

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461528

研究課題名(和文) 遺伝性日光過敏症(色素性乾皮症、コケイン症候群)の新規責任因子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel disease-causing gene mutations in patients with UV-sensitive syndromes

研究代表者

嶋田 繭子 (SHIMADA, Mayuko)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・技術職員

研究者番号：80623834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヌクレオチド除去修復機構(NER)は、DNA修復機構の1つで、紫外線により誘発されるDNA損傷の修復に機能する。NERの欠損により発症する遺伝性疾患には、本邦で罹患頻度が高い色素性乾皮症(XP)や、2015年に指定難病に認定されたコケイン症候群(CS)などが含まれる。NER欠損性疾患が疑われるが疾患責任遺伝子変異が未確定の症例について解析を実施し、新規の疾患関連因子を同定することを目指した。その中で、2例の興味深い症例を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Nucleotide excision repair (NER) removes DNA lesions generated by ultraviolet irradiation. Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome are the representative disorders associated with NER deficiency. We performed DNA repair assays on potentially NER-deficient cases without definite diagnosis before, and we aimed to identify new disease responsible genes. From the screening, we found two intriguing cases.

研究分野：DNA修復学

キーワード：ヌクレオチド除去修復 コケイン症候群 紫外線高感受性症候群

## 1. 研究開始当初の背景

ヌクレオチド除去修復機構 (Nucleotide Excision Repair: NER) は、DNA 損傷修復機構の1つで、太陽光に含まれる紫外線により誘発される光 DNA 損傷のほか、環境変異原による付加型損傷などを除去・修復する。ヒトで NER が先天的に欠損した場合、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP) やコケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)、紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UV<sup>S</sup>S) などの遺伝性疾患を引き起こす。NER は DNA 損傷の認識に関わるメカニズムの違いから、2 つの経路に分けられる。1 つは、ゲノム全域で機能する NER (global genome NER: GG-NER) であり、もう 1 つは、メッセンジャー RNA の転写が活発に行われている領域で機能する NER (transcription coupled NER: TC-NER) である。NER 欠損性疾患の中でも、CS 及び UV<sup>S</sup>S は TC-NER の機能異常により発症し、それぞれの患者に由来する初代培養細胞は紫外線照射に強い感受性を示すことが知られている。しかしながら、これらの患者の病態を比較すると、CS 症例では重篤な神経症状や早期老化症状を呈するのに対して、UV<sup>S</sup>S 症例では日光過敏としみ・そばかす等の軽微な皮膚に限定した症状のみが観察され、全身性の重篤な症状は見られない。なぜ、これら 2 疾患の患者に由来する細胞では、どちらも TC-NER が欠損するという共通の細胞機能の異常を示しながら、その個々の病態には大きな差異が生じるのかについての合理的な説明は、現在でもなされていない。

研究代表者らのグループは、疾患原因は不明であるが、同一相補性群に属すると考えられた日本人 UV<sup>S</sup>S 患者 2 症例に対して、全エキソーム解析を実施することにより、当時機能未知の遺伝子であった UVSSA 上に疾患原因となる変異を同定し、報告している (*Nature Genetics*, 44: 586-592, 2012)。この UVSSA の機能解析を行う中で、CS あるいは UV<sup>S</sup>S 様の臨床症状を示すが、CS の発症に関わる CSA, CSB 遺伝子、UV<sup>S</sup>S の発症に関与する CSA, CSB, UVSSA 遺伝子のいずれにも変異が認められない十数症例を見いだしていた。

CS や UV<sup>S</sup>S、XP など NER が欠損する遺伝性疾患の診断には、患者細胞の NER 活性の測定が有効である。GG-NER と TC-NER の活性は分離して評価することが可能であり、GG-NER の活性調査には不定期に起こる DNA 合成 (S 期以外で起きる DNA 合成) の量を指標とする UDS (Unscheduled DNA Synthesis) 試験が用いられ、TC-NER の活性調査には DNA 損傷によって停止した RNA 合成の再開を指標とする RRS (Recovery of RNA Synthesis) 試験が用いられる。研究代表者らのグループでは、この UDS/RRS 試験を改良し、核酸アナログである、EdU (エチニルデオキシウリジン)/EU (エチニルウリジン) の取り込みと、Click カップリング反応で直接蛍光標識する技術により、各

修復活性を蛍光強度として評価する方法を確立していた。また、UVSSA の機能解析の際、UVSSA 欠損患者由来細胞は、RRS 試験にて TC-NER の活性低下が検出されること、レンチウイルスを用いて、この患者由来細胞に野生型 UVSSA を強制発現させると、TC-NER 活性の回復が見られることを確認していた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的の 1 つは、近年新たに報告された遺伝子を含む、NER に関連する既知の全遺伝子について、それぞれの野生型 cDNA をレンチウイルスに組み込んだ、「NER 関連レンチウイルス cDNA ライブラリー」を作成し、これを NER 欠損性疾患の診断に応用することである。背景の項で記述したように、蛍光標識による UDS/RRS 試験での修復活性の評価及び、レンチウイルスを用いた修復活性回復試験 (相補性試験) の有効性は実証済みであり、これらの手法を診断技術として発展させることを目指した。

また、この「NER 関連レンチウイルス cDNA ライブラリー」を利用したスクリーニングを実施することで、(1) 疾患原因未知の NER 欠損性疾患症例を抽出し、(2) 次世代シーケンサーを利用した全エキソーム解析等により、新規疾患責任遺伝子変異を探索・同定し、(3) この新規因子の分子機能を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

NER 関連遺伝子を発現するレンチウイルス cDNA ライブラリーの作成: NER 関連遺伝子には、その異常によって NER 関連疾患を発症することが知られている古典的な XP 責任遺伝子群、ERCC 遺伝子群などが存在するが、これ以外にも、クロマチンリモデリング因子、DNA 修復共通遺伝子なども多く存在する。これら NER 関連遺伝子の cDNA をレンチウイルスベクターへクローニングし、レンチウイルス cDNA 発現ライブラリーを作成した。

症例スクリーニング: 研究室で保有する DNA 修復欠損性疾患のうち、UDS/RRS スクリーニングの結果 NER 欠損が疑われる症例、あるいは他施設にて臨床検査などから XP や CS が疑われるとして本所で NER 活性/疾患原因遺伝子変異の特定を依頼された症例を対象に解析を行うこととした。作成した NER 関連 cDNA 発現レンチウイルスを対象初代培養細胞に個別に感染させ、UDS/RRS を指標に NER 活性の回復を調査する。

次世代ゲノム解析: 既知の NER 関連遺伝子を発現するレンチウイルスの感染によって NER 機能が回復したケースでは、その後 Sanger 法によって疾患原因変異の特定を行った。既知の NER 相補性群以外であった症例については、次世代エキソーム解析を実施した。

分子機能解析：本研究は主に診断手法開発の一貫としてNER 遺伝子の多くをカバーするレンチウイルスベクターの作成とそれを用いたスクリーニングに取り組んだ。スクリーニングの結果同定された新規疾患原因遺伝子の分子機能解析については本研究期間では導入部分の解析を実施し、詳細な分子機能解析については引き続き他のプロジェクトとして継続して取り組む予定である。

#### 4. 研究成果

NER 関連遺伝子を発現するレンチウイルスを用いたUDS/RRS アッセイは、全研究期間を通して、XP/CS/UV<sup>S</sup> およびその他 NER 関連疾患の診断に供した。DDB2 遺伝子変異によりXP を発症するXP-E 群症例は臨床症状も軽症であり、診断は難渋することが多い。DDB2 欠損XP 細胞は正常細胞の70%程度のUDS 活性を保持しており、cell reactivation assay など、既存の手法では正確な相補性診断が不可能であった。本研究では、複数の未確定 DDB2 欠損XP-E 群症例についても、DDB2 発現レンチウイルスを用いたウイルス相補性試験でUDS 活性の回復を指標に正確な診断が可能であった。また、矮小変異により軽微な表現形を示した、他のXP 相補性群やCS の症例についてもウイルス相補性試験で良好な診断結果を示したことから、NER 欠損性疾患全般の診断に有用であることが示された。本成果を元に、現在のプロトコルでは、通常UDS/RRS の欠損が見られた症例は、ほぼ全例についてウイルス相補性試験を実施している。

既存症例のスクリーニングにより新規 NER 欠損性疾患原因遺伝子を探索する課題については、疾患原因遺伝子変異が確定していない、XP/CS/UV<sup>S</sup> 症例を中心にスクリーニングを実施した。これまでに、CS 様の紫外線感受性/小頭/低身長/早期老化などを示し RRS 活性が欠損する症例や、紫外線感受性/日光暴露部の好発がん性を示しUDS 活性が低下する症例を相当数抽出することができたが、1 例を除き、全てが既知のNER 関連遺伝子のウイルス相補性試験により相補し、疾患原因遺伝子が確定した。スクリーニングの結果UDS が低下し既知のNER 関連遺伝子で相補しない1 例については、エキソーム解析を実施した結果、既知の他疾患の原因遺伝子に変異が同定された。本疾患原因遺伝子変異により、dNTP プールの枯渇が生じたためUDS 欠損を示したことが判明している。

スクリーニングの結果、NER 正常であることが確定した症例について、エキソーム解析を実施したところ、NER 欠損ではないが、他のDNA 修復機構に疾患原因を持つと考えられる症例を1 例認めた。現在、分子機能解析を実施している。

以上、本研究開発により、既知のNER 関連遺伝子 cDNA を発現するレンチウイルスライブラリーを用いたNER 相補性試験と、症例スクリーニングが有用であることが示され、こ

れらは既存の手法と比較しても高精度な診断を提供可能であることが明らかにされた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Guo C\*, Nakazawa Y\*, Woodbine L\*, Bjorkman A, Shimada M, Fawcett H, Jia N, Ohyama K, Li TS, Nagayama Y, Mitsutake N, Pan-Hammarstrom Q, Gennery AR, Lehmann AR, Jeggo PA, Ogi T §. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136: 1007-1017 (2015). 査読有  
DOI: 10.1016/j.jaci.2015.06.007.
- ② Jia N\*, Nakazawa Y\*, Guo C, Shimada M, Sethi M, Takahashi Y, Ueda H, Nagayama Y, Ogi T §. A rapid comprehensive assay system for DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA damaging reagents by measuring unscheduled DNA synthesis and recovery of RNA synthesis after DNA damage. *Nature Protocols*, 10: 12-24 (2015). 査読有  
DOI: 10.1038/nprot.2014.194.

[学会発表] (計31件)

- ① 中沢由華、岡泰由、郭朝万、賈楠、唐田清伸、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男。ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の病態解析と新規疾患責任遺伝子変異探索。第39回日本分子生物学会年会, 2016.11.30-12.2, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ② 賈楠、中沢由華、郭朝万、唐田清伸、岡泰由、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男。コケイン症候群と紫外線高感受性症候群の分子病態解析。第39回日本分子生物学会年会, 2016.11.30-12.2, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ③ 郭朝万、中沢由華、嶋田繭子、唐田清伸、賈楠、岡泰由、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男。TC-NER 因子UVSSA によるRNAポリメラーゼIIのユビキチン化に関する分子機能解析。第39回日本分子生物学会年会, 2016.11.30-12.2, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ④ 中沢由華、荻朋男、唐田清伸、郭朝万、岡泰由、賈楠、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子。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析研究。第38回日本分子生物学会年会, 2015.12.2, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

- ⑤ 郭朝万、中沢由華、嶋田繭子、賈楠、唐田清伸、岡泰由、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. 第38回日本分子生物学会年会, 2015.12.2, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑥ 賈楠、中沢由華、荻朋男、唐田清伸、郭朝万、岡泰由、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子. 各種コケイン症候群の分子診断. 第38回日本分子生物学会年会, 2015.12.2, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑦ 郭朝万、中沢由華、嶋田繭子、賈楠、唐田清伸、岡泰由、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. 第23回DNA複製・組換え・修復ワークショップ, 2015.10.20, 焼津グランドホテル (静岡県焼津市)
- ⑧ 中沢由華、荻朋男、郭朝万、唐田清伸、岡泰由、賈楠、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子. 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析研究. 第23回DNA複製・組換え・修復ワークショップ, 2015.10.20, 焼津グランドホテル (静岡県焼津市)
- ⑨ 嶋田繭子、中沢由華、郭朝万、賈楠、宮崎仁美、唐田清伸、荻朋男. エキソーム解析を用いたDNA修復機構欠損性疾患の新規責任遺伝子の探索. 第37回日本分子生物学会年会, 2014.11.25-27, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑩ 中沢由華、郭朝万、嶋田繭子、宮崎仁美、唐田清伸、荻朋男. 放射線感受性および各種発達異常を示す遺伝性疾患の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析  
Characterization of new pathogenic mutations associated with radiation sensitivity and developmental abnormalities. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2014.11.25-27, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑪ Guo C, Nakazawa Y, Shimada M, Jia N, Karata K, Miyazaki H, Ogi T. Molecular and functional study on the initiation of transcription coupled nucleotide excision repair. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2014.11.25-27, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑫ 宮崎仁美、中沢由華、郭朝万、嶋田繭子、賈楠、唐田清伸、荻朋男. コケイン症候群様の臨床症状を示す遺伝性疾患の責任遺伝子探索. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2014.11.25-27, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/index-sjis.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

嶋田 繭子 (SHIMADA, Mayuko)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・技術職員

研究者番号：80623834

### (2) 研究分担者

荻 朋男 (OGI, Tomoo)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：80508317

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし