

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20510051
 研究課題名（和文） 脊椎動物細胞におけるDNA蛋白クロスリンク損傷修復過程の解析とその生物影響評価
 研究課題名（英文） Characterization and biological assessment of DNA-Protein crosslink repair in vertebrate cells.
 研究代表者
 田野 恵三（TANO KEIZO）
 京都大学・原子炉実験所・准教授
 研究者番号：00183468

研究成果の概要（和文）：細胞レベルでのDNA蛋白クロスリンク（DPC）修復を明らかにする目的で、ニワトリ DT40 細胞を用いて、修復経路に関わる遺伝子群の逆遺伝学的に解析を行った。そのDPCの発生に深く関わると考えられている細胞内での活性酸素種の除去に関わる遺伝子の破壊を行い、細胞内での活性酸素除去機構の解析を進めた。さらにマウスを用いて特異的にDPCを導入できる薬剤（HMTA）の臨床応用へ、とくに癌組織への集中的デリバリーの可能性を示唆する基礎データを集積した。これらの結果は全て研究期間内に投稿発表を行った。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the process of DNA-Protein Crosslink (DPC) repair, we employed reverse genetic approach using chicken DT40 cells. It has been suggested that endogenous reactive oxygen species (ROS) is involved in formation of DPC. We generated several ROS scavenge enzyme genes knock out cells to elucidate mechanism of antioxidant defense system. In addition, we try to look for the therapeutic potential of DPC producing chemical, HMTA, in mouse level. All the results so far, already published in peer reviewed journals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線化学物質影響学

キーワード：修復、生物影響

1. 研究開始当初の背景

近年注目を集めているDNA損傷の一つに、DNA蛋白クロスリンク（DPCs）がある。DPCsは放射線や白金化合物、アルデヒド化合物によって生じ、アルデヒド化合物のホルムアルデヒドは、タバコや自動車排ガス等に含有される環境汚染物質である。国際癌研究機構（IARC）がホルムアルデヒドを環境発癌物質 Group1 に再評価しただけでなく、ホル

ムアルデヒドの主要なDNA損傷がDPCsであり、その生成量と発癌頻度に相関関係があることも知られている。

一方、ホルムアルデヒドは通常の代謝においても生産され、その細胞内濃度は13～97fMと言う。つまり、ホルムアルデヒドによるDPCsは自然発癌の原因損傷にもなり得ると考えられるが、ホルムアルデヒド等によるDPCsが遺伝子へ与える影響の重要性が

認識されていることに反し、細胞内におけるこれら DPCs に対する損傷応答や修復系についてはほとんど知られていない。

ここ数年の DPCs 損傷修復機構の解析は、合成オリゴを基質とする試験管内解析に重点を置いているが、脊椎動物細胞レベルでの解析はほとんど行われて来なかった。代表者らはトリ B リンパ細胞由来 DT40 から現在利用可能な DNA 損傷変異株を多種利用し、そのほぼ全数を対象に動物細胞におけるフォルムアルデヒドの遺伝子損傷応答を解析した。その結果、DPCs 損傷修復は除去修復系のみならず、複製後修復、特に FANCD2/BRCA 依存的な相同組み換えによる複合した系で修復されることを示した (Cancer Res., 2007, 23, 11117-11122)。

フォルムアルデヒドが生理状態でも生産され、それが DPCs を誘導することを考えると、この DPCs がヒトにおいて FANCD2/BRCA 欠損に見られる発癌や骨髄不全、発生異常の原因になっている可能性を暗示させる。

2. 研究の目的

(1) フォルムアルデヒド誘発 DPCs の除去修復系と FANCD2/BRCA 系の細胞レベルの動的解析

DPCs の修復には、少なくとも初期には除去修復 (塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復) が行われ、後期には FANCD2/BRCA 依存的な相同組み換え修復が関わることを、脊椎動物細胞で明らかにした (Cancer Res., 2007, 23, 11117-11122)。この二つの経路が相補的に働くことで、損傷の除去と複製鎖の維持が保たれ、致死的な二重鎖切断 (DSB) から守られていると考えられるため、さらにこれら一連の細胞内挙動を解析する。

また、FANCD2/BRCA 経路の主要因子である FANCD2 破壊細胞が、フォルムアルデヒドによる DPCs と DNA-DNA クロスリンク修復の双方に対して高感受性を示すことから、FANCD2 によるユビキチン化経路が、DPCs 修復にも強く関与していることが示唆される。これについて、FANCD2 の細胞内挙動とユビキチン化の関係を DNA クロスリンク修復との比較から明らかにする。さらに姉妹染色分体交換頻度の測定から組み換え修復の評価を行い、FANCD2/BRCA 依存的な相同組み換えの DPCs 修復への寄与を細胞レベルで明らかにする。

(2) DPCs 修復が複製鎖維持に果たす役割の解析

DPCs は初期の除去修復で完全に修復されずとも、最終的には FANCD2/BRCA 依存的な相同組み換え修復や損傷乗り越え修復 (TLS) と言った複製後修復機構 (PRR) により、複製フォークが維持され、複製鎖が正常に伸長することで致死作用から逃れると考えられる。このことは、代表者らが確認した複数の複製後修復遺伝子の破壊細胞がフォルムアルデ

ヒドに対して高い感受性を示すこととも符合している。この複製鎖の動態を解析するため、DNA Combing 法 (Mol. Cancer Res., 2010, 8, 204-15) を用い、種々の遺伝子破壊細胞について複製鎖の進行速度を比較する。

また、実際の DSB 等の損傷定量をコメントアッセイと H2AX、53BP1 染色で評価し、DPCs とそれから派生する DSB がフォーク進行に与える効果を評価する。さらに、損傷乗り越え修復の REV3、RAD18 破壊株でもフォルムアルデヒドに対して感受性を示したことから、同様の手法で DPCs 修復における TLS の寄与を解析する。未だその寄与が明らかでなかったミスマッチ修復や RecQ ヘリカーゼ群についても解析を行い、DPCs 修復の全容解明の一助を目指す。

(3) in vivo FANCD2/BRCA 欠損移植腫瘍系を用いたアルデヒド化合物の生物影響評価

前述のように生存率解析の結果から、フォルムアルデヒド誘発 DPCs の修復には FANCD2/BRCA 経路が重要であることを示した。これは、遺伝的背景の相違によりフォルムアルデヒドの発癌性が異なることを示唆している。特に BRCA 依存的な乳癌の増加が危惧される時、外因的かつ内因的なフォルムアルデヒドがこの寄与を評価することは重要である。より個体に近いレベルでこの解析を行うため、アイソジェニックな FANCD2/BRCA 欠損細胞をヌードマウスに移植し、移植腫瘍に対するフォルムアルデヒドの効果を細胞死と小核形成の両面から解析する。

(4) フォルムアルデヒド以外のアルデヒド化合物の環境発癌、自然発癌損傷としての評価

フォルムアルデヒド以外にも、同様な作用機序で DPCs を生じると考えられているアルデヒド化合物がある。特に生理作用で生じるアルデヒド化合物は自然発生的に DPCs を生じさせるため、これら化合物の生物影響を同様の方法で解析し、評価する。

3. 研究の方法

(1) 細胞レベルでの解析

① フォルムアルデヒド誘発損傷における相同組み換えと除去修復の役割 (田野、菓子野)

DPCs 修復に関与する相同組み換えでは、特に FANCD2、BRCA2、BRCA1 を破壊すると高感受性になる一方、除去修復ではヌクレオチド除去修復 (NER) の XPA が、塩基除去修復 (BER) の pol β 、FEN1 より強く関与している。以上の除去修復系と相同組み換え系路の遺伝学的相互作用を調べる。二重欠損株を作成し、感受性、染色分体交換、損傷関連蛋白の損傷部位への集積などを指標にして、両経路の機能連関を解析する。

② フォルムアルデヒド誘発損傷における Poly ADP ribose polymerase (PARP) の役

割 (田野)

塩基除去修復 (BER) 遺伝子 Pol β 及び FEN1 は、DPCs 修復には強い関与が見られなかったにも関わらず、単鎖切断 (SSB) のモニター蛋白 PARP ノックアウト細胞では、フォルムアルデヒドに対して強い感受性を示した。これは、PARP の複製鎖阻害に伴う DSB 防護作用によるものと考えられるため、PARP 遺伝子破壊細胞に PARP 機能変異 cDNA を導入した変異細胞を作成し、DPCs 修復への PARP の関与を調べる。

さらに、フォルムアルデヒド処理前と処理後において DNA 複製鎖の維持の挙動を Molecular Combing 法にて解析する。また、実際の DSB、SSB の解析には中性、アルカリコメットアッセイを行い、そのための指摘条件化を行う。

③フォルムアルデヒド誘発損傷における損傷乗り越え修復 (TLS) の役割 (田野、菓子野)

TLS 関係の遺伝子群のうち、Pol θ 以外の REV1、3 と RAD18 がフォルムアルデヒドに感受性を示した。一方、RAD18 に依存した PCNA のユビキチン化が Pol η の TLS に関わることが知られている。RAD18 と Pol η のユビキチン化による相互作用を調べるため、ユビキチン化と損傷感受性との関連を解析する。

④フォルムアルデヒド誘発損傷におけるミスマッチ修復の関与 (田野)

塩基損傷、ヌクレオチド損傷認識の系として知られるミスマッチ修復 (MMR) の生体内の基質については論議があるが、DPCs が大きな DNA adducts であることを考えると MMR 蛋白の認識の可能性が考えられる。MMR、特に DNA 損傷認識に関わる MutS α 、 β の破壊株を作成し、DPCs への関与を解析する。MutS α 、 β のサブユニット MSH2、3 及び 6 の単独破壊株は作成済みである。MMR の試験管内アッセイについては、米国ネブラスカ大学別所忠昌博士と共同研究を行う。

⑤フォルムアルデヒド誘発損傷における RecQ ヘリカーゼ遺伝子の関与 (田野、菓子野)

RecQ ファミリーの BLM と WRN の関与について調べる (単独ノックアウトは所有している)。最近、4NQO による損傷は 4NQO 代謝物を介したトポイソメラーゼと DNA との解離不全であるとする報告が出ている。これも一種の DPCs であり、BLM のフォルムアルデヒド誘発 DPCs 修復への関与も考えられる。単独破壊株の感受性を調べると共に、除去修復系との二重破壊株を作成し、これらヘリカーゼ群の除去修復 (NER、BER) への相互作用を調査する。

⑥DPCs 形成に及ぼす細胞内抗酸化機能の解析 (田野、菓子野)

タンパクの酸化損傷の DPCs への寄与をモデルとして扱う。既に活性酸素種 (ROS) のスーパーオキシド (SOX) を触媒する酵素ス

ーパーオキシドデヒドロゲナーゼ (SOD) の条件欠損細胞を作製した。この細胞を用いて生理的に生じる SOX が DPCs 形成に関与するかどうかを解析する。

一方、損傷タンパク質のクリーニング機構としてプロテオソームによる分解、小胞体によるタンパク質の恒常性維持とオートファジーによる分解が知られている。関連遺伝子である parkin、siha あるいは atg 遺伝子の欠損細胞を得ている。これらの細胞を用い、これら遺伝子産物による損傷タンパクのクリーニングが DPCs の形成を阻止するのに関与しているかどうかを検証する。

DNA 損傷とタンパク損傷の両面から DPCs 形成と修復機構のスキームを描く。

(2) 移植腫瘍系を用いた解析

①FANCC 移植腫瘍系を用いたフォルムアルデヒドの細胞致死効果と小核形成の解析 (増永)

FANCC、FANCG 造腫瘍されたヌードマウスを用い、フォルムアルデヒド生物効果を致死効果と小核形成頻度の両面から解析する。

②BRCA 系移植腫瘍系を用いたフォルムアルデヒドの細胞致死効果と小核形成の解析 (増永、田野)

BRCA1 あるいは BRCA2 造腫瘍されたヌードマウスを用い、フォルムアルデヒド生物効果を致死効果と小核形成頻度の両面から解析する。

③生体内に存在するアルデヒドグループによる DPCs 損傷とその修復系 (田野、増永)

フォルムアルデヒド以外にも、生体内において DPCs を生じると考えられるアルデヒド化合物には、acetaldehyde、methylglyoxal、glyoxyal、acrolein、crotonaldehyde 等があり、一部は産業廃棄物に含まれる環境汚染物質である。これらアルデヒド化合物がフォルムアルデヒド同様に DPCs を生じ、また同様な修復経路で修復されているか否かについて、細胞パネル及び移植造腫瘍系を用いて解析し、アルデヒド化合物による総合的な生体影響を評価する。

④抗腫瘍剤としてみた DPCs 産生薬剤の評価 (田野、増永)

DPCs 産生薬剤である HMTA は既に抗炎症剤として使用されているばかりでなく、酸性下においてフォルムアルデヒド 6 分子となる。これを利用すればハイポキシア状態の癌組織への有効なドラッグデリバリー系となりうる。さらに HMTA のハイポキシアでの増感作用、あるいは細胞殺傷作用の機構を細胞レベルで解析するために可変型低酸素培養装置を用いて検証する。BRCA や FANCC の欠損細胞を用いて HMTA の致死効果と外酸素圧の影響を解析する。また低酸素下での、これら遺伝子の細胞内の挙動についても解析を行う。

⑤FANC/BRCA 移植腫瘍系を用いた HMTA の評価

HMTA の作用機序とフォルムアルデヒドに対する FANC、BRCA 由来細胞の感受性を考えると、これら腫瘍への選択的な抗がん作用への期待ができる。これら2種の腫瘍由来細胞による移植腫瘍系を用いて、HMTA の評価を行う。

4. 研究成果

(1)細胞レベルでの成果

①DPCs 修復における除去修復系と相同組み換え系路の遺伝学的相互作用について、除去修復及び相同組み替え修復二重欠損株を作成し、主に感受性をもとに解析を行った結果、除去修復系よりは相同組み替え修復に依存している可能性が示唆された。

②ミスマッチ修復の種々のサブユニット遺伝子をノックアウトした細胞を構築した。これらのミスマッチ修復遺伝子サブユニットの損傷認識は、強い損傷認識特異性があることが生細胞のレベルで明らかになった。

③DPCs 修復が、複製を伴う相同組み替えに依存していることから、DPC 修復過程での複製鎖の挙動を解析することを試みた。Molecular Combing 法を用いて解析する系の改善を行った。基礎実験として、ロングパッチ修復欠損の FEN1 遺伝子破壊株を用いて酸化損傷後の複製鎖維持について解析を行い、FEN1 の複製鎖維持に関わる役割を可視化することができた。

④DPSs 修復過程での複製鎖の挙動を解析するために、Molecular Combing 法の改善を行った。この解析系は損傷修復過程、特に修復後の複製を視覚化出来る。FEN1 ノックアウト細胞を用いて行い解析を行った。以上の結果は既に投稿、掲載された。

⑤活性酸素種 (ROS) は、DPCs (DNA 蛋白クロスリンク) を内在的に生み出す因子と考えられる。外的要因に関係なく、内在性 ROS (分子状酸素) を消去できる遺伝子のコンデショナルノックアウト細胞を作成した。これらのうち、SOD1 ノックアウト細胞は、SOD1 枯渇状態で細胞死が誘導された。また DPCs が原因の一つである娘染色体交差の上昇が認められた。

しかしながら、細胞質局在性が異なる SOD2 ノックアウト細胞では、SOD2 枯渇下でも細胞死が見いだされず、娘染色体交差の上昇も無かった。以上のことから、内在的な ROS による DPCs の原因になり得ることが推測された。さらに ROS の細胞内での局在性により、染色体 DNA に損傷を与える場合と与えない場合が明確に区別出来ることが明らかになった。以上の結果は既に投稿、掲載された。

(2) 移植腫瘍系を用いた解析による成果

①DPCs を生み出すフォルムアルデヒド系薬剤である HMTA の抗がん作用、他の抗がん剤への増感作用について移植腫瘍系を用いて解析し、有効性を明らかにした。HMTA は、既に抗炎症剤として使用されており安全性には問題がない。BRCA 或いは FANC ノックアウト細胞が、フォルムアルデヒドに対して感受性を示すことを明らかにしているため、これら由来の腫瘍細胞への選択的な有効性が示唆される。

④DPCs を生み出すフォルムアルデヒドは野生株では感受性が低く、修復欠損株では感受性が高い。このことは、フォルムアルデヒドあるいはその類似化合物を制ガン剤として利用できる可能性を示唆する。そのような化合物の中で、HMTA を見出し、腫瘍移植マウス系を用いて HMTA の制ガン剤あるいは増刊剤としての作用を確認した。また、その組織へのデリバリーシステムを開発する意味からリポソーム封入 HMTA を作成した。以上の結果は既に投稿、掲載された。

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)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Kashino G, Liu Y, Suzuki M, Masunaga S, Kinashi Y, Ono K, Tano K, Watanabe M, An alternative mechanism for radioprotection by dimethyl sulfoxide; possible facilitation of DNA double-strand break repair, *J. Radiat. Res.*, 査読有, **51**, 2010, 733-740.
- ② Inoue E, Tano K, Yoshii H, Nakamura J, Tada S, Watanabe M, Seki M, Enomoto T, SOD1 Is Essential for the Viability of DT40 Cells and Nuclear SOD1 Functions as a Guardian of Genomic DNA, *J. Nucleic Acids*, 査読有, **2010**, 2010, 795946(1-11).
- ③ Asagoshi K, Tano K, Chastain II PD, Adachi N, Sonoda E, Kikuchi K, Koyama H, Nagata K, Kaufman DG, Takeda S, Wilson SH, Watanabe M, Swenberg JA, Nakamura J, FEN1 Functions in Long Patch Base Excision Repair Under Conditions of Oxidative Stress in Vertebrate Cells, *Mol. Cancer Res.*, 査読有, **8**, 2010, 204-215.
- ④ Masunaga S, Tano K, Nakamura J, Watanabe M, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Ono K, Adverse effect of mild hyperthermia combined with hexamethylenetetramine compared to its effect combined with tirapazamine

- in the treatment of solid tumors, *Exp. Ther. Med.*, 査読有, **1**, 2010, 169-174.
- ⑤ Masunaga S, Tano K, Nakamura J, Watanabe M, Kashino G, Takahashi A, Tanaka H, Suzuki M, Ohnishi K, Kinashi Y, Liu Y, Ohnishi T, Ono K, Usefulness of hexamethylenetetramine as an adjuvant to radiation and cisplatin in the treatment of solid tumors: its independency of p53 status, *J. Radiat. Res.*, 査読有, **51**, 2010, 27-35.
- ⑥ Pachkowski BF, Tano K, Afonin V, Elder RH, Takeda S, Watanabe M, Swenberg JA, Nakamura J, Cells deficient in PARP-1 show an accelerated accumulation of DNA single strand breaks, but not AP sites, over the PARP-1-proficient cells exposed to MMS, *Mut. Res.*, 査読有, **671**, 2009, 93-99.
- ⑦ Masunaga S, Tano K, Watanabe M, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Ono K, Nakamura J, Evaluation of the potential of hexamethylenetetramine, compared with tirapazamine, as a combined agent with γ -irradiation and cisplatin treatment in vivo, *Br. J. Radiol.*, 査読有, 2009, **82**, 392-400.
- ⑧ Masunaga S, Kono K, Nakamura J, Tano K, Yoshida H, Watanabe M, Kashino G, Suzuki M, Kinashi Y, Ono K, Usefulness of hexamethylenetetramine in combination with chemotherapy using free and pegylated liposomal doxorubicin in vivo, referring to the effect on quiescent cells, *Oncol. Rep.*, 2009, 査読有, **21**, 1307-1312.
- ⑨ Takada S, Inoue E, Tano K, Yoshii H, Abe T, Yoshimura A, Akita M, Tada S, Watanabe M, Seki M, Enomoto T, Generation and characterization of cells that can be conditionally depleted of mitochondrial SOD2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, **379**, 2009, 233-238.

[学会発表] (計 9 件)

- ① ○Tano K, Inoue E, Yoshimura A, Seki M, Enomoto T, Watanabe M, Either SOD1, SOD2 or PRDX1 is required for normal cell growth in vertebrate cells, The 2011 GRC on Oxidative Stress and Disease, 平成 23 年 3 月 16 日, Ventura, CA, USA.
- ② ○樋口優人、井上絵里、田野恵三、吉村明、渡邊正己、榎本武美、関政幸、SOD1 枯渇細胞と PRDX1 枯渇細胞の抗酸化剤に対する挙動の違い、第 33 回日本分子生物学会年会、平成 22 年 12 月 7 日、神戸。
- ③ ○縄田寿克、菓子野元郎、田野恵三、法村俊之、渡邊正己、染色体 3 倍体化におけるがん形質の獲得、日本放射線影響学会第 53 回大会、平成 22 年 10 月 20 日、京都。
- ④ ○田野恵三、井上絵里、縄田寿克、菓子野元郎、関政幸、榎本武美、渡邊正己、細胞内局在性を異にする内在性スーパーオキシドによる細胞増殖阻害へのアスコルビン酸及び低酸素の効果、日本放射線影響学会第 53 回大会、平成 22 年 10 月 20 日、京都。
- ⑤ ○岡田卓也、菓子野元郎、田野恵三、渡邊正己、X 線誘発微小核形成は DNA 二重鎖切断に起因しない、日本放射線影響学会第 53 回大会、平成 22 年 10 月 20 日、京都。
- ⑥ ○井上絵里、田野恵三、吉居華子、高田隼也、吉村明、縄田寿克、中村純、多田周右、渡邊正己、関政幸、榎本武美、Nuclear superoxide may trigger spontaneous sister chromatid exchanges, 日本分子生物学会 32 回年会、平成 21 年 12 月 9 日、横浜。
- ⑦ ○縄田寿克、田野恵三、久郷裕之、押村光雄、渡邊正己、発がん過程における染色体異数化の役割、日本放射線影響学会 52 回大会、平成 21 年 11 月 11 日、広島。
- ⑧ ○岡田卓也、菓子野元郎、田野恵三、渡邊正己、ビタミン C は X 線誘発 DNA 二重鎖生成を抑制しない、日本放射線影響学会 52 回大会、平成 21 年 11 月 11 日、広島。
- ⑨ ○田野恵三、井上絵里、吉居華子、縄田寿克、関政幸、榎本武美、渡邊正己、内在性スーパーオキシドによる細胞増殖阻害及び染色体不安定化に対するアスコルビン酸の抑制効果、日本放射線影響学会 52 回大会、平成 21 年 11 月 11 日、広島。

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田野 恵三 (TANO KEIZO)
京都大学・原子炉実験所・准教授
研究者番号：00183468

(2) 研究分担者

- ① 菓子野 元郎 (KASHINO GENRO)
京都大学・原子炉実験所・助教
研究者番号：00437287
- ② 増永 慎一郎 (MASUNAGA SHINICHIRO)
京都大学・原子炉実験所・准教授
研究者番号：80238914

(3) 連携研究者

なし