

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500997

研究課題名（和文）

発がん過程におけるDNA損傷・修復のゲノム内分布動態の解明

研究課題名（英文） Elucidation of genomic distribution dynamics of DNA damage and repair in carcinogenesis process

研究代表者

赤塚 慎也 (AKATSUKA SHINYA)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40437223

研究成果の概要（和文）：

免疫沈降の原理に基づき、DNA 損傷の存在部位をゲノム全体にわたって検出する方法を新たに開発し、実用性を評価した。鉄ニトリロ三酢酸誘発げっ歯類腎発がんモデルの標的細胞より抽出したゲノム DNA について、代表的な酸化修飾塩基である 8-OHdG および acrolein-dA に対する抗体を用いて免疫沈降を施行し、それらの酸化的 DNA 損傷のゲノム内分布をアレイ CGH により解析した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a novel method to detect genomic sites harboring DNA damage comprehensively and verified practical effectiveness of the method. We conducted immunoprecipitations with genomic DNA extracted from target cells of ferric nitrilotriacetate-induced rodent renal carcinogenesis model using antibodies against two types of representative oxidative modified bases, 8-OHdG and acrolein-dA, and analyzed genomic distributions of the oxidative DNA damages by the use of array-CGH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：実験動物モデル、ゲノム損傷

1. 研究開始当初の背景

各種のがんにおいて、個々のがん関連遺伝子に変異している頻度は、遺伝子座ごとに異なっている。この理由は、大きく二つが考えられる。一つは、DNA 変異の発生頻度がゲノム内で一様でなく部位ごとに偏りがあるというもので、もう一つは、変異の発生頻度は一様だが、がん発生のための選択圧が遺伝子間で異なるというものである。これまでは一般的に、後者の要因のほうが大きいと考え

られてきた。しかし、例えばがん抑制遺伝子が不活化される場合でも、遺伝子または腫瘍によって、塩基レベルの欠失が染色体レベルの欠失あるいはプロモーターのメチル化など、様々な変異の様式が見られることから、DNA 変異の発生過程そのものに偏りが含まれるという考えも十分に支持される。DNA 損傷は DNA 変異の原因となるため、損傷の生成しやすい遺伝子や損傷の修復されにくい遺伝子は、変異もしやすいと考えられる。

したがって、各種細胞におけるゲノム内での DNA 損傷の分布動態を知ることが、それぞれのがんに固有の発生経路を明らかにするうえで極めて重要となる。

しかしながら、ゲノム部位間での損傷頻度の違いを網羅的に評価するための技術は、現状確立されたものはない。DNA 損傷・修復の研究でこれまでに使われてきた技術では、生化学的な方法の場合は損傷の生成と修復のゲノム全体での収支を見ているだけであり、組織学的・細胞学的方法の場合は損傷・修復の組織および細胞内での空間的な分布を見ているだけでしかない。すなわち、これまでの方法では、損傷への感受性が増加した領域や相対的に修復の遅い領域を、染色体上の位置により同定することは不可能である（そのような領域は、細胞のがん化を防止するためには、特に重要になると考えられる）。私たちは、本研究課題の開始以前に、損傷 DNA を認識する抗体を使用した免疫沈降法（略称：DnaIP）により試料ゲノムから損傷部位を選択的に収集する技術を開発し、その検証結果を報告していた。本研究課題では、ChIP-Chip 法にならって、ゲノムアレイを用いた DNA 免疫沈降産物の網羅的解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、最新のゲノム網羅的方法を用いて、発がん初期過程における DNA 損傷のゲノム内分布動態を解明することを目的とするものである。DNA 損傷は遺伝子変異の原因となるため、そのゲノム内での分布動態を知ることが、がんの発生経路を確定し、予防の方策を講じるうえで重要となる。本研究では、酸化ストレス発がんモデルとして認められている鉄ニトリロ三酢酸誘発げっ歯類腎発がんモデルを使用し、発がん刺激下の細胞における酸化的 DNA 損傷のゲノム内分布を解析する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

正常時および鉄ニトリロ三酢酸腹腔内投与後（酸化ストレス亢進時）のマウス腎組織を採取し、ゲノム DNA を抽出する。分布解析の対象とする投与後のタイムポイントを決めるにあたり、8-オキシグアニンおよびアクロレイン修飾アデニンの組織免疫染色により、DNA 傷害の蓄積量の時間推移を検討した。最も初期の段階としては、細胞死の始まる段階である投与後3時間の標本より抽出したゲノム DNA を解析した。同じ条件につき3個体以上のゲノム検体より解析を実施し、

損傷分布データの個体間での一致性を評価した。

(2) DNA 免疫沈降

2種の酸化損傷 DNA（8-オキシグアニン、アクロレイン修飾アデニン）に対する抗体を使用した。ゲノム DNA を断片化する方法としては、超音波を使用するとアーティファクトして DNA 損傷が生じるため、制限酵素を用いる。以前の検証研究からの改良としては、ゲノム断片化に使用する制限酵素の種類を多くした。これは、制限酵素の切断部位の分布によるバイアスを評価するためである。免疫沈降後の回収 DNA 量は極微量となるため、アダプター付ランダムプライマーを用いた Whole genome amplification (WGA) 法による全断片増幅を行い、マイクロアレイに適用可能なターゲット DNA 量を確保した。

(3) ゲノムアレイ

以前の DnaIP 法の検証研究では、免疫沈降産物である損傷 DNA 断片をクローニングし、ひとつひとつシーケンスを行ってゲノム上へマップしていた。今回は、ゲノムアレイに適用することによりハイスループットなデータ取得を実現した。

Agilent Technologies 社の高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを採用した。CGH (Comparative genomic hybridization) 解析用アレイにより全ゲノムにおける解析を施行した。同じ制限酵素により断片化したゲノムを、免疫沈降産物と同程度に少量から同じく WGA 法で全断片増幅したものをアレイ CGH のリファレンス DNA として用いた。

4. 研究成果

(1) DNA 免疫沈降プロトコルの確立

酸化修飾塩基 (8-OHdG, acrolein-dA など) を特異的に認識する抗体を用いて、制限酵素により断片化したゲノム DNA から免疫沈降を施行し、酸化損傷を含むゲノム断片を選択的に収集する実験プロトコルについて、いくつかの条件検討を行い、評価可能な実験手法として確立した。

① ゲノム試料の一本鎖化の検討

私たちの開発した免疫沈降法はゲノム DNA に対して行い、網羅的な分析には適切な DNA 回収量が必要である。DNA 回収量がゲノム試料の初期量に比例して増えることを、1:5の量比の DNA を使用し回収量について検討した。その結果、DNA 使用量の多い方が 2.4~4.2 倍程度ゲノム断片の回収量が多かった。抗 acrolein-dA モノクローナル抗体を用いた場合のほうが、使用ゲノム DNA

量に対する回収量の割合が、抗 8-OHdG モノクローナル抗体を用いた場合よりも多かった (図 1 A)。また、ゲノム試料を二本鎖 DNA のまま免疫沈降する場合と、一本鎖に変性させてから免疫沈降する場合の比較を行った。結果的に、一本鎖 DNA の場合のほうが二本鎖 DNA の場合より 1.7~7.2 倍程度、免疫沈降での回収 DNA 量が多かった (図 1 B)。

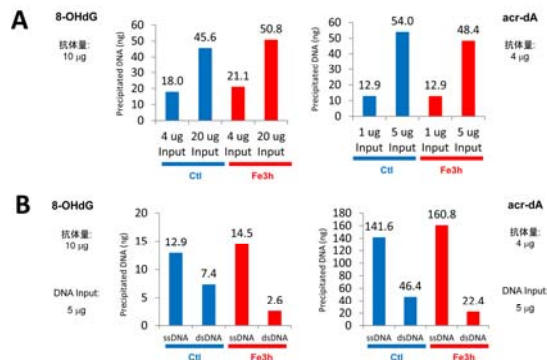


図 1. DNA 免疫沈降の基礎実験 A. 投入 DNA 量に対する回収量の依存性 B. 投入 DNA を一本鎖/二本鎖としたときの比較

この一本鎖/二本鎖での検出量の差は、メンブレン上で抗原抗体反応させるドットプロット法によっても見られており、ゲノム DNA が一本鎖の場合は、抗体が酸化修飾塩基 (抗原) を認識できる部位が二本鎖の場合よりも多くなっていると考えられる。また、一本鎖で免疫沈降を行った場合には、抽出する臓器 (腎臓) が鉄ニトリロ三酢酸投与により酸化ストレス状態にあると、より多くの DNA (酸化損傷を含む断片) が回収される傾向があった。

② ゲノム試料を断片化する制限酵素の検討
 これまでの実験では、HaeIII および RsaI という 4 塩基の配列を認識する II 型制限酵素を用いた。C57BL/6 マウスの無処置と Fe-NTA 投与後の腎臓のゲノム DNA のサンプルを HaeIII または RsaI で処理した後、抗 8-OHdG モノクローナル抗体または抗 acrolein-dA モノクローナル抗体により免疫沈降を行った。8-OHdG では、HaeIII 断片の場合より RsaI 断片の方が明らかに回収量が多くなっており、両制限酵素間での差は Fe-NTA 投与後で小さくなっていった (図 2 A)。Acrolein-dA の場合、無処置時のゲノムでは両制限酵素間で回収量の差はほとんどなく、Fe-NTA 投与後で若干の差が見られた (図 2 B)。

Hae III は二本鎖 DNA を 'GG/CC' という配列の部位で切断するが、ゲノム上で遺伝子が多い領域は GC% が高いことが知られている。GC% が高ければ Hae III の標的となる部位も多くなるので、制限断片は短くなりやすく、制限断片長と遺伝子密度あるいは

RNA 発現量との間には強い負の相関が生じる。一方、Rsa I は 'GT/AC' という形で切断するので、制限断片長と遺伝子密度や RNA 発現量との間に顕著な相関は生じない。

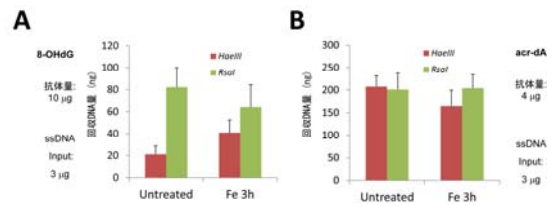


図 2. 使用制限酵素による DNA 免疫沈降回収量の比較 A. 抗 8-OHdG 抗体で免疫沈降したときの HaeIII と RsaI の違い B. 抗 acrolein-dA 抗体で免疫沈降したときの HaeIII と RsaI の違い

(2) 遺伝子密度および遺伝子発現レベルとの相関解析 (CGH アレイによる解析のプロトタイプピング)

アレイ CGH による DNA 免疫沈降産物解析のプロトタイプピングとして、Agilent 社製オリゴヌクレオチドマイクロアレイ (Mouse Genome CGH Microarray 4x180K) による解析を、無処置のマウス 4 匹と Fe-NTA 投与後 3 時間のマウス 4 匹 (計 8 匹) を用いて施行した。1 匹のマウスの腎臓から得たゲノム DNA について、8-OHdG および acrolein-dA に対する免疫沈降の産物をアレイ CGH 解析に用いた。免疫沈降に使用するゲノム DNA の断片化には、HaeIII および RsaI を用いた (それぞれの酵素によるゲノム試料の消化反応液を 1:1 で混合して使用)。結果として、15 (16 のマイクロアレイのうち 1 つが失敗した) の CGH アレイデータが得られた。図 3 に、マウス染色体 4 番と 7 番の CGH プロファイルを示す。

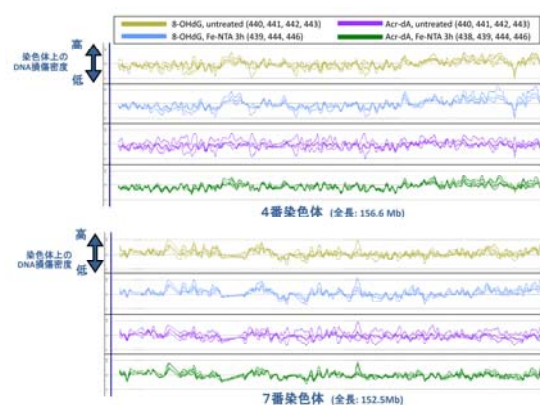


図 3. DNA 免疫沈降産物のアレイ CGH による解析. 例として、マウス 4 番染色体および 7 番染色体のアレイ CGH プロファイルを表示.

8-OHdG に関しては、Fe-NTA の投与前後で、染色体の全領域における 8-OHdG の蓄積

しやすいゲノム部位に大きな違いは現れなかった。acrolein-dA に関しては、Fe-NTA 投与後では染色体の全領域で acrolein-dA の蓄積しやすいゲノム部位の個体間変動が小さいのに対し、無処置の場合では個体間の変動が大きかった。

哺乳類のゲノムにおいて転写単位としての遺伝子は、染色体にそって均等に分布してはいない。ゲノム中の遺伝子密度の高い領域と低い領域では、クロマチン構造、RNA への転写活性、DNA の複製時期などが異なると考えられている。ゲノム上を 100kbp の間隔で刻んだ点の周囲 1Mbp における遺伝子密度と、同じ 1Mbp 範囲で平均化した CGH アレイのシグナル log 比 (DNA 酸化修飾の頻度に対応) との相関関係を分析した。8-OHdG 頻度については、全てのアレイの結果で、遺伝子密度と正の相関関係が見られた。Acrolein-dA 頻度については、1つの例外的なアレイ結果をのぞいて、遺伝子密度と正の相関関係が見られた。

細胞内の遺伝子発現プロファイルは組織によって異なっており、そのことはクロマチン構造の変化の分布も組織によって異なるという仮説につながっている。RNA-seq (次世代シーケンサーによる長鎖 RNA の解析) により得られる発現プロファイルデータは、ゲノム部位間での定量的な比較が可能であるため、DNA 損傷頻度との相関解析に利用することができる。ゲノム上を 100kbp の間隔で刻んだ点の周囲 1Mbp における BPKM score (発現 RNA の割合を対数化したスコア) の総和と、同じ 1Mbp 範囲で平均化した CGH アレイのシグナル log 比 (DNA 酸化修飾の頻度に対応) との相関関係を分析した。8-OHdG 頻度については、全てのアレイの結果で、遺伝子発現活性と正の相関関係が見られた。Acrolein-dA 頻度については、遺伝子発現活性との相関関係は、アレイごとに正の場合と負の場合があり、一定の傾向が見られなかった。

(3) ゲノム断片化に用いる制限酵素種類によるアレイ CGH 解析結果への影響分析 (制限断片長による補正方法の検討)

(2)の解析プロトタイプにおいては、同一実験条件のアレイ結果においても大きなばらつきが見られた。そこで、制限断片長と免疫沈降での回収効率の関係について検討する必要があると考えられたが、(2)の実験では二種の制限酵素による消化物を混合していたため、アレイシグナルと制限断片長の直接の関係分析することができず限界があった。そのため、アレイ解析の試料として HaeIII または RsaI による断片化ゲノム DNA を、それぞれ単独で用いた場合を比較するという検証実験を追加で実施した。無処置のマウ

ス 2 匹から腎臓を採取し、ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を HaeIII または RsaI で処理し、それぞれに別々の免疫沈降を行って、異なるマイクロアレイにより分析した (計 4 アレイ)。

ゲノムの断片化に HaeIII 用いた場合と RsaI を用いた場合で、アレイ CGH の結果が大きく異なることが判明した。HaeIII を使ったサンプルでは、検出された 8-OHdG 頻度の分布は、ゲノム全体として遺伝子密度や遺伝子発現活性と負に相関していた。それに対して、RsaI を使った場合では、遺伝子密度や遺伝子発現活性の分布との相関性はそれほど強くないものの、実施した 2 枚のアレイで相関係数の正負が異なっていた。

マイクロアレイ間でのシグナル補正法を検討するため、マイクロアレイ上の各プローブと対応する制限断片長と、そのプローブでのシグナル log 比の関係性を分析した。HaeIII と RsaI の場合それぞれに、制限断片長は免疫沈降での回収効率に影響を与えており、何らかの方法でその影響を相殺するような補正が必要であることが分かった。相関プロット上から、制限断片長の長さの範囲によって、回収効率への影響が異なっていると考えられたため、便宜的に制限断片長の長さの範囲を 4 つに分割し、それぞれの範囲で直線回帰により補正值を定めた。この補正法により新たに得られた CGH アレイ結果では、元々の CGH アレイ結果と比較して、同一制限酵素および異種制限酵素の結果で、アレイ間のばらつきが小さくおさえられた。すなわち、(2)の解析プロトタイプで得られていた結果についても、制限酵素によるゲノムの切断特性によるバイアスが多く含まれていたものと考えられる。今後は、適切な制限酵素および補正法を選択することで、解析の正確度向上が期待される。

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 5 件)

①Akatsuka S, Toyokuni S. Genome-scale approaches to investigate oxidative DNA damage. J Clin Biochem Nutr. vol. 47 (2010) pp. 91-97. 査読有り

②Ohara H, Akatsuka S, Nagai H, Liu YT, Jiang L, Okazaki Y, Yamashita Y, Nakamura T, Toyokuni S. Stage-specific roles of fibulin-5 during oxidative stress-induced renal carcinogenesis in rats. Free Radic Res. vol. 45 (2011) pp. 211-220. 査読有り

③Akatsuka S, Toyokuni S. Genome-wide assessment of oxidatively generated DNA

damage. Free Radic Res. vol.46(2012)
pp.523-530. 査読有り

④Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu YT, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H, Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagama H, Toyokuni S. Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. PLoS One. vol.7(2012) e43403. 査読有り

⑤赤塚慎也, 豊國伸哉. 酸化ストレスによるゲノム変化と発がん. 実験医学 vol.30(2012) pp.2779-2785. 査読無し

[学会発表] (計7件)

①Akatsuka S. Ferric nitrilotriacetate-induced rat renal cancer exhibits extensive chromosomal instability. 8th International Workshop on Genetic Systems in the Rat (2010年12月3日, 京都大学国際交流ホール[京都市]).

②Akatsuka S. Ferric nitrilotriacetate-induced rat renal cancer exhibits extensive chromosomal instability. 15th Japan-Korea Cancer Research Workshop (2010年12月22日, シェラトン仁川ホテル[仁川, 韓国]).

③赤塚慎也. 鉄ニトリロ三酢酸誘発腎癌モデルを用いた酸化ストレス発がん機構の解析. 第26回発癌病理研究会 (2011年8月29日, ルネッサンスサッポロホテル[札幌市]).

④赤塚慎也. マウス腎発がん過程における

酸化的DNA損傷のゲノム内分布. 第101回日本病理学会総会 (2012年4月26-28日, 京王プラザホテル[新宿区]).

⑤赤塚慎也. マウス腎発がん過程における酸化的DNA損傷のゲノム内分布. 第65回日本酸化ストレス学会学術集会 (2012年6月7-8日, あわぎんホール[徳島市]).

⑥赤塚慎也. マウス腎発がん過程における酸化的DNA損傷のゲノム内分布. 第71回日本癌学会学術総会 (2012年9月20-21日, ロイトン札幌[札幌市]).

⑦赤塚慎也. マウス腎発がん過程における酸化的DNA損傷のゲノム内分布. フォーラム2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2012年10月25-26日, 名古屋観光ホテル[名古屋市]).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤塚 慎也 (AKATSUKA SHINYA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 40437223

(2) 研究分担者

豊國 伸哉 (TOYOKUNI SHINYA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 90252460

(3) 連携研究者なし