

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 目黒 史也
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第484号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Oxidative stress-induced DNA damage is repaired by Reptin during embryonic epidermis development
(Reptin は胎仔上皮における DNA 損傷応答を介して器官形成を制御する)

論文審査委員 主査 教授 大峽 淳
副査 教授 佐伯 万騎男
副査 教授 多部田 康一

博士論文の要旨

[背景および目的]

Reptin は、核小体低分子 RNA の生合成、RNA ポリメラーゼ II の構築、mTORC1 や他の PIKK ファミリーの構築、細胞周期の調節、細胞分裂の調節、発がん性転写因子の調節、上皮間葉移行の調節、損傷 DNA の修復など様々な機能を有することが知られている。さらに、Reptin は発癌と関連することが報告されている。しかし、Reptin の上皮における機能の多くは明らかにされていない。現在までの Reptin 研究の多くは *in vitro* による検索であり、*in vivo* による Reptin の機能解明はなされていない。Reptin の生体における正確な機能の理解には、*in vivo* による解析が欠かせない。そこで、Reptin 欠損マウスを作成し、その解析から上皮における Reptin の機能を検索した。

[試料および方法]

Reptin を全身から欠損させたマウスでは、Reptin の多岐に渡る機能を鑑みると、胎生の非常に初期に致死となってしまう可能性が高いと判断し、Cre-LoxP システムを利用した Reptin の上皮特異的欠損マウスを作成した。Keratin 14 (K14) Cre マウスと Reptin flox マウスを交配させ、得られた Reptin 上皮特異的欠損マウス (Reptin^{flox}/K14Cre) を形態学的に観察するとともに、分子レベルの変化を、免疫染色、*in situ* hybridization、qPCR で解析した。p53 欠損マウス、p21 flox マウスも併用した。

[結果]

Reptin^{fl/fl};K14Cre マウスは、下部組織の血管が見え、光沢を持った皮膚を有して出生し、数時間後に致死となった。出生直後から体重が著しく減少した。正常マウスでは皮膚のバリア機能によりトルイジンブルーが皮膚を通過せず皮膚の色に変化がなかったのに対し、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスではトルイジンブルーが皮膚を通過して皮膚が青く染色された。組織学的観察において、正常マウスの皮膚では重層扁平上皮が認められたのに対し、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚では2層の上皮細胞のみが観察された。毛包の形成も正常マウスでは観察されたものの、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚では認められなかった。正常マウスの胎生期の皮膚の上皮に *Reptin* の発現が確認された。*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚では、正常マウスに比べアポトーシスの増加はわずかであったが、細胞増殖は著しく低下していた。*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚では、正常マウスに比べ p53 と p21 の発現が著しく増加していた。DNA が損傷しているかを確認するために γ H2AX の免疫染色をおこなった所、正常マウスの皮膚に γ H2AX 陽性細胞は認められないのに対し、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚では複数の γ H2AX 陽性細胞が観察された。*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚に老化活性を示す senescence associated β -galactosidase の活性は確認できなかった。p53/p21 経路の活性が *Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚の表現型を誘導したかを確認するために、*Reptin* と p53 のダブルノックアウトマウス (*Reptin^{fl/fl};K14Cre;p53^{-/-}*)、*Reptin* と p21 のダブルノックアウトマウス (*Reptin^{fl/fl};p21^{fl/fl};K14Cre*) を作成し観察を行なったところ、*Reptin^{fl/fl};K14Cre;p53^{-/-}* マウス、*Reptin^{fl/fl};p21^{fl/fl};K14Cre* マウスともに、皮膚に重層扁平上皮が確認され、毛包の形成も確認された。*Reptin^{fl/fl};K14Cre;p53^{-/-}* マウスの重層扁平上皮の方が、*Reptin^{fl/fl};p21^{fl/fl};K14Cre* マウスの重層扁平上皮よりも、正常マウスの重層扁平上皮に形態学的に近い傾向が認められた。いかなる因子が *Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスで DNA を損傷させたかを確認するために、活性酸素の有無を胎仔で確認したところ、胎生期の正常マウス皮膚に活性酸素が発現することを確認した。*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスでの DNA 損傷が活性酸素によって引き起こされたかを確認するために、抗酸化物質である N-アセチル-L-システインを、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスを子宮内にもつ母親マウスに投与したところ、活性酸素は除去され、それに伴って *Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚に重層扁平上皮と毛包の形成が認められた。*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスと同様の表現型が *Pontin* の上皮特異的欠損マウス (*Pontin^{fl/fl};K14Cre*) でも認められた。

[考察]

Reptin^{fl/fl};K14Cre マウスは、出生時に2層の上皮細胞しか持たず、トルイジンブルーにより染色されることや、出生直後の体重の減少などから、皮膚のバリア機能が確立していないため致死に至ったと考えられる。*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスでの表現型に加え、正常マウスの胎生期の皮膚に *Reptin* の発現も認められたことから、*Reptin* が皮膚表皮の発生に不可欠であることが示唆された。 γ H2AX 陽性細胞の出現や、p53 と p21 の発現の優位な増加、*Reptin^{fl/fl};K14Cre;p53^{-/-}* マウス、*Reptin^{fl/fl};p21^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚における重層扁平上皮から、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの上皮では、DNA 損傷によって p53/p21 経路の活性化が生じ、細胞増殖が抑制され、2層の上皮細胞しかもたないという表現型に繋がったと考えられる。p53/p21 経路は老化など様々な事象を引き起こすが、老化現象は認められず、アポトーシスにも大きな変化がないのに対し、細胞増殖が著しく低下したことから、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの上皮における p53/p21 経路は、主に細胞増殖の停止を誘導したと考えられる。*Reptin^{fl/fl};K14Cre;p53^{-/-}* マウスの重層扁平上皮の方が、*Reptin^{fl/fl};p21^{fl/fl};K14Cre* マウスの重層扁平上皮よりも正常に近かったことは、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの上皮の表現型は p53/p21 経路に加

え、p53 の p21 転写誘導非依存的機能にも起因すると考えられる。一方、正常マウスの胎仔で活性酸素が皮膚に認められたことから、正常な皮膚の発生でも活性酸素が発生し DNA を損傷する可能性があることが示された。更に、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの活性酸素を N-アセチル-L-システインの投与により除去すると、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスに重層扁平上皮が認められたことから、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスで認められた DNA 損傷は、活性酸素によって引き起こった DNA 損傷が *Reptin* の欠損によって残存したものであると考えられた。

[結論]

本研究結果から、正常な胎生期の皮膚の発生では、活性酸素が発生し、それによって引き起こった DNA の損傷を *Reptin* が修復していることが示された。

審査結果の要旨

我々の全ての細胞の DNA は、常に紫外線や化学物質など様々な因子により損傷を受けている。これらの損傷した DNA の蓄積が疾患につながると考えられている。一方で、胎生期は子宮内であるため、紫外線や化学物質の影響をあまり受けないと考えられ、胎生期に DNA 損傷が引き起こるかかどうかという議論すら持たれることはなかった。*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚に DNA 損傷を認めたという結果は、胎生期でも DNA 損傷は生じていることを意味し、本研究の新規性の高さを表しており、生物学的にもこの結果は非常に大きな意義がある。*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚に 2 層の上皮細胞しか存在せず、それがバリア機能を有さないことが致死の原因であることを見出した点も、非常に有用な知見といえる。また、2 層のみという形態学的な手法だけでなく、K10 の免疫染色による手法で、どのような細胞で構成された 2 層であるかということを示した点も、本研究のデータの信用性を考える上で重要な点と考える。本来本研究は、*Reptin* の癌への関わりを考慮し、生後の *Reptin* の機能解析を主眼に開始した課題であったにもかかわらず、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの表現型から、生後の *Reptin* の機能解析に固執せず、胎生期の皮膚の発生にテーマを転換した点は、特筆すべきことと考える。また、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスでの p53/p21 の著しい上昇を示しただけでなく、さらに *Reptin^{fl/fl};K14Cre;p53^{-/-}* マウスや *Reptin^{fl/fl};p21^{fl/fl};K14Cre* マウスの作成により、p53/p21 の著しい上昇を除去することで表現型を回避し、p53/p21 が表現型の原因分子であることを特定した点は、データの信頼性を高める上で非常に重要なポイントと考えられる。正常マウス胎仔の皮膚に活性酸素が発現していることを見出し、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスへの N-アセチル-L-システインの投与による表現型のレスキューを認めただけでなく、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスへの N-アセチル-L-システインの投与による活性酸素の欠損も確認していることは、本研究の科学性の高さを示している。胎生期における活性酸素とそれによる DNA 損傷の存在は、その残存が先天性疾患の発症につながる可能性を示しており、本研究結果は先天性疾患を知る上でも極めて重要な知見と言える。また *Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスの皮膚では上皮が層状化していない。上皮の層状化を制御する分子メカニズムには未だ多くの謎が存在し、本研究は上皮の層状化メカニズムを知る上でも非常に貴重なデータであり、本研究が単に *Reptin* 分子の研究に留まらず、器官発生研究にも貢献できることを意味している。また、*Reptin* は単独で機能せず、何らかの分子との複合体で機能することが知られている。*Reptin* と複合体を形成する *Pontin* の上皮特異的欠損マウスでも、*Reptin^{fl/fl};K14Cre* マウスと同様の表現型が認められたという発見も極めて意義が大きい。また、*Pontin* だけでなく TIP60 や INO80 の分子との関わり追及した点も重要である。*Reptin* の癌との関係性を考えれば、*Reptin* がいかなる分子との複合体で DNA を

修復しているかを *in vivo* 研究で知ることは、本研究成果の影響力が大きいことを示している。

本研究によって得られた、胎生期の皮膚に活性酸素が生じ、それにより DNA が損傷するが *Reptin* の複合体により修復されるという解析結果は、*Reptin* の機能解析のみならず、皮膚発生研究にとっても、皮膚の先天異常の発症メカニズムの理解にとっても、非常に意義のある研究といえ、学位論文としての十分な価値が認められる。