

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08749

研究課題名(和文) 紫外線による多段階皮膚発癌における網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文) The landscape of genetic alterations of UVB-induced skin tumors in DNA repair-deficient mice

研究代表者

国定 充 (Kunisada, Makoto)

神戸大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：80566969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Xpa-ノックアウトマウスと野生型マウスにUVBを照射して腫瘍を形成させ、その腫瘍組織を用いてエクソーム解析を行い、NMSCの網羅的な体細胞遺伝子変異解析を行った。結果として、Caretaker型のがん抑制遺伝子の変異が野生型と比較してXpa-KOで特異的に多く検出された。変異パターンとしては殆どの遺伝子がUV signature mutationを示し、さらに最も顕著にみられた現象として、DNA鎖の転写鎖と非転写鎖で体細胞変異の数を比較したところ、野生型においては非転写鎖に、Xpa-KOにおいては転写鎖に体細胞変異が優位にみられる「偏り」(strand bias)が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紫外線発がんの仕組みについてはその始まりのDNA損傷という部分と最終的に皮膚腫瘍になった時点での遺伝子変異の種類などが分かっていたが、その途中の段階が全く明らかになっていなかった。大腸がんのような所謂多段階発がんのシステムが紫外線発がんでも同様に存在し、その途中経路、特に遺伝子変異の全容を把握することによって、発がんが生じる前に予防的介入等の目印として活用できる可能性が出来るため、今後の同様研究の礎となるような学術的意義および社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed whole-exome sequencing (WES) of squamous cell carcinoma (SCC) samples after repetitive ultraviolet B (UVB) exposure to investigate the differences in the landscape of somatic mutations between Xpa knockout and wild-type mice. Although the tumors that developed in mice harboured UV signature mutations in a similar set of cancer-related genes, the pattern of transcriptional strand asymmetry was largely different; UV signature mutations in Xpa knockout and wild-type mice preferentially occurred in transcribed and non transcribed strands, respectively, reflecting a deficiency in transcription-coupled nucleotide excision repair in Xpa knockout mice. Serial time point analyses of WES for a tumor induced by only a single UVB exposure showed pathogenic mutations in Kras, Fat1, and Kmt2c, which may be driver genes for the initiation and promotion of SCC in Xpa knockout mice.

研究分野：紫外線皮膚がん

キーワード：紫外線皮膚発がん 多段階発がん Xpa-ノックアウトマウス 炎症 次世代シーケンサー 全エクソーム解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

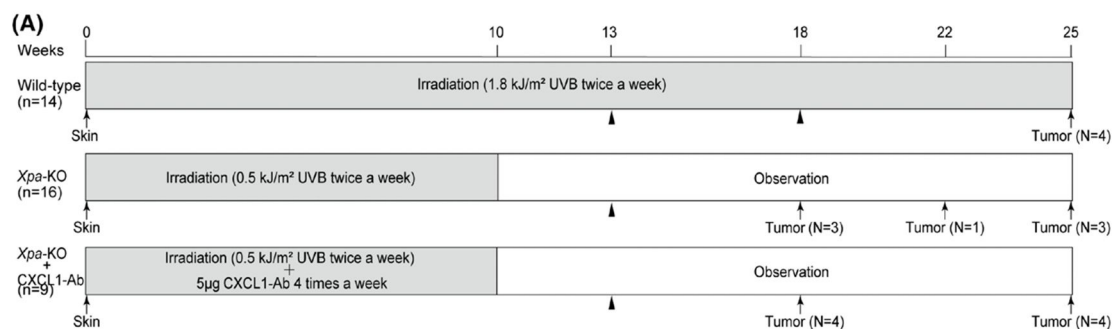
悪性黒色腫やその他のノンメラノーマ皮膚がん (NMSC) は、おもに紫外線 (UV) によって DNA 上にシクロブタンピリミジンダイマー (CPD) およびピリミジン (6-4) 光生成物 (6-4 PP) が生成されることなどが原因で体細胞変異がおこり形成する。これら発がんの過程には、化学発がん物質によって誘導される皮膚がんと同様に、イニシエーション、プロモーション、プログレッションという多段階な機構があると考えられている。がん抑制遺伝子 (TSG) である *TRP53* や、がん遺伝子である *RAS* は、UV で誘導される皮膚発がんに関与する重要な遺伝子として報告されており、その他 TSG である *NOTCH1*、*NOTCH2* の体細胞変異が UV 照射を受けた正常なヒト皮膚で観察されることが報告されている。ヌクレオチド除去修復機構 (NER) は DNA 上に生成された CPD や 6-4PP を除去・修復する働きがあるが、常染色体潜性 (劣性) 遺伝性疾患である色素性乾皮症 A 群 (XP-A) ではこの NER の機能が欠損するために DNA 損傷の修復が行われず、NMSC や悪性黒色腫のリスクがそれぞれ 10,000 倍、2,000 倍以上に増加することが知られている。また UV による皮膚の DNA 損傷の他の要因として、活性酸素種 (ROS) により 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) が DNA へ蓄積することも関与しており、*Xpa* ノックアウトマウス (*Xpa-KO*) では野生型マウス (WT) に比べて UVB (波長: 280~315 nm) 照射後に 8-oxoG がより多く蓄積することが報告されている。以前の我々の研究で、*Xpa-KO* において UVB 照射により好中球遊走因子である *CXCL1* というケモカインの血中濃度が上昇すること、また *CXCL1* モノクローナル中和抗体 (*CXCL1-Ab*) の投与により UVB 照射による皮膚の炎症反応および NMSC の発生量が減少することを報告した。しかし、*CXCL1-Ab* が NMSC 発生のどの段階でいかなるがん遺伝子や TSG の体細胞変異に影響を与えるかの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、UVB 照射により発症したマウスの NMSC に対して全エクソームシーケンス (WES) 解析を行い、それらの体細胞変異の特性を調べ、*CXCL1-Ab* 投与による皮膚腫瘍抑制効果のメカニズムに迫ることを試みた。

3. 研究の方法

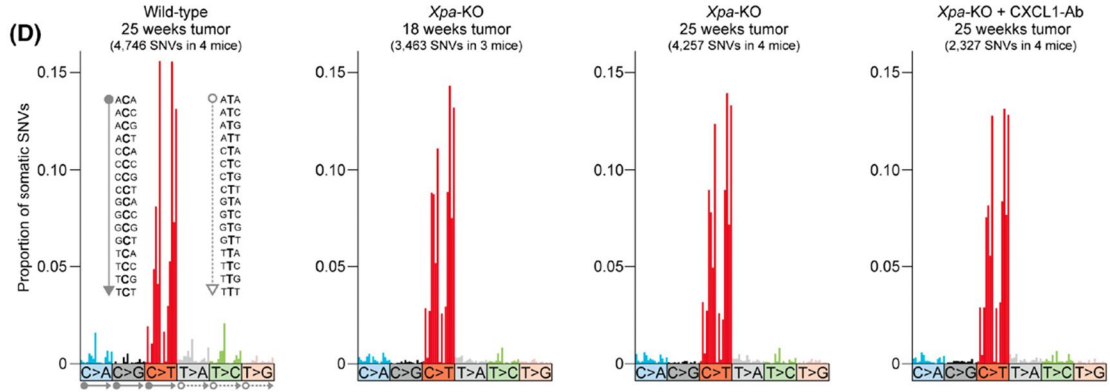
今回使用した UVB は 311-313nm をピークとした 280-320nm の波長特性をもつ光源であり、光源から 40 cm 離してマウス背部皮膚に照射した。マウスは 12~15 週齢の *Xpa-KO* と WT を使い、マウスを以下 3 群のグループにわけて慢性的に UVB 照射し皮膚腫瘍発症の経過を評価した。まず WT (14 匹) に 1 回あたり 1.8 kJ/m² で週に 2 回、25 週間にわたって UVB を照射した。次に *Xpa-KO* (16 匹) に 1 回あたり 0.5 kJ/m² を週 2 回、10 週間にわたって UVB を照射した後、15 週間にわたりマウスの皮膚の腫瘍形成を観察した。最後に *Xpa-KO* (9 匹) に同様の方法で 10 週間にわたり 0.5 kJ/m² の UVB を照射し、照射直後と 24 時間後に *CXCL1-Ab* 5 µg を腹腔内投与し、その後 15 週間にわたりマウスの皮膚腫瘍形成について観察した (図 A)。



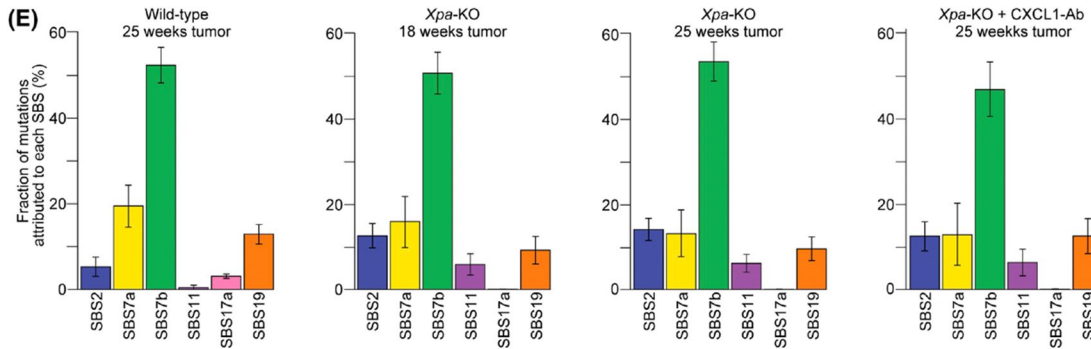
これら 3 群のマウスのうち、WT の 25 週目、*Xpa-KO* の 18 週目と 25 週目、*CXCL1-Ab* を投与した *Xpa-KO* の 25 週目の皮膚腫瘍を採取し WES 解析を行った。WES 解析の一塩基多型 (SNV) と塩基の挿入・欠失は、各同一マウスの UVB 曝露前の皮膚をコントロールとして比較し、体細胞変異の検出、および変異のバイオインフォマティクス分析を行った。また体細胞一塩基置換 (SBS) のスペクトルをがん体細胞変異カタログ (COSMIC) 変異シグネチャーに適合させ、変異プロセスとして機能する変異シグネチャーを評価した。採取したマウスの皮膚あるいは皮膚腫瘍に対してヘマトキシリンエオジン染色、および *TRP53*、*RAS* (G12D 変異)、*PIK3CA*、*mTOR* に対するポリクローナル抗体で免疫組織染色を施行した。各群間の皮膚腫瘍収量の違いや免疫組織染色における陽性細胞の半定量化シグナルの比較評価は *t* 検定を使用し、統計的有意性は *P* 値 < 0.05 と設定した。

4. 研究成果

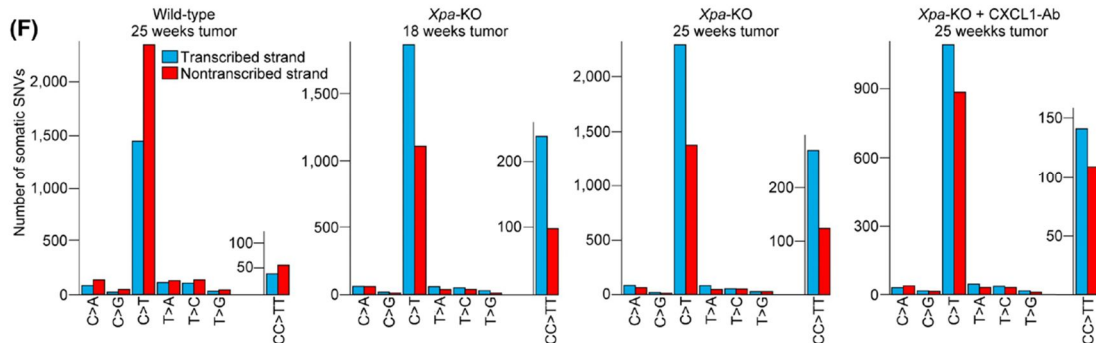
Xpa-KO は既報告の通り WT と比べ少ないUVB 照射線量でより多くの皮膚腫瘍が早い段階で発生した。また前出の我々のデータ通り、CXCL1-Ab を投与した *Xpa*-KO は、同じUVB 照射プロトコルの *Xpa*-KO に比べて皮膚腫瘍の発生個数が有意に少なく、また発生時期が遅かった。WT の25週目、*Xpa*-KO の18週目と25週目、CXCL1-Ab を投与した *Xpa*-KO の25週目の皮膚腫瘍をWES解析し、体細胞SNVをC>T、C>A、C>G、T>C、T>G、T>Aの6つのピリミジン置換とそれらの前後の4つの塩基からなる、96の変異クラスに分類し、それらの傾向を評価した。結果、UVシグネチャー突然変異であるC>T変異が全ての群で高頻度にみられ、特にダイジピリミジンサイト(CC、CT、TC)でのC>T変異が多かった(図D)。



その他の変異シグネチャーとして全ての群の皮膚腫瘍において SBS2 (シチジンを脱アミノ化する酵素である APOBEC ファミリー)、SBS7 (UV 曝露に関連)、SBS19 (NER により修復される DNA 損傷に関連) が有意にみられ、SBS11 (アルキル化による変異に関連) は *Xpa*-KO の腫瘍において他の群より有意に多くみられた(図E)。



次にそれぞれの群の皮膚腫瘍において、C>T および CC>TT などの UV シグネチャー変異を特徴とする体細胞変異が DNA 鎖のうち転写鎖 (T 鎖) と非転写鎖 (NT 鎖) のどちらに優位に生じているかを評価した。結果、WT においては NT 鎖に、*Xpa*-KO においては T 鎖に体細胞変異が優位にみられ、さらに CXCL1-Ab を投与した *Xpa*-KO において T 鎖に変異が優位にみられるも、CXCL1-Ab を投与しない *Xpa*-KO の群に比してその優位性は低かった(図F)。



さらにヒトの NMCS や他臓器の扁平上皮癌で重要な役割を果たすと報告されているがん遺伝子と TSG の変異に注目したところ、マウスの皮膚腫瘍においても *Kras*、*Hras*、*Pik3ca* などのがん遺伝子、*Notch1*、*Trp53*、*Fat1*、*Nf1*、*Smad4* などの TSG に変異がみられた。また *Fanca*、*Msh6*、

Xrcc4, *Xrcc5* などのいわゆる Caretaker 型の TSG の変異は *Xpa-KO* で特異的に多く検出された。さらに ROS による 8-oxoG が誘導するとされる G:C>A:T 変異は、*Xpa-KO* の *Kras*, *Hras*, *Fat1* で主にみられた。さらに WT においては通常、単回の UVB 照射で皮膚腫瘍が生じることはないが、*Xpa-KO* においては単回の UVB 照射で皮膚腫瘍が形成されることを以前の研究で我々は経験していた。そこで 1 回の UVB 照射で生じる皮膚腫瘍を検討して NMSC 発生に関わるドライバー遺伝子を同定することを目的に、追加実験として 1 回の UVB 照射のみで誘導された *Xpa-KO* の皮膚腫瘍の体細胞遺伝子変異を評価することとした。*Xpa-KO* に 0.5kJ/m² の UVB 照射を 1 回だけ行い、生じた同一腫瘍の一部ずつを照射後 13 週目、18 週目、25 週目にそれぞれ採取し WES 解析を行った。その結果、いずれのサンプルにおいても *Kras*, *Fat1*, *Kmt2c* の体細胞変異がみられた。その他に前出の変異スペクトルや、UV シグネチャー変異である体細胞変異が T 鎖に優位にみられることなどは、慢性的に UVB 照射を行った *Xpa-KO* の結果と同様であった。一般的にがん細胞はアポトーシスの機能喪失と共に生存シグナルの亢進がみられるが、これらに重要なシグナル伝達経路として Ras/Raf/MAPK シグナル伝達経路と並び PI3K/mTOR 経路がある。*Xpa-KO* の皮膚腫瘍ではがん遺伝子である *Kras*, *Hras* の変異が多くみられたが、CXCL1-Ab を投与した *Xpa-KO* での皮膚腫瘍ではこれらの変異はみられず、一方で PI3K/mTOR 経路の構成タンパクをコードする遺伝子である *Pik3ca* の変異が検出された。さらに免疫組織染色した結果、CXCL1-Ab を投与した *Xpa-KO* の皮膚腫瘍においては、投与していない *Xpa-KO* に比して PIK3CA および mTOR の染色陽性率が腫瘍細胞に有意に高かった。

考察として、UVB 照射によって生じた *Xpa-KO*, WT の皮膚腫瘍において *Hras*, *Kras* などがん遺伝子や、*Apc*, *Dcc*, *Fat1*, *Kmt2c*, *Nf1*, *Notch1*, *Pten*, *Smad4*, *Trp53* などの TSG の変異がみられ、これらはヒトの NMSC において報告されている変異遺伝子と同様の傾向であった。またマウスの NMSC において *Trp53* の UV シグネチャー変異が WT は NT 鎖に、*Xpa-KO* は T 鎖に優位に生じることが既報告で明らかとなっていたが、今回は UV シグネチャー変異がみられるがん遺伝子、TSG の体細胞変異が全般的に WT は NT 鎖、*Xpa-KO* は T 鎖に優位にみとめることを初めて確認できた。この結果は UVB 照射など外因性に DNA が損傷された際に、NER が T 鎖の DNA 損傷を修復する働きがあるために通常の NER が機能する WT では相対的に NT 鎖に体細胞変異が多くみられたものと考えられる。一方 *Xpa-KO* においては NER の機能が損なわれており T 鎖の体細胞変異が修復されないために、相対的に T 鎖の変異が多くみられたものと解釈できる。また *Xpa-KO* に対して単回の UVB 照射を行った皮膚腫瘍を WES 解析した結果、*Kras*, *Fat1*, *Kmt2c* の変異をいずれの経時的な皮膚腫瘍からも検出した。つまりこれらの変異が *Xpa-KO* の NMSC の発生および増生に十分な要素であると考えられる。加えて UVB の慢性照射と単回照射のいずれの皮膚腫瘍においても共通して検出された *Kras* 変異は *Xpa-KO* の NMSC の発生段階において重要なドライバー遺伝子となる可能性が示唆された。また CXCL1-Ab を投与した *Xpa-KO* の皮膚腫瘍では *Kras*, *Hras* の変異を認めず、一方で *Pik3ca* は UV シグネチャー変異を認め、腫瘍組織の免疫染色でも PIK3CA およびその下流のシグナルタンパクである mTOR の発現を多く認めた。この結果より、CXCL1-Ab が UVB 照射によって NMSC を生じる免疫環境に何らかの変化をもたらす Ras/Raf/MAPK シグナル伝達経路が抑制され、代償的に PI3K/mTOR 経路の細胞増殖シグナル伝達経路が活性化したものと解釈できる。このことは我々が以前の研究で示した *Xpa-KO* における抗炎症作用を有する CXCL1-Ab の皮膚発がん抑制効果のメカニズムの一端を説明できるものと考えた。結論としては、マウスにおいて UVB 照射により発症した NMSC における UV シグネチャー変異をみとめる体細胞変異は全般的に *Xpa-KO* では T 鎖、WT では NT 鎖に多くみられることが WES 解析の結果確認でき、これは *Xpa-KO* で NER の機能が損なわれているという病態と一致した結果であった。また *Xpa-KO* マウスにおいて UVB 照射により NMSC を誘導する際に、UVB 照射により血中濃度が上昇する炎症性ケモカイン CXCL1 の中和抗体を投与することで Ras/Raf/MAPK シグナル伝達経路を抑制し、結果的に発がん抑制効果をもたらす可能性があることがわかった。さらにヒトにおいても UVB 照射に誘導される NMSC 発生に *KRAS* 変異が腫瘍発生のドライバー遺伝子として関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshioka Ai, Nakaoka Hirofumi, Fukumoto Takeshi, Inoue Ituro, Nishigori Chikako, Kunisada Makoto	4. 巻 31
2. 論文標題 The landscape of genetic alterations of <sc>UVB</sc> induced skin tumors in <sc>DNA</sc> repair deficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 1607 ~ 1617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/exd.14634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ai Yoshioka
2. 発表標題 The landscape of genetic alterations of UVB-induced skin tumors in DNA repair-deficient mice.
3. 学会等名 The 47th Annual meetings of the Japanese Society for Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------