

マウス造精機能障害モデルにおけるTRAIL発現抑制の効果

合田 上政¹⁾, 後藤 章暢²⁾, 白川 利朗²⁾, 寺尾 秀治¹⁾,
土橋 正樹¹⁾, 岡田 弘³⁾, 守殿 貞夫¹⁾, 藤澤 正人¹⁾

1) 神戸大学大学院医学系研究科器官治療医学講座腎泌尿器科学
2) 神戸大学医学研究国際交流センター
3) 帝京大学泌尿器科学

はじめに

不妊症の約半数は男性要因であり, 原因として造精機能障害の占める割合は大きい [1, 2]. 精子形成は細胞増殖, 減数分裂, 機能分化の過程からなり, 精巣内には複雑な細胞間調節機構が存在する. 精巣機能を調べるためにもっともよく用いられる動物実験モデルの1つに停留精巣モデルがある [3]. マウス停留精巣モデルにおいて停留精巣作成後に精巣重量は減じ, 病理組織学的には精細管径の減少と精子形成の障害, アポトーシス細胞の増加を認め, 造精機能障害は長期間の停留精巣化の後には精巣固定術を施行しても不可逆となることが知られている. これまでにp53, bcl-2, Fas/Fas ligandなど多くのsystemsが精巣内のアポトーシスに関与していることが知られており, またp53 [4] やFas [5] のノックアウトマウスにおいて停留精巣作成による造精機能障害過程の遅延が報告されている.

Tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) はFas ligandと同じくTumor necrosis factor (TNF) ファミリーに属し1995年にWiley [6] ら, 1996年にPitti [7] らによりそれぞれヒトTRAIL cDNAが同定された. またヒトでは281アミノ酸, マウスでは291アミノ酸からなり, ヒトとマウスで65%のアミノ酸相同性があることが明らかとなった. TRAILはdeath domainを細胞内領域に含む受容体であるDR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2を介してアポトーシスを誘導し, 機能的death domainをもたない受容体DcR1/TRAIL-R3, DcR2/TRAIL-R4はTRAILのdecoy receptorsとして働くことが知られている [8]. これまでにヒト, ラット精巣におけるTRAIL, TRAIL receptorsの発現が報告されており germ cells, Leydig

cellsに広く分布していることが知られており, アポトーシスを介した精子形成の調節に関与していることが示唆されている (図1) [9, 10, 11]. 本研究ではマウス精巣におけるTRAIL, TRAIL receptorsの発現を調べるとともに, マウス停留精巣作成による造精機能障害モデルでTRAIL発現抑制の効果について検討した.

研究の方法

1) 実験動物

本研究では8週齢C57BL/6Jマウスを用いた. すべての動物実験はNational Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsの指針に沿って行った.

2) プラスミドベクター作製

pEGFP-N1 vector に MoLV-LTR promoter, hygromycin cassetteを組み込んだpMoHygroを作製, さらにマウスTRAILをantisense方向に組み込みpMoHygro-TRAILasを, またLacZ遺伝子を組み込みpMoHygro-LacZをそれぞれ作製した (図2) [12].

3) 造精機能障害モデル

マウス片側停留精巣作成時に各プラスミドベクターを30 μ g精細管注入し, 8 square electric pulses, voltage 50V, pulse length 50msecの条件のin vivo electroporation法で遺伝子導入した [13, 14]. 造精機能障害過程の7日と14日目にPAS染色による精子形成, 精巣重量を評価した.

4) X-gal染色, 免疫組織染色

プラスミドベクター注入4日目にX-gal染色 (pMoHygro群, pMoHygro-LacZ群), 免疫組織染色 (pMoHygro群, pMoHygro-TRAILas群) で遺伝子導入を確認した.

連絡先: 合田上政, 神戸大学大学院医学系研究科器官治療医学講座腎泌尿器科学,
〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-1
TEL: 078-382-6155
FAX: 078-382-6169
E-mail: godagoda@med.kobe-u.ac.jp

TRAIL/ TRAIL-Receptors	Cell types					
	spermatogonia	spermatocytes	round spermatids	elongated spermatids	Sertoli cells	Leydig cells
TRAIL	Rat	Human, Rat	Human, Rat	Human, Rat		Human, Rat
DR4/TRAIL-R1		Human	Human	Human, Rat	Human	
DR5/TRAIL-R2		Human, Rat	Human, Rat	Human, Rat		Human, Rat
DcR1/TRAIL-R3			Human, Rat	Human, Rat		
DcR2/TRAIL-R4		Human, Rat	Human, Rat	Human, Rat		Human, Rat

図1 ヒト, ラット精巣におけるTRAIL, TRAIL receptorsの発現

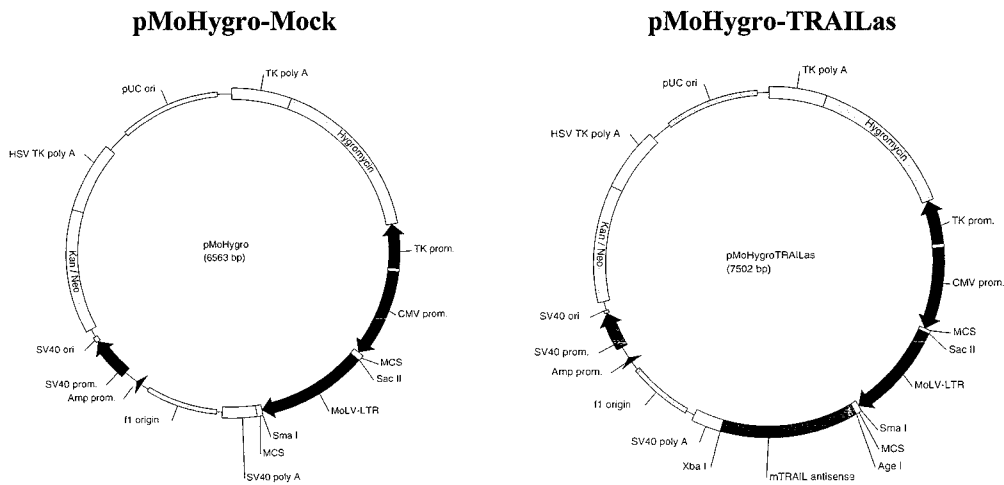


図2 pMoHygro-TRAILasプラスミドの構造

5) PCR, Western blot

プラスミドベクター注入4日, 7日, 14日目にTRAILas specific primersを用いたPCRで導入を確認[12], Western blotでTRAIL発現の抑制を確認した。さらにcaspase-8, caspase-3 cleavageの抑制を確認した。

6) TUNEL

プラスミドベクター注入4日, 7日, 14日目にTUNEL法により一精細管あたりのアポトーシス細胞数を評価した。

7) 統計解析

統計学的処理はStudent's t testを用い, p<0.05を以って有意と判定した。

マウス精巣におけるTRAILと受容体の発現

マウス精巣においてTRAILはspermatogonia, spermatocytes, round spermatids, elongated spermatids, Leydig cellsに広く発現を認めた。pMoHygro-LacZ精細管注入4日目のX-gal染色で, germ cellsとsomatic cellsに遺伝子導入を確認し, MoLV-LTR promoter下のin vivo electroporation法による精巣への効果的な遺伝子導入が確認された。同様にpMoHygro-TRAILas精細管注入によってgerm cellsとsomatic cellsにTRAIL発現の抑制を免疫組織染色で認めた(図3)。TRAIL受容体のDR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DcR1/TRAIL-R3, DcR2/TRAIL-R4についてもspermatocytes, round spermatids, elongated spermatids, Leydig cellsに広く発現を認めた(図4)。

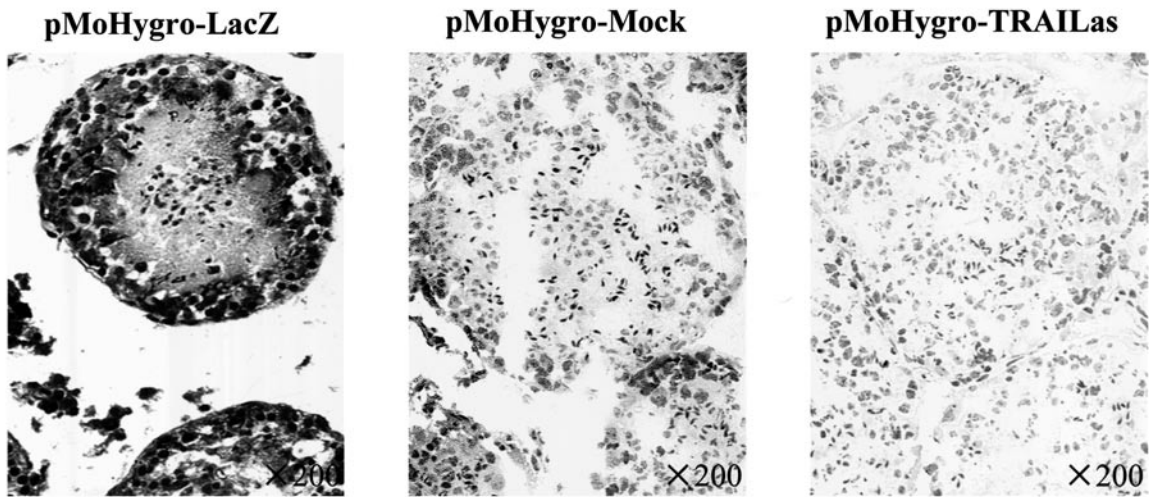


図3 X-gal染色, 免疫組織染色による遺伝子導入の確認

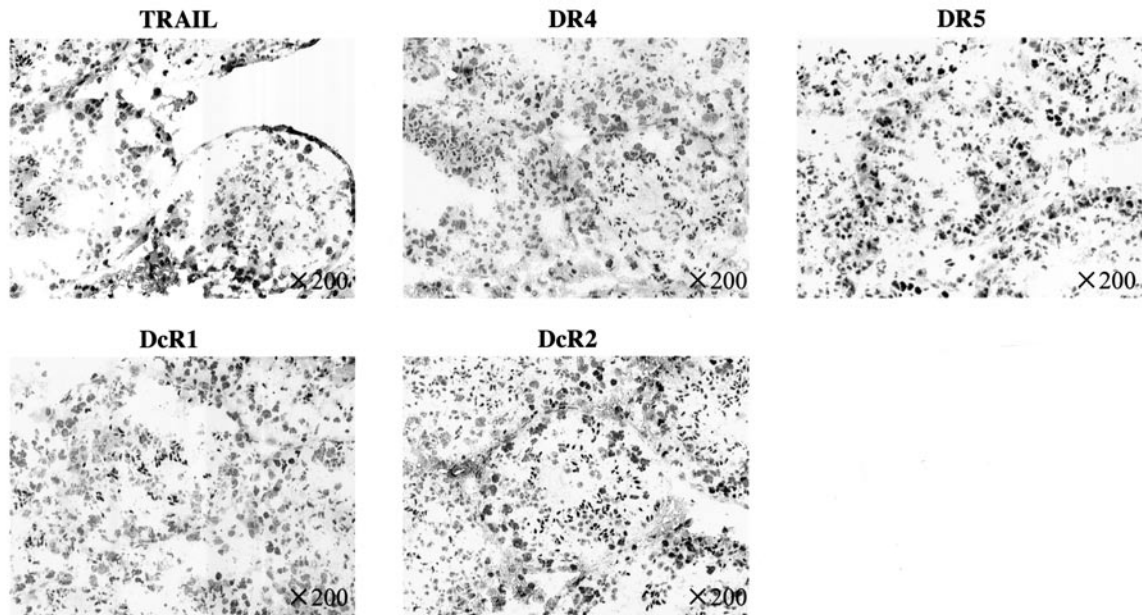


図4 マウス精巣におけるTRAIL, TRAIL receptorsの発現

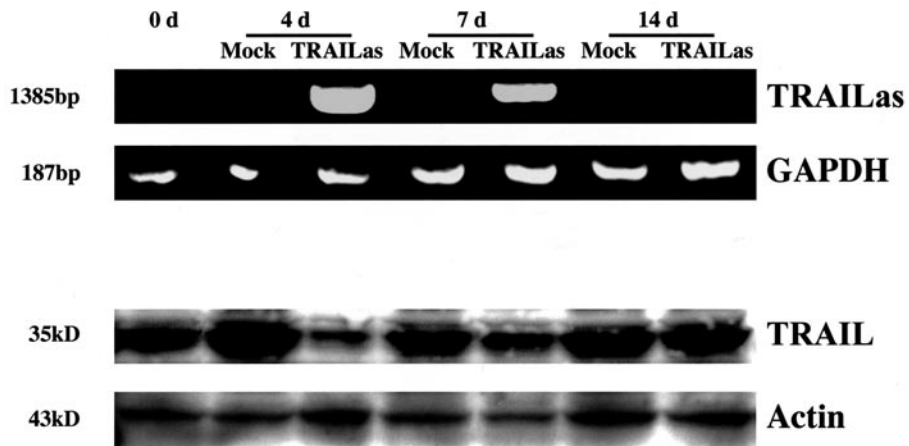


図5 マウス造精機能障害モデルにおけるTRAILas遺伝子導入とTRAIL抑制

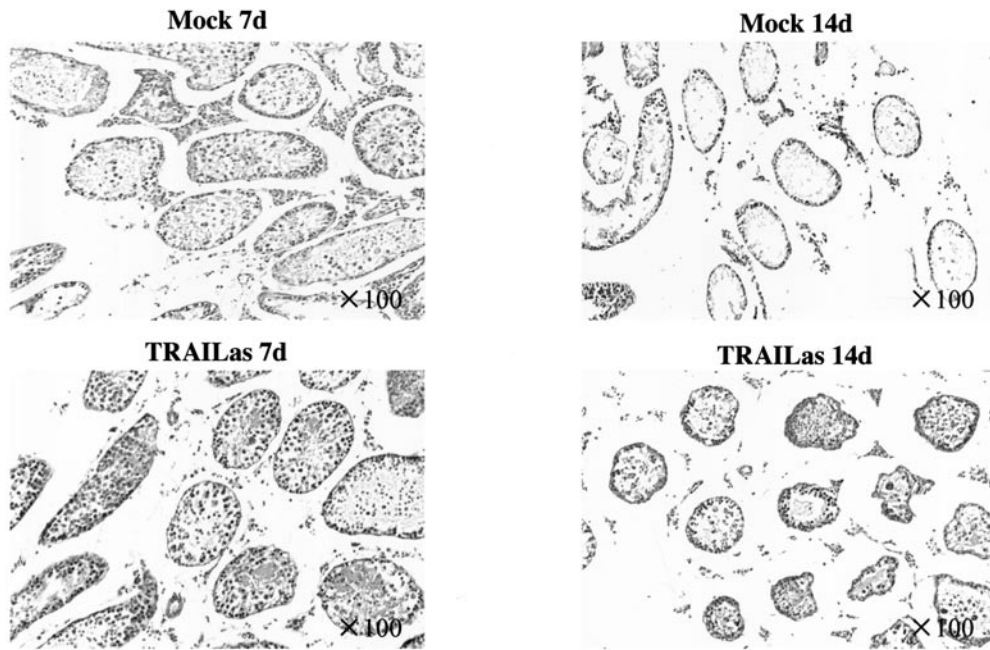


図6 マウス造精機能障害モデルにおけるPAS染色による精子形成の確認

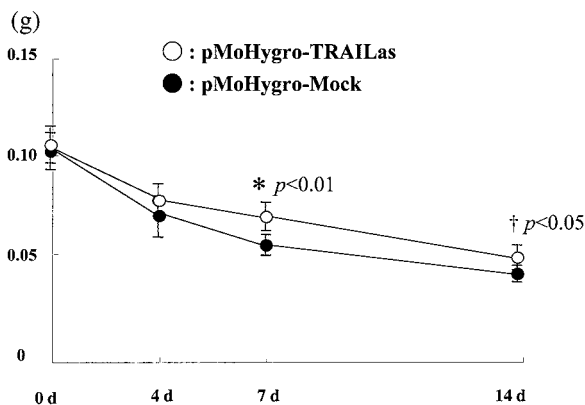


図7 マウス造精機能障害モデルにおける精巣重量の経時変化

マウス停留精巣モデルにおける TRAIL発現抑制の影響

マウス造精機能障害モデル精巣DNA extractの TRAILas specific primersを用いたPCRによる解析で TRAILas (1385bp) は, pMoHygro-TRAILas注入後4日目に最も強く発現し, 14日目にかけて徐々に減じた. pMoHygro control群ではTRAILasを認めなかった. TRAIL蛋白 (35kD) についても同様にwestern blotによりpMoHygro-TRAILas群で抑制されていることを確認した (図5). またTRAIL発現はpMoHygro-LacZ群とpMoHygro control群で差を認めなかった. さらに片

側精巣へのpMoHygro-TRAILasのelectroporationによる遺伝子導入は対側精巣へのTRAIL発現に影響せず, electroporationによる遺伝子導入は精巣局所でTRAIL発現を抑制した. 停留精巣作成後, 造精機能障害過程7日, 14日目の精子形成については各seminiferous tubules内のgerm cells数においてpMoHygro control群に比べてpMoHygro-TRAILas群で増加を認めた (図6). 同様に精巣重量についてもpMoHygro control群 (術後7日目; 0.056 ± 0.005g, 術後14日目; 0.042 ± 0.004g) と比較して, pMoHygro-TRAILas群 (術後7日目; 0.070 ± 0.007g, 術後14日目; 0.050 ± 0.006g) で増加を認めた ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) (図7). また精子形成と精巣重量はpMoHygro-LacZ群とpMoHygro control群で差を認めなかった. このようにマウス造精機能障害モデルにおいてTRAIL発現の抑制により, 精子形成の障害と精巣重量の減少が抑制されることが確認された.

TRAIL発現抑制による抗アポトーシス効果

精巣におけるTRAIL/TRAIL Receptorsシグナルを調べるためcaspase-8, caspase-3についてwestern blotにより確認した. 遺伝子導入後4日目のpMoHygro-TRAILas群ではpMoHygro control群に比べてcaspase-8, caspase-3 cleavageの抑制を認め, 14日目にかけて徐々にその差を減じた (図8). 結果TRAIL/TRAIL

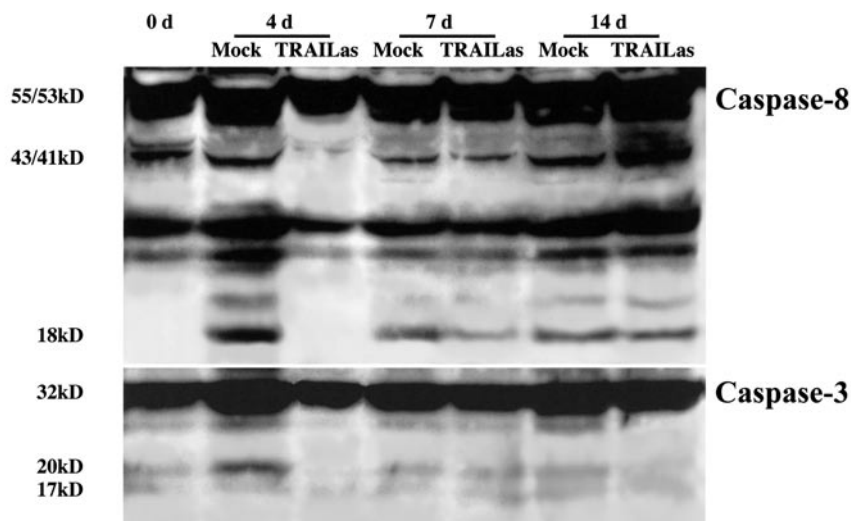


図8 マウス造精機能障害モデルにおけるcaspase-8, caspase-3 cleavageの抑制

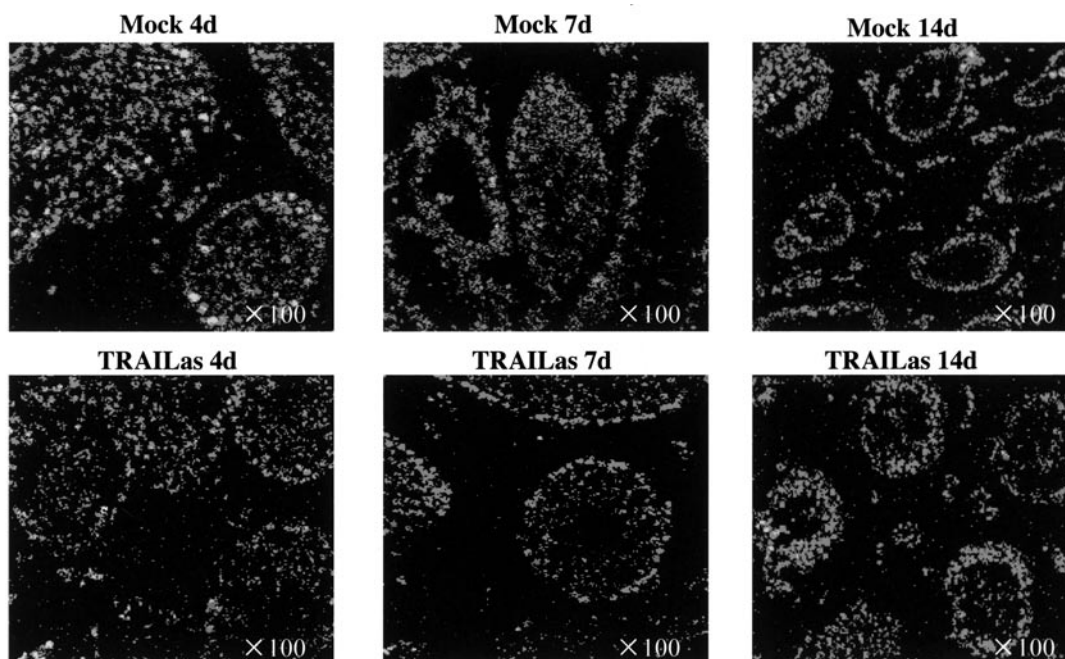


図9 マウス造精機能障害モデルにおけるアポトーシスの経時変化

Receptorsのinteractionsは造精機能障害モデル精巣の精子形成に重要な役割を果たしたと考えられた。最後にTRAIL抑制による抗アポトーシス効果をTUNEL法により検討した。一般に停留精巣作成によりアポトーシス細胞は増加することが知られており、遺伝子導入後4日、7日目ともにpMoHygro control群に比べ、pMoHygro-TRAILas群でアポトーシス細胞の減少を認めた(図9)。このことから停留精巣による胚細胞数の減少にアポトーシスが関与し、TRAIL抑制による抗アポトーシス効果

により精子形成の障害が抑制されたと考えられた。

おわりに

マウス精巣においてもTRAILおよびTRAIL受容体であるDR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2, DcR1/TRAIL-R3, DcR2/TRAIL-R4の発現を認めた。マウス造精機能障害モデルにおいてTRAIL antisense遺伝子導

入による抗アポトーシス効果を認め、停留精巣による造精機能障害にTRAIL-induced apoptosisの関与することが示唆された。また、マウス造精機能障害モデルにおいてTRAIL antisense遺伝子導入による精子形成および精巣重量の増加を認め、精巣におけるTRAIL/TRAIL-Rs systemの重要性が示唆された。

謝辞

第9回日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞し、またこのような執筆の機会をいただきましたことを大変光栄に存じます。本研究の遂行にあたり多大なご指導をいただきました藤澤正人先生、後藤章暢先生にこの場をお借りして深く感謝の意を表します。

文 献

1. Comhaire FH (1996) In : Comhaire FH (ed) Male Infertility. Chapman & Hall Medical, London, pp.123-131.
2. Mosher WD, Pratt WF (1991) Fecundity and infertility in the United States: Incidence and trends. *Fertil Steril* 56, 192-193.
3. Nishimune Y, Maekawa M, Sakamaki K, Haneji T (1986) Effect of duration of cryptorchidism on ability of mouse germ cells to regenerate and differentiate. *Arch Androl* 16, 89-96.
4. Yin Y, DeWolf WC, Morgentaler A (1998) Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biol Reprod* 58, 492-496.
5. Ogi S, Tanji N, Yokoyama M, Takeuchi M, Terada N (1998) Involvement of Fas in the apoptosis of mouse germ cells induced by experimental cryptorchidism. *Urol Res* 26, 17-21.
6. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
7. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271, 12687-12690.
8. Younes A, Kadin ME (2003) Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy. *J Clin Oncol* 15, 3526-3534.
9. Grataroli R, Vindrieux D, Selva J, Felsenheld C, Ruffion A, Decaussin M, Benahmed M (2004) Characterization of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in the adult human testis. *Mol Hum Reprod* 10, 123-128.
10. Grataroli R, Vindrieux D, Gougeon A, Benahmed M (2002) Expression of tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in rat testis during development. *Biol Reprod* 66, 1707-1715.
11. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S (2004) Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52, 821-831.
12. Strebel A, Bachmann F, Wernli M, Erb P (2002) Tumor necrosis factor-related, apoptosis-inducing ligand supports growth of mouse mastocytoma tumors by killing tumor-infiltrating macrophages. *Int J Cancer* 20, 627-634.
13. Yamazaki Y, Fujimoto H, Ando H, Ohyama T, Hirota Y, Noce T (1998) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells by deoxyribonucleic acid injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. *Biol Reprod* 59, 1439-1444.
14. Muramatsu T, Shibata O, Ryoki S, Ohmori Y, Okumura J (1997) Foreign gene expression in the mouse testis by localized in vivo gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 7, 45-49.