



Decreased gene expression responsible for post-ultraviolet DNA repair synthesis in aging: a possible mechanism of age-related reduction in DNA repair capacity

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 慶人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/313

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 1 2 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 1 月 2 0 日
氏 名	高 橋 慶 人		
論文題目	Decreased gene expression responsible for post-ultraviolet DNA repair synthesis in aging: a possible mechanism of age-related reduction in DNA repair capacity (紫外線照射後の DNA 修復合成に関わる遺伝子の加齢による発現低下：加齢に伴う DNA 修復能低下の考え得るメカニズム)		

博士(医学) 高 橋 慶 人

論文題目

Decreased gene expression responsible for post-ultraviolet DNA repair synthesis in aging: a possible mechanism of age-related reduction in DNA repair capacity

(紫外線照射後のDNA修復合成に関わる遺伝子の加齢による発現低下：加齢に伴うDNA修復能低下の考え得るメカニズム)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

DNAの損傷は細胞死や突然変異を誘導し、老化や癌化の原因となることが知られている。紫外線(UV)によるDNA損傷は主にヌクレオチド除去修復機構(nucleotide excision repair: NER)によって修復されるが、近年、皮膚細胞において加齢に伴うNERの機能低下が報告されており、この加齢変化が皮膚老化の進行に影響を与えると考えられている。しかし、そのメカニズムについての報告例は少ない。そこで本研究ではヒト皮膚線維芽細胞を用いて加齢に伴うDNA修復能低下のメカニズムを検討した。

〔材料ならびに方法〕

様々な年齢(0、3、4、5、7、10、68、69、75、79、88、89および95才)の日本人皮膚に由来する線維芽細胞について以下の2種類の方法によりDNA修復能を評価した。①chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子を含むレポータープラスミドに0-700J/m²のUVC(主に254nm)を照射し、一定量の損傷を与えた後、各細胞に導入し48時間後のCAT活性を測定した(宿主細胞回復法)。②各細胞に20J/m²のUVCまたは500J/m²のUVB(290-320nm)を照射し、経時的に回収したDNA中の損傷量をシクロブタン型ピリミジンダイマーおよび6-4 光産物のモノクローナル抗体を用いてELISA法により定量した。次いでNERに関わる既知因子の内、約20種類について定常状態でのmRNA発現量をadaptor-tagged competitive PCR (ATAC-PCR)法により0才および95才由来の細胞間で比較した。これらのNER因子の内、9遺伝子について様々な年齢(3、4、5、10、68、69、75および88才)の細胞におけるmRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法により解析した。さらにこれらの細胞におけるDNA polymerase δ 1タンパク質の発現量をウェスタンブロットティング法により調べた。

〔結果〕

宿主細胞回復法によりUVで損傷を受けたDNAの機能回復を指標としたDNA修復能の評価を行った。その結果、老齢者由来の細胞では若齢者由来の細胞の約2分の1程度まで修復能の低下が見られた。次に同じ細胞群を用いてELISA法によりUVによる主要なDNA損傷を定量し、UV照射後のDNA損傷量の経時的な減少速度を求めて損傷の除去能を調べたところ、加齢変化は認められなかった。NERは30種類以上の因子の働きにより、①損傷DNAの認識、②損傷DNA鎖の切除、③修復合成(新生DNA鎖合成)の過程を経て完了するが、2種類の評価法による結果の食い違いから、老齢者の細胞ではDNA損傷の認識・切除能ではなく、最終過程の修復合成能が衰えていると考えられた。そこでNER因子の発現との関連性を調べるため、老齢者および若齢者の細胞1例ずつを用い(0および95才)、約20種のNER因子のmRNA発現量をATAC-PCR法により網羅的に比較した。その結果、老齢者由来の細胞では全体的な発現低下が見られ、特にreplication factor C (RFC)やDNA polymerase δ など修復合成に関わる因子の発現低下が顕著であっ

た。この結果が個体差でないことを確認するため、さらに複数の細胞を用いてNER各過程の代表的な因子のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法により解析したところ、ATAC-PCR法の結果と一致して特に修復合成に関わる因子(DNA polymerase δ 1、RFC4およびPCNA)に加齢による顕著な発現低下が見られた。さらにDNA polymerase δ 1についてはタンパク質レベルでも加齢による発現の低下を確認した。以上の結果より、加齢に伴うDNA修復能低下が修復合成因子の量的な不足によって生じている可能性が示された。

〔考察〕

修復合成因子の不足は損傷DNA鎖が切除されたあとの不安定な一本鎖DNAの状態を長引かせると推測される。このような場合、UV照射後の細胞生存率が低くなる可能性が考えられる。しかしながら、加齢によってUV感受性は高くなるという事実は知られておらず、加齢に伴うDNA修復能の低下はUV感受性にはほとんど影響を与えていないと考えるのが妥当である。とは言え、UV照射後に不安定な一本鎖状態のDNAが多く存在するということは、塩基取り込みの際にエラー頻度の増加を招く恐れがある。したがって、このような加齢変化が長期的にDNA変異の蓄積に影響を与え、皮膚癌の発生や老化の進行に拍車をかけている可能性が十分に考えられる。

〔結論〕

UVによるDNA損傷の加齢に伴う修復能低下は、NERの最終過程に関わる因子の発現低下がもたらす修復合成能の衰えが要因であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

皮膚は、加齢とともにゆっくりと変性する。特に、環境からの光照射によってDNAに損傷が起こり、それが蓄積することで、見た目にも区別できる老化特有の変性となって現れる。実際には、DNAの損傷は蓄積するだけでなく、修復もされている。この修復過程を担うのは、ヌクレオチド除去修復機構(nucleotide excision repair: NER)である。この機構が加齢とともに低下して、十分な働きをしなくなることが皮膚老化の原因と考えられている。しかし、これまでのところ、その機構の詳細な研究例は少なく、全貌は分かっていない。そこで申請者は、ヒト皮膚標本を集め、NERの働きの程度を調べて、加齢による変化を明らかにしようとした。

〔方法〕

様々な年齢の日本人の皮膚由来の線維芽細胞のもつDNA修復能を評価した。DNA標本にUVCの光照射をしてこれに損傷を与えたのち、これを細胞にトランスフェクトし、48時間後に発現した酵素(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)の活性を測定して、修復能の回復の程度を調べた。また、細胞に直接UVCやUVBの光照射をし、照射後に一定の時間間隔でDNAを抽出し、その損傷を分子の形態変化として検出した。形態変化として、シクロブタン型ビリミジンダイマーおよび6-4光産物の産生を選び、それらの構造に対するモノクローナル抗体によるELISA法を用いて定量した。20種類のNERに関わる既知因子の発現量をPCRによってmRNAを定量して調べた。DNAポリメラーゼ δ 1の発現量をウェスタンブロット法により調べた。これらの量を年齢間で比較することを行った。

〔結果〕

DNAの修復能力を年齢間で比較したところ、高齢者由来の細胞では、若年者由来の細胞に比して、1/2程度まで修復能が低下していた。UV照射した線維芽細胞におけるDNA損傷の除去能については、高齢者と若年者では差が見られなかった。しかし、NERに関わる蛋白の20種に対応するmRNAの発現レベルは、両者で顕著な差を示し、若年者では多くの発現があるのに対し、高齢者ではその半分前後の発現量となるものが多数あった。DNAポリメラーゼ δ 1の発現も高齢者では、著明に減少していた。

これらのことから申請者は、老化にともなうDNA修復能の低下は、DNA損傷部位の認識、巻き戻し、切り出しのような修復前段階の機能低下によるのではなく、修復の後段階のDNA合成過程における機能の低下が原因となっていることを結論した。審査委員会は、タンパクとmRNAの発現量をヒト皮膚からの標本において実際に調べ、損傷DNAの修復機構に関する詳細を明らかにしたことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) DNAの光吸収の波長依存性
- 2) DNAの分子構造の中で光吸収能をもつ部位はどこか
- 3) DNAの細胞への導入量を制御する方法
- 4) DNA修復能が飽和することはないか
- 5) 線維芽細胞を実験に使用した理由
- 6) 年齢依存曲線が急な曲がりを持って高齢者領域で横ばいになる理由
- 7) 細胞に光照射をするときの条件
- 8) ELISA法の実施の実際(オリゴヌクレオチドの処理法、蛋白が結合したときの処理法)
- 9) NERに関わる蛋白の遺伝子は構成性か誘導性か
- 10) UV以外の原因によるDNA傷害にも同様の修復機構が働くか
- 11) 修復機構の発癌性との関連

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	寺 川 進	
	副査	梅 村 和 夫	副査 中 神 哲 司