

## 高発癌性遺伝病患者由来培養細胞の紫外線感受性とDNA修復

UV Sensitivity and DNA Repair of the Cells Derived from Human Disorders Involving Hypersensitivity to Carcinogen.

奥井 登代

Toyo Okui

1968年、Cleaver<sup>1)</sup>は、高発癌性遺伝病として知られている色素性乾皮症(XP)患者由来の培養細胞が、紫外線(UV)で誘発されたDNA損傷に対する修復機能を欠いていると報告した。この知見は、単にXP症の原因を解明しただけではなく、発癌と細胞のDNA修復機構との間に密接な関係があることを示唆した重要な研究であった。以来、様々な高発癌性遺伝病患者由来の培養細胞について、そのUV感受性やUV照射によって生じた損傷DNAの修復機構に関する研究が数多く行なわれて来た<sup>2)~4)</sup>。

著者は動物培養細胞のUV感受性や、そのDNA修復機構について興味を持ち、正常人由来細胞、XP症患者由来細胞のUV感受性や、そのDNA修復機構における無機化合物の影響について研究を進めて来た<sup>5)6)</sup>。今回、札幌医大小児科教室より、高発癌性遺伝病であるXP症および基底細胞母斑症候群(BCNS)そして、高発癌性ではないが、遺伝病の一つである、早老症、Hutchinson Gilford Progeria(HGPR)の培養細胞の提供を受けた。そこで、これらの細胞のUV感受性およびUV照射後の細胞で起こる不定期DNA合成(UDS)を調べたのでその結果について報告する。

本実験に用いた培養細胞は、XP患者由来のXP1SA、XP2SA、XP3SA、およびXP4SAの4株、BCNS患者由来のBCNS1SA、BCNS2SA、BCNS3SAの3株、HGPR患者由来のHGPR1SA、1株の計8株である。また、対照として正常人由来のNHSF37を用いた。これらの細胞はいずれも纖維芽細胞である。

細胞培養はすべて、10%の牛胎児血清を含むMEM培養液を使用し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>培養器中で行なった。

供試細胞のUV感受性を調べるために、それぞれの細胞10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>個を径6cmのプラスチックシャーレに播種し、4時間培養した後、培養液を除き、シャーレ上に接着した細胞に対し、UV殺菌灯(15W、1J/m<sup>2</sup>/sec)を用いてUV照射した。照射後、シャーレ内に培養液を加え、2週間培養を

続け、生じたコロニーを計測した。

その結果をFig. 1に示した。XP3SAおよびXP4SAのD<sub>0</sub>値はそれぞれ0.32、0.34 J/m<sup>2</sup>XPISAのD<sub>0</sub>値は0.5 J/m<sup>2</sup>であった。そしてXP25AのD<sub>0</sub>値は、2.2 J/m<sup>2</sup>であった。また、BCNSのD<sub>0</sub>値はいずれも4.2 J/m<sup>2</sup>と、正常人由来細胞、NHSF37よりやや低く、HGPR患者由来細胞、HGPR1SAのD<sub>0</sub>値はNHSF37のそれと有意な差は認められなかつ

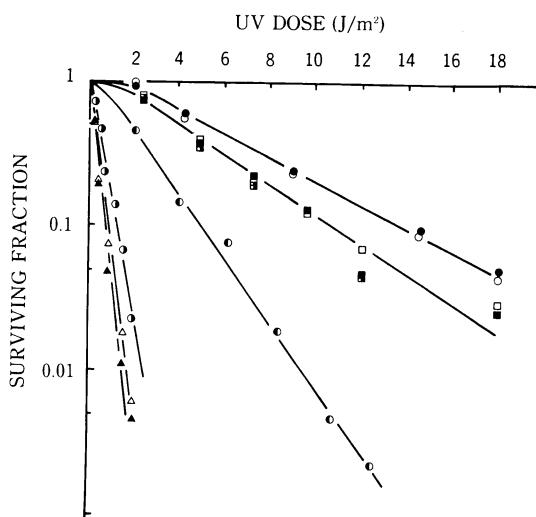


Fig. 1 Lethal effects of UV-irradiation on XP, BCNS, HGPR and normal human fibroblasts.

○: NHSF37 (normal) △: XP3SA ■: BCNS1SA  
●: XP1SA ▲: XP4SA □: BCNS2SA  
●: XP2SA ●: HGPR1SA ▨: BCNS3SA

た。

なお、HGPR1SAについては、0.1~0.5 μg/mlのマイトマシンC(MMC)で処理し、この薬剤に対する感受性を調べたが、正常人由来細胞の感受性との間に有意な差は認められなかった。(Fig. 2)

よく知られているように、UV や、X 線の照射を受けた細胞の DNA はその分子内に損傷を受ける。しかし、正常な細

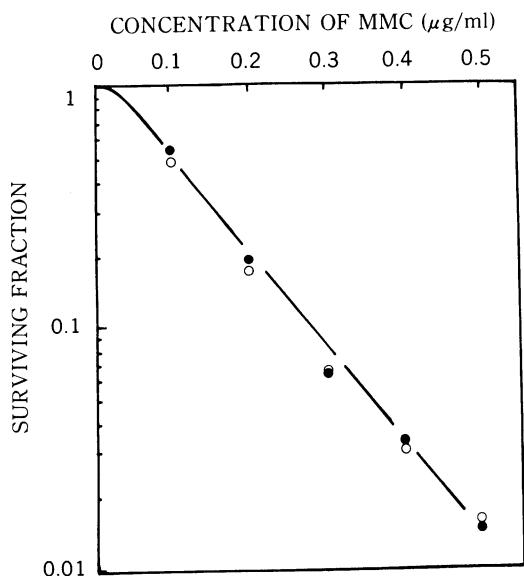


Fig. 2 Lethal effects of MMC on HGPR and normal human fibroblasts.

○ ; NHSF 37 (normal), ● ; HGPR1SA

胞は、その損傷を除去修復する機構を持ち、新たな DNA 合成即ち、不定期 DNA 合成 (UDS) が始まる<sup>7)</sup>。一方、ある種の遺伝病患者由来の細胞ではこの UDS が不完全か、あるいは全く認められない<sup>8)</sup>。

本実験では、供試細胞の DNA 修復機能を調べるために UV 照射による誘発される UDS を調べた。9 株の培養細胞、 $1 - 5 \times 10^3$  個を径 1.8 cm のカバーグラス上に播種し、10% 牛胎児血清を加えた MEM 培養液で 4 時間培養した後、培養液を捨て、UV 照射した。照射後、直ちに  $^{3}\text{H}$ -チミジン (20 Ci/mmol, 5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) および、2.5 mM ハイドロキシウレア含有 MEM 培養液を加えて、4 時間培養した。その後、細胞が接着したカバーグラスを、10 mM 磷酸緩衝液 (PH 7.2) で洗浄し、カルノア (メタノール : 酢酸 = 3 : 1) を用いて細胞を固定した。これらの細胞について、オートラジオグラフィにより、核内への  $^{3}\text{H}$ -チミジンの取り込みを観察した。その結果を Fig. 3 に示した。

XP2SA, BCNS1SA, BCNS2SA, BCNS3SA および HGPR1SA の UDS は、正常人由来の細胞の UDS と有意な差異は認めなかった。しかし、XP1SA の UDS は著しく低く、その量は正常人由来細胞のそれの約 10% であった。また、XP3SA および XP4SA では UDS が全く認められなかった。

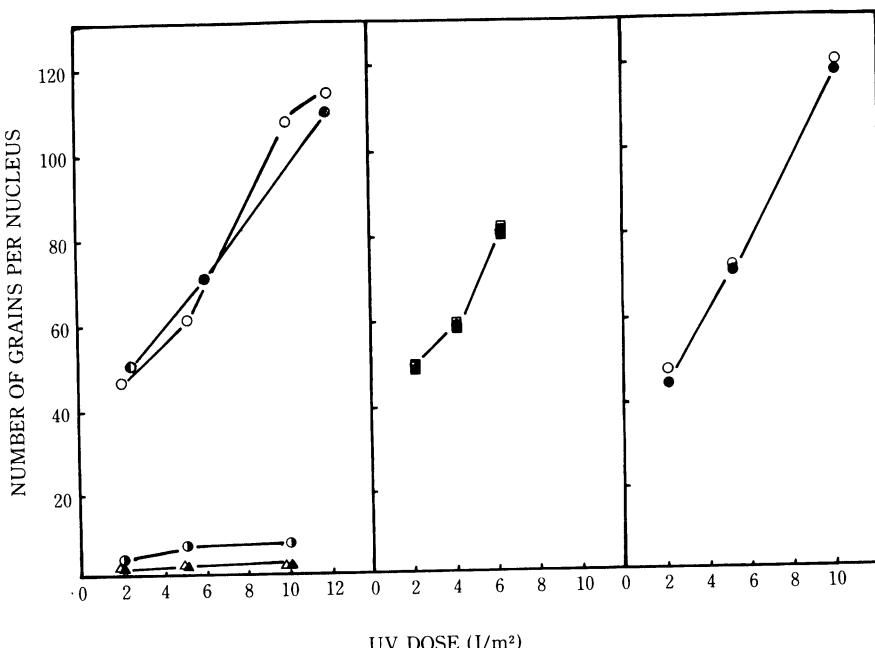


Fig. 3 The induction of UDS in XP, BCNS, HGPR and normal human fibroblasts after UV irradiation.

○ ; NHSF37 (normal)      △ ; XP3SA      ■ ; BCNS1SA      ● ; HGPR1SA  
 ○ ; XP1SA      ▲ ; XP4SA      □ ; BCNS2SA  
 ○ ; XP2SA      ■ ; BCNS2SA

XP症患者は、その細胞を細胞融合法を用いて相補性試験を行うと、AからIおよびVariantの10群に分けられることが知られている<sup>9)</sup>。そして Variant 患者由来細胞のUDSは正常人由来の細胞と変わらないと考えられている。しかし、他の群の細胞は正常に比べてUDSが低く、A群0.3~1.3%，B群3~7%，C群10~25%，D群25~50%，E群10~20%，F群10~20%，G群2%，H群30%そしてI群17%と報告されており、それぞれの細胞のDNA修復機構には何らかの欠損が存在するとされている。

今回の実験に用いたXP患者由来の細胞中XP2SAはそのUV感受性が正常人由来細胞に比較して、やや高いが、そのUDSは正常人由来細胞のUDSと差異がなかったことから Variantと考えられた。

XP3SAおよびXP4SAのUV感受性は著しく低く、UDSも認められないことから、これらはXP-A群であると判明した。また、XP1SAのUV感受性は、XP3SAおよびXP4SAよりやや低く、UDSが僅かに認められ、さらに、この細胞を提供した患者の神経症状が軽いと診断されていたことからC群と判定したが、神戸大学の藤原による相補性試験の結果（私信）、A群であると判明した。

基底細胞母斑症（BCNS）患者由来の纖維芽細胞のX線感受性についてTaylorら<sup>10)</sup>は、正常人のX線感受性と有意な差は認めないと報告している。また、Ringborgら<sup>11)</sup>はBCNS患者由来の末梢リンパ球細胞をUV照射し、その細胞に比べ、UDSが、25%低下していたと報告している。

本実験に供した3株のBCNS患者由来纖維芽細胞のUV感受性は、正常人由来細胞のUV感受性よりやや高かったが、それぞれの細胞のUDSの低下は認められず、BCNS患者由来纖維芽細胞にはDNA除去修復機能の欠損はないと考えられた。

一方、高発癌遺伝病ではないが、DNA修復欠損が何らかの形で関与していると考えられている<sup>12)</sup>遺伝性早老症の一種である Hutchinson Gilford Progeria症患者由来細胞ではUVおよびMMC感受性、そして、UDSも正常人の由来細胞のそれと有意な差は認められなかった。

本実験にあたり、多数の細胞を提供していただきました札幌医科大学、館延忠博士、ならびに久保喜平博士、XP細胞の相補性テストを実施していただいた神戸大学医学部・藤原教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) Clever, J. E.: Nature, 218, 652 (1968)
- 2) Setlow, R. B. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 64, 1035 (1969)
- 3) Takebe, H.: Mutat. Res., 15, 98 (1982)
- 4) Hanawalt, P. C. et al.: DNA Repair Mechanisms, 813, Academic Press, New York (19789)
- 5) 奥井 登代他：道衛研所報, 34, 14 (1984)
- 6) Okui, T. et al.: Mutat. Res., 147, 271 (1985)
- 7) 近藤宗平：分子放射線生物学, 98, 東大出版, 東京 (1972)
- 8) 異 紘一：新しい発癌のメカニズムと評価, 226, サイエンスフォーラム, 東京 (1984)
- 9) 武部 啓：DNA修復, 58, 東大出版会, 東京 (1983)
- 10) Taylor, A. M. R. et al.: Nature, 258, 428 (1975)
- 11) Ringborg, U. et al.: J. Invest. Dermatol., 76, 268 (1981)
- 12) Harty, R. W. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 71, 21 (1974)