

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390296

研究課題名 (和文) 皮膚癌発症における長波長紫外線の関与

研究課題名 (英文) Relevance of near UV to the development of skin cancer

研究代表者

錦織 千佳子 (NISHIGORI CHIKAKO)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50198454

研究成果の概要：

紫外線の波長特異的な生物学効果とリスクの検証のために、二つの実験を行った。NB-UVB と BB-UVB の長期、継続的照射試験による発がん性の検討を行なったところ、ナローバンド UVB 照射群マウスにおいてブロードバンドのそれと比較して有意に皮膚腫瘍の悪性化率の上昇を認め、その原因として NB-UVB が Cyclobutane pyrimidine dimers をより多く形成していることが示唆された。長波長紫外線として UVA 領域の 364nm レーザーを用いて 1MJ/m² の UVA 領域の照射を行ったところ、酸化型 DNA 損傷のみでなく、ピリミジンダイマーも生じることが明らかになった。おそらく内因性の光増感物質の関与があると思われるが、この事実はヒトにおける皮膚癌発症を考える上で重要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：光医学、皮膚腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ピリミジンダイマー、皮膚がん、メラノーマ、8-ヒドロキシグアニン、長波長紫外線

1. 研究開始当初の背景

(1) 医学分野で公汎な波長域のレーザー光、LED の利用、光線力学療法、Narrow band UVB など、多様な光の高線量を治療に用いる機会が増えたが、その有用性の検証は進んでいるが、risk-benefit のバランスは不十分である。

(2) UVB が DNA に吸収されて生じるダイピリミジン光産物が *in vitro* での細胞死、突然変異に深く関わる DNA 損傷であることから、UVB が光発症の主因と考えられてきたが、最近、「UVB だけではなく、UVA も皮膚癌の発症に深く関わる」という報告も散見さ

れる。その根拠として(a)UVA によっても突然変異が生じる。(b)マウスを用いた動物実験で紫外線発症の作用スペクトルは、UVB に大きな山があるが、UVA にも小さな山がある。(c)魚のメラノーマの発生において UVA(360 nm あたり)にもピークがある。

(3) 一方、UVB と UVA によって生じる DNA 損傷ならびにそれによる変異を比較すると、UVB はダイピリミジン光産物を生成し、ピリミジンが並んだ部位でのトランジション型の変異を引き起こし、UVA は光増感剤の関与のもとに、酸化的 DNA 損傷を作り、

それらによる変異はトランスバージョン変異を引き起こすと信じられてきた。しかし、最近、酸化的 DNA 損傷の高感度マーカーである 8-oxoG よりも大量の CPD が UVA によって生じるという報告がなされた。一方で、それを否定する報告もあるものの、UVA と皮膚癌発症との関連性について、多角的に検討する事は、今後の皮膚癌予防対策の面から、重要且つ早急に明らかにすべき点である。

2. 研究の目的

光線治療に用いられる光線の波長特異的な効果と安全性の検討と光発癌における長波長紫外線の関与を明確にする事が本研究の目的である。波長の違いによって生じる DNA 損傷の種類とその生物学的効果の差を明らかにし、皮膚癌発症への関与を以下の点を中心に明らかにしようとした。(I)ナローバンド UVB(NB-UVB)とブロードバンド UVB(BB-UVB)を用いて発癌実験を行い、波長の差による発癌のリスクを比較検討する。

(II)内因性の光増感剤+UVA 照射により、*iv vivo*でどのような DNA 損傷が生じるかを検討(III)紫外線 DNA 損傷のメラノサイトとケラチノサイトにおける修復のされ方、アポトーシスの起こり方等の生物学的な反応性の差の検討。

3. 研究の方法

(1) NB-UVB と BB-UVB とを用いて、長期使用での皮膚発癌発生頻度の差をマウスを用いて検討した。臨床に用いるのと類似した照射量で、長期、継続的照射試験による発がん性の検討を行なった。具体的には NB-UVB と BB-UVB のそれぞれの照射源による MED を測定し、1 MED を週 3 回、40 週間照射した。

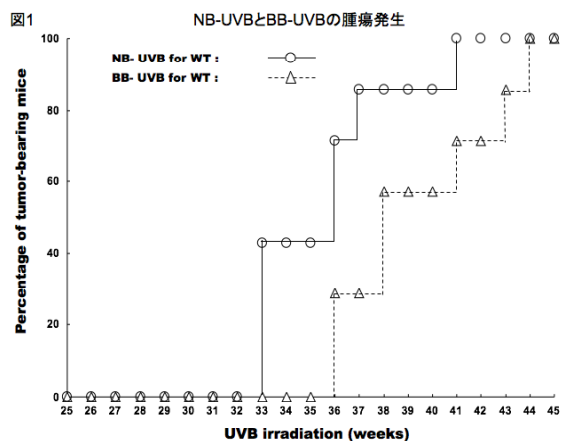
(2) 各照射源によって生じる DNA 損傷を見る目的で、それぞれ 1MED 照射後の CPD、(6-4)光産物、ならびに 8-oxo-G の形成とその経時的な修復(細胞内の DNA 損傷の除去)をそれぞれの損傷に対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

(3) 長波紫外線(UVA)による DNA 損傷を検討し、UVB によるそれと比較した。特に、UVA による CPD の産生とその修復過程を見るのに、紫外線 DNA 損傷を修復できない色素性乾皮症(xeroderma

pigmentosum: XP) マウスを用いる事で明確な回答を得られると考え、DNA 損傷の検討には XPA マウスも用いて比較検討した。さらに、メラニンの種類によって紫外線による活性酸素の生成量などの差異をみる目的で、ユーメラニン(C57BL)、アルビノ(Skh/hr-1)の二系統を用いた。これらに UVA あるいは UVB を単回照射を行い、各群での①紫外線照射後の CPD、あるいは酸化的 DNA 損傷の生じ方、②メラノサイトとケラチノサイトでは紫外線による紫外線 DNA 損傷、細胞障害とそれに対する修復反応の差を検討した。CPD ならびに酸化的 DNA 損傷のマーカーとされる 8-oxoG の検出はそれらに対するモノクローナル抗体を用いた。③) UVA は基礎生物研究所の 360nm の UVA レーザーあるいは 360 nm の LED を用いて、0.3 MJ/cm²、1 MJ/cm²を照射した。2) 光増感剤にはリボフラビンあるいはレボフロキサシンを用いた。UVB は 1 kJ/cm²を照射した。

4. 研究成果

(1) NB-UVB と BB-UVB を用いて長期、継続的照射試験による発がん性の検討を行なった。ナローバンド照射群の方が、早くに皮膚腫瘍ができて始め(図1)、良性、悪性を含めた全体の腫瘍数は大きな差がないが、ナローバンド UVB 長期照射群のマウスにおいて有意にブロードバンドのそれと比較して発生した皮膚腫瘍の悪性化率の上昇を認めた(表1)。



またナローバンド照射したマウス皮膚においてブロードバンド照射よりも有意に紫外線照射による DNA 障害である Cyclobutaine pyrimidine dimers の除去の遅れが認められ、NB-UVB の方が BB-UVB よりもより高率に皮膚悪性腫瘍が生じる原因として、NB-UVB の Cyclobutaine pyrimidine dimers(CPD) 形成の多さが深く関与していることが示唆された(図 2)。

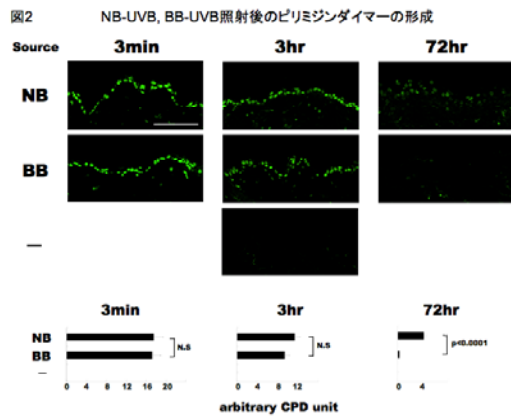


表1 BB-UVBとNB-UVBによって生じた腫瘍の種類と比較

Albino hairless									
UVB Source	number of Tumors			Mean number of tumors/mouse	Histological analysis %				
	Male	Female	Total		Squamous Cell Carcinoma	Sarcoma	Total	Benign tumors %	Unidentified*
Broad Band	6(2)†	43(9)	49(9)	6.1 ± 5.9	57.1 (29/49)†	4.1(9)‡	61.2† (30/49)	36.7(18/49)	2.0(1/49)
Narrow Band	13(2)	37(7)	40(9)	4.4 ± 2.8*	80.0 (32/40)	0(0)‡	80.0† (32/40)	15.0(6/40)	5.0(2/40)

C57Bl									
UVB Source	number of Tumors			Mean number of tumors/mouse	Histological analysis %				
	Male	Female	Total		Squamous Cell Carcinoma	Sarcoma	Total	Benign tumors %	Unidentified*
Broad Band	2(1)‡	10(9)	12(7)	1.7 ± 0.8†	41.7 (5/12)*	8.3(1/12)	50.0* (6/12)	41.7(5/12)	8.3(1/12)
Narrow Band	3(1)	9(8)	12(7)	1.7 ± 0.8*	67.7 (8/12)	25.0(3/12)	92.8* (11/12)	8.3(1/12)	0(0/12)

* Unidentified tumors were those which we were not able to make the diagnosis due to the failure of the embedding the sections.
 † The number of skin tumors/dosing mice at the end of the experiment.
 ‡ The number of skin tumors/total skin tumors histologically.
 †‡ p < 0.05.
 †* p < 0.01.
 *†, †‡, Not significant.

ただし、MED ベースではなく、照射した積算線量で比較すると、BB-UVB の方が少ない積算線量で皮膚腫瘍を多く発生した。BB-UVB は少量ではあるが、270-300 nm の波長の有害紫外線も含んでいるので、同じ線量照射されると、遺伝子への傷は大きくなるが、MED を基本にして照射すると、1回あたりの照射線量はNB-UVB だと BB-UVB の2-3 倍になるので、同じスケジュールで同じ回数照射すると、発癌性はブロードより高くなる。NB-UVB の方が治療効果が優れており、少量の紫外線量でも有効なことが多いことから、有効性を確保できて副作用が生じない量のバランスをとりながら臨床応用するこ

とが重要であると考えた。

(2) 長波長紫外線として UVA 領域の 364nm レーザーを用いて、抗菌剤としても用いられる光増感剤ロメフロキサシン投与下で UVA 照射を行うと酸化型 DNA 損傷のみでなく、CPD も生じることが明らかになった。光増感剤は内因性、外因性ともに多くヒトの体内に存在していることから、この事実はヒトにおける皮膚癌発症を考える上で重要である。ヒトの光発癌に最も関連が深いと思われる太陽光の中に多く含まれる UVA により CPD がどの程度の形成されるかにつき検討した。マウスに光増感剤の投与は行わなくても、364nm レーザーを用いて 1MJ/m² の UVA 領域の照射を行ったところ、酸化型 DNA 損傷のみでなく、CPD も生じることが明らかになった。おそらく内因性の光増感物質の関与があると思われるが、この事実はヒトにおける皮膚癌発症を考える上で重要である。CPD を修復することのできない XPA マウスのうち黒色のものを選び、メラノマの作用波長における第二のピークが存在する 364nm のレーザー光を照射したが、アルビノ XPA マウスと黒色 XPA マウスとで CPD の形成に大きな差はみられなかったことより、少なくともユーメラニンの存在が CPD の形成に大きく関与することは少なそうである。今後は酸化型 DNA 損傷をつくりやすいとされているフェオメラニンの関与を検討したい。

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 10 件)

- ① Yoshimoto T, Morishima N, Mizuguchi I, Shimizu M, Nagai H, Oniki S, Oka M, Nishigori C, Mizuguchi J, Anti-proliferative activity of IL-27 on melanoma., J Immunol, 査読有, 180, 2008, 6527-6535.
- ② Masaki T, Ono R, Tanioka M, Funasaka Y, Nagano T, Moriwaki S, Nishigori C, Four types of possible founder mutations are responsible for 87% of Japanese patients with Xeroderma pigmentosum variant type., J Dermatol Sci, 査読有, 52, 2008, 144-148.

- ③ Ohtani Y, Harada T, Funasaka Y, Nakao K, Takahara C, Abdel-Daim M, Sakai N, Saito N, Nishigori C, Aiba A, Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for *in vivo* growth of melanoma., *Oncogene*, 査読有, 27, 2008, 7162-7170.
- ④ Nagano T, Kunisada M, Yu X, Masaki T, Nishigori C, Involvement of interleukin-10 promoter polymorphism in non-melanoma skin cancers –A case study in non-carcinoma skin cancer patients., *Photochem Photobiol*, 査読有, 84, 2008, 63-66.
- ⑤ Yonetani S, Osawa M, Moriyama M, Maku S, Nishigori C, Nishikawa S, In vitro expansion of immature melanoblasts and their ability to repopulate melanocyte stem cells in the hair follicle., *J Invest Dermatol*, 査読有, 128, 2008, 408-420.
- ⑥ 錦織千佳子, エビデンスに基づいた UVB 療法—安全性と有効性のバランス—, *日本皮膚科学会誌(増)*, 査読無, 118, 2008, 2768-2872.
- ⑦ 錦織千佳子, 紫外線発癌, *日本皮膚科学会誌*, 査読無, 117(増), 2007, 2201-2203.
- ⑧ Kunisada M, Kumimoto H, Ishizaki K, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nishigori C, Narrow-band UVB induced more carcinogenic skin tumors than broad-band UVB through the formation of cyclobutane pyrimidine dimmer., *J Invest Dermatol*, 査読有, 127, 2007, 2865-2871.
- ⑨ 錦織千佳子, 「皮膚科セミナー」高発癌性皮膚疾患：遺伝と皮膚癌 色素性乾皮症, *日本皮膚科学会誌*, 査読無, 117, 2007, 15-22.
- ⑩ Tanioka M, Masaki T, Ono R, Nagano T, Otoshi-Honda E, Matsumura Y, Takigawa M, Inui T, Miyachi Y, Moriwaki S, Nishigori C, Molecular analysis of DNA polymerase eta gene in Japanese patients diagnosed as xeroderma pigmentosum variant type., *J Invest Dermatol*, 査読有, 127, 2007, 1745-1751.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Oka M, Kamo T, Edamatsu H, Kunisada M, Kataoka T, Nishigori C, Crucial role of phospholipase C ϵ in ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and skin tumor development., 34th Meeting of the American Society for Photobiology, 2008/6/20-6/25, Burlingame, CA, USA.
- ② Nishigori C, Relevance to the UV wavelength in carcinogenesis., 21th World Congress of Dermatology, 2007/10/1-5, Buenos Aires, Argentina.

[図書] (計 3 件)

- ① 錦織千佳子, 文光堂, 皮膚科サブスペシャリティ—シリーズ 1 冊でわかる光皮膚科—皮膚科医に必須の photodermatology—, 2008, 37-39.
- ② 錦織千佳子, 中外医学社, 図説分子病態学 4 版, 2008, 370-375.
- ③ 錦織千佳子, 文光堂, 皮膚科診療プラクティス 20 *Environmental Dermatology* 環境・職業からみた皮膚疾患, 2007, 41-47.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

錦織 千佳子 (NISHIGORI CHIKAKO)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50198454

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者