

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12168

研究課題名(和文) ヒト脳オルガノイドを用いた色素性乾皮症A群患者の進行性神経障害の機構解析

研究課題名(英文) Mechanism analyses of progressive neurological diseases in xeroderma pigmentosum group A patients using their iPSCs-derived cerebral organoids

研究代表者

森 俊雄 (Mori, Toshio)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10115280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：色素性乾皮症A群(XP-A)はDNA損傷修復機構のヌクレオチド除去修復を欠損する遺伝病である。運動失調など進行性の神経障害を発症するがその機序は不明である。本研究では、XP-A患者由来の脳オルガノイドを用い、神経変性と酸化性DNA損傷サイクロプリンの関係を調べようとしたが、オルガノイド作製担当者が研究分担者を辞退したため不成功に終わった。そこで、マウス脳におけるサイクロプリンを測定した結果、12月齢と26月齢で、Xpaマウスは野生型に比べて多量の損傷を蓄積していた。さらに、XP-A患者剖検脳では、神経細胞脱落が顕著な部位ではサイクロプリン量は低い、脱落が少ない部位では高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

色素性乾皮症患者の神経障害発症機序として、酸化性DNA損傷サイクロプリンの関与説を補強する。これはヒト老化の機序としても適応できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Xeroderma pigmentosum group A (XP-A) is a genetic disorder associated with defects in the nucleotide excision repair pathway which eliminates various helix-distorting DNA lesions. XP-A patients develop progressive neurological disease. To understand the mechanism, we studied the involvement of oxidatively generated DNA damage (cyclopurine; cyclo-dA) in neurological degeneration using cerebral organoids from XP-A-derived iPSCs. However, this study was not completed because of withdrawal of the co-investigator responsible for organoid generation. Cyclo-dA levels in brains were then measured by the immunological assay. There were more cyclo-dA lesions in Xpa mice than wild-type mice at 12 and 26 months of age. Autopsy analysis of an XP-A brain revealed the cyclo-dA levels are low at sites with atrophy, but high at a less atrophic site.

研究分野：放射線・化学物質影響科学

キーワード：神経障害 サイクロプリン 酸化性DNA損傷 修復欠損

1. 研究開始当初の背景

色素性乾皮症A群 (XP-A) は日本人患者数が世界で最も多い常染色体劣性遺伝病で、DNA損傷修復機構のヌクレオチド除去修復 (NER) を欠損する。太陽露光部における高頻度皮膚がんなどの皮膚障害に加え、運動失調や知能低下など進行性の神経障害を発症するが、後者の発症機序は不明である。長年の仮説として、内因性のNER型DNA損傷の蓄積およびその転写阻害による神経細胞死が提唱され、酸化的DNA損傷サイクロプリンが損傷候補となっているが、測定困難性のため検証されずにいた。そこで、私達は同損傷特異的モノクローナル抗体を独自開発し酵素標識免疫法に応用することで、Xpa 欠損マウスの脳は野生型に比べて過剰のサイクロプリンを蓄積していることを明らかにした。これが仮説を支持する最初で唯一のものであり、ヒトを含めさらなる研究が必要である。

2. 研究の目的

XP-A 患者の進行性神経障害とサイクロプリン誘発神経細胞致死との関連を研究するため、Xpa マウス脳や XP-A 患者剖検脳におけるサイクロプリン蓄積について、その量と細胞内分布を検討する。加えて、神経障害を発症した日本人 XP-A 患者由来 iPS 細胞から作製した脳オルガノイドを長期培養する系を用い、進行性の神経変性がサイクロプリンの経時的蓄積により引き起こされるか検討する。

3. 研究の方法

(1) Xpa マウス脳組織におけるサイクロプリンの可視化と定量

Xpaおよび野生型マウス脳は研究協力者より提供された。マウス脳組織を4%PFAで灌流固定後、OTCで包埋し、組織切片を作製した。Sodium citrate bufferによる90 20分間の浸透化処理に続きDNA一本鎖化処理を行った後、損傷特異抗体CdA-1および蛍光2次抗体を処理することによりサイクロプリン(Cyclo-dA)を検出した。蛍光顕微鏡を用いてサイクロプリンを可視化後、蛍光量測定により細胞核あたりの損傷量を定量した。

(2) XP-A患者剖検脳におけるサイクロプリンの定量

研究協力者より神経障害を呈したXP-A患者剖検脳から5部位が提供された。各部位からDNAを抽出し、CdA-1を用いた酵素標識免疫法によりサイクロプリン(Cyclo-dA)を測定した。さらに、損傷量既知サンプルの検量線を用いてCyclo-dAを定量した。

4. 研究成果

(1) ヒト脳オルガノイド

日本人創始者変異を持つXP-A患者由来iPS細胞および同細胞にXPA cDNAを導入した対照細胞からそれぞれ脳オルガノイドを作製すべく細胞の取得など準備を進めていた。しかし、オルガノイド作製担当者が研究分担者を辞退することになり、研究が困難になった。研究代表者が脳オルガノイド作製を目指したが、研究期間内に脳オルガノイドを長期培養する系は確立できなかった。

(2) Xpa マウス脳組織におけるサイクロプリンの可視化と定量

蛍光顕微鏡測定の結果、マウス脳組織の細胞核上にサイクロプリンが染色され、そのDNAあたりの蛍光量は6ヶ月齢では、Xpaと野生型マウスで差は見られなかったが、12ヶ月齢と26ヶ月齢

では、Xpaマウスの方が野生型に比べて大きいことがわかった。

(3) XP-A患者剖検脳におけるサイクロプリンの定量

Xpaマウスと異なる点は、XP-A患者の剖検脳は神経細胞の脱落が顕著なことである。実際、5部位中の4部位では損傷の蓄積が予測される神経細胞の脱落が顕著であり、サイクロプリン量は極めて低いものとなった。一方、神経細胞脱落が比較的軽微であった残りの1部位ではサイクロプリン量は高齢のXpaマウス脳の値を超える高いものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwasa N, Matsui TK, Iguchi N, Kinugawa K, Morikawa N, Sakaguchi YM, Shiota T, Kobashigawa S, Nakanishi M, Matsubayashi M, Nagata R, Kikuchi S, Tanaka T, Eura N, Kiriya T, Izumi T, Saito K, Kataoka H, Saito Y, Kimura W, Wanaka A, Nishimura Y, Mori E, Sugie K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Gene Expression Profiles of Human Cerebral Organoids Identify PPAR Pathway and PKM2 as Key Markers for Oxygen-Glucose Deprivation and Reoxygenation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Neurosci.	6. 最初と最後の頁 605030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2021.605030.	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 K. Nishimura, H. Ikehata, T. Douki, J. Cadet, S. Sugiura and T. Mori	4. 巻 97
2. 論文標題 Seasonal differences in the UVA/UVB ratio of natural sunlight Influence the efficiency of the photoisomerization of (6-4) photoproducts into their Dewar valence isomers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photochem. Photobiol.	6. 最初と最後の頁 582-588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/php.13361	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 俊雄
2. 発表標題 DNA損傷特異抗体で道を拓く（学会賞講演）
3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 俊雄、西村和樹、池畑広伸、Thierry Douki、Jean Cadet、杉浦重樹
2. 発表標題 太陽光中のUVA/UVB比率の季節差はDNA損傷6-4型光産物のDewar型光産物への光異性化への効率に影響を及ぼす
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 DNA鎖上のアデノシン型サイクロプリンに特異的に結合する抗体	発明者 森俊雄、杉浦重樹、 高木由美	権利者 株式会社メイベル、奈良県立医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7107497号	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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
研究分担者	森 英一朗 (Mori Eiichiro) (70803659)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	
研究分担者	松井 健 (Matsui Takeshi) (90528605)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・特任講師 (15201)	削除：2022年3月28日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------