

平成10年度

厚生省科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

研究報告書

主任研究者 田中 亀代次

田中亀代次

- 1) Kaneda, Y., Kaneda Y, Kinoshita, K., Sato. M., Saeki, Y., Yamada, R., Wataya-Kaneda, M., & Tanaka, K., The induction of apoptosis in HeLa cells by the loss of LBP-p40. *Cell Death and Differentiation*, 5, 20-28, 1998
- 2) Takeuchi, S., Nakatsu, Y., Nakane, H., Murai, H., Hirota, S., Kitamura, Y., Okuyama, A., & Tanaka, K., Strand specificity and absence of hotspots for p53 mutations in UVB-induced skin tumors of XPA-deficient mice. *Cancer Research*, 58, 641-646, 1998
- 3) Yeo, J. P., Nakatsu, Y., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Kraemer, K. H., & Tanaka, K. RPA2, A gene for 32 kDa subunit of replication protein A on chromosome 1p35-36, is not mutated in patients with familial melanoma linked to chromosome 1p36., *Melanoma Research*, 8, 47-52, 1998
- 4) Winter, D. B., Phung, Q. H., Umar, A., Baker, S. M., Tarone, R. E., Tanaka, K., Liskay, R. M., Kunkel, T. A., Bohr, V. A., & Gearhart, P. J., Altered spectra of hypermutation in antibodies from mice deficient for the DNA mismatch repair protein PMS2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 6953-6958, 1998
- 5) Hayashi, T., Takao, M., Tanaka, K., & Yasui, A., ERCC1 mutations in UV-sensitive Chinese hamster ovary (CHO) cell lines., *Mutation Research*, 407, 269-276, 1998
- 6) Ikegami, T., Kuraoka, I., Saijo, M., Kodo, N., Y. Kyogoku, Morikawa, K., Tanaka, K., & Shirakawa, M., Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA., *Nature Structural Biology*, 5, 701-706, 1998
- 7) Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M., Tanaka, K., & Kaneda, Y., Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ-liposomes. *Gene Therapy*, 5, 1031-1037, 1998
- 8) Kobayashi, T., Takeuchi, S., Saijo, M., Nakatsu, Y., Morioka, H., Otsuka, E., Wakasugi, M., Nikaido, O., & Tanaka, K., Mutational analysis of a function of xeroderma pigmentosum group A (XPA) protein in strand specific DNA repair., *Nucleic Acid Research*, 26, 4662-4668, 1998.
- 9) Ikegami, T., Kuraoka, I., Saijo, M., Kodo, N., Y. Kyogoku, Morikawa, K., Tanaka, K., & Shirakawa, M., Resonance assignments, solution structure, and backbone dynamics of the DNA- and RPA-binding domain of human repair factor XPA., *J. Biochem.*, in press.
- 10) Miyauchi-Hashimoto, H., Okamoto, H., Tanaka, K., & Horio, T., Ultraviolet Radiation-induced suppression of natural killer cell activity is enhanced in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice., *J. Invest. Dermatol.*, in press.

北村幸彦

- 1) Tsujino K, Kanno H, Hashimoto K, Fujii H, Jippo T, Morii E, Lee YM, Asai H, Miwa S, and Kitamura Y: Delayed onset of hemolytic anemia in CBA-Pk-lslc/Pk-1slc mice with a point mutation of the gene encoding red blood cell type pyruvate kinase. *Blood* 91:2169-2174, 1998.
- 2) Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Tunio GM, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, and Kitamura Y: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279:577-580, 1998.
- 3) Ito A, Morii E, Maeyama E, Jippo T, Kim DK, Lee YM, Ogihara H, Hashimoto K, Kitamura Y, and Nojima H: Systematic method to obtain novel genes that are regulated by mi transcription factor (MITF): impaired expression of granzyme B and tryptophan hydroxylase in mi/mi cultured mast cells. *Blood* 91:3210-3221, 1998.
- 4) Tachibana K, Hirota S, Iizaka H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa SI, Kishimoto T, and Nagasawa T: A chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393:591-594, 1998.

- 5) Sato M, Morii E, Komori T, Kawahata H, Suigimoto M, Terai K, Shimizu H, Yasui T, Ogihara H, Yasui N, Oshi T, Kitamura Y, Ito Y, and Nomura S: Transcriptional regulation of osteopontin gene in vivo by PEBP2aA/CBAF, and ETS1 in the skeletal tissues. *Oncogene* 17:1517-1525, 1998.
- 6) Tsukamoto Y, Kuwabara K, Hirota S, Kawano K, Yoshikawa K, Ozawa K, Kobayashi T, Yanagi H, Stern DM, Toyama M, Kitamura Y, and Ogawa S: Expression of 150KDa oxygen-regulated protein (ORP150) in human breast cancer. *Lab Invest.* 78:699-706, 1998.
- 7) Kim DK, Morii E, Ogihara H, Hashimoto K, Oritani L, Lee YM, Jippo T, Adachi S, Kanakura Y, and Kitamura Y: Impaired expression of integrin alpha-4 subunit in cultured mast cells derived from mutant mice of mi/mi genotype. *Blood* 92:1973-1980, 1998.
- 8) Lee YM, Jippo T, Kim DK, Katsu Y, Tsujino K, Morii E, Kim HM, Nawa T, and Kitamura Y: Alteration of protease expression phenotype of mouse peritoneal mast cells by changing the microenvironment demonstrated by in situ hybridization histochemistry. *Am J Pathol* 153:931-936, 1998.
- 9) Berin MC, Kiliann AJ, Yang PC, Groot JA, Kitamura Y, and Perdue MH: The influence of mast cells on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine. *J Immunol* 161:2561-2566, 1998.
- 10) Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, Kanakura Y, Tanaka T, Takebayashi A, Matsuda H, and Kitamura Y: Familial gastrointestinal stromal tumors with germ line mutation of KIT. *Nature Genet* 19:323-324, 1998.
- 11) Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Hase-Sawada N, Taniguchi M, Nishida T, Nakayama S, Kitamura Y, Shinomura Y, and Matsuda Y: A novel gain-of-function mutation of c-kit in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 115:1090-1095, 1998.
- 12) Tsujimura T, Hashimoto K, Kitayama H, Ikeda H, Sugahara H, Matsumura I, Kaisho T, Terada N, Kitamura Y, and Kanakura Y: Activating mutation in the catalytic domain of c-kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-association not at the ligand-induced dimerization site. *Blood*, in press.

#### 島中 寛

- 1) K. Shimoke, S. Yamagishi, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka (1999) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Dev. Brain Res.*, 112, 245-253.
- 2) H. Ohnishi, M. Yamada, M. Kubota, H. Hatanaka and S. Sano (1999) Tyrosine phosphorylation and association of BIT with SHP-2 induced by neurotrophins. *J. Neurochem.*, in press.
- 3) S. Kinoshita, H. Yasuda, N. Taniguchi, R. Katoh-Semba, H. Hatanaka and T. Tsumoto (1999) Brain-derived neurotrophic factor prevents low-frequency inputs from inducing long-term depression in the developing visual cortex. *J. Neurosci.*, in press.
- 4) Y. Ishikawa, T. Satoh, Y. Enokido, C. Nishio, T. Ikeuchi and H. Hatanaka (1999) Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspase are required for the high oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. *Brain Res.*, in press.
- 5) T. Satoh, T. Yamagata, Y. Ishikawa, M. Yamada, Y. Uchiyama and H. Hatanaka (1999) Regulation of reactive oxygen species by nerve growth factor but not by Bcl-2 as a novel mechanism of protection of PC12 cells from superoxide anion-induced death. *J. Biochem.*, in press.
- 6) N. Takei, O. Tanaka, Y. Endo, D. Lindholm and H. Hatanaka (1999) BDNF and NT-3 but not CNTF counteract the Ca<sup>2+</sup> ionophore-induced apoptosis of cultured cortical neurons: Involvement of dual pathways. *Neuropharmacol.*, in press.
- 7) H. Aoshima, K. Kadoya, H. Taniguchi, T. Satoh and H. Hatanaka (1999) Generation of free radicals during the death of *Saccharomyces cerevisiae* caused by lipid hydroperoxide. *Biosci.*

Biotech. Biochem., in press.

- 8) T. Satoh, T. Numakawa, Y. Abiru, T. Yamagata, Y. Ishikawa, Y. Enokido and H. Hatanaka, (1998). Production of reactive oxygen species and release of L-glutamate during superoxide anion-induced apoptosis of cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.*, 70, 316-324.
- 9) A. Nakatani, M. Yamada, A. Asada, M. Okada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka (1998) Comparison between survival-promoting effects of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on PC12h cells stably expressing TrkB receptor. *J. Biochem.*, 123, 707-714.
- 10) T. Ikeuchi, A. Nakatani, M. Yamada, N. Itokazu, A. Awaya and H. Hatanaka (1998) MS-430, a synthetic pyrimidine derivative, influences intracellular signal transduction pathway leading to neuronal differentiation in PC12h cells. *J. Biochem.*, 123, 423-430.
- 11) T. Araki, Y. Enokido, N. Inamura, S. Aizawa, J. C. Reed and H. Hatanaka (1998) Changes in c-Jun, but not Bcl-2 family proteins in p53-dependent apoptosis of mouse cerebellar granule neurons induced by DNA damaging agent bleomycin. *Brain Res.*, 794, 239-247.
- 12) N. Takei, T. Numakawa, S. Kozaki, N. Sakai, Y. Endo, M. Takahashi and H. Hatanaka (1998) Brain-derived neurotrophic factor induces rapid and transient release of glutamate through the non-exocytotic pathway from cortical neurons. *J. Biol. Chem.*, 273, 27620-27624.
- 13) K. Shimoke, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka (1998) Synthetic lipid products of PI3-kinase which are added to culture medium prevent low K<sup>+</sup>-induced apoptosis of cerebellar granule neurons via Akt kinase activation. *FEBS Lett.*, 437, 221-224.
- 14) Y. Abiru, R. Katoh-Semba, C. Nishio and H. Hatanaka (1998) High potassium enhances secretion of neurotrophic factors from cultured astrocytes. *Brain Res.*, 809, 115-126.

堀尾 武

- 1) Miyauchi-Hashimoto, H., Okamoto, H., Tanaka, K., & Horio, T., Ultraviolet Radiation-induced suppression of natural killer cell activity is enhanced in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice., *J. Invest. Dermatol.*, in press.

「老化、癌化における DNA 修復の役割に関する研究」

主任研究者 田中亀代次 大阪大学細胞生体工学センター 教授

研究要旨：本研究は、老化、癌化における DNA 修復の役割の解析を目的として、1) ヒトにおける転写と共役したヌクレオチド除去修復機構の解析、2) その異常による早期老化の分子病態の解析、および、3) ヌクレオチド除去修復欠損マウスにおける紫外線誘発皮膚発癌過程に関与する遺伝子の同定とその解析を行った。本研究の主な成果は以下のように総括できる。1) XPA 蛋白質の損傷 DNA および RPA p70 subunit 結合ドメインである MF122 (98 番目のメチオニンから 219 番目のフェニールアラニンまでの 122 個のアミノ酸残基よりなる) の高次構造を NMR 法により解明した。2) 遺伝的早老症コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS) A 群、B 群の原因遺伝子産物である CSA、CSB、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP) A 群の原因遺伝子産物である XPA、および、RNA Polymerase II と結合する活性を持ち、転写と共役したヌクレオチド除去修復機構に関与する新規の蛋白質 (XPA-binding protein 2: XAB2) を同定し、その遺伝子をクローニングした。3) XPA 遺伝子をノックアウトしたマウス (XPA 欠損マウス) は、外観上の異常を示さないが、ヌクレオチド除去修復能を完全に欠損し、低線量の UV 照射により皮膚癌を高頻度で発生した。XPA 欠損マウスに UV 照射し発生した皮膚癌の p53 遺伝子の突然変異は、正常マウスのそれとは異なり、変異のホットスポットが欠如し、転写鎖の DNA 損傷が突然変異の原因になっていた。Restriction Landmark Genomic Scanning 法により、XPA 欠損マウスに発生した皮膚癌と正常皮膚上皮の DNA を比較し、皮膚癌で特異的に変化している遺伝子を同定した。以上の結果は、ヒトにおける転写と DNA 修復機構およびその欠損の分子病態の解明に向けて重要な糸口を提供するものと考えられる。

分担研究者

北村幸彦・大阪大学医学部教授

島中 寛・大阪大学蛋白質研究所

堀尾 武・関西医科大学教授

A. 研究の目的

ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) 機構は、紫外線 (ultraviolet light; UV)、種々の化学発癌剤を始め多種の要因による DNA 損傷を修復する重要な DNA 修復機構の一つである。NER 機構に異常を持つヒト遺伝疾患として、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) が知られている。XP 患者は、日光紫外線による高頻度皮膚癌発生に加え、知能低下、小頭症、神経原性難聴、運動歩行障害など種々の精神神経症状を合併する。XP には A から G 群とバリエーションの 8 つの遺伝的相補性群が存在

する。XPA (A 群 XP)、XPB、XPC、XPD、XPF、XPG 遺伝子が既にクローニングされ、NER の分子機構の解明が急速に進展している。一方、転写鎖上の DNA 損傷は非転写鎖上のそれよりも早く修復される機構が存在し、「転写と共役したヌクレオチド除去修復」 (transcription-coupled NER; TC-NER) と呼ばれる。転写鎖以外の損傷はゆっくりと修復され、「ゲノム全体の修復」 (global genome NER; GG-NER) と呼ばれる。転写機構と NER 機構の密接な相互作用が示唆される。コケイン症候群 (Cockayne syndrome; CS) は、悪液質性瘰癧、特徴ある鳥様顔貌、知能低下、色素性網膜変性症、種々の早期老化徴候など多様な臨床症状を示すヒト遺伝疾患である。CS 患者は XP 患者と同様に日光過敏性を示すが、XP 患者と異なり高頻度皮膚癌発生を示さないことが特徴である。CS 患者由来の細胞は、XP 患者由来の細

胞と同様に紫外線に高感受性を示し、CSではTC-NER機構が選択的に欠損していることが解っている。逆に、XP-CではTC-NER機構は正常だが、GG-NER機構が特異的に欠損している(図4)。従って、TC-NERやGG-NER機構を解明する上で、CSA、CSB蛋白質やXPC蛋白質の機能の解明がキーポイントになる。CSにはAとB群の2つの遺伝的相補性群が存在し、CSA(A群CS)、CSB遺伝子が既にクローニングされている。CSA蛋白質はWD40リピートモチーフを持ち、蛋白質相互作用に関与することが示唆され、CSB蛋白質は、そのアミノ酸配列から、染色体の構造変換に伴う転写制御に関与するSWI2/SNF2ヘリカーゼファミリーに属し、ヘリカーゼ活性はないものの、DNA依存性ATPase活性を持つことが明かになっている。また、CSB蛋白質は、RNA Polymerase IIによるin vitroでの転写伸長を増強することも明かにされている。XPC蛋白質は、XPA蛋白質よりも損傷DNAに優先的、且つ、より強固に結合することが明かにされ、GGR機構における損傷認識蛋白質としての役割が考えられている。しかし、依然としてNE-TCR機構の詳細は不明である。

本研究では、XAB2蛋白質の機能の解明を進め、TC-NERの分子機構の一端を解明すると共に、XPA遺伝子をノックアウトしたマウスを用いて、その紫外線による高頻度皮膚発癌の分子機構やXP-A患者における神経身体異常の分子病態を解明することを目的とした。

## B. 研究方法

1) XPA蛋白質の損傷DNA結合ドメインおよびRPA p70 subunit結合ドメインであるMF122の高次構造解析は、multi-dimensional heteronuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopyにより行った。

2) 変異型XPA蛋白質を産生する細胞のstrand-specific DNA repairを調べる実験では、site-directed mutagenesis法により $\Delta$  N36,  $\Delta$  E-cluster,  $\Delta$  C46, H244R, C264S, R207Gの各変異XPA cDNAを作成し、それらをCMV enhancerとbeta actin promoterおよびLacswitch promoterに

つないだ上、A群XP細胞(XP12ROSV)にトランスフェクションし、トランスフェクタントを得た。そして、トランスフェクタントのDHFR遺伝子の転写鎖および非転写鎖のピリミジンダイマーの修復能を、Hanawaltらの方法(Spivak, G. and Hanawalt, P.C., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 7, 147-161, 1995)により調べた。

3) 酵母Two Hybrid SystemによるXAB2遺伝子のクローニングは、pGBT9-XPA(Gal4 DNA binding domain-XPA fused protein producer, TPR1)をbaitにして、pGADGH-HeLa cDNA library(Gal4 activation domain fused protein producer, LEU2)をスクリーニングすることにより行った。

4) XAB2とCSA、CSBの免疫共沈降実験には、heamagglutinin (HA)-tagを付けたCSA、CSB cDNAを発現させたCS-AおよびCS-B細胞を用いた。まず、これらの細胞抽出液を抗HAモノクローナル抗体で免疫沈降し、その沈降物をSDS-PAGEで分離してのち、抗XAB2ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットし、XAB2とCSA、CSBの細胞内での結合を確かめた。XAB2とRNA polymerase IIとの免疫共沈降では、Dr. Jean-Marc Eglyから分与されたRNA polymerase II最大サブユニットに対するモノクローナル抗体を用いた。

5) 抗XAB2血清のマイクロインジェクション法によるXAB2蛋白質の機能解析は以下のように行った。正常ヒト線維芽細胞の細胞質に抗XAB2血清をマイクロインジェクションし、24時間培養する。そこで紫外線を照射し、不定期DNA合成の測定のためには、照射後すぐに[3H]-thymidineによるパルスラベルを行う。紫外線照射後のRNA合成の回復の測定には、紫外線照射24時間後に[3H]-uridineによるパルスラベルを行う。ついで、オートラジオグラフィによりこれらの[3H]-thymidine、[3H]-uridineの細胞内取り込みを銀粒子として可視化した。

6) XPA欠損マウスの紫外線照射により発生した皮膚癌組織におけるp53遺伝子の突然変異の解析は以下のように行った。切片標本において皮膚癌組織部分のみをmicrodissection法でかき集め、DNAを抽出し、PCR法にてexon 5、6とexon 7、8を増幅し

た。それらを用いて direct sequencing 法にて突然変異の有無を調べた。

7) RLGS 解析は吉川らの方法 (*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 196, 1566-1572, 1993) により行った。

### C. 研究結果

1) XPA 蛋白質の損傷 DNA および RPA p70 subunit 結合ドメインである MF122 (98 番目のメチオニンから 219 番目のフェニールアラニンまでの 122 個のアミノ酸残基よりなる) の高次構造を NMR 法により解明した。MF122 は、C4 タイプ Zinc フィンガーと  $\alpha$  ヘリックス・ターン・ヘリックスのサブドメインからなり、C4 タイプ Zinc フィンガードメインに RPA p70 subunit が結合し、 $\alpha$  ヘリックス・ターン・ヘリックスドメインに損傷 DNA が結合することを明らかにした。蛋白質が結合する Zinc フィンガードメインの構造解析としては最初の成果である。

2) strand specific DNA repair における XPA 蛋白質の役割を解析する目的で、site-directed mutagenesis 法により  $\Delta$  N36,  $\Delta$  E-cluster,  $\Delta$  C46, H244R, C264S, R207G の各変異 XPA cDNA を作成し、それらを A 群 XP 細胞 (XP12ROSV) に発現させたトランスフェクタントを得た。そして、トランスフェクタントの DHFR 遺伝子の転写鎖および非転写鎖のピリミジンダイマーの修復能を調べた。その結果、いずれのトランスフェクタントにおいても、転写鎖および非転写鎖の修復能が平行して低下した。また、Lacswitch promoter を用いて発現蛋白質量を調節すると、発現量と転写鎖および非転写鎖両方の修復能とに正の相関が認められた。これらの結果は、XPA 蛋白質が転写鎖および非転写鎖両方の修復に均等に重要であること、XPA 蛋白質が両方の修復の律速要因になっていることを示唆する。また、R207G 変異を持つ XP12ROSV の紫外線抵抗性リパータント XP129 が非転写鎖の修復のみを特異的に欠損する原因として、R207G 変異以外の原因が考えられた。

3) yeast two hybrid system を用いて新規の蛋白質 (XPA-binding protein 2: XAB2) が XPA 蛋白質

と結合することを見つけた。さらに、XAB2 蛋白質は CSA 蛋白質と直接結合すること、RNA ポリメラーゼ II/CSB 蛋白質複合体とも結合することを明らかにした。正常細胞抽出液をゲルろ過すると、CSA (44kDa) は約 500kDa のフラクションに、CSB (168kDa)、RNA ポリメラーゼ II large subunit (200kDa)、XAB2 (100kDa) は共に 700kDa 以上の大きなフラクションに検出される。1M KCl 存在下でも依然としてこれらの蛋白質は大きなフラクションに分画される。細胞内では RNA Polymerase II/CSB/XAB2 複合体が形成され、CSA は別の複合体を形成し、これら 2 つの複合体は XAB2 を介して相互作用していることが示唆された。これらの結果は、XAB2 蛋白質が RNA Polymerase II、CSB、CSA 蛋白質と共に TCR 機構に関与することを示唆した。そこで、抗 XAB2 抗体を正常細胞にマイクロインジェクションしたところ、XP-C 細胞における紫外線照射後の不定期 DNA 合成が著明に抑制されたが、正常細胞の不定期 DNA 合成は抑制されなかった。さらに、正常細胞の紫外線照射後の RNA 合成の回復が抗 XAB2 抗体により著明に抑制された。これらの結果は、XAB2 蛋白質が、TC-NER に必須の因子であることを示唆する。全長の XAB2 蛋白質に対する抗体をマイクロインジェクションすると、未照射細胞の RNA 合成も抑制され、XAB2 蛋白質は転写そのものにも重要な役割を果たすことが明らかになった (論文投稿中)。

4) XAB2 遺伝子をノックアウトしたマウスを作成するため、マウス XAB2 遺伝子をクローニングし、その構造と機能を明らかにした。XAB2 遺伝子は、19 個のエキソンおよび転写調節部位からなる約 15 kb の全長を持ち、その全ての DNA 塩基配列を決定した (論文作成中)。そして、転写制御部位とエキソン 1-4 を欠失させるような、あるいは、XAB2 の C 末端 162 個のアミノ酸残基を欠失させるような、ポジティブ・ネガティブ選別用のターゲティングベクターを構築し、そのターゲティングにより相同組み換え体 ES 細胞を数クローン得た。相同組換え ES 細胞をマウス胚へ注入しキメラマウスを得ていく。

5) XP の分子病態を解析するため、XPA 遺伝子をノックアウトしたマウス(XPA 欠損マウス)を作成した。XPA マウスは外観上の異常を示さないが、NER 能を完全に欠損していた。そして、低線量の UV 照射により皮膚癌を高頻度で発生した。XPA マウスに UV 照射し発生した皮膚癌の p53 遺伝子の突然変異は正常マウスのそれとは異なり、変異のホットスポットが欠如していること、転写鎖の DNA 損傷が突然変異の原因になっていることを明らかにした。XPA マウスは、XP 患者における日光紫外線による皮膚癌発生の分子病態を検索する上でよいモデルになることを示唆した。

6) XPA マウスにできた皮膚腫瘍組織より、腫瘍細胞株を樹立した。これらの皮膚癌細胞株は、XPA(-/-)の遺伝子型を保持し、NER 能を欠損したままであるにもかかわらず、UV に著明な抵抗性を示した。このことは、皮膚癌細胞株が NER 機構欠損と共に、アポトーシスやチェックポイントに異常を持つことを示唆し、多段階発癌の重要な一過程と考えられる。事実、これらの癌細胞で dominant-negative と思われる p53 遺伝子の突然変異が認められた。一方、皮膚癌細胞株の HGPRT 座位での突然変異率を調べるため 6-チオグアニン選別を行ったところ、6-チオグアニンに非常に抵抗性を示すことを見つけた。この表現形質はミスマッチ修復欠損細胞株で認められているので、皮膚癌細胞におけるミスマッチ修復蛋白質をウエスタンブロット法で調べた。その結果、皮膚癌細胞株では hMSH2 や hMSH3 蛋白質の著明な減少を見つけた。p53 遺伝子と共に、ミスマッチ修復系はチェックポイント (G2/M) に関与することも明かになっており、皮膚癌細胞株の UV 抵抗性の原因になっている可能性が高い。そこで、FACS を用いて皮膚癌細胞のチェックポイント機能を調べると共に、ミスマッチ修復能の異常を調べている。また、XPA/MSH2 ダブル欠損マウスを作成中であり、そのマウスから細胞株を樹立し、UV 抵抗性の有無について調べる。また、皮膚癌細胞に MSH2 cDNA を導入し、UV 感受性になるか否かを調べる。さらに、XP-A 群患者に発生した皮膚癌でミスマッチ修復蛋白質の発現異常があるか否かを調べ

る。

7) XPA 欠損マウスを用いた紫外線誘発皮膚発癌に関与する遺伝子の同定を、ゲノム研究的手法により試みており、以下のような結果を得た。A) 正常皮膚組織 2 例、皮膚癌細胞株 3 例、皮膚癌組織 3 例より DNA を抽出し、RLGS (restriction landmark genomic scanning) 法によって約千個のスポットをスクリーニングし、癌細胞および癌組織で共通に変化しているスポット 63 例 (減衰スポット 45、増幅スポット 18) を選定し、更に、そのうち共通性の高いスポット 19 例 (減衰スポット 12 例、増幅スポット 7 例) についてクローニングを行い、サブクローニングおよびノーザンブロット法によって、単離した DNA の皮膚癌におけるゲノム構造および発現の変化を調べた。減衰スポットより単離した DNA 断片 18 例、増幅スポット 5 例、計 23 例においてゲノム構造が変化しているのが認められた。それらの内、6 例は既知の遺伝子、2 例は EST データベースにおいて認められた遺伝子であった。既知の遺伝子として、goosecoid, *thrombospondin-4*, *fibroblast growth factor-1*, *homologous factor-1*, *voltage-sensitive calcium channel alpha 1 A*, (*dermo-1*), *K channel snab* を確認した。しかし、既知の遺伝子に関して *Dermo-1* 以外はノーザンブロット法で発現を確認できていない。EST データベースで認められた遺伝子に関しては 1 例で発現が認められたが、正常細胞および癌細胞で違いはなかった。その他の 15 例の DNA 断片に関しては発現を認めていない。*Dermo-1* 遺伝子発現の変化が、XPA 欠損マウスの紫外線誘発皮膚発癌のどのステップでおこるかを、*in situ* で調べている。B) 正常細胞に較べて癌細胞株で発現が変化する遺伝子を同定するために、cDNA expression array (Atlas<sup>TM</sup> Mouse cDNA Expression Array) を用いて、既知の遺伝子 588 個に関して調べた。対象は線維芽細胞初代培養をコントロールにして、癌細胞株 3 例について調べた。明らかに発現量の違うものとして、*cyclin D2*, *HSP-86* (*HSP-90*), *mHR21* (*spa*), *Sox17*, *myogenic factor 5*, *BMP-1*, *urokinase type plasminogen activator* を確認して



いる。post-genome sequencing の一つの方向として、DNA chip technology を用いた、健常および病的状態における遺伝子発現プロファイルを検索する必要性が説かれており、今後そのような方向に本研究課題を発展させて行きたいと思っている。

8) 大腸菌リボソームの小サブユニット蛋白質をコードする遺伝子 (rpsL 遺伝子) を導入したトランスジェニックマウスと XPA 欠損マウスを交配し、紫外線照射後の XPA 欠損マウス皮膚上皮における rpsL 遺伝子上の突然変異を調べた。その結果、非常に低線量の紫外線照射でも XPA 欠損マウスでは紫外線照射に特異的な変異が導入されることを明かにしつつある。

9) XPA 欠損マウスでは加齢に伴い、体重減少、各臓器重量の低下、臓器の病変が認められた。XPA 欠損マウスと、酸化 DNA 損傷の塩基除去修復に働く OGG1 (MutM ホモログ) 遺伝子や NTH1 (Endonuclease III ホモログ) 遺伝子をノックアウトしたマウスとを交配しつつあり、XPA 欠損マウスに認められた軽度徴候が増悪するか否かを調べている。

#### D. 考察

1) MF122 の NMR による高次構造解析は、ヒト NER に関与する蛋白質の初めての構造解明例である。また、蛋白質が結合する Zinc フィンガードメインの構造解析としても最初の成果である。

2) XPA 蛋白質が TC-NER および GG-NER に均等に重要であること、XPA 蛋白質が両方の修復の律速要因になっていることを示唆する。

3) XAB2 遺伝子の解析について、Gordon Research Conference (Mammalian DNA Repair: February 7-11, 1999, Ventura, California) の招待講演で発表を行ったが、参加者から高い評価を受けた。ヒトにおける TC-NER の分子機構、すなわち、転写と DNA のカップリング機構は現在殆ど不明の状況であるが、その解明に向けて、我々の XAB2 遺伝子の発見は重要な糸口を提供するものと期待される。TC-NER 機構に欠損を持つヒト遺伝疾患としてコケイン症候群が知られている。XAB2 が CSA、CSB と

密接な相互作用をし、同じく TC-NER 機構に関与することから、XAB2 遺伝子に突然変異を持つことにより発症している早期老化症コケイン症候群と類似のヒト遺伝疾患が存在する可能性があり、現在それを検索している。その意味で、XAB2 遺伝子の解析は老化機構の解明に貢献する可能性を秘めており、そのことが明かになれば、XAB2 遺伝子の polymorphisms と正常人老化の関連という、post-genome sequencing の一つの方向に貢献できるものと考えている。

一方、XAB2 遺伝子を欠損したマウスを遺伝子ターゲティング法により作成中である。XAB2 が基本転写に関与する遺伝子であることより、XAB2-null mutant マウスは致死性を示すかも知れない。そこで、XAB2 遺伝子の C 末端 162 アミノ酸残基を欠失するような部分的なターゲティングも同時に進め、相同組み換え体 ES 細胞を得ている。全長の XAB2 蛋白質に対する抗体をマイクロインジェクションすると、未照射細胞の RNA 合成および UV 照射後の RNA 合成の回復の両方が抑制されたのに対し、XAB2 蛋白質の C 末端 162 アミノ酸残基に対する抗体をマイクロインジェクションすると、UV 照射後の RNA 合成の回復は抑制されたが、未照射細胞の RNA 合成は影響を受けなかった。このことから、XAB2 蛋白質の C 末端が TCR 機構に特異的に関与するドメインであると推測され、この部分の欠失では基本転写に影響を与えず、viable でしかも TCR 機構が低下したマウスが得られる可能性がある。いずれにしろ、XAB2 遺伝子を欠損したマウスあるいは培養細胞が樹立できれば、XAB2 の機能を分子細胞生物学的に検索することが可能となる。

4) XP 患者における紫外線皮膚発癌の分子機構も現在殆ど不明の状況である。XPA 欠損マウスは、それを解明する上でよいモデルになることを示した。今後、post-genome sequencing の一つの方向として、DNA chip technology を用いた、健常および病的状態における遺伝子発現プロファイルを検索する必要性が説かれており、そのような方向で、XPA 欠損マウスにおける皮膚発癌の分子機構を解明して行きたいと思っている。

## E. 結論

1) XPA 蛋白質の損傷DNA およびRPA p70 subunit 結合ドメインであるMF122 (98番目のメチオニンから219番目のフェニールアラニンまでの122個のアミノ酸残基よりなる) の高次構造をNMR法により解明した。2) 遺伝的早老症コケイン症候群

(Cockayne syndrome:CS) A群、B群の原因遺伝子産物であるCSA、CSB、色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum:XP) A群の原因遺伝子産物であるXPA、および、RNA Polymerase II と結合する活性を持ち、転写と共役したヌクレオチド除去修復機構に関与する新規の蛋白質(XPA-binding protein 2: XAB2)を同定し、その遺伝子をクローニングした。

3) XPA 遺伝子をノックアウトしたマウス(XPA欠損マウス)は、外観上の異常を示さないが、ヌクレオチド除去修復能を完全に欠損し、低線量のUV照射により皮膚癌を高頻度で発生した。XPA欠損マウスにUV照射し発生した皮膚癌のp53遺伝子の突然変異は、正常マウスのそれとは異なり、変異のホットスポットが欠如し、転写鎖のDNA損傷が突然変異の原因になっていた。Restriction Landmark Genomic Scanning法により、XPA欠損マウスに発生した皮膚癌と正常皮膚上皮のDNAを比較し、皮膚癌で特異的に変化している遺伝子を同定した。以上の我々の結果は、ヒトにおける転写やDNA修復機構およびその欠損の分子病態の解明に向けて重要な糸口を提供するものである。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kaneda, Y., Kaneda Y., Kinoshita, K., Sato, M., Saeki, Y., Yamada, R., Wataya-Kaneda, M., & Tanaka, K. The induction of apoptosis in HeLa cells by the loss of LBP-p40. *Cell Death and Differentiation*, 5, 20-28, 1998
- 2) Takeuchi, S., Nakatsu, Y., Nakane, H., Murai, H., Hirota, S., Kitamura, Y., Okuyama, A., & Tanaka, K.

Strand specificity and absence of hotspots for p53 mutations in UVB-induced skin tumors of XPA-deficient mice.

- 3) Yeo, J. P., Nakatsu, Y., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Kraemer, K. H., & Tanaka, K. RPA2, A gene for 32 kDa subunit of replication protein A on chromosome 1p35-36, is not mutated in patients with familial melanoma linked to chromosome 1p36. *Melanoma Research*, 8, 47-52, 1998
- 4) Winter, D. B., Phung, Q. H., Umar, A., Baker, S. M., Tarone, R. E., Tanaka, K., Liskay, R. M., Kunkel, T. A., Bohr, V. A., & Gearhart, P. J. Altered spectra of hypermutation in antibodies from mice deficient for the DNA mismatch repair protein PMS2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 6953-6958, 1998
- 5) Hayashi, T., Takao, M., Tanaka, K., & Yasui, A. ERCC1 mutations in UV-sensitive Chinese hamster ovary (CHO) cell lines. *Mutation Research*, 407, 269-276, 1998
- 6) Ikegami, T., Kuraoka, I., Saijo, M., Kodo, N., Y. Kyogoku, Morikawa, K., Tanaka, K., & Shirakawa, M. Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA. *Nature Structural Biology*, 5, 701-706, 1998
- 7) Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M., Tanaka, K., & Kaneda, Y. Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ-liposomes. *Gene Therapy*, 5, 1031-1037, 1998
- 8) Kobayashi, T., Takeuchi, S., Saijo, M., Nakatsu, Y., Morioka, H., Otsuka, E., Wakasugi, M., Nikaido, O., & Tanaka, K. Mutational analysis of a function of xeroderma pigmentosum group A (XPA) protein in strand-specific DNA repair.

*Nucleic Acid Research*, 26, 4662-4668, 1998.

9) Ikegami, T., Kuraoka, I., Saijo, M., Kodo, N., Y. Kyogoku, Morikawa, K., Tanaka, K., & Shirakawa, M.

Resonance assignments, solution structure, and backbone dynamics of the DNA- and RPA-binding domain of human repair factor XPA  
*J. Biochem.*, in press.

10) Miyauchi-Hashimoto, H., Okamoto, H., Tanaka, K., & Horio, T.

Ultraviolet Radiation-induced suppression of natural killer cell activity is enhanced in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice.

*J. Invest. Dermatol.*, in press.

## 2 学会発表

1) Yoshimichi Nakatsu, Masafumi Saijo, Hiroshi Asahina, Hironobu Nakane, Naohiko Kodo, Seiji Takeuchi, Masahiko Nitta, Masahumi Yoshino, Minoru Ichikawa, Mitsuyoshi Minami, and Kiyoji Tanaka

Function of xeroderma pigmentosum group A gene in nucleotide excision repair and UV-induced skin carcinogenesis.

"Workshop on DNA Repair and Mutagenesis '98"  
February 5 - 7, 1998, Sendai

2) 新田雅彦、西條将文、中津可道、田中亀代次

XPA 蛋白質と結合する XAB1 (XPA binding protein 1) 蛋白質についての解析 II。

ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis '98」

平成10年2月5日～7日、仙台

3) 南満芳、中津可道、田中亀代次

XPA と結合する新規蛋白質 XAB2 (XPA binding protein 2) 遺伝子の解析。

ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis '98」

平成10年2月5日～7日、仙台

4) 田中亀代次

DNA 修復・突然変異と病気。

第87回日本病理学会総会、レクチャーシリーズ  
平成10年4月14-16日、広島

5) Kiyoji Tanaka

Function of the XPA gene in nucleotide excision repair.

Symposium 11 "Genomic Instability" in 3rd. Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology.

August 24-28, 1998, Osaka

6) 田中亀代次

ヌクレオチド除去修復異常と紫外線皮膚発癌。

第57回日本癌学会、ワークショップ12「DNA損傷と発癌」

平成10年9月30日～10月2日、横浜

7) 竹内聖二、吉川浩英、米増理恵、中津可道、市川稔、中根裕信、松原謙一、田中亀代次

RLGS法を用いて同定されたA群色素性乾皮症欠損マウスの紫外線誘発皮膚癌におけるゲノムの変化。

第57回日本癌学会

平成10年9月30日～10月2日、横浜

8) 市川稔、中津可道、中根裕信、田中亀代次

A群色素性乾皮症モデルマウスにおける紫外線誘発皮膚癌由来細胞株の紫外線抵抗性獲得機構の解析。

第57回日本癌学会

平成10年9月30日～10月2日、横浜

9) Kiyoji Tanaka

Functions of the XPA and XPA-binding proteins in nucleotide excision repair French-Japanese Cooperative Cancer Research Program, The 13th Workshop "Genomic Integrity and Molecular Bases of Cancer", October 6-8, 1998, Paris, France

10) 田中亀代次

XPA 蛋白質と結合する新規蛋白質の構造と機能。

第71回日本生化学会大会、シンポジウム「ゲノム情報の変換と維持」

平成10年10月14日-17日、名古屋

11) 田中亀代次

色素性乾皮症。

日本人類遺伝学会第43回大会、シンポジウム「変

異導入マウスを用いた遺伝病の発症機構の解析」  
平成10年10月14日～16日、甲府

12) 田中亀代次

色素性乾皮症とコケイン症候群タンパク質を共役させる新規タンパク質。

第21回日本分子生物学会年会、シンポジウム「ヘリカーゼ病の分子生物学的解析」

平成10年12月16日～19日、横浜

13) 新田雅彦、西條将文、中津可道、立花太郎、米田悦啓、田中亀代次

XPA 蛋白質と結合する XAB1 (XPA binding protein 1) 蛋白質についての解析 III。

第21回日本分子生物学会

平成10年12月16日～19日、横浜

14) 南満芳、中津可道、田中亀代次

XPA と結合する新規蛋白質 XAB2 (XPA binding protein 2) 遺伝子の解析。

第21回日本分子生物学会

平成10年12月16日～19日、横浜

15) Kiyoji Tanaka

Xeroderma pigmentosum group A-binding protein involved in basal transcription and transcription-coupled repair.

Gordon Research Conference on Mammalian DNA Repair

February 7-12, 1999, Ventura, California, USA.

16) 村井浩明、中津可道、権藤洋一、勝木元也、田中亀代次

A群色素性乾皮症遺伝子欠損・rpsL遺伝子トランスジェニックマウスを用いた紫外線誘発突然変異の検出。

ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis'99」

平成11年2月22日～25日、大阪

17) 南満芳、中津可道、田中亀代次

XPA と結合する XAB2 (XPA binding protein 2) 遺伝子の構造とその発現。

ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis'99」

平成11年2月22日～25日、大阪

18) 市川稔、吉野雅文、中津可道、池島三与子、島田隆、田中亀代次

A群色素性乾皮症モデルマウスにおける紫外線誘発皮膚癌由来細胞株の解析。

ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis'99」

平成11年2月22日～25日、大阪

19) 竹内聖二、吉川浩英、米増理恵、中津可道、市川稔、中根裕信、松原謙一、田中亀代次

RLGS法を用いて同定されたA群色素性乾皮症欠損マウスの紫外線誘発皮膚癌におけるゲノムの変化。

ワークショップ「DNA Repair and Mutagenesis'99」

平成11年2月22日～25日、大阪

G. 知的所有権の取得状況

特許、実用新案登録等は得られなかった。

**研究要旨** c-kit 癌原遺伝子の傍細胞膜領域の機能獲得性突然変異はヒト消化管ストローマ細胞腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor, GIST)の原因となる。多くの GIST は散発性で、体細胞突然変異によりおこるが、同様の突然変異が生殖系列でおこったため、GIST を多発した家系もみつかった。

#### A. 研究目的

c-kit 癌原遺伝子は、癌遺伝子 v-kit のホモログで、レセプター・チロシンキナーゼの 1 種(KIT)をコードしている。c-kit の機能獲得性突然変異遺伝子を 2 個持つマウスではメラノサイト、生殖細胞、赤血球、マスト細胞、カハール介在細胞を欠損あるいは減少することが知られている。一方 c-kit の機能獲得性突然変異はマスト細胞腫瘍の原因となることが知られており、ヒト消化管筋層に発生する消化管ストローマ腫瘍(gastrointestinal stromal tumor, GIST)は KIT を強く発現していることが知られているので、GIST でも c-kit の機能獲得性突然変異がみられるかどうか調べた。さらに散発性の GIST で c-kit の機能獲得性突然変異がみられた場合、生殖細胞に同様の変異を持つ家族性の GIST がないかどうか調べた。

皮膚における腫瘍としては扁平上皮癌とともに重要であるメラノーマはメラノサイトの腫瘍であるが、メラノサイトの腫瘍化に c-kit が関与している可能性もあり、手始めとして、c-kit の関与が最も強く疑われ、材料も入手しやすい GIST の研究からはじめたものである。

#### B. 研究方法

手術で切除された消化管の間葉系腫瘍のうち、パラフィン切片のヘマトキシリン染色で GIST と矛盾しない形態を示すとともに、免疫組織学的に、KIT か CD34、あるいはその両方を発現している腫瘍を GIST とした。GIST のパラフィン切片 5 枚から DNA を抽出して、c-kit のエクソン 11 と 17 を PCR で増幅し、おのおの塩基配列を決定した。

#### C. 研究結果

GIST の約 60% で、KIT の傍細胞膜領域に突然変異

をみとめた。突然変異を持つ cDNA をヒト胎児腎から樹立された細胞株 293T に導入して、c-kit のチロシンがリン酸化しているかどうか調べると、傍細胞領域に突然変異を有する c-kit の cDNA を導入した際にはすべての例でチロシンのリン酸化が認められると共に、*in vitro* カイネース法により、カイネース活性が構成的に認められた。対照として正常の c-kit の cDNA を 293T 細胞に導入した、KIT のチロシン・リン酸化は KIT のリガンドである stemcell factor(SCF)を加えた場合にのみ認められた。

次にこの c-kit の突然変異の生物学的意義を調べた。GIST でみつかった傍細胞膜領域の突然変異と同じ変異をマウス c-kit の cDNA に導入、この cDNA をマウスの Va/F3 細胞にレトロウィルスベクターを用いて導入した。Va/F3 細胞はインターロイキン 3 (IL-3) に依存性の細胞株であるが、マウス型の変異 c-kit の cDNA を導入すると IL-3 を加えなくても増殖を続け、ヌードマウスに移植すると、ヌードマウスを腫瘍死させた。

GIST のほとんどは単発であるが、もし c-kit の傍細胞膜領域の変異が生殖細胞でおこり、その変異が発生過程で致死的に働かないなら、GIST を多発する家系がみられるはずである。実際そのような家系が見つかった。発端者は、60 歳の女性であり、彼女は腸閉塞のため 2 回手術を受けた。手術時に小腸の筋層に腫瘍が多発していることがみつき、その時は平筋筋腫症と診断されたが、組織標本を見直した結果、多発する GIST であることが分かった。家族歴を調べると、この家系では多発性 GIST が優勢に遺伝していることが分かった。この家系で発生した GIST はすべてで c-kit の傍細胞膜領域に同じ変異を持っている。また白血球を調べてみると、GIST を発症したヒトでは白血球にも同じ c-kit の変異が見つかったので、c-kit の傍細胞膜領域の機能獲得性突然変異

が生殖系列におこると、多発性 GIST をその家系におこすことが分かった。多発性 GIST は cancer syndrome の 1 種と考えられる。

#### D. 考察

c-kit の傍細胞領域の突然変異は GIST の原因になる。この時傍細胞膜領域の変異は腫瘍ごとに異なり、によりコードされる codon550 から 560 のアミノ酸では、点突然変異でも欠失でもその結果として KIT の構成的な活性化がおこる。この原因はこれらのアミノ酸は KIT が構成的に 2 量体を形成するのを阻止する役割を持つためであろう。実際に傍細胞膜領域の 2 種の突然変異（点突然変異あるいは欠失）により KIT が構成的に 2 量体化することが確かめられている。傍細胞膜領域の突然変異は KIT の生理学的機能を失わせるという意味では機能獲得性ではなく、実は機能喪失性である。

#### E. 結論

c-kit 癌原遺伝子の傍細胞膜領域の機能獲得性突然変異は消化管ストローマ細胞腫瘍(gastrointestinal stromal tumor, GIST)の原因となる。通常の GIST は散発性に体細胞突然変異の結果おこるが、我々は同様の突然変異が生殖系列でおこったため、GIST を多発した家系も発見した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tsujino K, Kanno H, Hashimoto K, Fujii H, Jippo T, Morii E, Lee YM, Asai H, Miwa S, and Kitamura Y: Delayed onset of hemolytic anemia in CBA-Pk-lslc/Pk-lslc mice with a point mutation of the gene encoding red blood cell type pyruvate kinase. *Blood* 91:2169-2174, 1998.
- 2) Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Tunio GM, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, and Kitamura Y: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279:577-580, 1998.

- 3) Ito A, Morii E, Maeyama E, Jippo T, Kim DK, Lee YM, Ogihara H, Hashimoto K, Kitamura Y, and Nojima H: Systematic method to obtain novel genes that are regulated by mi transcription factor (MITF): impaired expression of granzyme B and tryptophan hydroxylase in mi/mi cultured mast cells. *Blood* 91:3210-3221, 1998.
- 4) Tachibana K, Hirota S, Iizaka H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa SI, Kishimoto T, and Nagasawa T: A chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393:591-594, 1998.
- 5) Sato M, Morii E, Komori T, Kawahata H, Suigimoto M, Terai K, Shimizu H, Yasui T, Ogihara H, Yasui N, Oshi T, Kitamura Y, Ito Y, and Nomura S: Transcriptional regulation of osteopontin gene in vivo by PEBP2aA/CBAF, and ETS1 in the skeletal tissues. *Oncogene* 17:1517-1525, 1998.
- 6) Tsukamoto Y, Kuwabara K, Hirota S, Kawano K, Yoshikawa K, Ozawa K, Kobayashi T, Yanagi H, Stern DM, Toyama M, Kitamura Y, and Ogawa S: Expression of 150KDa oxygen-regulated protein (ORP150) in human breast cancer. *Lab Invest.* 78:699-706, 1998.
- 7) Kim DK, Morii E, Ogihara H, Hashimoto K, Oritani L, Lee YM, Jippo T, Adachi S, Kanakura Y, and Kitamura Y: Impaired expression of integrin alpha-4 subunit in cultured mast cells derived from mutant mice of mi/mi genotype. *Blood* 92:1973-1980, 1998.
- 8) Lee YM, Jippo T, Kim DK, Katsu Y, Tsujino K, Morii E, Kim HM, Nawa T, and Kitamura Y: Alteration of protease expression phenotype of mouse peritoneal mast cells by changing the microenvironment demonstrated by in situ hybridization histochemistry. *Am J Pathol* 153:931-936, 1998.
- 9) Berin MC, Kiliann AJ, Yang PC, Groot JA, Kitamura Y, and Perdue MH: The influence of mast cells on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine. *J Immunol* 161:2561-2566, 1998.
- 10) Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, Kanakura Y, Tanaka T,

Takebayashi A, Matsuda H, and Kitamura Y: Familial gastrointestinal stromal tumors with germ line mutation of KIT. *Nature Genet* 19:323-324, 1998.

11) Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Hase-Sawada N, Taniguchi M, Nishida T, Nakayama S, Kitamura Y, Shinomura Y, and Matsuda Y: A novel gain-of-function mutation of c-kit in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 115:1090-1095, 1998.

12) Tsujimura T, Hashimoto K, Kitayama H, Ikeda H, Sugahara H, Matsumura I, Kaisho T, Terada N, Kitamura Y, and Kanakura Y: Activating mutation in the catalytic domain of c-kit elicits hematopoietic transformation by receptor self-association not at the ligand-induced dimerization site. *Blood*, in press.

切片培養系におけるマウス小脳顆粒細胞のアポトーシスにおける  
p53遺伝子の役割に関する研究

分担研究者 畠中 寛 大阪大学蛋白質研究所教授

研究要旨 小脳切片培養上でみられたDNA切断に伴うアポトーシスにおいても、p53が関与していることが明らかになった。また、c-Junの発現上昇が、p53依存的にみられることから、p53依存性の細胞死のカスケードに深く関与していることが示唆された。

A. 研究目的

脳神経系におけるニューロンのアポトーシスは、非分裂細胞にとって、その死が置き換えがきかないことから重要なものと考えられている。特に、疾患あるいは障害によって生じるアポトーシスは脳神経系における機能に重大な影響を及ぼすものと考えられる。分裂終了後の小脳顆粒細胞を用いたDNA鎖切断傷害で生じるアポトーシスに、がん抑制遺伝子p53が関わっていることがすでに明らかになっている。ここでは、脳神経系を構成している様々な細胞相互の影響がどのようにニューロン死に関わっているのかを明らかにする目的で、よりin vivoに近い系である切片培養系を確立し、p53野生型およびそのノックアウトマウスを用いて研究を行った。

B. 研究方法

生後12日目のp53野生型及びそのノックアウトマウスの小脳を、正中線に平行に厚さ400 $\mu$ mにスライスし、多孔質膜上で1日間培養後、DNA鎖切断をもたらす薬剤プレオマイシンを添加し、切片培養下のニューロンに与える影響を調べた。培養後凍結切片を作製し、ニッスル染色、TUNEL染色、および、抗p53、抗c-Jun、抗c-Fos抗体での免疫組織化学染色を行った。また、リン酸化JNKの上昇、即ちJNKの活性化、caspase-3の活性化、およびPARPの分解については、小脳顆粒細胞の分散培養系を用いて解析を行った。

C. 研究結果

p53野生型マウスの小脳培養切片にプレオマイシン添加を行ったところ、TUNEL陽性細胞数の経時的増加を観察した。このとき、p53およびc-Jun陽性細胞数

の増加もみられた。しかし、p53ノックアウトマウスからの小脳培養切片では、TUNEL陽性細胞は観察されず、c-Jun陽性細胞もみられなかった。一方、c-Fos陽性細胞では差はみられなかった。p53、c-Jun発現の小脳における構成分布をp53野生型マウスの培養切片上で観察した結果、特に内顆粒層、プルキンエ細胞層において、プレオマイシン添加により著しい発現上昇がみられた。以上の結果は、小脳切片培養上でみられたDNA切断に伴うアポトーシスにおいても、p53が関与していることが明らかになった。また、c-Junの発現上昇が、p53依存的にみられることから、p53依存性の細胞死のカスケードにc-Junが深く関与していることが示唆された。

c-Jun陽性細胞の発現は、TUNEL、p53陽性細胞の発現よりも早い段階で起こっていた。即ち、プレオマイシン添加後比較的早い時間にc-Jun細胞の増加がみられることがわかった。そこで、プレオマイシン添加後9時間以内における、c-Junの上流にあるJNKの活性の変動を調べた。即ち、リン酸化JNKの上昇を培養小脳顆粒細胞を用いてウェスタンブロットティング法により調べた。その結果、プレオマイシン添加により、リン酸化JNKの上昇がみられた。一方、ノックアウトマウスの小脳顆粒細胞では、その変化はみられなかった。このことから、この細胞死でのc-Junの発現上昇の上流にJNKの活性化が関与していることが示唆された。

次に、この細胞死におけるcaspaseの関与を調べるため、切片培養系にプレオマイシンとcaspase-3の阻害剤Ac-DEVD-choを同時添加した。その結果、TUNEL染色によるアポトーシス陽性細胞の数は減少したが、p53およびc-Jun陽性細胞数に変動はみられ



なかった。このことから、この細胞死におけるcaspase-3の活性化の関与が考えられた。そこで、実際にcaspase-3の活性化が起きているかどうかを調べた結果、ブレオマイシン添加後6時間後で、無添加に比べて約18倍のcaspase-3活性の上昇がみられた。

さらに、ブレオマイシン添加によるcaspase-3の活性化によるPARPの分解が起こっているかをウェスタンブロッティングにより調べると、ブレオマイシン添加時間が長くなるに連れて、PARPの分解が進んでくることが分かった。このとき、caspase-3の阻害剤を同時添加すると、PARPの分解が抑制された。

これらのことから、ブレオマイシン添加によるDNA鎖切断傷害で生じる小脳顆粒細胞のアポトーシスにおいては、p53が深く関与していること、また、p53およびc-Junの発現上昇の上流にJNKの活性化が関与していること、そして、p53およびc-Junの発現上昇の下流にcaspase-3の活性化、そしてそれに伴うPARPの分解が関与していることが示唆された。

#### D. 考察

今回の研究において、小脳切片培養系におけるDNA鎖切断傷害に伴うアポトーシスにおいてp53が深く関与する事がわかった。今後、JNKおよびcaspase-3の活性化等を、分散培養系だけでなく、切片培養系においても調べていく必要があると考えている。そして、これらのアポトーシスに関与する分子が、時空間的にどのように変動するか、また、それらをp53がどのように制御しているかを今後この小脳切片培養系を用いて解析していこうと考えている。

#### E. 結論

p53野生型及びそのノックアウトマウスの小脳切片培養系を用いて、DNA鎖切断により誘導されるアポトーシスの解析を行った結果、小脳顆粒細胞およびプルキンエ細胞がともにp53依存的にアポトーシスを起こすことがわかった。また、このDNA鎖切断に伴うアポトーシスにおいて、c-Junの発現上昇が観察され、このc-Junの発現上昇もp53依存的に起こることがわかった。一方、培養小脳顆粒細胞の実験から、DNA鎖切断処理により、JNKの活性化がp53依存的に観察されることがわかった。また、このアポトーシスの系において、

caspase-3の活性化が起こることが観察された。そして、このcaspase-3の活性化は、p53およびc-Junの発現上昇の後に起こっている可能性を見出した。

#### F. 研究発表

1. K. Shimoke, S. Yamagishi, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1999) *Dev. Brain Res.*, 112, 245-253.
2. H. Ohnishi, M. Yamada, M. Kubota, H. Hatanaka and S. Sano (1999) *J. Neurochem.*, in press.
3. S. Kinoshita, H. Yasuda, N. Taniguchi, R. Katoh-Semba, H. Hatanaka and T. Tsumoto (1999) *J. Neurosci.*, in press.
4. Y. Ishikawa, T. Satoh, Y. Enokido, C. Nishio, T. Ikeuchi and H. Hatanaka (1999) *Brain Res.*, in press.
5. T. Satoh, T. Yamagata, Y. Ishikawa, M. Yamada, Y. Uchiyama and H. Hatanaka (1999) *J. Biochem.*, in press.
6. N. Takei, O. Tanaka, Y. Endo, D. Lindholm and H. Hatanaka, (1998) *Neuropharmacol.*, in press.
7. H. Aoshima, K. Kadoya, H. Taniguchi, T. Satoh and H. Hatanaka, (1999) *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press.
8. T. Satoh, T. Numakawa, Y. Abiru, T. Yamagata, Y. Ishikawa, Y. Enokido and H. Hatanaka, (1998) *J. Neurochem.*, 70, 316-324.
9. A. Nakatani, M. Yamada, A. Asada, M. Okada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1998) *J. Biochem.*, 123, 707-714.
10. T. Ikeuchi, A. Nakatani, M. Yamada, N. Itokazu, A. Awaya and H. Hatanaka, (1998) *J. Biochem.*, 123, 423-430.
11. T. Araki, Y. Enokido, N. Inamura, S. Aizawa, J. C. Reed and H. Hatanaka, (1998) *Brain Res.*, 794, 239-247.
12. N. Takei, T. Numakawa, S. Kozaki, N. Sakai, Y. Endo, M. Takahashi and H. Hatanaka (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 27620-27624.
13. K. Shimoke, M. Yamada, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, (1998) *FEBS Lett.*, 437, 221-224.
14. Y. Abiru, R. Katoh-Semba, C. Nishio and H. Hatanaka, (1998) *Brain Res.*, 809, 115-126.

## 分担研究報告書

X P A, C S B 欠損マウスの腫瘍免疫学的解析

分担研究者

堀尾 武

関西医科大学皮膚科教授

### 研究要旨

腫瘍の排除には、種々の免疫学的排除機構が関与する。色素性乾皮症（以下 X P）の高頻度皮膚発癌には、紫外線 DNA 損傷の除去修復障害のみでなく、免疫学的腫瘍排除能の障害も関与する可能性がある。そこで、X P モデルマウスを用いて、細胞性免疫能及び腫瘍免疫能について検討した。ハプテン経皮塗布による接触過敏反応により、抗原特異的細胞性免疫能を野生株マウスと比較した。また、抗原非特異的腫瘍免疫については、natural killer（以下 N K）細胞数とその cytotoxic activity を検討した。さらに、これらが紫外線照射により障害されやすいかどうかを検討した。その結果、X P マウスでは、紫外線非照射状態における細胞性免疫能や N K 細胞機能は正常であったが、紫外線照射によりこれらが著しく障害された。したがって、X P の高頻度皮膚発癌には、紫外線による免疫抑制の増強も関与していることが示唆された。

### A. 研究の目的

紫外線腫瘍の機序としては、紫外線損傷 DNA による突然変異の発生や oncogene の活性化、癌抑制遺伝子の不活化が示されている。加えて近年では、紫外線の免疫抑制作用により、癌の免疫学排除機構が障害されるために発癌にいたることが明らかにされている。色素性乾皮症（以下 X P）患者における高頻度皮膚発癌にも、DNA 修復障害だけでなく、腫瘍免疫や細胞性免疫の低下が関与している可能性がある。

腫瘍免疫には、抗原特異的細胞性免疫と、N K 細胞を主体とした抗原非特異的細胞性免疫が関与している。X P 患者の高頻度皮膚発癌の病態形成におけるこれらの異常の関与を明らかにするために今回の実験を立案した。

### B. 研究方法

1. X P マウスの細胞性免疫能とその紫外線感受性を、以下の方法で野生株マウスと比較した。紫外線照射には中波長紫外線（以下 U V B）を用いた。

- (1) 感作物質 D N F B で経皮感作し、5 日後に耳介で惹起を行い接触過敏反応の程度を比較した。
- (2) 表皮ランゲルハンス細胞数に対する U V B の影響を経時的に検討した。染色法は A D P a s e 染色を用い

- た。
- (3) U V B 照射皮膚にハプテン D N F B を塗布して経皮感作を行い、5 日後の耳介での惹起反応により、局所性紫外線誘導性免疫抑制の程度を検討した。
- (4) U V B 照射後に非照射皮膚に D N F B を塗布して経皮感作を行い、5 日後の耳介での惹起反応により、全身性紫外線誘導性免疫抑制の程度を検討した。

2. X P マウスの腫瘍免疫能とその紫外線感受性を、以下の方法で野生株マウスと比較検討した。

- (1) 末梢血中の白血球、リンパ球、リンパ球サブセット、N K 細胞数を検討した。
- (2) 紫外線照射後の末梢血中の白血球、リンパ球、リンパ球サブセット、N K 細胞数を検討した。
- (3) N K 細胞機能を、Y A C 細胞を target cell にした cytotoxic assay により検討した。マウスの spontaneous N K 活性は低値であるため、poly I:C を脾臓採取の 18 時間前に腹腔内投与した場合の誘導性 N K 活性も検討した。
- (4) 紫外線照射後の脾臓の N K 細胞機能を、Y A C 細胞を target cell にした cytotoxic assay により検討した。
- (5) 上記 assay にて、紫外線照射後の N K 細胞活性の経時的变化を検討した。

## C. 研究結果

### 1. 細胞性免疫能の検討

#### (1) 接触過敏作用能

X Pマウスの接触過敏作用能は野生株マウスと同程度であった。

#### (2) 表皮ランゲルハンス細胞数に対するUVBの影響

非照射状態での表皮ランゲルハンス細胞数には、両群マウスで違いはみとめられなかった。少量UVB照射(25mJ/cm<sup>2</sup>)翌日のランゲルハンス細胞数は、野生株マウスでは照射前の25~30%に低下していたが、X Pマウスでは5%以下で、UVBによる減少が強度であった。

さらに、UVB照射後の細胞数の経時的変化を検討したところ、野生株マウスでは、照射3日後に最低値をとり、7~14日後には60~75%に回復し、19日後にはほぼ照射前の状態に戻るが、X Pマウスでは、照射19日後でも照射前の50%で、回復の遅延が認められた。

#### (3) 局所性紫外線免疫抑制

野生株マウスでは、100mJ/cm<sup>2</sup> UVB照射では、約50%の免疫抑制がみられたが、40mJ/cm<sup>2</sup>、10mJ/cm<sup>2</sup>照射では免疫抑制の程度は10~20%であった。一方、X Pマウスでは、いずれのUVB照射量でも50~70%の免疫抑制が生じ、局所性紫外線免疫抑制の増強が認められた。

#### (4) 全身性紫外線免疫抑制

野生株マウスでは、0.5J/cm<sup>2</sup> UVB照射では約75%の、0.125J/cm<sup>2</sup>照射では40%の免疫抑制がみられた。一方、X Pマウスでは、いずれのUVB照射量でも95%以上の免疫抑制が生じ、全身性紫外線免疫抑制の増強が認められた。

### 2. 抗原非特異的腫瘍免疫能の検討

#### (1) 末梢血中の白血球数、リンパ球数、NK細胞数の検討

非照射状態では、白血球数、リンパ球数、NK細胞数のいずれも、X Pマウスでは野生株マウスに比較して高値の傾向があったが、有意差はなかった。

#### (2) 末梢血中の各血球に対するUVB照射の影響

UVB500mJ/cm<sup>2</sup>を1回照射、3日連日照射、5日連日照射した翌日に細胞数を検討した。野生株マウスでは、いずれの照射量でも、照射前に比較して有意な変化はみとめられなかった。一方、X Pマウスでは、1回照射では変化が生じなかったが、3回及び5回照射により、リンパ球、NK細胞数に有意な減少がみら

れた。

また、500mJ/cm<sup>2</sup>を5回連日照射した後のこれらの経時的変化を検討した。白血球、リンパ球は、両群マウスとも、照射3~5日後に最低となり、10日~15日後には照射前の値に回復した。X Pマウスでは、減少の程度がやや強度で、回復が遅延する傾向にあった。NK細胞は、野生株マウスでは照射3日後に一過性に若干の減少を示したのみであったが、X Pマウスでは、照射翌日から5日後まで著明な減少が持続してみられ、15日後にようやく回復した。

#### (3) NK細胞機能の検討

非照射状態では、spontaneous及び誘導性のNK活性ともに、X Pマウスの方が野生株マウスよりも高い傾向がみられた。

#### (4) NK細胞に対するUVB照射の影響

UVB500mJ/cm<sup>2</sup>を1回、及び3回、5回連日照射した翌日のNK活性を検討した。野生株マウスでは、いずれの照射量によっても、poly I:C誘導性NK活性の低下はみられなかった。一方、X Pマウスでは、1回照射ではNK活性に変化はなかったが、3回及び5回連日照射により、非照射状態のそれぞれ60%、30~40%に活性が低下した。

#### (5) UVB照射後のNK活性の経時的変化

X Pマウスにおける、500mJ/cm<sup>2</sup>-UVB3回及び5回照射後のNK活性の経時的変化を検討した。3回照射では、照射翌日から5日後までは照射前の60%の活性に低下しており、10日後にはほぼ元の値に回復した。5回連日照射の場合には、照射翌日から3日後までは照射前の20~40%、5日後から10日後まではやや回復して照射前の40~60%の値をとり、15日後に照射前の値に回復した。なお、この間、脾臓のNK細胞数には変化はなかった。

## D. 考察

腫瘍排除には種々の免疫機構が関与している。腫瘍細胞が組織適合抗原を表出している発癌早期には抗原特異的細胞性免疫が機能し、発癌後期の組織適合抗原表出を失った未分化腫瘍にはNK細胞を主体とした抗原非特異的細胞性免疫が働くと考えられている。今回の実験では、X Pマウスでは、ハプテンに対する抗原特異的細胞性免疫とNK細胞機能の両方が紫外線照射により強度に障害されることが示された。

まず、X Pマウスでは少量のUVB照射でも局所性及び全身性紫外線免疫抑制が強度に誘導された。局所性紫外線免疫抑制は、UVBによるランゲルハンス細

胞の減少だけでなく、UVBにより分泌される種々のサイトカインが関与すると考えられている。また、全身性免疫抑制にも、UVBにより皮膚で産生されるIL-10、prostaglandins、ウロカニン酸が関与することが明らかにされている。したがって、XPマウスでは、UVBによりこれらの免疫抑制性サイトカインやprostaglandinの産生が亢進している可能性がある。XP細胞では、紫外線DNA損傷の修復障害により、ピリミジンダイマー除去ができないために、これらのサイトカインやprostaglandinsの産生亢進が誘導されるものと考えられる。今後は、ピリミジンダイマーの過剰形成及び残存が、これらのサイトカインやprostaglandins産生にどのように関与するかを検討する必要がある。

また、XPマウスでは、UVBによるNK細胞機能抑制も強度に生じた。この機序としては、末梢循環NK細胞に対するUVBの直接傷害とサイトカインを介した間接作用が考えられる。後者については、局所性及び全身性免疫抑制と同様に皮膚構成細胞や血球からIL-10やprostaglandinが大量に産生されるために、NK細胞活性化に必要なIFN-gやIL-12が阻害されてNK細胞機能障害が生じている可能性がある。

実際のヒトXPでも、一部の患者では種々の免疫学的異常が報告されている。細胞性免疫の低下、リンパ球数やそのサブセットの異常及びNK細胞数の低下、リンパ球、NK細胞機能の低下などが挙げられる。しかし、正常であったという報告や患者によりheterogeneousであるという報告もあり、一定しない。XPマウスを用いた実験では、非照射状態では、接触過敏反応もNK細胞数およびその機能も共に低下はなく、UVB照射によって低下がみとめられた。したがって、XP患者で報告されているこれらの異常も、constitutiveな異常ではなく紫外線曝露により生じた可能性が示唆される。XP患者の免疫能におけるheterogeneityは紫外線曝露の程度を反映している可能性がある。

#### E. 結論

XPマウスはヒトXPの皮膚症状である強度の光線過敏や高頻度皮膚発癌を表現しており、ヒトXPの優れたモデルである。XPの高頻度紫外線発癌の機序には、主に皮膚構成細胞の紫外線DNA損傷の修復障害が関与している。さらに、今回の実験により、免疫学的腫瘍排除機構が紫外線により著しく障害されることも、XPの高頻度発癌に関与することが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Enhanced inflammation and immunosuppression by ultraviolet radiation in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice.

Hiroko Miyauchi-Hashimoto, Kiyoji Tanaka, Takeshi Horio.

J. Invest Dermatol 107:343-348:1996

Ultraviolet (UV) radiation-induced suppression of natural killer (NK) cell activity was enhanced in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice.

Hiroko Miyauchi-Hashimoto, Hiroyuki Okamoto, Kiyoji Tanaka, Takeshi Horio.

J Invest Dermatol 110:696:1998

##### 2. 学会発表

Ultraviolet (UV)-induced inflammation and immunosuppression enhanced in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice.

Hiroko Miyauchi-Hashimoto, Kiyoji Tanaka, Takeshi Horio.

第20回日本研究皮膚科学会

Photodermatological reactions in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice.

Hiroko Miyauchi-Hashimoto, Kiyoji Tanaka, Takeshi Horio.

European Society for Dermatological Research, 25th annual meeting

色素性乾皮症のモデルマウス

橋本洋子、堀尾 武

第97回日本皮膚科学会総会ワークショップ“紫外線と皮膚”

Ultraviolet (UV) radiation-induced suppression of natural killer (NK) cell activity was enhanced in xeroderma pigmentosum group A (XPA) model mice.

Hiroko Miyauchi-Hashimoto, Hiroyuki Okamoto, Kiyoji Tanaka, Takeshi Horio.

International Investigative Dermatology 1998