

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08891

研究課題名(和文) 死細胞DNA分解システムの全容と、cfDNA生成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of dead cell DNA degradation and cell-free DNA generation

研究代表者

水田 龍信 (Mizuta, Ryushin)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：50297628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：循環血液中にはCell-free DNA (cfDNA) とよばれるDNAが存在し、腫瘍診断のためのバイオマーカーとして注目されている。我々は、cfDNAの生成に2つのDNA切断酵素、すなわちDNase (別名DNase1L3) とCADが関与することを予想し、それぞれの遺伝子欠損マウスに、アセトアミノフェンあるいは抗Fas抗体を投与し、肝細胞ネクローシスまたはアポトーシスを誘導した。その結果(i)ネクローシスの際にcfDNAを生成するDNA切断酵素はDNase であり、(ii)アポトーシスの際には、CADおよびDNase の両方がcfDNAの生成に関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2つのDNA切断酵素CADおよびDNase がcfDNAの生成に関与することが明らかになったことより、酵素の特異性をふまえたcfDNAの評価ならびに精製プロトコルの作製に寄与するものと期待される。また、DNase が血流中に漏出したDNAを最初に分解する酵素であることが明らかになったことより、DNAを骨格として形成された血栓の治療に有効であること、またそのような血栓を足場として広がるがん細胞の転移の抑制にも応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cell-free DNA (cfDNA) (e.g. fetal- or tumor-derived DNA) is DNA found in the blood circulation. It is now widely investigated as a biomarker for prenatal screening, tumor diagnosis, and tumor monitoring as “liquid biopsies”. However, the biological and biochemical aspects of cfDNA remain unclear. Although cfDNA is considered to be mainly derived from dead cells, information is scarce as to whether it is apoptotic or necrotic and what kinds of endonucleases or DNases are involved. We induced in vivo hepatocyte necrosis and apoptosis in mice deficient in DNase (also named DNase1L3) and/or caspase-activated DNase (CAD) genes with acetaminophen overdose and anti-Fas antibody treatments. We found that (i) DNase was the endonuclease responsible for generating cfDNA in acetaminophen-induced hepatocyte necrosis and (ii) CAD and DNase cooperated in producing cfDNA for anti-Fas mediated hepatocyte apoptosis.

研究分野：医歯薬

キーワード：DNase DNase1L3 CAD ネクローシス アポトーシス cfDNA NETS liquide biopsy

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の体は数十兆個の細胞でできていて、そのうち毎秒数千万個の細胞が死んでいくという。死んだ細胞は体内で処理されるが、この際重要なのが、クロマチン DNA の分解処理である。分解が適切に行われないと血液中に大量に流出し、SLE などの自己免疫疾患が誘発される。この死細胞クロマチン DNA の分解を担っているのが DNA 切断酵素 (DNase) であり、生体内には幾種類かの DNase が存在する。死細胞中の DNA はこれら DNase により効率よく分解されると考えられているが、この DNase 相互の関連性と生体内における個々の役割に関しては不明な点が多い。また血液中には、健康人でも微量の DNA が存在し、これは cell-free DNA (cfDNA) と呼ばれていて最近特に臨床現場で注目されている。cfDNA は以前より、胎児の出生前診断に用いられていたが、1994 年にがん患者の血液より精製した cfDNA 中に RAS 遺伝子変異が見つかったことにより (Vasioukhin et al. Br J Haematol, 1994)、がんの診断マーカーとしての期待が一気に広がった。特に最近では、次世代シーケンサーと PCR 技術、さらには AI の進歩により、cfDNA を用いた遺伝子解析はプレジジョン・メディシン (精密医療) の基幹技術として爆発的な広がりを見せている。血液検査だけでがんの診断ができることからメリットが多く、低侵襲性のバイオプシー、すなわちリキッドバイオプシー (liquid biopsy) として注目を集めている。さらには、がんの診断ばかりでなく、抗癌剤治療後の効果判定にも使えることから、その応用には大きな期待が寄せられている。しかし cfDNA に関しては、期待は大きいものの、生化学的解析が不十分で、その由来がどういう細胞、あるいはどのような細胞死によるのか、すなわちアポトーシス由来なのか、ネクローシス由来なのか、またどのようにして生成されるのかという基本的な事実さえも明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

我々はこれまで SLE 様自己免疫疾患原因因子である DNA 切断酵素 DNase (別名 DNase1L3) の機能解析を行ってきた。DNase は DNase I ファミリーに属する分泌タンパクで、血流中に存在し、DNase I とともに主にネクローシス細胞の DNA 分解に関与するといわれている。またアポトーシス細胞においては、細胞内に存在する CAD が DNA 切断を行うと考えられている。しかしながら、生体内でこれら 3 つの DNA 分解酵素 (DNase、DNase I、CAD) が実際どのようにして死細胞を分解し、cfDNA の生成に関与するかは明らかになっていない。本研究では、DNase の生体内での機能解析を手始めに、現有の DNase 遺伝子欠損 (DNase<sup>-/-</sup>) マウスと CAD 遺伝子欠損 (CAD<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、生体内での死細胞 DNA の分解処理システムの解明を目指す。特に各 DNA 切断酵素の使い分けと、cfDNA の生成のメカニズムの解明を主たる目的とする。また DNase I 遺伝子欠損 (DNase I<sup>-/-</sup>) マウスを作製し、他の遺伝子欠損マウスとの比較を行う。

### 3. 研究の方法

- (1) 生体内での DNase の機能を解析するために、DNase<sup>-/-</sup> マウスの肝臓に DNase の発現ベクターを hydrodynamic injection 法で導入し、アセトアミノフェン大量投与による肝細胞ネクローシスを誘導した場合の変化を観察する。
- (2) 現有の CAD<sup>-/-</sup> マウス、DNase<sup>-/-</sup> マウス、CAD & DNase 両遺伝子欠損 (CAD<sup>-/-</sup> DNase<sup>-/-</sup>) マウスの肝臓に、アポトーシス、ネクローシスを別々に誘導し、症状、病理像、組織中 DNA 分解の有無、血中 cfDNA の検討を行う。なおアポトーシスは抗 FAS 抗体 (Jo2) の腹腔内投与、ネクローシスはアセトアミノフェンの腹腔内大量投与にて誘導する。
- (3) CRISPER/CAS9 システムを用い DNase I 遺伝子欠損 (DNase I<sup>-/-</sup>) マウスを作製する。

### 4. 研究成果

(1) DNase (DNase1L3) の機能  
Karyolysis (核崩壊) は、死細胞核の完全な溶解現象であるが、その生成メカニズムは明らかにされていない。我々これまでネクローシスの際の DNA 断片化酵素 DNase を研究してきた。その過程で、アセトアミノフェンの過剰投与により肝細胞ネクローシスを引き起こした DNase<sup>-/-</sup> マウスでは肝細胞核の崩壊が阻害されることを発見した。これが DNase の欠損のみで起こるのか確認するために、DNase の発現ベクターを hydrodynamic injection 法で DNase<sup>-/-</sup> マウスの肝臓に導入後、アセトアミノフェンによる肝細胞ネクローシスを誘導した。その結果、核崩壊が起こらなかった DNase<sup>-/-</sup> マウスの肝細胞核に核崩壊を誘導することができた。また、野生型マウスに Clodronate liposome を投与し、肝臓のクッパー細胞を除去すると、肝臓での DNase の発現と活性が低下した。したがって、クッパー細胞から産生された DNase が、ネクローシスを起こした肝細胞の核崩壊を引き起こすことが明らかになった。このことは、クロマチン DNA は核の構造物であり、それが切断されることにより核が内側から壊れていくことを意味している。したがって DNase は死細胞すなわちネクローシス細胞の分解に極めて重要な役割があることが明らかになった。

(2) 血中循環 DNA (cfDNA) の生成メカニズムの解明  
アポトーシス、ネクローシスの代表的な DNA 切断酵素 CAD、DNase の遺伝子欠損マウス (CAD<sup>-/-</sup>

マウス、DNase<sup>-/-</sup>マウス) ならびに両遺伝子欠損マウス (CAD<sup>-/-</sup>DNase<sup>-/-</sup>マウス) を用い、それぞれに肝細胞ネクロシス、あるいは肝細胞アポトーシスを誘導し、血中 cfDNA の検出を試みた。その結果、ネクロシスの場合には CAD<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと同様にモノヌクレオソームまで分解された cfDNA が検出されたが、DNase<sup>-/-</sup>マウスでほとんど cfDNA が検出されず、さらに両遺伝子欠損マウスでは全く検出されなかった。またアポトーシスの場合は CAD<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと同様に、モノヌクレオソームの長さの cfDNA が検出されたが、DNase<sup>-/-</sup>マウスで cfDNA は検出されるものの DNase 活性は弱く、モノヌクレオソームだけでなく、中間産物であるマルチヌクレオソームの長さの cfDNA が検出された。しかし両遺伝子欠損マウスでは全く検出されなかった。このことからネクロシスの場合は DNase が、またアポトーシスの場合は、まず CAD で大まかに切断され、その後 DNase で細かく分解されることが明らかになった。また、血清中の DNase と DNase I の活性を測定すると、肝臓のダメージが進むとそれに比例するようにいずれの酵素活性も上昇することがわかった。核崩壊が見られず、cfDNA も検出できなかった両遺伝子欠損マウスでも高い DNase 活性が認められたことから、DNase は cfDNA の生成よりも、その後のさらなる分解に寄与することが示唆された。この発見は、cfDNA の生化学の基盤となる発見であり、酵素の特異性をふまえた cfDNA の評価ならびに精製プロトコルの作製に寄与するものと期待される。

### (3) NET の抑制

炎症時に好中球から循環血液中へ放出される網目状の構造物である好中球細胞外トラップ (NET) は、宿主防御の一端を担っている反面、過剰な放出は血栓症を誘発する。例えば、好中球増多症や敗血症の際には NET 形成が亢進し、血管を閉塞させ、臓器損傷を引き起こす。しかしながらその有効な治療法は知られていない。我々は以前、DNase<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞をサイトカイン無しで培養すると、細胞死が誘導され、NET 様の網状の DNA が放出されることを観察していた。そこで、DNase が NET の抑制に重要であろうという仮説のもと、検討を行ったところ、予想通り DNase が NET の分解に必要なことが明らかになり、DNase がその予防や治療に使えることが示唆された。なお NET に関しては、がん細胞が転移する際に、その足場として使われている可能性が示唆されている。したがって、DNase によって NET を分解することによりがん転移を抑制することができると予想され、今後の展開が期待される。

### (4) DNase I<sup>-/-</sup>マウスの作製

CRISPER/CAS9 システムを用い DNase I 遺伝子欠損 (DNase I<sup>-/-</sup>) マウスの作製を行った。現在、個体数を増やしている状況である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kijima Marie, Yamagishi Hiroyuki, Kawano Riho, Konishi Tomoki, Okumura Takuya, Hayase Masanori, Mizuta Ryushin	4. 巻 NA
2. 論文標題 Linker histone H1 determines cell stiffness and differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.01.21.914770	査読の有無 無
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 Shuhei Takada, Taiki Watanabe, Ryushin Mizuta	4. 巻 82
2. 論文標題 DNase <sup>-</sup> dependent DNA fragmentation causes karyolysis in necrotic hepatocyte.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Vet. Med. Sci.	6. 最初と最後の頁 23-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0499	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 Taiki Watanabe, Shuhei Takada, Ryushin Mizuta	4. 巻 516
2. 論文標題 Cell-free DNA in blood circulation is generated by DNase1L3 and caspase-activated DNase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 790-795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.069	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 Marie Kijima, Ryushin Mizuta	4. 巻 40
2. 論文標題 Histone H1 quantity determines the efficiencies of apoptotic DNA fragmentation and chromatin condensation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed. Res.	6. 最初と最後の頁 51-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.40.51	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 Marie Kijima, Hiroyuki Yamagishi, Yasushi Hara, Mai Kasai, Yasunari Takami, Hiroshi Takemura, Yusuke Miyanari, Yoichi Shinkai, Ryushin Mizuta	4. 巻 512
2. 論文標題 Histone H1 quantity determines the efficiency of chromatin condensation in both apoptotic and live cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	6. 最初と最後の頁 202-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.03.030	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 水田龍信	4. 巻 71
2. 論文標題 細胞死におけるDNase の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 114-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 水田龍信	4. 巻 35
2. 論文標題 細胞死に学ぶ生体の「もの壊し」の知恵と疾患-DNAはいかにして分解されていくか	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 理大科学フォーラム	6. 最初と最後の頁 34-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Jimenez-Alcazar Miguel, Rangaswamy Chandini, Panda Rachita, Bitterling Josephine, Simsek Yashin J., Long Andy T., Bilyy Rostyslav, Krenn Veit, Renn? Christoph, Renn? Thomas, Kluge Stefan, Panzer Ulf, Mizuta Ryushin, Mannherz Hans Georg, Kitamura Daisuke, Herrmann Martin, Napirei Markus, Fuchs Tobias A.	4. 巻 358
2. 論文標題 Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1202 ~ 1206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aam8897	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田周平、渡邊大樹、水田龍信
2. 発表標題 DNase1L3とCaspase-activated DNaseがcell-free DNAを生成する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊大樹、高田周平、小野里磨優、福島健、水田龍信
2. 発表標題 餌の違いによる薬剤感受性の違いとその原因の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水田龍信、渡邊大樹、高田周平
2. 発表標題 血液中cell-free DNA 生成のメカニズムの解明
3. 学会等名 第28回日本Cell Death 学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水田龍信、渡邊大樹、高田周平
2. 発表標題 肝細胞死におけるcell-free DNA生成のメカニズム
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊大樹、高田周平、木島真理恵、河野莉穂、水田龍信
2. 発表標題 DNase はネクロシスの際のcell-free DNA生成に主要な役割を担う
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊大樹、木島真理恵、河野莉穂、高田周平、水田龍信
2. 発表標題 ネクロシス下のcell-free DNA 生成におけるDNase の関与
3. 学会等名 第27回日本Cell Death 学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水田龍信、渡邊大樹、高田周平、木島真理恵、河野莉穂
2. 発表標題 肝細胞死におけるcell-free DNA 生成のメカニズム
3. 学会等名 第25回肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木島真理恵、河野莉穂、渡邊太樹、水田龍信
2. 発表標題 細胞死DNA断片化とクロマチン凝集の生成メカニズムと生理的意義
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水田龍信、木島真理恵、河野莉穂、渡邊太樹
2. 発表標題 DNA断片化とクロマチン凝集の生成メカニズムと生理的意義
3. 学会等名 第26回日本Cell Death 学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水田龍信、木島真理恵、河野莉穂
2. 発表標題 肝細胞ネクロシスにおけるcell-free DNA生成のメカニズム
3. 学会等名 第24回肝細胞研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究紹介 <a href="http://www.ribs.tus.ac.jp/wp-content/uploads/mizuta_hp.pdf">http://www.ribs.tus.ac.jp/wp-content/uploads/mizuta_hp.pdf</a>
---

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