



The landscape of genetic alterations of UVB-induced skin tumors in DNA repair-deficient mice

吉岡, 愛育

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2022-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8447号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477873>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

The landscape of genetic alterations of UVB-induced skin tumors in DNA repair-deficient mice

DNA 修復機構欠損マウスにおける UVB 照射により形成された皮膚腫瘍の網羅的遺伝子変異解析

吉岡 愛育, 中岡 博史, 福本 肇, 井ノ上 逸朗, 錦織 千佳子, 国定 充

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

内科系講座 皮膚科学

(指導教員 : 久保亮治教授)

吉岡 愛育

背景

悪性黒色腫やその他の非悪性黒色腫皮膚がん（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発症する。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。がん遺伝子である*RAS*やがん抑制遺伝子（TSG）である*TRP53*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。

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。

材料と方法

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40cm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を使用し、マウスを以下3群のグループにわけて慢性的にUVBを照射し、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1.8kJ/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0.5kJ/m²を週2回、10週間にわたりUVBを照射した後、15週間にわたり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0.5kJ/m²のUVBを照射し、照射直後と24時間後にCXCL1-Ab 5μgを腹腔内投与し、その後15週間にわたり皮膚腫瘍形成について観察した。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ソエオジン染色、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。

結果

Xpa-KO は既報告の通り、WT よりも少ない 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。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。

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。

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 0.5 kJ / m² の UVB 照射を 1 回だけ行い、生じた腫瘍から照射後 13 週目、18 週目、25 週目にそれぞれ一部を採取して 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し、複数の内臓悪性腫瘍でがん遺伝子として報告されている *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

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 鎖に優位にみられ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ることができる。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におけるNMSCの発生段階において重要なドライバー遺伝子であ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し 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であると考えた。

結論

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る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。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第3219号	氏名	吉岡 愛育
論文題目 Title of Dissertation	<p>The landscape of genetic alterations of UVB-induced skin tumors in DNA repair-deficient mice</p> <p>DNA修復機構欠損マウスにおけるUVB照射により形成された皮膚腫瘍の網羅的遺伝子変異解析</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p>	<p>野津 寛之</p> <p>青井 貴之</p> <p>菊 淳一郎</p>	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

背景

悪性黒色腫やその他の非悪性黒色腫皮膚がん (NMSC) は、おもに紫外線 (UV) によってDNA上にシクロプロパ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発症する。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。がん遺伝子である *RAS* やがん抑制遺伝子 (TSG) である *TRP53* 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。

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。

結果と考察

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 鎖に優位にみられるなど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ることができる。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 における NMSC の発生段階において重要なドライバー遺伝子であ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し 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であると考えた。

結論

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。

以上、同分野において重要な知見を得ることに成功し、価値のある成果を排出したものと認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。