

論文内容の要旨

論文提出者氏名 大橋 宗洋

論文題目

Disruption of circadian clockwork in in vivo reprogramming-induced mouse kidney tumors.

論文内容の要旨

約 24 時間の自律振動を刻む概日時計は、個体レベルだけではなく、諸臓器そしてほぼ全ての細胞にも備わっている普遍的な機能の一つであり、代謝や細胞周期・分裂などの多くの生理機能に関わっている。癌と概日時計の関連について、これまで多くの報告があるものの、未だ不明な点が多く統一した見解を得るに至っていない。我々は本研究で概日時計と癌との関連について、概日時計形成と細胞分化制御との関係性という視点から検討し、新たな病理学的意義を見出した。

まず初めに概日時計と細胞分化の関係性について、マウス ES 細胞では明瞭な概日時計の振動が見られず、これらを in vitro で分化誘導することによって細胞自律的に概日リズム振動が形成されることがわかった。さらに、分化した細胞をリプログラミングすることによって概日時計の振動が再消失することを見出し、概日時計と細胞分化とが密接な共役関係があることが明らかになった。そして近年、c-Myc の過剰発現、DNA メチル化酵素群 (Dnmt1, 3a, 3b) ノックアウトなどの遺伝子改変マウス ES 細胞の分化誘導培養では、細胞分化異常による概日時計形成の阻害が生じることを明らかにし、概日時計の形成には適切な細胞分化過程制御が必要であることが示された。

一方で、このような細胞分化過程の異常、すなわち、エピゲノム制御異常による広範な細胞系譜特異的遺伝子発現ネットワークの破綻は、発癌と関連があることが示唆されている。特に、小児癌において、遺伝子変異率が非常に低い癌腫が報告されており、エピゲノム変化を発癌要因として考える動きがある。その中で、リプログラミング 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) による in vivo reprogramming マウスモデルを用いた異常な細胞分化制御を病因とするエピゲノム発癌が報告された (Onishi et al, Cell, 2014)。この不完全な in vivo reprogramming によってマウス腎臓に形成される腫瘍は、ヒト胎児性腎腫瘍である Wilms tumor と酷似していることが報告されており、ある種の癌においては、リプログラミングによる発癌プロセスを経ている可能性が示されている。

本研究では、in vivo reprogramming マウスモデルおよびヒト Wilms 腫瘍を用い、細胞分化制御の観点から癌と概日時計との関連を検討した。まず我々は、概日リズムレポーター

として、マウス時計遺伝子 (mPer2) プロモーターにホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入した mPer2:luc 遺伝子をドキシサイクリン依存性にリプログラミング可能な ES 細胞 (tet-OSKM ESC) に導入した。この ES 細胞においてもこれまでの知見通り、細胞分化初期段階では概日時計を形成していないが、in vitro 分化誘導によって概日リズムを形成されること、さらに脱分化誘導することで概日リズムが再消失することを確認した。次に、この ES 細胞が寄与するキメラマウスを作成し、正常に発達したマウス腎臓を採取後、高感度 CCD カメラを搭載した発光イメージングシステム (CCD camera based macro-imaging device) にセットして器官培養を行い概日リズムを測定した。1 時間ごと 96 時間にわたり ES 細胞が寄与した腎組織における発光像を撮影したところ、明瞭な概日リズムが形成されていることが確認された。一方で、partial な in vivo reprogramming による異常な細胞分化制御によって形成された Wilms tumor に酷似するマウス腎腫瘍でも同様に器官培養・発光像を撮影し、マウス腎腫瘍においては概日リズムが障害されていることを示した。概日リズム障害の要因として、マウス腎腫瘍細胞においては、転写後調節メカニズムによって、概日時計分子機構のコア時計タンパク質 CLOCK が発現抑制されていることを見出した。さらに、これらの転写後調節による CLOCK の発現消失はヒト Wilms tumor にも共通して認められた。これらの所見は、partial な in vivo reprogramming によって生じたマウス腎腫瘍がヒト Wilms 腫瘍のモデルであることを支持する。また、小児腎腫瘍の中で、SNF5 (SMARCB1) の不活化によるエピゲノム発癌であることが示されている malignant rhabdoid tumor (MRT) においても同様の所見が観察された。

これらのことから、癌細胞における時計タンパク質 CLOCK の消失という特徴は、概日時計発振障害を示すだけでなく、エピゲノム変化による細胞分化制御異常という発癌プロセスを反映している可能性が示唆され、概日時計と癌との関連性に新たな視点による病理学的意義が示されたと考える。