

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12158

研究課題名（和文）メラニン合成異常がもたらす紫外線皮膚ゲノム毒性の評価とその機構の解明

研究課題名（英文）Estimation of UV toxicity for the genome of skin with defective melanin synthesis and the elucidation of its mechanism

研究代表者

池畑 広伸（Ikehata, Hironobu）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90250737

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）：皮膚表皮に存在するメラニン色素は強力な環境ゲノム毒性因子である紫外線から皮膚を防護しているが、メラニン合成異常が逆に紫外線毒性を増強する例も指摘されている。メラニンが関わる紫外線皮膚ゲノム毒性の防護や増強機構の研究は試験管内実験系では限界があり、本研究によりメラニンの皮膚ゲノムに対する防護機能や毒性機構を生体皮膚で直接解析できる解析系をマウスで開発した。これを用い突然変異を指標に正常メラニンの防護能を定量的に明らかにし、メラニン合成異常の紫外線皮膚ゲノム毒性に対する影響を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スキンタイプで示されるようにメラニン変異による皮膚色の多様性が紫外線感受性に影響している。ケルト系人種の「赤毛」に限らず、メラニン代謝系遺伝子変異は人種間・個人間の皮膚色の違いを生み出しており、日本人でも多様な遺伝子多型が知られ、紫外線感受性・皮膚がんリスクとの強い相関が報告されている。これを実験的に証明できる解析系を開発するところに本研究の学術的意義である。開発した系を利用することによりメラニンの多様性と紫外線感受性の相関関係を定量的に評価できるようになる点に社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Melanin protects skin from a harmful genotoxic environmental agent, ultraviolet radiation (UVR), although some of its variations are assumed to become toxic in the interaction with UVR. This study developed an in vivo system to evaluate various types of melanin on the capacities of protection and sensitization for UVR hazard to skin, using genetically modified mice, whose skin is melanized with melanocytes populating to the epidermis. Using these mice, the skin with various types of melanin was examined for the sensitivities to UVB, and estimated quantitatively the protection efficiencies of each types of melanin in terms of induced mutation frequencies in the epidermis and dermis.

研究分野：紫外線生物学

キーワード：メラニン 紫外線 皮膚 ゲノム毒性

1. 研究開始当初の背景

紫外線には DNA 損傷を生成し突然変異を誘発する強いゲノム毒性があり、過剰に浴びると皮膚発癌の危険がある。皮膚は紫外線に対し DNA 修復などの細胞レベルの分子機構で自らのゲノムを保護しているが、組織レベルでもメラニンという表皮に存在する色素(図1)により侵入紫外線量を減衰させ皮膚を防護している。このようにメラニンは個体レベルの紫外線防護で極めて重要な役割を果たしているが、そのゲノム防護能に関する解析・評価はあまり進んでいない。

またメラニンはその合成に異常があると逆に紫外線の毒性を増強する場合もある。メラニンには黒いユーメラニンと黄色のフェオメラニンがある。前者は紫外線防護能が高いが、後者は酸化作用や光増感能があると指摘されており紫外線の皮膚ゲノム毒性を増強する作用が疑われている(表1)。メラノサイトでのユーメラニン合成誘導(図2)に関わる MC1R 受容体に欠損があると、ユーメラニン合成が抑制されフェオメラニン主体のメラニンが合成されるが、「赤毛」で知られるケルト系人種は遺伝的にこの欠損を持ち、日光露光部にメラノーマなどの皮膚がんが発生しやすい。日本人にも皮膚色に影響する MC1R 遺伝子の多型が報告されている (Abe *et al.*, 2013, *J Dermatol Sci* 69:167-172)。

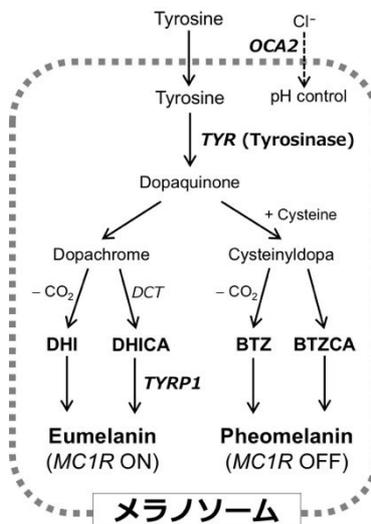


図1: メラニン合成反応。メラニンはメラノサイトの細胞小器官メラノソーム内でチロシンからチロシナーゼ(TYR)の作用で合成される。MC1Rからの指令(図2参照)がONになるとDCTやTYRP1などの酵素反応が活性化しDHIやDHICAのモノマーを介してユーメラニンが合成されるが(左側の経路)、OFFの場合は非酵素的過程でBTZやBTZCAといったモノマーを介してフェオメラニンが合成される(右側の経路)。OCA2はメラノソーム内のpHを調節する。

表1. メラニンの種類と性質

メラニン	ユーメラニン		フェオメラニン	
モノマー	5,6-dihydroxyindole (DHI)	DHI-carboxylic acid (DHICA)	1,4-benzothiazine (BTZ)	BTZ-carboxylic acid (BTZCA)
ポリマーの性質	可視光吸収 抗酸化作用	紫外光吸収 高い抗酸化作用	高い酸化作用	光増感作用

各メラニンのモノマーはカルボキシル化の有無により、メラニンポリマーに付与する性質が異なる。ユーメラニンは高い光吸収・抗酸化能を示すのに対し、フェオメラニンは相対的に光吸収能が劣り、酸化剤や光増感剤としての毒性も示す。Micillo *et al.* 2016, *Int J Mol Sci* 17: 746

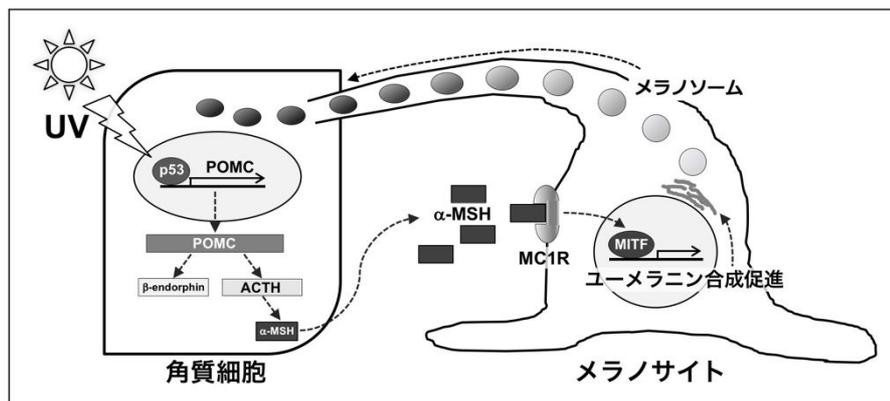


図2: 紫外線による皮膚ユーメラニン合成誘導。紫外線をあびた表皮の角質細胞は α-MSH を産生し、メラノサイトに MC1R 受容体を通じてユーメラニン合成の指令を出す。メラニンはメラノソーム内で合成され(図1参照)、メラノサイトから角質細胞へ渡される。

更にユーメラニンの合成自体にも多数の変異が知られ、肌・毛・目の色の多様性をもたらすが、そこで生じる異常ユーメラニンの紫外線に対するゲノム防護能(あるいは増感能)はほとんど評価されることがない。日本人でもユーメラニン合成系の遺伝子多型が知られ、OCA2 遺伝子多型と日焼けしやすさや皮膚がんリスクの強い相関が報告されている (Shido *et al.*, 2019, *J Invest Dermatol* 139:1605-1608; Yoshizawa *et al.*, 2014, *J Dermatol* 41:296-302)。

このように紫外線ゲノム毒性に対する組織・個体レベルの生体防護を考える上でメラニンによる皮膚ゲノム防護機構の解明は極めて重要である。

2. 研究の目的

紫外線に対するメラニンの皮膚ゲノム防護能の定量的評価を行う。更に紫外線ゲノム毒性に対するフェオメラニンや異常ユーメラニンの防護能・増感能を評価し、その機構を解明する。

(1) 表皮にメラノサイトの常在する *K14-SCF* マウスを利用して、紫外線に対する正常メラニンの皮膚ゲノム防護能の定量的評価を行う。

(2) メラニン合成変異体である毛色遺伝子変異マウスを利用して、紫外線ゲノム毒性に対するフェオメラニンや異常ユーメラニンの防護能・増感能を評価し、誘発される DNA 損傷や突然変異パターンを解析することにより、その防護・毒性機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) メラノサイト表皮常在性突然変異研究用マウスの作出：*K14-SCF* マウスを突然変異解析用トランスジェニックマウス (*Muta* マウス、大腸菌 *lacZ* トランスジーンを変異マーカとして有す

表2：マウス毛色遺伝子

毛色遺伝子		劣性形質		
遺伝子名	Allele 優性/劣性	毛色	ユーメラニン	フェオメラニン
<i>Tyrp1</i>	<i>B/b</i>	茶色	不完全	+
<i>Tyr</i>	<i>C/c</i>	白(アルビノ)	-	-
<i>Mc1r</i>	<i>E/e</i>	黄色	少	+
<i>Oca2</i>	<i>P/p</i>	灰色	少	少

る)と交配して作出したメラノサイト表皮常在性の突然変異解析用 *K14-SCF* マウスをベースに、各種の毛色変異遺伝子(表2)を導入し、メラニン合成異常により皮膚表皮色が異なるマウスを作出する(図3)。*B/B C/C E/E P/P*を野生型として、*b/b, c/c, e/e, p/p*の各変異形質を交配により導入する。作出マウスについてメラノサイトの表皮への局在、角質細胞へのメラノソームの分配を、皮膚切片の Masson-Fontana 染色により組織学的に確認する。その上で以下の(2)~(4)の3つの実験を行う。

(2) 正常メラニンによる皮膚ゲノム防護能の解析：野生型皮膚色(黒)を示す *B/B C/C E/E P/P* マウスで、紫外線照射による DNA 損傷生成量と突然変異誘発度を解析し、通常非メラニンマウスと比較することにより正常ユーメラニンの紫外線に対する皮膚ゲノム防護能を評価する。

(3) ユーメラニン異常による皮膚ゲノム防護能の変化の評価：マウス毛色変異によりユーメラニン形成に異常をきたし皮膚色が野生型と異なる *b/b* (茶)、*p/p* (灰色)、*c/c* (白、アルビノ)の3系統のマウスで、紫外線照射による DNA 損傷生成量と突然変異誘発度を解析し、異常ユーメラニンによる防護能の変化を評価する。紫外線に対する増感が認められた場合は変異マーカ遺伝子に生じた塩基配列変化や生成した DNA 損傷タイプを解析し、その機構を解明する。

(4) フェオメラニンの皮膚ゲノム毒性の解析：*Mc1r* (*e/e*) 変異マウスに紫外線を照射し、皮膚における DNA 損傷生成量と誘発突然変異頻度を解析し、フェオメラニンの紫外線照射皮膚へのゲノム毒性を評価する。変異マーカ遺伝子に生じた塩基配列変化や生成した DNA 損傷タイプを解析し、フェオメラニンによる紫外線ゲノム毒性機構を解明する。

(5) 実験方法：あらかじめ除毛したマウス背中皮膚に UVB(東芝 FL20S.E ランプ)を照射する。DNA 損傷量は照射直後の皮膚で、突然変異は照射4週間後の皮膚で、それぞれから抽出したゲノム DNA を用いて評価する。評価は表皮と真皮に分けて行う。DNA 損傷量については、UV 特異的 DNA 損傷に対するモノクローナル抗体による ELISA 法で解析する。突然変異は *lacZ* トランスジーンの変異を指標に解析する。

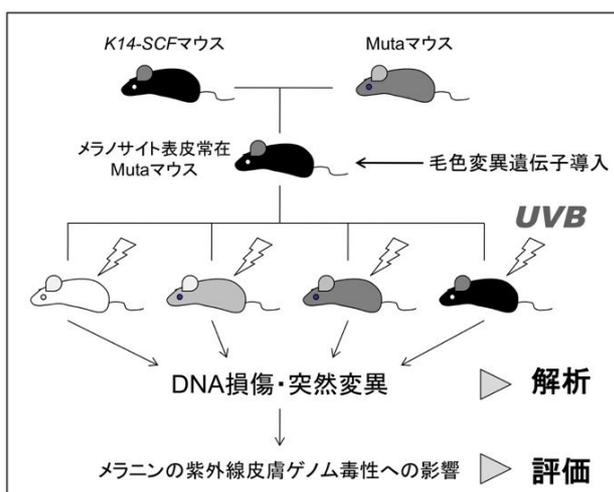


図3：研究方法の概略。Muta マウスは突然変異解析用トランスジェニックマウスである。

4. 研究成果

(1) *K14-SCF* マウスと突然変異解析用トランスジェニックマウス (*Muta* マウス)を交配し、皮膚表皮にメラノサイトの常在する突然変異解析用マウスを作成し皮膚で紫外線ゲノム毒性が評価できる系を開発した。メラニン合成の正常な野生型メラニンマウスとして遺伝子型が *a/a B/B C/C E/E P/P* のマウスを、皮膚表皮にメラニン合成異常を有するメラノサイトが常在する突然変異解析用マウスとして *Tyrp1* 欠損 (*b/b*) マウス、*Mc1r* 欠損 (*e/e*) マウス及び *Oca2* 欠損 (*p/p*) マウス(遺伝子型はそれぞれ *a/a b/b C/C E/E P/P*、*a/a B/B C/C e/e P/P* または *a/a B/B C/C E/E p/p*) を作出した。開発マウスの皮膚を組織学的に解析し実際にメラノソームが表皮に局在していることを確認した。

(2) 野生型メラニンマウスで紫外線に対する正常メラニンの皮膚ゲノム防護能の定量的評価を行った。実際には背中を除毛し、3日後麻酔下で紫外線 UVB を照射した。4週間後に照射部皮

膚を採取し、表皮・真皮それぞれで誘発された突然変異をそれぞれの組織のゲノムDNAから回収した *lacZ* トランスジーンでモニターした。対照として *K14-SCF* トランスジーンを持たない *Muta* マウスでも同様の解析を行った。その結果、表皮にメラニンを有する野生型メラニンマウスで対照マウスよりも有意に低い突然変異誘発が表皮・真皮両組織で観測され、表皮メラニンによる紫外線ゲノム毒性の抑制効果が確認できた(図4)。またUVBにより皮膚表皮・真皮に誘発されるDNA損傷もELISA法で定量し、表皮メラニンにより損傷生成が抑制されることを確認した。

(3)メラニン合成異常マウスについて、前記(2)と同様にしてUVB誘発突然変異を解析した。*Tyrp1* 欠損(*b/b*)マウス、*Mc1r* 欠損(*e/e*)マウス及び*Oca2* 欠損(*p/p*)マウス、いずれについても野生型と同等の紫外線変異誘発感受性を示し、大きな差異は認められなかった。当初の予想に反し、メラニン合成異常による紫外線毒性の増大は認められなかった。また当初予定していたアルビノメラニンマウス(*c/c*)での解析は飼育施設の改修工事でマウスの作出が間に合わず実施できなかった。

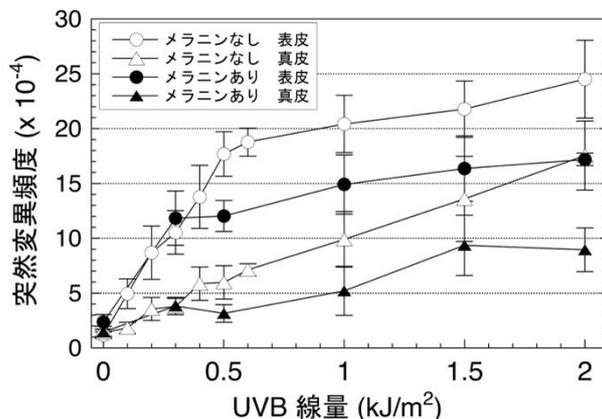


図4：UVBによる皮膚突然変異誘発動態。メラニンあり・なしは *K14-SCF* トランスジーンの有無に対応する。野生型 (*B/B*) マウスの結果を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 H. Ikehata, M. Yamamoto	4. 巻 98
2. 論文標題 Cyclobutane pyrimidine dimers produced with narrowband UVB are on average more mutagenic than those with broadband UVB in mouse skin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 916-924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/php.13568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Nishimura, H. Ikehata, T. Douki, J. Cadet, S. Sugiura, T. Mori	4. 巻 97
2. 論文標題 Seasonal differences in the UVA/UVB ratio of natural sunlight influence the efficiency of the photoisomerization of (6-4) photoproducts into their Dewar valence isomers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 582-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/php.13361	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池畑広伸、山本雅之
2. 発表標題 広帯域UVBと狭帯域UVBの皮膚ゲノム毒性の違いはシクロブタン型ピリミジンダイマー生成の有効波長の違いにある
3. 学会等名 第43回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池畑広伸、山本雅之
2. 発表標題 紫外線に対するメラニンのマウス皮膚ゲノム防護能の評価
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森俊雄、西村和樹、池畑広伸、T. Douki、J. Cadet、杉浦重樹
2. 発表標題 太陽光中のUVA/UVB比率の季節差はDNA損傷6-4型光産物のDewar型光産物への光異性化の効率に影響を及ぼす
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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