

精巣 Leydig 細胞の熱ショック応答因子 (HSF1) を介する ストレス応答機構

岡 真太郎, 白石 晃司

山口大学大学院 医学系研究科 泌尿器科学講座

緒言

テストステロンは、精巣間質組織に存在する Leydig 細胞でコレステロールを原料として合成され、二次性徴の発達、筋肉の増強、骨密度の維持など、多くの生理的プロセスに寄与している。テストステロンは、精巣間質組織に存在する Leydig 細胞でコレステロールを原料として合成される。テストステロン合成の律速段階は、コレステロール輸送タンパク質 steroidogenic acute regulatory protein (StAR) を介するミトコンドリア内膜へのコレステロールの取り込みである。StAR の遺伝子発現は下垂体から分泌される Luteinizing hormone (LH) によって調節される。精巣は体温よりも低い温度で最適に機能する臓器であり、入浴やサウナ浴等による外部環境からの熱ストレスを受けやすい臓器である。熱ストレスは造精機能に影響を与えるのみならず、テストステロン合成過程にも影響が及ぶことが知られている。ステロイド合成過程においては、StAR の合成障害を引き起こし、テストステロン合成を低下させることが報告されている^{1,2)}。テストステロンを安定して合成するために熱ストレス応答機構が必要と考えられるが、ステロイド産生細胞における熱ストレス応答機構に関する報告は少ない。以上のことから、われわれは Leydig 細胞の熱ストレス応答機構に着目して研究を開始した。

熱ストレス応答は、生物が高温環境に晒された際に発現する細胞レベルでの防御機構である。熱ストレス応答は、生物が熱ストレスに適応し生存を確保する上で不可欠な要素である。熱ストレス応答によって、細胞は熱ショックタンパク質を自ら作り出し、タンパク質の損傷を修復し、細胞内の恒常性を維持している。その中心的な役割を、熱ショック応答因子 1 (heat shock transcription factor 1; HSF1) が担っている³⁾。われわれは、Ley-

dig 細胞の熱ストレス応答機構を解明するために HSF1 とステロイド合成の関連を調べた。HSF1 ノックアウトマウスを用いて、停留精巣による熱ストレス下でのテストステロン合成への影響を分析した⁴⁾。また HSF1 をノックアウトした Leydig 細胞株 (MA-10) を用いて細胞レベルでの機能解析を行った。

停留精巣モデルを用いたテストステロン産生における HSF1 の役割

H.E.染色により、停留精巣モデルマウスの Leydig 細胞と精子形成細胞の形態変化を評価した。それぞれのコントロールと比較して、wild type (WT) マウスと HSF1 ノックアウト (KO) マウスの精子形成細胞は減少傾向となった。HSF1 KO マウスでは WT マウスと比較して精子形成細胞の減少がさらに進み、精子形成がより早期に抑制された。これらの形態変化は、停留精巣モデルが精巣組織に慢性的な熱ストレスを誘発し、精子形成に影響を与えたことを示している。その一方で、WT マウスと HSF1 KO マウスの Leydig 細胞を比較したところ、細胞数は減少せず、個々の細胞形態変化は認められなかった。Leydig 細胞のステロイド産生能を評価するために、ELISA 法を用いて血清テストステロン値を測定した (図 1 A)。テストステロンの測定を行う 3 時間前にマウスに hCG を投与し、テストステロン産生を誘導した。WT マウスと HSF1 KO マウスの基礎テストステロン値に有意差は認められなかった。停留精巣モデルにおいては、HSF1 KO マウスの血清テストステロン値のみが有意に減少した。これらの結果から、HSF1 を欠損した Leydig 細胞は熱ストレス条件下でステロイド合成能を維持できないことが示された。

停留精巣モデルマウスのステロイド合成酵素の発現変化を、Western blotting 法を用いて解析した。コレステロール輸送タンパク質である StAR の発現量が著明に変化した (図 1 B)。停留精巣モデルを作成して 1 週間後には、WT マウスおよび HSF1 KO マウスの StAR はコントロール群に比べて有意に低下した。2 週間を経て比較

連絡先: 岡真太郎 山口大学大学院医学系研究科泌尿器科学講座

〒755-8505 山口県宇部市南小串 1 丁目 1 番 1 号

TEL : 0836-22-2275

FAX : 0836-22-2276

E-mail : s-oka@yamaguchi-u.ac.jp

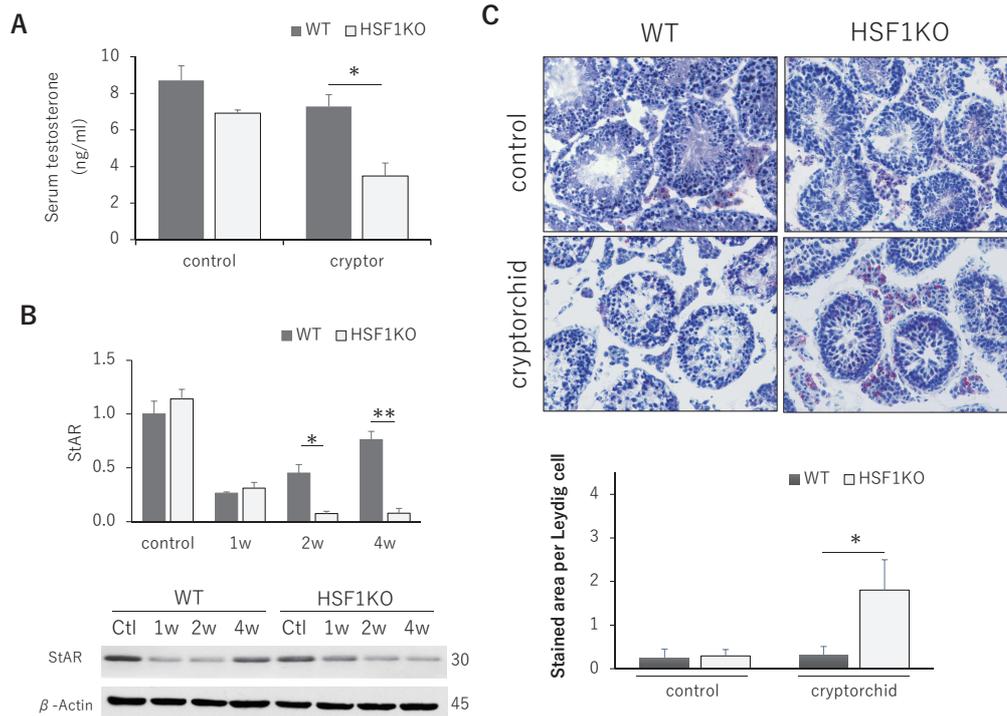


図1 停留精巣モデルにおける StAR の発現変化

すると、WT マウスと HSF1KO マウスの StAR の発現量に差があり、WT マウスの StAR 合成はコントロール群と同等まで改善するが、HSF1KO マウスの StAR は継続的に減少し続け、コントロール群の10%まで低下した。非ストレス下においては、WT マウスと HSF1KO マウス間で StAR の基礎発現量は同等であり、非ストレス下での StAR の安定性に HSF1 は必須ではなかった。熱ストレスモデルによって StAR の転写が抑制されているかを確認するために、リアルタイム PCR 法を用いて mRNA を評価した。WT マウスと HSF1KO マウスの StAR mRNA は1週間でコントロールに比べて約40%減少したが、停留精巣モデル作成2週間後には正常化していた。これらの結果から、停留精巣による転写への影響は限定的であり、HSF1KO マウスでは StAR の翻訳過程または翻訳後修飾が阻害されていることを示している。他のステロイド生成酵素を WT と HSF1KO マウスで比較したが、CYP11A1, 3β-HSD, CYP17A1, 17β-HSD の発現に変化は認められなかった。

オイルレッド O 染色を用いて、Leydig 細胞のコレステロール滴を可視化し、細胞内のコレステロール含有量を比較検討した (図 1C)。コントロールでは、WT マウスと HSF1KO マウス間で脂質滴の含有量に差は認められなかった。HSF1KO マウスは、熱ストレス下において細胞質内のコレステロール含有量が有意に増加して

いた。HSF1KO マウスで観察されたコレステロールの過剰な蓄積は、慢性熱ストレス条件下における StAR の合成異常によるコレステロール輸送障害が原因となり引き起こされたことを示唆する結果であった。

MA-10細胞を用いたステロイド産生と熱ショックタンパク質の発現解析

MA-10細胞は、マウスの精巣から樹立された Leydig 細胞株であり、ステロイド合成能を有する細胞である。MA-10細胞は、StAR を介するコレステロール輸送能を有しており、その最終産物はプロゲステロンとされる。CRISPR/Cas9 法を用いて、マウス HSF1 遺伝子を欠損させた細胞を作成し、2個のクローンを獲得した。細胞を42度に加温した温浴槽内で1時間加温し、6-12時間のリカバリー期間を設けたのち、細胞と培養液を回収した。細胞と培養液を回収する3時間前に1mM cAMP を添加した。Western Blotting 法を用いて StAR, CYP11A1 および 3β-HSD の発現を確認し、ELISA 法を用いて培養液中のプロゲステロン濃度を測定した。WT 細胞および HSF1KO 細胞におけるプロゲステロン合成量を比較した (図 2A)。非ストレス条件下では、WT 細胞と HSF1KO 細胞のプロゲステロン合成量に差は認められなかったが、熱ストレスを加えた後に比較したところ、

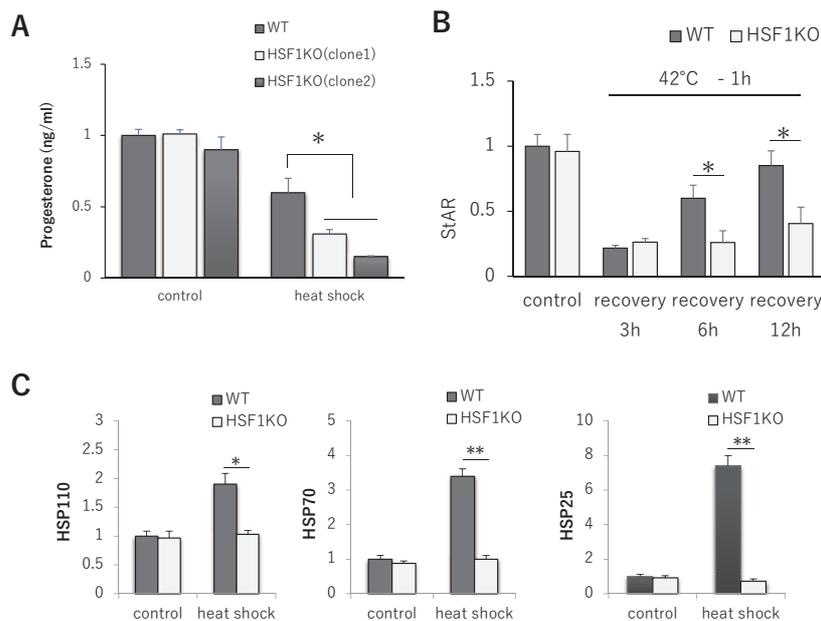


図2 MA-10細胞における StAR と熱ショックタンパク質の変化

WT細胞に比べて HSF1KO細胞 (クローン1) と HSF1KO細胞 (クローン2) のプロゲステロン合成量は有意に減少した (図2A)。WT細胞および HSF1KO細胞における StARの基礎発現量は同等であった。HSF1KO細胞における StARの発現量は、熱ストレスを加えることにより WT細胞と比較して有意に減少した (図2B)。リカバリー時間を設けて StARの発現を比較したところ、WT細胞においては、StARの発現量は6時間後から改善され、12時間後にはコントロールと同じレベルに達した。一方、HSF1KO細胞の StARの発現は12時間まで改善されず、WT細胞よりも有意に低かった。StARの mRNAは、熱ストレス処理直後に WT細胞および HSF1KO細胞で低下し、6時間以降はいずれの細胞もコントロールレベルに改善した。これらの結果は、HSF1KOマウスを用いた解析と同様の結果であった。これらの結果は、HSF1欠損による StARの合成障害がステロイド合成に関連し、熱ストレス応答とステロイド合成の関与を示唆する結果である。

続いて、WT細胞と HSF1KO細胞の熱ショックタンパク質 (heat shock protein; HSP) の発現量を比較した。本研究では、HSP110, HSP70, mitochondria HSP70, HSP60, HSP25を検討対象とした。いずれの熱ショックタンパク質も、定常発現量は同等であった。42度の熱ストレスを加え6時間のリカバリー時間を設けて発現変化を確認したところ、WT細胞では HSP110, HSP70および HSP25が増加した (図2C)。HSF1KO細胞においては、HSP110, HSP70, HSP25の発現量は変化しなかつ

た。以上の結果から、HSP110, HSP70, HSP25と StAR合成の関連を検討した。

HSF1はミトコンドリア膜電位障害を改善し StAR合成を維持

ステロイド合成の初期段階においてミトコンドリアが不可欠であり、その機能不全は StARの翻訳後調節に影響を与えることが知られている⁵⁾。MA-10細胞における HSF1欠損とミトコンドリア機能の関連を確認するために、mitochondrial membrane potential (MMP), ATP合成、およびミトコンドリア形態異常を評価した。MMPと ATP合成は、42°Cの熱ショック処理から12時間のリカバリー期間を設けて評価した。JC-1染色を用いて、MMPの評価を行った。低MMPでは緑色蛍光を示すモノマーとして存在し、高MMPでは赤色蛍光を示すポリマーとして存在するため、赤/緑の蛍光強度比の減少はMMPの低下を示す。熱ストレス条件下において、HSF1KO細胞はWT細胞に比べてMMPが有意に減少していた (図3A)。また、熱ストレスは HSF1KO細胞の ATP合成を減少させた (図3B)。これらの結果は、HSF1を欠損させると MA-10細胞のミトコンドリア機能障害が誘発されることを示している。MitoBright LT Red染色を用いてミトコンドリアの形態を確認した。非ストレス条件下において、WT細胞と HSF1KO細胞のミトコンドリアは線維状であったのに対し、熱ストレス条件下では HSF1KO細胞において断片化したミトコンドリアの

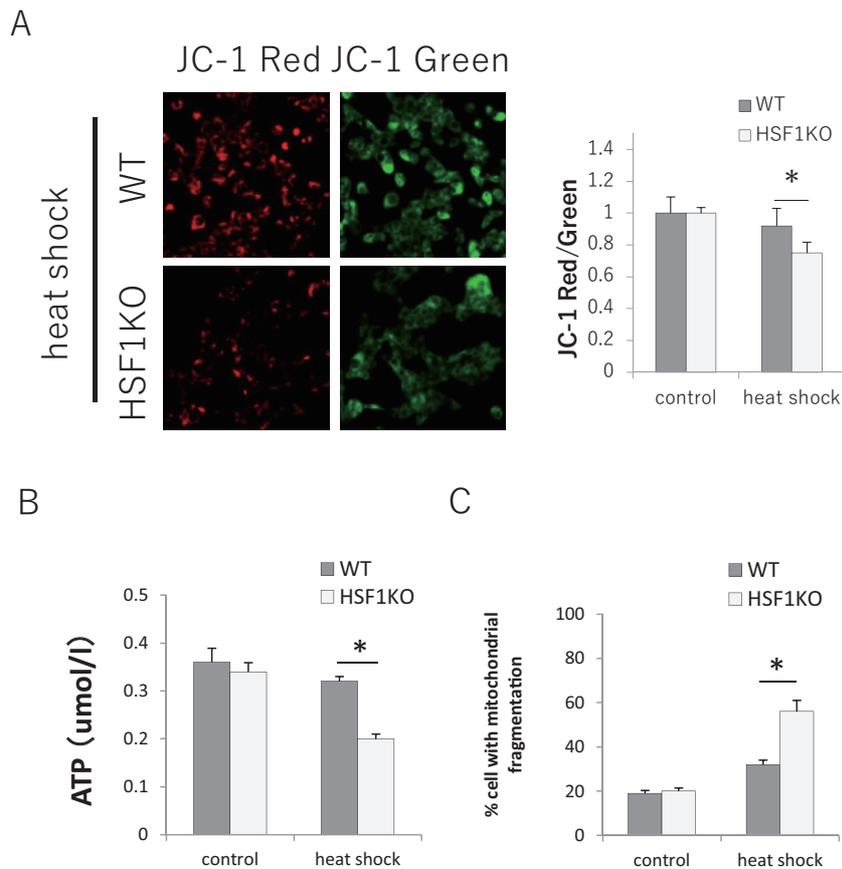


図3 MA-10細胞の熱ストレスによるミトコンドリア機能異常

数が増加していた (図 3 C)。

ミトコンドリア膜電位障害を誘発するため, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) を添加した培養液で細胞を 3 時間培養し, 12 時間のリカバリー時間を設けて細胞を回収した。CCCP 添加により, いずれの細胞も JC1 染色で MMP 低下が確認された。12 時間のリカバリー時間を設けて MMP を比較したところ, WT 細胞では MMP は正常化していたが, HSF1KO 細胞では WT と比べて優位に MMP が低下していた。以上のことから, HSF1 はミトコンドリア膜電位の安定化に関与することが示された。CCCP 添加後に熱ショックタンパク質の変化を調べたところ, HSP25 が強く誘導されていた。以上の結果から, MA-10 細胞のミトコンドリア膜電位の安定化に HSP25 が主に関与することが示唆された。

HSP25 の StAR 合成への関与

熱ストレスに対して HSP25 がミトコンドリア膜電位を安定化させるか確認するため, HSP25 に対する siRNA を使用して MA-10 細胞の HSP25 をノックダウンした。

HSP25KD 細胞では, 熱ストレスを加えても HSP25 の発現量は増加せず, HSP25 の発現量は HSF1KO 細胞と同様であった。HSP25KD 細胞における StAR の合成は熱ストレスによって減少した (図 4 A)。また熱ストレスを受けた HSP25KD 細胞における MMP および ATP レベルも, HSF1KO 細胞と同様に減少していた。続いて, HSF1KO 細胞にマウス HSP25 を遺伝子導入して, HSP25 を過剰発現させた細胞を作成した。HSP25 を過剰発現させた細胞では, HSF1KO 細胞と比較して, 熱ストレスを加えた 6 時間後からの StAR 発現量が増加した (図 4 B)。これらの結果は, MA-10 細胞において熱ストレス条件下でのミトコンドリア機能の安定化および StAR 合成の維持に HSP25 が重要な役割を担うことを示している。

まとめ

HSF1 が熱ストレスからミトコンドリア機能を保護し, ミトコンドリア膜電位を安定化させることにより StAR 合成を補助することが示された。またその中心的な役割を HSP25 が担っていた (図 4 C)。これはステロ

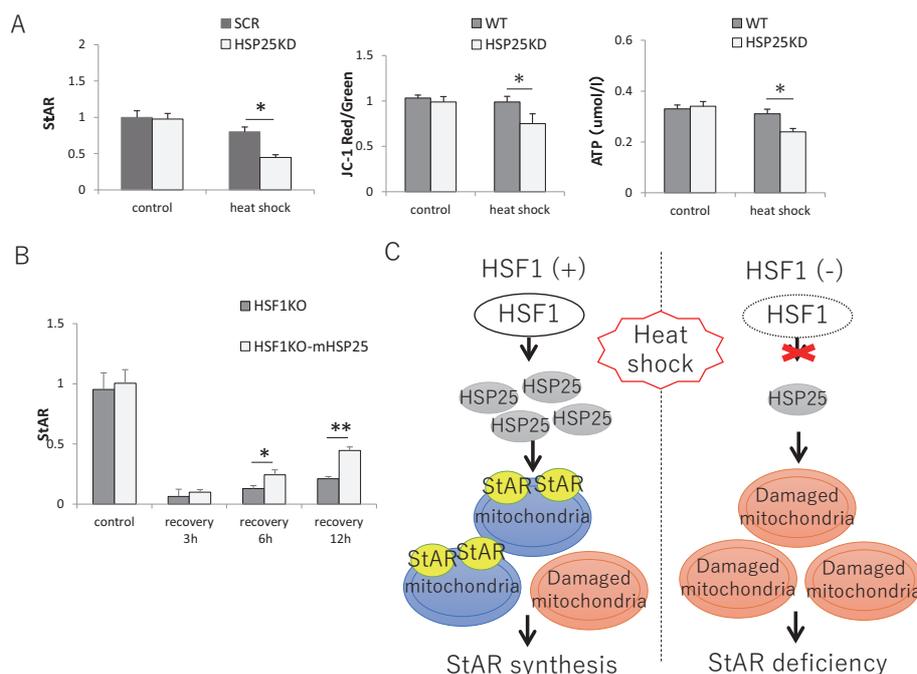


図4 StAR合成におけるHSP25の役割

イド産生細胞における HSF1 および HSP25 を介した熱ストレス応答のメカニズムを解明する新しい知見である。ミトコンドリアの形態変化は、熱ストレスがミトコンドリアの融合と分裂のバランスを崩すことを示している。しかし、マイトファジーを含めたミトコンドリア構造の制御における HSF1 の役割はまだ不明であり、ミトコンドリアの保護メカニズムを示すさらなる研究が必要である。これらの知見はステロイド産生細胞における HSF1 の新しい機能を示し、ステロイド産生細胞のストレス応答の新しい機能を示すものである。

引用文献

1. Liu Z, Stocco DM (1973) Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with in-

hibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 138, 2722-2728.

2. Murphy BD, Lalli E, Walsh LP, Liu Z, Soh J, Stocco DM, Sassone-Corsi P (2001) Heat shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Endocrinol* 15, 1255-1263.

3. Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ (2018) Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 14-19.

4. Oka S, Shiraishi K, Fujimoto M, Katiyar A, Takii R, Nakai A, Matsuyama H (2017) Role of Heat Shock Factor 1 in Conserving Cholesterol Transportation in Leydig Cell Steroidogenesis via Steroidogenic Acute Regulatory Protein. *Endocrinology* 158, 2648-2658.

5. Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, Hales KH, Hales DB (2006) Energized, polarized, and actively respiring mitochondria are required for acute Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 147, 3924-3935.