

19990348

平成11年度

厚生科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

研究報告書

主任研究者 田中亀代次

平成11年度

厚生科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

研究報告書

主任研究者 田中亀代次

「老化、癌化における DNA 修復の役割に関する研究」

主任研究者 田中亀代次 大阪大学細胞生体工学センター 教授

研究要旨

本研究は、老化、癌化における DNA 修復の役割の解析を目的として、1) ヒトにおける転写と共役したヌクレオチド除去修復機構の解析、2) その異常による早期老化の分子病態の解析、および、3) ヌクレオチド除去修復欠損マウスにおける紫外線誘発皮膚発癌機構の解析を行った。本年度の主な成果は以下のように総括できる。1) 新規蛋白質 XAB2 は、色素性乾皮症 A 群 (XPA)、コケイン症候群 A、B 群 (CSA、CSB) 蛋白質、RNA polymerase II とも結合し、転写と共役したヌクレオチド除去修復機構に関与する可能性を示唆した。2) XAB2 蛋白質は蛋白質複合体を形成する。XAB2 複合体の精製を行い、少なくとも 10 個以上の蛋白質が XAB2 複合体に含まれ、それらのアミノ酸配列を決定し、当該遺伝子を同定した。3) マウス XAB2 遺伝子の構造を明かにした後、XAB2 遺伝子のノックアウトは胎児致死をもたらすことを明かにした。4) コケイン症候群と類似の症状を示す *cerebro-oculo-facio-skeletal* (COFS) 症候群患者細胞より XAB2cDNA を増幅し、*direct sequencing* したが、変異は見つからなかった。5) XPA 遺伝子を欠損させたマウスにできた皮膚癌より、5つの皮膚癌細胞株を樹立した。これらの皮膚癌細胞株は、UV 照射後の細胞周期チェックポイント機構、ミスマッチ修復活性が低下していることを見つけた。ついで、XPA/MSH2 ダブル欠損マウスを作成することにより、ミスマッチ修復蛋白質が UV 照射後の細胞周期チェックポイント機構及び細胞死に関与していることを確認した。6) RLGS (*restriction landmark genomic scanning*) 法により、XPA 欠損マウスの UV 皮膚発癌に関与する遺伝子をスクリーニングし、*Dermo-1* 遺伝子が皮膚癌細胞で高発現しているのに対し、正常皮膚上皮では発現が認められなかった。7) 大腸菌リボソームの小サブユニット蛋白質をコードする遺伝子 (*rpsL* 遺伝子) を導入したトランスジェニックマウスと XPA 欠損マウスを交配し、紫外線照射後の XPA 欠損マウス皮膚上皮における *rpsL* 遺伝子上の突然変異を調べた。その結果、非常に低線量の紫外線照射でも XPA 欠損マウスでは紫外線照射に特異的な変異が導入されることを明かにした。8) XPA 或は CSB 単独欠損マウスは特に著明な神経学的異常をしめさないのに対して、XPA/CSB ダブル欠損マウスは生後 3 ~ 4 週で死に、小脳外顆粒層において *neuroblast* の減少及びアポトーシスの亢進、*Purkinje* 細胞の形成異常が認められた。このことは、XPA 或は CSB 蛋白質は、ヌクレオチド除去修復能以外に重要な相補的機能を持つことを示唆する。9) XPA 欠損マウスでは紫外線照射により細胞性免疫能と NK 細胞能が著明に抑制され、これらの免疫学的障害に *prostaglandin E2* が関与することを示した。以上の結果は、ヒトにおける転写と DNA 修復機構およびその欠損の分子病態の解明に向けて重要な糸口を提供するものと考えられる。

分担研究者

北村幸彦・大阪大学医学部教授

畠中 寛・大阪大学蛋白質研究所

堀尾 武・関西医科大学教授

#### A. 研究の目的

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) は、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) 機構に異常を持つヒト遺伝疾患で、日光紫外線 (UV) による高頻度皮膚癌発生と、種々の精神神経症状を臨床的特徴とする。XP には A から G 群 (XP-A-XP-G) とバリエーション (XP-V) の 8 つの遺伝的相補性群が存在し、XPA (A 群 XP)、XPB、XPC、XPD、XPF、XPG、XPV 遺伝子が既にクローニングされ、NER の分子機構の解明が急速に進展している。一方、NER は転写機構と密接な関連を持ち、転写鎖上の DNA 損傷は非転写鎖上のそれよりも早く修復される機構が存在し、「転写と共役したヌクレオチド除去修復」 (transcription-coupled NER; TC-NER) と呼ばれる。転写鎖以外の損傷はゆっくりと修復され、「ゲノム全体の修復」 (global genome NER; GG-NER) と呼ばれる。コケイン症候群 (Cockayne syndrome; CS) は、悪液質性瘵瘦、知能低下、種々の早期老化徴候などを示すヒト遺伝疾患である。CS 細胞は UV に高感受性を示し、TC-NER 機構が選択的に欠損していることが解っている。CS には A と B 群の 2 つの遺伝的相補性群 (CS-A と CS-B) が存在し、CSA (A 群 CS)、CSB 遺伝子が既にクローニングされている。他方、XP-C では TC-NER 機構は正常だが、GG-NER 機構が特異的に欠損している。

本研究では、1) 我々が発見した新規蛋白質で、XPA、CSA、CSB、RNA polymerase II と結合し、TC-NER と転写機構に関与する XAB2 (XPA-binding protein 2) の機能の解明を進め、TC-NER の分子機構およびその異常による分子病態の解明を研究目的とした。また、2) XPA 欠損マウスや CSB 欠損マウスを用いて、UV による高頻度皮膚癌の分子機構の解明、神経学的異常の分子病態の解

析をもう一つの研究目的とした。

#### B. 研究方法

1) 酵母 Two Hybrid System を用いた、XPA 蛋白質と結合する新規蛋白質 XAB2 の遺伝子クローニングは、pGBT9-XPA を bait にして、pGADGH-HeLa cDNA library をスクリーニングすることにより行った。

2) XAB2 と CSA、CSB の免疫共沈降実験には、heamagglutinin (HA)-tag を持つ CSA あるいは CSB cDNA を発現させた CS-A および CS-B 細胞を用いた。これらの細胞抽出液を抗 HA 抗体で免疫沈降し、その沈降物中に XAB2 が含まれるかを、抗 XAB2 抗体を用いたウエスタンブロット法で確かめた。XAB2 と RNA polymerase II との免疫共沈降では、RNA polymerase II 最大サブユニットに対するモノクローナル抗体を用いた。

3) XAB2 蛋白質の機能解析は、抗 XAB2 血清を生きた正常ヒト線維芽細胞の細胞質にマイクロインジェクションし、24 時間後に紫外線照射し、不定期 DNA 合成や紫外線照射後の RNA 合成の回復に影響があるか否かをオートラジオグラフィ法を用いて行った。

4) XPA 欠損マウスの紫外線照射により発生した皮膚癌より皮膚癌細胞株 5 つを樹立し、それらの DNA 修復能や細胞周期チェックポイント能の解析を行った。

5) XPA 欠損マウス皮膚発癌に関与する遺伝子の同定は、吉川らの RLGS 解析法 (Biochem. Biophys. Res. Comm., 196, 1566-1572, 1993) により行った。

6) XPA/CSB 欠損マウスの神経学的解析には、生後 8 日と 14 日齢の XPA/CSB 欠損マウス脳を摘出し、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、厚さ 10  $\mu$ m の切片を作成した。これらを Nissle 染色、抗カルビンデイン染色により解析した。アポトーシス細胞は TUNEL 法により検出した。細胞増殖能はマウス腹腔内 BrdU ラベリングを行った後、抗 BrdU 抗体を用いて染色を行った。

7) XPA 欠損マウスにおける紫外線照射後のプロスタグランジン測定は enzyme immunoassay で行い、プロスタグ

ランジン合成酵素との関連は、COX-1、COX-2、cytosolic phospholipase A2 遺伝子の発現を RT-PCR 法で解析することにより行った。

8) 倫理面での配慮：本研究で使用するヒト細胞は細胞バンク等より入手したが、これらの細胞は、診断と研究のために使用するという informed consent のもとで生検されたものであり、本研究で使用することに倫理的問題はない。

## C. 研究結果

### C. 研究結果及び考察

1) XAB2 蛋白質は、XPA、CSA、CSB 蛋白質、RNA polymerase II と結合することから、TC-NER に関与する可能性が示唆された。2 種類の抗 XAB2 抗体（完全長の XAB2 に対する抗体 antiXAB2FL と、XAB2 の C 端に対する抗体 antiXAB2C）を生きた細胞にマイクロインジェクションし、TC-NER 能が抑制されるか否かを調べた。その結果、いずれの抗体によっても、XP-C 細胞における紫外線照射後の不定期 DNA 合成、及び、正常細胞の紫外線照射後の RNA 合成の回復が著明に抑制され、XAB2 蛋白質が、TC-NER に必須の因子であることが明らかになった。antiXAB2C では未照射細胞の RNA 合成が影響を受けなかったのに対し、antiXAB2FL をマイクロインジェクションすると、未照射細胞の RNA 合成も抑制され、XAB2 蛋白質は転写そのものにも重要な役割を果たすことが明らかになった。

2) XAB2 蛋白質は tetratricho peptide repeat (TPR) motif を持ち、蛋白質複合体形成に関与することが示唆された。事実、正常細胞抽出液をゲルろ過すると、XAB2 (100kDa) は 700kDa 以上の大きなフラクションに検出された。XAB2 複合体の精製を、FLAG-XAB2 を発現させた HeLa 細胞抽出液と抗 FLAG 抗体アフィニティーカラムを用いて行い、少なくとも 10 個以上の蛋白質が XAB2 複合体に含まれることを明らかにした。質量分析法により、それらのアミノ酸配列を決定し、当該遺伝子を同定した。それらは、pre-mRNA processing、細胞周期チェックポイントに関与するものであったり、RNA 結合、NTP 結合、ヘリケースドメイン等を持つ新規蛋白質であった。これらのデータは、XAB2 が TC-NER や転写に関与する結果と良く一致し、XAB2 複合体の解析により新しい生命現象が明らかになる可能性が示唆された。

3) マウス XAB2 遺伝子をクローニングし、その構造を

明らかにした。そして、XAB2 遺伝子のターゲティングを行い、XAB2 遺伝子のノックアウトは胎児致死をもたらすことが示唆された。

4) 16 人の、CS と類似の症状を示す cerebro-oculo-facio-skeletal (COFS) 症候群患者細胞より XAB2cDNA を増幅し、direct sequencing したが、変異は見つからなかった。

5) 他方、XPA 欠損マウスは、XP 患者と同様に低線量の UV 照射により皮膚癌を高頻度で発生した。そして、XPA 欠損マウスにできた皮膚癌より、5 つの皮膚癌細胞株を樹立した。これらの皮膚癌細胞株は、NER 能を欠損したままであるにもかかわらず、UV に著明な抵抗性を示し、UV 照射後の G1/S のチェックポイント機構に異常を持つことを明らかにした。さらに、皮膚癌細胞株ではミスマッチ修復蛋白質量が減少し、ミスマッチ修復活性も低下していることを見つけた。ついで、XPA/MSH2 ダブル欠損マウスを作成することにより、ミスマッチ修復蛋白質が UV 照射後の G1/S のチェックポイント機構、ひいては UV 抵抗性に関与していることを確認した。ミスマッチ修復異常が皮膚発癌過程に重要な役割を果たしていることを示唆した。

6) RLGS (restriction landmark genomic scanning) 法により、XPA 欠損マウスの UV 皮膚発癌に関与する遺伝子をスクリーニングし、Dermo-1 遺伝子が皮膚癌細胞で高発現しているのに対し、正常皮膚上皮では発現が認められないことを見つけた。最近、Dermo-1 がアポトーシス抑制に関与することが報告されており、皮膚発癌過程において、Dermo-1 高発現によるアポトーシス異常が関与していることが示唆された。

8) 大腸菌リボソームの小サブユニット蛋白質をコードする遺伝子 (rpsL 遺伝子) を導入したトランスジェニックマウスと XPA 欠損マウスを交配し、紫外線照射後の XPA 欠損マウス皮膚上皮における rpsL 遺伝子上の突然変異を調べた。その結果、非常に低線量の紫外線照射でも XPA 欠損マウスでは紫外線照射に特異的な変異が導入されることを明らかにしつつある。

9) XPA 欠損マウスでは紫外線照射により細胞性免疫能と NK 細胞能が著しく障害される。紫外線照射後の皮膚組織中のプロスタグランジン E2 を enzyme immunoassay 法で測定した結果、XPA 欠損マウスでは正常マウスと比較してプロスタグランジン E2 産生の著明な上昇を認めた。また、cyclo-oxygenase (COX) mRNA の発現を RT-PCR

法で解析したところ、XPA 欠損マウスでは COX-2 mRNA の発現が紫外線照射により著しく増強した。また、Indomethacin の前投与でこれらの増強が抑制され、免疫抑制も解除された。

10) XPA あるいは CSB 単独の遺伝子欠損マウスで見られる神経症状が、それらを共に欠くダブルノックアウトマウスでは顕著化し、生後 3 から 4 週間で致死になることを明らかにした。免疫組織化学的な解析により、小脳外顆粒層においてニューロブラストの減少およびアポトーシスの亢進、プルキンエ細胞の形成異常が観察されたことから、これら生後小脳の形態形成異常が運動失調の原因の一つであることが予想された。これらの神経症状は、NER 活性の低下によるものではなく、XP や CS が互いに代償可能な未知の生理機能が欠失したことが原因である可能性が示唆された。

#### D. 考察

TC-NER 及び転写機構に関与し、TPR モチーフを持つ新規蛋白質 XAB2 の機能解析を目的として、XAB2 蛋白質複合体の精製と構成因子の同定を試み、それを達成した。また、XAB2 遺伝子のノックアウトマウス作成も達成し、胎児致死をもたらすことを明らかにした。COFS 患者における XAB2 遺伝子の突然変異の解析を行ったが、変異は認められなかった。本研究は、NER と転写機構の相互作用に関与する新規蛋白質の解析を行ったものであり、世界中の多くの研究室がその解明を競っている TC-NER 機構のみならず、新規の生命現象の解明に貢献する可能性を持つ。今後、精製した XAB2 複合体の機能解析を行う。例えば、DNA、RNA およびクロマチンに対する結合活性、転写開始活性（これには影響しないことを明らかにしている。）、転写伸張活性、pre-mRNA processing 活性を測定する。転写伸張中の RNA polymerase II が損傷部位で arrest した時の tertiarily complex および CSB を含めた quaternary complexes に XAB2 複合体が結合する活性を有するか、あるいはそれらの complex を解離する活性を有するかをフットプリント法で調べる。XAB2 複合体を形成する構成因子に対して得られたそれぞれの抗体を、マイクロインジェクション法で生きた細胞に注入し、TC-NER や転写に影響を及ぼすか否かを調べる。XAB2 ノックアウトマウスは胎児致死となったが、細胞株の樹立が出来ないか否かを試み、その細胞の TC-NER、転写、pre-mRNA processing、DNA 損傷による細胞周期チェック

ポイント異常の有無等の機能解析を行う。XAB2 の C 末端部分を除くようなターゲティングも行い、致死にならないマウスを作成し、個体の発育異常、老化、癌化等について解析する。

他方、XPA 欠損マウスにおける UV 皮膚発癌の解析において、ミスマッチ修復蛋白質が UV 誘発細胞周期チェックポイント、Dermo1 遺伝子とその upregulation によるアポトーシス抑制機構に関与していることを示唆した。これらは、UV 皮膚発癌の機構解明に貢献する可能性を持つ。また、XPA 欠損マウスにおける紫外線炎症と免疫抑制の著明な増強には紫外線による COX-2 発現の誘導に伴うプロスタグランジン E2 産生の促進が関与することが強く示唆された。XPA/CSB 欠損マウスにおける神経学的解析の結果は、色素性乾皮症やコケイン症候群の患者で見られる神経症状が神経系の発達過程における形態形成に異常が生じた結果引き起こされている可能性を示すものである。と同時に、これまで考えられてきた「長期的な DNA 傷害の蓄積が早期老化を促進し、神経細胞の損傷および細胞死をとともなう神経症状の引き金になる」という仮説に対して一石を投じる重要な知見である。このことを踏まえ、今後 XP や CS で見られる神経症状が発達過程のいつ・どこで・どの様にして生じているのかを明らかにしていく必要がある。

以上の実験により、老化、癌化における DNA 修復の役割についてさらなる解析を加えたい。

#### E. 結論

我々が発見した新規蛋白質で、XPA、CSA、CSB、RNA polymerase II と結合し、TC-NER と転写機構に関与する XAB2 の機能の解明を進めた。また、XPA 欠損マウスを用いて、UV による高頻度皮膚発癌の分子機構を解析した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ikegami, T., Kuraoka, I., Saijo, M., Kodo, N., Y. Kyogoku, Morikawa, K., Tanaka, K., & Shirakawa, M. Resonance assignments, solution structure, and backbone dynamics of the DNA- and RPA-binding domain of human repair factor XPA. *J. Biochem.*, 125, 495-506, 1999
- 2) Miyauchi-Hashimoto, H., Okamoto, H., Tanaka, K., & Horio, T. Ultraviolet Radiation-induced suppression of natural

killer cell activity is enhanced in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice. *J. Invest. Dermatol.*, 112, 965-970, 1999.

3) Manabu Sato, Yoshinaga Saeki, Kiyoji Tanaka & Yasufumi Kaneda. Ribosome-associated protein LBP/p40 binds to S21 protein of 40S ribosome: Analysis using a yeast two-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 256, 385-390, 1999

4) Okamoto, H., Mizuno, K., Itoh, T., Tanaka, K., & Horio, T. Evaluation of apoptotic cells induced by ultraviolet light B radiation in epidermal sheets stained by the TUNEL technique. *J. Invest. Dermatol.*, 113, 802-807, 1999

5) Maru, Y., Kobayashi, T., Tanaka, K., & Shibuya, M. BCR binds to the xeroderma pigmentosum group B protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 260, 309-312, 1999

6) Kazue Kuwamoto, Hiroko Miyauchi-Hashimoto, Kiyoji Tanaka, Naomi Eguchi, Takashi Inui, Yoshiro Urade, Seiji Ito & Takeshi Horio. Possible involvement of enhanced prostaglandin E2 production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group A model mice. *J. Invest. Dermatol.*, 114, 241-246, 2000.

7) Nobuaki Tamamaki, Yoshihiko Sugimoto, Kiyoji Tanaka, and Rumiko Takauji. Cell migration from the ganglionic eminence to the neocortex investigated by labeling nuclei with UV-irradiation via a fiber-optic cable. *Neuroscience Res.*, 35, 241-251, 1999.

8) Minoru Ichikawa, Hironobu Nakane, Giancarlo Marra, Chantal Corti, Josef Jiricny, Maureen Fitch, James M. Ford, Miyoko Ikejima, Takashi Shimada, Masafumi Yoshino, Seiji Takeuchi, Yoshimichi Nakatsu and Kiyoji Tanaka. Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice. *Mutation Research*, in press.

9) Hiroaki Murai, Seiji Takeuchi, Yoshimichi Nakatsu, Minoru Ichikawa, Masafumi Yoshino, Yoichi Gondo, Motoya Katsuki and Kiyoji Tanaka. Studies of in vivo mutations in rpsL tamsgene in UVB-irradiated epidermis of XPA-deficient mice. *Mutation Research*, in press.

## 2 学会発表

国内学会：

1) 西條将文 1、小林武弘 2、田中亀代次 1 (1 阪大・細生工セ、2 新潟大・医)、XPA 蛋白質の機能解析、Workshop on DNA Repair, Recombination and Mutagenesis

1999、平成 11 年 2 月 22 日～25 日、大阪

2) 中津可道、Khaw Min Cheh、Lim Hui Ying、米増理恵、田中亀代次 (阪大・細生工セ)、XPA と結合する新規蛋白質 XAB2 の解析～蛋白質相互作用を中心として～、Workshop on DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 1999、平成 11 年 2 月 22 日～25 日、大阪

3) 南満芳、中津可道、田中亀代次 (阪大・細生工セ)、XPA と結合する XAB2 (XPA-binding protein 2) 遺伝子の構造とその発現、Workshop on DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 1999、平成 11 年 2 月 22 日～25 日、大阪

4) 市川稔 1、吉野雅文 1、中津可道 1、池島三与子 2、島田隆 2、田中亀代次 1 (1 阪大・細生工セ、2 日本医大・生化)、A 群色素性乾皮症モデルマウスにおける紫外線誘発皮膚発癌由来細胞株の解析、

5) 竹内聖二 1、吉川浩英 2、米増理恵 1、中津可道 1、市川稔 1、松原謙一 3、田中亀代次 1 (1 阪大・細生工セ、2 NCI・USA、3 奈良先端大院・バイオ)、RLGS 法を用いて同定された A 群色素性乾皮症欠損マウスの紫外線誘発皮膚癌におけるゲノムの変化、Workshop on DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 1999、平成 11 年 2 月 22 日～25 日、大阪

6) 田中亀代次、ヌクレオチド除去修復とがん、第 25 回医学会総会、シンポジウム「がんと DNA 複製」、平成 11 年 4 月 3 日、東京

7) 田中亀代次、「DNA 修復異常と発癌」、第 58 回日本癌学会総会、サンライズレクチャー、平成 11 年 9 月 30 日～10 月 1 日、広島

8) 田中亀代次、転写とヌクレオチド除去修復に関与する XAB2 蛋白質、第 72 回日本生化学会大会、ワークショップ「DNA 修復の分子メカニズムと疾患」、平成 11 年 10 月 6 日～9 日、横浜

9) 田中亀代次、市川稔、吉野雅文、神内伸也、米増理恵、任燕、竹内聖二、西條将文、中津可道、DNA 除去修復異常の分子病態、第 22 回日本分子生物学会年会、ワークショップ「DNA 修復研究の最前線」平成 11 年 12 月 7 日～10 日、福岡

10) 田中亀代次、「色素性乾皮症における DNA 修復欠損と高頻度皮膚発癌の分子メカニズム」、大阪大学微生物病研究所共同無菌実験施設公開シンポジウム「DNA 修復機構とその欠損に起因する早期発癌と老化の分子機構」、平成 12 年 1 月 19 日

国際学会：

1) Kiyoji Tanaka; "Xeroderma pigmentosum group A-binding protein involved in basal transcription and transcription-coupled repair", Gordon Research Conference on Mammalian DNA Repair. February 7-12, 1999, Ventura, California, USA.

2) Kiyoji Tanaka, Masafumi Yoshino, Minoru Ichikawa, Seiji Takeuchi, Rie Yonemasu and Yoshimichi Nakatsu; "UV-induced skin carcinogenesis in nucleotide excision repair-deficient mice". The First Fujihara International Seminar on "Analysis and prevention of Carcinogenesis in Animals: Modulation with DNA Repair Related Genes", September 22-23, 1999, Tokyo, Japan.

3) Kiyoji Tanaka "Molecular basis of human diseases with nucleotide excision repair deficiency"

American Society of Microbiology Conference on "DNA Repair and Mutagenesis: mechanism, Control, and Biological Consequences", November 1-7, 1999, Hilton Head, South Carolina, USA

4) Kiyoji Tanaka, Yoshimichi Nakatsu, Shinya Kamiuchi, Masafumi Saijo, Rie Yonemasu, Hiroaki Murai, Seiji Takeuchi, "Role of XPA and XPA-binding proteins in nucleotide excision repair processes and prevention of carcinogenesis", 2nd 3R Symposium, November 16-19, 1999, Greenpia Miki, Japan

5) Kiyoji Tanaka, "Protein complex involved in nucleotide excision repair and transcription", The 16th Radiation Biology Center International Symposium "Bioregulation of radiation Response: Evolutional Dynamism of Damage Tolerance", December 12-13, 1999, Kyoto, Japan

#### G. 知的所有権の取得状況

特許、実用新案登録等は得られなかった。



## 皮膚癌の分子病理学的解析

分担研究者 北村幸彦 大阪大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨** c-kit癌原遺伝子の傍細胞膜領域の機能獲得性突然変異はヒト消化管ストローマ細胞腫瘍(gastrointestinal stromal tumor, GIST)の予後を判定する分子マーカーとして有用である。突然変異陽性のGISTは陰性のGISTに比し再発率、生存率とも有意に高い。

### A. 研究目的

c-kit癌原遺伝子は、癌遺伝子v-kitのホモログで、レセプター・チロシンキナーゼの1種をコードしている。c-kitの機能獲得性突然変異遺伝子を2個持つマウスではメラノサイト、生殖細胞、赤血球、マスト細胞、カハール介在細胞を欠損あるいは減少することが知られている。一方我々はc-kitの機能獲得性突然変異はマスト細胞腫瘍と消化管ストローマ細胞腫瘍(gastrointestinal stromal tumor, GIST)の原因となることを明らかにした。ヒトのマスト細胞腫瘍とGISTではc-kit遺伝子の機能獲得性突然変異のおこる場所が異なる。マスト細胞腫瘍ではc-kitのチロシンキナーゼ領域の特定のアスパラギン酸がバリンに変わる点突然変異がみられるのに対し、GISTでは傍細胞膜領域の欠失あるいは点突然変異あるいはその両方がみられる。ヒトではマスト細胞腫瘍がきわめて稀なのに対しGISTは上皮由来の癌ほどではないにしても、かなりの症例を集めることができる。本年はヒトのGIST症例をできるかぎり多数収集して、GISTにおけるc-kit突然変異の頻度、突然変異の種類、さらに突然変異の有無と予後との関係について解析した。

### B. 研究方法

手術で切除された消化管の間葉系腫瘍のうち、パラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色標本でGISTと矛盾しない形態を示すとともに、免疫組織学的に、c-kit蛋白かCD34、あるいはその両方を発現している腫瘍をGISTとした。GISTのパラフィン切片5枚からDNAを抽出して、c-kitの傍細胞膜領域をコードするエクソン11とチロシンキナーゼ領域をコードするエクソン17をPCRで増幅し、おのおの塩基配列を決定した。

### C. 研究結果

組織学的にGISTと診断された124例を収集した。このうち71例(57%)の例でエクソン11に欠失あるいは点突然変異あるいはその両方をみいだした。突然変異の大部分はコドン550から561の間に見られた。エクソン17の突然変異は1例もみられなかった。

c-kitの突然変異の有無と臨床的ならびに病理学的な所見を比較すると、c-kit突然変異陽性のGISTはより高齢の患者に多く、腫瘍は有意に大きかった。またc-kit突然変異陽性のGISTの方が浸潤性を示した。さらに顕微鏡による観察ではc-kit突然変異陽性のGISTの方が細胞分裂像、壊死像、腫瘍組織内への出血とも有意に多かった。

次にc-kit突然変異陽性のGISTと陽性のGISTの間で再発率と生存率を比べてみた。再発率、生存率ともc-kit突然変異陽性のGISTは陰性のGISTに比べ有意に高かった。

### D. 考察

GISTの57%にc-kitの傍細胞膜領域の機能獲得性突然変異をみつけた。またc-kit突然変異陽性のGISTの方が陰性のGISTよりも、より悪性の病理所見を示した。この点について以下の2つの可能性がある。1) GISTにはc-kit突然変異陽性のものと陰性のものの2種はあり、陽性のものがより悪性である。2) c-kit突然変異陰性のGISTに突然変異がおこることにより悪性化する。我々は同じGISTについて2回以上c-kitの突然変異を調べたことがあるが、c-kit突然変異陰性のGISTが陽性のGISTに変化した例は経験していない。

### E. 結論

c-kit癌原遺伝子の傍細胞膜領域の突然変異はGISTの予後判定に有用である。

## F. 研究発表

1. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, and Kitamura Y: Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res 59:4294-4300, 1999.
2. Ito A, Morii E, Kim DK, Kataoka TR, Jippo T, Maeyama K, Nojima H, and Kitamura Y: Inhibitory effect of the transcription factor encoded by the mi mutant allele in cultured mast cells of mice. Blood 93:1189-1196, 1999.
3. Tsujimura T, Hashimoto K, Kitayama H, Ikeda H, Sugahara H, Matsumura I, Kaisho T, Terada N, Kitamura Y, and Kanakura Y: Activating mutation in the catalytic domain of c-kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-association not at the ligand-induced dimerization site. Blood 93:1319-1329, 1999.
4. Jippo T, Lee YM, Katsu Y, Tsujino K, Morii E, Kim DK, and Kitamura Y: Deficient transcription of mouse mast cell protease 4 gene in mutant mice of mi/mi genotype. Blood 93:1942-1950, 1999.
5. Sato M, Morii E, Takebayashi-Suzuki K, Yasui N, Ochi T, Kitamura Y, and Nomura S: Microphthalmia-associated transcription factor interacts with PU.1 and c-Fos: determination of their subcellular localization. Biochem Biophys Res Comm 254:384-387, 1999.
6. Harada Y, Shiomi N, Koike M, Ikawa M, Okabe M, Hirota S, Kitamura Y, Kitagawa M, Matsunaga T, Nikaido O, and Shiomi T: Postnatal growth failure, short life span and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the xeroderma pigmentosa group G gene. Mol Cell Biol 19:2366-2372, 1999.
7. Kim DK, Morii E, Ogihara H, Lee YM, Jippo T, Adachi S, Kim HM, and Kitamura Y: Different effect of various mutant MITF encoded by mi, Mi<sup>or</sup>, or Mi<sup>wh</sup> allele on phenotype of murine mast cells. Blood 93:4179-4186, 1999.
8. Ogihara H, Kanno T, Morii E, Kim DK, Lee YM, Sato M, Kim WY, Nomura S, Ito Y, and Kitamura Y: Synergy of PEB2/CBF with mi transcription factor (MITF) for transcription of mouse mast cell protease 6 gene. Oncogene 18:4632-4639, 1999.
9. Tanaka A, Arai K, Kitamura Y, and Matsuda H: Matrix metalloproteinase-9 production, a newly identified function of mast cell progenitors, is downregulated by c-kit receptor activation. Blood 94:2390-2395, 1999.
10. Nakaji T, Kataoka TR, Watabe K, Nishiyama K, Nojima H, Shimada Y, Sato F, Matsushima H, Endo Y, Kuroda Y, Kitamura Y, Ito A, and Maeda S: A new member of the GTPase superfamily that is upregulated in highly metastatic cells. Cancer Lett, in press.
11. Ito A, Kataoka TR, Watanabe M, Nishiyama K, Mazaki Y, Sabe H, Kitamura Y, and Nojima H: A truncated isoform of the PP2A B56 subunit promotes cell motility through paxillin phosphorylation. EMBO J, in press.
12. Hirota S, Okazaki T, Kitamura Y, O'Brien T, Kapusta L, and Dardick I: Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of c-kit gene. Am J Surg Pathol, in press.

## 分担研究報告書

### A群色素性乾皮症原因遺伝子およびB群コケイン症候群原因遺伝子 ダブルノックアウトマウスにみられる小脳の発達異常

分担研究者 畠中 寛 大阪大学蛋白質研究所教授

**研究要旨** A群色素性乾皮症 (XP-A)、B群コケイン症候群 (CS-B) の原因遺伝子およびそれら双方を欠くジーンターゲットマウスを用い、これまで明らかでなかった DNA修復酵素の異常によって生じる神経症状の解析を行った。その結果、XPA あるいは CSB 単独の遺伝子欠損マウスでみられる神経症状が、それらを共に欠くダブルノックアウトマウスでは顕著化し、生後3から4週間で致死になることを明らかにした。また、免疫組織化学的な解析により、小脳外顆粒層においてニューロプラストの減少およびアポトーシスの亢進、プルキンエ細胞の形成異常が観察されたことから、これら生後小脳の形態形成異常が運動失調の原因の一つであることが予想された。

#### A. 研究目的

非分裂細胞であるニューロンにおいて、遺伝情報の維持に必須な DNA 修復機構の破綻は、それらの集合体である脳全体にとっても深刻な機能障害をもたらす。このことは、脳の老化や様々な病態の主たる原因としてこれまでも盛んに論じられてきた。本研究では、ヒトにおいて進行性の知能低下、神経性難聴、小脳性運動失調、神経原性筋萎縮等の神経症状を特異的に示すことが知られる A 群色素性乾皮症 (XP-A)、B 群コケイン症候群 (CS-B) の原因遺伝子およびそれら双方を欠くジーンターゲットマウスを用い、これまで明らかでなかった DNA修復酵素の異常によって生じる神経症状の解析を行った。

#### B. 研究方法

生後8日と14日齢の正常ならびにXPA/CSB遺伝子欠損マウス脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、厚さ10 $\mu$ mの切片を作成した。小脳組織の全体像は、Nissle染色を行うことにより得た。プルキンエ細胞の形態変化は、抗カルビンディン抗体を一次抗体として用いた免疫組織染色により解析した。アポトーシス細胞の検出は、TUNEL法に基づいて行った。細胞の増殖能の解析は、マウス腹腔内BrdUラベリングを行った後、抗BrdU抗体を用いて染色を行った。

#### C. 研究結果

我々は、XPA あるいは CSB 単独の遺伝子欠損マウスでみられる神経症状が、それらを共に欠くダブルノックアウトマウスでは顕著化し、生後3から4週間で致死になることを明らかにした。また、免疫組織化学的な解析により、小脳外顆粒層においてニューロプラストの減少およびアポトーシスの亢進、プルキンエ細胞の形成異常が観察されたことから、これら生後小脳の形態形成異常が運動失調の原因の一つであることが予想された。現在これらの結果をもとに、免疫組織化学的な手法を用いたマウスの脳・神経組織全般における神経脱落の部位特異性について解析を行っている。

一方、さらに興味深いことに、転写修復および DNA 除去修復活性は XPA あるいは CSB 単独の遺伝子欠損マウスでもほぼ完全に消失していることから、上述の神経症状は、単なる DNA 除去修復活性の低下によるものではなく、XP や CS が互いに代償可能な未知の生理機能（転写調節因子？）が欠失した事が原因である可能性が示唆された。

#### D. 考察

以上の結果は、色素性乾皮症やコケイン症候群の患者で見られる神経症状が神経系の発達過程における形態形成に異常が生じ

た結果引き起こされている可能性を示すものである。と同時に、これまで考えられてきた「長期的な DNA 傷害の蓄積が早期老化を促進し、神経細胞の損傷および細胞死をともなう神経症状の引き金になる」という仮説に対して一石を投じる重要な知見である。このことを踏まえ、今後 XP や CS で見られる神経症状が発達過程のいつ・どこで・どの様にして生じているのかを明らかにしていく必要がある。

## E. 結論

XPA ならびに CSB 遺伝子異常で生じる神経症状は、神経芽細胞の増殖低下とアポトーシスの亢進をともなった神経系の形態形成異常が原因であることが予想された。また、XPA と CSB が補償的に機能することが、マウスとヒトとの神経系で見られる表現型の違いであると思われる。

## F. 研究発表

1. T. Araki, M. Yamada, H. Ohnishi, S. Sano, T. Uetsuki and H. Hatanaka, (2000) Role of phosphatase activity of Shp-2 in BDNF signaling in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, **74**, 659-668.
2. H. Nakayama, S. Ueno, T. Ikeuchi, and H. Hatanaka (2000) Regulation of  $\alpha 3$  nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA levels by NGF and cAMP in PC12 cells. *J. Neurochem.*, in press.
3. M. Yoshikawa, H. Nakayama, S. Ueno, M. Hirano, H. Hatanaka, H. Furuya (2000) Chronic fentanyl treatments induce the up-regulation of m opioid receptor mRNA in rat pheochromocytoma cells. *Brain Res.*, in press.
4. T. Numakawa, N. Takei, and H. Hatanaka (2000) BDNF rapidly induces aspartate release from cultured CNS neurons. *Neurosci. Res.*, in press.
5. N. Inamura, T. Araki, Y. Enokido, C. Nishio, S. Aizawa, and H. Hatanaka, (2000) The role of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in organotypic slice cultures from the mouse cerebellum. *J. Neurosci. Res.*, in press.
6. K. Shimoke, S. Yamagishi, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Dev. Brain Res.*, **112**, 245-253.
7. H. Ohnishi, M. Yamada, M. Kubota, H. Hatanaka and S. Sano (1999) Tyrosine phosphorylation and association of BIT with SHP-2 induced by neurotrophins. *J. Neurochem.*, **72**, 1402-1408.
8. S. Kinoshita, H. Yasuda, N. Taniguchi, R.

- Katoh-Semba, H. Hatanaka and T. Tsumoto (1999) Brain-derived neurotrophic factor prevents low-frequency inputs from inducing long-term depression in the developing visual cortex. *J. Neurosci.*, **19**, 2122-2130.
9. Y. Ishikawa, T. Satoh, Y. Enokido, C. Nishio, T. Ikeuchi and H. Hatanaka (1999) Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspase are required for the high oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. *Brain Res.*, **824**, 71-80.
  10. T. Satoh, T. Yamagata, Y. Ishikawa, M. Yamada, Y. Uchiyama and H. Hatanaka (1999) Regulation of reactive oxygen species by nerve growth factor but not by Bcl-2 as a novel mechanism of protection of PC12 cells from superoxide anion-induced death. *J. Biochem.*, **125**, 952-959.
  11. N. Takei, O. Tanaka, Y. Endo, D. Lindholm and H. Hatanaka, (1999) BDNF and NT-3 but not CNTF counteract the  $Ca^{2+}$  ionophore-induced apoptosis of cultured cortical neurons: Involvement of dual pathways. *Neuropharmacol.*, **38**, 283-288.
  12. H. Aoshima, K. Kadoya, H. Taniguchi, T. Satoh and H. Hatanaka, (1999) Generation of free radicals during the death of *Saccharomyces cerevisiae* caused by lipid hydroperoxide. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1025-1031.
  13. M. Yamada, H. Ohnishi, S. Sano, A. Nakatani, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) BDNF stimulates interaction of Shp2 with PI3-K and Grb2 in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.*, **73**, 41-49.
  14. Y. Hashimoto, Y. Abiru, C. Nishio and H. Hatanaka, (1999) Synergistic effects of BDNF and CNTF on cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal two-week-old rats. *Dev. Brain Res.*, **115**, 25-32.
  15. T. Yamagata, T. Satoh, Y. Ishikawa, A. Nakatani, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) Brain-derived neurotrophic factor prevents superoxide anion-induced death of PC12h cells stably expressing TrkB receptor via modulation of reactive oxygen species. *Neurosci. Res.*, **35**, 9-17.
  16. T. Satoh, Y. Ishikawa, Y. Kataoka, Y. Cui, H. Yanase, K. Katoh, Y. Watanabe, K. Nakadate, K. Matsumura, H. Hatanaka, K. Kataoka, R. Noyori, M. Suzuki and Y. Watanabe (1999) CNS-specific prostacyclin ligands as neuronal survival-promoting factors in the brain. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3115-3124.
  17. T. Numakawa, N. Takei, S. Yamagishi, N. Sakai and H. Hatanaka, (1999) Neurotrophin-elicited short-term glutamate release from cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.*, **842**, 431-438.

## 分担研究報告書

### XPA欠損マウスにおける紫外線免疫抑制の機序に関する研究

分担研究者 堀尾 武 関西医科大学皮膚科教授

#### 研究要旨

色素性乾皮症 (XP) 患者では、紫外線 DNA 損傷の除去修復機構が欠損しているため日光照射部位に皮膚癌を高頻度に発症する。一般的に腫瘍の排除には、免疫学的機構が重要な役割を演ずる。昨年度の研究により、われわれは XPA 欠損の XP モデルマウスでは、紫外線照射により細胞性免疫能と NK 細胞能が著しく障害されることを報告した。今回の研究により、これらの免疫学的障害に prostaglandin (PG)  $E_2$  が関与する可能性を示した。すなわち、紫外線照射後の皮膚組織中の PG を enzyme immunoassay 法で測定した結果、XPA マウスでは wild type マウスと比較して  $PGE_2$  産生の著明な上昇がみられた。また、cyclo-oxygenase (COX) mRNA の発現を RT-PCR 法で解析したところ、XPA マウスでは COX-2 mRNA の発現が紫外線照射により著しく増強した。Indomethacin の前投与でこれらの増強が抑制され、免疫抑制も解除された。

#### A. 研究目的

実験動物のみならずヒトにおいても紫外線の免疫抑制作用は証明されている。XPA 欠損マウスは、紫外線発癌のみならず、紫外線炎症、紫外線免疫抑制の誘導が著しく亢進しており、光免疫学の研究にも有用な実験動物である。 $PGE_2$  は、紫外線炎症 (sunburn) の主要な chemical mediator であると同時に免疫抑制作用を有する。そこで、XPA 欠損マウスを用いて紫外線照射による  $PGE_2$  の産生と、光生物学的作用に対する indomethacin の効果を検討した。本研究により、DNA 損傷が発癌のみならず炎症や免疫抑制に関わることが明らかとなる。

#### B. 研究方法

##### 1. 実験動物

XPA-gene を homozygous に欠如する 8~12 週齢の雌の XPA (-/-) マウスと、対照としてその wild type マウス (+/+) を使用した。

##### 2. 紫外線光源

中波長紫外線 (UVB) を主に放射する蛍光灯型 sunlamp (FL20SE30, 東芝メディカルサプライ) を使用した。

##### 3. 紫外線炎症に対する indomethacin の効果

$250\text{mJ}/\text{cm}^2$  の UVB を照射直後に 1% indomethacin アセトン溶液の  $20\ \mu\text{l}$  を耳介に塗布し、耳介の腫脹を経時的に測定した。

4. 紫外線免疫抑制に対する indomethacin の効果  
マウス腹部に  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  - UVB を照射直後に 0.2% indomethacin を塗布した。翌日、同部位に 1% dinitrofluorobenzene (DNFB) の  $25\ \mu\text{l}$  を塗布して接触アレルギー感作し、その 5 日後に耳介で 0.2% DNFB による惹起試験を行った。感作程度は塗布後 24 時間の耳介腫脹で判定した。

##### 5. 紫外線照射後の PG 産生

$250\text{mJ}/\text{cm}^2$  - UVB を照射して 24, 48, 72 時間後にマウス耳介を切除し、組織中の  $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_2\ \alpha$  量を enzyme immunoassay 法で測定した。

##### 6. 紫外線照射後の COX 発現

PG 産生と PG 合成酵素の関連を検討した。 $250\text{mJ}/\text{cm}^2$  - UVB を照射した後、耳介組織より mRNA を単離し、RT-PCR 法により COX-1, COX-2, cytosolic phospholipase  $A_2$  (cPLA $_2$ ) の発現を解析した。

## C. 研究結果

### 1. Indomethacinによる紫外線炎症の抑制

紫外線照射後24時間から4日まで毎日耳介の腫脹を測定した。XPAマウスはwild typeマウスと比較して著しく強度の耳介腫脹を呈した。両マウスともindomethacin塗布群では非塗布群に比べて浮腫の抑制がみられた。例えば、紫外線照射4日後の耳介腫脹がindomethacin塗布により、wild typeマウスでは52.5%、XPAマウスでは42.2%抑制された。

### 2. Indomethacinによる紫外線免疫抑制の解除

紫外線照射局所にhaptен(DNFB)を塗布して感作すると惹起反応は抑制される(UVB-induced local immunosuppression)。非照射皮膚で感作した場合と比較して、wild typeマウスでは52.9%、XPAマウスでは74.1%の抑制がかかった。しかし、紫外線照射直後にindomethacinを塗布しておく、紫外線による免疫抑制は誘導されず、positive controlと同程度の感作が成立した。

### 3. XPAマウスにおけるPG産生の増強

Wild typeマウスにおいては、250mJ/cm<sup>2</sup>-UVB単回照射ではPGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>αの増加はみられなかった。一方、XPAマウスでは紫外線照射後48時間、72時間にいずれのPGにも著しい増加がみられた。とくに、PGE<sub>2</sub>産生量が著明で、48時間後および72時間後にはそれぞれwild typeマウスの8倍および15倍に増強した。Indomethacin塗布により紫外線照射後のPGE<sub>2</sub>産生は完全に阻害された。

### 4. XPAマウスにおけるCOX-2 mRNAの発現増強

XPAマウス、wild typeマウスともに紫外線照射後24時間、48時間、72時間とCOX-2 mRNAの発現がtime dependentに増強した。また、XPAマウスでとくに著明な発現がみられた。COX-1、cPLA<sub>2</sub>のmRNAは、いずれのマウスでも恒常的に発現しており、紫外線照射による変化はみられなかった。

## D. 考察

XP患者やXPAマウスは紫外線によるDNA損傷の修復欠損により、慢性紫外線照射に対して易発癌性を示す。しかし、XPが強度の紫外線急性炎症(sunburn)を呈する機序は不明であった。われわれは、すでにXPAマウスでは紫外線照射により強度の免疫抑制が誘導されることを示してきた。今回は、これら異常な光生物学的反応の機序を明らかにするために実験を行った。

まず、紫外線による急性炎症(浮腫)も免疫抑制(local immunosuppression)もindomethacinにより防止することができた。従って、これらの反応にはPGの関与が強く示唆された。皮膚組織中のPGを定量した結果、XPAマウスでは紫外線照射により大量のPGが産生することが判明した。XPAマウスとwild typeマウスにおける紫外線炎症と免疫抑制の程度の差は、紫外線によるPG産生量の差によると考えられる。PGE<sub>2</sub>が紫外線炎症のchemical mediatorであることは周知の事実であり、また、免疫抑制作用も知られている。PGE<sub>2</sub>は末梢単核球や表皮角化細胞からのIL-10産生を促進する。このIL-10は、抗原提示細胞のTh1細胞活性を抑制するがTh2細胞の活性化は妨げられない。従って、Th2優位の状態で細胞性免疫や腫瘍免疫が抑制される可能性がある。Indomethacinによりhairless mouseの紫外線発癌が抑制できたという報告もある。

## E. 結論

今回の実験結果から、XPAマウスにおける紫外線炎症と免疫抑制の著明な増強には、紫外線によるCOX-2発現の誘導に伴うPGE<sub>2</sub>産生の促進が関与することが強く示唆された。そのtriggerとしてはDNA損傷が考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Possible involvement of enhanced prostaglandin E<sub>2</sub> production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group A model mice.

Kazue Kuwamoto, Hiroko Miyauchi-Hashimoto, Kiyoji Tanaka, Naomi Eguchi, Takashi Inui, Yoshihiro Urade, Takeshi Horio.

J Invest Dermatol 114:2000, in press.

### 2. 学会発表

Increased prostaglandin E<sub>2</sub> production by ultraviolet radiation may be involved in enhanced inflammation and immunosuppression in xeroderma pigmentosum group A model mice.

Kazue Kuwamoto, Hiroko Miyauchi-Hashimoto, Kiyoji Tanaka, Yoshihiro Urade, Takeshi Horio. European Society of Dermatological Research 29th Annual Meeting

色素性乾皮症A群モデルマウスにおける紫外線炎症および免疫抑制とprostaglandin E<sub>2</sub>の関係  
桑元香津恵, 橋本洋子, 田中亀代次, 浦出良博, 堀尾 武.

第21回日本光医学・光生物学会

**Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice**

Minoru Ichikawa<sup>a</sup>, Hironobu Nakane<sup>a,\*</sup>, Giancarlo Marra<sup>b</sup>, Chantal Corti<sup>b</sup>, Josef Jiricny<sup>b</sup>, Maureen Fitch<sup>c</sup>, James M. Ford<sup>c</sup>, Miyoko Ikejima<sup>d</sup>, Takashi Shimada<sup>d</sup>, Masafumi Yoshino<sup>a</sup>, Seiji Takeuchi<sup>a</sup>, Yoshimichi Nakatsu<sup>a,e</sup> and Kiyoji Tanaka<sup>a,e,\*\*</sup>

<sup>a</sup>Division of Cellular Genetics, Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, 1-3 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan; <sup>b</sup>Institute of Medical Radiobiology of the University of Zurich, August Forel Strasse 7, CH-8008 Zurich, Switzerland; <sup>c</sup>Departments of Medicine and Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305-5115, USA; <sup>d</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, 11-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8602, Japan; <sup>e</sup>CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST)

\*Present address. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tottori University, 86 Nishimachi, Yonago, Tottori, 683-8503, Japan.

\*\*Corresponding author. Division of Cellular Genetics, Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, 1-3 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan. Tel:+81-6-6879-7971; Fax:+81-6-6877-9136; E-mail: ktanaka@imcb.osaka-u.ac.jp

**Keywords :** Xeroderma pigmentosum, Nucleotide excision repair; Mismatch repair; Cell cycle checkpoint, Skin cancer

## **Abstract**

Xeroderma pigmentosum group A gene (XPA)-deficient mice are defective in nucleotide excision repair (NER) and are therefore highly sensitive to ultraviolet (UV)-induced skin carcinogenesis. We established cell lines from skin cancers of UVB-irradiated XPA-deficient mice to investigate the phenotypic changes occurring during skin carcinogenesis. As anticipated, the skin cancer cell lines were devoid of NER activity but were less sensitive to killing by UV-irradiation than the XPA(-/-) fibroblast cell line. The lines were also more resistant to 6-thioguanine (6-TG) than XPA(-/-) and XPA(+/+) fibroblasts, which was suggestive of a mismatch repair (MMR) defect. Indeed, *in vitro* mismatch-binding and MMR activity were impaired in several of these cell lines. Moreover, these cell lines displayed cell cycle checkpoint derangements following UV-irradiation and 6-TG exposure. The above findings suggest that MMR downregulation may help cells escape killing by UVB as was seen previously for methylating agents and cisplatin and thus that MMR deficient clones are selected for during the tumorigenic transformation of XPA(-/-) cells.

## **1. Introduction**



The nucleotide excision repair (NER) system eliminates a variety of DNA lesions, including UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and (6-4) photoproducts, a wide variety of chemical adducts and certain types of DNA crosslinks [1, 2]. The biological relevance of NER is illustrated by distinct genetic diseases in which NER is defective: xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD) [3]. XP is an autosomal recessive disease, characterised by hypersensitivity to sunlight, predisposition to skin cancer and neurological abnormalities, and consists of seven different complementation groups, XP-A to XP-G. In the last decade, all the genes have now been cloned, and the repair reaction has been reconstituted *in vitro* with purified proteins. There are two sub-pathways of NER: transcription-coupled NER (TCR) that accomplishes efficient removal of lesions blocking transcription, and global genome repair (GGR), which addresses lesions in the non-transcribed regions of the genome [4]. Most XP groups have defects in both NER sub-pathways, while CS and XPC are associated with specific defects in TCR and GGR sub-pathways, respectively. In order to understand the molecular mechanisms of skin carcinogenesis and neurological abnormalities in XP, we generated XPA-deficient mice [5], which are defective in NER and are highly susceptible to UVB- or DMBA-induced skin carcinogenesis [5,6]. These animals thus represent a valid model of human malignancy in XP-A individuals. Indeed, the spectrum of p53 mutations in UV-induced skin tumours of the XPA-deficient mice was characteristic of a

NER defect [7]. In an attempt to elucidate the molecular events involved in the transformation of XPA (-/-) cells to tumors, we decided to examine the phenotypic traits in cell lines generated from skin tumors of the XPA-deficient mice. Our findings are described below.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Cell lines and Culture Conditions*

Five tumor cell lines were established from UVB-induced skin cancers in XPA-deficient mice by the method described before [8]. As shown in Table, they were designated as 18, 26, 108, 161, and 174, respectively. The 18, 26, 108 and 174 cell lines were derived from squamous cell carcinoma, while 161 was from fibrosarcoma. The XPA (-/-) genotype of these cancer cell lines was confirmed by PCR and subsequent Southern blot analysis using mouse XPA cDNA as a probe, and no genomic rearrangement in the XPA (-/-) allele was detected. The tumor cell lines were maintained in  $\alpha$ MEM (Gibco-BRL) supplemented with 10 % fetal calf serum and grown in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. The 207 and MI-X cell lines were spontaneously transformed control fibroblasts from XPA (-/-) mouse embryos (E14). The 202 cell line was a spontaneously transformed control fibroblast derived from XPA (+/+) mouse embryo (E14). Two skin cancer cell lines derived from spindle cell carcinomas in the UVB-irradiated normal mice were kindly provided by Dr. Chikako Nishigori [8]. These cell lines were maintained in Dulbecco's modified MEM

(Gibco BRL) supplemented with 10 % fetal calf serum.

## *2.2. Cell Survival Assay*

For cell survival assays, 4000 cells from exponentially growing cultures were seeded into 10 cm plastic Petri dishes. Six hrs later, the cells were either UV-irradiated or exposed continuously to various concentrations of 6-TG in the culture medium. After six days, the cells were fixed with 3.7 % formalin in PBS and stained with 0.1 % (w/v) crystal violet (Sigma). Colonies containing more than 50 cells were counted. The experiment was repeated at least three times.

## *2.3. Strand-specific DNA Repair Analysis*

Repair of CPD was examined within the transcribed and non-transcribed strand of a 20 kb BamHI restriction fragment spanning the central region of a DHFR gene, using methods described previously [9]. Cells were UV-irradiated with 10 J/m<sup>2</sup>, lysed immediately for an initial sample or incubated in growth medium containing 5-bromodeoxyuridine to density label newly replicated DNA, and then lysed at various time points. Density labeling was performed during repair periods to allow unreplicated DNA to be isolated by cesium chloride isopyknic density gradient sedimentation. BamHI-treated DNA samples from each time point were treated or mock-treated with T4 endonuclease V, electrophoresed in parallel under denaturing conditions, Southern transferred to a membrane, and hybridized with strand-specific RNA

probes generated by transcription *in vitro*. The ratio of full length restriction fragments in the T4 endonuclease V treated and untreated samples was determined by phosphorimager analysis (Bio-Rad model GS-363) and was used to calculate the average number of CPD (endonuclease-sensitive sites) per fragment using the Poisson expression.

#### ***2.4. UV-induced unscheduled DNA synthesis and global DNA repair analysis***

UV-induced unscheduled DNA synthesis in the control and skin cancer cell lines was measured as described [5]. The relative number of CPDs and 6-4 photoproducts in total genomic DNA from cells collected at various times following UV-irradiation was determined using an immunoblot assay as described [9].

#### ***2.5. Western Blot Analyses***

Whole cell lysates were prepared using lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin and 0.5 mM PMSF). Nuclear extracts were prepared according to the method of Schreiber, E. et al. with some modification [10]. The harvested cells were washed twice with PBS, collected and dissolved in 400 µl of ice cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, 0.05% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). After 10 min. incubation on ice, the lysates were centrifuged for 2 min. at 5000 rpm. The pellets were resuspended in 100 µl of ice cold buffer C (50 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM KCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0,