

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03849

研究課題名(和文) DNA修復機構に着目した顎顔面領域における先天異常発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism on congenital abnormality in the maxillofacial region focusing on DNA repair mechanism

研究代表者

前田 健康 (MAEDA, TAKEYASU)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40183941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復機構は細胞生存に必要な不可欠なプロセスである。発生過程で、DNA修復機構が必要であるかは不明である。本研究ではDNA修復分子であるReptinに着目し、上皮特異的なReptin欠損マウスを作成したところ、頭部をはじめとする皮膚表皮の形成が抑制されていた。表皮におけるDNA損傷と、それによって活性化されたp53/p21シグナルによる細胞増殖停止が原因であった。正常な皮膚の発生において、酸化ストレスにより表皮のDNAが一時的に損傷されることが示された。皮膚は、発生中に生じる酸化ストレスによって引き起こされた損傷DNAをReptinにより修復することで、正常に発生することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAは紫外線や化学物質などの影響で日々損傷を受けているが、DNA修復分子機構により修復されることで、正常な機能が維持される。この修復機構が破綻すると癌などの疾患を引き起こす。胎生期にもDNAの修復機構が必要であることを示した本研究結果は、先天異常の原因の理解や、先天異常の生前治療に新たな展開をもたらす可能性を持つ。また、DNA修復機構の基盤的知見ともなる

研究成果の概要(英文)：DNA repair is essential process for cell survive. It remains unclear whether DNA repair system is required for development. We generated mice with epithelial conditional deletions of DNA repair-related molecule, Reptin. Reptin cKO showed the arrest of epidermis development. The anomalies of epidermis were found to be caused by DNA damages and subsequent inhibition of cell proliferation due to aberrant activation of p53/p21 signals. We found that oxidative stress damage DNA during normal skin development. DNA damage caused by oxidative stress is repaired by Reptin, which lead to normal skin development.

研究分野：口腔組織・発生学

キーワード：DNA修復機構 Reptin 先天異常 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の継承と発現を担う高分子生体物質である DNA は、酸化ストレス、紫外線、放射線、化学物質など、さまざまな要因により日常的に損傷を受けている。しかしながら、DNA 修復機構により損傷した DNA 分子はすみやかに修復される。DNA 分子の損傷は細胞のもつ遺伝情報の変化あるいは損失をもたらすだけでなく、その構造を劇的に変化させることにより、コード化されている遺伝情報の読み取りに重大な影響を与えることがあるため、損傷した DNA の修復は細胞生存に必要不可欠かつ重要なプロセスである。そのため、DNA 修復機構の理解は生命維持機構の解明の一助となる。また、DNA 修復機構の破綻は癌などさまざまな疾患の発症に直結するため、DNA 修復機構の研究は疾患発症メカニズム解明にも繋がる。

Reptin は DNA 修復分子であることが明らかにされて以来、in vitro 系を用いて、DNA の修復能解析や癌発症との関連性などの解明が進められてきた(J Cell Biol 180:563-578 [2008], J Cell Biochem 106:920-928[2009], 他 14 編)。しかし、in vivo による検索はなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、Reptin 欠損マウスを用いて、Reptin の上皮における機能を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

生体内では細胞-細胞間および臓器-臓器間相互作用が存在するため、全ての細胞から Reptin を欠損させたマウスでは、どの部位の Reptin 欠損により機能不全が生じたのかを把握することは難しい。そこで、Reptin の欠損部位を特定するために、Cre-LoxP システムを用いて、上皮特異的 Reptin 欠損マウス (Reptin<sup>fl/fl</sup>;Keratin(K)14Cre) を作成し、形態的、分子的検索から Reptin の機能を検索した。手法としては、in situ hybridization, qPCR, 免疫染色などを選択した。

## 4. 研究成果

正常マウスの皮膚は、出生時、重層扁平上皮であるのに対し、Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre マウスの頭部をはじめとする表皮は 2 層の上皮のみであった(図 1)。以上のことは、Reptin が胎生期に必須の分子であることを示している。基底細胞以外の有棘層、顆粒層、角化層の細胞には、keratin10 の発現が通常認められるが、Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre マウスの表皮には、認められなかった(図 2)。胎生期の正常な表皮の最表層には、1 層の periderm が認められ、keratin17 の発現で確認できる。Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre マウスの表皮にも、keratin17 の発現が認められた(図 3)。以上のことより、Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre マウスの表皮では、periderm は存在するものの、基底細胞の有棘細胞への分化が生じなかったことが明らかとなった。

Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre マウスの表皮に、著しいアポトーシスの増加は認められなかった。一方、細胞増殖は Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre マウスの表皮において著しく低下しており(図 4)、これが、Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre マウスの表皮の形成抑制の原因である可能性が考えられた。細胞増殖抑制を引き起こすシグナルである老化シグナルは、認められなかった。

DNA 損傷は瞬時に修復されるため、正常皮膚で DNA の損傷を認めることはほとんどない。しかし、Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre マウスの表皮では DNA 損傷を認めた(図 5)。DNA 損傷が残存した際

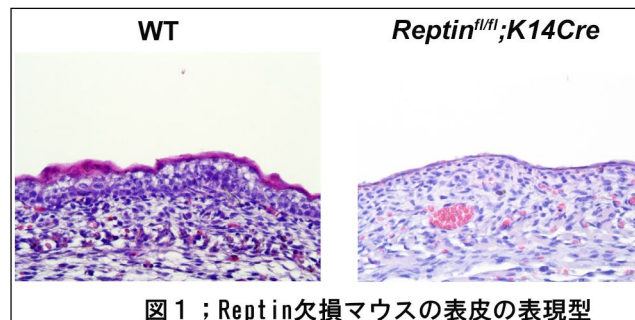


図 1 ; Reptin 欠損マウスの表皮の表現型

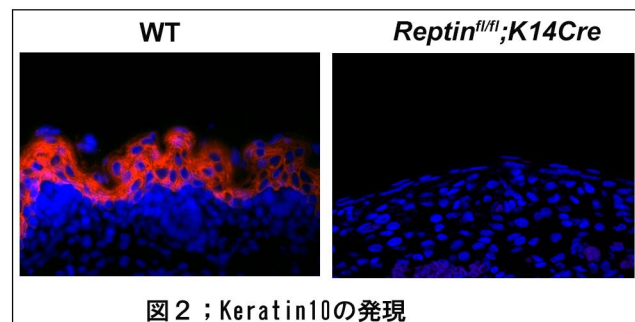


図 2 ; Keratin10 の発現

に発動される分子群の検索の中で、p53 の発現が *Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre* マウスの表皮で、著しく増加していた (図 6)。p53 の発現と同様に、p53 の下流分子の一つである p21 の発現も上昇していた (図 7)。DNA 損傷によって p53/p21 のシグナルが惹起され、それによって細胞増殖が停止したことが、*Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre* マウスの表皮の表現型の原因であるかを検索するために、*Reptin* と p53 のダブルノックアウトマウス (*Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre;p53<sup>-/-</sup>*) を作成した。その結果、*Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre;p53<sup>-/-</sup>* マウスの表皮は、正常マウスと同じような重層扁平上皮を示し、*Reptin* 欠損によって引き起こる表現型が、p53 の除去によりレスキューされたことが示された (図 8)。

*Reptin* と p21 とのダブルノックアウトマウスでも、同様の結果が認められた (図 9)。

*Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre* マウスの表皮における DNA 損傷は、何らかの要因が DNA を損傷させたことを意味する。いかなる要因が表皮細胞の DNA を損傷させたかを検索する中で、正常な表皮

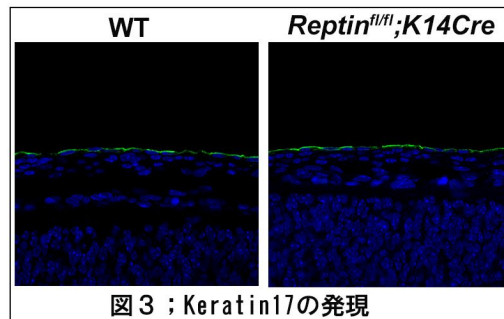


図 3 ; Keratin17の発現

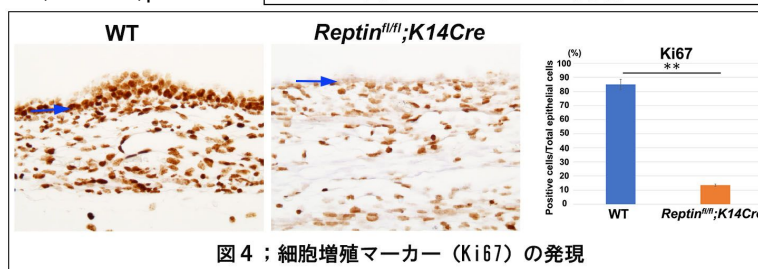


図 4 ; 細胞増殖マーカー (Ki67) の発現

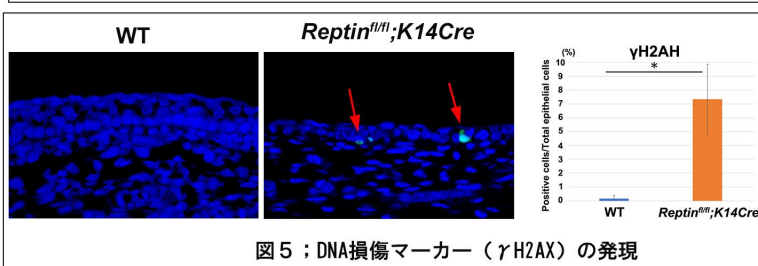


図 5 ; DNA損傷マーカー (γH2AX) の発現

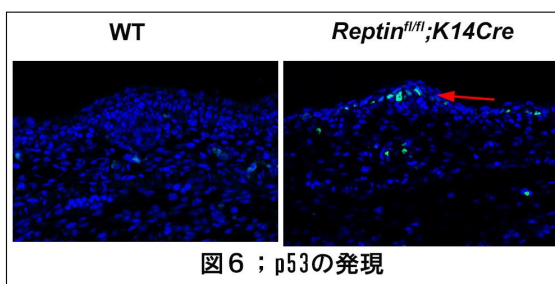


図 6 ; p53の発現

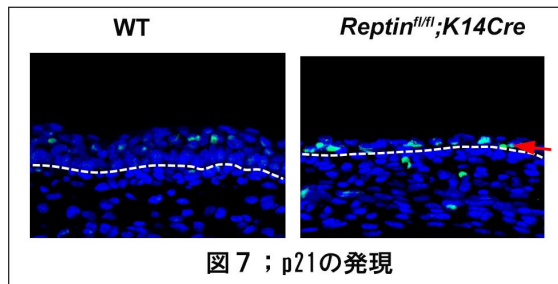


図 7 ; p21の発現

の発生において、酸化ストレスが一時的に生じていることを見出した (図 10)。*Reptin* 欠損マウスにおける DNA 損傷が、この酸化ストレスによるものであるかを検索するために、抗酸化作用を持つ N-アセチル-L-システイン (NAC) を妊娠マウスに投与したところ、子宮内に居た *Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre* マウスに重層扁平上皮が認められ、表皮の表現型がレスキューされていたことが確認された (図 11)。

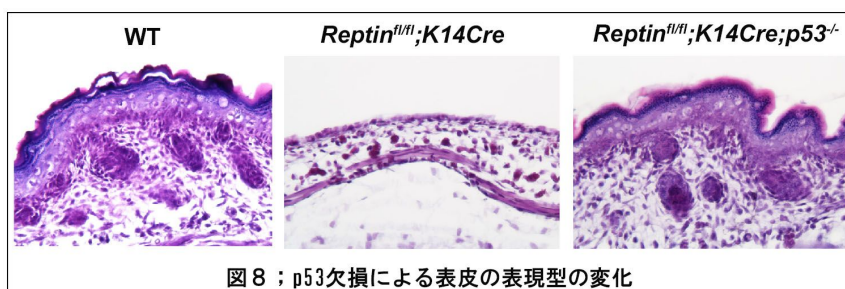


図 8 ; p53欠損による表皮の表現型の変化

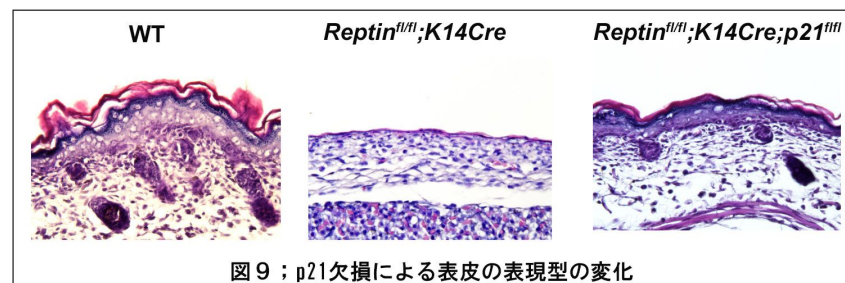


図 9 ; p21欠損による表皮の表現型の変化

以上のことより、皮膚は、正常な状況でも酸化ストレスによって DNA が損傷するものの、損傷した DNA は *Reptin* により修復されることで、正常に発生することが示された。*Reptin<sup>fl/fl</sup>;K14Cre* マウスでは、酸化ストレスによる DNA 損傷が *Reptin* の欠損により残存するため、p53/p21 シグナルが活性化され、上皮細胞の増殖が停止することで、皮膚の発生が抑制されたと考えられる。本研究結果から、胎生期でも DNA が損傷していること、損傷 DNA の修復がなされているこ

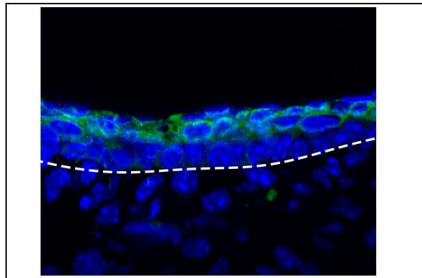


図10；正常表皮発生における酸化ストレス

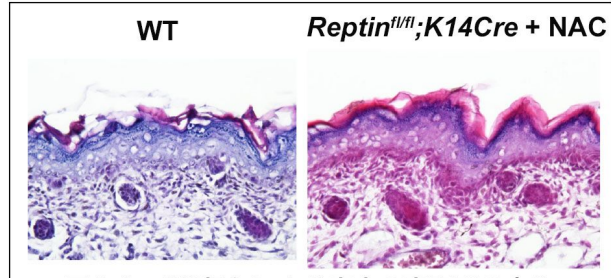


図11；NAC投与による表皮の表現型の変化

と、修復のエラーは器官形成に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。歯科領域は、歯をはじめとして外胚葉性上皮とのつながりが大きい。外胚葉性上皮の異常によると考えられる先天性疾患も数多く存在する。非家族性の先天性疾患の多くは、その原因が明らかでないが、先天疾患の原因に、DNA 損傷の残存が関与している可能性があり、本研究結果は、先天性疾患の理解や生前治療に、新たな展開を促す可能性を有する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)           | 備考           |
|-------|--|---------------------------------|--------------|
| 研究分担者 | 佐伯 万騎男<br><br>(Saeki Makio)<br><br>(30273692)    | 新潟大学・医歯学系・教授<br><br><br>(13101) | 削除：2022年3月7日 |
| 研究分担者 | 大峽 淳<br><br>(Ohazama Atsushi)<br><br>(40266169)  | 新潟大学・医歯学系・教授<br><br><br>(13101) |              |
| 研究分担者 | 柿原 嘉人<br><br>(Kakihara Yosito)<br><br>(40379938) | 新潟大学・医歯学系・助教<br><br><br>(13101) |              |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |