

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591639

研究課題名(和文) 色素性乾皮症神経変性に対する治療法の探索～抗酸化という側面からの基礎的検討～

研究課題名(英文) Research on the treatment for xeroderma pigmentosum focusing on the oxidative DNA damage

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：色素性乾皮症(XP)、コケイン症候群(CS)患者における原因不明の神経変性の機序として酸化ストレスによるDNA損傷の修復に着目した。In Vitro実験系(H₂O₂感受性実験、酸化ストレスによるDNA損傷修復能定量)にてXP、CS細胞は酸化ストレスに弱く、その高感受性は抗酸化剤で軽減できる可能性が確認された。CSモデルマウスにおいて、CS患者の画像所見同様、脳のミエリン障害が免疫組織学的に観察された。これら in vitro、in vivo 評価系は今後XP、CSの治療法の探索に有用な tool となり得る。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on oxidative DNA damage and its repair in the pathogenesis of neurodegeneration in XP and CS patients. Both XP, CS and XP or CS knockdown cells were hypersensitive to killing by hydrogen peroxide and the level of DNA repair ability to oxidative DNA damage estimated by plasmid host cell reactivation in XP and CS cells was decreased compared to that in normal cells. The hypersensitivity to hydrogen peroxide in XP and CS cells slightly ameliorated after the treatment of some antioxidants. In CS mice, the demyelinating change was observed in the cerebral cortex immunohistochemically, as in MRI image of progressive CS cases. These in vitro and in vivo experimental systems would be a useful tool to explore a novel remedy for the neurologic manifestations.

研究分野：皮膚科学

キーワード：色素性乾皮症 コケイン症候群 酸化ストレス DNA修復 抗酸化

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者のグループでは1998年11月より紫外線により生じたDNA損傷の修復システムの先天性異常で発症する遺伝性光線過敏症の診断センターを維持している。主な対象疾患は色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum; XP)とコケイン症候群(Cockayne syndrome; CS)であり、いずれも進行性の神経発達障害を伴うため「神経皮膚症候群」に含まれる。研究代表者が長年にわたり積極的に支援活動を行っているXP、CS患者家族会においても「一刻も早い治療法の確立を切望する」との声を頻りに耳にする。しかし現時点では神経症状を伴えば有効な治療法もなく患者の予後はきわめて不良となる。

これらの疾患は単一遺伝子疾患であるため根治的な治療は困難である。野生型の責任遺伝子を外部から導入するという遺伝子治療、幹細胞移植、エクソスキップ療法などが検討されているが、まだまだ研究途上である。また昨今世界的に注目されているiPS細胞をXP患者皮膚から作成し神経を誘導して、神経症状に有効な薬剤を網羅的に検索する方法も臨床応用までにはかなりの年月を要するものと考えられる。

XP、CSでは紫外線性DNA損傷の代表的な修復システムであるヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair; NER)に関与する遺伝子に変異が同定される。これまでの分子遺伝学的研究から日光過敏、色素異常や高発がんなど種々の皮膚症状の病態はかなり解明されているが、XP、CSに合併する進行性の神経障害の分子機構の詳細は未だに不明である。その中でHayashiらによりXP患者の剖検組織を用いた免疫組織学的検討にて酸化されたDNA損傷の指標である8-OHdGが大脳基底核部に検出されたという興味深い研究結果が報告されていた(J Neuropathol Exp Neurol, 2001)。

2. 研究の目的

本研究の目的はXP、CS患者において、生命予後に強く関連する原因不明、進行性の神経変性の病態を解明し、治療手段を探索することである。脳や神経は紫外線非曝露組織であるため、その変性の機序は各種XP因子、CS因子が担うNERの異常のみでは説明できない。そこで今回我々は、皮膚外症状の誘因として、NER機能に欠損のあるXP、CS患者ではこれまで異常が指摘されなかった酸化されたDNA損傷の修復低下による損傷蓄積の可能性に着目した。8-ヒドロキシグアニンを代表とする酸化されたDNA損傷はNERではなく塩基除去修復(base excision repair: BER)で修復される。今回研究代表者はXPやCSではNERのみならずこのBERシステムにも異常が生じ、修復されずに残された酸化されたDNA損傷が脳神経組織に過剰に蓄積し、

その結果様々な表現形を呈するのではないかと仮説を立て、立証を試みた。

3. 研究の方法

材料

これまで研究代表者が樹立し、様々な表現型を呈するXP、CS、XP/CS患者由来細胞株、さらに、本研究期間中も全国から紹介されてくるXP、CS、XP/CS患者由来細胞株を研究同意のもとに使用した。

またマウス実験ではXPG遺伝子が完全にノックアウトされCSモデルマウスとして販売されているマウスを理化学研究所より購入して用いた。

方法

(1)コロニー形成能を指標にしたH2O2感受性試験

0-500mMのH2O2を培養液中に1時間処理し、コロニー形成法により各細胞の酸化ストレス感受性を検討した。また各種抗酸化剤の前処理による酸化ストレス感受性の変化も観察した。

(2)8-OHdG誘発ベクターを用いた宿主細胞回復能によるDNA修復能の定量

ローズベンガル処理、可視光線照射により8-OHdGを誘発したpLuc(ルシフェラーゼ発現ベクター)を各細胞に導入し、各患者由来細胞内でDNA修復させ、細胞抽出液のルシフェラーゼ活性を測定することで各患者のBER機能を評価した。

(3)CSモデルとしてのXPG nullマウス脳組織の解析

脳内各部位におけるMBP、CC1、Olig2の発現を各種抗体を用いて免疫組織学的に解析した。

(4)患者情報蓄積

全国から紹介されるXP、CS疑い患者の解析を細胞レベル、分子レベルで詳細に行い、XPあるいはCS関連遺伝子の異常と、皮膚、神経を含めた各種臨床症状の重症度、多様性との関連性を検討する材料としてのデータベースの構築を行った。

4. 研究成果

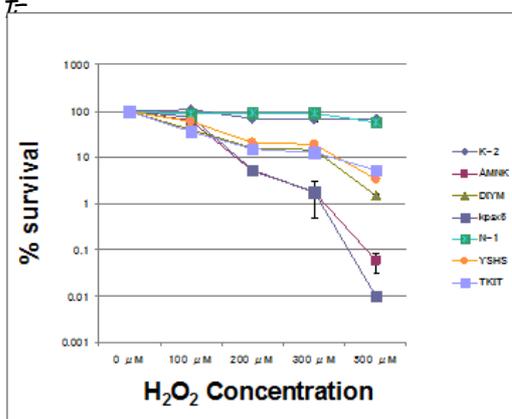
(1)XP細胞、CS細胞、CSA/CSBノックダウン細胞はH2O2処理で高感受性である。H2O2感受性向上はある種のフリーラジカルスカベンジャー処理で軽度ではあるが改善する現象が観察できた(図)。

(2)XP、CS細胞は正常細胞に比べて酸化されたDNA損傷の代表的生成物である8-OHdGの修復に著明な低下がみられた。すなわちこれらの細胞のBER機能が低下していることが判明した。またその低下はXP、XP/CSでは遺伝型、神経症状の重症度と関連性が見られたが、CSでは重症度との関連は認められなかった。

(3)CSモデルであるXPGノックアウトマウスにおいて、大脳皮質におけるオリゴデンド

口サイトの遊走能には異常はないが、分化異常、ミエリン形成の障害がみられた。この結果は実際の CS 患者でみられる MRI 画像に矛盾しないものであった。

(4) 今回3年間で解析した紹介患者数は74検体で、その内XP疑い患者数は62例であった。精査により、XP-A10例、XP-C1例、XP-D4例、XP-G3例、XP-V6例が確定し、XPではなかった例は27例であり、残りはまだ解析中である。XP以外では6例中、CSが8例、毛細血管拡張性失調症1例(放射線照射後のH2AX形成で評価)、CSと鑑別を要したがアイカルディ・ゴートイエ症候群(Aicardi-Goutières syndrome; AGS)と判明した症例が1例であった。XP、CSと確定した患者の検査結果と臨床データは連結可能匿名化ののち、非ネット接続のPCに保存した。



DNA修復異常で発症するXP、CS患者のQOL向上、予後改善、治療法の探索を行う上で、発症機序の詳細な把握は重要である。しかしながら両疾患における脳・神経症状など皮膚外症状の発症機序は現在も全く不明である。今回、XP細胞、CS細胞は紫外線のみならず酸化ストレスに対しても弱く、その脆弱性は抗酸化処理により部分的に回復することから、XP、CSにおいて塩基除去修復システムに機能不全が生じている可能性を示唆する結果が得られた。

この結果は、XP、CS患者では普遍的に酸化ストレスに対して弱く、またその異常は抗酸化剤の投与により部分的に回復することが期待され、将来におけるXP、CS治療法の可能性が示唆された。また今回行ったin vitro、in vivo評価系は今後XP、CSの治療法の探索に有用なtoolとなり得るものと思われた。またさらなる患者情報蓄積による遺伝型・表現型の検討も重要である。今後もXP・CS診断センターを維持していきたい。

疾患マウスを用いた検討は創薬という観点からは有用である。今後は一時的に中断したXPマウス研究をできるだけ早くに再開し、XP、CSの神経症状の病態把握を行い、様々な抗酸化剤を用いたin vitro研究を遂行し、臨床研究を通じた臨床医療につながる治療

法の開発を目指したい。

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13件)

- (1) Tofuku Y, Nobeyama Y, Kamide K, Moriwaki S, Hidemi Nakagawa H Xeroderma pigmentosum complementation group F: report of a case and review of Japanese patients. J Dermatol, in press 査読あり doi:10.1111/1346-8138.12942
- (2) Kuwabara A, Tsugawa N, Uejima Y, Ogawa J, Otao N, Yamada N, Tanaka K, Masaki T, Nishigori C, Moriwaki S, Okano T High prevalence of vitamin D deficiency in patients with xeroderma pigmentosum (XP)-A under strict sun-protection European Journal of Clinical Nutrition, in press 査読あり doi:10.1038/ejcn.2015.1
- (3) Munemoto S, Osawa S, Kurokawa T, Moriwaki S A case of generalized eruptive keratoacanthoma, J Dermatol, in press. 査読あり
- (4) Kokunai Y, Tsuji M, Yuko Ito Y, Kurokawa T, Otsuki K, Moriwaki S Immunohistochemical analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human skin tumor, Medical Molecular Morphology 47:8-13, 2014 査読あり doi:10.1007/s00795-013-0030-3
- (5) Sugimoto A, Kurokawa T, Kishi K, Yasuda E, Tamai H, Moriwaki S Generalized milia in an infant with full trisomy 13 J Dermatol 41:763-4, 2014 査読あり doi:10.1111/1346-8138.12550
- (6) Moriwaki S, Saruwatari H, Nakanishi N, Kanzaki T, Kanekura T, Minoshima S Trichothiodystrophy Group A: A first Japanese patient with a novel homozygous nonsense mutation in the GTF2H5 gene. J Dermatol 41:705-8, 2014 査読あり
- (7) Ishii K, Kotani M, Fujita A, Moriwaki S Usefulness of a newly-developed device, the Power Tree®, for body massage: Evidence from a medical evaluation. J Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications, 4:185-9, 2014 査読あり doi:10.4236/jcdsa.2014.43026
- (8) Moriwaki S Hereditary disorders with deficient repair of UV-induced DNA damage Jpn Clin Med, 4 : 29-35, 2013 査読なし doi:10.4137/JCM.S10730
- (9) Brooks BP, Thompson AH, Bishop RJ, Clayton JA, Chan CC, Tsilou ET, Zein WM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, Oh KS, moto K, Inui H, Moriwaki S, Emmert S,

- Iloff NT, Bradford P, Digiovanna JJ, Kraemer KH. Ocular Manifestations of Xeroderma Pigmentosum: Long-Term Follow-up Highlights the Role of DNA Repair in Protection from Sun Damage. *Ophthalmology*. 120:1324-1336, 2013
 査読あり doi:10.1016/i.optha.2012.12.044
- (10) Imoto K, Nadem C, Moriwaki S, Nishigori C, Oh KS, Sikandar G, Khan SG, Goldstein AM, Kraemer KH Ancient origin of a Japanese xeroderma pigmentosum founder mutation *J Derm Sci* 69:175-176, 2013
 査読あり
 doi:10.1016/j.jdermsci.2012.10.008
- (11) Moriwaki S, Yamashita Y, Nakamura S, Fujita D, Kohyama J, Takigawa M, Ohmichi H Prenatal diagnosis of xeroderma pigmentosum group A in Japan *J Dermatol* 39:516-9, 2012
 査読あり
- (12) Moriwaki S, Takigawa M, Igarashi N, Nagai Y, Amano H, Ishikawa O, Khan SG, Kraemer KH Xeroderma pigmentosum complementation group G patient with a novel homozygous mutation and no neurological abnormalities, *Exp Dermatol* 21:304-7, 2012
 査読あり
 doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01446.x.
- (13) Moriwaki S, Takahashi Y, Shimizu H, Inoue M, Sugiyama Y, Inoue S Decreased repair of singlet oxygen-induced DNA damage in xeroderma pigmentosum group A cells determined by plasmid host cell reactivation *J Derm Sci* 66:516-9, 2012
 査読あり
 doi:10.1016/j.jdermsci.2012.02.001

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) Moriwaki S, Takahashi Y, Nakamura S, Nakazawa Y, Ogi T A Novel XPA gene mutation resulting in trace level of XPA expression in an elderly XP-A patient without neurological abnormalities The 44th ESDR 2014, Sept.12, 2014 (Copenhagen, Denmark)
- (2) Shimizuhira C, Yokota H, Moriwaki S, Yoshida Y, Miyachi Y, Yamanaka S, Kabashima K Establishment of iPS cells from XPA patients as a new tool for its mechanistic analysis The 44th ESDR 2014, Sept.12, 2014 (Copenhagen, Denmark)
- (3) Numemoto S, Osawa S, Kurokawa T, Moriwaki S A case of generalized eruptive teratoacanthomas The 3rd Eastern Asia Dermatology Conference Sept.24-26, 2014 (Jeju, Korea)
- (4) Moriwaki S, Kurokawa T, Kitamura S A child case of cutaneous type of xeroderma pigmentosum group G with a novel mutation The 3rd Eastern Asia Dermatology Conference

- Sept.24-26, 2014 (Jeju, Korea)
- (5) Moriwaki S Recent experience in the diagnosis of XP and CS in Japan International symposium on xeroderma pigmentosum and related diseases : Disorders of DNA damage response – Bench to Bedside - March 5, 2014 (Kobe International Conference Hall, Kobe)
- (6) Osawa S, Nakamura A, Maemura K, Otsuki Y, Moriwaki S Post-irradiation DNA Damage Repair Function in Cells Derived from Patients with Xeroderma Pigmentosum and Cockayne syndrome. International symposium on xeroderma pigmentosum and related diseases : Disorders of DNA damage response – Bench to Bedside - March 5, 2014 (Kobe International Conference Hall, Kobe)
- (7) Kraemer KH, DiGiovanna JJ, Khan SG, Tamura D, Bradford P, Totonchy M, Goldstein A, Masaki T, Kuschal C, Ueda T, Inui H, Imoto K, Takeuchi S, Moriwaki S DNA repair disorders xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy : bench to bedside and back. International symposium on xeroderma pigmentosum and related diseases : Disorders of DNA damage response – Bench to Bedside - March 5, 2014 (Kobe International Conference Hall , Kobe)
- (8) Honda H, Nishiyama C, Inobe M, Wakasugi M, Moriwaki S, Matsunaga T Newly developed immunoassay for evaluating nucleotide excision repair ability using individual peripheral lymphocytes and its possible application to the diagnosis of xeroderma pigmentosum International symposium on xeroderma pigmentosum and related diseases : Disorders of DNA damage response – Bench to Bedside – March 6, 2014 (Kobe International Conference Hall , Kobe)
- (9) Shimizuhira C, Yokota H, Moriwaki S, Yoshida Y, Miyachi Y, Yamanaka S, Kabashima K Establishment and characterization of iPS cells derived from XPA patients The 39th annual meeting of JSID, Dec.12, 2014 (Hotel Hankyu Expo Park, Suita, Osaka)
- (10) Moriwaki S, Makinodan E, Nakazawa Y, Ogi T Adult onset Cockayne syndrome appears in two cases of UV sensitive syndrome with C229T CSB mutation IID2013 May 2013 (Edinburgh, Scotland)
- (11) Kokunai Y, Tsuji M, Ito Y, Kurokawa T, Otsuki Y, Moriwaki S Immunohistochemical analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human melanoma in comparison with skin squamous cell carcinoma. The 37th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2012.12.9 (Loisir Hotel, Naha, Okinawa)

〔図書〕(計 21 件)

- (1) 森脇真一 光線過敏症 今日の小児治

療指針、第 16 版 (医学書院) 印刷中
(2) 森脇真一 光線力学療法 光と生命の事典 (朝倉書店) 印刷中
(3) 森脇真一 光線力学療法はどこまで有用か 最新・EBM 皮膚疾患の治療 (中外医学社) 印刷中
(4) 森脇真一 色素性乾皮症 難病事典 (学研メディカル秀潤社) 印刷中
(5) 森脇真一 Q15 「光や電磁波が皮膚に与える影響について教えてください。」 スキンケアマイスター試験参考テキスト (3 級用) (メディカルレビュー社) 印刷中
(6) 森脇真一 Q16 「季節、高地、緯度、湿度などで、光の曝露量が異なると、肌へどのような影響がありますか？」 スキンケアマイスター試験参考テキスト (3 級用) (メディカルレビュー社) 印刷中
(7) 森脇真一 Q19 「日焼けによって肌が赤くなり人と、黒くなる人がいますが、日焼けで違いはありますか？」 スキンケアマイスター試験参考テキスト (3 級用) (メディカルレビュー社) 印刷中
(8) 森脇真一 光接触皮膚炎 皮膚疾患最新の治療 2015 - 2016 p99 (南江堂) , 2015.1
(9) 森脇真一 光線過敏症 今日の治療指針 2015 年版 私はこう治療している p1153-4、(医学書院) 2015
(10) 森脇真一 可視光のアンチエイジング効果 p45-50 光老化科学の最前線 (シーエムシー出版) 2015
(11) 森脇真一 光線力学療法はどこまで有用か p356-359, 2015 最新・EBM 皮膚疾患の治療 (中外医学社)
(12) 森脇真一 トピック UDS、ポルフィリアなど p59-60 定番・外来皮膚科検査法のすべて 2015 (文光堂)
(13) 森脇真一 遺伝性光線過敏症 定番・外来皮膚科検査法のすべて p161-164 (文光堂) 2014
(14) 森脇真一 こどもの異常な日焼け診断の決め手：色素性乾皮症を疑うべきかの解決法は？ 苦手な外来皮膚疾患 100 の解決法～そのとき達人はどのように苦手皮膚疾患を克服したか？～ p104-105 (メディカルレビュー社) 2014
(15) 森脇真一 アトピー性皮膚炎患者への紫外線に関する生活指導のポイントを教えてください 臨床力を磨く アトピー性皮膚炎 Q&A 55 p121-123、2014 (診断と治療社)
(16) 森脇真一 日常臨床の場でも常に発表する気持ちで p146-7, 若い医師たちに紡ぐことば 2014 (メディカルレビュー社)
(17) 森脇真一 コケイン症候群 忘れてはならない皮膚科症候群 p102-105 皮膚科臨床アセット 20 (中山書店) 2013
(18) 森脇真一 誤診：しみ、本当は色素性乾皮症 誤診されている皮膚疾患 p304-307、2013 (メディカルレビュー社)

(19) 森脇真一 光線力学治療 (PDT) の皮膚科への応用 一冊でわかる最新皮膚科治療皮膚科サブスペシャリティシリーズ第 7 巻 (文光堂) pp211-pp214、2013
(20) 森脇真一 思春期に見つかる光線過敏症への対処法は？ 思春期皮膚トラブル pp126-130、2013 (診断と治療社)
(21) 森脇真一 色素性乾皮症 今日の皮膚疾患治療指針 p585-587、2012 (医学書院)

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 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

: