

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390091

研究課題名（和文）男性不妊、潰瘍性大腸炎における細胞接着分子 TSLC1 の異常の意義の解析

研究課題名（英文） Analysis of pathological significance of a cell adhesion molecule TSLC1 in male infertility and in ulcerative colitis.

研究代表者

氏名 村上 善則（MURAKAMI YOSHINORI）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30182108

研究成果の概要：

細胞接着分子 TSLC1 の男性不妊症、潰瘍性大腸炎における病理学的意義を検討した。*Tslc1* 遺伝子欠損マウスが精子形成障害を示す知見に基づき、130 例のヒト男性不妊症例を解析し、TSLC1 タンパク質発現欠如を示す 6 例を見出したが遺伝子変異は認めなかった。一方、*TSLC1* 遺伝子の転写制御機構を解明し、精巣での新規結合タンパク質を同定した。さらに TSLC1 タンパク質の発現が潰瘍性大腸炎の病勢に相関することを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学、男性不妊、潰瘍性大腸炎、細胞接着分子

1. 研究開始当初の背景

申請者らは2001年に、肺がんに新規癌抑制遺伝子として免疫グロブリンスーパーファミリ

ー細胞接着分子（IgCAM）をコードする TSLC1/CADM1を同定したが、TSLC1は上皮以外にも精巣、シナプス、マスト細胞、活性

化ナチュラルキラー(NK)細胞などで高発現し、精子形成、種々の炎症、腫瘍免疫などにも関与することが示唆された。

特に申請者らは *Tslc1* 遺伝子欠損マウスが精子形成障害による雄性不妊を示すことを見出し、この際認められる精子細胞の滑脱が、ヒト男性不妊症でも一定の頻度で認められることが共同研究者の武内らにより経験された。

また、申請者らは TSLC1 が炎症や過形成など構造の乱れた上皮細胞でむしろ発現が上昇することを免疫組織染色で認めていたが、TSLC1 が、活性化NK細胞や CD8⁺T 細胞によって特異的に認識される上皮側の抗原であるという知見を踏まえ、炎症性腸疾患の組織での発現を研究協力者らと共同で検討したところ、潰瘍性大腸炎や一部のクローン病の腸上皮で TSLC1 が過剰に発現し、炎症の程度に相関することが予備的ながら見出された。

2. 研究の目的

精子形成障害、炎症性腸疾患という二つの病態における細胞接着分子TSLC1の異常の意義を、分子細胞生物学、マウス個体、患者検体で解析することにより基礎的に解明することを目的とし、下記の4点を明らかにする。

(1) TSLC1 の関わる分子経路を精巢で明らかにし、新たな男性不妊の分子標的を同定する。

(2) ヒト男性不妊症における TSLC1 の関与の実態と意義を明らかにする。

(3) レチノイン酸 TSLC1経路の精子形成における意義を細胞、マウスレベルで解明し、遺伝子発現回復による不妊症治療の可能性に関する基礎的検討を行なう。

(4) ヒト潰瘍性大腸炎、クローン病における TSLC1 の関与の実態と意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト男性不妊症における TSLC1 の関与の実態と意義の解析：

特発性男性不妊症の患者に対してインフォームドコンセントを得た上で行った精巢生検組織、或いは倫理審査を経て使用が認められた過去の症例の精巢生検組織を試料とし、精細管上皮における TSLC1 の発現の有無を抗 TSLC1 抗体を用いた免疫組織染色により検討した。また *TSLC1* 遺伝子変異の有無は、*TSLC1* 全エクソン、並びにエクソン・イントロン接合部の塩基配列決定により検索した。

(2) 精巢、精子細胞における TSLC1 分子経路の解明とその意義の解析：

Tslc1 遺伝子欠損マウスにおける雄性不妊は、精子細胞における TSLC1 の機能欠損による未熟精子細胞のセルトリ細胞からの滑脱が原因である。しかし、TSLC1の細胞接着能は細胞内の結合蛋白質群との相互作用に依存するものであるため、細胞内結合蛋白質の機能欠損も同様の滑脱を惹起する可能性がある。そこで、これまでに自ら同定した 4.1 群タンパク質、MAGuK 群タンパク質の精子細胞における発現を免疫組織染色により解析した。また、酵母2ハイブリッド法、免疫沈降物の質量分析法により、新たな TSLC1 結合タンパク質を検索した。

(3) *TSLC1* 遺伝子のレチノイン酸 (RA) などによる発現誘導の分子機構の解析：

TSLC1 遺伝子の構造異常のみならず、遺伝子発現の低下によって精子形成障害を生じる例が想定される。その介入を最終の目的として、ルシフェラーゼ・アッセイ、EMSA 解析、染色体免疫沈降法(ChIP) などの手法により、RA によって *TSLC1* 遺伝子が発現誘導される分子機構を解析した。一方、*TSLC1* 遺伝子導入マウスの作成を進め、得られたマウスと、共同研究により入手するレチノイン酸受容体 α 遺伝子欠失マウスとの交配を準備した。

(4) ヒト潰瘍性大腸炎における TSLC1 の関与の実態と意義の解明：

TSLC1 は、活性化 NK 細胞や CD8⁺T 細胞に特異的に発現する IgCAM である CRTAM と特異的な結合を形成する上皮側の抗原としても作用し、免疫細胞による上皮細胞の特異的な認識と細胞障害性反応に関与することが示唆される。そこで、潰瘍性大腸炎 67 症例の大腸粘膜上皮に関して TSLC1 の発現を免疫組織染色により解析し、臨床的、病理学的指標との相関の有無を検討した。また、TSLC1 の様々な部位に対する単クローン性抗体、多クローン性抗体を作成し、診断効率を高めた。

4. 研究成果

(1) ヒト男性不妊症における TSLC1 の関与の実態と意義の解析

特発性男性不妊症患者の精巣生検組織で、Tslc1 遺伝子欠損マウスが示した精子細胞のセルトリ細胞からの滑脱と類似の形態を示す例の中で、精巣組織での TSLC1 タンパク質の発現低下が認められた 6 例について、TSLC1 遺伝子の塩基配列解析を行ったが、変異は認められなかった。

(2) 精巣、精子細胞における TSLC1 分子経路の解明とその意義の解析

分化、成熟中の精子細胞が接着する相手細胞であるセルトリ細胞において、TSLC1 タンパク質と結合する候補分子を TSLC1 免疫沈降物の質量分析によって検索し、さらに個別の結合活性に関する解析を加えることにより、3 種の新規結合タンパク質を同定した。現在、これら分子群の精子形成における生理学的、病理学的意義を検討しているが、少なくとも 1 種はセルトリ細胞で発現する膜タンパク質であることを確認した。

(3) TSLC1 転写制御の精子形成における意義の解明

レチノイン酸による TSLC1 遺伝子の発現誘導が転写活性化によること、また転写活性化には TSLC1 遺伝子上流の Sp1 結合部位が重要であることを、ルシフェラーゼ・アッセイ等を用いて見出した。また Tslc1 遺伝子欠損マウスの遺伝的相補による精子形成能の回復を目的として前年度までに作成した TSLC1 トランスジェニック・マウスの精巣での TSLC1 タンパク質の発現を確認し、Tslc1 遺伝子欠損マウスとの戻し交配の準備を完了した。

(4) ヒト潰瘍性大腸炎における TSLC1 の関与の実態と意義の解明

潰瘍性大腸炎症例 67 例について大腸粘膜上皮における TSLC1 の発現の程度を検討し、潰瘍性大腸炎の炎症の強さの指標である Matts グレードと TSLC1 発現とが関連することを見出した。

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 6 件)

Hagiyama M, Ichiyangi N, Kimura BK, Murakami Y, Ito A. Expression of a soluble isoform of cell adhesion molecule 1 in the brain and its involvement in directional neurite outgrowth. Am J Pathol, in press. (査読あり)

Ando K, Ohira M, Ozaki T, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A. TSLC1 mapped top 11q23 is a candidate tumor suppressor in neuroblastoma. Int J Cancer, 123:2087-2094, 2008. (査読あり)

Takeuchi T, Neri QV, Palermo GD. Male gamete empowerment. Ann N Y Acad Sci, 1127:64-66, 2008. (査読あり)

Wakayama T, Sai Y, Ito A, Kato Y, Kurobo M, Murakami Y, Nakashima E, Tsuji A, Kitamura Y, Iseki S. Heterophilic binding of the adhesion molecules poliovirus receptor and immunoglobulin superfamily 4A in the interaction between mouse spermatogenic and Sertoli cells. Biology Reprod, 76:1081-1090, 2007. (査読あり)

Ito A, Hagiyaama M, Oonuma J, Murakami Y, Yokozaki H, Takaki M. Involvement of the SgIGSF/Necl-2 adhesion molecule in degradation of mesenteric mast cells. J Neuro Immunol, 184:209-213, 2007. (査読あり)

Kashibuchi K, Tomita K, Schalken JA, Kume H, Takeuchi T, Kitamura T. The prognostic value of E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin in bladder cancer patients who underwent radical cystectomy. Int J Urol, 14:789-794,2007. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yoshinori Murakami. Involvement of a tumor suppressor CADM1/TSLC1 in lung tumorigenesis. The 13th Japan-Korea Cancer Research Workshop. Symposium. 2008年12月12-14日。Daejon, Korea.

山田大介、永田政義、尾鼻孝滋、増田万里、市原博美、増田智子、吉田緑、堤雅弘、北村唯一、村上善則。ヒト家族性腫瘍のモデルとしての Tslc1/Cadm1 遺伝子欠損マウスの解析。第12回家族性腫瘍学会。2007年6月16日。高知市

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 善則 (MURAKAMI YOSHINORI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号 30182108

(2)研究分担者

武内巧 (TAKEUCHI TAKUMI)

東京大学・大学院医学部附属病院・准教授

研究者番号 90167487

(3)連携研究者

なし