

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592446

研究課題名(和文)低温ショック蛋白質の精子形成における役割に関する研究

研究課題名(英文) Roles of mammalian cold shock proteins in spermatogenesis

研究代表者

藤田 潤 (FUJITA, JUN)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50173430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：低温ショック蛋白質Cirpの精子形成における機能とその作用機序を明らかにし、軽度低温の生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

1. CirpはDyrk1bを抑制して未分化精原細胞の増殖を促進した。2. Cirpは体内時計遺伝子の制御により概日リズムの安定化に参与した。3. Cirpは細胞外から作用して炎症を増悪させた。マウスに実験的に肝がんや大腸がんを誘発するとCirp欠損マウスでは、炎症や発がんが抑制された。低温ショック蛋白質が、細胞の保護、増殖促進といった有益な作用だけでなく、炎症や発がんの促進という不都合な作用も示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the functions of the cold shock protein Cirp in vivo, we produced cirp-knockout mice. We found that Cirp facilitates proliferation of undifferentiated spermatogonia by inhibiting Dyrk1b. Cirp confers robustness to circadian oscillators through regulation of Clock expression. CIRP functions extracellularly as well and is a damage-associated molecular pattern molecule that promotes inflammatory responses in shock and sepsis. Cirp promotes the development of inflammation and carcinogenesis in liver and colon through regulating apoptosis and production of cytokines in inflammatory cells. Thus, Cirp has both beneficial and detrimental effects in vivo.

研究分野：分子医学

キーワード：ストレス応答 精巣 炎症 体内時計 発がん

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精巣は通常体温よりも低い温度環境下であり、実験的・臨床的に 37 度環境下に置かれると、精子形成細胞は増殖・分化が阻害され多くが死滅する。高温に対するストレス応答については熱ショック蛋白質 Hsp の解析をはじめいろいろな研究がなされているが、哺乳類での低温に対する細胞応答の研究は遅れており、確立した低温ショック蛋白質としては我々の報告した Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) 及び Rbm3 のみである。ともに 37 度から 32 度に培養温度を下げるとほとんどの細胞株で発現が亢進し、停留精巣になると発現が低下する。また、いろいろなストレスに対する細胞の抵抗性を上昇させ、抗アポトーシス作用をもつことからオンコジンとも言われている。

我々が Cirp 遺伝子ノックアウトマウスを作成したところ、雄性不妊ではなかったが、未分化 spermatogonia の数が減少していた。Rbm3 遺伝子ノックアウトマウスも雄性不妊ではないと報告されたが、詳細な解析はなされていない。

### 2. 研究の目的

低温ショック蛋白質 Cirp と Rbm3 の生体における機能を、それぞれの遺伝子ノックアウトマウスを利用して明らかにする。細胞株を利用して、低温ショック蛋白質に影響を受ける RNA や、相互作用する蛋白質を明らかにし、その分子をもとに低温ショック蛋白質の新たな機能を細胞、個体レベルで見いだす。これらにより、哺乳類精巣が軽い低温環境下にあることの生物学的な意味を考える。また、ヒト男性不妊症および精巣腫瘍の時に低温ショック蛋白質発現に変化が起きていないかどうかを解析し、臨床的な応用の可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

ヒト胎児腎臓 293 細胞、HeLa 子宮癌細胞、骨肉腫細胞株 U-2 OS、マウス NIH/3T3 細胞、マウス胎児由来線維芽細胞(MEF)は 10%胎仔あるいは仔牛血清添加 DMEM 培地を用いて 5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。培養温度は 37 度か 32 度。一部、温度が 34 度から 38 度へ 24 時間周期で日内変動する培養器を用いた。

細胞遊走能は、35 mm 培養皿にコンフルエントに細胞を増殖させ、青色ピペットチップでかき傷をつけ、23 時間後に写真撮影により細胞の移動を測定した(スクラッチ試験)。細胞死の誘導には TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) と cycloheximide (10  $\mu$ g/ml) を培養液に添加し、トリパン青染色で生存細胞数をカウントした。サイトカインの影響解析するために、Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ , 10 ng/ml)、Tumor Growth Factor (TGF, 2 ng/ml)、Interleukin (IL)-1 $\beta$  (10 ng/ml) を培養液に

添加し、4 時間後に細胞を回収した。

#### (2) 遺伝子ノックアウトマウス

cirp 遺伝子を欠損させたマウスを作成し、野生型マウスと掛け合わせて生殖能を解析した。精巣から未分化精粗細胞を c-kit、EpCAM、6-integrin の発現を指標として精製した。精子形成の回復は、マウスに抗癌剤 Busulfan (30 mg/kg 体重) を投与し、経時的に精巣の組織、精子形成細胞数を解析して判定した。ノックアウトマウスから線維芽細胞株を樹立し、Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation Regulated Kinase 1B (Dyrk1b) や Cirp の発現を shRNA や cDNA のトランスフェクションにより変動させ、細胞周期、細胞増殖、p27 及び cyclin D1 蛋白質の量やリン酸化の変化を解析した。

rbm3 遺伝子欠損マウスは東京大学の谷口から入手し、7 回以上 C57BL/6 にバッククロスを掛けて実験に使用した。

#### (3) 動物モデル

皮膚創傷治癒過程の解析のため、麻酔下で生検トレパン(径 6 mm)によりマウス背部皮膚に全層欠損創を作成した。

劇症肝炎は、D-galactosamine (GalN, 1000 mg/kg) と lipopolysaccharide (LPS, 0.1, 35  $\square$ g/kg) を腹腔内に投与し誘発した。その後マウスを 25 度(低温群)または 35 度(対照群)で飼育した。血清 alanine aminotransferase (ALT) 値の測定により、肝組織の損傷を判定した。

マウス発がん実験は、10 週齢雄マウスに 3% デキストラン硫酸を投与して Colitis-associated cancer (CAC) を、ジエチルニトロサミン(DEN)を投与して肝がんを発生させた。

出血性ショックのモデルは、麻酔下でマウスあるいはラットの大腿動静脈にカテーテルを留置し、10 分以内に血圧が 25-30 mmHg になるまで出血させ 90 分間観察。次いで蘇生のため出血量の 2 倍の輸液を 60 分かけて行い作成した。

#### (4) 遺伝子発現、Cirp 結合 RNA の解析

蛋白質の発現量はウェスタンブロット解析で、コントロールとしてアクチンまたは p84 を用いて行った。RNA 発現量は cDNA に変換した後に定量的 PCR(RT-qPCR)法で解析した。

Cirp 蛋白質に結合する RNA の同定は、Cross-Linking and Immuno-Precipitation で結合 RNA を精製して塩基配列決定を行う CLIP-seq 法により、網羅的に行った。

#### (5) 軽度低温応答エレメント(MCRE)の同定:

Luciferase レポーター上流に cirp ゲノムの 5' 領域を繋いだ発現ベクターを作成し、293 細胞に一過性にトランスフェクションした。32 度でのレポーター発現量が 37 度よりも多くなる cirp ゲノム領域を決定し、その配列

を欠損させていくことにより MCRE を決定した。

MCRE の塩基配列から結合する転写因子を予測し、Chromatin Immuno-Precipitation 法により、cirp ゲノムの 5' 領域への結合を解析した。また shRNA によりその転写因子の発現を低下させ、32 度での Cirp 発現誘導に対する影響を検討した。

(6) 実験動物を用いた実験及び DNA 組換えはそれぞれ施設の専門委員会に申請、承認を得た。

#### 4. 研究成果

(1) 低温ショック蛋白質欠損が生殖能に与える影響

cirp ノックアウトマウスは野生型マウスと比べ、形態的な異常や妊孕性の変化は認めなかったが、未分化精原細胞の数が減少していた。さらに、Busulfan 投与後の未分化精原細胞数の回復が遅延した。

rbm3 ノックアウトマウスを野生型マウスと、あるいは rbm3 ノックアウトマウス同士で掛け合わせたが、妊娠、出産への影響は検出できなかった。また、精巣の重さ、形態、組織構築、精子の形態にも異常がなかった。rbm3 と cirp のダブルノックアウトマウスもメンデル遺伝に従って生まれ、形態学的にも異常を認めなかった。精巣の重さ、形態、組織構築も正常であった。

(2) 炎症・発がんへ与える影響

Cirp は細胞外にも存在し、炎症性サイトカインの分泌を促進して炎症を増悪させた。重傷出血性ショックの患者血清、出血性ショックや敗血症のモデルマウス、ラットの血清中に Cirp タンパク質を検出した。細胞外の Cirp が TLR4 を介してサイトカインの分泌を亢進させ、全身性炎症反応症候群を起こすこと、Cirp ノックアウトマウスでは全身性炎症反応症候群を起こしにくいことを見いだした。

CAC モデルにおいて、Cirp 欠損マウスでは野生型マウスに比べ大腸での TNF $\alpha$ 、IL23/IL17、Bcl-2、Bcl-xL、Sox2 発現と Dcl1k1(+) 細胞数が低下し、炎症が軽く、がん発生が少なかった。DEN による肝の炎症やがん発生も Cirp 欠損マウスでは抑制された。

(3) 細胞増殖に与える影響

マウス spermatogonia 細胞株及び線維芽細胞株に Cirp を過剰発現、あるいは発現抑制した結果、Cirp の細胞増殖促進活性を見いだした。Cirp が結合する蛋白質を酵母 2 ハイブリッド法で同定し、Cirp の細胞増殖促進活性は Cirp が Dyrk1b 蛋白質に結合してそのキナーゼ活性を抑制し、基質である p27 蛋白質の不安定化及び cyclin D1 の安定化を起こして細胞周期を進行させるためであることを示した。

Cirp は細胞増殖を促進する場合も抑制す

る場合もあり、マウス皮膚線維芽細胞では増殖に影響せず、細胞運動能を亢進した。この作用のシグナル伝達経路を明らかにし、ノックアウトマウスで皮膚創傷の治癒が遅れることを見いだした。

(4) Cirp に結合する RNA の同定

CLIP-seq 法により Cirp に結合する RNA として、Per3、Rora1、Sirt1、Hspa41 他多くの遺伝子を同定した。特に主要な体内時計遺伝子である Clock は、Cirp により制御を受け、概日リズムが増強・安定化された。炎症性サイトカイン TNF や TGF は Cirp の発現を抑制することにより、体内時計の遺伝子発現を抑制していた。

(5) Cirp の発現制御

一過性トランスフェクション法を用いて、cirp ゲノムの 5' 領域に存在する 5'-TCCCCGCC-3' 配列が MCRE であると同定した。この配列に結合する転写因子は Sp1 であり、軽度低温による Cirp の発現誘導には Sp1 が必要であった。

(6) 連携研究者の施設にてヒト精巣腫瘍症例を免疫染色し、がん蛋白質ガンキリンが正常精母細胞だけではなく一部の腫瘍で高発現していることを見いだした。

低温ショック蛋白質が、細胞の保護、増殖促進・抑制といった有益な作用だけではなく、炎症や発がんの促進という不都合な作用も示すことが明らかになった。軽度の低温環境は、精巣だけではなく皮膚等の臓器にも関係し、その生物学は臨床的にも重要であることが示唆された

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

Sakurai T, Fujita J. (他9名、最後から2番目) Cold-inducible RNA-binding protein promotes the development of liver cancer. *Cancer Sci.* 査読有 2015 106:352-8. doi: 10.1111/cas.12611.

Sakurai T, Fujita J. (他8名、最後から2番目) Stress response protein Cirp links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *Cancer Res.* 査読有 2014. 74:6119-28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0471.

Adachi T, Sakurai T, Fujita J. (他8名、最後から2番目) Involvement of Heat Shock Protein A4/Apg-2 in Refractory Inflammatory Bowel Disease. *Inflam Bowel Dis* 査読有 2014. 21:31-9. doi: 10.1097/MIB.0000000000000244.

Lopez MA, Fujita J, Fontana A. (他 3 名、最後から 2 番目) Tumor necrosis factor and transforming growth factor regulate clock genes by controlling the expression of the cold inducible RNA-binding protein (CIRBP). *J Biol Chem.* 査読有 2014. 289:2736-44.  
doi: 10.1074/jbc.M113.508200.

Ando S, Fujita J, Nishiyama H. (他 7 名、最後から 2 番目) Expression of the oncoprotein gankyrin and phosphorylated retinoblastoma protein in human testis and testicular germ cell tumor. *Int J Urol.* 査読有 2014. 21:992-8.  
doi: 10.1111/iju.12484.

Qiang X, Fujita J, Wang P. (他 12 名、最後から 5 番目) Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis. *Nat Med.* 査読有 2013. 19:1489-95.  
doi: 10.1038/nm.3368.

Liu Y, Higashitsuji H, Fujita J. (他 6 名、最後) Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 2013. 432:22-7.  
doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.09.

Sakurai T, Kudo M, Fujita J. (他 9 名、最後) Hypothermia Protects against Fulminant Hepatitis in Mice by Reducing Reactive Oxygen Species Production. *Dig Dis.* 査読有 2013. 31:440-6.  
doi: 10.1159/000355242.

Masuda T, Itoh K, Fujita J. (他 13 名、最後) Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有 2012. 109(27):10885-90.  
doi: 10.1073/pnas.1121524109.

Morf J, Fujita J, Schibler U. (他 4 名、最後から 3 番目) Cold-inducible RNA-binding protein modulates circadian gene expression posttranscriptionally. *Science.* 査読有 2012. 338:379-83.  
doi: 10.1126/science.1217726.

Sumitomo Y, Higashitsuji H, Fujita J. (他 7 名、最後) Identification of a novel enhancer that binds Sp1 and contributes to

induction of cold-inducible RNA-binding protein (cirp) expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 査読有 2012. 12:72.  
doi: 10.1186/1472-6750-12-72.

Gajjar M, Fujita J, Fähræus R. (他 4 名、最後から 3 番目) The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer Cell.* 査読有 2012. 21:25-35.  
doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.016.

Nambu Y, Fujita J, Sugai M. (他 11 名、最後から 4 番目) In situ differentiation of CD8 cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. *Sci Rep.* 査読有 2012. 2:642.  
doi: 10.1038/srep00642.

〔学会発表〕(計 4 件)

藤田潤、伊藤克彦、熱ショック蛋白質 Apg-1 (Hspa41/Osp94/HspH3) 欠損によるマウス雄性不妊の機序、第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.25、神戸市

藤田潤、低温ショック蛋白質 Cirp (Cold-Inducible RNA-binding Protein) の生理的な機能の解析、第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013.4.28、札幌市

藤田潤、ほ乳類低温ショックタンパク質 Cold-Inducible RNA-binding Protein の生理機能、第 7 回臨床ストレス応答学会大会、2012.11.24、東京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田潤 (FUJITA, Jun)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：5 0 1 7 3 4 3 0

### (3) 連携研究者

西山 博之 (NISHIYAMA, Hiroyuki)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：2 0 3 2 4 6 4 2