

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790895

研究課題名(和文)色素性乾皮症A群患者の神経障害に及ぼす酸化的DNA損傷サイクロプリンの役割

研究課題名(英文) Possible contribution of oxidative DNA damage 8,5'-purine cyclodeoxynucleosides to progressive neurodegeneration of xeroderma pigmentosum

研究代表者

岩本 顕聡 (Iwamoto, Takaaki)

奈良県立医科大学・医学部・研究助教

研究者番号：20448773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復欠損遺伝病である色素性乾皮症A群(XP-A)における進行性の神経障害が酸化的DNA損傷サイクロプリンの蓄積による神経細胞死と関係するか明らかにするため、同損傷に対するモノクローナル抗体(CdA-1)を作製した。性能解析の結果、抗体はサイクロプリンの内cyclo-dA(cdA)に特異的に結合することがわかった。また、本抗体を用いた測定系により、フェントン反応処理DNA中のcdAの定量測定が可能となった。さらに、cdAオリゴ導入ヒト細胞中のcdAの蛍光免疫染色も可能となった。XP-Aマウス肝臓DNA中に対照より多量のcdA蓄積が測定できるようになり、本格実験への準備が完了した。

研究成果の概要(英文)：Xeroderma pigmentosum A group (XP-A) patients develop progressive neurological disease, which has been hypothesized to be associated with the accumulation of a type of oxidative DNA damage called purine 8,5'-cyclo-2'-deoxynucleosides. Thus, we generated a monoclonal antibody (CdA-1) specific for 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine (cyclo-dA). An immunoassay using CdA-1 revealed a linear dose response between known amounts of cyclo-dA in oligonucleotides and the antibody binding to them. The quantitative immunoassay revealed that treatment with Fenton-type reagents dose-dependently produces cyclo-dA in DNA. Moreover, immunofluorescent analysis enabled the visualization of cyclo-dA in human cells, which had been transfected with oligonucleotides containing cyclo-dA. Thus, the CdA-1 antibody is a valuable tool for the detection and quantification of cyclo-dA in DNA, and may be useful for characterizing the mechanism(s) underlying the development of XP neurological disease.

研究分野：神経病態免疫学

キーワード：酸化的DNA損傷サイクロプリン 色素性乾皮症 ヌクレオチド除去修復 神経障害

### 1. 研究開始当初の背景

紫外線誘発ピリミジン二量体型 DNA 損傷や化学変異物質による DNA 付加体など、二重鎖 DNA 構造を大きく歪ませる損傷はヒト細胞ではヌクレオチド除去修復 (NER) 依存的に修復される。NER を欠損する代表的遺伝病は色素性乾皮症 (XP) であり、その中で最も重篤な症状を呈する A 群 (XP-A) の患者数は日本が世界最大である。XP-A 患者は太陽光露光部に超高頻度に皮膚がんを発症するが、太陽光被ばくを防止すれば発症を回避できる。しかし、運動失調や知能低下などの神経障害を防止する手立てはなく進行性に確実に増悪する。有効な治療法はなく、発症機序も不明なため、平成 19 年度に厚生労働省「難治性疾患克服研究事業」の対象疾患に指定された。神経障害発症の仮説として、内因性の NER 依存型 DNA 損傷の経年蓄積およびその転写阻害による神経細胞死が考えられており (Andrews et al. Proc Natl Acad Sci 75, 1984, 1978)、酸化的 DNA 損傷サイクロプリン (図 1) がその有力候補である。しかし、サイクロプリンの簡便な検出法は開発されておらず、研究者は研究したくてもできない状況にある。現在 LC-MS/MS 法が唯一稼働しているが、高額機器および同位体標識標準試薬等を必要とするため、世界の 2~3 グループの利用に限定されている。また、測定にはサンプル DNA のヌクレオシドへの分解が必須なため、脳切片上の損傷を可視化することもできない。そこで、我々はサイクロプリン特異モノクローナル抗体の作製に挑戦し、8 年の努力の結果、遂に作製に成功した。

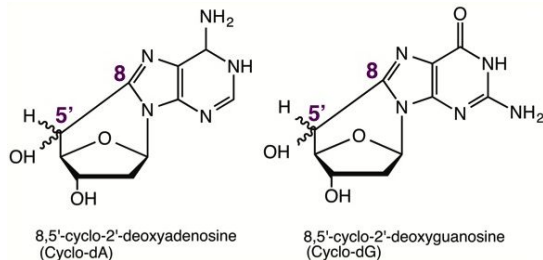


図 1

### 2. 研究の目的

我々は、紫外線誘発ピリミジン二量体 (3 種類)、アセチルアミノフルオレン-DNA 付加体、および不飽和型エストロゲン-DNA 付加体に特異的なモノクローナル抗体を世界に先駆けて開発し、ELISA や蛍光免疫染色に応用してきた (Okahashi et al, Nucleic Acid Res 38, e133, 2010 など)。こうした伝統技術をベースに、世界で初めて作製に成功したサイクロプリン特異的モノクローナル抗体 CdA-1 の性能を明らかにする。さらに、XP-A マウス組織、XP-A 患者剖検脳組織中のサイクロプリンの可視化や定量測定の技術を開発し、その損傷の蓄積が神経障害の発症に関係しているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) エピトープの決定

(5' S)-cyclo-dA、(5' R)-cyclo-dA、紫外線照射 DNA、AAF-DNA-oligo、8-oxo-dA-oligo、正常 DNA を用いて、CdA-1 が DNA 中の cyclo-dA に特異的に結合するかを ELISA 法による競合阻害実験で確認する。

(5' S)-cyclo-dG、(5' R)-cyclo-dG、(dG)<sub>20</sub>、(dC)<sub>20</sub>、(dT)<sub>20</sub>、正常 DNA に X 線を窒素環境下で 1000Gy 照射し、CdA-1 が DNA 中の cyclo-dG に特異的に結合するかを ELISA 法 [1] で確認する。

#### (2) フェントン型反応で処理した DNA 中のサイクロプリンの測定

calf thymus DNA 500μg に CuCl<sub>2</sub> (25-200μM)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-1600μM)、Ascorbate (0-16mM) を加え、3 または 24 時間処理する。EtOH による DNA 抽出後、検量線用サンプルと同量の DNA を 96 穴プレート (0.003% プロタミン処理済) にコーティングし、CdA-1 を用いた ELISA 法 [1] で DNA 中のサイクロプリンの定量を行う。

#### (3) 細胞組織中のサイクロプリンの可視化

U2OS 細胞 (ヒト骨肉腫) 2 × 10<sup>5</sup> cells を 35mm glass bottom dish に植え、24 時間培養した。(5' S)-cyclo-dA-oligo あるいは control-oligo 各々 10μg を細胞に導入後、細胞を固定し、CdA-1 を用いた蛍光免疫染色を行う。

厚生労働省「難治性疾患克服研究事業」の XP 研究班班員 (東京都医学総合研究所・林雅晴先生) から種々の年齢の XP-A 患者および健康人の剖検脳組織切片の提供を受けた。これら脳組織切片において、前述の蛍光免疫染色を行う。

#### (4) XP-A マウス組織中のサイクロプリンの測定

中根裕信先生 (鳥取大学・医学部) から、種々の年齢 (5 ヶ月齢、6 ヶ月齢、24 ヶ月齢、25 ヶ月齢、29 ヶ月齢) の XP-A マウスおよび野生型マウスの組織 (肝臓、腎臓、脳、精巣) を提供された。これらの組織から DNA を抽出し、検量線用サンプルと同量の DNA を 96 穴プレートにコーティングし、ELISA 法 [1] あるいは [2] を行う。

#### (5) ELISA 法による競合阻害実験

(5' S)-cyclo-dA-oligo 5ng を 96 穴プレートにコーティングする。2% FBS でブロッキングを行い、CdA-1 (希釈率 1/20000; 溶媒 1M NaCl 含有 PBS) に (5' S)-cyclo-dA、(5' R)-cyclo-dA、紫外線照射 DNA、AAF-DNA-oligo、8-oxo-dA-oligo、あるいは正常 DNA (各々 1, 10, 100, 1000ng/well) のいずれかを加え競合反応させる。つづいて、Biotin 標識二次抗体 (希釈率 1/2000) および AMDEX-Streptavidin-HRP (希釈率 1/2500; 溶媒 3% BSA, 1% Tween20, ×1 PBS) を加え

37、30min 反応させる。2M 硫酸で反応停止し、OD492nm で測定した後、阻害率を算出する。

(6)ELISA 法[1]

検量線用 DNA、フェントン型反応処理 DNA や X 線照射 DNA、各々500ng を 96 穴プレートにコーティングする。2% FBS でブロッキングを行い、CdA-1 (希釈率 1/10000; 溶媒 1M NaCl 含有 PBS)、Biotin 標識二次抗体 (希釈率 1/2000; 溶媒 × 1 PBS)、および AMDEX-Streptavidin-HRP (希釈率 1/2500; 溶媒 3% BSA, 1% Tween20, × 1 PBS) を加え 37、30min 反応させた後、2M 硫酸で反応を停止し、OD492nm で測定する。

(7)ELISA 法[2]

検量線用 DNA、および組織から抽出したゲノム DNA の各々1μg を 96 穴プレート(0.003% プロタミン処理済)にコーティングする。2% FBS でブロッキングを行い、CdA-1 (希釈率 1/30000; 溶媒 × 1 PBS)、Biotin 標識抗体 (希釈率 1/500; 溶媒 × 1 PBS)、および Streptavidin-poly HRP80 (希釈率 1/5000; 溶媒 3% BSA, 1% Tween20, × 1 PBS) を加え 37、30min 反応させた後、2M 硫酸で反応を停止し、OD492nm で測定する。

(8)蛍光免疫染色法

U2OS 細胞を 4%ホルマリンで固定後、0.5% TritonX-100 で浸透処理を行う。20% FBS でブロッキング後、CdA-1 (希釈率 1/20000; 溶媒[1M NaCl+GM]) および Alexa488 標識抗体 (希釈率 1/200; 溶媒 × 1 PBS) で cyclo-dA を染色する。また、Alexa594-phalloidin 抗体 (7units; 溶媒 × 1 PBS) および DAPI (0.05μg/ml; 溶媒 × 1 PBS) を用いて、細胞質および細胞核を染色する。

4. 研究成果

(1)CdA-1 抗体の性能解析

抗体産生細胞の培養上清を約 20 倍濃縮したモノクローナル抗体溶液を本研究のすべての実験に使用した。

まず、CdA-1 のより詳細な性能解析を行った。タイピングキットを用いて CdA-1 のクラス・サブクラスを測定した結果、IgG2a・鎖であることがわかった。次に、抗体の結合特異性を ELISA 法で検討した。CdA-1 は抗原に用いた(5' S)-cyclo-dA だけでなく、異性体の(5' R)-cyclo-dA にも強く結合した。しかし、(5' S)-cyclo-dG、(5' R)-cyclo-dG、(dA)<sub>20</sub>、(dG)<sub>20</sub>、(dC)<sub>20</sub>、(dT)<sub>20</sub>、紫外線照射 DNA、AAF-DNA-oligo、8-oxo-dA-oligo、および正常 DNA には結合しないことがわかった (図 2)。

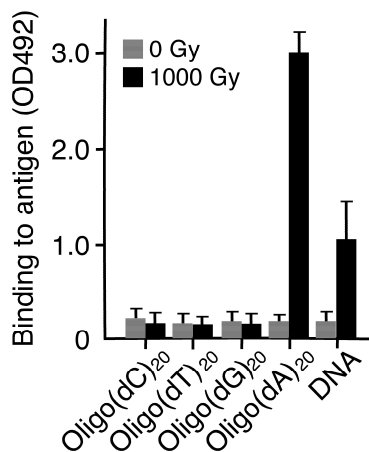
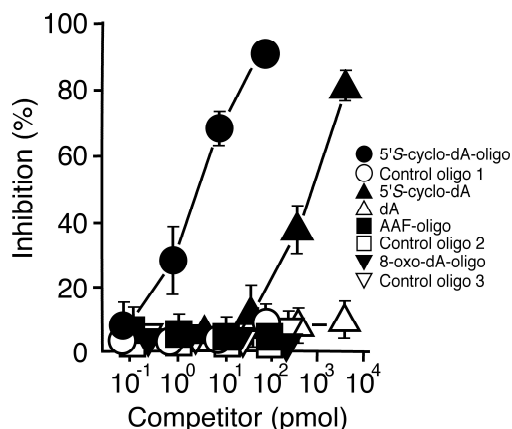


図 2

(2)サイクロプリン検量線の作成

次に、cyclo-dA の定量測定系の確立に取り組んだ。20mer のオリゴヌクレオチドを用いて ELISA[1]で定量測定を行った結果、CdA-1 は損傷量に正比例に結合量を増加させ、10<sup>5</sup>塩基中 1 個の損傷の検出が可能であることがわかった (図 3)。

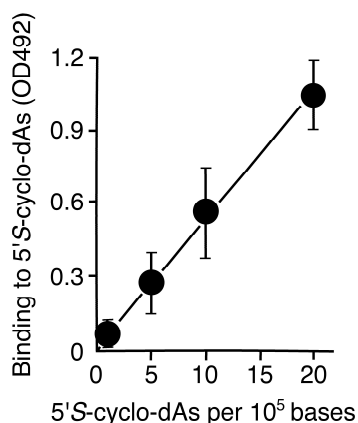


図 3

(3)フェントン型反応で処理した DNA 中のサイクロプリンの定量測定

検量線を用いたサイクロプリンの定量測定を試みた。効率よく損傷を形成させるためにフェントン型反応を利用した。裸の DNA に CuCl<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、および Ascorbate を処理する

と、cyclo-dA が濃度依存的に誘発され、最大 $10^5$ 塩基中70個まで増加した(図4)。

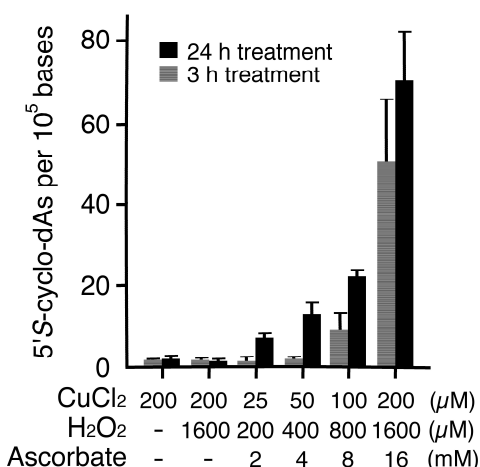


図4

#### (4)細胞中のサイクロプリンの可視化

(5' S)-cyclo-dA-oligo あるいは control-oligo を導入したU2OS細胞の蛍光免疫染色を行った。結果、細胞質内に(5' S)-cyclo-dA-oligo がドット状に染色された(図5)。

XP-A 患者および健常者由来の剖検脳組織切片を使用した実験は、まだ抗原賦活化など基本的条件設定の段階である。

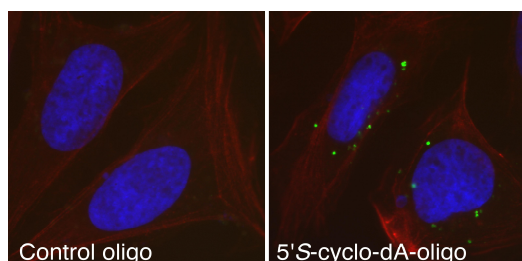


図5

#### (5)XP-A マウス組織中のサイクロプリンの定量

種々の年齢のXP-A および野生型マウスの臓器(肝臓、腎臓、精巣、脳)中のcyclo-dAの測定をELISA法[1]で試みた。その結果、いずれの臓器でも、対応するマウス間でcyclo-dA蓄積量の有意な差異は見られなかった。しかしながら、検出感度を約10倍増強したELISA法[2]を用いて、肝臓中のcyclo-dAを再測定した結果、XP-Aマウスは野生型マウスに比べ蓄積量が多いことがわかった。

今後、XP-Aマウスの残りの臓器(腎臓、精巣、脳)におけるcyclo-dAの再測定を試みる。

#### 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3件)

1) T. Iwamoto, P.J. Brooks, T. Nishiwaki, K. Nishimura, N. Kobayashi, S. Sugiura and T. Mori

Quantitative and in situ detection of oxidatively generated DNA damage 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine using an immunoassay with a monoclonal antibody  
Photochem. Photobiol., 90, 2014, 829-836,  
査読あり  
DOI:10.1111/php.12239.

2) 森 俊雄、岩本顕聡

DNA 損傷特異的モノクローナル抗体  
放射線生物研究、47、2012、112-125、  
査読あり

3) S. Somekawa, K. Imagawa, H. Hayashi, M. Sakabe, T. Ioka, G.E. Sato, K. Inada, T. Iwamoto, T. Mori, S. Uemura, O. Nakagawa, and Y. Saito

Tmem100, an ALK1 signaling-dependent gene essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109, 2012, 12064-12069, 査読あり  
DOI:10.1073/pnas.1207210109.

[学会発表](計4件)

1) 森 俊雄、岩本顕聡、小林信彦、杉浦重樹  
新規モノクローナル抗体を用いた酸化的DNA損傷サイクロプリンの定量測定と可視化

日本放射線影響学会第57回大会、鹿児島  
2014年10月1日~2014年10月3日

2) T. Iwamoto, P.J. Brooks, N. Kobayashi, S. Sugiura and T. Mori

Quantitative and in situ detection of oxidatively generated DNA damage 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine using an immunoassay with a monoclonal antibody  
16<sup>th</sup> International Congress on Photobiology, Cordoba, Argentina,  
2014年9月8日~2014年9月12日

3) 岩本顕聡、P.J. Brooks、小林信彦、杉浦重樹、森 俊雄

新規モノクローナル抗体を用いた酸化的DNA損傷サイクロプリンの定量測定と可視化  
第36回大会日本光医学光生物学会、大阪  
2014年7月25日~2014年7月26日

4) T. Iwamoto, P.J. Brooks, N. Kobayashi, S. Sugiura and T. Mori

Quantitative and in situ detection of oxidatively generated DNA damage 8,5' -cyclo-2' -deoxyadenosine using an immunoassay with a monoclonal antibody  
International symposium on xeroderma pigmentosum and related diseases: Disorders of DNA damage response-Bench to bedside-, 神戸  
2014年3月5日～2014年3月7日

(4)研究協力者  
P.J. Brooks  
中根 裕信 (Nakane Hironobu)  
林 雅晴 (Hayashi Masaharu)

〔図書〕(計 0 件)

〔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  
奈良県立医科大学・ラジオアイソトープ実験施設  
<http://www.narmed-u.ac.jp/university/kenkyu-sangakukan/radioisotope/radioisotope.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

岩本 顕聡 (Iwamoto Takaaki)  
奈良県立医科大学・先端医学研究機構・  
研究助教  
研究者番号：20448773

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：