

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591898

研究課題名 (和文)

DNA 修復欠損マウスの精子形成不全における精巣幹細胞のゲノム維持機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of genome maintenance of testicular stem cells in DNA deficient mice with impaired spermatogenesis.

研究代表者

中根 裕信 (NAKANE HIRONOBU)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：10304205

研究成果の概要 (和文)： A 群色素性乾皮症(XP)遺伝子(Xpa 遺伝子)を欠損した Xpa 遺伝子欠損マウス(Xpa マウス)が、XP 患者の皮膚癌だけでなく、2 年令で発育不全、悪性腫瘍の多発、精子形成不全を示し、XP の病態モデルとなることを示した。経時的な遺伝子発現の詳細な分析から、DNA 修復、細胞周期(チェックポイント)、細胞死に関わる遺伝子の発現異常が検出された。さらに、これら遺伝子発現異常を示す同月令の Xpa マウス精巣病変を精細管のステージも考慮して調べたところ、興味深いことに組織変性と細胞増殖の混在した病変が見られ、今後の病態解明につながるものと思われる。

研究成果の概要 (英文)： We have showed that xeroderma pigmentosum group A (Xpa) gene-knockout mice [Xpa (-/-) mice] provide a valuable model for growth retardation, internal tumor formation, impaired spermatogenesis as well as for UV-induced skin tumors in XPA patients. Gene expression analysis of each aged Xpa mice testis showed a different expression pattern of DNA repair gene, cell cycle-related gene(checkpoint), apoptosis-related gene compared to control. We found other pathological changes of the aged Xpa mice testis. These data will help us to understand the impaired spermatogenesis in the Xpa mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・アンドロロジー

キーワード：DNA 修復欠損マウス、精子形成、精巣幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 修復欠損マウス(Xpa マウス)が加齢と共に進行性の精子形成不全を示した。12

ヶ月令 Xpa マウス精巣の遺伝子発現解析から、DNA 修復系・幹細胞特異的な遺伝子発

現も低下し、修復異常および幹細胞の機能不全の可能性が考えられた。

(2) 生殖補助技術(ART)では、精子ゲノムの質の維持が重要であり、そのゲノム維持機構の解明が待たれている。また特発性造精不全の病態にも関わる可能性もある。

2. 研究の目的

DNA 修復欠損マウスが加齢と共に進行性の精子形成不全を示した。12ヶ月令 Xpa マウス精巢の遺伝子発現解析から、DNA 修復系・幹細胞特異的な遺伝子発現も低下し、修復異常と幹細胞の機能不全が、精子形成不全に関わる可能性があった。本研究は、DNA 修復欠損マウス精巢で、幹細胞の機能異常が精子形成不全に関与するか否かを検証し、幹細胞のゲノム維持機構の解明を目的とする。

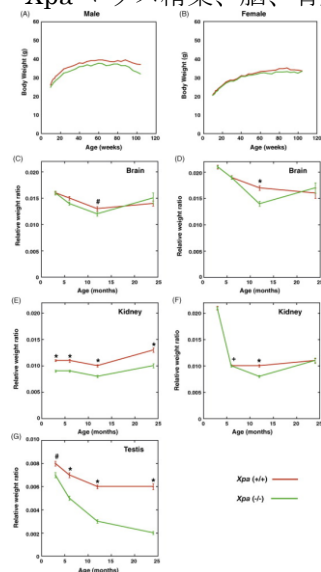
3. 研究の方法

加齢による XPA マウス精子形成不全の経過を知るために、各時期の Xpa マウス精巢および自然発症腫瘍の病理学的な検索を行った。また、精巢幹細胞の機能不全との関係を調べるため、各時期・各精細管の変性状態を分類した。各時期(3,6ヶ月令)の Xpa マウス精巢の遺伝子発現の経過を DNA microarray で解析した。

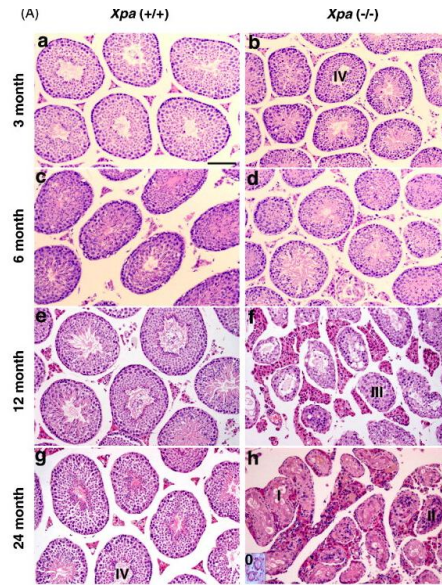
4. 研究成果

A 群色素性乾皮症遺伝子(Xpa 遺伝子)を欠損した Xpa 遺伝子欠損マウス(Xpa マウス)の解析から、このマウスが XP 患者の臨床症状の皮膚癌だけでなく、24ヶ月令で発育不全、悪性腫瘍の高頻度発生、精子形成不全を示すことから、XP の病態モデルとなることを論文として発表した(DNA Repair,7:1938-50, 2008)。

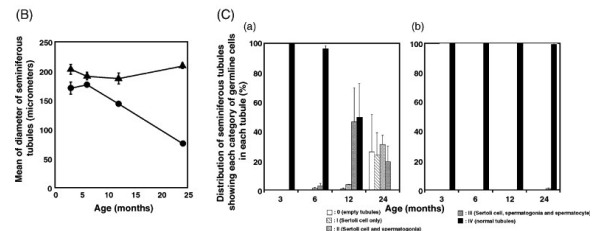
・ Xpa マウス精巢、脳、腎臓の発育不全



・ Xpa マウスの精子形成不全



・ Xpa マウス精巢の変性過程 (精細管直径の減少と変性精細管の出現)



・ Xpa マウスの自然発症腫瘍の種類と頻度

Histopathological findings of spontaneous tumors in the Xpa (-/-) and Xpa (+/+) mice.

Mouse No. (Genotype)	Sex	Age (Months)	Histological type	Anatomic site
1(-/-)	M	12	malignant lymphoma	spleen, LN
2(-/-)	M	12	well-differentiated adenocarcinoma (papillary)	lung
3(-/-)	F	12	malignant lymphoma	spleen
4(-/-)	F	12	malignant lymphoma	spleen, liver, kidney
5(-/-)	F	18	hemangiosarcoma (haemoangiopericytoma)	right leg
6(-/-)	F	18	malignant lymphoma	spleen
7(-/-)	M	21	[HCC alveolar tumor	liver lung
8(-/-)	M	24	[HCC renal cell carcinoma	liver kidney
9(-/-)	M	24	well-differentiated adenocarcinoma (papillary) [malignant lymphoma	lung LN
10(-/-)	M	24	malignant lymphoma	kidney
11(-/-)	M	24	moderately differentiated squamous cell carcinoma	left ear
12(-/-)	M	24	[malignant lymphoma well-differentiated adenocarcinoma (papillary)	spleen, liver, kidney lung
13(-/-)	M	24	HCC	liver
14(-/-)	F	24	malignant lymphoma	lung, spleen, liver, kidney
15(-/-)	F	24	malignant lymphoma	LN
16(-/-)	F	24	malignant lymphoma	LN
17(-/-)	F	24	malignant lymphoma	LN
18(-/-)	F	24	HCC	liver
19(+/+)	M	24	well-differentiated adenocarcinoma (papillary)	lung
20(+/+)	M	24	adenocarcinoma	lung
21(+/+)	M	24	HCC	liver
22(+/+)	M	24	malignant lymphoma	spleen
23(+/+)	M	24	adenocarcinoma	lung
24(+/+)	F	24	malignant lymphoma	LN
25(+/+)	F	24	malignant lymphoma	spleen, LN
26(+/+)	F	24	malignant lymphoma	spleen, LN
27(+/+)	F	24	malignant lymphoma	spleen, lung
28(+/+)	F	24	malignant lymphoma	spleen, liver, LN, lung

LN: lymph node, HCC: hepatocellular carcinoma

Tumor spectrum in *Xpa*^{-/-} and *Xpa*^{+/+} mice

Type of tumor	<i>Xpa</i> ^{-/-}		<i>Xpa</i> ^{+/+}	
	12mo. No.(% of tumor incidence)	24*mo. No.(% of tumor incidence)	12mo. No.(% of tumor incidence)	24*mo. No.(% of tumor incidence)
Lung cancer (adenocarcinoma, alveolar tumor)	1 (1.8)	3 (5.9) ^{a), b), c)}	0	3 (5.8)
Hepatocellular carcinoma(HCC)	0	4 (7.8) ^{a), d)}	0	1 (1.9)
Malignant lymphoma	3 (5.5)	8 (15.7) ^{b), c)}	0	6 (11.5)
Other cancer				
hemangiosarcoma	0	1 (2)	0	0
renal cell carcinoma	0	1 (2) ^{d)}	0	0
squamous cell carcinoma	0	1 (2)	0	0
Total	4 (7.3)	18 (35.3)	0	10 (19.2)
Total No. of mice examined	55	51	49	52

Xpa^{-/-} mice bearing multiple tumors
a) : lung cancer, hepatocellular carcinoma
b), c) : lung cancer, malignant lymphoma
d) : hepatocellular carcinoma, renal cell carcinoma
* 24 month old mice contained 18, 21 month old mice.
() : % of tumor incidence

今回、3、6ヶ月令 *Xpa* マウス精巣サンプルを採取するのにあたり、上記アレイ解析に用いた12ヶ月令 *Xpa* マウスの遺伝的背景を合わせるため、新たに凍結胚から *Xpa* マウスを作成し実験系を立ち上げた。同マウスを用いて経時的に *Xpa* マウス精巣の遺伝子発現を解析した。

本研究開始当初、12ヶ月令 *Xpa* マウス精巣で精巣幹細胞に特異的な遺伝子発現の低下があり精巣幹細胞の機能低下の可能性を考えたが、さらに3、6ヶ月令精巣を加えた遺伝子発現解析において顕著な差がみられなかった。しかし、同解析から、DNA修復、細胞周期(チェックポイント)、細胞死に関わる遺伝子の発現異常が検出された。さらに、これら遺伝子発現異常を示す同月令の *Xpa* マウス精巣病変を各分化段階にある精子形成過程細胞の種類に注目して調べたところ、興味深いことに組織変性と細胞増殖の混在した病変が見られ、今後の病態解明につながる糸口になると思われる。今後、上記遺伝子発現解析の確認のとれたDNA修復欠損マウスと *Xpa* マウスとの2重欠損マウス精巣の解析によって、DNA修復欠損マウスの精子形成不全における精巣幹細胞のゲノム維持機構の病態が解明される。

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3件)

① Histopathological analysis of impaired spermatogenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (*Xpa*)-deficient mice

Hironobu Nakane, Kiyoji Tanaka, Toshio Kameie, Sumire Inaga, Tomonori Naguro
The Journal of Physiological Sciences,
Vol.61.supple.1, S218, 2011 査読なし

② スクレオチド除去修復欠損マウス -転写異常とその病態-

中根裕信

医学のあゆみ 1月10日号、228巻、p157-158、2009 査読なし

③ Impaired spermatogenesis and elevated spontaneous tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (*Xpa*)-deficient mice.

Hironobu Nakane, Seiichi Hirota, Philip J. Brooks, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Yoshitake Nishimune, Akihiro Iino, Kiyoji Tanaka, DNA Repair (Amst). 2008 ;vol.7(No.12):p1938-50. 査読あり

[学会発表] (計9件)

① Differential DNA damage signaling accounts for distinct neural apoptotic responses in DNA repair deficient mice of ATLD, NBS, XPA, XPG - Insight from neuropathology of DNA repair-deficiency disorders -

Hironobu Nakane

1st RIRBM International Symposium — Genome Damage and Non-Cancerous Diseases — (invited speaker)
March 3 – 4 (Thu. – Fri.), 2011 Koujin Conference Hall on Kasumi Campus, Hiroshima University

② DNA修復異常症におけるDNA損傷応答の違いによる脳神経病変への関与-ATLD, NBS, XPAの神経病変

中根裕信, Erin R. P. Shull, Youngsoo Lee, 栗政明弘, 稲賀すみれ, 名黒知徳, 田中亀代次, Peter J. McKinnon

BMB2010 workshop (招待講演)、平成22年12月8日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

③ CSモデルマウスの解析

中根裕信

コケイン症候群(CS)の集い 2010、平成22年10月30・31日 ロレアル東京アカデミー

(東京都渋谷区代々木)

④ コケイン症候群のモデル動物としての *Xpg* マウス
ヌルマウスの検討

中根裕信、広田誠一、塩見忠博、大浜栄作、亀家俊夫、稲賀すみれ、名黒知徳

第4回日本エピジェネティクス研究会、平成22年5月28-29日、米子市文化ホール(米子市)

⑤ 色素性乾皮症 G 群遺伝子欠損マウス (*XPG* null マウス) の病理学的解析

中根裕信、広田誠一、塩見忠博、大浜栄作、亀家俊夫、稲賀すみれ、名黒知徳

第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、平成22年3月30日、岩手県民会館(盛岡市)

⑥ Impaired spermatogenesis and elevated spontaneous tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (*Xpa*)-deficient mice

Hironobu Nakane, Seiichi Hirota, Kiyoji Tanaka

第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、平成21年3月29日、岡山理科大学(岡山県)

⑦ XP・CS モデルマウスの分子病態

中根裕信

色素性乾皮症全国大会(難病指定記念講演会)、平成20年11月1-2日、あいち健康プラザ(愛知県)

⑧ Pathological analysis of *XPG*-deficient mice

Hironobu Nakane, Seiichi Hirota, Tadahiro Shiomi, Eisaku Ohama, Toshio Kameie, Sumire Inaga, Tomonori Naguro

The 6th 3R Symposium (3R Symposium 2008) Oct.27th-30th, 2008, Tsumagoi Resort

(Kakegawa, Shizuoka)

⑨ Hypersensitivity to oxidative damage in the developing nervous system of XPA mice
Hironobu Nakane, Akihiro Kurimasa, Kiyoji Tanaka

The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008, April 22[Tue]-26[Sat], 2008. Ohtsu Prince Hotel (Ohtsu, Shiga)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中根 裕信 (NAKANE HIROBOBU)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号: 10304205

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし