

厚生省厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
基礎老化

ヒト個体における老化機構の分子疫学的解明
(H10-長寿-031)

平成10年度研究報告書

1999.3.

主任研究者：山木戸 道郎
(広島大学医学部 教授)

ヒト個体における老化機構の分子疫学的解明

山木戸 道郎（広島大学 医学部 内科学第二講座 教授）

長期に亘り疾患及び寿命の追跡調査を行っている原爆被爆者集団のデータおよび臨床背景が参照可能であった症例の解析では、定常時の末梢血単核球のテロメア長の短縮、テロメラーゼ活性の低下と臨床背景との関連は認められなかった。しかし、抗原曝露時のテロメラーゼ活性増強能に差があることが示唆された。また、原爆被爆者集団の解析では、血液細胞の体細胞突然変異頻度の増加が癌の発生頻度と関連していることを示唆する結果が得られた。早老性老化を主徴とするウェルナー症候群患者より、細胞の不死化と老化遺伝子の変異との関連を解明することを可能にした不死化細胞株を複数樹立した。DNA の損傷の蓄積の機構として、活性酸素により細胞内に生成した酸化損傷ヌクレオチドは、DNA に取り込まれ蓄積されるルートが一般的機構であることが明らかとなった。また、単独では変異原性を示さない化合物が、結合により新規化合物を形成し、変異原性を誘発することも示唆された。修復機能と老化に関しては、修復酵素欠損マウスでは加齢とともに癌の発生頻度が有意に高くなることが明らかにされた。

研究組織

- 山木戸道郎（広島大学医学部内科学第二講座教授）
- 葛西 宏（産業医科大学産業生態科学研究科職業性腫瘍学教授）
- 中別府雄作（九州大学生体防御医学研究所生化学部門教授）
- 二階堂 修（金沢大学薬学部分子細胞薬学教授）
- 平井裕子（放射線影響研究所放射線生物学部主任研究員）
- 若林敬二（国立がんセンター研究所がん予防研究部部長）

A. 研究目的

老化に関して多くの研究が行われてきたが、個体の老化の分子機構は殆ど明らかにされていない。その機構を明らかにするためには、遺伝子、細胞レベ

ルでの老化研究の結果を個体の老化（寿命）研究と融合する必要があると考える。本研究は、ヒト個体の老化及び寿命を遺伝子異常の蓄積による生理的老化という観点で捉え、これまでに提唱されてきたが直接的証拠の得られていない老化の仮説のうち、1、老化は体細胞遺伝子の突然変異の蓄積により生じる、2、遺伝子異常の蓄積の要因の一つは、遺伝子修復機能の低下であるとの2つの仮説の検証を行うことにより、内的、外的要因により生じる遺伝子損傷に対する修復機能の低下及び遺伝子異常の蓄積とヒト個体の老化及び寿命との関係を解析することを目的とする。個体の老化に関しては、長期に亘る大規模集団での疫学調査が必要と考えられるが、我々は既に、疾患及び寿命の追跡調査を長期に亘り行っている原爆被爆者集団の蓄積されたデータを有している。

本年度は原爆被爆者集団の対象者について、テロメア長、テロメラーゼ活性や体細胞突然変異頻度 (Mf) と臨床背景、予後や寿命との関連を解析し

た。遺伝子損傷の生成、蓄積に関しては、新しい機序の解析を行った。無限増殖能を得たウェルナー症候群患者由来細胞については、その原因について検討した。更に、遺伝子修復機能の低下と老化の関係を解析できるモデル実験系として作製した酸化ヌクレオチドの分解酵素を欠損したノックアウトマウスについて、ヒトの老化で生じる疾患や寿命について調べた。

B. 研究方法

1. 原爆被爆者及び疾患背景が参照可能であった症例について、末梢血単核球におけるテロメア長、テロメラーゼ活性とヘモグロビン、血液細胞数、血沈について比較検討した。アレルゲン曝露によるアレルゲン特異的メモリーTリンパ球におけるテロメラーゼ活性の変化を、ハウスダスト(HDM)感作アトピー型喘息患者の末梢血単核球を用いて調べた。
2. 原爆被爆者の末梢血単核球におけるヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)及びT細胞抗原レセプター(TCR)遺伝子突然変異体頻度(Mf)と発癌率及び寿命について解析した。
3. 活性酸素により生じる酸化的損傷ピリミジンヌクレオチドの DNA への取り込み及び変異の誘発を大腸菌をモデルとして調べた。
4. 環境中に広く存在するノルハルマンは、代謝活性化酵素存在下アニリンと共存させることにより変異原性を示す。この両者の結合した新規変異原物質の構造及び DNA への付加体生成について検討した。
5. 無限増殖能を得たウェルナー症候群患者の細胞について、原因遺伝子(WRN)の突然変異部位、mRNA 及び蛋白質の発現量を調べた。更に、p53蛋白質の発現量についても調べた。

6. 酸化ヌクレオチドプールの浄化に関わる酵素をコードするヒト MTH1 遺伝子の遺伝的多型の連鎖関係について調べた。また、MTH1 を欠損したマウスの加齢に伴う病的変化の解析を行った。

C. 研究結果

放射線影響研究所には既に十数万人よりなる原爆被爆者集団について、長期に亘り、疾患及び寿命の追跡調査を行っており、詳細なデータの蓄積がある。山木戸はその中、原爆被爆者及び疾患背景が参照可能であった症例 287 例について、末梢血単核球のテロメア長、テロメラーゼ活性と背景要因を解析したが、統計的に有意な要因は認められなかった。しかし、テロメア長の短縮に関しては、早期死亡例、担癌患者、甲状腺疾患、また、テロメラーゼ活性の低値については、膠原病、甲状腺疾患がある程度の傾向を示す要因として示唆された。10 名の喘息患者の末梢血単核球を、アレルゲン(HDM)で処理後、Tリンパ球画分と非Tリンパ球画分に分離し、Tリンパ球画分はさらにメモリーTリンパ球とナイーブTリンパ球に分画して、テロメラーゼ活性を比較したところ、メモリーTリンパ球画分にもっとも活性の増強が認められた。10 名の患者を増強されたテロメラーゼ活性レベルで2つのグループ(high responder 5名, low responder 5名)に分けると high responder 群は全例小児期にアトピー疾患の既往を有していた。一方、low responder 群では、5例中1例のみが小児期アトピー疾患の既往があり、小児期のアトピー疾患の既往は、両群で有意差が認められた。

平井は、原爆被爆者という固定集団について、末梢血単核球における HPRT Mf と TCR Mf と発癌率との関係を調べた。TCR Mf は、Mf の上昇とともに発癌リスクは統計的に有意に上昇した。HPRT Mf では、統計的有意差は認められなかった。しかし、いずれの Mf 測定集団においても、Mf を平均の3倍以上

高い群とその他の群に分け、両群間での発癌リスクを比べると、いずれの測定法においても、Mf の高い群が統計的に有意に発癌リスクが高かった。死亡時年齢と Mf はいずれの Mf 測定群においても統計的有意差は認めなかった。癌の既往のある対象者について、死亡群と生存群に分けて各群の Mf を比較したが、有意な結果は得られなかった。

葛西は、活性酸素による DNA 損傷の蓄積を解明するために、活性酸素により生ずる酸化的損傷ヌクレオチドの細胞内 DNA への取り込みに着目し、2種の酸化的損傷ピリミジンヌクレオチド(dCTP, dTTP から生成される5-ヒドロキシデオキシシチジン5'-三リン酸(5-OH-dCTP)及び5-フォルミルデオキシウリジン5'-三リン酸(5-CHO-dUTP))について検討した。その結果、酸化損傷ピリミジンは DNA ポリメラーゼにより DNA に取り込まれ、DNA 上に蓄積し、濃度依存的に変異を誘発することが明らかとなった。誘発された突然変異は、塩基置換変異の頻度が自然突然変異より2-3倍高かった。

環境中幅広く存在するノルハルマンは代謝活性化酵素の存在下でアニリンと共存させるとサルモネラ菌に変異原を示すことが知られている。若林は、この両化合物から生成される変異原物質の構造を解析し、新規変異原物質がアミノフェニルノルハルマンであることを明らかにした。この化合物は DNA 付加体を生成し、付加体量は反応時間の増加とともに上昇した。例えば、12時間反応で、 10^8 ヌクレオチドあたり20付加体量であった。

二階堂は、遺伝的早老症を特徴とするウェルナー症候群患者由来細胞(WS 細胞)24株のうち4株が高い増殖能を示した(疑 WS 細胞と略す)ので、これらの細胞について、何故 WS 細胞が不死化したのか、その原因について検討した。ウェルナーの原因遺伝子 WRN の変異について調べたところ、疑WS細胞には、いずれも日本人の WS 細胞の60%以上に変異

が報告されている3ヶ所の突然変異部位には変異を同定できなかった。しかも、WRN 遺伝子 mRNA の発現量の低下及び WRN 蛋白量の低下や欠損も認めなかった。p53蛋白については、発現量の低下が認められた。

中別府は、酸化損傷ヌクレオチドの分解酵素の一つである MTH1 は、転写、スプライシング、翻訳の各ステップで複雑な制御を受けていることを示した。また、MTH1 には、スプライシングに変化をもたらす遺伝的多型とアミノ酸の置換をもたらす遺伝的多型がある。アミノ酸多型 (Val83→Met83) に関しては、癌患者 290 例の癌部及び非癌部組織の DNA、パーキンソン病、結核、乾癬患者 311 例および健康人 400 例の血液 DNA の合わせて 1001 例の対象者について調べ、11例が Met83 ホモ接合体であった。特に、女性の肝細胞癌患者において Met83 ホモ接合体の頻度が 10%と有意に高かった。アミノ酸多型とスプライシング多型とは、連鎖不平衡であることが示唆された。また、MTH1 遺伝子欠損マウスに生じた病変、特に腫瘍に関しては、野生型では見られない胃の腫瘍の発生が有意であった ($p=0.02$)。肺及び肝臓の腫瘍は、野生型でも認められたが、欠損マウスでは有意差は得られないものの、発生頻度の上昇が観察された。

D. 考察

当研究班は、ヒト個体の老化及び寿命は遺伝子異常の蓄積による生理的老化を基盤とするとの仮説を元に、その機構を解明することを目的としている。

本年度の結果は、長期に亘り、疾患および寿命の追跡調査を行っている原爆被爆者集団のデータより、臨床背景と定常時の末梢血単核球のテロメア長、テロメラーゼ活性の関連を解析したが、明らかな関連性は認められなかった。しかし、炎症の場では、疾患活動性に関連してテロメラーゼ活性が検出されることを

既に報告している。in vitro の実験で、抗原曝露により活性の増強能に差があることを示唆する結果を得た。しかも、メモリーTリンパ球画分のテロメラーゼ活性が強く増強された。この結果は、clonal expansion を繰り返した症例はテロメラーゼ活性増強能が強いことを予想させる。リンパ球増殖時にテロメラーゼ活性の増強能が高い個体は、加齢に伴う免疫能の低下が少なく、テロメラーゼ活性の増強能の低い個体は免疫能の老化が早い可能性も考えられた。

老化に伴う疾患の一つである癌の罹患リスクが赤血球だけではなく、リンパ球の Mf とも相関することが明らかとなり、血液細胞の体細胞突然変異の蓄積が老化に伴う疾患発生に強く関与していることが示唆された。これらの遺伝子は、発癌に直接関係した遺伝子ではないが、個体の癌関連遺伝子の突然変異を間接的に反映していることを示唆した。しかし、死亡年齢と血液細胞の Mf には相関が認められなかった。今後癌以外の老年疾患や寿命と Mf の関係について、長期にフォローアップすることが必要であると考え。

また、ウェルナー症候群患者の Mf は 80-90 才以上の高齢者に相当するぐらい高く、癌の発生頻度も高い。ウェルナー症候群患者より樹立した細胞株は集団倍加数が低いことが特徴であるが、培養により無限増殖する細胞株が4種類得られた。これらの細胞の WRN 遺伝子は、これまでに報告されている変異部位のうち日本人によく認められる変異部位には異常は認められなかった。今後、これらの細胞を詳しく調べることにより、WRN 遺伝子の突然変異と細胞の不死化の関連性、WRN 蛋白質の機能および他の遺伝子との関係など、遺伝子レベルでの老化機構解明が期待できると考える。

昨年、活性酸素により生じる酸化的 DNA 損傷の蓄積は、直接 DNA 鎖に作用するのみでなく、細胞内に生じた酸化損傷ヌクレオチドが DNA に取り込まれ、DNA に蓄積され、変異を誘発することを、酸化損傷

プリンヌクレオチドで証明したが、これはプリンヌクレオチドに限ったことではなく、ピリミジンヌクレオチドでも生じることが明らかとなった。活性酸素による DNA 損傷の蓄積が、このルートで行われることが一般的となった。

環境中には、種々の変異原物質があるが、単独では、変異原性を示さない化合物が結合して新規変異原物質を形成し、DNA と付加体を形成することが明らかとなった。タバコの煙や加熱食品中に豊富に存在するノルハルマンとタバコの煙やある種の野菜中に存在しているアニリンは結合して、アミノフェニルノルハルマンを形成し、DNA と付加体を形成する。このように、日常生活において、単独では変異原性を示さない化合物に知らず知らずの中に、同時に曝露していることはよくあることである。

これまでの当研究班の研究において、遺伝子異常の生成、蓄積、修復機構に関して、試験管や細胞レベルの研究は可能であった。個体の老化に関しても、大規模集団での疫学的データを基本に研究を進めることが可能であった。しかし、修復機能の低下と異常の蓄積に関する研究を in vivo の系で行うことができなかったが、本年より参加の中別府により可能となった。酸化損傷ヌクレオチドの分解酵素の一つである MTH1 遺伝子欠損マウスにおいて老化に伴う胃、肝臓、肺における自然発癌の発生頻度が有意に上昇したことから、MTH1 の機能欠損が発癌リスクとなることを始めて示した。また、この遺伝子には、アミノ酸多型が存在し、ヒト女性の肝癌患者において、Met83 ホモ接合体の割合が平均の10倍以上であった。Met83-MTH1 は何らかの機能欠損を持っており、それが発癌の危険因子となっている可能性が示唆される。これらの結果は、遺伝子異常の蓄積が老化にともなう疾患の一つである発癌に関与し、その蓄積が修復酵素の機能低下により生じるという仮説を間接的に支持する。今後、この系において、実際に酸化損

傷ヌクレオチドの蓄積がどのくらいの頻度で生じているかを、検討する必要がある。

今後、遺伝子、細胞レベルでの老化研究を個体の老化研究の解明に近いづけるために、基礎的研究で明らかになった種々の老化のパラメーターの関連性を、原爆被爆者集団について調査することが必要であると考ええる。

E. 結論

1. ヒト個体の老化が遺伝子異常の蓄積により生じるという仮説は、癌発生率と体細胞突然変異頻度が相関することにより強く支持された。しかし、癌を含め老化に伴う疾患を評価するには、個体の免疫能の低下を把握することが重要である。老化に伴う免疫能の個体差を評価する指標として、テロメラーゼ活性の有用性が示唆された。
2. 遺伝子異常の蓄積が遺伝子修復能の低下に基づくという仮説は、修復酵素欠損マウスにおいて加齢と共に癌の発生頻度が有意に高くなることから、間接的に支持された。
3. 基礎的研究としては、遺伝子異常の蓄積の新しい機構が証明され、正常細胞の不死化機構を遺伝子レベルで解明できる細胞株を複数樹立した。

老化とゲノム反復配列に関する研究

－末梢血単核球のテロメア長，テロメラーゼ活性と背景因子－

山木戸道郎（広島大学医学部 教授）

ヒト *in vivo* では、定常時の末梢血単核球のテロメラーゼ活性レベルは、疾患背景を反映しないが、抗原曝露など、炎症の場での増強能に差があり、その差がリンパ球の免疫記憶機構に関与している可能性が示唆された。加齢に伴う免疫能の低下も、この増殖に伴うテロメラーゼ活性増強能に依存しているかもしれない。

キーワード：テロメラーゼ、テロメア長、単核球、リンパ球、加齢、免疫

A. 研究目的

原生動物テトラヒメナからヒトにいたるまで、現在同定された7種の生物のテロメラーゼは、すべて逆転写酵素モチーフを有する触媒蛋白質成分とテロメア配列の鋳型となるRNA成分の2分子がコアエンザイムを形成するという、構造的にも機能的にも種を越えて保存されている逆転写酵素であることが判明した¹⁾。生物の進化上これほど古くから保存されている酵素の存在は、DNA複製の維持において他の機構が容易には代償できないことを予想させる。ヒト悪性腫瘍の8割以上で活性化されているこの酵素テロメラーゼは、リンパ球でもその増殖と共に活性化されるが、加齢と共に減弱することから、免疫関連疾患においても重要な働きをしており、加齢に伴う免疫能の減弱にも関与していることを予想した²⁾。この仮説を検証するため、様々な臨床背景を持つ個体の末梢血単核球の相対的テロメラーゼ活性レベル・テロメア長とその臨床背景・予後との関係を検討した。

B. 研究方式

1. 定常時末梢血単核球のテロメア長・テロメラーゼ活性と臨床背景の検討

対象は、放射線影響研究所放射線生物学部および臨床研究部の協力のもと、疾患背景が参照可能であった287例とし、テロメラーゼ活性、テロメア長と比較した検討項目は、赤血球MN型変異頻度（59例）、ヘモグロビン（265例）、白血球数（265例）、好中球数（173例）、リンパ球数（171例）、血沈（256例）であった。

末梢血単核球テロメラーゼ活性の測定の測定は昨年度の報告の如く、ヘパリン採血された末梢血から単核球を分離し、 10^6 個の単核球をCHAPSを含むlysis buffer 100 μ lで溶解し蛋白を抽出した³⁾。残った核ペレットは、DNA抽出用に保存した。TRAP-ezeキット (ONCOR) を用いて、 α -³²P-dCTP内部標識によるPCRでTRAPアッセイを行い、12.5%PAGEで泳動した。ゲルはイメージングプレートに露光し、BAS2000を用いて、各サンプル毎にテロメラーゼに特異的な6塩基ラダーおよび内部標準バンド (36bp) の

シグナル強度を計測した。ラダーシグナル/内部標準シグナルの比を標準テンプレート(TSR8)のそれと比較し、各サンプルの相対的テロメラーゼ活性レベルとした⁴⁾。

末梢血単核球テロメア長の測定も昨年度の報告の如く、テロメラーゼを抽出した残りの 10^6 個末梢血単核球核ペレットからDNA抽出キット(WAKO)を用いてDNAを抽出し、制限酵素Hinf Iで消化後、0.8%アガロースゲルで泳動。0.25N HClで15分間処理し、DNAを断片化した後、アルカリ処理を行った。サザンロット法によりアガロースゲル中のDNAを $6 \times \text{SSC}$ ($1 \times = 0.15 \text{ M NaCl} - 0.015 \text{ M citrate}$)でニトロセルロースフィルターにトランスファーさせ、80°Cのオーブンで乾燥させた。T4 キナーゼにより $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPラベルした(TTAGGG)₄ オリゴDNAをプローブとして、ニトロセルロースフィルターを50°Cで16時間ハイブリダイスした後、 $4 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS液で55°C15分間ずつ4回洗浄し、イメージングプレートに2-3時間露光させた。それぞれのレーンにおけるスミアのピークをBAS2000によって決定し、ピーク的位置をその組織における平均のテロメア長として、その長さを計算した⁵⁾。

臨床背景とテロメラーゼ活性・テロメア長の関係についての統計解析は、正規分布もしくはそれに近い因子についてはANOVA・対応なしのT検定を用い、それ以外の因子についてはKruskal-Wallisの順位検定で検討した。

2、刺激時末梢血リンパ球のテロメラーゼ活性

自然抗原刺激に曝露した時の末梢血リンパ球のテロメラーゼ活性を検討するため、アレルゲンがあきらかな気管支喘息患者の末梢血単核球を用いて、アレルゲン曝露によるアレルゲン特異的メモリーTリンパ球におけるテロメラーゼ

の活性化について検討した。ハウスダスト(HDM)感作アトピー型喘息患者10人およびHDM皮内反応陰性の健常人8人を対象とした。採血時、HDM感作喘息患者は全例喘息症状を有さず、ステロイドの全身投与や免疫療法は受けていなかった。各対象者から20 mlの末梢血をヘパリン採血し、単核球をFicoll-Paque (Pharmacia Biotech)を用いた比重遠心法により分離した。回収された単核球はPBSで2回洗浄し、10%加熱非働化ウシ胎児血清(三菱化成)、2 mMグルタミン、100 U/mlペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン添加RPMI 1640 (Gibco)に 10^6 細胞/mlに再浮遊させ、6穴培養プレートにまいた。細胞は、HDM (Dp)抽出液添加もしくは非添加で5% CO₂存在下に37°Cで培養し、各検体はtriplicateで検討した。培養後、0.5%ウシ血清アルブミンおよび2 mM EDTA加PBSで洗浄した。

培養した末梢血単核球から、CD4+CD45RO+メモリーT細胞を、磁気細胞分離システム(MACSシステム、Miltenyi Biotec)およびCD4・CD45RO磁性ビーズモノクローナル抗体を用いて高純度に分取した。すなわち、 10^7 個の培養細胞を抗CD4磁性ビーズモノクローナル抗体と8°Cで30分間反応させ、CD4+細胞をポジティブセレクション用カラムを通して分取した。次いで磁性ビーズをはずし、CD4+細胞をCD45RO磁性ビーズモノクローナル抗体と反応させ、CD4+CD45RO+T細胞を得た。得られた各検体のテロメラーゼ活性を、前述のTRAPアッセイにて半定量的に測定した。

テロメラーゼ活性レベルは平均 \pm SEMで示した。HDM刺激によるテロメラーゼ活性レベルの比較など、対応のあるデータの検定にはWilcoxon signed-ranks testを用いた。テロメラーゼ活性レベルとアトピー歴との関係は、Fisher

の直接確率計算法で検討した。統計解析は、マッキントッシュコンピュータにより StatView4.1TM (Abacus Concepts) を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

1. 末梢血単核球のテロメア長、テロメラーゼ活性

単核球のテロメア長・テロメラーゼ活性と統計学的に有意な要因は認められなかったが、ある程度の傾向を示す要因としては、

テロメア長短縮：早期死亡例、担癌患者、

甲状腺疾患

テロメラーゼ活性低値：膠原病（リウマチ含む）、

甲状腺疾患

であった。概して、定常時の末梢血単核球のテロメア長・テロメラーゼ活性はその患者の臨床背景と明らかな関連性を示さないことが予想された。

2. 喘息患者末梢血リンパ球のテロメラーゼ活性

採血してFicolにより分離された単核球では、喘息患者・対照健常人全例において弱いテロメラーゼラダーシグナルが検出された。内部標準TSK1および陽性コントロールTSR8を用いた半定量的評価では、喘息患者および対照患者の末梢血単核球のテロメラーゼ活性に有意な差はみられなかった（平均±SEM：4.7±1.0%、4.5±0.9%）。

喘息患者10人および対照健常人8人の末梢血単核球をそれぞれHDM抽出液添加・非添加で7日間培養し、磁気細胞分離システムおよびCD4・CD45RO磁性ビーズモノクローナル抗体を用いてCD4+CD45RO+T細胞（メモリーT細胞）、CD4+CD45RO-T細胞（ナイーブT細胞）、

CD4-細胞分画を分取し、テロメラーゼ活性を測定したところ、喘息患者のHDM添加各細胞分画のテロメラーゼ活性（平均±SEM）は、CD4-細胞分画、ナイーブT細胞分画、メモリーT細胞分画、それぞれ16.0±5.7%、32.1±14.6%、48.8±19.6%で、メモリーT細胞分画が最も増強されており、培養前末梢血単核球未分画の活性と比較し有意に増強していた（ $P = 0.0166$ ）。しかし、喘息患者HDM非添加メモリーT細胞分画のテロメラーゼ活性は増強しておらず、対照健常人においても、各細胞分画のテロメラーゼ活性の差は小さかった。

HDM抽出液非添加培養した喘息患者メモリーT細胞分画のテロメラーゼ活性レベルは、平均+2SDが26%であった。ゆえに、HDM抽出液添加培養した喘息患者メモリーT細胞分画のテロメラーゼ活性レベルがTSR8の26%以上であった5例をHigh responder群、26%未満の5例をLow responder群として、それぞれの群の臨床データを比較した。末梢血好酸球数、血清総IgEレベル、*Dermatophagoides Pteronyssinus*特異IgE抗体レベル、ECPLレベルなど全身的な生化学データは、High responder群とLow responder群の間で有意な差はなかった。喘息の罹病期間、重症度にも有意な差はみられなかった。しかし、High responder群は全例小児期にアトピー疾患の既往を有しており、一方、Low responder群では5例中1例のみであり、小児期のアトピー疾患の既往は、両群で有意差が認められた（ $P = 0.024$ ）。

D. 考察

定常時の末梢血単核球のテロメア長・テロメラーゼ活性はその患者の臨床背景と明らかな関連性を示さないことが予想されたが、膠原病肺の気管支肺胞洗浄細胞やリウマチの滑膜組織な

ど、炎症の場では、疾患活動性に関連してリンパ球のテロメラーゼ活性が検出されることは、既に報告した。ゆえに、末梢血単核球のテロメラーゼ活性は、平常状態では疾患背景を反映しないが、刺激が加わった時の増強に差がみられるのではないかと考え、アレルギーがあきらかな気管支喘息患者の末梢血単核球を用いて、アレルギー曝露によるアレルギー特異的メモリーTリンパ球におけるテロメラーゼの活性化について検討した。予想通り、末梢血Tリンパ球テロメラーゼの検討では、喘息患者・対照健康人全例において弱いテロメラーゼラダーシグナルが検出され、半定量的評価では、喘息患者群および健康群の末梢血単核球のテロメラーゼ活性に有意な差はみられなかった。このことは、たとえばアレルギーに感作されていても定常状態のリンパ球はテロメラーゼ活性が正常と差がないことを裏付ける。しかし、ダニ抗原刺激による全リンパ球・メモリーTリンパ球分画テロメラーゼ活性の検討では、ダニ感作喘息患者の末梢血メモリーTリンパ球分画は、ダニ抗原刺激により、ダニ抗原非添加各リンパ球分画や対照健康人のダニ抗原刺激メモリーTリンパ球分画に比べ、テロメラーゼ活性が強く増強された。特にダニ抗原刺激によるメモリーTリンパ球分画のテロメラーゼ活性の増強レベルが強い喘息患者は、全例小児期のアトピー疾患の既往を有し、統計学的に有意な唯一の臨床背景因子であった。すなわち、増強が著しい喘息患者は全例小児期にアトピー歴を有しており、抗原感作メモリーTリンパ球が長期にclonal expansionを繰り返してきたと考えられる症例は、そのテロメラーゼ活性増強能が高いことが予想された。

以上より、リンパ球増殖時にテロメラーゼ活性増強能が高い個体は、加齢に伴う免疫能の低下が少なく、テロメラーゼ活性増強能が低い個

体は、免疫能の老化が早い可能性も考えられた。

E. 結論

定常時の末梢血単核球のテロメラーゼ活性レベルは、疾患背景を反映しないこと、しかし、抗原曝露など、炎症の場での増強能に差があることが示唆された。加齢に伴う免疫能の低下も、この増強能について検討する必要性が考えられた。

F. 参考文献

- 1) Nakamura TM, Cech TR: Reversing time: origin of telomerase. *Cell* 92:587-590, 1998.
- 2) Hiyama K., Hirai Y., Kyoizumi S., et al.: Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells, *J. Immunol.*, Vol. 155: 3711-3715, 1995.
- 3) Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R. et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science*, Vol. 266: 2011-2015, 1994.
- 4) Hiyama K., Ishioka S., et al.: Telomerase activity as a novel marker of lung cancer and immune-associated lung diseases. *Int. J. Mol. Med.* Vol. 1: No.3: 545-549, 1998.
- 5) Shirohani Y., Hiyama K., et al.: Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer, *Lung Cancer*, Vol. 11: 29-41,

1994 Rhyu: Telomeres, telomerase, and immortality. J. Natl. Cancer Inst., Vol. 87: 884- 894, 1995.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oshima M., Maeda A., Ishioka S., Hiyama K., Yamakido M.: Expression of C- C Chemokines in Bronchoalveolar Lavage Cells from Patients with Granulomatous Lung Diseases. Lung in press.
- 2) Ishioka S., Nishisaka T., Maeda A., Hiyama K., Yamakido M.: A case of Group II nonspecific interstitial pneumonia developed during corticosteroid therapy after acute respiratory distress syndrome. Respirology in press.
- 3) 檜山桂子, 檜山英三, 石岡伸一, 山木戸道郎: テロメラーゼの測定. Lab. Clin. Pract. in press.
- 4) Ishioka S., Hiyama K., Hozawa S., Maeda A., Maeda H., Yamakido M.: A case of sarcoidosis with increased response of peripheral blood mononuclear cells to purified protein derivative antigen after depletion of CD8+ T cells *in vitro*. Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases 15 (2):194- 195, 1998.
- 5) 檜山桂子, 檜山英三, 石岡伸一, 小西太, 佐藤裕恵, 山木戸道郎: ヒトの悪性腫瘍におけるテロメラーゼ. 炎症と免疫 6 (6):53- 58, 1998.

6) 檜山桂子, 石岡伸一, 檜山英三, 山木戸道郎: 肺癌とテロメア・テロメラーゼ. 分子呼吸器病学 2 (3):233- 235, 1998.

7) 檜山桂子, 石岡伸一, 檜山英三, 山木戸道郎: テロメラーゼ研究の現状. 癌と化学療法 25 (8):1105 1110, 1998.

8) 檜山桂子, 石岡伸一, 檜山英三, 山木戸道郎: 肺癌の腫瘍マーカーとしてのテロメラーゼ活性測定の意義. 日本臨床 56 (5):1253- 1257, 1998.

2. 学会発表

- 1) Oshima M., Maeda A., Hiyama K., Ishioka S., Yamakido M. Expression of C- C chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with granulomatous lung diseases. ERS annual congress; 1998; Geneva, Switzerland.
- 2) Haruta Y., Hiyama K., Maeda H., Hozawa S., Ishioka S., Yamakido M. Activation of telomerase in lymphocytes in Type I allergy. 1998 International Conference of American Thoracic Society (ATS); Chicago, Illinois, USA.
- 3) 村上功, 檜山桂子, 磯部威, 横崎恭之, 石岡伸一, 山木戸道郎. 肺癌における分子生物学的異常の治療前診断. 第38回日本呼吸器学会総会; 1998; 熊本市.
- 4) 春田吉則, 檜山桂子, 前田裕行, 保澤総一郎, 石岡伸一, 山木戸道郎. 気道炎症とリンパ球テロメラーゼ. 第21回日本気管支学会総会; 1998; 広島市.

老化と活性酸素； DNA損傷の蓄積およびその修復活性の変動

葛西 宏（産業医科大学・産業生態科学研究所・職業性腫瘍学教授）

老化のプロセスと関連していると思われる、活性酸素によるDNA損傷の蓄積を解明するために、活性酸素によって生ずる酸化損傷ヌクレオチドの細胞内DNAへの取り込みに着目して研究を進めた。その結果、dCTP、dTTPから生成する5-ヒドロキシデオキシシチジン 5'-三リン酸、5-フォルミルデオキシウリジン 5'-三リン酸が細胞内に生成すると、染色体DNAに蓄積され、変異を誘発することが明らかにされた。

キーワード：活性酸素、DNA損傷、ヌクレオチドプール、変異誘発

A. 研究目的

活性酸素（酸素ラジカル）によるDNA損傷の蓄積は、老化のプロセスと深く関連していると思われる。DNAに損傷が蓄積する過程には、DNA中の塩基部や糖部が直接的に攻撃を受けるルートと、DNA前駆体の集合体であるヌクレオチドプール中に生じた、酸化損傷ヌクレオチドがDNAポリメラーゼによってDNA中に取り込まれるルートがあると考えられている。我々は、一昨年度の研究で、ヌクレオチドプール中に4種類の酸化損傷ヌクレオチド（2-ヒドロキシデオキシアデノシン 5'-三リン酸、8-ヒドロキシデオキシグアノシン 5'-三リン酸、5-ヒドロキシデオキシシチジン 5'-三リン酸、5-フォルミルデオキシウリジン 5'-三リン酸）が生成することを示唆する結果を得ている¹⁾。また、昨年度は、活性酸素によって生ずる酸化損傷プリンヌクレオチド、2-ヒドロキシデオキシアデノシン 5'-三リン酸、8-ヒドロキシデオキシグアノシン 5'-三リン酸が細胞内DNAへ蓄積し、変異を誘発することを明らかにした²⁾。今年度は、2種の酸化損傷ピリミジンヌクレオチド、2-ヒドロキシデオキシシチジン 5'-三リン酸、5-フォルミルデオキシウリジン 5'-三リン酸（それぞれ、dCTP、dTTPから生成する）の取り込みに着目して研究を進めた。

ン酸が細胞内DNAへ蓄積し、変異を誘発することを明らかにした²⁾。今年度は、2種の酸化損傷ピリミジンヌクレオチド、2-ヒドロキシデオキシシチジン 5'-三リン酸、5-フォルミルデオキシウリジン 5'-三リン酸（それぞれ、dCTP、dTTPから生成する）の取り込みに着目して研究を進めた。

B. 研究方法

1. 酸化損傷デオキシヌクレオチド三リン酸である、5-ヒドロキシデオキシシチジン 5'-三リン酸 (5-OH-dCTP) 及び5-フォルミルデオキシウリジン 5'-三リン酸 (5-CHO-dUTP) を調製し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した。大腸菌をモデル細胞として用いることとし、両損傷ヌクレオチドを野生株であるW3110株に塩化カルシウム法により導入した。処理した大腸菌の染色体DNA中の*lacI*遺伝子に変異を有するコロニーを選択し、変異体類

度を算出した。*lacI*遺伝子変異体を単離し、酸化的損傷ヌクレオチドにより誘発された変異の解析をハイブリダイゼーション及びシークエンシングにより行った。

2. ³³P で標識した 5-OH-dCTP、5-CHO-dUTPを調製し、W3110株に塩化カルシウム法により導入した。処理した大腸菌を溶菌し、細胞質中の放射活性を測定することにより、細胞内に取り込まれたヌクレオチド量を算出した。

C. 研究結果

1. 野生株大腸菌W3110株に5-OH-dCTP、5-CHO-dUTPを塩化カルシウム法により導入し、*lacI*遺伝子の変異体頻度を算出したところ、5-OH-dCTP、5-CHO-dUTPともに濃度依存的に変異を誘発することが明らかとなった。このことは、大腸菌体内に導入された酸化的損傷ヌクレオチドが、DNA鎖に取り込まれて変異を誘発した結果であると考えられる。さらに、大腸菌懸濁液に50 nmolのヌクレオチドを加えた場合に誘発された*lacI*遺伝子変異体を単離し、酸化的損傷ヌクレオチドにより誘発された変異の解析を行った結果、自然突然変異に比較して、塩基置換変異の頻度が、5-OH-dCTPで約2.8倍、5-CHO-dUTPで約1.9倍上昇することが明らかになった。塩基置換変異のうち、5-OH-dCTPはG・C→A・T、A・T→C・G、G・C→T・A変異を、5-CHO-dUTPはG・C→A・T、A・T→G・C、G・C→T・A変異を誘発することが判明した。

2. ³³P で標識した 5-OH-dCTP、5-CHO-dUTPを調製し、1.の項で用いた条件でW3110株に導入した。処理した大腸菌を溶菌し、その放射活性を測定したところ、5-OH-dCTPは約0.08 nmol (0.16%)、5-CHO-dUTPは約

0.13 nmol (0.26%) 細胞内に取り込まれたことが明らかになった。したがって、1.の項で述べたように、酸化的損傷ヌクレオチドが大腸菌体内に導入され、さらにDNA鎖に取り込まれて変異を誘発したという解釈が妥当なものであることが支持された。

D. 考察

活性酸素によって生ずる酸化的DNA損傷の蓄積が、老化のプロセスに関連していることが推測されている。昨年度は、酸化的損傷プリンヌクレオチドである、2-ヒドロキシデオキシアデノシン 5'-三リン酸、8-ヒドロキシデオキシグアノシン 5'-三リン酸が細胞内DNAへ蓄積し、変異を誘発することを明らかにした²⁾。今年度の研究はこの結果に基づき、酸化的損傷ピリミジンデオキシヌクレオチドのDNAポリメラーゼによる取り込みを経由する、DNA損傷の蓄積に関して研究を行い、興味深い点が幾つか明らかになった。

第一点目は、活性酸素により生ずる損傷ピリミジンヌクレオチドが、細胞内で実際に取り込まれることが明らかになったことである。昨年度の我々の研究以前には、8-OH-dGTPを加水分解するMutT蛋白質（大腸菌）やMTH1蛋白質（哺乳動物）が存在すること³⁾、*mutT*遺伝子欠損大腸菌でA・T→C・Gトランスバージョン頻度が高まっていることや8-OH-Gua含量が高いこと⁴⁾のような、間接的な証拠しか得られていなかった。昨年度の研究により、細胞内に存在する酸化的損傷プリンヌクレオチドが、DNAポリメラーゼにより取り込まれてDNA上に蓄積することが初めて示された。今年度は、酸化的損傷ピリミジンヌクレオチドも同様にして蓄積することが明らかになった。したがって、酸化的損傷ヌク

レオチドがこのルートでDNA鎖上に蓄積することが一般的なことであることが明らかになった。

第二点目は、5-OH-dCTP、5-CHO-dUTPの両損傷ピリミジンヌクレオチドが、老化の原因の一つであると思われる変異を誘発することを明らかにしたことである。細胞を用いた直接的な証明は今回が初めてである。

第三点目は、5-OH-dCTP、5-CHO-dUTPともに細胞内で生じた場合には、変異を同程度（塩基置換変異の頻度が、5-OH-dCTPで約2.8倍、5-CHO-dUTPで約1.9倍上昇）、引き起こすことが明らかになった点である。細胞内に取り込まれた効率と塩基置換変異頻度の上昇の関係を、昨年度の結果と照らし合わせると、両損傷ヌクレオチドの変異誘発能は、8-ヒドロキシデオキシグアノシン 5'-三リン酸と同程度であることが明らかになった。したがって、今年度の研究対象である、5-OH-dCTP、5-CHO-dUTPの両損傷ピリミジンヌクレオチドも活性酸素による老化プロセスと密接に関連する可能性が示唆された。

E. 結論

活性酸素によるDNA損傷の蓄積が、老化の一つの原因であるという観点に立ち、今年度は、酸化的損傷ピリミジンヌクレオチドの生成によるDNA損傷の蓄積について研究を進めてきた。その結果、ピリミジンヌクレオチド（dCTP、dTTP）の酸化もDNA損傷の蓄積、ひいては老化過程に重要な役割を担っている可能性が明らかになった。

F. 引用文献

- 1) Murata-Kamiya, N., Kasai, H. et al.
Comparison of oxidation products from

DNA components by γ -irradiation and Fenton-type reactions. *J. Radiat. Res.*, 38, 121-131, 1997

- 2) Inoue, M., Kasai, H. et al. Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli* by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 273, 11069-11074, 1998
- 3) Bessman, M. J., Frick, D. N., and O'Handley, S. F. The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J. Biol. Chem.*, 271, 25059-25062, 1996
- 4) Tajiri, T., Maki, H. & Sekiguchi, M. Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 336, 257-267, 1995

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asami, S., Kasai, H., et al. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243, 678-682, 1998
- 2) Inoue, M., Kasai, H., et al. Lung cancer patients have increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in peripheral lung tissue DNA. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 691-695, 1998
- 3) Murata-Kamiya, N., Kasai, H., et al.

- Nucleotide excision repair proteins may be involved in the fixation of glyoxal-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248, 412-417, 1998
- 4) Inoue, M., Kasai, H., et al. Induction of chromosomal gene mutations in *Escherichia coli* by direct incorporation of oxidatively damaged nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 273, 11069-11074, 1998
 - 5) Takahashi, S., Kasai, H., et al. Immunohistochemical detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in paraffin-embedded sections of rat liver after carbon tetrachloride treatment. *Toxicologic Pathology*, 26, 247-252, 1998
 - 6) Kamiya, H., Kasai, H., et al. The (6-4) photoproduct of thymine-thymine induces targeted substitution mutations in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 26, 2611-2617, 1998
 - 7) Kohno, T., Kasai, H., et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the *hOGG1* gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*, 16, 3219-3225, 1998
 - 8) Kasai, H. and Lunec, J. Analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine, an oxidative DNA damage product, in human samples. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 10, 51-52, 1998
 - 9) Shinmura, K., Kasai, H., et al. Infrequent mutations of the *hOGG1* gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 825-828, 1998
 - 10) Kasai, H., et al. DNA modifications by the mutagen glyoxal: adduction to G and C, deamination of C and GC and GA cross-linking. *Carcinogenesis*, 19, 1459-1465, 1998
 - 11) Arashidani, K., Kasai, H., et al. Genotoxicity of ribo- and deoxyribonucleosides of 8-hydroxyguanine 5-hydroxycytosine, and 2-hydroxyadenine: induction of SCE in human lymphocytes and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA 100. *Mutation Res.*, 403, 223-227, 1998
 - 12) Tsurudome, Y., Kasai, H., et al. 2-Hydroxyadenine, a mutagenic form of oxidative DNA damage, is not repaired by a glycosylase type mechanism in rat organs. *Mutation Res.*, 408, 121-127, 1998
 - 13) Fujikawa, K., Kasai, H., et al. The mutation induced by oxidatively damaged nucleotides, 5-formyl-dUTP and 5-hydroxy-dCTP, in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 26, 4582-4587, 1998
- 2.学会発表
- 14) 鶴留洋輔, 葛西 宏他, ディーゼル排気微粒子 (DEP) 気管内注入ラットの肺組織中 8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua) 値とその修復酵素活性の検討, 第57回日本癌

- 学会総会, 1998
- 15) 井上政昭, 葛西 宏他, 肺がんp53遺伝子変異と酸化的DNA損傷, 第57回日本癌学会総会, 1998
 - 16) 紙谷尚子, 葛西 宏他, 内因性変異原メチルグリオキサルが大腸菌 lacI 遺伝子において誘発する変異, 第57回日本癌学会総会, 1998
 - 17) 紙谷浩之, 葛西 宏他, 部位特異的導入方による紫外線誘発DNA損傷の変異の解析, 第25回核酸化学シンポジウム, 1998
 - 18) 野本 実, 葛西 宏他, 8-ヒドロキシグアニンのゲノム塩基配列レベルでの解析, 第57回日本癌学会総会, 1998
 - 19) 井上政昭, 葛西 宏他, 繊維化肺組織における酸化的DNA損傷と発癌, 第39回日本肺癌学会総会, 1998
 - 20) 葛西 宏, 酸化的DNA損傷, 第57回日本癌学会総会, 1998
 - 21) 紙谷浩之, 葛西 宏, 酸化的ヌクレオチド損傷が誘発する変異の分子機構の解析, 第57回日本癌学会総会, 1998
 - 22) 新村和也, 葛西 宏他, DNA修復酵素遺伝子hOGG1の多型・変異と発がんとの関連性, 第57回日本癌学会総会, 1998
 - 23) 平野 雄, 葛西 宏他, 強制および自発運動ラット臓器DNA中8-ヒドロキシグアニンレベルに対する影響, 第57回日本癌学会総会, 1998
 - 24) 藤川勝義, 葛西 宏他, 大腸菌MutT蛋白質の各種酸化的損傷ヌクレオチドに対する分解活性の比較, 第57回日本癌学会総会, 1998
 - 25) 木戸利恵, 葛西 宏他, ディーゼル排気微粒子 (DEP) 気管内注入によるラット肺組織中8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua) 値およびその修復酵素活性の変動, 日本環境変異原学会 第27回大会, 1998
 - 26) 紙谷尚子, 葛西 宏他, メチルグリオキサルによるDNA損傷の修復におけるヌクレオチド除去修復の関与, 第21回日本分子生物学会年会, 1998
 - 27) 紙谷浩之, 葛西 宏, 各種酸化的ヌクレオチド損傷の変異誘発の比較, 第21回日本分子生物学会年会, 1998
 - 28) 藤川勝義, 葛西 宏他, 各種損傷ヌクレオチドに対する大腸菌MutT蛋白質の基質特異性, 第21回日本分子生物学会年会, 1998
 - 29) 鶴留洋輔, 葛西 宏他, ヒトはなぜ加齢により癌になりやすいのか?: 加齢とヒト大腸癌粘膜中8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua) 値の関係について, 第98回日本外科学会総会, 1998
 - 30) Kamiya, H., Kasai, H., et al. Mutational properties of oxidatively damaged DNA precursors in vivo., Gordon Research Conference, Mutagenesis, USA, 1998

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老化と酸化ヌクレオチドの浄化機構に関する研究

分担研究者 中別府雄作 九州大学生体防御医学研究所

研究要旨

酸化ヌクレオチドプールの浄化に関わる酵素（8-oxodGTPase）をコードするヒトMTH1遺伝子は転写、スプライシング、翻訳の各ステップで複雑な制御を受ける。ヒト集団中には、MTH1 mRNAのスプライシングと翻訳開始の両方の変化をもたらす遺伝的多型とアミノ酸の置換をもたらす遺伝的多型が存在し、この2つの遺伝的多型間には連鎖不平衡が存在する。MTH1遺伝子を欠損したマウスにおいては、老化に伴い胃、肝臓、肺における自然発がんの発症頻度が有意に上昇する。現在、それぞれの遺伝的多型とMTH1蛋白質の機能との関係、さらにその機能欠損がヒト発がんにおける危険因子となる可能性について検討中である。

A. 研究目的

ヒトMTH1蛋白質は、ヌクレオチドプール中のdGTPが活性酸素により酸化されて生じる8-oxo-dGTPを8-oxo-dGMPに分解することでDNA複製の際に誤って取り込まれるのを防ぎ、A:T⇌C:Gトランスバージョン型の突然変異を抑制する。このようなヌクレオチドの酸化によるゲノム障害は老化とともに蓄積し、老化の原因の1つとして考えられている。

我々は、哺乳動物やヒトの老化における活性酸素によるゲノム障害の実体を明らかにするべく、酸化ヌクレオチドプールの浄化に関わるヒトMTH1遺伝子の解析を進め、①ヒトMTH1遺伝子が7番染色体の短腕（22P）に位置し、②5つの主なエクソンからなり、エクソン1が1aと1b、エクソン2が2a、2b、2cの3つのセグメントからなること、③これらエクソンの択一的スプライシングにより7種類のmRNA（Type 1, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B）をコードすること、④エクソン2の2b-2c間の5'スプライシング部位（GTGA）の配列が（GCGA）に置換された結果、2b-2c間のスプライシングが不可能になり、Type 1以外に2b-2cが必ず連結したType 2B, 3B, 4Bのみが生じる遺伝的多型の存在と、⑤さらにアミノ酸（Val83→Met83）の置換を伴う遺伝的多型の存在を明らかにしてきた（1-4）。

本研究では、①ヒトMTH1遺伝子のスプライシングの変化をもたらす遺伝的多型がMTH1遺伝子発現におよぼす影響を明らかにし、さらに②ヒト集団中においてアミノ酸の置換をもたらす遺伝的多型（Val83→Met83）との連鎖関係を明らかにすることを目的として研究を進めた。③我々は、実験動物個体レベルでMTH1遺伝子の機能を明らかにする目的で遺伝子欠損マウスをすでに樹立しており、その自然飼育下で老化に伴う病的変化の解析を行った。

B. 研究方法

①スプライシング多型のMTH1遺伝子発現におよぼす影響の解析

4つのMTH1 mRNA（Type 1, 2A, 3A, 4A）には共通の開始コドン（ATG4）から始まる1つの翻訳フレームが存在する。一方、エクソン2b-2cのセグメントが連続して存在する3種類のmRNA（2B, 3B, 4B）の5'-領域にはin frameで新たな翻訳開始コドンが3つ（ATG1~3）上流に存在する。エクソン2b-2c間の5'スプライシング部位が（GTGA）の場合、このTGAがin frameのストップコドンとなるため3つの開始コドン（ATG2~4）が機能することが予測され、（GCGA）の場合、4つの開始コドンが（ATG1~4）全て機能する可能性が示唆された（4）。エクソン2の2b-2c間の5'スプライシング部位が、GTとGCの個体からMTH1 cDNAから各mRNAを試験管内で調整し、ウサギ網状赤血球ライセート用いた試験管内翻訳系で合成される蛋白質を、ヒトMTH1抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。さらに、各開始コドンの機能を明らかにするために、ATG1, ATG2, ATG3をそれぞれATCに変換したcDNAを作製し、コードされる蛋白質を解析した。

エクソン2の2b-2c間の5'スプライシング部位に関して、GT/GTのホモ、GT/GCのヘテロ、GC/GCのホモの個体から樹立したリンパ球細胞株で発現しているMTH1蛋白質をヒトMTH1抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。

②スプライシング多型とアミノ酸多型（Val83→Met83）との連鎖関係

肝細胞癌患者104例、肺癌患者186例の癌部および非癌部組織から調製したゲノムDNAとパーキンソン病患者100例、結核患者66例、乾癬患者145例、健常人400例の血液から調製したゲノムDNAを用いてPCR-SSCP-塩基配列決定によりMTH1遺伝子の

多型 (GT/GCとVal83/Met83)をスクリーニングした。

③MTH1遺伝子欠損マウスの自然老化における病的変化

遺伝子標的組換えにより作製したMTH1遺伝子欠損マウス (MTH1^{-/-}:♂33, ♀39) と野生型マウス (MTH1^{+/+}:♂23, ♀30) をSPF自然飼育条件下で1年半飼育したのちに、病理解剖により全身の病変を観察した。

C. 研究成果

(1) スプライシング多型とMTH1蛋白質の発現: 4つのMTH1 mRNA (Type1, 2A, 3A, 4A) は1つの翻訳フレームを有し、18kDaのMTH1ポリペプチドをコードすることが予測され、これは大腸菌での発現と試験管内翻訳系で確認された。一方、エクソン2b-2cのセグメントが連続して存在する3種類のmRNA (2B, 3B, 4B) については、スプライシング多型GTの場合3つの開始コドン (ATG2~4) が機能することが予測され、実際に試験管内翻訳系で18, 19.5, 20kDaの3つのポリペプチドが検出された。スプライシング多型GCの場合、4つの開始コドン (ATG1~4) が全て機能すると考えられたが、実際に試験管内翻訳系で分子量18, 19.5, 20, 22.5kDaの4つのポリペプチドが翻訳されることが確認された。それぞれのATG配列をATCに置換することにより対応する翻訳産物が消失することから、1つのタイプのmRNAから択一的な翻訳開始が起ることが期待された。さらに、複数のボランティアから樹立したリンパ球細胞株のウエスタンブロッティングの解析から、エクソン2b-2c間の5'スプライシング部位の遺伝的多型性に一致して3つあるいは4つのMTH1ポリペプチドが検出された。

(2) スプライシング多型とアミノ酸多型 (Val83→Met83) との連鎖関係
我々は、これまでにゲノムDNAを用いてPCR-SSCP-塩基配列決定によりMTH1遺伝子異常のスクリーニングを実施してきた。その結果、MTH1蛋白質の83番目のアミノ酸が異なる2つのMTH1対立遺伝子Val83 (GTG) とMet83 (ATG) を見出した。それぞれのMTH1対立遺伝子の頻度は、健常人で (Val83:Met83=0.909:0.091) であることを明らかにしている (別表 参考)。肝細胞癌患者104例、肺癌患者186例の癌部および非癌部組織から調製したゲノムDNAとパーキンソン病患者100例、結核患者66例、乾癬患者145例を合わせた全1001例において11例のMet83/Met83のホモ接合体の存在が明らかになった。女性の肝細胞癌患者においてMet83/Met83ホモ接合体の頻度が10%と有為に高かった。

Met83のホモ接合体11例について、エクソン2の2b-2c間の5'スプライシング部位の多型を解析したところ、10例がGC/GCのホモ接合体で2b-2cが必ず連結したMTH1 mRNAのみが生じるタイプであることが明らかになった。1例は、GT/GCのヘテロ接合体であった。また、ランダムに抽出したVal83/Val83のホモ接合体10例は全てGT/GTのホモ接合体であった。GC/GCホモ接合体の1例においてVal83/Met83のヘテロ接合体が検出された。Met83ホモ接合体の肺癌患者のがん組織及び正常肺組織で発現するMTH1蛋白質をウエスタンブロッティングで解析したところ、18, 19.5, 20, 22.5kDaの4つのバンドが検出された。以上から、Met83多型とエクソン2のスプライシング多型 (GC) が、連鎖不平衡にあることが強く示唆された。

(3) MTH1遺伝子欠損マウスの自然老化における病的変化
通常SPF飼育条件下で1年半を経過した時点のマウス個体 (MTH1^{-/-}:♂33, ♀39匹, MTH1^{+/+}:♂23, ♀30匹) について剖検を行い腫瘍を中心に解析を行ったところ、MTH1^{-/-}マウス個体群においてのみ胃の腫瘍の発生が5例 (カルシノーマ:2例, アデノーマ:3例) 認められた。このような胃の病変は野生型 (MTH1^{+/+}) には全く見られず、有意差 (p=0.02) のある結果であった。野生型 (MTH1^{+/+}) で肺及び肝臓の自然腫瘍が認められたが、これらの腫瘍についてもMTH1^{-/-}マウス群で有意差は得られなかったものの発症頻度の上昇が観察された。

D. 考察

これまでの研究から、ヒトMTH1遺伝子の発現は転写開始点とスプライシングの多様性、そして翻訳開始の多様性と3つのステップで複雑な制御を受けていることが明らかになった (4)。まず、転写そのものは、細胞の増殖あるいは分裂に呼応して制御されているようである。MTH1遺伝子のプロモーター領域には増殖細胞で活性の高い転写因子の結合配列やストレスにตอบสนองして遺伝子発現を制御することが知られている複数の転写因子の結合配列のコア配列が存在する。今後は、このような転写因子によるMTH1遺伝子の発現制御の機構を明らかにすることを計画している。

スプライシングについては、臓器ごとに発現するmRNAのタイプの違いが存在する可能性があり、それぞれにコードされるMTH1ポリペプチドの機能や、細胞内の分布を明らかにすることが必須である。我々は、これまでにMTH1蛋白質は主に細胞質とミトコンドリアに局在することを明らかにしているが (2)、ミトコンドリア局在の機構は不明である。上流のATGから翻訳されるポリペプチドの持つリーダーペプチド

のいずれかが細胞内局在の制御に関与する可能性がある
ので、これを明らかにする予定である。

我々は、ヒトMTH1遺伝子構造の解析から、ヒト集団中にはMTH1蛋白質多型を生じる2つの塩基置換が存在することを明らかにしたが、このような多型がMTH1蛋白質の機能に影響を及ぼす場合、それぞれの遺伝子型を持つ個体間で突然変異の抑制能力に差があることが示唆される。このような遺伝子多型のヒトにおける表現型への影響を解析することは、突然変異の分子病態を明らかにする上で重要と思われる。我々はすでにMet83の変異を持つ組み換えMTH1蛋白質が、その高次構造と活性ともに高温感受性であることを明らかにしている(3)。ヒトがん患者のグループの中で、女性の肝がん患者におけるMet83のホモ接合体の割合が平均の10倍以上であった。Met83-MTH1はなんらかの機能欠損をもたらす、それが発がんの危険因子となっている可能性が示唆される。MTH1遺伝子欠損マウスにおいて胃がん、肝がん、肺がんの自然発症率が有意に上昇したことは、この仮説を支持するものである。すなわち、8-oxodGTPの生成とその浄化機能の欠損がヒトや哺乳動物において突然変異や癌の原因となる可能性を示しており、いわゆる自然発癌の成因と機構を考える上で重要な示唆を与える。

Met83多型とスプライシング多型GCは密接に連鎖していることから、スプライシング多型GCの個体で発現するアミノ末端の伸張したMTH1蛋白質は、Met83の高温感受性に起因する機能欠損を相補している可能性が高い。今回調べた集団では、2002のMTH1対立遺伝子座において1対立遺伝子座のみがGT-Met83であったが、このような個体のフォローアップが重要と考えられる。

F. 結論

突然変異原性を持つ酸化ヌクレオチド8-oxo-dGTPの分解酵素をコードするヒトMTH1遺伝子の発現制御機構を詳細に解析した結果、MTH1遺伝子は転写、スプライシング、翻訳の各ステップで複雑な制御を受けることを明らかにした。さらに、ヒト集団にスプライシングと翻訳開始の変化をもたらす遺伝的多型

(GT/GC)とアミノ酸の変化をもたらす遺伝的多型(Val83/Met83)を見出した。その分布の解析から、この2つの遺伝的多型間に連鎖不平衡が存在することを明らかにした。現在、それぞれの遺伝的多型とMTH1蛋白質の機能との関係について研究中である。

MTH1遺伝子欠損マウスにおいて老化に伴う胃、肝臓、肺における自然発がんの発症頻度が有意に上昇したことから、MTH1の機能欠損が発がんリスクとなることを始めて示した。ヒト肝細胞癌患者において女性20例のうち2例の患者が、Met83/Met83のホモ接合体であったが、この頻度は健常者を始めとする他の

グループに比べて10倍以上の値である。Met83-MTH1がなんらかの機能欠損を持っており、それが女性の肝細胞癌発症の危険因子となっている可能性が示唆される。

G. 引用文献

- 1) Furuichi, M., Yoshida, M., Oda, H., Tajiri, T., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T. and Sekiguchi, M. (1994). Genomic structure and chromosome location of the human *mutT* homologue gene *hMTH1* encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion. *Genomics* 24, 485-490.
- 2) Kang, D., Nishida, J., Iyama, A., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., Fujiwara, T., Sekiguchi, M., and Takeshige, K. (1995). Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 270, 14659-14665.
- 3) Yakushiji, H., Maraboeuf, F., Takahashi, M., Deng, Z.-S., Kawabata, S., Nakabeppu, Y., and Sekiguchi, M. (1997). Biochemical and physicochemical characterization of normal and variant forms of human MTH1 protein with antimutagenic activity. *Mutation Res.* 384(3), 181-194.
- 4) Oda, H., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., and Sekiguchi, M. (1997). Regulation of Expression of the Human MTH1 Gene Encoding 8-Oxo-dGTPase: Alternative Splicing of Transcription Products. *J. Biol. Chem.* 272 (28), 17843-17850.

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Crocker, S.J., Morelli, M., Nakabeppu, Y., and Robertson, G.S. (1998). D1-Receptor-related priming is attenuated by antisense-mediated 'knockdown' of *fosB* expression. *Mol. Brain Res.* 53, 69-77.

- 2) Hazell, A.S., McGahan, L., Tetzlaff, W., Bedard, A. M., Robertson, G.S., Nakabeppu, Y., and Hakim, A. M. (1998). Immediate-Early Gene Expression in the Brain of the Thiamine Deficient Rat. J. Molec. Neurosci. 10, 1-15.
- 3) McGahan, L., Hakim, A. M., Nakabeppu, Y., and Robertson, G. S. (1998). Ischemia-induced CA1 neuronal death is preceded by elevated FosB and Jun expression and reduced NGFI-A and JunB levels. Mol. Brain Res. 56, 146-161
- 4) Ohtsubo, T., Matsuda, O., Iba, K., Terashima, I., Sekiguchi, M., and Nakabeppu, Y. (1998). Molecular cloning of *AtMMH*, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli mutM* gene and analysis of functional domains of its product. Mol. Gen. Genet. 259, 577-590.
- 5) Hayakawa, H., Hofer, A., Thelander, L., Kitajima, S., Cai Y., Oshiro, S., Yakushiji, Y., Nakabeppu, Y., Kuwano, M. and Sekiguchi, M. Metabolic Fate of Oxidized Guanine Ribonucleotides in Mammalian Cells. Biochemistry. (1999) (in press).
- 6) Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K., and Nakabeppu, Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced *OGG1* mRNAs. Mol. Biol. Cell. (1999) (in press).
2. 学会発表
- 1) Oda, H., Furuichi, M., Kang, D., Fujiwara, T., and Nakabeppu, Y. Alternative Splicing and Alternative Translational Initiation of the Human MTH1 transcripts Encoding 8-Oxo-dGTPase. Gordon Research Conference on DNA alteration in transformed cells. 1998
- 2) Nishioka K., Ohtsubo, T., Oda, H., , Kang, D., Fujiwara, T., and Nakabeppu, Y. Regulation of expression and intracellular localization of the 8-oxoguanine DNA glycosylases (OGG1 proteins) in human cells. Gordon Research Conference on Mammalian DNA repair, 1999.
- 3) Nishioka K., Ohtsubo, T., Oda, H., Kang, D., Fujiwara, T., and Nakabeppu, Y. Regulation of expression and intracellular localization of the 8-oxoguanine DNA glycosylases (OGG1 proteins) in human cells. The 14th Workshop on DNA Replication, 1998.
- 4) Tominaga, Y., Ohtsubo, T., Nishioka, K., Sakumi, K., Tsuzuki, T., Tsukiyama, T., and Nakabeppu, Y. Biological Significance of the Error Avoiding Mechanisms for 8-Oxoguanine in Mammals. The 14th Workshop on DNA Replication, 1998.
- 5) 早川浩, F. Taddei, 薬師寺浩之, 中別府雄作, 北嶋繁考, 祭勇, 大城聡, A. Hofer, L. Thelander, M. Radman, 関口睦夫. MutT蛋白及びそのヒトホモログMTH1は転写の忠実度を制御する. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis'98, 1998
- 6) 中別府雄作, 藤井喜充, 蔡剣平, 薬師寺浩之, 下川英俊, 関口睦夫. 部位特異的アミノ酸置換法によるヒトMTH1変異蛋白質の解析. Workshop on DNA Repair and Mutagenesis'98, 1998
- 7) 續輝久, 河手久弥, 作見邦彦, 伊東理世子, 野田哲生, 中鶴陽子, 石川隆俊, 関口睦夫, 中別府雄作. アルキル化剤感受性および腫瘍形成に関する2つのDNA修復酵素系, Workshop on DNA Repair and Mutagenesis'98, 1998
- 8) 中別府雄作, 藤井喜充, 小田尚伸, 服部信孝, 志村秀樹, 水野美邦, 関口睦夫. 活性酸素によるゲノム障害と神経細胞死の防御: MTH1蛋白質の関与. 第71回日本生化学会大会シンポジウム, 1998
- 9) 藤川勝義, 紙谷浩之, 藤井喜充, 薬師寺浩之, 中別府雄作, 葛西宏. 大腸菌MutT蛋白質の各種酸化的損傷ヌクレオチドに対する分解活性の比較. 第57回日本癌学会総会, 1998