

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550042

研究課題名(和文) 色素性乾皮症A群患者における進行性神経障害の機構解析

研究課題名(英文) Mechanism analysis of progressive neurological abnormalities in xeroderma pigmentosum group A patients

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷欠損遺伝病である色素性乾皮症A群(XP-A)が発症する進行性の神経障害が酸化的DNA損傷サイクロプリンの蓄積による神経細胞死と関係するか検討するため、8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine (Cyclo-dA)に特異結合するモノクローナル抗体を作製した。酵素標識免疫法を用いて、損傷量と抗体結合量が比例関係を示し、1,000,000塩基あたり1個の検出感度を持つCyclo-dA定量系を確立した。5ヶ月齢から29ヶ月齢の野生型およびXP-Aマウス臓器間におけるCyclo-dA蓄積量を比較した結果、脳ではXP-Aマウスが有意に多量の損傷を蓄積していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Xeroderma pigmentosum group A (XP-A) patients develop progressive neurological abnormalities, which has been hypothesized to be associated with a type of oxidatively generated DNA damage called purine 8,5'-cyclo-2'-deoxynucleosides. Thus, we generated a monoclonal antibody specific for 8,5'-cyclo-2'-deoxynadenosine (Cyclo-dA) in DNA. The immunoassay revealed a linear dose-response between known amounts of Cyclo-dA in oligonucleotides and the antibody binding to them with a detection sensitivity of about 1 lesion/10⁶ bases in a 1 ug DNA sample. We compared the amounts of Cyclo-dA accumulated in organs between wild type and XP-A mice with ages from 5 months to 29 months. We found that XP-A mice accumulate significantly higher amounts of Cyclo-dA in brains than do wild type mice, supporting the hypothesis.

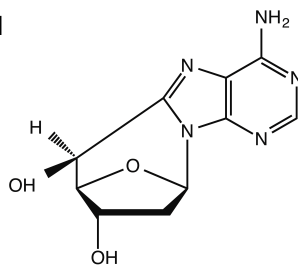
研究分野：遺伝情報制御学

キーワード：色素性乾皮症 神経障害 酸化的DNA損傷 サイクロプリン モノクローナル抗体 DNA修復異常

1. 研究開始当初の背景

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ヒト細胞ではヌクレオチド除去修復 (NER) で修復される。NER を欠損する代表的遺伝病は色素性乾皮症 (XP) であり、その中で最も重篤な症状を呈する A 群 (XP-A) の日本人患者数は世界最多である。XP-A 患者は太陽露光部に超高頻度に皮膚がんを発症するが、太陽光被ばくを遮断することで発症を回避できる。一方、運動失調や知能低下などの神経障害は確実に発症し進行性に増悪する。有効な治療法はなく、発症機序も不明なため、平成 19 年度に厚生労働省「難治性疾患克服研究事業」の対象疾患に指定された。神経障害発症の仮説として、内因性の NER 型 DNA 損傷の蓄積およびその転写阻害による神経細胞死が考えられており (Andrews ら, Proc Natl Acad Sci 75, 1984, 1978)、酸化 DNA 損傷サイクロプリン (図 1) がその有力候補である。サイクロプリンは一般に Purine 8,5'-cyclo-2'-deoxynucleoside と呼ばれ、8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine (Cyclo-dA) と 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine (Cyclo-dG) がある。また、それぞれに 5' S と 5' R の異性体がある。しかし、これまでサイクロプリンの簡便な検出法は確立されていない。唯一 LC-MS/MS 法が稼働しているが、大型機器および同位体標識標準試薬などが必要なため、利用できるのは欧米の 3 グループに限定されている。そこで、私達はサイクロプリン特異モノクローナル抗体の作製に挑戦し、8 年の努力の結果、遂に作製に成功した。

図 1



(5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine
(5'S-cyclo-dA)

2. 研究の目的

まず、新規モノクローナル抗体 (CdA-1) がサイクロプリンに特異結合することを様々な性能試験を通して確認する。次に、高感度および高精度のサイクロプリン定量系を酵素標識免疫法 (ELISA) を基に確立する。同時に、細胞や組織中のサイクロプリンを細胞構造を維持したまま観察できるように蛍光免疫染色法を確立する。これらの技術を利用し、幅広い月齢の野生型マウスおよび XP-A マウス臓器 (脳など) 中のサイクロプリン蓄積量を比較することで、同損傷の神経障害への関与の可能性を探る。さらに、厚生労働省

XP 研究班員との共同研究の下、XP-A 患者や健常人の剖検脳組織切片上の損傷を比較測定する。こうして、サイクロプリンの神経細胞への蓄積が XP-A 患者の神経障害発症に関係するか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 抗体が認識するエピトープの決定

5' S- Cyclo-dA、5' R- Cyclo-dA、紫外線照射 DNA、対照 DNA 等を用いて、抗体 CdA-1 が DNA 中の Cyclo-dA に特異的に結合するかを ELISA 法による競合阻害実験で確認する。また、5' S- Cyclo-dG、5' R- Cyclo-dG、(dG)₂₀、(dC)₂₀、(dT)₂₀、対照 DNA に窒素環境下で X 線を 1000 Gy 照射し、CdA-1 が DNA 中の Cyclo-dG にも結合するか ELISA 法で確認する。

(2) サイクロプリン定量系の作製

Cyclo-dA を 1 個含むオリゴヌクレオチド (Cyclo-dA オリゴ) と対照オリゴヌクレオチドの混合割合を変えて損傷量の異なるサンプルを作製し、ELISA 法で抗体の結合量を測定する。この実験により、抗体結合の損傷量依存性や損傷検出感度を明らかにする。なお、応用実験において、Cyclo-dA 含有オリゴヌクレオチドを検量線に使用する。

(3) サイクロプリン定量系の応用

仔牛胸腺 DNA に種々の濃度のフェントン型試薬 (CuCl₂, H₂O₂, Ascorbate) を 3 時間あるいは 24 時間処理した後、ELISA 法により誘発された Cyclo-dA 量を定量する。また、鳥取大学医学部の中根裕信博士より 5 ヶ月齢から 29 ヶ月齢の野生型マウスおよび XP-A マウスの臓器 (脳、肝臓、腎臓、精巣) の提供を受けており、DNA を抽出後、ELISA 法により蓄積した Cyclo-dA を定量・比較する。

(4) 細胞におけるサイクロプリンの可視化

ヒト骨肉腫細胞 (U2OS) を 35 mm glass bottom dish に植え、24 時間培養する。Cyclo-dA オリゴおよび対照オリゴヌクレオチドを細胞に導入後、細胞を固定し、CdA-1 を用いた蛍光免疫染色を行う。

4. 研究成果

(1) CdA-1 抗体の性能解析

抗体産生細胞の培養上清を約 20 倍濃縮したモノクローナル抗体溶液を全ての実験に使用した。まず、抗体のタイピングキットを用いて CdA-1 を調べた結果、IgG2a・鎖であることがわかった。次に、抗体の結合特異性を ELISA 法で検討した。その結果、抗体のエピトープは Cyclo-dA であり、その損傷が DNA 中に存在することで結合が 300 倍安定することがわかった (図 2)。また、5' S-Cyclo-dA だけでなく 5' R-Cyclo-dA もほぼ同様に結合できることがわかった。一方、抗体は、Cyclo-dG、アセチルアミノフルオレ

ン DNA 付加体、8-oxo-dG、紫外線照射 DNA、X 線照射 (dG)₂₀、X 線照射 (dC)₂₀、X 線照射 (dT)₂₀、および対照 DNA に結合しないことがわかった (図 3)。

図 2

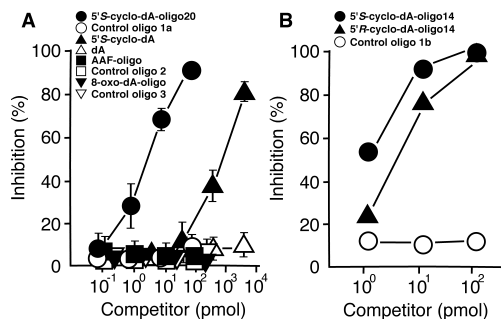
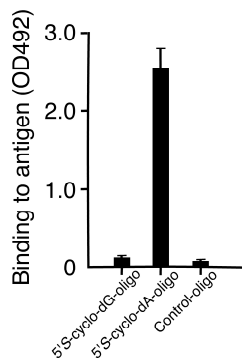


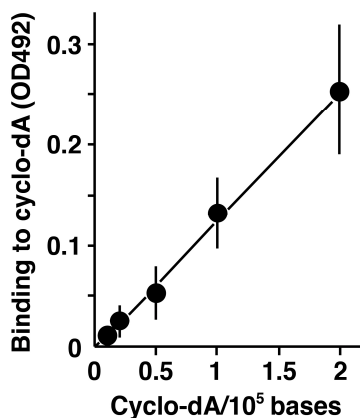
図 3



(2) サイクロプリン検量線の作製

Cyclo-dA の定量測定のために、種々の濃度の Cyclo-dA オリゴとそれに対する抗体結合の関係を ELISA 法で調べた。その結果、プレートに結合した Cyclo-dA 量とそれに対する抗体結合量が比例関係を示した (図 4)。また、1 μg の DNA を用いれば、1,000,000 塩基あたり 1 個の検出感度で Cyclo-dA を定量できることがわかった。

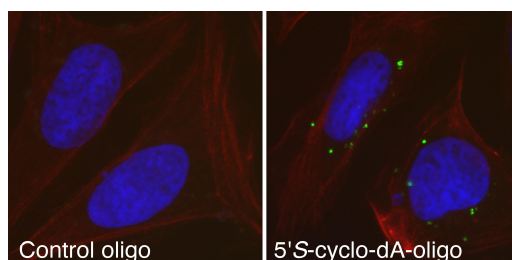
図 4



(3) 細胞中のサイクロプリンの可視化

Cyclo-dA オリゴおよび対照オリゴヌクレオチドを細胞に導入後、CdA-1 を用いて蛍光免疫染色を行った (図 5)。その結果、Cyclo-dA オリゴを導入した細胞にはドット状に Cyclo-dA が染色されたが、対照細胞には全く染色が見られなかった。それ故、細胞や組織に有意量の Cyclo-dA が誘発されれば、蛍光免疫染色で可視化できると推測される。

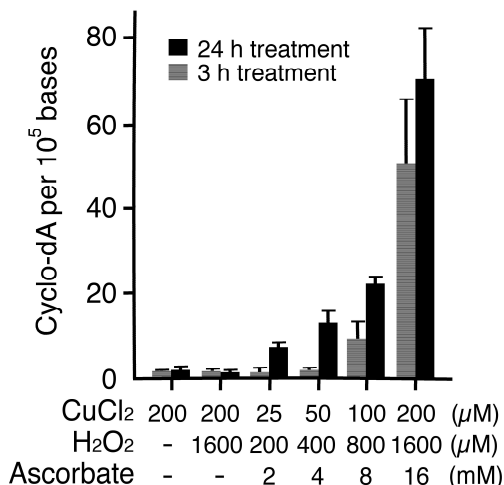
図 5



(4) サイクロプリンの定量

仔牛胸腺 DNA に種々の濃度のフェントン型試薬 (CuCl₂, H₂O₂, Ascorbate) を 3 時間あるいは 24 時間処理した後、誘発された Cyclo-dA 量を定量した。その結果、フェントン型試薬処理量および処理時間に依存して Cyclo-dA が誘発された (図 6)。また、5 ヶ月齢から 29 ヶ月齢の野生型マウスおよび XP-A マウスの臓器 (脳、肝臓、腎臓、精巣) に蓄積した Cyclo-dA を定量した。その結果、特に脳において、XP-A マウスは野生型マウスに比べ多量の Cyclo-dA を蓄積していることがわかった。この結果は、XP-A 患者の神経障害と酸化損傷 DNA 損傷 Cyclo-dA の関係を支持するものである。しかしながら、実験を続ける中、検量線に用いた Cyclo-dA オリゴの一部がプレートから剥離していることが判明し、この改善に全力で取り組んでいるところである。

図 6



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1). M. Fujiwara, T. Mori, K. Hamada, T. Ota, R. Wiedemuth, A. Temme and M. Tatsuka (14名、8番目). Radiation-induced RhoGDI β cleavage leads to perturbation of cell polarity: A possible link to cancer spreading. *J Cell Physiol*, 231 (2016) 2493-2505.

査読有り、DOI: 10.1002/jpc.25362

2). A. Kato, T. Mori, T. Kuno, S. Suzuki, H. Kato, H. Ohara, T. Joh and S. Takahashi (20名、13番目). Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3 β and ERK1/2.

Oncotarget, 6 (2015) 42963-42975.

査読有り、DOI: 10.18632/oncotarget.5981

3). H. Ikehata, T. Mori and M. Yamamoto. *In vivo* spectrum of UVC-induced mutation in mouse skin epidermis may reflect the cytosine deamination propensity of cyclobutane pyrimidine dimers. *Photochem. Photobiol.*, 91 (2015) 1488-1496.

査読有り、DOI: 10.1111/php.12525

4). M. Akita, H. Saitoh, S. Iwai, T. Mori, K. T. Ikura, W. Sakai, F. Hanaoka, and K. Sugasawa (14名、10番目). SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *Scientific Reports*, 5 (2015) 10984.

査読有り、DOI: 10.1038/srep10984

5). S. Matsumoto, S. Iwai, T. Mori, R. Nishi, K. Yoshino, W. Sakai, F. Hanaoka, N.H. Thoma, and K. Sugasawa (12名、6番目). Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *Nucleic Acids Res.*, 43 (2015) 1700-1713.

査読有り、DOI: 10.1093/nar/gkv038

6). T. Iwamoto, P.J. Brooks, T. Nishiwaki, K. Nishimura, N. Kobayashi, S. Sugiura and T. Mori. Quantitative and *in situ* detection of oxidatively generated DNA

damage 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody. *Photochem. Photobiol.*, 90 (2014) 829-836.
査読有り、DOI: 10.1111/php.12239

〔学会発表〕(計 8 件)

1) 森 俊雄: 紫外線誘発 DNA 損傷に対するモノクローナル抗体、日本放射線影響学会第59回大会、2016年10月26-28日、広島

2) 森 俊雄: DNA 損傷特異モノクローナル抗体と歩んで35年、日本薬学会北陸支部特別講演、2016年9月30日、金沢

3) 森 俊雄、岩本顕聡、杉浦重樹、中根裕信: 酸化的DNA損傷サイクロブリン定量系の高感度化、第38回日本光医学・光生物学会、2016年7月22-23日、京都

4) 森 俊雄: DNA 修復異常疾患 (XP/CS/TTD) の病態と細胞/分子レベルの特性との関連、第37回日本光医学・光生物学会、2015年7月17-18日、宮崎

5) T. Mori, T. Iwamoto, P. J. Brooks, N. Kobayashi and S. Sugiura: Quantitative detection of oxidative DNA damage 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody, 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29, 2015, Kyoto

6) 森 俊雄、岩本顕聡、小林信彦、杉浦重樹: 新規モノクローナル抗体を用いた酸化的DNA損傷サイクロブリンの定量測定と可視化、日本放射線影響学会第57回大会、2014年10月1-3日、鹿児島

7) T. Iwamoto, P.J. Brooks, N. Kobayashi, S. Sugiura and T. Mori: Quantitative and *in situ* detection of oxidatively generated DNA damage 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody, 16th International Congress on Photobiology, September 8-12, 2014, Cordoba, Argentina

8) 岩本顕聡、P.J. Brooks、小林信彦、杉浦重樹、森 俊雄: 新規モノクローナル抗体を用いた酸化的DNA損傷サイクロブリンの定量測定と可視化、第36回日本光医学・光生物学会、2014年7月25-26日、大阪

〔図書〕(計 2 件)

1). 森 俊雄. 4.2 ヒトにおけるヌクレオチド除去修復のしくみ、放射線医科学 -生体と放射線・電磁波・超音波-、大西武雄監修、医療科学社, pp.135-136, 2016.

2). 森 俊雄. 第10章 DNA損傷の定量測定と可視化、光老化科学の最前線、前田憲寿監修、シーエムシー出版, pp.89-96, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
奈良県立医科大学 ラジオアイソトープ実験施設

<http://www.naramed-u.ac.jp/university/kenkyu-sangakukan/radioisotope/radioisotope.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

P. J. Brooks

中根 裕信 (Nakane Hironobu)

林 雅晴 (Hayashi Masaharu)