

# 主論文

## Expression analysis of Dickkopf-related protein 3 (Dkk3) suggests its pleiotropic roles for a secretory glycoprotein in adult mouse

(成体マウスにおける Dickkopf-related protein 3 (Dkk3)の発現解析は、Dkk3 の生体内における分泌性糖タンパク質としての多面的な役割を示す)

### [緒言]

*Dickkopf-related protein (Dkk) 3*は、5つの遺伝子をメンバーに持つ Dkk 遺伝子ファミリーの一員であり、この遺伝子ファミリーには *Dkk1*から *Dkk4*と *Dkk like 1(Dkk1)*が存在する。Dkkファミリーは、共通して N 末端にシグナルペプチドドメインを持つ分泌性糖タンパク質であり、内側に二つの保存されたシステインリッチなドメインが存在するが、その機能は明らかになっていない。Dkk1、Dkk2、Dkk4 については、Wnt 受容体に結合することで Wnt シグナルに関与していることが過去に報告されているが、*Dkk3* についてはこれらと共通の受容体に結合しない。しかし、マウス精巣とヒトのがんで Wnt シグナルを阻害していることが報告されている。

一方、*Dkk3*は不死化した細胞やがん細胞でその発現が消失していることから、*reduced expression in immortalized cells (REIC)*とも呼ばれており、そのがん抑制遺伝子としての機能が近年注目され、がん遺伝子治療の材料として研究が進められている。ヒト *Dkk3/REIC*の過剰発現は、正常細胞には影響はないが、前立腺がん細胞や精巣がん細胞でアポトーシスを引き起こす。その原因は *Dkk3* 発現ががん細胞内で小胞体ストレスや、抗がん免疫の活性化を引き起こすことである。

ヒト *Dkk3*の各臓器における網羅的な発現は、データベース等で既に公開されているが、*Dkk3*の組織学的な発現パターンについては、ほとんど明らかとなっていない。さらに *Dkk3* knock out (KO)マウスでは明らかな組織学的な変化は見られない。そのため、我々は、*Dkk3* の生体内での機能解明の第一歩として、*in situ* hybridization (ISH)法と免疫組織化学法を用いて、成体マウスの様々な組織における *Dkk3*の細胞レベルでの発現パターンを解析した。

### [材料と方法]

#### 動物実験

臓器は 10-25 週齢の雌雄の C57BL/6 系統または 129S6 系統マウスより採取した。それぞれの実験は2回以上行い、それぞれの実験でマウス2個体以上を使用した。個々の組織に対しヘマトキシリン・エオシン染色を行って組織の同定を行った。

#### 凍結切片作製

マウスに対し灌流固定を行った後、組織の採取を行った。採取された臓器は 6 時間浸漬固定した後、15%ショ糖/りん酸緩衝生理食塩水(PBS)、30%ショ糖/PBS の順に組織内液を置換させた。その後凍結包埋し、クライオスタット(ライカ社)を用いて 14  $\mu$  m 切片に薄切した。

## ISH

ISHに用いるプローブは *Dkk3* 翻訳領域(1047塩基)を鋳型とした RNA プローブを合成した。ISHは過去に報告されたプロトコール(Schaeren-Wiemers and Gerfin-Moser, 1993)に従い、実験操作を行った。実験後、発色した切片を正立顕微鏡で観察し、画像撮影した。

## 抗体作製

桃太郎源社で作製されたもの(抗体番号1)を用いた。抗原は、大腸菌でマウス *Dkk3* 全長タンパク質を発現させたものが用いられ、MBL 社にてウサギを用いてポリクローナル抗体が作製された。

## ウェスタンブロッティング

11週齢の野生型(WT)または *Dkk3* KO マウスの臓器を取り出し、凍結粉碎処理後 lysis buffer に懸濁した。各組織を蛋白量が各 50ug となるように調製した。サンプルは 10%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲルで泳動した後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写し、その後 PVDF 膜を一次抗体で 4°C 一晩反応させた。翌日、Horseradish peroxidase (HRP) 標識された抗ウサギ IgG 抗体を 1:5000 に希釈し、常温 1.5 時間反応させ、その後発色法によりバンドを検出した。検出後の PVDF 膜は Coomassie Brilliant Blue を用いて染色し、WT マウスと KO マウスの臓器の間に、タンパク質量の差がないことを示した。

## 免疫組織化学法

組織切片を洗浄し、5%正常ヤギ血清入り PBST で 30 分ブロッキング、その後最適濃度にそれぞれの一次抗体を希釈し、切片にかけ反応させた。常温で 3 時間静置させた後、4°C で一晩反応させた。翌日、切片を洗浄し、最適濃度に希釈した二次抗体にて、1.5 時間反応させた。最後に洗浄を行い、4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)入り封入剤で封入した。胃組織においては、蛍光標識抗レクチン抗体(GS II)を用いて頸部粘液細胞を可視化した。陰性対照として、*Dkk3* KO マウスの組織あるいはウサギ IgG を用いて実験を行った。

## **[結果と考察]**

### 過去に報告されている *Dkk3* 発現パターンの再現

脳、眼、心臓における *Dkk3* の発現パターンは過去の論文で報告があり、これと同じ発現パターンであることを私が行った ISH でも確認した。脳では大脳皮質、海馬、手綱核、扁桃核、視床下部で、眼では神経節細胞層、内顆粒層、視細胞層の外節で、心臓では心房で *Dkk3* の組織特異的な強い発現が見られた。これらの結果により、今回の ISH 実験に用いた RNA プローブと実験条件は、マウス組織での *Dkk3* を特異的に検出していると考えられた。また、小脳のプルキンエ細胞で、*Dkk3* が発現していることを見出した。

### 消化器系における *Dkk3* の発現パターン

消化器系では広範囲に *Dkk3* が発現していた。組織特異的に、前胃の上皮組織、胃体部の主細胞層、胃の幽門腺、十二指腸ブルネル腺、小腸の腸線や粘膜上皮など、腺組織で特に強い発現が見られた。さらに、胃において、ISH 後 GSII を用いた共染色を行った結果、胃体部において *Dkk3* を強く発現している細胞は、主細胞層の細胞であることを特定した。また消化管での発現は胃から直腸にかけて、減弱していく傾向にあった。胆嚢の粘膜上皮においても、強い *Dkk3* の発現が観察された。以上の結果から、*Dkk3* は消化管において、消化酵素の外分泌に関与している可能性が示唆された。

### 内分泌系とリンパ性器官における *Dkk3* の発現パターン

内分泌系では、甲状腺の濾胞上皮細胞、膵臓の腺房組織、副腎の髄質において、*Dkk3* の組織特異的な発現が見られた。ヒトの膵臓ランゲルハンス島で *Dkk3* が発現していることがこれまでに報告されていたが、マウスの膵臓ではこれと異なる発現パターンを示すことがわかった。また副腎においては、ISH 後にアドレナリン合成酵素であるフェニルエタノールアミン-N-メチルトランスフェラーゼ (PNMT) の免疫組織化学法による共染色を行ったところ、*Dkk3* の強い発現は、PNMT の免疫陽性と重ならないことがわかった。従って、副腎髄質において *Dkk3* はアドレナリン産生細胞ではなく、ノルアドレナリン産生細胞やそれ以外の細胞で強く発現していた。以上の結果をまとめると、*Dkk3* は内分泌系において、ホルモン産生組織で発現する特徴があることが分かった。

リンパ性器官において、*Dkk3* は脾臓の赤脾髄と白脾髄、胸腺の髄質、リンパ節の皮質で強く発現していることがわかった。過去に *Dkk3* と CD8 T 細胞が関係していることが報告されていることから、*Dkk3* は免疫系細胞と関連している可能性が示唆された。

### 生殖器系における *Dkk3* の発現パターン

雄マウスでは、精細管の内側、前立腺の腺上皮、精嚢の粘膜上皮で、*Dkk3* の組織特異的な強い発現が見られた。精巣において、ISH 後セトリ細胞のマーカーであるビメンチンの抗体染色を行った結果、*Dkk3* はセトリ細胞では発現せず、精祖細胞や精母細胞で発現していることが示唆された。

一方、雌マウスにおいて、卵巣の卵胞上皮と卵細胞、さらに子宮体部の円柱上皮や子宮頸部の重層扁平上皮の基底部でも強い *Dkk3* の発現が見られた。子宮に対し、頸部の扁平上皮のマーカーである protein 63(p63)との抗体染色を行ったところ、主に p63 陽性となる重層扁平上皮の基底側の細胞が *Dkk3* を強く発現していることが明らかとなった。

### 免疫組織化学法

これまでに報告した *Dkk3* 発現組織において、*Dkk3* タンパク質が存在するかを調べるために、*Dkk3* mRNA の発現が顕著であった組織に対し、抗マウス *Dkk3* 抗体を用いた免疫組織化学法を行った。まず初めに、ウェスタンブロッティングを行って、抗体の特異性を確認した。その結果、*Dkk3* タンパク質は、分子量 38 から 65kDa の位置に泳動された。これは *Dkk3* が糖鎖修飾されるためである

と考えられた。一方、精巣と脾臓において、KO マウスの組織でもバンドが見られた。このことは、抗 Dkk3 抗体がポリクローナル抗体であったことが原因であると考えられる。

ISH 結果と同じく、脳の大脳皮質と海馬、眼の神経節細胞層と内顆粒層、心臓の心房、副腎の髄質において、Dkk3 タンパク質の発現が特定の組織細胞に局在していた。また高温で処理するため、ISH では発現が確認できなかった皮膚においても、表皮組織で Dkk3 の組織特異的な免疫陽性が確認された。さらに興味深いことに、胃や小腸においては、胃底腺や胃腔、小腸の腸管腔の内側でも、分泌されたと思われる Dkk3 の免疫陽性が見られた。このことは、Dkk3 は胃底腺あるいは小腸の腸腺から、胃腔や腸管腔へ外分泌されている可能性を示した。

#### [結論]

*Dkk3* はさまざまな組織で特異的に発現していることがわかった。これらの発現の多くは、上皮組織であった。また心房組織、甲状腺、副腎などの内分泌性細胞において *Dkk3* が強く発現していた。*Dkk3* は分泌シグナルドメインを持つ糖タンパク質であることから、これらの臓器から血中に分泌されていると考えられる。さらに、*Dkk3* タンパク質は胃や小腸から胃腔や腸管腔へ分泌されていることも明らかとなった。これらのことは、*Dkk3* が生体内において、分泌性糖タンパク質として、様々な組織において、多面的な機能を有していることを示している。