

氏 名 田中 成和

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第 808 号

学位授与の日付 平成 16 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 Functional analysis of Rim3 mutation that exhibits  
aberrant epidermal morphogenesis.

論文審査委員 主 査 教授 相賀 裕美子  
助教授 藤澤 敏孝  
助教授 平田 たつみ  
助教授 山本 博章（東北大学）

## 論文内容の要旨

Two dominant mouse skin mutants, Recombinant-induced mutation 3 (*Rim3*) and Rex denuded (*Re<sup>den</sup>*), arose spontaneously in different inbred strains, but exhibit very similar phenotype of hyperkeratosis and alopecia. Both mutants have a genetic alteration in GasderminA-3 (*GsdmA-3*), which is a member of novel gene family, *Gsdm*. The *Gsdm* family commonly share unique leucine-rich C-terminus domain, but the functions of *GsdmA-3* and *Gsdm* family are largely unknown.

In this study, to elucidate the function of *GsdmA-3* in the epidermal morphogenesis, I conducted analysis of spatiotemporal expression patterns of *GsdmA-3* and the related genes. In addition, I carried out in-depth characterization of the *Rim3* phenotype. The results indicated that *GsdmA-3* is specifically expressed in differentiated keratinocytes in epidermis after postnatal stage, but not in proliferating epidermal cells. Immunohistochemical analysis of BrdU labeled epidermis revealed hyperproliferation and misdifferentiation of the upper follicular cells and the epidermis in the *Rim3* mutant. All the results suggested that *GsdmA-3* is involved in downregulation of cell-proliferation and differentiation of the epidermal stem cells.

As collaboration with a research group of National Cancer Institute, Tokyo, it was demonstrated that a human homologue *GSDMA* has a tumor suppressor activity. Mice heterozygous for *Trp53* knockout (*Trp53<sup>-</sup>*) allele are known to frequently develop lymphomas, but never develop skin tumors. Although mice heterozygous for the *Rim3* mutation alone develop no skin tumors, I examined whether *GsdmA-3* is involved in tumor suppression in the *Trp53<sup>-</sup>* genetic background. To do this, I generated mice heterozygous for both of the *Rim3* and *Trp53<sup>-</sup>* alleles. As a result, the double heterozygous mice (*GsdmA-3<sup>Rim3</sup>/+*; *Trp53<sup>-</sup>/+*) developed multiple metastatic squamous cell carcinomas (SCC) as early as 7 months of the age. In conjunction with the data that a human homologue *GSDMA* is a tumor suppressor for gastric cancer in human, this result suggested that *GsdmA-3* has a function to prevent tumor development in the mouse skin as well.

国立遺伝学研究所哺乳動物研究室で確立されたマウス突然変異系統 *Rim3* は表皮の過ケラチン化と毛嚢の退化という表現型を持ち、その原因遺伝子が新規遺伝子群に属する *GasderminA-3* (*GsdmA-3*) の一塩基置換であり優性遺伝することが知られていた。田中君は、この遺伝子の機能を明らかにし、皮膚および毛根の形成維持に関わる調節機構を明らかにすることを目的として研究をおこなった。

まず、*Rim3* の表現型を組織化学的方法で詳細に解析することにより、*Rim3* において皮膚の過増殖がおこること、月齢を追うごとに毛根が失われていくことがわかった。さらにその間に正常マウスでは表皮のみで観察されるケラチンが毛嚢部において異所的に発現すること、変異体の毛嚢は皮脂腺を消失することがわかった。一般に皮膚や毛嚢、皮脂腺を形成する細胞は毛根のバルジと呼ばれる部位に存在する幹細胞に由来することがわかっている。幹細胞が毛嚢に沿って表皮側に移動して皮脂腺および基底層を形成し、毛根に移動した細胞は毛乳頭にはいり毛細胞となる。田中君は、*GsdmA-3* は細胞の増殖を負に制御するとともに分化にも関与すると考えた。この分子機構を明らかにするために、*GsdmA-3* に対する抗体を作成し、その蛋白質の局在を解析した。*GasderminA* (*GsdmA*) には *A3* と非常によく似た *A1* が存在し、抗体はこれら2者を区別することはできなかったが、野生型と *Rim3* 変異体を比較することにより、正常細胞でも変異体でも *GsdmA* は主にケラチン層の細胞膜に局在し、基底層では発現しないことがわかった。さらに *BrdU* との共染色を行った結果、分裂細胞における発現は認められず、分化した細胞に存在することがわかった。また免疫電顕でその局在を詳細に観察した結果、細胞膜以外にも細胞内の膜状の構造や細胞間隙に存在することが明らかになり、*GsdmA* は分泌される可能性も示唆された。田中君は、細胞の過増殖が見られるにもかかわらず分裂細胞に *GsdmA* が見られないことから、細胞非自立的に変異型 *GsdmA3* が機能することにより、細胞の増殖や分化に異常をきたすのではないかというモデルを提唱するにいたった。さらに、田中君は、*GsdmA3* が癌抑制機能をもつのではないかという考えを検証するために、前癌状態を引き起こすことが知られている *Trp53* ノックアウトマウスとのダブルヘテロ接合体を作成した。その結果、単独ではみられない皮膚癌が非常に高頻度で引き起こされる事実を発見した。また前癌細胞でみられた *GsdmA* の発現が癌化した細胞では消失していること、また正常な *GsdmA3* やヒトの相同遺伝子 *GSDMA* が培養がん細胞の増殖抑制をおこすことや変異体の *GsdmA3* ではその抑制効果が低くなることから考えて、*GsdmA3* は増殖抑制能を持つと結論した。

以上のように、田中君は新規遺伝子 *GsdmA3* が、分化した皮膚細胞で発現し、その増殖を抑制すること、そしてそれが細胞非自立的に幹細胞に機能し、細胞の増殖分化を調節している可能性を示した。このように、*Rim3* 変異マウスの解析を通して、癌抑制活性を持つ新規遺伝子を発見したことは高く評価でき、遺伝学専攻の博士論文としての条件を満たすと審査委員全員が認めた。