

E. 結論

XP 疑いの患者に対する、EdU/EU 解析、ウイルス相補性試験、ゲノム解析による臨床診断は、非常に有効である。また、各患者の確定診断を実施することで、病状悪化のリスク軽減に役立つ事が可能である。

F. 健康危険情報

(委託業務成果報告(業務項目)には記入せず、委託業務成果報告(総括)にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

(*corresponding author)

Jia N, Nakazawa Y, Guo C, Shimada M, Sethi M, Takahashi Y, Ueda H, Nagayama Y & Ogi T.*

A rapid comprehensive assay system for DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA damaging reagents by measuring unscheduled DNA synthesis and recovery of RNA synthesis after DNA damage.

Nature Protocols 10: 12-24 (2015)

Baple E. L., Chambers H., Cross H. E., Fawcett H., Nakazawa Y., Chioza B. A., Harlalka G. V., Mansour S., Sreekantan-Nair A., Patton M. A., Muggenthaler M., Rich P., Wagner K., Coblentz R., Stein C. K., Last J. I., Taylor A. M., Jackson A. P., Ogi T., Lehmann A. R., Green C. M. & Crosby A. H.

Hypomorphic PCNA mutation underlies a human DNA repair disorder.

Journal of Clinical Investigation 124: 3137-3146 (2014)

2. 学会発表

第37回日本分子生物学会年会 中沢由華ら「放射線感受性および各種発達異常を示す遺伝性疾患の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析」横浜 2014年11月

第37回日本分子生物学会年会 Chaowan Guo *et al.* 「Molecular and functional study on the initiation of transcription coupled nucleotide excision repair」横浜 2014年11月

第37回日本分子生物学会年会 唐田清伸ら「転写と共役したヌクレオチド除去修復の *in vitro* 反応系の構築」横浜 2014年11月

第37回日本分子生物学会年会 宮崎仁美ら「コケイン症候群様の臨床症状を示す遺伝性疾患の責任遺伝子探索」横浜 2014年11月

第37回日本分子生物学会年会 嶋田繭子ら「エキソーム解析を用いたDNA修復機構欠損性疾患の新規責任遺伝子の探索」横浜 2014年11月

3R Symposium Program. Tomoo Ogi 「Molecular cloning and characterisation of new human DNA repair genes」御殿場 2014年11月

3R Symposium Program. Chaowan Guo *et al.* 「Molecular characterization and functional analysis of XRCC4, a novel pathological gene for radiation sensitivity and developmental abnormalities」御殿場 2014年11月

3R Symposium Program. Yuka Nakazawa *et al.* 「ERCC1/XPF deficiency causes three NER-deficient disorders: a patient with various symptoms of xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and Fanconi anemia」御殿場 2014年11月

第57回日本甲状腺学会学術集会 招待講演 荻朋男 「ゲノム不安定性疾患群の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析」大阪 2014年11月

第87回日本生化学会大会 シンポジウム 荻朋男 「ヒストン H3K9 メチル化酵素類のDNA二重鎖切断修復反応への関与」京都 2014年10月

日本放射線影響学会第57回大会 ワークショップ 荻朋男 「転写共役ヌクレオチド除去修復の開始反応の分子機構」鹿児島 2014年10月

第20回日本家族性腫瘍学会学術集会 教育講演 荻朋男 「DNA修復機構の異常により発症する先天性疾患とゲノム不安定性/発がん」福島 2014年6月

第10回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス 中沢由華ら「新規小頭症/放射線感受性症責任遺伝子の同定と機能解析」長崎 2014年5月

International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases 国際学会・招待講演 Ogi Tomoo 「Transcription, DNA damage and Repair」神戸 2014年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1. 特許取得

日本国特許

発明者: 荻 朋男、シリパン リムシリチャイクル、

中沢 由華、山下 俊一
特許出願人：長崎大学
名称：損傷DNA修復物質のスクリーニング法
番号：特許第5549908号
登録日：平成26年5月30日

米国特許出願
発明者：萩 朋男、シリパン リムシリチャイクル、
中沢 由華、山下 俊一
特許出願人：長崎大学
名称：損傷DNA修復物質のスクリーニング法
番号：12/656,408
出願日：平成22年1月28日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分子シミュレーション解析

担当責任者 高岡 裕 神戸大学医学部附属病院 准教授

研究要旨

XPタンパク質の *in silico* 分子シミュレーション解析により、分子レベルで病態を明らかにすることを目標に、まずは解析系を確立する。具体的には、正常XPタンパク質と変異XPタンパク質を、ATP結合部位やDNA結合部位の静電ポテンシャル、ATPとのドッキング解析などにより解析することで、疾患発症のメカニズムを解明する。

高岡 裕・神戸大学医学部附属病院 准教授

A. 研究目的

XPタンパク質の正常型構造から変異型の立体構造解析を分子シミュレーション解析する。初年度は最も計算時間を要する分子動力学計算による構造最適化の解析系を立ち上げ、次年度には正常型と変異型XPタンパク質の原子座標の比較、ATP結合部位とDNA結合部位の静電ポテンシャル、ATPのドッキング解析系を確立し、疾患発症のメカニズム解明に取り組む。最終年度には治療薬の候補分子探索系も確立する。具体的には、PubChem、ChemIDPlus、ChemSpider等に登録の分子からドッキングと誘導適合解析で選択可能な、パイプライン化された解析系の確立を目指す。

B. 研究方法

分子シミュレーション解析系は、本予算で整備する解析用高速計算機で、分子動力学計算のソフトNAMD(無料)と統合計算科学システムMolecular Operating Environmentを利用し立ち上げる。

本研究は計算機による分子シミュレーションであり、倫理面への配慮は特に必要ない。

C. 研究結果

本予算で整備した解析用高速計算機で、分子動力学計算のソフトNAMDによる構造最適化解析が可能になった。また解析の更なる高速化に向けて、神戸大学の π コンピュータ(スパコン「京」の兄弟機)で解析可能な分子動力学計算ソフトのGromacs(無料)を、本予算で整備した解析用高

速計算機で使用可能にした。NAMDとGromacsでそれぞれ解析した変異体タンパク質の構造に、大きな差異は無かった。

D. 考察

次年度は、 π コンピュータ上でのGromacsによる解析を可能にして、京コンピュータでの解析に道を拓く。なお、 π コンピュータによる解析結果が、これまでと同様であればGromacsの利用が可能といえる。

E. 結論

XPタンパク質の *in silico* 分子シミュレーション解析が可能な解析系を立ち上げた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

高岡 裕、三浦研爾、大田美香、菅野亜紀：分子シミュレーション解析を基盤としたUGT1A1抱合能の数理モデル。(生化学 86・184頁・2014年)

H. 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

生化学的検討による色素性乾皮症の新規治療標的の探索

担当責任者 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) は紫外線誘発DNA損傷の修復異常による皮膚症状を特徴とする一方、XP-A群の精神神経症状に代表されるように、DNA修復との関連が明らかでない原因不明の病態をしばしば合併する。このような病態を理解し、治療法の開発につなげるためには、従来明らかにされていないXP遺伝子産物の新たな機能について検討する必要がある。この目的のため、二重タグを融合したXP責任遺伝子産物を培養細胞、あるいはマウス個体で発現させ、生化学的に精製したタンパク質複合体の構成成分を質量分析により同定する。特に、XPの病態と関連した組織特異的な機能を探索するため、複合体精製の材料としてマウス組織のほか、iPS細胞の分化誘導系を利用する。

A. 研究目的

色素性乾皮症 (XP) の責任遺伝子産物のうち、*XPA*~*XPG* の 7 つは主要な DNA 修復経路の一つであるヌクレオチド除去修復 (NER)、*XPV* は損傷乗り越え DNA 複製の分子機構にそれぞれ関与し、紫外線誘発 DNA 損傷による突然変異と皮膚がんの抑制に寄与する。一方、本邦の多くの XP-A 群患者が示す進行性の精神神経症状のように、単純に DNA 損傷の修復異常のみで説明することが困難な症例も少なくない。実際、*XPB* および *XPD* 遺伝子産物は基本転写に必須な TFIIH 複合体の構成成分であり、これらの遺伝子の変異は、NER と基本転写の欠損のバランスにより、きわめて多様で複雑な病態を発現しうることが明らかにされてきた。

XP 患者が示す、皮膚がん以外の原因不明の病態を理解し、治療法の開発につなげるためには、DNA 修復異常と病態との関係を引き続き検討する一方で、XP 責任遺伝子産物が未知の機能をあわせ持つ可能性を考慮する必要がある。本研究では、生化学的手法により XP 責任遺伝子産物を含むタンパク質複合体を単離・精製し、その構成成分を網羅的に同定することで、従来知られていなかった当該遺伝子産物の機能を探るとともに、治療標的としての可能性を検討することを目的とする。特に、一般的に用いられてきたがん細胞株だけでなく、iPS 細胞や遺伝子改変マウスを利用して、症状に関連した特定の組織における相互作用因子を同定することにより、病態の理解と新規

治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

XP 責任遺伝子産物を含むタンパク質複合体の単離・精製は、HA-FLAG 二重タグを用いたタンデム・アフィニティークロマトグラフィーによって行った。ヒト *XPA* および *DDB2* (*XPE*) 遺伝子を FLAG タグ、PreScission プロテアーゼ認識配列、HA タグと順次融合したものを、レトロウイルス・ベクターにより HeLa 細胞で発現させた。細胞抽出液を抗 HA 抗体カラムに通し、PreScission プロテアーゼによって HA タグを切り離すことで溶出した画分を、さらに抗 FLAG 抗体カラムに通した。FLAG ペプチドで溶出された画分に含まれるタンパク質を質量分析により同定した。一方、HA-FLAG 二重タグを融合したヒト *XPA* 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作製は、pCAG1.1 ベクターを用いて行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、神戸大学動物実験委員会の承認を得た上で、同委員会の指針に従って必要最小限の動物数を使用するとともに、処置にあたってはできるだけ苦痛を与えないように配慮している。

C. 研究結果

DDB2 遺伝子産物は紫外線誘発 DNA 損傷の認識に加えて、がん抑制遺伝子産物 p53 の機能制御やアポトーシス誘導など、多彩な機能を持つこと

が示唆されており、そのシグナル経路の解明は病態の理解に重要である。HA-FLAG 二重タグを C 末端に融合したヒト DDB2 タンパク質を HeLa 細胞で安定発現させ、タンデム・アフィニティークロマトグラフィーによって、比較的穏和な条件で DDB2 を含む複合体の精製を行った。得られた複合体を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により展開し、レーン全体を 30 程度の領域に切り分けて、質量分析により網羅的にタンパク質の同定を行った。その結果、DDB1 や CUL4A などの既知相互作用因子に加え、細胞内代謝経路やクロマチンリモデリングに関わる新たな因子が見出された。

一方、HeLa 細胞および XP-A 群患者由来線維芽細胞株 (XP2OSSV) を親株として、HA-FLAG 二重タグを N 末端に融合したヒト XPA タンパク質を安定発現する形質転換細胞株を作製した。これまでに FLAG タグのみを用いた小スケールの複合体精製を試み、既知相互作用因子である一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA のほか、ヒストンを含むさまざまな因子を検出している。さらに、XP-A 群患者が示す精神神経症状を考慮して、神経組織における XPA 相互作用因子の探索を行う目的で、HA-FLAG 二重タグを融合したヒト XPA 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した。現在、このトランスジェニックマウスの神経組織における XPA の発現確認を進めている。

D. 考察と結論

HA-FLAG 二重タグを融合したヒト DDB2 および XPA タンパク質をまずは培養細胞レベルで発現し、生化学的な複合体精製から質量分析によるタンパク質同定に至るシステムの有効性が確認できた。今後、トランスジェニックマウスの神経組織から XPA タンパク質を含む複合体の精製と構成成分の同定、さらに HeLa 細胞から精製した複合体との比較検討を行う予定である。また、XP 患者由来線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を親株として、二重タグを融合した XP 責任遺伝子で相補した細胞株を作製し、これをさまざまな組織に分化させたものから複合体を精製する実験を計画している。

E. 健康危険情報

F. 研究発表

1. 論文発表

Kikuchi, Y., Umemura, H., Nishitani, S., Iida, S., Fukasawa, R., Hayashi, H., Hirose, Y., Tanaka, A., Sugawara, K., and Ohkuma, Y.: Human mediator MED17 subunit plays essential roles in gene regulation by associating with both transcription and DNA repair machineries. *Genes Cells in*

press.

Matsumoto, S., Fischer, E.S., Yasuda, T., Dohmae, N., Iwai, S., Mori, T., Nishi, R., Yoshino, K., Sakai, W., Hanaoka, F., Thomä, N.H., and Sugawara, K.: Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *Nucleic Acids Res.* in press.

2. 学会発表

岸本藍子、赤木純一、松井豪志、酒井 恒、菅澤 薫：紫外線損傷修復における XPC タンパク質の脱ユビキチン化機構の解析 日本遺伝学会第 86 回大会 長浜 9 月 (2014).

菅澤 薫：紫外線誘発 DNA 損傷修復の細胞内制御機構 日本放射線影響学会第 57 回大会 鹿児島 10 月 (2014).

松本翔太、Eric S. Fischer, Nicolas H. Thomä, 菅澤 薫：ヌクレオチド除去修復における XPC と DDB2 の機能的相互作用 第 87 回日本生化学会大会 京都 10 月 (2014).

Sugawara, K.: Post-translational modifications coordinating recognition and repair of UV-induced DNA damage. The 5th Japan-US DNA Repair Meeting, Naruto, Japan, October (2014).

Kishimoto, A., Akagi, J., Matsui, T., Matsumoto, S., Sakai, W., and Sugawara, K.: Studies on the de-ubiquitination mechanism of the xeroderma pigmentosum group C protein. The 9th 3R Symposium. Gotemba, Japan, November (2014).

Matsumoto, S., Fischer, E.S., Thomä, N.H., Sugawara, K.: Functional interactions between XPC and DDB2 in nucleotide excision repair. The 9th 3R Symposium. Gotemba, Japan, November (2014).

秋田眞季、松本翔太、井倉 毅、酒井 恒、菅澤 薫：翻訳後修飾を介した色素性乾皮症遺伝子産物の機能制御 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜 11 月 (2014).

松本翔太、Fischer, E. S., Thomä, N. H., 酒井 恒、菅澤 薫：DNA 損傷応答における DDB2 の翻訳後修飾の機能解析 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜 11 月 (2014).

Sugawara, K.: In vivo regulation of mammalian nucleotide excision repair. Gordon Research Conference on Mammalian DNA Repair. Ventura, U.S.A., February (2015).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

色素性乾皮症患者iPS細胞の樹立と症状が発現する細胞への分化誘導の開発に関する研究

担当責任者 青井 貴之 神戸大学大学院医学研究科 特命教授

研究要旨

色素性乾皮症の患者由来 i P S 細胞を樹立・使用するため、学内倫理委員会等の手続きを行うと共に、技術的基盤整備を行った。

複数の色素性乾皮症症例の体細胞から、それぞれ複数株のiPS細胞を樹立することに成功した。

色素性乾皮症の症状が発現する皮膚細胞および神経細胞への分化誘導法の検討を行い、それらの細胞の分化マーカーを発現する細胞が再現性をもって得られた。

A. 研究目的

色素性乾皮症(Xeroderma Pigmentosum; XP)は光線過敏と原因不明の進行性の神経症状をきたす稀少難治性遺伝疾患で、患者数は500名以下と見積もられているが、その約60%に合併する神経症状に関しては治療法がない。本研究では(1)病態解明により、XPで欠損する機能を薬物で補う、(2)原因遺伝子産物の機能を回復させる治療の開発研究を行う。

遺伝子異常に起因し、皮膚と神経という異なる器官の異常を示すXPは①分化多能性、②無限増殖能、③様々な個人から樹立が可能、というiPS細胞の3つの要素を有効に活用できる疾患の一つである。そこで、XP患者由来iPS細胞を樹立し、これを、XPの症状が出現する細胞である皮膚細胞および神経細胞へと分化誘導を行うことで、病態解析および治療開発の基盤形成を行うことを目的とする。

B. 研究方法

XP由来iPS細胞を樹立し使用するために倫理委員会による審査等の学内手続きを行う。また、患者体細胞培養からiPS細胞樹立とその特性解析にいたる一連の技術プラットフォームを確立する。さらに、iPS細胞からの神経および皮膚細胞への分化誘導を行い、それぞれの細胞種のマーカー遺伝子発現等で分化細胞の特性評価を行う。

(倫理面への配慮)

研究推進にあたっては人権保護・擁護、個人情報保護、動物愛護について十分留意し、個人情報

保護法、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成25年文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第1号)、世界医師会の各種宣言などに基づいて研究を推進する。

C. 研究結果

XP患者由来iPS細胞を作製するために必要な、学内倫理委員会等の手続きを行った。また、医薬基盤研究所JCRB生物資源バンクより、XP患者由来細胞を入手する手続きを行った。

患者由来iPS細胞を、様々な方法で樹立する技術基盤の構築を完了した。具体的には以下の方法の全ての組み合わせでのヒトiPS細胞樹立を実施した。(1)由来細胞：末梢血単核球および皮膚線維芽細胞；(2)初期化因子導入法：エピソーマルプラスミドベクターおよびセンダイウイルスベクター；(3)培養条件：フィーダー細胞上およびフィーダー細胞なし。樹立されたiPS細胞について、形態、未分化マーカー遺伝子の発現、3胚葉系への分化能力と、導入遺伝子の残存の有無の評価を行った。

複数のXP症例と健常対象者から、それぞれ複数株のiPS細胞の樹立に成功した。樹立されたiPS細胞の特性解析の結果、分化誘導および分化細胞を用いた病態解析・治療開発研究に供するものとして適格な品質を有していることが確認された。

iPS細胞から皮膚および神経細胞への分化誘導を行い、得られた細胞の特性評価を行った。既報の方法を参考に最適な分化誘導条件を検討した

結果、皮膚と神経それぞれの分化マーカーを発現する細胞を高効率に再現性を持って得ることに成功した。

D. 考察

現在、ヒト iPS 細胞の樹立・維持にかかる様々な方法が報告されており、このような方法の違いが分化特性を含む iPS 細胞の性質に影響を与える可能性も否定し得ないことが示唆されている。そこで、XP の病態解析・治療開発に最適な iPS 細胞をより確実に作成するために、今回我々は 8 通りの方法で行える技術基盤を確立したことには意義があると考えられる。

疾患によっては、患者由来 iPS 細胞の樹立が健常人由来のそれと比較して困難であるものも存在している。XP 患者由来の iPS 細胞樹立が健常人と同様に可能であるかという点は懸念事項であったが、問題なく樹立できることが再現性をもって明らかになった。したがって、XP の病態解明と治療法の開発に関する研究において iPS 細胞を用いることは妥当かつ有用であることが確認されたということができ、今後の進捗は大きく期待し得るものである。

iPS 細胞から目的細胞への分化誘導については、近年極めて多くの技術が報告されている。それぞれについて、報告者以外の研究室における再現性やプロトコールの頑強性は様々であり、個々の研究室で目的に沿って検証することが重要である。今回我々は、iPS 細胞から、XP の症状が現れる細胞である皮膚および神経細胞への高効率かつ安定に分化させることに成功した。iPS 細胞は無限増殖能と多分化能があるのみならず、遺伝子の強制発現や発現抑制、あるいはレポーターの導入などの遺伝子工学的操作を加えることが容易であるので、従来の研究材料であったヒト線維芽細胞や病態モデルマウスと比較して、XP 患者 iPS 細胞由来ヒト皮膚/神経細胞は XP の病態解明・治療開発における強力なツールとなると期待される。

E. 結論

XP 患者由来 iPS 細胞と対象健常人由来 iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞から神経および皮膚分化マーカーを発現する細胞を高効率かつ安定に分化誘導することができた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
特記すべきことなし。
2. 学会発表

特記すべきことなし。

(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。)

1. 特許取得
特記すべきことなし。
2. 実用新案登録
特記すべきことなし。
3. その他
特記すべきことなし。

疾患モデルでのXPA遺伝子導入による治療法に関する研究

研究分担者 国定 充 神戸大学大学院医学研究科 助教

研究要旨

XP-Aの疾患モデルであるXP-Aアルビノヘアレスマウスを用いてXPAにおける重要な発癌に至る重要な因子・遺伝子を探索し、その遺伝子を導入、あるいは抑制因子を投入し、結果的に紫外線皮膚発癌が抑制されるかどうかを検討し、同様結果がXP-A患者において効果を呈するか臨床応用を想定した実験を計画する。特に紫外線を受ける細胞として表皮細胞を対象とし、同細胞の初代培養が難しい部分をXP-A患者線維芽細胞より樹立したiPS細胞より表皮細胞に分化させ、それを用いて患者での実験検証を行う。

A. 研究目的

紫外線による色素性乾皮症 (XP) 患者には若年時より皮膚腫瘍、特に皮膚がんを発症する。特にその形質が強く現れるのは色素乾皮症 A 群 (XP-A) であるがそのマウス疾患モデルである XP-A アルビノヘアレスマウスでも同様形質が再現され、動物実験の結果によりヒトへの応用が期待できる。また XP-A においては紫外線照射後同部位の皮膚が著明に炎症を起こしまたその反応が遷延することが特徴である。よって高紫外線発癌の形質が紫外線照射の皮膚の高度の炎症反応の遷延化と何らかの結びつきがあるのではないか、またそのメカニズム、特に炎症に関連するような遺伝子を同定、コントロールすることにより皮膚がん発症を抑えられないかという仮説を元に実験し、その結果をヒトで応用できないかの検討も目的とする。それらの対象となる細胞は皮膚の表皮角化細胞で通常それらをマウス、ヒト、いずれであっても初代培養するのが非常に困難とされているため、マウス、ヒト (患者) より採取した線維芽細胞より induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を作成し、それより表皮角化細胞に分化させその細胞を用いて解析を行うことも研究目的とする。

B. 研究方法

B-1. XP-A マウスを用い、まず紫外線による皮膚の炎症反応における解析を行う。紫外線照射後の遺伝子の発現の変化を網羅的に捉え、XP-A マウスで野生型と比較して有意に上昇 (下降) する遺伝子を同定する。同定後、その遺伝子の中和抗体あ

るいは遺伝子組み換え体などをマウスに投薬し、その上で紫外線照射後の炎症反応がいかに調節できているかを検討する。炎症反応が例えば抑制することができればそれらの試薬投与下において紫外線を長期間、慢性的にマウスに照射し、野生型にも同様照射を施行しそれらと比較して皮膚腫瘍発生数、あるいは発生時期などに違いが出てくるかを検討解析する。皮膚腫瘍発現抑制効果が得られれば B-2 へと移行し、認められなければ B-1 での最初の実験での有意な遺伝子は複数あるので次の候補遺伝子を選定し、結果的に皮膚腫瘍発生抑制が認められるまで同様実験を繰り返す。B-2. B-1 においてマウス特異的の中和抗体を用いた結果をヒトに応用できるかを検討する。マウスの時と同ように患者より単離した線維芽細胞より樹立した iPS 細胞より表皮細胞に分化させヒトでもマウスの実験結果が再現できるか検討する。再現できればヒトでの臨床応用の可能性を示唆する結果となる。

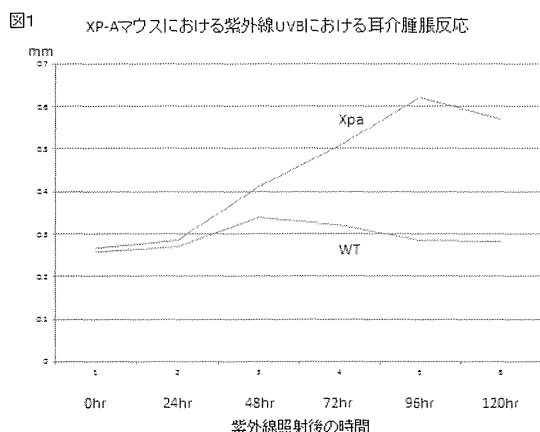
(倫理面への配慮)

研究推進にあたっては人権保護・擁護、個人情報保護、動物保護について十分留意し、個人情報保護法、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針、世界医師法の各種宣言などに基いて研究を推進する。遺伝子解析研究では法規およびガイドラインに沿った十分なインフォームド・コンセントの取得や患者の遺伝子情報の保護などの対策をとって個人情報、人権擁護に万全を期する。“次世代シーケンサーによる遺伝性光線過敏症システムの構築と病態解析は平

成 23 年に本研究科遺伝子解析研究倫理審査医員会の承認を得ている (No. 77)。

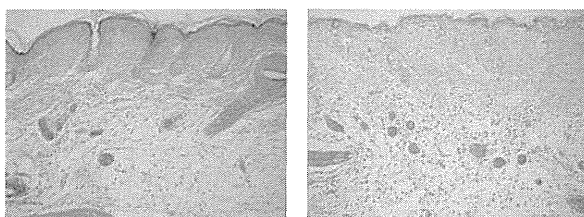
C. 研究結果

C-1. まず紫外線照射により如何に野生型と XP-A マウスでの炎症反応に違いがあるかを、マウス耳介腫脹を測定し、比較した。UVB 光源を $1\text{kJ}/\text{m}^2$ マウスの背部に照射し経時的に測定した (図 1)。マウスの耳介は野生型では照射後 48 時間後に耳介腫脹がピークになるのに対し、XP-A マウスでは腫脹は 48 時間後も続き 96 時間後にピークを向かえ、いわゆるヒトにおける炎症反応の遷延と同じ反応が認められることを確認し、また設定した UVB の線量での耳介腫脹のピーク時間を把握した。



C-2. 照射後 48 時間後でのマウス背部皮膚での病理組織学的変化を検討した。C-1 と同線量でマウス背部に照射後、48 時間後に皮膚を採取し、ホルマリン固定、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色にて野生型および XP-A マウスにて比較した。48 時間後では野生型では表皮は肥厚する傾向を認めるのに比較し、XP-A マウスでは表皮は萎縮、個別細胞壊死も多く認めた。真皮においては XP-A マウスにおいて浮腫が著明で真皮の下層から脂肪組織においては炎症細胞浸潤が著明であった。それらの細胞は主に好中球が主体でリンパ球が混在していた (図 2)。

図2 48hr 野生型 XP-Aモデルマウス



C-3. 48 時間後で著明な炎症変化の違いが確認できたので、48 時間後の皮膚における遺伝子発現の変化、mRNA レベルでの違いを網羅的に捉えるため、野生型マウスと XP-A マウス皮膚より RNA を抽出し、それらを用いてマイクロアレイ法により解析した。まず個々の遺伝子を抽出する前にいかなる遺伝子群が主体として XP-A マウスにおいて有意に働いているかをパスウェイ解析により群抽出を行った (表 1)。その結果、すべてのパスウェイのなかで炎症関連遺伝子群のいくつかが有意に野生型と比較して認め、炎症という因子が著明に紫外線照射後の遺伝子変化において起きているということが分かった。現在、如何なる個々の遺伝子が XP-A マウスにおいて紫外線後に誘導されているか同定し、その遺伝子の中和抗体をマウスに投与する実験などを施行している。さらにヒト XP-A 患者の表皮細胞においてマウスと同様の炎症反応関連遺伝子の変化が起きるか、またそのメカニズムを XP-A 患者由来のヒト表皮角化細胞を得るため、XP-A 患者より単離した線維芽細胞より iPS 細胞を樹立しているのでそれらを用いて現在表皮角化細胞に分化させる実験を行っている。

表1

| Pathway Name | Changed Genes | Total Genes | Z score | P-value |
|-------------------------------------|---------------|-------------|---------|---------|
| Senescence and Autophagy | 9 | 92 | 4.866 | 0.00032 |
| Inflammatory Response Pathway | 5 | 29 | 5.44 | 0.00078 |
| Chemokine signaling pathway | 11 | 167 | 3.773 | 0.00161 |
| Cytokines and Inflammatory Response | 4 | 27 | 4.399 | 0.00439 |
| Focal Adhesion | 10 | 173 | 3.126 | 0.00639 |
| Insulin Signaling | 9 | 147 | 3.161 | 0.00681 |
| IL-6 signaling Pathway | 6 | 93 | 2.728 | 0.021 |
| Matrix Metalloproteinases | 3 | 27 | 3.102 | 0.02731 |

D. 考察

炎症と発癌の関係については現在多くの研究者が注目している分野で大腸癌抑制にアスピリンの長期内服が有効というものもすでに報告されている。一方、紫外線による皮膚における炎症反応は誰も経験するものではあるが、それが結果的に発癌に結びつくものかどうかという点においては詳細に検討された報告はまだ認められない。実際 XP-A 患者では激しい紫外線による炎症反応およびその遷延化を認め、それらの反応により XP-A と診断されることも多い。XP-A 患者が遮光を怠ると小学生時迄に顔面を中心に皮膚がんが多発してくる。XP-A における発癌機構で明らかになっているのは紫外線照射後に生じるピリミジン二量体と呼ばれる DNA 損傷が修復 (ヌクレオチド除去修復) されないことによって遺伝子変異を引き起こし発癌に至るといものであるが、そ

れとは別にあるいは何らかの経路で結びつく形で炎症反応が発癌形成に関与していることは考えられる。その関与する遺伝子を制御することにより発癌を抑制できれば、XP-A 患者に対しての皮膚癌発症の予防的治療にも応用できる可能性にもつながる。また未だ解決されていない重要な疑問は、そもそも紫外線による DNA 損傷を修復できないことにより何故非常に強い炎症反応が誘導されるかということである。そのメカニズムについては現在のところ何も明らかにはなっていないが、遺伝子の DNA の損傷の認識の違いによる修復機構に関係することが考えられる。XP の中でも XP-A 群や XP-D 群、またコケイン症候群 (CS) など transcription coupled nucleotide excision repair (TCR-NER) が障害されている患者では、共通して紫外線曝露後に炎症反応が遷延化する。逆に全ゲノムの認識をすることによって修復を行うおうとする global genomic NER (GGR-NER) のみが低下して TCR の低下がみられない XP-C 群、NER は正常で損傷乗り越え複製に障害に障害のある XP-V 型患者においては原則そのような遷延化は起こらない。ただ TCR と GGR 共に障害される XP-A や XP-D では発癌が生じるが TCR のみ欠損する CS では発癌は生じない。さらに紫外線照射後の炎症反応の遷延化が認められない XP-V 型患者などでは紫外線発癌が好発するなど修復機構の差だけでは炎症反応の違い、あるいは発癌との結びつきは説明できない。今後これらのメカニズムを詳細に検討するためにも当研究計画における XP-A 患者からの iPS 細胞樹立およびそれらから表皮細胞に分化させることを遂行することによって成されるものと考えられる。

E. 結論

XP-A マウスにおいて紫外線照射後の炎症反応は視覚的、病理組織学的に確認できた。また遺伝子のレベルでもマイクロアレイ法にて網羅的に解析を行った結果、炎症反応関連遺伝子のグループが多く野生型よりも有意に認められ、ここでも炎症反応が重要であることが確認できた。今後はこの炎症反応で重要な遺伝子をさらに絞り込んで抽出し、それらの遺伝子をコントロールすることによって XP-A マウスにおいて炎症反応が抑えられ、結果的に紫外線で誘導される皮膚癌の発生を抑えられるかどうかの検討を行い、メカニズム解明において XP-A 患者線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、その後表皮細胞に分化させてそれらを用いて細胞レベルでのメカニズムの解析・検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Kunisada M, Yogi anti F, Sakumi K, Ono R, Nakabeppu Y, Nishigori C

Inflammatory response is closely related to versican overexpression in UVB/reactive oxygen species-induced skin tumorigenesis
Am J Pathol 179(6); 3056-65, 2011

Yogi anti 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); 637-43, 2012

Kunisada M, Masaki T, Ono R, Morinaga H, Nakano E, Yogi anti F, Okunishi K, Sugiyama H, Nishigori C

Hydrochlorothiazide enhances UVA-induced DNA damage
Photochem Photobiol 89(3); 649-54, 2013

Yogi anti F, Kunisada M, Nakano E, Ono R, Sakumi K, Oka S, Nakabeppu Y, Nishigori C

Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis
J Invest Dermatol 134(10); 2610-19, 2014

2. 学会発表

World Congress of Cancers of the Skin at the Edinburgh

2014年9月15日

Edinburgh, Scotland

Molecular mechanisms of UVB carcinogenesis
国定 充

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

既知薬の神経細胞への有効性の評価に関する研究

担当責任者 林 雅晴 公益財団法人東京都医学総合研究所 脳発達・神経再生研究分野 分野長

研究要旨

本研究では、色素性乾皮症 (XP) 患者において種々の理由で用いられ神経症状を修飾した可能性のある、ならびに基礎研究で神経障害への有効性が示唆された抗酸化薬 (エダラボン)、メラトニン、モノアミン神経作動薬 (少量レボドパ、アリセプトなど) などの既存薬の効果を後方視的・前方視的に検証し、XPの神経症状に対する新規治療法開発に役立てる。平成26年度は、患者尿を用いて酸化ストレスマーカーの日内変動を追究するとともに、少量レボドパ療法に関して全国調査結果とXP-A患者での使用経験を検討した。

A. 研究目的

担当責任者は、A 群色素性乾皮症 (XP) (XP-A) とコケイン症候群 (CS) に関して、剖検脳での免疫組織化学研究、患者髄液・尿での enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を通じて、大脳基底核病変での酸化ストレス、大脳基底核・脳幹のアミン神経の障害、メラトニン代謝異常、喉頭ジストニアに対する少量レボドパ療法の有効性を明らかにしてきた。

本研究では、XP 患者に投与されたことのあるレボドパ等既存薬の神経細胞への効果を検証する。また、先行研究で明らかにしてきた各病態を患者生体試料 (尿、脳脊髄液) と剖検脳において詳細に検討し、既知薬による病態制御の可能性を追究すると同時に、XP 患者で種々の理由で用いられた既知薬に関して、神経症状に対する影響を後方視的に検討する。

平成 26 年度は、酸化ストレスとメラトニン代謝異常との相関、少量レボドパ療法やアセチルコリン作動性塩酸ドネペジルの臨床応用に関する研究を進めた。

B. 研究方法

(1) 酸化ストレス研究: 先行研究により XP 脳での酸化ストレス (Adv Exp Med Biol 2008;637:120-7)、XP 患者でのメラトニン代謝異常 (論文発表③) を明らかにした。XP-A で酸化ストレスとメラトニン代謝との関連を明らかにするため、健常対照の 6 歳未満 2 例、6-15 歳 3 例、15 歳超 2 例と、XP-A 患者の 8-15 歳 3 例、15 歳超 5 例において、1 日 4 回 (0:00, 6:00, 12:00, 18:00)

採取した尿検体で、酸化ストレスマーカー (DNA : 8-OHdG、脂質 : hexanoyl lysine, HEL) とメラトニン代謝物を ELISA キットで定量し、クレアチニン (Cr) 比を求めた。

(2A) アミン神経研究: XP-A 患者の喉頭ジストニアでの有効性を明らかにした少量レボドパ療法 (0.5~1.0mg/kg/day) (Brain Dev 2010;32:685-7) の効果を検証するため、研究会を設立し全国調査を行った。さらに XP-A 患者での少量レボドパ療法を、症例数を増やして進めた。

(2B) 先行研究により XP-A 脳でのアセチルコリン神経病変 (Brain Dev 2012;34:287-92) を明らかにしたが、担当責任者も関係する「ダウン症候群の急激退行に対するアセチルコリン作動性の塩酸ドネペジルの臨床治験」での知見から、XP-A 患者での使用可能性が示唆された。

(倫理面への配慮)

従前より進めている患者生体試料 (尿、脳脊髄液) と剖検脳を用いた解析は都医学研倫理委員会の承認を得ている。また、少量レボドパ療法に関する全国調査は、関係医療機関の倫理委員会での承認を受けた上で、日本小児神経学会共同研究支援 No 13-03 として進めている。XP-A 患者での少量レボドパ療法は、十分な説明の上、文書による同意を得て進めている。

C. 研究結果

(1) 尿 8-OHdG では、6 歳未満対照で 0 時をピークとする日内変動がみられ、発達に伴いリズムは消失し Cr 比も低下した。XP-A では 15 歳超患者で対照とは逆に Cr 比上昇と 6 時をピークとす

る日内変動の明瞭化がみられた。尿 HEL では、15 歳以下対照で 18 時をピークとする日内変動がみられ、発達に伴いリズムは消失し Cr 比も低下した。XP-A では 15 歳超患者で対照とは逆に Cr 比上昇と 18 時をピークとする日内変動の明瞭化がみられた。現在、メラトニン代謝物の測定値との相関を解析中である。

(2A) 少量レボドパ療法に関する全国調査結果を解析し、発達障害の行動異常とトゥレット症候群のチックに有効であることを見出した。一方、有害事象はほとんど認められなかった。現在、英文論文を投稿準備中である。一方、XPA 患者 5 例において 3 カ月以上の持続投与が行われ、投与期間中は、喉頭ジストニア、上肢の不随意運動（振戦）が抑制された。多動、筋緊張高度亢進には効果がみられなかった。3 例で投与初期、筋緊張の低下が一過性にみられた。

(2B) XP-A 患者家族が知的障害の進行に対し塩酸ドネペジル治療を希望した。

D. 考察

(1) 今回の解析結果は、メラトニンの有する抗酸化作用の観点からも、XP 患者でのメラトニン使用の可能性を示唆していると推定される。担当責任者が関与する「発達障害での睡眠障害に対するメラトニン臨床治験」は順調に進行中であり、数年後に小児適応を得られる可能性が高い。

(2A) 少量レボドパ療法は、小児科以外の診療科（神経内科、精神科）に周知されておらず、全国調査の結果を open access 等英文論文に出版するとともに、XP 医療関係者への周知を進める必要があると考えられた。さらに XP-A 患者での使用に関して倫理的配慮を再度行う必要性が示唆された。

(2B) XP-A 患者での塩酸ドネペジル治療については、倫理委員会承認など適応外使用に関する倫理的配慮を十分行った上で、同薬製造・販売元の製薬会社に相談し、慎重に投与可能性を模索すべきと考える。

E. 結論

今後、睡眠障害治療と抗酸化薬使用でのメラトニン用量の差を考慮した上で、XP 患者でのメラトニン治療の可能性を追究する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S, Hayashi M. Cerebrospinal fluid oxidative stress markers and tau protein in human herpesvirus-6 associated acute encephalopathy/febrile seizures. Mediators

Inflamm 2014;2014:564091.

- ② Miyata R, Hayashi M, Itoh E. Pathological changes in the cardiac muscles and the cerebellar cortex in Vici syndrome. Am J Med Genet A 164(12): 3203-3205.
- ③ Okoshi Y, Tanuma N, Miyata R, Hayashi M. Melatonin alterations and brain acetylcholine lesions in sleep disorders in Cockayne syndrome. Brain Dev 2014; 36(10):907-913.
- ④ 林雅晴. VII 先天性代謝異常. DNA 修復障害 色素性乾皮症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.28 神経症候群 (第 2 版) III. 日本臨床社, 2014, pp664-667.

2. 学会発表

Hayashi M, Sakuma H. Increase of microglia in the autopsy brains in xeroderma pigmentosum group A and Cockayne syndrome. 第 56 回日本小児神経学会. 2014, 5.29, 浜松

(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。)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

治療開発に関わる研究開発に関する研究

研究分担者 竹内 聖二 神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野医学研究員

研究要旨

色素性乾皮症 (XP) は光線過敏、高頻度皮膚発癌、様々な神経症状を臨床的特徴とした遺伝性疾患である。XPの病態を細胞生物学的手法で解析し、その機能異常を相補、回復することのできる治療薬の開発を目指し、研究を行っている。これまでの研究結果より、XPA細胞では、低線量の紫外線照射後、早期に、cell cycle関連遺伝子群が誘発されてくることが分かった。また、XPA細胞が細胞移動の異常を持つことを見出した。また、ゲンタシン投与により、XP12RO細胞でXPAタンパクの回復が軽微ではあるが認められた。

A. 研究目的

色素性乾皮症 (XP) は光線過敏、高頻度皮膚発癌、様々な神経症状を臨床的特徴とした遺伝性疾患である。A から G 群の XP 患者はヌクレオチド除去修復 (NER) 機構に、また、バリエーション群 (XPV) は損傷乗り越え複製機構に異常を持つ。私の研究の目的は、XP の病態を分子レベルで解析すること、とりわけ、未だ明らかでない神経症状発症メカニズムに関して、主に細胞生物学的手法を用い、明らかにする。さらにその機能異常を相補、回復することのできる、既存の治療薬、治療法の適応、開発を行うことである。現在、以下に示す3つの側面からの研究を遂行している。1) マイクロアレイを用いた転写産物の網羅的解析 2) XP 細胞移動の解析 3) Non-sense mediated decay を抑制するアミノグリコシド系薬剤を用いた治療薬の開発

B. 研究方法

- 1) XPiPS 細胞の作製に先立ち、XPA 患者線維芽細胞に紫外線 (UV) 照射 ($0.5\text{J}/\text{m}^2$) を行い、4時間後に RNA を採取し、マイクロアレイを用いて全ゲノム的な転写産物の解析を行った。
- 2) XPA 患者線維芽細胞を用いて、スクラッチ法を用い、3日後の細胞の移動度を測定した。
- 3) XPA 患者細胞 (XP12RO) にゲンタマイシンを添加し ($5, 500\text{mg}/\text{dl}$) 1日後と3日後に XPA タンパクの回復をウェスタンブロット法にて評価した。

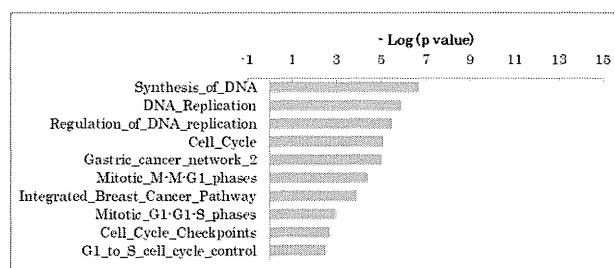
(倫理面への配慮)

研究推進にあたっては人権保護・擁護、個人あ

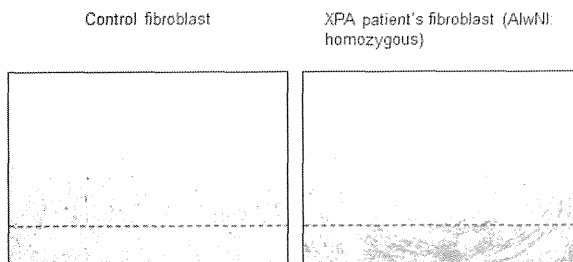
情報保護、動物保護について十分留意し、個人情報保護法、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針、世界医師法の各種宣言などに基づいて研究を推進する。遺伝子解析研究では法規およびガイドラインに沿った十分なインフォームド・コンセントの取得や患者の遺伝子情報の保護などの対策をとって個人情報、人権擁護に万全を期する。“次世代シーケンサーによる遺伝性光線過敏症システムの構築と病態解析”は平成23年に本研究科遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得ている

C. 研究結果

1) UV 未照射細胞と照射細胞細胞を比較して、2倍以上発現量が増加した遺伝子群について Wikipathway を用いて、パスウェイ解析を行った。以下に上位 10 位のパスウェイを示す。大多数が cell cycle に関わるパスウェイが誘発されていることが分かった。健常人線維芽細胞では、全く cell cycle に関わるパスウェイは上位 10 位には認められなかった。

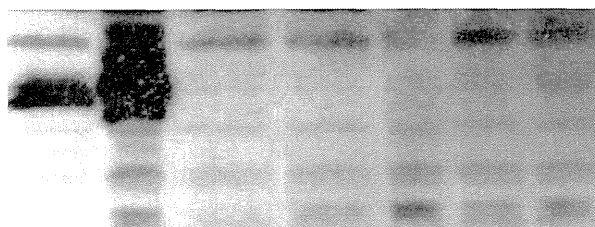


2) XPA 患者細胞は健常人コントロール細胞に比べ、移動度が低いことが分かった。次ページに結果を示す。



3) 以下にウェスタンブロットの結果を示す。XPA タンパクはわずかであるが、ゲンタマイシンの濃度および時間依存的に回復してくることが示唆された。

| | 12RO | 12RO | 12RO | 12RO |
|----------|-----------|------|--------|--------|
| | GM 5µg/ml | GM 5 | GM 500 | GM 500 |
| | 1day | 3day | 1day | 3day |
| WI38 | | | | |
| Halo-XPA | | | | |
| 12RO | | | | |



D. 考察

1) XPA 患者細胞では、UV 照射後 4 時間で cell cycle に関連する遺伝子群が有意に誘発されることが分かった。とりわけ、複製や DNA 合成に関わる遺伝子群が上位を占めている。このことは、生理的な状態において XPA タンパクが複製に対して、抑制的に働いていることを示唆するデータである。XPA は NER で働いているのみならず、同時に複製を抑制することによって、生体の恒常性を維持しているという新たな機能を持っているのかもしれない。XPA 患者で見られる、神経症状や皮膚症状が、この異常に起因するのであれば、この異常を回避するような薬剤を探索し、治療につなげていければと考えている。また、このマイクロアレイの結果が神経細胞や他の皮膚細胞でも見られるものなのか、今後の研究課題であり、治療薬開発のための機能マーカーとして有用であるか、検討を要する。

2) XPA 細胞は細胞移動の異常を示すことを認めた。現在、インキュベーター顕微鏡を用いて、ライブイメージング解析を行っている。この表現型は、XPA が NER 以外にも、細胞移動の調節にも関わっていることを示す。発生段階において、神経細胞の移動が、さまざまな脳組織の構築、形成に重要なファクターであるが、iPS 細胞から分化

させた XPA 神経細胞においても同様の表現型が見られるかどうか検討することは、XP でみられる神経症状を説明すること、さらには、神経症状を改善させる治療薬開発のための機能回復マーカーとして有用なアッセイ系となりうると考えている。

3) 現在、Non-sense mediated decay を抑制するゲンタマイシンを用いて、XPA タンパクの発現を戻すことにより、治療薬として用いることができないか実験を行っている。結果に示すようにストップ変異を持つ XP12RO では、XPA タンパクの機能は、わずかではあるが回復できる結果を得ている。しかしながら、日本の XPA 患者の大多数を占める、intron3 にスプライシング受容部に異常をもつ患者細胞では、効果は得られていない。今後、iPS から誘導する神経細胞において同様の実験を行う予定である。

E. 結論

XPA 細胞は低線量の UV 照射後、早期に cell cycle 関連遺伝子群が誘発されてくることが分かった。また、XPA 細胞は細胞移動の異常をおこすことを見出した。また、ゲンタシン投与により、XP12RO 細胞で XPA タンパクの回復がわずかであるが認められた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Makino-Okamura C, Niki Y, Takeuchi S, Nishigori C, Declercq L, Yarosh DB, Saito N. Heparin inhibits melanosome uptake and inflammatory response coupled with phagocytosis through blocking PI3k/Akt and MEK/ERK signaling pathways in human epidermal keratinocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Nov; 27(6):1063-74.

○Fluorescence detection of cellular nucleotide excision repair of damaged DNA. Toga T, Kuraoka I, Watanabe S, Nakano E, Takeuchi S, Nishigori C, Sugawara K, Iwai S. *Sci Rep.* 2014 Jul 4; 4:5578

○Nakano E, Ono R, Masaki T, Takeuchi S, Takaoka Y, Maeda E, Nishigori C Differences in clinical phenotype among patients with XP complementation group D: 3D structure and ATP-docking of XPD in silico. *J Invest Dermatol.* 2014 Jun; 134(6):1775-8.

Takeuchi S, Abe Y, Yamada T, Kawano S, Hozumi Y, Ito S, Suzuki T, Nishigori C. Case of Hermansky-Pudlak syndrome 1 patient with milder symptoms in Japanese. *J Dermatol.* 2014 Mar; 41(3):268-70

○Ono R, Masaki T, Takeuchi S, Shimizu A, Tanioka M, Kambe N, Matsue H, Kamide R,

Nishigori C. Three school-age cases of xeroderma pigmentosum variant type. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2013 29(3):132-139

○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・A群色素性乾皮症の軽症例 小児皮膚科会雑誌 2013 32(2): 77-82

○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 2012 191: 7-14

2. 学会発表

2014年度の筆頭発表のみ示す

1) Abnormal cell migration in the XPA-deficient cell

Seiji Takeuchi, Makoto Sato, Chikako Nishigori: Disorders of DNA Damage Response - Bench to Bedside- (神戸 3月5日—7日)

2) Microarray analysis for the transcriptional profile in the keratinocyte and melanocyte with UVB irradiation

Seiji Takeuchi, Taro Masaki, Toshiro Matsuda, Chikako Nishigori 第73回日本癌学会学術総会 (横浜 9月24日—26日)

6) A群色素性乾皮症患者細胞における低線量紫外線照射時の網羅的遺伝子発現解析

竹内 聖二、松田 外志朗、小野 竜輔、錦織 千佳子 日本放射線影響学会 第57回 (鹿児島 10月1日—3日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特記することなし

Ⅲ. 学会等発表実績

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|---|--|----------|--------|
| 光線過敏症の最近の動向（口頭発表） | 錦織千佳子 | 第113回日本皮膚科学会総会・学術大会（京都） | 2014.5-6 | 国内 |
| 小児色素性乾皮症C群の1例（口頭発表） | 錦織千佳子他 | 第38回日本小児皮膚科学会学術大会（東京） | 2014.5-6 | 国内 |
| 特異な臨床症状を示した小児色素性乾皮症C群(XP-C)の1例（口頭発表） | 正木太朗、中野英司、錦織千佳子、鈴木民夫 | 第36回日本光医学・光生物学会（吹田） | 2014.7 | 国内 |
| 細胞の紫外線損傷DNA修復能の蛍光検出（口頭発表） | 梅達也、倉岡功、渡邊駿、中野英司、竹内聖二、錦織千佳子、菅澤薫、岩井成憲 | 第36回日本光医学・光生物学会（吹田） | 2014.7 | 国内 |
| UV and Melanoma: Insights from Clinical View Points.（口頭発表） | Nishigori C | XXII International Pigment Cell Conference (Singapore) | 2014.9 | 国外 |
| Photocarcinogenesis is a complex process caused by DNA damage, inflammation and immunosuppression.（口頭発表） | Nishigori C | 16th International Congress on Photobiology (Cordoba, Argentina) | 2014.9 | 国外 |
| Genotype-Phenotype Correlation Among Xeroderma Pigmentosum Complementation Group D.（口頭発表） | Nakano E, Ono R, Masaki T, Takeuchi S, Takaoka Y, Sugasawa K, Nishigori C | The 3rd Eastern Asia Dermatology Conference (Jeju, Korea) | 2014.9 | 国外 |
| ナローバンド、ブロードバンドUVB照射後のケラチノサイトとメラノサイトにおけるマイクロアレイ解析（ポスター発表） | 正木太朗、竹内聖二、松田外志朗、錦織千佳子 | 第73回日本癌学会学術総会（横浜） | 2014.9 | 国内 |
| 角化細胞と色素細胞における、UVB照射時のマイクロアレイを用いた遺伝子変動解析（ポスター発表） | 竹内聖二、正木太朗、松田外志朗、錦織千佳子 | 第73回日本癌学会学術総会（横浜） | 2014.9 | 国内 |
| A群色素性乾皮症患者細胞における低線量紫外線照射時の網羅的遺伝子発現解析（口頭発表） | 竹内聖二、松田外志朗、小野竜輔、錦織千佳子 | 第57回日本放射線影響学会（鹿児島） | 2014.10 | 国内 |
| 低線量紫外線照射が遺伝子発現プロファイルに与える影響（口頭発表） | 松田外志朗、竹内聖二、小野竜輔、錦織千佳子 | 第57回日本放射線影響学会（鹿児島） | 2014.10 | 国内 |
| 光線過敏症 最近の話題（口頭発表） | 錦織千佳子 | 第368回日本皮膚科学会山形地方会（山形） | 2014.12 | 国内 |
| NER assay based on flow cytometry of pyrimidine dimerimmunocytochemistry: comparison with unscheduled DNA synthesis using autoradiography.（口頭発表・ポスター発表） | Nakano E, Takeuchi S, Ono R, Masaki T, Nishigori C | 日本研究皮膚科学会 第39回年次学術大会・総会（大阪） | 2014.12 | 国内 |
| Microarray analysis in the keratinocyte and melanocyte exposed to Narrow-band UVB and Broad-band UVB.（ポスター発表） | Masaki T, Takeuchi S, Matsuda T, Nishigori C | 日本研究皮膚科学会 第39回年次学術大会・総会（大阪） | 2014.12 | 国内 |
| 診療科横断的な色素性乾皮症の診療経験（口頭発表） | 錦織千佳子、正木太朗、中野英司、竹内聖二、山下大介、荻田典生、酒井良忠 | 第438回日本皮膚科学会京滋地方会（京都） | 2014.12 | 国内 |
| 新たに経験した色素性乾皮症G群の1例（口頭発表） | 森脇真一、北村佐千子、荻朋男 | 日本皮膚科学会長崎地方会第322回例会（長崎） | 2014.4 | 国内 |
| 13トリソミーの患児に多発した稗粒腫の1例（口頭発表） | 杉本彰、黒川晃夫、森脇真一、岸勘太、安田恵美 | 第30回日本臨床皮膚科学会（横浜） | 2014.4 | 国内 |
| UVBと皮膚（口頭発表） | 森脇真一 | 第113回日本皮膚科学会総会（京都） | 2014.6 | 国内 |
| 皮膚科領域の遺伝カウンセリング：理論から実践へ（口頭発表） | 森脇真一 | 第38回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（東大阪） | 2014.6 | 国内 |
| 若年女性の後頭部に生じたケラトアカントーマの1例（口頭発表） | 島本純子、黒川晃夫、森脇真一 | 第107回近畿皮膚科集談会（大阪） | 2014.7 | 国内 |
| 悪性リンパ腫寛解後に生じた慢性光線性皮膚炎の1例（口頭発表） | 河嶋公実子、黒川晃夫、森脇真一 | 第36回日本光医学・光生物学会（吹田） | 2014.7 | 国内 |

| | | | | |
|---|---|---|---------|----|
| A Novel XPA gene mutation resulting in trace level of XPA expression in an elderly XP-A patient without neurological abnormalities (ポスター発表) | <u>Moriwaki S</u> , Takahashi Y, Nakamura S, Nakazawa Y, Ogi T | The 44th ESDR 2014 (Copenhagen, Denmark) | 2014.9 | 国外 |
| Establishment of iPS cells from XPA patients as a new tool for its mechanistic analysis (ポスター発表) | Shimizuhiro C, Yokota H, <u>Moriwaki S</u> , Yoshida Y, Miyachi Y, Yamanaka S, Kabashima K | The 44th ESDR 2014 (Copenhagen, Denmark) | 2014.9 | 国外 |
| A case of generalized eruptive teratoacanthomas (ポスター発表) | Numemoto S, Osawa S, Kurokawa T, <u>Moriwaki S</u> | The 3rd Eastern Asia Dermatology Conference (Jeju, Korea) | 2014.9 | 国外 |
| A child case of cutaneous type of xeroderma pigmentosum group G with a novel mutation (ポスター発表) | <u>Moriwaki S</u> , Kurokawa T, Kitamura S | The 3rd Eastern Asia Dermatology Conference (Jeju, Korea) | 2014.9 | 国外 |
| Establishment and characterization of iPS cells derived from XPA patients (口頭発表) | Shimizuhiro C, Yokota H, <u>Moriwaki S</u> , Yoshida Y, Miyachi Y, Yamanaka S, Kabashima K | The 39th annual meeting of JSID (Osaka) | 2014.12 | 国内 |
| 遅発型コケイン症候群の1例 (口頭発表) | 二宮悠紀子、穀内康人、黒川晃夫、 <u>森脇真二</u> 、高橋麻衣子 | 第438回日本皮膚科学会京滋地方会 (京都) | 2014.12 | 国内 |
| 新規小頭症/放射線感受性症責任遺伝子の同定と機能解析 (口頭発表) | 中沢由華、郭朝万、嶋田繭子、賈楠、唐田清信、永山雄二、 <u>荻朋男</u> | 第10回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス | 2014.5 | 国内 |
| DNA修復機構の異常により発症する先天性疾患とゲノム不安定性/発がん (口頭発表) | <u>荻朋男</u> | 第20回日本家族性腫瘍学会学術集会 (福島) | 2014.6 | 国内 |
| ヒストンH3K9メチル化酵素類のDNA二重鎖切断修復反応への関与 (シンポジウム・口頭発表) | <u>荻朋男</u> | 第87回日本生化学会大会 (京都) | 2014.10 | 国内 |
| 転写共役ヌクレオチド除去修復の開始反応の分子機構 (ワークショップ・口頭発表) | <u>荻朋男</u> | 日本放射線影響学会第57回大会 (鹿児島) | 2014.10 | 国内 |
| 放射線感受性および各種発達異常を示す遺伝性疾患の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析 (口頭発表・ポスター発表) | 中沢由華、郭朝万、嶋田繭子、宮崎仁美、唐田清伸、 <u>荻朋男</u> | 第37回日本分子生物学会年会 (横浜) | 2014.11 | 国内 |
| Molecular and functional study on the initiation of transcription coupled nucleotide excision repair (ポスター発表) | Chaowan Guo, Yuka Nakazawa, Mayuko Shimada, Nan Jia, Kiyonobu Karata, Hitomi Miyazaki, <u>Tomoo Ogi</u> | 第37回日本分子生物学会年会 (横浜) | 2014.11 | 国内 |
| 転写と共役したヌクレオチド除去修復のin vitro反応系の構築 (ポスター発表) | 唐田清伸、郭朝万、 <u>荻朋男</u> | 第37回日本分子生物学会年会 (横浜) | 2014.11 | 国内 |
| コケイン症候群様の臨床症状を示す遺伝性疾患の責任遺伝子探索 (ポスター発表) | 宮崎仁美、 <u>荻朋男</u> | 第37回日本分子生物学会年会 (横浜) | 2014.11 | 国内 |
| エキソーム解析を用いたDNA修復機構欠損性疾患の新規責任遺伝子の探索 (ポスター発表) | 嶋田繭子、 <u>荻朋男</u> | 第37回日本分子生物学会年会 (横浜) | 2014.11 | 国内 |
| Molecular cloning and characterisation of new human DNA repair genes (口頭発表) | <u>Tomoo Ogi</u> | 3R Symposium Program | 2014.11 | 国内 |
| Molecular characterization and functional analysis of XRCC4, a novel pathological gene for radiation sensitivity and developmental abnormalities (ポスター発表) | Chaowan Guo, <u>Tomoo Ogi</u> | 3R Symposium Program | 2014.11 | 国内 |

| | | | | |
|--|---|---|---------|----|
| ERCC1/XPF deficiency causes three NER- deficient disorders: a patient with various symptoms of xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and Fanconi anemia (ポスター発表) | Yuka Nakazawa, Kazuya Kashiya, Daniela T. Pilz, Chaowan Guo, Mayuko Shimada, Kensaku Sasaki, Heather Fawcett, Jonathan F. Wing, Susan O. Lewin, Lucinda Carr, Tao-Sheng Li, Koh-ichiro Yoshiura, Atsushi Utani, Akiyoshi Hirano, Danielle Greenblatt, Tiziana Nardo, Miria Stefanini, David McGibbon, Robert Sarkany, Hiva Fassihi, Norisato Mitsutake, Alan R. Lehmann, and <u>Tomoo Ogi</u> | 3R Symposium Program | 2014.11 | 国内 |
| ゲノム不安定性疾患群の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析 (招待講演・口頭発表) | <u>荻朋男</u> | 第57回日本甲状腺学会学術集会 (大阪) | 2014.11 | 国内 |
| 分子シミュレーション解析を基盤としたUGT1A1抱合能の数理モデル (ポスター発表) | <u>高岡 裕</u> 、三浦研爾、大田美香、菅野亜紀 | 日本生化学会 (京都) | 2014.10 | 国内 |
| 紫外線損傷修復におけるXPCタンパク質の脱ユビキチン化機構の解析 (口頭発表) | 岸本藍子、赤木純一、松井豪志、酒井恒、 <u>菅澤 薫</u> | 日本遺伝学会第86回大会 (長浜) | 2014.9 | 国内 |
| 紫外線誘発DNA損傷修復の細胞内制御機構 (口頭発表) | <u>菅澤 薫</u> | 日本放射線影響学会第57回大会 (鹿児島) | 2014.10 | 国内 |
| ヌクレオチド除去修復におけるXPCとDDB2の機能的相互作用 (口頭・ポスター発表) | 松本翔太、Fischer ES, Thomä NH, <u>菅澤 薫</u> | 第87回日本生化学会大会 (京都) | 2014.10 | 国内 |
| Post-translational modifications coordinating recognition and repair of UV-induced DNA damage (口頭発表) | <u>Sugasawa K</u> | The 5th Japan-US DNA Repair Meeting (Naruto, Japan) | 2014.10 | 国内 |
| Functional interactions between XPC and DDB2 in nucleotide excision repair (ポスター発表) | Matsumoto S, Fischer ES, Thomä NH, <u>Sugasawa K</u> | The 9th 3R Symposium (Gotemba, Japan) | 2014.11 | 国内 |
| 翻訳後修飾を介した色素性乾皮症遺伝子産物の機能制御 (口頭・ポスター発表) | 秋田眞季、松本翔太、井倉毅、酒井恒、 <u>菅澤 薫</u> | 第37回日本分子生物学会年会 (横浜) | 2014.11 | 国内 |
| DNA損傷応答におけるDDB2の翻訳後修飾の機能解析 (ポスター発表) | 松本翔太、Fischer ES, Thomä NH, <u>菅澤 薫</u> | 第37回日本分子生物学会年会 (横浜) | 2014.11 | 国内 |
| In vivo regulation of mammalian nucleotide excision repair (口頭発表) | <u>Sugasawa K</u> | Gordon Research Conference on Mammalian DNA Repair (Ventura, USA) | 2015.2 | 国外 |
| Molecular mechanisms of UVB carcinogenesis (口頭発表) | <u>Kunisada M</u> | World Congress of Cancers of the Skin (Edinburgh, Scotland) | 2014.9 | 国外 |
| Increase of micorglia in the autopsy brains in xeroderma pigmentosum group A and Cockayne syndrome (口頭発表・English session) | <u>Masaharu Hayashi</u> | 第56回日本小児神経学会 (浜松) | 2014.5 | 国内 |

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文 (発表題目) | 発表者氏名 | 発表した場所 (学会誌・雑誌等名) | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---------------------------------------|--------------------|---|--------|--------|
| Photocarcinogenesis and inflammation. | <u>Nishigori C</u> | Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects. Edited by Hiraku Y, Kawanishi S, Ohshima H, John Wiley & Sons, Inc, pp271-283 | 2014 | 国外 |

| | | | | |
|--|--|--|----------|----|
| Differences in clinical phenotype among patients with XP complementation group D: 3D structure and ATP-docking of XPD <i>in silico</i> . | <u>Nakano E</u> , Ono R, Masaki T, <u>Takeuchi S</u> , Takaoka Y, Maeda E, <u>Nishigori C</u> | J Invest Dermatol 134(6) : 1775-1778 | 2014 | 国外 |
| 色素性乾皮症 (XP) バリエント型 | 錦織千佳子 | 皮膚病診療 36(11): 998-1006 | 2014 | 国内 |
| High prevalence of vitamin D deficiency in patients with xeroderma pigmentosum (XP)- A under strict sun-protection | Kuwabara A, Tsugawa N, Uejima Y, Ogawa J, Otao N, Yamada N, Tanaka K, Masaki T, Nishigori C, <u>Moriwaki S</u> Okano T | European Journal of Clinical Nutrition | in press | 国外 |
| 光線過敏症 | 森脇真二 | 今日の小児治療指針 第16版 (医学書院) | 印刷中 | 国内 |
| 光線力学療法 | 森脇真二 | 光と生命の事典 (朝倉書店) | 印刷中 | 国内 |
| 光線力学療法はどこまで有用か | 森脇真二 | 最新・EBM皮膚疾患の治療 (中外医学社) | 印刷中 | 国内 |
| 色素性乾皮症 | 森脇真二 | 難病事典 (学研メディカル秀潤社) | 印刷中 | 国内 |
| UDS、ポルフィリアなど | 森脇真二 | 定番・外来皮膚科検査法のすべて (文光堂) | 印刷中 | 国内 |
| 遺伝性光線過敏症 | 森脇真二 | 定番・外来皮膚科検査法のすべて (文光堂) | 印刷中 | 国内 |
| Q15「光や電磁波が皮膚に与える影響について教えてください。」 | 森脇真二 | スキンケアマイスター試験参考テキスト (3級用) (メディカルレビュー社) | 印刷中 | 国内 |
| Q16「季節、高地、緯度、湿度などで、光の曝露量が異なると、肌へどのような影響がありますか?」 | 森脇真二 | スキンケアマイスター試験参考テキスト (3級用) (メディカルレビュー社) | 印刷中 | 国内 |
| Q19「日焼けによって肌が赤くなり人と、黒くなる人がいますが、日焼けで違いはありますか?」 | 森脇真二 | スキンケアマイスター試験参考テキスト (3級用) (メディカルレビュー社) | 印刷中 | 国内 |
| 光接触皮膚炎 | 森脇真二 | 皮膚疾患 最新の治療 2015-2016 p99 (南江堂) | 2015 | 国内 |
| 光線過敏症 | 森脇真二 | 今日の治療指針 2015年版—私はこう治療している p1153-4 (医学書院) | 2015 | 国内 |
| Immunohistochemical analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human skin tumor | Kokunai Y, Tsuji M, Yuko Ito Y, Kurokawa T, Otsuki K, <u>Moriwaki S</u> | Medical Molecular Morphology 47(1):8-13 | 2014 | 国内 |
| Generalized milia in an infant with full trisomy 13 | Sugimoto A, Kurokawa T, Kishi K, Yasuda E, Tamai H, <u>Moriwaki S</u> | J Dermatol 41(8):763-764 | 2014 | 国内 |
| Trichothiodystrophy Group A : A first Japanese patient with a novel homozygous nonsense mutation in the GTF2H5 gene | <u>Moriwaki S</u> , Saruwatari H, Nakanishi N, Kanzaki T, Kanekura T, Minoshima S | J Dermatol 41(8):705-708 | 2014 | 国内 |
| Usefulness of a newly-developed device, the Power Tree?, for body massage: Evidence from a medical evaluation. | Ishii K, Kotani M, Fujita A, <u>Moriwaki S</u> | J Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications 4(3):185-189 | 2014 | 国外 |
| 小児光線過敏症のQI | 森脇真二 | Visual Dermatology 13(10) : 1176-1177 | 2014 | 国内 |
| 皮膚科領域の遺伝カウンセリング：理論から実践へ | 森脇真二 | 日本遺伝カウンセリング学会雑誌 35(3) : 67-72 | 2014 | 国内 |