

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03065

研究課題名(和文) 核酸分解酵素(DNase)における疾患への病態遺伝および生理学的関与の解明

研究課題名(英文) Pathological and physiological involvement of DNase with certain diseases

研究代表者

竹下 治男 (TAKESHITA, HARUO)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：90292599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNase I 遺伝子内にmissenseやnonsense変異を引き起こすSNP、indel変異のような遺伝的変異が活性レベルに影響を与えるfunctional variantであるか調査・解析した。酵素活性消失がみられた18 SNPsのほとんどがin silico解析によつdamaging/deleteriousと判定され、高い予測精度が確認されたこれらのDNase Iの酵素活性消失・低下を引き起こす変異の解析結果は、自己免疫疾患等の遺伝的危険因子を検討する上で有益であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでDNA多型(SNPs等)の違いに基づき、疾患素因や中毒代謝に関わる様々な遺伝的多型に関する研究を推進してきた。昨今の犯罪の悪質・巧妙化に伴って、法医学鑑識科学分野において、被疑者や被害者などを特定する上で個人識別精度の向上が益々要請されている。近年の分子生物学領域の進歩に立脚したDNA多型の発見・法医学実務への導入によって個人識別精度の飛躍的向上がもたらされている。本研究により上記観点において、学術的意義や社会的意義を向上させた。

研究成果の概要(英文)： Considering the positions in the DNase I protein corresponding to the various nonsense SNPs, all of the other nonsense SNPs and frameshift variants registered in the Ensembl database (<https://asia.ensembl.org>) appear likely to exert a pathogenetic effect through loss of the activity. Accordingly, a total of 60 genetic variants in the DNase 1 gene (DNASE1) inducing abolishment or marked reduction of the DNase I activity could be identified as genetic risk factors for autoimmunity, irrespective of how sparsely they were distributed in the population. It was noteworthy that SNP p.Gln244Arg, reportedly associated with autoimmunity and reducing the activity to about half of that of the wild type, and SNP p.Arg107Gly, abolishing the activity completely, were distributed worldwide and in African populations at the polymorphic level, respectively.

研究分野：法医学

キーワード：核酸分解酵素 DNase 遺伝的多型 疾患素因 病態遺伝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでの研究から、核酸分解酵素 DNase I の遺伝的多型がある種のがんや心筋梗塞等の疾患の新規な疾患感受遺伝子であること、あるいは核酸分解酵素 DNase II の遺伝的多型が自己免疫疾患やリウマチ等の疾患と相関をもつことなどを明らかにしてきた。本研究は応募者らの研究成果を基盤として、それら疾患の発症や診断に係る DNase I および DNase II を含めた核酸分解酵素 DNase family の病態遺伝および生理学的関与について多型性をベースとして解明することによって、DNase を疾患の危険因子や診断マーカーとして確証することを研究目的としている。本研究は、あらたな個人識別マーカーとしての DNase に基づいた法医学的研究成果を臨床医学へ波及することを目論んでいる。

### 2. 研究の目的

目的 1: DNase family の活性低下と自己免疫疾患との関連が示唆されてきたが活性低下に係る遺伝子レベルの解析はなされておらず、活性低下を惹起する functional SNPs database の構築およびアレル機能相関によって、疾患感受性遺伝子としての DNase family 遺伝的多型に関する病態遺伝学的基盤を確立する。

目的 2: DNase II が疾患感受性遺伝子として炎症性疾患に関与しているという知見を得ている。同様に炎症反応を背景とする動脈硬化等の慢性疾患に関しても DNase II が関与している可能性が考えられ、このような慢性疾患を有する患者試料を用いての DNase II の構造・機能本態を解明する。

目的 3: 疾患との相関が認められる DNase I および II 遺伝子産物酵素と野生型である遺伝子産物酵素について、1) DNase I および II の各型のアポトーシスに及ぼす効果の差異の解明、2) 遺伝子改変細胞を用いた DNase I および II の発癌への影響の各型の差異の解明によって、疾患危険因子としての DNase I および II を病態生理学的に解明していく。

### 3. 研究の方法

#### 【目的 1】

- 1) 様々な民族および集団から DNA を継続的に採取する。
- 2) RCP-RFLP 法、site-directed mutagenesis 法、single radial enzyme diffusion(SRED)法等によって、DNase I 遺伝子内に分布する全非同義置換型 SNP 約 100 座位について解析する。
- 3) DNase II 型および 2 型に相当する cDNA を導入した哺乳類細胞発現ベクターを作成し、各種細胞などで発現させる。発現した DNase I はタンパク質精製装置を用いてそれぞれ精製する。
- 4) 精製した DNase II 型および 2 型酵素について、DNase II 型と 2 型の生化学的相違（比活性、安定性、蛋白分解酵素・阻害物質抵抗性など）を解明する。
- 5) 前項で精製した DNase II 型及び 2 型を抗原として、モノクローナル抗体を作製する。

#### 【目的 2】

- 1) 本学で実施される法医解剖・検案のご遺体から血液を採取する。その際、死因、死後経過時間、年齢、性別、既往歴の有無等の情報を得る。なお、本研究開始以前に本学倫理委員会の許可を得る予定である。
- 2) 本学附属病院内科に依頼し、慢性関節リウマチ、動脈硬化、心肥大患者の血液試料を提供していただく。その際、患者の臨床背景等の情報を得る。なお、本研究開始以前に本学倫理委員会の許可を得る予定である。
- 3) 得られた血液試料について、DNA を抽出し、PCR-RFLP 法により DNase II SNP 型を判定する。死因および慢性関節リウマチ、動脈硬化、心肥大等の既往と DNase II SNP 型の相関を随時検討する。
- 4) 1 型および 2 型 DNase I 哺乳類細胞発現ベクターを Cos-7 や HepG2 細胞など培養細胞に遺伝子導入し、それぞれの安定発現細胞株を樹立する。
- 5) 4 項で構築した安定細胞株を使用し、様々なアポトーシス誘導剤によって処理した後のアポトーシスの発生頻度の測定や発生形態を観察する。
- 6) ミトコンドリアの膜電位の変化や AnnexinV で細胞膜の変化などを蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡で観察する。さらに、activated caspase の活性測定キットを用いて、それらの活性を測定する。
- 7) 得られた血液等の体液試料について、SRED 法を用いて血清 DNase II 活性を定量する。死因および慢性関節リウマチ、動脈硬化、心肥大等の既往と血清 DNase II 活性の相関を随時検討する。
- 8) 死後経過時間等の影響を調べるため、異なる温度や添加剤の添加などの様々な条件下に放置した血液試料中の DNase II 活性変動を精査する。この結果に基づき、血清 DNase II 活性定量に供する法医学的試料の保存方法・採取法等を確立する。

- 9) 得られた血液試料および DNA について、慢性関節リウマチ、動脈硬化、心肥大を有するサンプルに関して、年齢、性、素因や既往の有無等に分類し、それぞれの DNase II 型および血清 DNase II 酵素活性との間の相関を統計学的に解析する。
- 10) 野生型のヒト DNase II cDNA を鋳型として Site-directed mutagenesis 法により変異型発現ベクターを作成する。
- 11) 変異型発現ベクター(野生型および変異型)を COS-7、HepG2 細胞などの細胞に遺伝子導入後、培養上清に分泌された変異型 DNase II を回収する。
- 12) 変異型酵素の精製方法について検討する。DNase II における生化学的性状および機能解析、変異型発現ベクターの作成、遺伝子導入による変異型 DNase II の発現、変異型 DNase II の精製方法の確立、精製後の野生型・変異型 DNase II 酵素活性の解析、生型・変異型 DNase II の生化学的性状の精査および機能解析等を行う。

#### 【目的 3】

- 1) 1 型 DNase I を発現している膵臓がん由来 QGP-1 細胞を用い、CRISPR によるゲノム編集作業を行い、2 型 DNase I 遺伝子に置換したノックイン細胞を樹立作製する。
- 2) DNase I 1 型及び 2 型に GFP 蛋白を連結したキメラ変異体を作製し、培養細胞などに導入、共焦点レーザー顕微鏡を用いてそれらの細胞内局在、及びアポトーシスやストレス化における DNase I の局在変動を調査する。
- 3) DNase I 1 型および 2 型に対するモノクローナル抗体がアポトーシスを阻止するかどうかを決定する。
- 4) アポトーシス誘導前後における DNase I 遺伝子発現の変動を DNase I 産生細胞の QGP-1 細胞を用いて real-time PCR 法によって解析する。アポトーシス誘導後におけるマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析によって、遺伝子発現への多型性の影響を調査する。
- 5) 1 項で作製した DNase I 1 型および 2 型 QGP-1 細胞の増殖性等を比較し、両酵素の細胞増殖性への影響の差異を調べる。
- 6) 1 項で作製した DNase I 1 型および 2 型 QGP-1 細胞をヌードマウス等に接種し、それぞれの細胞の浸潤性や増殖性を病理組織学的に精査する。
- 7) DNase 1L1、1L2、1L3 及び II 遺伝子に非同義置換型 SNP について、functional SNPs を検索同定する
- 8) 以上によって、DNase family における functional SNPs database が構築されるので、その成果をホームページ等で公表する。

#### 4. 研究成果

- 1) 18 missense SNPs、7 nonsense SNPs、9 indel 変異において酵素活性の消失が認められた。
- 2) 全ての集団において p.Gln244Arg のみに多型が認められ、p.Arg2ser、p.Tyr117Ser、p.Gly127Arg はアフリカ人とコーカシア人へのみに多型が認められた。
- 3) 酵素活性消失がみられた 18 SNPs のほとんどが in silico 解析によって damaging/deleterious と判定され、高い予測精度が確認された。
- 4) 日本人及びドイツ人のどちら集団にも 2 diploid copy number のみが認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Junko Fujihara 1, Yoshikazu Takinami 2, Misuzu Ueki 3, Kaori Kimura-Kataoka 4, Toshihiro Yasuda 5, Haruo Takeshita 4	4. 巻 497
2. 論文標題 Circulating Cell-Free DNA Fragment Analysis by Microchip Electrophoresis and Its Relationship With DNase I in Cardiac Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta	6. 最初と最後の頁 61-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2019.07.014	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 -
1. 著者名 Misuzu Ueki 1, Junko Fujihara 2, Kaori Kimura-Kataoka 2, Kazuo Yamada 2, Yoshikazu Takinami 3, Haruo Takeshita 2, Reiko Iida 4, Toshihiro Yasuda 1	4. 巻 14
2. 論文標題 Low Genetic Heterogeneity of Copy Number Variations (CNVs) in the Genes Encoding the Human Deoxyribonucleases 1-like 3 and II Potentially Relevant to Autoimmunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 214579-214588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0215479	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 -
1. 著者名 Junko Fujihara 1, Toshihiro Yasuda 2, Kaori Kimura-Kataoka 3, Haruo Takeshita 3	4. 巻 36
2. 論文標題 Association of SNPs in Transferrin and Transferrin Receptor Genes With Blood Iron Levels in Human	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Legal Med	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2018.09.022	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 -
1. 著者名 Misuzu Ueki 1, Kaori Kimura-Kataoka 2, Junko Fujihara 2, Reiko Iida 3, Yasuyuki Kawai 4, Akari Kusaka 2, Takamitsu Sasaki 2, Haruo Takeshita 5, Toshihiro Yasuda 1	4. 巻 9
2. 論文標題 Evaluation of the Functional Effects of Genetic Variants;missense and Nonsense SNPs, Indels and Copy Number Variations;in the Gene Encoding Human Deoxyribonuclease I Potentially Implicated in Autoimmunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1360-1365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49935-y	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 -

1. 著者名 Junko Fujihara 1, Naoki Nishimoto 2, Toshihiro Yasuda 3, Haruo Takeshita 1	4. 巻 64
2. 論文標題 Discrimination Between Infant and Adult Bloodstains Using Micro-Raman Spectroscopy: A Preliminary Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Forensic Sci	6. 最初と最後の頁 698-701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1556-4029.13904	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 -

1. 著者名 Fujihara J1, Nishimoto N2, Yasuda T3, Takeshita H1.	4. 巻 30
2. 論文標題 Discrimination Between Infant and Adult Bloodstains Using Micro-Raman Spectroscopy: A Preliminary Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Forensic Sci.	6. 最初と最後の頁 28-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1556-4029.13904	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 -

1. 著者名 Fujihara J1, Yasuda T2, Kimura-Kataoka K3, Takinami Y4, Nagao M5, Takeshita H3.	4. 巻 30
2. 論文標題 Association of SNPs in genes encoding zinc transporters on blood zinc levels in humans.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leg Med (Tokyo).	6. 最初と最後の頁 28033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2017.10.009	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

島根大学医学部法医学  
[https://www.med.shimane-u.ac.jp/legal\\_med/Legal%20Med%20index.html](https://www.med.shimane-u.ac.jp/legal_med/Legal%20Med%20index.html)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------