

のうち、孤発例が80人家族例が20人であった(図3)。遺伝子検査を施行したものが65人いた。そのうち、TSC1が16人(25%)、TSC2が22人(34%)いずれにも異常が認められなかった患者が27人(41%)であった(図4)。この65人の患者のうち、孤発例が50人(77%)、家族例が15人(23%)であった(図5)。この孤発例50人のうち、TSC1が10人(20%)、TSC2が17人(34%)何れにも異常が認められなかった患者が23人(46%)であった。家族例15人のうちTSC1が6人(40%)3家族で、TSC2が5人(33%)何れにも異常が認められなかった人が4人(27%)であった(図5)。逆にTSC116人のうち孤発例は10人(63%)で、家族例6人(37%)で3家族として考えると孤発例が77%で家族例が23%となる。一方TSC2のうち孤発例は、17人(77%)で家族例は5人(23%)3家族で、家族数で考えると孤発例が85%家族例が15%となり、今まで言われていたように、TSC1では家族例が多いとのことが確認された。また何れに



図1 結節性硬化症の患者の男女比

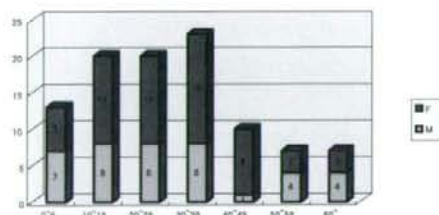


図2 年齢、男女別結節性硬化症の患者の分布



図3 結節性硬化症の孤発例と家族例の割合



図4 結節性硬化症患者の遺伝子型

も異常の認められなかった症例の内、孤発例は23人(85%)で家族例4人(15%)家族数で考えると2家族8%で孤発例が92%に達し、孤発例の方が遺伝子異常の確認が困難であると考えられた(図6)。結節性硬化症の精神発達遅滞に関しては、軽症も含めて精神発達遅滞や自閉症がある人が46%それらの異常が全く認められない人が54%と精神発達遅滞がない人の方が多かった(図7)。これは従来言われていた精神発達遅滞合併率60~70%に比して、低い値であった。痙攣発作の有無に関しては過去に一度でも痙攣発作をおこした既往のある人はすべて、痙攣ありとして取り扱ったが、その結果でも痙攣ありの頻度が60%でなしの頻度が40%であった(図8)。痙攣発作がありの人の中には、過去に一度発作を起こしたことがあるだけで、抗痙攣剤も全く

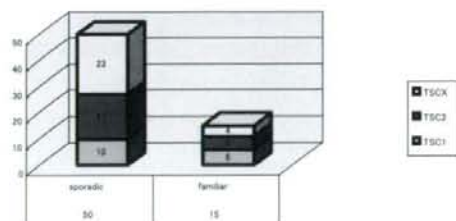


図5 結節性硬化症患者の遺伝と遺伝子型

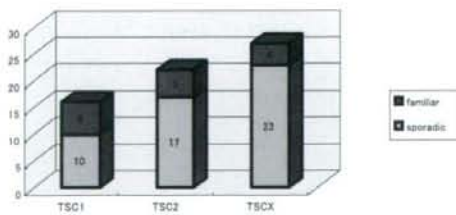


図6 結節性硬化症患者の遺伝子型と遺伝



図7 結節性硬化症における精神発達遅滞の頻度



図8 結節性硬化症における痙攣発作の頻度

使用していないような人も含まれており、我々が皮膚科であるという特殊性を考慮しても、これは今まで言われていた頻度 80% 前後より遙かに低い頻度であった。痙攣発作と精神発達遅滞や自閉症などの中枢神経症状との関係を検討するために、痙攣既往あり、痙攣発作が過去に一度だけあるが、抗痙攣剤の使用経験もない人、全く痙攣発作の既往がない人の 3 グループに分けて、それぞれにおける精神発達遅滞、自閉症の割合を検討した。痙攣発作のある人のうち精神発達遅滞がある人は 35 人 (65%) 自閉症が 8 人 (15%) で、あわせて、神経症状のある人は 80% に達した。逆に、全くこれら神経症状がない人 11 人 (20%) であった。痙攣発作が一回のみのグループでは 6 人全員が正常で、痙攣なしのグループでは、37 人 (95%) が正常であり、痙攣発作の頻度と精神発達遅滞には相同性がある事が確認できた。ただ、痙攣発作が全くないグループにおいても、3 人 7% に精神発達遅滞が認められた (図 9)。

皮膚症状に関しては、顔面の血管線維腫は 89% に認められ (図 10)、89 人の年齢分布を検討した結果、何れの年齢においても高頻度に認められた (図 11)。皮膚症状として唯一早期より認められる白斑に関しては、白斑を、全く認めない頻度は 21%、1 個か 2 個の白斑を認める割合が 29%、3 個以上の白斑を認める割合が 50% であった (図 12)。一方、白斑より出現が遅いと考えられているシャーグリーンパッチやさらに遅い爪開線維腫の頻度でも全年齢を

通しての割合で 80%、63% であり (図 13,14)、皮膚症状が本症診断に重要であることが示唆された。最近問題になってきている肺病変に関しては、100 人のうち HRCT を施行した 62 人に関して検討した。全て HRCT による診断であるが、MMPH (Multifocal Multinodular Pneumocyst Hyperplasia) を有する頻度が 55%、LAM (Lymphangiomyomatosis) を有する頻度が 32%、これら両病変を同時に有する頻度が 13% であり、従来考えられていたのとは桁違いに多かった (図 15)。LAM と MMPH の男女比に関

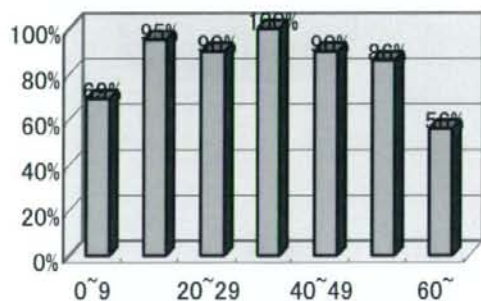


図 11 結節性硬化症における顔面の血管線維腫の年齢別頻度



図 12 結節性硬化症における白斑の頻度



図 13 結節性硬化症におけるシャーグリーンパッチの頻度

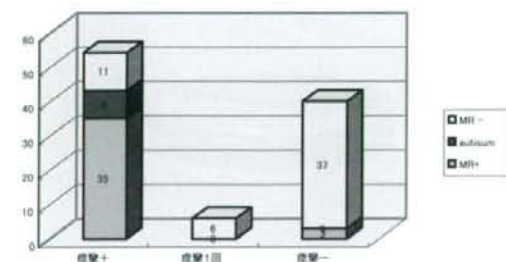


図 9 結節性硬化症における痙攣発作と精神発達遅滞の関係

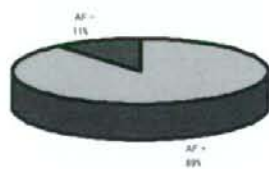


図 10 結節性硬化症における顔面の血管線維腫の頻度



図 14 結節性硬化症における爪開線維腫の頻度

しては何れにおいても女性が多いが、母集団が女性が多いことを考慮してもLAMではやはり女性の割合が極めて高かった(図16)。年齢別男女比に関しては、LAMでは20代30代40代と増加している。一方MMPHではLAMよりやや若く20代30代でピークをむかえている(図17,18)。MMPHでは男性も女性同様のカーブを描いているが、LAMでは今までの報告と同様に男性例は極めて少なかった。腎病変に関しては、100人のうちエコーや腹部CT、



図15 結節性硬化症における肺病変の頻度

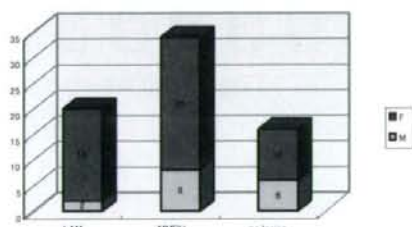


図16 LAMとMMPHの男女比

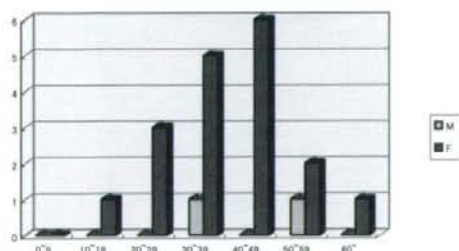


図17 LAMの好発年齢と男女比

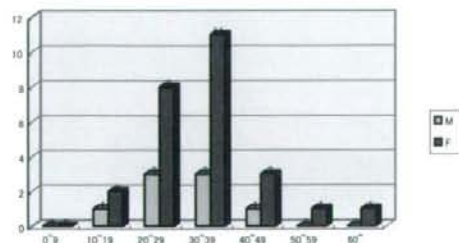


図18 MMPHの好発年齢と男女比

MRIで検索した患者88人について解析した。その結果、血管筋脂肪腫(AML)が認められたのは39人(44%)で、そのうちAMLと腎癌(RCC)を合併していた者が3人(3%)。RCCのみ認めた患者が1人(1%)。嚢腫(Cyst)を認めた患者が23人(27%)で、そのうちAMLとcystを合併していた患者が12人(14%)。Cystのみ認めた患者が11人(13%)。何れの腎病変も認められなかった患者は25人(28%)であった(図19)。年齢別腎病変に関しては、AMLは10代から20代30代と徐々に増加するが、それに反してCystは各年代において大きな変化が無いように思われた。RCCに関してはAMLに遅れて、20代頃より出現してくる(図20)。ただ、RCC4例のうち3例はAMLに合併しておこっており、AMLに無関係におこった1例に関しては、結節性硬化症と無関係におこった可能性も否定できず、結節性硬化症におけるRCCがAMLに引き続いておこってくる可能性が示唆された。

D. 考察および結論

以上より、結節性硬化症では昔から言われていたのに比して、精神発達遅滞や痙攣発作の割合が減少しており、逆に腎病変や肺病変の頻度が増加している事が確認できた。MMPHは良性だが希な疾患とされており、CT所見で診断する場合は肺ガンとの鑑別が困難なことがある。したがって、結節性硬化症の患者においては、肺ガンなどとの鑑別診断を行うに於いて、MMPHは決して希な疾患では無いこ

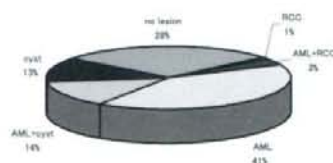


図19 結節性硬化症における腎病変の頻度

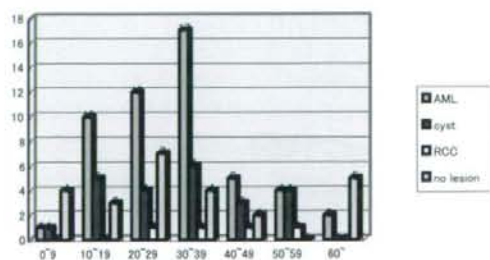


図20 結節性硬化症における腎病変の好発年齢と男女比

とを肝に銘じておく必要があると思われた。一方、LAMは今まで言われていたのと同様に20代30代40代と増加しているが、実際は20歳以前に積極的にLAMやMMPHを調べた報告はなく、我々の所でも、12歳のLAMの少女も見つかっており、今後もっと年齢層を拡大して検査を進めていく必要があると思われた。現時点ではLAMは進行性の予後不良の疾患と考えられているが、我々のところでは高頻度にLAMが見つかるが、かならずしも全症例が重篤になるわけではなく、10年近くフォローしていても殆ど進行が認められない症例も多々あり、進行性に増悪していく従来から言われているタイプのものと、殆ど進行しない良性のものと2通りあるのではないかと思われた。現時点ではLAMに対する確実かつ有効な治療法はなく、世界的にはラパマイシン等のmTOR阻害剤の使用が試みられており、今後我が国においても使用を考えていくべきと思われる。ただ、それに当たって、非進行性の良性のLAMと進行性のLAMをいかに鑑別していくかが問題であると思われた。腎のAMLの割合も40%と極めて高く、相当おおきな腫瘍が出来ていても一般の検査では異常が認められないことが多く、初診時にすでに巨大な腫瘍を有している例も多い。腎機能は維持されているが、腫瘍の破裂の予防の為に、腎摘出せざるおえないような症例もあり、透析や腎移植に伴う患者の苦痛を考えるとラパマイシンなどを、腫瘍を縮小させ破裂の危険を減らして、腎摘出を少しでも送らせる目的で使用することも期待される。ただ、何れの場合も現時点では本邦においては患者さんの個人輸入でしか利用できず、高額な

医療費がかり、財政面においても何らかの検討が必要であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Wataya-Kaneda and I. Katayama: Dissociate expression of TSC-1 product hamartin in a skin and pulmonary lesion of a tuberous sclerosis complex: Hum Pathol in press
- 2) Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, Watabe H, Rouzaud F, Yasumoto K, Hara T, Tohyama C, Katayama I, Miki T, Hearing VJ. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. FASEB J. 2008 ;22:1009-20.
- 3) Murayama K, Kimura T, Tarutani M, Tomooka M, Hayashi R, Okabe M, Nishida K, Itami S, Katayama I, Nakano T. Akt activation induces epidermal hyperplasia and proliferation of epidermal progenitors. Oncogene. 2007; 26:4882-8.

2. 学会発表

- 1) International Investigative Dermatology 2008 (2008.5): A novel protein-interaction on tuberous sclerosis complex Mari Wataya-Kaneda, Chiharu Toyama and Ichiro Katayama
- 2) 第60回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (2008.10) 結節性硬化症ノ基礎と臨床、金田眞理、片山一郎

Tuberous sclerosis complex (TSC) の Facial angiofibroma に対する 剥削術・雪状炭酸圧抵併用療法

研究分担者 倉持 朗 埼玉医科大学医学部皮膚科教授

研究要旨

TSC 患者の皮膚病変中、患者から最も治療の要望の高いものは、Facial angiofibroma である。mTOR 阻害剤の有効例が報告されているが、現時点では、外科的対応が、治療の主体であり、本邦でも様々な工夫がなされてきた。本法は、従来なされてきた皮膚剥削術、および液体窒素冷凍凝固術の両者を取り入れた変法で、リード万能グラインダー G1000 とダイヤモンドバーによる皮膚剥削術を行った後、直ちにドライアイス塊での圧抵を併用する方法である。自験例では、皮膚剥削術単独より遙かに勝る効果が、最長 16 年間継続して得られており、Facial angiofibroma に対する有効な治療法となるものと考えた。

A. 研究目的

概念と治療の変遷

TSC 患者の皮膚病変において、患者からの治療の要望の最も高いものは Facial angiofibroma である。1890 年に Pringle により、“Congenital adenoma sebaceum” としてではあるが、その臨床像が、明確に示されており（図 1、Pringle JJ ; Br J Dermatol 2 ; 1-14 1890）、我々が治療にあたる症例の多くは、酷似した臨床像を呈す（図 2）。ただし、出生時からこの丘疹をみることは稀で、4-5 歳ごろに、顔面の中央—鼻部・頬部・顎部に生じ、対側性に、蝶形の拡がりを持って、年齢と共に増加・増大するのが普通である。個疹は油性光沢を有し、毛細血管拡張を伴う。中には比較的早期から、丘疹が集簇し桑の実状を呈するものがある（図 3）が、このようなものは、切除し、顔面以外の部位から採皮、植皮術を行うことで、対応できる。

組織学的には Angiofibroma であるが、真皮上層での血管の増殖と拡張、および血管周囲・付属器周囲での膠原線維の層状の増殖、間質での GFAP 陽性グリア様の星芒状細胞や、リンパ球様の形状をした細胞の増殖、弾力線維の高度な減少、脂腺の萎縮、を特徴とする（図 4）。

Facial angiofibroma に対する治療としては、mTOR

阻害剤の有効例の報告はあるが、現時点では、外科的な対応が主体であり、①切除・縫縮術、②切除+植皮術、③電気乾固術、④液体窒素冷凍凝固術、⑤



図 1 Pringle のスケッチ（1890 年）

皮膚剥削術、⑥炭酸ガスレーザー、⑦ケミカルピーリング、が行われ、おのおの報告されてきた。それぞれに効果はあるが、限定的で、皮疹の再発、および新生のため、治療を繰り返し行う必要がある。

④、⑤については本邦において詳しい検討がなされている。筆者はその両者の方法と利点とを取り入

れた、皮膚剥削術と、(使い勝手のよい)ドライアイスに抱える雪状炭酸圧抵の併用療法を行った。また、本法を、特に切除術で治療した症例、と皮膚剥削術で治療した症例で、治療効果と奏効期間に関して比較し、本法の妥当性について検討した。

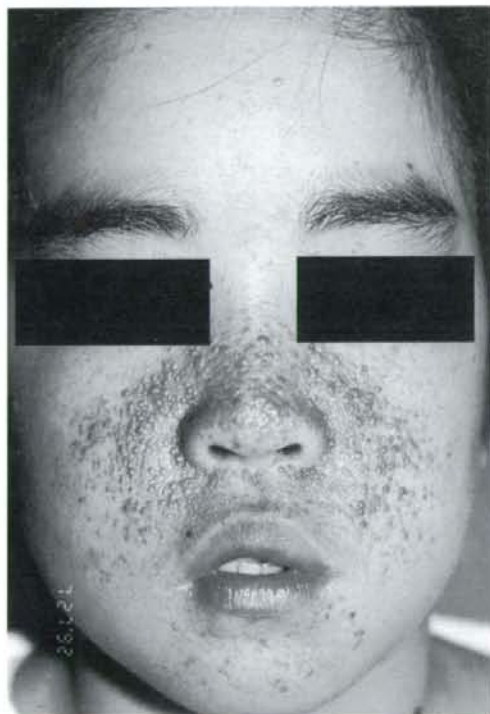


図2 Tuberous sclerosis complex の典型的な Facial angiofibroma (10歳 女児)

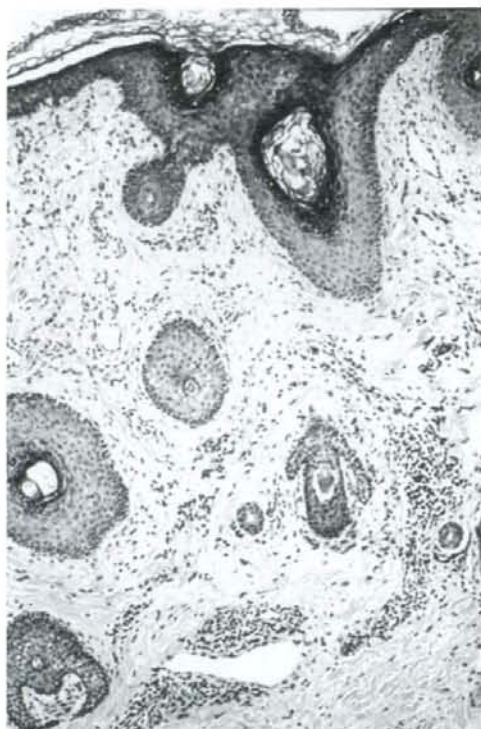


図4 Facial angiofibroma の病理組織像



図3 桑の実状を呈した Facial angiofibroma. Atheroma の混在が認められた (14歳 男児)

倫理面の配慮

この治療法の新たな試みは、皮膚科領域において、患者から最も治療の要望の高いものであるために、考案され、なされたものであるが、治療効果の判定や、経過の観察には、顔面の臨床写真での記録が、どうしても必要である。報告にあたり、個人を特定できる情報はすべて削除し、顔の一部は、本人と分からないようにするため、ブラックで覆った。

B. 研究方法と結果

治療の対象は、全例とも顔面に広い範囲で Facial angiofibroma があり、治療を希望して来院した TSC 症例で、全例とも全麻下に、手術を施行した。

いずれの症例においても皮疹の再発と新生が認められた。

1) 切除・縫縮術

可及的広範囲に丘疹の拡がりの目立つ部位において Spindle excision を行った。全例で皮疹は術後にも生じ、拡大した。小児の症例のみならず、成人に於いても皮疹の再燃、新生をみた。図5に34歳男性例での施行例を示すが、6年6ヶ月後、広範に皮疹が生じている(図5)。

2) 皮膚剥削術

従来のシュロイスのアパラタス(図6)を用いた Dermabrasion 法で、(真皮乳頭層までの剥削術では容易に再発が生じるため、)真皮中層まで剥削をおこなった。最近の8症例についての奏効期間は、症例:①23歳女性—奏効期間5ヶ月、②22歳男性—奏効期間1年、③11歳女児—奏効期間6ヶ月、④

17歳女性—奏効期間8ヶ月、⑤18歳女性—奏効期間2年、⑥27歳女性—奏効期間9ヶ月、⑦24歳男性—奏効期間2年3ヶ月、⑧9歳女児—奏効期間3ヶ月、であり、平均の奏効期間は10.5ヶ月であった。図7は22歳男性例での施行例(症例②)で、1年後には、明らかな皮疹の再燃を生じた症例であ

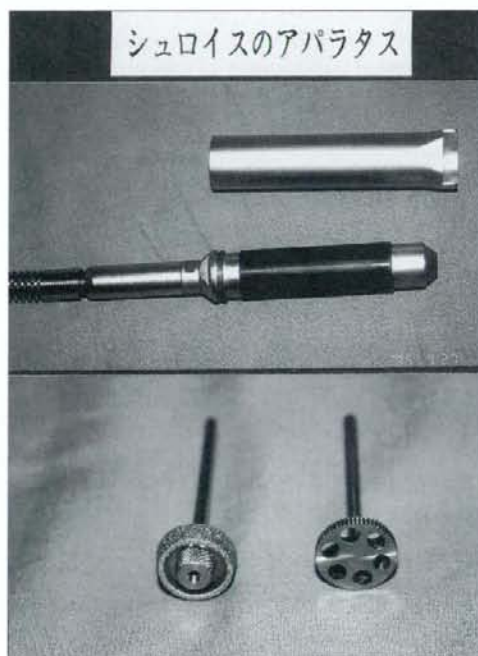


図6 シュロイスのアパラタス



図5 34歳男性; 切除縫縮術後の再発・新生。術後6年6ヵ月後の臨床像(右端)

る。図の右は、術後5年後(27歳時)のものである(図7)。

3) 皮膚剥削術・雪状炭酸圧抵併用療法

ここでは使用機材としては、リード万能グラインダーとダイヤモンドバー(図8)を用い、市販のドライアイス塊(solid carbon dioxide)一図9の如く、直方体に割り、圧抵面をナイフに押し当て平らにして使う一を準備する(図9)。

治療方法の実際(の2例)を、図10、図11に示す。少なくとも真皮中層までDermabrasionを行うことが原則で、雪状炭酸柱を、剥削した皮膚面に垂直に圧抵する。1回の圧抵は5秒とし、2回繰り返した(図10、図11)。経過を長期みることのできた19歳女性症例(図12)を示す。了承を得て、ここでは顔面の右半分では、前述のDermabrasion+ドライアイスの併用療法を、また、左半分では、Dermabrasion単独による治療を行った(図12)。術後約3ヶ月後で両側頬部に丘疹の再燃がわずかにみられた。しかし再発はあるものの、Dermabrasionとドライアイス圧抵療法を併用した右側頬部の皮疹の再燃は、Dermabrasion単独の左側に比べ、ごく少なく、その効果が持続した。図13は術後10年、また、図14は、術後16年が経過した時点での臨床像である(図13、図14)。

C. 考察および結論

TSCのFacial angiofibromaについても、2008年mTOR阻害剤の有効例が、報告された(Hofbauer GFL. et al; Br J Dermatol 159; 473-475, 2008)。生命を脅かすほどのRenal angiomyolipomaからの大出血のため、両側腎の摘出、腎移植、免疫抑制剤投与を余儀なくされた女性TSC症例において、Rapamycin3-5mg/day投与がなされ、このときFacial

angiofibromaの“劇的な”改善がみられ、しかもその効果が少なくとも9ヶ月間、良好なまま続いた、というものである。ただし、Hypopigmented maculeに対しては影響を及ぼさなかったという。(この論文で論じられているFacial angiofibromaの“劇的な改善”というものが、どの程度のものを指しているか、は、実際の論文中の臨床写真を見てほしい。)RapamycinはVEGFの発現を抑制することも知られている。腫瘍ではhypoxiaのためHIF-1の活性化に伴うVEGFの発現誘導により、腫瘍血管の新生が

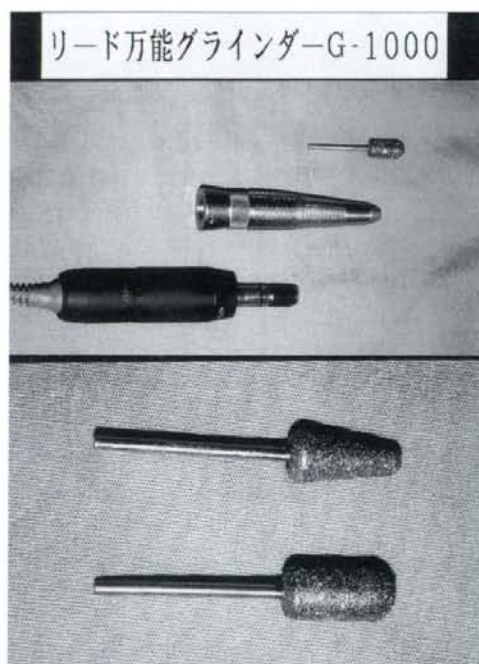


図8 グラインダーとダイヤモンドバー



図7 22歳男性;Dermabrasion単独療法後の再発・新生。術後5年後の臨床像(右端)



図9 雪状炭酸柱（ドライアイス）の準備

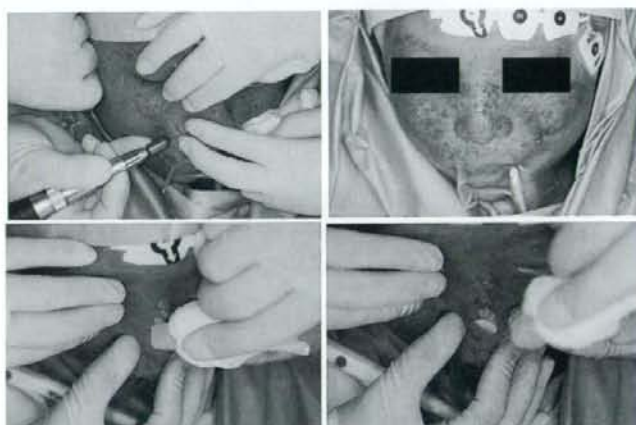


図10 治療の実際（1） Dermabrasion+ドライアイス圧抵併用療法

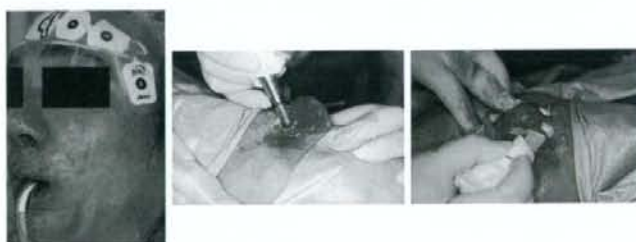


図11 治療の実際（2）



図12 19歳女性の Facial angiofibroma に対する治療。顔面の右半分—Dermabrasion+ドライアイス圧抵。顔面の左半分—Dermabrasion 単独



図13 図12症例の術後10年後の臨床像



図14 図12症例の術後15年後の臨床像. Dermabrasion+ドライアイス併用側(右側)の治療効果がDermabrasion単独側(左側)に勝る

みられるが、Rapamycinの投与により、HIF-1の活性化が抑制され、VEGFの産生が低下、血管新生が阻害されるため、抗腫瘍効果が得られる。本症に対するRapamycinの作用機序はこのことに基づくと考えられる。

現時点で現実的な方法としては、外科的対応が主体となろう。皮膚剥削術、また凍結療法に関しては、欧米から極めて多くの報告がなされているが、本邦でも、詳細な報告が、以前からなされており、その治療後の病理変化についても、この研究班で、詳しく報告がなされてきた。

DermabrasionはFacial angiofibromaの病変部を表面から削り取り、その部位を新しい皮膚組織の修復で置換、治癒に至らしめる方法である。剥削は真皮中層まで行う。治癒後、真皮浅層は結合織に置き換えられているが、目立つ瘢痕はつからない。病勢の盛んなものでは特に早く、またそうでなくとも経時

的に再発・新生を来たすため、繰り返す必要がある。

凍結療法としては、以前から、綿棒法による液体窒素を用いた冷凍凝固術がなされてきた(中内洋一、熊切正信)。中内の方法は同一の丘疹に対し、1回約10秒圧抵、これを5回繰り返すもので、週に1回、計11回施行の後に皮疹が縮小、平坦化したとするものである(神経皮膚症候群調査研究班 昭和62年度研究報告書;33-36)。熊切の方法は1回の治療で5-6箇所、1箇所に関しては5秒間圧抵、10秒間おいて更に5秒間圧抵を行うもので、2-3日後には水疱を形成、痂皮となり、また2-3週間後には平坦化、3-4ヶ月後に、殆ど正常に近い皮膚になるというものである。2ヶ月後にもし効果が不十分であれば、同様のことを繰り返す。この方法では、治療後3ヶ月の組織学的変化として、つぎのことが確認されている。すなわち(もとも

との facial angiofibroma で)増加していた間質の細胞は減少、欠如していた弾力線維は増加、また萎縮していた脂腺はむしろ肥大して、特徴的な facial angiofibroma の組織像が失われるとともに、皮膚付属器と melanocyte は残存、肥厚性瘢痕とは異なる形で修復される(神経皮膚症候群調査研究班 平成3年度研究報告書;106-109)。

今回報告した方法が奏効した機序は、上述の2種類の治療法の、「奏効機序と考えられるもの」の、「単純な総和」とは考えられないだろう。また病勢の盛んなものには繰り返す必要がある点も、同様である。ダイヤモンドバーを用いた Dermabrasion は、1個1個の丘疹に対しての治療ではなく、一度に、facial angiofibroma の形成する、広範な局面に対しての剥削が、可能であり、そのことの利点は大きいと思われる。また、われわれ皮膚科医は、LASER 治療出現以前に、長い間、太田母斑に対して Dry Ice の圧抵療法で治療してきたことから、ここでも液体窒素ではなく使い勝手のよい Dry Ice を選択したのであるが、(cotton tip 法ではまた、創面に凍り付いて付着し、治療に困難があるとも想定される一、)実際に用いたものが液体窒素ではなくて Dry Ice であった、ということも、術後、長い奏効期間を得られたことに、なんらかの関わり

一すなわち人工的な創傷に対する創傷治療に関わる分子機序や、凍結免疫学を通じての、一があるものと、考えられる。

奏効機序を明らかにすることはできないが、Dermabrasion 単独の方法より、遥かに勝る効果が、最長、16年間継続して得られており、本は、Tuberous Sclerosis Complex の Facial angiofibroma に対する、妥当で安全な治療法になるものと考えた。

D. 研究発表

1. 論文発表

著書

倉持 朗 顔の疾患で見つける全身疾患1 結節性硬化症複合 顔の皮膚病最前線(宮地良樹監修) メディカルレビュー社 2009年

2. 学会発表

倉持 朗 結節性硬化症複合の顔面血管線維腫、および神経線維腫症1における神経原性腫瘍に対する外科的対応 第60回日本皮膚科学会西部支部学術大会 ワークショップ2「神経皮膚症候群の基礎と臨床」 2008年10月18日

E. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

色素性乾皮症の現状把握： 患者把握とその解析の調査研究

研究分担者 錦織千佳子 神戸大学大学院医学研究科皮膚科学教授

研究要旨

昨年に引き続き色素性乾皮症（XP）の患者数、相補性群の分布などの現状を把握するための一次調査を行った。昨年報告以降に増えた症例は37名（23施設）であった。平成18年、平成19年をあわせると、全国の研修指定病院皮膚科を訪れたXP全患者数は258名（89施設）、男女比はほぼ1、分布はほぼ全国に散らばっていた。これらの患者対象に詳細な二次調査を実施中である。

今年度は中間群の相補性群の診断に注力し、5例のD群を確定した。日本人のD群は神経症状が軽度であるが、それが遺伝子変異の差によるものの可能性が示された。XPの神経症状を考える上で意義深い。マウスに子宮内エレクトロポレーション法を用いて、マウス *xpa* 遺伝子をノックダウンさせることにより、神経細胞の移動が阻止されることを見出した。XPの神経症状、発症機序との関連性が注目される。

A. 研究目的

昨年度に引き続き、色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum : XP）の正確な患者数とその状況の把握をめざした。今迄診断が後回しになりがちであった中間群の中で、神経症状を伴うXP-D群の診断の確立をめざした。今年、特にXPの神経症状発症の機序について、未だ一定の見解が得られていないので、その解明のためにマウスを用いて *xpa* 遺伝子をノックダウンさせることにより解析を試みた。

B. 研究方法

① XPの現状把握：昨年の全国調査において、XP患者が存在しないと回答した（未回答を含む）皮膚科研修指定病院543施設を対象に、色素性乾皮症患者の有無等についての一次調査を行ない、新たな患者の把握を行なった。調査対象は平成19年1月から12月に当該施設を受診したXP患者である。XP患者有と回答した施設に患者の詳細な症状を把握するための二次調査を実施した。

② 色素性乾皮症中間群診断の確立：D群は教科書的には神経症状を合併するとされているが、欧米と

比較し、本邦では重篤な神経症状を合併することは希である。神経症状の有無は *XPD* 遺伝子の変異部の違いが影響している可能性があり、色素性乾皮症の神経症状の機序を検討する上でも非常に興味深い。そこで、今回、我々は神経症状を伴わない色素性乾皮症D群の日本人3家系5症例を新しく診断確定し、*XPD* 遺伝子解析を行った。診断はXP相補性群の遺伝子を含むプラスミド（XP-プラスミド）を導入し、宿主細胞のDNA修復能の回復をルシフェラーゼアッセイで検出して相補性群を調べるプラスミド宿主細胞回復能試験（Host cell reactivation assay : HCR）により行なった。

③ 個体レベルでXP-Aの神経細胞における機能を解析：子宮内エレクトロポレーション法を用いて、マウス *xpa* 遺伝子をターゲットとしたshRNAiベクターをEGFP遺伝子とともに導入することにより *xpa* ノックダウン神経細胞を可視化し、表現型の解析を行った。

（倫理面への配慮）

一次調査では患者数のみの記載としたので、個人情報などへの配慮は特に行う必要はなかった。一次

調査でXP有と回答した施設に詳細な二次調査を行なうべく、神戸大学医学研究科医学倫理委員会に審査を申請し、承認された。遺伝子検索については神戸大学倫理委員会の承認を得たうえで、患者の同意を文書にて取得したのちに行った。

C. 研究結果

①日本のXP患者の現況：XP患者を有する施設は89施設であった。全患者数は258名で男女比はほぼ1であった。地域的には、北海道5名、東北8名、関東61名、北陸・甲信越8名、東海30名、近畿108名、中国6名、四国8名、九州・沖縄24名であった。関西から西日本にかけて患者数が多い傾向がみられるものの、広範囲の地域に広く散在していることが明らかとなった。

②臨床症状および患者皮膚線維芽細胞を用いた細胞学的検査にて色素性乾皮症D群が疑われた5症例(3家系)に関してXPD遺伝子解析を行った。

男性1例、女性4例。年齢は平成20年11月時点で19～58才であった。症例1と症例2は姉妹、症例4と症例5は姉弟であった。各症例の臨床症状および病歴の詳細は図中に記した(表1)。全症例で両親が血族結婚(いとこ婚)であり、全症例が生後まもなく日光曝露後に水疱形成や著明な紅斑などの光線過敏症状を生じている。いずれの症例も明らかな神経症状は認められず、看護師や学生として健常人と同様に社会的に活動している。MED(最小紅斑量)は33～60mJ/cm²と低下を認めた。

ヌクレオチド除去修復のうちglobal genome repairの指標となるUnscheduled DNA synthesis(UDS)全例健常人の約30%と低下していた。また、コロニー形成能による紫外線致死感受性試験では、健常人とXPA群の中間であり、37%生存率を与えるD0値は健常人:4.8～12.1J/m²、XP-A:0.45-0.56 J/m²に対してXP-D例:1.1～2.1J/m²であった。

XPD遺伝子の解析では(表2)、症例1および2ではexon 22のG2048A(R683Q)の変異とexon 20

の1866-1868塩基の3塩基欠失のheteroの変異を認めた。後者は3塩基欠失のためin-frame shiftとなり、アミノ酸配列は…AVIMFG…から…AVMFG…となり、結果的に1アミノ酸(イソロイシン)の欠落となると考えられた。症例3はエクソン17のA1661G(S541R)のホモあるいはヘミと考えられた。症例4と症例5では、症例1・2と同様のexon 22のA2048Gヘテロ(R683Q)のmutationを認めた。もう一方のalleleのmutationは現在検索中である。

③xpaノックダウン神経細胞の大脳皮質法線方向における移動の解析:xpaノックダウン3日後の胎生期17日目において大脳の組織切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。コントロールでは、多数のGFP陽性細胞が皮質板(Cortical Plate: CP)に到達しているのに対し、xpaをノックダウンしたものでは、ほとんどのGFP陽性細胞が皮質板の脳室側、特に中間帯(Intermediate Zone: IZ)に蓄積しているのが認められた(図1)。

[考察および結論]

日本でのXP患者の現況については二次調査の集計結果をみて解析する。

XP群は欧米では半数近くのXPD症例が中程度から重篤な神経学的異常を合併するのに対し、本邦では重篤な神経症状を伴った症例は報告されていない。今回調べた5症例においてもすべての症例で神経症状は合併していなかった。XPD遺伝子の異常により色素性乾皮症(XP)の他にコケイン症候群(CS)、XP/CSの合併例、Cerebro-Oculo-Facio-Skeletal症候群(COFS症候群)などが生じるが、

表2 XPD遺伝子解析

	allele 1		allele 2	
	cDNA	Amino acid	cDNA	Amino acid
症例1	c2048G>A	R683Q	c1866del3nt	del619
症例2	c2048G>A	R683Q	c1866del3nt	del619
症例3	c1661A>G	S541R	c1661A>G	S541R
症例4	c2048G>A	R683Q		
症例5	c2048G>A	R683Q		

表1 XPD群臨床症状

症例	年齢	光線過敏	MED (mJ/cm ²)	日光部 色素斑	皮膚病				神経症状	UDS(%)
					BCC	AK	SCC	MM		
症例1	58	+	33	+	—	44	96	—	—	27.2
症例2	52	+	ND	+	40	38	—	—	—	37.4
症例3	48	+	40	+	—	—	—	—	—	35.7
症例4	21	+	40	+	19	—	—	—	—	24.8
症例5	19	+	60	+	—	—	—	—	—	30.4

MED: minimum erythema dose
ND: Not Done

BCC: basal cell carcinoma
AK: actinic keratosis (SCC in situ)
SCC: squamous cell carcinoma
MM: malignant melanoma

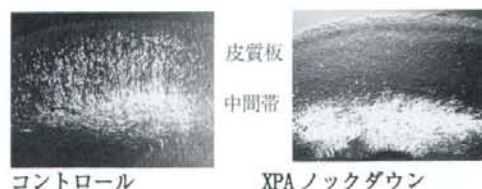


図1. XPAノックダウン神経細胞は中間帯で細胞移動を停止する

これらの疾患と XPD 遺伝子の変異部位にはある程度の疾患特異性があることが示されている。遺伝子解析された XPD 患者 25 症例について神経症状の有無と遺伝子変異部の関連を調べたところ、神経症状を合併する XPD 患者 11 例中 9 例で R683W の変異を認めている。一方、今回の症例でみられた R683Q および S541R の変異をもつ症例は自験例を含めて 7 例報告があるが、1 例で難聴を認めるのみである。R683W の変異は欧米では 25 例中 17 例と高頻度に見られるが本邦では 9 例中 1 例と少なく、この違いが神経症状の合併頻度を反映している可能性がある。今後は症例を集積して日本人の XPD 群の遺伝子変異の傾向を明らかにし、神経症状との関連を調べる。また、遺伝子変異の違いが ERCC2 活性や他の NER に関わる蛋白との相互作用に与える影響について検討する予定である。

xpa ノックダウン神経細胞は中間帯において移動を停止した。今後これらの停止した細胞の神経発生学的な分化マーカー、分裂能などについて検討し、xpa 遺伝子が DNA 修復のみならず神経細胞の移動、分裂、分化に関与している可能性、その神経症状との関連性がないかなどにつき研究を進める予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

- Masaki T, Ono R, Tanioka M, Funasaka Y, Nagano T, Moriwaki S, Nishigori C : Four types of possible founder mutations are responsible for 87% of Japanese patients with Xeroderma pigmentosum variant type. *J Dermatol Sci* 52 : 144-148, 2008.
- Yoshimoto T, Morishima N, Mizuguchi I, Shimizu M, Nagai H, Oniki S, Oka M, Nishigori C, Mizuguchi J : Anti-proliferative activity of IL-27

on melanoma. *J Immunol* 180 : 6527-6535, 2008.

- Tanioka M, Yamada H, Doi M, Bando H, Yamaguchi Y, Nishigori C, Okamura H : Molecular clocks in the mouse skin. *J Invest Dermatol* 2008 Nov 27. [Epub ahead of print]
- Ohtani Y, Harada T, Funasaka Y, Nakao K, Takahara C, Abdel-Daim M, Sakai N, Saito N, Nishigori C, Aiba A : Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for *in vivo* growth of melanoma. *Oncogene* 27, 7162-7170, 2008.
- 錦織千佳子 : II 免疫・アレルギー学的検査法 光線過敏症に対する検査 .MB Derma 印刷中
- 錦織千佳子 : 日本における色素性乾皮症の現況および皮膚科的管理 .医学のあゆみ 印刷中
- 古賀浩嗣, 濱田尚宏, 安元慎一郎, 橋本 隆, 錦織千佳子 : PCR 法と *AlwNI* による制限酵素消化で診断した A 群色素性乾皮症 .皮膚病診療 印刷中

2. 学会発表

- 正木太朗, 小野竜輔, 谷岡未樹, 長野 徹, 船坂陽子, 森脇真一, 錦織千佳子 : 日本人色素性乾皮症バリエーション群における遺伝子変異 .第 30 回日本光医学・光生物学会, 2008.7.11-12

E. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし
- その他
なし

色素性乾皮症の診断に向けた分子細胞生物学的検討

研究分担者 菅澤 薫 神戸大学自然科学系先端融合研究環
バイオシグナル研究センター教授

研究要旨

色素性乾皮症（XP）の遺伝的相補性群のうち、C群とE群の原因遺伝子産物はヌクレオチド除去修復機構においてDNA損傷の認識に関わる重要な因子である。国内におけるこれらXP相補性群の実態把握に寄与する目的で、患者細胞におけるXPC遺伝子の突然変異をDNA塩基配列レベルで同定するためのシステムを構築した。また、E群の簡便な診断法の開発を目指してXPCタンパク質のエピキチン化を指標とした解析を進めている。

菅澤 薫 神戸大学自然科学系先端融合
研究環バイオシグナル研究セ
ンター教授

A. 研究目的

色素性乾皮症（XP）の遺伝的相補性群のうち、ヌクレオチド除去修復の損傷認識段階に欠損を示すC群、E群について、国内患者の変異解析、および簡便な診断法の開発を目指す。XP-C群については欧米を中心に多数の変異が同定されているが、国内の患者については従来報告がなかったため、どのような変異アレルがどの程度の頻度で分布しているのか実態を把握する必要がある。またXP-E群はDNA修復活性の欠損がマイルドであることから、従来の手法ではその同定が容易ではなく、実際よりも患者数が少なく見積もられている可能性がある。我々は紫外線照射によって誘導されるXPCタンパク質のエピキチン化が、XP-E群患者細胞において特異的に欠損していることを見出しており、この現象をE群の診断に応用するための基礎的な研究を進める。

B. 研究方法

細胞融合による遺伝的相補性テストや宿主細胞プラスミド再活性化法により、XP-C群と同定された（あるいはC群が疑われる）国内の患者由来の培養

細胞からゲノムDNAを調製し、XPC遺伝子を構成する16のエクソンとその前後のイントロンの一部を含む領域をそれぞれPCR増幅して、直接シーケンシング法により変異の同定を行った（図1）。また、同じ患者細胞から全RNAを調製し、RT-PCR法によるXPC全長cDNAの増幅と塩基配列の決定、およびリアルタイムRT-PCR法によるXPC mRNAの定量解析を行った。さらに、XP-E群細胞で特異的に見られるXPCタンパク質のエピキチン化欠損についてウエスタンブロット法による解析を進めた。

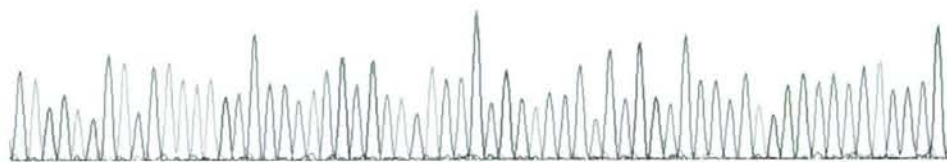
国内のXP患者由来の細胞としては、細胞バンク等から入手可能な樹立細胞株を使用しており、研究倫理面での問題はない。また一部の細胞は神戸大学大学院医学研究科皮膚科の錦織千佳子教授から提供を受けており、研究に使用することに関して患者・家族からの同意を得ている。

C. 研究結果と考察

XP4KA患者由来線維芽細胞のゲノムDNAからXPC遺伝子の各エクソンをPCR増幅、および直接シーケンシングを行ったところ、2番エクソン中に1塩基（T）の挿入が見出された（図2）。この変異により、XPCタンパク質の73番目のアミノ酸でフレームシフトが起こっていることがわかった。このシーケンシング反応において波形の重なりがなかったことから、XP4KA患者はこの変異についてホモ

exon 9

```
3827 3870 3913 3956 3999 4042 4085 4128 4171 4214 4257 4300 4343 4386 4429 4472 4515 4
G A G C A G G A G G A A A A D T G G G T A T G T G T A G A C T G T G C A C G G T G T G G G C C A G C C T C T G A C C T G
325 329 333 337 341 345 349 353 357 361 365 369 373 377 381 385
```



2 base (TG) deletion at position 1748-1749
Val548→Ala frame shift

cDNA

```
58 2100 2142 2184 2226 2268 2310 2352 2394 2436 2478 2520 2562 2604 2646 2688 2730 2772
T T G G T G A G G C T T G G A G A A G T A C C C T A C A A G G A C T G A T G G A T A C A T C G T C T G C G A G G A A T T C
1 173 175 177 179 181 183 185 187 189 191 193 195 197 199 201 203 205 207 209 211 213 215 217 219 221 223 225 227 229 231
```

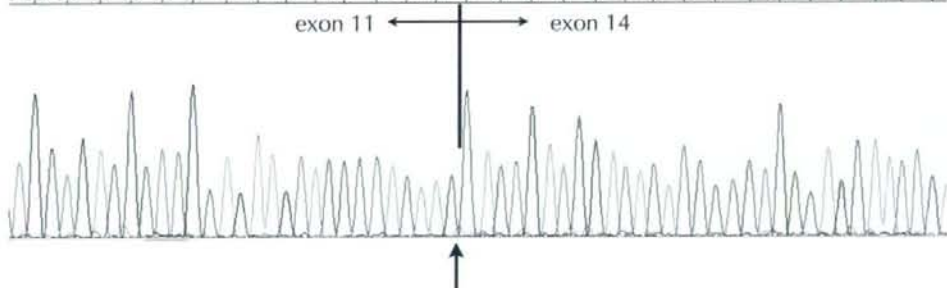


図3 XP3KA 患者細胞から同定された *XPC* 遺伝子の変異

した cDNA についてさらに解析を進めたところ、11 番イントロンの途中から 14 番イントロンの途中まで約 2.2 kbp の欠失があり、これにより cDNA 上では 12 番、13 番エクソンに相当する 305 塩基の欠失、およびフレームシフトが生じていることが明らかになった。すなわち XP3KA 患者は上記二種類の欠失変異を持つ複合ヘテロ接合体であると考えられる。

このように XP-C 群の遺伝子配列レベルでの診断が確立されたところで、神戸大学大学院医学研究科皮膚科の錦織教授より、患者細胞の解析を依頼された。この患者は光線過敏症状を示し、細胞の紫外線感受性や不定期 DNA 合成能から XP が疑われたが、宿主細胞プラスミド再活性化法により XP-C 群であることが示唆された。しかしながら、上記の方法でゲノム DNA、および cDNA の配列を調べたところ、

XPC 遺伝子に変異は見出されなかった。リアルタイム PCR 法によって *XPC* の mRNA は正常に発現していることが確認されたが、ウェスタンブロットの結果から *XPC* タンパク質の発現量は正常に比べて低いように見受けられた。この患者細胞でどのような異常が生じているのか、現在詳しい解析を進めている。

D. 健康危険情報

E. 研究発表

1. 論文発表

Sugasawa, K.: *XPC*: its product and biological roles. in "Molecular Mechanisms of Xeroderma Pigmentosum" (Ahmad, S. I. & Hanaoka, F. eds., Landes Bioscience) pp. 47-56 (2008).

Sugasawa, K.: Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. *Carcinogenesis* 29: 455-465 (2008).

Roche, Y., Zhang, D., Segers-Nolten, G. M. J., Vermeulen, W., Wyman, C., Sugasawa, K., Hoeijmakers, J. H. J., and Otto, C.: Fluorescence correlation spectroscopy of the binding of nucleotide excision repair protein XPC-hHr23B with DNA substrates. *J. Fluoresc.* 18: 987-995 (2008).

2. 学会発表

Sugasawa, K.: Damage recognition mechanism for mammalian nucleotide excision repair. Russian-European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability, St. Petersburg, Russia, June (2008).

Sugasawa, K., Nishi, R., Akagi, J., Tak, Y.-S., Kobayashi, H., and Hanaoka, F.: Molecular mechanisms underlying efficient DNA damage recognition for nucleotide excision repair. The 6th International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair (3R Symposium), Kakegawa, Japan, Oct. (2008).

Sugasawa, K.: Xeroderma pigmentosum proteins and their functions in DNA damage recognition. The

67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Symposium on "DNA Repair Network Deficiency and Carcinogenesis", Nagoya, Japan, Oct. (2008).

菅澤 薫: スクレオチド除去修復における DNA 損傷認識の分子機序. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会 (BMB2008) シンポジウム「ゲノムの安定性と多様化を制御する分子機構」神戸、12 月 (2008).

Nishi, R., Miyake, H., Murakami, K., Kitano, K., Hanaoka, F., and Sugasawa, K.: Centrin 2 enhances in vitro nucleotide excision repair via complex formation with xeroderma pigmentosum group C protein through its C-terminal domain. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会 (BMB2008) 神戸、12 月 (2008).
赤木純一、菅澤 薫: スクレオチド除去における TFIH ヘリカーゼ活性調節機構の解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会 (BMB2008) 神戸、12 月 (2008).

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし

神経皮膚症候群に関する調査研究

研究分担者 森脇真一 大阪医科大学皮膚科准教授

A. 研究目的

色素性乾皮症（XP）は常染色体劣性形式で遺伝する高発癌性光線過敏症である。主としてヌクレオチド除去修復に異常をもつXPは本邦では諸外国に比べて患者の頻度は高く、その内約60%の症例では進行性の神経学的異常が出現するがその原因は不明である。またXPは遺伝的に異なる8群に分類されるが、同じ群でもフェノタイプが異なることが知られている。

本研究の目的はXP神経症状に関する詳細な臨床所見を蓄積し、その分子機構を解明し、治療ストラテジーについてのエビデンスを得ることである。

今回は昨年同様、XP神経障害との関連が推定されている酸化的DNA損傷の修復（塩基除去修復）に注目して研究を行った。

B. 研究方法

近年XP神経症状との関連が示唆されている酸化的DNA損傷の修復能を検出する鋭敏な系を、昨年度レポータープラスミドの宿主細胞回復能を指標にすることで確立した。本研究年度において分担研究者はこのシステムを利用して昨年同様に新しいXP患者由来初代培養線維芽細胞を用いた追加解析を行い、さらにSV40不死化細胞を使用したXP因子導入実験も行った。さらに塩基除去修復に深く関わるDNAグリコシラーゼ、OGG1を欠損したマウス由来細胞を用いて本システムの有用性も検討した。

（倫理面への配慮）

上記の研究は大阪医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査会において承認されている。研究はその審査会の基準を遵守し、患者あるいは家族の文書による同意を得た後に施行し、その場合検体は連結可能コード化して取り扱った。個人情報には十分配慮し、検体の保管も厳重に行った。また一部の細胞はすでに論文などで発表されており本研究者が長

年連結不可能化して保持しているものである。

C. 研究結果

原因不明のXP神経症状との関連が示唆されている酸化的DNA損傷の修復能を細胞レベルで解析する鋭敏なシステムをローズベンガル処理+可視光線（キセノンランプ）照射したルシフェラーゼ発現ベクター含有のレポータープラスミドを細胞に遺伝子導入することで確立したが、この有用性をOGG1ノックアウトマウス由来細胞にて確認できた。さらに重篤なXP神経症状が必発するXPA細胞では酸化的DNA損傷（主として8オキシグアニン）に対する修復能が有意に低下しているという所見を確認し、この低下がXP重症度と関連し、XPA因子導入で回復するという現象を観察した。他群XP細胞でも修復能が低下する症例（13/22）がみられたが、XP症状との関連性は見いだせなかった。

今回の結果は、神経症状の有無・重症度などXP臨床症状の多様性に塩基除去修復が関与していること、またヌクレオチド除去修復において重要な役割を果たしているXPA因子が塩基除去修復にも関わっている可能性を示唆する。

D. 健康危険情報

省略

E. 研究発表

E-1 論文発表

英文

- (1) Moriwaki S, Takahashi Y. Photoaging and DNA repair. *J Derm Sci* 50: 169-76, 2008
- (2) Saito Y, Toyoshima M, Okai A, Shuo L, Moriwaki S, Yamamoto O, Kanzaki S, Hanaki K, Ninomiya H, Nanba E, Kondo A, Maegaki Y, Ohno K. Mental retardation, spasticity, basal

ganglia calcification, cerebral white matter lesions, multiple endocrine defects, telangiectasia and atrophic skin: A new syndrome? *Brain & Development* 30 : 221-5, 2008

- (3) Masaki T, Ono r, Nagano T, Funasaka Y, Tanioka M, Moriwaki S, Nishigori C Four types of possible founder mutations are responsible for 87% of Japanese patients with xeroderma pigmentosum variant type *J Derm Sci* 52 : 144-8, 2008
- (4) Konishi A, Sakai R, Ohta M, Fujii H, Moriwaki S, Horiguchi Y Multiple basal cell carcinomas on the lateral neck linearly arranged along the lines of Blaschko occurring 50 years after X-ray radiation therapy for lymphadenitis coli tuberculosa *J Dermatol* 35 : 680-682 ,2008
- (5) Utako Otsu, Shinichi Moriwaki, Mariko Iki, Kenichi Nozaki, Yuji Horiguchi, Kimihiro Kiyokane Early blistering, poikiloderma, hypohidrosis, alopecia and exocrine pancreatic hypofunction: A peculiar variant of Rothmund-Thomson syndrome? *Eur J Dermatol* 2008 Oct.27[Epub ahead of print]

邦文

- (1) 森脇真一、川又里美、小谷麻由美、藤田晃人 赤色 LED の正常ヒト線維芽細胞に及ぼす影響 *日本美容皮膚科学会誌* 18 : 30-34, 2008
- (2) 塚原孝子、旗持 淳、濱崎洋一郎、山崎?次、森脇真一 右内顎に有棘細胞癌を伴った色素性乾皮掌 D 群の 1 例 *臨床皮膚* 62 : 270-72, 2008
- (3) 中井大介、中村直美、井上和之、益田浩司、竹中秀也、加藤則人、岸本三郎、森脇真一 基底細胞癌と有棘細胞癌を生じた色素性乾皮症バリエーションの 1 例 *臨床皮膚* 62 : 527-29, 2008
- (4) 森脇真一、高城倫子 遺伝性光線過敏症 紫外線と皮膚 update *Monthly Derma*, 138; 17-24 2008
- (5) 森脇真一 光線過敏症のスキンケア スキンケア最前線 *皮膚科診療最前線シリーズ* メディカルレビュー社 224-225. 2008
- (6) 森脇真一 DNA 損傷と修復「1冊でわかる光皮膚科」皮膚科サブスペシャリティーシリーズ (1) 48-51 2008 文光堂
- (7) 森脇真一 防御グッズ「1冊でわかる光皮膚科」皮膚科サブスペシャリティーシリーズ (1) 99-100 2008 文光堂
- (8) 森脇真一 色素性乾皮症「1冊でわかる光皮膚科」皮膚科サブスペシャリティーシリーズ (1) 114-116 2008 文光堂
- (9) 森脇真一 コケイン症候群、トリコチオディストロフィ「1冊でわかる光皮膚科」皮膚科サブスペシャリティーシリーズ (1) 117-118 2008 文光堂
- (10) 森脇真一 色素性乾皮症などの遺伝子検索はどこに誰に頼むか? 「1冊でわかる光皮膚科」皮膚科サブスペシャリティーシリーズ (1) 121-123 2008 文光堂
- (11) 森脇真一、川又里美、小谷麻由美、藤田晃人、平野 達 赤色 LED (Light emitting diode) の正常ヒト線維芽細胞に及ぼす影響 *日本美容皮膚科学会* 18;30-33, 2008
- (12) 森脇真一 小児に光線過敏症を見たら何を考える *Topics in Atopy* (タイユ社) 7; 19-23 2008
- (13) 森脇真一 異常な日焼けから光線過敏症を見つけるには? 小児の皮膚トラブル FAQ (診断と治療社) p208-210, 2008
- (14) 森脇真一 色素性乾皮症・コケイン症候群の分子細胞診断 医学のあゆみ (医歯薬出版) 228:128-132, 2009
- (15) 森脇真一 ポルフィリン症 皮膚疾患最新の治療 2009-2010, p146, 2009
- (16) 森脇真一 色素性乾皮症 「顔の皮膚病最前線」皮膚科最前線シリーズ (メディカルビュー社) 印刷中
- (17) 森脇真一 遮光の指導はどうする? 「顔の皮膚病最前線」皮膚科最前線シリーズ (メディカルビュー社) 印刷中
- (18) 森脇真一 光線過敏症 皮膚疾患診療実践ガイド (文光堂) 印刷中
- (19) 森脇真一 放射線皮膚障害 皮膚疾患診療実践ガイド (文光堂) 印刷中
- (20) 森脇真一 色素性乾皮症 皮膚科セミナーウム 日皮会誌、印刷中
- (21) 森脇真一 色素性乾皮症 眼でみる遺伝病のターナー症候群 *メディアアート* 印刷中

E-2 学会発表

国際学会

- (1) Moriwaki S, Kiyohara T, Hirata Y, Takahashi Y, Inoue M, Kiyokane K Decreased repair of singlet oxygen-induced DNA damage in