

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15229

研究課題名(和文)レスベラトロールによるUV障害緩和機構-アポトーシス及びオートファジーへの影響-

研究課題名(英文)UV damage mitigation mechanism by resveratrol - effects on apoptosis and autophagy -

研究代表者

細川 敏幸 (Hosokawa, Toshiyuki)

北海道大学・高等教育推進機構・教授

研究者番号：00157025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は抗酸化作用のあるレスベラトロールが、ヒト表皮角化細胞等においてUV曝露によるDNA損傷等の抑制効果があるか否かをピリミジンダイマー及び6-4光産物、過酸化由来の細胞死等の因子を調べることにより明らかにした。

すなわち、レスベラトロール投与によりUV曝露によるDNA損傷能が大幅に緩和することを明らかにした。さらにフローサイトメトリー等の解析により、UVによるオートファジー由来のアポトーシスによる細胞死がレスベラトロール添加でmTORのリン酸化が増加することにより抑制されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that resveratrol has shown inhibition of obesity and activating of longevity gene due to its antioxidant ability. In this study, to investigate whether resveratrol has an inhibitory effect on DNA damage by UV exposure in human epidermal keratinocytes and others pyrimidine dimer, 6-4 photoproduct, and factors such as cell death derived from peroxidation were measured by enzyme linked-immunosorbent assay and western blotting method.

As results, it was revealed that DNA damaging ability by UV exposure is greatly relieved by administration of resveratrol. Furthermore, analysis by flow cytometry and western blotting method revealed that cell death caused by apoptosis derived from autophagy due to UV irradiation was suppressed by increasing mTOR phosphorylation which induced by resveratrol.

研究分野：衛生学

キーワード：レスベラトロール 紫外線照射 正常ヒト表皮角化細胞 角膜上皮細胞 シクロブタン型ピリミジン二量体 6-4光産物 アポトーシス オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

従来、ブドウ皮に多く含まれるレスベラトロールの生体に与える防御効果に関する研究は、経口摂取を前提とした方法で評価されてきた。例えば、サーチュイン等の長寿命関連遺伝子がレスベラトロール投与でその発現が活性化されること、およびレスベラトロールが肥満を抑制する効果等は動物実験の経口投与（餌に混入しての自由摂取を含む）を中心とした実験で証明されてきた。また、最近の我々の研究により、肥満に関連して遺伝子の発現調節を担う DNA メチル基転移酵素の発現および前述したサーチュイン遺伝子の発現にも関与していることがわかってきた (Sun et al. PLoS One 8, e74559, 2013)。一方、紫外線曝露による障害では、地表面に到達する UVB (285~320 nm) が皮膚の红斑 (sunburn) を引き起こし、UVB より長波長である UVA (320~390 nm) はその後の皮膚の色が黒くなる (suntan)。さらに過度の UV 曝露により細胞内に生じる酸化的ストレスは組織や DNA を損傷させ、白内障および皮膚がんの発症や進行促進の原因となることが知られている。そのため、効果的で安全かつ機能的な UV 防御策が現在強く望まれている。

多くの *in vitro* もしくは動物実験においては、抗酸化物質を経口的に摂取し効果的な結果が得られていると報告されているが（-カロテン、-トコフェロールおよびリコペン等）一方で、ヒトにおいて、抗酸化物質を経口的に摂取しても効果はわずかであるという報告もなされている。そこで本研究では皮膚における塗布、あるいは眼球への滴下による吸収を想定した実験系を組めばいいのではないかとこの着想を得た。

また本研究において、「ヒトでは抗酸化物質を経口的に摂取しても効果はわずかである」とされる UV 曝露による障害軽減効果について、レスベラトロールを用いて新しい軽減法を提案するものである。そこで、経口のみならず皮膚への塗布を視野に入れている。

これまでの UV 曝露による障害軽減効果研究は、ほとんどが経口摂取などの方法によって行われてきた。また、UV 曝露に関しても、極めてブロードの波長を照射することで行われてきたが、DNA は 260 nm 辺りの波長の吸収、タンパク質では 280 nm 辺りの波長の吸収が主に認められているようにターゲットとする分子により影響のある波長が変化することに対する配慮は UV 曝露障害に関する研究ではこれまで余り考慮されて来なかった。我々はこれまで細胞にバンド幅 10 nm 単位で決められた波長の UV を面積当たり設定の mJ 量照射する系を開発し、照射波長を 20 nm 単位で変化させた時に波長の違いでシクロブタン型ピリミジンダイマーの生成量に違いが生じることを見出している (Masuma et al. J. Photochem. Photobiol.

B: Biology, 125, 202-208, 2013)。

## 2. 研究の目的

抗酸化作用のあることで著名なレスベラトロールの経口摂取により肥満の抑制、長寿遺伝子である Sirt1 の活性化および過酸化脂質産生抑制等の効果があることがこれまで報告されている。一方 UV 曝露における皮膚癌の増加、白内障、免疫能の低下および成長阻害等が実験研究および疫学的研究から明らかにされているが、トコフェロール等の防御効果では完全に抑制することが困難である。今回、我々はレスベラトロールが、UV 曝露による皮膚の DNA 損傷および酸化ストレス増大の抑制効果があるのではないかとこの着想を得、本研究において、ヒト表皮角化細胞及び水晶体上皮細胞を用いて UV 照射におけるピリミジンダイマー生成、6-4 光産物、過酸化物質生成および過酸化由来の細胞死への影響を指標に、レスベラトロールの抑制機構の解明を研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### 【本計画・方法の概要】

UV 曝露による基本的な障害の機構を確認するために、まずレスベラトロール (Sigma-Aldrich 社製) の細胞への適正な曝露量の検討およびその濃度の毒性の有無を検討する。次にヒト正常表皮角化細胞および水晶体上皮細胞に UVC 領域の 250~280 nm、UVB 領域の 290~320 nm、UVA 領域の 330~380 nm の波長を 10 nm 間隔で照射し、対照細胞と比較して、Sirt1 および 2、エピゲネチック因子、アポトーシス因子、オートファジー因子及びピリミジンダイマー及び 6-4 光産物生成の変化を免疫抗体法 (ELISA) を用いて測定し、検討した。決定されたレスベラトロール量を細胞に投与し、上記 UV 曝露実験を行ない、ピリミジンダイマーおよび光産物生成のレスベラトロール有無による変化を検討した。

### 【UV 照射実験】

培養液が UV を吸収するので、照射前に正常ヒト表皮角化細胞の培地を捨て、UV 吸収能の無い 2 ml のリン酸緩衝化生理的食塩水で二度ディッシュを洗った後に、新しく 2 ml のリン酸緩衝化生理的食塩水を加えた。UV 照射はキセノンランプを光源とする照射装置 (MAX-301、朝日 Spectra、日本、東京) を用いた。この装置にバンドフィルターを組み合わせることで選択した波長の  $\pm 5$  nm 範囲に 99.9% の光を集中させることが可能になった。各々の波長の照射前に、シリコン・フォトダイオード探知器 (SEL033、インターナショナル Light Technologies) に接続している放射計 (IL 1400A、インターナショナル Light Technologies、ピーボディー、USA) を用いて、UV 照射量時間の決定を行なった。UV 照射実験は 250 nm 及び 290 nm の両波

長で行なわれた（主な実験は全て 250 nm 照射のみで行われた）。照射波長の照射量は、既知である 24 時間後半数致死量の照射量に相当する照射時間を算出した。本研究を行なうにあたり、一番の根幹となる波長単位の UV 照射については、キセノンランプ光源装置（朝日分光）を用いた。



図 1 UV 照射装置

DNA 損傷の測定 (Kurasaki et al. Adv. Biol. Chem. 2, 243-247, 2012)、酸化ストレス因子、オートファジー及びアポトーシス因子のウェスタンプロテイング (Miyajima et al. Biogerontology, 14, 491-501, 2013) サーチユインおよびエピゲネチック因子のリアルタイム PCR (Sun et al. J. Appl. Toxicol., 33, 1484-1492, 2013) などの手法に準拠した。

#### 【細胞よりの DNA 抽出】

ヒト正常表皮角化細胞の紫外線照射 1 時間後にトリプシン EDTA を用いて剥離された細胞は 150mM NaCl を含む 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で洗われ、The highly pure PCR template preparation kit を使用して抽出精製された。キットを用いた最終ステップである 15 分間の RNase 処理後、DNA はエタノール沈殿に供され、-20 over night 後、DNA は遠心、洗浄及び乾燥され 89mM Tris-HCl バッファ (pH 8.1) 1mM EDTA (1 × TBE) 50  $\mu$ l に再懸濁された。DNA 濃度は 260 nm 及び周辺波長の比により GeneQuant Pro (GE ヘルスケア・ジャパン、東京) を用いて自動計算された。

#### 【免疫抗体法を用いたシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) および 6-4 光産物 (6-4) 測定法】

正常ヒト表皮角化細胞から抽出された DNA サンプルは、1 × TBE で、DNA 濃度を 1  $\mu$ g/ $\mu$ l に調整された。イムノプレート 1 ウェル当たり 0.1 ~ 0.5  $\mu$ g になるようにさらに 1 × TBE を用いて調整した後、DNA の変性のために 100 5 分、氷上 15 分の処理を行ない、1 つのサンプル当たり 2 つのウェルに 50  $\mu$ l ずつ DNA 溶液を加え、37 で一晩乾燥処理を行なった。翌日、各ウェルの DNA 溶液が完全に乾いていることを確認し、各ウェルを 1 度 100  $\mu$ l の 40 mM Tris-Cl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween100 溶液で洗浄した後、2% スキムミルク溶液になるように

スキムミルクを 40 mM Tris-Cl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 100 溶液で溶かしたもの (2% ブロッキング液) を各ウェルに 200  $\mu$ l ずつ加え、37 30 分保温を行なった。30 分後、各ウェルを 100  $\mu$ l の 40 mM Tris-Cl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween100 溶液 (洗浄バッファー) で 2 回洗い、1% ブロッキング溶液で 1:1000 に希釈された CPD あるいは 6-4 に対するモノクロナル抗体溶液 100  $\mu$ l を各ウェルに加え 37 1 時間の保温を行なった。保温後各ウェルを洗浄バッファー 150  $\mu$ l で 3 回洗った。つぎに、1% ブロッキング液で 1:500 まで薄めた二次抗体 (ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識化された抗マウス免疫グロブリン) を 100  $\mu$ l ずつ各ウェルに加え、イムノプレートを 37 で 1 時間保温した。保温後各ウェル洗浄バッファー 150  $\mu$ l で 5 回洗い、0.03% ペルオキシホウ酸ナトリウムを含む 50mM リン酸塩-クエン酸塩バッファー (pH 5.0) で 0.1% になるように溶解された OPD 溶液を 100  $\mu$ l ずつ各ウェルに加え 37 で最大 20 分の保温を行なった。ペルオキシダーゼ酵素反応を止めるために、6N HCl を、50  $\mu$ l 加え、Microplate Reader (モデル 450; Biorad) を用いて、495nm の吸光度を測定した。

#### 【フローサイトメトリー】

正常ヒト皮膚角化細胞等に対するレスベラトロールのアポトーシスへの効果を、Annexin V-FITC キット (BioVision Incorporated; Milpitas, CA, USA) を用いプロトコールに従って検出した。レスベラトロールで処理した細胞を回収し、PBS で洗浄し、次いで結合緩衝液で再懸濁した。その後細胞をアネキシン V-FITC およびヨウ化プロピジウム (PI) と共に 5 分間反応させた。最終的に、蛍光活性化細胞選別 (FACS) 装置 (FACSCanto BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA) によって初期および後期アポトーシス細胞の両方を測定した。

## 4. 研究成果

#### 【UV 照射による CPD 及び 6-4 産生とレスベラトロールの効果】

ヒト正常表皮角化細胞に 250 nm 波長の UV を LD50 に近い 10 mJ/cm<sup>2</sup> 照射し、照射後 1 時間後に細胞から DNA を抽出し、UV 照射前後にレスベラトロールを最終濃度として 0.5 から 50  $\mu$ M の範囲で投与した。その結果を図 2 に示す。コントロール細胞では CPD はあまり生成していないが UV 照射により 20 倍前後に増加している。レスベラトロールは図では 5  $\mu$ M 添加した場合の結果である。単独投与ではコントロールの場合とほぼ同じ CPD 生成量であったが、UV 照射と同時に投与すると CPD 生成を半分以下に抑える効果を示した (図 2)。

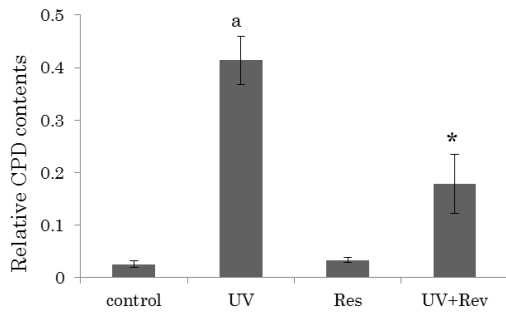


図2 CPD 産生へのレスベラトロールの影響  
aはコントロール、\*はUV群に対する $p < 0.01$

また同様の効果は280 nmのUV照射でも認められたが、両波長ともに、レスベラトロールの効果は5  $\mu\text{M}$ 以上でほぼ同じ効果を示し、量的な依存性は観察されなかった。また、回数は少ないがヒト角膜上皮細胞においても同様の傾向が認められた。

一方6-4光生成物では図3に示すようにヒト正常表皮角化細胞に250 nm波長のUVをLD50に近い10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ で照射したところ、同様にUV照射により6-4光生成物が飛躍的に産生されたが、5  $\mu\text{M}$ レスベラトロールと同時投与した場合には、CPDに対するよりもやや弱い効果（UV照射群のばらつきが大きいので有意差も認められなかった）を示した。

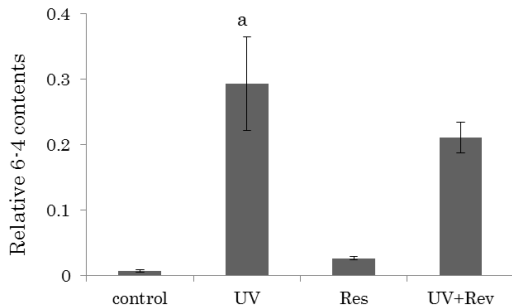


図3 6-4産生へのレスベラトロールの影響  
aはコントロールに対する $p < 0.01$

また、レスベラトロールを最終濃度として5  $\mu\text{M}$ になるようにUV照射前後に細胞に添加しているが、前に投与する場合と後から加える場合のどちらに効果があるかをCPD産生に対して調べた。前投与した場合は前後投与の6割程度、後投与した場合は前後投与の7割くらいの効果を示し、本実験からはどちらか一方の投与を行うより前後双方に投与を行うほうが、効果が高いことが明らかになった。また各波長照射に対する効果は、まだ、全て統計処理が行われるほどのサンプルが集積をしていないが、300 nm以上の波長では紫外線の障害能自体が低下していくためレスベラトロールの効果もやや弱まるように思われた。

【UV照射による細胞死へのレスベラトロールの影響】

250あるいは280 nmのUVを照射した場合（それぞれ10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ 及び15  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ）24時間後の正常ヒト皮膚角化細胞の細胞生存率はそれぞれ55%および62%であった。その生存率はレスベラトロールを最終濃度で5  $\mu\text{M}$ になるように投与したところ、それぞれ80%以上の生存率に回復した。

この細胞死の形態を明らかにするためにAnnexin V-FITCキットを用いてフローサイトメトリーを試みた（図4）。

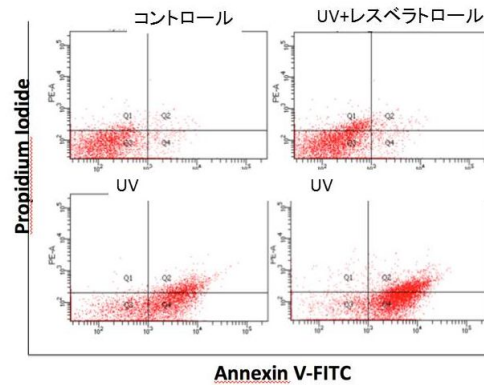


図4 Annexin Vにより細胞死の同定

その結果、UV照射によりオートファジーを介したアポトーシスが起きていることが推察されたが、その細胞死はレスベラトロールの投与により抑制されていることが明らかになった。

#### 【アポトーシス因子の解析】

オートファジーを介したアポトーシスが起きていることをリン酸化Aktを調べることによって確かめた。正常ヒト皮膚角化細胞にレスベラトロールを最終濃度で5  $\mu\text{M}$ になるように添加すると、コントロールに比べてややリン酸化Aktが増加しているがUV照射（250 nmのUVを10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ）によりリン酸化Aktは劇的に低下する。その低下はレスベラトロールを同時に投与することで抑えられた（図5）。

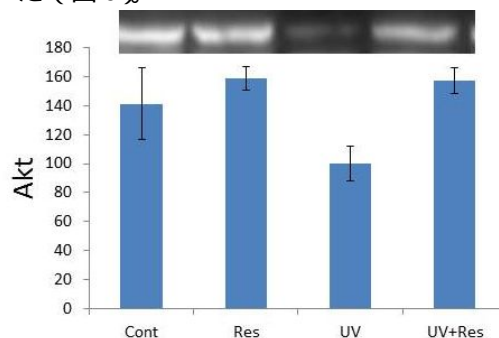


図5 Akt発現に及ぼすUVとレスベラトロールの影響

他の因子に関してはUV照射によりリン酸化mTorが減少し、その減少はレスベラトロールにより回復している。同時に内在性のアポトーシス経路においてもBaxおよび

caspace 9 が UV 照射により増加し、レスベラトロールを加えると減少していた。今後この二つの経路の因子をさらに精査し論文としてまとめたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kaniz Fatima Binte Hossain, Md. Mostafizur Rahman, Md. Tajuddin Sikder, Takeshi Saito, Toshiyuki Hosokawa, Masaaki Kurasaki. Inhibitory effects of selenium on cadmium-induced cytotoxicity in PC12 cells via regulating oxidative stress and apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 180-189, 2018. (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.034>

Mahmuda Akter, Md. Tajuddin Sikder, Md. Mostafizur Rahman, A. K. M. Atique Ullah, Kaniz Fatima Binte Hossain, Subrata Banik, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, Masaaki Kurasaki. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 9, 1-16, 2018. (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>

Md. Tajuddin Sikder, Md. Jakariya, Md. Mostafizur Rahman, Sayaka Fujita, Takeshi Saito, Masaaki Kurasaki. Facile synthesis, characterization, and adsorption properties of Cd (II) from aqueous solution using  $\beta$ -cyclodextrin polymer impregnated in functionalized chitosan beads as a novel adsorbent. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(4), 3395-3404, 2017. (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.06.007>

蔵崎正明、齋藤 健. 銅の輸送と代謝. 総説集: 微量元素の生体機能と疾患-基礎・臨床研究の最新知見-(荒川泰昭編)日本臨床, 74(7), 1103-1110, 2016. (依頼・査読無し)

Chuang Liu, Yongkun Sun, Yutong Song, Takeshi Saito and Masaaki Kurasaki. Nonylphenol diethoxylate inhibits apoptosis induced in PC12 cells. *Environmental Toxicology*, 31(11), 1389-1398, 2016. (査読有) 10.1002/tox

Md. Tajuddin Sikder, Shunitz Tanaka, Takeshi Saito, Toshiyuki Hosokawa, Sulmin Gumiri, Ardianor, M. Kabir Uddin, Shafi M. Tareq, Mashura Shammi, Abdul Kadir Ibne Kamal and Masaaki Kurasaki. Vulnerability assessment of surface water quality with an innovative integrated multi-parameter water quality index (IMWQI). *Pollution*, 1(3), 333-346, 2015. (査読有)

10.7508/pj.2015.03.010

〔学会発表〕(計 8 件)

山崎尚二郎、上野祐可子、木村 豪、富原 朋美、Ketema Rahel、Sikder Md. Tajuddin、佐藤 伸、蔵崎正明、細川敏幸、齋藤 健. 授乳期のレスベラトロール投与による仔ラットの肝臓におけるコレステロール代謝変動. 第 88 回 日本衛生学会(東京)2018 年.

Md. Tajuddin Sikde、Md. Mostafizur Rahman、山崎尚二郎、木村 豪、富原朋美、Ketema Rahel、上野祐可子、蔵崎正明、齋藤 健. 高グルコース条件下でのアルファリポ酸の PC12 細胞および Caco-2 細胞への影響. 第 88 回 日本衛生学会(東京)2018 年.

山崎尚二郎、小野 舞、木村 豪、杉井志衣、上野祐可子、川原 妙、北 朋美、蔵崎正明、佐藤 伸、齋藤 健. 授乳期のレスベラトロール投与による成熟期仔ラットの肝臓中コレステロール代謝変動. 第 87 回日本衛生学会(宮崎)2017 年.

Md. Mostafizur Rahman、齋藤 健、蔵崎正明. 亜鉛過剰摂取による銅吸収阻害機構の解明. 第 27 回日本微量元素学会(京都)2016 年.

上野祐可子、北 朋美、菱岡なおこ、小森幹育子、蔵崎正明、川原 妙、山崎尚二郎、齋藤 健. PC12 細胞におけるレスベラトロール投与による活性酸素代謝のメカニズムについて. 第 86 回日本衛生学会(旭川)2016 年.

齋藤 健、田中将登、上野祐可子、北 朋美、川原 妙、山崎尚二郎、細川敏幸、蔵崎正明、佐藤 伸. 授乳期のレスベラトロール投与が成熟期の仔ラットの肝臓中脂肪酸合成に及ぼす影響. 第 86 回日本衛生学会(旭川)2016 年.

上野祐可子、北 朋美、小森幹育子、菱岡なおこ、田中将登、蔵崎正明、齋藤 健. 未分化および分化 PC12 細胞の活性酸素代謝酵素に及ぼすレスベラトロールの作用の違い. 第 26 回日本微量元素学会(札幌)2015 年.

〔図書〕(計 1 件)

Yustiawati, Kazuto Sazawa, M. Suhaemi Syawal, Hideki Kuramitz, Takeshi Saito, Toshiyuki Hosokawa, Masaaki Kurasaki and Shunitz Tanaka. Springer, Chapter 18: Peat fire impact on water quality and organic matter in peat soil. pp. 281-296, In "Tropical peatland ecosystems" (Eds. Mitsuru Osaki and Nobuyuki Tsuji), (p651). 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

細川 敏幸 (HOSOKAWA, Toshiyuki)  
北海道大学・高等教育推進機構・教授  
研究者番号：00157025

### (2)研究分担者

齋藤 健 (SAITO, Takeshi)  
北海道大学・保健科学研究所・教授  
研究者番号：40153811