

配偶子形成における細胞貪食の分子機構と意義の研究

Molecular mechanism and role of phagocytosis in gametogenesis

研究代表者 金沢大学大学院医学系研究科 生体防御応答学分野 講師 白土 明子
Assistant Professor, Molecular and Cellular Biochemistry, Graduate School of Medical Science,
Kanazawa University, Akiko SHIRATSUCHI

和文アブストラクト

生体内での機能獲得の過程では、特定細胞がアポトーシスを起こし、このような細胞は食細胞により貪食排除される。本研究では、配偶子形成の場である精巣および卵巣で起こるアポトーシスと貪食反応が解析された。精子への分化途中で死んだ精子形成細胞はセルトリ細胞により貪食され、この反応は精子形成細胞表面のリン脂質ホスファチジルセリン(PS)とセルトリ細胞の膜受容体 SR-BI との直接結合により担われると分かった。また、この反応は精子形成過程の進行に必須であり、貪食反応の生理学的意義が示された。一方、卵巣では退行時の黄体組織内に、黄体細胞のアポトーシスとマクロファージ遊走因子の産生とが起こり、黄体マクロファージは黄体細胞を死細胞選択的に貪食した。これより、食細胞によるアポトーシス細胞貪食排除は、雌雄どちらの配偶子形成においても重要な役目を果たすと考えられる。

Abstract

During mammalian gametogenesis, portions of the differentiating cells ought to die by apoptosis and are heterophagically eliminated by surrounding phagocytes. This study was done to clarify the molecular basis of this phenomenon occurring in both the testis and ovary of the rat, and the outcome has been the followings. In the testis, apoptotic spermatogenic cells are phagocytosed by Sertoli cells through direct binding of phosphatidylserine exposed on the surface of apoptotic spermatogenic cells to class B scavenger receptor type I of Sertoli cells. Inhibition of this phagocytosis in the testes of live animals leads to a severe reduction in the level of sperm production. In regressing corpora lutea within the ovary, the induction of apoptosis and the production of monocyte chemoattractant protei-1 are induced simultaneously but in distinct populations of luteal cells. Apoptotic luteal cells are phagocytosed by luteal macrophages in a phosphatidylserine-mediated manner. These results support the idea that macrophages, which infiltrate regressive corpora lutea thought the action of monocyte chemoattractant protein-1, phagocytose apoptotic luteal cells.

1. 研究目的

生体の発生過程における機能獲得や恒常性維持の過程では、特定の細胞が生理学的細胞死であるアポトーシスで死に、周辺の食細胞により貪食されて排除される必要がある。配偶子形成の場である精巣および卵巣にも、このようなしくみが存在する。哺乳類の精子形成過程では、大多数の精子形成細胞が精子への分化途中で死に、精巣セルトリ細胞に貪食される。一方、卵巣における黄体退行の過程では、アポトーシスを起こした黄体細胞が組織外から集まってきたマクロファージに貪食排除されることで、排卵周期が制御されると考えられている。本研究では、これらの知見に基づき、精巣および卵巣で生じたアポトーシス細胞の貪食機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

2. 研究経過

2.1 精巣セルトリ細胞による精子形成細胞貪食の分子機構

筆者らのこれまでの研究により、セルトリ細胞は、クラス B スカベンジャー受容体タイプ I (SR-BI) を使ってアポトーシス精子形成細胞表層に出現したリン脂質ホスファチジルセリン(PS)を認識して、アポトーシス精子形成細胞を選択的に貪食することが示されている。そこで本研究では、まず、SR-BI と PS との直接結合を検証した。次に、SR-BI を介したアポトーシス細胞貪食反応が生体内で起きているかどうかを調べ、さらにこの反応の生理学的意義の解明を目指した。

2.1.1 SR-BI による PS の認識機構

SR-BI は長い細胞外領域を有する 2 回膜貫通型タンパク質と予想され、また細胞外領域に N-結合型糖鎖を含む。ラットセルトリ細胞より単離した SR-BI cDNA を用い、細胞外領域と予想される SR-BI の様々な部分を、ヒトイムノグロブリン Fc との融合タンパク質として動物細胞に発現させて精製した。PS をプラスチック表面に固定し、試料タンパク質を加えて一定時間放置してから洗浄し、抗 Fc 抗体を用いた酵素抗体法により、結合した Fc 融合タンパク質を呈色反応により検出して数値化してタンパク質とリン脂質との結合程度を比較した。解析の結果、SR-BI の細胞外領域は、PS と結合することが判明し、これは貪食誘導性 PS 受容体と PS との結合を示す初めての例となった。PS 以外の代表的細胞膜リン脂質である、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、そしてホスファチジルイノシトールへはこのタンパク質はほとんど結合しなかったことから、結合はリン脂質の種類特異性を有していた。また、この様な PS 結合能は、SR-BI の細胞外領域のうち約 160 アミノ酸残基からなる領域により担われること、カルシウムイオンの共存または N-結合型糖鎖の除去で促進されることが分かった。

2.1.2 SR-BI を介した貪食反応解析と精子形成過程における貪食反応の意味

通常の前駆組織中では、アポトーシス精子形成細胞はほとんど検出されない。これはセルトリ細胞により死細胞が速やかに貪食されて分解されるためであると考えられている。そこで、貪食阻害時の前駆組織を解析して、SR-BI を介した貪食反応が生体内でも起きて

いるかどうかを検証した。抗 SR-BI 抗体を生きたラットの精巣精細管内に微量注入して飼育後、精巣を取りだして組織化学的にアポトーシス細胞を検出したところ、精細管内に検出されるアポトーシス精子形成細胞数が顕著に増加したが、陰性コントロール抗体やバッファーのみの注入ではこのような変化は認められなかった。この結果は、特異抗体により貪食反応が阻害されたために、アポトーシス精子形成細胞が検出ようになったと解釈される。一方、抗がん剤処理により精子形成細胞を一過性に死滅させたマウス精巣は、精子形成能回復のよいモデルとなる。この様なマウス精細管内で微量注入法により貪食反応を阻害すると、精子形成能回復の遅延と産生される精子数減少とが認められた。以上より、SR-BI を介した反応が生体内でも起きていることが示され、また、アポトーシス精子形成細胞の貪食排除が精子形成過程進行に必須であると考えられた。

2.2 退縮時黄体におけるマクロファージ遊走と黄体マクロファージによるアポトーシス黄体細胞の貪食

哺乳類卵巣では、排卵を終えた卵胞は黄体へと変化して妊娠維持に必要なホルモンを産生する。妊娠不成立時には、黄体細胞はアポトーシスを起こし、このような細胞は組織外から浸潤してきたマクロファージに貪食排除されることで、黄体が不必要なホルモンを産生しないよう制御されると考えられている。本研究では、マクロファージがアポトーシス細胞の近くに集まってくる機構の解明と、黄

体マクロファージによるアポトーシス黄体細胞の貪食反応解析とを目指した。

2.2.1 黄体細胞のアポトーシスとマクロファージ遊走因子の産生

ラット黄体組織中のアポトーシス黄体細胞、マクロファージ、そして monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 産生細胞について、性周期に伴うそれぞれの変化を組織化学的方法により解析した。その結果、アポトーシス黄体細胞の多い黄体組織では、MCP-1 発現細胞数が多いこと、非アポトーシス黄体細胞が MCP-1 を産生することが判明した。さらに、初代培養細胞系を用いた解析から、アポトーシスと MCP-1 発現とは、どちらも酸化ストレスにより、しかし別々の黄体細胞に誘導されることが分かった。

2.2.2 黄体マクロファージによるアポトーシス黄体細胞の貪食

初代培養したラット黄体細胞を抗がん剤ドキシソルピシン存在下で培養すると、アポトーシスによる細胞死が検出された。この様な細胞を、別に調製した黄体組織中のマクロファージと混ぜて培養すると、マクロファージ内に取り込まれた黄体細胞が検出された。これより、黄体組織中のマクロファージはアポトーシス黄体細胞を貪食することが明らかになった。

3. 研究成果

SR-BI は、PS と直接結合することで、セルトリ細胞の貪食反応を誘起することが判明した。また、セルトリ細胞による精子形成細胞の貪食排除は、精子形成過程の進行に必須で

あることが示された。一方、黄体組織では酸化ストレスにより黄体細胞のアポトーシスとマクロファージ遊走因子産生とが誘導され、これらは別々の細胞に起こると分かった。また、黄体マクロファージは、実際にアポトーシス黄体細胞を死細胞選択的に貪食する能力を有することが判明した。

4 . 今後の課題と発展

セルトリ細胞の貪食反応機構に関しては、今後はPS 結合後に起こるSR-BI からの貪食誘導の細胞内情報伝達経路、および貪食反応後の精子形成過程進行の分子機構の解明が次の課題である。黄体マクロファージによる貪食機構を理解するためには、マクロファージ遊走因子の産生誘導機構、そして特異的認識を規定する分子の同定が必須である。

5 . 発表論文リスト

- 1 Inhibition of sperm production in mice by annexin V microinjected into seminiferous tubules: possible etiology of phagocytic clearance of apoptotic spermatogenic cells and male infertility. Maeda, Y., Shiratsuchi, A., Namiki, M., and Nakanishi, Y. *Cell Death Differ.* **2002**, 9: 742-749
- 2 Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular Sertoli cells. Kawasaki, Y., Nakagawa, A., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A.,

and Yoshinobu, Y. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277: 27559-27566

- 3 Independence of plasma membrane blebbing from other biochemical and biological characteristics of apoptotic cells. Shiratsuchi, A., Mori, T., and Nakanishi, Y. *J. Biochem.* **2002**, 132: 381-386
- 4 Determination of cell type specificity and estrous cycle dependency of monocyte chemoattractant protein-1 expression in corpora lutea of normally cycling rats in relation to apoptosis and monocyte/macrophage accumulation. Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., Nakanishi, Y. *Biol. Reprod.* **2002**, 67: 1502-1508
- 5 A presumed human nuclear autoantigen that translocates to plasma membrane blebs during apoptosis. Shiratsuchi, A., Mori, T., Takahashi, Y., Sakai, K., Nakanishi, Y. *J. Biochem.* **2003**, 133: 211-218
- 6 不要細胞の食細胞による貪食排除の分子機構と生理学的意義、中西義信、白土明子 生化学 2003 (印刷中)
- 7 Concomitant induction of apoptosis and expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured rat luteal cells by nuclear factor-kB and oxidative stress. (投稿中)
- 8 Accelerated degradation of engulfed apoptotic cells in Toll-like receptor 4-deficient macrophages. (投稿中)
- 9 Expression and function of class B scavenger receptor type I on both apical and basolateral sides of the plasma membrane of polarized testicular Sertoli cells of the rat. (投稿準備中)