

令和元年6月12日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12600

研究課題名(和文) 損傷のタイプに応じて修復を亢進させる損傷特異的人工型'ヌクレアーゼ'の応用

研究課題名(英文) Application of DNA damage-specific endonucleases which enhance a repair ability

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗CPDモノクローナル抗体をベースに作製したCPD特異的エンドヌクレアーゼは、ヌクレオチド除去修復(NER)が欠損したXP-A細胞のみならず、野生型細胞においてもCPDの修復を亢進した。日本人に多い色素性乾皮症A群(XP-A)は、NERが出来ないため、進行性の神経障害を引き起こすが、根本的治療は未だない。Xpaマウスの解析から、酸化されたDNA損傷であるサイクロプリンが神経細胞内に蓄積し、この神経障害を引き起こすと考えられる。従ってCPDのケース同様、我々の抗サイクロプリン抗体をベースにサイクロプリン特異的エンドヌクレアーゼを作製すれば、治療薬として使える可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷に対するモノクローナル抗体をベースにしたDNA損傷特異的エンドヌクレアーゼが修復を亢進したことは、治療薬としての可能性を示したものであり、他に類を見ない全く新しいアプローチである。しかも色素性乾皮症で見られる進行性の神経障害の原因が、酸化されたDNA損傷のサイクロプリンであることを世界で初めて確認できたことから、我々の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エンドヌクレアーゼが、現在根本的治療のない色素性乾皮症に初めて治療への道を開くことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：CPDs were efficiently removed by expressing the CPD specific endonuclease based on an anti-CPD monoclonal antibody not only in NER-deficient XP-A cells but also in normal cells. XP group A is the most common form in Japan and the defect in NER causes neurological abnormalities.

ELISA assay of Xpa^{-/-} mouse tissue DNA revealed that cyclo-dA lesion, oxidatively generated type of DNA damage accumulated with the age in the brain of Xpa^{-/-} mouse. This finding suggested that the accumulation might be prevented in a similar way to CPD by cyclopurine specific endonuclease based on our anti-cyclopurine monoclonal antibody.

研究分野：分子生物学

キーワード：修復 DNA 損傷 モノクローナル抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

紫外線照射により DNA のピリミジン塩基が連続した箇所には 3 種類の主要なピリミジン二量体を形成するが、中でも CPD (シクロブタン型ダイマー) の形成量が多く、修復効率が悪い。

日本人に多い色素性乾皮症 A 群 (XP-A) は、ヌクレオチド除去修復 (NER) が出来ないため、紫外線暴露により生じたピリミジン二量体を修復出来ず、高頻度で皮膚ガンを発症する。しかも進行性の神経障害を引き起こすが、根本的治療は未だない。

この神経症状を引き起こす原因は、本来 NER で修復されるべき酸化的 DNA 損傷サイクロプリンが脳内に蓄積することにより引き起こされる神経細胞死ではないかと長年疑われてきたが、証明されていなかった。

2. 研究の目的

ヌクレオチド除去修復は 30 種類もの蛋白が強調して働くが、最初に DNA 損傷を認識し、損傷を持つ側の DNA 鎖にニックを入れる過程が非常に重要である。

そこで我々がこれまでに作製した DNA 損傷に対するモノクローナル抗体をベースに損傷特異的人工エンドヌクレアーゼを構築し、これが NER の初期過程を効率化することで DNA 修復を飛躍的に亢進するか調べ、治療への応用を探る。

3. 研究の方法

(1) 核移行型損傷特異的エンドヌクレアーゼの構築

(2) 核移行型損傷特異的エンドヌクレアーゼ導入細胞の樹立

発現ベクターに核移行型損傷特異的エンドヌクレアーゼ、Fab をクローニング後、NER 陽性である U2OS 細胞に導入し、安定発現株を樹立した。これらに加えベクターのみを導入した合計 3 種類の NER 陽性細胞を樹立した。NER 陰性である XP-A 細胞についても同様に 3 種類の導入を行い、安定発現株を樹立した。

(3) 紫外線感受性の測定

3 種類の NER 陽性細胞を 24 well plate に植え、翌日様々な線量の紫外線を照射後培養を行った。4 日後、MTS 試薬を加え 2 時間培養した後、492 nm の吸光度を測定し生存数を求めた。その後、非照射細胞と照射細胞の生存数の割合から、紫外線感受性曲線を求めた。同様の実験を NER 陰性 XP-A 細胞についても行った。

(4) CPD 修復能の測定

3 種類の NER 陽性細胞を 10 cm dish に植え、コンフルエントになるまで培養した。細胞を DPBS で洗浄後、10 J/m² の紫外線で照射し、照射直後、あるいは 4、8、21 および 24 時間修復させた後、細胞を回収し -80 に保存した。細胞を解凍後、DNA Extractor TIS kit (Wako) を用いて DNA を精製・抽出した。DNA を 1 本鎖に熱変性後、10 ng ずつを 96 well plate にコートする。その後、CPD 特異抗体 (TDM-2) を用いた酵素標識免疫法 (ELISA) により DNA 中の CPD を吸光度測定した後、損傷量既知サンプルの検量線を用いて定量化した。照射直後の CPD 量を 100 とした時の修復時間と CPD 量変化の関係を求め、細胞間で比較することにより、CPD の修復に差があるか調べた。

(4) *Xpa* マウスにおける各臓器別サイクロプリンの定量

様々な月齢 (1~29) の *Xpa* マウスの脳、肝臓、腎臓、精巣から DNA を抽出し、抗 Cyclo-dA 抗体を用いた ELISA 法で Cyclo-dA を定量した。

4. 研究成果

(1) CPD 特異的エンドヌクレアーゼによる紫外線抵抗性の獲得

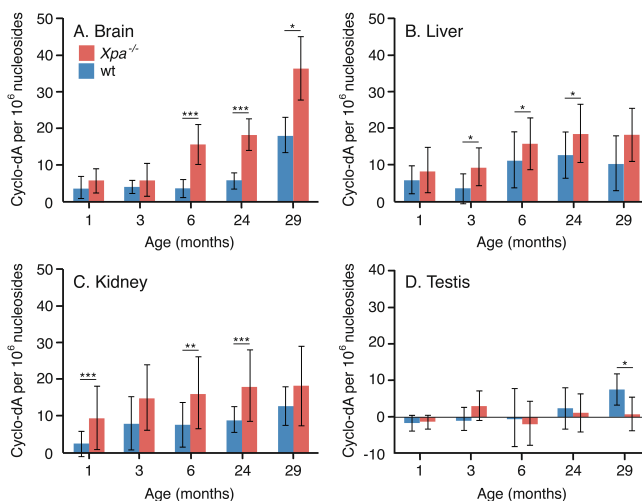
(2) CPD 特異的エンドヌクレアーゼによる CPD 修復亢進

(3) *Xpa* マウスにおける cyclo-dA の蓄積

様々な月齢の (1, 3, 6, 24, 29) の *Xpa* マウス及び野生型マウスについて、脳、肝臓、腎臓、精巣の4つの組織から DNA を抽出し、抗 Cyclo-dA 抗体を用いた ELISA にて、各組織における Cyclo-dA を定量した。その結果が右図である。

精巣のみ両者で差が見られなかったものの、他の3つの臓器では *Xpa* マウスが有意に多く、中でも脳における蓄積が顕著で、生後日数に依存して増大した。

この結果は、XP-A 患者における進行性の神経症状が、神経細胞内に蓄積するサイクロプリンが原因であることを強く示唆するものである。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

(1) Mori, T., Nakane, H., Iwamoto, T., Krokidis, M. G., Chatgililoglu, C., Tanaka, K., Kaidoh, T., Hasegawa, M., and Sugiura, S. (2019) High levels of oxidatively generated DNA damage 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine accumulate in the brain tissues of xeroderma pigmentosum group A gene-knockout mice. *DNA repair*, in press 査読有、DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.04.004

(2) Nukuzuma, S., Nukuzuma, C., Kameoka, M., Sugiura, S., Nakamichi, K., Tasaki, T., and Takegami, T. (2018) Establishment of COS-JC cells persistently producing archetype JC polyomavirus. *Microbiol Immunol.*, 62(8) 524-530 査読有、DOI: 10.1111/1348-0421.12632

(3) Ikehata, H., Mori, T., Douki, T., Cadet, J., and Yamamoto, M. (2018) Quantitative analysis of UV photolesions suggests that cyclobutane pyrimidine dimers produced in mouse skin by UVB are more mutagenic than those produced by UVC. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 17(4) 404-413. 査読有、DOI:10.1039/c7pp00348j

(4) Nukuzuma, S., Nukuzuma, C., Kameoka, M., Sugiura, S., Nakamichi, K., Tasaki, T., and Takegami, T. (2017) CPT11 prevents virus replication in JCI cells persistently infected with JC polyomavirus. *Microbiol Immunol.*, 61(6) 232-238 査読有、DOI: 10.1111/1348-0421.12486

(5) Ishikawa-Fujiwara, T., Shiraishi, E., Fujikawa, Y., Mori, T., Tsujimura, T., and Todo, T. (2017) Targeted inactivation of DNA photolyase genes in Medaka fish (*Oryzias latipes*). *Photochem. Photobiol.*, 93(1) 315-322. 査読有、DOI:10.1111/php.12658

(6) Fujiwara, M., Okamoto, M., Hori, M., Suga, H., Jikihara, H., Sugihara, Y., Shimamoto, F., Mori, T., Nakaoji, K., Hamada, K., Ota, T., Wiedemuth, R., Temme, A. and Tatsuka, M. (2016) Radiation-induced RhoGDI β cleavage leads to perturbation of cell polarity: A possible link to cancer spreading. *J Cell Physiol.*, 231(11) 2493-2505. 査読有、DOI:10.1002/jcp.25362

(7) Nukuzuma, S., Nakamichi, K., Kameoka, M., Sugiura, S., Nukuzuma, C., Tasaki, T., Takegami, T. (2016) Suppressive effect of topoisomerase Inhibitors on JC polyomavirus propagation in human neuroblastoma cells *Microbiol Immunol* 60(4) 253-260 査読有、DOI: 10.1111/1348-0421.12372

[学会発表](計10件)

(1) 池畑広伸、森 俊雄、山本雅之:作用スペクトル解析によるマウス皮膚における紫外線 DNA 損傷量と誘発突然変異頻度の定量関係の解明、日本放射線影響学会第61回大会、2018年11月8日、長崎

(2) Nukuzuma, S., Nukuzuma, C., Kameoka, M., Sugiura, S., Nakamichi, K., Tasaki, T., Hidaka, K., Takegami, T. Establishment of COS-JC cells persistently producing archetype JC

polyomavirus The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, October 28-30, 2018, Kyoto

(3) 池畑広伸、森 俊雄、亀井保博、山本雅之：マウス皮膚における紫外線 DNA 損傷量と誘発突然変異頻度の定量的関係の作用スペクトル解析、第 40 回日本光医学・光生物学会、2018 年 7 月 20 日、仙台

(4) Nukuzuma, S., Nukuzuma, C., Kameoka, M., Sugiura, S., Nakamichi, K., Tasaki, T., Takegami, T. CPT11 prevents virus replication in JCI cells persistently infected with JC polyomavirus. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, October 24-26, 2017, Osaka

(5) 池畑広伸、森 俊雄、山本雅之：マウス皮膚における紫外線 DNA 損傷量と誘発突然変異頻度の定量的関係の解析、日本放射線影響学会第 60 回大会、2017 年 10 月 27 日、千葉

(6) 池畑広伸、森 俊雄、山本雅之：マウス皮膚に対する広帯域および狭帯域 UVB のゲノム毒性の比較、第 39 回日本光医学・光生物学会、2017 年 7 月 21 日、名古屋

(7) 森 俊雄：紫外線誘発 DNA 損傷に対するモノクローナル抗体、ワークショップ「UV 損傷モノクローナル抗体 25 年：紫外線生物影響研究の今昔」、日本放射線影響学会第 59 回大会、2016 年 10 月 27 日、広島

(8) Nukuzuma, S., Nakamichi, K., Kameoka, M., Sugiura, S., Nukuzuma, C., Tasaki, T., Takegami, T. **Suppressive effect of topoisomerase inhibitors on JC polyomavirus propagation in human neuroblastoma cells** The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, October 23-25, 2016, Sapporo

(9) 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、平成 28 年（2016）7 月 22-23 日、京都

(10) 奴久妻聡一、中道一生、亀岡正典、杉浦重樹、奴久妻智代子、田崎隆史、竹上勉 トポイソメラーゼ I 阻害剤の JC ウイルス増殖抑制効果について 第 30 回近畿エイズ研究会、神戸 平成 28 年 6 月 4 日

〔図書〕(計 1 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.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：DNA 鎖上のアデノシン型サイクロブリンに特異的に結合対するモノクローナル抗体

発明者：森 俊雄、杉浦 重樹、高木 由美

権利者：奈良県立医科大学、メイベル (株)

種類：特許

番号：特願 2018-028157

出願年：平成 30 年 2 月 20 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 1 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森 俊雄

ローマ字氏名：MORI, Toshio

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：医学部

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：10115280

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。