

I-C-07

光刺激とリズムリセット機構

田中 雅樹、井端 泰彦

京都府立医科大学 解剖学

I-C-08

Comparative expressed sequence hybridization (CESH)
を用いた食道扁平上皮がんの遺伝子変化の解析龍田 健^{1,2)}、杉原 洋行¹、凌 志強¹、谷 徹²、
服部 隆則¹¹滋賀医科大学 第一病理、²滋賀医科大学 外科

哺乳類の概日リズムの中権は脳視床下部、視交叉上核(SCN)に存在する。動物に夜間光を照射すると行動リズムの位相が変位する。我々は以前より光によりリズムが変位(リセット)する機構について研究を進めてきた。まず、SCNには網膜より視神経(網膜視床下部路)が入力しており、光情報が直接SCNに伝わることを明らかにした。また夜間光を照射すると視神経が入力するSCNの腹側部のニューロンが応答してc-fosやNGFI-AなどのImmediate early gene (IEG)が急速に誘導発現されることも報告した。近年哺乳動物にもショウジョウバエのperiodに相同なおよそ24時間周期で発現が日内変動する時計遺伝子、mPerが報告された。またmPer1,2はIEGと同様に光刺激後1時間ほどで、SCNに誘導発現され、KOマウスを用いた実験などでリズムリセットに必須であることが知られるようになった。光刺激後のSCNにおける細胞内変化は、視神経のニューロトランスマッターであるglutamateの受容体を介した細胞内Ca²⁺の増加が重要であり、最終的には転写因子であるCREBがリン酸化されることが時計遺伝子mPerの転写活性に必要であるとされている。しかしリン酸化(p)CREBがどのように核内でmPer1の転写を活性化させるかについてはまだ不明である。また、一般に遺伝子が転写される時はクロマチンのヒストンテールが修飾されることが知られている。今回我々は時計遺伝子の転写調節にヒストンのアセチル化と脱アセチル化が関与し、光照射後pCREBが結合する部位を同定したので報告する。夜間光照射後のSCN組織を用いてクロマチンの免疫沈降を行って、照射後急速に5分をピークにmPer1上流プロモーターのCREにpCREBが結合し、やや遅れてmPer1転写開始点付近に結合するアセチル化ヒストンが増加した。さらに、通常夜間はSCNのmPer1の発現は低く抑えられているが、脳室内に脱アセチル化酵素の特異的な阻害剤であるトリコスタチンAを投与すると、急速にmPer1がSCNに誘導発現されることをin situ hybridization法を用いて明らかにした。

我々は、これまでに、個々の腫瘍の異なる部位からサンプルを採取し、Comparative Genomic Hybridization(CGH)を用いて、ゲノムコピー数の変化を同定し、がんの発生や進展に関わる遺伝子変化を染色体レベルでとらえる研究をおこなってきた。CESH(comparative expressed sequence hybridization)は、CGH解析におけるゲノムDNAをcDNAに置き換えた方法で、遺伝子発現変化を染色体レベルで測定する簡便な方法である。本研究の目的は、CGHやCESHを用いて、染色体レベルでゲノムコピー数変化と発現の変化を対比させ、腫瘍内多様性を解析することである。今回は CESH を用いた食道扁平上皮がんの遺伝子発現解析について報告する。食道扁平上皮がん切除例3例の凍結標本より、Laser capture microdissectionを用い、個々の腫瘍の深達度の異なる領域からがん細胞を採取し、RNAを抽出。referenceとして正常食道扁平上皮からRNAを抽出。T7-transcriptionによる増幅後、それぞれCy3,Cy5でラベルしたcDNAプローブを作成。cot1DNAをmixし、Rnaseで処理した正常分裂中期染色体スライドに競合的にhybridizeさせた。得られたimageからCGH解析システムを用い、発現が上昇している領域、低下している領域を同定する。さらにCGHの結果との相関を加え報告する。