

## 56. DNA 損傷修復の異常と発がん/老化の関係

萩 朋男

Key words : DNA 修復, ゲノム不安定性

\*長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科  
附属原爆後障害医療研究施設  
社会医学部門  
放射線災害医療研究分野

### 緒言

ゲノム DNA を安定に維持し、伝達するには、DNA 修復機構が正常に機能する事が重要である。DNA 修復メカニズムの異常は、ゲノム不安定性を引き起こし、発がんや老化の原因となると考えられる。これは、DNA 修復機構の異常により発症する疾患から予測されることであり、例えば、ヌクレオチド除去修復機構 (nucleotide excision repair: NER) の欠損に起因するヒト遺伝性疾患として、皮膚がんを発症する色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP)、早期老化を示すコケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)、日光過敏が見られる紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UV<sup>S</sup>S) 等がある。また、DNA 鎖間架橋修復の異常により、発がん性を示すファンコーニ貧血 (Fanconi anemia: FA) など知られている。このようなゲノム不安定性を示す遺伝性疾患の責任遺伝子探索・解析から、多くの DNA 修復因子が同定され、そのメカニズム解明に貢献してきた。

研究代表者らは、DNA 修復機構の異常により発症するヒトの先天性疾患を対象として、新規疾患責任遺伝子の同定とその機能解析に取り組んできた。その結果、DNA 修復欠損を検証するスクリーニング法を確立し<sup>1-3)</sup>、過去4年で6つの新規疾患責任遺伝子変異を同定・報告してきた<sup>4-8)</sup>。

本研究において、DNA 損傷誘発がんと老化の分子メカニズムの理解を深めるため、国内外の DNA 修復機構欠損疑い症例を追加収集し、新たな疾患責任遺伝子変異同定に取り組んだ。

### 方法

#### 1. 新規疾患責任遺伝子変異の同定

DNA 修復欠損が疑われる先天性の症例を収集し、細胞レベルの DNA 修復活性を指標としたスクリーニングと次世代ゲノム解析を併用する事により、新規疾患責任変異同定を試みた。DNA 修復活性の評価には、紫外線照射後の DNA 修復合成の量を計測する事により、ゲノム全体で働く NER (GG-NER) の活性を特異的に調べる、UDS (unscheduled DNA synthesis) 評価や、DNA 損傷により停止した RNA 合成の再開を測定する事により、転写と共役した NER (TC-NER) の活性を調査する RRS (recovery of RNA synthesis) 評価、放射線照射に伴う DNA 損傷量の経時的变化を、リン酸化 H2AX ( $\gamma$  H2AX) を指標として計測する方法など、様々な評価法を使用した。これらにより、DNA 修復活性に何らかの異常が見られた検体に関して、まずは既知の疾患責任遺伝子変異の有無を確認した。既知の疾患遺伝子変異が見つからなかった症例に関して、当ラボ所有の次世代シーケンサー MiSeq/HiSeq (イルミナ社) を用いて、エキソーム解析を実施した。次世代ゲノム解析によって、多数の疾患責任遺伝子候補が得られたが、それぞれの遺伝子を個別に、レンチウイルスを用いて患者由来細胞に導入する事で、欠損していた DNA 修復活性が回復するかを指標として、疾患責任遺伝子同定を行った (ウイルス相補性試験)。

\*現所属：名古屋大学 環境医学研究所 発生遺伝分野

## 2. 新規疾患責任遺伝子変異の機能解析

本研究で新たに同定した疾患責任遺伝子は、DNA二重鎖切断修復に関わる *XRCC4* であり、疾患原因変異の機能異常を中心に解析した。まず、ウエスタンブロット法および免疫染色法により、変異蛋白質の発現を確認した。次に、IP および質量分析法により、野生型と変異型において相互作用に変化のある蛋白質群を調査した。さらに、相互作用因子および野生型/変異型蛋白質を精製し、*in vitro* でDNA修復における機能異常を調査した。

## 結果および考察

### 1. 新規疾患責任遺伝子変異の同定

DNA修復活性を指標としたスクリーニングにより、放射線に感受性を示す症例が抽出された。その中の1症例は、小頭症や発達異常を示し、現在車いす生活である。本症例に関して、エキソーム解析により、いくつかの有力な責任遺伝子候補を得たが、ウイルス相補性試験により、*XRCC4* を同定した。通常、正常細胞では、放射線照射後DNA損傷量は急激に増加し、時間とともに低下するが、本症例では損傷が長く残る事が示された。しかし *XRCC4* の野生型 cDNA を導入する事により、DNA損傷量が正常細胞程度に減少する事が確認された (図1)。

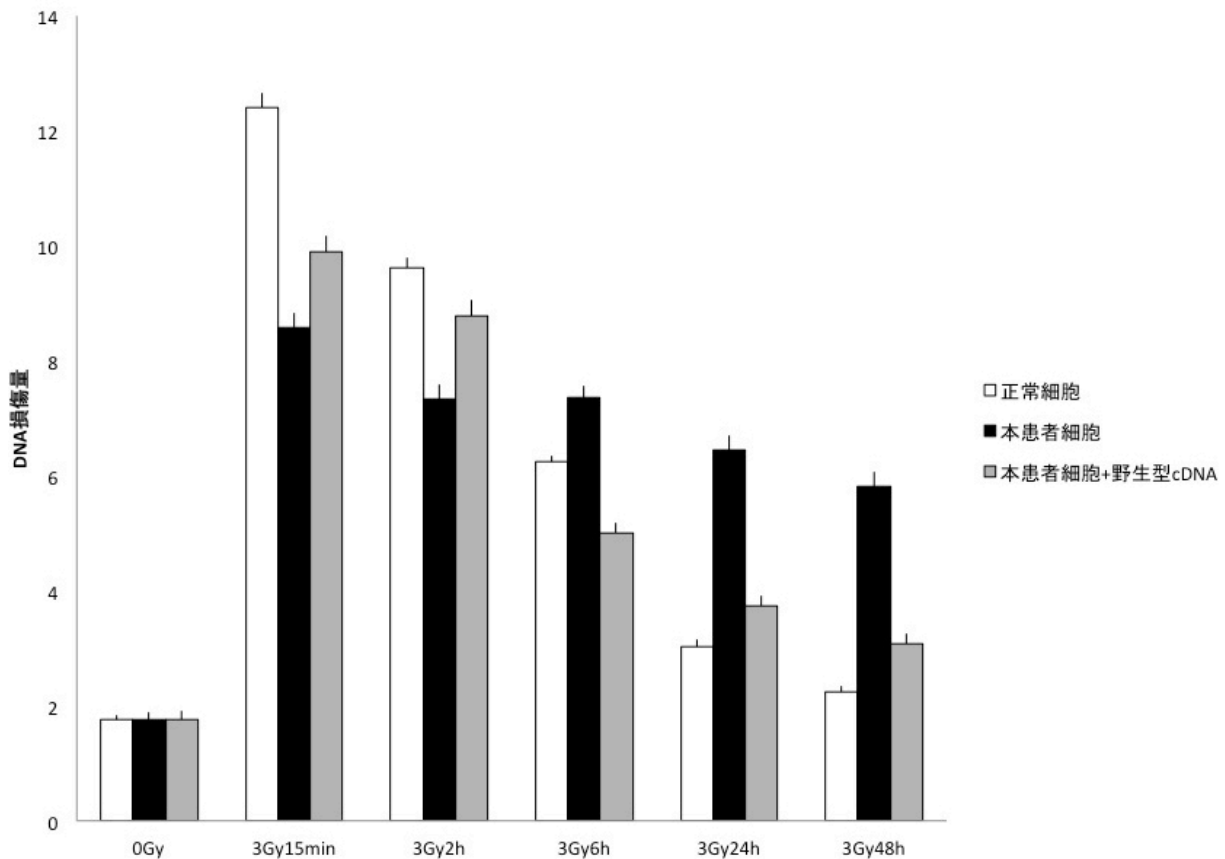


図1. ウイルス相補性試験.

$\gamma$ 線 (3Gy) 照射後、表示の時間におけるDNA損傷量を  $\gamma$ H2AX の foci 数を指標に評価した。正常細胞 (白) に比べ、患者細胞 (黒) ではDNA損傷が48時間でも多く残る。レンチウイルスを用いて *XRCC4* の野生型 cDNA を導入する事により、修復活性の回復が見られる (灰)。

## 2. 新規疾患責任遺伝子変異の機能解析

ウエスタンブロット法により患者由来細胞における XRCC4 の発現を確認したところ、発現量の低下が見られた (図 2). 免疫染色法により、患者由来細胞での XRCC4 の発現を調査したところ、核内での発現が非常に低下しているのが確認された (図 3). その一方で、細胞質での分布も確認されたことから、プロテアソームによる分解を疑った. そこで、プロテアソーム阻害剤である MG-132 を添加したところ、XRCC4 の分解抑制が確認された (ウエスタンブロット法および免疫染色法).

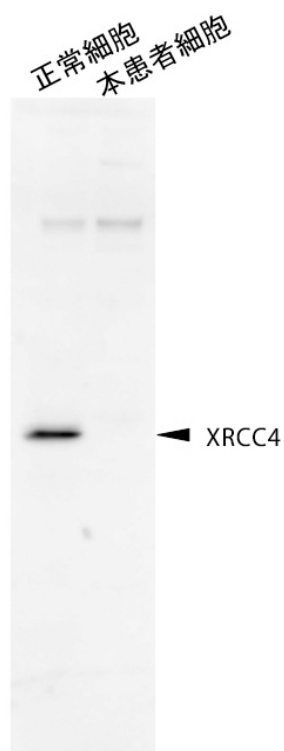


図 2. ウエスタンブロット法による XRCC4 の発現確認.

患者細胞では XRCC4 の発現量が、正常細胞と比べて低下している (矢印).

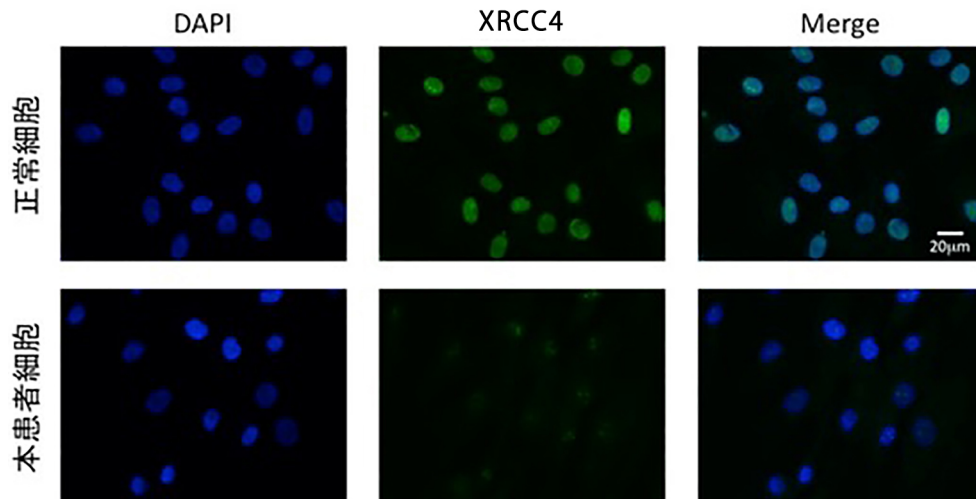


図3. 免疫染色法による XRCC4 の発現確認.

患者細胞では XRCC4 の発現量が、正常細胞と比べて低下している。

また、XRCC4 の野生型と変異型とで、IP および質量分析法による相互作用因子の変化を比較したが、顕著な差は見られなかった。さらに、相互作用する関連因子と、野生型/変異型 XRCC4 を精製し、*in vitro* で修復機能の違いを検証したが、有意な差は認められなかった。しかし、変異型 XRCC4 存在下では、相互作用因子 LIG4 の安定性が低下する事が確認された (ウエスタンブロット法)。

以上の結果から、XRCC4 は、本来核内において存在し、LIG4 の安定性に寄与しているが、本患者において見つかった変異型 XRCC4 は、細胞質に多く分布し、プロテアソームによって分解されることで、LIG4 の不安定化が起き、全体として修復能の異常を引き起こしているものと考えられた。XRCC4 の機能異常と病態 (小頭症や発達障害) との関連については、さらなる研究が必要と考えられる。本研究は、上原記念生命科学財団による研究助成金を基に実施されたものであり、本研究成果は、Guo ら, JACI, 2015 (研究代表者は責任著者) に掲載された<sup>9)</sup>。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、長崎大学原爆後障害医療研究所の郭 朝万, 中沢由華, 嶋田繭子, 賈 楠, 光武範吏, 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療薬学講座の大山 要, サセックス大学ゲノムセンターの Alan Lehmann, Penny Jeggo, Lisa Woodbine, Heather Fawcett である。

### 文 献

- 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.
- 2) Nakazawa, Y., Yamashita, S., Lehmann, A. R. & Ogi, T. : A semi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives. *DNA Repair*, **9** : 506-516, 2010.
- 3) Limsirichaikul, S., Niimi, A., Fawcett, H., Lehmann, A. R., Yamashita, S. & Ogi, T. : A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU). *Nucleic Acids Res.*, **37** : e31, 2009.
- 4) 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., Coblentz, R., Stein, C. K., Last, J. L., 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. *J. Clin. Invest.*, **124** : 3137-3146, 2014.

- 5) Woodbine, L., Neal, J. A., Sasi, N. K., Shimada, M., Deem, K., Coleman, H., Dobyns, W. B., Ogi, T., Meek, K., Davies, E. G. & Jeggo, P. A. : PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J. Clin. Invest.*, **123** : 2969-2980, 2013.
- 6) Kashiwama, 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., Fassih, 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. *Am. J. Hum. Genet.*, **92** : 807-819, 2013.
- 7) 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 Genet.*, **8** : e1002945, 2012.
- 8) 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 II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Genet.*, **44** : 586-592, 2012.
- 9) Guo, C., Nakazawa, Y., Woodbine, L., Björkman, A., Shimada, M., Fawcett, H., Jia, N., Ohyama, K., Li, T. S., Nagayama, Y., Mitsutake, N., Pan-Hammarström, Q., Gennery, A. R., Lehmann, A. R., Jeggo, P. A. & Ogi, T. : XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **136** : 1007-1017, 2015.