

氏 名	大塚 俊宏
(ふりがな)	(おおつか としひろ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙博医第7号
学位審査年月日	令和4年1月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Decreased Ionizing Radiation-induced DNA Damage Repair Function of Cultured Fibroblasts Derived from Patients with Xeroderma Pigmentosum Variant (色素性乾皮症バリエント型患者由来皮膚細胞におけ る電離放射線誘発 DNA 損傷修復能の低下)
論文審査委員	(主) 教授 二瓶 圭二 教授 大須賀 慶悟 教授 矢野 貴人

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) は、常染色体劣性の高発がん性遺伝性光線過敏症であり、紫外線 (UV) に対して高い感受性を呈し、露光部皮膚に高い頻度で皮膚悪性腫瘍を引き起こす。遺伝的にヌクレオチド除去修復 (NER) が欠損する XPA 群~G 群 (XP A-G) と、DNA ポリメラーゼ η の変異により損傷乗り越え複製 (translesion DNA synthesis; TLS) 機能が欠損するバリエント型 (XP-V) の8つの異なるグループに分類される。XP-V は日本で2番目に多いグループであり (頻度: XP-A 55%; XP-V 25%)、XP-V の患者は XP-A とは異なり神経学的症状の出現はなく皮膚症状のみを呈して予後は比較的良好である。

これまでの研究において、XP 細胞は UV 性 DNA 損傷の修復機能に低下がみられることは分子レベルまで詳細に解析されているが、XP 細胞の電離放射線 (IR) に対する応答については、報告が少なく議論の余地が多分にある。

X 線検査は画像診断目的でよく使用され、また放射線治療は悪性腫瘍患者を治療するために行われることが多いが、XP-V における放射線誘発 DNA 損傷の修復機能の詳細は解明されていない。このような背景から、我々は XP-V 患者における皮膚腫瘍に対して安全に X 線検査や放射線治療が実施できるかという臨床的疑問を抱いた。そこで、TLS 機能が欠損する XP-V 患者由来の初代培養線維芽細胞を用いて、XP-V における IR 照射後の DNA 損傷修復機能を評価した。

《対 象》

XP-V と確定診断された 11 名の日本人患者 (平均年齢 54.4 歳 (16~82 歳))。

《方 法》

本研究では、DNA 二重鎖切断 (DSB) の高感度マーカーであるリン酸化 H2AX (γ -H2AX) に対する抗体を用いた免疫蛍光染色により、IR 照射後の DNA 損傷修復機能を、XP-V 患者由来の皮膚線維芽細胞、正常細胞および DSB 修復が遺伝的に欠損する毛細血管拡張性運動失調症 (AT) 患者由来細胞 (日本癌研究資源バンク (JCRB) から購入) を用いて検討した。

規定数の細胞をウェルチャンバーに播種し 1Gy 照射処理した。照射前および照射後 30 分、1 時間、2 時間および 4 時間の各時点で細胞を固定し、蛍光標識抗体を含む各種抗体と反応させ標本作製した。レーザー顕微鏡を用いて、各標本の IR 照射後の DNA 損傷部位として DSB を示すマーカーとなる 1 フィールドあたりの標識された γ -H2AX フォーカス形成数を、無作為に選んだ 100 個の細胞で盲検法により目視でカウントして計測した。

γ -H2AX フォーカス形成数の細胞間の違いは、スチューデント t 検定により分析した。フィッシャーの直接確率検定を適用して、 γ -H2AX 応答の経時的変化の有意差を分析した。

《結 果》

XP-V 細胞、正常細胞、AT 細胞すべてのグループで、照射後の DNA 損傷を示すフォーカス数は、IR 照射後 30 分で最も増加し 4 時間後まで徐々に減少し、IR 照射後の DNA 損傷には段階的な修復が確認できた。4 時間以内における正常細胞の修復率は AT 細胞のそれよりも速かった。しかし、各 XP-V 細胞株の IR 照射後の γ -H2AX フォーカス形成能の変化は多様であり、XP-V 細胞の修復率は XP-V 細胞株によって異なることが示された。

DNA 修復機能の定量的評価を行うために、XP-V 細胞および AT 細胞において、IR 照射 30 分後のフォーカス数から 4 時間後のフォーカス数を差し引き、正常細胞の値との比を算出した。平均比は 0.92 (XP-V) 、0.66 (AT) であり、XP-V 細胞の正常細胞に対する DSB 修復の相対レベルは、XP-V 細胞 11 株中 9 株で低かった (比率 : <1) 。

(比率が 1 に近いほど、正常細胞と同等の DNA 修復能を有することを示す。)

《考 察》

本研究の結果は、XP-V 患者の DNA 損傷の修復機能が UV 照射後だけでなく IR 曝露後にも低下している可能性を示唆する。さらに、IR 照射後の DNA 損傷修復は、正常細胞と XP-V 細胞で照射直後に開始したが、その速度は正常細胞と比較して十分ではなかった。しかし、XP-V 細胞における IR 誘発 DNA 損傷の修復能の低下は、ATM 遺伝子の変異により細胞周期チェックポイントキナーゼが機能せず IR に対してきわめて高感受性を示す AT 細胞レベルまでの低下はみられなかった。

11 名の XP-V 患者細胞では、DSB 修復機能に多様性が認められたが XP-V 遺伝型や皮膚症状の重症度との関連はみられなかった。

XP-V 細胞における IR 照射後の DNA 損傷修復能を低下させる分子機構は不明であるが、細胞周期チェックポイント経路の一部にポリメラーゼ η が関与している可能性があることを示唆している。XP-V 細胞の UV 感受性はカフェイン添加により上昇する。UV に対するカフェイン添加致死効果の増強は、カフェイン感受性の組換え修復プロセスの阻害による

ものであることが知られており、細胞分裂における S 期および G2 期の DNA 損傷チェックポイントに影響をもたらすとされる。TLS は、DNA ポリメラーゼが関与する保存された機能であり、DNA ポリメラーゼ η は NER 経路が働いた後に残存するシクロブタンピリミジン二量体やピリミジン (6-4) ピリミドン光生成物などの UV 誘発 DNA 損傷をエラーなく修復するバックアップ的な役割を担っている。また DNA ポリメラーゼ η は、8-オキソグアニンやチミングリコールなどの遺伝毒性物質を含む酸化ストレスによる DNA 損傷の耐性にも重要である。しかし、TLS が DSB 修復に関与しているとは考え難く、DNA ポリメラーゼ η が相同組換えにも部分的に関与しているとの知見と合わせ、今回の結果は、XP-V 細胞では相同組換えシステムが機能していない可能性を示唆している。

本研究では、XP-V 患者の解析細胞株数が比較的少ないという限界がある。DSB 修復能と XP-V の臨床的重症度や遺伝型との関係や、XP-V 患者における各種悪性腫瘍の放射線治療への反応性については、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

《結 論》

IR 照射後の DNA 損傷修復機能は多くの XP-V 細胞で正常細胞に比べて低下する 경우가多く、XP-V 患者の細胞は軽度ではあるが放射線感受性が高いことが示唆された。XP 患者における放射線使用に関するガイドラインは確立されていないため、今後 XP-V 細胞における放射線の生物学的影響を分子レベルでより詳細に調査し、臨床の場において XP-V 患者への X 線使用についての安全性を評価する必要がある。

XP-V は比較的予後の良い皮膚型の XP 病型であるため、日常診療における XP-V 患者の管理において、IR を用いた検査や治療後の皮膚状態の変化には注意を払うべきと考えられる。

(様式 乙7)

論文審査結果の要旨

色素性乾皮症 (XP) は遺伝性の高発がん性光線過敏症であり、紫外線 (UV) に対する高感受性を特徴とし、露光部皮膚に高頻度で皮膚悪性腫瘍を引き起こす。XP は 8 つの遺伝学的に異なるグループがあるが、XP バリエント型 (XP-V) は日本で 2 番目に多いグループで、神経学的症状の合併がないため生命予後は比較的良好である。

申請者らは、これまでの研究でまだ解明されていない XP 細胞の電離放射線 (IR) に対する応答について着目し、臨床の場で XP 患者に対する診断や治療目的で使用される放射線の安全性について検討するため、XP でも生命予後の良い XP-V 患者由来の線維芽細胞を用いて検討している。評価方法は IR 照射後の各細胞の DNA 損傷修復機能の定量化を γ -H2AX フォーカス形成能を指標に行っている。

その結果、XP-V 細胞の IR 誘発 DNA 損傷の修復能は XP-V 細胞の株により異なり、多くの細胞株で低下していることが示された。XP-V 細胞において IR 照射後の DNA 修復能を低下させる分子機構は不明であるが、XP-V 患者への IR 使用には留意する必要がある可能性が示唆された。

申請者らの研究結果は、将来的に XP-V 患者への放射線使用に関するガイドランス策定に寄与することが期待でき、その医学的意義は高いと評価できる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 14 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

BULLETIN OF OSAKA MEDICAL AND PHARMACEUTICAL UNIVERSITY

67(1): 2021, in press