

Cell-based assay を用いた DNA 修復解析系の確立

○西永 真理¹, 井村 真由美¹, 倉田 隆一郎², 大西 一禎², 栗山 健一², 松永 司¹
(¹金沢大院薬, ²マンダム中央研)

我々の DNA は環境中に存在する外的要因によって絶え間なく損傷を受けているが、その要因の一つに太陽光紫外線があり、シクロピリミジン型ダイマー(CPD)や6-4 光産物(6-4PP)がその代表的な DNA 損傷である。これらはヒトにおいてヌクレオチド除去修復機構で修復され、細胞死や突然変異の誘発が抑制されている。ヒト皮膚への太陽光紫外線の影響を調べるには、表皮に存在するケラチノサイトで DNA 修復応答を解析する必要があるが、従来ほとんどの解析は太陽光紫外線がほとんど届かない真皮由来の線維芽細胞で行われており、ケラチノサイトの培養上の制限が大きな問題となっていた。本研究では、これを克服するために少ない細胞数でも DNA 修復応答を解析できる cell-based assay 系の確立を試みた。

まず、健常人由来線維芽細胞を用いて CPD および 6-4PP 検出の条件設定を行った。具体的には、96 マイクロウェルプレートへの植え込み細胞数、紫外線照射線量、抗体濃度などを詳細に検討し、線量依存的にシグナルが増大する条件を確定した。次に、この条件を基に、健常人由来線維芽細胞とヌクレオチド除去修復に先天的な異常をもつ色素性乾皮症 A 群(XP-A)患者由来線維芽細胞を用いて CPD と 6-4PP の修復動態を比較した。その結果、健常人由来線維芽細胞では紫外線照射後の時間に依存して両 DNA 損傷の減少が示されたのに対し、XP-A 患者由来線維芽細胞ではほとんど減少が見られず、従来酵素標識免疫測定法(ELISA)と同等の結果が得られることがわかった。本 cell-based assay 系は、DNA 抽出を行う必要がないためこれまでより約 2 桁少ない細胞数でアッセイが可能であり、ケラチノサイトなど培養に制限のある細胞種の DNA 修復解析に有用であることが示唆された。