

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09698

研究課題名(和文) 機能未知ユビキチン様タンパク質を介した精巣腫瘍発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of testicular cancer development mediated by the ubiquitin-like protein

研究代表者

上田 紗弥(伊藤紗弥)(Ueda, Saya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90534511

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): ショウジョウバエをモデル生物として用いた遺伝学的解析により、精巣で特異的に高発現するユビキチン様タンパク質が胚発生の初期から個体の生存維持に必須であることを明らかにした。精巣においてこのユビキチン様タンパク質の発現を低下させても生殖機能に顕著な異常は認められなかった。一方、精巣でユビキチン様タンパク質を発現低下させた雄の次世代個体は熱ストレス下での生存率が、発現低下させていない雄の次世代個体に比較し上昇することを見出した。

また、このユビキチン様タンパク質量の減少は、ポリユビキチン化タンパク質の増加・蓄積を促し、結果的にクロマチン構造の異常に繋がる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、機能未知の精巣特異的ユビキチン様タンパク質が生体内で果たす役割の一端として、ポリユビキチン化タンパク質の量的制御によるクロマチン構造調節への寄与を示唆した。

これまでに加齢やストレスによる異常タンパク質の蓄積と発がんの相関は示唆されているもののその分子メカニズムに関しては不明な点が多く、本研究をさらに発展させることでがんの発生メカニズムに関する新たな知見が得られるものと期待される。また、雄性生殖細胞のエピゲノム情報が世代を超えて伝承されるメカニズムの一端を明らかにすることもできると考えられる。

研究成果の概要(英文): We have revealed that the testis-specific ubiquitin-like protein is essential for maintaining the survival of individuals in the early stages of embryogenesis using *Drosophila* genetic analysis. Defect of this ubiquitin-like protein in testis did not show any significant abnormalities in male reproductive function. On the other hand, we found that the next-generation male individuals whose expression of the ubiquitin-like protein was reduced in testis had a higher survival rate under heat stress than the next-generation male individuals whose expression was not reduced.

In addition, we suggested that decrease of the ubiquitin-like protein induces accumulation of poly-ubiquitinated proteins, which may lead to an abnormality in chromatin structure.

研究分野：分子生物学

キーワード：ユビキチン様タンパク質 精巣 クロマチン構造調節 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

精巣腫瘍は罹患率の低い悪性腫瘍であるものの、生下時や 20～40 歳代の若年男性で最も多く発症することから社会的に極めて重要な疾患の一つと位置づけられる。これまでに精巣腫瘍の発症原因は明らかにされておらず、癌発生の分子メカニズム解明は効果的治療を行う上で必須であると考えられる。

申請者らは本申請研究の開始以前にアンドロゲンがセミノーマ型精巣腫瘍の細胞増殖を顕著に抑制することを見出した (Nakagawa et al., *Oncotarget*, 2016)。精巣腫瘍細胞においてアンドロゲン投与で発現低下する遺伝子の一部は癌細胞の増殖に対し促進的に作用したことから、アンドロゲンシグナルで発現変動する因子は精巣腫瘍発生や増悪に關与する可能性が高いと推測した。

2. 研究の目的

本申請研究では、セミノーマ型精巣腫瘍細胞においてアンドロゲン刺激依存的に顕著な発現低下が認められたユビキチン様タンパク質 (UBQLNL) の分子機能を解明し、精巣腫瘍の発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。UBQLNL は精巣腫瘍患者の癌部位での発現が正常部位に比較して顕著に低く、精巣腫瘍発生や癌の増悪制御に關与することが推測された。従って、精巣の発生・分化における UBQLNL の作用機序を明確にすることが、癌発生のメカニズム解明へと繋がると考えられた。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト UBQLNL のショウジョウバエホモログ CG31528 に着目し、遺伝学的手法を用いた個体レベルの解析を試みた。CG31528 は UBQLNL と同様に成虫精巣で顕著に高発現しており、UBQLNL の生体内での役割を明らかにする上でショウジョウバエをモデル個体として用いた CG31528 の高次な機能解析は有用であると考えた。具体的には、CG31528 遺伝子変異系統を作出し、作出した遺伝子変異系統を用いて表現型観察や生化学的解析を行い、CG31528 の機能評価を行った。

4. 研究成果

データベース上では CG31528 の mRNA は雄成虫の精巣組織で顕著に高発現するとされている。CG31528 認識抗体を用いた免疫染色により、精巣組織での CG31528 タンパク局在を観察した結果、CG31528 は発生初期の生殖細胞に局限していることが確認された (図 1)。また、精巣での CG31528 発現量は加齢に伴い増加することが示唆された。

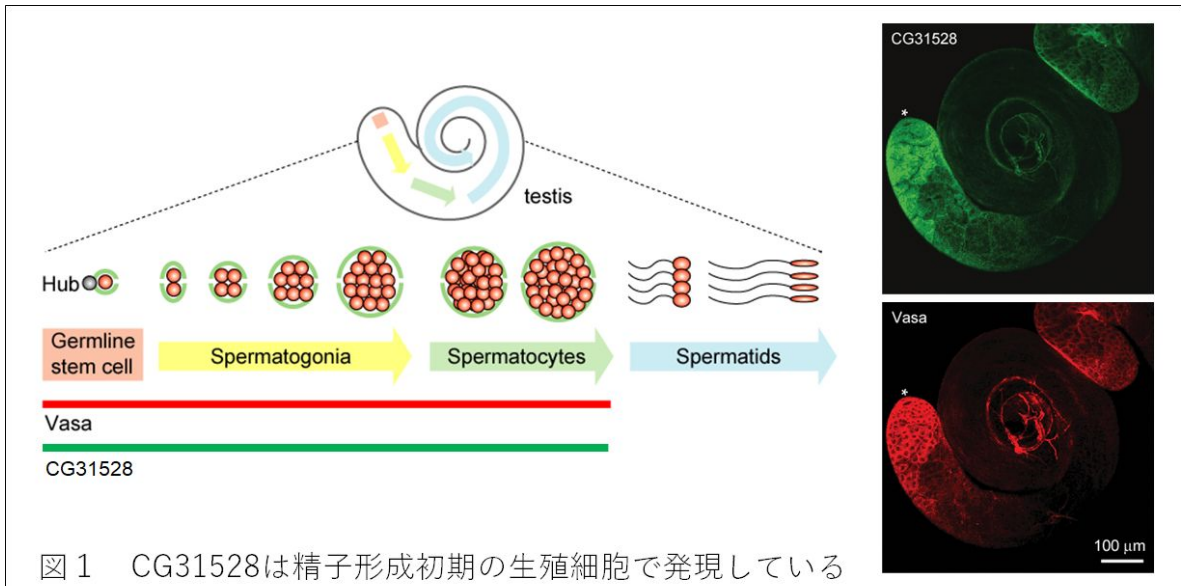


図1 CG31528は精子形成初期の生殖細胞で発現している

精巣での CG31528 の役割を解明する目的で、まず精巣特異的発現ドライバーを用いて CG31528 をノックダウンしたが、精子形成など精巣機能に顕著な異常は認められなかった。CG31528 の属するユビキリンファミリー因子の量は細胞内で厳密に補正制御されることが知られている。そこで、CG31528 遺伝子欠損系統を作出し CG31528 完全欠失の条件下、表現型解析による再評価を試みた。その結果、CG31528 遺伝子ホモ欠損系統は胚性致死であり、一部の発生初期胚で部分的な細胞の欠失が認められた (図 2)。

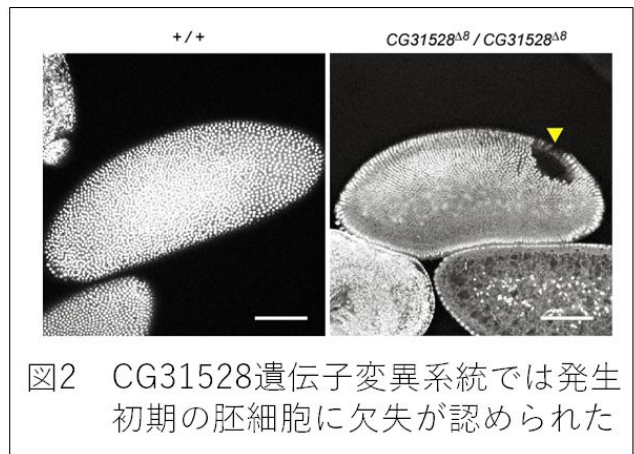


図2 CG31528遺伝子変異系統では発生初期の胚細胞に欠失が認められた

次に、CG31528 遺伝子ヘテロ欠損系統を用いて精巣機能に対する CG31528 の影響を検証した。雄成虫での CG31528 遺伝子変異に起因する生殖能力への影響は認められず、子世代の発生も正常であった。一方、CG31528 遺伝子変異系統の雄を親にもつ子世代は熱ストレス条件下での生存率が野生系統に比較し高くなる傾向が認められた。

一部のユビキリンファミリー因子はポリユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームに運搬するシャトルファクターとして働くことが知られている。そこで、CG31528 遺伝子ヘテロ欠損系統を用いて精巣のポリユビキチン化タン

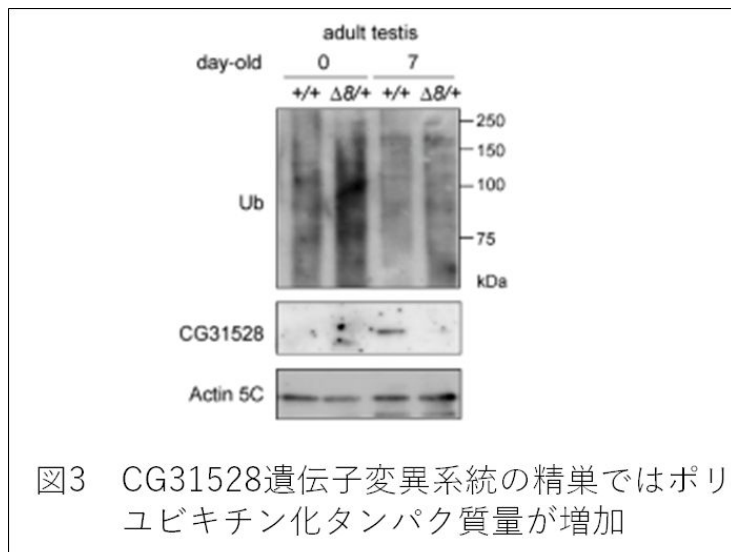


図3 CG31528遺伝子変異系統の精巣ではポリユビキチン化タンパク質量が増加

パク質量を定量した結果、遺伝子変異系統においてポリユビキチン化タンパク質量の増加が認められた(図3)。さらに、CG31528の欠失に起因するポリユビキチン化タンパク質量の異常増加・蓄積がクロマチン構造に変動を来たす可能性を検証するため、成虫複眼の斑入り位置効果(PEV)を利用したクロマチン構造調節能の評価を行った。PEV解析系ではヘテロクロマチン近傍に位置する赤眼遺伝子の発現を複眼の目の色を指標として評価することができる。ヘテロクロマチンプロテイン1(HP1)の遺伝子変異系統(Su(var)205[5])は、赤眼遺伝子近傍のヘテロクロマチン化が抑制され遺伝子発現が促された結果、赤眼を呈することが知られている。HP1遺伝子変異系統の複眼の色はCG31528の遺伝子変異によりさらに赤くなったことから、CG31528はHP1と協調的に作用しヘテロクロマチン形成を促進することが示唆された(図4)。

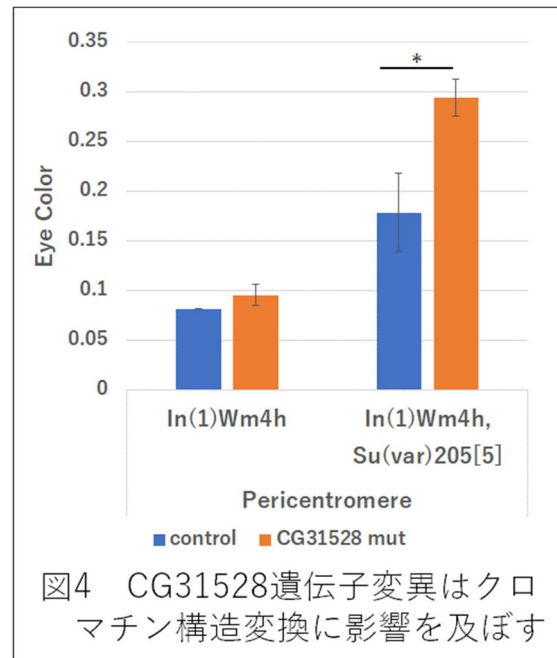


図4 CG31528遺伝子変異はクロマチン構造変換に影響を及ぼす

以上の結果より、CG31528の発現は精巢で顕著に高いものの、その機能は胚発生初期から発揮され個体の生存維持に必須であることが示された。また、CG31528の機能低下はユビキチン化タンパク質量の増加・蓄積を引き起こし、結果的にクロマチン構造異常につながる可能性が示唆された。今後は、CG31528の機能低下に起因するクロマチン構造異常が世代を超えて継承され次世代個体の生存等に影響する可能性を検討するとともに、哺乳動物においてUBQLNL機能低下が癌の発生・増悪に関与する可能性を検証していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saya Ito, Takashi Ueda, Atsushi Yokoyama, Atsuko Fujihara, Fumiya Hongo, Osamu Ukimura	4. 巻 Mar;29(3-4)
2. 論文標題 PCA3 controls chromatin organization and p53 signal activation by regulating LAP2 -lamin A complexes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 58-368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-021-00314-8	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 Ito S, Nomura T, Ueda T, Inui S, Morioka Y, Honjo H, Fukui A, Fujihara A, Hongo F, Ukimura O	4. 巻 Jun 23;11(1)
2. 論文標題 Gene expression profiles during tissue remodeling following bladder outlet obstruction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 13171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92756-1	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 eda T, Shiraishi T, Ito S, Ohashi M, Matsugasumi T, Yamada Y, Fujihara A, Hongo F, Okihara K, Ukimura O	4. 巻 May 12;11(1)
2. 論文標題 Abiraterone acetate versus bicalutamide in combination with gonadotropin releasing hormone antagonist therapy for high risk metastatic hormone sensitive prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89609-2	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Saya Ito, Takashi Ueda, Atsushi Yokoyama, Fumiya Hongo, Osamu Ukimura
2. 発表標題 PCA3 regulates nucleoplasmic lamina in prostate cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤紗弥、上野彰久、粥川成優、上田崇、本郷文弥、浮村理
2. 発表標題 ARの誘導と分解の分子メカニズム
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤紗弥、上田崇、横山敦、本郷文弥、浮村理
2. 発表標題 前立腺癌特異的長鎖ノンコーディングRNA-PCA3による核質ラミンの制御
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤紗弥、粥川成優、上田 崇、谷口英史、森岡由佳子、本郷文弥、浮村 理
2. 発表標題 MRGBP promotes AR-mediated transactivation of KLK3 and TMPRSS2 via acetylation of histone H2A.Z in prostate cancer cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 崇、伊藤紗弥、粥川成優、谷口英史、本郷文弥、浮村 理
2. 発表標題 前立腺癌細胞のAR依存性増殖におけるMRGBPの機能解析
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saya Ito, Takashi Ueda, Atsushi Yokoyama, Atsuko Fujihara, Fumiya Hongo, Osamu Ukimura
2. 発表標題 Functionally characterization of tumor or normal tissue-specific human lncRNAs in urogenital system
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤紗弥、上田崇、横山敦、本郷文弥、浮村理
2. 発表標題 前立腺癌特異的長鎖ノンコーディングRNA-PCA3の機能解明
3. 学会等名 第109回日本泌尿器学会総会
4. 発表年 2021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	上田 崇 (Ueda Takashi) (50601598)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究 分担者	浮村 理 (Ukimura Osamu) (70275220)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

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
---------	---------