

令和元年6月11日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02958

研究課題名(和文) DNA損傷特異抗体を損傷除去修復薬に進化させる

研究課題名(英文) Transform the antibodies against DNA lesions into the repair-enhancing reagents of them

研究代表者

森 俊雄 (MORI, Toshio)

奈良県立医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：10115280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：太陽光を浴びすぎると、細胞DNA中にシクロブタン型二量体(CPD)などの損傷が形成される結果、皮膚がんなどの障害が発生する。それ故、太陽紫外線障害の防止にはCPDの迅速除去が効果的と推測される。そこで、独自に開発したCPD特異抗体の抗原結合断片にDNA切断酵素を結合(Fab-X)し、正常ヒト細胞核で発現させた。その結果、空ベクターや抗体断片のみを導入した対照細胞に比べ紫外線抵抗性が増加した。また、この増加はCPDの修復速度の亢進と関連した。このように、DNA損傷特異抗体を損傷除去修復薬に進化させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達は太陽紫外線で最も多く形成されるDNA損傷(CPD)に特異的なモノクローナル抗体を作製し、同損傷を簡易に定量したり可視化できる貴重な研究ツールとして育てた後、世界の研究者に利用機会を提供してきた。本研究により、CPD特異抗体断片にDNA切断酵素を結合することで、CPDの細胞内での修復を増強できることが判明し、さらに健康面での社会的貢献の可能性があったことがわかった。このように、DNA損傷特異抗体を損傷修復薬に進化させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Too much exposure to sunlight produces DNA damage including cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) at exposed skin areas and causes harmful effects including skin cancers. This suggests that quick removal of CPDs from cellular DNA may prevent from such harmful effects. In this study, we examined whether the antibodies against CPD which was bound to restriction enzymes (Fab-X) can increase UV resistance in human cells by stimulating repair efficiency of CPDs. Indeed, we found that Fab-X-expressing human cells showed higher UV survival than control cells, which was related with higher efficiency of CPD repair from genomic DNA. These findings indicate that we can transform the antibodies against DNA lesions into the repair-enhancing reagents of them.

研究分野：放射線・化学物質影響科学

キーワード：紫外線 DNA修復 シクロブタン型二量体(CPD) CPD特異抗体 修復亢進 損傷修復試薬

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

1. 研究開始当初の背景

太陽紫外線は生体に3種類のピリミジン二量体型DNA損傷を効率よく誘発し、皮膚がんなど様々な有害作用を引き起こす。中でも、シクロブタン型二量体(CPD)は形成量が最も多い上にヌクレオチド除去修復(NER)による修復速度が遅いため、有害作用の主原因とみなされている。現在、紫外線の防御のためにはサンスクリーン剤が一般的に使われている。しかし、完全防御は容易ではないため、結果的に形成されてしまう細胞DNA中のCPDを自身の修復能力を超えて効率的に除去する方法が求められている。しかし、現状ではCPDの修復促進を目的とした医薬品はほとんど開発されていない。唯一T4 endonucleaseを含む製品が開発中との情報があるが、太陽紫外線を浴びることが日常的であることを考えると、様々なCPD修復促進薬の開発の重要性は明白であろう。

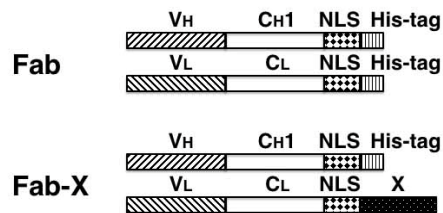
2. 研究の目的

独自に開発したCPD特異抗体(TDM-2)の抗原結合断片にDNA切断酵素を結合(Fab-X)させ、ヒト細胞核内で発現させる系を利用し、CPDの近傍でDNA切断を誘発することがCPD修復の亢進につながるか明らかにする。この戦略のもと、紫外線皮膚障害の防止・軽減を目的とする、抗体を利用した世界初の損傷除去修復薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 核移行型 Fab-X 導入細胞の作製

NER陽性U2OS細胞に核移行型のFab-XおよびFab vectorあるいは空vectorを導入し、薬剤選択下で安定発現する3種類のクローンを選別した。NER陰性XP-A細胞にも同様な操作を行い、3種類のクローンを選別した。右図に、vectorに組み込んだ核移行型FabおよびFab-Xの構造を示す。



(2) 紫外線感受性の測定

Fab-X導入細胞など3種類のNER陽性細胞を24well plateに植え、翌日様々な線量の紫外線を照射後培養する。4日後、MTS試薬を加え2時間培養後、492nmの吸光度を測定し生存数を求める。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る。同様の実験を3種類のNER陰性XP-A細胞についても行う。

(3) CPD修復能の測定

3種類のNER陽性細胞を10cm dishに植え、コンフルエントになるまで培養する。細胞をDPBSで洗浄後、10 J/m²の紫外線で照射する。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に保存する。細胞を解凍後、DNA Extractor TIS kit (Wako)を用いてDNAを精製・抽出する。DNAを1本鎖に熱変性後、10 ngずつを96well 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する。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の修復が増強されているか判定する。

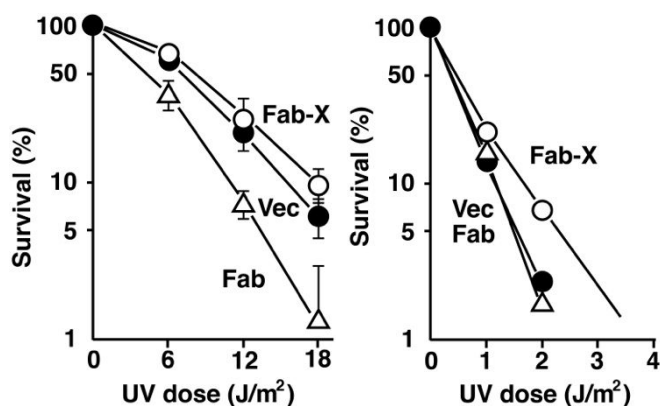
(4) Fab-XのCPD切断箇所の測定

1個のCPDを含んだオリゴヌクレチドを購入する。3'末端あるいは5'末端を³²Pで標識後、相補配列のオリゴヌクレチドを用いて二重鎖にしてからFab-Xを作用させる。その後、PAGEを用いてCPDの切断箇所を塩基レベルで解析する。Fab-Xについては、Fab-Xを発現vectorに組み込み、バキュロウイルスあるいはヒト培養細胞で大量に産生させた後、精製する。

4. 研究成果

(1) Fab-X導入細胞における紫外線抵抗性の増加

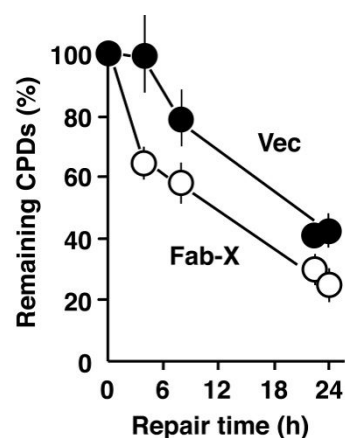
右図の左側にNER陽性U2OS細胞における紫外線感受性曲線を、右側にNER陰性XP-A細胞における同曲線を示す。これらの結果は、細胞のNER活性の有無にかかわらずFab-X導入は紫外線抵抗性を増加させることを示す。機序として、CPD近傍でDNA切断を誘発することで、NER活性を促進する、あるいはDNA切断修復を介したCPD修復を行うことが考えられる。一方、NER陽性細胞へのFabの導入は紫外線抵抗性を減少させたことから、FabのCPD結合により修復阻



害を引き起こすことが推測される。

(2) Fab-X 導入細胞における CPD 修復能の促進

Fab-X 導入細胞における紫外線抵抗性の増加が果たして CPD の修復亢進と関連するかを調べるために、Fab-X 導入 U2OS 細胞に 10 J/m^2 の紫外線を照射後、24 時間まで様々な時間修復させ、CPD 量の経時変化を測定した。空 vector を導入した対照細胞では、CPD 形成量の約半分が 24 時間でゲノム DNA よりゆっくり修復除去された。一方 Fab-X 導入細胞では、照射後 3 時間までの初期の CPD 修復が亢進され、その後対照と同様の速度で修復された。この結果は、照射直後から 3 時間にかけての CPD 修復促進が紫外線抵抗性の増加を導いていることを示唆している。つまり、DNA 損傷特異抗体を損傷除去修復薬に進化させることに成功した。



(3) その他

Fab-X の CPD 切断機序を解明するため、Fab-X の CPD 切断箇所を同定する実験を計画した。しかし、Fab-X を発現 vector に組み込み、バキュロウイルス、プレバチルス属細菌あるいはヒト培養細胞で大量に産生させる実験にどうしても成功せず、未だ Fab-X の準備ができていない。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

(1) T. Mori, H. Nakane, T. Iwamoto, M.G. Krokidis, C. Chatgililoglu, K. Tanaka, T. Kaidoh, M. Hasegawa and S. Sugiura. 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*, (2019) in press. 査読有
DOI:10.1016/j.dnarep.2019.04.004

(2) H. Ikehata, T. Mori, T. Douki, J. Cadet and M. Yamamoto. 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 (2018) 404-413. 査読有
DOI:10.1039/c7pp00348j

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

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

(5) S. Nukuzuma, C. Nukuzuma, M. Kameoka, S. Sugiura, K. Nakamichi, T. Tasaki, T. Takegami. CPT11 prevents virus replication in JCI cells persistently infected with JC polyomavirus. *Microbiol Immunol* 61(2017) 232-23. 査読有
DOI: 10.1111/1348-0421.12486

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

(7) S. Nukuzuma, K. Nakamichi, M. Kameoka, S. Sugiura, C. Nukuzuma, T. Tasaki, T. Takegami. Suppressive effect of topoisomerase Inhibitors on JC polyomavirus propagation in human neuroblastoma cells. *Microbiol Immunol* 60 (2016) 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) 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

(3) 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

(4) 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

(5) 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

(6) 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

(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) 森 俊雄、岩本顕聡、杉浦重樹、中根裕信. 酸化的 DNA 損傷サイクロプリン定量系の高感度化、第 38 回日本光医学・光生物学会、2016 年 7 月 22 日、京都

(9) 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

(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、2016 年 6 月 4 日、神戸

〔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プリンに特異結合する抗体

発明者：森俊雄、杉浦重樹、高木由美

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2018-028157 号

出願年：2018 年

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：杉浦重樹

ローマ字氏名：SUGIURA, Shigeki

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：医学部

職名：教育教授

研究者番号(8桁): 40179130

研究分担者氏名：織田昌幸

ローマ字氏名：ODA, Masayuki

所属研究機関名：京都府立大学

部局名：生命環境科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20318231

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岩本顕聡

ローマ字氏名：IWAMOTO, Takaaki

研究協力者氏名：東伸岳

ローマ字氏名：HIGASHI, Nobutake