

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19310040

研究課題名 (和文) 細胞間相互作用を有する精巣細胞システムの開発

研究課題名 (英文) Development of testicular cell system with cell-cell interactions

研究代表者

田淵 圭章 (TABUCHI YOSHIAKI)

富山大学・生命科学先端研究センター・准教授

研究者番号：20322109

研究成果の概要 (和文)：TTE3 セルトリ細胞と TTE1 ライディヒ細胞を共培養した時、セルトリ細胞において数多くの遺伝子の発現が変動した。本細胞システムにおいて、セルトリ細胞の細胞分化の指標であるトランスフェリンの発現が上昇し、細胞周期関連遺伝子であるサイクリン D1 の発現が減少した。さらに、コンピューターを用いた遺伝子発現解析により、細胞間相互作用に関連するユニークな遺伝子ネットワークを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：When Sertoli TTE3 cells were co-cultured with Leydig TTE1 cells, many genes were differentially expressed in the TTE3 cells. The expression levels of transferrin, a differentiation marker of Sertoli cells, and cyclin D1, a cell cycle-associated gene, were up- and down-regulated in the cell system, respectively. In addition, we identified unique gene networks involved in the cell-cell interactions using computational gene expression analysis tools.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：内分泌かく乱物質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、地球環境に放出された内分泌かく乱物質を含む化学物質が地球上の生物に多大な影響を与えるため大きな社会問題となっている。環境化学物質や医薬品の毒性評価

実験など生体に影響を与える物質の評価には、未だに実験動物が数多く使用されている。一方、動物福祉の観点から動物実験は必要最小限にとどめ動物を用いない *in vitro* の実験で代替するという認識がある。また、国際的な流れとして、1999 年に開催された第 3 回

国際動物実験代替法会議においてこの精神が盛り込まれたボロニア宣言が採択された。今後、益々、動物実験を反映する *in vitro* 実験代替法が必要になると考えられる。

(2)これまで、新しい物質の生体組織に及ぼす影響を実験動物に頼らずに生体外で効率的に調べるための培養細胞として、細胞の増幅が長期間維持でき継代可能な、癌化した細胞株が用いられている。しかしながら、このような癌化した細胞は生体組織の機能を必ずしも正常に反映していない。一方、我々は、これまでに癌遺伝子産物の発現をコントロールできる温度感受性 SV40 大型 T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスやラットを用いて正常機能を保持したマウス精巣細胞株等の樹立に成功している。我々は、樹立した精巣セルトリ細胞を用いて、内分泌かく乱物質類の一つであるビスフェノール A の精巣細胞障害誘導機構を詳細に調べ、細胞障害発現に少なくとも一部に小胞体ストレスが関与していることを明らかにした。

(3)生体は複数の細胞の集合体として機能しており、各々の細胞は遠方の細胞からのホルモンによる制御や近傍あるいは自らのサイトカイン等による制御を受けている。従って、生体の機能を反映する *in vitro* の細胞システムを構築するためには、複数の細胞を用い、さらには、各々の細胞間の相互作用が再現できる細胞システムである必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが独自に開発した正常な機能を保持した精巣の細胞を複数同時に用いることで、単独の細胞ではできなかった細胞間の相互作用を観察できる細胞システムの構築を目指す。

## 3. 研究の方法

(1)細胞培養 温度感受性 simian virus 40 大型 T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウス由来の正常機能を保持したマウス精巣セルトリ細胞株 TTE3 とライディヒ細胞株 TTE1 を用いた。これらの細胞を共培養する時、TTE3 細胞をコラーゲンタイプ I 膜フィルター上で培養し、下部に TTE1 細胞を同時に培養した (図 1)。

(2)網羅的遺伝子発現解析 セルトリ細胞の遺伝子発現を指標にして、細胞間の相互作用を評価した。DNase 消化した total RNA を用いて、GeneChip システムにより網羅的遺伝子

発現解析を行った。得られたデータは、さらに、遺伝子発現解析ソフトウェア GeneSpring や Ingenuity tool を使用して解析した。

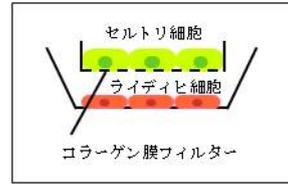


図1 セルトリTTE3細胞とライディヒTTE1細胞との共培養の模式図

## 4. 研究成果

(1)TTE3 セルトリ細胞の分化の過程に関与する遺伝子の解析 細胞間相互作用を有する精巣細胞システムの開発を目指し、先ず、本システムに使用する不死化セルトリ TTE3 細胞の性質を詳細に解析した。TTE3 細胞は、許容温度で増殖し、非許容温度では細胞が分化する。網羅的遺伝子発現解析と解析ソフトウェアを用いて、この分化の過程に関与する遺伝子を詳細に調べた。その結果、数多くの遺伝子の発現が変動し、これらは階層解析により 6 遺伝子グループに分けることができた (図 2)。

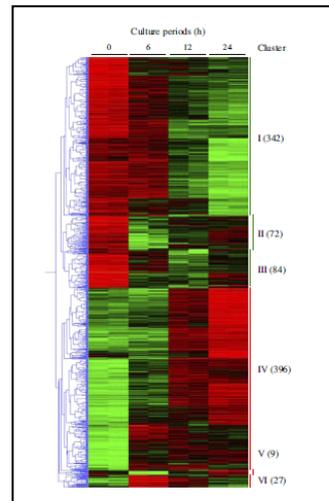


図2 セルトリTTE3細胞の分化の過程で発現変動する遺伝子の階層解析

遺伝子発現が上昇する遺伝子クラスターIVから、CDKN1A, RB1, KIT, STAT1 等を含む遺伝子ネットワークが明らかになった (図 3)。また、遺伝子発現が減少する遺伝子クラスター I から、FOSL1, PLAUR, FN1 等の遺伝子を含む遺伝子ネットワークも明らかになった (図 4)。発現変動する遺伝子やこれらの遺伝子ネットワークが TTE3 セルトリ細胞の細胞分化に関与する可能性が示された (*Cell Biol. Int.*

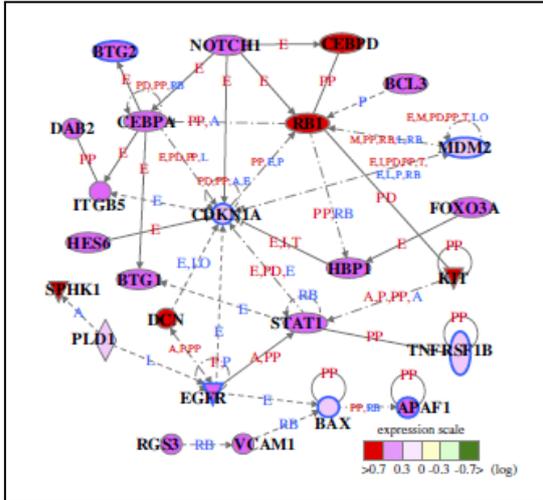


図3 セルトリTTE3細胞の分化の過程で発現が上昇する遺伝子の遺伝子ネットワーク

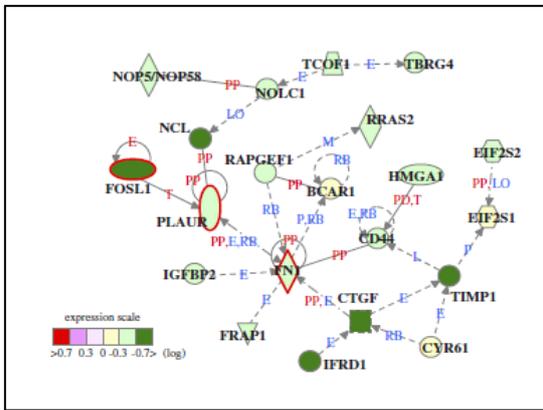


図4 セルトリTTE3細胞の分化の過程で発現が減少する遺伝子の遺伝子ネットワーク

(2)細胞間相互作用を有する精巣細胞システムの構築 膜フィルターを用いて、TTE3セルトリ細胞と TTE1 ライディヒ細胞を共培養した。細胞間の相互作用は、TTE3細胞の遺伝子発現変化を指標とした。TTE1 ライディヒ細胞との共培養により、数多くの遺伝子の発現が変動することが明らかとなった。発現が上昇する遺伝子には、VEGF, CAT, E2F1, TF が含まれた。TF (transferrin) は、Sertoli細胞の細胞分化の指標であり、Leydig細胞との共培養により Sertoli細胞が分化することが示された。発現が減少する遺伝子には、CCND1, CASP9, MET, TFR3 が含まれた。CCND1 (cyclin D1) は、細胞増殖に関与する遺伝子で、この遺伝子の減少が、細胞増殖抑制や細胞分化に関与する可能性が考えられる。さらに、TFとCCND1を含む細胞間の相互作用に関連するユニークな遺伝子ネットワークを同定した(図5)。種々の遺伝子が細胞間相互作用に

のように寄与しているのかは、今後の研究課題ではあるが、少なくともこの遺伝子ネットワークに含まれる遺伝子が遺伝子間で関連しながら細胞間相互作用に影響を与えていると考えられる。以上より、細胞間相互作用を有する精巣細胞システムが構築できたと考えられる。さらに、本システムが血液—精巣関門のモデルとなり得るか否かを調べた。本条件下、細胞間の有意な膜電気抵抗が形成されなかった。従って、本実験条件下では、TTE3細胞間には完全な密着結合が形成されていないことが示された。これは、網羅的な遺伝子発現解析により、密着結合の構成タンパク質である、occludinや claudin 11が発現していないことから示された。一方、密着結合の構成タンパク質である Zo-1は発現していた。現在、密着結合が形成され、血液—精巣関門を完全なものにするために、細胞外マトリックスの効果を検討している。今回、構築できた細胞間相互作用を有する細胞システムを使用することにより、実験動物を使用しない in vitro の実験系で、精巣機能に対する内分泌かく乱化学物質等の効果を評価することができると考えられる。これは、実験動物数の減少に貢献できるので、動物福祉の観点から価値がある。一方、本 in vitro システムが動物を用いた in vivo システムをどの程度反映しているかは、今後、さらに検討していかなければならないと考えている。

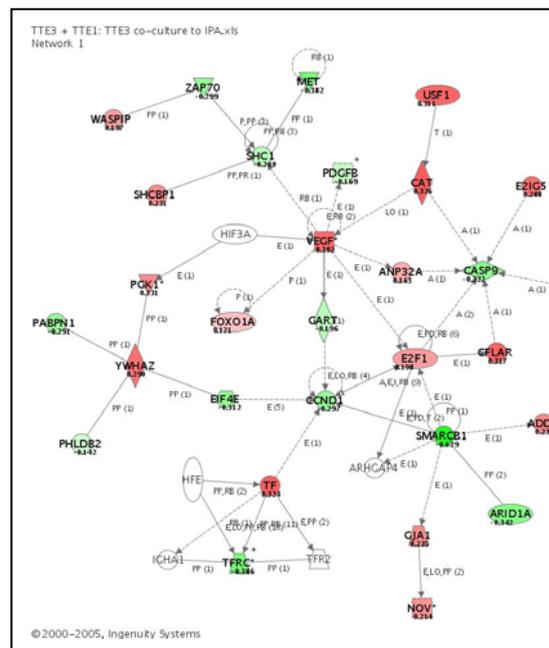


図5 セルトリTTE3細胞とライディヒTTE1細胞との共培養において細胞間相互作用に関連する遺伝子ネットワーク

(3)本研究課題に関連の成果 癌遺伝子産物の発現をコントロールできる温度感受性SV40大型T抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物やその遺伝子は、正常機能を保持した細胞株樹立に有用である。我々は、本遺伝子を導入したトランスジェニックラットから新規に気道上皮細胞, (*Cell Biol. Int.* **32**, 1344-1352, 2008), 口腔上皮細胞や皮膚角化細胞の樹立に成功した。また、同遺伝子を直接細胞に導入し、中枢神経系に存在するグリア細胞の一つであるラットアストロサイト細胞株の樹立に成功した(*J. Cell. Biochem.* **102**, 1472-1485, 2007)。樹立したこれらの細胞株は、正常細胞が有する機能を保持しており、今後、数々の研究に応用可能と考えられる。

本研究において、細胞間の相互作用を調べるために、網羅的遺伝子発現解析とバイオインフォマティクス技術の一つである遺伝子ネットワーク解析を使用した。これらの手法は、生物作用を解析するための非常に有効な手段である。これらの方法を用いて、化合物や物理化学的なストレスに対する遺伝子ネットワークを明らかにした (*Int. J. Hyperthermia* **23**, 529-537, 2007; *Int. J. Hyperthermia* **24**, 613-622, 2008; *Cancer Lett.* **270**, 286-294, 2008; *Cell Biol. Int.* **33**, 1253-1262, 2009)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Takasaki I., Takarada S., Fukuchi M., Yasuda M., Tsuda M., and Tabuchi Y., Identification of genetic networks involved in the cell growth arrest and differentiation of a rat astrocyte cell line RCG-12, *J. Cell. Biochem.*, Vol. 102, pp. 1472-1485, 2007, 査読有
- ② Tabuchi Y., Takasaki I., Suto A., Kondo T., Suzuki Y., and Obinata M., Genetic networks in nonpermissive temperature-induced cell differentiation of Sertoli TTE3 cells harboring temperature-sensitive SV40 large T-antigen, *Cell Biol. Int.*, Vol. 31, pp. 1231-1236, 2007, 査読有
- ③ Salunga T.L., Tabuchi Y., Takasaki I., Feril L.B. Jr., Zhao Q.L., Ohtsuka K., Tsuneyama K., and Kondo T., Identification of genes responsive to paeoniflorin, a heat shock protein-inducing compound, in human leukemia U937 cells, *Int. J.*

*Hyperthermia*, Vol. 23, pp. 529-537, 2007, 査読有

- ④ Tabuchi Y., Takasaki I., Wada S., Zhao Q.L., Hori T., Nomura T., Ohtsuka K., and Kondo T., Genes and genetic networks responsive to mild hyperthermia in human lymphoma U937 cells, *Int. J. Hyperthermia*, Vol. 24, pp. 613-622, 2008, 査読有
- ⑤ Tabuchi Y., Doi T., Takasaki I., Takahashi R., Ueda M., Suzuki Y., and Obinata M., Establishment and characterization of tracheal epithelial RTEC11 cells from transgenic rats harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen, *Cell Biol. Int.*, Vol. 32, pp. 1344-1352, 2008, 査読有
- ⑥ Tabuchi Y., Takasaki I., Zhao Q.L., Wada S., Hori T., Feril L.B. Jr., Tachibana K., Nomura T., and Kondo T., Genetic networks responsive to low-intensity pulsed ultrasound in human lymphoma U937 cells, *Cancer Lett.*, Vol. 270, pp. 286-294, 2008, 査読有
- ⑦ Tanida T., Warita K., Ishihara K., Fukui S., Mitsunashi T., Sugawara T., Tabuchi Y., Nanmori T., Qi W.M., Inamoto T., Yokoyama T., Kitagawa H., and Hoshi N., Fetal and neonatal exposure to three typical environmental chemicals with different mechanisms of action: Mixed exposure to phenol, phthalate, and dioxin cancels the effects of sole exposure on mouse midbrain dopaminergic nuclei, *Toxicol Lett.*, Vol. 189, pp. 40-47, 2009, 査読有
- ⑧ Furusawa Y., Tabuchi Y., Takasaki I., Wada S., Ohtsuka K., and Kondo T., Gene networks involved in the apoptosis induced by hyperthermia in human lymphoma U937 cells, *Cell Biol. Int.*, Vol. 33, pp. 1253-1262, 2009, 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 割田克彦, 菅原照夫, 田淵圭章, 三觜友子, 松本由樹, 三木崇範, 石原可奈, 谷田任司, 横山俊史, 竹内義喜, 北川 浩, 星 信彦, 外因性エストロゲン様化学物質がLeydig細胞株TTE1 のステロイドホルモン産生系遺伝子発現に与える影響とヒストンアセチル化解析, 環境ホルモン学会第10回研究発表会, 2007年12月10日, 大宮市

②高崎一朗, 林 淳美, 近藤 隆, 田渕圭章, 精巣セルトリ細胞のビスフェノールA による細胞死に関与するbZIP転写因子群, 日本薬学会第128年会, 2008年3月26-28日, 横浜市

(3)連携研究者

なし

③土井健司, 高崎一朗, 平 敬宏, 有賀寛芳, 近藤 隆, 田渕 圭章, 精巣セルトリ細胞における小胞体ストレスに対するDJ-1 の細胞保護作用, 日本薬学会第129年会, 2009年3月26-28日, 京都市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.lsrc.u-toyama.ac.jp/mgrc/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田渕 圭章 (TABUCHI YOSHIAKI)  
富山大学・生命科学先端研究センター・  
准教授  
研究者番号: 20322109

### (2) 研究分担者

高崎 一朗 (TAKASAKI ICHIRO)  
富山大学・生命科学先端研究センター・  
助教  
研究者番号: 00397176