

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12167

研究課題名(和文) 酸化的 DNA 損傷に対する人為的な修復亢進-色素性乾皮症治療を目指して-

研究課題名(英文) Enhancing the repair of oxidative DNA damage with an artificial endonuclease

研究代表者

杉浦 重樹 (Sugiura, Shigeki)

奈良県立医科大学・医学部・教育教授

研究者番号：40179130

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)：サイクロプリンは色素性乾皮症 A 群(XPA)における進行性の神経障害の原因と考えられていることから、Cyclo-dA 特異的人工ヌクレアーゼが Cyclo-dA の修復亢進に効果があるか調べるため、培養細胞に酸化損傷を誘導しようと試みたものの、十分量を誘発することは出来なかった。そこで次ぎに神経変性と酸化損傷であるサイクロプリンの関係を調べるため、マウスの脳組織における Cyclo-dA を免疫染色したところ、12ヶ月齢と26ヶ月齢では Xpa マウスの方が Cyclo-dA が多いことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの脳組織におけるサイクロプリンを免疫染色したところ、12ヶ月齢と26ヶ月齢では Xpa マウスの方が多かったことから、色素性乾皮症患者における神経障害発症に酸化損傷であるサイクロプリンが関与しているとする従来の仮説を強く支持するものである。

研究成果の概要(英文)：Cyclopurine is believed to be the cause of progressive neurodegeneration in Xeroderma Pigmentosum Group A (XPA). To investigate whether an artificial endonuclease specific to cyclo-dA promotes cyclo-dA repair, we initially attempted to induce sufficient oxidative damage in cultured cells. However, this attempt was unsuccessful. Next, we proceeded to examine the relationship between neurodegeneration and cyclopurine by performing immunostaining of cyclo-dA on mouse brain tissues. The results revealed that Xpa mice have higher levels of cyclo-dA lesions compared to wild-type mice at 12 and 26 months of age.

研究分野：分子生物学

キーワード：酸化損傷 修復亢進 サイクロプリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

色素性乾皮症 (XP) はヌクレオチド除去修復 (NER) ができないため、皮膚ガンを高率に発生する遺伝性疾患であり、A~G 群、V(バリエーション)型の8つの病型に分けられる指定難病である。日本人に多い A 群は幼少期に神経症状を呈し、進行性の神経障害を引き起こすことが知られている。根本的治療法が未だなく、対症療法しか行えないのが現状である。

この神経障害が起こる有力な仮説は、脳で大量に消費される酸素により NER で本来除去されるはずの酸化 DNA 損傷が蓄積する結果、RNA 合成が阻害され、神経細胞死に至るといったものである。蓄積する酸化 DNA 損傷の有力な候補として、サイクロプリン (Cyclo-dA と Cyclo-dG) が考えられている。(図1参照)

実際我々は Cyclo-dA に対するモノクローナル抗体を作製し、これを使い *Xpa* KO マウスの脳で Cyclo-dA が生後6ヶ月以降は有意に蓄積することを世界で初めて確認した。

従って脳内のサイクロプリンを人為的に修復亢進する手法を確立できれば、色素性乾皮症に伴う神経障害の有効な治療法になる可能性が考えられた。

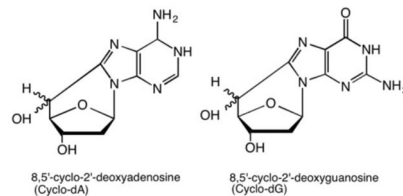


図1 サイクロプリン

2. 研究の目的

我々は様々な DNA 損傷に対するモノクローナル抗体をこれまで作製し、それを基にした損傷特異的人工エンドヌクレアーゼで修復亢進を試みており、シクロプタン型二量体 (CPD) についてはすでに成功している。そこで抗サイクロプリン抗体をベースとしたサイクロプリン特異的人工エンドヌクレアーゼが、サイクロプリン除去修復に効果があるのか検証し、根本的治療法のない色素性乾皮症の神経障害に応用できるか検討する。また *Xpa* マウスの脳切片を免疫染色し、サイクロプリンがどの領域に蓄積するのか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) サイクロプリン特異的人工エンドヌクレアーゼの作製と発現系の構築

抗サイクロプリン抗体の Fab (VH-CH1, VL-CL) に、SV40 T-antigen の核移行シグナル(NLS)と X のヌクレアーゼドメインを融合させ、サイクロプリン特異的人工エンドヌクレアーゼ (Fab-X) を作製する。この際使う X は、ヌクレアーゼ活性はそのまま、ダイマー形成しない変異体 X(KK) を使用した。(図2参照)

CPD の場合は軽鎖に融合させた方が、修復亢進する活性が高かったが、サイクロプリンの場合も同じである保証はなく、両者作製し、効果の高い方を選択する。(図2参照)

これを培養細胞用発現ベクターに組み込んだ後、テロメラーゼにより不死化した線維芽細胞にトランスフェクションを行い、安定発現株を樹立した。

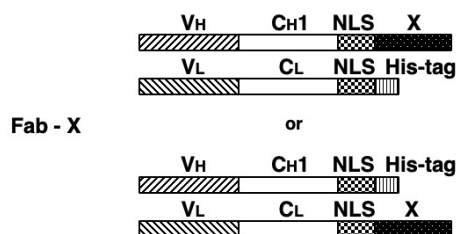


図2 Fab-Xの構造

(2) 安定発現株における Fab-X の修復亢進評価

コンタクトインヒビションにより増殖が停止した細胞に、酸化 DNA 損傷を誘発する BSO などの薬剤を加え、さらに2週間から1ヶ月培養を行うなどして、細胞に酸化 DNA 損傷を誘導する条件を検討した。

次にこの条件で Fab-X を安定発現する細胞とコントロール細胞を培養し、それぞれの細胞から DNA を抽出後、DNA 中に存在するサイクロプリンを ELISA により定量し、サイクロプリン特異的人工エンドヌクレアーゼによる効果について評価した。

(3) 抗サイクロプリン抗体による *Xpa* マウス脳切片の免疫染色

様々な月齢の *Xpa* 及び野生型マウスの脳組織を 4% PFA で灌流固定後 OTC で包埋し脳切片を作製した。この脳切片を Sodium citrate buffer による 90 20分間の浸透化処理を行い、さらに DNA 一本鎖化処理を行った後、我々が作製した抗サイクロプリンモノクローナル抗体及び蛍光二次抗体で処理し、サイクロプリン (Cyclo-dA) を検出した。可視化後蛍光顕微鏡を用いて蛍光量を測定し、細胞核当たりの損傷量を定量した。

4. 研究成果

(1) 酸化的 DNA 損傷の誘発

コンタクトインヒビションを起こした不死化正常ヒト線維芽細胞をミトコンドリア阻害薬である Rotenone, Antimycin A, BSO 及び過酸化水素で処理しても、十分量の酸化的損傷は誘発されなかった。そこでヌクレオチド除去修復能が低下した *XPA* 欠損細胞をゲノム編集で作製したものの、十分量の酸化的損傷を誘発する条件を確立するには至らなかった。

日本人に多い *XPA* 患者で神経症状が多く見られるが、症状が現れるのは学童期以降であり、長い時間をかけて脳神経細胞に酸化的損傷が蓄積していくものと考えられる。このことは *Xpa* マウスは野生型に比べ酸化的損傷が有意に存在するにも関わらず、マウスの寿命程度では神経症状が見られないことと符合する。酸化的損傷を誘導する酸素ラジカルは細胞にとって非常に有毒であるため直ちに無害化する機構が備わっており、この事が酸化的損傷を誘発するのを難しくしていると考えられる。

我々がすでに効果を確認している シクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) 特異的人工ヌクレアーゼの場合は、細胞を紫外線照射することで簡単に十分量の CPD を誘発出来るのに対し、酸化的 DNA 損傷を誘発する条件設定は非常に難しく、当初の目的であるサイクロプリン特異的人工ヌクレアーゼがサイクロプリンの修復亢進に効果があるかについては評価することが出来なかった。

(2) *Xpa* マウス脳組織におけるサイクロプリンの定量

我々が作製した抗サイクロプリンモノクローナル抗体でマウス脳組織を免疫染色したところ、シグナルはすべて細胞核上に局在していた。これらのシグナルについて DNA 当たりの蛍光量を定量した結果、6 ヶ月齢では *Xpa* と野生型マウスに差は見られないものの、12 ヶ月齢と 26 ヶ月齢では *Xpa* マウスの方が多量であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishimura, K., Ikehata, H., Douki, T., Cadet, J., Sugiura, S. and Mori, T.	4. 巻 97
2. 論文標題 Seasonal Differences in the UVA/UVB Ratio of Natural Sunlight Influence the Efficiency of the Photoisomerization of (6-4) Photoproducts into their Dewar Valence Isomers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photochem Photobiol	6. 最初と最後の頁 582-588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/php.13361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nukuzuma, S., Nukuzuma, C., Kameoka, M., Sugiura, S., Nakamichi, K., Tasaki, T., Hidaka, K. and Takegami, T.	4. 巻 74
2. 論文標題 Characterization of JC Polyomavirus Derived from COS-IMRb Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 48-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2020.32	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 俊雄、西村和樹、池畑広伸、Thierry Douki、Jean Cadet、杉浦重樹
2. 発表標題 太陽光中のUVA/UVB比率の季節差はDNA損傷6-4型光産物のDewar型光産物への光異性化への効率に影響を及ぼす
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 DNA 鎖上のアデノシン型サイクロプリンに特異的に結合する抗体	発明者 森俊雄、杉浦重樹、 高木由美	権利者 株式会社メイベル、奈良県立医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7107497号	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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
研究 分 担 者	森 俊雄 (Mori Toshio) (10115280)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	

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