 1 日以内にラット精巣に誘導され、そしてまた、クラスタリン発現はこの熱ストレスに応答して著明にアップレギュレートされ持続的にその発現が亢進することを示唆している。

そこで我々は、クラスタリン発現の機能的意義の解析を行うための実験を計画した。セルトリ細胞は精巣内のクラスタリン産生の主要な供給源であることが知られている。そこで、セルトリ細胞を培養し siRNA 技術を使用してクラスタリン発現のサイレンシングを行い、熱ストレスの影響について比較検討した。siRNA は効果的にクラスタリンの発現を阻害した。またクラスタリンの発現を抑制したこれらの細胞において熱ストレスによるアポトーシスの誘導は増強した。これらの結果は、熱ストレスに誘導されるクラスタリン発現のアップレギュレーションは、熱ストレスによる精巣の損傷を抑制するように機能することを示している。

【結論】

我々はラット精巣において熱ストレスによるクラスタリン発現の著明なアップレギュレーションとアポトーシスの誘導を示した。さらに、クラスタリン遺伝子を標的とした siRNA は培養したラットのセルトリ細胞のクラスタリン発現を効果的に阻害し、これらクラスタリン発現の抑制されたセルトリ細胞においては熱ストレスによるアポトーシスの誘導が増強することが示された。ラット精巣において熱ストレスに誘導されるクラスタリン発現のアップレギュレーションは精子形成の防御因子として作用することが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2501 号	氏 名	松下 経
論 文 題 目 Title of Dissertation	ラット精巣においてセルトリ細胞の産生するクラスタリンは熱ストレスにより誘導されるアポトーシスを抑制する Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress-induced apoptosis in the rat testis		
審 査 委 員 Examiner	主 査 中村 誠 Chief Examiner 副 査 西尾久英 Vice-examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

クラスタリンは様々な生理的機能を有することが報告されている。アポトーシスに陥っている組織においてその発現が著明に亢進することが知られている。精巣においてはセルトリ細胞の成熟とともに増加し、性成熟期以降は変化しない。またセルトリ細胞、Elongated 精子細胞、成熟精子細胞の細胞膜に存在することが報告されている。しかしながら、その機能については詳細には分かっていない。本研究の目的は精巣でのクラスタリンの発現レベルを定量し、熱ストレスによって誘導される精巣組織のアポトーシスとの関連を明らかにすることである。

In vivo 実験には成熟した雄の Sprague-Dawley (S-D) ラットを使用した。43℃サーモスタット制御水槽中にラットの陰嚢を完全に浸漬させ、15 分間の熱ストレスを加える injury model を作製した。熱ストレス後 1、4、7、14、21 日目にラットを安楽死させ、精巣を摘出した。精巣重量は熱ストレス後 4 日目に減少し 21 日目まで改善は見られなかった。クラスタリン mRNA の発現は熱ストレス後 1 日目から上昇が見られ、21 日目まで持続した。同様に熱ストレス後クラスタリンタンパクの発現は経時的に上昇した。TUNEL 染色で評価したアポトーシス指数(全細胞数中の TUNEL 染色陽性細胞の割合)は 1 日目が最も高くその後減少した。

In vitro 実験として、19 日齢の雄の S-D ラットの精巣組織よりセルトリ細胞を培養した。培養セルトリ細胞にクラスタリンを標的とした siRNA を導入してクラスタリン発現を抑制した細胞と、control vector を導入した細胞とを作成し 41℃で 12 時間の熱ストレスを加えその影響を比較検討した。クラスタリンを標的とした siRNA の導入により培養セルトリ細胞におけるクラスタリン mRNA の発現は control vector を導入した培養セルトリ細胞と比較して約 30%に抑制された。control vector を導入した培養セルトリ細胞では熱ストレス後にクラスタリン mRNA の発現が著明に亢進したのに対して、siRNA を導入した培養セルトリ細胞におけるクラスタリン mRNA の発現は熱ストレス後も抑制された。TUNEL 染色による評価ではクラスタリンの発現を抑制した培養セルトリ細胞において熱ストレス後のアポトーシス誘導が顕著に見られ、アポトーシス指数は 24 時間以内では control と比較して有意に高値であった。

ラット精巣において熱ストレスによるクラスタリン発現の著明なアップレギュレーションとアポトーシスの誘導を示した。さらに、クラスタリン遺伝子を標的とした siRNA は培養したラットのセルトリ細胞のクラスタリン発現を効果的に阻害し、クラスタリン発現の抑制されたセルトリ細胞においては熱ストレスによるアポトーシスの誘導が増強することが示された。以上より、ラット精巣において熱ストレスに誘導されるクラスタリン発現のアップレギュレーションは精子形成の防御因子として作用する可能性があることが間接的に示されたと考える。

結果、クラスタリン発現と精巣における細胞死に新しい知見を加える業績があるといえる。よって本研究者は博士(医学)の学位と得る資格があると認める。