

セルトリ細胞においてIL-1 β はJNK経路を活性化し、一酸化窒素(NO)発現を亢進させる

石川 智基¹⁾²⁾, Patricia L. Morris²⁾, 藤澤 正人¹⁾

1) 神戸大学大学院医学系研究科腎泌尿器科学分野

2) Center for Biomedical Research, The Population Council and The Rockefeller University

はじめに

精子形成過程は、精原細胞が体細胞分裂のち減数分裂を行い、第一精母細胞に分化し、さらに形態形成過程を経て精子に分化するという複雑な過程から成る。この過程のなかで、精巣内に存在する細胞間でさまざまな情報伝達が行われ、造精機能を保っていると考えられる。精巣内細胞間の機能調節には、視床下部—下垂体—精巣軸からの調節とは別に、精巣局所でのparacrine/autocrine機構が存在すると考えられ、精子形成までの分化機構は、支持細胞である体細胞のセルトリ細胞が非常に重要な役割を果たしている。この細胞からのエストラジオール、乳酸、トランスフェリンなどの分泌物は、精細胞の分化調節に影響を与える。それらの分泌物の産生調節には、インターロイキン(IL)を含むサイトカインや成長因子、バクテリアエンドトキシン(LPS)などが関与する。このうちIL-1 β はセルトリ細胞自身からも分泌されており、その分泌は、卵巣刺激ホルモン(FSH)による刺激、また精巣内の急性炎症が関与していることが分かっている。われわれはセルトリ細胞機能の調節には、このIL-1 β を介したautocrine機構も関与している可能性を報告した[1, 2]。さらにIL-1 β はテストステロン産生に重要なライディヒ細胞においても、一酸化窒素(Nitric Oxide: NO)の分泌に大きな影響を与えていることについてもすでに報告している[3]。IL-1 β に関してはさまざまな細胞において分泌物とその経路が解明されているが、精巣内において経路とその役割は未知の部分が多く、解明が急がれている。特に精巣炎などの急性炎症後の精子形成障害にはさまざまな説があることがこの理由として挙げられる。

近年、NOは勃起能をはじめ、生殖機能において深く

関わっていることは数多く報告されているが、精巣における具体的な機能については明らかでない部分が多い。NOは、血管拡張因子、神経伝達物質、殺菌あるいは殺腫瘍因子などとして多彩な役割が注目されているフリーラジカルであり、情報伝達物質である。そのNO合成酵素であるNitric Oxide Synthase (NOS)には3つのアイソフォーム(iNOS, eNOS, nNOS)が存在し、それぞれ異なったシグナル伝達系を介してその発現が調整されている。ヒト精巣においてもiNOSおよびeNOSがライディヒ細胞とセルトリ細胞において発現していることが認められている。われわれは男性不妊患者のセルトリ細胞におけるeNOSのpotential bioactivityについて組織免疫学的に示し、eNOSの発現が変性をきたした精細胞に強く発現していることから、eNOSとアポトーシスの関連性を報告している[4]。また、eNOS活性が精細胞のアポトーシスに関与していることをeNOSトランスジェニックマウスを用いた停留精巣モデルにて明らかにした[5]。さらに、諸家によりiNOSと精細胞のアポトーシスの関連性も報告されている。

神経細胞、軟骨細胞、マクロファージなど数多くの細胞においてもNOとアポトーシスとの関連が報告されており、精細胞においてもNOがアポトーシスに強く関与している可能性がある。このような結果は、NOならびにNOSが精巣機能に重要な関わりがあることを示唆している。

精細胞のアポトーシスに影響を与えとされるNOについては、われわれはセルトリ細胞やライディヒ細胞におけるNO産生が円形精子細胞からの分泌因子により増加する細胞間情報伝達機構を解明している[6]。さらに、NO自身の機能としてライディヒ細胞におけるテストステロン産生を抑制することも報告した。先に示したeNOSトランスジェニックマウスを用いた研究により、熱ストレスや酸化ストレスに関連する精子形成障害においてeNOSを制御することが有効な治療法になりうる可能性が示唆された[5]。

今回われわれは、精製分離したラットセルトリ細胞を

連絡先：石川智基、神戸大学大学院医学系研究科腎泌尿器科学分野

〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1

TEL: 078-382-6155

FAX: 078-382-6169

E-mail: iskwtmmt@med.kobe-u.ac.jp

用い、NOならびにNOSの発現について解析し、シグナル伝達の経路について検討を加えた。免疫応答のバランスが崩れることによる精巣内の障害を、酸化ストレスと活性酸素、活性窒素、フリーラジカルとの関与を通して、分子細胞、組織及び個体レベルで明らかにすることを主眼としている。本研究の最終的な目的は、精巣局所でのparacrine/autocrine機構の制御因子の1つとしてNOに注目し、IL-1 β によるセルトリ細胞の機能調節機構を解明することにより、造精機能障害に対する治療法確立を目指すことである。

リン酸化JNK, COX-2の活性化

The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) グループは重要な細胞内伝達分子であり、extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), そしてp38 MAPKが含まれる。さまざまな細胞においてNOのシグナリングにはこれらのキナーゼが関与していることが知られている。近年Petersonら[7]は増殖期である8日齢のラットセルトリ細胞においてIL-1 β がp38 MAPKを活性化させることを示した。また睪頭細胞、心筋細胞、精子やグリア細胞においてNOはCOX-2の活性化、アラキドン酸カスケードによるプロスタグランジンにより調節されることが示されている[8-11]。

われわれは18日齢SD雄ラットより精巣を摘出し、セルトリ細胞を精製分離、培養の後、3日目にIL-1 β (10 ng/ml)刺激を加えた。刺激されたセルトリ細胞より蛋白を抽出し、Western Blotting法を用いて分析した。セ

ルトリ細胞においてIL-1 β は30分以内にリン酸化JNKを活性化したが、同じMAP kinaseグループであるリン酸化p44/42-(ERK), リン酸化p38MAPKを活性化させなかった(図1A, B)。またリン酸化Akt, リン酸化JAK2なども活性化を示さなかった。同様に抗COX-2抗体を用い、Western Blottingを行ったところ、COX-2蛋白量はIL-1 β 刺激後1時間から有意な上昇を認め、6時間で50倍の増加を認めた(図1C, D)。しかしながらCOX-1は活性化を示さなかった。

JNKがCOX-2を誘導するか否かについて検討すべく、IL-1 β 刺激と同時にJNK活性阻害剤であるSP600125 (10 μ M)を添加し、比較を行った。SP600125はIL-1 β 刺激により増加したリン酸化JNKとCOX-2蛋白レベルを有意に阻害した(図2A, B)。

NOがprotectiveに働くか、それともdestructiveに働くかはNOとROSのバランスによることがさまざまな細胞において示唆されている[12]。

IL-1 β 刺激が活性酸素を増やすかを検討する目的にて、活性酸素のバランスをフローサイトメトリー法にて測定した。IL-1 β 刺激による活性酸素反応をIL-6刺激、そしてポジティブコントロールとしてH₂O₂刺激と比較した。さまざまな細胞においてIL-1 β は活性酸素を増加させることが報告されているが、セルトリ細胞においては増加しなかった。それどころか、活性酸素量に関して、逆に抗炎症の役割を示していることが示唆された。IL-6刺激にても活性酸素の量は増加しなかった(図2C)。

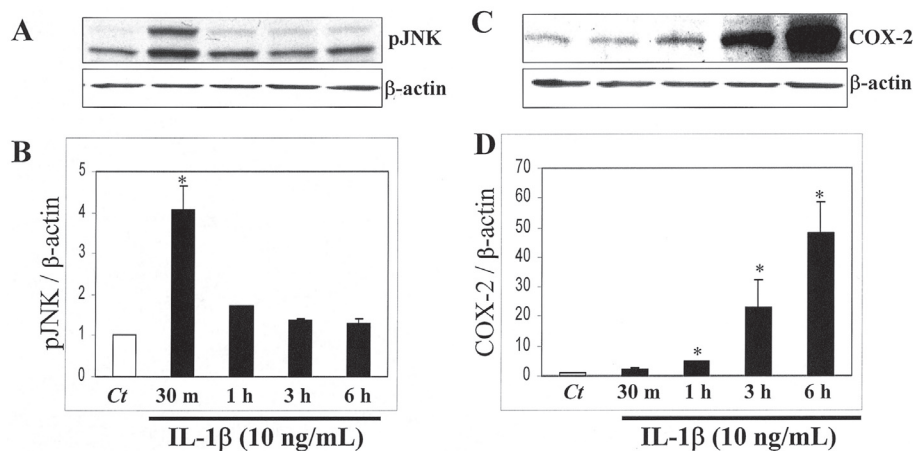


図1 (A) リン酸化JNK (phospho-JNK; 54- と46 kDa)の2つのバンドが30分以内に活性化している。(B) IL-1 β 刺激によりJNK経路が30分でコントロール群に比し4.1倍と有意に活性化が起こった。(C) COX-2蛋白量はIL-1 β 刺激後1時間から有意な上昇を認め、(D) 6時間で50倍の増加を認めた。(* $p < 0.05$)

セルトリ細胞におけるIL-1 β 刺激によるNO生成はJNK経路を介する

セルトリ細胞におけるIL-1 β 刺激によるNO生成を測定するために、セルトリ細胞培養液をGriess法により評価した。リン酸化JNKの活性化はIL-1 β 刺激後30分以内に起こり、この時間に一致して細胞内のNO濃度の有意な上昇がみられた(data not shown)。IL-1 β 刺激により、培養液内のNO濃度が24時間以内に8倍と増加を示し

た。NO生成と細胞外への分泌はCOX-2阻害剤であるNS-398(10 μ M)添加では阻害されなかったが、SP600125添加にて有意にNO濃度の上昇が阻害された。なおFSH, forskolinにてはNO生成の増加はみられなかった(図3)。セルトリ細胞は主に内分泌的にゴナドトロピンのFSHによる調節を受けているが、本実験系においてはFSHあるいはforskolin刺激にてiNOS, NO生成は増加しなかった。

JNKは細胞外からの刺激に対してc-Jun, AP-1, activating

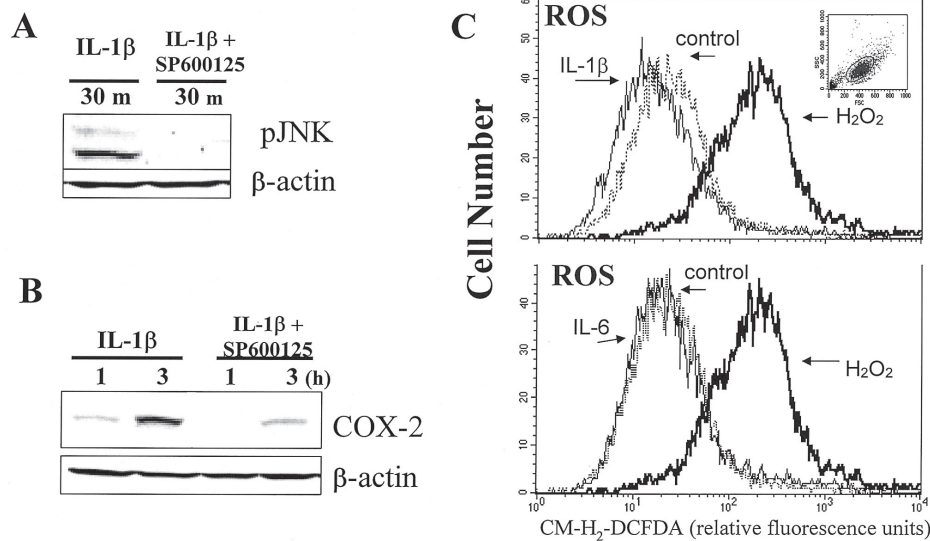


図2 SP600125はIL-1 β 刺激により増加したリン酸化JNK(A)とCOX-2蛋白レベル(B)を有意に阻害した。フローサイトメトリーを用いてIL-1 β 刺激による活性酸素反応をIL-6刺激、そしてポジティブコントロールとしてH₂O₂刺激と比較した。

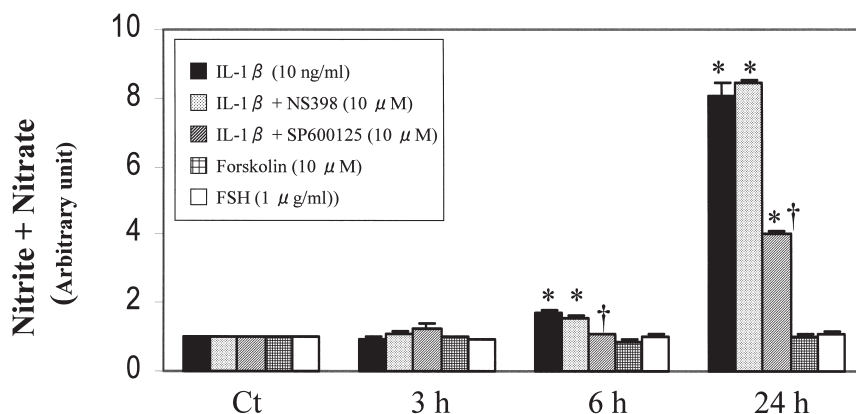


図3 セルトリ細胞におけるIL-1 β 刺激によるNO生成の評価。IL-1 β 刺激によりNO濃度が24時間以内に8倍と増加を示した。このNO濃度の上昇はNS-398添加では阻害されなかったが、SP600125添加にて阻害された。なおFSH, ForskolinにてはNO生成の増加はみられなかった。(* p < 0.05, Ctに比し) († p < 0.05, IL-1 β 刺激に比し)

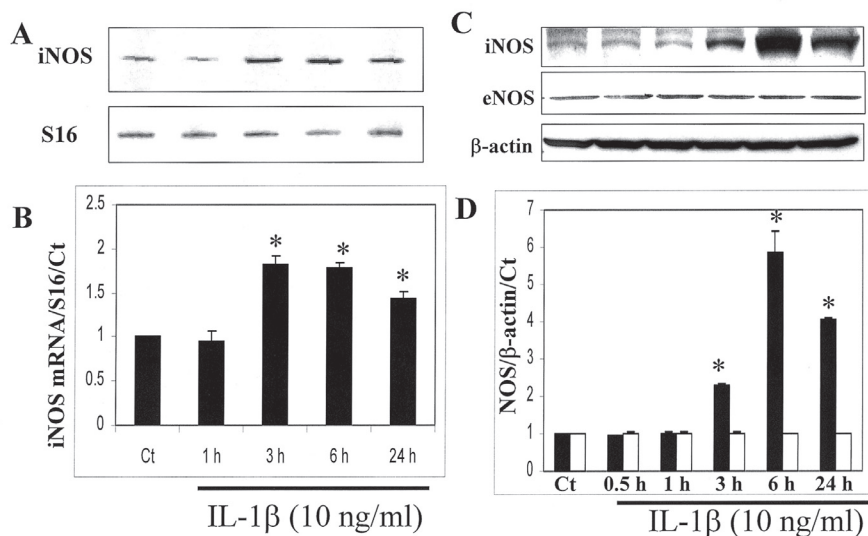


図4 IL-1 β 刺激によるiNOS mRNAレベルの変化をRT-PCR法にて定量した(A, B). iNOS, eNOSの蛋白量の変化をWestern blotting法にて定量した(C, D). (* $p<0.05$)

transcription factor-2 (ATF-2), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)やhistone modificationsなど数多くのtranscription factorを活性化する [13-17]. IL-1 β 刺激はNF- κ BとDNA結合を調節することが分かっている. 最近のtransformed and transfected immortalized cell linesにおいて, NF- κ B p65サブユニットのチロシンニトロ化がactivityをおさえることが証明され [18], 肺上皮細胞やJurkat細胞において, サイトカインによるNF- κ Bの調節はニトロ化を介して行われ, これによりNO濃度が調節されていることが報告されている [19]. これらの調節機構は細胞特異的であると考えられ, セルトリ細胞においてはいまだにはっきりと解明されておらず, さらなる検討が必要であると考えられる.

セルトリ細胞においてIL-1 β 刺激によりiNOS発現が亢進する

正常な状態において精巣内にiNOSは発現しており, このことはNOが生理的に産生されていることを示している. 精子形成における複雑な過程において, iNOS活性化によるNO産生はサイトカインやgrowth factorの生成, 伝達に影響を及ぼしていることが示唆されている [20]. 精細管内においてLPSによる精細胞の損傷, アポトーシスに伴いiNOSとNO発現レベルの上昇が認められている [12, 21].

われわれの実験において, セルトリ細胞においてIL-1 β 刺激によりNO濃度の増加がみられたが, IL-1 β 刺激によるiNOS mRNAレベルの変化をRT-PCR法, iNOS,

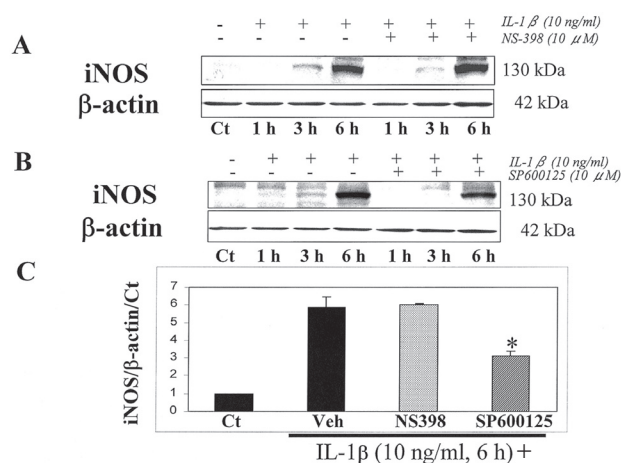


図5 iNOS蛋白量の増加はNS-398添加では阻害されなかったが(A), SP600125添加にて有意に上昇が阻害された(B). (* $p<0.05$)

eNOSの蛋白量の変化をWestern blotting法にて定量した. IL-1 β 刺激によりiNOS蛋白, mRNA量は有意に増加したが, eNOSに関して増加はみられなかった(図4). iNOS蛋白量の増加はNS-398添加では阻害されなかったが, SP600125添加にて有意に上昇が阻害された(図5).

まとめ

セルトリ細胞においてIL-1 β 刺激はJNK経路を介してiNOS発現を亢進させ, NOを生成する. これらの経路の概念は精巣内病態における新たな治療戦略上において重要な一部であり, セルトリ細胞におけるサイトカイン制御機構の解明は将来的に精子形成障害の治療に貴重な情

報を与えることが期待される。

文 献

1. Ishikawa T, Hwang K, Lazzarino D, Morris PL (2005) Sertoli cell expression of steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer 1 and 5 domain-containing proteins and sterol regulatory element binding protein-1 are interleukin-1 β regulated by activation of c-Jun N-Terminal kinase and cyclooxygenase-2 and cytokine induction. *Endocrinology* 146, 5100-5111.
2. Ishikawa T, Morris PL (2006) A multi-step kinase-based Sertoli cell autocrine-amplifying loop regulates prostaglandins (PG), their receptors, and cytokines *Endocrinology* 147, 1706-1716.
3. Tatsumi N, Fujisawa M, Kanzaki M, Okuda Y, Okada H, Arakawa S, Kamidono S (1997) Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells. *Endocrinology* 138, 994-998.
4. Fujisawa M, Yamanaka K, Tanaka H, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S (2001) Expression of endothelial nitric oxide synthase in the Sertoli cells of men with infertility of various causes. *BJU Int* 87, 85-88.
5. Ishikawa T, Kondo Y, Goda K, Fujisawa M (2005) Overexpression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Transgenic Mice Accelerates Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Experimental Cryptorchidism. *J Androl* 26, 281-288.
6. Fujisawa M, Tatsumi N, Fujioka H, Kanzaki M, Okuda Y, Arakawa S, Kamidono S (2000) Nitric oxide production of rat Leydig and Sertoli cells is stimulated by round spermatid factor(s). *Mol Cell Endocrinol* 160, 99-105.
7. Petersen C, Svechnikov K, Froya B, Soder O (2005) The p38 MAPK pathway mediates interleukin-1-induced Sertoli cell proliferation. *Cytokine* 32, 51-59.
8. Corbett JA, Kwon G, Turk J, McDaniel ML (1993) IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry* 32, 13767-13770.
9. Herrero MB, Franchi AM, Gimeno MA (1995) Mouse spermatozoa can synthesize PGE2 and 5-HETE in vitro: stimulatory action of nitric oxide. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 53, 347-350.
10. Goodwin DC, Gunther MR, Hsi LC, Crews BC, Eling TE, Mason RP, Marnett LJ (1998) Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385. *J Biol Chem* 273, 8903-8909.
11. LaPointe MC, Isenovic E (1999) Interleukin-1 β regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* 33, 276-282.
12. O'Bryan MK, Schlatt S, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP (2000) Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology* 141, 238-246.
13. Bonizzi G, Piette J, Merville MP, Bours V (1997) Distinct signal transduction pathways mediate nuclear factor-kappaB induction by IL-1 β in epithelial and lymphoid cells. *J Immunol* 159, 5264-5272.
14. Bleich D, Chen S, Wen Y, Nadler JL (1997) The stress-activated c-Jun protein kinase (JNK) is stimulated by lipoxygenase pathway product 12-HETE in RIN m5F cells. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 448-451.
15. Madamanchi NR, Bukoski RD, Runge MS, Rao GN (1998) Arachidonic acid activates Jun N-terminal kinase in vascular smooth muscle cells. *Oncogene* 16, 417-422.
16. Whitmarsh AJ, Yang SH, Su MS, Sharrocks AD, Davis RJ (1997) Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol* 17, 2360-2371.
17. Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320, 3-21.
18. Park SW, Huq MD, Hu X, Wei LN (2005) Tyrosine nitration on p65: a novel mechanism to rapidly inactivate nuclear factor-kappaB. *Mol Cell Proteomics* 4, 300-309.
19. Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM (2004) Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8945-8950.
20. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N (1998) Spermatogenesis. *Hum Reprod* 1, 1-8.
21. O'Bryan MK, Gerdprasert O, Nikolic-Paterson DJ, Meinhardt A, Muir JA, Foulds LM, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP (2005) Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal localized suppression of inflammatory responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1744-1755.