

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 堀米 亮子
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1100 号
学位授与の日付 令和5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 Involvement of DNA damage response via the Ccndbp1-Atm-Chk2 pathway in mice with Dextran-Sodium-Sulfate-Induced colitis.
(DSS 誘発腸炎モデルマウスの粘膜での DNA 損傷応答に Ccndbp1-Atm-Chk2 経路が関与する)
論文審査委員 主査 教授 西條 康夫
副査 教授 近藤 英作
副査 准教授 森山 雅人

博士論文の要旨

【背景と目的】デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎モデルマウスは、ヒトの腸炎研究に広く利用されている。その粘膜障害のメカニズムには、DSS による細胞障害に伴う二本鎖デオキシリボ核酸 (DNA) 損傷に引き続くアポトーシスが関与する。様々な DNA 損傷応答経路が知られているが、DSS 誘発大腸炎モデルマウスの粘膜障害時に ataxia telangiectasia mutated (Atm)-checkpoint kinase 2 (Chk2) 経路が活性化するのか、まだ報告されていない。最近、申請者らはサイクリン D1 結合タンパク質 1 (Ccndbp1) のノックアウトマウスの肝臓の解析で、Ccndbp1 が Atm-Chk2 経路を介した DNA 損傷応答に重要であることを明らかにした。そこで、本研究では、DSS 誘発大腸炎における Ccndbp1 および Atm-Chk2 経路の寄与を検討することを目的とした。

【方法】野生型マウス及び Ccndbp1 ノックアウトマウスに DSS を経口投与し、大腸炎を誘発した。臨床経過として、体重変化や便性状などの疾患活動性指数 (DAI) を測定し、炎症によって短縮することが知られている腸管長を計測した。さらに大腸を遠位と近位で二分割し、炎症細胞浸潤などの組織学的スコアを評価した。種々の免疫組織化学的検証と TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色によるアポトーシスの検討により、DSS 腸炎の粘膜障害で Ccndbp1-Atm-Chk2 経路が関与するか評価した。

【結果】DSS 誘発大腸炎における腸管長は、野生型マウスでは DSS 投与 1 週間後で有意に短縮が見られたのに対し、Ccndbp1 ノックアウトマウスでは短縮しなかった。DAI は野生型マウスで経時的に上昇したが、Ccndbp1 ノックアウトマウスでは上昇が抑制された。組織学的解析では、野生型マウスで既報と同様、遠位結腸有意に重症化が見られたが、Ccndbp1 ノックアウトマウスでは有意差を認めず、全大腸で炎症は軽度であった。以上より Ccndbp1 ノックアウトマウスでは野生型に比較して、DSS による大腸の炎症が、軽度であることが明らかになった。

続いて、Ccndbp1-Atm-Chk2 経路がこの現象に関与するか検討した。腸管上皮細胞における Atm および Chk2 タンパクの発現とそれらのリン酸化を組織学的に評価したところ、DSS を投与した野生型マウスでリン酸化

Atm の発現が有意に高く、その比率は近位結腸よりも遠位結腸で高かった。一方 Ccndbp1 ノックアウトマウスでは、DSS 投与後も Atm-Chk2 経路の活性化は見られなかった。したがって、Ccndbp1 は肝細胞でのその機能と同様に DSS 誘発大腸炎でも Atm-Chk2 経路の活性化に寄与し、DNA 障害応答に関与することが明らかになった。

Ccndbp1 ノックアウトマウスでは、DSS による組織傷害が少なく、Atm-Chk2 経路の活性化を認めなかったことから、引き続きアポトーシスの検討を行った。TUNEL 染色とアポトーシスの初期段階を反映する cleaved caspase3 の発現解析では、DSS を投与した野生型マウスの遠位結腸で有意に増加が見られたのに対して、Ccndbp1 ノックアウトマウスでは増加しなかった。このように、Ccndbp1 は Atm-Chk2 経路の活性化と腸管上皮のアポトーシスを介して、大腸粘膜の DSS に対する損傷反応に関与することが明らかとなった。

【結論・考察】 Ccndbp1 は DSS 誘発大腸炎マウスモデルにおいて Atm-Chk2 経路の活性化に寄与し、大腸の炎症と腸管上皮細胞のアポトーシスを引き起こすことが示唆された。これは、Ccndbp1 の過剰発現が X 線による肝細胞の二本鎖 DNA 損傷に依存する Atm-Chk2 経路活性化の抑制に寄与するという申請者らの先行研究の結果を支持するものであった。また、Ccndbp1 の欠損は、DSS 投与 8 日後の炎症性サイトカイン遺伝子の発現低下に関与しており、慢性炎症や炎症性発癌などにも関連している可能性も示唆された。Ccndbp1 は様々な臓器で発現しており、大腸炎だけでなく種々の炎症やアポトーシスを抑える治療ターゲットとなり得ることが示されたが、アポトーシスは恒常性維持に不可欠な機構であり、慢性炎症への関与も含め、今後より長期間での検証が必要と考えられた。

審査結果の要旨

サイクリン D1 結合タンパク質 1 (Ccndbp1) は Atm-Chk2 経路を介した DNA 損傷応答に重要である。そこで、本研究では、DSS 誘発大腸炎における Ccndbp1 および Atm-Chk2 経路の寄与を検討することを目的とした。野生型マウス及び Ccndbp1 ノックアウトマウスに DSS を経口投与し、臨床的变化に加えて、組織学的評価や遺伝子発現の解析で、Ccndbp1-Atm-Chk2 経路が関与するか評価した。ノックアウトマウスは、野生型に比べて、腸炎は軽度であることが臨床的および組織学的解析で明らかになった。続いて、腸管上皮細胞における Atm および Chk2 タンパクの発現とリン酸化を組織学的に評価したところ、野生型でリン酸化 Atm の発現が有意に高く、一方ノックアウトマウスでは、DSS 投与後も Atm-Chk2 経路の活性化は見られなかった。更に、TUNEL 染色と cleaved caspase3 の発現解析では、ノックアウトマウスでは増加しなかった。このように、Ccndbp1 は Atm-Chk2 経路の活性化と腸管上皮のアポトーシスを介して、大腸粘膜の DSS に対する損傷反応に関与することが明らかとなった。Ccndbp1 は DSS 誘発大腸炎マウスモデルにおいて Atm-Chk2 経路の活性化に寄与し、大腸の炎症と腸管上皮細胞のアポトーシスを引き起こすことが示唆された。

本研究は、Ccndbp1 が DSS 大腸炎発症に深く関与することを始めて示した研究であり、十分に学位論文に値すると判断する。