

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 30 年 5 月 1 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29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 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 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・突然変異解析
(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・免疫組織化学的 解析
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

有害紫外線(UVB)による皮膚癌発症のメカニズムとして、UVB により DNA 損傷が起こり、その部位に突然変異が導入され発癌が誘導されることが想定されている。DNA 損傷トレランスは、DNA に損傷を伴う細胞を死から救う働きをしているが、その代償として損傷部位に突然変異を導入してしまうことがあり、DNA 損傷後の発癌への関与が示唆されている。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 損傷トレ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。REV7 は DNA 損傷トレランスのキー蛋白の一つであり、突然変異の導入に大きく関与している。

本研究では、UVB が誘発する皮膚癌発症に REV7 が関与していることを、遺伝子改変マウスを用いて *in vivo* にて明らかにし、そのメカニズムについて遺伝子改変マウス由来の培養細胞を用いて *in vitro* で解明する。さらに、皮膚癌の臨床検体を用いて、REV7 のヒト皮膚癌発症への関与を明らかにする。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* コンディショナルノックアウト (*Rev7cKO*) マウスを UVB 誘発皮膚癌好発系の *Polh* 欠損マウスと交配して二重遺伝子改変マウスを作出し、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明らかにする。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 *Ttp53* 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、ヒト皮膚組織における REV7 発現と DNA 損傷蓄積率、p53 陽性率等との関連を病理学的に解析する。これらにより皮膚癌発症における REV7 の関与とその役割を明らかにする。

7. 共同利用研究の成果

本年度は、UVB 誘発皮膚癌好発系の *Polh* 欠損マウスと *Rev7* 欠損マウスを交配した二重遺伝子改変マウスを用いて UVB 照射実験を行う予定だったが、*Rev7* 欠損マウスは胎生致死になることが判明した。そのため、*Rev7* コンディショナルノックアウト (*Rev7cKO*) マウスを用いることに変更し、*Rev7cKO* マウスの戻し交配を現在進めている。一方、*Polh* 欠損マウスと皮膚特異的高発現を示す *Rev7* トランスジェニック (K14-*Rev7*TG) マウスを交配させた場合、さらに腫瘍発生が早くなる可能性があるため、以前のプロトコール (2 kJ/m²/day を週3回照射) より照射量・照射回数を減らして腫瘍発生が遅くなるようなプロトコールを作成することとした。*Polh* 欠損マウスと野生型マウスの背中の中毛を剃った後に、2 kJ/m²/day を週1回または、0.5 kJ/m²/day を週3回照射したところ、以前のプロトコールと比較して腫瘍の発生時期をおよそ8週間遅らせることに成功した。*Polh* 欠損マウスと K14-*Rev7*TG マウスを交配した二重遺伝子改変マウスを作出し、UVB 照射実験を現在進めている。

皮膚癌の臨床検体を用いた解析では、基底細胞癌や扁平上皮癌、悪性黒色腫の手術検体を用いて、REV7 および Ki-67 の発現を免疫組織学的に検討した。腫瘍細胞の核に染色された REV7 の染色強度と陽性率をそれぞれ 0-3 の4段階で評価し、その和を REV7 発現スコアとした。REV7 の発現スコアは悪性黒色腫が最も高く、次いで基底細胞癌、扁平上皮癌の順に発現スコアが低下するという傾向が得られた。また、Ki-67 の免疫染色を施行し、REV7 の発現と増殖能との関係を検討したところ、REV7 の発現が高い腫瘍は Ki-67 の陽性率が有意に高く、REV7 の発現は腫瘍増殖に関係している可能性が示唆された。また、REV7 を高発現する腫瘍は病変が厚い傾向が見られたが、有意差は認められなかった。現在、ヒト悪性黒色腫細胞株を用いて REV7 ノックダウン細胞を作製中であり、今後 REV7 発現と細胞増殖能、浸潤能の関連について *in vitro* で検討する。

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。