

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860953

研究課題名(和文)色素性乾皮症の迅速診断法の確立

研究課題名(英文)Rapid diagnosis of xeroderma pigmentosum

研究代表者

富村 沙織 (TOMIMURA, Saori)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：30404271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エチニルウラシル化合物の取り込みと直接蛍光標識法を取り入れた高感度アッセイを用いて UDS (不定期DNA合成能、unsheduled DNA synthesis : UDS) およびRNA合成能 (RNA合成回復能、recovery of RNA synthesis : RRS) を測定し、XP遺伝子発現ベクターをプラスミドからレンチウイルスに変えトランスフェクション効率を飛躍的にあげるにより、色素性乾皮症の亜型診断を迅速に行うことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare disease that has extraordinary photosensitivity and the skin-cancer predisposition with an autosomal recessive inheritance. Compromised nucleotide excision repair (NER) activity is known to be the cause of several photosensitive disease including XP. NER activity are divided into two subtypes, one is 'unscheduled DNA synthesis (UDS)', and the other is 'recovery of RNA synthesis (RRS)' that is a specific measure of the transcription-coupled repair. Until very recently, reliable methods for these assays involved measurements of incorporation of radio-labeled nucleosides. We recently developed nonradioactive assay utilizing the alkyne-nucleosides, such as 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for thymidine alternatives in UDS and 5-ethynyluridine (EU) for uridine in RRS. With an integrated image analyser, we determined the incorporation of EdU as well as EU, which reflected a repair activity of the patient's dermal fibroblasts.

研究分野：皮膚科学

キーワード：色素性乾皮症 DNA修復能の検出 遺伝子相補性試験

1. 研究開始当初の背景

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum, 以下 XP) は本邦での頻度は稀ではあるが、光線過敏症の患者が来院した際には鑑別疾患の一つとして見逃してはならない重篤な疾患である。しかし、従来の方法による診断法は迅速性、簡便性、さらに感度に問題があり、確定診断に至らない例が存在しているのが現状であった。

2. 研究の目的

XP の診断は、患者由来線維芽細胞に紫外線照射を行い DNA を損傷した後、DNA 合成能 (不定期 DNA 合成能、unscheduled DNA synthesis : UDS) を測定し診断する。その後、亜型を決定するために相補性試験を行う。

現在最も普及している UDS 量の測定方法は、放射性 3 H-チミジンの取り込みを利用するものである。これは、DNA 修復の過程で取り込まれた放射性チミジンをオートラジオグラフィー、または、液体シンチレーションカウンターを用いて計測することで UDS 活性を測定する技法である。オートラジオグラフィーは正確な UDS 活性の測定を提供するが、実験過程は複雑でかつ高度な技能を要し、所要時間も 2~3 週間と長期に渡るだけでなく、ラジオアイソトープ利用施設が必須である。

また、相補性試験は、旧来、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法が用いられてきた。これは、患者細胞と既知の XPA~XPG 群の細胞のヘテロカリオン (異種融合細胞) に注目してその UDS が変化するかどうかで XP の群を判定するものである。例えば、患者細胞と XPA 群細胞の融合細胞の UDS は低値のままであり、XPB~XPG 群細胞との融合細胞の UDS が全て正常レベルまで上昇 (=相補) する現象が確認されれば、その患者は XPA 群と確定する。同法は手技が煩雑で結果が出るまで数

ヶ月を要する、現在では稀少となった既知の XP 各群細胞の使用が必要であるなどの点から、多数の臨床献体を同時に扱うことは不可能であった。近年、プラスミドを用いた相補性試験 (host cell reactivation : HCR 試験) も行われている。これは、各群 XP 分子の cDNA を持つプラスミドを患者細胞にトランスフェクションし、その UDS を測定するもので、従来の方法よりも簡便となった。但し、この方法ではヌクレオチド除去修復機能が比較的保たれている XPE 群の診断はできないなど改善の余地がある。

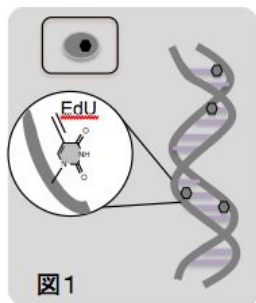
今回我々は、XP 診断法の迅速性、簡便性、更に感度を改善した。つまり、エチニルウラシル化合物の取り込みと直接蛍光標識法を取り入れた高感度アッセイを用いて UDS および RNA 合成能 (RNA 合成回復能、recovery of RNA synthesis : RRS) を測定し、XP 遺伝子発現ベクターをプラスミドからレンチウイルスに変えトランスフェクション効率を飛躍的にあげることにより、XP の亜型診断を迅速に行う。これは、申請者の属する皮膚科学教室も共著者として参加した紫外線高感受性症候群の診断のシステムに応用された実践的方法である (Nakazawa et al. *DNA Repair* 9 : 506-516, 2010、Nakazawa et al. *Nature Genet* 44(5) : 586-592, 2012)。このシステムの応用として、更に各候補遺伝子の DNA シークエンスをあわせて行い、XP の遺伝子診断を迅速同定することを目指した。

3. 研究の方法

- (1) 色素性乾皮症疑い患者を収集する。
- (2) 患者の無疹部から 4mm 程度の皮膚組織を採取し、定法に従い初代線維芽細胞を培養する。
- (3) 患者由来線維芽細胞を培養し、96 穴プレートにまく。UVC 照射を行い、DNA 損傷を誘発する。
- (4) DNA 修復の際、チミジンアナログとして

エチニルデオキシウリジン (EdU) を取り込ませる。その後、アジ化蛍光色素 (Alexa Fluor 488 azide) を加え、

取り込まれた EdU を蛍光標識することで可視化する。(核内の修復部位が多いほど、蛍光強度が高い。)(図 1)



(5) 蛍光画像取得顕微鏡装置(高感度検出装置)を用いて 96 穴プレートの各ウェルの細胞の蛍光画像を自動収集する。解析ソフトウェアを用いて蛍光強度 (= 修復活性) を算出する。同様に、エチニルウリジンを取り込ませることにより、RNA 合成回復試験も測定する。これにより、UDS および、RRS を評価する。

(6) 患者由来線維芽細胞にて UDS 及び RRS を測定し、その組み合わせから複数の候補遺伝子を決定する。患者由来線維芽細胞に、既知の XP 各群遺伝子 cDNA を含むレンチウイルスを患者細胞に感染させる。その細胞に UVC を照射後、上述の如く UDS、RRS を測定し、相補されている群を決定する。(XP ではバリエーションを除く全ての群で UDS が低下する。また、A、B、D、F、G 群では RRS が低下、C、E 群では正常である。)(図 2)

UDS/RRS結果	候補遺伝子
UDS活性 低 RRS活性 正常	→ XPC、E
UDS活性 低 RRS活性 低	→ XPA、B、D、F、G

図 2

(7) DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen ®) を用いて患者の線維芽細胞より DNA を単離する。

Web site Primer3 Input (ver 0.4.0) を用いてデザインし、プライマーを作成する。(XPF に関しては、全エクソン 11 個を網羅するプライマーを作成し、PCR にて増幅している。) PCR 産物を用いて Big-Dye (Toyobo ®) にてシーケンスを行い、PRISM 3130 Genetic Analyzer(ABI)を用いて、配列を決定する。レンチウイルスで相補群が決定する度に、XPF 以外の群のシーケンスプライマーも同様に作成し、DNA 配列の変異を同定する。

4 . 研究成果

17 症例の解析を上記方法で行い、XP A 群 1 例、XP F 群 3 例、XP バリエーション 4 例の診断および亜型診断をつけることができた。また、同定し得た遺伝子変異は下記の通りである。

XP A 群 ;

XPA c.348t>a,P.Y116X compound heterozygosity.

XP F 群 ;

XPF c.2,749c>t,P.R917X heterozygosity
他 2 例は検索した限りでは病的変異なし。

XP バリエーション ;

polH c.725c>g,P.S242X, c.1403del Cfsx2

polH c.490g>t,splicing mutation, homozygous

polH c.409g>t,P.E164X homozygous

不明

残り 9 例は XP とは診断できず、また病的変異も検出できなかった。しかし、このうち 2 症例は腎臓移植後で免疫抑制剤内服中患者であり、いずれも日光露光部に皮膚悪性腫瘍が多発していた。従来、免疫抑制剤内服患者においては、紫外線照射による発癌が免疫抑制剤により増幅されており、皮膚癌の発症が増加すると考えられている。しかし、移植後に免疫抑制剤内服している患者全てに皮膚癌が発症する訳ではない。皮膚癌が多発して

いる患者では、DNA 損傷修復に関与する分子の軽微な機能低下を生じている可能性が推測される。今後は、今回確立したシステムを用い、XP 以外の DNA 損傷修復に異常があると疑われる症例についても検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 浅井 幸, 小池雄太, 富村沙織, 竹中基, 宇谷厚志: 長期観察中の色素性乾皮症 F 群の 1 例. *西日本皮膚科* 査読有 75(6): 508-510, 2013.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 宇谷厚志、富村沙織: 色素性乾皮症を中心とした光線過敏症を呈する症例に関する報告. 厚生労働省難治性疾患実用化研究事業「ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集とゲノム・分子機能解析による病態解明研究」斑 平成 26 年度第 1 回斑会議 (2015/1/30, 長崎市・ベストウェスタンプレミアホテル長崎)
2. Tomimura S, Nakazawa Y, Kuwatsuka S, Kuwatsuka Y, Ogi T, Utani A: Four cases of xeroderma pigmentosum diagnosed by non-radioactive system using ethynyluracil derivatives. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (2014/12/12 ~ 12/14, 吹田市・ホテル阪急エキスポパーク)

6. 研究組織

(1)研究代表者

富村 沙織 (TOMIMURA, Saori)

長崎大学・病院 (医学系)・講師

研究者番号: 30404271