

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659533

研究課題名(和文)ヌクレオチド除去修復欠損性日光過敏症のウイルス発現系とゲノム解析による網羅的探索

研究課題名(英文)A rapid, comprehensive system for assaying DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA-damaging reagents

研究代表者

荻 朋男(OGI, Tomoo)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：80508317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復活性を測定する手法の開発は、基礎研究や臨床診断のみならず、抗がん剤の開発などの応用研究にも有用である。本研究では、収集した症例をUDS/RRS、細胞DNA損傷感受性試験、チェックポイント誘導試験などのDNA修復機能を包括的に調査するアッセイ系を確立した。DNA修復機構に關与する遺伝子を発現するレンチウイルスを細胞に感染させ、上記エンドポイントで評価することで、疾患責任遺伝子相補性群の決定が可能である。相補性群が未知であるものについては、次世代ゲノム解析を実施して変異決定を実施する。これら典型的な解析により、患者細胞を受領後、変異同定まで最短で1週間で実施可能であった。

研究成果の概要(英文)：Nucleotide excision repair (NER) is most versatile DNA repair process: it prevents cells from genomic instability as it removes various DNA damages arose in the genome. DNA repair assays that can directly measure NER activities are useful for clinical diagnoses and clinical researches including anticancer drug discovery. Unscheduled DNA synthesis (UDS) and recovery of RNA synthesis (RRS) are two commonly used DNA repair endpoints for assessing the activity of NER. We developed a comprehensive procedure for measuring UDS, RRS and cell-sensitivity by the incorporation of ethynyl-nucleoside analogs (EdU and EU) followed by the click-chemistry reaction.

The developed system is suitable for a virus-based UDS / RRS / cell-sensitivity complementation tests, by which we can systematically determine the pathogenic gene of a patient with defect in the DNA repair pathways. A typical clinical diagnosis, using human primary fibroblast cells, takes less than 1 week.

研究分野：DNA修復・人類遺伝学・皮膚科学

キーワード：ヌクレオチド除去修復

1. 研究開始当初の背景

ヒトの DNA 修復経路の一つ、ヌクレオチド除去修復機構 (nucleotide excision repair: NER)の先天性な欠損は、日光過敏症を示す遺伝性疾患である、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP)やコケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)、紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UV^{SS})などの原因となる。CS 及び UV^{SS} 患者由来の細胞は、メッセンジャー RNA の転写領域に発生した DNA 損傷に対して作用する、転写共役 NER (transcription-coupled NER: TC-NER)が欠損しており、CS と UV^{SS} の両者では、患者細胞の紫外線感受性や DNA 修復活性の欠損は同質である。しかしながら、CS 患者が全身性の症状、各種神経症状や発達障害等の重篤な症状を示すのに対して、UV^{SS} 患者では日光過敏症/そばかす等の皮膚に局所的な病態のみがみられる。UV^{SS} の原因遺伝子は 1990 年代より不明であり、CS と UV^{SS} に見られる細胞応答と病態の矛盾の説明も不可能であった。研究代表者らは 2012 年に、日本人由来の UV^{SS} 症例の全エクソーム解析を実施し、UV^{SS} の新規疾患責任遺伝子変異を KIAA1530 遺伝子に同定し、UVSSA と命名した。UV^{SS} の責任遺伝子同定の過程で、研究代表者らはヌクレオチド除去修復による DNA 修復活性 (unscheduled DNA synthesis: UDS; recovery of RNA synthesis: RRS)を非放射性のエチニル化ヌクレオシド標識により正確に定量する技術開発をおこなった (DNA Repair, 2010 年/研究代表者は責任著者; Nucleic Acids Research, 2009 年/研究代表者は責任著者)。また、研究代表者らは、国内外の皮膚科/遺伝診断ラボに DNA 修復測定技術を提供することで、XP/CS/UV^{SS} 等の DNA 修復欠損性光線過敏症例を多数収集するネットワークの構築をおこなっている。

2. 研究の目的

紫外線により DNA 中に生じた、シクロブタン型ピリミジン 2 量体、6-4 光産物などの光 DNA 損傷を修復する、ヌクレオチド除去修復機構 (NER)は、生物の DNA 修復系の中でも、もっとも多能であり、様々な形状の損傷を DNA 鎖から除去することが可能である。NER の欠損は、色素性乾皮症、コケイン症候群、紫外線高感受性症候群等の種々の日光過敏症を伴うヒトの遺伝性疾患の原因となっている。研究代表者らは、紫外線高感受性症候群の新規責任遺伝子として UVSSA を同定した。本申請研究は、日光過敏症の患者に由来する細胞に、DNA 修復に関連する各種遺伝子を発現するレンチウイルスを感染させるウイルス相補性試験により網羅的に解析する。これまでに収集した日光過敏症例のうち、責任遺伝子が同定されていない NER 欠損性疾患症例を抽出し、それらについてゲノム解析を実施することで新規 NER 関連遺

伝子を発見することを目標としている。

3. 研究の方法

研究は、以下のサブテーマについて平行して実施した。

(1)国内外の臨床医と共同で、XP や CS、UV^{SS} を中心に、「NER 欠損性を示す日光過敏症」患者に由来する初代培養細胞を継続的に収集して、セルバンク化する。

(2)既知の NER 機構に作用する遺伝子 (cDNA)を発現するレンチウイルスライブラリーを作製する。これらを先述の NER 欠損性疾患患者に由来する細胞に感染させ、NER の指標となる、UDS/RRS 活性を測定するウイルス相補性試験を実施することで、既知の NER 遺伝子が疾患責任遺伝子であるかを迅速に判定する臨床診断システムを構築する。

(3)上述の検査により、既知の NER 関連遺伝子の変異が疾患の責任ではないと考えられるケースについて、順次、次世代ゲノム解析を実施することにより、新規 NER 因子関連遺伝子を探索する。

4. 研究成果

DNA 修復システムはゲノムの不安定化と発がんを抑制するため、DNA 修復活性を測定する手法の開発は、基礎研究や臨床診断のみならず、抗がん剤の開発などの応用研究にも有用である。NER は DNA 修復機構の主要経路の一つであるが、これは不定期 DNA 合成 (unscheduled DNA synthesis: UDS)と RNA 合成回復 (recovery of RNA synthesis: RRS)の 2 つの試験法により評価される。UDS は、DNA 修復に伴う非常に微量の DNA 合成を定量する手法で、これまでは放射性同位体を用いたアッセイ方法でのみ定量が可能であった。本研究で我々は、臨床診断用途に適した非放射性 (エチニル化合物と蛍光アジ化物のカップリング反応を利用する)の、包括的かつ、簡便で高精度な UDS/RRS アッセイ技術の開発に取り組み、実際に皮膚科臨床研究室と共同で、疾患責任遺伝子変異が未知である XP と CS の責任遺伝子、責任変異の決定に適用した。開発した手法は、UDS/RRS 活性の測定のみならず、S 期の DNA 合成を指標とすることで、細胞の DNA 損傷感受性を測定することが可能である。

これらの DNA 修復活性に関する細胞機能アッセイと、ゲノム解析を併用することで臨床診断の包括的プロトコルを作成した (Jia *ら* Nature Protocol, 2015)。本システムでは、まず収集した症例は、UDS/RRS、細胞 DNA 損傷感受性試験、チェックポイント誘導試験をおこない、機能欠損のある DNA 修復機構の決定を試みる。この結果、細胞レベルでのエンドポイントが確立される。その後、既知の DNA 修復機構に関連する遺伝子を発現するレンチウイルスを個別に細胞に感染させ、上述したエンドポイントで評価することで、疾患責任遺伝子相補性群を決定する。この結

果、相補性群が未知であるものについては、次世代ゲノム解析を実施して変異決定を試みる。典型的な解析は、細胞を受領後、変異決定まで最短で1週間で実施可能であった。

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 8 件)

1. Jia N., Nakazawa Y., Guo C., Shimada M., Sethi M., Takahashi Y., Ueda H., Nagayama Y. & Ogi T.* A rapid comprehensive assay system for DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA damaging reagents by measuring unscheduled DNA synthesis and recovery of RNA synthesis after DNA damage. **Nature Protocols** 10, 12-24 (2015) 査読有
doi: 10.1038/nprot.2014.194.
2. Baple E.L., Chambers H., Cross H.E., Fawcett H., Nakazawa Y., Chioza B.A., Harlalka G.V., Mansour S., Sreekantan-Nair A., Patton M.A., Muggenthaler M., Rich P., Wagner K., Coblenz R., Stein C.K., Last J.I., Taylor A.M., Jackson A.P., Ogi T., Lehmann A.R., Green C.M.* & Crosby A.H.* Hypomorphic PCNA mutation underlies a human DNA repair disorder. **Journal of Clinical Investigation** 124, 3137-3146 (2014) 査読有
doi: 10.1172/JCI74593.
3. Woodbine L., Neal J.A., Sasi N.K., Shimada M., Deem K., Coleman H., Dobyys W.B., Ogi T., Meek K.*, Davies E.G.* & Jeggo P.A.* PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. **Journal of Clinical Investigation** 123, 2969-2980 (2013) 査読有
doi: 10.1172/JCI67349.
4. Kashiya K., Nakazawa Y., Pilz D., Guo C., Shimada M., Sasaki K., Fawcett H., Wing J., Lewin S., Carr L., Li T.S., Yoshiura K., Utani A., Hirano A., Yamashita S., Greenblatt D., Nardo T., Stefanini M., McGibbon D., Sarkany R., Fassihi H., Takahashi Y., Nagayama Y., Mitsutake N., Lehmann A.R.* & Ogi T.* Malfunction of Nuclease ERCC1-XPF Results in Diverse Clinical Manifestations and Causes Cockayne Syndrome, Xeroderma Pigmentosum, and Fanconi Anemia. **American Journal of Human Genetics** 92, 807-819 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.007.
5. Matsuse M., Mitsutake N.*, Tanimura S., Ogi T., Nishihara E., Hirokawa M., Fuziwara C.S., Saenko V.A., Suzuki K., Miyachi A. & Yamashita S. Functional characterization of the novel BRAF complex mutation, BRAF(V600delinsYM), identified in papillary thyroid carcinoma. **International Journal of Cancer** 132, 738-743 (2013) 査読有、doi: 10.1002/ijc.27709.
6. Ogi T.*, Walker S., Stiff, T. Hobson E., Limsirichaikul S., Carpenter G., Prescott K., Suri M., Byrd P.J., Matsuse M., Mitsutake N., Nakazawa Y., Vasudevan P., Barrow M., Stewart G.S., Taylor A.M.R.*, O'Driscoll M.* & Jeggo P.A.* Identification of the First ATRIP-Deficient Patient and Novel Mutations in ATR Define a Clinical Spectrum for ATR-ATRIP Seckel Syndrome. **PLoS Genetics** 8, e1002945 (2012) 査読有
doi: 10.1371/journal.pgen.1002945.
7. Nakazawa Y., Sasaki K., Mitsutake N., Matsuse M., Shimada M., Nardo T., Takahashi Y., Ohyama K., Ito K., Mishima H., Nomura M., Kinoshita A., Ono S., Takenaka K., Masuyama R., Kudo T., Slor H., Utani A., Tateishi S., Yamashita S., Stefanini M., Lehmann A.R., Yoshiura K.I. & Ogi T.* Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. **Nature Genetics** 44, 586-592 (2012) 査読有、doi: 10.1038/ng.2229.
8. Kashiya K., Mitsutake N.*, Matsuse M., Ogi T., Saenko V.A., Ujifuku K., Utani A., Hirano A. & Yamashita S. miR-196a Downregulation Increases the Expression of Type I and III Collagens in Keloid Fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology** 132, 1597-1604 (2012) 査読有
doi: 10.1038/jid.2012.22.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Ogi T. 「Molecular cloning and characterisation of new human DNA repair genes」 The 9th 3R Symposium 2014年11月17日～21日、御殿場高原ホテル (静岡県御殿場市)
2. 荻 朋男 「ゲノム不安定性疾患群の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析」 第57回日本甲状腺学会学術集会 2014年11月14日
コングレコンベンションセンター (大阪府大阪市)
3. 荻 朋男 「ヒストン H3K9 メチル化酵素類の DNA 二重鎖切断修復反応への関与」 第87回日本生化学会大会 シンポジウム 2014年10月15日～18日 国立京都国際会館 (京都府京都市)
4. 荻 朋男 「転写共役ヌクレオチド除去修復の開始反応の分子機構」 日本放射線影響学会第57回大会 2014年10月1日～3日 鹿児島県民交流センター (鹿児島県鹿児島市)
5. 荻 朋男 「DNA 修復機構の異常により発症する先天性疾患とゲノム不安定性/発がん」 第20回日本家族性腫瘍学会学術集会 2014年6月13日
コラッセ福島 (福島県福島市)
6. Ogi T. 「Transcription, DNA damage and Repair」 International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases 2014年3月5日～7日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
7. Ogi T. 「Molecular cloning and characterisation of human DNA repair genes.」 The International Kick-Off Symposium for Atomic Bomb Disease Institute at Nagasaki University 2013年11月28日 長崎大学医学部良順会館 (長崎県長崎市)
8. 荻 朋男 「紫外線高感受性症候群～UVSSA 遺伝子の発見と病態解析」 第22回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2013年11月20日～22日 ホテルニュー水戸屋 (岩手県仙台市)
9. Ogi T. 「Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polIIo processing.」 11th International Conference on Environmental Mutagens ICEM 2013年11月3日～8日、Foz do Iguassu (Brazil)
10. 荻 朋男 「紫外線高感受性症候群～UVSSA 遺伝子の発見と病態解析」 日本美容皮膚科学会・学術大会 2013

年8月10日～11日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

11. 荻 朋男 「DNA 修復欠損性遺伝性疾患の責任因子の検索と分子機構の解析」 日本環境変異原学会 第26回夏の学校 2013年6月22日～23日 アイブラザー宮 (愛知県一宮市)
12. 荻 朋男 「放射線・紫外線による染色体 DNA 損傷修復の分子基盤」 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日～14日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
13. Ogi T. 「Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair.」 3R International Symposium 2012年11月25日～28日 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)
14. 荻 朋男 「転写共役修復と紫外線高感受性症候群」 BIO JAPAN 2012年10月10日～12日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
15. 荻 朋男 「紫外線高感受性症候群責任因子 UVSSA による損傷停止 RNA ポリメラーゼのコピキチン化修飾メカニズムの解析」 日本遺伝学会第84回大会 2012年9月24日～26日 九州大学医学部 百年講堂・同窓会館 (福岡県福岡市)
16. Ogi T. 「Molecular cloning and characterisation of KIAA1530/UVSSA, the responsible gene for UV sensitive syndrome complementation group-A.」 The 11th Surugadai International Symposium - the MRI Joint Research Symposium 2012年7月31日 東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂 (東京都文京区)
17. 荻 朋男 「紫外線感受性症候群責任遺伝子 UVSSA の同定と分子機能解析」 日本皮膚科学会 2012年4月8日 長崎大学(長崎県長崎市)

〔図書〕(計 2 件)

1. 荻 朋男*, 中沢 由華, 佐々木 健作, 郭 朝万, 吉浦 孝一郎, 宇谷 厚志, 永山 雄二. 紫外線高感受性症候群責任因子 UVSSA の分子機能解析. 生化学 85, 日本生化学会, 133-144 (2013)
2. 荻 朋男*, 中沢 由華, 吉浦 孝一郎, 宇谷 厚志, 永山 雄二. 紫外線高感受性症候群. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.19 先天代謝異常症候群 (第2版)(上), 日本臨床社, 670-674 (2012)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nrgic.prj.nagasaki-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻 朋男 (OGI, Tomoo)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：80508317

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：