

論文名：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

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 北見 公平

【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 修復を制御する 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 日齢の胎仔を摘出し、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 バッファーにてサンプルを調整し、Western blotting にてタンパク質産生量の比較を行った。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。