

Figure 3. UVB-induced inflammation was attenuated in the skin of *Ogg1*-KO mice that were fed *Spirulina platensis* (SP). The relative mRNA expression of *IL-1β* (a) and *Cxcl1* (b) in the skin of *Ogg1*-KO and WT mice at different time points after UVB irradiation was determined with two-step real-time quantitative RT-PCR. The expression was normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Values shown are mean ± SD. Immunohistochemical study of IL-1β (c) and TLR4 (d) expression in *Ogg1*-KO and WT mouse skin. For each group, that is, WT/SP(-), WT/SP(+), KO/SP(-), and KO/SP(+), skin samples were obtained 24 hours after UVB irradiation along with no-UVB control and were subjected to immunohistochemical staining with either rabbit polyclonal antibody against IL-1β or TLR4. Positive cells in the epidermis are indicated by arrowheads. Scale bar = 50 μm. The relative mRNA expression of *TLR4* in *Ogg1*-KO and WT mice 24 hours after UVB exposure was evaluated with quantitative reverse transcriptase-PCR (e). IL, interleukin; KO, knockout; TLR4, Toll-like receptor 4; WT, wild-type.

DISCUSSION

Our results showed that UVB-induced skin tumor development was significantly suppressed by dietary *S. platensis* in mice, even though each of our experiments included only a relatively small number of mice per group and used only a historical control group of untreated mice (Kunisada *et al.*, 2005). Epidermal 8-oxoG formation was lower in the SP(+) group than in the SP(-) group, clearly indicating that *S. platensis* exerted a suppressive effect on ROS production caused by UVB in the skin. Indeed, when *S. platensis* is used as a dietary supplement, it increases the levels of antioxidant enzymes and the basal level of reduced glutathione in the tissues (Dasgupta *et al.*, 2001). In particular, the increase of reduced glutathione levels might lead to a decrease in the level of reactive electrophiles able to bind DNA, leading to reduction in ROS-induced 8-oxoG formation. Another significant finding of the present study was the anti-inflammatory effects of *S. platensis* on mouse skin caused by UVB in terms of erythema and ear swelling. Several studies have shown that the expression of the inflammatory cytokine IL-1 β is upregulated in UVB-irradiated skin cells (Skiba *et al.*, 2005; Meeran *et al.*, 2009), and we previously reported that the increase in the mRNA expression level of IL-1 β after UVB exposure was much higher in *Ogg1*-KO mice than in WT mice (Kunisada *et al.*, 2011). In addition, in the present study, *Cxcl1*, a chemokine that functions in neutrophil migration, was also significantly upregulated in *Ogg1*-KO mice after UVB irradiation. Indeed, neutrophil infiltration is a well-known consequence of UVB exposure in mouse skin (Oka *et al.*, 2011) and human skin (Hawk *et al.*, 1988), and infiltrative neutrophils as well as macrophages were more intensively observed in *Ogg1*-KO mice than in WT mice in our previous study (Kunisada *et al.*, 2011). We have also previously shown that significantly increased 3-nitro-L-Y modifications, product mediated by reactive nitrogen species such as peroxynitrite (ONOO⁻) at inflammation site, were detected after repetitive exposure of mice skin to UVB. Peroxynitrites are generated by the reaction of NO with superoxide (O₂⁻), which is released by the infiltrating neutrophils and macrophages (Hattori *et al.*, 1996). Peroxynitrite is known to inactivate important cellular targets and also mediate oxidative damage in DNA, suggesting that phycocyanin from *S. platensis* and phycocyanobilin might scavenge peroxynitrite (Bhat and Madyastha, 2001).

Furthermore, our present data showed that higher TLR4 expression is associated with more severe inflammation induced by UVB/ROS: higher amount of 8-oxoG is associated with higher expression of inflammatory cytokines such as IL-1 β and *Cxcl1* as well as higher expression of TLR4 (Figures 3d, e and 4). It has been shown that TLR4 is required for skin inflammation-mediated tumorigenesis in a two-stage chemical carcinogenesis model in which the high-mobility group box1 is released from keratinocytes and functions as a ligand for TLR4 (Branco-Madeira and Lambrecht, 2010; Mittal *et al.*, 2010). Our results have shown that *S. platensis* inhibits the expression of IL-1 β and TLR4 concomitantly with the inhibition of tumor development, especially inhibitory effect of *S. platensis* was prominent in *Ogg1*-KO mice, which could

imply that 8-oxoG might be some trigger signal for the TLR4 expression leading to inflammatory response. In our system, expressions of TLR4 both in the dermal inflammatory cells as well as in the epidermal keratinocytes were inhibited by *S. platensis* resulting in the inactivation of neutrophils and macrophages and leading to the downregulation of *Cxcl1* and IL-1 β , respectively. The action mechanism of how *S. platensis* inhibited TLR4 in the skin after UVB exposure remains to be elucidated. One possibility is through direct inhibition of TLR4 by *S. platensis* and the other possibility is through its antioxidant pathway resulting in the lower amount of 8-oxoG.

We also investigated which MAPK was actively involved. Our data showed that *S. platensis* effectively inhibited all the analyzed signal protein kinases (i.e., p38 MAPK, SAPK/JNK, and ERK), especially in *Ogg1*-KO mice after UVB exposure. Kim *et al.* reported that p38 MAPK regulates UVB-induced inflammatory responses, presumably through the induction of *Cxcl1*, IL-6, and cyclooxygenase-2 in the skin of hairless mice (Kim *et al.*, 2005). This finding suggested that *S. platensis* could function as a p38 MAPK inhibitor similar to SB203580, thereby suppressing the production of *Cxcl1* and leading to the attenuation of the inflammatory response induced by UVB exposure. In the present study, the phosphorylation of SAPK/JNK was effectively suppressed by *S. platensis* in *Ogg1*-KO and WT mice. As SAPK/JNK is inhibited by the antioxidant *N*-acetylcysteine in human keratinocytes (Assefa *et al.*, 1997), the inhibitory effects of *S. platensis* on the phosphorylation of SAPK/JNK might be attributed to the reduction of ROS production by UVB. Inhibition of the ERK pathway observed in *Ogg1*-KO mice, which regulates the development and progression of cancer (Dhillon *et al.*, 2007) and is involved in UV-induced skin cancers (Li *et al.*, 2012), explains one of its anticancer mechanisms.

In summary, dietary *S. platensis* effectively inhibited UVB-induced skin tumor development and induction in mouse skin through its anti-inflammatory and antioxidant properties. In addition, *S. platensis* also suppressed the phosphorylation of p38 MAPK, SAPK/JNK, and ERK, indicating that it possesses various effective sites for the inhibition of skin tumor development upon UVB exposure. *S. platensis* could be safely and effectively used as a daily dietary supplement for protection against UVB-induced skin tumorigenesis. Our present investigation also supports the epidemiological findings that acute intense exposure to UVR is a risk factor for the development of skin cancers.

MATERIALS AND METHODS

S. platensis dietary food

A fine dark blue-green dried powder containing *S. platensis* and purified phycocyanobilin (PCB), the active form of the main compound C-phycocyanin in *S. platensis*, were kindly provided by DIC LIFTECH (Tokyo, Japan). The purity of C-phycocyanin and phycocyanobilin as estimated by purification with high-performance liquid chromatography was 95 and 85%, respectively. A diet supplemented with 10% *S. platensis* was prepared with standard chow purchased from Clea Japan (Tokyo, Japan). The highest dose of *Spirulina* recommended as health food is 4 g per day for adults with a body weight of 50 kg, and a 10% dose of *S. platensis* is consistent with

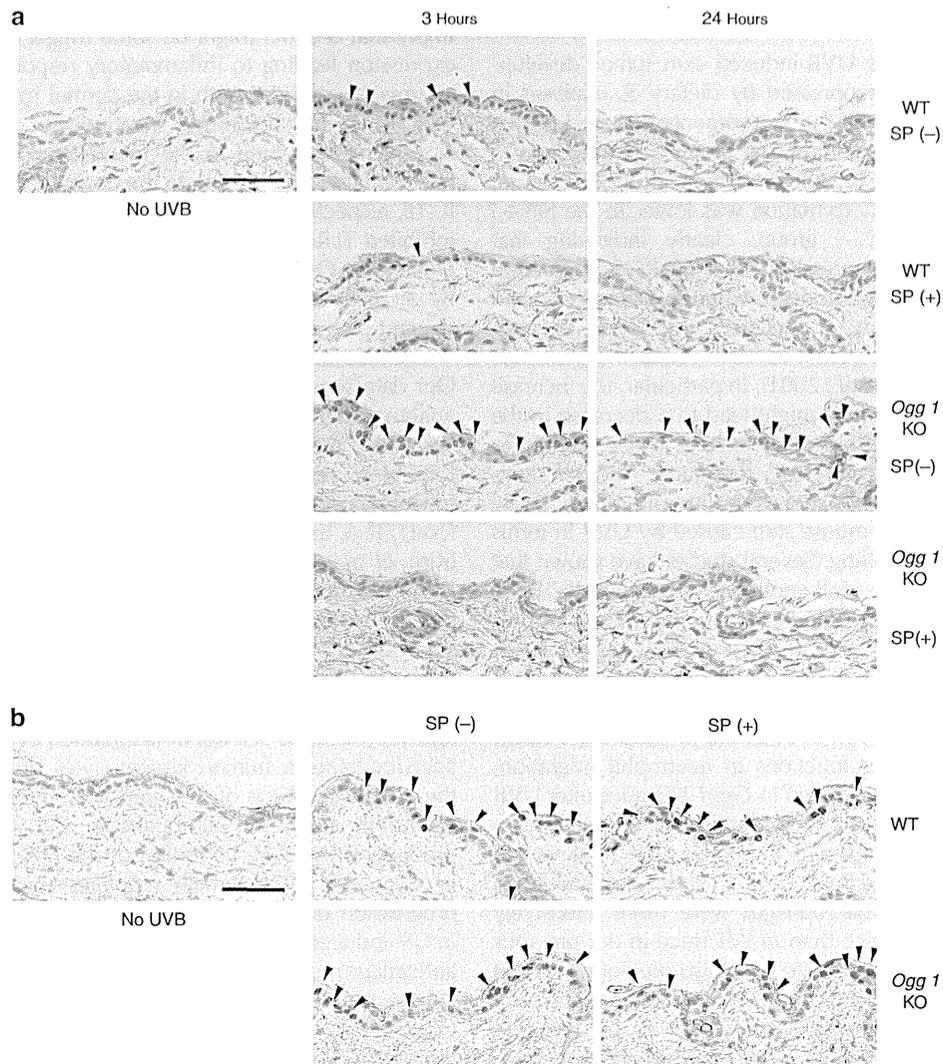


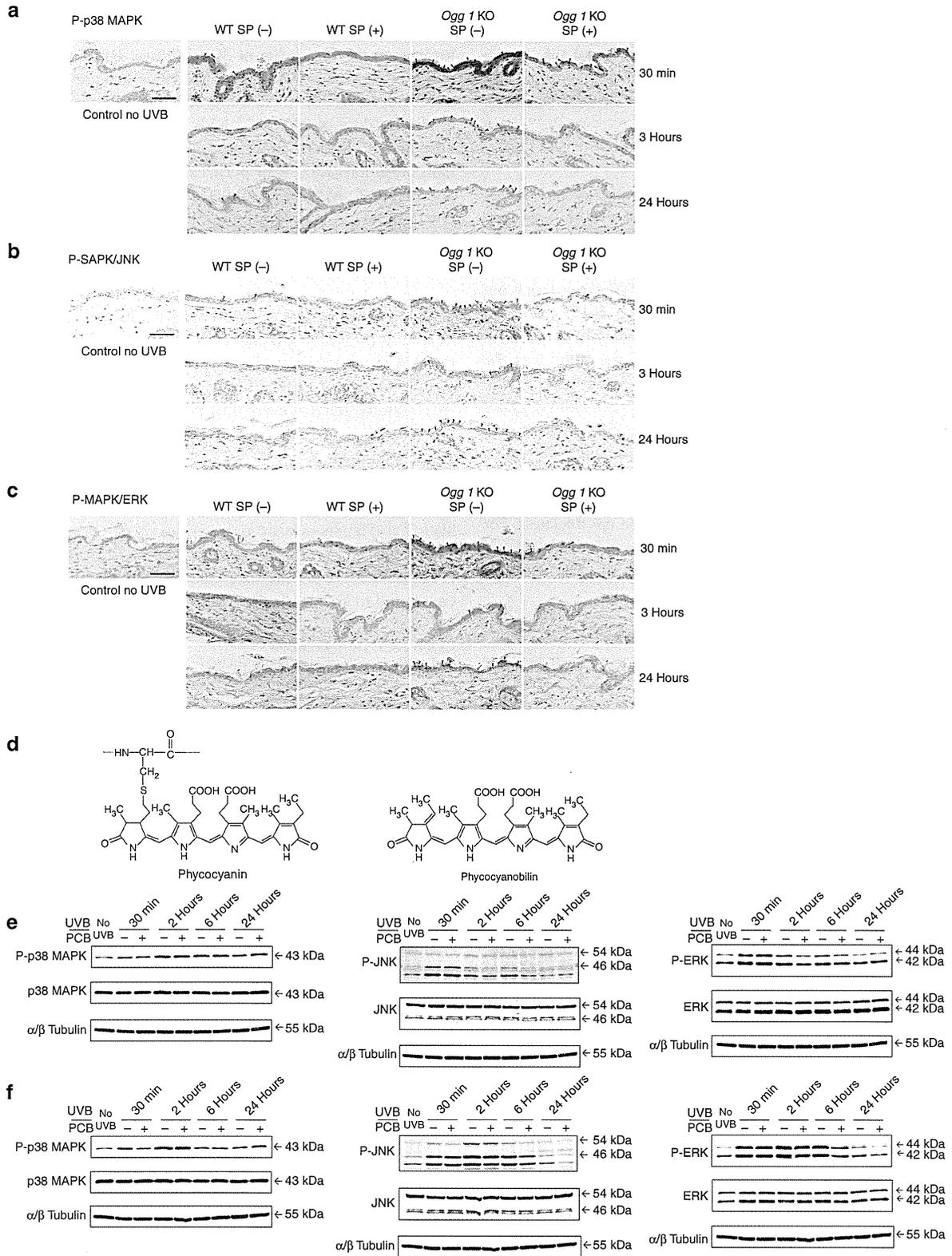
Figure 4. Reduction in oxidatively damaged DNA in the groups of *Spirulina platensis* (SP) treated mice. (a) Formation of 8-oxoG in *Ogg1*-KO and WT mouse skin with or without *S. platensis* after UVB exposure. For each group, that is, WT/SP(-), WT/SP(+), KO/SP(-), and KO/SP(+), skin samples were obtained 3 and 24 hours after UVB irradiation along with no-UVB control and subjected to immunohistochemical staining with mouse mAb against 8-oxoG. Positive cells in the epidermis are indicated by arrowheads. Scale bar = 50 μ m. (b) Immunohistochemical study for CPDs in *Ogg1*-KO and WT mice skin with or without *S. platensis* after UVB exposure. Skin samples from WT/SP(-), WT/SP(+), KO/SP(-), and KO/SP(+) mice were taken 3 hours after UVB irradiation, and immunohistochemical staining was performed using mouse mAb against cyclobutane pyrimidine dimer (TDM-2). 8-oxoG, 8-oxo-7,8-dihydroguanine; KO, knockout; WT, wild-type.

Figure 5. Phosphorylation of stress-activated protein kinases, p38 MAPK, JNK, ERK in *Ogg1*-KO and WT mice was suppressed by *Spirulina platensis*. Immunohistochemical study of phosphorylation of p38 MAPK (a), JNK (b), and ERK (c) in *Ogg1*-KO and WT mice skin. For each group, that is, WT/SP(-), WT/SP(+), KO/SP(-), and KO/SP(+), skin samples were obtained 30 minutes, 3 hours, and 24 hours after UVB irradiation along with no-UVB control and subjected to immunohistochemical staining with rabbit polyclonal antibody against phospho-p38 MAPK, phospho-SAPK/JNK, and phospho-MAPK/ERK. Positive cells are indicated by arrowheads. Scale bar = 50 μ m. Phosphorylation of SAPK, p38 MAPK, JNK, and ERK was suppressed in phycocyanobilin-treated *Ogg1*^(+/+) and *Ogg1*^(-/-) MEFs. (d) Chemical structure of phycocyanin (left) and phycocyanobilin (PCB; right). PCB was purified and analyzed with high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Immediately after plating, MEFs were incubated with normal medium or 5 μ g/ml (8.49 μ M) PCB for about 16 hours (overnight), and were then exposed to UVB and incubated again with normal medium or PCB-containing medium until the time of protein extraction (30 minutes, 2 hours, 6 hours, and 24 hours after UVB exposure). The levels of phosphorylation of p38 MAPK, JNK, and ERK in *Ogg1*^(+/+) (e) and *Ogg1*^(-/-) (f) MEFs were studied by western blot analysis. *Ogg1*^{(+/+)/PCB(-)}, *Ogg1*^{(+/+)/PCB(+)}, *Ogg1*^{(-/-)/PCB(-)}, and *Ogg1*^{(-/-)/PCB(+)}. Each experiment is representative of three separate determinations. ERK, extracellular signal-regulated kinase; KO, knockout; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; SAPK/JNK, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase; WT, wild-type.

previous reports examining the physiological activity of *Spirulina* in rodents (Rodriguez-Hernandez et al., 2001; Ishimi et al., 2006; Lu et al., 2010).

Mice

Ogg1-KO mice were developed as described previously (Sakumi et al., 2003). Mice were selected and divided into two groups:



Ogg1-KO and WT. Next, each genotype group was subdivided into two groups, the *S. platensis* diet (SP(+)) and normal diet (SP(-)) groups. In total, four groups consisting of 10 mice each were irradiated with UVB. To investigate the effect of the *S. platensis* diet on the erythema response, we used *Kud*⁻ hairless mice, which were divided into two groups, SP(+) and SP(-), and the mice in the SP(+) group were fed the *S. platensis* diet from 4 weeks of age. All the animal experiments were conducted according to the Guidelines for Animal Experimentation of the Kobe University Graduate School of Medicine.

UVB irradiation

A bank of six TL 20W/12RS fluorescent lamps (Philips, Eindhoven, Holland) was used to irradiate the mice as described previously (Kunisada *et al.*, 2005). For skin tumor production, the dorsal parts of the mice were shaved and the mice were placed 40 cm below the light source and irradiated with 2.50 kJ m⁻² UVB three times per week for 40 weeks. The data for the SP(-) group of WT mice and *Ogg1*-KO mice were reintroduced from the results of our previous study. (Kunisada *et al.*, 2005). The duration of the study was the same between the present and previous studies, and one of the experimenters was involved in both studies. The procedure of chow production was the same with or without *S. platensis* and was carried out by the same company, Clea Japan. For studying the acute response to UVB irradiation, four groups (*Ogg1*-KO/SP(+), *Ogg1*-KO/SP(-), WT/SP(+), and WT/SP(-)) of mice were irradiated with a single dose of 2.50 kJ m⁻² UVB to measure the ear thickness. For determining the erythema score and ear thickness in *Kud* Hairless mice, the mice were irradiated with a single dose of 1.50 kJ m⁻² UVB.

RNA isolation and real-time qPCR

RNA was isolated from mouse dorsal skin at 3, 6, and 24 hours after UVB exposure, as described previously (Kunisada *et al.*, 2011). The expression levels of *IL-1β*, *Cxcl1*, and *TLR4* were analyzed using two-step real-time quantitative reverse transcriptase-PCR (qPCR) using the Universal Probe Library (LightCycler 480 System II; Roche, Mannheim, Germany), according to a previously published protocol (Kunisada *et al.*, 2011). The expression levels of *IL-1β*, *Cxcl1*, and *TLR4* were normalized based on the level of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. All expression levels were again normalized based on 18s ribosomal RNA levels to confirm consistency with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase normalization (data not shown). Information on the primer sets used for *IL-1β*, *Cxcl1*, and *TLR4* is given in Supplementary Information online.

Immunohistochemical study

Skin specimens were obtained at 30 minutes, 3 and 24 hours after UVB exposure, fixed with 10% neutralized formalin, embedded in paraffin, and used for immunohistochemical staining using mAb against 8-oxoG (N45.1) or cyclobutane pyrimidine dimer (TDM-2) and rabbit polyclonal antibody against IL-1β (Abcam, Cambridge, MA), TLR4 (Abcam), phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185; Cell Signaling), and (ERK) 1/2 (Promega, Madison, WI) as described elsewhere (Kunisada *et al.*, 2007, 2011).

Western blot for p38 MAPK, SAPK/JNK, and ERK using *Ogg1* MEFs

Ogg1-KO MEFs, that is, *Ogg1*^(-/-) (OG7L), along with WT *Ogg1*^(+/+) (OG9L) MEFs were established previously (Oka *et al.*, 2008). MEFs were divided into four groups: *Ogg1*^(+/+) treated with 5 μg ml⁻¹ PCB, *Ogg1*^(+/+) without PCB, *Ogg1*^(-/-) treated with 5 μg ml⁻¹ PCB, and *Ogg1*^(-/-) without PCB. The dose 5 μg ml⁻¹ (8.49 μM) is lower than the IC₅₀ value of 30.5 ± 0.8 μM, based on the inhibitory effects of peroxy-nitrite-dependent oxidation in a previous report (Bhat and Madyastha, 2001). All the groups were irradiated with a single irradiation dose of 200 J m⁻² UVB, and the cells were collected at 30 minutes, 2 hours, 6 hours, and 24 hours after UVB exposure. The blots were incubated with polyclonal antibody against p38 MAPK, phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), SAPK/JNK, phospho-JNK (Thr183/Tyr185), and alpha/beta-tubulin, which were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), and ACTIVE MAPK and (ERK) 1/2 (Promega, Madison, WI).

Evaluation of average erythema score and ear thickness

After UVB irradiation, evaluation of the erythema and ear thickness in the skin of mice from each group was performed as described previously (Ono *et al.*, 2012). Mean values for the grades were calculated for all the mice at every time point after UVB irradiation.

Statistical study

The differences in the number of developed tumors between the two groups were assessed for significance by using the Student's *t*-test. Statistical differences were examined with the χ²-test for the malignant tumor rate. Two-factor factorial analysis of variance was applied to differences in ear swelling and erythema scores. *P* < 0.05 was considered to be statistically significant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant-in-Aid 19390296 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT), Grant-in-Aid from the Program for "Raising Young Research Leaders in Biomedical Science of Kobe University", the Foundation of International Dermatology of Charitable Trust, Global Centre of Excellence Program for "Education and Research on Signal Transduction Medicine in the Coming Generation" (GCOE Program "Signal") of MEXT, the Kanoe Foundation for the Promotion of Medical Science, and the Cosmetology Research Foundation. We thank DIC LIFTECH (Tokyo, Japan) for kindly providing us the *S. platensis* and PCB powder.

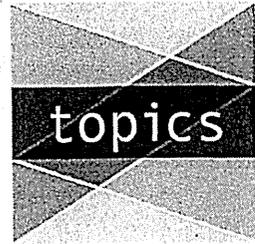
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

REFERENCES

- Aburatani H, Hippo Y, Ishida T *et al.* (1997) Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res* 57:2151–6
- Assefa Z, Garmyn M, Bouillon R *et al.* (1997) Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 108:886–91
- Belay A, Ota Y., Miyakawa K. *et al.* (1993) Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J Appl Phycol* 5:235–41
- Bermejo-Bescos P, Pinero-Estrada E, Villar del Fresno AM (2008) Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against

- iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicol In Vitro* 22:1496–502
- Bhat VB, Madyastha KM (2001) Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 285:262–6
- Branco-Madeira F, Lambrecht BN (2010) High mobility group box-1 recognition: the beginning of a RAGEless era? *EMBO Mol Med* 2:193–5
- Dasgupta T, Banejee S, Yadav PK et al. (2001) Chemomodulation of carcinogen metabolising enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. *Mol Cell Biochem* 226:27–38
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O et al. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26:3279–90
- Grawish ME, Zaher AR, Gaafar AI et al. (2010) Long-term effect of *Spirulina platensis* extract on DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis (immunohistochemical study). *Med Oncol* 27:20–8
- Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T et al. (1996) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* 107:733–7
- Hawk JL, Murphy GM, Holden CA (1988) The presence of neutrophils in human cutaneous ultraviolet-B inflammation. *Br J Dermatol* 118:27–30
- Hayashi K, Hayashi T, Kojima I (1996a) A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:1463–71
- Hayashi T, Hayashi K, Maeda M et al. (1996b) Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J Nat Prod* 59:83–7
- Howe HL, Wingo PA, Thun MJ et al. (2001) Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* 93:824–42
- Hutadilok-Towatana N, Reanmongkol W, Satitit S et al. (2008) A subchronic toxicity study of *Spirulina platensis*. *Food Sci Technol Res* 14:351–8
- Ishimi Y, Sugiyama F, Ezaki J et al. (2006) Effects of *Spirulina*, a blue-green alga, on bone metabolism in ovariectomized rats and hindlimb-unloaded mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:363–8
- Ismail MF, Ali DA, Fernando A et al. (2009) Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina*. *Int J Biol Sci* 5:377–87
- Khan M, Shobha JC, Mohan IK et al. (2005) Protective effect of *Spirulina* against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother Res* 19:1030–7
- Kim AL, Labasi JM, Zhu Y et al. (2005) Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *J Invest Dermatol* 124:1318–25
- Kim HM, Lee EH, Cho HH et al. (1998) Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Spirulina*. *Biochem Pharmacol* 55:1071–6
- Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S et al. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13300–5
- Kunisada M, Kumimoto H, Ishizaki K et al. (2007) Narrow-band UVB induces more carcinogenic skin tumors than broad-band UVB through the formation of cyclobutane pyrimidine dimer. *J Invest Dermatol* 127:2865–71
- Kunisada M, Sakumi K, Tominaga Y et al. (2005) 8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 65:6006–10
- Kunisada M, Yogiánti F, Sakumi K et al. (2011) Increased expression of versican in the inflammatory response to UVB- and reactive oxygen species-induced skin tumorigenesis. *Am J Pathol* 179:3056–65
- Li J, Malakhova M, Mottamal M et al. (2012) Norathyriol suppresses skin cancers induced by solar ultraviolet radiation by targeting ERK kinases. *Cancer Res* 72:260–70
- Lu J, Ren DF, Wang JZ et al. (2010) Protection by dietary *Spirulina platensis* against D-galactosamine- and acetaminophen-induced liver injuries. *Br J Nutr* 103:1573–6
- Maki H, Sekiguchi M (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355:273–5
- McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F (2010) Oral phycocyanobilin may diminish the pathogenicity of activated brain microglia in neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses* 74:601–5
- Meeran SM, Singh T, Nagy TR et al. (2009) High-fat diet exacerbates inflammation and cell survival signals in the skin of ultraviolet B-irradiated C57BL/6 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 241:303–10
- Minowa O, Arai T, Hirano M et al. (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4156–61
- Mittal D, Saccheri F, Venereau E et al. (2010) TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells. *EMBO J* 29:2242–52
- Nakabeppu Y, Oka S, Sheng Z et al. (2010) Programmed cell death triggered by nucleotide pool damage and its prevention by MutT homolog-1 (MTH1) with oxidized purine nucleoside triphosphatase. *Mutat Res* 703:51–8
- Nishigori C (2006) Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 5:208–14
- Nishigori C, Hattori Y, Toyokuni S (2004) Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 6:561–70
- Oka M, Edamatsu H, Kunisada M et al. (2011) Phospholipase C ϵ has a crucial role in ultraviolet B-induced neutrophil-associated skin inflammation by regulating the expression of CXCL1/KC. *Lab Invest* 91:711–8
- Oka S, Ohno M, Tsuchimoto D et al. (2008) Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J* 27:421–32
- Ono R, Masaki T, Dien S et al. (2012) Suppressive effect of recombinant human thioredoxin on ultraviolet light-induced inflammation and apoptosis in murine skin. *J Dermatol* 39:843–51
- Rodríguez-Hernández A, Ble-Castillo JL, Juárez-Oropeza MA et al. (2001) *Spirulina maxima* prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. *Life Sci* 69:1029–37
- Sakumi K, Tominaga Y, Furuichi M et al. (2003) Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res* 63:902–5
- Salazar M, Martínez E, Madrigal E et al. (1998) Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *J Ethnopharmacol* 62:235–41
- Schram BL, Kroes HH (1971) Structure of phycocyanobilin. *Eur J Biochem* 19:581–94
- Skiba B, Neill B, Piva TJ (2005) Gene expression profiles of TNF- α , TACE, furin, IL-1 β and matrilysin in UVA- and UVB-irradiated HaCat cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21:173–82
- Slaper H, Velders GJ, Daniel JS et al. (1996) Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna Convention achievements. *Nature* 384:256–8
- Urbach F (1997) Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. *J Photochem Photobiol B* 40:3–7
- Zheng J, Inoguchi T, Sasaki S et al. (2013) Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304:R110–20



色素性乾皮症(XP)バリエント型

錦織千佳子*

Key words

皮膚癌, 雀卵斑様色素斑, MED, DNAポリメラーゼη, 損傷乗り越え複製

はじめに

光線過敏症は原因が異なる多種多様の疾患を含んでいるが、小児における光線過敏症で忘れてはならないものの1つに色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum; XP)がある。XPは露光部に皮膚癌を好発する遺伝性の疾患群で、いくつかのタイプがある¹⁾。日本人のXPの半数を占めるXPのA群(XP-A)では日光曝露後の日焼けの症状が高度で、光に少し当たっただけで、翌日からひどい浮腫と紅斑を生じ、ときに水疱形成もきたす。それを繰り返すうちに、日光に当たった部位に雀卵斑(そばかす)様のシミが生じ、やがて若年からの皮膚癌を好発する。一方、日本人XPの約4分の1を占めるXPのバリエント型(XP-V)では、日焼けの症状はほとんど生じず、日光曝露を繰り返すうちに雀卵斑様の色素斑が多数生じる。このような日光曝露後の急性期症状の差から、XP-Aでは両親も早期に気づき、1~2歳で診断に至る例が多いのに比して、XP-Vでは急性期の反応に乏しいため診断が遅れ、若いころの紫外線防御が不完全であることも多く、中年以降に皮膚癌が多発する。いずれにしても、初期症状は光線に対する皮膚の異常な反応であり、初期診断における皮膚科専門医の役割は大きい。

I. 日光と皮膚癌

日光が皮膚癌の原因になることは経験的によく知られている。日光のなかには紫外線が含まれており、日光による皮膚癌の主因は紫外線(UV)と考えられているが、その理論的根拠は紫外線が遺伝子DNAに傷をつくるからである。癌はいくつかの癌関連遺伝子の傷が積み重なることにより生じる。皮膚に紫外線が当たると、皮膚を構成する細胞のDNAに紫外線のエネルギーが吸収される。そうするとDNAを構成する塩基であるピリミジン(チミン:T, シトシン:C)が隣接した部位に、ピリミジンダイマー、(6-4)光産物(ダイピリミジン光産物と総称)といった傷が生じ、それらが紫外線による致死作用ならびに突然変異を誘発する。ヒトでは紫外線DNA損傷であるダイピリミジン光産物は、ヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair; NER)というDNA修復機構により修復されるが、それでも傷が残ってしまった場合に、複製フォークがDNA損傷に遭遇すると、損傷を乗り越えて複製を行う、損傷乗り越え複製(translesion synthesis; TLS),あるいは相同組み換えのいずれかの機構で複製を遂行する²⁾(図1)。XPではこのような修復複製機構に障害があり、DNAの傷が修復されないために遺伝子の傷が積み重なって日光の当たった部位に皮膚癌が生じてしまう。

UVが皮膚癌の原因となることは経験的にもよ

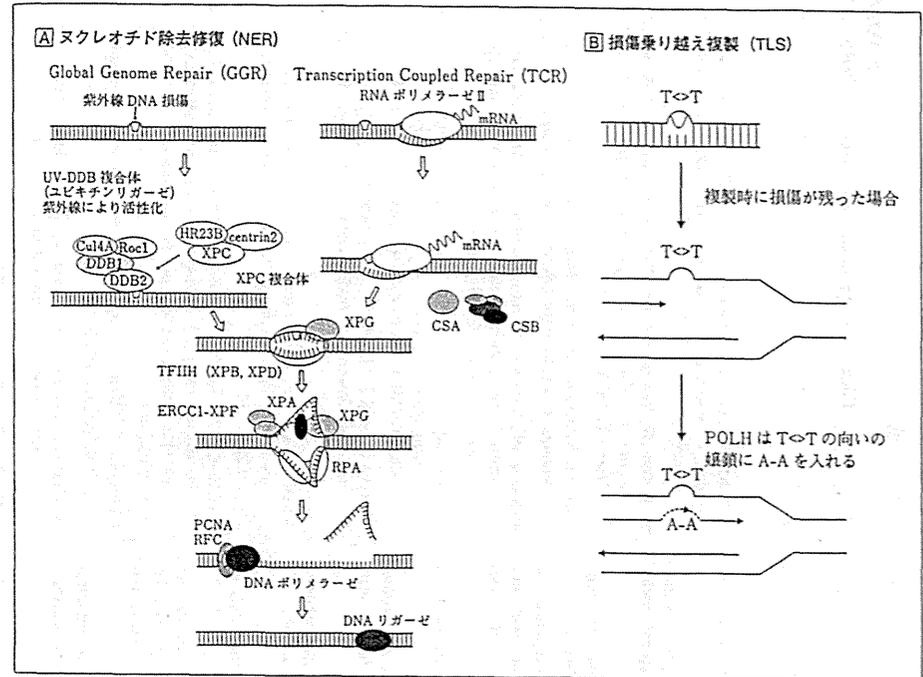


図1 紫外線によって生じた傷のDNA修復経路。ヌクレオチド除去修復(NER)(A)と損傷乗り越え複製(TLS)(B)の両方で紫外線によるDNAの傷を元に戻している。A)NER: 損傷のあるDNAをみつめて、損傷を含むフラグメント約30ヌクレオチドを切り取り、その部分を穴埋めする修復過程であるが、転写鎖をみつめてそれを優先的に修復する転写共役修復と、ゲノム全体を一樣にスキャンして損傷を順番に直していく全ゲノム修復の2つのタイプの修復経路を組み合わせて修復している。B)TLS: 時間的に余裕があれば、また、DNAの損傷が修復能力を超えていなければ、紫外線によって生じた傷はNERで修復されるが、複製時に傷が残っている場合にはTLS機構が働く。TLS機構は紫外線によって生じた傷があっても、その損傷を乗り越えて、A-Aを入れていくタイプの複製過程である。紫外線によって生じた傷はチミンダイマーが多いので、それについてはA-Aを対合すると、結果的には正しい塩基が対合されたことになるので、紫外線DNA損傷については修復されたのと同じ結果となる。

く知られているだけでなく、実験的、理論的にも数多くの証拠があるが、XPのような紫外線によって生じたDNAの傷を修復する酵素を欠損する疾患において日光露光部に皮膚癌が高率に発症するという事実は、日光のなかに含まれる紫外線が皮膚癌発症の原因の1つであることを示す根拠ともなっている。

II. 色素性乾皮症(XP)とはどんな病気か

XPは露光部に皮膚癌を好発することを共通点とする常染色体劣性遺伝性の疾患群で、日本人全人口における発生頻度は22,000人に1人と推定されている³⁾。2007~2010年にかけて厚生労働省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(班長・大塚藤男)」により、日本におけるXPの患者調査が実施され、患者数、相補性群の

*Nishigori, Chikako(教授) 神戸大学大学院医学研究科内科系器産皮膚科学分野(〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-1)

表1 色素性乾皮症(各群の比較)

相補性群	原因遺伝子	遺伝子の機能	UDS (%)	皮膚症状			神経症状	
				光線過敏	皮膚癌の初発平均年齢(歳)			
					BCC	SCC		MM
A	XPA	一本鎖DNA状態の安定化	<5	+++	9.7	9.1	10.2	++
B	XPB/ERCC1	3'→5'ヘリカーゼ	3~7	++				~++
C	XPC	損傷DNA認識	10~20	++	14.0	7.8	14.0	-
D	XPD/ERCC2	5'→3'ヘリカーゼ	20~50	++	38.0	35.3	39.5	~++
E	DDB2/p48	損傷DNA認識	40~60	+	38.3	-	-	-
F	XPF/ERCC4	5'エンドヌクレアーゼ	10~20	+	43.7	64.0	-	-
G	XPG/ERCC5	3'エンドヌクレアーゼ	<5	+	32.0	-	-	+
V	XPV/POLH	DNAポリメラーゼη	75~100	+	41.5	42.0	48.5	-

BCC: 基底細胞癌, SCC: 有棘細胞癌, MM: 悪性黒色腫

(文献5より引用, 文献6より一部改変)

分布などの現状把握が行われた。研修指定病院皮膚科609施設を対象としたアンケート調査の結果、回答のあった433施設(回答率71.1%)中、2006~2008年の3年間のいずれかでXP患者が受診した施設は87施設(15.2%)で、患者数は合計259名、男女比は、ほぼ1:1であった。分布は北海道5名、東北地方8名、関東地方6名、北陸・甲信越地方8名、東海地方30名、近畿地方108名、中国地方6名、四国地方8名、九州・沖縄地方24名で、患者は西日本に多い傾向があるものの、比較的広範囲に日本全国に散在していることから、早期発見には全国の皮膚科医の役割が大きいと思われる⁴⁾。

XPは、NER欠損型のA~G群とNERは正常で、TLSに障害のあるXP-Vの8つの相補性群に分けられるが(図1)、各相補性群でDNA修復能、日光曝露後の激しい日光皮膚炎の有無、露光部皮膚癌の初発年齢と発症頻度、神経症状の有無に差がある(表1)^{5,6)}。日本人XP患者の約半数はXP-Aで、約1/4がXP-Vである。XP-VはTLS機構に働くDNAポリメラーゼがあるポリメラーゼη(イータ)(Pol η)の障害が原因である。TLSは損傷があってもそれを修復することなく、そのまま複製を進めていくので、本来error prone(誤りがち)な複製経路といえるが、DNAポリメラーゼηの場合は、チミンダイマーの向かいの娘鎖にA-Aを入れる形で複製を進める(図1B)。太陽紫外線の90%以上を占める

UVAをヒトの皮膚に照射した場合、ピリミジンダイマーの中でもチミンダイマーが多くできていることが知られており⁷⁾、結果的にDNAポリメラーゼηは紫外線DNA損傷に関しては誤りが少ない複製となる。このようにヒトは紫外線によって遺伝子に傷がつくことから、巧みに生体を守るシステムを何重にも備えている。そのいずれかが破綻すると皮膚癌が生じやすくなるということになる。

光線過敏症は“健康人が照射されてもなら皮膚に異常を呈さない程度の光照射で、照射部位に異常な反応を呈する疾患”と定義される。最少紅斑量(minimum erythema dose; MED)の低下はその重要な指標の1つであるが、光による慢性の反応である日光曝露部に限局した色素斑は光線過敏の一症状と認識されずに、案外見落とされているケースが多い。実際、XPのA群だけでなく、B, D, F, G群では異常に強い日焼けがみられ、急性の激しい日光皮膚炎がおさまった後に種々の程度の色素沈着、脱色素斑を残し、それを繰り返すうちに皮膚の乾燥、毛細血管拡張もきたし、遮光が適切に行われなければ、幼児期から皮膚癌を多発する。しかし、XPの中でもC, E群, V型では日焼けをしやすいという自覚症状は乏しく、MEDも低下しない。激しい日焼けの反応がおこらないため、日光を避けることなく過ごし、幼少時期に露光部に限局した色素斑が現れ、それが年齢を追っ

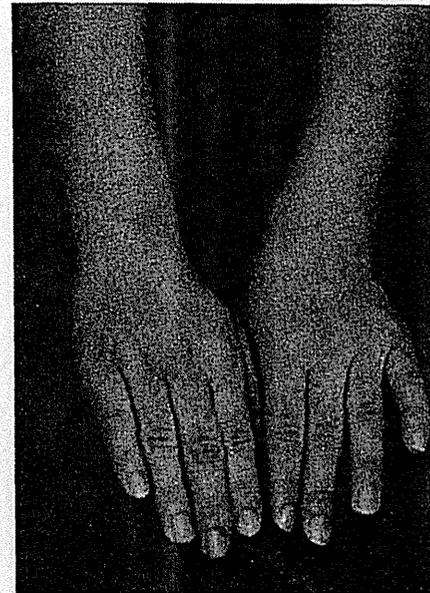


図2 XP-V小児例(12歳, 女). よくみると手背から前腕にかけて色素斑を認める。

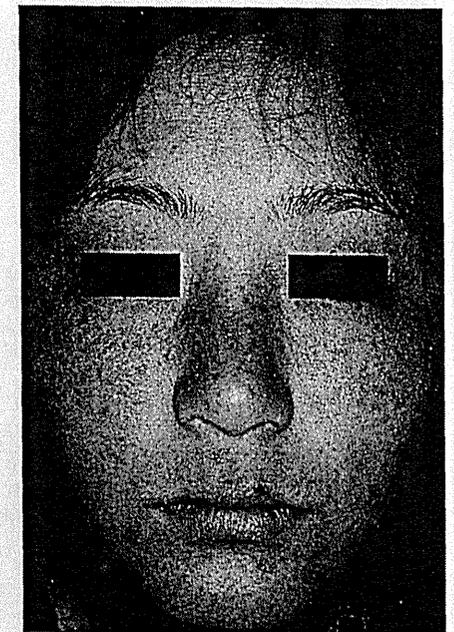


図3 XP-V(18歳, 女). 顔面全体に淡褐色の色素斑と毛細血管拡張を認め、皮膚全体は乾燥傾向が強い。

て増えることが唯一のサインである。XPでみられる雀卵斑様の色素斑の特徴は、雀卵斑で通常みられる部位を越えて、耳介、下顎、頸部、V-areaにも拡大して生じる。個々の色素斑の形状は不規則で大きさも大小入り乱れた色素斑が混在し、色調も不均一である点が臨床診断のうえで参考になる。色素斑、皮膚癌だけでなく、皮膚の乾燥、毛細血管拡張もみられ、これらはすべて、光老化の徴候であり、光老化が異常に早くおこっていると推察することができる(図2, 3)。雀卵斑様色素斑に気づかれる年齢、その程度は各患者の紫外線曝露の状況によって大きく異なるが、5~6歳で気づかれ始めることが多く、ほとんどの症例で10歳くらいまでに気づかれ、その後、皮膚癌も発生する(図4)。皮膚癌発生は早い症例で10代で、その後、20代、30代、40代と皮膚癌の発生が増えてくる(表2)。

日本人のXP患者の約半数を占めるXP-Aでは皮

膚症状はとりわけ重症で、皮膚、目の光線過敏症は生後初めての5分程度の日光曝露でも高度の紅斑、腫脹、水疱を伴う激しい日光皮膚炎を生じるが(図5)⁵⁾、その紅斑のピークは照射後3~4日目と遅延し、7~10日持続することが多い。それを繰り返すうちに露光部を中心とした色素斑が多数みられるようになり(図6)、遮光が適切に行われなければ、幼児期から皮膚癌を多発する。しかし、XP-Aであっても急性期の日焼け様の皮膚炎が軽快した後の色素斑だけではこの兆候の重要性を見落としてしまいかねない。XP-Aでは急性期の激しい急性期症状が特徴的であり、日本での頻度が高いことから皮膚科医の関心も高く、早期に診断され、その後の遮光の取り組みが熱心になされることから、皮膚癌発症は20年前と比較するとかなり

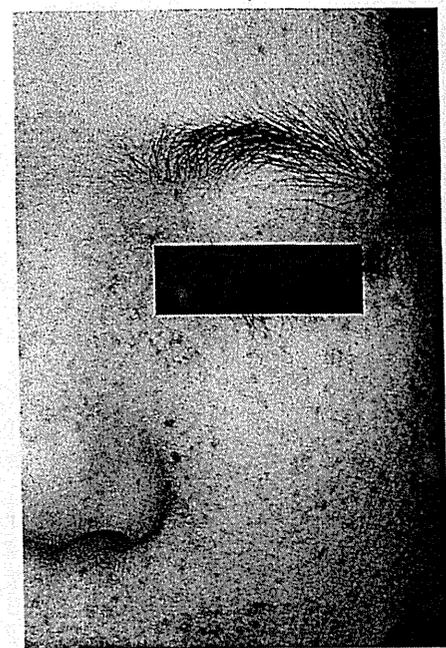


図4 XP-V(12歳, 女). 左内眼角に生じた基底細胞癌(千葉大学・松江弘之教授原図).

表2 神戸大学を受診したXP-V患者と各皮膚癌の初発年齢

	初診時 年齢	各皮膚癌初発年齢			
		MM	BCC	SCC	AK
XPV1KO	16		24		
XPV2KO					
(XP16KO)	50		50	62	54
XPV3KO	50	56			
XPV4KO	44	44	44		44
XPV5KO				45	multi
XPV6KO	54			54	
XPV7KO	45	47			47
XPV8KO	44	44	44	48	48
XPV9KO	12				
XPV10KO	51	60	45		51
XPV11KO	79		76	77	78
XPV12KO	48	48		48	48
XPV13KO	66	66	36		
XPV14KO	70			71	71
XPV15KO	27		27		
XPV16KO	34	35	34		
XPV17KO	60				63
XPV18KO	11				
XPV19KO	11		12		
XPV20KO	69		72		
XPV21KO					
(XP9KO)	32		39	41	40
XPV22KO	18				
XPV23KO	73		73		73
XPV24KO	57		57		57

MM: 悪性黒色腫, BCC: 基底細胞癌, SCC: 有棘細胞癌, AK: 日光角化症

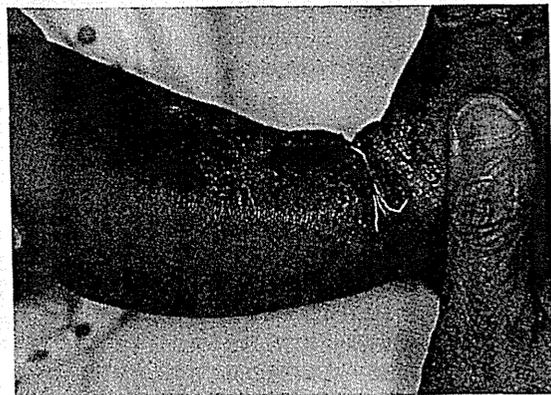


図5 XP-A(生後3カ月, 女). 日光照射部に比較的境界鮮明な水疱を伴う紅斑が生じている。

改善された(表3)⁸⁾。一方, XP-Vでは急性期の日光皮膚炎の症状を欠くため, 異常に気づかれる年齢が高く, 青年, 中年になるまで診断されずに過ごし, 成人に達して皮膚癌が生じて, 初めてXPを疑われることも多い(図3)。しかし, その時点ですでにそれまでの生涯に曝露された紫外線量はかなり多いので, 診断後に遮光を行っても, 皮膚癌を多数に生じる。皮膚癌の発症部位は常に日光曝露を受ける顔面, 手背, 下口唇, 舌尖等に多くみられるが, ときどき日光に曝露する機会がある背部, 大腿, 下腿に生じることもある。皮膚癌の初発

は早くて10代, 平均すると40代くらいである(表2)。表2の12歳, 27歳で皮膚癌を発症しているXPV15KO, XPV19KOの症例はそれぞれ, 水泳, ウインドサーフィンを行っていた症例である。そのこと自体, 患者が日焼けの反応は自覚していないことを示唆しており, 露光部に限局した雀卵斑が初期診断において非常に重要であることを示している。これらのことからXP-Vでの皮膚癌発生には診断に至るまでの幼少時期の日光曝露の影響が大きいと考えられる。

診断方法 (a) MEDの測定: XP-Vでは日焼けしやすいと訴える患者においてもMEDの低下は必ずしも明らかではない。(b) 光線過敏症状としては, 光線曝露による慢性の症状が通常に比して激しく生じる(露光部に限局した特徴的な色素斑, 皮膚萎縮, 毛細血管拡張, 皮膚癌)などの光老化の徴候が年齢に比して不相応に早期に出現している。この2点が最初にXP-Vを疑う重要なポイントである。これらの所見がみられた場合, 臨床症状を考慮しながらXP-Vを疑い, 患者線維芽細胞を用いてXP-Vの原因遺伝子であるPOLHの遺伝子産物の有無をウエスタンブロットで確認し(図7)⁹⁾, POLH蛋白の欠損か減少がみられた場合には, 遺伝子診断によって確定診断を行う。診断が困難な症例では, 修復能テスト(不定期合成能の測定), 紫外線致死感受性テストでの

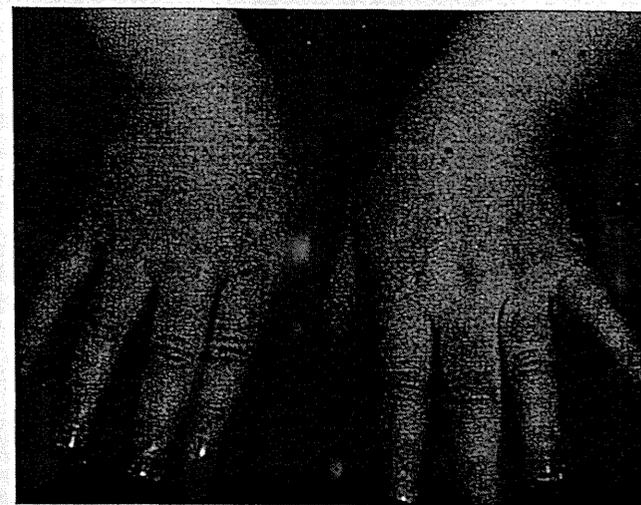


図6 XP-A(3歳, 女). 両側手背の色素斑がみられる。

表3 皮膚悪性腫瘍の平均初発年齢
今回の患者調査(2007~2010年)

相補性群	患者数	罹患者数合計	平均初発年齢(歳)			1988年の報告*				
			BCC	SCC	MM	患者数	罹患者数合計	平均初発年齢(歳)		
								BCC	SCC	MM
A	86	23	13.2	19.8	20.5	121	41	9.3	8.2	7.5
C	1	0	-	-	-	8	7	14.0	7.8	14.0
D	9	7	39.8	53.0	-	6	4	44.0	42.5	-
F	3	1	42.0	-	-	12	3	45.4	64.0	-
V	32	24	44.7	55.9	54.2	87	40	41.5	42.0	46.8

BCC: 基底細胞癌, SCC: 有棘細胞癌, MM: 悪性黒色腫

* (文献8より引用)

カフェインによる感受性の増強等も参考にする。XPの遺伝子診断は神戸大学医学部附属病院, 大阪医科大学附属病院において実施可能である。2012年度より保険適応となっており, 現在, 外部委託できる検査機関を探索中である。XPでは視診上, 露光部の色素斑ならびに皮膚癌は共通しているものの, 原因遺伝子は8種類あり, 神経症状を伴うタイプと伴わないタイプ, 予後, 生活指導が大きく異なるので, 早期の遺伝子診断を行い, その後の遮光による皮膚癌発症予防を進める意義は大きい。

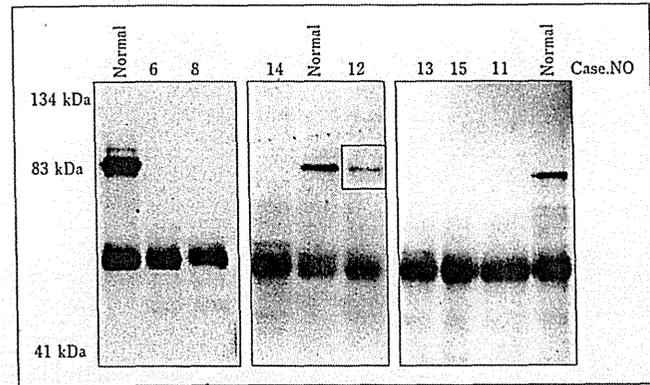


図7 POLHの検出によるXP-Vの診断⁹⁾

日本人XP患者の約半数はXP-Aで、しかもそのうちの80%以上ではXPA遺伝子のIVN3のスプライス受容部位のg→cの変異のfounder mutationと推定されている。日本ではXPAだけでなく、XP-V患者においても創始者効果により87%の患者でDNAポリメラーゼη (POLH) の変異が特定の4カ

所に集中して認められることが明らかとなっている¹⁰⁾ (図8)。

III. XP-V患者の診断上の注意点

XP-V患者は日光曝露後の日光皮膚炎症は軽度または欠如し、患者本人は光線過敏を自覚しないことが多く、唯一の自覚症状が日光曝露部の色素斑であることも多い。成人例では皮膚癌の発生を機会に皮膚科を受診し、

診断されることが多いが、小児例では雀卵斑などの鑑別はしばしば困難である。XP-Vの小児例の報告は比較的少ないが¹⁴⁻¹⁶⁾、報告例の多くは皮膚癌を発症しており、皮膚癌発症以前のXP-Vの診断の困難さがうかがえる。臨床症状で露光部に一致する濃淡がさまざまな不均一な色素斑、色素脱失、

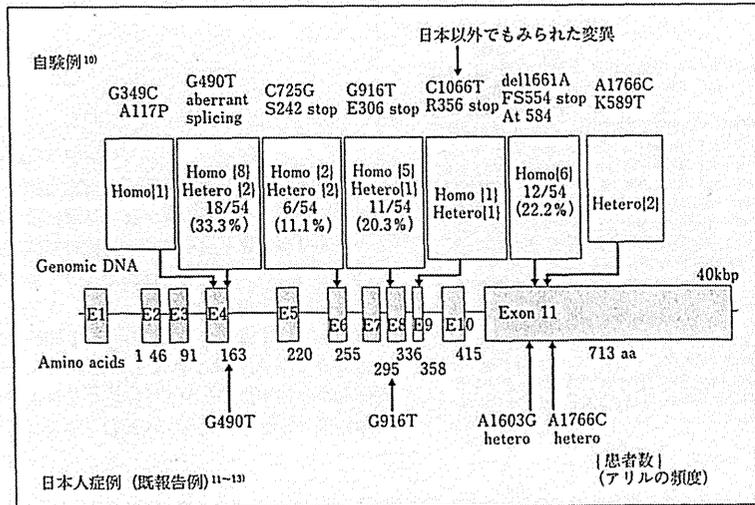


図8 日本人XP-V患者におけるPOLHの変異箇所¹⁰⁾。上段は自験例、下段は既報告例¹¹⁻¹³⁾。G490Tの変異が約40%にみられる。欧米人と共通するのはC1066Tの1カ所のみ。

毛細血管拡張などがあればXP-Vを疑い、遺伝子検査ならびに細胞学的検査を行うことが推奨される。

IV. XPの遮光対策

XPと診断した場合は、XP-Vにおいても、完璧な遮光を行うよう指導する。幼児期の遮光が、中年以降の皮膚癌発生を防ぐことはいまでもない。遮光は日焼け止め塗布と遮光服など、複数の手段を組み合わせるよう教育する。日照時間帯の戸外活動は原則禁止する。

外出時には、つば広の帽子、長袖、長ズボンを着用し、露出部には日焼け止めを塗布する。日照時の外出が必要な学童にあっては、遮光フィルムで作った遮光ガウンを着用するのは有効である。

日焼け止めはSPF30以上の強力なものをを用いるが、期待される効果を得るには定められた量(2mg/cm²; 顔にはパール粒2個くらいが必要な量)を塗布し、汗で落ちたりすることも考え2時間ごとに塗り直すことが必要である。口唇も露光部であり、皮膚癌の好発部位であるので、光防御効果のあるリップクリームを用いるが、遮光効果の確実なリップクリームを入手できない場合は、マスクを用いるのも有効である。目も横からの光もカットできるような紫外線防御効果のある眼鏡をかける。サングラスは眩暈を引きおこすので逆効果のことがあり、注意を要する。

部屋、車の窓ガラスに貼る遮光フィルムはいくつかのメーカーから販売されているが、紫外線領域、とくにUVB領域の遮光性能を確認する必要がある。日焼け止めは光線過敏症患者が用いる際にも化粧品扱いになり、保険適応はないが、地方自治体によっては補助金を出しているところもある。

これらの徹底的な遮光には、両親、保育者、教師の理解と協力が不可欠である。

V. 治療と診療指針

1. 皮膚と眼科の定期検診

皮膚科へは皮膚癌が生じるまでは年に1~2回、皮膚癌が生じ始めてからは年に3~6回、眼科へは

1~2年に1回を受診が望ましい。

2. 皮膚癌の治療

早期発見、早期治療が鉄則。臨床像、ダーモスコピーの所見を参考にしながらトレパンで生検を兼ねて切除してしまうのが現実的かつ確実な治療法である。

神経症状を伴っている患者では切除に際しての協力を得にくいこと、皮膚癌切除のための入院で、廃用性からくと思われる日常生活能力の衰退が多いので、その観点からも、幼少時の遮光による皮膚癌発症の予防と早期発見、早期治療が重要である。小さいものが多発している場合にはベセルナクリーム、液体窒素、5FU軟膏塗布も有用である。すでに大きくなってしまった皮膚癌は麻酔のうえ、外科的に切除する。

基底細胞癌(BCC)、有棘細胞癌(SCC)は内臓への転移は少ないが、局所での下床の組織を破壊する。露光部である顔、手背に生じると、腫瘍のsafety marginを十分にとって切除しきることがむずかしいケースも多く、早期発見、早期治療が重要である。悪性黒色腫(MM)は適切に切除されなければ、転移をきたし致命的となる。

VI. 予後と患者教育

XP-Vで診断が若年でなされた症例では、遮光により、皮膚症状、皮膚癌の発症を防ぐことができ、通常の生活を送ることができるので、とくに早期の診断が重要である。一方で、小児のXP-V患者に特有の問題点としては、成長発達は正常であり、増加する色素斑以外はXP-Aにみられるような重篤な日光皮膚炎症など示さないため、患者本人が病識がないことが多いことがあげられる。将来的な皮膚癌の予防のためには、SPF50以上の日焼け止めの塗布や長袖、長ズボン、帽子での物理的遮光、屋外での体育授業やクラブ活動の制限が推奨されるが、診断されるまでは普通に行っていた戸外活動ができなくなるのは学童期の小児にとってつらいことである。そのため、家族、学校関係者の協力やカウンセリングなどでの精神面のサポートが必要である。しかし、経験的には1年くらい

で自分の疾患を理解し、遮光を行うことを納得して実施できるようになるので、将来的な皮膚癌発生に伴うQOLの低下を考えればできるだけ早い時期に時間をかけて指導するのがよいのではないかと考える。また、臨床診断でかなり疑わしい症例もあるものの皮膚癌を発症していない小児例では確定診断は遺伝子診断を行うまではむずかしく、上記の患者教育を考えた場合、遺伝子診断による確定診断は家族、学校関係者、本人の遮光への意識を格段に高める。

<文 献>-----

- 1) 錦織千佳子：日本医事新報 4278：49, 2006
- 2) Wood, R.D.：Annu Rev Biochem 65：135, 1996
- 3) Hirai, Y. et al.：Mutat Res 601：171, 2006
- 4) 錦織千佳子：神経皮膚症候群に関する調査研究 平成23年度分担研究報告書, p.119, 2012
- 5) 錦織千佳子：最新皮膚科学大系 16, 中山書店, 東京, 2003
- 6) 森脇真一：Dermatology No.3：2, 2004
- 7) Mouret, S. et al.：Proc Natl Acad Sci USA 103：13765, 2006
- 8) 佐藤吉昭, 錦織千佳子：皮膚病診療 10：22, 1988
- 9) Tanioka, M. et al.：J Invest Dermatol, in press
- 10) Masaki, T. et al.：J Dermatol Sci 52：144, 2008
- 11) Masutani, C. et al.：Nature 399：700, 1999
- 12) Itoh, T. et al.：J Invest Dermatol 155：981, 2000
- 13) Itoh, T. et al.：J Invest Dermatol 117：1672, 2001
- 14) Ono, R. et al.：Photodermatol Photoimmunol Photomed 29：132, 2013
- 15) Inui, H. et al.：J Invest Dermatol 128：2055, 2008
- 16) Broughton, B.C. et al.：Proc Natl Acad Sci USA 99：815, 2002

光老化のモデルとしての色素性乾皮症

Xeroderma pigmentosum as the model of photoaging



中野英司(写真) 錦織千佳子

Eiji NAKANO and Chikako NISHIGORI

神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野

◎色素性乾皮症(XP)はDNA修復異常による遺伝性高発癌性皮膚疾患である。紫外線によるDNA損傷を修復できないため、日光曝露部は若年から光老化をきたし、皮膚悪性腫瘍の発症が促進される。日本では重症型であるA群がもっとも多く、以前は10歳までに皮膚癌を発症し、20歳前後で死亡する症例が多くみられていた。しかし、疾患概念が確立・浸透してきたことにより近年では遮光の重要性が認識され、皮膚悪性腫瘍の頻度は減少し、平均発症年齢も上昇している。また、著者らの施設での症例を検討すると、A群の早期診断症例において皮膚悪性腫瘍の頻度は減少しており、早期診断することによって皮膚悪性腫瘍の予防につながると考えられた。光老化を予防するには遮光が重要であり、XPにおいては予後に直結するため、医療従事者はそのことをもっとも認識し、患者・家族を支え、指導しなければならない。

Key word

色素性乾皮症(XP), 光老化, 皮膚悪性腫瘍

色素性乾皮症の病因・分類

色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum: XP)は著明な光線過敏症状を呈し、若年から日光曝露部に皮膚癌を生じる常染色体劣性遺伝性疾患で、DNA修復機構にかかわる因子の変異や欠失によって引き起こされる。遺伝子は紫外線や放射線や化学物質などの外的要因ならびに細胞内代謝で生じる酸化ストレスなどの内因性の要因によって種々の損傷を受ける。

紫外線によるDNA損傷にはおもに、ピリミジン塩基が連続する部位で二量体を形成するシクロブタン型ピリミジンダイマー(cyclobutane pyrimidine dimer: CPD)や6-4光産物(6-4 photoproduct: 6-4PP)などがある。CPD, 6-4PPはDNA二本鎖構造にゆがみを生じるが、このような比較的大きなDNA損傷に対してはヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair: NER)が働く。しかし、NERで除去しきれないDNA損傷

があった場合、損傷が残ったまま複製が起こると複製は停止してしまう。それを防ぐため、生物には複製後修復という機構が備わっている。複製後修復のひとつである損傷乗り越え複製(translesional DNA synthesis: TLS)は、複製フォークがDNA損傷部位に到達すると損傷を乗り越えて複製を行う¹⁾。

XPはその原因遺伝子から8つのグループに分類されるが、①NERにかかわる因子の障害であるA~G群の7つの遺伝的相補性群と、②NERは正常であるもののTLSにかかわるポリメラーゼの一種であるポリメラーゼη(polymerase η: POLH)の障害であるバリエーション型からなる。紫外線によるDNA損傷が蓄積されることにより、癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの多くの遺伝子に突然変異を生じて皮膚癌が発生すると考えられている²⁾。

表 1 色素性乾皮症 (XP) の分類と頻度、臨床的特徴^{25,16)}

グループ	頻度 (%)		不定期 DNA 合成 (UDS; %)	皮膚症状		神経症状
	全世界	日本		光線過敏症状	皮膚癌	
A	25	62	<5	+++	+++	++
B	まれ	0	3~7	++	+	--~++
C	25	0.9	10~20	++	++	-
D	15	8.3	20~50	++	+	--~++
E	まれ	0	40~60	+	+	-
F	6	2.8	10~20	+	+	-
G	6	0	<5	+	+	+
バリエント	21	26	75~100	+	++	-

全世界の頻度は日本も含む。日本の頻度は2008~2010年の全国調査によるもの¹⁶⁾。UDSに関しては「サイドメモ」参照。

色素性乾皮症の疫学・臨床(表1)

XPは比較的まれな疾患ではあるが、欧米での頻度が数十万人に1人であるのに対し、わが国では2.2万人に1人と高頻度にみられる。日本人にはA群とバリエント型が多く、欧米ではC群、D群が多い。また、日本人のA群患者の80%にはXPA遺伝子の同一の変異が認められ、創始者効果²⁻⁵⁾がみられる²⁻⁵⁾。

XPは前述の皮膚症状に加え、同じく光線過敏に起因する眼症状、また原因不明の進行性の神経変性に伴う神経症状を呈する。各症状の程度や有無、発症時期などは相補性群によって異なるが、同一相補性群内でもその遺伝子変異部位などによってさまざまである。

A群、とくに日本人に多いタイプの遺伝子変異では光線過敏症状、神経症状ともに重症であり、典型的には生後まもなく、数分程度の日光曝露で高度の紅斑、腫脹、水疱形成を伴う激しい日光皮膚炎を生じ、さらに紅斑も遅延し3~4日後にピークとなる。この急性期の日光皮膚炎が治まった後には色素沈着あるいは色素脱失をきたし、日光曝露が繰り返されると同様の症状を繰り返すこととなり、徐々に雀卵斑様の色素斑を生じてくる。この色素斑はおもに老人性色素斑であるため、経過とともに色調は濃くなり、さらに新旧の皮疹が混在して色調・濃淡の不揃いな色素斑が日光曝露部にびまん性にみられるようになる。さらに、症状が進行すると、皮膚は乾燥して鱗屑を伴うようになり、毛細血管拡張、色素沈着と色素脱失、皮膚萎縮の混在する多型皮膚萎縮をきたす(図1-A)。また、基底細胞癌や有棘細胞癌、悪性黒色腫といった皮膚癌を高率に発症する。

A群では神経症状も重症であり、2~3歳ごろまでの発達は正常下限からやや遅い程度でめだたないが、中枢性、末梢性の進行性神経障害が徐々に顕在化してくる。10歳までには聴覚が進行し、20歳までには腱反射の消失、小脳失調、痙攣性麻痺が出現、重症化して歩行不能となる。また、20歳前

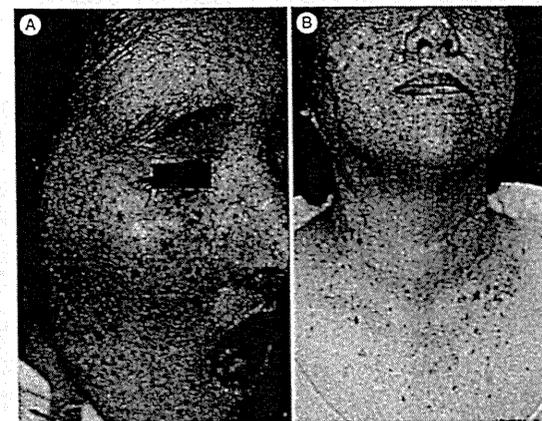


図 1 色素性乾皮症 (XP) の臨床像

- A: A群患者, 23歳女性。1歳時にA群と診断され、その後遮光を続けているが、顔面全体に大小や色調、濃淡の不揃いな色素斑が多発している。
B: D群患者, 61歳女性。日光の当たらない下顎~前頸部および、衣服で遮光される部分には色素斑を認めないが、日光曝露部には特徴的な色素斑が多発している。

後では嚥下機能も低下し、誤嚥性肺炎をしばしば起こし、気管喉頭分離や胃瘻が必要となる。突然死や肺炎などで死に至ることが多い。

D群は海外の報告では皮膚症状、神経症状ともに比較的重症とされているが、日本の報告では皮膚症状は認められるものの神経症状はまれである。著明な日光皮膚炎を呈するが、その後の慢性期における経過はA群よりも軽症で進行も緩徐である(図1-B)。しかし、適切な遮光がなされない場合は露光部の皮膚症状は顕著で、若年での皮膚癌発症もみられる。海外と日本の報告における神経症状の相違はおそらくXPD遺伝子の変異部位の差に起因すると考えられているが、神経症状を合併する症例では30歳前後での死亡例が多い⁶⁾。

バリエント型は神経症状を伴わず、NERが障害されるA~G群と比較すると皮膚症状も軽症であり、皮膚癌の発症も遅い。日光皮膚炎症状を欠く症例も多く、自覚症状が乏しいため皮膚癌の発症を契機に診断がつくことが多い。そのため、適切な遮光がなされずに露光部に皮膚癌が多発する症例もしばしばみられる。

光老化と色素性乾皮症

光老化に関する詳細については本特集、上出「光老化のメカニズムと臨床」の稿を参照されたいが、光老化とは加齢に慢性的な紫外線曝露が加わることによって引き起こされる皮膚の変化の総称で、具体的には皮膚癌(光発癌)、シミ、シワである。①メラノサイトへの障害によって起こる色素沈着、色素脱失、真皮の膠原線維、②弾性線維への障害によって起こる皮膚の粗造化、黄褐色調への変化、③血管成分への障害によって起こる毛細血管拡張などがあり、真皮の変性によって、シワやタルミを生じ特徴的な外観を呈する。また、DNAへの障害によって皮膚腫瘍を形成する⁷⁾。XP患者においては通常、シミやタルミなどの変化は顕著ではないが、これは紫外線の波長による深達度の違いと各症状を引き起こす波長の差に起因する。つまりXPで修復障害がみられるポリミジン二量体は主としてUVBによって多く生じ、また、シミや毛細血管拡張の原因となるメラノサイトや毛細血管は表皮や真皮浅層にあり、真皮の浅層までしか到達しないUVBによるDNA障害によって引き起こされるためにXPにおいて顕著

サイドメモ

不定期DNA合成(UDS)

色素性乾皮症(XP)の診断において有用な検査法のひとつに、不定期DNA合成(unscheduled DNA synthesis: UDS)がある。これは患者皮膚より樹立した線維芽細胞を用いてDNA修復能を調べる検査で、この検査でDNA修復能の低下があればXPを考える根拠となる。線維芽細胞を培養皿に播き、紫外線を照射した直後よりラジオアイソトープ標識をしたチミジン含有培養液で培養すると、DNA修復が働く際に障害部位は切り出され、修復DNAの合成にチミジンが取り込まれる。それをラジオグラフィで検出し、核当りの粒子数の平均値を出し、正常コントロールとの比で表したものがUDSである。ヌクレオチド除去修復(NER)が欠損すると、DNA修復がされない。つまりチミジンの取込みが低下するため、UDSは低くなる。日本に多い重症型のA群では正常の5%以下程度である。バリエント型はNERが障害されないため、正常から軽度低下する程度となる。近年ではラジオアイソトープを用いない、より簡便な方法が確立されつつある。

表 2 XPにおける皮膚悪性腫瘍の平均初発年齢と頻度

グループ	1988年調査					2008~2010年調査					神戸大学症例				
	患者数	罹患者数合計	平均初発年齢(歳)			患者数	罹患者数合計	平均初発年齢(歳)			患者数	罹患者数合計	平均初発年齢(歳)		
			BCC	SCC	MM			BCC	SCC	MM			BCC	SCC	MM
A	121	41	9.3	8.2	7.5	86	23	13.2	19.8	20.5	41	6	14.0	17.0	22.0
C	8	7	14.0	7.8	14.0	1	0	—	—	—	1	0	—	—	—
D	6	4	44.0	42.5	—	9	7	39.8	53.0	—	7	4	40.0	55.0	—
バリエーション	87	40	41.5	42.0	46.8	32	24	44.7	55.9	54.2	22	17	45.9	57.9	49.1

1988年調査と2008~2010年調査、神戸大学症例の比較。

BCC:基底細胞癌(basal cell carcinoma), SCC:有棘細胞癌(squamous cell carcinoma), MM:悪性黒色腫(malignant melanoma)。

である。一方、シワやタルミは真皮深層の膠原線維や弾性線維の蛋白構造の変化によるものであり、真皮深層に到達するUVAによる直接的な障害によって起こるため、XPにおいてそれほどめだたないといわれている⁸⁾。そのような相違はあるものの、XPにおける皮膚症状とはまさにDNA障害に起因する光老化にほかならず、XPにおける皮膚癌について検討することは光老化における発癌、つまり紫外線による発癌を考えるうえで興味深い。

紫外線と関連する皮膚癌として代表的なものに基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫があげられる。基底細胞癌と有棘細胞癌は非黒色腫皮膚癌とも称されるが、これらは露光部に多く、癌抑制遺伝子であるp53の解析においても紫外線によるDNA損傷との関連が示唆されている⁹⁾。欧米の報告ではXP患者では非黒色腫皮膚癌の発症頻度は健常人のおよそ10,000倍、悪性黒色腫は非黒色腫皮膚癌と比較すると頻度はまれであるが、健常人の約2,000倍と報告され¹⁰⁾、顔面などの露光部に集中して生じる。わが国でもやはり健常人と比較すると高率に発症する¹¹⁾。発症年齢をみても、わが国の全国調査において基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫の受診時平均年齢はそれぞれ72.6歳¹²⁾、77.8歳¹³⁾、62.5歳¹⁴⁾であるのに対し、XP患者では平均初発年齢はかなり低い。つまり健常人において数十年をかけて起こる光老化が、XPにおいては非常に短時間で起こっているといえる。しかし、XPの皮膚癌平均初発年齢について、1988年の報告¹⁵⁾と2008~2010年の報告¹⁶⁾を比較すると皮膚癌初発年齢はおおむね高くなっていることがわかる(表2)。これはこの20年間でXPと

いう疾患概念が浸透したことにより、早期診断および避光が紫外線曝露が減少したことによると考えられる。

神戸大学の色素性乾皮症症例の検討

早期診断と避光の重要性を検討するにあたり過去10年間で神戸大学に通院あるいは神戸大学で診断したXP患者を集計、解析した。神戸大学遺伝子検査を行った診断の確実なXP患者は全体で71人、A群が41人(57.7%)、C群が1人(1.4%)、D群が7人(9.9%)、バリエーション型が22人(31%)であった。これは以前報告された日本における頻度とほぼ同様であるが、D群の頻度に増加がみられる。これは、XPの理解が進み、専門機関へ紹介されるケースが増えたことに加え、診断技術、精度の進歩によるものと考えられる。

A群、D群、バリエーション型における皮膚癌の発症頻度やその平均初発年齢は表2のとおりである。C群患者は1人のみであり、皮膚癌の発症は認めていない。全国調査と同様に、1988年の報告よりもA群患者の皮膚癌発症頻度は減少し、平均初発年齢の高齢化を認めた。神戸大学の症例ではA群全体で平均14.5歳と以前の皮膚癌初発年齢を上まわっているにもかかわらず、皮膚癌の発症は6人(14%)と少数であった。なお重複はあるが、悪性黒色腫1人、基底細胞癌5人、有棘細胞癌2人であり、いずれの癌も平均初発年齢は10歳を上まわっている。D群やバリエーション型はA群ほど皮膚症状が重くないため、皮膚癌を契機に皮膚科を受診する症例も多く、皮膚癌の頻度や平均初発年齢は過去の報告と比較しても、A群ほど大きな変化はみられなかった。しかし、バリエーション型にお

いてもやや平均初発年齢が遅くなっている傾向はみられた。

また、A群患者における診断時の年齢で分けて検討すると、生後1年以内に診断がついた症例は17人(41.5%)、それ以降に診断がついた症例は24人(58.5%)であった。それぞれの平均年齢が13歳、15.5歳とそれほど変わらないのに対し、皮膚癌の発症は1年以内に診断された患者では1人のみ、それ以降に診断された患者では5人であり、診断の遅れが皮膚癌の増加に関連している傾向があった。A群では強い日光皮膚炎を呈するため、診断される前よりある程度の避光をしているケースが多い。そのため、診断された時期が直接的に紫外線曝露と相関するわけではないが、患者、保護者や周囲環境、社会的な側面も考えると、確実な診断は避光の徹底につながるため、早期診断は早期からの避光を促し、皮膚癌発症予防につながると考えられる。

おわりに

XPにおける避光は予後に直結しうる重要な因子であるが、厳密な避光を継続することは容易ではない。XPの早期診断が重要であることは疑いないが、その後の避光の説明・指導こそが患者にとってもっとも有益な情報となる。そのことを念頭に置きつつ、また、A群患者においては皮膚癌などの手術で入院することによってADLを損なうこともあるため、皮膚癌の早期発見も含め、患者およびその家族を支えていくことが重要である。

紫外線による皮膚への影響は日光皮膚炎などの急性の反応以外では自覚症状に乏しく、普段から意識されることは少ない。近年、屋外でのレ

ジャーや美容目的での日焼けなどによる紫外線曝露の増加や高齢化に伴い、皮膚癌は増加傾向であり、今後も増加すると予想される。光老化や皮膚癌の予防や治療を考えるうえで、XPの病態生理を理解することは重要であり、さらなる研究によって治療へとつながることが期待される。

謝辞: 稿を終えるにあたり、色素性乾皮症(XP)の患者調査にご協力いただきました全国の皮膚科研修指定病院の先生方に深謝致します。

文献

- 1) Lagerwerf, S. et al.: *DNA Repair*, 10: 743-750, 2011.
- 2) 錦織千佳子: 最新皮膚科学体系16 動物性皮膚症—環境因子による皮膚障害(玉木邦彦編). 中山書店, 2003, pp.304-309.
- 3) Cleaver, J. E. et al.: *Hum. Mutat.*, 14: 9-22, 1999.
- 4) Kleijer, W. J. et al.: *DNA Repair*, 7: 744-750, 2008.
- 5) 森脇真一: 日本皮膚科学会雑誌, 120: 1861-1867, 2010.
- 6) Ueda, T. et al.: *J. Exp. Med.*, 13: 3031-3046, 2009.
- 7) Gilchrist, B. A.: *J. Invest. Dermatol.*, 133: E2-E6, 2013.
- 8) DiGiovanna, J. J. and Kraemer, K. H.: *J. Invest. Dermatol.*, 132: 785-796, 2012.
- 9) Nishigori, C.: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 5: 208-214, 2006.
- 10) Bradfore, P. T. et al.: *J. Med. Genet.*, 48: 168-176, 2011.
- 11) Takebe, H. et al.: *Jpn. J. Cancer Res.*, 78: 1135-1143, 1987.
- 12) 石井良征・他: *Skin Cancer*, 28: 205-211, 2013.
- 13) 石井良征・他: *Skin Cancer*, 28: 195-204, 2013.
- 14) 藤澤康弘・他: *Skin Cancer*, 27: 195-204, 2012.
- 15) 佐藤吉昭, 錦織千佳子: 皮膚病診療, 10: 22-27, 1988.
- 16) 厚生労働省: 神経皮膚症候群に関する調査研究. 平成23年度報告書.

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

A Bead-based Normalization for Uniform Sequencing depth (BeNUS) protocol for multi-samples sequencing exemplified by *HLA-B*

Kazuyoshi Hosomichi¹, Shigeki Mitsunaga², Hideki Nagasaki³ and Ituro Inoue^{1*}

Abstract

Background: Human leukocyte antigen (HLA) is a group of genes that are extremely polymorphic among individuals and populations and have been associated with more than 100 different diseases and adverse drug effects. HLA typing is accordingly an important tool in clinical application, medical research, and population genetics. We have previously developed a phase-defined HLA gene sequencing method using MiSeq sequencing.

Results: Here we report a simple, high-throughput, and cost-effective sequencing method that includes normalized library preparation and adjustment of DNA molar concentration. We applied long-range PCR to amplify *HLA-B* for 96 samples followed by transposase-based library construction and multiplex sequencing with the MiSeq sequencer. After sequencing, we observed low variation in read percentages (0.2% to 1.55%) among the 96 demultiplexed samples. On this basis, all the samples were amenable to haplotype phasing using our phase-defined sequencing method. In our study, a sequencing depth of 800x was necessary and sufficient to achieve full phasing of *HLA-B* alleles with reliable assignment of the allelic sequence to the 8 digit level.

Conclusions: Our HLA sequencing method optimized for 96 multiplexing samples is highly time effective and cost effective and is especially suitable for automated multi-sample library preparation and sequencing.

Keywords: HLA, Next-generation sequencing

Background

To date, several high-throughput HLA typing methods using next-generation sequencing (NGS) have been developed [1-8]. In our previous study, we completely sequenced long-range PCR amplicons encompassing entire regions of each of the HLA genes (*HLA-A*, *-C*, *-B*, *-DRB1*, *-DQB1*, and *-DPB1*). PCR amplicons were subjected to transposase-based library construction and multiplex sequencing with the MiSeq sequencer. Paired-end reads of 2 × 300 bp enabled us to demonstrate phase-defined allele determination (also defined as HLA gene haplotypes) in 33 HLA homozygous samples, 11 HLA heterozygous samples, and 3 parent-child families. Our sequencing protocol and pipeline provided essentially complete phase-defined HLA gene sequences; however, it required complicated and labor-intensive workflows especially in the library preparation

step. Most importantly, the method is not well adapted for processing multiple samples. In the present study, we developed a new library preparation method for NGS and applied it to 96 samples. Long-range PCR products of *HLA-B* spanning from promoters to 3'-UTRs were prepared and sequenced with the MiSeq sequencer via transposase-based library preparation. In the previous protocol, although the DNA amount of each library was strictly measured and the library size was validated using a BioAnalyzer before the sequencing step, it was difficult to equalize the DNA amount and molecular size of the libraries, resulting in variable numbers of reads in each sample. We observed dropouts of samples owing to insufficient reads. Here, we developed a **Bead-based Normalization for Uniform Sequencing (BeNUS)** procedure using three steps of bead purification. BeNUS can easily and precisely normalize the molar concentrations of up to 96 samples, not only simplifying the library preparation step but also permitting automation of HLA typing using NGS.

* Correspondence: itinoue@nig.ac.jp

¹Division of Human Genetics, National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima, 411-8540 Shizuoka, Japan
Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Hosomichi et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Results and discussion

PCR amplification of *HLA-B* and library preparation

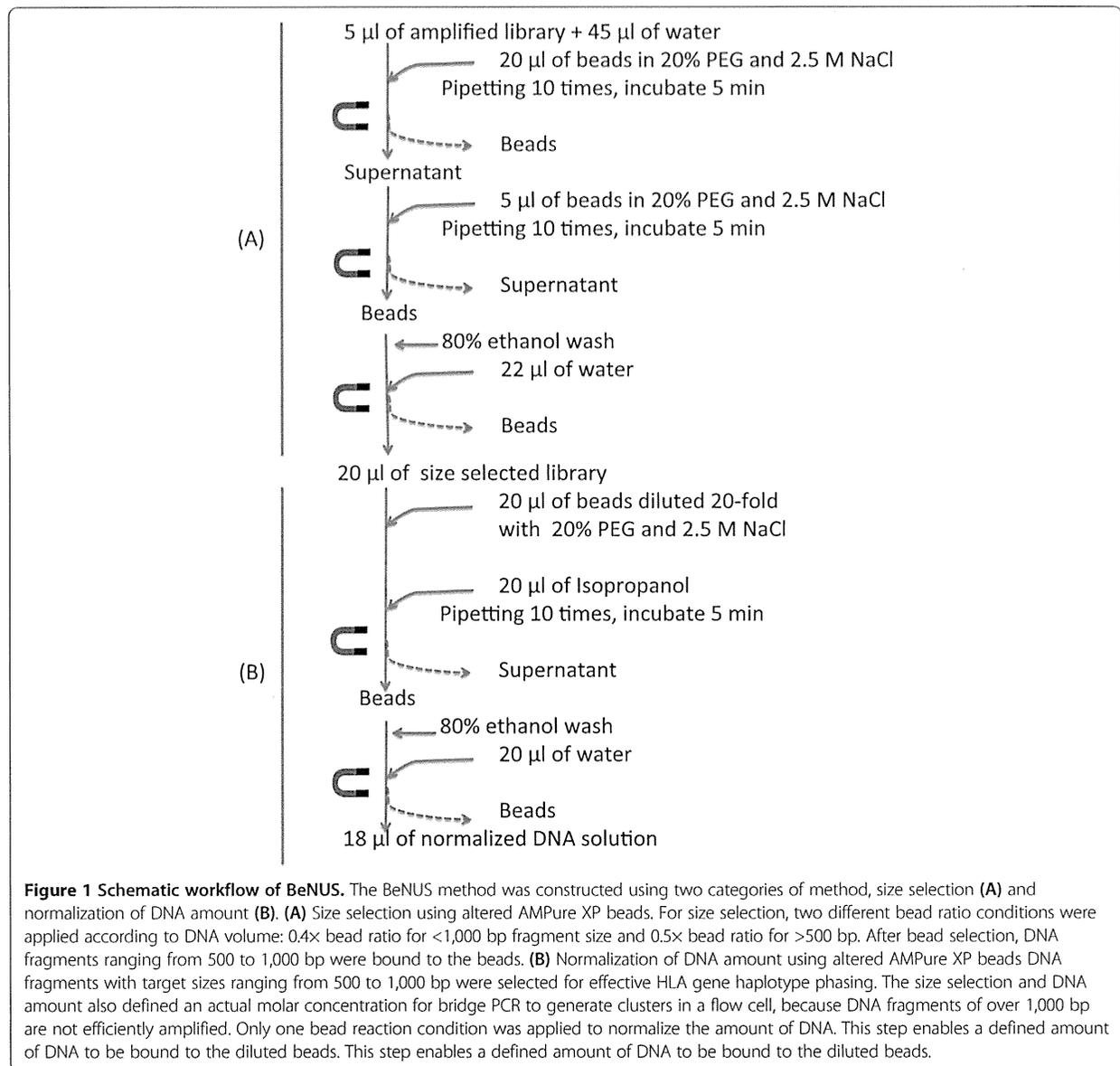
We applied long-range PCR to amplify *HLA-B*, which is known to be highly polymorphic. *HLA-B*-specific amplification products were obtained from 96 individuals. All 96 PCR amplicons were subjected to transposase-based library construction using the Nextera kit, which simultaneously fragments the DNA and adds adaptors needed for multiplex sequencing. We developed protocol steps using altered AMPure XP beads to normalize the molar concentrations of 96 samples. Each PCR amplicon was subjected separately to transposase-based library construction, whereby a sample-specific index was introduced. The Nextera kit can construct libraries of a broad size range. For phase-defined HLA sequencing, a library range of 500–1,000 bp is desirable. In the previous protocol [1], the library size selection was achieved by cutting of agarose gel and checking using a BioAnalyzer, which is a very laborious step, especially for preparing multiple samples.

Our new method, BeNUS, which is described in detail in the Methods section, circumvents the gel cutting method and employs bead-based steps for library size selection as well as equalization of DNA molar concentrations in up to 96 samples. More specifically, three bead steps were performed: first, 20 μ l of altered beads suspended in 20% PEG and 2.5 M NaCl solution was added to 50 μ l of diluted PCR product, and the supernatant fraction containing the desired fragments (<1,000 bp) was collected. Second, 5 μ l of beads was added to the collected supernatant. Desired fragments of larger than 500 bp were bound to the beads, while smaller fragments remaining in the supernatant were discarded (Figure 1). After these two steps, the desired DNA fragments (500–1,000 bp) were selected (actual size: 492 to 1,625 bp, average size: 924 bp) (Additional file 1: Figure S1). Finally, 20-fold diluted beads were added to the size-fractionated library. Small numbers of beads can bind saturated amounts of DNA because bound DNA is in proportion to the number of beads (Additional file 2: Figure S2). Eventually, the final DNA size, concentration, and thereby molar concentration were equalized (Additional file 3: Figure S3).

Complete sequencing of *HLA-B* for 96 samples

The Nextera-treated libraries from 96 *HLA-B* PCR amplicons were subjected to NGS sequencing. The distribution of reads among the 96 multiplexed indexes ranged from 0.2% to 1.55% as percentages of 24.6 million reads and $1.04 \pm 0.32\%$ on average. Technical improvements in libraries preparation were clarified by comparison between our previous method, cutting of agarose gel followed by the BioAnalyzer, and BeNUS method. The distribution of respective read numbers by the previous method was 0.06% to 2.74% and the value by BeNUS method was 0.2

to 1.55% (Figure 2). Sequence reads of *HLA-B*, were aligned to the reference sequence at an average mapped rate of 99.63%, ranging from 99.11 to 99.87%. The average depth of the alignment before phasing was $6495.3\times$ and the phased haplotype depth was $2097.8\times$. Of the 96 samples, heterozygous SNVs and indels were not observed in 8 samples (0605, 0607, 0645, 1057, 1169, 1184, 1199, and 1229) indicating completely homozygous haplotypes. Generally, MiSeq yields base errors at a rate of 0.8% with PCR free library preparation [9]. In the result of these homozygous samples, the total error rate of sequencing reaction and PCR amplification was estimated to be as less than 1.2%. In our simulated alignment result, the maximum error rates in $300\times$ and $200\times$ average depth were 4.8% and 6%, respectively, and the minimum depth for complete phasing was approximately $800\times$ average depth. We recognize phasing result is not only dependent on average depth but also on distance between two heterozygous SNVs and long insert library covering the two heterozygous SNVs. As a general method, we propose that sequence reads of at least $800\times$ depth is valid for providing the phase-defined HLA sequences with for high accuracy (less than 5% error rate). All samples were completely phased by the phase-defined sequencing pipeline [1], although six samples showed only 1 to 7 SNVs in one exon: samples 0785, 1018, 1117, and 1175 had 4, 7, 3, and 3 heterozygous SNVs in exon 2, respectively. Sample 1224 had 3 heterozygous SNVs in exon 3, whereas sample 0979 had one heterozygous SNV in exon 5 (Figure 3). All the above samples were also phased using partial phasing (Additional file 4: Figure S4). Allelic imbalance as a result of PCR is manifested by skewed allelic calls after HLA sequencing. Allelic imbalance of the PCR amplification of *HLA-B* was negligible, as judged by the ratio of sequencing depth between the two phased alignments; 1:1.68 at the maximum and 1:1.19 on average in heterozygous samples (Table 1). Consequently, 192 haplotype sequences of 96 individuals, which include 28 different haplotype sequences, were constructed as phased allelic *HLA-B* sequences. In general, allelic imbalance after PCR amplification has been occasionally observed. Evidently, this problem is not specific to NGS analyses. If capture, NGS, or the analytical step are causes of allelic imbalance, we would observe the discrepancy between our NGS typing and SSO typing, which was not the case in the current study. The current protocol aimed at minimizing the disparity of each sample; this was achieved although not perfectly. The minimum depth could be important to obtain phase-defined sequences because lower depth could leave unphased region. However, complete phase-defined sequencing is dependent on the allelic type of the sample, thereby it is not easy to give an exact depth number to accomplish the sequencing in general. In the current study, the most important point of the current study was to obtain complete phase-defined



sequences of 96 samples without any dropout, which was achieved using the current protocol.

After obtaining phase-defined HLA gene sequences for 192 haplotype sequences, we attempted to assign HLA allele numbers to these sequences by searching for known allele sequences in the IMGT/HLA database. We used phased *HLA-B* haplotype sequences that spanned all of the intronic and exonic regions as queries against genomic and CDS sequences in the database. The determined *HLA-B* allele calls in all samples were consistent with PCR-SSO and Omixon Target, although the PCR-SSO determined HLA allele numbers were limited to a 4-digit resolution.

Conclusions

We established a simple, high-throughput, high-resolution, and high-fidelity HLA sequencing and genotyping method, as a combination of the Nextera kit and our new BeNUS method. We successfully applied our method for *HLA-B* sequencing in 96 samples, without dropouts. By developing BeNUS, it becomes feasible to construct multi-libraries without agarose gel size selection and DNA density control of each library. This method would be greatly advantageous for clinical applications that require a user-friendly and cost-effective protocol, with high throughput and accuracy. Our protocols open a way to prepare NGS libraries for large-scale

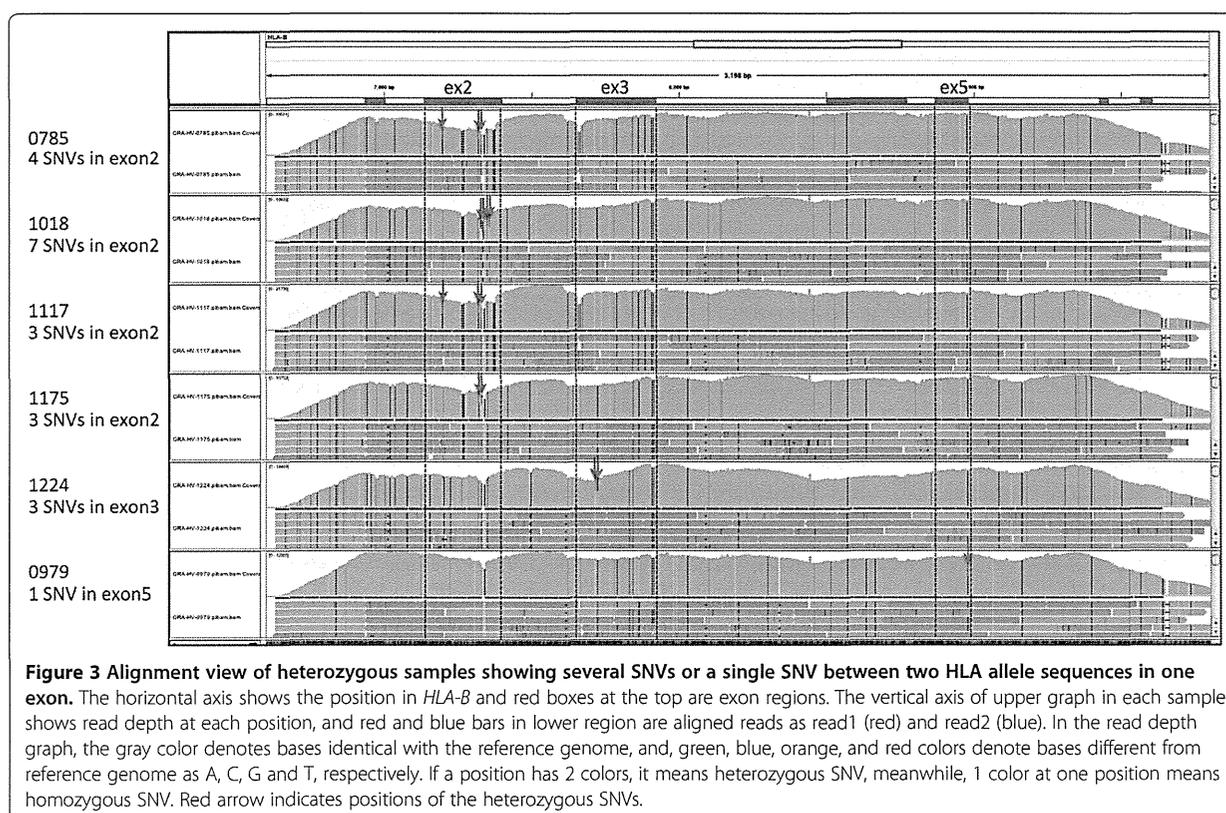
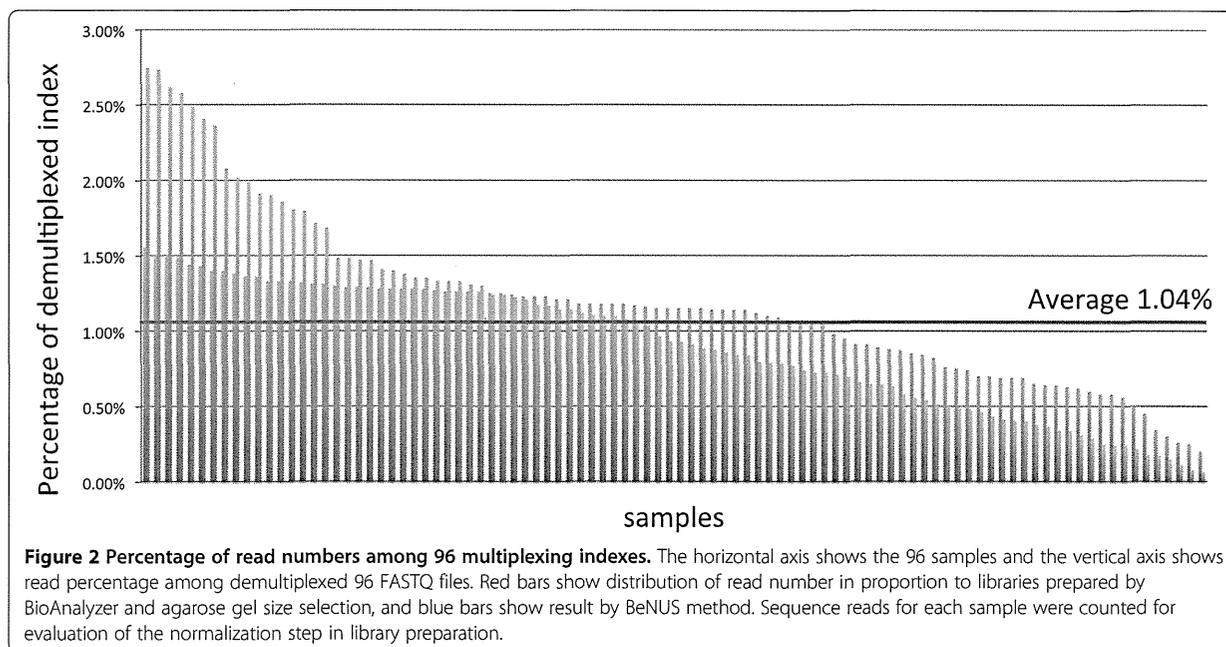


Table 1 Alignment of the HLA-B sequence and genotype in 96 samples

Sample	HLA-B SSO		HLA-B PSP*		Depth		Note
	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	
0554	HLA-B*44:03	HLA-B*40:06	HLA-B*44:03:01:01	HLA-B*40:06:01:01	1543.4	1114.5	
0555	HLA-B*40:01	HLA-B*44:03	HLA-B*40:01:02	HLA-B*44:03:01	2228.5	2084.8	
0556	HLA-B*13:01	HLA-B*46:01	HLA-B*13:01:01	HLA-B*46:01:01	860.5	765	
0560	HLA-B*13:01	HLA-B*51:01	HLA-B*13:01:01	HLA-B*51:01:01	1416.5	1455.9	
0605	HLA-B*52:01	HLA-B*52:01	HLA-B*52:01:01:02	HLA-B*52:01:01:02	6928.7		Homozygous
0607	HLA-B*07:02	HLA-B*07:02	HLA-B*07:02:01	HLA-B*07:02:01	7357.3		Homozygous
0616	HLA-B*40:02	HLA-B*52:01	HLA-B*40:02:01	HLA-B*52:01:01:02	513.2	500.6	
0639	HLA-B*40:06	HLA-B*35:01	HLA-B*40:06:01:01	HLA-B*35:01:01:02	1758	1656.8	
0642	HLA-B*40:01	HLA-B*35:01	HLA-B*40:01:02	HLA-B*35:01:01:02	2016.8	1545.3	
0645	HLA-B*54:01	HLA-B*54:01	HLA-B*54:01:01	HLA-B*54:01:01	6537		Homozygous
0649	HLA-B*55: 02	HLA-B*40:02	HLA-B*55:02:01	HLA-B*40:02:01	1402.3	1635.5	
0652	HLA-B*15:01	HLA-B*35:01	HLA-B*15:01:01:01	HLA-B*35:01:01:02	2395.4	2308.4	
0658	HLA-B*56:01	HLA-B*44:03	HLA-B*56:01:01	HLA-B*44:03:01	1686.7	2074	
0663	HLA-B*13:01	HLA-B*52:01	HLA-B*13:01:01	HLA-B*52:01:01:02	1538.1	1455.7	
0666	HLA-B*54:01	HLA-B*38:02	HLA-B*54:01:01	HLA-B*38:02:01	2105	1790.8	
0703	HLA-B*55:02	HLA-B*40:06	HLA-B*55:02:01	HLA-B*40:06:01:01	1173.1	1445.3	
0735	HLA-B*44:03	HLA-B*38:02	HLA-B*44:03:01	HLA-B*38:02:01	2507.5	1998.5	
0739	HLA-B*40:02	HLA-B*48:01	HLA-B*40:02:01	HLA-B*48:01:01	1947.1	2382.9	
0741	HLA-B*59:01	HLA-B*07:02	HLA-B*59:01:01:01	HLA-B*07:02:01	1458.6	2336	
0772	HLA-B*07:02	HLA-B*48:01	HLA-B*07:02:01	HLA-B*48:01:01	3512.9	3425	
0779	HLA-B*44:02	HLA-B*39:01	HLA-B*44:02:01:01	HLA-B*39:01:01:03	1677.5	1060.6	
0784	HLA-B*40:06	HLA-B*15:01	HLA-B*40:06:01:01	HLA-B*15:01:01:01	1875.1	1820.8	
0785	HLA-B*52:01	HLA-B*51:01	HLA-B*52:01:01:01	HLA-B*51:01:01	6041.4	6018.4	Onlu 4 heterozygous SNVs
0810	HLA-B*40:02	HLA-B*46:01	HLA-B*40:02:01	HLA-B*46:01:01	560.8	546.8	
0815	HLA-B*35:01	HLA-B*07:02	HLA-B*35:01:01	HLA-B*07:02:01	1239.5	1740	
0821	HLA-B*40:01	HLA-B*40:02	HLA-B*40:01:02	HLA-B*07:02:01	1239.5	1740	
0821	HLA-B*40:01	HLA-B*40:02	HLA-B*40:01:02	HLA-B*40:02:01	2144.4	1925.5	
0822	HLA-B*54:01	HLA-B*35:01	HLA-B*54:01:01	HLA-B*35:01:01	1550	1840.6	
0823	HLA-B*15:11	HLA-B*07:02	HLA-B*15:11:01	HLA-B*07:02:01	703.5	914.6	
0830	HLA-B*51:01	HLA-B*48:01	HLA-B*51:01:01	HLA-B*48:01:01	1833.8	2509	
0969	HLA-B*40:06	HLA-B*51:01	HLA-B*40:06:01:01	HLA-B*51:01:01	1575.4	1650.4	
0975	HLA-B*44:03	HLA-B*07:02	HLA-B*44:03:01	HLA-B*07:02:01	180.4	209.3	
0976	HLA-B*54:01	HLA-B*35:01	HLA-B*54:01:01	HLA-B*35:01:01	3635.9	3759.2	
0977	HLA-B*44:02	HLA-B*15:18	HLA-B*44:02:01:01	HLA-B*15:18:01	722.2	574.4	
0979	HLA-B*39:01	HLA-B*39:01	HLA-B*39:01:01:03	HLA-B*39:01:03	2128	2125.7	Only 1 heterozygous SNV
0991	HLA-B*15:01	HLA-B*39:01	HLA-B*15:01:01	HLA-B*39:01:01:03	1685.4	1551.3	
0997	HLA-B*15:01	HLA-B*51:01	HLA-B*15:01:01:01	HLA-B*39:01:01:03	1685.4	1551.3	
0997	HLA-B*15:01	HLA-B*51:01	HLA-B*15:01:01	HLA-B*51:01:01	2588	2692.1	
0999	HLA-B*48:01	HLA-B*39:01	HLA-B*48:01:01	HLA-B*39:01:01:03	1470.4	1045.3	
1009	HLA-B*54:01	HLA-B*39:01	HLA-B*54:01:01	HLA-B*39:01:01:03	326.8	294.7	
1011	HLA-B*52:01	HLA-B*07:02	HLA-B*52:01:01:02	HLA-B*07:02:01	730.9	943.7	
1012	HLA-B*35:01	HLA-B*48:01	HLA-B*35:01:01:02	HLA-B*48:01:01	1830.1	2482.1	

Table 1 Alignment of the HLA-B sequence and genotype in 96 samples (Continued)

1013	HLA-B*54:01	HLA-B*52:01	HLA-B*54:01:01	HLA-B*52:01:01:02	533.9	600.7	
1014	HLA-B*55:02	HLA-B*51:01	HLA-B*55:02:01	HLA-B*51:01:01	970.1	1153.1	
1016	HLA-B*44:03	HLA-B*35:01	HLA-B*44:03:01	HLA-B*35:01:01	739.7	655.5	
1018	HLA-B*46:01	HLA-B*15:01	HLA-B*46:01:01	HLA-B*15:01:01:01	5360.8	5496.1	Only 7 heterozygous SNVs
1030	HLA-B*40:06	HLA-B*07:02	HLA-B*40:06:01:01	HLA-B*07:02:01	1638.8	2668.6	
1045	HLA-B*15:11	HLA-B*35:01	HLA-B*15:11:01	HLA-B*35:01:01:02	1597.5	1448.8	
1056	HLA-B*58:01	HLA-B*67:01	HLA-B*58:01:01	HLA-B*67:01:01	2497.9	2214.5	
1057	HLA-B*40:02	HLA-B*40:02	HLA-B*40:02:01	HLA-B*40:02:01	4113.6		Homozygous
1064	HLA-B*40:06	HLA-B*51:01	HLA-B*40:06:01:01	HLA-B*51:01:01	963.5	1048.8	
1065	HLA-B*54:01	HLA-B*52:01	HLA-B*54:01:01	HLA-B*52:01:01:02	1213.9	1563.8	
1071	HLA-B*56:01	HLA-B*40:06	HLA-B*56:01:01	HLA-B*40:06:01:01	4061.2	1223	
1079	HLA-B*40:02	HLA-B*39:01	HLA-B*40:02:01	HLA-B*39:01:03	2319.8	1507.5	
1082	HLA-B*40:01	HLA-B*51:01	HLA-B*40:01:02	HLA-B*51:01:01	639.3	542.7	
1083	HLA-B*59:01	HLA-B*54:01	HLA-B*59:01:01	HLA-B*54:01:01	716.5	1208.2	
1087	HLA-B*44:03	HLA-B*07:02	HLA-B*44:03:01	HLA-B*07:02:01	1975.5	2605.1	
1095	HLA-B*40:02	HLA-B*54:01	HLA-B*40:02:01	HLA-B*51:01:01	946.4	962.2	
1097	HLA-B*40:01	HLA-B*40:06	HLA-B*40:01:02	HLA-B*40:06:01:01	2642.2	1822.5	
1110	HLA-B*40:01	HLA-B*51:01	HLA-B*40:01:02	HLA-B*51:01:01	1277.1	1156.9	
1111	HLA-B*54:01	HLA-B*40:03	HLA-B*54:01:01	HLA-B*40:03	831.3	943.7	
1116	HLA-B*52:01	HLA-B*07:02	HLA-B*52:01:01:02	HLA-B*07:02:01	981.1	1535.6	
1117	HLA-B*52:01	HLA-B*51:01	HLA-B*52:01:01:02	HLA-B*51:01:01	5900.6	6084.9	Only 3 heterozygous SNVs
1119	HLA-B*35:01	HLA-B*07:02	HLA-B*35:01:01:02	HLA-B*07:02:01	921.3	1370.1	
1129	HLA-B*59:01	HLA-B*40:02	HLA-B*59:01:01:01	HLA-B*40:02:01	1472.9	2178.5	
1131	HLA-B*44:03	HLA-B*52:01	HLA-B*44:03:01	HLA-B*52:01:01:02	1519.9	1456.8	
1142	HLA-B*40:02	HLA-B*39:04	HLA-B*40:02:01	HLA-B*39:04	1253	886.5	
1144	HLA-B*44:03	HLA-B*15:11	HLA-B*44:03:01	HLA-B*15:11:01	1061.7	993.2	
1149	HLA-B*44:03	HLA-B*52:01	HLA-B*44:03:01	HLA-B*52:01:01:02	719.6	633.6	
1154	HLA-B*59:01	HLA-B*40:02	HLA-B*59:01:01:01	HLA-B*40:02:01	146.2	171.8	
1157	HLA-B*35:01	HLA-B*48:01	HLA-B*35:01:01:02	HLA-B*48:01:01	911	1077.3	
1160	HLA-B*59:01	HLA-B*54:01	HLA-B*59:01:01:02	HLA-B*54:01:01	129.8	166.8	
1161	HLA-B*55:02	HLA-B*51:01	HLA-B*55:02:01	HLA-B*51:01:01	402.5	366.6	
1163	HLA-B*56:01	HLA-B*46:01	HLA-B*56:01:01	HLA-B*46:01:01	2048.1	2276.5	
1165	HLA-B*15:01	HLA-B*07:02	HLA-B*15:01:01:01	HLA-B*07:02:01	688.1	907.3	
1167	HLA-B*40:06	HLA-B*52:01	HLA-B*40:06:01:01	HLA-B*52:01:01:02	1486.7	4508.1	
1169	HLA-B*54:01	HLA-B*54:01	HLA-B*54:01:01	HLA-B*54:01:01	7086.1		Homozygous
1171	HLA-B*54:01	HLA-B*44:03	HLA-B*54:01:01	HLA-B*44:03:01	1586.6	1833.9	
1175	HLA-B*15:11	HLA-B*15:01	HLA-B*15:11:01	HLA-B*HLA-B*15:01::01:01	5717.6	5693	Only 3 heterozygous SNVs
1182	HLA-B*55:02	HLA-B*51:01	HLA-B*55:02:01	HLA-B*51:01:01	1156.6	1451.5	
1183	HLA-B*54:01	HLA-B*35:01	HLA-B*54:01:01	HLA-B*35:01:01	1413.5	1537.7	
1184	HLA-B*52:01	HLA-B*52:01	HLA-B*52:01:01:02	HLA-B*52:01:01:02	6701.3		Homozygous
1199	HLA-B*51:01	HLA-B*51:01	HLA-B*51:01:01	HLA-B*51:01:01	5229.1		Homozygous
1201	HLA-B*44:03	HLA-B*52:01	HLA-B*44:03:01	HLA-B*52:01:01:02	1990.6	1665.9	
1203	HLA-B*54:01	HLA-B*52:01	HLA-B*54:01:01	HLA-B*52:01:01:02	1246.4	1313.2	
1217	HLA-B*40:01	HLA-B*46:01	HLA-B*40:01:02	HLA-B*46:01:01	2225.1	1882.2	