

氏名 (本籍)	波多野 裕一郎 (愛知県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1460 号
学位授与日付	平成 24 年 9 月 12 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Genetic ablation of a candidate tumor suppressor gene, <i>Rest</i> , does not promote mouse colon carcinogenesis
審査委員	(主査) 教授 吉田 和 弘 (副査) 教授 千田 隆 夫 教授 大 沢 匡 毅

論文内容の要旨

Repressor element 1 silencing factor (REST) は、神経関連遺伝子の転写抑制因子として発見され、現在では神経形成および神経分化の主な制御因子と考えられている。近年、REST の機能異常が、肺小細胞癌、乳癌、神経芽腫などの様々な腫瘍で報告され、REST のがん関連遺伝子としての注目が高まっている。ヒト大腸癌細胞株では REST が腫瘍増殖に抑制的に働くとの報告もあるため、本研究では、*Rest* コンディショナルノックアウト (CKO) マウスを用いて、*Rest* の欠損によるマウス大腸発がんへの影響を検討した。

【対象と方法】

Rest ノックアウト (KO) アリルのホモ接合マウスは胎生致死であるため、本研究では、コンディショナルに *Rest* 遺伝子の欠損を誘導できるマウス (*Rest*^{2lox} マウス) を大腸発がん実験に用いた。*Rest*^{2lox} アリルでは、*Rest* の機能に重要な CoRest 結合部位を含む最終 exon が LoxP 配列で挟まれているため、Cre リコンビナーゼ (Cre) 存在下で最終 exon を欠失し、*Rest* KO アリル (*Rest*^{1lox}) に変化する。また、*Rest*^{2lox} は、3' 非翻訳領域に *ires-Gfp* 配列を持つため、*Gfp* の発現によって、*Rest* の発現をモニターできる。

大腸発がんおよび Cre 発現の機序が異なる 2 つのマウス大腸発がん実験 (実験 1, 2) を行った。
(実験 1) : Tet-On システムを用いたドキシサイクリン (Dox) 誘導 Cre アリルを有する *Rest*^{2lox/2lox} マウスの生後 5 週目にアゾキシメタン (15mg/kg) を腹腔内投与し、生後 6 週目に 2% デキストラン硫酸ナトリウムを 1 週間飲水投与した。さらに生後 8, 14, 20 週目に、*Rest* CKO 群 (n = 27) には 0.2% Dox をそれぞれ 1 週間飲水投与し、対照群 (n = 11) には蒸留水を投与した。生後 22 週目に全てのマウスを解剖した。

(実験 2) : 腸管上皮特異的に Cre を発現する *Fabp-Cre* トランスジェニックマウスと、*Rest*^{2lox/2lox} マウス、および、*Apc*^{Min/+} マウスを交配させ、*Rest* CKO 群 (*Apc*^{Min/+}; *Fabp-Cre*⁺; *Rest*^{2lox/2lox}, n=23), Heterozygous *Rest* CKO 群 (*Apc*^{Min/+}; *Fabp-Cre*⁺; *Rest*^{2lox/+}, n = 32), 対照群 (*Apc*^{Min/+}; *Fabp-Cre*⁻; *Rest*^{2lox/+}, n = 26) の 3 群を得た。生後 20 週目に全てのマウスを解剖し、大腸粘膜上の腫瘍の数と最大径を計測した。同時にパラフィン切片を作成し、免疫組織化学的解析を行った。また、パラフィン切片より大腸腫瘍の DNA を抽出し、PCR 法によって *Rest* アリルの欠損を確認した。

腺管分離法により正常大腸陰窩上皮から DNA を抽出し、サザンブロット法によって *Rest* アリルの欠失を確認した。また、同様にして得た RNA を用いて qRT-PCR を行い、*Rest* および *Rest* 標的遺伝子の発現を評価した。

統計学的解析には t 検定を用い、P 値が 0.05 以下の場合を統計学的有意と判定した。

【結果】

1) 2種類の異なる Cre 発現マウスラインを用いることにより、マウス大腸陰窩上皮において、*Rest* 遺伝子欠損を誘導できることが確認された。Dox 誘導 *Cre; Rest^{2lox/2lox}* マウスの正常大腸陰窩上皮は Dox 投与後に、高頻度に *Rest^{1lox}* への組み替えが起こることをサザンブロット法で確認した。また、*Apc^{Min/+}; Fabp-Cre⁺; Rest^{2lox/2lox}* マウスの大腸腫瘍で、*Rest^{1lox}* への組み替えが起こっていたことを PCR 法で確認した。

2) *Rest* CKO に引き続いて、マウス正常大腸陰窩上皮では *Rest* の発現低下が起こり、*Rest* 標的遺伝子の転写抑制が解除される。

Dox 誘導 *Cre; Rest^{2lox/2lox}* マウスの正常大腸陰窩上皮は Dox 投与後に、*Rest* および *Gfp* の有意な発現低下、*Rest* 標的遺伝子の有意な発現上昇が起こることを qRT-PCR 法で確認した。

3) *Rest* CKO は、マウスの大腸発がんおよび正常大腸陰窩上皮に有意な影響を与えない。

2つのマウス大腸発がん実験の *Rest* CKO 群で、大腸腫瘍の数の増加傾向あるいは大腸腫瘍の最大径の減少傾向がみられたが、いずれも統計学的に有意な差は確認されなかった。大腸腫瘍の組織学的性状について、HE 染色による組織像の評価、Ki-67 免疫染色による細胞増殖能の評価、Chromogranin A 免疫染色による内分泌細胞分化の評価を行ったが、2つの実験の *Rest* CKO 群と対照群の間で、明らかな差は認められなかった。また、正常大腸陰窩上皮も、2つの実験の *Rest* CKO 群と対照群の間で、組織学的に明らかな違いは確認されなかった。

【考察】

大腸発がんは多段階的な過程を経ることが知られており、最近の研究では、その早期に DNA のメチル化などの epigenetic な変化が関わっていることが示されてきた。

Rest は、CoRest などの補助因子と共同して、クロマチン構造の変化、ヒストン修飾、DNA メチル化修飾などの epigenetic な変化を起こし、repressor element 1 配列を有する遺伝子の転写を抑制する。神経幹/前駆細胞では、*Rest* の発現低下に引き続いて、神経関連遺伝子の転写抑制が解除され、神経分化が誘導されると考えられている。本研究では、*Rest* CKO によって、正常大腸陰窩上皮の *Rest* の発現低下および神経関連遺伝子の発現上昇を確認したが、神経内分泌系分化の誘導は確認されなかった。

本研究の結果より、マウス大腸陰窩上皮の恒常性の維持に対する *Rest* の役割は限定的であり、その他の因子の関与が示唆された。また、マウス大腸発がんでは、*Rest* の機能異常に加えて、その他の genetic/epigenetic な変化の関与が腫瘍促進に重要である可能性が示唆された。

【結論】 *Rest* の欠損単独では、マウス大腸腫瘍形成の有意な促進は認められなかった。

論文審査の結果の要旨

申請者 波多野裕一郎は、大腸炎症及び canonical Wnt pathway に関連した大腸腫瘍形成モデルマウスにおいて、コンディショナルな *Rest* 遺伝子欠損を誘導することにより、*Rest* の単独機能欠損のみでは大腸腫瘍形成を有意に促進しないことを明らかにした。本知見は、がん関連遺伝子とされる *Rest* の大腸発がん過程における役割を明確にし、消化器病学および腫瘍生物学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Yuichiro Hatano, Yasuhiro Yamada, Kazuya Hata, Suphot Phutthaphadoong, Hitomi Aoki, Akira Hara: Genetic ablation of a candidate tumor suppressor gene, *Rest*, does not promote mouse colon carcinogenesis. *Cancer Science* 102, 1659-1664 (2011)