

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 北見 公平
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第380号
学位授与の日付 平成29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 DNA repair via BRCA1 and BRCA2 is essential for craniofacial bone development
(BRCA1 および BRCA2 を介した DNA 修復機能は頭蓋顔面骨の発生に重要である)

論文審査委員 主査 教授 大峽 淳
副査 教授 齋藤 功
副査 教授 魚島 勝美

博士論文の要旨

[背景および目的]

出生時にみられる先天異常の約3分の1で顎顔面領域の形態異常が見られる。顎顔面形態の支持組織である顔面骨は頭部神経堤細胞に由来し、中胚葉に由来する頭頂骨やその他全身の骨とは起源が異なる。したがって顎顔面領域の硬組織の形態異常は、頭部神経堤細胞の発生分化過程の異常が主な原因であると考えられる。近年、顎顔面領域の形態形成異常と DNA 損傷修復機能の疫学的関連性が報告されているだけでなく、頭部神経堤細胞の起源となる神経上皮細胞内には酸化ストレスが増加しているなど、神経堤細胞が内在的に DNA 損傷を受けやすい状態にあることも示唆されている。しかしながら、神経堤細胞における DNA 修復機能が顎顔面形態形成に及ぼす影響については未だ明らかではない。

そこで本研究では、DNA 修復をする Breast cancer 1(BRCA1)および Breast cancer 2(BRCA2)に着目し、DNA 修復機能が顎顔面形態形成においてどのように機能しているのかを明らかにすることを目的とした。

[試料および方法]

神経堤細胞特異的に Brca1 または Brca2 を欠損、さらに Brca1 と p53 を共に欠損するマウスを作製するために Cre-LoxP マウスシステムを用いて、Brca1:Wnt1-Cre, Brca2:Wnt1-Cre, Brca1:p53:Wnt1-Cre をそれぞれ作製した。観察領域には前頭骨を用いた。マウス出生時の骨・軟骨染色は Alizarin red および Alcian blue を用い、撮影したデータ上で Image J にて形態計測を行った。BrdU 溶液を妊娠マウスの腹腔内に投与し、二時間後に胎生 12.5~16.5 日齢の胎子を摘出し、厚さ 7 μ m のパラフィン切片を作製して組織学的解析を行った。骨芽前駆細胞の分化(RUNX2)、細胞増殖能(BrdU、Ki-67)、アポトーシス経路の活性化(Cleaved-Caspase3)、DNA 損傷(γ -H2AX)を評価する免疫組織化学染色および細胞死を観察する TUNEL 染色を蛍光法で行い、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。13.5 日齢胎仔顔面領域の組織から RIPA バッファールにてサンプルを調整し、Western blotting にてタンパク質生産量の比較を行った。統計処理には

Student's t-test を用い、有意水準は 5%とした。

[結果]

Brca1:Wnt1-Cre マウスは、コントロール群と比較し、出生時において前頭骨、上下顎骨を含む神経堤に由来する骨の低形成が観察された。12.5 日齢の前頭骨原基を形成する **Runx2** 陽性の骨芽前駆細胞群において、**BrdU** 陽性細胞数の減少と **TUNEL** 陽性細胞数の増加が観察され、DNA 損傷マーカー(γ -H2AX)の増加と、それに伴うアポトーシス経路の活性化を示す **Caspase-3** の増加が認められた。さらに 13.5 日齢の顔面領域において、アポトーシスならびに細胞周期停止を制御する **p53** の産生量増加が見られた。また、**Brca1:p53:Wnt1-Cre** マウスにおいては **Brca1:Wnt1-Cre** マウスで見られた神経堤由来の骨の低形成の回復が認められた。一方、前頭骨原基の組織学的解析により、**TUNEL** 陽性細胞数はコントロールと同じレベルにまで回復したのに対し、**BrdU** 陽性細胞数には変化が見られなかった。**Brca2:Wnt1-Cre** マウスは、**Brca1:Wnt1-Cre** マウスと同様に出生時に顔面骨の低形成を示し、前頭骨原基における細胞動態の変化も同様の傾向を示した。

[考察]

BRCA1 は DNA 損傷応答において、相同組み換え修復機構の誘導や DNA 修復を促すための細胞周期停止など、幅広い機能を果たしていることが知られている。神経堤細胞における **Brca1** 欠損により引き起こされた骨の低形成は、DNA 損傷の結果誘導された **p53** を介したアポトーシスが関与していることが示唆された。また一方で、神経堤細胞における **Brca2** 欠損も **Brca1** 欠損と類似した表現型を示した。BRCA1 と BRCA2 はどちらも DNA 修復に重要であるが、幅広い機能を持つ BRCA1 に対し、BRCA2 は主に相同組み換え修復において機能していると考えられている。このような観点から、数ある修復機構のなかで、BRCA1 と BRCA2 が共有する機能である相同組み換え修復が神経堤由来の骨の形成に重要であることが示唆された。

[結論]

神経堤由来細胞において **Brca1** または **Brca2** 欠損による DNA 修復機能の破綻は、細胞増殖の低下と細胞死の増加により顎顔面骨の劣成長を引き起こすことから、顎顔面骨の発生における BRCA1/2 を介した DNA 修復機能の重要性が示された。本研究成果は、顎顔面発生において DNA 修復機能という新たな先天性異常の発症メカニズムを呈示した点において重要な知見であると考えられる。

審査結果の要旨

近年、DNA 損傷修復機能に関わる遺伝子の欠損マウスに、先天異常が引き起こることが報告され、発生における DNA 損傷修復機能の重要性が注目されている。ヒトにおける様々な先天奇形の原因も、DNA 損傷修復機能の低下である可能性も指摘されているが、その詳細は明らかにされていない。**Brca1** または **Brca2** は、家族性乳がんの原因遺伝子として発見され、様々な解析が数多くなされている非常にメジャーな分子である。しかし、その顔面領域の発生期における機能はまったく明らかにされていない。そのため、本研究が明らかにした顔面領域発生における **Brca1** と **Brca2** の機能解析は、生物学的にも、医学的にも非常に大きな意義がある。上皮、間葉、それぞれから特異的に **Brca1** または **Brca2** を欠損させたマウスを作成した結果、上皮特異的欠損マウスには異常が認められず、間葉特異的欠損マウスにのみ異常を認めた点は、非常に有用な知見といえる。異常の認められた **Brca1:Wnt1-Cre** マウスは、出生時において前頭骨、上下顎骨を含む神経堤に由来する骨の低形成が観察されたという。下顎骨の劣成長など様々な表現形が

存在するなか、欠損形態の鑑別が簡便な前頭骨の欠損に焦点を絞ったことは、解析精度に直結するため、特筆すべきことと考える。さらに、12.5日齢の前頭骨原基を形成する **Runx2** 陽性の骨芽前駆細胞群において、**BrdU** 陽性細胞数の減少、DNA 損傷マーカー(γ -H2AX)の増加と、それに伴うアポトーシスの活性化を認めたとする。さらに13.5日齢の顔面領域において、アポトーシスならびに細胞周期停止を制御する **p53** の産生量増加を示している。このように、**Brca1** の DNA 修復機能の欠損によって、**p53** を介したアポトーシスの亢進を認めたとする意義は大きい。また、その発見を、**p53** 欠損マウスと **Brca1** 欠損マウスのコンパウンドマウスの作成とその表現形の確認という、非常に科学性の高い方法で検索した点は評価できる。**Brca1:p53:Wnt1-Cre** マウスにおいては、**Brca1:Wnt1-Cre** マウスで見られた神経堤由来の骨の低形成の回復が認められたという。その際、**TUNEL** 陽性細胞数はコントロールと同じレベルにまで回復したのに対し、**BrdU** 陽性細胞数には変化が見られなかったという。このアポトーシスと細胞増殖が別の経路により制御されていることを示す結果は、大きな発見と言える。**Brca1** は DNA 損傷応答において、相同組み換え修復機構の誘導や DNA 修復を促すための細胞周期停止など、幅広い機能を果たしていることが知られている。**BRCA2** も DNA 修復に重要であるが、幅広い機能を持つ **BRCA1** に対し、**BRCA2** の機能は主に相同組み換え修復に限定したものと考えられている。**Brca2:Wnt1-Cre** マウスは、**Brca1:Wnt1-Cre** マウスと同様に出生時に顔面骨の低形成を示し、前頭骨原基における細胞動態の変化も同様の傾向を示したという。この結果は、数ある修復機構のなかで、**BRCA1** と **BRCA2** が共有する機能である相同組み換え修復が、神経堤由来の骨の形成に重要であることを示唆している。この発見は、2つの分子の頭蓋発生での機能を知る上で、非常に重要である。本研究で認められた結果は、他の DNA 修復分子である **Tcof1** の結果とも類似しており、DNA 修復分子の顎顔面発生における機能解明に非常に重要な知見となる。顎顔面形成における解析から、**BRCA1** と **BRCA2** の新たな機能の解明に繋がる可能性もあり、本研究結果は生物学的にも、医学的にも重要な知見を与えたと考えられる。

本研究によって得られた顎顔面形成における **BRCA1** と **BRCA2** の機能解析は、顔面発生研究にとって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。