

論文名 : Oxidative stress-induced DNA damage is repaired by Reptin during embryonic epidermis development (要約)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 目黒 史也

---

ここから記入

[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 は発癌とも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不明である。現在までの Reptin 研究の多くは *in vitro* による検索であり、Reptin 機能の正確な解析には、*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]

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<sup>fl/fl</sup>;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 マウスも使用した。

[結果]

Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre マウスは、皮下の血管が可視化でき、光沢を持った異常な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<sup>fl/fl</sup>;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。組織学的観察で、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、*Reptinfl/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、*Reptinfl/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。*Reptinfl/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。*Reptinfl/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 の損傷の有無を確認するために  $\gamma$ H2AX の免疫染色をおこなった所、正常マウスの皮膚に  $\gamma$ H2AX 陽性細胞は認められなかったのに対し、*Reptinfl/fl;K14Cre* マウスの皮膚では複数の  $\gamma$ H2AX 陽性細胞が観察された。*p53/p21* 経路の活性化が *Reptinfl/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 (*Reptinfl/fl;K14Cre;p53<sup>-/-</sup>*)、*Reptin* と *p21* のダブルノックアウトマウス (*Reptinfl/fl;p21 fl/fl;K14Cre*) を作成したところ、*Reptinfl/fl;K14Cre;p53<sup>-/-</sup>* マウス、*Reptinfl/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。*Reptinfl/fl;K14Cre;p53<sup>-/-</sup>* マウスの重層扁平上皮の方が、*Reptinfl/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 *Reptinfl/fl;K14Cre* マウスで DNA を損傷させたか検索するために、活性酸素の有無を正常胎仔で確認したところ、正常マウスの胎生期皮膚に活性酸素が発生することを確認した。*Reptinfl/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(NAC)を、*Reptinfl/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 *Reptinfl/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。*Reptinfl/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 (*Pontinfl/fl;K14Cre*) でも認められた。

## [考察]

*Reptinfl/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

## 【別紙2】

ルーにより染色されることや、出生直後に体重が減少することなどから、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。Reptinfl/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。 $\gamma$ H2AX 陽性細胞の出現や、p53 と p21 の発現の優位な増加、Reptinfl/fl;K14Cre;p53<sup>-/-</sup>マウス、Reptinfl/fl;p21 fl/fl;K14Cre マウスの皮膚表現型のレスキューから、Reptinfl/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 経路はアポトーシスなど様々な事象を引き起こすが、アポトーシスに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、Reptinfl/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。Reptinfl/fl;K14Cre;p53<sup>-/-</sup>マウスの重層扁平上皮の方が、Reptinfl/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、Reptinfl/fl;K14Cre マウスの上皮の表現型は p53 の p21 転写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、Reptinfl/fl;K14Cre マウスの活性酸素を NAC の投与により除去すると、Reptinfl/fl;K14Cre マウスに重層扁平上皮が認められたことから、Reptinfl/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。