

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29 年 4 月 28 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 北里大学・医学部  
職 名 助教  
研究代表者名 櫻井靖高

下記のとおり平成 28 年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 281006 )

1. 共同利用研究 課題名	有害紫外線による皮膚発癌において DNA 損傷トランス蛋白である REV7 が担う機能の解明			
2. 共同利用研究 目的	有害紫外線による皮膚発癌に REV7 が関与していることを、遺伝子改変マウスを用いて <i>in vivo</i> で明らかにし、そのメカニズムについて培養細胞を用いて <i>in vitro</i> で解明する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 櫻井靖高	北里大学・医学部	助教	紫外線照射実験	
(分担研究者) 村雲芳樹 梅澤敦子	北里大学・医学部 北里大学・医学部	教授 技術員	病理組織学的解析 紫外線照射実験	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル統合経路研究 部門・ゲノム機能制御研 究分野	氏 名	横井雅幸

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号: 281006 )

#### 6. 共同利用研究計画

オゾン層の破壊に伴って地表に到達する有害紫外線量(UVB)の増加は、皮膚癌を含む皮膚疾患や眼疾などの健康被害の増加と密接な相関関係を示す。UVBはDNA損傷による突然変異を誘発し、細胞の癌化のみならず、癌化した細胞を除去する免疫システムを抑制し、二重に皮膚癌の発生を促進すると考えられている。突然変異の導入は主にDNA損傷に対する耐性機構(DNA損傷トランス)によるものであり、その機構に関連する蛋白の一部が癌化した細胞を除去する免疫システムに関与することが示唆されている。そのため、皮膚癌の発生機序の解明や予防、治療への展開を行う上で、DNA損傷トランスのメカニズムを詳細に解析することは非常に重要である。

本研究では、DNA損傷トランスに関与する蛋白であるREV7の遺伝子改変マウスを用いてUVBに対するREV7の機能を明らかにすることを目的とする。具体的には、皮膚特異的にREV7を高発現させた*Rev7*トランスジェニック(K14-*Rev7*TG)マウスと*Rev7*欠損マウスをUVB誘発皮膚癌好発系*Polh*欠損マウスと交配して二重遺伝子改変マウスを作成し、UVB誘発皮膚癌を発生させて、REV7高発現とREV7欠損が*Polh*欠損による皮膚癌発生に及ぼす影響を解析する。発生した皮膚癌の組織学的検討と共に、皮膚癌組織からDNAを抽出して*Trp53*遺伝子の突然変異発生率の解析を行う。また、作出した二重遺伝子改変マウスより表皮ケラチノサイト培養細胞を作成し、UVB照射後の突然変異発生率を検討する。さらに、皮膚の免疫システムを司るランゲルハンス細胞の分布密度やサイトカインの分泌を調べ、REV7の欠損が皮膚の細胞障害性や免疫応答に影響を及ぼすかを検討する。

#### 7. 共同利用研究の成果

本年度は*Polh*欠損マウスを用いて紫外線誘発皮膚癌のプロトコールの最適化と遺伝子改変マウスの作出を行った。8-12週齢の野生型マウスおよび*Polh*欠損マウスの背部をバリカンで剃毛し、2 kJ/m<sup>2</sup>あるいは4 kJ/m<sup>2</sup>のUVBを週3回、20週間継続して照射した。週に一度、皮膚の変化を肉眼で観察し、腫瘍の有無を判別した。紫外線照射後にマウスを屠殺し、腫瘍組織の切り出しと同時に解剖による主要臓器への転移部位の検索を行った。2 kJ/m<sup>2</sup>のUVBを照射した群では、野生型マウスには腫瘍は認められなかったが、*Polh*欠損マウスでは9週目から腫瘍の発生が認められ、13週までにすべてのマウスで腫瘍の発生が認められた。病理学的解析により、*Polh*欠損マウスに発生した腫瘍は表皮有棘細胞癌であり、腫瘍の転移は認められなかった。一方、野生型マウスでは組織学的にも腫瘍の発生は認められなかった。4 kJ/m<sup>2</sup>のUVB照射群は現在照射中であるが、*Polh*欠損マウスでは10週から17週にかけて腫瘍の発生が見られており、UVBの線量の増加による腫瘍の発生頻度に大きな差は見られていない。これらの結果は、過去の報告と矛盾しないものであり、以降の実験には2 kJ/m<sup>2</sup>のUVBを用いることにした。

次に、先行研究にて樹立した皮膚特異的にREV7を高発現するトランスジェニックマウス(K14-*Rev7* TG)7系統から本研究に用いる系統の選定を行った。尻尾の皮膚組織を用いて細胞抽出液を作製し、ウエスタンブロッティングにより各系統でのREV7蛋白発現を確認した。その中でREV7発現が特に高かった2系統から1系統を用いてさらなる研究を行うことにした。一方、すでに樹立している*Rev7*欠損マウスを用いる予定だったが、*Rev7*欠損マウスが耐性致死を示したため、代わりに*Rev7*コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを用いることにした。*Rev7* cKOマウスをCRE-ERT2マウスと交配し、タモキシフェン投与により成体マウスにてREV7を欠損させることに成功している。現在、K14-*Rev7* TGマウス、*Rev7* cKOマウスと*Polh*欠損マウスとの間で交配を行い、二重遺伝子改変マウスを作成中である。今後、これらのマウスに対してUVB照射実験を行い、解析を進める予定である。

#### 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。