

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19690

研究課題名(和文) 色素性乾皮症における症状とDNA修復能との解析および治療の探索

研究課題名(英文) Investigation of treatment based on analysis between clinical phenotype and DNA repair activity of xeroderma pigmentosum

研究代表者

中野 英司 (Nakano, Eiji)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：80734970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：色素性乾皮症は光線過敏症状、露光部の皮膚がんを特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患であり、早期診断によって皮膚がんの予防につながることを示唆されている。従来の診断方法では時間がかかること、放射性同位元素を使用すること、手技に熟練を要することなどの問題があった。今回、フローサイトメトリーを用いた手法が従来の方法と高い相関性を示すことを明らかにし、細胞周期ごとの解析を行うことで診断の迅速化を行うことに成功した。DNA修復能の新たな手法を確立し、従来の方法の代替手段としてだけでなく、細胞周期ごとの修復能を評価することによりさらなる病態解明、治療薬候補のスクリーニングとして応用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Xeroderma pigmentosum is autosomal recessive hereditary disease characterized by photosensitivity and predisposing skin cancers in sun-exposed area and it is known that early diagnosis prevent skin cancers. In conventional method, there are some problems such as time-consuming, radioisotope use, skill requiring. We showed flow cytometry based assay had strong correlation with conventional method and succeed quickly diagnosing by analyzing each cell cycle. We established new assay for evaluating DNA repair and demonstrated that is applied to not only as alternative to conventional method but also as screening for candidate of treatment drug or clarifying the pathogenesis by evaluating DNA repair activity at each cell cycle.

研究分野：色素性乾皮症

キーワード：色素性乾皮症 DNA修復 診断 治療

1. 研究開始当初の背景

色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum: XP) は、著明な光線過敏症状を呈し、若年から日光曝露部に皮膚がんを生じる常染色体劣性遺伝性疾患である。XP は欧米では数十万人に 1 人の稀な疾患であるが、本邦では 2.2 万人に 1 人と比較的頻度の高い疾患である。XP は紫外線 DNA 損傷を修復する機構であるヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair; NER) の障害される A-G の 7 つの遺伝的相補性群と、損傷乗り越え複製に障害のあるバリエーション型の 8 つの病型に分類され、各病型によって様々な程度の皮膚症状、神経症状を呈する (Moriwaki S, et al. Visual Dermatology. 2004;3)。XP は NER の異常であるため、診断には DNA 修復能の評価が重要である。実際には、臨床症状からの鑑別に加え、患者線維芽細胞を用いて不定期 DNA 合成能 (Unscheduled DNA synthesis; UDS) や紫外線致死感受性試験、相補性群試験や遺伝子解析、蛋白の発現などにより確定診断を行う。紫外線損傷後の DNA 修復能検査法としては RI を用いた UDS が広く行われていたが、感度や実験手技の熟練などの問題があること、また細胞周期ごとの評価は不能であることなどの欠点がある。最近フローサイトメトリーを用いた DNA 修復能検査の有用性が報告されている (Rouget R, et al. J Biol Chem. 2008;283:5533-41) が、従来の UDS との比較検討はなされておらず、XP の診断にどの程度寄与しうるかは不明であった。

また、XP バリエーション型 (XP variant type: XP-V) は NER が正常であり、複製後修復の一つである損傷乗り越え修復の異常が病因である。そのため、NER は障害されず、前述の UDS や DNA 修復能を評価することでは診断がつかず、これまでは原因遺伝子のポリメラーゼ (*POLH*) の蛋白の発現をウェスタンブロット法や免疫沈降法で確認したり、カフェイン感受性を示すため、カフェイン添加したうえで、紫外線感受性を検討したりすることで診断を行っていた (Masaki T, et al. J Dermatol Sci. 2008;52:144-8)。これらの検査方法についても診断に時間がかかり、また手技に熟練を要するといった問題点があった。近年、XP-V 患者細胞において、S 期の DNA 修復が遅れることが報告された (Auclair Y, et al. DNA Repair Amst. 2010;9:754-64) が、この現象が診断に使用できるかどうかはまだ検討されていない。

2. 研究の目的

フローサイトメトリーを用いた新たな NER 評価検査を確立することにより、XP の診断を迅速化すると共に、細胞周期ごとの DNA 修復能の評価を行い、XP の症状と DNA 修復、細胞周期の関連を明らかにする。また従来の NER 評価検査では XP-V の診断はできないため、細胞周期ごとの DNA 修復能を検討する手法が、より簡便で迅速な XP-V の診断方法となりえ

るかを検証する。

3. 研究の方法

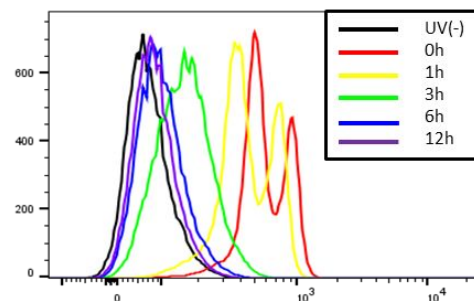
XP 患者だけでなく、他の NER 障害疾患であるコケイン症候群、健常人コントロールの線維芽細胞における、NER を従来の方法およびフローサイトメトリーを用いた検査法と比較、検討した。従来の方法として紫外線照射後の UDS を放射性同位元素を用いた測定法 (Nishigori C, et al. Arch Dermatol. 1994; 130:191-7) で評価した。また、紫外線照射による DNA 損傷をモノクローナル抗体による免疫染色し、その蛍光をフローサイトメトリーで検出、定量化した。紫外線 DNA 損傷はシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) と 6-4 光産物 (6-4PP) の二種類に対する抗体を使用した。CPD は紫外線照射 24 時間後、6-4PP は 6 時間後の除去率を算出し、UDS との相関を検討した。

また、XP-V は日本では *POLH* 遺伝子に 4 つの創始者変異が報告されており、これらの遺伝子変異をホモ接合体で有する患者細胞を使用した。また、創始者変異以外の遺伝子変異を持つ患者においても同様の S 期特異的な DNA 修復能の低下が見られるかを検討した。

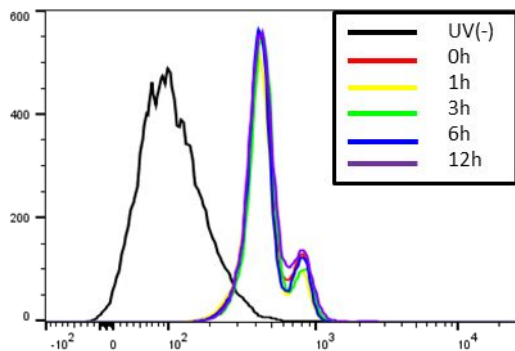
4. 研究成果

まず、UDS とフローサイトメトリーを用いた DNA 修復能検査の結果の相関を検証した。XP のそれぞれの相補性群と、NER 障害疾患であるコケイン症候群 (CS) と、健常人コントロールの細胞を用いて、UDS とフローサイトメトリーを用いた DNA 修復能検査を行った。XP では A 群 3 名、うち 2 人は日本における創始者変異をもつ重症型、1 人は軽症型、C 群 1 名、D 群 2 名、F 群 1 名、バリエーション型 1 名の合計 8 名の線維芽細胞を使用した。CS は A 群 1 名、B 群 1 名、健常人コントロールは 2 名を用いた。

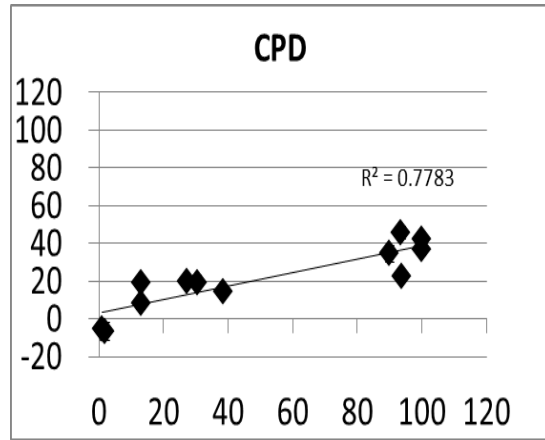
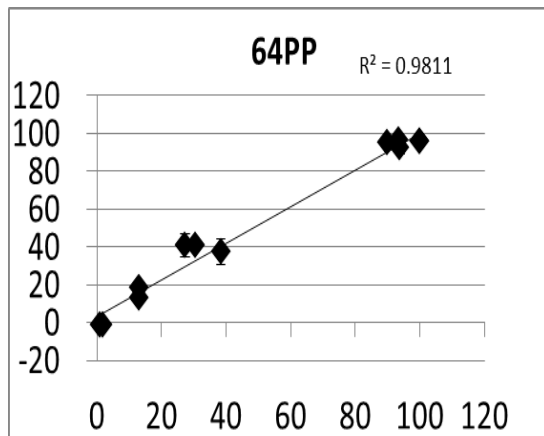
UDS は健常人コントロールの一人を基準として、コントロールと比較した不定期 DNA 合成能を百分率で計算した。フローサイトメトリーを用いた DNA 修復能検査では、各細胞に置いて紫外線非照射、紫外線照射直後、照射 6 時間後、24 時間後のサンプルにおける、蛍光強度を測定し、非照射時の蛍光強度を背景とし、照射直後の蛍光強度を基準とした 6 時間後、24 時間後の 6-4PP、CPD の蛍光強度を百分率で計算し、蛍光強度の減少分を除去率として算出した。



上図は健常人コントロールにおける 6-4PP の除去を継時的に表している。横軸に 6-4PP の蛍光強度を示し、縦軸に細胞数を示す。紫外線非照射の蛍光強度を黒で示し、照射直後には赤線で示すように 6-4PP を検出している。その後、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間と経過すると徐々に左方に移動しており 6-4PP が除去されていくことが分かり、健常人コントロールでは紫外線照射 6 時間後にほぼ 6-4PP は完全に除去されていた。一方、日本人に最も多い、重症型の A 群では紫外線 DNA 損傷はほとんど修復されないことが分かっており、下図に示す通り、紫外線非照射の蛍光強度を黒線で示しているが、紫外線照射直後から 12 時間経過を見たが、6-4PP は全く修復されていないことが分かった。



また、XP-V、コケイン症候群の細胞においては健常人コントロールとほぼ同等で、90% から 100% 近くの 6-4PP が除去されていた。重症型の A 群 2 名では全く除去されておらず、軽症の A 群、C 群では 10 - 20% 程度、D 群、F 群では 30 - 40% 程度除去されていた。これらの 6-4PP 除去率を縦軸に示し、従来の UDS の結果を横軸にプロットしたところ、両者には強い相関を認めた。 $(R^2 = 0.9811)$ 。CPD は一般に 6-4PP よりもその除去に時間がかかることが知られている。健常人コントロールでは 24 時間後の CPD 除去率は 40% 程度であった。コケイン症候群の細胞でも同様に 40% 程度を示した。XP-V では 6-4PP とは異なり、健常人、コケイン症候群よりも除去率は低く 20% 程度であった。C、D、F 群患者もそれぞれ 20% 前後の除去率である一方で、重症の A 群では



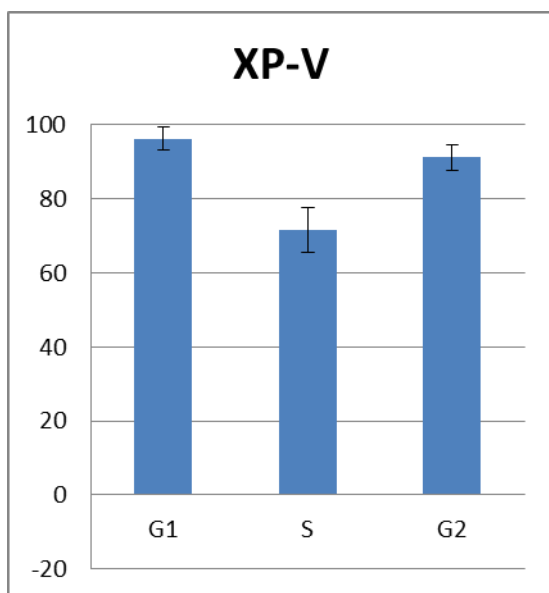
やはり全く修復されていなかった。これらの紫外線照射 24 時間後の CPD 除去率も、UDS 結果と比較的良好な相関を示した $(R^2 = 0.7783)$ 。

以上より、フローサイトメトリーを用いた DNA 修復能検査は、従来使用されていた UDS の代替手段として使用できることが示された。24 時間後の CPD 除去率では健常人コントロールでも 40% 程度の除去率であること、バリエーション型は低めに、C 群では高めになること、UDS との相関係数が 6-4PP よりもやや低いこと、6-4PP では除去がより高率で短時間で結果が判明すること等より、6-4PP 除去率の方が、より簡便で迅速な UDS の代替検査となると考えられた。

次に、より簡便な XP-V 診断方法として細胞周期ごとの DNA 修復能を評価した。これまでに XP-V 細胞において S 期特異的に DNA 修復能が低下していることが報告されているが、遺伝子変異との関連や、診断方法として使用できるか否か不明であった。そこで、我々は XP-V の原因遺伝子である *POLH* 遺伝子において、日本人の創始者変異と考えられる 4 種類の遺伝子変異ともう 1 種類の遺伝子変異を有する患者について S 期の DNA 修復能を検討した。

創始者変異である *POLH* 遺伝子の c.490G>T が 2 名、c.725C>G が 1 名、c.916G>T が 1 名、c.1661delA が 2 名に加え、創始者変異ではない c.349G>C を 1 名加えた 7 名で検討した。遺伝子型と表現型の相関を調べるために、全患者遺伝子変異をホモ接合体で持つ患者を選び、臨床症状の詳細も調べたが、同じ遺伝子変異を有する患者であっても臨床症状にかなりばらつきが見られた。これは、XP-V の皮膚症状は強い日光皮膚炎症状を伴わず、おもに慢性紫外線障害、つまり色素沈着や皮膚がんの発症が中心となるためと考えられる。慢性紫外線障害はそれぞれの遮光の度合い、衣服やサンスクリーン剤の使用、環境、居住地、職業などの影響を受けるため、表現型に一定の傾向が見られなかったと思われる。次に、それぞれの細胞に紫外線を照射し、6 時間後の 6-4PP の除去率を調べた。6-4PP 抗体で染色するとともに、細胞周期を調べるために Propidium Iodide (PI) で DNA 染色を行った。PI の染色程度に応じて G1 期、S 期、G2 期に

分類し、それぞれの細胞周期における 6-4PP 除去率を求めた。前述のとおり、表現型には遺伝子型に関わらず、一定の傾向は見られなかったものの、いずれの遺伝子型においても S 期においてのみ 6-4PP 除去率は減少していた。代表として下図に c.490G>T 変異を有する患者の各細胞周期の 6-4PP 除去率を示す（縦軸に 6-4PP 除去率を示し、3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示している）。G1 期、G2 期と比較して S 期では有意に 6-4PP 除去率の低下を認めた。他の相補性群、コケイン症候群、健常人コントロールでは、この S 期における 6-4PP 除去率の低下は見られず、XP-V においてはいずれの遺伝子型においても、この患者と同様に S 期特異的な 6-4PP 除去率の低下が見られた。



以上より、XP-V の診断において、細胞周期ごとの DNA 修復能を評価することで、従来よりも迅速に、また簡便に診断することが可能であることを示した。

これらの結果をまとめると、我々は従来 XP の診断に用いられてきた UDS と比較し、迅速、簡便で UDS と同等の結果を得られる DNA 修復能検査を確立することに。UDS では不可能であった細胞周期ごとの DNA 修復能を評価することによって、XP-V の迅速な診断も可能となった。この手法を応用することで、治療薬のスクリーニングや、軽症例の解析からさらなる病態解明が進むと考えられる。

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 2 件)

1 Nakano E, Masaki T, Kanda F, Takeuchi S, Moriwaki S, Nishigori C, The present status of xeroderma pigmentosum in Japan and a tentative severity classification scale. *Exp Dermatol*. 査読有、25 巻、2016 年、28-33. Doi: 10.1111/exd.13082

2 Ono R, Masaki T, Mayca Pozo F, Nakazawa Y, Swagemakers SM, Nakano E, Sakai W, Takeuchi S, Kanda F, Ogi T, van der Spek PJ, Sugawara K, Nishigori C. A 10 year follow-up of a child with mild case of xeroderma pigmentosum complementation group D diagnosed by whole-genome sequencing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 査読有、32 巻、2016 年、174-80. Doi: 10.1111/phpp.12240

〔学会発表〕(計 3 件)

1 Yukari Tamesada, Eiji Nakano, Mariko Tsujimoto, Taro Masaki, Hironori Niizeki, Chikako Nishigori. A child case of xeroderma pigmentosum complementation group C, The 4 the Eastern Asia Dermatology Congress, 2016.11.16- 2016.11.18、東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート (千葉県)

2 Nakano E, Masaki T, Kanda F, Ono R, Takeuchi S, Moriwaki S, Nishigori C, Xeroderma pigmentosum as the model of photoaging -The present features of XP in Japan. 第 17 回光老化研究会、2016.8.20-2016.8.21、神戸臨床研究情報センター (兵庫県)

3 Eiji Nakano, Seiji Takeuchi, Taro Masaki, Ryusuke Ono, Chikako Nishigori, Usefulness of flow-cytometry based nucleotide excision repair assay for diagnosis of xeroderma pigmentosum variant type, 日本研究皮膚科学会第 40 回学術大会・総会、2015.12.11- 2015.12.13、岡山コンベンションセンター (岡山県)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 英司 (NAKANO Eiji)

神戸大学大学院医学研究科 助教

研究者番号: 80734970

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()