

モノクローナル抗体を用いた紫外線誘発DNA損傷の検出

森 俊雄 (奈良県立医科大学 ラジオアイソトープ実験施設)

太陽光に含まれる紫外線（特に、B紫外線）は皮膚細胞中にシクロブタン型ダイマーや(6-4)型ダイマーといったDNA損傷を効率的に誘起する。これらのDNA損傷が皮膚がん発生に深く関与することは、ヌクレオチド除去修復機構に欠陥を持つ色素性乾皮症(XP)患者の太陽光被ばく部位に皮膚がんが高頻度で発生することから支持される。

本研究では、発がん等、紫外線による種々の生物学的作用に対するDNA損傷の役割を明かにするため、モノクローナル抗体を利用した紫外線誘発DNA損傷の高感度検出系の確立を試みた。BALB/cマウスを、紫外線照射1本鎖DNA-メチル化牛血清アルブミン複合体で4回免疫後、脾臓細胞を摘出し、ミエローマ細胞と融合させた。生成した188個のハイブリドーマの培養上清について、紫外線照射DNAには結合するが未照射DNAには結合しないものをELISA法（酵素標識免疫法）で検討した結果、6個がこの条件に該当した。後で述べる性格付け実験を基に、これらの抗体をTDM-2, TDM-3, 64M-2, 64M-3, 64M-4, および64M-5と命名した。全ての抗体において、紫外線照射DNAとの結合性は、照射線量に依存して増加した。大腸菌由来の光回復酵素を用いてDNA損傷からシクロブタン型ダイマーのみを特異的に消去したところ、TDM抗体は結合性が著しく低下したが、64M抗体に変化は見られなかった。この結果から、TDM抗体はDNA中のシクロブタン型ダイマーを認識し、64M抗体はそれ以外の損傷を認識することが明かとなった。(6-4)型ダイマーは313 nmの紫外線で光異性化されること（Dewar型ダイマーに変化）を利用して、64M抗体がDNA中の(6-4)型ダイマーを認識することも明かにした。これらの実験を含め最終的に、シクロブタン型ダイマーに対して3種類、(6-4)型ダイマーに対して5種類、またDewar型ダイマーに対して1種類の、合計9種類のモノクローナル抗体が性格付けされた。

DNA損傷を鋭敏に検出するために、紫外線照射細胞から抽出したDNAを96穴プレートに吸着し、損傷特異モノクローナル抗体、ビオチン標識2次抗体、さらに酵素標識ストレプトアビジンを投与後、基質の着色度を定量するELISA法を確立した。シクロブタン型ダイマーの場合、50 ngのDNAを用いることにより、 0.5 J/m^2 といった超低線量の254 nm紫外線で誘発される損傷(0.28 fmol)を、換言すれば50万塩基中に1個生じる頻度の損傷を検出することができた。本法を用いて、ヒト正常およびXP-C細胞におけるシクロブタン型ダイマーおよび(6-4)型ダイマーの修復動態を定量化できた。さらに、紫外線照射した細胞や皮膚組織を固定し、損傷特異モノクローナル抗体、ビオチン標識2次抗体、さらに蛍光標識ストレプトアビジンで染色後、共焦点レーザー顕微鏡を利用することにより、細胞や組織内の損傷検出が可能である。修復過程にある正常ヒト細胞のDNA損傷を個々の細胞で三次元的に可視化した結果、損傷は細胞核内で不均一に修復されることが示唆された。また、紫外線照射されたヒト皮膚表皮の各細胞での損傷の定量化が可能となり、メラニンキャップにカバーされた細胞はそうでない細胞に比べて生成されるDNA損傷量が小さいことがわかった。