



Candesartan Mediated Amelioration of Cisplatin-Induced Testicular Damage Is Associated with Alterations in Expression Patterns of Nephrin and Podocin

Enatsu, Noritoshi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6686号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006686>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Candesartan Mediated Amelioration of Cisplatin-Induced
Testicular Damage Is Associated with Alterations in Expression
Patterns of Nephron and Podocin

精巣内ネフリン、ポドシンの発現変化は
カンデサルタンによる精巣保護作用に関与する。

神戸大学大学院医学研究科外科系講座

腎泌尿器科学分野

指導教員： 藤澤正人 教授

江夏 徳寿

【背景と目的】ネフリン、ポドシンは腎臓の糸球体毛細血管壁の足突起に位置しており、互いに結合することによって、スリット膜のバリア機能に重要な役割を果たしていることが報告されている。腎臓の他に脳と精巣でも発現が確認されているが、脳や精巣内での働きははっきりしていない。今回我々はネフリン、ポドシンの精巣内での働きについて研究し、解明を目指した。さらに、培養セルトリ細胞を用いて細胞レベルでも同様の結果が得られるかの確認を行った。さらに、腎臓においてネフリン、ポドシンの発現を安定化させる作用を持つと報告されているアンギオテンシンⅡ受容体阻害薬がシスプラチンの毒性を軽減させる経路について研究を行った。

【方法】in vivo: 成熟ラットを用いて精巣でのネフリン、ポドシンの発現をPCR、ウェスタンブロットで確認した。また、免疫染色を行い精巣内での局在を確認した。比較対象の不妊ラットとしてシスプラチンを投与したラットを用いて発現の変化を確認した。さらに腎臓においてネフリン、ポドシンの発現を安定化させる効果が立証されているアンギオテンシンⅡ受容体阻害薬を用いてシスプラチンの影響を緩和できるか検証した。またアンギオテンシンⅡ受容体阻害薬の作用機序を調べるため、カルボニル蛋白染色と SOD 活性の定量を行い、各検体の活性酸素の発生を調べた。

In vitro: マウスセルトリ細胞(TM-4)を用いて、ポドシン、ネフリンの発現をウェスタンブロット法、RT-PCR 法にて確認した。続いてシスプラチン、アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬であるカンデサルタンを加えその発現の変化を確認した。さらに、免疫沈降を用いて両タンパクの精巣内での結合を確認した。

【結果】ラットにシスプラチンを投与すると、精巣および、精子へのダメージが認められたが、カンデサルタン投与群では精子の運動率、奇形率の一定の改善を認めた(Fig1)。RT-PCR 法、ウェスタンブロット法にて、ネフリン、ポドシンが共にラット精巣内に発現していることが確認された。シスプラチンの投与群ではネフリン、ポドシン共にその発現が低下していたが、カンデサルタン追加投与を行った群では発現の低下が緩和できることが確認できた(Fig2)。また蛍光免疫染色法にてネフリン、ポドシンは精細管の基底膜付近に共発現していることが確認された。この発現形式はシスプラチン投与によって不連続な顆粒状パターンへと変化した。アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬を追加投与した群では連続性を保っていることが確認できた(Fig3)。これらの変化は精細管の病理所見や精液所見とリンクしており、シスプラチンによってアポトーシスが亢進している事も確認された(Fig4)。続いて、シスプラチンが精巣機能障害を来す機序について調べるために、精巣内酸化ストレスの指標を調べる目的でカルボニル化タンパクの定量、SOD 活性の測定を行った。カルボニル化タンパ

クは、シスプラチン投与群において増加しており、カンデサルタン投与群ではその増加が抑制されていた。また、SOD 活性に関しては、シスプラチン投与群で減少しており、カンデサルタン投与群では減少が抑えられていた。このことから、カンデサルタンはシスプラチンによって引き起こされた活性酸素の増加を緩和していると考えられた (Fig5)。さらに、アンギオテンシン系がネフリン、ポドシンにおよぼす直接的な作用を調べる目的で、In vitro の実験をおこなった。培養セルトリ細胞において、ネフリン、ポドシン共にアンギオテンシンⅡの作用により発現が減弱すること、アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬の追加投与によってその変化が緩和されることが確認された。また、蛍光免疫染色にて培養セルトリ細胞の細胞壁側に強くネフリンの発現を確認した。この発現はシスプラチンの投与により低下することが確認され、アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬追加投与にてある程度緩和されることが確認された。ポドシンも同様の局在を持って確認されたため、共発現していると考えられ、共免疫沈降法にて、ポドシンとネフリンは互いに結合して存在していることが立証された (Fig7)。

【考察】ネフリン、ポドシンは腎臓のスリット膜を構成するタンパクとして知られており、互いに結合することによってバリア機能や過機能を有すると考えられている。今回の我々の検討によると、ネフリン、ポドシン共に精巣の基底膜沿いに共発現しており、血液精巣関門を構成する因子であることが示唆された。今回精巣障害モデルを作成するのに用いられたシスプラチンは、精巣機能障害を引き起こす事が知られており、本研究においても精子形成を障害することが確認された。興味深いことに、シスプラチン投与群において精巣内ネフリンとポドシンはその発現が低下しているだけでなく、発現形式が規則正しい直線状のパターンから不連続な顆粒状に変化していることが確認されており、その結合が外れる事が、バリア機能の破綻と関連しているのではないかと考えられた。今回の検討では、さらにカンデサルタンを加えて実験を行ったが、その理由としてアンギオテンシン受容体阻害薬が腎臓のスリット膜タンパクに直接作用し、その保護作用を有するという報告に基づいている。実際に、我々の検討においてもカンデサルタン投与群において、ネフリン、ポドシンの発現低下が緩和されていることが確認された。続いて、シスプラチンが精巣障害を引き起こす機序を調べる目的で酸化ストレスに注目した。酸化ストレスの増加が精巣障害を来すことは良く知られており、アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬が酸化ストレスを抑制するという報告も散見される。今回の検討でも、諸家の報告と同様にシスプラチン投与によって酸化ストレスの発生が促され、カンデサルタン投与によってその発生が抑制されていた。この酸化ストレスの発生はシスプラチンの精巣機能障害のメカニズムの 1 つと考えられるが、留意しておく必要があるのは、精子形成障害を来すには、精細管内の血液精巣関門の内側ま

でシスプラチンの影響が及ぶ必要があるという事である。そのため、今回の実験で用いた、シスプラチンとカンデサルタンは血液精巣関門とそれを構成する分子にも作用している必要がある。その機序をより正確に確認するため、培養セルトリ細胞での実験を行った。培養細胞においてもネフリン、ポドシンの両タンパクは細胞質に存在しており、特に辺縁に強く発現していた。さらに、この発現はアンギオテンシンⅡの投与によって抑制されていたことから、ネフリン、ポドシンの発現がアンギオテンシン系に関与してコントロールされていることが細胞レベルで証明された。

【結論】ネフリン、ポドシンは互いに結合して血液精巣関門の構成分子として機能しており、シスプラチンによるアンギオテンシン系を介した両タンパクの発現低下が精巣のバリア機能の低下と関連していると考えられた。カンデサルタンはシスプラチンによる精巣障害を緩和したが、これにはネフリン、ポドシンの発現低下の緩和が関わっている事が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2588号	氏 名	江夏 徳寿
論文題目 Title of Dissertation	Candesartan Mediated Amelioration of Cisplatin-Induced Testicular Damage Is Associated with Alterations in Expression Patterns of Nephryn and Podocin 精巣内ネフリン、ポドシンの発現変化はカンデサルタンによる精巣保護作用に関与する。		
審査委員 Examiner	主 査 眞 庭 謙 昌 Chief Examiner 副 査 林 祥 剛 Vice-examiner 副 査 山 田 秀 人 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

ネフリン、ポドシンは腎臓の糸球体毛細血管壁の足突起に位置しており、互いに結合することによって、スリット膜のバリア機能に重要な役割を果たしていることが報告されている。腎臓の他に脳と精巣でも発現が確認されているが、脳や精巣内での働きははっきりしていない。今回の研究ではネフリン、ポドシンの精巣内での働きについて研究し、解明を目指した。さらに、培養セルトリ細胞を用いて細胞レベルでも同様の結果が得られるかの確認を行った。さらに、腎臓においてネフリン、ポドシンの発現を安定化させる作用を持つと報告されているアンギオテンシンⅡ受容体阻害薬がシスプラチンの毒性を軽減させる経路について研究を行った。

in vivoの実験では、成熟ラットを用いて精巣でのネフリン、ポドシンの発現をPCR、ウェスタンブロットで確認した。また、免疫染色を行い精巣内での局在を確認した。比較対象の不妊ラットとしてシスプラチンを投与したラットを用いて発現の変化を確認した。さらに腎臓においてネフリン、ポドシンの発現を安定化させる効果が立証されているアンギオテンシンⅡ受容体阻害薬を用いてシスプラチンの影響を緩和できるか検証した。またアンギオテンシンⅡ受容体阻害薬の作用機序を調べるため、カルボニル蛋白染色とSOD活性の定量を行い、各検体の活性酸素の発生を調べた。その結果、ラットにシスプラチンを投与すると、精巣および、精子へのダメージが認められたが、アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬、カンデサルタン投与群では精子の運動率、奇形率の一定の改善を認めた。RT-PCR法、ウェスタンブロッティング法にて、ネフリン、ポドシンが共にラット精巣内に発現していることが確認された。シスプラチンの投与群ではネフリン、ポドシン共にその発現が低下していたが、カンデサルタン追加投与を行った群では発現の低下が緩和できることが確認できた。また蛍光免疫染色法にてネフリン、ポドシンは精細管の基底膜付近に共発現していることが確認された。この発現形式はシスプラチン投与によって不連続な顆粒状パターンへと変化した。アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬を追加投与した群では連続性を保っていた。これらの変化は精細管の病理所見や精液所見とリンクしており、シスプラチンによってアポトーシスが亢進している事も確認された。

次にIn vitroの研究として、マウスセルトリ細胞(TM-4)を用いて、ポドシン、ネフリンの発現をウェスタンブロッティング法、RT-PCR法にて確認した。続いてシスプラチン、アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬であるカンデサルタンを加えその発現の変化を確認した。さらに、免疫沈降を用いて両タンパクの精巣内での結合を確認した。培養セルトリ細胞において、ネフリン、ポドシン共にアンギオテンシンⅡの作用により発現が減弱すること、アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬の追加投与によってその変化が緩和されることが確

認められた。また、蛍光免疫染色にて培養セルトリ細胞の細胞壁側に強くネフリンの発現を確認した。この発現はシスプラチンの投与により低下することが確認され、アンギオテンシンⅡ受容体阻害薬追加投与にてある程度緩和されることが確認された。ポドシンも同様の局在を持って確認されたため、共発現していると考えられ、共免疫沈降法にて、ポドシンとネフリンは互いに結合して存在していることが立証された。

本研究は、腎臓の糸球体毛細血管壁の足突起などで多く発現しているネフリン、ポドシンについて、精巣での発現の意義を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったシスプラチンによる精巣の障害におけるネフリン、ポドシンの役割、さらにはアンギオテンシンⅡ受容体阻害薬によるネフリン、ポドシンを介した障害の回避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、本研究は、博士（医学）の学位を取る資格があると認める。