

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580341

研究課題名（和文）染色体脆弱部位に存在する腫瘍抑制因子 WWOX の神経および内分泌機能に関する研究

研究課題名（英文）Research on the nerve and endocrine function of the tumor suppressor gene WWOX located in a chromosomal fragile site

研究代表者

鈴木 浩悦（SUZUKI HIROETSU）

日本獣医生命科学大学・獣医学部獣医学科・教授

研究者番号：50277662

研究成果の概要（和文）：染色体脆弱部位に存在する WWOX は、抗腫瘍因子であると考えられているが、その生理機能はよくわかっていない。WWOX を遺伝的に欠損する *Ide/Ide* ラットを用いて、WWOX の脳神経系における役割を調査した。WWOX は広範な臓器で発現し、脳では大脳皮質、海馬、脳幹等で発現していた。*Ide/Ide* ラットでは海馬の空胞変性だけでなく、大脳や脳幹におけるニューロンやグリアの数が減少しており、BrdU による増殖活性の調査では、側脳室周囲の側脳室下帯における陽性細胞数が減少していた。このことから WWOX は適正な数のニューロンやグリアを生じるための神経幹細胞の増殖・分化に役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The gene encoding WWOX is located in a chromosomal fragile site, and WWOX is a candidate for antitumor factor. The physiological function of WWOX has remained unknown. In the present study, we examined the role of WWOX in central nerve system using *Ide/Ide* rats in which a spontaneous mutation causes the loss of WWOX function. The expression of WWOX was detected in most of organs examined and in central nerve system such as cerebral cortex, hippocampus, and brainstem in normal rats. The neuronal and glial densities in cerebrum and brainstem were significantly lower in *Ide/Ide* than in normal rats. In the BrdU-incorporation assay, the number of BrdU-positive cells was significantly lower in the subventricular zone of lateral ventricle of *Ide/Ide* than that of normal rats. These results suggest that WWOX might be necessary for maintaining normal numbers of neuron and glia through the regulation of proliferation and differentiation in neuronal stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生理学、遺伝学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：神経、抗腫瘍因子、染色体脆弱部位、てんかん

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

WWOX はその遺伝子が染色体脆弱部位に存在し、様々な腫瘍細胞で突然変異を起こしているため、抗腫瘍因子であると考えられているが、その生理作用はよくわかっていない。WWOX のノックアウトマウスは矮小を呈し、生後早期に死亡するため、WWOX が生後の発達過程に果たす役割は不明である。我々が発見し系統化した *Ide/Ide* ラットでは、WWOX の機能的欠損により、生後の重篤な矮小、聴原性てんかん発作、海馬 CA1 領域における空胞、精巣の発達異常などを呈する。WWOX を全身性に欠損し、脳神経系の異常を示す動物は他に報告されていないので、*Ide/Ide* ラットは WWOX の生理機能を解析する上で有用なモデルであると考えられる。

2. 研究の目的

WWOX は神経系や内分泌系に発現することが報告されているが、その役割は良く分かっていない。正常ラットで WWOX の経時的発現を確認し、*Ide/Ide* ラットで脳神経系や内分泌系の異常や腫瘍発生の有無を調査することで、WWOX の生理機能を解析する。

3. 研究の方法

- ① 動物の生産：*Ide/Ide* ラットは不妊および早期致死を示すため、PCR に基づく原因遺伝子変異の同定により、*+Ide* ラットを選抜し、交配することで *Ide/Ide* 産子を得る。対象動物は基本的に同腹の正常個体とする。生後 7 日以降の矮小により *Ide/Ide* 個体を同定できるが、PCR に基づく突然変異の同定により遺伝子型を確定する。
- ② 試料採取：生後の早期の各日齢の動物を麻酔し、血液サンプルを得る。放血させた後に、病理学的解析のため臓器を摘出する。これとは別に脳の病理学的解析のため、固定灌流した標本も作成する。
- ③ 病理学的解析：パラフィン切片、凍結切片等を作成し、通常染色、ニューロンやグリア細胞のための各種特殊染色、抗体による免疫染色、BrdU 投与による増殖活性の評価、TUNEL によるアポトーシスの検出を行う。
- ④ 一部の *Ide/Ide* ラットおよび *+Ide* ラットを長期間生存させた後で、安楽死させ、剖検し、腫瘍発生の有無を調べる。

4. 研究成果

① 脳神経系の異常：*Ide/Ide* ラットの脳は絶対重量で正常と同等で相対重量では正常より大きい。肉眼解剖および MRI 検査で *Ide/Ide* ラットの脳は低形成を示さず、逆に脳室が減少し、浮腫様に脳の大きさが増大している様に見えた。*Ide/Ide* ラットでは生後 15 日で既に海馬に空胞が見られ、日齢の進行に伴い重篤化した。さらに空胞変性が見られるより早期から、大脳皮質、海馬、脳幹などの広範囲でニューロンやグリアの数(密度)が少ないことが判明した。ニューロンの減少や空胞変性の原因を明らかにするために、21 日齢において TUNEL 法によるアポトーシスと BrdU による増殖活性の調査を行った。空胞変性が見られる海馬周辺においてアポトーシスの増加は観察されなかったが、神経細胞の増殖と分化が起こるとされる側脳室周囲の側脳室下帯において、*Ide/Ide* ラットは BrdU 陽性細胞が明らかに少なく、増殖活性が低下していた。

② WWOX の発現：WWOX は、心臓、肝臓、腎臓、肺、脾臓、精巣などの広範な臓器で発現しており、特に、肝臓と腎臓において発現レベルが高かった。*Ide/Ide* ラットでは生化学検査において生後初期から尿素窒素とクレアチニンが高値であり、腎機能低下を示唆したが、病理学的解析では腎臓に明らかな異常を認めなかった。肝臓と腎臓で発現している WWOX の機能は現在のところ不明であるが、*Ide/Ide* ラットでの血漿中の尿素窒素とクレアチニンの上昇は、これらの臓器での WWOX 発現に関連するものかもしれない。WWOX は大脳皮質、海馬、脳幹、小脳などの中枢神経系のニューロンにおいて広範に発現が認められた。*Ide/Ide* ラットのこれらの領域におけるニューロンとグリアの数の減少が WWOX の欠損と関連する可能性が考えられた。

③ 腫瘍発生と内分泌：WWOX ノックアウトマウスでは、出生直後の骨肉腫の発生が報告されている。*Ide/Ide* の産子では離乳後も生存する個体が多く見られ、それらで骨肉腫を含めた腫瘍の発生はなかった。ヘテロ個体を 1 年以上長期飼育しても腫瘍の発生は見られなかった。下垂体におけるホルモンの発現を正常と *Ide/Ide* の雌ラットで比較したところ、21 日齢での FSH の発現が *Ide/Ide* で正常より低下していた。

以上のことから、WWOX は脳神経系で広範に発現し、その欠損によりニューロンやグリア

アの数（密度）が減少することが示され、このことが海馬での空胞変性や、癲癇発作、神経内分泌系の異常に関連している可能性が考えられる。ニューロンやグリアの減少するメカニズムは明らかでないが、アポトーシスの亢進よりも神経幹細胞の増殖低下が要因となっている可能性が考えられる。この仮説を裏付けるためには、今後神経幹細胞における WWOX の発現の有無や機能を明らかにする必要があるだろう。

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 6 件）

- ① Kuwabara T, Hasegawa D, Ogawa F, Kobayashi M, Fujita M, Suzuki H, Matsuki N, Orima H. A familial spontaneous epileptic feline strain: a novel model of idiopathic/genetic epilepsy. *Epilepsy Research* (査読有) 92, 2010, 85-88. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2010.08.010.
- ② Chiba J, Suzuki H, Aoyama H, Katayama K, Suzuki K. Postnatal development of hypoplastic thymus in semilethal dwarf *pet/pet* males. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有) 73, 2011, 495-499.
- ③ Amakasu K, Suzuki K, Katayama K, Suzuki H. Age-related patho-physiological changes in rats with unilateral renal agenesis. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有) 73, 2011, 787-795.
- ④ Katayama K, Sasaki T, Goto S, Ogasawara K, Maru H, Suzuki K, Suzuki H. Insertional mutation in the *Golgb1* gene is associated with osteochondrodysplasia and systemic edema in the OCD rat. *Bone* (査読有) 49, 2011, 1027-1036. DOI: 10.1016/j.bone.2011.08.001.
- ⑤ Takanosu M, Mori H, Suzuki H, Suzuki K. Genotyping of exercise-induced collapse in Labrador retrievers using an allele-specific PCR. *Veterinary Journal* (査読有) 193, 2012, 293-295. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.10.018.
- ⑥ Katayama K, Yasuda H, Tochigi Y, Suzuki H. The microtubule-associated protein astrin rescues spermatogenesis and renal function in hypogonadic (*hgn/hgn*) rats. *Andrology*

(査読有) 1, 2013, 301-307. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2012.00032.x.

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 稲垣勝裕、ラット眼球の生後発生過程における組織学的変化-自然発生性の眼球内出血について、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年次報告、2010 年 6 月 18 日、沖縄コンベンショナルセンター
- ② 鈴木浩悦、精巣形成不全 (HGN) ラットの *Spag5* cDNA 導入による救済実験、第 29 回アンドロロジー学会、2010 年 7 月 30 日、日本獣医生命科学大学
- ③ 安田英紀、腎低形成症ラットの貧血傾向における血管外溶血と大球性変化、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 20 日、大阪府立大学
- ④ 稲垣勝裕、ラット乳児で見られる自然発生性眼房内出血の悪化による眼球腫大の発生-Flubendiamide のビタミン K 依存性血液凝固阻害を介した影響、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年次報告、2011 年 7 月 12 日、横浜会議センター
- ⑤ 片山健太郎、ゴルジ体タンパク Giantin の欠損が細胞の増殖およびゴルジ体の形成に及ぼす影響の解析、第 154 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 15 日、岩手大学
- ⑥ 安田英紀、両側性腎低形成症 (HPK) ラットにおける腎線維症および糸球体肥大の免疫組織学的解析、第 154 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 15 日、岩手大学
- ⑦ 栃木裕貴、紡錘体結合タンパク質 Astrin の精巣形成過程における役割、第 154 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 16 日、岩手大学

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木浩悦 (SUZUKI HIROETSU)

日本獣医生命科学大学・獣医学部獣医学科・
生理学教室・教授

研究者番号：50277662

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：