

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08293

研究課題名(和文) 太陽光誘導皮膚がんの新規治療法の開発 - D-DTをターゲットとした研究 -

研究課題名(英文) Overexpression of D-dopachrome tautomerase increases ultraviolet B irradiation-induced skin tumorigenesis in mice

研究代表者

清水 忠道 (shimizu, Tadamichi)

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：70260396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線(UV)は皮膚悪性腫瘍の発症における主要な因子である。本研究ではMIFの機能的水モログであるD-dopachrome tautomerase (D-DT)の過剰発現(Tg)マウスを用い、光発癌におけるD-DTの役割を解析した。UVB照射により野生型(WT)マウスと比べD-DT Tgマウスで腫瘍発生が促進された。また、D-DT Tgマウス由来の培養ケラチノサイト(KCs)にUVBを照射したところ、WTマウス由来の培KCsと比べp53, PUMAおよびBaxの発現が抑制されていた。以上よりD-DTはUVB照射により誘導されるKCsのアポトーシスの抑制を介して発癌の促進に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D-DTは光発癌における機能的に重要なサイトカインであり、光発癌予防のための治療標的になりうることが証明された。

研究成果の概要(英文)：Ultraviolet irradiation (UV) exposure is the leading factor underlying the development of skin malignancies. D-dopachrome tautomerase (D-DT), a functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF), has functional similarities to MIF. We explored the role of D-DT in photocarcinogenesis by developing D-DT transgenic (D-DT Tg) mice and provided a research model for future studies targeting D-DT. Chronic UVB exposure accelerated tumor development in D-DT Tg mice compared with wild-type (WT) mice, with a higher incidence of tumors observed in D-DT Tg mice than in WT mice. In D-DT Tg irradiated mouse keratinocytes, the p53, PUMA, and Bax expression was lower than that in WT mice. These results indicate that D-DT Tg overexpression confers prevention against UVB-induced apoptosis in keratinocytes. Taken together, these findings support D-DT as a functionally important cytokine in photocarcinogenesis and potential therapeutic target for the prevention of photocarcinogenesis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：D-dopachrome tautomerase MIF ultraviolet p53 skin cancer carcinogenesis apoptosis

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚は身体の最外層に存在するため常に太陽光に晒されている。地表に到達する太陽光には紫外線、可視光線、赤外線があり、これらは光老化や光発癌など皮膚に様々な影響を及ぼす。中でも紫外線は、表皮角化細胞に DNA の損傷を及ぼすが、通常はその修復機構により修復される。また、修復が不可能な場合はその細胞自体がアポトーシスに陥ることにより DNA の損傷は排除される。しかし、DNA 損傷の修復や排除が不可能であった場合、その表皮角化細胞は徐々に悪性化し、前癌病変である日光角化症を生じる。さらに数年の経過で有棘細胞癌に至る。一方、可視光線や赤外線に由来する温熱刺激も、ストレス応答に関与する転写調整因子であるヒートショックファクター (HSF) を介して発癌や癌細胞増殖に作用することが報告されている (Chengkai D, et al., Cell, 2007)。このような太陽光の曝露による皮膚障害、特に光発癌は、昨今の高齢化社会において増加の一途を辿っており、その対策は医学的にも社会的にも重要な課題である。

マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor: MIF) は、炎症や免疫応答をはじめとする様々な生理的反応に密接に関与する炎症性サイトカインの一種である。我々は以前より MIF の生物学的機能や各種疾患との関連について研究しており、これまでにアトピー性皮膚炎や気管支喘息等の炎症性疾患の発症や病態形成に MIF が関与していることを報告してきた (Shimizu T, et al., J allergy clin immunol, 1997, Shimizu T, et al., Biochem Biophys Res Commun, 1997, Yamaguchi E, et al., Clin Exp Allergy, 2000)。また、MIF はがん抑制遺伝子である p53 の機能抑制という他のサイトカインにはないユニークな機能も有している。我々は MIF が p53 の発現抑制を介してアポトーシスを抑制すること、その結果 UVB 照射により誘導される癌化を促進することを見出した (Honda A, et al. Carcinogenesis, 2009)。さらに最近、MIF が heat shock factors (HSFs) とそれに連続する p53-Bax-Caspase3 系と JNK-Bad-Caspase3 系を抑制することにより、温熱刺激が誘導するアポトーシスに対しても抑制的に作用することも明らかにした (Yoshihisa Y, et al. FASEB J, 2016)。

一方、近年 MIF とアミノ酸配列と立体構造の相同性が非常に高い蛋白質である D-dopachrome tautomerase (D-DT) が報告された (Merk M, et al. Cutokine, 2012)。D-DT は 12 kDa の細胞内タンパク質で、肝臓、心臓、腎臓、脳や眼など種々の組織および血清中に局在することが知られている (Esumi N, et al. Mamm Genome, 1998)。D-DT は D-ドーパクロームを 5, 6-ジヒドロキシインドールに変換する酵素であるが、D-DT の中和により炎症反応が有意に減少することが報告され、炎症性サイトカインとしての機能も示唆されている (Merk M, et al. PNAS, 2011)。我々は前述した温熱刺激が誘導するアポトーシスにおいて、D-DT は MIF 作用を補完するように作用することを見いだした (Yoshihisa Y, et al. FASEB J, 2016)。さらに我々は、D-DT を全身に過剰発現させた D-DT Tg マウスを世界に先駆けて作製し、現在、D-DT の機能解析や各種疾患との関連について、MIF と比較した解析を行っている。

## 2. 研究の目的

本研究は、紫外線曝露により誘発される皮膚癌の発症における D-DT の役割や機能を解明することを目的とし、将来的には D-DT をターゲットとした皮膚癌の新規治療法を開発することを目指した。

## 3. 研究の方法

### 紫外線照射による発癌における D-DT の関与の検討

紫外線曝露による発癌に D-DT が関与しているかを検討するため、D-DT Tg マウスおよび対照である WT (C57BL/6) マウスに紫外線照射を行い、形成される腫瘍の数やサイズについて比較検討した。また、形成された腫瘍を用いて組織学的、分子生物学的な解析を行い、発癌における D-DT の役割を検討する。UVB 照射量および照射期間に関しては申請者が以前 MIF Tg マウスで行った条件とし、各群 n=5 で実験を行った。

### 紫外線照射により誘導されるアポトーシスの D-DT 作用機序の解明

D-DT Tg マウスおよび WT マウスから得た培養表皮角化細胞 (D-DT 過剰発現 KCs およびコントロール KCs) や siRNA で D-DT の発現を抑制した培養表皮角化細胞 (D-DT 欠損 KCs) に UVB 照射し、p53, JNK および Akt を介したアポトーシスにおける D-DT の機能について解析した。

#### 4. 研究成果

D-DT Tg マウスおよび WT マウスの背部皮膚に紫外線を照射して発生させた腫瘍を採取し、病理組織学的組織学的な検討を行った。D-DT マウス、WT マウスのいずれにおいても発生した腫瘍は有棘細胞癌であった。さらに D-DT Tg マウスでは WT マウスよりも腫瘍細胞における p53 の発現が減少しており、これが発癌の促進に関与する可能性が示唆された。

培養ケラチノサイトを Annexin V/PI 染色し FACS 解析を施行したところ、WT マウス由来のケラチノサイトに比べ D-DT Tg マウス由来のケラチノサイトで紫外線照射によるアポトーシス細胞の数が有意に減少していた。また、紫外線照射により誘導されるアポトーシス関連タンパク質の発現における D-DT の影響を解析したところ、WT マウス由来ケラチノサイトでは紫外線照射により p53, PUMA, Bax, p-JNK, p-Bad の発現が著しく増加したが、D-DT Tg マウス由来ケラチノサイトではそれらの発現は有意に抑制されていた。さらに、siRNA により D-DT の発現を抑制したマウスケラチノサイトを用いて、紫外線誘導アポトーシスにおける D-DT の関与を調べた。D-DT siRNA 導入ケラチノサイトでは、紫外線照射によるカスパーゼ-3 活性の増加がコントロール siRNA 導入ケラチノサイトを比べ有意に増加していた。また、D-DT siRNA 導入ケラチノサイトでは、紫外線照射により p53, PUMA, Bax, p-JNK および p-Bad の有意な発現の増加と Akt のリン酸化の著明な抑制が観察された。

以上の結果から、D-DT は p53, JNK および Akt を介したアポトーシスの抑制により発癌の促進に関与している可能性が示唆された。

今後は、今回得られた実験結果に基づき、光老化における D-DT と MIF の関与についても *in vivo*, *in vitro* の両実験系において明らかにする必要がある。さらには紫外線照射および温熱刺激による発癌による D-DT の作用点の網羅的探索を行い、さらに実験系を進展させる必要があると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Makino T, Kagoyama K, Murabe C, Nakamura T, Shimizu T.	4. 巻 101
2. 論文標題 Association of Development of Solar Elastosis with Increased Expression of Fibrillin-1, LTBP-2 and Fibulin-4 in Combination with Decreased Expression of LTBP-4.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Derm Venereol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-3738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshihisa Y, Andoh T, Rehman MU, Shimizu T	4. 巻 34(6)
2. 論文標題 The regulation of protein kinase CK2 by apigenin is involved in the inhibition of UVB-induced macrophage migration inhibitory factor-mediated hyperpigmentation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytother Res.	6. 最初と最後の頁 1320-1328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ptr.6597.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Makino T, Mizawa M, Yoshihisa Y, Yamamoto S, Tabuchi Y, Masashi Miyai M, Hibino T, Shimizu T	4. 巻 27(6)
2. 論文標題 Trichohyalin-like 1 protein plays a crucial role in proliferation and anti-apoptosis of normal human keratinocytes and squamous cell carcinoma cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Discov. 109	6. 最初と最後の頁 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-020-00344-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Andoh T, Akasaka C, Shimizu K, Lee JB, Yoshihisa Y, Shimizu T.	4. 巻 189(9)
2. 論文標題 Involvement of $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone-Thromboxane A2 System on Itching in Atopic Dermatitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 1775-1785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.05.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizawa M, Makino T, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T.	4. 巻 99(7)
2. 論文標題 Erythropoietic protoporphyria in a Japanese population.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Derm Venereol.	6. 最初と最後の頁 634-639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-3184.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makino T, Mizawa M, Yoshihisa Y, Shimizu T.	4. 巻 44(7)
2. 論文標題 Ultraviolet B irradiation increases the expression of trichohyalin-like 1 protein in human skin xenotransplants.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Dermatol.	6. 最初と最後の頁 773-776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ced.13904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makino T & Shimizu T.	4. 巻 1;29(2)
2. 論文標題 Fibrillar-type dermatitis herpetiformis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 115-120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2019.3533.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsui Y, Makino T, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu T.	4. 巻 29(5)
2. 論文標題 Detection of IgG antibodies to BP180 NC16a and C-terminal domains and LAD-1 in nivolumab-associated bullous pemphigoid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 554-555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2019.3618.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arase N, Tanemura A, Jin H, Nishioka M, Aoyama Y, Oiso N, Matsunaga K, Suzuki T, Nishigori C, Kawamura T, Shimizu T, Ito A, Fukai K, Abe Y, Yang L, Tsuruta D, Takeoka K, Iwatani Y, Hidaka Y, Nishida M, Yamauchi-Takahara K, Arase H, Fujimoto M, Katayama I.	4. 巻 95(2)
2. 論文標題 Autoantibodies detected in patients with vitiligo vulgaris but not in those with rhododendrol-induced leukoderma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 80-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2019.06.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihisa Y, Rehman MU, Nakagawa M, Matsukuma S, Makino T, Mori H, Shimizu T	4. 巻 22
2. 論文標題 Inflammatory cytokine-mediated induction of serine racemase in atopic dermatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cell Mol Med.	6. 最初と最後の頁 3133-3138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.13592.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kagoyama K, Andoh T, Shimizu T.	4. 巻 28(6)
2. 論文標題 Enlarging the irradiation spot to include the edge of hyperkeratotic papules using a CO2 surgical laser dramatically improves the treatment of lichen amyloidosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 837-839.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2018.3413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yanagihara M, Makino T, Shimizu T, Mochizuki T.	4. 巻 45
2. 論文標題 Nerve alterations showing autophagy in two patients with lichen aureus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cut Pathol.	6. 最初と最後の頁 423-427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cup.13131.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurosaki Y, Suga Y, Negi O, Takamori K, Ishii N, Makino T, Shimizu T, Hashimoto T.	4. 巻 45
2. 論文標題 Monitoring of IgA antibodies to epidermal and tissue transglutaminases over an 18-month period in a Japanese patient with dermatitis herpetiformis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 e211-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計17件(うち招待講演 4件/うち国際学会 12件)

1. 発表者名 牧野輝彦、清水忠道
2. 発表標題 サルコイドーシスを合併した抗PM-SCL抗体陽性皮膚筋炎
3. 学会等名 強皮症・膠原病国際シンポジウム2020(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makino T, Mizawa M, Yoshihisa Y, Yamamoto S, Tabuchi Y, Miyai M, Shimizu T.
2. 発表標題 Trichohyalin-like 1 protein plays a crucial role in the proliferation of normal human keratinocytes and squamous cell carcinoma cells.
3. 学会等名 第45回日本研究皮膚科学会(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水忠道
2. 発表標題 光老化の発症メカニズムー真皮の変化についてー
3. 学会等名 第38回日本美容皮膚科学会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水忠道
2. 発表標題 痒みをともなう皮膚疾患 update—漢方治療を含めて—
3. 学会等名 大分皮膚科医会 学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水忠道
2. 発表標題 痒みをともなう皮膚疾患 UP DATE
3. 学会等名 第74回日本皮膚科学会高知地方会 第38回総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水忠道
2. 発表標題 皮膚疾患における漢方治療の決め手
3. 学会等名 Derma Kampo（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井波智恵子、三澤恵、古川史奈、清水忠道
2. 発表標題 日光蕁麻疹を契機に診断した軽症晩発性皮膚ポルフィリン症の1例
3. 学会等名 第83回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizawa M, Shimizu T
2. 発表標題 The five-year-follow-up of three Japanese patients with incomplete erythropoietic protoporphyria.
3. 学会等名 The 24th World Congress of Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Andoh T, Akasaka K, Shimizu K, Lee JB, Yoshihisa Y, Shimizu T
2. 発表標題 T. -Melanocyte-stimulating hormone and itching in atopic dermatitis
3. 学会等名 The 10th World Congress of Itch (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ko Kagoyama, Megmi Mizawa, Chieko Inami, Ryotaro Torai, Yu Matsui, Tadamichi Shimizu.
2. 発表標題 Usefulness of meshed advancement flap in reconstruction of defects following resection of vulvar cancer
3. 学会等名 28th European Academy of Dermatology and Venereology (EADV) Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihisa Y, Andoh T, Rehman MU, Tabuchi Y, Shimizu T
2. 発表標題 Regulation of eotaxin, macrophage migration inhibitory factor and IL-4 expression by berberine is involved in the anti-atopic action by Kampo medicine Orengedokuto
3. 学会等名 The 10th World Congress of Itch (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shimizu K, Makino T, Shimizu T.
2 . 発表標題 Pigmentation within depigmented lesion of pigmentary mosaicism.
3 . 学会等名 The 2nd Annual Meeting of the East Asian Vitiligo Association and the 1st Annual Meeting of the Japanese Society for Vitiligo. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Makino T, Yoshihisa Y, Mizawa M, Shimizu T.
2 . 発表標題 The histological and immunological characterization of fibrillar-type dermatitis herpetiformis.
3 . 学会等名 International Investigative Dermatology. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yoshihisa Y, Shimizu T.
2 . 発表標題 Ultraviolet B radiation upregulates the production of serine racemase in mouse keratinocytes.
3 . 学会等名 International Investigative Dermatology. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Andoh T, Akasaka C, Shimizu K, Yoshihisa Y, Shimizu T.
2 . 発表標題 -Melanocyte-stimulating hormone is involved in pruritus in atopic dermatitis.
3 . 学会等名 27th EADV Congress Paris 2018. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Torai R, Makino T, Mizawa M, Shimomura Y, Shimizu T.
2. 発表標題 A novel missense mutation in exon 3 of the TRPS1 gene in a patient with a mild phenotype of tricho-rhino-phalangeal syndrome type 1.
3. 学会等名 International Investigative Dermatology. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水忠道
2. 発表標題 サイトカインからみた光老化・光発がん UPDATE
3. 学会等名 第1回 フォトダーマトロジー学会(国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 清水忠道	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 1568
3. 書名 1361専門家による私の治療2019-20年度版	

1. 著者名 三澤 恵, 清水忠道	4. 発行年 2019年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 81-87
3. 書名 新しい薬疹 薬剤による皮膚有害事象の新タイプ	

1. 著者名 牧野輝彦, 清水忠道.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 213-215
3. 書名 木村病 (軟部好酸球形肉芽腫症) 頸部腫瘤の診かた	

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学皮膚科学講座研究業績 <a href="http://www.med.u-toyama.ac.jp/derma2/study/#kenkyu">http://www.med.u-toyama.ac.jp/derma2/study/#kenkyu</a> 富山大学大学院医学薬学研究部皮膚科学講座研究業績 <a href="http://www.med.u-toyama.ac.jp/derma2/study/#kenkyu">http://www.med.u-toyama.ac.jp/derma2/study/#kenkyu</a>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	牧野 輝彦  (Makino Teruhiko)  (90359711)	富山大学・学術研究部医学系・准教授    (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------