

201442046A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等克服研究事業

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集と
ゲノム・分子機能解析による病態解明研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 荻 朋男

平成27（2015）年3月

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人長崎大学が実施した平成26年度「ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集とゲノム・分子機能解析による病態解明研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集とゲノム・分子機能解析による病態 解明研究 -----	1
萩 朋男 （資料）本拠点において収集した症例／コケイン症候群患者会と色素性乾皮症患者会の様子	
II. 委託業務成果報告（分担）	
1. スクレオチド除去修復（NER）異常症（色素性乾皮症／コケイン症候群）の症例収集と診断 に関する研究 -----	7
錦織千佳子	
2. 甲状腺癌に関する調査研究 -----	10
光武範吏	
3. ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集と臨床診断 -----	12
中沢由華	
4. ゲノム不安定性疾患の原因究明に向けた低コスト次世代ゲノム解析技術開発 -----	15
井ノ上逸朗	
5. ゲノム不安定性疾患遺伝子変異データベースの構築 -----	17
中村保一	
6. 色素性乾皮症に関する調査研究 -----	19
宇谷厚志	
7. コケイン症候群／ゼッケル症候群／原発性小頭症の症例収集と診断 -----	21
久保田雅也	
8. スクレオチド除去修復（NER）異常症（色素性乾皮症／コケイン症候群）の症例収集と診断 -----	23
立石智	
9. 家族性若年性甲状腺腫瘍症例の収集と診断 -----	25
内野眞也	
10. 本邦におけるBaller-Gerold症候群の実態 -----	27
金子英雄	
11. 先天性早老症候に関する調査研究 -----	29
花田克浩	
12. 原因不明の免疫不全症、多発がん症例の診断収集 -----	31
宮崎泰司	
13. DNA修復・DNA損傷応答因子の分子機能解析/病態解明研究 -----	33
中田慎一郎	
III. 学会等発表実績 -----	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	49

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集とゲノム・分子機能解析による病態解明研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	荻 朋男	長崎大学原爆後障害医療研究所	准教授
研 究 分 担 者	錦織千佳子	神戸大学大学院医学研究科	教授
	光武 範吏	長崎大学原爆後障害医療研究所	准教授
	中沢 由華	長崎大学原爆後障害医療研究所	助教
	井ノ上逸朗	国立遺伝学研究所	教授
	中村 保一	国立遺伝学研究所	教授
	宇谷 厚志	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	教授
	久保田雅也	国立成育医療研究センター	医長
	立石 智	熊本大学発生医学研究所	講師
	内野 眞也	医療法人野口記念会 野口病院	外科部長
	金子 英雄	国立病院機構長良医療センター	臨床研究部長
	花田 克浩	大分大学医学部	助教
	宮崎 泰司	長崎大学原爆後障害医療研究所	教授
	中田慎一郎	大阪大学大学院医学系研究科	独立准教授
研 究 協 力 者	深尾 敏幸	岐阜大学大学院医学系研究科	教授
	三嶋 博之	長崎大学原爆後障害医療研究所	助教
	細道 一善	国立遺伝学研究所	助教
	竹中 克也	東京医科歯科大学難治疾患研究所	助教
	中島 正洋	長崎大学原爆後障害医療研究所	教授
	船戸 道德	国立病院機構長良医療センター	医長
	柳原 克紀	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	教授
	永山 雄二	長崎大学原爆後障害医療研究所	所長
	仁木 宏典	国立遺伝学研究所	教授
事 務 局	江口 智章	長崎大学 研究国際部 産学官連携課 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14 T E L 095-819-2038 F A X 095-819-2040 e-mail teguchi@nagasaki-u. ac. jp	主査
経理事務担当者	溝口 明邦	長崎大学医歯薬学総合研究科 学術協力課 学術交流係 T E L 095-819-7198 F A X 095-819-7199 e-mail gakujutu_kouryu@ml. nagasaki-u. ac. jp	係長

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費

(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))

委託業務成果報告 (統括)

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集と ゲノム・分子機能解析による病態解明

業務主任者 荻 朋男 長崎大学原爆後障害医療研究所 准教授

研究要旨

本研究では、先天的なDNA修復・DNA損傷応答機構 (DNA repair and DNA damage response system: DDR) の異常により発症し、有病率が出生10万人~100万人に1名程度である、稀少で難治性の「ゲノム不安定性疾患群」の症例をシステムティックに多数収集し、本疾患群に対して迅速で高精度な確定診断を提供することが可能な「DNA修復活性検査・遺伝子診断拠点」の構築を目指している。本年度は、検体収集ネットワークの整備と症例収集に注力し、1年間の研究期間に、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP)、コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)、ウェルナー症候群 (Werner syndrome: WRN)、ゼッケル症候群 (Seckel syndrome: SS) などのゲノム不安定性を示す種々の疾患群の症例を新たに約300例収集した。これにより、既存の症例と併せてこれまでに約600例を収集している。収集した臨床検体は、DNA修復活性の測定と次世代ゲノム解析法を併用した検査により、疾患責任遺伝子変異の同定をおこなった。解析結果は臨床医へ報告し、患者の増悪因子排除などのQOL改善に利用可能であった。収集した患者由来細胞及びゲノムDNAはバンキングし、病態・遺伝情報のデータベース化もあわせておこなった。

A. 研究目的

先天的な DNA 修復・DNA 損傷応答機構 (DNA repair and DNA damage response system: DDR) の異常により発症する、「ゲノム不安定性稀少難治性疾患群」の症例を多数収集し、DNA 修復活性の測定と次世代ゲノム解析法を併用することで、迅速・高精度な確定診断を提供する「DNA 修復活性検査/遺伝子診断拠点」の構築を目指す。また、DNA 修復分子機能解析・ゲノム解析・分子疫学的調査を通じて、ゲノム不安定性疾患群の病態解明に貢献する。

B/C. 研究方法と研究結果

1. ゲノム不安定性疾患群の臨床診断拠点の形成

高精度 DNA 修復活性測定と次世代ゲノム解析

を併用した、稀少なゲノム不安定性疾患の診断技術開発

これまで、不定期 DNA 合成 (UDS) 解析及び、RNA 合成回復 (RRS) 解析を用いて DNA 修復活性を調査してきた。本年度は、さらに広範な DNA 修復を評価する新たな手法を開発する事を目的とした。既存の免疫染色法を応用し、大規模スクリーニングにも応用可能な DNA 二重鎖切断修復活性測定法を確立し、臨床診断とスクリーニングに適用した。その結果、新たなゲノム不安定性遺伝性疾患の疾患責任遺伝子変異の同定に成功した。詳細な分子生物学的解析を実施し、現在論文投稿中である。(荻)

ゲノム不安定性疾患の原因究明に向けた低コスト次世代ゲノム解析技術開発

解析対象とする遺伝子群を迅速にシーケンスすることで、網羅的に変異を検出する安価で簡便

なシステムを構築すること、及び、Dual-indexにより、多検体を同時に解析するための最適化を進めることを目的とした。ハイブリダイゼーションに用いる DNA ライブラリ調整を簡便化し、3 時間で 96 サンプルの調整を可能とした。さらに、ハイブリダイゼーションは、1 チューブの反応とすることで、ターゲット遺伝子の濃縮が安価に行えるようになった。96 サンプル間で、ほぼ等量のデータを得ることが可能であった。本システムにより、様々な遺伝子を対象に低コストで迅速かつ網羅的に変異検出することが可能となったほか、検出された変異の信頼性も高く、遺伝子診断法としても応用が期待される。(井ノ上)

ゲノム不安定性疾患遺伝子変異データベースの構築

ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患の責任遺伝子変異と臨床所見、分子病態を網羅した疾患統合データベースを構築することにより、ゲノム不安定性疾患の責任遺伝子変異の迅速な発見と増悪因子排除/病態緩和/治療に役立つ情報提供のためのシステム開発を目的とした。国内外のゲノム不安定性疾患患者由来のエクソームデータ 200 例をもとに、遺伝性疾患データベースの構築を行った。研究者・医師による病因の解釈ならびに発見を支援するために校正済の連結データを格納し、容易に利用可能な状態で提供することで、ゲノム不安定性疾患の責任遺伝子の迅速な発見と治療、さらには分子メカニズムの解明や治療法の開発等の応用研究に貢献することが期待される。(中村)

2. ゲノム不安定性疾患症例収集と診断

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集と臨床診断

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例を多数収集し、DNA 修復活性の測定、ウイルス相補性試験、次世代ゲノム解析等を統合的に用いて、これらの症例の疾患責任遺伝子変異の同定を行い、解析結果を検体提供元へ報告することで、疾患特有の増悪因子の排除等に役立てることを目的とした。本研究では、約 300 例のゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患症例 (XP、CS、SCID、CID、UVSS 等) を収集し、臨床診断を実施した。ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群を統合的に診断・解析する拠点は非常に重要であり、得られた情報を適切に利用する事は、患者や患者家族、臨床医への大きな支援となる。(中沢)

ヌクレオチド除去修復異常症 (色素性乾皮症

/コケイン症候群) の症例収集と診断に関する研究

ヌクレオチド除去修復 (NER) の修復活性、宿主細胞回復を指標に遺伝性相補性群試験の結果を踏まえて責任遺伝子の遺伝子解析により、色素性乾皮症 (XP) の遺伝子診断を行なう。遺伝子変異が見つからない症例については次世代ゲノム解析による遺伝子診断を実施し、病態解明に資することを目的とした。XP-A 群の患者においては創始者変異が知られており、今回の患者もいずれか一方のアリルに創始者変異をもっていた。一方、XP-F 群については、日本における創始者変異や遺伝子型表現型相関は未だ明らかではない。XP 疑いの患者に対する、NER アッセイ、宿主細胞回復を指標とした遺伝子相補性試験、ゲノム解析による臨床診断は、非常に有効である。各患者の確定診断を実施することで、医療に資するとともに、将来的には DNA 修復能がいかなる病態に帰結するかについての情報も得られるようになることを期待される。(錦織)

色素性乾皮症に関する調査研究

迅速な XP、紫外線高感受性症候群 (UV^S)、コケイン症候群 (CS) 等の診断を行い、遮光を中心とした患者指導や皮膚悪性腫瘍の発見・治療等を行うことを目的とした。臨床診断は、1) 自動蛍光画像取得顕微鏡装置を用いた DNA 修復能の評価、2) レンチウイルスを用いた遺伝子導入による相補性試験、3) ゲノム配列解析による疾患責任遺伝子変異の同定、により行った。本年収集した症例のうち約半数について診断が確定した。残りの症例については、NER 活性 (UDS/RRS 活性) が正常であった。一次産業従事者では、長時間日光暴露されても皮膚悪性腫瘍発生頻度には個人差が大きい。これは、UDS、RRS が正常であっても DNA 損傷修復に関する分子のミスセンス変異等が関与している可能性が考えられる。そこで今後は、XP、UV^S、CS 疑い患者だけではなく、日光暴露部に皮膚悪性腫瘍を多発する患者も積極的に収集し、解析を行っていく。(宇谷)

コケイン症候群/ゼッケル症候群/原発性小頭症の症例収集と診断

CS は発症年齢と重症度から 3 つの型に分類される。古典的 CS の I 型、乳児期・胎内発症で重症型の II 型、遅発性発症で緩徐な進行を示す III 型がある。日本においては 100 万出生あたり約 2 人、約 70~100 人の患者数が推定されている。今回 I 型の中でも比較的急速な全身症状の悪化をみせた症例を経験した。本例は 7 才から急速に腎不全が進行し、透析となった。得られた腎病理は一般に加齢でも認められものでもある。てんかん発

作はCSの約2割にみられるがそのコントロールは比較的容易であり、本例のように重積に至ることは稀とされる。腎不全の進行の速さとあわせ中枢神経系の病理の重篤さも考えられる。頭部MRI上の萎縮も栄養状態の改善にもかかわらず進行している。CSI型で38才の患者もいることから、多様な経過を決定する遺伝的な因子が存在すると考えられる。本例の遺伝子解析を進め、病態と疾患責任遺伝子変異との関連を調査していく。(久保田)

ヌクレオチド除去修復 (NER)異常症 (色素性乾皮症/コケイン症候群)の症例収集と診断

日光過敏症を示し、XPまたはCSが疑われる症例から繊維芽細胞を樹立し、臨床診断を実施するとともに、これらの疾患の基礎研究を進めることを目的とする。国内の大学病院と連携して、11例のXPあるいはCSが疑われる症例を収集した。新規疾患責任遺伝子変異が原因と考えられる症例が3例得られた。また、臨床所見と同定された原因遺伝子の間には、一定の関連性が見られた。(立石)

甲状腺癌に関する調査研究

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の責任遺伝子の同定率を向上させ、疾患発症のメカニズムを明らかにする。また、特定のDNA修復経路の分子機能と発がんメカニズムとの関連を解明し、その知見を一般集団に還元することを目的とする。ゲノム解析のワークフロー確立、甲状腺癌症例収集のためのネットワーク構築、核酸の抽出方法の最適化は、概ね達成された。研究遂行の基盤整備は確実に進んでおり、今後は、甲状腺癌症例に限らず、様々な収集検体に対応していけるものと期待される。(光武)

家族性若年性甲状腺腫瘍症例の収集と診断

家族性甲状腺腫瘍に関する研究は、症例が比較的稀なことと、症例集積が困難であるなどの背景から、なかなか進展がみられなかった。今回、甲状腺疾患の専門病院において、家族性腫瘍症例を収集し、その臨床的特徴を明らかにし、疾患原因遺伝子変異の解明を目的とした。家族性甲状腺癌に関して、778家系、対象患者2488名を、家族性腺腫様甲状腺腫に関しては、99家系、対象患者358名を抽出した。家族性甲状腺癌の頻度は手術を行った全甲状腺癌の約5%であることが判明した。この頻度は一般の他臓器の家族性腫瘍の頻度と同等であり、決して稀ではないことが判明した。(内野)

本邦におけるBaller-Gerold症候群の実態

遺伝子修復異常症に分類されるRothmund-Thomson症候群の類縁疾患としてBaller-Gerold症候群が知られている。過去の調査で、小児科専門医研修施設、皮膚科、がん診療拠点病院に調査用紙を送付し、アンケート調査を実施したところ、本邦において1家系の兄弟例のBaller-Gerold症候群の存在が明らかになっていた。今回、1例のBaller-Gerold症候群の追加報告があった。本症例について、臨床症状を兄弟例と比較するとともに、遺伝子解析を行った。その結果、RecQL4遺伝子の約1.5kbの欠失をhomozygousに有することを明らかにした。本邦で初めてのRecQL4遺伝子異常によるBaller-Gerold症候群の報告であり、今後、Baller-Gerold症候群とRothmund-Thomson症候群の表現型の異同等を検討する事で、疾患の詳細な理解につながると期待される。(金子)

先天性早老症候群に関する調査研究

DNA修復はゲノムの恒常性維持を担っており、その破綻はガンや進行性の神経変性を起こす。さらに、一部のDNA修復の異常は、老化を促進させることが知られている。今回は、早期老化を伴う先天性疾患の原因遺伝子解明を目的とした。国内外より、先天性早老症疾患であるコケイン症候群、ウェルナー症候群を中心に、患者由来細胞を20例収集した。ウェルナー症候群由来細胞の5例について、これまでに責任遺伝子とされていたWRNおよびLMNA遺伝子上に病的変異は同定できなかった。そこで、全エキソーム解析を実施したところ、1例の患者由来の細胞から、先天性早老症を示すXPF遺伝子の変異(XFE変異と呼ばれる)が同定された。今後さらに解析を進める事で、疾患発症のメカニズム解明につながると期待される。(花田)

原因不明の免疫不全症、多発がん症例の診断収集

二重鎖切断修復異常を原因とする疾患に置けるのは、免疫不全、悪性腫瘍の多発、血液異常など多彩な病態を呈することが知られている。これまでに原因の同定されていないこれらの疾患を収集し、診断を実施することで、新たな疾患原因遺伝子同定を試みた。当科を受診した症例の中で、明らかな免疫不全を呈する例が3例、悪性腫瘍の多発例が1例、先天異常を伴って悪性腫瘍を多発した例が1例見られた。このうち原発性の免疫不全例、および先天異常を伴って悪性腫瘍を多発した例については検体を収集することができた。今後これらを詳細に解析する事で、原因遺伝子の同定、新たな疾患メカニズムの解明につながると期待される。(宮崎)

3. 新規ゲノム不安定性疾患原因遺伝子の同定と分子機能解析

DNA 修復・DNA 損傷応答因子の分子機能解析/病態解明研究

ゲノム不安定性症候群の中には、セリンスレオニンキナーゼ ATR や DNA-PKcs の変異により発症するものがある。ATR は DNA2 本鎖から 1 本鎖が露出した状態の時に、DNA-PKcs は DNA2 本鎖損傷発生時に様々な分子のリン酸化を介して DNA 損傷応答を制御することが知られている。本研究では、DNA の相同組換え修復過程において行われる DNA end resection における ATR や DNA-PKcs の活性制御とユビキチン化との関連について分子生物学的に検証を行った。DNA end resection 部位において露出した DNA1 本鎖には RPA が結合し、ATR や DNA-PKcs によりリン酸化が行われる。このリン酸化には、いくつかの E2 ユビキチン化酵素と E3 ユビキチンリガーゼが関与していることを示唆する結果を得た。今後、相同組換え修復制御機構を「DNA end resection- ユビキチン化-ATR/DNA-PKcs による RPA リン酸化の軸」から明らかにする事で、ゲノム不安定性症候群の病態解明につながる重要な知見が得られると考えられる。(中田)

D/E. 考察と結論

ゲノム不安定性を示す稀少な難治性遺伝性疾患群の症例収集ネットワークの構築は順調に進んでいる。これを反映して、本年 1 年間で、XP、CS、WRN、SS、UV^S 等の症例約 300 例を収集した。さらに、迅速・高精度な確定診断を提供する DNA 修復/遺伝子診断拠点の構築にむけて、新たな診断方法を確立した他、次世代ゲノム解析技術の改良なども行った。これにより、確定診断に多大な労力を要していた DNA 二重鎖切断修復機構の異常による疾患のスクリーニングが可能となり、新規疾患の同定につながった。今後も、検体収集ネットワークの拡大と臨床診断技術の向上、疾患発症のメカニズムを探る基礎研究を進める事で、診断拠点として活動するだけでなく、病態の解明と治療薬・緩和薬開発につながる知見の蓄積に貢献できると期待される。

本研究班は、実施した確定診断の結果を臨床現場へ還元し、患者の増悪因子排除などに利用することで、社会貢献も果たしてきた。今後、さらに研究班の活動を活発にすることで、患者、患者家族、臨床医のサポートを進めながら、基礎的研究の発展も望める。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 EL, Chambers H, Cross HE, Fawcett H, Nakazawa Y, Chioza BA, Harlalka GV, Mansour S, Sreekantan-Nair A, Patton MA, Muggenthaler M, Rich P, Wagner K, Coblenz R, Stein CK, Last JI, Taylor AM, Jackson AP, Ogi T, Lehmann AR, Green CM, Crosby AH.

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、郭朝万、嶋田繭子、宮崎仁美、唐田清伸、荻朋男
「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

Guo C, Nakazawa Y, Shimada M, Jia N, Karata K, Miyazaki H, Ogi T.

「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、郭朝万、荻朋男

「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、中沢由華、郭朝万、嶋田繭子、賈楠、唐田清伸、荻朋男

「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、中沢由華、郭朝万、賈楠、宮崎仁美、
唐田清伸、荻朋男
「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

The 9th 3R Symposium
Ogi T
「Molecular cloning and characterisation of
new human DNA repair genes」
御殿場 2014 年 11 月

The 9th 3R Symposium
Guo C, Nakazawa Y, Shimada M, Woodbine L, Jia
N, Karata K, Miyazaki H, Lehmann A, Jeggo PA,
Ogi T.
「Molecular characterization and functional
analysis of XRCC4, a novel pathological gene
for radiation sensitivity and developmental
abnormalities」
御殿場 2014 年 11 月

The 9th 3R Symposium
Nakazawa Y, Kashiyama K, Pilz DT, Guo C,
Shimada M, Sasaki K, Fawcett H, Wing JF, Lewin
SO, Carr L, Li TS, Yoshiura K, Utani A, Hirano
A, Greenblatt D, Nardo T, Stefanini M,
McGibbon D, Sarkany R, Fassihi H, Mitsutake N,
Lehmann AR, Ogi T.
「ERCC1/XPF deficiency causes three NER-
deficient disorders: a patient with various
symptoms of xeroderma pigmentosum, Cockayne
syndrome & 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、郭朝万、嶋田繭子、賈楠、唐田清伸、
永山雄二、荻朋男
「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 T
「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：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：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

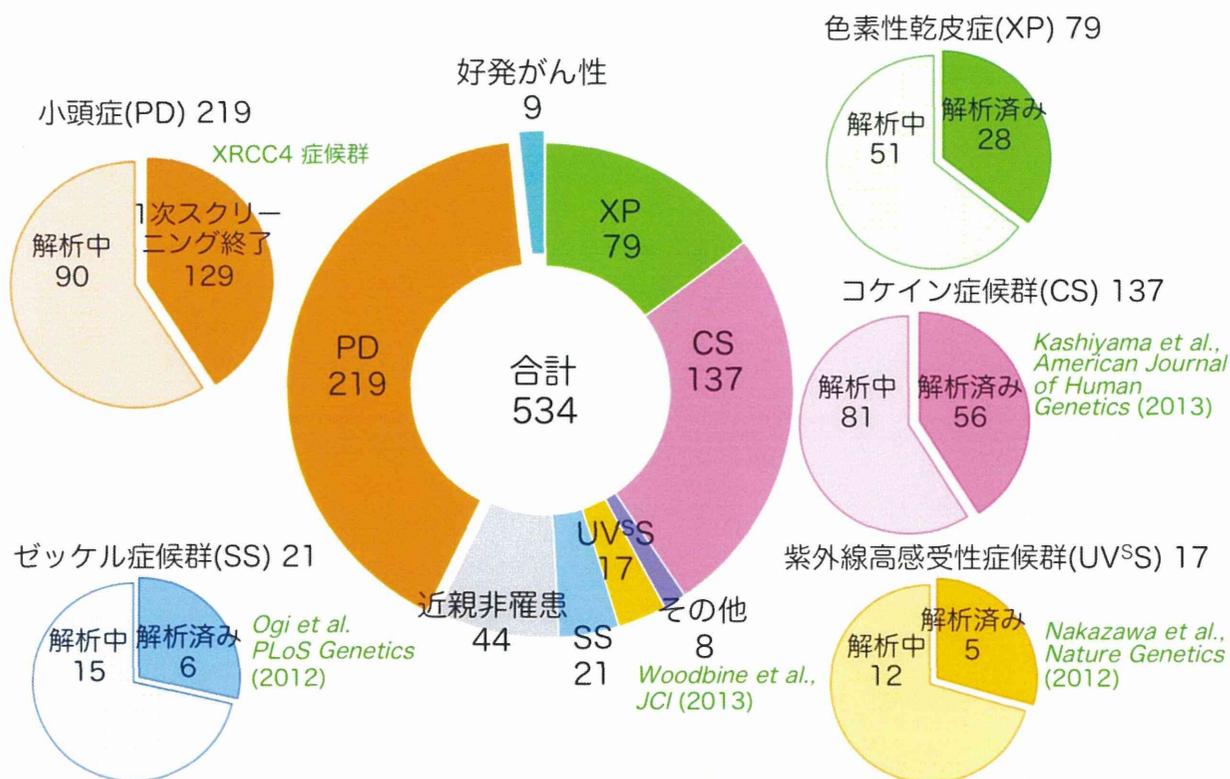


図1 本拠点において収集した症例



図2 コケイン症候群患者会と色素性乾皮症患者会の様子

Ⅱ. 委託業務成果報告（分担）

厚生労働科学研究委託費

(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))

委託業務成果報告 (分担)

ヌクレオチド除去修復 (NER) 異常症 (色素性乾皮症/コケイン症候群) の 症例収集と診断に関する研究

担当責任者 錦織 千佳子 神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野 教授

研究要旨

神戸大学に色素性乾皮症を疑われて受診した症例について、不定期DNA合成能測定を用いたヌクレオチド除去修復活性と色素性乾皮症の各相補性群cDNAを含むプラスミドを遺伝子導入して宿主細胞回復を指標に遺伝性相補性テストを実施し、相補性群の決定・疾患責任遺伝子を行なった。遺伝子解析については、各疾患責任遺伝子において、日本で比較的頻度の高い (創始者変異) を中心に当施設で遺伝子解析を進めたが、既知の遺伝子に疾患責任変異が認められない症例について、次世代ゲノム解析を長崎大学で実施するために、試料を供した。

A. 研究目的

ヌクレオチド除去修復機構 (NER) の修復活性、宿主細胞回復を指標に遺伝性相補性群試験の結果を踏まえて責任遺伝子の遺伝子解析により、XP の遺伝子診断を行なう。その方法で遺伝子変異が見つからない症例については次世代ゲノム解析による遺伝子診断を実施し、病態解明に資する。

B. 研究方法

臨床的に色素性乾皮症 (XP) を疑われて神戸大学に紹介された症例を中心に、不定期 DNA 合成量 (UDS) を測定するとともに、チミンダイマーに対するモノクローナル抗体を用いて NER の修復活性を評価した。NER 活性の低下している群について、色素性乾皮症の各相補性群 cDNA を含むプラスミドを遺伝子導入して宿主細胞回復を指標に遺伝性相補性テストを実施し、相補性群の決定・疾患責任遺伝子の決定を行なった。各エクソン毎にダイレクトシーケンシング法により、疾患責任遺伝子の変異の同定を行なった。NER の低下がみられないが、XP を強く疑った症例について XP-V の責任遺伝子である POLH タンパクを免疫ブロットにより検出した。XP 関連遺伝子に変異が同定されなかった症例は、次世代ゲノム解析により、遺伝子の変異の同定を試みるべく長崎大学に試料を供した。

(倫理面への配慮)

研究推進にあたっては人権保護・擁護、個人情報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 (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した。

C. 研究結果

神戸大学に紹介を受けた患者は 20 名でそのうち NER が低下していた症例は 8 例あり、XP-A : 3 例、XP-V : 4 例、XP-C : 2 例、XP-D : 2 例を同定した。XP-A 群、XP-D 群については、何れの患者においても、少なくとも一方のアルルに既知の変異があった。相補性群テストで XP-F を疑うも同定が出来なかった 1 症例については、NGS を実施し、XP-F と診断された。POLH タンパクを検出できなかった症例が 4 例あり、それらについては POLH 遺伝子に原因となりうる遺伝子変異を同定した。臨床的に XP を疑われたが XP ではないと考えられる症例が 8 例あった。

D. 考察

皮膚科医が XP を疑って XP であると診断できた症例は 67% であり、正診率はかなり高い。したがって臨床家のスクリーニングを経て遺伝子解析

を実施するのは診断効率が高いと考えられる。XP-A 群の患者においては創始者変異が知られており、今回の患者もいずれか一方に創始者変異をもっていたため、創始者変異から調べると効率が良い。一方、以前の報告でもそうであるが、XP-F については、日本における創始者変異、あるいは、塩基配列上のホットスポットはなく、遺伝子型表現型相関も明らかではないので、強く疑う場合は NGS による解析が威力を発揮できると考える。

E. 結論

XP 疑いの患者に対する、NER アッセイ、宿主細胞回復を指標とした遺伝子相補性試験、ゲノム解析による臨床診断は、非常に有効である。各患者の確定診断を実施することで、医療に資するとともに、将来的には DNA 修復能がいかなる病態に帰結するかについての情報も得られる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. *Journal of Investigative Dermatology* 134: 1775-1778 (2014)

Toga T, Kuraoka I, Watanabe S, Nakano E, Takeuchi S, Nishigori C, Sugasawa K, Iwai S. Fluorescence detection of cellular nucleotide excision repair of damaged DNA. *Scientific Reports* 4: 5578 (2014)

Nishigori C.

Photocarcinogenesis and inflammation. *Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects*. Edited by Yusuke Hiraku, Shosuke Kawanishi, Hiroshi Ohshima, John Wiley & Sons, Inc, : 271-283 (2014)

Yogianti 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.

Journal of Investigative Dermatology 134: 2610-2619 (2014)

錦織千佳子

色素性乾皮症 (XP) バリエント型.
皮膚病診療 36: 998-1006 (2014)

中野英司、錦織千佳子

光老化のモデルとしての色素性乾皮症.
医学の歩み 248: 577-581 (2014)

2. 学会発表

第 113 回日本皮膚科学会総会・学術大会 (教育講演)

錦織千佳子

「光線過敏症の最近の動向」

京都 2014 年 5-6 月

第 38 回日本小児皮膚科学会学術大会

錦織千佳子

「小児色素性乾皮症 C 群の 1 例」

東京 2014 年 7 月

第 36 回日本光医学・光生物学会

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

「細胞の紫外線損傷 DNA 修復能の蛍光検出」

吹田 2014 年 7 月

XXII International Pigment Cell Conference

Nishigori C

「UV and Melanoma: Insights from Clinical View Points」

Singapore, Singapore 2014 年 9 月

16th International Congress on Photobiology

Nishigori C

「Photocarcinogenesis is a complex process caused by DNA damage, inflammation and immunosuppression」

Cordoba, Argentina 2014 年 9 月

3rd Eastern Asia Dermatology Congress

Nakano E, Ono R, Masaki T, Takeuchi S, Takaoka Y,

Sugasawa K, Nishigori C

「Genotype -Phenotype Correlation Among

Xeroderma Pigmentosum Complementation Group D」

Jeju, Korea 2014 年 9 月

第 57 回日本放射線影響学会

竹内聖二、松田外志朗、小野竜輔、錦織千佳子

「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」

鹿児島 2014 年 10 月

第 57 回日本放射線影響学会

松田外志朗、竹内聖二、小野竜輔、錦織千佳子

「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」

鹿児島 2014 年 10 月

日本研究皮膚科学会第 39 回年次学術大会・総会

Masaki T, Takeuchi S, Matsuda T, Nishigori C

「Microarray analysis in the keratinocyte and
melanocyte exposed to Narrow-band UVB and
Broad-band UVB」

吹田 2014 年 12 月

日本研究皮膚科学会第 39 回年次学術大会・総会

Nakano E, Takeuchi S, Ono R, Masaki T,

Nishigori C

「NER assay based on flow- cytometry of
pyrimidine dimer immunocytochemistry:
comparison with unscheduled DNA synthesis
using autoradiography」

吹田 2014 年 12 月

第 438 回日本皮膚科学会京滋地方会

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

「診療科横断的な色素性乾皮症の診療経験」

京都 2014 年 12 月

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

甲状腺癌に関する調査研究

担当責任者 光武 範吏 長崎大学原爆後障害医療研究所 准教授

研究要旨

次世代ゲノム解析のワークフローを整備し、様々な疾患モデルに対応する解析パイプラインを最適化した。甲状腺癌症例約70例を収集し、核酸抽出、遺伝子バンク樹立の基盤整備を行った。これら症例に対し、既知の腫瘍体細胞変異、疾患罹患感受性多型の同定等のゲノム解析を行い、疾患発症因子群の分別を施行中である。

A. 研究目的

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の責任遺伝子の同定率を向上させ、疾患発症のメカニズムを明らかにする。また、これらゲノム不安定性を示す疾患には、傷害された DNA 修復分子の違いにより、易発がん性を示すものとそうでないものが存在する。本研究により特定の DNA 修復経路の分子機能と発がんメカニズムとの関連を解明し、その知見を一般集団に還元することを目的とする。

B. 研究方法

次世代ゲノム解析技術により得られたデータを、様々な疾患モデルに対して最適化し、さらに他のゲノム解析技術を開発、組み合わせることによって、疾患関連遺伝子の同定率を向上させる。様々な甲状腺乳頭癌症例 (成人散発性、小児、放射線誘発) を収集し、正常部、腫瘍部の核酸を抽出、遺伝子バンクを樹立する。これら試料の腫瘍体細胞変異、ゲノム解析を様々な手法で行う。(倫理面への配慮)

ヒトゲノム研究は、長崎大学の倫理委員会の承認を得て実施されている。

C. 研究結果

次世代ゲノム解析に関しては、それぞれの研究分担者の解析対照を考慮し、様々な公的データベースにおける多型や変異情報を取り込み、利用する閾値や組み合わせを検討、最適化を行った。今後も解析アルゴリズムやデータベースのアップデートに合わせ、柔軟に対応していく必要がある。

本年度は、甲状腺癌症例約 70 例を収集、核酸抽出を行い、現在、腫瘍体細胞変異、疾患感受性遺伝子多型の解析中である。

D. 考察

ゲノム解析のワークフロー、症例収集のためのネットワーク構築、核酸の抽出方法は概ね確立、最適化できた。実際の試料収集はまだ開始されたばかりで、解析によるデータも得られつつあるところである。

E. 結論

研究遂行の基盤整備は確実に進んでいる。今後、様々な収集症例に対応していけるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Rogounovitch T, Bychkov A, Takahashi M, Mitsutake N, Nakashima M, Nikitski A, Hayashi T, Hirokawa M, Ishigaki K, Shigematsu K, Bogdanova TI, Matsuse M, Nishihara E, Minami S, Yamanouchi K, Ito M, Kawaguchi T, Kondo H, Takamura N, Ito Y, Miyauchi A, Matsuda F, Yamashita S, Saenko V.

The common genetic variant rs944289 at chromosome 14q13.3 associates with risk of both malignant and benign thyroid tumors in Japanese population.

Thyroid: Epub (2015)

Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Yamashita S.

Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: Possible roles of radiation in carcinogenesis. *Cancer Science*: Epub (2014)

Kurashige T, Shimamura M, Yasui K, Mitsutake N, Matsuse M, Nakashima M, Minami S, Eguchi S, Nagayama Y.

Studies on Expression of Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancerous Tissues of Thyroids.

Hormone and Metabolic Research: Epub (2014)

Ito M, Bogdanova T, Saenko V, Rogounovitch T, Mitsutake N, Kondo H, Maeda S, Nakashima M, Yamashita S.

Morphological difference in adult thyroid papillary carcinoma between Japan and Ukraine.

Endocrine Journal: Epub (2014)

2. 学会発表

11st Asia Oceania Thyroid Association Congress Mitsutake N

「Genetic alterations in thyroid cancer and their clinical implications」

Kochi, India 2014年9月,

第 87 回日本内分泌学会学術総会

Saenko V, Rogounovitch T, Bychkov A, Mitsutake N, Matsuse M, Nishihara E, Hirokawa M, Nikitsky A, Minami S, Yamanouchi K, Yoshiura K, Miyauchi A, Yamashita S.

「Association of polymorphism in the *FOXO1* gene locus with papillary thyroid carcinoma in Japanese patients」

福岡 2014年4月

第 87 回日本内分泌学会学術総会

ログノビッチ タチアナ、サエンコ ウラジミール、ピチコブ アンドレイ、ニキツキー アリャクサンドル、高橋めい子、中島正洋、林徳眞吉、廣川満良、宮内昭、石垣克、重松和人、松瀬美智子、光武範史、西原永潤、南恵樹、山内孝彰、伊東正博、吉浦孝一郎、松田文彦、山下俊一

「Rare T allele of rs944289 associates not only with risk of malignant but also of benign thyroid tumors」

福岡 2014年4月

第72回日本癌学会学術集会

鈴木啓司、光武範史、山下俊一

「放射線発がんプロセスに関与する甲状腺生物

学」
横浜 2014年10月

第57回日本甲状腺学会学術集会

松瀬美智子、鈴木啓司、山之内孝彰、光武範史、山下俊一

「三次元培養法を用いた新たな甲状腺初代培養法の開発」

大阪 2014年11月

第 57 回日本甲状腺学会学術集会

Nikitski A, Mitsutake N, Saenko V, Rogounovitch T, Yamashita S.

「Effect of targeted overexpression of Foxel on a mouse thyroid」

大阪 2014年11月

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

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集と臨床診断

担当責任者 中沢 由華 長崎大学原爆後障害医療研究所 助教

研究要旨

国内外のゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集と臨床診断を実施した。DNA修復活性の測定その他、ウイルス相補性試験による責任遺伝子の同定、およびゲノム解析による原因変異の決定を行い、診断結果を検体提供元へ報告した。責任遺伝子変異が同定されなかった症例に関しては、次世代ゲノム解析による新規疾患責任遺伝子変異の同定を試みた。

A. 研究目的

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群を、国内外から多数収集する。DNA 修復活性測定、ウイルス相補性試験、次世代ゲノム解析等を統合的に用いて、これらの症例の臨床診断 (疾患責任遺伝子変異の同定)を行う。合わせて、新規疾患責任遺伝子探索も実施する。また、解析結果を検体提供元へ報告し、疾患特有の増悪因子の排除等に役立てる。

B. 研究方法

コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)、ゼッケル症候群 (Seckel syndrome: SS)、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP)、複合免疫不全 (combined immunodeficiency: CID)、ヘリケース異常症などの症例を中心に、ゲノム不安定性を伴う稀少難治性遺伝性疾患群を多数収集する。国内外の小児科・皮膚科、あるいはDNA 修復関連の研究を実施している機関より、新規症例だけでなく、過去に診断不明となっている症例についても合わせて収集する。これらを、発達異常、小頭症、日光過敏性、放射線感受性、神経症状、などの病態に応じて分類する。分類に基づいてDNA 損傷応答・DNA 修復活性を評価する。特に、DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand break: DSB) 修復の活性、ヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair: NER) の活性、DNA 損傷チェックポイントの活性の欠損について重点的に調査する。その後、レンチウイルス発現系により患者由来細胞に既知のDNA 修復因子を導入し、修復活性

の回復を評価する事で、疾患原因となっている変異を持つ遺伝子の確定をおこなう。さらに、レンチウイルス相補性試験により特定された遺伝子について、対象患者のゲノムDNA の配列解析を実施する事で、責任変異の同定を行う。既知のDNA 修復関連遺伝子に変異が同定されなかった症例に関しては、次世代ゲノム解析により新規疾患責任遺伝子変異の同定を試みる。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム研究は、長崎大学の倫理委員会の承認を得て実施されている。

C. 研究結果

新たに、約300例のゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患症例を収集した。これらの症例について、NERによる修復活性を調べる、UDS (不定期DNA 合成) 試験とRRS (RNA 合成回復) 試験を実施した。さらに、 γ H2AX のリン酸化を指標として、DSB 修復活性の評価も行った。収集した症例の約70% に関して、これら3種の試験による修復活性調査が終了した。現在、残りの症例に関しても、試験を進めている。修復欠損あるいは、修復活性異常が認められた検体に関しては、ウイルス相補性試験を実施し、既知のDNA 修復遺伝子の異常が疾患原因であるかの判定を行った。

DSB 修復活性に異常が認められた症例で、既知の疾患責任遺伝子変異が同定されなかった検体に対して、エキソーム解析を実施したところ、新規疾患責任遺伝子変異を同定することに成功した。本症例は、当初、CS との診断を受けていたが、

本研究において、CS 患者では異常を示す事が知られる RRS 試験では異常が認められず、DSB 修復異常が判明した。本症例解析に関しては、現在論文投稿中である。

本年度解析した症例の中には、上記例のような誤診が多数見受けられた他、過去に診断不明とされていた患者に関して、診断が確定した例も複数あった。診断が確定した症例については、解析情報を検体提供に報告するとともに、医療機関や研究者が共有できるゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群に関するデータベース構築に向けた情報整理を進めている。

D. 考察

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群に含まれる種々の疾患は、それぞれ病態にオーバーラップが認められることから、臨床所見のみでの確定診断は非常に困難である。さらに、これまで国内には、本疾患群を統合的に取り扱う専門機関が無く、疾患に関する知見不足につながっている。今回、多数の症例を収集・解析した結果、過去に診断不明であった症例に確定診断が付いたケース、あるいは誤診が発覚したケースもあり、これまでの診断基準の不鮮明さが明らかになった。一方で、本研究において用いた、DNA 修復活性測定、ウイルス相補性試験、ゲノム解析を併用する臨床診断方法は、非常に有効であることが示唆された。

C. 研究結果の項で示した誤診のケースでは、NER 欠損性の CS と考えられていた患者が、DSB 修復欠損の新規疾患である事が判明した。NER は紫外線による DNA 損傷の修復に関わるため、CS 患者は日光暴露を避ける事が必要となってくるが、DSB 修復欠損患者では、X 線などの医療被ばくをできるだけ控える事を考慮しなければならない。患者の予後に大きく影響する臨床診断結果を正しく行うために、より多くの症例を集め、解析し、知見を蓄積していく事が重要である。

E. 結論

ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群を統合的に診断・解析する拠点は非常に重要であり、得られた情報を適切に利用する事は、患者や患者家族、臨床医への大きな支援となる。今後、本拠点の拡充と研究ネットワークの拡大により、さらに多くの症例収集・臨床診断・症例解析が進み、その情報が共有される事で、疾患発症のメカニズム解明、新規確定診断技術の確立、病態緩和薬・治療薬の開発等につながっていくことが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 EL, Chambers H, Cross HE, Fawcett H, Nakazawa Y, Chioza BA, Harlalka GV, Mansour S, Sreekantan-Nair A, Patton MA, Muggenthaler M, Rich P, Wagner K, Coblenz R, Stein CK, Last JI, Taylor AM, Jackson AP, Ogi T, Lehmann AR, Green CM, Crosby AH.
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 荻朋男

「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

The 9th 3R Symposium

Nakazawa Y, Kashiyama K, Pilz DT, Guo C, Shimada M, Sasaki K, Fawcett H, Wing JF, Lewin SO, Carr L, Li TS, Yoshiura K, Utani A, Hirano A, Greenblatt D, Nardo T, Stefanini M, McGibbon D, Sarkany R, Fassihi H, Mitsutake N, Lehmann AR, Ogi T.

「ERCC1/XPF deficiency causes three NER-deficient disorders: a patient with various symptoms of xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome & Fanconi anemia.」
御殿場 2014 年 11 月

第 10 回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス

中沢由華、郭朝万、嶋田繭子、賈楠、唐田清信、永山雄二、荻朋男

「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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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：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：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