

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591626

研究課題名(和文) 薬剤による cAMP 濃度上昇、CREB 活性化と皮膚および神経系細胞の DNA 修復亢進

研究課題名(英文) The cAMP elevation and CREB activation stimulates DNA repair capacity in skin and neuronal cells.

研究代表者

小林 信彦 (Kobayashi, Nobuhiko)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70316074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)： cAMP濃度上昇とCREB活性化作用を持つ薬剤によりDNA修復を亢進し、色素性乾皮症の皮膚癌・メラノーマ、神経症状を予防するための基礎実験を行った。DBcAMP投与により神経芽細胞腫細胞のNERを亢進させる可能性を示唆する結果が得られた。

色素性乾皮症の神経症状発症にはサイクロプリンが関与することが推測されている。DBcAMPがサイクロプリン修復を亢進できるか検討するために、サイクロプリンを認識するモノクローナル抗体の樹立をした。

研究成果の概要(英文)： A basic research was performed to develop a novel method in preventing sun-induced skin cancers and melanomas, and progressive neurological disease in xeroderma pigmentosum (XP) patients using agents that can stimulate DNA repair capacity through the elevation of cellular cAMP level and CREB activity. Our results suggested that DBcAMP can stimulate DNA repair capacity in neuroblastoma cells.

Cyclopurines are candidates to be involved with XP neurological disease. Thus, we established a novel monoclonal antibody specific for a type of cyclopurine, cyclo-dA, in order to determine whether DBcAMP can also stimulate repair capacity for cyclopurines.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：DBcAMP 神経芽細胞腫 DNA修復 サイクロプリン モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 紫外線誘発ピリミジン二量体や化学物質による DNA 付加体など、二重鎖 DNA を大きく歪ませる損傷はヌクレオチド除去修復 (NER) により修復される。色素性乾皮症 (XP) は NER を欠損する遺伝疾患であり、太陽紫外線により健康人の数千倍の頻度で皮膚癌やメラノーマを発症する。さらに知能低下や運動失調など進行性の神経症状を発症する。太陽光を徹底的に遮断して生活することにより皮膚癌やメラノーマは予防できる。しかし、太陽光の到達しない脳神経病変については発症機序さえ解明されておらず、したがって有効な予防方法はなく、臨床で大きな問題となっている。

(2) 脳は酸素を大量に消費することから、活性酸素を介して XP 患者が修復できない特別な酸化 DNA 損傷が生成・蓄積して神経細胞が死に至り、XP 神経症状が発症すると推測されている。XP 神経症状の原因として、酸化 DNA 損傷サイクロプリン (cyclo-dA と cyclo-dG) が最有力候補である (Fig. 1)。しかし、XP 神経症状の原因がサイクロプリンであることを証明する研究が進んでいない。最大の理由は、多くの研究者が利用可能なサイクロプリンの高感度・高精度な検出・定量系が確立されていないことである。現在唯一使用可能な LC-MS 分析法は、専門的技術や特殊試薬を必要とする大型機器による解析であるため、実際に論文発表できている研究グループは極めて少ない。また、この LC-MS 分析法では、細胞 DNA を塩基レベルに分解することが必要のため、XP 患者剖検脳や皮膚切片中のサイクロプリンを *in situ* で検出することはできない。

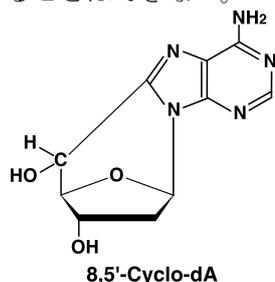


Fig. 1 サイクロプリン

2. 研究の目的

(1) 健康人や XP などの DNA 修復 (NER) 欠損疾患の皮膚悪性腫瘍や神経症状の予防には DNA 損傷の生成予防とともに NER の亢進が重要である。これまでに、cAMP 濃度上昇と CREB 活性化により NER が亢進することを報告してきた。市販されている薬剤の中にこれらの作用を持つものがあり、これらの外用あるいは全身投与により、皮膚および脳神経系細胞の NER を亢進し、皮膚悪性腫瘍や神経症状を予防する新しい方法を開発するための基礎的実験を行うことが本研究の第 1 の目的である。

(2) XP の神経症状発症にサイクロプリンが関与することが推測されている。cAMP 濃度上昇と CREB 活性化作用を持つ薬剤がサイクロプリン修復能を亢進することができるか検討するために、サイクロプリンを定量する実験系の樹立が必要である。そこで、サイクロプリンを認識するモノクローナル抗体を樹立し、ELISA 法や免疫蛍光染色法によりサイクロプリンの修復を定量あるいは可視化する実験系を確立することが本研究の第 2 の目的である。

3. 研究の方法

(1) cAMP 濃度上昇、CREB 活性化作用を持つ薬剤として DBcAMP を使用した。正常ヒト線維芽細胞および神経系細胞のモデルとして理化学研究所から購入した神経芽細胞腫細胞と乏突起神経膠腫細胞を使用した。MTS アッセイにより紫外線感受性を、モノクローナル抗体を用いた ELISA 法によりシクロブタン型ダイマー (CPD) 修復能を定量して NER 活性を検討した。

(2) ① サイクロプリン特異モノクローナル抗体の樹立と性格付け

BALB/c マウスにサイクロプリン (cyclo-dA) を含むオリゴヌクレオチドと Freund アジュバントを腹腔内注射して免疫した。脾臓を摘出し、脾細胞とミエロマ細胞を細胞融合して得られたハイブリドーマをクローニングした。サイクロプリンを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを ELISA 法によりスクリーニングした。

② X 線照射した DNA・オリゴヌクレオチドとサイクロプリン特異モノクローナル抗体の結合

N₂ 存在下にガンマ線を照射すると DNA 中にサイクロプリンが誘発されることが知られている。DNA あるいはサイクロプリンを含むオリゴヌクレオチドに N₂ 存在下に X 線を照射し、ELISA 法によりサイクロプリン特異モノクローナル抗体の結合を検討した。

③ サイクロプリン検量線の作成

既知の個数のサイクロプリンを持つオリゴヌクレオチドを用いて、モノクローナル抗体を用いた ELISA 法によりサイクロプリンの絶対数を定量する検量線の作成を行った。

④ フェントン反応によるサイクロプリンの誘発

DNA を CuCl₂、H₂O₂、ビタミン C と反応させ、フェントン反応により DNA 中にサイクロプリンを誘発できるか検討した。生成したサイクロプリンはモノクローナル抗体を用いた ELISA 法により検出・定量した。

⑤ 免疫蛍光染色法による可視化

骨肉腫細胞にサイクロプリンを含むオリゴヌクレオチドを導入し、モノクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色法により培養細胞中のサイクロプリンを可視化した。

4. 研究成果

(1) 正常ヒト線維芽細胞では DBcAMP 投与により紫外線抵抗性とはならなかった。もともと十分な DNA 修復能を持つ細胞の NER 活性をさらに亢進させることは困難であると考えた。我々はこれまでに、ラットを用いて、神経系細胞の NER 活性は線維芽細胞よりも低いこと報告している。このため、神経芽細胞腫細胞と乏突起神経膠腫細胞を使用したところ、神経芽細胞腫細胞は線維芽細胞よりも紫外線感受性であった。そこで、神経芽細胞腫細胞に 5 日間 DBcAMP 処理した後に紫外線 (UVC 10J/m²) を照射し、CPD 修復能を比較した。24 時間後の CPD 修復率は、コントロール細胞の 62% に対して DBcAMP を処理した細胞では 80% と亢進していた。DBcAMP が神経系細胞の NER 活性を亢進する可能性を示唆する結果であった。DBcAMP (アクトシン) の全身投与により XP 患者の神経症状発症を予防あるいは遅延できる新しい方法となる可能性があるため、将来の臨床応用に向けた基礎実験をさらに継続したい。

(2) ① サイクロプリン特異モノクローナル抗体の樹立と性格付け

2,315 個のハイブリドーマをスクリーニングし、サイクロプリンを特異的に認識するモノクローナル抗体 (CdA-1) を樹立した。CdA-1 は、IgG_{2a} (κ) クラスのモノクローナル抗体で、1 本鎖 DNA 中のサイクロプリン (cyclo-dA) と高い親和性・特異性を持ち結合した (Fig. 2)。また、S 体と R 体の両方の光学異性体を認識した。

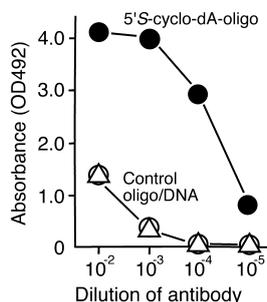


Fig. 2 CdA-1 は cyclo-dA と高い親和性を持つ

② X 線照射した DNA・オリゴヌクレオチドと CdA-1 の結合

DNA あるいはサイクロプリンを含むオリゴヌクレオチドに N₂ 存在下に X 線を照射し、ELISA 法により CdA-1 が cyclo-dA と特異的に結合することを証明した。

③ サイクロプリン検量線の作成

既知の個数のサイクロプリンを持つオリゴヌクレオチドを用いて、ELISA 法でサイクロプリンの絶対数を定量する検量線を作成することに成功した。

④ フェントン反応によるサイクロプリンの誘発

フェントン反応により DNA 中にサイクロプリンを誘発することに成功し、生成したサイクロプリン数を ELISA 法により定量した。

⑤ 免疫蛍光染色法による可視化

サイクロプリンを含むオリゴヌクレオチドを導入した骨肉腫細胞に免疫蛍光染色を行い、培養細胞中のサイクロプリンを可視化することに成功した。

以上の実験を通じて、サイクロプリンを認識するモノクローナル抗体を世界で初めて樹立し、ELISA 法および免疫蛍光染色法によりサイクロプリンの誘発・修復を定量あるいは可視化する実験系を確立した。DBcAMP が神経系細胞のサイクロプリン修復能を亢進し、XP 神経症状を予防できるかの検討に用いることができるだけでなく、XP 患者剖検脳や皮膚、培養細胞中のサイクロプリンを定量・可視化することにより、サイクロプリンが XP 神経症状を引き起こすことを証明できる実験系が世界で初めて確立されたことになる。我々が樹立したサイクロプリン特異モノクローナル抗体の持つ科学的インパクトは絶大である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Iwamoto T, Kobayashi N, Mori T (4 名省略、5 番目)、Quantitative and in situ detection of oxidatively generated DNA damage 8,50-cyclo-20-deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody、Photochem Photobiol、査読有、2014、印刷中
DOI: 10.1111/php.12239
- ② Schäfer A, Mori T, Kobayashi N (10 名省略、10 番目)、Characterization of 3 novel XPG-defective patients identifies 3 missense mutations that impair repair and transcription、J Invest Dermatol、査読有、133 巻、2013、1713-1717
DOI: 10.1038/jid.2013.54

[学会発表] (計 2 件)

- ① Iwamoto T, Brooks PJ, Kobayashi N, Sugiura S, Mori T、Quantitative and in situ detection of oxidatively generated DNA damage 8,5'-cyclo-2'

-deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody、International symposium on xeroderma pigmentosum and related diseases: disorders of DNA damage response -bench to bedside-, 2014. 3. 5-7、Kobe.

- ② 森 俊雄、吉田唯真、西村和樹、岩本顕聡、池畑広伸、小林信彦、太陽紫外線による3主要ピリミジン2量体DNA損傷の誘発、第33回日本光医学・光生物学会、20011. 7. 22-23、吹田市

[その他]

ホームページ等

www.naramed-u.ac.jp/~derm/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 信彦 (KOBAYASHI, Nobuhiko)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70316074

(2) 研究分担者

森 俊雄 (MORI, Toshio)
奈良県立医科大学・医学部・研究教授
研究者番号：10115280