

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16616

研究課題名(和文)紫外線による皮膚癌発生においてDNA損傷トレランスが果たす機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the function of DNA damage tolerance in UV-induced skin cancer development

研究代表者

櫻井 靖高 (Sakurai, Yasutaka)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50733101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線(UV)による皮膚癌の発生にREV7が関与していること明らかにするために、細胞レベルの解析とマウス個体レベルの解析を行った。細胞レベルの解析から、REV7はUV照射後の細胞生存に大きく寄与しており、突然変異の導入にも関与していることが明らかになった。一方、マウス個体レベルの解析では、Polh欠損マウスとPolh欠損 / Rev7ヘテロ欠損マウスではUV照射による腫瘍の発生時期・発生個数に差は見られなかった。Rev7ヘテロ欠損マウスではREV7の機能喪失には不十分な可能性があり、更なる解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

REV7は紫外線(UV)に対する細胞生存に大きく寄与しており、皮膚の恒常性の維持に関与している可能性がある。また、REV7はUVによる突然変異の導入にも関与しているため、皮膚癌の発症に関与している可能性が十分考えられる。本研究を継続することにより、UVによる皮膚癌の発生におけるREV7の役割が明らかとなり、皮膚癌の予防や治療に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the involvement of REV7 in ultraviolet (UV)-induced skin cancer development, analyses using culture cells and genetically modified mouse conducted. Using culture cells, we revealed that REV7 contributed significantly to cell survival after UV irradiation and was also involved in the introduction of mutations. On the other hand, no difference in the timing or number of UV-induced tumors was observed between Polh-deficient mice and Polh-deficient / Rev7-heterodeficient mice, suggesting that loss of REV7 function may not be sufficient in Rev7 heterodeficient mice.

研究分野：分子生物学、実験病理学

キーワード：REV7 DNA損傷トレランス 紫外線 発癌 損傷乗り越えDNA合成 突然変異 DNAポリメラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の国民病と言われる癌の大部分は、ゲノム上に生じた突然変異の蓄積によるものであり、その突然変異を引き起こす主な原因は DNA 損傷である。紫外線 (UV) は DNA 損傷を引き起こす要因の一つであり、UV の曝露と皮膚癌の発生頻度は相関性を示す。DNA 損傷によって突然変異が引き起こされるメカニズムには、DNA 損傷に対する細胞の防御機構が深く関係している。

DNA 損傷は DNA 修復機構により修復されるが、修復されずに損傷が残った場合、DNA 損傷に対する耐性機構 (DNA 損傷トレランス) が細胞を死から救う働きをしている (Sale *et al.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012)。しかし、その代償として突然変異を導入してしまうことがあり、それが発癌を誘発すると考えられている。従って、DNA 損傷トレランスのメカニズムを明らかにすることは、癌の発生メカニズムの解明とその予防・治療の開発のために非常に重要である。

DNA 損傷トレランスには、突然変異を誘発しやすい場合と誘発しにくい場合が存在する (Vaisman *et al.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 2017)。色素性乾皮症 V 群の責任遺伝子 *POLH* がコードする DNA ポリメラーゼ・イータ (Pol ϵ) は、UV 損傷に対して突然変異を誘発しにくい。申請者は、Pol ϵ による DNA 損傷トレランスが UV による突然変異と発癌の抑制に寄与していることを遺伝子改変マウスを用いて明らかにしてきた。これまでに Pol ϵ をはじめ、皮膚癌の抑制に寄与する DNA 損傷トレランスタンパク質は複数報告されているが、発癌に関与するタンパク質は報告されていない。

一方、REV7 は突然変異を誘発しやすい DNA 損傷トレランスタンパク質であり、REV7 の発現を抑制したヒト線維芽細胞株では UV 照射後の突然変異発生率が減少することが報告されている (McNally *et al.* DNA Repair, 2008)。また、ヒトの病理標本において、REV7 は小細胞肺癌や精巣腫瘍など複数の悪性腫瘍で高発現していることから、REV7 は発癌に密接に関係している可能性が考えられる。しかし、発癌への関与について、ほ乳類動物個体を用いて直接的に証明した研究は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、UV が誘発する皮膚癌の発生に REV7 が関与していることをマウス個体レベルで証明し、そのメカニズムを細胞・組織レベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 表皮角化細胞の作成と UV 損傷応答の解析

先行研究にて樹立済みのマウス表皮角化細胞 (野生型と *Polh* 欠損型) を用いて、CRISPR/Cas9 システムによる *Rev7* 遺伝子を欠損させた。作成した細胞株の増殖について、血球計算盤を用いた算定法で定量化し、UV 感受性について、コロニー形成率を指標にした方法で生存率を求めた。

(2) 表皮角化細胞における UV 照射後の突然変異発生率の解析

REV7 の発現量の違いが突然変異導入に及ぼす影響を細胞レベルで解析するため、(1) で作成した表皮角化細胞を用いて *supF* 遺伝子変異を利用した突然変異の解析を行った。*supF* 遺伝子を持つシャトルベクターに UV を照射し、作成した表皮角化細胞に導入してシャトルベクター上の遺伝子変異を解析した。

(3) REV7 欠損が UV 誘発皮膚癌発生に及ぼす影響の解析

REV7 の発現量の違いによる UV 発癌への影響を解析するため、8-12 週齢の二重遺伝子改変マウス (野生型マウス、*Rev7* ヘテロ欠損マウス、*Polh* 欠損マウス、*Polh* 欠損 / *Rev7* ヘテロ欠損マウス) の背中を剃毛し、2 kJ/m²/day の UV を週 3 日照射した。経時的に肉眼による皮膚腫瘍の発生状態を観察し、腫瘍の発生時期や数、形態、発生部位を記録した。最も大きい腫瘍が 7 mm 大に達したマウスは安楽死し、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。その時に UV 未照射部位として腹部の皮膚も同時に採取した。

(4) 皮膚特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスの樹立

(3) について *Rev7* ヘテロ欠損では REV7 の機能喪失には不十分な可能性があるため、コンディショナルノックアウトマウスを用いた実験系を進めた。皮膚特異的に *Rev7* を欠損させるために、K14 プロモーター下で *iCre*-GFP を発現するトランスジェニックマウス (K14-*iCre*-GFP TG) を作成した。K14 プロモーターを持つ発現ベクターに *iCre* cDNA を挿入し、トランスジェン発現ベクターを作製した。K14-*iCre*-GFP TG マウスの作製は北里大学遺伝子高次機能解析センターに依頼して行った。

4. 研究成果

(1) 表皮角化細胞の作成と UV 損傷応答の解析

先行研究で樹立したマウス由来のケラチノサイト（野生型細胞と *Polh* 欠損型細胞）を用いて *Rev7* 遺伝子のノックアウトを行い、*Rev7* 欠損型細胞と *Polh / Rev7* 二重欠損型細胞を作成した。これらの細胞の増殖速度を調べたところ、*Polh* 欠損型細胞では細胞増殖に影響は見られなかったが、*REV7* を欠損することで細胞の増殖速度が低下した。次に、紫外線感受性をコロニー形成試験法で解析を行ったところ、*Rev7* 欠損型細胞は *Polh* 欠損型細胞よりも高い感受性を示した。また、*Polh / Rev7* 二重欠損型細胞はそれぞれの単独欠損と比較して、相乗的な感受性の亢進を示した。*Rev7* 欠損型細胞で見られる高い紫外線感受性が *REV7* の欠損に起因するかを調べるために、*Rev7* 発現ベクターを用いて *REV7* の発現を回復させたところ、紫外線感受性が親株と同程度にまで回復した。さらに、紫外線によって生じる二本鎖切断を免疫染色で解析したところ、*Polh* 欠損型細胞は *Rev7* 欠損型細胞よりも強いシグナルが得られた。この結果は、紫外線感受性の結果と逆転する結果であり、*Rev7* 欠損型細胞が示す高い紫外線感受性には、DNA 損傷トランス機能だけでなく、二本鎖切断修復機能が関与している可能性が考えられる。

(2) 表皮角化細胞における UV 照射後の突然変異発生率の解析

REV7 の発現量の違いが UV による突然変異導入に及ぼす影響を細胞レベルで解析するため、(1) で作成した 4 種の細胞を用いて *supF* 遺伝子変異を利用した突然変異の解析を行った。その結果、*Rev7* 欠損型細胞は野生型細胞よりも低い突然変異頻度を示し、*Polh* 欠損によって上昇する突然変異頻度は *Rev7* のノックアウトにより抑えられることがわかった。さらに、*supF* 遺伝子上の変異スペクトラムを解析したところ、*REV7* を欠損するとすべての突然変異頻度が低下し、中でも皮膚癌で高頻度に見られる G:C to A:T 変異が顕著に低下した。

(3) *REV7* 欠損が UV 誘発皮膚癌発生に及ぼす影響の解析

当初使用する予定だった *Rev7* ホモ欠損マウスが胎生致死を示したため、*Rev7* ヘテロ欠損マウスを用いて解析を進めた。2 kJ/m²/day の UV を週 3 日間照射したところ、野生型マウスと *Rev7* ヘテロ欠損マウスでは腫瘍の発生は認められなかった。一方、*Polh* 欠損マウスと *Polh* 欠損 / *Rev7* ヘテロ欠損マウスでは UV 照射による腫瘍の発生が認められたが、発生時期・発生個数に差は見られなかった。生じた腫瘍の病理学的解析を行ったところ、*Polh* 欠損マウスと *Polh* 欠損 / *Rev7* ヘテロ欠損マウスで見られた腫瘍のほとんどが高分化型扁平上皮癌であり、遺伝子型による有意な所見は見られなかった。

(4) 皮膚特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスの樹立

Rev7 ヘテロ欠損では *REV7* の機能喪失には不十分な可能性がある。*Rev7* コンディショナルノックアウトマウスを用いて皮膚特異的に *Rev7* を欠損させるために、K14 プロモーター下で *iCre-GFP* を発現するトランスジェニックマウス (K14-*iCre-GFP* TG) の作成を行なった。K14 プロモーター下に *iCre-GFP* の cDNA を挿入したトランスジーンをインジェクションし、243 個の移植胚から F0 マウスが 49 匹得られた。ジェノタイプングの結果、TG 陽性のマウスが 1 匹得られた。得られた F0 マウスを野生型マウスと交配し、F1 マウスを作出した。作出した F1 マウスにおいて、*iCre-GFP* の発現を免疫染色により解析したところ、抗 Cre 抗体 および抗 GFP 抗体のいずれにおいても、有棘層において発現が認められ、K14 が発現する基底層での発現が見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Tadehara Masayoshi, Kato Takuya, Adachi Kai, Tamaki Akihiro, Kesen Yurika, Sakurai Yasutaka, Ichinoe Masaaki, Koizumi Wasaburo, Murakumo Yoshiki	4. 巻 51
2. 論文標題 Clinicopathological Significance of BRCAness in Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Association With Anticancer Drug Sensitivity in Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 183 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001975	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 -
1. 著者名 Adachi Kai, Sakurai Yasutaka, Ichinoe Masaaki, Tadehara Masayoshi, Tamaki Akihiro, Kesen Yurika, Kato Takuya, Mii Shinji, Enomoto Atsushi, Takahashi Masahide, Koizumi Wasaburo, Murakumo Yoshiki	4. 巻 480
2. 論文標題 CD109 expression in tumor cells and stroma correlates with progression and prognosis in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 819 ~ 829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-021-03230-2	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 -
1. 著者名 Hoshino Akiyoshi, Nakayama Chika, Jiang Shi Xu, Sakurai Yasutaka, Kato Takuya, Numata Yoshiko, Umezawa Atsuko, Ichinoe Masaaki, Murakumo Yoshiki	4. 巻 72
2. 論文標題 Upregulation of REV7 correlates with progression of malignant melanoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 14 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13174	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 -
1. 著者名 Sakurai Yasutaka, Ichinoe Masaaki, Yoshida Kazuki, Nakazato Yuka, Saito Shoji, Satoh Masashi, Nakada Norihiro, Sanoyama Itaru, Umezawa Atsuko, Numata Yoshiko, Shi-Xu Jiang, Ichihara Masatoshi, Takahashi Masahide, Murakumo Yoshiki	4. 巻 489
2. 論文標題 Inactivation of REV7 enhances chemosensitivity and overcomes acquired chemoresistance in testicular germ cell tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 100 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2020.06.001	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 -

1. 著者名 Sanoyama Itaru, Sakurai Yasutaka, Ichinoe Masaaki, Hoshino Akiyoshi, Kesen Yurika, Kato Takuya, Numata Yoshiko, Umezawa Atsuko, Jiang Shi Xu, Murakumo Yoshiki	4. 巻 71
2. 論文標題 Increased expression of REV7 in small cell lung carcinomas and its association with tumor cell survival and proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 15 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13040	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 -

1. 著者名 Nakada Norihiro, Mikami Tetuo, Horie Kayo, Nagashio Ryo, Sakurai Yasutaka, Sanoyama Itaru, Yoshida Tsutomu, Sada Miwa, Kobayashi Kiyonori, Sato Yuichi, Okayasu Isao, Murakumo Yoshiki	4. 巻 70
2. 論文標題 Expression of CA2 and CA9 carbonic anhydrases in ulcerative colitis and ulcerative colitis associated colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 523 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12949	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 蓼原 将良、加藤 琢哉、安達 快、櫻井 靖高、一戸 昌明、村雲 芳樹
2. 発表標題 膵癌におけるBRCAnessの臨床病理学的特性および膵癌細胞株における抗癌剤感受性
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安達 快、櫻井 靖高、加藤 琢哉、一戸 昌明、村雲 芳樹
2. 発表標題 膵臓癌におけるCD109発現の臨床的、細胞生物学的意義の解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞山 到、一戸 昌明、櫻井 靖高、村雲 芳樹
2. 発表標題 Biological significance of REV7 expression in small cell lung carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎名 勇貴、櫻井 靖高、加藤 琢哉、一戸 昌明、村雲 芳樹
2. 発表標題 Identification of novel REV7 interacting proteins using the BiOLD method
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野 昭芳、一戸 昌明、櫻井 靖高、村雲 芳樹
2. 発表標題 REV7 expression is associated with disease progression of malignant melanoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井 靖高、仲田 典広、一戸 昌明、蔣 世旭、高橋 雅英、村雲 芳樹
2. 発表標題 REV7不活化はシスプラチン抵抗性胚細胞腫瘍の抗癌剤感受性を増強する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯貝 奈々子、櫻井 靖高、加藤 琢哉、梅沢 敦子、沼田 賀子、一戸 昌明、吉田 松生、村雲 芳樹
2. 発表標題 生殖細胞維持および精子形成におけるDNA損傷応答蛋白質REV7の重要性
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞山 到、村雲 芳樹、一戸 昌明、櫻井 靖高
2. 発表標題 小細胞肺癌の生物学的特性におけるREV7発現の意義
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野 昭芳、一戸 昌明、櫻井 靖高、村雲 芳樹
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるREV7の機能解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達 快、櫻井 靖高、加藤 琢哉、一戸 昌明、村雲 芳樹
2. 発表標題 膵臓癌の予後におけるCD109発現の意義の解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 将良、加藤 琢哉、安達 快、櫻井 靖高、一戸 昌明、村雲 芳樹
2. 発表標題 手術検体を用いた膀胱癌におけるBRCAnessの解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯貝 奈々子、櫻井 靖高、加藤 琢哉、一戸 昌明、沼田 賀子、梅沢 敦子、村雲 芳樹
2. 発表標題 生殖細胞維持および精子形成におけるDNA損傷応答蛋白質REV7の重要性
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学医学部病理学（村雲）単位 https://www.med.kitasato-u.ac.jp/lab/murakumo/

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