The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Suppressive action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on proliferation of immature mouse Leydig cell line TM3 cells
Author(s)	松本, 章士
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54227
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【150】

氏　　名	松　本　章　士（まつもと しょうし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２３４４６　号
学位授与年月日	平成21年12月16日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	Suppressive action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on proliferation of immature mouse Leydig cell line TM3 cells （マウスLeydig細胞TM3におけるPACAPの細胞増殖抑制作用について）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　黒川　信夫 （副査） 教　授　奥山　明彦　　教　授　祖父江憲治

論　文　内　容　の　要　旨

[目 的]

セクレチン/グルカゴン/VIP family に属する生理活性ペプチドである pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は、adenylate cyclase を活性化するペプチドであり、アミノ酸残基の数から PACAP27 と 38 が存在する。PACAP の作用として、中枢神経系における神経伝達物質としての機能の他、神経細胞死を抑制することから、神経栄養因子として注目されている。また、精巣に高濃度に存在することから精子形成などの調節に重要な働きをしていると考えられている。本研究では、未熟な精巣における PACAP 生理的機能の解明を目的として、生後 11-13 日の BALB/c マウス精巣由来の細胞株である TM3（Leydig 細胞由来）および TM4（Sertoli 細胞由来）を用い、これらの生殖細胞におけるレセプターの発現、細胞内伝達物質の変化および分裂増殖に対する影響について検討を行った。

[方法ならびに成績]

1）TM3 における PACAP レセプターの発現については、[^{125}I]-PACAP27 を用いた binding receptor assay と SDS-PAGE による解析の結果、TM3 に PACAP に特異的なレセプターが存在し、その分子量は約 65kDa であった。さらに Real-Time PCR による mRNA の解析により、このレセプターが PAC1 であることを確認した。これに対して TM4 には PACAP レセプターが存在しなかった。なお、TM3 と TM4 における PACAP27、38 およびこれらの mRNA の発現量は検出限界以下であった。

2）TM3 に対する PACAP の作用を検討するため、細胞内 cAMP 濃度と培地中テストステロン濃度を測定した。PACAP27 と 38 は共に 10^{-10} M 以上で、濃度依存的に細胞内 cAMP を増加させ、同様に培地中のテストステロン濃度の増加も認められた。また、dibutyryl cAMP 添加においても培地中のテストステロン濃度が増加した。

3）TM3 の細胞増殖に与える PACAP の影響を、リアルタイム細胞計測システム(RT-CES)を用いて測定した。PACAP は添加 10～72 時間後、10^{-10}M 以上の濃度において、有意に細胞増殖を抑制し、フローサイトメトリーの解析によって、細胞周期 S 期の細胞周期パーセンテージの減少と G_2/M 期の増加が認められた。また、位相差顕微鏡による観察では、細胞の脱離、核の凝集などの apoptosis を示す形態は認められなかった。なお、これらの TM3 の細胞増殖に与える影響において、PACAP27 と PACAP38 の差異は存在しなかった。

[総括]

我々は、PAC1 が Leydig 細胞由来の TM3 に存在し、Sertoli 細胞由来の TM4 には存在しないことを示したが、この結果は、PACAP がこの発育時期における Leydig 細胞において重要な役割を有しており、マウスの未熟な時期に特異的に作用する可能性を示すものであった。さらに、PACAP mRNA の発現と PACAP の生成は TM3、TM4 共に測定限界以下であったことから、マウスの未熟な段階において PACAP は paracrine または endocrine 的に Leydig 細胞に作用することが推測された。

Leydig 細胞における PACAP のステロイド生成に対する作用については、幾つかの報告がなされているが、動物種と年齢が異なることから、それぞれの見解は異なっている。本研究において、10^{-10} M~10^{-7} M の PACAP は、TM3 に対し、基底のテストステロン濃度を増加させ、さらに dibutyryl cAMP はテストステロンの分泌を増加させた。これは未熟なマウスの精巣を起源とする株化した細胞から得られた結果であり、本研究は、未熟なマウスの Leydig 細胞において、PACAP が期特異的（stage-specific）に cAMP 生成を促進しステロイド生成を刺激することを明らかにした。

RT-CES は TM3 の増殖と形態の変化を持続的にモニターするのに有用であり、PACAP は 10^{-10}M 以上で濃度依存的に細胞増殖を抑制した。位相差顕微鏡による画像においても PACAP 添加により細胞数は対照に比べて減少したが、この PACAP による細胞増殖抑制作用は、細胞傷害性またはアポトーシスによるものではなく、細胞周期の S 期と G_2/M 期に作用することで、細胞周期の進行を制御していると考えられた。

以上、我々は株化した培養細胞を用い、PACAP が未熟なマウスの Leydig 細胞に対し、cAMP 生成によるステロイド生成を刺激すると共に、細胞周期の制御による持続した細胞増殖の抑制作用をひき起こし、細胞分化を促進させる可能性を初めて示した。

論文審査の結果の要旨

生理活性ペプチドであるPACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) は、adenylate cyclase を活性化するペプチドであり、特に脳における神経伝達物質や栄養因子として注目されている。また、精巣においては精子形成の調節に重要な働きをしていると考えられているが詳細は明らかではない。本研究は未熟な精巣におけるPACAP生理的機能の解明を目的として、マウス精巣由来の細胞株である TM3 Leydig細胞およびTM4 Sertoli細胞を用い、PACAPレセプターの発現、細胞内伝達物質の変化および細胞増殖に対する影響について検討を行った。

その結果、未成熟マウス精巣におけるPACAPの作用について、TM3 Leydig細胞とTM4 Sertoli細胞との差異を示すと共に、PACAPがLeydig細胞に対し、パラクリンまたはエンドクリン的に作用している事を明らかにした。さらに、未成熟Leydig細胞において、PACAPはテストステロン産生を刺激し、細胞周期を制御することで細胞増殖を持続的に抑制し、細胞分化を促進させる可能性を示した。

今後、脳梗塞や精巣の疾病に対する治療を目的として、PACAPとそのレセプターに関連した医薬品が開発されることが予想される。従って、この論文の基礎データはPACAPの効果や有害作用を予測する場合において、有益な情報になると考えられ、臨床医学の発展に寄与することが期待される。

以上より、この論文は学位論文に値する。