

A、B 領域紫外線の直接照射により SCID マウス移植ヒト皮膚に誘発される遺伝子変異とその予防

大阪大学 医学部

本 行 忠 志

To study the mechanism and risk of human skin cancer from solar light, we exposed human skin transplanted to severe combined immunodeficient mice to daily doses of UVA and UVB (dose rate of 2.8 J/m²/sec) for period of approximately 2 years and investigated morphological and genetic changes of human skin tissues. Of 18 normal skins, 14 actinic keratoses (77.8%) and 4 skin cancers (3 squamous cell carcinomas and 1 undifferentiated carcinoma) developed, whereas neither actinic keratosis nor cancer was observed in 15 human skins not exposed to UVA and B. This is the first success in inducing cancer and solar (actinic) keratosis in human skin by UVA, B.

Among p53 mutations at various sites, mutation at codon 242 (cTGC → cCGC; Cys → Arg) was specifically observed in both skin cancers and actinic keratoses. Furthermore, double or triple mutations were induced in all UVA, B-induced skin cancers and in three of eight actinic keratoses. As well as p53 mutations, 2 of 3 squamous cell carcinomas had also K-ras and c-kit mutations. So far as we know, c-kit mutation has not been reported in the skin cancer except melanoma. Mutations of β-catenin gene occurred in 7 human skins, but these were non-specific mutations.

1 緒 言

ヒト発がんの実験的研究は、限られた、あるいは不自然な条件下（ヒト培養細胞、動物実験など）でしか成され得なかった。現在米国で使われている T 細胞、B 細胞の欠損した SCID (Severe Combined Immunodeficiency) マウスは、若年で白血病を多発し（約 30%）、また、T、B 両細胞ともに一部正常に戻ってしまうため（約 30%）、マウス皮膚の allograft すら生着しにくいことがわかっている。野村らは、1986 年より IgG、IgM が検出限界以下の C.B17-scid マウスを 20 代以上 Selective Inbreeding (ホモ交配) した改良 SCID マウスに、最も観察の容易なヒト正常皮膚を移植し、長期間にわたり太陽紫外線類似の A、B 領域紫外線 (UVA, UVB) を連日照射したところ、ケラトシスが高率にヒト皮膚に発生し、1～2 年間の連日照射により、ヒト皮膚がんを世界で初めて実験的に誘発するのに成功した¹⁾。

また、本行らは、放射性同位元素を使わず、従来の方法に比べ、迅速・簡便・高感度・安価に遺伝子変異を検出し得る独創的な Cold SSCP 法を開発しており²⁾、キャピラリーシークエンサーと共に普通の実験室で容易に遺伝子変異解析が可能となっている。

本研究では、ヒト皮膚組織移植 SCID マウスを用い、UVA, B によりヒト皮膚に誘発された全ての突然変異のシークエンスを行い、UV 照射、時間的変化、病理組織学的経過

との相関を解析することにより太陽紫外線によるヒト皮膚に実際に誘発される障害を確認した。また、これまで考えられなかった新しい観点からヒトの前癌病変から癌に至る特性とその悪性化機構を明らかにすることを目的とした。

2 実 験

2.1 ヒト正常皮膚の継代・維持

ヒト正常皮膚は、大阪大学附属病院およびその関連病院の外科、皮膚科、泌尿器科および神戸大学附属病院皮膚科において、乳がん患者、包茎患者および老人性角化症患者の手術切除片で廃棄されるものを了解を得て用いた。ヒト正常皮膚は、我々の改良 C.B17/N-scid に加え、我々の作成した C3H/HeJ/N-scid を用い、ヒト正常皮膚のより健全な継代・維持を行った。

2.2 A, B 領域紫外線 (UVA, B) 照射

TOSHIBA 健康ランプ FL-20 S.E (20W) 4 本を用い、Kodacel TA407 (Eastman 社) にて 290nm 以下の波長の紫外線を全面的にカットし、地上に到達する太陽光と類似させた。月、水、土曜日に 8000 J/m²、火、木、金、日曜日に 2000 J/m² を線量率約 2.8 J/m²/sec で照射した。

2.3 病理組織学的検索

ヒト正常皮膚を改良 SCID マウスに移植し、UVA, B 照射を行い、継代移植時に biopsy をとり、パラフィン包埋切片の H-E 染色にて病理組織学的検索を行った (Fig. 1 参照)。

2.4 遺伝子変異検索

パラフィン包埋切片あるいは凍結保存サンプルより DNA 抽出を行い PCR-Cold-SSCP 法^{2) 3)} (Fig. 2 参照)、Direct sequence 法により、p53, K-ras および c-kit 遺伝子



Gene mutations induced by UVA, B light in human skin maintained in severe combined immunodeficient mice

Tadashi Hongyo

Department of Medical Genetics and Radiation Biology, Osaka University, Graduate School of Medicine.

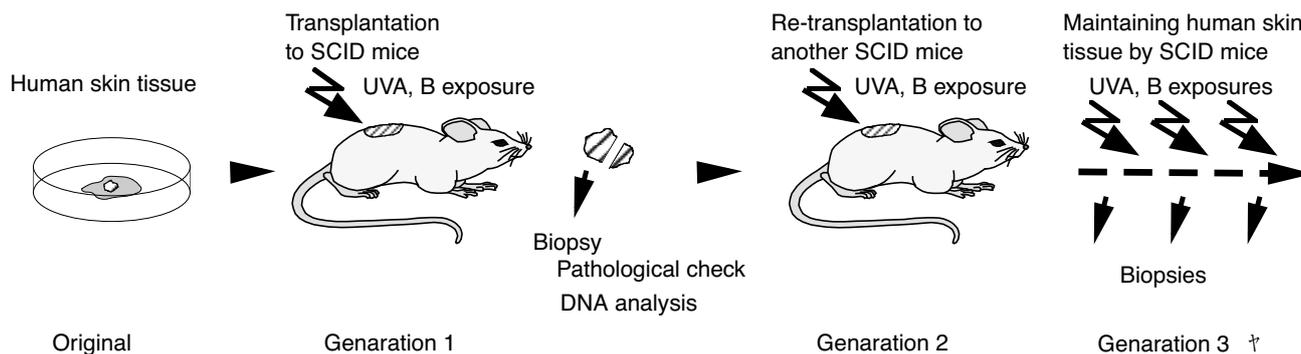
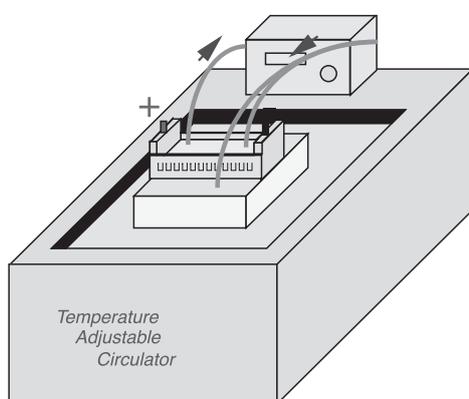


Fig. 1 Human skin transplantation to SCID mice and UVA, B exposure



PCR product	5.0 μL
15% Ficoll	3.0 μL
1 M MMH (CH_3HgOH)	0.2 μL
1X TBE	11.8 μL
Total	20.0 μL

18% gradient TBE mini-gels
300 V for 1-2 hrs.
Ethidium bromide staining 20 min,
destaining for 5 min.

Fig. 2 Cold-SSCP Method

の変異を経時的に検出し、紫外線によるヒト皮膚のケラトーシス、皮膚がんへの進行過程での関与を調べた。*p53*, *K-ras*, *c-kit* および *β -catenin* 遺伝子増幅に用いたプライマーを Table 1 に示した。

2.5 皮膚がん高発疾患患者の皮膚の継代・維持

各種皮膚がん高発疾患患者の皮膚（ケラトーシス、色素性乾皮症他）の継代・維持を行い、UVA、Bによるヒト皮膚のDNA損傷と修復をマウスの身体をかりて明らかにし、ケラトーシス、皮膚がんの誘発状況と遺伝子変異を調べた。

3 結果と考察

3.1 ヒト正常皮膚の継代・維持とUVA、B照射によるヒト皮膚ケラトーシス、皮膚がんの誘発

改良 SCID マウスへのヒト正常皮膚移植組織の継代・維持は2年以上にわたり可能で、ヒト正常皮膚 110 例中 110 例（100%）が改良 SCID マウスに生着した。

UVA、B 照射により、18 例中 14 例に光線角化症（actinic keratosis）が見られ、ケラトーシスを経由して皮膚がんへ進展が4例に見られた（扁平上皮がん3例、未分化がん1例）。

また、ワイルドタイプ *CB17+/+* マウスに UVA、B 照射しても皮膚がんは発生しなかったこと、および、ヒト遺伝子プライマーにより PCR 産物がえられたことより、がんはマウス皮膚ではなくヒト皮膚より発生したと考えられる。

3.2 *p53* がん抑制遺伝子の特異的変異

UVA、B 照射により誘発された突然変異の例（Case 5）を Fig. 3 に示した。また、皮膚移植組織の継代移植時の組織および遺伝子変異の経時的变化の一部を Table 2 に示した。誘発されたケラトーシス、皮膚がんでは、*p53* 遺伝子に種々の突然変異が検出されており、そのスペクトラムを Fig. 4 に示した。特に、codon242 に *cTGC* \rightarrow *cCGC* transition (Cys \rightarrow Arg) が特異的に誘発されていた。ヒト Psoriasis 皮膚に PUVA 療法 (Psoralen + UVA) を行った際に発生した皮膚がんを高率に *p53* 遺伝子の codon242 に全く同じ突然変異が誘発されていることが報告されており (Nataraj, et al., Invest. Dermatol., 1997)、本実験とよく一致している。codon273 にも変異が多く見られたが UV 照射とは無関係に発生しており、非特異的と思われる。

Table 1 The PCR primer pairs for the amplification of *p53*, *K-ras*, *c-kit* and β -catenin genes.

Genes	Oligonucleotide		Annealing temperature of PCR (°C)	Temperature of SSCP (°C)	Size(base pair)
<i>p53</i>					
exon 5a	5'-TCTGTCTCCTTCCTCTTCCTA-3'	upstream	57	35	155
	5'-CATGTGCTGTGACTGCTTGT-3'	downstream			
exon 5b	5'-TGTGCAGCTGTGGGTTGATTC-3'	upstream	62	25	167
	5'-CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG-3'	downstream			
exon 6	5'-TTGCTCTTAGGTCTGGCCCCT-3'	upstream	60	35	241
	5'-TAGGGAGGTCAAATAAGCAG-3'	downstream			
exon 7	5'-TGCCACAGGTCTCCCCAAGG-3'	upstream	60	25	234
	5'-AGGGGTCAGCGGCAAGCAGA-3'	downstream			
exon 8	5'-TCTTGCTTCTCTTTCTCTAT-3'	upstream	56	10	188
	5'-CGCTTCTTGTCTGCTTGCT-3'	downstream			
<i>K-ras</i>					
exon 1	5'-CATGTTCTAATATAGTCACA-3'	upstream	48	25	164
	5'-CTCTATTGTTGGATCATATTCGTCC-3'	downstream			
exon 2	5'-ACTGTGTTTCTCCCTTCTCA-3'	upstream	48	5	151
	5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCCA-3'	downstream			
<i>c-kit</i>					
exon 11	5'-GATCTATTTTTCCCTTTCTC-3'	upstream	56	20	175
	5'-AGCCCCTGTTTCATACTGAC-3'	downstream			
exon 17	5'-CATGGTCGGATCACAAAGAT-3'	upstream	58	15	167
	5'-ATTATGAAAGTCACGGAAAC-3'	downstream			
β -catenin					
exon 3	5'-GCTGATTTGATGGAGTTGGA-3'	upstream	56	25	227
	5'-GCTACTTGTCTTGAGTGAA-3'	downstream			

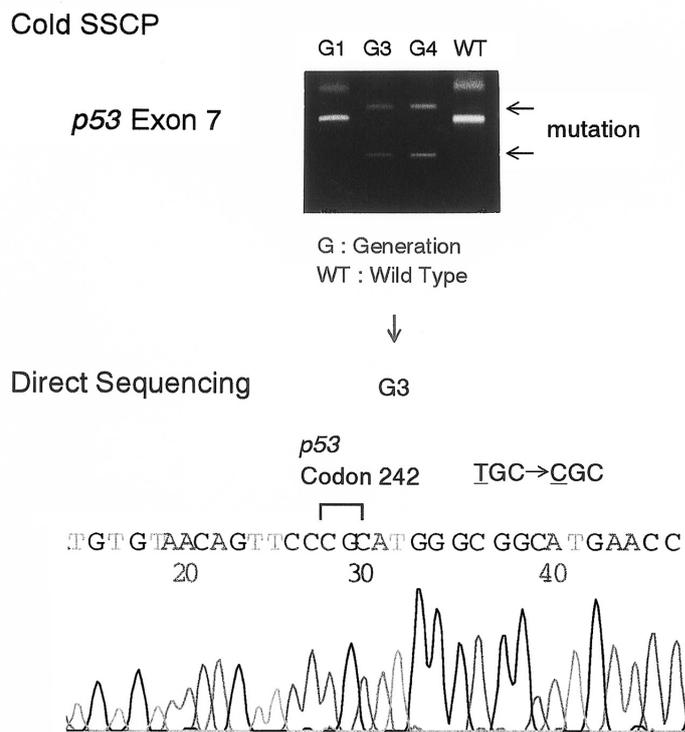


Fig. 3 Cold SSCP and Direct Sequencing of human skin tissue in SCID mouse by UVA,B exposure.

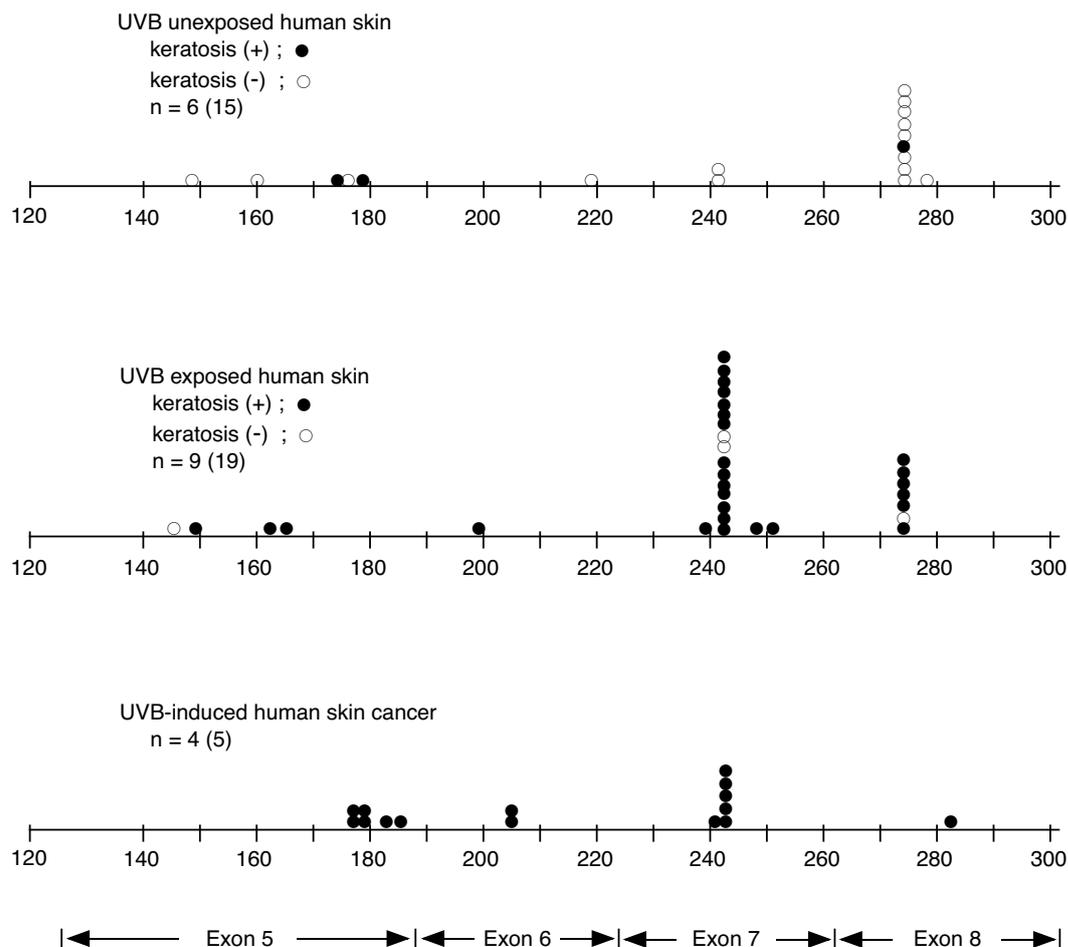


Fig. 4 *p53* mutation spectra of human skin tissue in SCID mice

3.3 UVA, B 照射によるヒト皮膚での *K-ras*, *c-kit* および β -*catenin* 遺伝子の変異

上記 UVA, B 照射ヒト皮膚の凍結サンプルを用い、*K-ras*, *c-kit* および β -*catenin* の変異を調べたところ、*K-ras* codon12 に GGT → GCT transversion が 2 例に起こっており、いずれも UVA, B で誘発した扁平上皮癌であった。*c-kit* codon 561 に GAG → GAA transition が 2 例に誘発されており、これも UVA, B 誘発扁平上皮癌であった。更に、codon559 に GTT → ATT transition が 1 例に認められたが、これは UVA, B 誘発ケラトシス皮膚であった。*c-kit* 遺伝子の変異は間質系、生殖系や血液系の腫瘍で報告されている⁴⁾が、メラノーマを除いた皮膚がんでは見られていない。

従って、UVA, B にて SCID マウスに移植したヒト正常皮膚に誘発したヒト皮膚がんには、*p53* 癌抑制遺伝子の突然変異 (codon242 に加え 2 ~ 3 重の変異) に加え、*K-ras*, *c-kit* の突然変異も重複して誘発されていることが新たにわかった。 β -*catenin* の変異も 7 例に見られたが非特異的であった。

3.4 基底細胞癌におけるヘッジホッグシグナルの特異的異常

基底細胞母班症候群の原因遺伝子 PTCH はヘッジホッグ蛋白のリセプターであり、一般人に生じる基底細胞癌においても PTCH の変異が報告されている⁵⁾。PTCH 変異を代表とするヘッジホッグシグナルの異常が PTCH の発現亢進を伴うことを利用して、神戸大学皮膚科で得られた各種のヒト皮膚腫瘍における PTCHmRNA の発現を RT-PCR 法により解析し、その異常の特異性を検討した。その結果 12 例の基底細胞癌全てに高発現を認めたのに対し、他の 24 例の腫瘍 (有棘細胞癌、メラノーマ、ボーエン病、日光角化症など) では 1 例のボーエン病を除いて、発現は低く、ヘッジホッグシグナルの異常は基底細胞癌特異的に生じている可能性が強く示唆された。

3.5 今後の方針

正常 *p53* 遺伝子導入によるヒト皮膚がん遺伝子治療モデルの作成を目的に、紫外線誘発ヒト皮膚がんの培養細胞系

を樹立しおり、皮膚がんの治療のみならず皮膚全体の研究にも役立てたい。

(引用文献)

- 1) Nomura T., Nakajima H., Hongyo T., et al. Induction of cancer, acnetic keratosis, and specific p53 mutations by UVB light in human skin maintained in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.*, 57: 2081-2084, 1997.
- 2) Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, et al. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single strand conformation polymorphism analyses. *Nucl Acid Res* 21:3637-3642, 1993.
- 3) Hongyo T, Buzard GS, Palli D, et al. Mutations of the K-ras and p53 gene in gastric adenocarcinoma from a high incidence region around Florence, Italy. *Cancer Res* 55:2665-2672, 1995.
- 4) Hongyo T., Li T., Syaifudin M., et al. Specific c-kit Mutations in Sinonasal NK/T-Cell Lymphoma in China and Japan. *Cancer Res.*, 60: 2345-2347, 2000.
- 5) Ahmed, N.U., Ueda, M., Nikaido, O., et al. High level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine appear in normal human epidermis after a single dose of ultraviolet radiation. *Brit J Dermatol.*, 140:226-231, 1999.