

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 31 年 4 月 26 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30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 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 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6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9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

本研究では、紫外線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 (*Rev7c*KO) マウスを紫外線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成し、紫外線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 *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、紫外線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

2018 年度は *Polh*^{-/-} K14-*Rev7*TG マウスを作成するために、それぞれ別に系統維持した *Polh*^{+/-} マウスと *Polh*^{+/-} K14-*Rev7*TG⁺ マウスの交配を行った。6ペアのマウスを交配に用いたが、1ペアしか妊娠せず産仔数も2匹と少なかった。目的のマウスが得られなかったため、K14-*Rev7*TG⁺ マウスは別のクローンも用いて *Polh*^{+/-} K14-*Rev7*TG⁺ マウスの作成を試みることにした。さらに、交配方法としてそれぞれ別に維持した系統のマウスを交配するのではなく、*Polh*^{+/-} K14-*Rev7*TG⁺ マウスの系統維持で得られた *Polh*^{+/-} マウスと *Polh*^{+/-} K14-*Rev7*TG⁺ マウスを兄妹交配することにより、*Polh*^{-/-} K14-*Rev7*TG⁺ マウスの作成することにした。K14-*Rev7*TG⁺ マウスおよび *Polh*^{+/-} K14-*Rev7*TG⁺ マウスは作成後2年以上が経過しているが、飼育環境下において肉眼的な皮膚腫瘍の発生は今のところ認められていない。

一方、*Rev7c*KO マウスに用いる Cre 発現マウスとして、皮膚特異的に Cre を発現するマウスの作成を行った。まず、K14 プロモーターが挿入された pG3Z-K14 ベクターに改良型 Cre (iCre) 遺伝子を挿入した。作成したベクターをマウス皮膚細胞にトランスフェクションし、ケラチノサイト選択的に iCre が発現することをウエスタンブロットで確認した。トランスジーンを精製したのち、マウスの作成を北里大学の遺伝子高次機能解析センターに依頼した。F0マウスが計37匹得られたため、現在遺伝子解析を行い、トランスジーンを有する個体を選抜している。今後は、作成した iCre マウスを用いて *Rev7* を皮膚特異的にノックアウトし、REV7 が紫外線による皮膚癌の発生に関与していることを明らかにする。

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。

紫外線による皮膚癌発生において DNA 損傷トランスが果たす機能の解明

科学研究費助成事業: 若手研究・代表

研究期間: 2019 年 4 月 - 2021 年 3 月 代表者: 櫻井靖高