Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Effect of mirabegron on tight junction molecules in primary cultured rat Sertoli cells

Tanaka, Mikito

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2019-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第7465号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007465

※ 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

Effect of mirabegron on tight junction molecules in primary cultured rat Sertoli cells

初代培養ラットセルトリ細胞におけるミラベグロンによる密着結合構成分子への影響に関する検討

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）

田中 幹人

【目的】

交感神経終末からのカテコラミン刺激は、膀胱平滑筋細胞膜のG蛋白質共役受容体であるβ_3アドレナリン受容体を通じてアデニル酸シクラーゼを活性化し、膀胱平滑筋弛緩作用を示す．ミラベグロンはβ_3アドレナリン受容体刺激薬であり、抗コリン薬に代わる過活動膀胱の治療薬として、広く臨床的に使用されている．一方で、ラットによる動物実験での高用量投与では、精巣、精嚢、前立腺および子宮の萎縮などといった生殖器系への影響が認められ、さらに、雌性ラットでは発情休止期の延長、黄体数の減少に伴う着床数および生存胎児数の減少を認めたことから、生殖可能年齢の患者へのミラベグロン投与はできる限りさけるよう、添付文書で警告されている．しかしながら、その生殖器への影響の機序は解明されておらず、また、ミラベグロンの生殖関連細胞に対しての研究は現在まで為されていない．
そこで本研究は、精細管内の体細胞であるセルトリ細胞に対してのミラベグロンの作用およびそのシグナル伝達経路を解明し、ミラベグロンによる生殖器毒性の機序の一因を探索することを目的とした．
セルトリ細胞は精細管基底膜に沿って配列し、隣接するセルトリ細胞同士で血液精巣関門を構成する働きを持つ、造精においてのnursing cellと称される細胞である．血液精巣関門は、精細管を基底膜側と管腔側に分画することにより、血中の有害物質や自己免疫系などからの生殖細胞への影響を防御するのみならず、周期的にリモデリングしながら精原細胞から精子細胞への分化を支持する機能を併せ持つ．血液精巣関門は密着結合や接着結合などの数種の結合で構成されるが、特に密着結合の構成分子の一つであるclaudin-11のノックアウトマウスは、不妊症を来すことが知られている．現在まで泌尿器科研究室は、内分泌撹乱物質がclaudin-11の発現に影響を与えることをin vitro研究により示し、また、臨床研究では無精子症による不妊症患者の精巣生検検体を免疫染色法で検討することにより、claudin-11の無精子症精細管内での発現低下または局在の乱れが存在することを示した．
この結果を踏まえて、今回は、claudin-11、occludin、ZO-1といった、世界的に広く研究されている密着結合構成分子を評価対象とし、ミラベグロンがセルトリ細胞への毒性を有するかを明らかにすることとした．また、その背景に存在するシグナル伝達経路の候補としては、アドレナリン受容体の代表的なセカンドメッセンジャーであるcAMPや、血液精巣関門の制御に関与することが知られるmitogen activated protein kinase(MAPK)ファミリーなどを選択し、ミラベグロンによる生殖器への影響に関与する可能性のある分子機構を解明することを目的とした．

【方法】

18日齢Sprague-Dawleyラットの精巣からセルトリ細胞を単離精製し、初代培養培地を作成した．
まずは、セルトリ細胞でのβ_3アドレナリン受容体の発現を確認する目的で、セルトリ細胞から抽出したmRNAを逆転写してcDNAを作成し、β_3アドレナリン受容体のプライマー

でPCRした後に、アガロースゲル電気泳動を行った．また、β_3アドレナリン受容体に対する抗体を用いて、ラットセルトリ細胞の蛍光免疫染色を行った．
次に、セルトリ細胞培地の培養液に終濃度1μMのミラベグロンを単独で、または、ミラベグロンと共にmitogen activated protein kinase kinase (MAPKK) の阻害薬であるU0126を終濃度10μMとなるよう添加した．30分、1時間、3時間、6時間経過時点でセルトリ細胞からmRNAと蛋白質を抽出し、それぞれ、定量的リアルタイムPCR法と、ELIZA法およびウエスタンブロット法により解析を行った．定量的リアルタイムPCR法では、先に述べた密着結合構成分子の mRNA 発現量へのミラベグロンによる影響を検討し、また、ELISA法ではcAMPの刺激亢進に関して、ウエスタンブロット法ではMAPKファミリーであるp44/42 MAPK、SAPK/JNK、p38 MAPKなどの刺激亢進が生じるかを検討した．
さらに、同様の投薬処理を行ったセルトリ細胞初代培養培地を、claudin-11に対する抗体を用いて蛍光免疫染色し、ミラベグロンおよびU0126によるclaudin-11への影響を、蛋白レベルでも検討した．

【結果】
逆転写 PCR 法と蛍光免疫染色法において、ラットセルトリ細胞はβ_3受容体抗体に対して陽性を示した．
定量的リアルタイムPCR法では、セルトリ細胞培養液への1μMミラベグロン添加後早期から、Claudin-11のmRNAの発現亢進を認めた．同時に、ELISA法ではcAMPの有意な増加が、ウエスタンブロット法でp44/42 MAPKの有意なリン酸化亢進が確認されたが、その程度はp44/42 MAPKが、cAMPの増加と比較して大きいものであった．
一方で、ミラベグロンによる p44/42 MAPK のリン酸化を U0126 で抑制したところ、Claudin-11のmRNAの発現は亢進しなかった．このことから、高用量ミラベグロン投与に対してセルトリ細胞は反応性を有しており、また、その背景にp44/42 MAPKを介するシグナル伝達機構が存在することが示唆された．
さらに、蛍光免疫染色法による検討では、セルトリ細胞間の claudin-11 の配列がミラベグロンにより断片化し、また、U0126 の追加によりその改善を認めた．よって、蛋白レベルにおいても、ミラベグロンのclaudin-11への影響とp44/42 MAPKの関与が示された．

【考察】
1980年代のβ_3アドレナリン受容体発見を契機として、βアドレナリン受容体の分類が、従前からのβ_1およびβ_2アドレナリン受容体の2者からβ_3アドレナリン受容体を加えた3者による分類へと改められた．また、セルトリ細胞でのβアドレナリン受容体に関しては、β_1およびβ_2アドレナリン受容体の発現が既に示されていたが、β_3アドレナリン受容体発見後に、改めてセルトリ細胞でのβ_3アドレナリン受容体の発現の有無を検討した研究は見られないことから、今回の本研究の過程において、ラットセルトリ細胞にβ_3アドレナリン受容体の発現が示されたことは、特筆すべきことである．
一方で、本検討でのミラベグロン投薬量は臨床使用量と比較して多量であり、また、ミラベグロンは、β_3アドレナリン受容体とは異なる作用点への非特異的刺激作用が多数報告されている．今回は、β_3アドレナリン受容体阻害薬による阻害実験を行っていないことから、本検討でのミラベグロンの効果が必ずしもβ_3アドレナリン受容体を介した作用であるとは断定できない．
しかしながら、他家によるin vivo研究でミラベグロンが性ホルモンに影響を与えないことが示され、ミラベグロンによる生殖器毒性の機序が全く未知のまま臨床応用されている現状や、過去にミラベグロンによる生殖関連細胞への影響を検討した研究が存在しないことを鑑みれば、今回、ミラベグロンが血液精巣関門への影響により生殖器毒性を呈する可能性が示されたことの重要性は高い．
今後の研究課題として、ミラベグロンによる生殖細胞への直接的影響の検討する目的で、セルトリ細胞と生殖細胞の共培養での実験や、in vivoでミラベグロンを大量投薬した場合においての精液所見などへの影響を検討する実験などが考えられる．
本研究は、ラットセルトリ細胞を用いてミラベグロンによる血液精巣関門への影響を示すことにより、ミラベグロンによる生殖関連細胞への影響を明らかにする目標を達成したが、その毒性の全容解明や、セルトリ細胞でのβ_3アドレナリン受容体の役割の解明には、更なる検討が必要である．

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2864号	氏　名	田中　幹人
論文題目 Title of Dissertation	Effect of mirabegron on tight junction molecules in primary cultured rat Sertoli cells 初代培養ラットセルトリ細胞におけるミラベグロンによる密着結合構成分子への影響に関する検討		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	真庭謙昌 林祥剛 児玉裕三	

(要旨は1，000字～2，000字程度)

交感神経終末からのカテコラミン刺激は、膀胱平滑筋細胞膜のG蛋白質共役受容体であるβ_3アドレナリン受容体を通じてアデニル酸シクラーゼを活性化し、膀胱平滑筋弛緩作用を示す．ミラベグロンはβ_3アドレナリン受容体刺激薬であり、抗コリン薬に代わる過活動膀胱の治療薬として、広く臨床的に使用されている．一方で、ラットによる動物実験での高用量投与では、精巣、精嚢、前立腺および子宮の萎縮などといった生殖器系への影響が認められ、さらに、雌性ラットでは発情休止期の延長、黄体数の減少に伴う着床数および生存胎児数の減少を認めたことから、生殖可能年齢の患者へのミラベグロン投与はできる限りさけるよう、添付文書で警告されている．しかしながら、その生殖器への影響の機序は解明されておらず、また、ミラベグロンの生殖関連細胞に対しての研究は現在まで為されていない．そこで本研究は、精細管内の体細胞であるセルトリ細胞に対してのミラベグロンの作用およびそのシグナル伝達経路を解明し、ミラベグロンによる生殖器毒性の機序の一因を探索することを目的とした．

方法として、18日齢Sprague-Dawleyラットの精巣からセルトリ細胞を単離精製し、初代培養培地を作成した．まずは、セルトリ細胞でのβ_3アドレナリン受容体の発現を確認する目的で、セルトリ細胞から抽出したmRNAを逆転写してcDNAを作成し、β_3アドレナリン受容体のプライマーでPCRした後に、アガロースゲル電気泳動を行った．また、β_3アドレナリン受容体に対する抗体を用いて、ラットセルトリ細胞の蛍光免疫染色を行った．

次に、セルトリ細胞培地の培養液に終濃度1μMのミラベグロンを単独で、または、ミラベグロンと共にmitogen activated protein kinasekinase(MAPKK)の阻害薬であるU0126を終濃度10μMとなるよう添加した．30分、1時間、3時間、6時間経過時点でセルトリ細胞からmRNAと蛋白質を抽出し、それぞれ、定量的リアルタイムPCR法と、ELIZA法およびウエスタンブロット法により解析を行った．定量的リアルタイムPCR法では、先に述べた密着結合構成分子のmRNA発現量へのミラベグロンによる影響を検討し、また、ELISA法ではcAMPの刺激亢進に関して、ウエスタンブロット法ではMAPKファミリーであるp44/42 MAPK、SAPK/JNK、p38MAPKなどの刺激亢進が生じるかを検討した．さらに、同様の投薬処理を行ったセルトリ細胞初代培養培地を、claudin-11に対する抗体を用いて蛍光免疫染色し、ミラベグロンおよびU0126によるclaudin-11への影響を、蛋白レベルでも検討した．

その結果、逆転写PCR法と蛍光免疫染色法において、ラットセルトリ細胞はβ_3受容体抗体に対して陽性を示した．

定量的リアルタイムPCR法では、セルトリ細胞培養液への1μMミラベグロン添加後早期から、Claudin-11のmRNAの発現亢進を認めた．同時に、ELISA法ではcAMPの有意な増加が、ウエスタンブロット法でp44/42MAPKの有意なリン酸化亢進が確認されたが、その程度はp44/42MAPKが、cAMPの増加と比較して大きいものであった．一方で、ミラベグロンによるp44/42MAPKのリン酸化をU0126で抑制したところ、Claudin-11のmRNAの発現は亢進しなかった．このことから、高用量ミラベグロン投与に対してセルトリ細胞は反応性を有しており、また、その背景にp44/42MAPKを介するシグナル伝達機構が存在することが示唆された．さらに、蛍光免疫染色法による検討では、セルトリ細胞間のclaudin-11の配列がミラベグロンにより断片化し、また、U0126の追加によりその改善を認めた．よって、蛋白レベルにおいても、ミラベグロンのclaudin-11への影響とp44/42MAPKの関与が示された．

本研究は，精細管内の体細胞であるセルトリ細胞に対してのミラベグロンの作用およびそのシグナル伝達経路を解明し、ミラベグロンによる生殖器毒性の機序の一因を探索したものである．従来，ミラベグロンによる生殖関連細胞への影響を検討した研究が存在しないことから、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ものと認める．