

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510071

研究課題名(和文)日本人に特有なXPA遺伝子創始者変異ヘテロ保因者の皮膚がんリスクの評価

研究課題名(英文)Evaluation of the skin cancer risk among heterozygotes bearing a founder mutation allele unique to a Japanese population at xeroderma pigmentosum group A (XPA) gene

研究代表者

平井 裕子(Hirai, Yuko)

公益財団法人放射線影響研究所・遺伝学部・研究員

研究者番号：90136052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：日本人に高い頻度で存在が報告されているXPA保因者の皮膚がんのリスクを明らかにするために、XPA遺伝子の創始者突然変異を簡単なPCR-RFLP法で検出して、皮膚がん(メラノーマを除く)患者と一般集団におけるXPA遺伝子の創始者変異の保因者の頻度を比較し、保因者の発がんリスクを評価することを目的とした。対照群682例中5例が保因者、皮膚がん患者は915例中13例が保因者だった。両群に統計的有意差は認められなかった。我々がこれまでに報告した頻度から考えると、日本全体で100万人ものXPA創始者変異の保因者が存在することになるが、保因者での皮膚がんリスクは高くないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the cancer risk of heterozygotes by comparing the frequency of heterozygotes bearing a founder mutation in the XPA gene in nonmelanoma skin cancer patients to control population, by taking advantage of the fact that a founder mutation at the XPA gene exists at a relatively high frequency among the Japanese population and can be found easily using the PCR-RFLP method.

We found 5 heterozygotes among 682 individuals in a control population and 13 heterozygotes among 915 nonmelanoma skin cancers. There was no statistically-significant difference between the frequencies of both groups. Although the frequency obtained from our previous study implies that there are about 1 million heterozygotes of the XPA founder mutation in the Japanese population, this study revealed that the frequency of heterozygotes of XPA founder mutation was not higher among nonmelanoma skin cancers than that in the control population.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：XPA(色素性乾皮症A群) 保因者 創始者変異 皮膚がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 高発がん性劣性遺伝性疾患の保因者（ヘテロ個体）は一般人と比べて発がんリスクが高いのではないかと考えられている。従来は、劣性遺伝病患者の両親と血縁家族に関する疫学調査が行われたが、最近では原因遺伝子の創始者突然変異を有するヒトの疫学調査が行われ、ナイミーヘン染色体不安定症候群やブルーム症候群に特異的な創始者変異を持つ保因者では、リンパ性腫瘍、乳がんや結腸がんのリスクが上昇すると報告されている。しかし、その発症メカニズムは調べられていない。

(2) 我々が提案した色素性乾皮症(XP)は、常染色体劣性の遺伝病で、主に紫外線により生じるDNA傷害の修復能力が損なわれているため、非常に高い頻度で、太陽に当たる部分に皮膚がんを生じる。XPの原因遺伝子は8種類のDNA修復遺伝子であり(XPAからXPGまでの7種類と、パリアント)世界中の民族において報告がある。特に、日本人集団には次の二つの特徴がある。一つは、患者頻度(2.2万人から10万人の新生児当たり一人と推定されている)が白人の頻度よりも10倍も高いこと。二番目としては、日本人XP患者の55%はXPA遺伝子に変異を持っており、更にこれらXPA遺伝子に変異を持つ患者の80%は特異的なXPA創始者変異のホモ接合(95%は、少なくとも一方のアリルが創始者変異である)により発症しているという点である。しかも、この創始者変異は、フレームシフトを生じるためタンパク質が生成されないことが知られている(不活性型突然変異)。我々は、既に日本人の一般集団の約1%がこの創始者変異を有する保因者であることを明らかにしている*。

以上の点から、皮膚がん(メラノーマを除く)患者と対照集団におけるXPA遺伝子の創始者変異の保因者の頻度を比較する本研究は、高発がん性劣性遺伝性疾患の保因者の発がんリスク評価のモデルとして適している。

*: Hirai Y et al. Mutat Res 601:171,2006

2. 研究の目的

色素性乾皮症(XP)のような高発がん性劣性遺伝性疾患は、患者(ホモ接合体)は通常10万人当たり数例程度と頻度が低いが、保因者(ヘテロ個体)は、稀ではない(%オーダー)ところが、保因者は、一般的にはその同定が困難で、発がんリスクに関してはよく分かっていない。しかし、不活性型突然変異の保因者は、遺伝子機能が50%に低下していると予想されるので、保因者における発がんリスク評価のモデルになると考えられる。本研究では、日本人に

は高い頻度でXPA遺伝子の創始者突然変異(不活性型突然変異)が存在し、制限酵素断片長多型(PCR-RFLP)法で容易に検出できることを利用して、皮膚がん(メラノーマを除く)患者と対照集団におけるXPA遺伝子の創始者変異の保因者の頻度を比較し、保因者の発がんリスクの評価に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料とDNA抽出: 皮膚がん(メラノーマを除く)試料(1000症例)はパラフィン包埋された組織を用いた(1957年~2011年作製保管)。XPA遺伝子創始者変異は生殖細胞(germline)変異であるので、皮膚がんのスクリーニングにおいては、がん部、非がん部を分けることなく、組織全体からDNAを抽出した。対照群の頻度はこれまでに約1000例のスクリーニングを行い、報告しているが、対照群の頻度をより正確に求めるために、当該研究所で1970年代に行われた子どもの染色体調査に用いられたギムザ染色されたリンパ球の塗抹標本700症例を使用した。各試料ともスライド1枚からDNAの抽出、濃縮を行った。

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守している。本研究で使用する皮膚がん組織はすでに1957年から2011年までに手術で摘出され、パラフィン包埋されて保管されているものなので、インフォームド・コンセントを得ることが困難な症例が大部分である。そのため、本研究は連結不可能匿名化を行って実施した。連結不可能匿名化を行うことにより、XPA保因者が発見されても、結果を個人に連結することはできない。

(2) スクリーニング: 創始者変異を含むDNA領域(図1参照)をPCR法によって増幅させる(増幅断片61bp)。

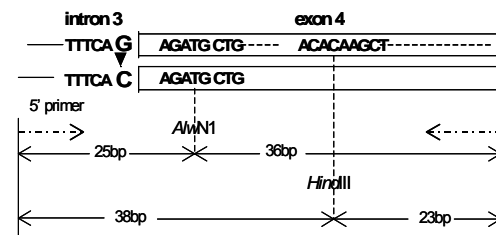


図1 XPA遺伝子の創始者変異部位であるイントロン3のプライム受容体近傍の配列と制限酵素切断部位。創始者変異はGからCへの一塩基置換。

プライマーは5'-TGGACTTAATCTGTTTCA-3'および5'-CCTCTGTTTGGTTATAAG-3'を設定した。

増幅DNA断片の一部を制限酵素AluNIあるいはHindIIIで処理し、ポリアクリル

アミドゲル電気泳動法（12%）により分離した。創始者変異がある場合には、増幅 DNA 断片（61bp）が *A1*/*wN1* 処理により 25bp と 36bp の二つの断片に分断される。よって、ヘテロ接合体では、3 種類の断片が観察される（1 本は正常遺伝子由来、2 本は創始者変異遺伝子由来）。PCR 法で増幅された DNA が正しく *XPA* 遺伝子に由来することを確認するためには、増幅 DNA 断片を *Hind* III で処理した。この場合、*XPA* 遺伝子由来であれば創始者変異の有無とは関わりなく、38bp と 23bp の長さの断片に分断される。

保因者の可能性が示唆されたときは、もう一枚の切片から DNA を抽出して、創始者変異を解析した。別々に抽出した 2 枚の切片の DNA を用いて、同じ結果が得られたとき、保因者と確定した。

4. 研究成果

(1) 保因者の頻度：対照群は 700 症例 DNA を準備し、682 例を解析し、5 例の保因者が確認できた。皮膚がん症例では、915 症例をスクリーニングし、14 例の保因者を確認した。腫瘍の発症部位は 3 例が体幹で、11 例は紫外線に当たる部分であった。

	症例数	保因者数
対照群	682 (1020)	5 (9)
皮膚がん群	915	14

() 内は Hirai Y et al. Mutat Res 601:171,2006 で報告した数。

カイ二乗検定で、P 値が 0.19 となり、両群に統計的有意差は認められなかった。

これまでに、我々が報告した対照群の頻度は 1020 例スクリーニングし、9 例の保因者が確認できているので、今回の結果を加えると、対照群は 1702 例中に 14 例の保因者が確認できたことになる。皮膚がん症例と比べてみると、やはり統計的有意差は認められなかった (P=0.15)。

皮膚がん症例は、1015 例 DNA を準備したが、約 100 症例の解析を期間内に終わることができなかった。残りのスクリーニングが終了後、論文を作成するが、多少頻度が変わることが予想される。

スクリーニングの結果、*XPA* 保因者では皮膚がんのリスクが上昇していると示唆された場合（オッズ比が 2.6 以上を有意とすると、 $9/1000 \times 2.6 = 23/1000$ 症例以上が *XPA* 保因者と予想される場合）には、保因者のがんが、*XPA* 遺伝子の失活によるのか、それとも正常対立遺伝子を残してヘテロ接合体のままで、別の遺伝子に変化を生じたのかを調べるために、ヘテロ接合性の消失（loss of heterozygosity; LOH）と塩基配

列を調べる予定であったが、有意差が認められなかったので、これ以上の解析は行わなかった。

(2) 保因者のがん部位と非がん部位の創始者変異：保因者と確定した試料では、がん部位と非がん部位から別々に DNA を抽出し、創始者変異を解析したところ、保因者 14 例のうち 1 例を除いて、両部位とも、ヘテロ接合体であった。これらの症例に関しては、がん部位では、*XPA* 遺伝子の別の位置に変異が生じ、*XPA* 活性を失活したために皮膚がんを発症したことが考えられるが、これ以上の解析は行っていない。残り 1 例は、非がん部位の *XPA* 遺伝子には創始者変異は観察されなかった。しかし、がん部位は創始者変異のヘテロ接合体であった。スクリーニングにおいては、*XPA* 遺伝子創始者変異は生殖細胞 (germline) 変異であるので、がん部位と非がん部位を分けることなく、組織全体から DNA を抽出して実施したため、保因者と断定したが、この症例は、保因者ではなく、がん部位にたまたま創始者変異が生じていた。創始者変異が生じたことが、この症例の皮膚がんの発症に必要なか否かは明らかではない。正常な遺伝子に創始者変異が生じることは、保因者に発症した皮膚がん 13 症例の正常対立遺伝子が変化なく残っていることから考えると、日常的に変異を生じやすい遺伝子とは考えにくい。本研究は非連結匿名化で行ったので、この対象者に関してこれ以上の調査は不可能であった。

本研究での保因者の最終頻度は現在までのところ、皮膚がん 915 症例中、13 症例であり、保因者の皮膚がんの発症頻度に統計的有意差はなかった (P=0.15)。

	症例数	保因者数
対照群	1702	14
皮膚がん群	915	13

日本人における皮膚がんは相対的にリスクは低いと昔から見なされてきたが、最近ではオゾン層の破壊による紫外線の増大が懸念されており、今後の数十年においては皮膚がん発生が重大な問題となる可能性がある。我々が行った研究から得られた頻度が、日本人全体を代表する値であるとする、日本全体で 100 万人もの *XPA* 創始者変異の保因者が存在することになる。もし、*XPA* 保因者においては皮膚や他のがんのリスクが高いとしたら、公衆衛生上重要な課題となると危惧された。しかし、幸いなことに、*XPA* 保因者に皮膚がんリスクが高いという結果は得られなかった。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 裕子 (HIRAI, Yuko)
公益財団法人放射線影響研究所・遺伝
学部・研究員
研究者番号：90136052

(2) 研究分担者

児玉 善明 (KODAMA, Yoshiaki)
公益財団法人放射線影響研究所・遺伝
学部・部長
研究者番号：60359453

中村 典 (NAKAMURA, Nori)
公益財団法人放射線影響研究所・遺伝
学部・顧問
研究者番号：00010116