

## E. 研究発表

### 論文発表

Ishii K, Zaito M, Yonemitsu N, Kan Y, Hamasaki Y, Matsuo M. 5-lipoxygenase pathway promotes cell proliferation in human glioma cell lines. Clin Neuro-pathol (2009) 28: 445-452

### 学会発表

松尾宗明、佐々木和也、石井清久. 神経線維腫症 2 型における COX-2 阻害薬の腫瘍抑制効果. 第 49 回日本小児神経学会総会. 2007.7.6. 大阪。

## E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 神経線維腫症Ⅱ型症例の方針決定までの プロセスに関する研究

研究分担者 原 晃 筑波大学大学院人間総合科学研究科教授

### 研究要旨

神経線維腫症Ⅱ型の治療方針決定までのプロセスを一側性聴神経腫瘍症例と比較検討した。神経線維腫症Ⅱ型では、より聴力温存に重きをおいて判断されていた。いずれの方針でも聴力温存は容易ではないが、それ故一側性聴神経腫瘍以上に、本人が納得し治療方針を決断できるまで時間をかけることが重要と考えられた。

### A. 研究目的

聴神経腫瘍（VS）の治療方針については①wait and scan、②摘出術、③放射線治療の3者が考えられる。しかし、個々の症例についての最善策がその内のいずれであるかは意見の分かれるところである。腫瘍径、年齢、全身状態等により、治療の選択肢は限られるが、画一的には決められない。当院における治療方針決定までのプロセスを一側性VSと神経線維腫症Ⅱ型（NF2）症例において検討し、NF2症例へ求められる対応を考察する。

### B. 研究方法

2000年4月から2010年3月までに当院を受診した一側性VS症例59例、並びに、1988年4月から2010年3月までに受診したNF2症例11例について、治療方針決定までのプロセスをretrospectiveに比較検討した。

（倫理面への配慮）

データは全て匿名とし、個人のプライバシーに十分配慮した。

### C. 研究結果

一側性VSについては、他の全身疾患合併のために手術適応から外れた3例を除くと、初診時の腫瘍径によって基本的な治療方針が分かれ、更に、経過観察時の腫瘍増大速度によって積極的な治療を行う判断がなされていた。診断時に有効聴力が認められ

た32例32耳中、経過観察によって難聴が50dB以上に進行した症例は4例認められた。

NF2症例では、原則としてより腫瘍径の大きい、聴力レベルの悪い方を先に治療していることが確認されたが、治療のタイミングは症例によって様々であった。21耳中4耳では初診時に既に高度難聴であった。聴力が残存していた17耳中、10耳においては難聴進行までは治療を希望されず、その内、経過観察中に高度難聴に至った症例が4耳認められた。7耳では有効聴力残存時に手術あるいは放射線の治療が施行された。有効聴力残存時に治療施行された症例においても、聴力悪化例が、手術：5耳中3耳、放射線治療：4耳中2耳と認められた。現在までの経過で11例21耳中、10例12耳が高度難聴、3例4耳が中等度難聴に至り、有効聴力残存症例は5例5耳であった。

### D. 考察

NF2の治療方針は、より聴力温存に重きをおいて判断されていた。いずれの方針でも聴力温存が容易ではない現状ではあるが、それ故、一側性VS以上に、本人が納得して治療方針を決断できるまで時間をかけることが重要と考えられた。

### E. 結論

いずれの方針でも聴力温存が容易ではないが、それ故、一側性VS以上に、本人が納得して治療方針

を判断できるまで時間をかけることが重要と考えられた。

## **G. 研究発表**

### 1. 論文発表

耳鼻咽喉科臨床に投稿予定

### 2. 学会発表

平成 22 年聴神経腫瘍研究会にて発表

## **H. 知的財産権の出願・登録状況**

特になし。

# 1. 色素性乾皮症の皮膚症状の診断と診療の 標準化のためのアンケート調査

## 2. XP-A 細胞のアミノグリコシド系薬剤による XPA 蛋白発現と機能回復への試み

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

平成 19-20 年に実施した色素性乾皮症（XP）の一次調査によって把握できた患者の二次調査を行なった。平成 19 年、平成 20 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 259 名（92 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した。約半数が A 群患者で、25%が V 群という分布は従来の報告と一致した。A 群の生存年数は長くなっている。ゲンタマイシンによる read through による XPA 蛋白の回復を明らかにした。

### A. 研究目的

①平成 19 年度から実施している色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum: XP）の一次調査を引き続き行なった。18 年度と 19 年度までの一次調査と二次調査が完了しているので本年度は引き続き、平成 20 年、21 年の一次調査を行ない、患者数の推移とその状況の把握をめざした。

②アミノグリコシド系の薬剤は nonsense mediated decay を抑制することが知られているので、色素性乾皮症の治療をめざして、XP-A 細胞に同薬剤を処理し、read through による XPA 蛋白の発現の回復、紫外線照射後の生存率の回復等を指標として治療への応用を検討した。

### B. 研究方法

①XP の現況把握: 平成 20 年、21 年に全国の皮膚科研修指定病院皮膚科研修指定病院 609 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実施し、新たな患者の把握を行なった。調査対象は平成 20 年 1 月から 12 月、平成 21 年 1 月から 12 月に当該施設を受診した XP 患者である。

診療ガイドライン作成のために必要な神経症状の対応を考案するため、平成 21 年度に行った二次調

査の解析を引き続き行なったが、神経内科医あるいは小児神経科の医師による詳細な神経学的検査の回答例が少なかったため、本院に通院する XP-A 群の患者を対象に日常生活での機能障がい程度などについてアンケート調査を行なった。

②read through を利用した XPA 群の治療への試み: ゲンタマイシンは non-sense mediated decay を抑制し、ノンセンス変異の部位を read through することが知られている。そこで、XPA 線維芽細胞（YKMT: IVN3G →C）にゲンタマイシンを処理して XPA 蛋白の発現が回復するかをみた。XP12RO（SV）（c.619,T; R207X）を用いて同様にゲンタマイシン 6 日間処理後紫外線照射を行ない、コロニー形成率を指標に紫外線致死感受性をみた。

（倫理面への配慮）

二次調査を行なう方法については、連結可能匿名化を行なって実施する手法をとっており、神戸大学医学研究科医学倫理委員会に審査を申請し、承認済みである。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なった。

### 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60施設であった。当該医療機関を受診した患者数は平成20年は217名、平成21年は225名で男女比(103:114)、(111:114)とほぼ1であった。

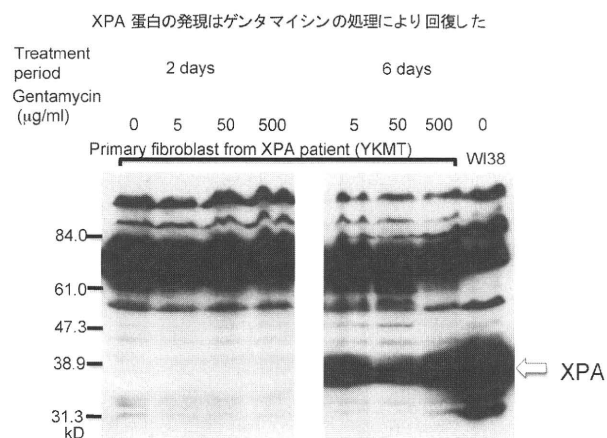
二次調査の解析では、患者の年齢分布は0歳から90歳まで広く分布しているが、11-20歳が50名で最も多く、A群の患者がその多くを占める。A群の患者は11-20歳をピークに0歳から40歳までに分布している。A群と診断が確定している患者について診断に至った年齢は平均20.89歳であった。

神経内科医あるいは小児神経科の医師による詳細な神経学的検査が全て行なわれた症例16例(1歳6ヶ月から19歳)について検討した。1歳から2歳で知能発育遅延を認めている。特に言語発達の遅れとして現れる事が多いようである、一方で、眼振・眼球の動きの異常などの眼科的所見は全例で見られなかった。聴力低下は今回の調査では不明と回答された例が殆どであった。知能発育低下があり、通常の聴力検査では正確な聴力を把握するのは難しいようである。聴力障害はXPの神経症状のうちでも比較的早く始まるので、今後はABRで解析する必要があるとそうである。腱反射の低下、病的反射の出現は略全例で見られていた。筋緊張、筋力低下、不随意運動の出現はさほど見られていないが、小脳失調が比較的低年齢から見られた。1歳半で不安定歩行が見られた例がある一方で10歳で小脳失調が見られていない例もあった。また、年齢が進むと感覚障害も見られる事が明らかとなった。

患者に対してアンケート調査の結果では、11歳頃から食事中にむせたりする事が多くなり、19歳から21歳の間にPEGの造設を行なっている。十代後半では自立歩行が難しくなり、早い者で16歳、遅くても19歳で車椅子の生活となっている。アキレス腱短縮術、PEGの造節、喉頭気管分離術、皮膚癌切除などのために全身麻酔、入院による臥床が長引くと、入院前に行なっていた生活動作が行なえなくなったとの指摘が多かった。入院期間の短縮と獲得した機能の維持の方策の確立が重要と思われる。

以前のデータと比べるとA群患者への遮光指導が徹底し、低年齢層のA群における皮膚癌発症は減っているものの、今日でも、皮膚癌を発症しているA群症例が少なからずいる。とくに、現在20歳前後で、診断が12ヶ月を過ぎてなされた症例は、皮膚癌発症の頻度が高いようである。

②XPA細胞(IVN3G→C)にゲンタマイシンを6



図

日間処理することにより、XPA蛋白が回復した。XP12(RO)SV細胞を用いて、ゲンタシン5µg、6日処理後のコロニー形成法による紫外線致死感受性を見たところ、ゲンタシン処理群において生存率の回復がみられた(図)。

### D. E. 考察と結論

①以前のXPの統計と比較すると、A群の患者の寿命が延びているだけに、患者の能力に応じた適切な生活指導が必要である。XPの認知度は以前と比べると高まっているが、未だに1歳を過ぎてから診断される症例が多い。確定診断後遮光が徹底されるので、診断される時期によって皮膚癌の発症率が大きく異なる事を考えると、どこに住居しても的確な診断が迅速になされる必要を感じる。特にA群患者にとって生後1年から2年の間の日光曝露が生涯の皮膚癌発症に大きく関わる事、そして、10代の終わり近くになって生じた皮膚癌治療のために入院する際に臥床のために神経症状が急速に衰える事を考えると、皮膚癌の予防が神経症状との関連においても重要である事を再認識させられた。

神経症状については変異の部位によって異なる事も知られているので、今後の解析には遺伝子変異も加味した解析が必要かと思われる。

②今後、変異の種類による蛋白発現ならびに生存率の回復の差があるかを確認し、回復を誘導するのに最適な条件を見つけ、XP患者の治療につなげたい。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Oka M, Edamatsu H, Kunisada M, Hu L, Takenaka

- N, Sakaguchi M, Kataoka T, Nishigori C: Phospholipase C $\epsilon$ ; plays a crucial role in ultraviolet B-induced neutrophil-associated skin inflammation by regulating the expression of CXCL1/KC. Laboratory Investigation, in press
2. Bito T, Sumita N, Masaki T, Shirakawa T, Ueda M, Yoshiki R, Tokura Y, Nishigori C: Ultraviolet light induces Stat3 activation in human keratinocytes and fibroblasts through reactive oxygen species and DNA damage. *Exp Dermatol*: 19 : 654-660, 2010.
  3. Sreevidya CS, Fukunaga A, Khaskhely NM, Masaki T, Ono R, Nishigori C, Ullrich SE : Agents that reverse UV-Induced immune suppression and photocarcinogenesis affect DNA repair. *J Invest Dermatol*: 130: 1428-1437, 2010.
  4. Fukunaga A, Khaskhely NM, Ma Y, Sreevidya CS, Taguchi K, Nishigori C, Ullrich SE: Langerhans Cells Serve as Immunoregulatory Cells by Activating NKT Cells. *J Immunol* 185: 4633-4640, 2010.
  5. Abdel-Daim M, Funasaka Y, Kamo T, Ooe M, Matsunaka H, Yanagita E, Itoh T, Nishigori C: Effect of chemical peeling on photo- carcinogenesis. *J Dermatol* 37: 864-872, 2010.
  6. Oka M, Edamatsu H, Kunisada M, Hu L, Takenaka N, Dien S, Sakaguchi M, Kitazawa R, Norose K, Kataoka T, Nishigori C: Enhancement of ultraviolet B-induced skin tumor development in phospholipase C $\epsilon$  knockout mice is associated with decreased cell death. *Carcinogenesis* 31: 1897-1902, 2010.
  7. 国定 充、錦織千佳子：ナローバンド UVB と皮膚発癌。 *Monthly Book Derma*: 172: 51-55, 2010.
2. 学会発表
1. Dien S, Taguchi K, Fukunaga A, Nishigori C : Best timing of topical application of DNA repair enzyme to obtain both reduction of cyclobutane pyrimidine dimers and sustaining immune suppression sgirt Narrow Band UVB exposure. *American Society for Photobiology* 2010. 2010.6.11-16
  2. Taguchi K, Fukunaga A, Ogura K, Nishigori C: Cellular mechanism in narrowband UVB-induced immunosuppression. *14th International Congress of Immunology*. 2010.8.22-27
  3. Funasaka Y, Mohamed AD, Harada T, Aiba A, Kawana S, Nishigori C: Signals involved in oncogenic activities of metabotropic glutamate receptor 1. *16th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research*. 2010.9.4-7
  4. Takeuchi S, Sato M, Nishigori C: Aberrant migration in the XPA-lacking cells. *Workshop on xeroderma pigmentosum and other diseases of human premature aging and DNA repair: molecules to patients*. 2010.9.21-24
  5. Ono R, Masaki T, Takeuchi S, Tanioka M, Nishitani N, Shimizu A, Kambe N, Matsue H, Kamide R, Nishigori C: Three cases of xeroderma pigmentosum variant group (XP-V) genetically diagnosed in their childhood before developing skin cancers. *Workshop on xeroderma pigmentosum and other diseases of human premature aging and DNA repair: molecules to patients*. 2010.9.21-24
  6. Ogura K, Fukunaga A, Oniki S, Nagai H, Okazawa H, Matozaki T, Nishigori C, Horikawa T: Rho kinase pathway regulates contact hypersensitivity response by regulating DC migration through SHPS-1. *日本研究皮膚科学会第 35 回年次学術大会・総会* 2010.12.3-5
  7. Taguchi K, Fukunaga A, Ogura K, Nishigori C: The role of cutaneous dendritic cells in narrow-band UVB-induced immunosuppression. *日本研究皮膚科学会第 35 回年次学術大会・総会* 2010.12.3-5
  8. 錦織千佳子：紫外線発癌とその予防－パラダイムシフト－. *第 109 回日本皮膚科学会総会* 2010. 4.16-18
  9. 小野竜輔、正木太朗、竹内聖二、上出良一、錦織千佳子：スプライス異常の複合ヘテロ変異で POLH 蛋白の発現が弱く認められた色素性乾皮症バリエーション群の 1 例. *第 32 回日本光医学・光生物学会* 2010.7.30-31
  10. 錦織千佳子：光線過敏症up-to-date. *第 61 回日本皮膚科学会中部支部総会* 2010. 9.11-12

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 神経皮膚症候群に関する研究

研究分担者 森脇真一 大阪医科大学皮膚科教授

### 研究要旨

色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum; XP）は常染色体劣性形式で遺伝する高発がん性光線過敏症であり、本邦で過半数を占める XPA 群患者では 50% に原因不明、進行性の精神運動発達障害が出現するためしばしば遺伝医療での対象となる。本邦 XPA 群患者では創始者効果を思わせる共通の遺伝子変異（IVS3-1G > C）がホモ（79%）、ヘテロ（17%）にみられ、この変異は PCR 制限酵素（*AlwNI*、*HphI*）断片長変化により容易に検出できる。このことは日本人 XPA 患者に限り、簡易迅速に XPA の確定診断、保因者診断、出生前診断が可能であることを示唆する。これまで研究分担者は本年度に解析した 2 家系、2 例を含み XPA9 家系、10 例の XP 出生前診断を試みた。その結果 2 例が野生型、2 例が XPA、6 例が XPA 保因者であることが出生前に判明した。出生後の再チェックでも全く同様の所見を得た。この結果はメンデルの法則にほぼ一致するものである。今回の出生前診断施行 10 症例中 1 例は子宮内胎児死亡、1 例は人工妊娠中絶術が施行された。

### A. 研究目的

研究分担者が長年行っている色素性乾皮症（XP）の遺伝医療を行う上で必要不可欠である出生前診断に関して、診断システムの確立、検証を行った。なお分担研究者の施設での出生前診断の対象は XP の最重症型である XPA のみである。

### B. 研究方法

確定診断されたプロバンドの遺伝子変異を再度確認したのちに、プロバンドの両親の出生前診断に対する理解と意志の確認を行い、大阪医科大学で承認された様式を使用して文書によるインフォームドコンセントを取得した。次いで両親が XPA 保因者であることを遺伝子検査にて確認した。妊娠 13～15 週時に妊婦（プロバンドの母親）から羊水を 9ml 採取し、羊水（4.5ml）中の浮遊細胞を用いて遺伝子検査を施行した。同時に残りの羊水を用いて羊水細胞の初代培養を行い、培養羊水細胞を用いた紫外線感受性試験と再度の遺伝子解析により胎児が XP であるかどうかを判定した。最後に胎児が出生した後に出生前確定診断が正しかったかどうかの検討（出生

後診断）も行った。なお XPA 遺伝子解析は遺伝子変異に強い創始者効果（IV3-1G > C）（図）のある本邦でのみ可能な PCR 制限酵素（*AlwNI*）断片長変化により検出した。

（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。またコントロール細胞など一部の細胞はすでに論文などで発表

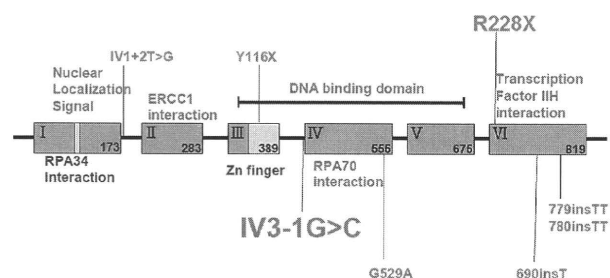


図 本邦 XPA 患者における XPA 遺伝子変異の種類と部位

表 XPA 出生前診断の実際

case No.	Age of father (yr)	Age of mother (yr)	Age of proband at visit (yr)	XPA mutation in proband	sample taken for analysis (weeks of pregnancy)	result of prenatal analysis (final diagnosis and course)
1	32	30	XPA (first child 3yr)	IVS3-19-C homozygus	CV (16wk)	IVS3-19-C heterozygus
2	41	37	three XPA children (11.7, 2yr)	IVS3-19-C homozygus	AF (15wk)	IVS3-19-C (XPA carrier, fetus undetectable)
3	35	33	XPA (second child 2yr)	IVS3-19-C homozygus	AF (15wk)	IVS3-19-C heterozygus (XPA carrier, born)
4	35	33	XPA (first child 3yr)	IVS3-19-C homozygus	AF (14wk)	no mutation (wild type, born)
5	35	32	XPA (first child 3yr)	IVS3-19-C homozygus	AF (14wk)	IVS3-19-C heterozygus (XPA carrier, born)
6	34	31	XPA (first child 3yr)	IVS3-19-C homozygus	AF (14wk)	no mutation (wild type, born)
7#	33	32	XPA (first child 2yr)	IVS3-19-C homozygus	AF (14wk)	IVS3-19-C heterozygus (XPA carrier, born)
8	34	29	XPA (first child 1yr)	IVS3-19-C homozygus	AF (15wk)	IVS3-19-C heterozygus (XPA carrier, born)
9#	35	35	XPA (first child 5yr)	IVS3-19-C homozygus	AF (15wk)	IVS3-19-C heterozygus (XPA carrier, born)

yr: year old  
CV: chorionic villi  
AF: amniocentesis fluid  
#: same family

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

研究分担者が過去に確定診断した XPA 患者を患児にもつ9家系、10例の XP 出生前診断を試みた(うち2家系、2症例は本年度に施行)(表)。その結果2例が野生型、2例が XPA, 6例が XPA 保因者であることが出生前に判明した。出生後の再チェックでも全く同様の所見を得た。この結果はメンデルの法則にほぼ一致するものである。今回の出生前診断施行10症例中1例は子宮内胎児死亡、1例は人工妊娠中絶術が施行された。

### D. 健康危険情報

なし

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) 森脇真一 皮膚科領域の遺伝医療 臨床講義 皮膚科の臨床 52:351-358、2010
- (2) Moriwaki S Ten Years of Clinical and Laboratory Work on Xeroderma Pigmentosum. Bulletin of the Osaka Medical College 56; 1-7, 2010
- (3) 森脇真一 色素性乾皮症 看護大辞典第二版、医学書院
- (4) 森脇真一 色素性乾皮症を疑ったらまずどんな検査をするか What's new in 皮膚科学 2010-2011 p196-197, 2010 (メディカルビュー社)
- (5) 森脇真一 色素性乾皮症 皮膚科セミナー ウム 日本皮膚科学会雑誌 120:1861-1867、2010
- (6) 森脇真一 色素性乾皮症 からだと光の事典 p171-175、2010 (朝倉書店)
- (7) 森脇真一 色素性乾皮症 小児科臨床ピクシス p64-65、2010 (中山書店)
- (8) 森脇真一 色素性乾皮症 子どもの皮膚疾患の診かた 小児科 51:670-671、2010 (金原出版)

- (9) 森脇真一 色素性乾皮症 日本小児皮膚科学会雑誌、29:1-5、2010
  - (10) Takahashi Y, Endo Y, Sugiyama Y, Inoue S, Iijima M, Tomita Y, Kuru S, Takigawa M, Moriwaki S Novel XPA Gene Mutations Resulting in Subtle Truncation of Protein in Xeroderma Pigmentosum Group A Patients with Mild Skin Symptoms. J Invest Dermatol 130:2481-8, 2010
  - (11) 森脇真一 光線過敏症 日本皮膚科学会平成22年度中部支部企画研修講習会テキスト
  - (12) 森脇真一 高齢者の光線過敏症をみたら? 高齢者の皮膚トラブル FAQ (診断と治療社) p94-97、2011
  - (13) Hirata Y, Koga S, Fukui N, Yu A, Koshida S, Kosaka Y, Moriwaki S 5-Aminolevulinic acid (ALA) - mediated photodynamic therapy to superficial malignant skin tumors using Super Lizer™ J Dermatology, in press.
  - (14) Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, Oh K-S, Imoto K, Inui H, Moriwaki S, Emmert S, Pike KM, Raziuddin A, Plona T, DiGiovanna JJ, Tucker MA, Kraemer KH CANCER AND NEUROLOGIC DEGENERATION IN XERODERMA PIGMENTOSUM: LONG TERM FOLLOW-UP CHARACTERIZES THE ROLE OF DNA REPAIR J Med Genet, in press
  - (15) 森脇真一 色素性乾皮症 皮膚疾患 最新の治療 2011-2012 南江堂、印刷中
  - (16) 森脇真一 遺伝性光線過敏症の分子診断と患者ケア 日本皮膚科学会雑誌 学術大会号 120:2582-2583、2010
  - (17) 森脇真一 皮膚疾患と看護 小児臨床看護学各論 小児看護学(改訂12版) p415-425 医学書院 2011
- #### 2. 学会発表
- (1) 森脇真一 色素性乾皮症の病態と日常生活での注意点 色素性乾皮症患者家族の集い(岡山皮膚難病支援ネットワーク)平成22年2月6日(岡山)
  - (2) 森脇真一 光環境と皮膚～色素性乾皮症と向き合って～第15回京都皮膚科治療フォーラム 平成22年3月18日(京都)
  - (3) 中西伸夫, 森脇真一 UVs 症候群は late onset のコケイン症候群に移行する? 第39回 UV-ABCclub 平成22年3月20日(京都)
  - (4) 森脇真一 遺伝性光線過敏症の分子診断と患



- 者ケア 教育講演 第109回日本皮膚科学会  
総会 平成22年4月17日(大阪)
- (5) 森脇真一 「色素性乾皮症を知ろう」 市民公  
開講座 第32回光医学・光生物学会 平成22  
年8月1日(東京)
- (6) 森脇真一 光線過敏症：基礎から最新の知見  
まで 日本皮膚科学会平成22年度中部支部企  
画研修講習会 平成22年9月10日(大阪)
- (7) Moriwaki S Experience of laboratory diagnosis of  
XP, CS and TTD in Japan XERODERMA PIG-  
MENTOSUM AND OTHER DISEASES OF HU-  
MAN PREMATURE AGING AND DNA RE-  
PAIR: MOLECULES TO PATIENTS2010.9.21-24  
(Lansdowne, VA)
- (8) 森脇真一 CSの遺伝と診断 CSの集い2010  
平成22年10月30日(東京)
- (9) 森脇真一 CS患者とともに20年 CSの集い  
2010 平成22年10月31日(東京)
- (10) Moriwaki S, Sakai Y, Nakanishi N, Nakamura S,  
Takahashi M, Toda K Progression of UV sensitive  
syndrome to adult onset Cockayne syndrome in a  
patient with CSB mutations 第35回日本研究皮  
膚科学会 平成22年12月3日(和歌山)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 神経皮膚症候群に関する調査研究 色素性乾皮症の神経障害に関する臨床神経病理学的研究

研究分担者 林 雅晴 東京都神経科学総合研究所神経発達・再生

### 研究要旨

A 群 XP 患者 (XP-A) 剖検例の大脳基底核において、calcineurin 陽性投射神経の残存、dopamine receptor 2 表出を確認し、臨床的に推定されるドーパミン神経受容体の過感受性による錐体外路症状発現の可能性を考察した。一方、少数例での予備的ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) 解析により、以前報告した XP-A 剖検例脳幹でのドーパミン・セロトニン神経細胞の減少と合致する形で、XP-A 患者髄液中でのドーパミン・セロトニン代謝物の低下を明らかにした。

### A. 研究目的

A 群 XP 患者 (XP-A) 脳では黒質から大脳基底核へのドーパミン神経入力障害が、大型介在神経も脱落するが、小型の神経細胞、淡蒼球の神経ペプチド表出は保たれることを報告した (J Neuropathol Exp Neurol 2004; 63: 1048-57)。また、ドーパミン神経受容体の過感受性が喉頭ジストニア、手指振戦などを惹起する可能性を指摘した。さらに年長 XP-A 患者の呼吸障害の原因となる喉頭ジストニアに対してドーパミン神経受容体を訓化する少量レボドパ療法 (0.3~1.5 mg/kg/日) を試み、呼吸障害、声帯運動、手指振戦の改善を確認した (Brain Dev 2010; 32: 685-7)。今回、XP-A 剖検脳での残存神経細胞に関する検討と、患者髄液中でのガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) を用いた予備的解析を行った。

### B. 研究方法

1) XP-A5 剖検例 (19~26 歳) と対照 4 例 (9~74 歳) の大脳基底核・中脳連続切片において、dopamine receptor 2 と投射神経細胞のマーカーである calcineurin の表出を免疫組織化学的に検討した。2) XP-D 患者 (13 歳)、XP-A 患者 (7 歳、18 歳、20 歳) の髄液において、GCMS を用いてドーパミン・セロトニンの主たる代謝物 homovanillic acid (HVA)・5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) なら

びにアミノ酸を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は東京都神経研と協力医療機関の倫理委員会から承認されている。生体資料・剖検脳の収集ならびに患者の治療にあたっては十分な説明の上での書面による同意を患者家族から受けている。

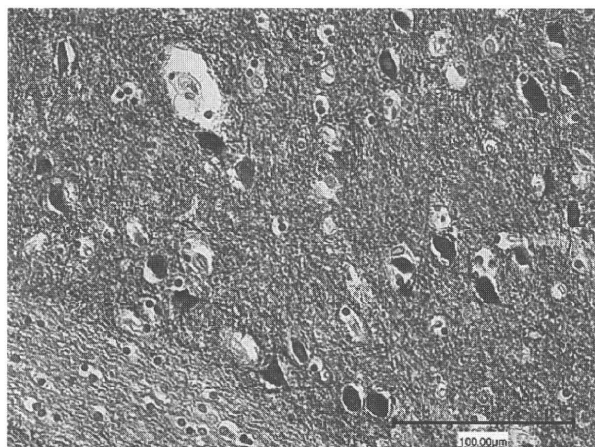
### C. 研究結果

1) 5 例全例で、大脳基底核 (被殻) の残存小型神経細胞が dopamine receptor 2 と calcineurin を表出し、一方、黒質では neuropil が calcineurin で濃染し、残存神経細胞が dopamine receptor 2 を表出していた (図 1)。2) XP-A 患者優位に、髄液中 HVA・5-HIAA 値が高度に低下していた。GABA・グルタミン酸などの濃度は比較的保たれていた (表 1)。

### D. 考察

XP-A 患者の大脳基底核では、投射神経、GABA 作動性介在神経が推定される小型神経細胞の密度が保たれていることを報告した。今回、calcineurin 陽性 medium-sized spiny neuron 投射神経細胞が残存していることを確認できた。さらに小型神経細胞での dopamine receptor 2 表出も同定され、臨床的に推定されるドーパミン神経受容体過感受性との関連が示唆された。我々は以前、XP-A 脳幹でのドーパ

## A. Calcinerin 染色



## B. Dopamine receptor 2 染色

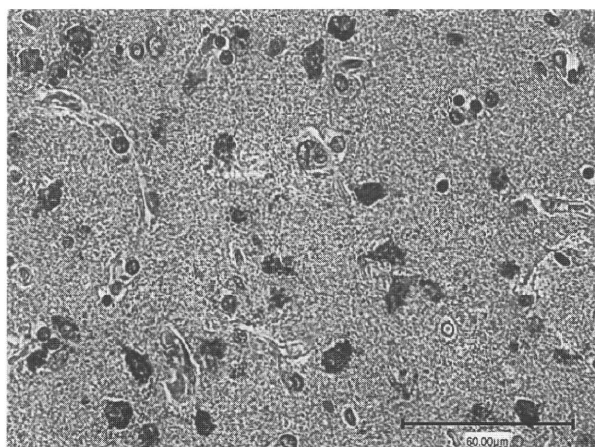


図1 大脳基底核（被殻）の免疫組織化学染色写真

表1 髄液 GCMS 解析のまとめ

		Mean	SD	XP-A 7y/Male	XP-D 13y/Male	XP-A 18y/Male	XP-A 20y/Female
(pg/ml)							
Homovanillic acid	HVA	154.7	98.1	(n/A)	16.4 ↓	4.9 ↓	6.2 ↓
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	DOPAC	5.06	3.31	(n/A)	0.5 ↓	0.1 ↓	0 ↓
5-Hydroxytryptophan	5-HT	20.1	9.7	6.3 ↓	27.5	22.3	9.4 ↓
5-Hydroxyindoleacetic acid	5-HIAA	3762	3421	(n/A)	405	146 ↓	215 ↓
(p mol)							
Glutamate	Glu	1.84	1.25	0.86	2.13	0.83	1.08
Glutamine	Gln	167.3	48.2	139.1	145.1	138	127.2
Gamma-aminobutyric acid	GABA	3	1.7	2.51	2.51	1.94	1.26 ↓
Glycine	Gly	3.6	1.92	6.9 ↑	7.2 ↑	5.63 ↑	3.56
Taurine	Tau	5.66	3	10.4 ↑	14.2 ▲	11.5 ↑	6.4

ミン・セロトニン神経の選択的脱落を報告した (J Neuropathol Exp Neurol 2004; 63: 1048-57)。少数例での解析ではあるが、今回、髄液中のドーパミン・セロトニン代謝物の低下が剖検脳での解析結果と合致する形で明らかになった。今後、髄液での GCMS 解析をさらに進め、治療による変化も追究する。

## E. 結論

XP-A 患者での錐体外路症状の発現における calcineurin 陽性投射神経の残存と dopamine receptor 2 表出の関与を明らかにした。さらに予備的 GCMS 解析により、XP-A 脳でのドーパミン・セロトニン代謝の異常を示唆する所見を得た。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Oba D, Hayashi M, et al. Autopsic study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD). Acta Neuropathol 119(4): 513-20, 2010
- 2) Hayashi M, et al. Oxidative stress in developmental brain disorders. In: Ahmad S, ed. Neurodegenerative diseases. Austin: Landes Bioscience (in press) (レビュー)

### 2. 学会発表

- 1) 林 雅晴ら. A 群色素性乾皮症と Cockayne 症候群の剖検脳での Thymidine glycol の蓄積. 第 52 回日本小児神経学会総会、福岡 (2010, 5.21).

## H. 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む)

該当するものは無い。

## A 群色素性乾皮症における神経障害の臨床像に関する研究

研究分担者 荻田典生 神戸大学大学院特命教授

### 研究要旨

XPA 患者 14 名について、神経障害の臨床経過を調査した。生下時は異常を認めないが、歩行開始時期は平均 1 年 4 月とやや遅延し、13 例で精神運動発達障害が確認された。転倒傾向は 8 歳～11 歳で顕著となり、13～18 歳で車椅子となり、その後 16 歳 5 月～20 歳 9 月には、胃瘻、気管切開が必要となった。

### A. 研究目的

A 群色素性乾皮症（XPA）における神経障害発現の機序を明らかにするために、臨床神経症状の推移を観察し、末梢神経伝導検査を評価した。

### B. 研究方法

XPA 患者 14 名（年齢 1 歳 3 月～20 歳 6 月）について、神経学的診察と末梢神経伝導検査を行った。一部の症例では、検査を繰り返し経年的変化を観察した。

（倫理面への配慮）

研究計画は神戸大学医学部附属病院倫理委員会の承認を受け、全ての被験者に説明と文書による同意を行った

### C. 研究結果

生下時は異常を認めないが、歩行開始時期は 1 歳～2 歳（平均 1 年 4 月）とやや遅延し、13 例で精神運動発達障害が確認された。転倒傾向は 8 歳～11 歳（9 歳）で顕著となり、13～18 歳で車椅子となり、その後 16 歳 5 月～20 歳 9 月（19 歳 4 月）には、胃瘻、気管切開が必要となった。（図 1）体幹失調を高頻度に認め、Babinski 徴候は、2 歳前後で一旦不明瞭となるが、6 歳以降は一貫して陽性であり、同じころから腱反射の低下が明らかとなった。末梢神経伝導検査では正中神経の CMAP と MCV はほぼ保たれていたが、SNAP は 14 歳以降で誘発されなくなった。後脛骨神経の CMAP は 10 歳以下でも低下

している症例が見られたが、14 歳以降では全例低下し、腓腹神経の SNAP は 12 歳以降で導出されなくなった。（図 2）。

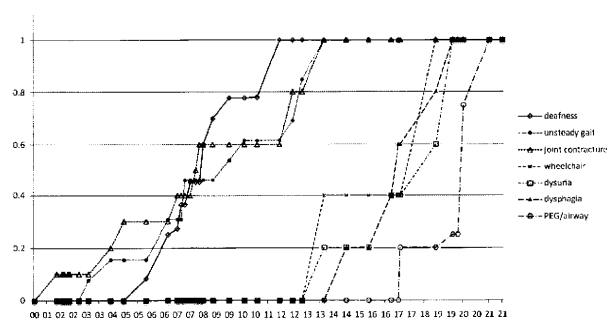


図 1 神経症状の発現頻度

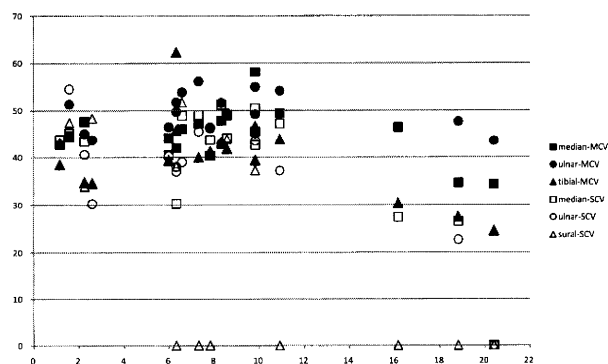


図 2 末梢神経伝導検査

#### D. 結論

XPA の神経障害は精神運動発達障害として早期から始まり、就学時期に顕在化する。末梢神経伝導検査で異常を検出する確率は高いが、潜在的障害に鋭敏であるとは言えない。

#### E. 参考文献

Kanda F et al. Clinical and Neurophysiological evaluation for neurological complications in xeroderma pigmentosum. *Clinical Neurophysiology* 121: S112, 2010

## 「色素性乾皮症やコケイン症候群における ヌクレオチド除去修復、転写の異常」に関する研究

研究分担者 田中亀代次 大阪大学大学院生命機能研究科教授

### 研究要旨

ヌクレオチド除去修復（nucleotide excision repair: NER）機構に異常を持つ色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum: XP）、コケイン症候群（Cockayne syndrome: CS）の原因遺伝子産物の機能解析、紫外線高感受性症候群（UV-sensitive syndrome: UV<sup>s</sup>S）遺伝子のクローニング、それらに欠損をもつ患者の分子病態の解析を研究目的とした。平成 22 年度に以下のような成果を得た。(1) ヌクレオチド除去修復における XPA 蛋白質と RPA の相互作用の意義を解析した。(2) XPF 蛋白質と結合する新規因子を同定し、XPF が細胞分裂に関与すること、XP-F 患者では細胞分裂の異常を高頻度に示すことを明らかにした。(3) 紫外線損傷部位における DDB2 (XPE) ユビキチンリガーゼ複合体の機能とその活性制御機構の解析を、再構成モノヌクレオソーム系を用いて解析した。(4) UV<sup>s</sup>S 患者 UV<sup>s</sup>1KO は CSB 遺伝子のヌル突然変異をホモ接合性に持ち、CSB 蛋白質は完全に欠損していた。他方、CS 徴候を示す CS-B 患者では何らかの短縮 CSB 蛋白質が生成されていた。そして、短縮 CSB 蛋白質がカンプトテシン処理後の DNA topoisomerase I-DNA covalent complex の修復過程を阻害することを明らかにした。(5) TFIIH 非依存性の XPD 新規蛋白質複合体 (MMXD と命名) を同定し、それが染色体分配に関与すること、XP-D 及び XP-D/CS 患者細胞では染色体分配の異常が高頻度に認められることを明らかにした。(6) 転写と共役した修復に関与するが、これまで未知であった UV<sup>s</sup>S/A 群 (Kps3 患者) 原因遺伝子を、マウス単一染色体移入、CGH array 法等を用いることによりクローニングすることができた。

### A. 研究目的

ヌクレオチド除去修復 (NER) は、紫外線や活性酸素による損傷を始め多様な DNA 損傷を修復できる重要な遺伝情報維持機構である。NER 機構に異常をもつヒト遺伝疾患として、日光露出部位での高頻度皮膚がんや種々の神経症状を示す色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP)、身体発育不全、精神神経症状や早期老化を示すコケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)、CS 様徴候に加えて毛髪脆弱、皮膚角化等を示す硫黄欠乏性毛髪発育異常症 (trichothiodystrophy: TTD)、日光過敏性や色素斑を示す紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UV<sup>s</sup>S) などが知られており、生命維持における NER の重要性が示唆される。NER 異常を示す XP には

XP-A ~ XP-G の 7 つ、CS には CS-A と CS-B の 2 つの遺伝的相補性群が存在する。TTD は TTDA 遺伝子以外に XPB、XPD 遺伝子の突然変異でも発症し、UV<sup>s</sup>S は CSA、CSB 遺伝子の他に、未知の遺伝子である UV<sup>s</sup>S/A の突然変異で発症する。UV<sup>s</sup>S/A 以外の遺伝子は既にクローニングされている。また、NER 機構には、転写を阻害し細胞死を誘発する転写鎖上の DNA 損傷を特異的に修復する「転写と共役した修復」(transcription-coupled nucleotide excision repair: TC-NER) と、転写部位の非転写鎖上や非転写部位の DNA 損傷も修復する「ゲノム全体の修復」(global genome nucleotide excision repair: GG-NER) の 2 つの機構が存在する。CS や UV<sup>s</sup>S では TC-NER 機構が、XP-C や XP-E では GG-NER

がそれぞれ選択的に欠損している。本研究では、XPA、XPD、XPE、XPF、CSB の機能解析、及び、UV<sup>s</sup>/A 遺伝子のクローニングを行い、NER の分子機構の解明、XP や CS の分子病態の解明を研究目的とした。

## B. 研究方法

XPA、XPD、XPE、XPF、CSB の生化学的、分子生物学的機能解析を行った。未知の UV<sup>s</sup>/A 遺伝子について、微小核導入法や CGH array 法を用い原因遺伝子のクローニングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する試料は、既に細胞バンクに登録され、学術論文に発表されている患者由来の皮膚繊維芽細胞であり、個人情報連結不可能匿名化された状態で研究用に広く一般に利用されている細胞である。従って、これらの試料を研究に使用することについては、インフォームドコンセント、個人情報管理体制などは免除される。

## C. 研究結果

### (C-1) ヌクレオチド除去修復における XPA 蛋白質と RPA の相互作用

XPA 蛋白質はヌクレオチド除去修復 (NER) 過程において、RPA、ERCC1、DDB2 (XPE)、TFIIH、さらには損傷DNA と相互作用し、中心的な役割を担うが、まだその詳細は解明されていない。我々は、XPA と RPA の相互作用の NER における役割について解析した。すなわち、RPA は heterotrimer を形成するが、XPA はその N 端で RPA32 と結合し、中央部で損傷DNA、RPA70 と結合する。XPA の N 端欠失で RPA32 との結合が低下し、NER 能も低下するが、損傷DNA との結合や RPA heterotrimer との結合は保たれていた。XPA 中央部の種々のアミノ酸置換は NER 能の低下を来とし、それらの幾つかの変異 XPA は RPA70 との結合も低下したが、損傷DNA との結合は正常に保たれていた。以上の結果より、XPA と RPA32 や RPA70 との結合が NER に必須であることが示唆された (西條将文ら: *J. Biological Chemistry*, 2010 Dec 9. [Epub ahead of print]) (図 1)。

### (C-2) XPF 蛋白質は細胞分裂に関与し、その異常が XP-F 患者の病因になっている

色素性乾皮症 F 群蛋白質 (XPF) は ERCC1 とヘテ

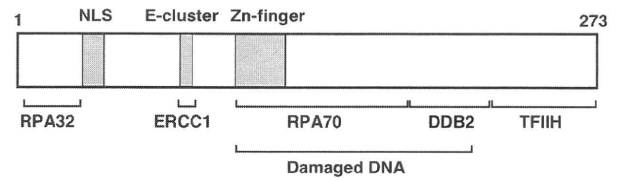


図 1 XPA の蛋白質結合ドメイン

ロ 2 量体を形成し、構造特異的エンドヌクレアーゼ活性をもち、ヌクレオチド除去修復や DNA 鎖間架橋修復に関与する。一方、XPF や ERCC1 遺伝子に突然変異を持つ患者は色素性乾皮症 (XP-F) の他にコケイン症候群 (XP-F/CS あるいは XFE) を発症する。さらに、Xpf や Ercc1 ノックアウトマウスは生後 4 週の離乳前に早老症状を呈して死亡する。XPF-ERCC1 複合体は DNA 修復のみならず、多様な機能をもち、その異常が XP-F や XP-F/CS (XFE) 患者が示す様々な病態の原因となっていることが示唆される。今回、我々は XPF 蛋白質がキネシン蛋白質 Eg5 と結合することを見つけた。Eg5 は、細胞分裂期において中心体や紡錘体の形成と分離に必須の蛋白質である。免疫蛍光染色所見でも、XPF は Eg5 と分裂期で共局在した。また、siRNA を用いた XPF のノックダウン細胞は高頻度に細胞分裂の異常、細胞核の形態異常を示した。さらに、XP-F や XP-F/CS 患者細胞でも高頻度に細胞分裂の異常、細胞核の形態異常が認められた。以上の結果は、XPF が正常な染色体分配機構の制御に必須の役割を担っており、XP-F や XFE 患者ではその機構に異常をもつことを示唆する (Li Jing Tan ら: 論文投稿中)。

### (C-3) 紫外線損傷部位における DDB2 (XPE) ユビキチンリガーゼ複合体の機能とその活性制御機構の解析

UV-damaged-DNA binding protein (UV-DDB) は DDB1, DDB2 の 2 つのサブユニットからなる複合体で、GG-NER において、損傷による DNA 構造の変化の認識に関与すると考えられている。また DDB2 は XP-E の原因遺伝子産物である。UV-DDB はさらに cullin4A, Roc1 とユビキチンリガーゼ (E3) 複合体を形成し、XPC, ヒストンなどをユビキチン化することから、GG-NER の初期過程におけるこの E3 複合体の機能が注目されている。そこで我々は紫外線照射した DNA を用いてモノヌクレオソームを再構成し、精製した DDB2 複合体を加えることでその E3 活性が損傷部位においてどのような影響を及ぼすのかについて解析した。その結果、ヌクレオ

ソーム中のヒストンのユビキチン化には、DDB2 複合体の損傷DNA 結合活性と E3 活性の両方が必要であることがわかった。興味深いことに、DDB2 複合体によるヒストンのユビキチン化はヌクレオソーム構造の安定性に影響を及ぼさなかった。また XPC は、損傷部位において DDB2 複合体によりユビキチン化されるだけでなくその E3 活性を促進すること、一方で紫外線照射後のクロマチン画分において DDB2 複合体と相互作用する因子として新たに同定された Ku70/86 が、損傷部位においてその E3 活性を抑制することがわかった。さらに、損傷部位における DDB2 複合体を介したユビキチン化が XPA のリクルートに関わることを示唆する結果が得られた。以上の結果は、DDB2 複合体の E3 活性がクロマチン構造をとる DNA 上の損傷部位において様々な制御され、GG-NER 機構に寄与していることを示唆している (竹立新人ら: *Molecular and Cellular Biology*, 30: 2708-2723, 2010)。

#### (C-4) CSB の DNA topoisomerase I-DNA covalent complex の修復過程における役割と患者における異常についての解析

UV<sup>s</sup> は、CS と同様に TC-NER に異常をもつが、CS 徴候を示さず軽度の XP 様皮膚症状を示すのみである。我々は以前、UV<sup>s</sup> 患者 (UV<sup>s</sup>1KO) が CSB 遺伝子に null 突然変異をもち、CSB 蛋白質が全く検出できないことを報告した。逆に、重篤な神経症状、身体発育不全を示す CS-B 患者では変異短縮 CSB 蛋白質が生成されていた (図 2)。

これらの結果から、変異短縮 CSB 蛋白質が何らかの阻害効果を持ち、そのことが CS 徴候の発症に関連していると考えた (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 15410-15415, 2004)。そこで、CS-B 細胞で認められる短縮 CSB 蛋白質の構造を解析した。CSB 遺伝子イントロン 5 にトランスポゾン PGBD3 が挿入されており、しかも alternative splicing によって CSB の N 末端部分とトランスポゾンの融合蛋白質 (CSB-PGBD3 fusion protein: CPFP) が正常細胞や CS-B 細胞で存在することを明らかにした。ある CS-B 細胞 (CS3PV) では、CSB の N 末端部分のみからなる変異 CSB 蛋白質 (3PV-CSB) が安定に産生されていた (図 3)。

本研究では、CPFP や 3PV-CSB の阻害的な機能を解明する目的で、野生型 CSB (WT-CSB)、CPFP、3PV-CSB 蛋白質に結合する蛋白質を精製し、その一つが DNA トポイソメラーゼ I (DNA

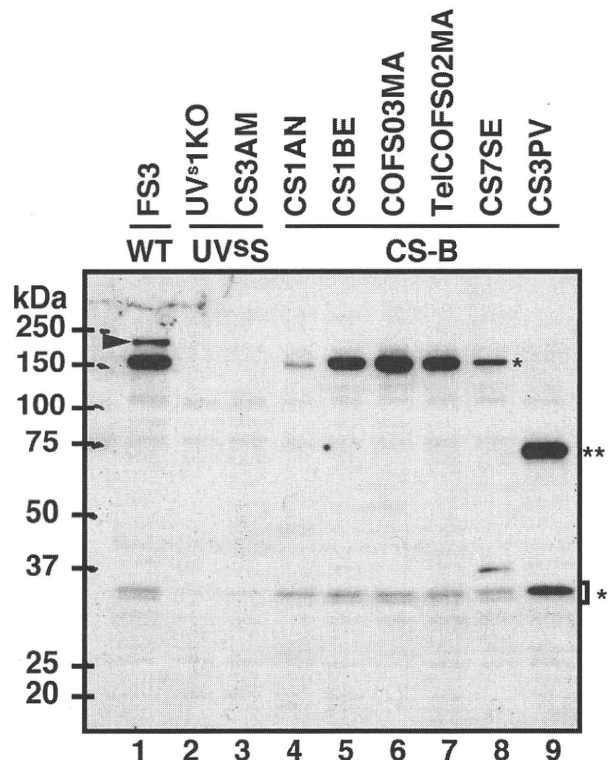


図 2 UV<sup>s</sup> および CS-B 患者細胞における CSB 蛋白質の western blot 解析

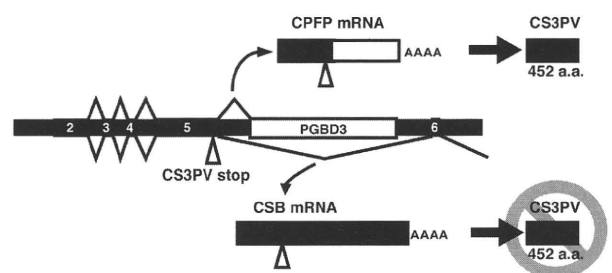


図 3 CSB 遺伝子イントロン 5 にトランスポゾン PGBD3 が挿入されている。alternative splicing によって CSB の N 末端部分とトランスポゾンの融合蛋白質 (CSB-PGBD3 fusion protein: CPFP) が生成される。そのことで、CS3PV 患者のように exon5 に nonsense 変異があっても、nonsense mediated mRNA decay (NMD) が起こらず、変異 mRNA は安定となり、短縮 CSB 蛋白質 (3PV-CSB) が CS3PV 患者で安定的に発現する。

topoisomerase I: Top1) であることを明らかにした。Top1 は DNA 複製や転写に際し DNA に生じる捻れを解消するため DNA にニックを入れ、捻れ解消後は再結合する活性を持つ。しかし、Top1 特異的阻害剤である camptothecin (CPT) 存在下では再結合が阻害され、Top1-DNA covalent complex (Top1-cc) が蓄積するため、細胞はそれを修復機構によって除去する必要がある。我々は、CPFP や 3PV-CSB を発現する細胞では CSB を発現しない細胞に比べ、



Top1-cc の修復が低下していることを明らかにした。しかし、WT-CSB を共存させるとその阻害は抑制された。以上の結果から、変異CSB 蛋白質が Top1-cc の修復過程を阻害し、CS の病因になっていることが示唆された(堀端克良ら: *Genes to Cells*, 16: 101-114, 2011)。

(C-5) XPD 新規蛋白質複合体の同定と機能解析、及び患者細胞における MMXD 機能異常についての解析

基本転写因子TFIIH は 10 個のサブユニットからなる蛋白質複合体であり、XPB、XPD、TTA を含み、NER にも必須の因子である。我々は、XPD 蛋白質が、TFIIH とは独立して、MMS19 や MIP18 (新規蛋白質)等と新規複合体を形成することを明らかにし、MMXD (MMS19-MIP18-XPD) 複合体と命名した。そして、MMS19、MIP18、XPD が細胞分裂期で紡錘体と一部共局在すること、それらのノックダウン細胞は分裂期で紡錘体やクロマチンの局在異常を示し、分裂間期細胞で異常核を示すことを明らかにした。また、XP-D や XP-D/CS 患者では、XPD のノックダウン同様に、細胞分裂期の紡錘体やクロマチンの局在異常、分裂間期での異常核を高頻度で示すことを明らかにし、XP-D や XP-D/CS 患者の病態に MMXD の機能異常が関与しているこ

とを示唆した(伊藤伸介ら: *Molecular Cell*, 39: 632-640, 2010) (図4)。

(C-6) 未知の UV<sup>s</sup>/A 群原因遺伝子のクローニング

TC-NER 異常を示す 3 つの相補性群UV<sup>s</sup> の中で、原因遺伝子が未知の UV<sup>s</sup>/A 群 (Kps3 患者) について、当該原因遺伝子のクローニングを試みた。微小核融合法により Kps3 細胞へマウス単一染色体移入を行い、紫外線抵抗性を獲得した複数の Kps3 細胞を得た。さらに、微小核にガンマ線を照射することで断片化した染色体を導入した Kps3 細胞からも紫外線抵抗性クローンを得た。各クローンに共通してマウス 5 番染色体が導入されていることをマルチカラー FISH 法と染色体特異的プライマーを用いた PCR 法によって確認した。さらに、比較ゲノムハイブリダイゼーションアレイ (CGH array) 解析から、紫外線抵抗性を獲得した 4 個の独立した Kps3 トランスフェクタントが保持する唯一のマウスゲノム共通領域として、5 番染色体中の 600kb の領域を同定した。この領域には 10 個の遺伝子が含まれる。また、マウス 5 番染色体の移入によって Kps3 細胞の TC-NER が回復することも確認した。当該領域をカバーする BAC クローンを Kps3 細胞に導入したところ、一つの BAC クローンが Kps3 細胞の紫外線感受性や TC-NER を正常化した。この BAC クローンに含まれる遺伝子の cDNA の導入によっても Kps3 細胞は正常化した。しかも、Kps3 細胞はこの遺伝子に nonsense mutation をホモ接合性を持っていた。このことから、我々は UV<sup>s</sup>/A 遺伝子をクローニングできたと確認した (X. Zhang ら: 未発表データ)。

D. 考察

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP)、コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS) の原因遺伝子産物の機能解析、紫外線高感受性症候群 A 群 (UV-sensitive syndrome group A: UV<sup>s</sup>/A) 原因遺伝子のクローニング、それらに欠損をもつ患者の分子病態の解析において当初計画以上に成果をあげることができた。XPD 及び UV<sup>s</sup>/A に関する論文を急いで発表できるようにしたい。

E. 結論

XPA、XPD、DDB2 (XPE)、CSB の新規機能を明らかにし、XP や CS の病因解明に貢献した。また、TC-NER に関与する未知の UV<sup>s</sup>/A 群 (Kps3 患

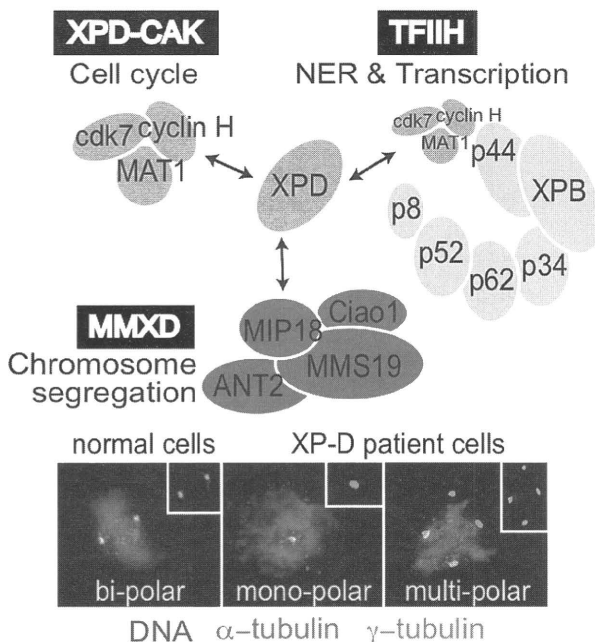


図4 XPD 蛋白質は、これまで知られていた TFIH 以外に、MMXD 複合体を形成し、染色体分配に関わる。しかも、XP-D 及び XP-D/CS 患者では染色体分配の異常が高頻度に認められ、病因になっている可能性が示唆される。

者)原因遺伝子のクローニングを行った。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### (G-1)論文発表

- 1) Li Jing Tan, Masafumi Saijo, Isao Kuraoka, Takashi Narita and Kiyoji Tanaka. Xeroderma pigmentosum group F protein binds to Eg5 and functions in mitosis: Implication for XP-F. Submitted, 2011
- 2) Ashild K. Andreassen, Inger-Lise Steffensen, Ann-Karin Olsen, Kiyoji Tanaka, Richard Wiger. Spermatogenesis not impaired in a nucleotide excision repair-deficient Min mouse model with or without neonatal mutagen. *International Journal of Andrology*, in press, 2011.
- 3) Masafumi Saijo, Arato Takedachi, and Kiyoji Tanaka. Nucleotide excision repair by mutant xeroderma pigmentosum group A (XPA) proteins with deficiency in interaction with RPA. *Journal of Biological Chemistry*, 2010 Dec 9. [Epub ahead of print]
- 4) Katsuyoshi Horibata, Masafumi Saijo, Mui Nee Bay, Li Lan, Isao Kuraoka, Philip J. Brooks, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Akira Yasui and Kiyoji Tanaka. Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase I-DNA covalent complex. *Genes to Cells*, 16, 101-114, 2011.
- 5) Touhei Usuda, Masafumi Saijo, Kiyoji Tanaka, Nobuyuki Sato, Makoto Uchiyama and Takehiro Kobayashi. A Japanese trichothiodystrophy patient with XPD mutations. *Journal of Human Genetics*, in press, 2010.
- 6) Shinsuke Ito, Li Jing Tan, Daisuke Andoh, Takashi Narita, Mineaki Seki, Yasuhiro Hirano, Keiko Narita, Isao Kuraoka, Yasushi Hiraoka, and Kiyoji Tanaka. MMXD, a TFIIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. *Molecular Cell*, 39, 632-640, 2010.
- 7) Hironobu Ikehata, Ryuhei Okuyama, Eisaku Ogasawa, Shingo Nakamura, Atsuko Usami, Toshio Mori, Kiyoji Tanaka, Setsuya Aiba, and Tetsuya Ono. Influences of p53 deficiency on the apoptotic re-

sponse, DNA damage removal and mutagenesis in UVB-exposed mouse skin. *Mutagenesis*, 25, 397-405, 2010.

- 8) Arato Takedachi, Masafumi Saijo, and Kiyoji Tanaka. The DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku, and contributes to the recruitment of XPA. *Molecular and Cellular Biology*, 30, 2708-2723, 2010.
- 9) Yoshihisa Takahashi, Yukihiko Hara, Masayo Imanaka, Hideki Wanibuchi, Kiyoji Tanaka, Takatoshi Ishikawa, Shigeo Mori and Toshio Fukusato. No inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate and lycopene on spontaneous hepatocarcinogenesis in C3H/HeN mice. *Fukushima J. Medical Science*, 56, 17-27, 2010.

### (G-2)学会発表

- 1) Kiyoji Tanaka. Keynote Lecture: "Molecular Mechanism and Human Inherited Disease of Nucleotide Excision Repair" in the Conference "Responses to DNA damage: from molecular mechanism to human disease", Egmond aan Zee, The Netherlands, April 3-8, 2011.
- 2) Kiyoji Tanaka. "XPD forms a TFIIH-independent protein complex involved in chromosome segregation" *Workshop on XERODERMA PIGMENTOSUM AND OTHER DISEASES OF HUMAN PREMATURE AGING AND DNA REPAIR: MOLECULES TO PATIENTS* September 21-24, 2010, Virginia, USA
- 3) Hisami Suetomo, Masafumi Saijo, Arato Takedachi, Kiyoji Tanaka. "Regulation of the formation of DDB2-E3 complex by DDA1" The 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2010年10月26-30日、富山
- 4) Arato Takedachi, Masafumi Saijo, Kiyoji Tanaka. "The DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku, and contributes to the recruitment of XPA" The 7th International 3R (DNA Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2010年10月26-30日、富山
- 5) 田中亀代次、伊藤伸介、Tan Li Jing、安藤大輔、成田 央、関 峰秋、平野泰弘、成田圭子、倉岡 功、平岡 泰「MMXD: 染色体分配に 関与する TFIIH 非依存性XPD タンパク質複合

- 体」第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、神戸
- 6) 末友寿実、西條将文、竹立新人、田中亀代次「DDA1によるDDB2ユビキチンリガーゼ複合体形成の制御」末友寿実、西條将文、竹立新人、田中亀代次 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、神戸
- 7) Arato Takedachi, Masafumi Saijo, Kiyoji Tanaka. "The DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku, and contributes to the recruitment of XPA" 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、神戸
- 8) Xue Zhang, Katsuyoshi Horibata, Chie Ishigami, Akiko Ukai, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Hidetoshi Tahara, Kiyoji Tanaka. "Molecular cloning of the UVsSA gene for UV-sensitive syndrome with deficiency in transcription-coupled repair" 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、神戸
- 9) Li Jing Tan, Masafumi Saijo, Isao Kuraoka, Kiyoji Tanaka. "Analysis of the interaction between XPF and bipolar motor protein Eg5" 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、神戸
- 10) Dawn Koh, Takashi Narita, Katsuyoshi Horibata, Akiko Ukai, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Kiyoji Tanaka "Molecular characterization of a patient with UV-sensitivity and de novo unbalanced translocation between chromosome 6p and 10q" 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、神戸
- 11) 中根裕信、Erin R.P. Shull、Youngsoo Lee、栗政明弘、稲賀すみれ、名黒知徳、田中亀代次、Peter J. McKinnon 「DNA修復異常症におけるDNA損傷応答の違いによる脳神経病変への関与 - ATLD、NBS、XPAの神経病変」第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、神戸

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む)

(H-1)特許取得

なし

(H-2)実用新案登録

該当なし

(H-3)その他

該当なし

## 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。XP-E群細胞で特異的に見られるXPCタンパク質のユビキチン化欠損を、従来同定が困難であったE群の診断に応用するための基礎データとして、DDB2（XPE）タンパク質とユビキチンリガーゼ活性の構造機能相関を解析した。

### 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タンパク質のユビキチン化が、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

紫外線損傷DNA結合タンパク質複合体（UV-DDB）のサブユニットで、XP-E群の原因遺伝子産物であるDDB2タンパク質の種々の変異体を過剰発現するヒト形質転換培養細胞株を作成した。具体的には立体構造的にdisorderしたDDB2のN末端領域に着目し、この領域を欠失したDDB2、あるいはその中で翻訳後修飾の標的となる可能性のあるアミノ酸を置換した点変異DDB2のN末端にHA

タグを融合し、これをヒト正常線維芽細胞株WI38 VA13を親株として安定に過剰発現する細胞株を樹立した。これらの細胞株に紫外線（UVC）を照射し、コロニー形成法による生存率測定、およびDNA損傷特異的抗体を用いたELISA法による損傷修復速度の測定を行った。

一方、バキュロウイルス・ベクターを用いてFLAGタグを融合したDDB1タンパク質と上記の変異DDB2を昆虫細胞内で共発現し、組換えUV-DDB複合体を精製した。これを別に精製したCUL4A-ROC1複合体と混ぜてユビキチンリガーゼ複合体を再構成し、XPCやDDB2のユビキチン化に対する変異の影響をin vitroで解析した。

### C. 研究結果と考察

DDB2は紫外線損傷DNAとの相互作用部位であるβプロペラ構造を含むC末端領域、DDB1との相互作用に関わる中央のhelix-loop-helix領域、さらにN末端側で特定の立体構造を取らないと予想される領域に分けられる。このN末端領域の機能を探るため、野生型DDB2、およびN末端を欠失した変異DDB2にHAタグを融合したものを、WI38 VA13細胞を親株としてそれぞれ安定に過剰発現する形質転換細胞株を樹立した。これらの細胞の紫外線感受性を測定したところ、野生型DDB2を過剰発現した細胞株が親株細胞と比べて顕著な抵抗性を示したの