

判断した。また、外用前後で末梢血、肝機能、総コレステロール値に大きな変化はなく、終了時の血中ラパマイシン濃度は検出限界以下であった。

D. 考察

今回我々は、TSCの顔面血管線維腫に対してラパマイシン外用療法が有意に有効であることを、左右比較試験で確認した。

今回の *in vitro* の経皮吸収試験の結果からは、同じ主剤の濃度でも基剤によりラパマイシンの吸収に大きな差が生じることが明らかとなった。

臨床試験において、10才以下の小児で有意に高い効果が得られたのは、小児では比較的腫瘍が小さく、増殖増加も急速でなく、皮膚が薄く経皮吸収がより高い可能性などが原因として考えられた。今回我々の作製したラパマイシン外用剤は、小児を含め大きな副作用は殆ど認められず、安全性の高いものであった。

現在、血管線維腫に対する治療法は、皮膚剥削、電気焼灼、CO2レーザー、ダイレーザー、凍結療法などである。凍結療法を除き、これらの殆どは外科的治療で、レーザーの一部を除き麻酔を要する。侵襲や治療期間・費用などの患者側の負担や、医療側のマンパワー・保険財政支出などの負担があり、幼少期や早期から簡単に行えるものではない。また凍結療法も疼痛があり、頻回の施行は難しい。

今回の結果から、TSCの血管線維腫に対して、皮疹の出現早期の時点で小児期よりラパマイシン外用治療を行うことは、TSC患者にとって大きな利益になり、また医療者側にとっても意義があると考え

えられた。

E. 結論

TSCの血管線維腫に対するラパマイシン外用療法は副作用が少なく有意に有効な治療法であること、特に小児期からの開始は非常に有効であることが確認された。基剤による吸収差の結果もふまえ、今後臨床応用を進めていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I. A novel application of topical rapamycin formulation, an inhibitor of mTOR, for patients with hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex. Arch Dermatol. 2012;148(1):138-9.
- 2) Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, Naka T, Katayama I Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. Pigment Cell Melanoma Res. 2012;25(2):219-30.
- 3) Arase N, Wataya-Kaneda M, Oiso N, Tanemura A, Kawada A, Suzuki T, Katayama I. Repigmentation of leukoderma in a piebald patient associated with a novel c-KIT gene mutation, G592E, of the tyrosine kinase domain. J Dermatol Sci. 2011;64(2):147-9.
- 4) Tanemura A, Kotobuki Y, Itoi S, Takata T, Sano S, Katayama I. Positive link between STAT3 activation and Th17 cell infiltration to the lesional skin in vitiligo vulgaris. J Dermatol Sci. 2012 ;67(3):207-9.

2. 学会発表

【特別講演】

片山一郎 皮膚疾患治療の新しい視点 白斑・強皮症・掌蹠膿疱症を中心に 日本皮膚科学会東北六県合同地方会学術大会 第357会例会 2012.2.4

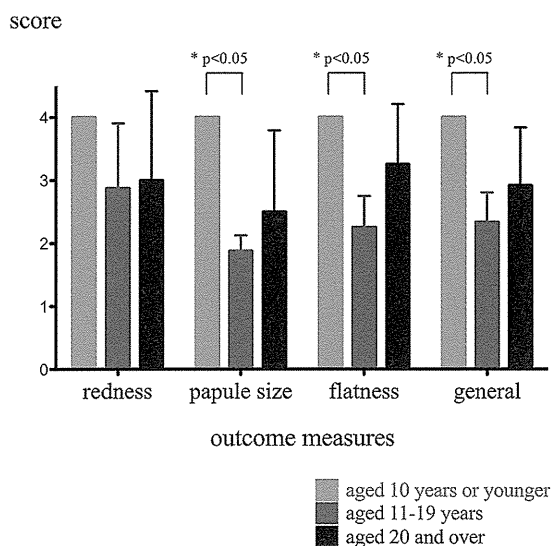


図3 12週終了時の年齢群別の改善度
各評価項目いずれも改善度は最高4点～最低-2点

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

出願中

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

1. 色素性乾皮症診療グループによる XP 診療マニュアル 2. 色素性乾皮症細胞におけるストレス応答に関する研究

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

研究期間：3年計画（平成23年～25年度）の2年目。

1. 院内に XP 診療グループを作り、症例検討を行ない、その成果をもとに、XP の診療マニュアル（案）を作成して、一般皮膚科医を対象に啓発活動を行った。しかし、神経症状を伴った患者の状態を客観的に評価して診療マニュアルに反映出来る様な診療データが少ないので、今後5年くらいかけて、客観的検査に協力出来る患者を増やしたうえで解析を行ない、マニュアルの改訂をめざす。

2. XP における神経症状の発症機序の解明のために、XP 細胞におけるストレス応答の研究を目指していたが、神経症状を合併していない XP-A 群患者が見つかったのでその患者細胞と神経症状を伴う XP-A 細胞での紫外線によるストレス応答を比較したところ、神経症状はヌクレオチド除去修復のうちのゲノム全体修復の修復能力に依存している事が示唆された。

A. 研究目的

①専門外の一般皮膚科医や一般内科医が XP 患者を診察する際に役立つような色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum: XP）の診療マニュアル（案）の作成をめざした。

②XP における神経症状の発症機序を解明する目的で XP 細胞のストレス応答に焦点を当てて研究を進めているが、神経症状を伴わない XP-A 患者が見つかったので、その患者細胞と神経症状を合併する XP-A 患者細胞における紫外線に対するストレス応答を比較した。

B. 研究方法

①以前行なった XP の全国調査では XP の患者数などの大きな動向はわかるが、それぞれの患者に応じた診療マニュアルの作成を行なうには情報がすくないので、一般皮膚科医、一般内科医が初めて XP 患者に接した際に適切な診療が施せる様な診療マニュアルを作成すべくその基礎データを得るため、院内に皮膚科、神経内科、耳鼻科、整形外科（リハ

ビリ科）より成る XP 診療グループを作成し、年に3回カンファレンスを持った。当院に通院中の XP 患者の症状について診療科毎のアセスメントと、診療指針等を討議する一方で、X-A マウスを用いてその聴力測定を行い、患者における異常と比較した。

②最近の XP-A 患者では診断時期が早いため、皮膚癌の発症は明らかに減っている一方で、神経症状が重症になると病院に通院する機会が減るため、神経症状を有する XP 患者の理学的診察、神経症状を客観的に評価出来る検査が必ずしも容易ではない。そこで、軽症で神経症状を伴いうる軽症型の A 群や D 群の神経症状の解析も重要である。今年度は、相補性群が明らかになっていない XP 患者について、遺伝子解析を進め、新たに2名の患者を D 群と同定した。また、神経症状を全く認めない8歳女兒の XP-A 患者の症例を経験した。XP-A 患者の症状発症メカニズムに迫るため、この軽症型 XP-A 患者由来の皮膚線維芽細胞を樹立し、その紫外線に対するストレス応答を検討した。また、遺伝子変異の箇所を明らかにし、タンパク発現および NER 能につ

いて、重症型XP-A細胞、正常細胞との比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

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

①XP診療グループをつくることによって明らかになったことは、XPの患者における聴力が従来言われていたほど早くから低下するわけではなく、むしろ、失調がかなり若い時期から低下している例もあることが明らかになった。聴力低下は6歳くらいか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り、症例により顕在化する年齢にかなり開きがある。この差が何に基づくのかは症例を増やして検討する必要がある、

ABRでみると聴力は保たれている例もあり、従来の聴力検査が精神発達遅滞の影響も受けていた事を示唆している。神経症状を把握する意味で、重要だと思われる。

また、10代の後半になると痛覚が落ちている事も明らかとなった。その結果、20代で生じた皮膚癌の切除は少量の局所麻酔で十分切除可能である。従来は年長児の皮膚癌切除はトリクロールシロップの投与後に行なっていたが、今後は年齢と神経症状に応じて、推奨出来る処置を示す必要が有る。

PEGの造設の時期、気管切開・喉頭気管分離手術のタイミングなどを指導する情報を今後も集めて行き、XPの診療に携わる医療従事者の診療の手引きとなるよう診療マニュアルを改訂して行く必要が有ろう。

②突然変異解析により、神経症状をと伴わない軽症型XP-Aは、重症型で高頻度に見られるイントロン3のスプライス受容部位における突然変異とエクソン6の一塩基挿入によるフレームシフト突然変異からなる共有ヘテロ接合体であることがわかった。軽症型のXPAタンパクは野生型のものと比較して、短いながらも予想される長さのXPAタンパクを認めた。不定期DNA合成において、重症型が正常の約2%に対して軽症型が約13%と、軽症型はGGR能が重症型に較べて高いことが示唆された。TCR能を反映するRNA合成回復能(RRS)において、重症型と軽症型では、明らかな違いは認められず、TCR能には違いがないことが示唆された。こ

れらの結果より、軽症例に認められるC末側の欠失したXPAタンパクの有無が、GGR能および症状の重篤度に反映していると考えられた。

D.E. 考察と結論

①A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。院内でXP診療グループを設けて細かく診療して行く事で、XP患者の診療に役立つ事で明らかになった事も多い。今後それを検証しながら、全国の医療従事者が使い易い診療マニュアルの作成を目指したい。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と患者指導が必要かと思われる。

今後、前回の全国調査から3年が経過したので、次年度以降に寿命、神経症状などの観察ポイントも念頭に置いた全国調査を再度実施し、XP診療の実情を評価し今後のマニュアル改訂にフィードバックを図りたい。2014年にはDNA修復異常症の恐臭いシンポジウムを計画しているので、海外の症例との比較も今後検討して行きたい。

②XPの神経症状がゲノム全体修復と密接に関連する事がわかった。また、13%のゲノム全体修復能があれば、神経症状がかなり軽くなる事がわかった。修復能を少しでも改善させる物資がみつければ、神経症状の著明な改善に繋がる可能性があり、患者にとっては福音になると思われる。今後、アッセイ系を立ち上げて、様々な化合物の中からゲノム全体修復を改善する様な薬物を見つけることも検討したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 竹内聖二、中野英司、山下大介、井川 健、森田明理、荻田典生、錦織千佳子：軽症型A群色素性乾皮症の1例。小児皮膚科印刷中
- 2) Imoto K, Nadem C, Moriwaki SI, Nishigori C, Oh KS, Khan SG, Goldstein AM, Kraemer KH: Ancient origin of a Japanese xeroderma pigmentosum founder mutation. J Dermatol Sci: 2012 Nov 9 [Epub ahead of print]
- 3) Yogianti F, Kunisada M, Ono R, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nishigori C: Skin Tumours Induced by

- Narrowband UVB Have Higher Frequency of *p53* Mutations than Tumours Induced by Broadband UVB Independent of *Ogg1* Genotype. *Mutagenesis*: 27(6): 637-643, 2012.
- 4) Funasaka Y, Abdel-Daim M, Kawana S, Nishigori C: Effect of chemical peeling on the skin in relation to UV irradiation. *Exp Dermatol*: 21 Suppl1: 31-35, 2012.
 - 5) Chiyomaru K, Nagano T, Nishigori C: *XRCC1* Arg194Trp polymorphism, risk of nonmelanoma skin cancer and extramammary Paget's disease in a Japanese population. *Arch Dermatol Res*: 304(5): 363-370, 2012.
 - 6) Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, Fukami Y, Nishigori C: Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol*: 132(7): 1877-1885, 2012.
 - 7) 小野竜輔、錦織千佳子：色素性乾皮症に合併する顔面の皮膚腫瘍。 *MB Derma*: 199:1-6, 2012.
 - 8) 錦織千佳子：シミ、しわは生活習慣から!? 健康ふらざ（日医ニュース 第1220号）：No.367, 2012.
 - 9) 錦織千佳子：紫外線発癌の機序とその予防（前編）。 *日本医事新報*：No.4595:67-70, 2012.
 - 10) 錦織千佳子：紫外線発癌の機序とその予防（後編）。 *日本医事新報*：No.4599:67-70, 2012.
 - 11) 竹内聖二、錦織千佳子：先天性光線過敏症の概説と最新の知見。 *MB Derma*:191: 7-14, 2012.
2. 学会発表
- 1) Takeuchi S, Okamura C, Niki Y, Nishigori C, Declercq L, Yarosh DB, Saito N: Live imaging analysis of melanosome transfer using lipophilic tracer. 2012 SID Annual Meeting & 75th Anniversary Celebration. 2012. 5.9-12
 - 2) Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, Fukami Y, Nishigori C: Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. 2012 SID Annual Meeting & 75th Anniversary Celebration. 2012. 5.9-12
 - 3) 錦織千佳子：太陽紫外線とビタミンD。 第111回日本皮膚科学会総会。 2012. 6.1-3
 - 4) Fujiwara S, Nagai H, Oniki S, Yoshimoto T, Nishigori C: Interleukin-17 and interleukin-27 exert opposite effects on tumor necrosis factor- α -mediated psoriasis related chemokine production in human keratinocytes. 2nd Eastern Asia Dermatology Congress. 2012. 6.13-15
 - 5) Yogiarti F, Kunisada M, Ono R, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nishigori C : Skin Tumors Induced by Narrowband UVB Have Higher Frequency of *p53* Mutations than Tumors Induced by Broadband UVB Independent of the *Ogg1* Genotype. 36th meeting of the American Society for Photobiology. 2012.6. 23-28
 - 6) Nakano E, Ono R, Takeuchi S Nishigori C: Five Case Reports of Xeroderma Pigmentosum Group D Without Neurological Symptoms. 36th meeting of the American Society for Photobiology. 2012.6.23-28
 - 7) 竹内聖二、中野英司、錦織千佳子：「紫外線に対する生物応答: 細胞から皮膚まで」A群色素性乾皮症（XPA）における神経症状発症メカニズムについての検討。 日本放射線影響学会第55回大会。 2012.9.6-8
 - 8) Bito T, Yanagita E, Matsuoka R, Itoh T, Nishigori C: Analysis of cell proliferation activity in human cutaneous tumors derived from keratinocyte by using immunohistochemistry-based Cell Cycle Detection (iCCD). 42nd Annual ESDR Meeting 2012. 2012.9.19-22
 - 9) Oka M, Sakaguchi M, Fukumoto T, Iwasaki T, Fukami Y, Nishigori C: Tyr705 phosphorylation and Ser727 phosphorylation in STAT3 have their own roles and regulation mechanisms in melanocytes and melanoma cells. The 24th Annual Meeting of the JSPCR (International Federation of Pigment Cell Societies Workshop). 2012.11.24-25
 - 10) Takeuchi S, Abe Y, Yamada T, Kawano S, Hozumi Y, Suzuki T, Nishigori C: A case report of Hermansky-Pudlak syndrome in Japan, harboring novel mutations in the *HPS1* gene. The 24th Annual Meeting of the JSPCR (International Federation of Pigment Cell Societies Workshop). 2012.11.24-25
 - 11) Bito T, Yanagita E, Matsuoka R, Itoh T, Nishigori C: Diagnostic meaning of immunohistochemistry-based Cell Cycle Detection on human cutaneous tumors derived from keratinocyte. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012.12.7-9

- 12) Kunisada M, Masaki T, Ono R, Nakano E, Yogianti F, Okunishi K, Morinaga H, Sugiyama H, Nishigori C: A Survey of UVA-induced DNA Damage enhanced in the Presence of Drugs. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012.12.7-9
- 13) Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, Fukami Y, Nishigori C: Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012.12.7-9
- 14) Tian H, Fukunaga A, Taguchi K, Fujiwara S, Nagai H, Matsuo Y, Yodoi J, Nishigori C: Thioredoxin Suppresses Irritant Dermatitis to Croton Oil via the Inhibition of Cytokines and Chemokines Produced by Keratinocytes. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012.12.7-9
- 15) Nishigori C: Mechanisms of Melanomagenesis in relation to signal transduction and transcription factors. The 23rd Korean Society for Investigative Dermatology (KSID) Annual Meeting. 2013.3. 22-23

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

演者は平成10年より色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum; XP)、コケイン症候群(Cockayne syndrome; CS)など紫外線性DNA損傷の修復障害による遺伝性光線過敏症の分子細胞診断に携わってきた。今回、世界的にも極めて稀な病型であるXP/CS complexの本邦症例3例を経験した。相補性師試験にて2例はXPD群、1例はXPG群と診断した。分子遺伝学的解析にてXPDにG47R/?、G47R/R616Gのアミノ酸変化、XPGにM1-V3del/Q184Xのアミノ酸変化を確認した。いずれの変異もXPにCSを合併する表現型との関連が疑われた。

A. 研究目的

研究分担者は13年以上にわたり色素性乾皮症(XP)の分子細胞診断を行っている。XPは臨床的には(1)XPF群、XPバリエーションなど皮膚のみに症状を有するXP cutaneous type、(2)XPA群を代表とする進行性、重篤な神経症状を併発するXP neurological type、(3)コケイン症候群(Cockayne syndrome; CS)を合併するXP/CS complexの3型に分類される。XP/CS complexはXPB、XPD、XPG遺伝子変異で発症し、臨床的にはCS、細胞学的にはXPの表現型を呈し、6歳までに死亡する予後不良できわめて稀な疾患群である。

研究分担者がこれまで解析した症例数は平成24年7月依頼分までで計415例、XPの新規確定診断症例は128例、CSの新規確定診断症例は23例となった。またXP保因者診断55例、XP出生前診断も12回実施した。今回、その診断過程の中で経験した、世界的にも非常に稀な病型であるXP/CS complexの本邦3症例を詳細に解析し、XP/CSにおける表現型・遺伝型関連を検討した。

B. 研究方法

症例1(XP37HM)は1歳7ヶ月の男児。激しい光線過敏、著明な発育低下を主訴に来院した。視神経萎縮、白内障、網膜色素変性、性腺萎縮あり。顔面の色素異常が徐々に進行し、2歳で皮膚癌を発症、

その後2歳7か月時に肝不全で死亡した。

症例2(XP82HM)は1歳1ヶ月の男児。光線過敏症、重度の精神発達障害、発育障害がみられた。網膜萎縮、黄斑部変性、小陰茎、停留精巣あり。ネフローゼ症候群を合併し1歳11ヶ月時、腎不全にて死亡した。

症例3(XP80HM)は9ヶ月の女児。生後2ヶ月より激しい光線過敏症状があり、1歳から発育・発達の遅れが生じ始めた。2歳の現在、著明な低身長、低体重、低頭囲でまだ歩行不能である。

(倫理面への配慮)

今回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されており本研究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

症例1は細胞学的にはXPD/CS complex (G47R/? in exon 3/?)、本邦第1例目のXP/CS complex症例を経験した。

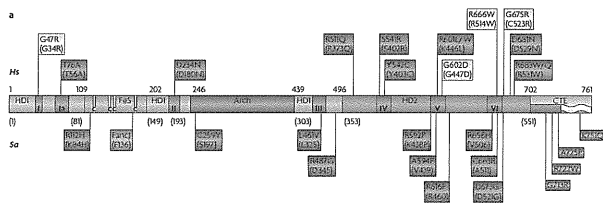


図1 XPD 遺伝子の構造

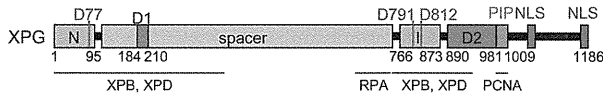


図2 XPG 遺伝子の構造

症例2はXPD/CS complex (G47R/R616G in exon 3/20)で本邦第2例目のXP/CS complex (XPD/CS complex)である。

症例3は精査にて本邦第1例目のXPG/CS complex (M1-V3del/Q184X in exon 1/6) (本邦第3例目のXP/CS complex)と判明した。

XPD 遺伝子 (図1) 変異では文献的にも G47R は XPD/CS complex に特有の変化である。XPG 遺伝子では変異がXPGの重要なドメイン (図2) に変化が起り、大部分の機能が損なわれればCS合併という重篤な表現型を呈するものと考えた。

XP/CS complex は全世界でも報告が20例にも満たず、本邦でのXP/CS complex 症例は今回記載した3症例のみである。CSを合併するXP患者は稀ではあるが、XPD、XPG患者を経験した際には遺伝子解析の実施は患者予後を推測する上で有用と思われる。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

- 1) 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, in press
- 2) Moriwaki S Hereditary disorders with deficient repair of UV-induced DNA damage Jpn Clin Med, in press
- 3) 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, in press

- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

(邦文著書)

- 1) 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 (メディカルレビュー)印刷中
- 2) 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」皮膚科臨床アセット20 (中山書店)印刷中
- 3) 森脇真一 発光ダイオード (LED) スキルアップ皮膚レーザー治療 p168-174, 2011 (中外医学社)
- 4) 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)
- 5) 森脇真一 色素性乾皮症 新領域別症候群シリーズ 別冊日本臨床 19:637-640, 2012 (日本臨床社)
- 6) 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 (診断と治療社)

(邦文論文)

- 1) 森脇真一 色素性乾皮症～確定診断へのプロセス～「色素異常症の診断と治療」日本皮膚科学会雑誌 2012、印刷中
- 2) 森脇真一 色素性乾皮症～最近の知見～「母斑症・遺伝性疾患最前線：診断、治療と対応」日本皮膚科学会雑誌 2012、印刷中

- 3) 森脇真一 光環境とライフスタイル「太陽紫外線環境と皮膚」日本皮膚科学会雑誌 2012、印刷中
 - 4) 森脇真一 紫外線を用いた皮膚病治療 皮膚科セミナーリウム 日本皮膚科学会雑誌 印刷中
 - 5) 森脇真一 遺伝性早老症の病態、診断と治療 難病と在宅ケア 17:25-28,2012
 - 6) 森脇真一 DNA 修復機構と色素性乾皮症 Monthly Book Derma 191:15-24,2012
 - 7) 森脇真一 光線過敏症の診断と患者ケア 第22回太陽紫外線防御研究委員会シンポジウム 報告書 22:39-41, 2012
2. 学会発表
- 1) 横田日高、吉田善紀、森脇真一、宮地良樹、山中伸弥iPS細胞を用いた色素性乾皮症の神経変性の病態モデル作成 分子皮膚科フォーラム 平成24年4月13日(弘前)
 - 2) 森脇真一 色素性乾皮症～確定診断へのプロセス 教育講演「色素異常症の診断と治療」第111回日本皮膚科学会総会 平成24年6月1日
 - 3) 森脇真一 色素性乾皮症～最近の知見 教育講演 母斑・遺伝性疾患最前線；診断、治療と対応 第111回日本皮膚科学会総会 平成24年6月1日
 - 4) 森脇真一 光環境とライフスタイル 教育講演「太陽紫外線環境と皮膚」第111回日本皮膚科学会総会 平成24年6月2日
 - 5) 森脇真一 光線による皮膚疾患；知っておくべき最近の知見 第23回 Niigata Dermatology Conference 平成24年6月23日(新潟)
 - 6) 森脇真一 光環境と皮膚～色素性乾皮症と向き合って 特別講演 第434回日本皮膚科学会北陸地方会 平成24年6月24日(金沢)
 - 7) 森脇真一、清水博子、黒川晃夫、寺木祐一 色素性乾皮症G群～本邦第4例目の報告例(XPG/CS complex?) 第34回日本光医学・光生物学会 平成24年7月28日(神戸)
 - 8) 森脇真一 その他の光治療(LEDなど) 教育講演2 第30回日本美容皮膚科学会 平成24年8月19日(名古屋)
 - 9) 森脇真一 太陽紫外線環境に生きる～色素性乾皮症から学んだこと～ 特別講演 山形地方会 平成24年9月9日(山形)
 - 10) 森脇真一 知っておくべき光線過敏症～その診断と患者ケア～ 秋田県皮膚科談話会 平成24年9月15日(秋田)
 - 11) 森脇真一、牧之段恵里 コケイン症候群患者に生じる早老症・発育障害・精神運動発達遅延の病態解明と治療法の探索～これまでの解析と今後の展望～ 皮膚の遺伝関連性希少難治性疾患群の網羅的研究班(厚生労働省) 平成24年度第1回班会議 平成24年10月12日(大阪)
 - 12) 大谷稔男、高尾真理子、藤井弓子、二宮伸介、多田廣司、森脇真一 ECC症候群と考えられた1例 第63回日本皮膚科学会中部支部学術大会 平成24年10月14日(大阪)
 - 13) 森脇真一 太陽紫外線環境に生きる～色素性乾皮症から学んだこと～ 第10回琉球大学皮膚科学リサーチセミナー 平成24年11月14日(那覇)
 - 14) 森脇真一 QOLを考慮した皮膚科診療～光線過敏症を中心に～ 第275回沖縄県皮膚科勉強会 平成24年11月15日(那覇)
 - 15) 森脇真一 色素性乾皮症の臨床経過と紫外線対策の基本 シンポジウム 第2回XP全国大会 平成24年11月24日(愛知)
 - 16) 牧之段恵里、森脇真一 色素性乾皮症の極めて稀な病型；XP/CS complexの本邦3症例 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「神経皮膚症候群に関する調査研究」班 平成24年12月7日(東京)
 - 17) 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 (Naha)

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

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。今回、新規相互作用因子の探索からXPCタンパク質がSUMO化修飾を受けることを見出し、この修飾がXP-E群欠損因子であるUV-DDBとの機能的相互作用を介して皮膚がんの抑制に重要な役割を果たしている可能性を示した。

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

XPCタンパク質と相互作用する新規因子の探索は、酵母2ハイブリッド法を用いたcDNAスクリーニング、およびエピトープタグを利用したタンパク質複合体のアフィニティ精製により行った。

細胞内におけるXPCタンパク質の翻訳後修飾の解析は、XPC欠損細胞XP4PASVを親株として、FLAG-XPCタンパク質（野生型または変異型）を安定発現する細胞を作成して行った。安定発現細胞株

の作成にはpIREShygベクターを用い、電気穿孔法によりコンストラクトを細胞に導入後、hygromycin Bにより形質転換株を選択した。タンパク質の一過性過剰発現にはpCAGGSベクターを用い、Lipofectamineによりコンストラクトを細胞に導入した。

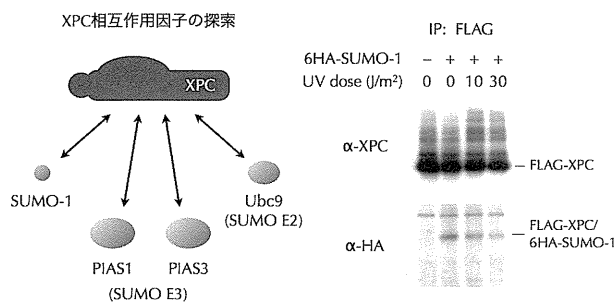
損傷除去活性の評価は、細胞に紫外線（10 J/m²）を照射後、経時的にゲノムDNAを調製して、残存する（6-4）光産物を損傷特異的なモノクローナル抗体を用いて定量することにより行った。組換えタンパク質はバキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞内で過剰発現したものを、精製して用いた。

（倫理面への配慮）

本研究で使用したXP-C群患者由来細胞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。

CD. 研究結果と考察

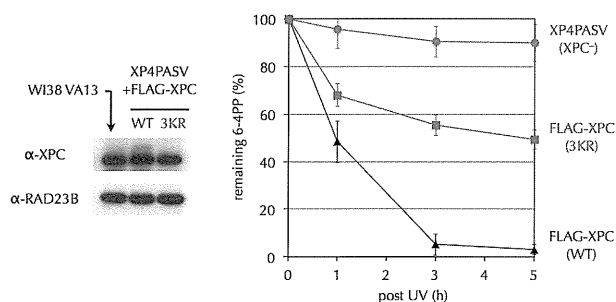
XPCタンパク質の新規相互作用因子を探索する目的で酵母2ハイブリッド法によるマウスcDNAライブラリーのスクリーニングを行ったところ、ユビキチン様タンパク質SUMO-1、およびSUMO化修飾に関わることが知られている複数の酵素が同定された。FLAG-XPC安定発現細胞においてHA-SUMO-1を一過性過剰発現し、抗FLAG抗体で免



XPc 相互作用因子の探索と SUMO 化の検出

免疫沈降することにより、XPc が細胞内で実際に SUMO 化修飾を受けることが見出された。

組換え XPc タンパク質を用いた無細胞 SUMO 化反応系を用いた解析から、少なくとも 3 か所の SUMO 化部位が同定された。これらのリジン残基をアルギニンに置換した変異 XPc (XPc-3KR) では、細胞内における SUMO 化が大部分抑制された。さらに XPc-3KR 安定発現細胞株を樹立したところ、紫外線照射後の (6-4) 光産物の修復が野生型 XPc 発現細胞と比較して有意に遅延することが見出された。精製した組換え XPc-3KR タンパク質が無細胞 NER 反応系で野生型 XPc と同等の活性を示したことから、この変異 XPc による DNA 損傷の直接認識とそれに続く修復過程には特に異常がないことが示唆された。



XPc-3KR 発現細胞における (6-4) 光産物修復遅延

一方我々は、紫外線照射に応答して DDB1-DDB2 (UV-DDB) に結合した CUL4 ユビキチンリガーゼ (CRL4^{DDB2} リガーゼ) が活性化され、これにより XPc が可逆的なユビキチン化を受けることを以前に報告している (Sugasawa et al. Cell 121: 387-400, 2005)。XPc-3KR 安定発現細胞に紫外線を照射したところ、この CRL4^{DDB2} 依存性のユビキチン化が野生型 XPc に比べて顕著に減弱していた。そこで XPc と UV-DDB の相互作用に着目して解析を行ったところ、無細胞系において XPc の SUMO 化が UV-DDB との物理的相互作用、および CRL4^{DDB2} リ

ガーゼによるユビキチン化を顕著に増強することを見出した。

以上の結果は、XPc の SUMO 化が UV-DDB との物理的・機能的相互作用を仲介することにより、紫外線誘発 DNA 損傷の認識過程の促進に寄与していることを示唆する。逆に SUMO 化が起こらない条件下では、損傷部位に結合した UV-DDB 自身が XPc による直接的な損傷認識の妨げとなっている可能性が考えられた。実際、XPc-3KR 発現細胞において DDB2 の発現を抑制することにより、(6-4) 光産物の修復遅延が部分的に解除されることが示された。

E. 結論

紫外線による DNA 損傷の認識機構としては、1) XPc による直接認識、2) UV-DDB を介した XPc のリクルートという二つの経路が並行して機能していることが知られている。XPc の SUMO 化は専ら後者の経路において、損傷認識因子間の機能的相互作用を仲介し、修復反応を促進することによって皮膚がんの抑制に寄与していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiomi, Y., Hayashi, A., Ishii, Y., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Sugasawa, K. and Nishitani, H.: Two different replication factor C proteins, Ctf18 and RFC1, separately control PCNA-CRL4^{Cdt2}-mediated Cdt1 proteolysis during S phase and following UV irradiation. Mol. Cell. Biol. 32: 2279-2288 (2012).

Pines, A., Vrouwe, M.G., Marteijn, J.A., Typas, D., Luijsterburg, M.S., Cansoy, M., Hensbergen, P., Deelder, A., de Groot, A., Matsumoto, S., Sugasawa, K., Thomä, N., Vermeulen, W., Vrieling, H. and Mullenders, L.: PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. J. Cell Biol. 199: 235-249 (2012).

2. 学会発表

Sugasawa, K.: Molecular mechanism of DNA damage

- recognition in mammalian nucleotide excision repair. DNA Repair Mini-Symposium at the National Institute of Health. Bethesda, MD, U.S.A., Apr. (2012).
- Sugasawa, K.: Post-translational protein modification regulating mammalian nucleotide excision repair. The 4th US-Japan DNA Repair Meeting. Leesburg, VA, U.S.A., Apr. (2012).
- 菅澤 薫：紫外線誘発DNA損傷の認識と修復の分子基盤. 第34回日本光医学・光生物学会（特別講演）神戸 7月（2012）.
- 松本翔太, 安田武嗣, Fischer, E.C., Thomä, N.H., 花岡文雄, 菅澤 薫：紫外線によるDNA損傷の修復を促進するDDB2の構造と機能制御. 日本放射線影響学会第55回大会 仙台 9月（2012）.
- Sugasawa, K. and Hanaoka, F.: Functional regulation of the DNA damage recognition factor DDB2 via post-translational modifications. 第71回日本癌学会学術総会 札幌 9月（2012）.
- Akita, M., Tak, Y.-S., Shimura, T., Matsumoto, S. and Sugasawa, K.: SUMO regulates DNA damage recognition in nucleotide excision repair. The 8th 3R Symposium. Awaji, Japan, Nov. (2012).
- Matsumoto, S., Fischer, E.C., Yoshino, K., Thomä, N.H. and Sugasawa, K.: Functional studies on ubiquitylation of the DNA damage recognition protein DDB2. The 8th 3R Symposium. Awaji, Japan, Nov. (2012).
- Mayca Pozo, F., Sakai, W., van der Spek, P.J., Nakazawa, Y., Ogi, T., Nishigori, C. and Sugasawa, K.: DNA repair synthesis defect in xeroderma pigmentosum group D cells. The 8th 3R Symposium. Awaji, Japan, Nov. (2012).
- 松本翔太, Fischer, E.C., 吉野健一, Thomä, N.H., 菅澤 薫：DNA損傷認識蛋白質DDB2における翻訳後修飾の機能解析. 第35回日本分子生物学会年会 福岡 12月（2012）.
- 菅澤 薫, 西良太郎, 酒井 恒, 戸根大輔, 花岡文雄：ゲノム安定維持に関わるcentrin-2の新たな機能. 第35回日本分子生物学会年会 福岡 12月（2012）.
- 戸根大輔, 吉野健一, 岩井成憲, 菅澤 薫：無細胞再構成系によるヌクレオチド除去修復活性制御因子の探索. 第35回日本分子生物学会年会 福岡 12月（2012）.
- 秋田眞季, 卓 妍秀, 志村 勉, 松本翔太, 花岡文雄, 菅澤 薫：ヌクレオチド除去修復におけるDNA損傷認識機構とSUMO化修飾の意義. 第35回日本分子生物学会年会 福岡 12月（2012）.
- Mayca Pozo, F., 酒井 恒, van der Spek, P.J., 中沢由華, 荻 朋男, 錦織千佳子, 菅澤 薫：Defect in the post-incision step of nucleotide excision repair in xeroderma pigmentosum group D (XP-D) cells. 第35回日本分子生物学会年会 福岡 12月（2012）.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

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特任教授

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）、紫外線高感受性症候群（UV-sensitive syndrome: UV^sS）の原因遺伝子のクローニングとその機能解析、及び、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 24 年度は以下の研究成果を得た。(1) 微小核融合法を用いたマウス染色体移入、比較ゲノムハイブリダイゼーションアレイ法等を用い、転写と共役した修復機構を欠損する UV^sS/A 群の原因遺伝子を同定し、これを *UVSSA*（UV-stimulated scaffold protein A）遺伝子と命名した。UV^sS/A 群患者細胞では *UVSSA* 遺伝子にノンセンス突然変異や 1 塩基欠失によるフレームシフト変異がホモ接合性に認められた。さらに、*UVSSA* タンパク質は脱ユビキチン化酵素 USP7 と複合体を形成し、紫外線照射細胞においてコケイン症候群 B 群（CSB）タンパク質を脱ユビキチン化し、CSB の動的安定性、ひいては、低リン酸化型 RNA ポリメラーゼ II の回復、すなわち転写の再開に関与していることを示唆した。(2) 色素性乾皮症 F 群蛋白質（XPF）は ERCC1 とヘテロ 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。今回、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タンパク質である。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 患者細胞や、XP に加え CS 症状を合併する XFE 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。

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発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^sS）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^sS は *CSA*、*CSB* 遺伝子の他に、未知の遺伝子で発症する UV^sS/A 群がある。UV^sS/A 以外の遺伝子は既にクローニングされている。

一方、NER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: TCR)機構と、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: GGR)機構の2つの機構が存在する。CSやUV^SではTCRが、XP-CやXP-EではGGRがそれぞれ選択的に欠損している。本研究では、UV^S/A原因遺伝子のクローニングとその機能解析、XPFの機能解析を行い、XPやCSの分子病態の解明を研究目的とした。

B. 研究方法

UV^S/Aの原因遺伝子のクローニングは、微小核融合による染色体導入法、比較ゲノムハイブリダイゼーションアレイ (CGH array) 法、BACトランスフェクション法等を用いて行った。XPFと結合するタンパク質の同定は、FLAG-His タグを付加したXPF cDNAをHEK293細胞で発現させ、その細胞抽出液から抗FLAG抗体を用いてXPFタンパク質複合体をアフィニティー精製した後、SDS-PAGEで分離し、銀染色で染まったバンドを切り出し、質量分析法にて行った。

(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、個人情報と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にあたっては、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) 紫外線高感受性症候群A群 (UV^S/A) 原因遺伝子のクローニングと機能解析

TCR異常を示す3つの相補性群UV^Sの中で、これまで原因遺伝子が未知であったUV^S/A群 (Kps3患者など) について、当該原因遺伝子のクローニングを行った。まず、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。微小核にガンマ線を照射し断片化したマウス染色体を導入した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、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共通マウスゲノム領域として、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。当該領域をカバーする6つのBACクローンをそれぞれKps3細胞に導入したところ、一つのBACクローン (KIAA1530遺伝子を含む) がKps3細胞の紫外線感受性やTCRを正常化した (図1)。KIAA1530 cDNAの導入によってもKps3細胞のTCRは正常化した。また、Kps3細胞はこの遺伝子にノンセンス突然変異をホモ接合性にかけていた。このことから、UV^S/Aの原因遺伝子をクローニングできたと確認し、UVSSA遺伝子と命名した (図2)。

TCR機構におけるUVSSAの機能を明らかにするために、まず、UVSSAと既知のTCR因子との相互作用を調べた。UVSSAは、UV照射した細胞より調製したクロマチン画分でCSA、CSB、RNAポリメラーゼII (RNA Pol II) と結合した。ついで、UVSSAと相互作用する新規タンパク質を検索した。その結果、ユビキチン鎖分解酵素であるUSP7がUVSSAと結合することが明らかになった。USP7をsiRNAを用いてノックダウンした細胞は、紫外線高感受性になり、紫外線照射後のRNA合成の回復 (UV-RRS) も低下した。さらに、USP7ノックダウン細胞ではUSP7のみならずUVSSAの量も減少した。すなわち、USP7はUVSSAと安定な複合体を形成し、TCRに必須の因子であることが示唆された。さらに、UV照射した細胞より調製したクロマチン画分で、UVSSA-USP7複合体はCSA、CSB、RNA Pol IIと結合した。しかも、UVSSA-USP7複合体とRNA Pol IIとの結合は、CS-A細胞やCS-B細胞では認められず、CSA、CSB依存性であることがわかった。

UV照射によるDNA損傷は、RNA pol II最大サブユニットRPB1のC末端領域 (CTD) が高リン酸化型であるRNA pol II α による転写伸長を阻害するだけでなく、RPB1のCTDが低リン酸化型であるRNA pol II α の減少をもたらす。RNA pol II α は転写再開に必要であり、正常細胞ではUV照射後の時間経過とともに回復するが、TCRを欠損したCS細胞では回復しない。そこで、親Kps3細胞と、UVSSA cDNAを導入しTCR能を正常化したKps3細胞との間で、UV照射後のRPB1のリン酸

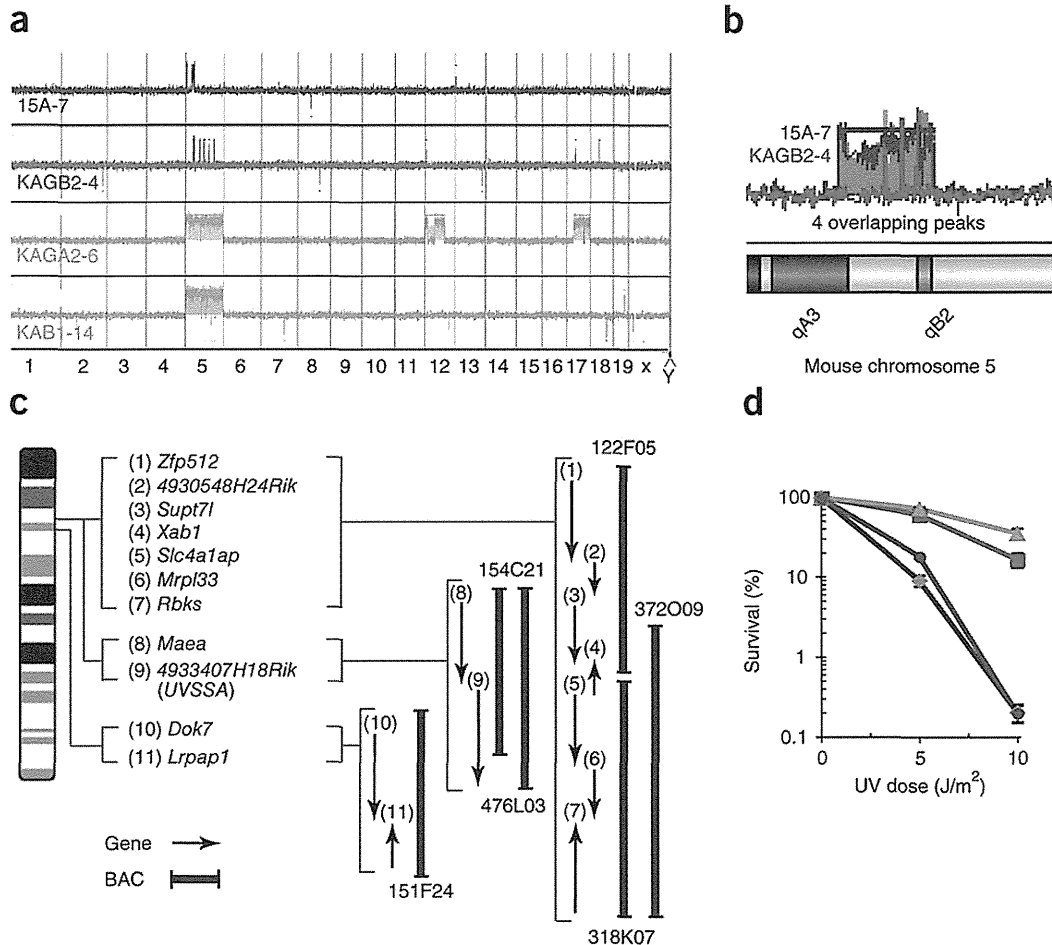


図1 CGH アレイ解析及び BAC クローンのトランスフェクション
 a) 紫外線抵抗性を獲得した Kps3 細胞に含まれるマウスゲノムの CGH アレイ解析による同定。
 b) 紫外線抵抗性を獲得した Kps3 細胞は、マウス 5 番染色体の約 600Kbp の領域を共通に保持する。
 c) マウス 5 番染色体の約 600Kbp の領域は 6 つの BAC クローンでカバーされる。
 d) BAC476L03 のトランスフェクションによって、Kps3 細胞は紫外線抵抗性を獲得する。
 緑：BAC476L03 をトランスフェクションした Kps3 細胞
 紫：BAC154C21 をトランスフェクションした Kps3 細胞
 赤：正常ヒト細胞
 藍：親 Kps3 細胞

化状態の違いを調べた。その結果、親 Kps3 細胞では RNA pol IIa は減少したままで回復しなかったのに対し、正常化 Kps3 細胞では RNA pol IIa は一旦減少したが、8 時間後には回復した (図 3)。この結果は、CSB, CSA に加え UVSSA も UV 照射後の RNA pol IIa の回復に必要であることを示している。さらに、UVSSA cDNA の導入により正常化 Kps3 細胞では UV 照射後の CSB の減少がわずかなのに対して、親 Kps3 細胞では大幅な減少がみられた (図 3)。この結果は、UVSSA が TCR において CSB を安定化するのに重要な役割を果たしていることを示唆する。UV 照射後の CSB の減少は、UVSSA をノックダウンした細胞のみならず、USP7 をノックダウンした細胞においても観察された。一方、UVSSA を

欠損している Kps3 細胞で USP7 をノックダウンしても CSB の更なる減少等の変化はなかった。以上の結果より、UVSSA-USP7 複合体は UV 照射後の CSB の分解を防いでいると考えられる。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下では、UV 照射後の Kps3 細胞における CSB の減少が抑制されるとともに、RNA pol IIa の回復も認められた。UVSSA が機能しないと UV 照射後に CSB はユビキチン化されてプロテアソームにより分解され、そのために RNA pol IIa の回復が起こらず、転写も再開しないことが示唆された (図 3, 4)。

(C-3) 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

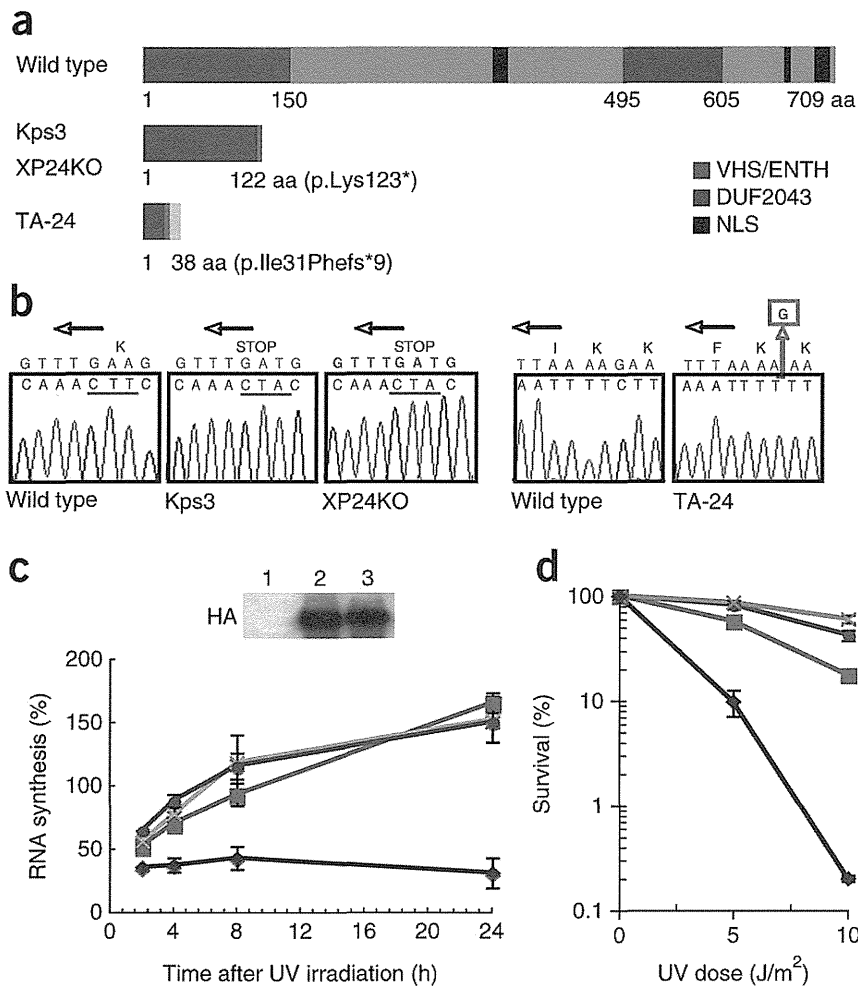


図2 UVSSA 遺伝子の構造と、UV^S/A 患者における突然変異
a) UVSSA 遺伝子の構造と、UV^S/A 患者における突然変異
b) UV^S/A 患者：Kps3、XP24KO、TA24 における UVSSA 遺伝子の突然変異
c) Kps3 細胞に UVSSA cDNA を発現した細胞の紫外線照射後の RNA 合成の回復
d) Kps3 細胞に UVSSA cDNA を発現した細胞の紫外線抵抗性の獲得
茶、水色：Kps3 細胞に UVSSA cDNA を発現した細胞
赤：正常ヒト細胞
藍：親 Kps3 細胞

色素性乾皮症F 群蛋白質 (XPF) は ERCC1 とヘテロ 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 遺伝子の突然変異は、色素性乾皮症 (XP-F) のみならず、コケイン症候群を合併する XFE 患者を発症する。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 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。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 と分裂期で部分的に共局在した。

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 XFE 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も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。

D. 考察

UV^S/A の原因遺伝子のクローニングに成功し、その欠損をもつ患者の分子病態の解析をおこない、TCR 機構の理解を大きく進展させた。さらに、XPF タンパク質の新規機能の発見と患者におけるその異常についても計画以上の成果をあげることができた。

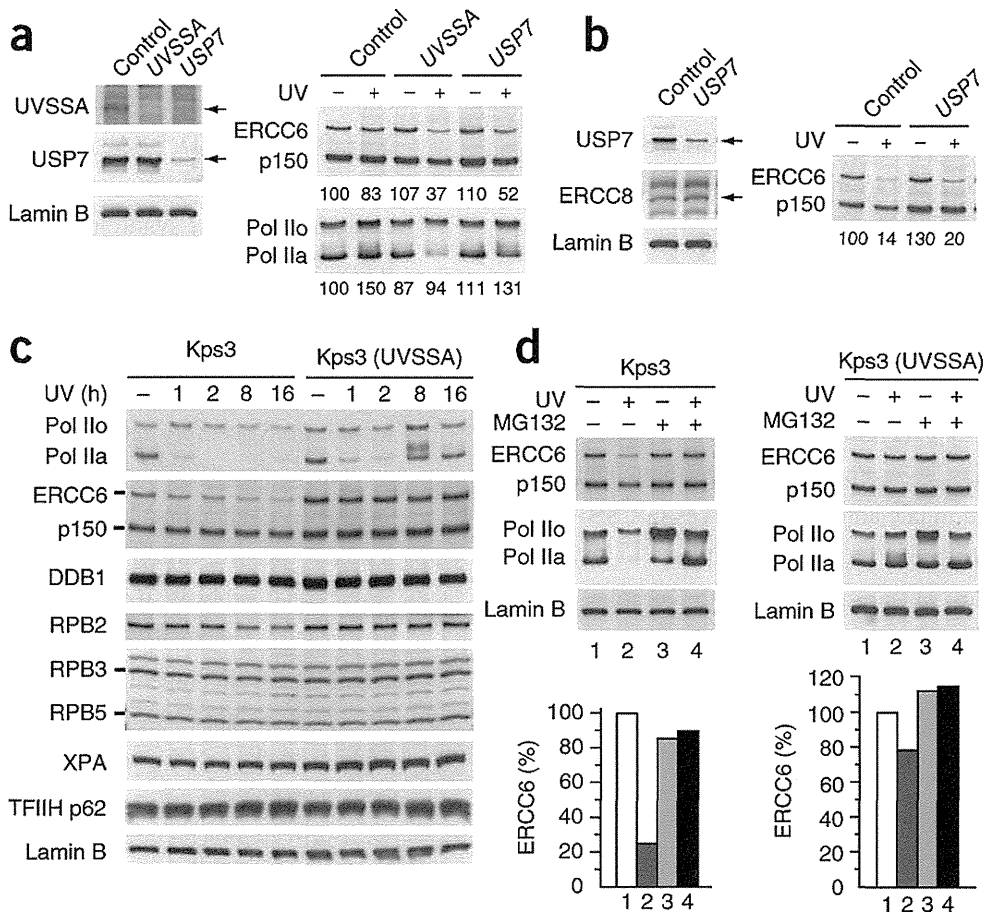


図3 親 Kps3 細胞と UVSSA cDNA を導入し正常化した Kps3 細胞における、紫外線照射後の ERCC6 (CSB) タンパク質の安定性と低リン酸化型 RNA ポリメラーゼ II の回復
 a) UVSSA、USP7 をそれぞれノックアウトした正常ヒト細胞における ERCC6 (CSB) 及び RNA ポリメラーゼ II の紫外線照射 8 時間後のタンパク質量
 b) USP7 をノックアウトした Kps3 細胞における ERCC6 (CSB) の紫外線照射 8 時間後のタンパク質量
 c) 親 Kps3 細胞と UVSSA cDNA を導入し正常化した Kps3 細胞における、紫外線照射後の ERCC6 (CSB) タンパク質の安定性と低リン酸化型 RNA ポリメラーゼ II の量
 d) 親 Kps3 細胞と UVSSA cDNA を導入し正常化した Kps3 細胞における紫外線照射 8 時間後の ERCC6 (CSB) タンパク質の安定性と低リン酸化型 RNA ポリメラーゼ II の量を、プロテアソーム阻害剤の有無で比較

E. 結論

TCR に関与する新規遺伝子 *UVSSA* の突然変異により紫外線高感受性症候群を発症する。*UVSSA* は USP7 と複合体を形成し、CSB の脱ユビキチン化、安定化ひいては低リン酸化 RNA Pol II の回復に関与し、転写の再開に働く。XPF は染色体分配に関する新規機能を持ち、XP-E 及び XFE 患者はその異常を持ち、XP-E 及び XFE 患者の病態に染色体分配の異常が関与することを示唆した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

(G-1) 論文発表

1) Xue Zhang, Katsuyoshi Horibata, Masafumi Saijo,

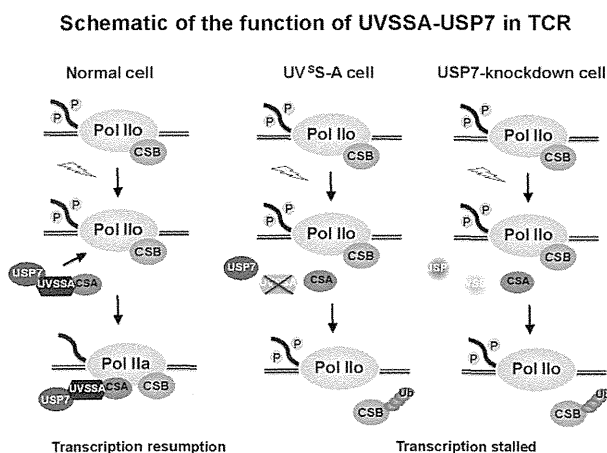


図4 TCR における UVSSA-USP7 複合体の役割：モデル

Chie Ishigami, Akiko Ukai, Shin-ichiro Kanno, Hidetoshi Tahara, Edward G. Neilan, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Akira Yasui and Kiyoji Tanaka. Mutations in KIAA1530/UVSSA cause UV-sensitive syndrome destabilizing ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nature Genetics*, 44, 593-597, 2012.

- 2) Arnold D. Bailey, Lucas T. Gray, Thomas Pavelitz, John C. Newman, Katsuyoshi Horibata, Kiyoji Tanaka, Alan M. Weiner. The conserved Cockayne syndrome B-piggyBac fusion protein (CSB-PG-BD3) affects DNA repair and induces both interferon-like and innate antiviral responses in CSB-null cells. *DNA Repair*, 11, 488-501, 2012.
- 3) 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. *Genes to Cells*, 17, 173-185, 2012.

(G-2)学会発表

- 1) Kiyoji Tanaka. "Mechanism and disorders of transcription-coupled repair", 3rd Erling Seeberg Symposium, June 19-24, 2012, Trondheim and Ørland, Norway.
- 2) Kiyoji Tanaka. "Mutations in KIAA1530/UVSSA cause UV-sensitive syndrome destabilizing ERCC6

in transcription-coupled DNA repair", DNA Repair Mini-symposium Featuring Eminent Japanese Scientists, April 10, 2012, Natcher Conference Center, NIH, Bethesda, MD, USA.

- 3) Kiyoji Tanaka. "Mutations in KIAA1530/UVSSA cause UV-sensitive syndrome destabilizing CSB in transcription-coupled DNA repair" The 4th US-Japan DNA Repair Meeting, April 11-14, 2012, National Conference Center, VA, USA.
- 4) Mineaki Seki and Kiyoji Tanaka. "MMS19 is a cytosolic Fe-S assembly factor required for genomic integrity", The 8th 3R Symposium, November 25-28, 2012, Awaji Yumebutai, Hyogo, Japan.
- 5) Yooksil Sin, Masafumi Saijo and Kiyoji Tanaka. "Functional analysis of CSB in transcription-coupled repair", The 8th 3R Symposium, November 25-28, 2012, Awaji Yumebutai, Hyogo, Japan.
- 6) 申 育實、西條将文、田中亀代次「転写と共役したヌクレオチド除去修復機構におけるCSBの機能解析」第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日～14日、福岡

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 |

色素性乾皮症の神経障害重症度分類に関する研究

研究分担者 荏田典生 神戸大学特命教授

研究要旨

A 群色素性乾皮症において、病期の進行を定量的に評価するための重症度分類を構築する目的で、試案を作成した。XPA 患者 7 名に適応し、その妥当性についても考察を加えた。

A. 研究目的

皮膚癌に対する予防や治療法が進歩した近年では、A 群色素性乾皮症における神経障害の進行が日常生活や生命予後を規定する。現在、神経障害に対する治療法は確立していないが、将来、治療薬開発において、障害度の定量的な評価方法の構築が不可欠である。

B. 研究方法

神経症状について、Section 1（日常生活障害度）13 項目、Section 2（神経所見）13 項目、Section 3（高次機能）2 項目について、正常（0）～機能廃絶（4）までの 5 段階評価法を作成した。また全体障害度（1～5 度）についても評価した。これらの項目の妥当性について、A 群色素性乾皮症 8 例で実際に評点し、検証した。

（倫理面への配慮）

評価は通常の診療行為の中で行い、趣旨については患者ならびにその保護者に説明し、同意を得た。

C. 研究結果

Section 1 は 5～51 点、Section 2 は 8～45 点、Section 3 は 0～8 点に分布し、Section 1 と 2 の間には良好な相関が得られた。全体障害度は 1 度～5 度であった。年齢とともに重症度が悪化する傾向は確認できたか、個々の項目では、年齢と障害度の間には解離が見られる項目もあった。

また、全体障害度と Section 1 には良好な関連を認めたが、Section 2 とは必ずしも合致しない症例が

みられた。

D. 考察

今回の重症度分類により、障害の進行度を定量的に評価することか可能となった。しかし、XPA には発達障害と退行性変化の両面があるため、乳幼児期の障害については、別の尺度を用いることが必要である。また、紅斑や癌などの悪性腫瘍の出現状況や、眼症状なども組み合わせた包括的な重症度分類の作成が必要と思われた。

E. 結論

A 群色素性乾皮症における重症度分類を提唱した。今後もさらなる改良が必要であることが判明した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirafuji T, Kanda F, et al: Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis with esophageal small cell carcinoma. Intern Med. 2012; 51(17): 2423-7
- 2) Sekiguchi K, Kanda F, et al. Fibrillation potentials of denervated rat skeletal muscle are associated with expression of cardiac-type voltage-gated sodium channel isoform Nav1.5. Clin Neurophysiol 2012; 123: 1650-5

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし