

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510081

研究課題名(和文) エストロゲン補充療法誘発 4-OHEN-DNA 付加体の難修復性とホットスポット解析

研究課題名(英文) Induction and repair of 4-OHEN-DNA adducts in human breast cancer cells by the metabolites of equine estrogens

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) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：更年期障害女性に対するエストロゲン補充療法薬プレマリンの長期服用により乳がんなどのリスクが上昇する。同薬に含まれるエクインエストロゲンは代謝活性化(4-OHEN)され4-OHEN-DNA付加体を形成する。我々は同付加体特異抗体を作製し、ヒト乳がん細胞において4-OHEN-DNA付加体は修復されにくいことを見つけた。また、4-OHEN感受性は正常ヒトおよび修復欠損細胞間でほぼ差がなかった。さらに、DNA結合蛋白ヒストンは修復蛋白に見立てた損傷特異抗体と4-OHEN-DNA付加体の結合を濃度依存的に阻害した。以上から、プレマリンによる難修復性のDNA損傷の形成が乳がんと関係するかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Hormone replacement therapy (HRT) is widely used to decrease menopausal symptoms in post-menopausal women. However, long-term HRT increases the incidence of breast, ovarian and endometrial cancers. 4-Hydroxyequilenin (4-OHEN), a metabolite of equine estrogens present in common HRT formulations (Premarin), is capable of producing bulky 4-OHEN-DNA adducts. An immunological assay using our adduct-specific antibodies revealed that 4-OHEN-DNA adducts are repaired inefficiently in human breast cancer cells. MTS assay revealed that similar 4-OHEN sensitivities are observed between human normal and repair-deficient cells. Moreover, histones including human H1 competitively inhibited the binding of the antibodies to 4-OHEN-DNA adducts in a concentration-dependent manner, which are considered as a model of damage-recognising repair protein. Thus, the formation of DNA adducts with inefficient repair character might be involved in carcinogenesis process of Premarin-induced cancers.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：人体有害物質 エストロゲン補充療法 乳がん 4-OHEN-DNA付加体

1. 研究開始当初の背景

更年期障害女性に対するエストロゲン補充療法の代表薬プレマリンの長期服用で、乳がんなどの発がんリスクが上昇する。プレマリンに含まれるエクインエストロゲンは代謝活性化され、DNAへの結合体である4-OHEN-DNA付加体を形成する。しかし、検出系が未整備なため同付加体の発がんとの関連性を探る研究は少ない。

2. 研究の目的

我々は4-OHEN-DNA付加体特異モノクローナル抗体を新規開発した。本抗体を用い、ヒト乳がん細胞における4-OHEN-DNA付加体の修復動態を他のDNA損傷のものと比較検討し、発がんとの関連性を探る。

3. 研究の方法

(1)4種類のDNA損傷の修復測定

ヒト乳がん細胞MCF7を10cmディッシュに培養し、4-OHEN処理、紫外線照射、あるいはアセチルアミノフルオレン(AAF)処理を行う。処理後、修復のために種々の時間培養し、細胞を回収する。細胞からDNAを抽出し、損傷特異抗体を用いた酵素標識免疫法(ELISA法)で4種類のDNA損傷(4-OHEN-DNA付加体、CPD;シクロブタン型ピリミジン2量体、6-4PP;6-4型光産物、AAF-DNA付加体)を測定し、修復動態を求めた。損傷特異抗体は、全て独自に開発した4OHEN-1、TDM-2、64M-2、およびAAF-1を用いた。

(2)MTSアッセイによる細胞生存率の測定

ヒト正常細胞および修復欠損の色素性乾皮症A群患者由来(XP-A)細胞を96穴プレートに培養し、4-OHEN処理、紫外線照射、あるいはAAF処理を行った。各処理4日後の生存率をMTSアッセイで測定し、対照群を100%にしたときの各処理群における細胞生存率(感受性)を計算した。

(3)DNA損傷と損傷特異抗体の結合に対するヒストンの競合阻害の測定

4-OHEN-DNA、AAF-DNA、および2種類の紫外線照射DNAと各損傷特異抗体との結合に対する中性蛋白(BSA;牛血清アルブミン)および塩基性蛋白(プロタミン、ヒトH1ヒストン、仔牛胸腺H1ヒストン、および仔牛胸腺全ヒストン)の競合阻害率をELISA法で測定した。

4. 研究成果

○活性型エクインエストロゲンで誘発した4-OHEN-DNA付加体はヒト細胞において修復されにくい損傷である。

(1)ヒト乳がん細胞MCF7は紫外線で誘発される2種類のピリミジン2量体(CPD、6-4PP)

やアセチルアミノフルオレン(AAF)-DNA付加体をヌクレオチド除去修復機構によりゲノムDNAから正常に修復できる。一方、活性型エクインエストロゲン(4-OHEN、4-OHEQ)で誘発した4-OHEN-DNA付加体は24時間後でもほとんど修復できないことがわかった。

(2)4-OHEN-DNA付加体がヒト細胞で修復されにくい特別な損傷であることを確認するため、ヌクレオチド除去修復が正常なヒト細胞と欠損したヒト細胞における4-OHENの感受性を測定した。4-OHEN-DNA付加体が修復されないのであれば、両細胞間で感受性に差が見られないはずである。実際、正常ヒト細胞は修復欠損XP-A細胞に比べ紫外線やAAFに対して高い抵抗性を示すのに対し、4-OHENに対しては両細胞間の感受性の差はほとんど見られないことがわかった。この結果は、4-OHEN-DNA付加体がヒト細胞で修復されにくい特別な損傷であることを支持している。

(3)次に、4-OHEN-DNA付加体の難修復性の機序の解明を試みた。以前、4-OHEN-DNA付加体特異抗体の性質を検討する実験過程で、4-OHEN-DNAが塩基性蛋白プロタミンと高い親和性を持つことを偶然発見した。精子中に存在する核蛋白プロタミンに対応する体細胞中の塩基性DNA結合蛋白はヒストンである。そこで、MCF7細胞において、ヒストンはDNA中の4-OHEN付加体に強く結合することで、修復蛋白の同付加体へのアクセスを妨害し、結果として修復低下を招くという仮説を立てた。これを証明するため、DNA損傷特異抗体を損傷認識修復蛋白に見立て、4-OHEN-DNA付加体を含む4種類のDNA損傷と対応する損傷特異抗体の結合反応に対するヒストンを含む各蛋白の競合阻害率を検討した。その結果、中性蛋白BSAは、4種類すべてのDNA損傷・抗体結合反応に対して全く阻害を示さなかった。一方、塩基性蛋白であるプロタミン、仔牛胸腺由来全ヒストン、仔牛胸腺由来H1ヒストンおよびヒト由来H1ヒストンはすべてのDNA損傷・抗体結合反応に対して蛋白量依存的に競合阻害を示した。これは損傷の種類に関係なく起こることから、プラスの電荷をもつ塩基性蛋白がマイナスの電荷をもつDNAと親和性を持つ結果、抗体のDNA損傷への結合反応を阻害したと考えられる。注目すべき点は、全ての塩基性蛋白は4種類の抗原抗体反応の中で、4-OHEN-DNA付加体を標的とする反応に対し最も高い阻害率を示したことである。この結果は、ヒストンの4-OHEN-DNA付加体への親和性は他の損傷に比べて高いことを示し、ヒストンが4-OHEN-DNA付加体に結合するため、修復蛋白が同付加体に近づけなくなり、結果として修復が働かなくなるという前述の仮説を支持するものである。

エストロゲン補充療法でプレマリンの服用

歴のある患者から頻度は極めて低いが4-OHEN-DNA付加体が検出されている。本研究で発見されたように、この付加体が修復されずにいるならその細胞でDNA複製が生じ、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼを介して突然変異が生じると予測される。これがプレマリンによる発がんリスク上昇につながるのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件) 全て査読あり

(1) H. Yanagihara, J. Kobayashi, S. Tateishi, A. Kato, S. Matsuura, H. Tsuchi, K. Yamada, J. Takezawa, K. Sugawara, C. Masutani, F. Hanaoka, C.M. Weemaes, T. Mori, L. Zou, and K. Komatsu. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates pol-eta-dependent translesion DNA synthesis. *Mol. Cell*, 43 (2011) 788-797.

(2) 森俊雄, 岩本顕聡, DNA 損傷特異的モノクローナル抗体, 放射線生物研究. 47 (2012) 112-125.

(3) J.-I. Komura, H. Ikehata, T. Mori, and T. Ono. Fully functional global genome repair of (6-4) photoproducts and compromised transcription-coupled repair of cyclobutane pyrimidine dimers in condensed mitotic chromatin. *Exp. Cell Res.*, 318 (2012) 623-631.

(4) J.M. O'Dowd, A.G. Zavala, C. Brown, T. Mori, and E.A. Fortunato. HCMV-infected cells maintain efficient nucleotide excision repair of the viral genome while abrogating repair of the host genome. *PLoS Pathogens*, 8 (2012) e1003038.

(5) S. Somekawa, K. Imagawa, H. Hayashi, M. Sakabe, T. Ioka, G.E. Sato, K. Inada, T. Iwamoto, T. Mori, S. Uemura, O. Nakagawa, and Y. Saito. Tmem100, an ALK1 signaling-dependent gene essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109 (2012) 12064-12069.

(6) A. Schafer, S. Schubert, A. Gratchev, C. Seebode, A. Apel, P. Laspe, L. Hofmann, A. Ohlenbusch, T. Mori, N. Kobayashi, A. Schurer, M.P. Schon, S. Emmert. Characterization of three XPG-defective patients identifies three missense mutations that impair repair and transcription. *J. Invest. Dermatol.*, 133 (2013) 1841-1849.

(7) 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.*, 2014, DOI: 10.1111/php.12239.

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 森俊雄, 吉田唯真, 西村和樹, 岩本顕聡, 池畑広伸, 小林信彦: 太陽紫外線による3主要ピリミジン2量体型DNA損傷の誘発, 第33回日本光医学・光生物学会, 2011年7月22-23日, 大阪

(2) 西村和樹, 吉田唯真, 岩本顕聡, 池畑広伸, 小林信彦, 森俊雄: 太陽紫外線によるピリミジン2量体型DNA損傷の誘発, 日本放射線影響学会第54回大会, 2011年11月17-19日, 神戸

(3) 小村潤一郎, 池畑広伸, 森俊雄, 小野哲也: M期の凝縮した染色体における細胞におけるDNA修復: 効率的なゲノム全体の除去修復と不活性な転写共役修復, 日本放射線影響学会第54回大会, 2011年11月17-19日, 神戸

(4) 柳原啓見, 立石智, 山田晃一, 森俊雄, 小林純也, 小松賢志: NBS1による損傷乗り越えDNA合成(TLS)の制御, 日本放射線影響学会第54回大会, 2011年11月17-19日, 神戸

(5) 池畑広伸, 森俊雄, 東正一, 亀井保博, 山本雅之: マウス皮膚における紫外線特異的DNA損傷誘発の作用スペクトル解析, 日本放射線影響学会第56回大会, 2013年10月18-20日, 青森

(6) 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, International symposium on xeroderma pigmentosum and related diseases: Disorders of DNA damage response -Bench to bedside-, March 5-7, 2014, Kobe

〔その他〕

ホームページ等

www.naramed-u.ac.jp/research/amrc/ri/index.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

岩本 顕聡 (IWAMOTO, Takaaki)
奈良県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：20448773