

京都大学	博士（医学）	氏名	山本 真子
論文題目	The transformation suppressor gene <i>Reck</i> is required for postaxial patterning in mouse forelimbs (がん抑制遺伝子 <i>Reck</i> はマウス前肢の前後軸形成に必要である)		
(論文内容の要旨)			
<p>悪性形質転換抑制遺伝子として同定された <i>RECK</i> は、GPI アンカー型 MMP 制御因子をコードする。多くの固形腫瘍で発現低下がみられ、がん細胞株での強制発現は血管新生、浸潤、転移、腫瘍形成などを抑制する。一方、<i>Reck</i> 遺伝子欠損マウスは、胎生 10.5 日頃に死亡するため、それ以降の発生および成体における <i>Reck</i> の役割については不明の点が多い。</p> <p>本研究では、発現量が正常の半分以下に低下した変異 <i>Reck</i> 遺伝子座 (<i>R_{Low}</i>) を用いて、この問題に検討を加えた。<i>R_{Low}/-</i> マウス (以下 low-<i>Reck</i> マウス) は、四肢に特徴的な表現型を示す。すなわち (1) 足背に生ずる角化突起物、(2) 丸く多孔化した末節骨、(3) 前肢にのみ右側優性に見られる後方骨 (第 5、4 指、尺骨など) の低形成または欠損、の 3 つである。この内、(3) は、11.5 日胚において既に、肢芽先端後方部 [zone of polarizing activity (ZPA) と一致する部位] の低形成として現れ、細胞分布の不均一性、肢芽表層組織の損傷、apical ectodermal ridge (AER) の低形成などを伴う。また初期間葉組織選択的 <i>Reck</i> 欠損 (<i>Reck-flox; Prx1-Cre</i>) によっても同様の表現型が見られた。</p> <p>これらの表現型の原因を究明する目的で以下の 3 種の実験を行った。第一に、<i>Reck</i> リポーターマウス (<i>Reck-CreERT2; R26R</i>) を用い、<i>Reck</i> 発現細胞の挙動を解析した。野生型 10.5 日胚では <i>Reck</i> 陽性細胞は肢芽の近位前方部分に局在し、発生が進むにつれて先端部に広がる。一方、変異体では、<i>Reck</i> 陽性細胞は数が少なく、不均一な分布を示し、発生が進むにつれて広い範囲に拡散し、先端部にあまり到達しない。</p> <p>第二に、whole-mount in situ hybridization (WISH) により、肢芽パターン形成に関わる遺伝子の発現を解析した。ZPA で産生され前後パターン形成に関わる <i>Shh</i> の発現は、10.5 日胚では野生型に比べて弱く、11.5 日胚では ZPA 領域自体の欠損が見られた。<i>Shh</i> の標的遺伝子 (<i>Gli1</i>, <i>Ptch1</i>, <i>Grem</i>) にも発現低下や分布異常が見られた。AER から産生され肢芽の近遠パターン形成に関わる <i>Fgf4</i>, <i>Fgf8</i> では、発現領域の短縮や途切れが見られた。肢芽の背側上皮 (dorsal ectoderm; DE) から産生され背腹パターン形成に関わる <i>Wnt7a</i> とその標的遺伝子 <i>Lmx1b</i> の発現は変異体で顕著に減弱し、腹側の運命決定に関わる <i>En1</i> 遺伝子の発現領域の拡大も見られた。</p> <p>第三に、3 つの系 [A. 培養未分化間葉細胞、B. 培養上皮細胞、C. 12.5 日胚の肢芽] において遺伝子およびタンパク質の発現解析を行った。その結果、A では、<i>Reck</i> が <i>Igf2</i> を強く発現誘導し、<i>Wnt7a</i>, <i>Fgf8</i>, <i>Igf2</i> が <i>Reck</i> 発現を高め、カドミウム、エタノールなどの催奇形因子が <i>Reck</i> 発現を低下させることを、B では、WNT7A が内在性 <i>Wnt7a</i> の発現を強く抑制し、<i>Igf2</i> が <i>Wnt7a</i> の発現を上昇させないことを、また、変異体由来の材料 C では、<i>Igf2</i> が確かに発現低下していることを見出した。</p>			

以上の結果から、少なくともマウス前肢においては、肢芽間葉組織に発現する *Reck* が *Igf2* などによる肢芽 DE の活性維持を介して肢芽パターンの形成に寄与することが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

RECK はがん抑制機能を持つ一方、*Reck* 遺伝子欠損マウスは発生初期に死亡するため、それ以降の発生および成体における *Reck* の役割については不明の点が多い。申請者らは、発現量が正常の半分以下に低下した変異 *Reck* 遺伝子座を見出し、そのヘミ接合体 (*Reck* 低下マウス) の表現型を解析した。*Reck* 低下マウスでは前肢芽の異常が認められ、表現型の類似性から、その原因は、肢芽背側上皮 (DE) からの *Wnt7a* のシグナル減弱にあると考えられた。一方、*Reck* の発現は肢芽前方間葉細胞 (AM) に見られ、初期間葉細胞特異的 *Reck* 欠損が *Reck* 低下と同様の表現型を与えることから、AM の *Reck* が DE の *Wnt7a* 発現維持に必要と考えられた。その機構を知るために、初期間葉細胞モデル系 (ATDC5 細胞) に *Reck* を発現させた際の遺伝子発現プロファイル変化を調べた。その結果、*Igf2* の強い発現誘導が見出され、*Reck* 低下マウス肢芽における *Igf2* 発現低下も確認された。しかし、培養上皮系細胞では、*Igf2* による *Wnt7a* 発現誘導は検出されず、WNT7A 添加が内在性 *Wnt7a* の発現を抑制することが見出された。これらの結果と、*Reck* 低下マウスでは DE に顕著な損傷が見られることから、AM の *Reck* は、*Wnt7a* の発現調節ではなく、*Igf2*などを介する DE の活性維持を介して肢芽パターン形成に寄与するという可能性が示唆された。

以上の研究は、がん抑制因子 *Reck* の生体における役割、間葉-上皮相互作用の分子基盤などの解明に貢献し、発生学および腫瘍学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 24 年 5 月 2 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降