

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08327

研究課題名（和文）RNA結合タンパク質RBM10欠損による無精子症の発症機序解明と治療法の探索

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of azoospermia caused by deficiency of the RNA-binding protein RBM10 and exploration of treatment methods

研究代表者

國本 浩之（Kunimoto, Hiroyuki）

大阪公立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80372853

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：RBM10は選択的スプライシングに関与するRNA結合タンパク質です。我々はRBM10欠損マウスを用いて、RBM10が精子形成に関与するかどうかを検証しました。その結果、RBM10欠損マウスでは精巣の萎縮が認められ、精子形成不全となることを見出しました。また、RBM10欠損となった精巣で、発現が変動したmRNAの一群も見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、挙児希望にもかかわらず不妊症と診断されるカップルが増加傾向にあり、少子化問題が日本の最も深刻な社会問題の一つとなっています。不妊症の原因の約50%は男性側にあるとされ、その主たる原因である精子形成不全は原因不明のため発症機序の解明が待たれています。我々はRBM10が精子形成をどのように制御するのかを明らかにすることで、男性不妊症患者に福音となるような治療法の開発を目指しています。

研究成果の概要（英文）：RBM10 is an RNA-binding protein involved in alternative splicing. We examined whether RBM10 is involved in spermatogenesis using RBM10-deficient mice. We found that RBM10-deficient mice show testicular atrophy and are deficient in spermatogenesis. We also found a group of mRNAs whose expression was altered in RBM10-deficient testes.

研究分野：分子生物学

キーワード：精子形成不全 男性不妊症

1. 研究開始当初の背景

申請者は、サイトカインシグナルにおける遺伝子応答とそれによる細胞の生存・増殖・分化・がん化・老化などの運命決定に関わる因子の解析を行ってきた。RNA 結合タンパク質の RBM10 は、我々のグループが同定し、その役割として培養細胞を用いて Fas や Bcl-x などアポトーシス関連遺伝子の pre-mRNAs の選択的スプライシングを制御することを報告している。

近年、RBM10 と疾患に関して、肺腺がん患者において高頻度に RBM10 の変異が認められ、また RBM10 が TARP 症候群と呼ばれる内反尖足、心房中隔欠損症、ピエール・ロバン連鎖 (小顎症、口蓋裂)、左上大静脈遺残などの奇形を呈する致死性 X 連鎖劣性遺伝病の原因遺伝子であることが報告された。このように RBM10 は細胞増殖・分化また組織ごとに重要な役割を担っていることが明らかとなってきたが、その生理的役割については解析がほとんどなされていない。

そこで我々は RBM10 の生理的役割を解析するため、RBM10 欠損マウスの作製を試みた。RBM10 欠損 ES 細胞を UC Davis 校の Knockout Mouse Project より入手し、別のマウスの初期胚にインジェクション後、偽妊娠マウスの子宮に移植することで 5 匹のオスキメラマウスを得た。しかしオスキメラマウスが正常メスマウスを一向に妊娠させることが出来なかったためスキメラマウスの精巣を解剖した。その結果、いずれも精細管内で精子形成が行われておらず、セルトリ細胞遺残症候群の症状を呈していた。また、CRISPR/Cas9 を用いて全身で RBM10 欠損するマウスの作製も試みた。ゲノム編集により 3 塩基欠失 (1 アミノ酸欠失) のマウスは数匹得られたが、フレームシフト変異を起こしたマウスは得られなかった。よって、マウス発生段階には RBM10 機能が必須であると考えられ、RBM10 は時期特異的に欠損させる必要があると結論づけた。

2. 研究の目的

本研究では、成体における RBM10 の生理的な役割を解析するに際し、RBM10 欠損が造精機能障害の原因となり得るのかについて検証及びその発症機序の解明を目的とする。

近年、挙児希望にもかかわらず不妊症と診断されるカップルが増加傾向にあり、少子化問題が日本の最も深刻な社会問題の一つとなっている。不妊症の原因の約 50% は男性側にあるとされ、その主たる原因として造精機能障害、精路通過障害、性機能障害などが知られている。精路通過障害、性機能障害については治療法が確立されてきたが、原因として最も割合が多い造精機能障害は、未だ原因不明となることが多い。

精子形成には、精子形成細胞とセルトリ細胞の密接な相互作用が必要であり、いずれかの細胞に欠陥があれば精子形成が途中で停止し不妊症となる。我々の予備実験の結果、RBM10 欠損で引き起こされる病態は、ほとんど精子形成細胞が見当たらないセルトリ細胞遺残症候群 (Sertoli cell only syndrome) 様であり、男性不妊の 10-30% 程度と言われている重症度が高いものであった。ヒトでのセルトリ細胞遺残症候群の原因は未だ不明であることから、RBM10 の欠損が精子形成細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞などの精巣内の細胞にどのような影響を与えるのかを遺伝子発現、サイトカイン・ホルモン分泌の変動を解析することで原因の解明、そして治療法の確立へと結びつけたい。

これまでにマウスでの遺伝子変異から 400 を超える不妊原因遺伝子が同定される一方、ヒトでの原因遺伝子は同定されていない。また、胎児期に分裂を終える卵子と比べて精子幹細胞は増殖を続けることから、遺伝子の変異頻度はより高く、変異の蓄積が起りやすいと考えられている。さらに、本研究で着目した RBM10 は X 染色体にあることから、常染色体の遺伝子よりも変異の影響を受けやすいと考えられる。我々が取り組む基礎研究から、不妊症に悩むカップルに福音を与える成果が出ることを期待している。

3. 研究の方法

(1) 臓器・時期特異的 RBM10 欠損マウスを用いた精子形成異常の確認

マウス発生・成長段階の種々の時期に RBM10 欠損が可能となるように、Cre-loxP システムを用いる。RBM10 遺伝子を loxP 配列で挟んだ (Rbm10 floxed) マウスは、所属機関の動物実験支援施設と共同で既に作製済みである。タモキシフェンの添加で活性化される Cre リコンビナーゼを全身で発現 (Ubiquitin C プロモーター:UBC-Cre-ERT2) あるいはセルトリ細胞特異的に発現 (Mullerian Inhibiting Substance プロモーター: MIS-Cre-ERT) するマウスと RBM10 floxed マウスとを交配することで臓器・時期特異的 RBM10 欠損マウスを得る。このマウスにタモキシフェンを種々の時期に添加し、RBM10 を欠損させた後、精巣を解剖し精子形成の状態を確認することで、RBM10 が精子形成に必要な時期を同定する。

(2) RBM10 欠損精巣におけるタンパク質・mRNA 発現のプロファイル (野生型との比較)

時期特異的な RBM10 欠損により精子形成不全が確認されれば、野生型精巣と RBM10 欠損精巣で発現している mRNA を次世代シーケンシング法にて比較検討する。候補となった分子については、組織免疫染色にてタンパク質の発現変化を確認する。候補タンパク質の発現変動によるホルモンやサイトカインシグナル伝達経路への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) セルトリ細胞特異的に RBM10 欠損となるマウスを用いた解析

MIS-Cre-ERT マウスと RBM10 floxed マウスを交配することで得られたセルトリ細胞特異的 RBM10 コンディショナルノックアウト雄マウスの離乳期 (3 週齢) に連続 5 日間 100mg/kg タモキシフェン投与を行った。その後、性成熟期 (8 週齢) で精巣を取り出し精巣重量/体重比率を測定したところ、無処理とタモキシフェン処理間に差は認められず、各精巣での RBM10 mRNA 量を測定したが、無処理とタモキシフェン処理間で優位な差は認められなかった。そこで、各精巣のパラフィン切片を作成し、セルトリ細胞での RBM10 発現を免疫組織染色で調べたところ、タモキシフェン処理群で明確な RBM10 発現低下が認められなかった。以上から、この実験系では正しくセルトリ細胞における RBM10 発現制御が行えないと判断し、解析を中断した。

(2) 全身で RBM10 欠損となるマウスを用いた解析

UBC-Cre-ERT2 マウスと RBM10 floxed マウスを交配することで得られた全身 RBM10 コンディショナルノックアウトオスマウスの離乳期 (3 週齢) に連続 5 日間 100mg/kg タモキシフェン投与を行った。その後、性成熟期 (8 週齢) で精巣を取り出し精巣重量/体重比率を測定したところ、タモキシフェン処理群で精巣の萎縮と RBM10 mRNA の発現低下が認められた (図 1 A, B)。

次に、各処理後の精巣のパラフィン切片を作成し、HE 染色、RBM10 組織免疫染色を行い、精巣内での RBM10 発現と精子形成を確認した。その結果、RBM10 発現低下させると精巣内および精巣上体に伸長した精子がほとんど認められなかった (図 1 C)。したがって、精巣での RBM10 発現低下は、精子形成に影響を与えることが示唆された。

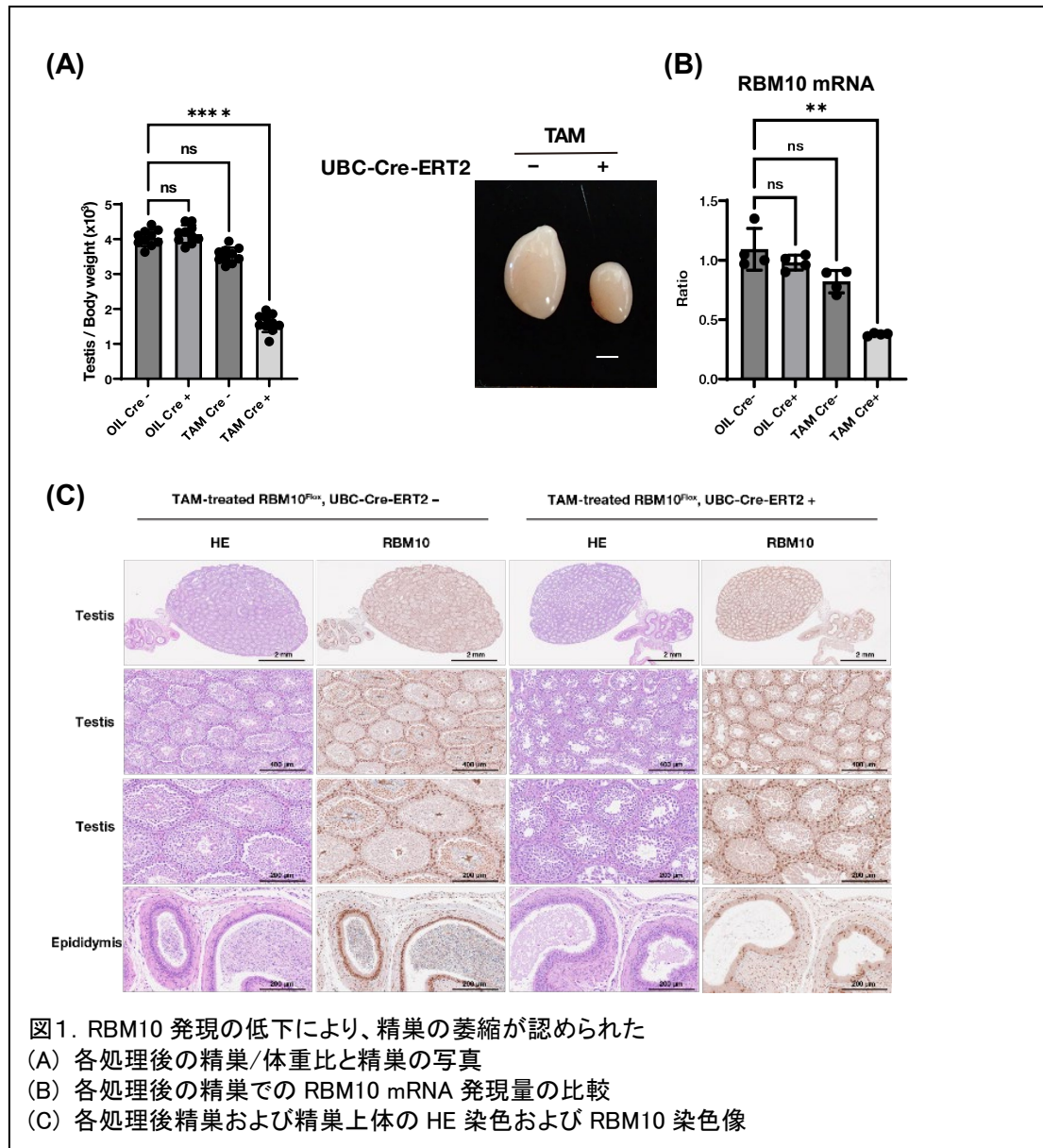


図1. RBM10 発現の低下により、精巣の萎縮が認められた

(A) 各処理後の精巣/体重比と精巣の写真

(B) 各処理後の精巣での RBM10 mRNA 発現量の比較

(C) 各処理後精巣および精巣上体の HE 染色および RBM10 染色像

次に、各処理後の精巣から Total RNA を回収し RNA-Seq 解析から両者で発現量に差がある遺伝子を求めた。その結果、ある一群の遺伝子に変動があることを見出した。これら遺伝子群の発現変動に RBM10 が直接選択的スプライシングを制御して関わっているのかどうか、現在解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Wang Ling-Yu, Xiao Sheng-Jun, Kunimoto Hiroyuki, Tokunaga Kazuaki, Kojima Hirotada, Kimura Masatsugu, Yamamoto Takahiro, Yamamoto Naoki, Zhao Hong, Nishio Koji, Tani Tokio, Nakajima Koichi, Sunami Kishiko, Inoue Akira	4. 巻 22
2. 論文標題 Sequestration of RBM10 in Nuclear Bodies: Targeting Sequences and Biological Significance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10526 ~ 10526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms221910526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Inoue Akira	4. 巻 783
2. 論文標題 RBM10: Structure, functions, and associated diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145463 ~ 145463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.145463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunimoto Hiroyuki, Inoue Akira, Kojima Hirotada, Yang Junhao, Zhao Hong, Tsuruta Daisuke, Nakajima Koichi	4. 巻 25(2)
2. 論文標題 RBM10 regulates centriole duplication in HepG2 cells by ectopically assembling PLK4 STIL complexes in the nucleus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 100 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yang Junhao, Kunimoto Hiroyuki, Katayama Bumpei, Zhao Hong, Shiromizu Takashi, Wang Lingyu, Ozawa Toshiyuki, Tomonaga Takeshi, Tsuruta Daisuke, Nakajima Koichi	4. 巻 32(2)
2. 論文標題 Phospho-Ser727 triggers a multistep inactivation of STAT3 by rapid dissociation of pY705?SH2 through C-terminal tail modulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 73 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Teramae Ayako, Kobayashi Yui, Kunimoto Hiroyuki, Nakajima Koichi, Suzuki Tamio, Tsuruta Daisuke, Fukai Kazuyoshi	4. 巻 139(5)
2. 論文標題 The Molecular Basis of Chemical Chaperone Therapy for Oculocutaneous Albinism Type 1A	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1143 ~ 1149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.10.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本 直樹、中谷 善彦、櫻村 剛、熊谷 望海、須藤 千晴、埜 雄大、生井 莉奈子、黒川 信、國本 浩之、井上 晃
2. 発表標題 細胞核RNAスプライシング制御因子RBM10の中樞神経系及び末梢組織における発現と機能
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 國本 浩之、井上 晃、趙 虹、中嶋 弘一
2. 発表標題 RBM10はHepG2において中心小体複製に関わる新規の調節因子である
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lingyu Wang, Hong Zhao, Junhao Yang, Hiroyuki Kunimoto, Koichi Nakajima
2. 発表標題 Tetramer-based model of STAT3 activation-inactivation
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱崎 考史 (Hamazaki Takashi) (40619798)	大阪公立大学・大学院医学研究科・教授 (24405)	
研究分担者	井上 晃 (Inoue Akira) (50109857)	大阪公立大学・大学院医学研究科・研究員 (24405)	削除：2023年5月17日
研究分担者	中嶋 弘一 (Nakajima Koichi) (00227787)	大阪市立大学・大学院医学研究科・特別研究員 (24402)	削除：2023年5月17日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------