OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Xpc-PolhダブルKOマウスにおける紫外線の皮膚発癌への影響
Author(s)	杉本, 大気
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46533
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	杉本大気（すぎもと たいき）
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第 20245 号
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	*Xpc-Polh* ダブル KO マウスにおける紫外線の皮膚発癌への影響
論文審査委員	（主査） 教授 花岡 文雄 （副査） 教授 山元 弘　教授 松田 敏夫　教授 岡部 勝

論文内容の要旨

高等真核生物の DNA 修復機構や TLS 機構の研究は、色素性乾皮症（XP：xeroderma pigmentosum）の解析を一つの柱として進められてきた。XP は、日光露光部での色素沈着、高頻度発癌、日光過敏症状などを主症状とする常染色体性劣性遺伝疾患であり、XP-A～G と XP-V の８つの遺伝的相補性群に分類されている。これらの８つの相補性群のうち、XP-A～G の７群は、ヌクレオチド除去修復（NER：nucleotide excision repair）機構に異常がある。一方で、XP-V は、DNA ポリメラーゼ η（pol η）をコードする *POLH* 遺伝子に異常を持ち、損傷乗り越え複製（TLS：translesion synthesis）機構を欠損する。

我々のグループでは、XP-C 群責任遺伝子産物 XPC を同定し、XPC が NER 機構の副経路のうちの１つ、ゲノム DNA 全体を対象とする修復機構（GGR：global genome repair）において特異的に機能するタンパク質であること、特に損傷の認識と損傷部位における修復複合体形成に必要な因子であることを明らかにしてきた。また近年、我々の研究室で、XP-V 群の責任遺伝子産物として pol η を同定し、これが複製の鋳型鎖に生じた紫外線損傷であるシクロブタン型ピリミジン２量体に対して正しいヌクレオチドを重合できる損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼであることを報告している。DNA 修復機構や TLS 機構に関わる因子の性質や生体内での機能を明らかにすることは、発癌機構の解明、および癌抑制機構に関する知見を得る上でも重要であると考えられる。私は、XPC タンパク質を欠損した *Xpc* 欠損マウス、pol η を欠損した *Polh* 欠損マウス、そして *Xpc-Polh* 二重欠損マウスを用いて、紫外線による皮膚発癌についての解析を行った。

まず、紫外線照射後のマウス胎児由来繊維芽細胞の生存率を［^{3}H］チミジンの取り込み量を指標にして測定した。細胞のチェックポイント機構に働く ATM/ATR キナーゼの阻害剤カフェインの非存在下で、$Xpc^{-/-}Polh^{+/+}$ 細胞、$Xpc^{+/+}Polh^{-/-}$ 細胞は、ほぼ同程度の紫外線感受性を示し、$Xpc^{-/-}Polh^{-/-}$ 細胞はこれらの細胞よりも強い感受性を示した。カフェイン存在下においても、$Xpc^{-/-}Polh^{-/-}$ 細胞は、$Xpc^{+/+}Polh^{-/-}$ 細胞や $Xpc^{+/-}Polh^{-/-}$ 細胞よりもやや強い感受性を示した。カフェイン添加による感受性の亢進は、$Xpc^{+/+}Polh^{-/-}$ 細胞で最も大きく、$Xpc^{-/-}Polh^{+/+}$ 細胞では少なかった。$Xpc^{-/-}Polh^{-/-}$ 細胞におけるカフェイン添加による感受性の亢進度合いは、*Xpc* 遺伝子と *Polh* 遺伝子の二重欠損による、相加的な影響が表れていた。

次に、各遺伝子欠損マウスに紫外線を照射し、皮膚発癌実験を行った。0.4 kJ/m^2/day の紫外線量で行ったとき $Xpc^{+/+}Polh^{+/+}$ マウスでは皮膚腫瘍の発生は全く認められなかったのに対し、$Xpc^{-/-}Polh^{+/+}$ マウスでは、13 週目

から腫瘍の発生が認められ、20週目までにおよそ70%のマウスに腫瘍の発生を確認した。*Xpc*$^{+/+}$*Polh*$^{-/-}$ マウスでは、12週目から腫瘍の発生が認められ、20週目までにおよそ80%のマウスに腫瘍の発生を確認した。紫外線量を2 kJ/m^2/dayに増加させた場合、*Xpc*$^{+/+}$*Polh*$^{+/+}$ マウスでは皮膚腫瘍の発生は全く認められなかったのに対し、*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{+/+}$ マウス、*Xpc*$^{+/+}$*Polh*$^{-/-}$ マウス共に、13週目から腫瘍の発生が認められ、20週目までにそれぞれおよそ 70%と 90%のマウスに腫瘍の発生を確認した。どちらの遺伝子欠損マウスにおいても、0.4 kJ/m^2/day と 2 kJ/m^2/dayとで同じような腫瘍発生傾向を示し、有意差は無かった。また、2 kJ/m^2/dayの紫外線を20週間照射したマウスの皮膚を組織病理学的に解析した結果、診断した *Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{+/+}$ マウスと *Xpc*$^{+/+}$*Polh*$^{-/-}$ マウスのすべてに、皮膚の表皮の癌である、扁平上皮癌が生じていることが明らかとなった。

一方で、*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{-/-}$ マウスの紫外線誘発皮膚発癌実験では、0.4 kJ/m^2/dayの UV-B を照射したとき、9週目に腫瘍発生が確認され、19週目には用いた14匹のすべてのマウスで腫瘍が発生し、*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{+/+}$ マウスや *Xpc*$^{+/+}$*Polh*$^{-/-}$ マウスよりも腫瘍発生時期が早まり、統計学的にも有意であることが明らかとなった。また、マウス一匹あたりに生じた腫瘍の個数でも、*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{-/-}$ マウスでは、およそ *Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{+/+}$ マウスと *Xpc*$^{+/+}$*Polh*$^{-/-}$ マウスに生じた腫瘍を足し合わせた数の腫瘍が発生しており、*Xpc* 遺伝子の欠損による効果と、*Polh* 遺伝子の欠損による効果の相加的な影響が現れていると考えられた。

紫外線量を2 kJ/m^2/dayにすると、*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{-/-}$ マウスは、9週目に腫瘍が確認され14週目には用いた7匹のすべてのマウスで腫瘍が発生し、*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{+/+}$ マウスや *Xpc*$^{+/+}$*Polh*$^{-/-}$ マウスよりも、腫瘍発生時期が早まった。さらに、この条件では、0.4 kJ/m^2/day の条件のときよりも腫瘍発生時期が早まった。つまり、それぞれの遺伝子を単独で欠損するマウスでは紫外線量の増加に伴う腫瘍発生傾向の変化は認められなかったのに対し、*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{-/-}$ マウスでは、紫外線量の増加に伴い腫瘍発生時期が早まることが明らかとなった。

また、マウスの皮膚を同様に病理学的に解析した結果、診断した *Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{-/-}$ マウス、*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{+/-}$ マウス、*Xpc*$^{+/-}$*Polh*$^{-/-}$ マウスのすべてに扁平上皮癌が生じていた。*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{-/-}$ マウスと *Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{+/-}$ マウスにおいて、1例ずつ（それぞれ、6例中、9例中）繊維肉腫が生じていた。この腫瘍は、扁平上皮癌とは違って皮膚の真皮に生じる腫瘍であり、*Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{+/+}$ マウスや *Xpc*$^{+/+}$*Polh*$^{-/-}$ マウスの解析では全く認められなかった腫瘍である。

本研究により、*Xpc* 欠損マウス、*Polh* 欠損マウスは、紫外線量を増加しても皮膚腫瘍発生傾向に差が無いのに対し、*Xpc*-*Polh* 二重欠損マウスの場合は、紫外線量に依存して腫瘍発生時期が早まることが明らかとなった。生じた皮膚腫瘍のほとんどは、表皮由来の扁平上皮癌であり、紫外線量に依存した発癌傾向の違いについて、癌抑制遺伝子の変異などを調べることで新たな知見が得られると期待している。また、症例数は少ないが *Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{-/-}$ マウスと *Xpc*$^{-/-}$*Polh*$^{+/-}$ マウスにのみ真皮の腫瘍である繊維肉腫が生じ、GGR と TLS を同時に欠損させることで初めて認められた現象であると推測する。これは、繊維肉腫の発生機序についての研究、および真皮における紫外線損傷の修復についての研究に大いに役立つと思われる。

論文審査の結果の要旨

ヌクレオチド除去修復（NER）において、C群色素性乾皮症の原因遺伝子産物であるXPCタンパク質は、ゲノム全体の修復の初期段階、すなわち損傷の認識に関わっていることが、主として無細胞 NER 系による研究から明らかになってきた。一方、バリアント群 XP 患者においては、損傷乗り越え複製（TLS）に関与する DNA ポリメラーゼ η（Polη）が紫外線損傷による DNA 複製の阻害を回避するところに働いている。すなわち XPC と Polη はともに紫外線損傷に対する細胞応答に働く重要なタンパク質である。本論文では NER と TLS の細胞内におけるクロストークの可能性を調べる目的で、既に当研究室で得られている XPC および Polη ノックアウトマウスを掛け合わせ、二重ノックアウトマウスを作成した。そしてそこから得られるマウス繊維芽細胞（MEF）の紫外線感受性あるいはノックアウトマウスの紫外線照射による皮膚発がんの様相を解析し、以下のような結果を得た。

1）*XPC*(−/−) 細胞と *Polη*(−/−) 細胞は、ほぼ同程度の紫外線感受性を示し、*XPC*(−/−)*Polη*(−/−)二重欠損細胞はほぼ相加的な感受性を示した。

2）2 kJ/m²/day の紫外線量で照射したとき、*XPC*(−/−)マウスと *Polη*(−/−) マウスは照射開始後 13 週目から皮膚に腫瘍を発生し、20 週目までにそれぞれおよそ 70%と 90%のマウスに腫瘍発生を認めた。一方、これらの二重欠損マウスでは 9 週目に腫瘍が認められ、14 週目には用いた 7 匹のすべてのマウスで腫瘍が発生した。すなわち紫外線照射による腫瘍発生において、これらの遺伝子の欠損は相加的に働いていると考えられる。

3）一方、病理学的な診断から、*XPC*(−/−)マウス、*Polη*(−/−) マウス、*XPC*(−/−) *Polη*(−/−) マウスのいずれにおいてもすべてのマウスにおいて扁平上皮がんが生じていた。また症例は少ないものの、*XPC* (−/−) *Polη* (−/−) マウスにおいてのみ、繊維肉腫が生じていた。すなわち、*XPC*(−/−)マウスと *Polη*(−/−) マウスは扁平上皮がんの発生機序に、また*XPC*(−/−) *Polη*(−/−)マウスは繊維肉腫の発生機序の解明に役立つことが期待される。

以上のように、本論文は紫外線による皮膚発がんに関して新たな知見を明らかにしており、博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものと考える。