

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)			
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。 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<i>low-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。 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。 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 Shh 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。Shh 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 Fgf4、Fgf8 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。 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 Igf2 を強く発現誘導し、Wnt7a、Fgf8、Igf 2 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 Wnt7a の発現を強く抑制し、Igf2 が Wnt7a 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、Igf2 が確かに発現低下していることを見出した。			

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) <i>RECK</i> はがん抑制機能を持つ一方、 <i>Reck</i> 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 <i>Reck</i> 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 <i>Reck</i> 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 <i>Reck</i> 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、 <i>Igf2</i> の強い発現誘導が見出され、Reck 低下マウス肢芽における <i>Igf2</i> 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