

学位論文要旨

株化培養細胞における D-アスパラギン酸の 細胞内濃度調節機構ならびにテストステロン産生促進機構の解析

高野友輔

高齢男性のテストステロン分泌量減少による性腺機能の低下は、加齢性腺機能低下症候群（Late-onset hypogonadism; LOH 症候群）を引き起こし、生活の質（QOL）の低下につながる。テストステロン生合成を促進する分子の一つに D-アスパラギン酸（D-Asp）がある。これまでにラット Leydig 初代培養細胞において、D-Asp は Luteinizing hormone（LH）存在下、細胞内に取り込まれることにより、Steroidogenic acute regulatory protein（StAR）発現の促進を介してテストステロン産生を促進させることが報告されている。しかし、D-Asp による StAR 発現の促進機構についてはほとんど明らかになっていない。D-Asp によるテストステロン産生亢進機構の解明は、これらテストステロンが関わる関連疾患の解明につながることを期待される。本研究では D-Asp によるテストステロン産生亢進機構の解明を目的とした。第一章ではキラル誘導体化 LC/MS/MS 法を用いて生体試料中の D,L-アミノ酸を測定するため、本測定法の評価（バリデーション）を行った。第二章では、第一章で確立した本測定法を用いて、今まで D-アミノ酸が検出できていないヒト肝がん由来培養細胞株 HepG2 細胞、マウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞の細胞内及び培地中の D,L-アミノ酸を測定し、細胞内 D-アミノ酸濃度調節機構を解明するために有用な測定方法であるか検討した。第三章では、D-Asp によるテストステロン産生亢進機構の解明に有用な株化細胞を用いた実験系を確立し、I-10 細胞における各種ステロイドホルモン産生への D-Asp の影響について解析した。第四章では、第三章で確立した実験系を用いて、D-Asp による StAR 遺伝子の発現調節機構の解析を行った。以下、本研究で得られた知見を各章ごとに総括する。

第一章：キラル誘導体化 LC/MS/MS 法を用いた D,L-アミノ酸測定のバリデーション

第一章では、 N^{α} -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide（FDLA）誘導体化 LC/MS/MS 法のバリデーションを行ったところ、D-Asp と D-セリン（D-Ser）について、検量線は良好な直線性を示し、定量限界はそれぞれ 174.5 pM、36.3 pM であった。よって、D-Asp と D-Ser は 174.5 pM、36.3 pM 以上の濃度で定量が可能であることを示した。また、日内日間変動試験では 5 μ M 以上で精度良く測定できることを示し、添加回収試験では 4 μ M でも良好な回収率を得ることができた。以上のことから、本測定法は生体試料中の D-Asp ならびに D-Ser を簡便かつ効率的に定量するために有用であり、D-Asp の細胞内濃度調節機構や生理機能の解析に利用可能な測定法であると考えられる。

第二章：細胞内 D-アミノ酸濃度調節機構の解析

第二章では、FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いて HepG2 細胞内及び培地中の D,L-アミノ酸を測定したところ、HepG2 細胞中で D-Asp、D-Ser を検出することができた。さらに、HepG2 細胞において、D-Asp が D-アスパラギン酸オキシダーゼによって代謝されている可能性やアスパラギン酸ラセマーゼによって生合成されている可能性が示唆された。一方、I-10 細胞内の D,L-アミノ酸を測定したところ、D-Asp を含め D-アミノ酸は検出されなかった。以上のことから、本測定法を用いることにより、細胞内 D-Asp

濃度調節機構を解析することが可能であることを示した。本測定法を用いて、新たな D-Asp 産生細胞の同定とその細胞における細胞内 D-Asp 濃度調節機構、ならびに、D-Asp の標的細胞である Leydig 細胞における細胞内 D-Asp の局在について解析することで、D-Asp を介した臓器間ネットワークやテストステロン産生促進機構の解明へとつながることが期待される。

第三章：マウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞を用いた実験系の確立

第三章では、LC/MS/MS による各種ステロイドホルモンの測定法を確立することができ、本測定法を用いて I-10 細胞における D-Asp によるテストステロン産生への影響の解析することが可能となった。本実験系を用いて解析を進めたところ、I-10 細胞において、D-Asp が Menaquinone-4 (MK-4) 存在下でテストステロン産生を促進していることを明らかにした。また別に、第二章で確立した FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いて D-Asp 量を解析したところ、I-10 細胞に D-Asp を添加した場合、細胞内に D-Asp が取り込まれることが明らかとなった。以上の結果から、株化細胞である I-10 細胞を用いた解析可能な実験系を確立できたと考えられる。今後は、本実験系を用いることにより、初代培養細胞では困難であると考えられる分子細胞生物学的な解析が可能となり、D-Asp による StAR 発現促進機構のより詳細な解明につながると考えられる。

第四章：D-アスパラギン酸によるテストステロン産生促進機構の解析

第四章では、第三章で確立した実験系を用いて、D-Asp による StAR 遺伝子の発現調節機構の解析を行った。その結果、D-Asp は MK-4 の存在下で StAR 発現を促進し、テストステロン産生を増加させることが明らかとなった。さらに、StAR promoter 領域に対する D-Asp の応答領域は MK-4 の応答領域とは異なった領域であることが明らかとなった。以上の結果から、D-Asp は MK-4 とは異なった StAR promoter 領域に作用し、その発現を促進することを明らかにした。今後、StAR promoter 上に存在する D-Asp の応答領域に結合する転写因子を同定し、当該因子の活性化に及ぼす D-Asp の影響を解析することにより、D-Asp による StAR 発現調節機構の解明につながることが期待される。

総括

以上より本研究では、FDLA 誘導体化 LC/MS/MS 法を用いることにより、今まで D-アミノ酸が検出されてこなかった細胞株における D-Asp の検出、細胞内濃度調節機構の解析を可能にし、さらにマウス精巣腫瘍 Leydig 由来 I-10 細胞を用いることで、D-Asp によるテストステロン産生促進機構の解明に貢献できることを示した。よって、これらの研究のさらなる進展により、D-Asp の細胞内濃度調節機構ならびにテストステロン産生促進機構を解明することができると考えられる。さらには、テストステロン分泌量の低下によって引き起こされる LOH 症候群の病態解明や治療法の確立、高齢男性の QOL 向上につながることが期待される。

Thesis Abstract

Analysis of the Mechanisms of the Regulation of Intracellular D-Aspartate concentration and the D-aspartate-induced Testosterone Production in Cultured Cell Lines.

Yusuke Takano

Reduced testosterone production in elderly men causes late-onset hypogonadism (LOH syndrome), leading to decreased quality of life. D-Aspartate (D-Asp) is one of the known factors that promote testosterone synthesis. Experiments using primary cultured rat Leydig cells have shown that D-Asp is taken up by the cells and promotes testosterone production by enhancing the expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the presence of luteinizing hormone (LH). However, the mechanisms of D-Asp-induced StAR expression are largely unknown. Elucidating the mechanism is expected to lead to a better understanding of testosterone-related diseases. This study aims to elucidate the mechanisms by which D-Asp promotes testosterone production, including the potential upregulation of StAR expression, and to explore its implications for the development and treatment of testosterone-related diseases. In chapters 1 and 2, the focus was on validating and establishing the LC/MS/MS method for measuring D- and L-amino acids in cultured cells, respectively. Chapter 3 aimed to establish an experimental method using a cultured cell line to study the mechanisms of D-Asp-induced testosterone production by measuring steroid hormones in I-10 cells. This was achieved by establishing an LC/MS/MS method to measure steroid hormones in I-10 cells. In chapter 4, the regulatory mechanisms of StAR gene expression by D-Asp in I-10 cells were investigated using the experimental method established in chapter 3, with the aim of elucidating the mechanism of D-Asp-induced testosterone production. In the following chapters, the findings of this study are summarized.

Chapter 1: Validation of D,L-Amino Acid Determination Using a Chiral Derivatization LC/MS/MS Method

In Chapter 1, the validation of the chiral derivatization LC/MS/MS method using the *N*^α-(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide (FDLA) derivatization reagent was performed, and as the results, it was shown that the calibration curves for D-Asp and D-Serine (D-Ser) showed good linearity, with limits of quantitation at 174.5 pM and 36.3 pM, respectively. In addition, the intra-day variation test showed that the assay was accurate at concentrations of 5 μM or higher, and good recovery was obtained even at 4 μM in the addition recovery test. In conclusion, this assay is useful for the simple and efficient determination of D-Asp and D-Ser in biological samples, and can be used to analyze the intracellular concentration regulation mechanism and physiological functions of D-Asp.

Chapter 2: Analysis of the Regulatory Mechanism of Intracellular D-Amino Acid Concentration

In chapter 2, the FDLA-derivatized LC/MS/MS method was used to measure D- and L-amino acids in HepG2 cell lysates and the culture medium, and the results showed that these amino acids are detectable in these samples. The study also suggested that D-Asp may be biosynthesized by aspartate racemase and metabolized by D-Aspartate oxidase in HepG2 cells. In contrast, no D-amino acids, including D-Asp, were detected in I-10 cells. These findings indicate that this assay can be utilized to investigate the regulatory mechanisms of intracellular D-Asp content. By using this assay, it is possible to identify new D-Asp-producing cells, analyze the regulatory mechanisms of

intracellular D-Asp concentration in those cells, and determine the subcellular localization of D-Asp in Leydig cells, which are the target cells of D-Asp. This approach may facilitate the elucidation of D-Asp-mediated inter-organ networks and the mechanism underlying the promotion of testosterone production.

Chapter 3: Establishment of an Experimental System Using I-10 Cells to Study D-Asp-Induced Testosterone Production

In chapter 3, the method for measuring various steroid hormones using LC/MS/MS has been established. By using this method, the analysis of the effect of D-Asp on testosterone production in I-10 cells became possible. Using this experimental system, it was shown that D-Asp promotes testosterone production in I-10 cells in the presence of Menaquinone-4 (MK-4). Additionally, the FDLA-derivatized LC/MS/MS method established in chapter 2 was utilized to analyze D-Asp, revealing that it was taken up by I-10 cells. Based on these findings, the experimental system utilizing I-10 cells, an established cell line, was shown to be useful for elucidating the molecular mechanism by which D-Asp promotes StAR expression, which is thought to be difficult to accomplish with primary cultured cells.

Chapter 4: Analysis of the Mechanism of the D-Asp-induced Testosterone Production

In chapter 4, the regulatory mechanism of StAR gene expression by D-Asp using the experimental system established in Chapter 3 was analyzed and found that D-Asp promotes StAR expression and increases testosterone production in the presence of MK-4. Furthermore, it was also found that the responsive element of D-Asp in the StAR promoter is different from that of MK-4. These results indicate that D-Asp acts on a different StAR promoter region than MK-4 and promotes its expression. Further studies identifying the transcription factors that bind to the D-Asp responsive element in the StAR promoter and analyzing the effect of D-Asp on their activation are expected to clarify the regulatory mechanism of StAR expression by D-Asp. Overall, this study contributes to the understanding of the biological functions of D-Asp and the potential as therapeutic agents.

Summary

In conclusion, this study demonstrated that FDLA-derivatized LC/MS/MS is useful to detect D-Asp in cell lines in which D-amino acids have not been previously detected and analyze the regulatory mechanisms of intracellular D-Asp contents in these cells. Additionally, the experimental system using I-10 cells established in this study is valuable for studying the molecular mechanisms of D-Asp-induced testosterone production. The findings of this study may contribute to develop new strategies for the treatment of low testosterone levels and improve the quality of life for elderly men who suffer from LOH syndrome.

論文審査の結果の要旨

主要アミノ酸は、グリシンを除き、キラル中心炭素原子を持つため、D、L体の鏡像異性体が存在する。アミノ酸はL体がほとんどであるが、D体も極微量に生体中に見出されている。近年、生体の微量D-アミノ酸分析が可能となり、D-アミノ酸は、アミノ酸トランスポーター等によって細胞内に取り込まれること、D-アミノ酸に特異的な酸化酵素によって代謝を受けることや、L-アミノ酸から異性化酵素（ラセマーゼ）によって生合成されていることが明らかにされている。D-アミノ酸の中で、特にD-セリン（Ser）やD-アスパラギン酸（Asp）の生理機能が報告され始めているものの、Aspラセマーゼの存在は哺乳類細胞中では見出されていない。

男性の重要な性ホルモンのひとつであるテストステロンがD-Aspによって生合成が促進されていることが明らかにされている。Leydig細胞ではD-Aspが産出されていないが、ラットLeydig初代培養細胞系では黄体形成ホルモン（LH）存在下、D-Aspがテストステロン生合成律速因子であるステロイド産生急性調節タンパク質（StAR）の発現を高めていること、マウス精巣腫瘍Leydig由来株化細胞（I-10細胞）ではDibutyryl-cAMP（db-cAMP）やMenaquinone-4（MK-4）がテストステロン産生亢進剤として作用していること、が報告されている。しかしながら、Leydig細胞でのD-Aspによるテストステロン生合成促進の作用機序については不明な点が多い。

本研究ではD、L-アミノ酸分析法として、キラル誘導体化LC/MS/MS法を提唱している。キラル誘導体化試薬 N^{α} -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide を用いてD、L-アミノ酸をジアステレオマー化して液体クロマトグラフィータンデム質量分析計で解析する方法である。ジアステレオマー誘導体はLC装置のODSカラムによって分離定量分析され、続くMS/MS装置でイオン質量から定性分析される。MS/MS分析ではフラグメントイオン解析ができることから、本法は夾雑物が多いとされる生体試料分析に有効である可能性が高い。

本研究では、キラル誘導体化LC/MS/MS法の生体試料解析への有効性を検討して、ヒト肝癌由来HepG2細胞やI-10細胞のD-アミノ酸分析に応用した。さらに、I-10細胞におけるD-Aspがもたらすテストステロン生合成促進への影響や作用に関する研究を展開した。

第一章では、キラル誘導体化LC/MS/MS法の生体試料解析への有効性を確認するために、定量限界、日内変動試験および日間変動試験や添加回収試験でのD、L-アミノ酸分析を検討した。

両異性体から成る20種類のアミノ酸において、L-アミノ酸は0.5~100 μM 、D-アミノ酸は0.01~5.0 μM の範囲で検量線を作成したところ、D、L-Tyr、L-Gln、D、L-Cysを除く、アミノ酸では相関係数0.995以上の直線性が確認され、L-アミノ酸は0.5 μM 、D-アミノ酸は0.01 μM 以上の濃度で定量分析できることを明らかにした。D、L-アミノ酸の定量限界はシグナル対ノイズ比を10として算出したところ、32.5~1768 pMの範囲であった。0.5、5、50 μM 濃度における日内変動試験および日間変動試験でAccuracyが80~120%の範囲内にあるアミノ酸を調べたところ、両試験ともに0.5 μM では20種類のアミノ酸のうち約1/3、5 μM では約2/3、50 μM ではD-Leu、L-Cysを除くD、L-アミノ酸がこの範囲内のAccuracyを示した。一部のアミノ酸ではジアステレオマー化したものが不安定であり、アミノ酸の濃度依存性が見られるものの、多くのアミノ酸で十分に日内日間変動を回避できることを明らかにした。次に夾雑物の影響下の試験として、HepG2細胞培養由来の細胞抽出液および培地を用いた添加回収試験を検討した。

ところ、細胞抽出液および培地ともに 20 種類中約 1/3 の D, L-アミノ酸で 80~120%の回収率で得られ、特に D-Ser や D-Asp については、低濃度でも良好な回収率を示した。以上から、キラル誘導体化 LC/MS/MS 法が生体試料分析への適応性が高いことが明らかにされた。

第二章では、キラル誘導体化 LC/MS/MS 法の生体試料分析への応用として、HepG2 細胞および I-10 細胞の細胞中及び培地中の D-アミノ酸分析を検討した。

キラル誘導体化 LC/MS/MS 法を用いて、HepG2 細胞中及びその培地中の D-アミノ酸分析をおこなったところ、D-Asp と D-Ser がそれぞれ検出された。次に、D-アスパラギン酸酸化酵素 (DDO) 阻害剤や D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) 阻害剤を添加した評価系の解析を検討したところ、DDO 阻害剤を添加した細胞中では両 D-アミノ酸の量は経時的に増加し、培地中では D-Asp が有意に増加していることを明らかにした。DAO 阻害剤では細胞中及び培地中ともに両 D-アミノ酸の有意な増加は認められなかった。本研究によって、初めて HepG2 細胞中に D-Asp と D-Ser が存在していることが見出され、HepG2 細胞には D-Asp に対する DDO が存在している可能性が示唆される成果が得られた。一方、I-10 細胞のものでは D-アミノ酸は全く検出されず、従来報告されている I-10 細胞では D-Asp が産生されないことを再確認・証明した。

第三章では、D-Asp を生合成していない I-10 細胞のテストステロン産出を明らかにするために、LC/MS/MS 法によるステロイドホルモン分析法の確立を目指し、D-Asp やテストステロン産生亢進剤がもたらす I-10 細胞におけるステロイドホルモン産出への影響について検討した。

LC/MS/MS 法によって、プロゲステロン、アンドロステンジオンならびにテストステロンの 3 種類のステロイドホルモンの分析法を確立することに成功した。I-10 細胞培地中に D-Asp を添加すると、細胞内に D-Asp が取り込まれるが、ステロイドホルモンの産出亢進効果は認められないことを明らかにした。MK-4 や db-cAMP のテストステロン産生亢進剤としての作用を確認して、新しい評価系として D-Asp と MK-4 の共存添加させたところ、ステロイドホルモン亢進作用がより強く促進されるという事実を明らかにした。ラット Leydig 初代培養細胞では LH 存在下、D-Asp によってテストステロン産生亢進作用を示すが、同じ Leydig 細胞である株化 I-10 細胞では、MK-4 と D-Asp の組み合わせでその作用が発現することを明らかにした。これらの結果から、初代培養細胞と I-10 細胞ではテストステロン産生亢進作用に違いがあることが示唆された。

第四章では、I-10 細胞のテストステロン産生亢進機構の解明を目指して、D-Asp と MK-4 が関与する StAR 遺伝子の promoter 領域を調べた。

ステロイドホルモン産生経路および StAR 発現に対する阻害剤を用いた評価系の解析から、D-Asp と MK-4 が StAR promoter 活性に関与していると推測された。そこで、StAR promoter 領域に対する D-Asp と MK-4 の応答領域を調べたところ、D-Asp と MK-4 はそれぞれ異なった StAR promoter 領域に作用していることを明らかにした。すなわち、StAR promoter 領域には別々に D-Asp と MK-4 が作用して、これらが相乗的な効果として StAR 発現を促進している可能性が示唆された。さらに、StAR promoter 領域には、D-Asp と MK-4 の共存下においてのみ特異的に結合する因子が見出されるに至った。

以上、本論文は、生体の D-アミノ酸を解析する迅速なツール開発に成功し、D-Asp が関与するステロイドホルモン産出亢進作用の解明に有用な情報を与えている。本論文は、本研究科課程による博士 (薬学) 論文に相応しいものであると判断する。