

5. 精巣男性ホルモン産生細胞におけるアポトーシスへのエンドトキシン及び IL-18 の関与

井上 岳人^{1,2)}, 石川 倫子¹⁾, 植村弥希子²⁾, 山下 勇人²⁾, 古賀 由華²⁾
 宇佐美 眞²⁾, 小谷 穰治¹⁾

¹⁾兵庫医科大学救急・災害医学講座

²⁾神戸大学大学院保健学研究科病態解析学領域

はじめに

Post-intensive care syndrome は ICU での集中治療後、呼吸障害や神経筋障害、運動機能障害などの身体的障害や認知機能のみならず精神的障害も生じる可能性があるが^{1,2)}、重症病態治療後の生殖機能および性腺機能に対する影響はほとんど報告されていない。重症感染症である敗血症に注目すると男性敗血症患者の約 20% を生殖適齢期を含む 18 から 45 歳が占めているため³⁾、重症感染症後の性腺機能を調べることは重症病態後の QOL の観点からも重要と考えられる。男性生殖器への病原菌の感染や炎症は精子の機能不全や形成不全を引き起こし、男性不妊の原因となっており⁴⁾、実際に、エンドトキシンで誘起された全身性炎症下では精巣でのステロイドホルモンの合成や精子形成が阻害されることが報告されている⁵⁾。われわれはエンドトキシンに起因する急性炎症期では内因性 interleukin (IL)-18 が精巣生殖細胞のアポトーシスを誘導するものの、急性炎症後の回復期では内因性 IL-18 が抑止に作用し、炎症のステージに依存しアポトーシスを調整している

可能性を見出し⁶⁾、IL-18 が新たな急性炎症下での精巣炎治療ターゲットとなる可能性を示してきた。また、この結果は急性炎症時の体内の IL-18 の動態をコントロールすることにより、炎症に伴う生殖細胞のアポトーシスを未然に防ぎ、男性不妊の一因である乏精子症や無精子症となるリスクを回避できる可能性を示した重要な知見である。しかし、精巣内の各細胞（ライディッヒ細胞やセルトリ細胞）と IL-18 との関連を明らかにすることはできておらず、これらの関係性を示すことは IL-18 を急性炎症下での精巣炎治療ターゲットとする上で重要であると考えられる。

1. 精巣における IL-18

精巣は精子形成が行われる精細管とその間の間質から構成され、精細管内には生殖細胞とセルトリ細胞が、間質には男性ホルモンを産生するライディッヒ細胞が存在する⁷⁾ (図 1)。精子形成や精巣の恒常性の維持にはセルトリ細胞やライディッヒ細胞が重要な役割を担っているが⁷⁾、炎症性サイトカインである IL-18 は精巣の恒常性の維持に関与している可能性が報告されており、

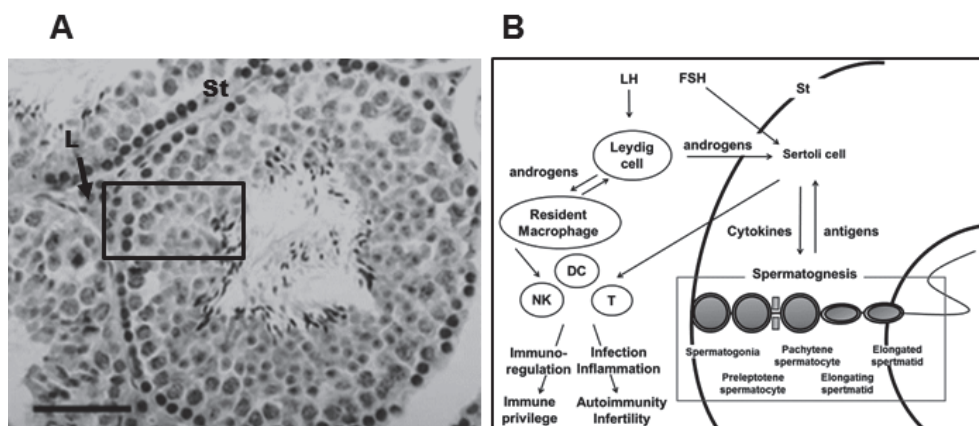


図 1 精巣切片および精巣における immuno communication

A : 精巣切片。L : ライディッヒ細胞, St : 精細管, スケール : 50 μm 。

B : 精巣における immuno communication (参考文献²⁰⁾図より一部改変)。St : 精細管, DC : dendritic cell, NK : natural killer cell

精巣内では恒常的に生殖細胞，ライディッヒ細胞や常在型マクロファージなどで産生される⁸⁻¹¹。また，LPS (lipopolysaccharide) に起因するマウス全身性炎症下の精巣では，LPS 濃度依存的に IL-18 の発現が増加することが報告されている^{12,13}。しかし，われわれの既報⁶を含め IL-18 の生殖細胞以外の精巣を構成する細胞，つまりライディッヒ細胞やセルトリ細胞への役割は明らかではない。本稿では精巣男性ホルモン産生細胞であるライディッヒ細胞のアポトーシスに対するエンドトキシンの影響ならびに IL-18 との関係について概説する。

2. 炎症刺激下でのライディッヒ細胞

マウスライディッヒ細胞は LPS 刺激に対して toll-like receptor 4 を介し，炎症反応が惹起される¹⁴。われわれはマウスライディッヒ細胞由来 TM3 細胞を LPS で刺激し経時的に解析した。LPS 刺激後 1 時間にてライディッヒ細胞の tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA および IL-6 mRNA の発現は一過性に上昇し

た。一方で，IL-18 タンパクの発現は非刺激群，LPS 刺激群に差はなく，両群ともに刺激後も増加は認められなかった。したがって，ライディッヒ細胞では炎症時に積極的に IL-18 を分泌する機能は無いと考えられた。そこで，ライディッヒ細胞以外の細胞から炎症時に産生される IL-18 がアポトーシスに及ぼす影響を検討することとし，最初に LPS 刺激におけるライディッヒ細胞のアポトーシス経路を確認した。アポトーシス経路には主に death receptor (DR) 経路と mitochondria (Mt) 経路が存在し¹⁵，われわれの先行研究⁶より DR 経路に焦点をあてた。DR 経路では，TNFR1 や Fas などの DR とそのリガンド (L) の活性を介し，アポトーシスが誘起される。DR のアダプター分子として Fas-associated protein with death domain (FADD) が存在し¹⁷，FADD の DD と TNFR1 や Fas の相互作用により caspase-8 を活性化し，caspase-3 依存的なアポトーシスを誘導する^{15,16}。われわれの結果では，ライディッヒ細胞の cleaved caspase-3 の発現は LPS 濃度に関係なく刺激 6 時間で発現が確認でき，12 時間以降，発現

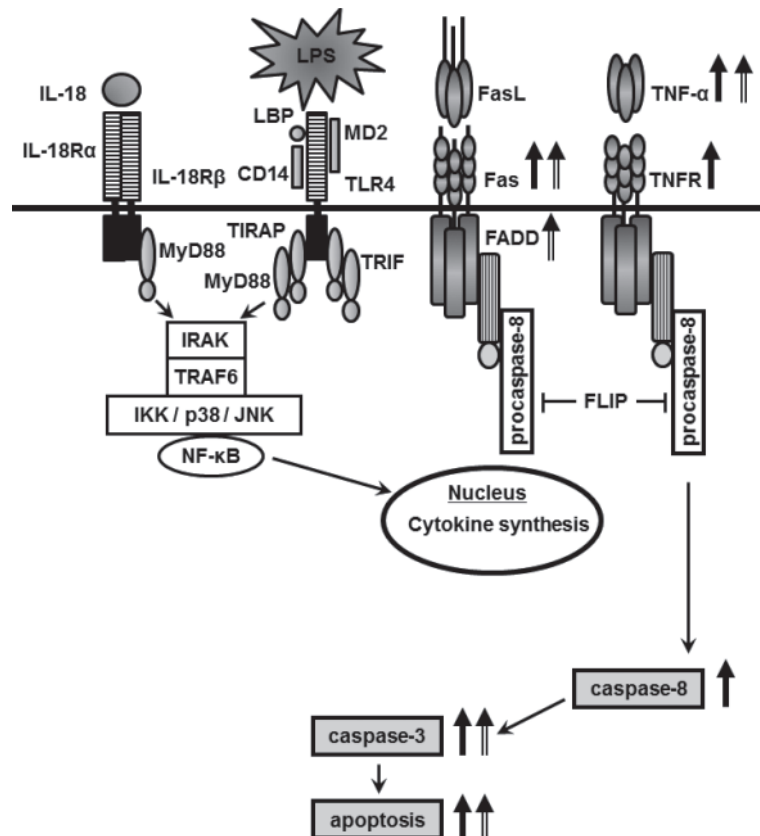


図 2 LPS 刺激ならびに recombinant IL-18 刺激による death receptor 経路関連遺伝子・タンパクの発現量
ライディッヒ細胞由来 TM3 細胞に LPS もしくは recombinant IL-18 で刺激し解析した。
➡: LPS 刺激により発現増加, ⇒: recombinant IL-18 刺激により発現増加。(参考文献¹⁹より一部改変)

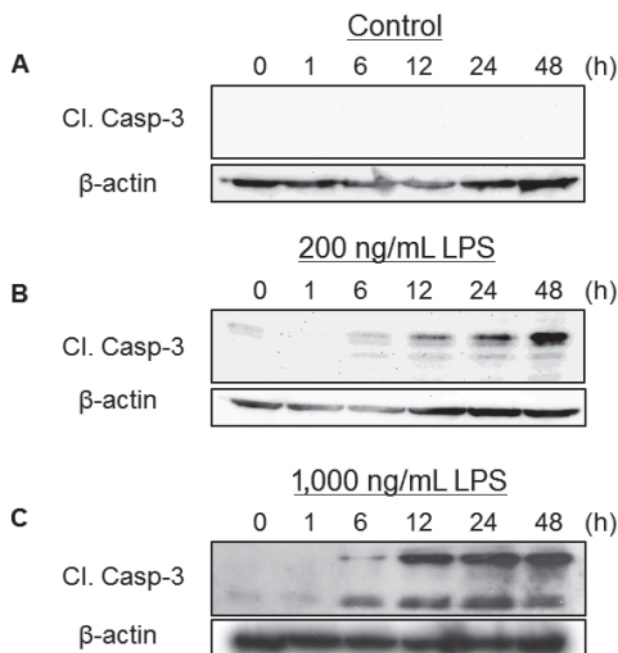


図3 LPS刺激によるマウスライディッヒ細胞 cleaved caspase-3の発現

LPS刺激濃度にかかわらず刺激6時間後でライディッヒ細胞のアポトーシスが確認でき、12時間以降発現が増強した。

A：LPS非刺激（control群）。B：200 ng/mL LPS刺激群。C：1,000 ng/mL LPS刺激群。Cl. Casp：cleaved caspase

が増加しアポトーシスが誘導された。DR経路関連因子の発現はLPS刺激12時間後TNFR1 mRNA, Fas mRNA および cleaved caspase-8の発現が増加した。FasL mRNA, FADD mRNAは非刺激群と差はなかった。したがって、LPS刺激によりFas, TNF- α , TNFR1, cleaved caspase-8の発現が増加し、caspase-3を活性化しライディッヒ細胞のアポトーシスが誘導された可能性が示唆された（図2, 3）。以上より、LPSによるライディッヒ細胞アポトーシスにはDR経路の関与が示唆されたが、Zhouらの研究¹⁷⁾にてLPS刺激によりラットライディッヒ細胞がMt経路を介しアポトーシスが誘導されることが報告されており、LPSに対するライディッヒ細胞のアポトーシスはDR経路だけでなくMt経路でも調節されていると考えられる。また、ライディッヒ細胞の主な役割であるステロイドホルモン（テストステロン）合成はsteroidogenic acute regulatory protein (StAR)により調整されている。StARは、ステロイドホルモン合成の律速段階にあたるコレステロールのMt外膜から内膜への移行に関与する因子であり、StARの発現が誘導され、ステロイドホルモンの合成・分泌が促進される¹⁸⁾。われわれの結果では炎症刺激下でのライディッヒ細胞StARの発現はcleaved caspase-3の発現が増加する12時間以降で

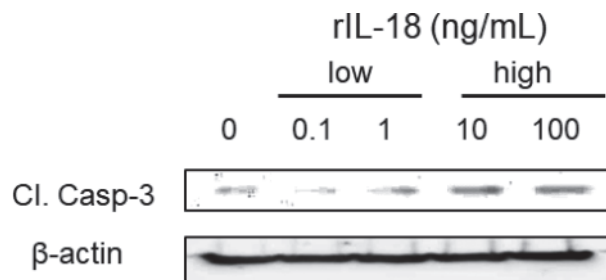


図4 recombinant IL-18刺激によるマウスライディッヒ細胞 cleaved caspase-3の発現

recombinant IL-18刺激12時間後、高濃度のIL-18刺激によりライディッヒ細胞のアポトーシスが誘導された。Cl. Casp：cleaved caspase

低下していた。したがって、炎症刺激下においてライディッヒ細胞のアポトーシスが生じステロイドホルモンの産生能が低下している可能性が示唆された。

3. ライディッヒ細胞とIL-18刺激

次に、急性炎症下における精巣でのIL-18の増加は炎症刺激後、精巣内に浸潤するマクロファージなど^{6,19)}の炎症性細胞に由来するものと考えられるため、ライディッヒ細胞に対する免疫細胞由来IL-18の影響を検討した。ライディッヒ細胞(TM3細胞)を低濃度(0.1および1 ng/mL)ならびに高濃度(10および100 ng/mL)のrecombinant IL (rIL)-18で12時間刺激し、その影響を解析した。高濃度のrIL-18はライディッヒ細胞のDR経路関連因子のFas mRNA, TNF- α mRNA, FADD mRNAの発現を増加させ、cleaved caspase-3の発現を活性化し、アポトーシスを誘起した(図2, 4)。同時に高濃度のrIL-18刺激によってライディッヒ細胞のStARの発現が低下することが明らかとなった。以上のことより、急性炎症下における精巣内の過剰なIL-18は生殖細胞のアポトーシス⁶⁾と同様に精巣の間質細胞に対してもアポトーシスを誘導し、ステロイドホルモン合成を低下させるのではないかと考えられた。

おわりに

LPSおよび高濃度のIL-18は男性ホルモン産生細胞であるライディッヒ細胞に対し、DR経路を活性化しアポトーシスを誘導した。われわれの既報⁶⁾では感染後、浸潤した免疫細胞から産生される過剰なIL-18により生殖細胞のアポトーシスが増加する可能性を示したが、本研究では、同時に過剰なIL-18がライディッヒ細胞のアポトーシスも誘起する可能性が示唆された。このことより精巣に浸潤する免疫細胞由来の過剰なIL-18を抑制することは全身性炎症下に起因する精巣炎の新たな治療ターゲットになりうるのではないかと考えている。つまり、急性炎症時の体内のIL-18の動態をモ

ニタリングすることで、生殖機能不全ならびに性腺機能不全のリスクを回避するための治療方針を決定する重要なツールとなる可能性がある。ゆえに、高度生殖医療や重症病態後の QOL 改善に貢献できるのではと考えている。

文 献

- 1) Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, et al. : One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 348 : 683-693, 2003
- 2) Stevens RD, Dowdy DW, Michaels RK, et al. : Neuromuscular dysfunction acquired in critical illness : a systematic review. *Intensive Care Med* 33 : 1876-1891, 2007
- 3) Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, et al. : Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS) : lessons from an international sepsis registry. *Infection* 37 : 222-232, 2009
- 4) Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, et al. : Chronic orchitis : a neglected cause of male infertility? *Andrologia* 40 : 84-91, 2008
- 5) Reddy MM, Mahipal SV, Subhashini J, et al. : Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod Toxicol* 22 : 493-500, 2006
- 6) Inoue T, Aoyama-Ishikawa M, Kamoshida S, et al. : Endogenous interleukin 18 regulates testicular germ cell apoptosis during endotoxemia. *Reproduction* 150 : 105-114, 2015
- 7) Cheng CY, Mruk DD : The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev* 64 : 16-64, 2012
- 8) Strand ML, Wahlgren A, Svechnikov K, et al. : Interleukin-18 is expressed in rat testis and may promote germ cell growth. *Mol Cell Endocrinol* 240 : 64-73, 2005
- 9) Komsky A, Huleihel M, Ganaiem M, et al. : Presence of IL-18 in testicular tissue of fertile and infertile men. *Andrologia* 44 : 1-8, 2012
- 10) Abu Elhija M, Lunenfeld E, Persky L, et al. : Constitutive expression of IL-18 binding protein in murine testicular tissues and cells. *Eur Cytokine Netw* 19 : 25-29, 2008
- 11) Abu Elhija M, Lunenfeld E, Eldar-Geva T, et al. : Over-expression of IL-18, ICE and IL-18 R in testicular tissue from sexually immature as compared to mature mice. *Eur Cytokine Netw* 19 : 15-24, 2008
- 12) AbuElhija M, Lunenfeld E, Eldar-Geva T, et al. : Lipopolysaccharide increased the expression levels of IL-18, ICE and IL-18 R in murine Leydig cells. *Am J Reprod Immunol* 60 : 151-159, 2008
- 13) Abu Elhija M, Lunenfeld E, Huleihel M : LPS increases the expression levels of IL-18, ICE and IL-18 R in mouse testes. *Am J Reprod Immunol* 60 : 361-371, 2008
- 14) Shang T, Zhang X, Wang T, et al. : Toll-like receptor-initiated testicular innate immune responses in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 152 : 2827-2836, 2011
- 15) Tripathi R, Mishra DP, Shaha C : Male germ cell development : turning on the apoptotic pathways. *J Reprod Immunol* 83 : 31-35, 2009
- 16) Tourneur L, Chiocchia G : FADD : a regulator of life and death. *Trends Immunol* 31 : 260-269, 2010
- 17) Zhou PH, Hu W, Zhang XB, et al. : Protective Effect of Adrenomedullin on Rat Leydig Cells from Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Apoptosis via the PI3K/Akt Signaling Pathway ADM on Rat Leydig Cells from Inflammation and Apoptosis. *Mediators Inflamm* 2016 : 7201549, 2016
- 18) Manna PR, Dyson MT, Stocco DM : Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression : present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 15 : 321-333, 2009
- 19) 井上岳人, 石川倫子, 西野哲, 他 : エンドトキシン血症時における精巣生殖細胞アポトーシスと内因性 IL-18 の役割. “エンドトキシン・自然免疫研究 17” 日本エンドトキシン・自然免疫研究会編. 医学図書出版株式会社, 2014, p98-102
- 20) Inoue T : Testicular germ cell apoptosis during orchitis. In “Spermatozoa : Biology, Motility, and Function and Chromosomal Abnormalities” eds Erickson BT, Nova Science Publishers, Inc. 2014, p149-168