

機関番号：24601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591324

研究課題名 (和文) XPD 変異を共通する二つの遺伝疾患でなぜ紫外線皮膚がん感受性が異なるか？

研究課題名 (英文) How do mutations in the *XPD* result in different skin cancer susceptibilities in patients with xeroderma pigmentosum or trichothiodystrophy?

研究代表者

森 俊雄 (MORI TOSHIO)

奈良県立医科大学・医学部・研究教授

研究者番号：10115280

研究成果の概要 (和文)： 同一 *XPD* 遺伝子に突然変異をもつ色素性乾皮症 D 群患者と硫黄欠乏性毛髪発育異常症 (TTD) 患者の間で紫外線皮膚がん発生頻度が大きく異なる機序を検討した。*XPD* を含む蛋白複合体 TFIIH のヘリカーゼ活性は両患者細胞で低下し DNA 修復欠損に差は見られなかった。TTD 細胞では転写コアクターとして働く TFIIH の濃度が半減することから、栄養不足によるがん細胞の成長抑制が TTD 患者の低発がん性に関係するかもしれない。

研究成果の概要 (英文)： We studied how mutations in the *XPD* gene result in different skin cancer susceptibilities in patients with xeroderma pigmentosum (XP) or trichothiodystrophy (TTD). XP-D and TTD cells were both deficient in the repair of UV-induced DNA damage because of helicase activity defects of TFIIH. Since TFIIH also acts as a coactivator, TTD-specific decrease in TFIIH content possibly results in transcriptional defects, which might be implication for the lack of increased incidence of skin cancers in TTD patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：遺伝情報制御学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚がん、色素性乾皮症、硫黄欠乏性毛髪発育異常症、紫外線、*XPD*、TFIIH、ヌクレオチド除去修復

1. 研究開始当初の背景

太陽紫外線は細胞 DNA 中の連続したピリミジン間に二量体型 DNA 損傷(シクロブタン型ダイマー(CPD)や 6-4 型ダイマー(6-4PP)など)を高頻度に誘発する。ヒト細胞はこれらの損傷をヌクレオチド除去修復 (NER) により修復する。色素性乾皮症 (XP) は NER に欠陥をもつ常染色体劣性遺伝疾患であり、紫外線高感受性、異常色素沈着および太陽露光部

での高頻度皮膚がん(健常人の 5,000 倍)を特徴とする。相補性群として、*XPD* 遺伝子に突然変異をもつ XP-D など 8 種類が存在する。一方、硫黄欠乏性毛髪発育異常症 (TTD) は脆弱な毛髪、魚鱗癬様の皮膚、精神および身体発達障害などを主徴とする常染色体劣性遺伝疾患である。症例の約半数は日光過敏症を示し、その大半は *XPD* 遺伝子に突然変異をもつが、太陽露光部での皮膚がん頻度の

上昇は見られない。つまり、同じ *XPD* 遺伝子に変異をもつ XP-D 患者と TTD 患者で皮膚がん発症頻度が大きく異なるが、その機序については明らかにされていない。なお、*XPD* は *XPB* などと共に 10 種類の蛋白複合体からなる TFIIH (Transcription Factor II H) を形成し、NER においてはヘリカーゼ活性により損傷近辺の 2 本鎖 DNA をほどこき 1 本鎖に変換する役割を担当する。

2. 研究の目的

本研究では、*XPD* 遺伝子の変異を共通する二つの遺伝疾患 (XP と TTD) がなぜ紫外線皮膚がんの感受性に大差を生じるかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発がん感受性差に DNA 修復が関係するかを研究するための方法

3 種類の XP-D 細胞、3 種類の TTD 細胞、および 2 種類の正常細胞を用い、ピリミジン二量体型 DNA 損傷 (CPD および 6-4PP) の修復動態を ELISA 法で、紫外線感受性を MTS 法で、TFIIH の細胞内濃度を western-blot 法で、TFIIH の局所 DNA 損傷部位への集積量および細胞 TFIIH ヘリカーゼ活性を局所紫外線照射に続く蛍光免疫染色法で測定した。ヘリカーゼ活性については、1 本鎖 DNA 特異結合蛋白 (RPA) の局所 DNA 損傷部位への集積量を測定する新規検出系を用いた。

(2) 発がん感受性差に initiation 細胞の増殖能が関係するかを研究するための方法

各細胞に 50% 致死線量の紫外線を照射後培養し、細胞数が元に回復した時点で再び同線量の紫外線を照射して培養した。こうして initiation されて promotion 過程にあるモデル細胞を作製し、液体室素中に凍結保管した。これらの細胞について、低血清濃度や低酸素 (2%) 下での増殖能を MTS 法で測定した。また、変異型 p53 発現細胞の出現頻度を PAb240 による蛍光免疫染色法で調べた。

4. 研究成果

(1) 発がん感受性差に DNA 修復は関係しない

3 種類の XP-D 細胞は細胞間で同程度に CPD と 6-4PP の修復に欠損を示した。紫外線感受性も 3 種類の細胞で同程度に上昇し、修復欠損の程度と良い相関を示した。一方、TTD 細胞も CPD と 6-4PP の修復に欠損を示した。修復欠損の程度は細胞間で異なり、紫外線感受性の程度と相関した。これらの結果より、紫外線主要 DNA 損傷の修復欠損について、XP-D 細胞と TTD 細胞で明確な差異がないことが明らかとなり、両疾患における皮膚がん感受性差に DNA 修復は関係しないことが示唆された。

次に、両疾患細胞における修復欠損機序を明らかにするため、*XPD* 変異を原因とする TFIIH の機能的・物理的变化について検討した。TFIIH の細胞内ヘリカーゼ活性は全ての XP-D および TTD 細胞で減少し、その減少程度は先に示したそれぞれの細胞の DNA 修復欠損の程度と相関した。一方、TFIIH の細胞内濃度は、XP-D 細胞がすべて正常レベルであるのに対し、TTD 細胞では 3 種類とも半減していた。また、XP-D 細胞では細胞内局所 DNA 損傷部位へ TFIIH が正常にリクルートされるのに対し、TTD 患者に観察される主要突然変異をもつ 2 種類の TTD 細胞ではこのリクルートに異常が見られた。以上の結果より、修復欠損機序は両細胞間で異なり、XP-D 細胞では TFIIH のヘリカーゼ活性低下のみが原因であるのに対し、TTD 細胞ではこれに加え、TFIIH の細胞内濃度低下や損傷部位へのリクルート異常も含む複合的原因であることがわかった。

TFIIH は修復因子および転写因子であるが、最近さらに、甲状腺ホルモン標的遺伝子において coactivator として働くことが報告された (Compe et al., 2007)。つまり、TFIIH は同ホルモン受容体のプロモーター結合を亢進および安定化することによりホルモン標的遺伝子の発現を高めるが、TTD 細胞に見られる TFIIH 濃度低下によりこの遺伝子発現は総じて減少となる。それ故、TTD 患者における低発がん性の一機序として、紫外線で initiation された細胞が何かの遺伝子発現低下のために充分がん成長できない可能性が考えられる。

(2) 発がん感受性差に initiation 細胞の増殖能が関係するか？

正常、XP-D および TTD 細胞に 50% 致死線量の紫外線照射を二度繰り返して、initiation されて promotion 過程にあるモデル細胞を作製した。これらの細胞について、牛胎児血清濃度を低下させた培地 (10%~0.1%) で 4 日間の増殖能を調べた結果、TTD 細胞は正常および XP-D 細胞に比べ増殖能が低下する結果を得た。この細胞増殖実験を低酸素 (2%) 下で行った場合も、同様に TTD 細胞の増殖能がより低下する結果を得た。しかし、新たに 5J/m² の同一紫外線量を照射した細胞モデルで増殖実験を行った結果、正常酸素の場合も、低酸素の場合も、XP-D 細胞と TTD 細胞間で有意な増殖差が観察されなかった。また、変異型 p53 発現細胞の出現頻度においても、XP-D 細胞と TTD 細胞間で有意な差異が観察されなかった。それ故、現時点では TTD 患者の低発がん性を増殖能の低下と結びつけられる証拠は限定的であり、さらなる検証実験が必要である。

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9件)

- ① Y. Okahashi, T. Iwamoto, N. Suzuki, S. Shibutani, S. Sugiura, S. Itoh, T. Nishiwaki, S. Ueno, and T. Mori. Quantitative detection of 4-hydroxyequilenin-DNA adducts in mammalian cells using an immunoassay with a novel monoclonal antibody. *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e133. (査読有)
- ② H. Ikehata, R. Okuyama, E. Ogawa, S. Nakamura, A. Usami, T. Mori, K. Tanaka, S. Aiba, and T. Ono. Influences of p53 deficiency on the apoptotic response, DNA damage removal and mutagenesis in UVB-exposed mouse skin. *Mutagenesis*, 25 (2010) 397-405. (査読有)
- ③ H. Hiura, T. Matsui, M. Matsumoto, Y. Hori, A. Isonishi, S. Kato, T. Iwamoto, T. Mori, and Y. Fujimura. Proteolytic fragmentation and sugar chains of plasma ADAMTS13 purified by a conformation-dependent monoclonal antibody. *J. Biochem.* 148 (2010) 403-4011. (査読有)
- ④ H. Asai, M. Hirano, K. Shimada, T. Kiriya, Y. Furiya, M. Ikeda, T. Iwamoto, T. Mori, K. Nishinaka, N. Konishi, F. Uda, and S. Ueno. Protein kinase C gamma, a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin. *Hum Mol Genet.* 18 (2009) 3533-3543. (査読有)
- ⑤ J. Akagi, C. Masutani, Y. Kataoka, T. Kan, E. Ohashi, T. Mori, H. Ohmori, and F. Hanaoka. Interaction with DNA polymerase eta is required for nuclear accumulation of REV1 and suppression of spontaneous mutations in human cells. *DNA Repair*, 8 (2009) 585-599. (査読有)
- ⑥ K. Kobayashi, Y. Yasuda, Y. Shintani, T. Sumitomo, T. Saga, M. Kimura, A. Yamamoto, T. Mori, A. Maeda, Y. Yamaguchi, and A. Morita. The development of a filter to enhance the efficacy and safety of excimer light (308 nm) therapy. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 25 (2009) 30-36. (査読有)
- ⑦ T. Tsujiuchi, M. Furukawa, Y. Obo, A. Yamasaki, M. Hotta, C. Kusunoki, N. Suyama, T. Mori, K. Honoki, and N. Fukushima. Infrequent mutation of lysophosphatidic acid receptor-1 gene in hamster pancreatic duct adenocarcinomas and established cell lines. *J. Toxicol. Pathol.* 22 (2009) 89-92.

(査読有)

- ⑧ Y. Shigemura, K. Iwai, F. Morimatsu, T. Iwamoto, T. Mori, C. Oda, T. Taira, E. Y. Park, Y. Nakamura, K. Sato. Effect of Prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood on growth of fibroblasts from mouse skin. *J Agric Food Chem.* 57 (2009) 444-449. (査読有)
- ⑨ T. Nishiwaki, N. Kobayashi, T. Iwamoto, A. Yamamoto, S. Sugiura, Y.-C. Liu, A. Sarasin, Y. Okahashi, M. Hirano, S. Ueno, and T. Mori. Comparative study of nucleotide excision repair defects between XPD-mutated fibroblasts derived from trichothiodystrophy and xeroderma pigmentosum patients, *DNA Repair.* 7 (2008) 1990-1998. (査読有)

[学会発表] (計14件)

- ① 森 俊雄、吉田淳一、岩本顕聡、池畑広伸、小林信彦：Dewar型ピリミジン二量体は熱に不安定である、第32回日本光医学・光生物学会、2010年7月31日、東京
- ② 平野牧人、池田真徳、殿村恭代、森 俊雄、中村雄作、楠進、上野 聡：FUS関連筋萎縮側索硬化症細胞の酸化ストレスに対する脆弱性とDNA損傷の蓄積、日本放射線影響学会第53回大会、2010年10月20日、京都
- ③ 小村潤一郎、池畑広伸、森 俊雄、小野哲也：M期細胞における効率的なDNA修復、日本放射線影響学会第53回大会、2010年10月22日、京都
- ④ 柳原啓見、森 俊雄、立石 智、小林純也、小松賢志：NBS1のDNA損傷トランス機構の役割、日本放射線影響学会第53回大会、2010年10月20日、京都
- ⑤ 岩本顕聡、岡橋友美子、池畑広伸、小林信彦、森 俊雄：紫外線誘発 Dewar型ピリミジン二量体を認識するモノクローナル抗体の樹立と応用、第31回日本光医学・光生物学会、2009年7月25日、大阪
- ⑥ 森 俊雄：ワークショップ「紫外線 DNA損傷の修復欠損遺伝病とその分子病態」、XPD変異を共通する色素性乾皮症および硫黄欠乏性毛髪発育異常症両患者間でなぜ紫外線皮膚発がん感受性が異なるか？、日本放射線影響学会第52回大会、2009年11月11日、広島
- ⑦ 平野牧人、森 俊雄、池田真徳、浅井宏英、桐山敬生、降矢芳子、上野 聡：ワークショップ「紫外線 DNA損傷の修復欠損遺伝病とその分子病態」、DNA単鎖切断修復蛋白アラタキシンと神経疾患 -常染色体優性・劣性小脳失調症とAAA症候群-、日本放射線影響学会第52回大会、2009年11月11日、広島

⑧ 柳原啓見、森 俊雄、立石 智、小林純也、小松賢志：紫外線損傷応答における NBS1 の新規機能解析、日本放射線影響学会第 52 回大会、2009 年 11 月 12 日、広島

⑨ 森 俊雄：XPD 変異を共通する二つの遺伝疾患でなぜ紫外線皮膚がん感受性が異なるか？ 太陽紫外線防御研究委員会第 18 回シンポジウム、2008 年 3 月 14 日、大阪

⑩ Y. Okahashi, T. Iwamoto, S. Shibutani, S. Ueno, T. Mori: Determination of 4-hydroxyequilenin-DNA adducts in tissues from mice treated with conjugated equine estrogens, American Association for Cancer Research 2008, April 14, 2008, San Diego, USA

⑪ 森 俊雄、西脇知永、岩本顕聡、小林信彦、上野 聡：XPD 変異を共通する二つの遺伝疾患で紫外線皮膚がん頻度に大差が生じる機構の解析（1）、第 30 回日本光医学・光生物学会、2008 年 7 月 11 日、松江

⑫ 柳原啓見、松本結実、森 俊雄、立石 智、小林純也、小松賢志：複製フォークでの NBS1 の新規役割、日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 20 日、北九州

⑬ 田野恵三、森 俊雄、中村 純、荒川 央、武田俊一、渡邊正己：トリ細胞におけるミスマッチ修復遺伝子の紫外線損傷修復に対する機能、日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 20 日、北九州

⑭ 平野牧人、浅井宏英、桐山敬生、池田真徳、降矢芳子、森 俊雄、安井 明、上野聡：酸化的 DNA 損傷修復系への小脳失調原因蛋白アプラタキシンの機能的関与、日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 20 日、北九州

[図書] (計 1 件)

① 太陽紫外線防御研究会、朝倉書店、からだ光の事典、2010、421

[その他]

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~ri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 俊雄 (TOSHIO MORI)

奈良県立医科大学・医学部・研究教授

研究者番号：10115280

(2) 研究分担者

岩本 顕聡 (IWAMOTO TAKAAKI)

奈良県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20448773