

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19500270
研究課題名 (和文) DNA 修復蛋白 XPA の新しい機能と神経症状発症機構の究明
研究課題名 (英文) Elucidation for the unidentified role and the neurological etiology in XPA
研究代表者 竹内 聖二 (TAKEUCHI SEIJI) 神戸大学・医学部附属病院・専攻医(医員) 研究者番号：10304065

研究成果の概要：本研究では A 群 XP(XPA)に着目し、子宮内エレクトロポレーション法を用いて、XPA ノックダウン神経細胞を可視化し、表現型の解析を行った。XPA ノックダウン神経細胞移動を停止し、分化マーカーである MAP2 が陰性にて、分裂細胞のマーカーである Ki-67 と M 期のマーカーであるリン酸化ヒストン H3 の両方が陽性であることを見いだした。一方、XPA ノックアウトマウスの胎生期大脳皮質において皮質板形成の異常を認めている。これらより、XPA は DNA 修復のみならず神経細胞の移動、分裂、分化に関与していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学 神経科学

科研費の分科・細目：神経科学 神経科学一般

キーワード：DNA 修復 XPA 神経変性 RNA 干渉 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

色素性乾皮症 (Xeroderma Pigmentosum; XP) は様々な精神神経症状、皮膚発癌を臨床的特徴とした常染色体劣性遺伝疾患である。XP は 8 つの相補性群 (A から G 群およびバリエーション群) からなり、すべての A から G 群の疾患原因遺伝

子産物は DNA 修復機構の 1 つであるヌクレオチド除去修復 (Nucleotide Excision Repair:NER) に関わる。皮膚癌の発症メカニズムは紫外線による DNA 損傷を修復できず、突然変異が蓄積し、発癌が促進されると考えられている。しかし、XP の神経症状発症に紫外線は明らかに影響せず、どのような損傷が

関わっているのか、それどころか DNA 修復の破綻が神経症状発症の主原因であるかどうかについても未だ一定の見解が得られていない。

NERには2つの経路が知られており、転写と共役した修復経路(Transcription-Coupled Repair:TCR)とゲノム全体の損傷に対する修復(Global Genome Repair:GGR)が生体内で機能している。XPの神経症状発症はTCRの異常と相関関係がある。XPの神経症状発症機構の解明に迫るべく、研究を行っている。

2. 研究の目的

(1)本研究は、日本のXP患者の大多数を占め、XPのなかでも最も重篤な神経症状を示すA群XP(XPA)に着目し、マウス大脳を用いて神経科学的な解析をすすめる。XPA患者は、発達遅延、学習障害、難聴、小頭症、運動失調など進行性の神経症状を示し、若年期に死亡する例が多く、神経変性疾患様の病理組織像を示す。XPA蛋白はNER機構に必須の因子であり、XPA患者の細胞はGGRとTCRの両方の経路が欠損している。

(2)近年、XPAは紫外線損傷が誘発する細胞周期チェックポイントにも関わっているデータも報告されており、DNA修復以外の生命機能にも関わっていることが予想される。個体レベルでXPAの神経細胞における機能を解析するために、子宮内エレクトロポレーション法を用いて、マウスXPA遺伝子をターゲットとしたshRNAiベクターをEGFP遺伝子とともに導入することによりXPAノックダウン神経細胞を可視化し、表現型の解析を行った。また、XPAノックアウトマウスの胎生期および5ヶ月齢の終脳における組織学的検討を行った。

3. 研究の方法

(1) XPA ノックダウン神経細胞の大脳皮質法線方向における移動の解析

子宮内でマウス胎生期14日目の胎児大脳の側脳室にXpaをターゲットとしたshRNAiベクターをEGFP遺伝子とともに導入し、3日後の胎生期17日目において大脳の組織切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) XPA ノックダウン神経細胞の細胞周期および分化に関する解析

脳室周囲で分裂している神経前駆細胞は、細胞周期から脱し、中間帯を経て、皮質板へと移動しながら神経細胞へと分化する。XPAが神経前駆細胞の分裂、分化に関与しているかどうか調べるため、分裂細胞のマーカであるKi-67とM期のマーカであるリン酸化ヒストンH3に対する抗体を用いて、免疫組織染色を行った。胎生期14日目にRNAiベクターを導入して3日後の大脳組織切片において、KI-67陽性細胞とGFP陽性細胞を比較、検討した。

(3) XPA ノックアウトマウスの大脳における組織学的検討

XPAノックアウトマウスがXPA患者の神経症状発症モデルになるかどうか検討するため、5ヶ月齢およびE17における大脳皮質の組織学的解析を行った。

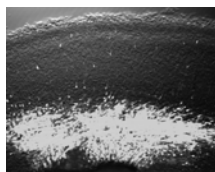
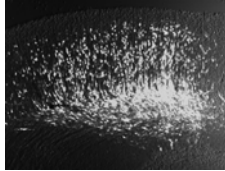
4. 研究成果

(1) XPA ノックダウン神経細胞の大脳皮質法線方向における移動の解析

コントロールでは、多数のGFP陽性細胞が皮質板(Cortical Plate:CP)に到達してい

CP

るのに対し、XPA をノックダウンしたものでは、ほとんどの GFP 陽性細胞が皮質板の脳室側、特に中間帯 (Intermediate Zone: IZ) に蓄積しているのが認められた。

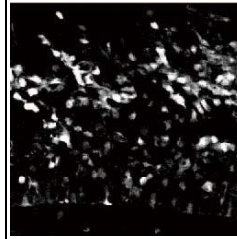


コントロール
Xpa ノックダウン

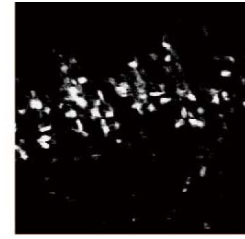
図 1. XPA ノックダウン神経細胞は IZ で 細胞移動を停止する

(2) XPA ノックダウン神経細胞の細胞周期および分化に関する解析

IZ に停止している XPA ノックダウン細胞のほとんどすべてが Ki-67 陽性であることが認められ、しかも、これらの細胞のほとんどすべてがリン酸化ヒストン H3 陽性であることを見いだした。これらの結果は、XPA ノックダウン細胞は、IZ に行く過程で後分裂細胞になっていないことを示す。さらに BrdU で細胞をラベルした後の XPA ノックダウン細胞は BrdU 陰性細胞数がコントロールと比較しても、違いがないことより、分裂頻度に違いがあるのではなく、後分裂細胞に移行する前に細胞周期が停止を起こしていることが示唆された。さらにノックダウン細胞の IZ での停止は皮質板での神経細胞分化に影響を与えるが、停止した細胞は MAP2 陰性であり、ノックダウンにより分化異常も引き起こすことが認められた。



Ki-67

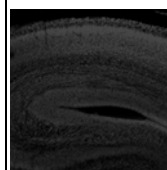


リン酸化ヒストン H3

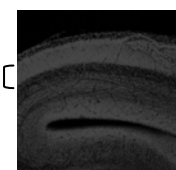
図 2. 中間帯で停止している XPA ノックダウン神経細胞は分裂期 (Ki-67) と M 期 (リン酸化ヒストン H3) のマーカーで陽性となる。

(3) XPA ノックアウトマウス的大脑における組織学的検討

5ヶ月齢 XPA ノックアウトマウス的大脑皮質はコントロール群に較べ、有意な異常は認められなかった。一方、E17 的大脑皮質において、発達段階である皮質板の厚さが XPA ノックアウトマウスにおいて薄く、皮質板下部の細胞数が少ない事が観察された。XPA ノックダウン細胞の解析結果と考え合わせると、これらの組織学的異常は神経前駆細胞の移動あるいは後分裂細胞への移行の異常に起因するものではないかと考えられた。



XPA (+/+) E17



XPA (-/-) E17

図 2. XPA ノックアウトマウス的大脑皮質は、野生型マウスに較べて薄く 皮質板下部の細胞密度が低いことが観察された

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)

[学会発表] (計 2件)

①竹内 聖二、 子宮内エレクトロポレーション法を用いた大脳皮質におけるA群色素性乾皮症(XPA)の機能解析、日本解剖学会シンポジウム、2007年3月、大阪

②竹内 聖二、謝 敏カク、八木 秀司、佐藤 真、子宮内エレクトロポレーション法を用いたXPAの機能解析、Neuro2007、2007年9月、横浜

[その他]

ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/dermat/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 聖二(TAKEUCHI SEIJI)
神戸大学・医学部附属病院・専攻医(医員)
研究者番号: 10304065

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし