

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09751

研究課題名(和文)紫外線性DNA損傷の修復異常で発症する遺伝性光線過敏症の放射線安全性に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of repair function of radiation-induced DNA damage on cultured human fibroblasts derived from patients with xeroderma pigmentosum

研究代表者

森脇 真一 (Moriwaki, Shinichi)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：40303565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：今回、神経型XPA、XPD/CS、皮膚型XPV、CSB患者を対象とし、放射線誘発DNA損傷修復機能を $\gamma$ -H2AXのフォーカス形成を指標に検討した。その結果、XPV細胞、CSB細胞における $\gamma$ -H2AXのフォーカス形成は正常細胞より10-30%低下がみられた。XPA、XPD/CS細胞では正常レベルであった。以上から、放射線照射後のCSB、XPV患者由来細胞のDNA損傷修復能は、正常細胞に比して劣る可能性があり、検査や治療における放射線の使用が生体に悪影響を及ぼす可能性がある。このDRC低下とXPV、CSBの遺伝型、臨床的重症度、放射線皮膚障害(急性、慢性)との関連は見いだせなかった。

研究成果の概要(英文)：Although radiation has been used to examine and sometimes treat patients with xeroderma pigmentosum(XP) and Cockayne syndrome (CS), radiation-induced DNA damage repair function in these patients has not been analyzed in detail. We investigated post-irradiation focus formation using IF staining with  $\gamma$ -H2AX antibody, a highly sensitive marker of radiation-induced DNA damage (double-strand breaks;DSB) in skin fibroblasts from XP and CS patients. In CSB and XPV (not XPA and XPD/CS) cells, a decrease in focus formation was seen as compared with normal cells. These results suggest that repair of DSB in CS and XPV may be impaired. However, so far the relation between decrease of DSB repair and XPV and CSB patients' phenotype/genotype was not obvious.

研究分野：皮膚科学

キーワード：色素性乾皮症 放射線 DNA二本鎖切断 H2AX

### 1. 研究開始当初の背景

色素性乾皮症 ( xeroderma pigmentosum ; XP )、コケイン症候群 ( Cockayne syndrome ; CS )はいずれも紫外線の直接作用により生じる DNA 損傷が、ヌクレオチド除去修復 (あるいは損傷乗り換え修復) の先天的機能欠損により発症する重篤な遺伝性光線過敏性疾患である。本邦では XP 患者の過半数は光線過敏症状に加え、原因不明の神経障害を合併し、CS 患者も光線過敏に加えて全例発達障害を合併し、これらの重症度が患者予後に直結する。一般臨床の間では XP、CS 患者に対しては定期的に精神・神経症状の評価が行われているが、この評価のためには MRI のみならず CT など放射線を使った画像検査が頻用されている。また XP は高発がん性光線過敏症であり、発症した皮膚がんに対しては外科的治療に加え、放射線療法やシスプラチンを用いた化学療法が行われる。放射線は直接、腫瘍細胞内 DNA に一本鎖、二本鎖切断を誘発し、シスプラチンなどのプラチナ製剤は腫瘍細胞 DNA 内にクロスリンクを生じさせ、その修復の過程で放射線照射時と同様の DNA 二本鎖切断を誘導して抗腫瘍効果を発揮する抗がん剤である。従って、XP、CS 患者でこのような二本鎖切断を生じさせるような検査、治療に関して、その安全性を高い精度で評価するはこれまでなされていない。

放射線による DNA 損傷の主たるものは DNA 二本鎖切断 ( double strand breaks ; DSB ) であり、この損傷は相同組換え修復系、非同源末端結合系で修復される。紫外線性 DNA 損傷の修復欠損で発症する色素性乾皮症 ( XP )、コケイン症候群 ( CS ) 患者において、紫外線以外、例えば放射線による DNA 損傷 ( DSB ) の修復能はどうかということに関しては明確な結論はまだ出されていない。

### 2. 研究の目的

これまで種々の研究結果は実験系が低感度評価システムであったため、放射線曝露の細胞内リスクは高感受性、正常レベルなど賛否両論であった。今回の研究目的は、XP、CS 患者に対する放射線使用 ( CT 検査、皮膚がんに対する放射線療法など ) の適否について、鋭敏なアッセイ系を用いて再評価し、異常が判明すればその分子機構を解明し、XP、CS 診療ガイドライン策定のための新たな医学的エビデンスを得ることである。

さらに、これらの研究成果をもとに、現在策定中の XP、CS 診療ガイドライン ( 診断、患者ケア、重症度分類など含む ) に放射線検査の安全性、皮膚がんの放射線療法、化学療法の適用を検討し、ガイドライン策定に役立てたい。

### 3. 研究の方法

研究代表者は長年 XP、CS、その他類縁疾患の分子細胞診断を行っており、これまで 100 例以上の XP、30 例以上の CS 症例を経験した。その中で研究同意を得た様々な臨床型、遺伝型をもつ数多くの皮膚由来線維芽細胞株を保有している。

電離放射線照射により細胞内に DSB が生じた場合、その周辺の DNA 領域では活性化 ATM を介してヒストン H2AX の 139 番目のセリンがリン酸化 ( -H2AX ) されることはよく知られている。そこで今回、放射線照射で形成される 2 本鎖切断後の修復応答を -H2AX を指標として放射線感受性を検討できる。

今回、「XP、CS、XP/CS 患者に放射線検査、放射線療法などの放射線使用は本当に安全か？」ということに関して、近年確立された放射線誘発 DNA 損傷修復の高感度アッセイ系である H2AX 指標に高感度アッセイ系により本研究代表者が保持している検体

を用いて詳細に再評価し、その病態を解析した。コントロールとしては4種類の正常細胞、2種類の ataxia telangiectasia (AT)細胞(放射線高感受性)を用いた。

#### 4. 研究成果

本研究では、XP、CS 患者細胞を用いて「患者の放射線感受性」を詳細に再評価し、異常が確認できればその病態を解析し、「XP、CS 患者での放射線を用いた検査の安全性」することを目的とした。放射線照射で形成される DNA 二本鎖切断(DSB)の修復応答を -H2AX を指標に蛍光染色にて高感度に可視化し定量化するシステムを用いて解析した。また、今回の対象患者の放射線検査の安全性(放射線照射後、部位の皮膚変化の有無)を臨床的に検討した。

(1)XP 細胞、CS 細胞、XP/CS 細胞の放射線照射後 H2AX の動態をスクリーニングし、XP、CS、XP/CS 細胞、正常細胞で異常があるかどうか、これら病型間で差があるかどうか、XP、CS 各群間で差があるかどうかの検討

6 系統の CSB 細胞、3 系統の XPA 細胞、2 系統の XPD/CS 細胞を検討した結果、全系統の CS、XPA、XPD/CS 細胞で DSB 修復応答が低下(CS ; 40-80%、XPA ; 50-80%、XPD/CS ; 60-80%/正常細胞)していることを見出した。本邦で比較的高頻度で多くは高齢になるまで生存する(すなわち放射線曝露の機会が多くなる)複製後修復に遺伝的な異常のある XP-V に特に注目したところ、XPV 細胞では8系統中4系統の患者由来細胞で -H2AX 形成能に軽度の低下(正常の 80-90%)がみられることが判明した。

(2)(1)に関して、異常がみられた細胞と当該患者の臨床症状の重症度に差があるかどうか、放射線を用いた検査履歴をチェックして患者重症度の関連があるかどうかを後

#### る向きに検討

今回の一連の研究で -H2AX 形成能(DNA 二本鎖切断(DSB)の修復能)を評価し得た各々の CSB、XPA、XPD/CS、XPV 症例に対して放射線を用いた検査が行われた詳細、照射後の皮膚の異常反応の有無、放射線被曝部位の皮膚の変化をカルテベース、あるいは患者再診時の皮膚科的診察、問診などにより検討した。約半数の症例で患者情報の詳細が把握できたが、その結果、CSB、XPA、XPD/CS、XPV 患者には特段、放射線照射による有意な異常反応(急性放射線障害、照射部位の皮膚がんなど)は見いだせなかった。XPV については DSB 修復応答が低下していた症例と正常であった症例では遺伝型、表現型に差異はみられなかった

今回の結果は CSB、XPA、XPD/CS、XPV 患者の一部では ATR、ATM を介した DSB に関する損傷修復応答に異常があることを示唆している。ただ今回解析した症例は XP あるいは CS 確定診断後の後向き研究である、フォロー期間も2年~最大10年と短いものである。引き続き XP、CS の放射線高感受性の分子機構の解明を進め、臨床的には慢性放射線障害の進展を含めて今後も長期にわたって、注意深く経過を見ていく必要がある。

#### 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15件)下記すべて査読あり  
(1)Calmels N, Botta E, Jia N, Fawcett H, Nardo T, Nakazawa Y, Moriwaki S, Sugita K, Kubota M, Obringer C, Spits MA, Stefanini M, Lauge V, Orioli D, Ogi T, Lehmann Functional and clinical relevance of novel mutations in a large cohort of patients with Cockayne syndrome. J Med Genet, in press.

(2)Nakao A, Tanizaki H, Yu A, Araki A, Yoshioka A, Moriwaki S A case of xeroderma pigmentosum group A with West syndrome, in press.

(3)Ozaki C, Ohnishi S, Yu A and Moriwaki S A case of photosensitivity after the

administration of olmesartan medoxomil. *J Dermatol*, in press.

(4)Moriwaki S Light-emitting diodes as a new medical tool in aesthetic dermatology. *Photomed Photobiol*, in press.

(5)Terada A, Aoshima M, Tanizaki H, Nakazawa Y, Ogi T, Tokura Y, Moriwaki S An adolescent case of a xeroderma pigmentosum variant confirmed by the onset of sun exposure-related skin cancer during Crohn's disease treatment. *J Cutan Immunol Allergy*. 2018;1:23–26.

(6)Yu A, Tanizaki H, Kokunai Y, Sugimoto A, Shimamoto J, Kurokawa T, Moriwaki S The association between the clinical and histopathological classifications of actinic keratosis and the efficacy of topical imiquimod treatment. *J Dermatol* 2017 Dec 19. doi: 10.1111/1346-8138.14192. [Epub ahead of print]

(7)Kondo D, Noguchi A, Tamura H, Tsuchida S, Takahashi I, Kubota H, Yano T, Oyama C, Sawaishi Y, Moriwaki S, Takahashi T Elevated urinary levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in a Japanese child of xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome complex with Infantile onset of nephrotic syndrome *Tohoku J Exp Med* 239:231-5, 2016

(8)Nakano E, Masaki T, Kanda F, Ono R, Takeuchi S, Moriwaki S, Nishigori C The present status of xeroderma pigmentosum in Japan and a tentative severity classification scale. *Exp Dermatol* 25 Suppl 3:28-33, 2016

(9)Kono M, Matsumoto F, Suzuki Y, Suganuma M, Saitsu H, Ito Y, Fujiwara S, Moriwaki S, Matsumoto K, Suzuki T, Tomita Y, Sugiura K, Akiyama M Dyschromatosis symmetrica hereditaria and Aicardi-Goutières syndrome 6 are phenotypic variants caused by ADAR1 mutations *J Invest Dermatol* 136:875-8, 2016

(10)Moriwaki S Human DNA repair disorders in dermatology: A historical perspective, current concepts and new insight *Revirew, J Derm Sci* 81:77-84, 2016

(11)Nimomiya Y, Kokunai Y, Tanizaki H, Nakano H, Moriwaki S X-linked dominant protoporphyria: The first reported Japanese case. *J Dermatol* 43:401-8, 2016

(12)Tofuku Y, Nobeyama Y, Kamide K, Moriwaki S, Nakagawa H Xeroderma pigmentosum complementation group F: report of a case and review of Japanese patients. *J Dermatol* 42:897-9, 2015.

(13)Kurusu Y, Tsuji M, Yasuda E, Fujiwara M, Moriwaki S Immunohistochemical findings and differential diagnosis of

papillary-type cutaneous verrucous carcinoma of the neck: A case report. *Oncol Lett* 10:3823-5, 2015

(14)Munemoto S, Osawa S, Kurokawa T, Moriwaki S A case of generalized eruptive keratoacanthioma, *J Dermatol* 42:1018-9, 2015.

(15)Kuwabara A, Tsugawa N, Tanaka K, Uejima Y, Ogawa J, Otao N, Yamada N, Masaki T, Nishigori, Moriwaki S, Okano T High prevalence of vitamin D deficiency in patients with xeroderma pigmentosum (XP)- A under strict sun-protection. *Eur J Clin Nutr* 69:693-6, 2015

〔学会発表〕(計 11 件)

(1)Tanizaki H, Terada A, Yamaguchi S, Takahashi K, Moriwaki S Xeroderma pigmentosum group D: a clinical and genetic study of 19 Japanese cases.47th Annual ESDR Meeting 2017 Oct.27, 2017 (Salzburg, Austria)

(2)Kono M, Matsumoto F, Suzuki Y, Sugiura M, Saitsu H, Ito Y, Fujiwara S, Moriwaki S, Matsumoto K, Matsumoto N, Tomita Y, Sugiura K, Akiyama M Impact of skin color on phenotype of dyschromatosis symmetrica hereditaria and Aicardi-Coutieres syndrome6 caused by ADAR1 mutations. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Dec. 9, 2016 (Sendai).

(3)Otsuka T, Tanizaki H, Kurokawa T, Moriwaki S, Nakamura A Decreased repair function of radiation-induced DNA damage on cultured fibroblasts derived from patients with xeroderma pigmentosum variant. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Dec. 9, 2016 (Sendai).

(4)Moriwaki S Proposal on the establishment of clinical guidelines for the diagnosis and management of xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome in Japan Workshop 10th Asian Dermatological Congress Sept.15, 2016 (Mumbai, India)

(5)Otsuka T, Tanizaki H, Kurokawa T, Nakamura A, and Moriwaki S Decreased repair function of radiation-induced DNA damage on cultured fibroblasts derived from patients with xeroderma pigmentosum variant type. European Society for ermatological Research 46th Annual Meeting Sept .7-10, 2016 (Munich, Germany)

(6)Hirakawa Y, Tanizaki H, Futaki S, Maemura K, and Moriwaki S Analysis of

acute UVB reaction on basement membrane of the skin using a 3-D cultured human skin model. Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference 2016 Aug.25-28, 2016 (Noosa, Australia)  
(7) Nakano E, Ono R, Kanda F, Takeuchi S, Moriwaki S, Nishigori C Xeroderma pigmentosum as the model of photoaging The 17th Annual Meeting of Society for Photoaging Research Aug.21, 2016 (Kobe)  
(8) Moriwaki S Diagnosis of XP in Japan XP-ERG meeting, The 74th American Academy of Dermatology Annual Meeting Mar.15, 2016 (Washington DC)  
(9) Moriwaki S Unusual cases of XP XP-ERG meeting, The 74th American Academy of Dermatology Annual Meeting Mar. 5, 2016 (Washington, DC)  
(10) Shimamoto J, Fukui N, Tanizaki H, Kurokawa T, Moriwaki S Evaluation of oxidative stress in patients with psoriasis and atopic dermatitis by measuring the level of urinary 8-OHdG The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Dec.11, 2015 (Okayama)  
(11) Shimizuhiro C, Yokota H, Otsuka A, Nonomura Y, Moriwaki S, Yoshida Y, Miyachi Y, Yamanaka S, Kabashima K Treating and understanding the pathology of xeroderma pigmentosum using induced pluripotent stem cells (iPS) cells Recent Advances in Intractable Skin Diseases JSID-Asia-Oceania Forum (JAOF) Dec.13, 2015 (Okayama)

〔図書〕(計 1 件)

(1) Moriwaki S Prenatal diagnosis of xeroderma pigmentosum group A, DNA repair disorders --clinical and molecular aspects--(ed. Nishigori C, Sugasawa K.), Springer, Japan, in press.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)  
なし

取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 森脇真一 (Shinichi Moriwaki)  
(大阪医科大・医学部・教授)

研究者番号 : 40303565

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし