

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590422
研究課題名（和文） 新規の老化モデルマウスにおける老人性疾患の病態解明
研究課題名（英文） Premature aging-like phenotypes in metastasis-associated protein 1 (Mta1) null mice.
研究代表者 瀧口 総一（TAKIGUCHI SOICHI） 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究部・研究員 研究者番号：00280793

研究成果の概要：

高転移性乳癌細胞株より単離された癌転移関連遺伝子 (Mta1) の生体内での機能解析を目的として、Mta1欠損マウスの作成を行った。本マウスは、早老化に類似した表現型（低回転型骨粗鬆症、脊柱彎曲、脱毛、白内障、生殖能力低下など）を示し、短命であった。また、MTA1欠損MEFは、培養中に細胞老化を起こす傾向があった。そのためMta1は、生体および細胞をストレス抵抗性にすると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：老化・老人性骨粗鬆症・クロマチン・NuRD・Mta1・ノックアウトマウス・細胞老化・モデル動物

1. 研究開始当初の背景

Mta1 はラットの高転移性乳癌細胞において高発現する遺伝子として同定された。その後、乳癌・胃癌・大腸癌・肝癌などの多くのヒトの癌においても非癌部よりも癌部で、とくに悪性度の高い転移部での発現が高いことが判明した。さらにトランスジーンにより細胞内で強制的に発現させると浸潤性や足場非依存性の増殖性の上昇が観察され、転移関連遺伝子と考えられる。正常組織においては精巣・卵巣・副腎などにおいて発現が高く、そ

の他の組織においては低レベルに発現が見られる。また生化学的な研究により NuRD (nucleosome remodeling and histone deacetylation) 複合体のサブユニットであり、クロマチン構造変換を介した遺伝子転写の co-repressor として機能することが報告されている

2. 研究の目的

本研究では Mta1 の生物個体における機能を明らかにすることを目的として研究を開始し

た。そのため定法に従って Mta1 ノックアウトマウスを作成しその表現型を解析した。Mta1 ノックアウトマウスは出生し、初期には野生型マウスと同様に生育する。ただしメンデル比で予想されるよりも少数が出生するため、発生の段階にも Mta1 は、何らかの関与をする可能性がある。出生した Mta1 ノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して矮小であり、精巣・卵巣・副腎の臓器重量が有意に低下しているが、全くの不妊ではなく生殖機能を低レベルで有している。さらに Mta1 ノックアウトマウスは、一年令を過ぎたあたりから老化に特徴的な症状（骨の異常、血液細胞の異常、血管の異常、皮膚の萎縮、脱毛）を示すようになり、野生型マウスと比較して寿命が短い。老人性骨粗鬆症は破骨細胞および骨芽細胞の両系統における分化障害がその原因とされているが、発症機構については未だに不明な点が多い。本ノックアウトマウスを使用し、細胞レベル・個体レベルでの解析を行うことにより詳細な老化の分子機構が得られると予想される。本ノックアウトマウスを“新規”老化モデルマウス”としてとらえ、その発症の分子メカニズムを解明することにより、従来は分子機構解析の糸口を見いだし難かった老化研究に貢献することが可能であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) Mta1 ノックアウトマウスの骨関連細胞の分化異常のメカニズムの解明。

骨について予備的に解析した結果、皮質骨および海綿骨の両方において骨塩量の減少を認め、骨形態計測では骨吸収面および形成面の減少が認められた。この成績は、本マウスで見られる骨病変が低回転型（老人性）骨粗鬆症であることを示しており、Mta1 ノックアウトマウスが新しい老化モデルマウスであることが示唆される。Mta1 ノックアウトマウスで、DNA マイクロアレイなどの解析手段を用いて遺伝子・細胞レベルでの解析を行い、骨粗鬆症に関連した遺伝子群の絞り込みを行うとともに、そういった遺伝子群の機能解析を行う。また、骨については micro-CT で骨密度の変化を経時的に観察するとともに、骨形態計測を行い、Mta1 ノックアウトマウスで見られる骨粗鬆症の病態を明らかにする。

(2) Mta1の細胞老化への関与機構の解明。

Mta1 ノックアウトMEFでは、野生型のMEFと比較して継代培養により観察される細胞老化が早期に起こるとの結果を予備的に得ている。これはMta1ノックアウトマウスが早期に老化する結果とパラレルな現象であり、個体老化を細胞レベルで解析するのに良い実験系である。本研究ではMEFを継代培養することで

細胞老化を観察し、老化のマーカー遺伝子の発現を経時的に調べる。また、新たなMta1の標的遺伝子をDNAマイクロアレイで同定し、転写調節の分子機構を、クロマチン免疫沈降法や in vitro 転写の再構成系などにより解明する。

4. 研究成果

(1) Mta1 ノックアウトマウスの骨関連細胞の分化異常のメカニズムの解明。

マイクロ CT で骨密度の変化を経時的に測定したところ、皮質骨密度は、5ヶ月から18ヶ月において Mta1 ノックアウトマウスにおいて減少傾向にあり、野生型マウスの8割から9割であった。また、海綿骨密度は、12ヶ月から18ヶ月において減少傾向にあり、野生型マウスの6割から9割であった。雌において減少傾向の程度は強かった。また、骨形態計測を行ったところ、骨吸収面 (ES/BS) および骨形成面 (OS/BS) の減少が認められた。また、単核の破骨細胞前駆細胞より分化する多核破骨細胞の数 (N. Mu. Oc/BS) および骨芽細胞数 (Ob. S/BS) も減少傾向にあった。この傾向は雌において強かった。これらの研究成果より、本マウスで見られる骨病変が低回転型（老人性）骨粗鬆症であることが判明した。

(2) Mta1の細胞老化への関与機構の解明。

Mta1 ノックアウトMEFでは、野生型のMEFと比較して継代培養により観察される細胞老化を検討した。野生型のMEFでも培養後15日からほとんど増殖しなくなるが、Mta1 ノックアウトMEFでは培養後12日から増殖が止まりはじめ最終的な細胞数で野生型MEFの1/10程度にしか増えなかった。培養後3日における老化のマーカー遺伝子の発現を調べたところ、Mta1 ノックアウトMEFにおいてp16 (INK4a) の発現が上昇していた。以上によりMta1 ノックアウトMEFにおいて細胞老化の傾向が野生型MEFと比較して強いことが判明した。また、5ヶ月令のMta1ノックアウトマウスにおいて老化関連遺伝子の発現を調べたところ、脳、肝臓、腎臓、副腎などの臓器においてp16 (INK4a)、p21 (CIP1)、p19 (ARF) の発現が2倍から4倍上昇しており、生体においても細胞老化傾向の促進が示唆された。以上よりMta1は、本来生体および細胞をストレス抵抗性にするように機能していると考えられ、ノックアウトすることにより早期の老化傾向を示したと考えられる。

Mta1の新規標的遺伝子の探索までは、今回の研究期間内に完遂することはできなかった。

今後、DNAマイクロアレイにより抽出された候補遺伝子のNuRDによる発現調節機構の解析を行っていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Maruta, S., Takiguchi, S., Ueyama, M., Kataoka, Y., Oda, Y., Tsuneyoshi, M., Iguchi, H.: "A role for leukemia inhibitory factor in melanoma-induced bone metastasis." *Clin. & Exp. Metastas.* 26. 133-141 (2009) (査読有)
- ② Kanai, S., Hosoya, H., Akimoto, S., Ohta, M., Matsui, T., Takiguchi, S., Funakoshi, A., Miyasaka, K.: "Gastric acid secretion in cholecystokinin-1 receptor, -2 receptor, and -1, -2 receptor gene knockout mice." *J. Physiol. Sci.* 59. 23-29 (2009) (査読有)
- ③ Matsusue, K., Kusakabe, T., Noguchi, T., Takiguchi, S., Suzuki, T., Yamano, S., Gonzalez, FJ.: "Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPAR γ target gene Fsp27." *Cell Metab.* 7. 302-311 (2008) (査読有)
- ④ Shimazoe, T., Morita, M., Ogiwara, S., Kojiya, T., Goto, J., Kamakura, M., Moriya, T., Shinohara, K., Takiguchi, S., Kono, A., Miyasaka, K., Funakoshi, A., Ikeda, M.: "Cholecystokinin-A receptors regulate photic input pathways to the circadian clock." *FASEB J.* 22. 1479-1490 (2008) (査読有)
- ⑤ Miyasaka, K., Kanai, S., Ohta, M., Hosoya, H., Sekime, A., Akimoto, S., Takiguchi, S., Funakoshi, A.: "Age-associated gallstone formation in male and female CCK-1(A) receptor-deficient mice." *J. Gastroenterol.* 42. 493-496 (2007) (査読有)
- ⑥ Miyasaka, K., Kanai, S., Ohta, M., Sekime, A., Akimoto, S., Takiguchi, S., Funakoshi, A.: "Susceptibility to obesity and gallbladder stasis produced by a protein- and fat-enriched diet in male mice compared with female mice." *Nutr. Metab. (Lond.)* 4. 14 (2007) (査読有)
- ⑦ Miyasaka, K., Takiguchi, S., Funakoshi, A.: "Cholecystokinin 1 (A) receptor polymorphisms." *Curr. Top. Med. Chem.* 7. 1205-1210 (2007) (査読有)

[学会発表] (計2件)

- ① Takiguchi, S., Yaguchi, M., Ogawa, K., Wada, Y., Matsusue, K., Ito, T., Hamamoto, H., Akimitsu, N., Sekimizu, K., Toh, Y., Iguchi, H.: "Premature aging-like phenotypes in metastasis-associated protein 1 (Mta1) null mice." American Society for Bone and Mineral Research 30th Annual Meeting. Montréal, Canada. September 12-16 (2008)
- ② Ikeda, M., Morita, M., Takiguchi, S., Funakoshi, A., Shimazoe, T.: "Retinal signal processing for the circadian clock inputs via amacrine cell cholecystokinin-A receptors." Neuroscience 2007, the 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, CA. November 3-7 (2007)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧口 総一 (TAKIGUCHI SOICHI)
独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究部・研究員
研究者番号: 00280793

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。