The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	精巣ライディッヒ細胞におけるC1q/TNF-related protein3(CTRP3)の発現とテストステロン産生促進作用
Author(s)	應谷, 昌隆
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59982
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

【7】

氏　　名	應　谷　昌　隆（おお たに まさ たか）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯学）
学 位 記 番 号	第　２５７７０　号
学位授与年月日	平成25年３月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	**精巣ライディッヒ細胞におけるC1q/TNF-related protein3(CTRP3)の発現とテストステロン産生促進作用**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　古郷　幹彦 （副査） 教　授　脇坂　　聡　　准教授　小川　裕三　　講　師　福田　康夫

論 文 内 容 の 要 旨

【研究の背景と目的】

抗糖尿病ホルモンとして知られるアディポネクチンと同様の構造をもつ一連の分子群は、C1q/TNF-related protein（CTRP）ファミリーと呼ばれ、CTRP ファミリータンパクは細胞外に分泌され、細胞間シグナルを伝達する分子として多彩な生理機能を持つことが知られている。このファミリーの一つである CTRP3 タンパクは、軟骨組織で初めて同定されたが、最近の研究により、抗炎症作用や血糖値降下作用、心筋細胞壊死の抑制など、多くの生理作用を有していることが明らかになってきた。そこで、骨格系以外で CTRP3 を発現している器官を検索したところ、ヒトおよびマウスの精巣組織に強く発現していることが判明した。精巣は精子形成やテストステロン分泌などの機能を持つ組織であり、CTRP3 がこれらの機能に対して、何らかの生理作用を有していることが予想された。本研究では、精巣における CTRP3 の作用を明らかにするために、その局在、発現時期、生理的役割について検討した。また、CTRP3 の刺激に応答する細胞内のシグナル伝達経路についても検討した。

【材料と方法】

組織を用いた実験

① マウス精巣組織におけるCTRP3発現の局在ならびに発現時期の検討

生後 0、1、3、4、6 および 8 週齢のマウス精巣組織のパラフィン切片を作製し、抗 CTRP3 抗体を用いた免疫組織化学染色により局在と発現時期を検討した。

細胞を用いた実験

マウス精巣組織より樹立されたマウスライディッヒ細胞株である TM3 ライディッヒ

細胞培養系を用いて以下の実験を行った。

② マウスライディッヒ細胞におけるCTRP3の生理的役割の検討

細胞を 24 時間培養後、血清飢餓培地に交換し細胞増殖を止めた。種々の濃度の組換え CTRP3 タンパクを加えてさらに 24 時間培養し、ブロモデオキシウリジン（BrdU）の取り込み量を指標にして、細胞増殖作用を調べた。また、細胞を 2 日間培養後、血清使用量低減培地に交換し、種々の濃度の組換え CTRP3 を加えて 24 時間培養した。回収した培養上清中のテストステロン量を ELISA 法で測定し、テストステロン産生促進作用を調べた。

③ テストステロン合成に関わるタンパク質の発現に対するCTRP3の作用の検討

細胞を 2 日間培養後、血清使用量低減培地に交換し、組換え CTRP3 を 10 μg/ml 添加してテストステロン合成に関わるタンパク質である Steroidogenic acute regulatory protein （StAR）および Cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme（P450scc）の mRNA およびタンパクの経時的な発現を、それぞれ RT-PCR 法とウェスタンブロット法により調べた。

④ CTRP3の刺激に応答する細胞内シグナル伝達経路の検討

CTRP3 刺激と cyclic adenosine monophosphate（cAMP）の関係を検討するために、細胞を 2 日間培養後、無血清培地に交換し、種々の濃度の組換え CTRP3 を添加して細胞内の cAMP 量を測定した。また、cAMP 量の経時的な変化についても調べた。次に、CTRP3 と Protein kinase A （PKA）の関係を検討するために、細胞を 2 日間培養後、無血清培地に交換し、組換え CTRP3 を 10 μg/ml 添加してリン酸化された cyclic AMP response element-binding protein （CREB）タンパクの発現をウェスタンブロット法にて調べた。また、特異的 PKA 阻害剤である H89 を用いて、CTRP3 のテストステロン産生促進作用に対する PKA の関与を検討した。

【結果と考察】

① マウス精巣組織においてCTRP3タンパクは、ライディッヒ細胞に特異的に局在しており、その発現時期は生後3週齢より認められた。

② 組み換えCTRP3タンパクの刺激はTM3ライディッヒ細胞の増殖には影響を与えなかったが、テストステロン産生量を濃度依存的に増加させた。これらの結果より、CTRP3の生理的役割が、ライディッヒ細胞におけるテストステロンの産生に関与していることが明らかになった。

③ CTRP3の添加により、テストステロン合成に関わるタンパク質であるStARとP450sccの発現誘導が遺伝子レベルおよびタンパクレベルで認められた。

④ CTRP3タンパクの刺激は、細胞内のcAMP量を濃度依存的に増加させ、その増加は一過性であった。さらに、CTRP3の刺激によりCREBのリン酸化が認められた。また、PKA阻害剤であるH89の添加によりCTRP3の刺激によるテストステロンの産生促進作用は完全に抑制された。これらの結果より、CTRP3の刺激に応答する細胞内シグナル伝達経路が、cAMP/PKA経路である可能性が示唆された。そのため、CTRP3タンパクの受容体として、Gタンパク質共役型受容体型のものが考えられた。

【結論】

CTRP3 は精巣のライディッヒ細胞に発現し、自己分泌／傍分泌の作用様式で、cAMP/PKA シグナル伝達経路を介して、ライディッヒ細胞における思春期以降のテストステロン産生の調節に関わっている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、マウスの精巣組織を用い、CTRP3の生理作用について検討を行った。

その結果、CTRP3は前思春期以降の精巣ライディッヒ細胞に認められ、CTRP3の刺激によりライディッヒ細胞からのテストステロン産生が促進されることがわかった。また、CTRP3の刺激は細胞内cAMP/PKA伝達経路により応答し、その受容体はGタンパク質共役型受容体である可能性が明らかになった。

以上の結果は、CTRP3がテストステロンの産生、分泌を調節している可能性を示したものであり、博士（歯学）の学位に値するものであると認める。