

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390424

研究課題名(和文) 哺乳類精巣が軽度低温環境を必要とする分子的基盤とその臨床的意義

研究課題名(英文) Molecular basis and clinical significance of moderately low temperature environment in the mammalian testis

研究代表者

藤田 潤 (FUJITA JUN)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50173430

研究成果の概要(和文)：一般に低温では細胞増殖・遺伝子発現ともに低下するが、哺乳類の精子形成細胞は体温よりも32度前後の軽度低温下でよりよく増殖・分化する。この理由・生物学的な意義は不明である。本研究では、軽度低温により特異的に誘導される低温ショック蛋白質 *Cirp* の発現を制御する分子機構を明らかにし、ストレス応答との関連を解析した。また *cirp* 遺伝子を欠失したマウスを作成し、*Cirp* の精子形成における役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although the cell growth and gene expression are generally suppressed at lower temperatures, mammalian male germ cells proliferate and differentiate better at moderately low temperatures such as 32 degree C than body cavity temperature. The reasons for and biological significance of this phenomenon is unknown. We clarified in this study the molecular mechanism that regulates the expression of *Cirp*, the cold shock protein specifically induced at moderately low temperatures. We further produced *cirp*-knockout mice, and demonstrated the involvement of *Cirp* in spermatogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：分子病診療学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：精巣・ストレス・低温環境・遺伝子発現・ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

一般に低温では、細胞増殖・遺伝子発現ともに低下するのが普通であるのに、なぜ精子形成細胞は体温環境下にあるよりも軽度低温下のほうがより良く増殖・分化できるのか、なぜ哺乳類の精巣が軽度低温環境下にあるのかは不明である。哺乳類での高温に対する応答に関しては、熱ショック蛋白質 *Hsp* 及び

その転写因子 *Hsf* の解析をはじめいろいろな研究がなされている。しかし、低温応答の研究は遅れている。我々は、32度で発現が亢進する蛋白質 *Cirp* を発見し、哺乳類細胞には32度前後の軽度低温により特異的に発現誘導される低温ショック蛋白質群が存在すること、停留精巣では *Cirp* 及び類似の低温ショック蛋白質 *Rbm3* の精巣における発現が

低下すること、32度環境がいろいろなストレスに対する細胞の抵抗性を高めることを示してきた。最近、32度で転写を促進する軽度低温応答エレメントを *cirp* 遺伝子中に発見したので本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究により軽度低温応答転写因子を確定し、その制御機構、ストレス抵抗性との関連、制御を受ける遺伝子群の同定を行う。さらに、男子不妊症及び精巣腫瘍発生とこれら遺伝子との関連を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 軽度低温で特異的に *cirp* 遺伝子転写物が増加する機序の解析

①軽度低温応答転写因子の同定：*cirp* 遺伝子発現に関与する軽度低温応答エレメントに *in vivo* 細胞核内で結合している蛋白質を同定。過剰発現、あるいは発現抑制により *Cirp* 発現への影響を確認。

②軽度低温応答転写因子に制御を受ける遺伝子の同定：転写因子の過剰発現によって転写産物量の変化する遺伝子群を DNA マイクロアレイで同定。

③軽度低温応答転写因子活性の制御機構：転写因子の修飾、局在、他の軽度低温応答エレメント結合蛋白質との関連、温度変化、ストレス等による変化を解析

(2) 軽度低温で発現亢進する遺伝子及び転写制御機構の機能に関する解析

①ストレス抵抗性と軽度低温応答転写因子との関連：過剰発現、発現抑制により。

②低温ショック蛋白質 *Cirp*、熱ショック蛋白質 *Apg-1*、*Apg-2* 遺伝子それぞれのノックアウトマウスについて、精子形成に対する影響を解析。

(3) 臨床的意義に関する解析

①ヒト胎生期癌細胞株、卵巣未分化胚細胞腫細胞株で、軽度低温で発現亢進する遺伝子群の発現変化を解析。

②ヒト精巣腫瘍、不妊症症例での変化の解析。

## 4. 研究成果

(1) 軽度低温で特異的に *cirp* 遺伝子転写物が増加する機序の解析

①軽度低温応答転写因子の同定：

軽度低温応答エレメントに *in vitro* で結合する複数の蛋白質について、クロマチン免疫沈降反応にて細胞核内でも結合していることを示した。過剰発現および内在性発現の抑制により、これらの蛋白質が *Cirp* 発現制御に関与していることを証明した。これらは軽度低温応答転写因子及びその補助因子と考えられた。

②軽度低温応答転写因子に制御を受ける遺伝子の同定：

転写因子を高発現させ、発現に影響を受ける遺伝子をマイクロアレイで検索したが、影響下にあることが既知の遺伝子発現が変化していなかった。使用した転写因子に変異が生じていたため、あるいは恒常的に過剰発現させた細胞を用いたことに問題があったと考えられる。

③軽度低温応答転写因子活性の制御機構：

軽度低温応答エレメントに *in vitro* で結合することを見いだした複数の蛋白質は、軽度低温下でキナーゼにより修飾され、細胞質から核へ移行した。これら転写補助因子が、転写因子とともに細胞核内で複合体を作っていることを免疫沈降反応により示した。さらに軽度低温では、染色体の *cirp* 遺伝子発現制御領域上でこの複合体の量が増え、転写を促進させることをクロマチン免疫沈降反応により示した。

(2) 軽度低温で発現亢進する遺伝子及び転写制御機構の機能に関する解析

①ストレス抵抗性と軽度低温応答転写制御機構との関連：

低温以外のストレスによっても、転写補助因子がキナーゼにより活性化され、核内で他の転写因子にも作用して原因ストレスに対する細胞抵抗性が生じることを見いだした。

②遺伝子ノックアウトマウスによる解析：

*cirp* 遺伝子ノックアウトマウスで未分化精原細胞数が減少していること、抗癌剤によるダメージからの精子数回復が遅れることを見いだした(図1)。この原因は、精子形成細胞中では軽度低温で *Cirp* がキナーゼに結合し、その結果増殖を促進するためであった。

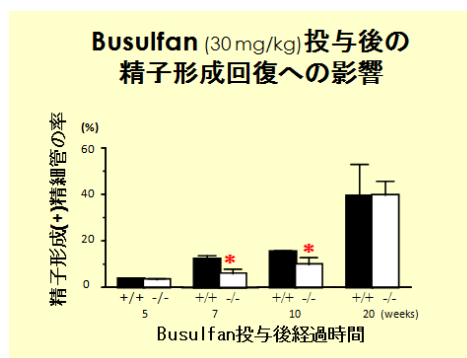


図1 精子形成が認められる精細管数の変化：*cirp* 遺伝子ノックアウトマウス(-/-)では野生型(+/+)に比し、ブスルファン投与後の回復が低下する。

軽度低温から軽度高温への変化で誘導される熱ショック蛋白質 *Apg-1* の遺伝子ノックアウトマウスが、100%雄性不妊であることを

見いだした。

Apg-2 の遺伝子ノックアウトマウスは、成長が悪く一部胎生致死であった。

複数のマウス系統で、かつバッククロスを8代以上掛けることが異常形質の発見に重要であった。

### (3) 臨床的意義に関する解析

ヒト胎生期癌細胞株、卵巣未分化胚細胞腫細胞株で、Cirp 及びその結合蛋白質が過剰発現していることを見いだした。臨床精巣腫瘍、不妊症例での変化、及び治療抵抗性等との関連を今後解析せねばならない。

## 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 17 件)

①Kobayashi T, Nishiyama H, Ogawa O. (他 7 名、7 番目). Regulation of androgen receptor transactivity and mTOR-S6 kinase pathway by Rheb in prostate cancer cell proliferation. Prostate. 査読有 2010;70:866-74.

② Izumi T, Takaori-Kondo A, Fujita J, Uchiyama T. (他 12 名、最後から 2 番目). MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. Retrovirology. 査読有 2009;6:1.

③Fukuda RI, Fujita J, Tsuji T. (他 4 名、5 番目). Human T-cell leukemia virus type I tax down-regulates the expression of phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate inositol phosphatases via the NF-kappaB pathway. J Biol Chem. 査読有 2009;284:2680-9.

④Kawanishi H, Nishiyama H, Nakamura E, Ogawa O. (他 15 名、7 番目). Secreted CXCL1 is a potential mediator and marker of the tumor invasion of bladder cancer. Clin Cancer Res. 査読有 2008;14:2579-87.

⑤Matsui Y, Ogawa O, Nishiyama H. (他 3 名、最後). Cancer-specific enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity with triptolide through an interaction of inactivated glycogen synthase kinase-3beta with p53. Oncogene. 査読有 2008;27:4603-14.

⑥Baba T, Fujita J, Fukumoto M. (他 7 名、最後から 3 番目). Analysis of gene and protein expression of cytochrome P450 and stress-associated molecules in rat liver after space flight. Pathol Int. 査読有 2008;58:589-595

⑦Qiu W, Fujita J, Xiao ZX. (他 4 名、最後から 2 番目). Retinoblastoma protein modulates gankyrin-MDM2 in regulation of

p53 stability and chemosensitivity in cancer cells. Oncogene. 査読有 2008;27:4034-43.

⑧Umamura A, Itoh K, Fujita J. (他 7 名、最後). Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma. Hepatology. 査読有 2008;47:493-502.

[学会発表] (計 3 件)

①藤田潤、増田智子、西山博之、伊藤克彦。低温ショック蛋白質 Cirp 遺伝子欠損がマウス未分化精原細胞に与える影響。第 98 回日本泌尿器科学会総会 (2010.4.29、盛岡)

②藤田潤、増田智子、西山博之、伊藤克彦。低温ショック蛋白質 Cirp 遺伝子欠損がマウス雄性生殖細胞系列に与える影響。第 97 回日本泌尿器科学会総会 (2009.4.17、岡山)

③藤田潤、東辻宏明。精巣の存在する軽度低温環境下で特異的に遺伝子発現を維持する機構。第 96 回日本泌尿器科学会総会 (2008.4.25、横浜)

[図書] (計 1 件)

①Fujita J. Springer, Encyclopedia of Cancer, 2nd ed. Schwab M (ed), 2008; 1205-1207.

[産業財産権]

○取得状況 (計 7 件)

①名称: Sequence capable of enhancing the expression of gene under moderately low temperature.

発明者: FUJITA JUN

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 140430

取得年月日: 2011.1.14

国内外の別: 国外

②名称: 軽度の低温により遺伝子の発現を促進させる配列

発明者: 藤田潤

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 4613160

取得年月日: 2010. 10. 22

国内外の別: 国内

③名称: Control elements that enhance gene transcription at moderately low temperature.

発明者: FUJITA JUN

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 236893

取得年月日: 2009. 11. 26

国内外の別：国外

④名称：Sequence capable of accelerating  
gene expression at moderately low  
temperature.

発明者：FUJITA JUN

権利者：同上

種類：特許

番号：2005224486

取得年月日：2009. 3. 19

国内外の別：国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 潤 (FUJITA JUN)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50173430

### (2) 研究分担者

西山 博之 (NISHIYAMA HIROYUKI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20324642