

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591454

研究課題名（和文） 紫外線照射および表皮発生・分化における皮膚の酸化ストレス防御機構の役割

研究課題名（英文） Roll of skin antioxidant system in UV irradiation and epidermal morphogenesis/differentiation

研究代表者

川内 康弘（KAWACHI YASUHIRO）

筑波大学・医療医学系・准教授

研究者番号：00272196

研究成果の概要（和文）：近年、UV照射は、細胞のDNAに吸収されてCPDや6-4光産物などのDNA障害を引き起こすほかに、活性酸素などの酸化ストレス物質の強力な細胞内発生刺激であることが知られてきており、UVの細胞傷害作用、発癌性、老化原性は、DNAに対する直接的障害作用だけではなく、UV照射によって発生した活性酸素等の酸化ストレスに起因することがわかってきている。本研究では細胞が酸化ストレスに暴露されると活性化し、抗酸化・生体防御蛋白の転写を活性化する主要な経路であるNrf2-Keap1経路を持たないNrf2ノックアウトマウスを用いて、UVによる皮膚老化と酸化ストレスとの関連を解析することを目的としている。Nrf2ノックアウトマウス群とコントロールマウス群に1回100 mJ/cm²のUVBを週3回X4ヶ月間照射し、長期UVB照射による皮膚のシワ形成を肉眼、レプリカ、病理組織について比較検討したところ、同じくUVBを繰り返し長期照射したNrf2ノックアウトマウス群とコントロールマウス群で、有意にシワの形成が多かった。また、光老化において蓄積することが知られているglycosaminoglycan（GAG）の蓄積の程度を病理組織学的に比較検討した。コロイド鉄染色で染色し、コントロールマウス群と比較した結果、Nrf2ノックアウトマウス群では有意に表皮直下にGAGの沈着が認められた。さらに、表皮はNrf2ノックアウトマウス群では、コントロールマウス群の2倍以上に肥厚していた。表皮肥厚も光老化の特徴の一つであることから、これらの結果は、Nrf2ノックアウトマウスでは光老化が促進しており、Nrf2が長期UVB照射による酸化ストレスを消去して光老化を防いでいることを強く示唆すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Ultraviolet（UV）radiation is one of the most important environmental factors involved in the pathogenesis of premature skin aging, termed photoaging. The harmful effects of UV in photoaging are associated with the generation of reactive oxygen species, and cellular antioxidants act to prevent the occurrence and reduce the severity of UV-induced photoaging. The transcription factor Nrf2 and its cytoplasmic anchor protein, Keap1, are central regulators of the cellular antioxidant response. Here, we investigated the role of the Nrf2 - Keap1 pathway in photoaging using *nrf2* gene-deficient (*nrf2*^{-/-}) mice. Our results indicated that UVB-irradiated *nrf2*^{-/-} mice showed accelerated photoaging, such as coarse wrinkle formation, loss of skin flexibility, epidermal thickening, and deposition of extracellular matrix in the upper dermis. In addition, *nrf2*^{-/-} mice also showed an increase in cutaneous reactivity for the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal and a significant decrease in cutaneous glutathione level. These findings indicate that Nrf2 plays the important role in the protection against UVB-induced photoaging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：酸化ストレス、Nrf2、ケラチノサイト

1. 研究開始当初の背景

(1) 活性酸素種と酸化ストレス：活性酸素やフリーラジカルなどの活性酸素種 (ROS) は、ミトコンドリアの好気性呼吸代謝系、好中球・マクロファージの食食・殺菌系や喫煙・放射線・紫外線暴露などで大量に発生する。過剰な活性酸素種は、細胞の DNA・脂質・蛋白を変性させ、生体に有害に作用するため、酸化ストレスと呼ばれている。今日では、酸化ストレスは動脈硬化や糖尿病などの生活習慣病や発ガン、老化などに深く関与していることがわかってきており、現在最も注目を集めている医学研究分野のひとつである。

(2) 酸化ストレスに対する防御機構：酸化ストレスに対し、生体は活性酸素種を中和・消去し、生体を酸化ストレスから保護するシステムも用意している。この酸化ストレス防御機構には、①変動の少ない恒常的防御機構と、②細胞が酸化ストレスに暴露されたときに大きく発現が活性化される誘導的防御機構があることが明らかになりつつある。恒常的防御機構として、SOD,カロテンやポリフェノール類、セレン蛋白群があり、一方、主要な誘導的防御機構として Nrf2-Keap1 系が最近同定され、ホットな研究領域として注目されている。

2. 研究の目的

Nrf2-Keap1 経路は、生体の誘導的抗酸化機構を担う主要な経路として最近同定され、発ガン、動脈硬化、老化、糖尿病などの病態に深く関わっていることが次々と明らかとなり、注目を集めている。応募者は、これまでに紫外線 (UV) 照射により皮膚細胞の Nrf2-Keap1 系が活性化され、サンバーンを緩和するなど、皮膚の紫外線防御に重要な役割を担っていることを報告してきた。本研究課題では、Nrf2-Keap1 経路が、①UV による皮膚光老化の制御、および②表皮ケラチノ

サイトの分化 (角化)・増殖に果たす役割にどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

ICRをバックグラウンドとするNrf2ノックアウトマウスと野生型 ICR マウスを実験に用いた。全てのマウスを用いた実験は、動物愛護の精神に則り、「国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程」の規定に従って、できる限り苦痛を与えないようよう実験を計画、実施した。

(2) 紫外線照射

剃毛したマウスの背部皮膚に 80 mJ/cm² の UVB を週 3 回 36 週間照射した。

(3) シワの定量的評価

シリコンゴムを用いて背部皮膚のレプリカを作製した。レプリカに 30° の入射角で光線を当て、その影を CCD カメラで取り込み、イメージアナライザー (ASA-03R) にて解析した。

(4) 皮膚粘弾性の定量的評価

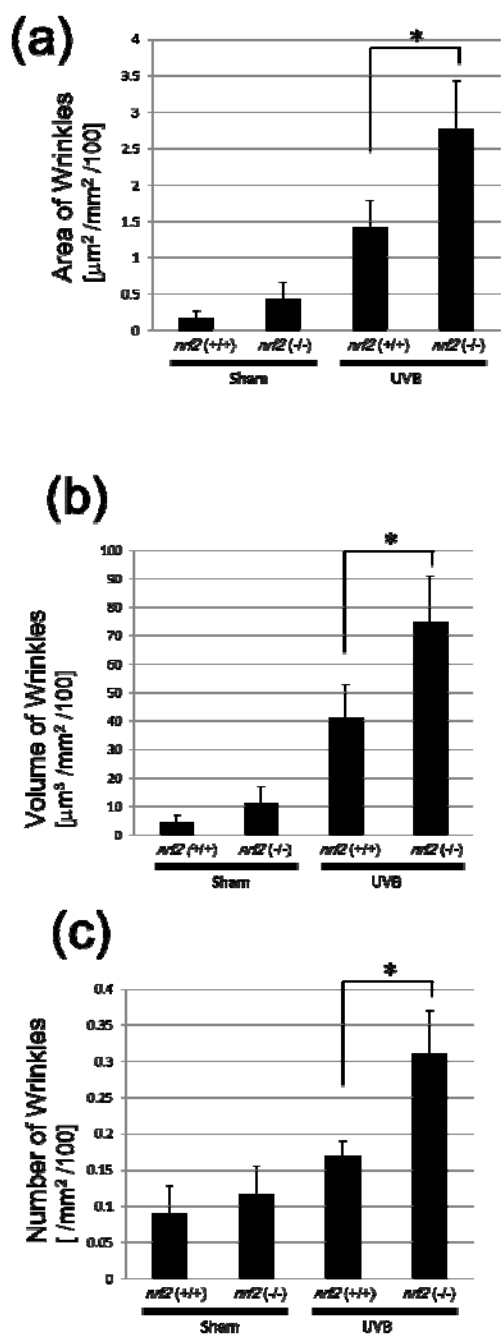
背部皮膚にキュートメーター (Cutometer SEM575) を当て、陰圧でサクシオンし、その戻り具合を数値化することにより、皮膚の粘弾性を定量化した。

4. 研究成果

(1) Nrf2 ノックアウトマウスは紫外線照射によるシワ形成が亢進する。

剃毛したマウスの背部皮膚に 80 mJ/cm² の UVB を週 3 回 36 週間照射した後に、形成されたシワの数・程度を定量的に解析した。その結果、単位面積あたりのシワ数、シワの深さ、シワの面積ともに、ノックアウトマウスで有意に増加していた (図 1 a, b, c)。

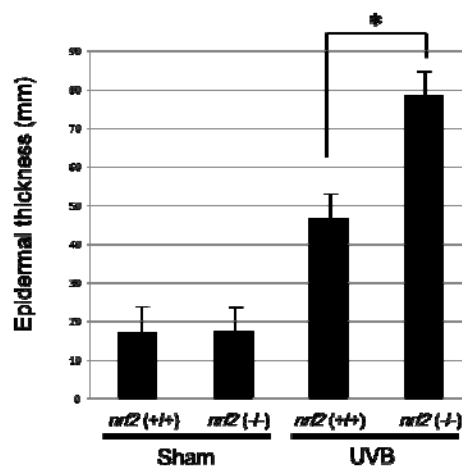
図 1



(2) *Nrf2* ノックアウトマウスは紫外線照射による表皮肥厚が亢進する。剃毛したマウスの背部皮膚に $80 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ の UVB を週 3 回 36 週間照射した後に、照射部位を皮膚生検し、表皮の厚さを顕微鏡下で測定し、比較検討した。その結果、図 2 に示すようにノックアウトマウスで有意に表皮肥厚が観

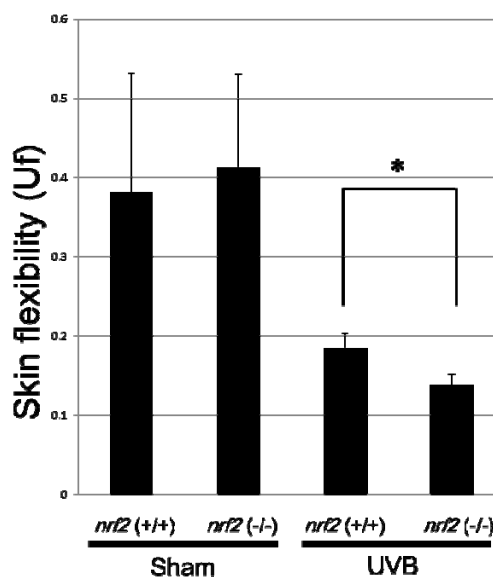
察された。(図 2)

図 2



(3) *Nrf2* ノックアウトマウスでは紫外線照射により、光老化の指標である皮膚弾性低下が顕著に観察される。剃毛したマウスの背部皮膚に $80 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ の UVB を週 3 回 36 週間照射した後に、キュートメーターにより照射皮膚の粘弾性を定量化し、比較検討した。その結果、ノックアウトマウスで有意に皮膚の弾性低下が観察された(図 3)。

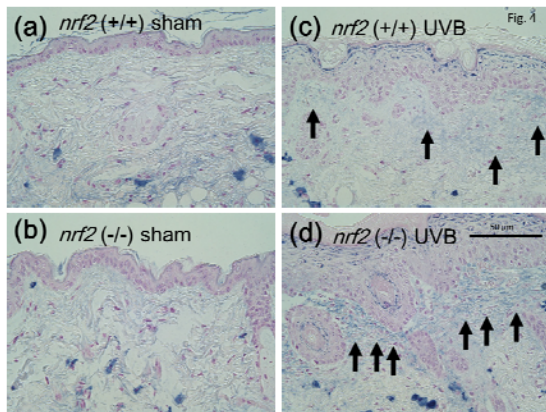
図 3



(4) *Nrf2* ノックアウトマウスは紫外線照射により、光老化の指標であるグリコサミノグリカンの真皮内沈着が亢進する。

剃毛したマウスの背部皮膚に 80 mJ/cm² の UVB を週 3 回 36 週間照射した後に、照射部位を皮膚生検し、コロイド鉄染色によりグリコサミノグリカンの真皮内沈着を顕微鏡下で観察し、比較検討した。その結果、図 4 に示すようにノックアウトマウスで有意にグリコサミノグリカンの沈着が増加していた。

図 4



(5) まとめ

Nrf2 ノックアウトマウスでは光老化が促進しており、*Nrf2* が長期 UVB 照射による酸化ストレスを消去して光老化を防いでいることを強く示唆すると考えられた。

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 12 件)

- 01) Kawachi Y, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Linear childhood discoid lupus erythematosus following the lines of Blaschko: successfully treated with topical tacrolimus. *Pediatr Dermatol.* 2011; 28(2): 205-7. (査読あり)
- 02) Kawachi Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Superficial epithelioma with sebaceous differentiation: immunohistochemical study of keratinocyte differentiation markers. *Eur J Dermatol.* in press (査読あり)
- 03) Fujisawa Y, Nabekura T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M. Enforced ROR(γ) expression in haematopoietic stem cells increases regulatory T cell number, which reduces immunoreactivity and attenuates hypersensitivity in vivo. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2011; 29(1): 86-93. (査読あり)
- 04) Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. A custom-made, low-cost intraoperative fluorescence navigation system with indocyanine green for sentinel lymph node biopsy in skin cancer. *Dermatology.* 2011; 222(3): 261-8. (査読あり)
- 05) Kawachi Y, Tanaka R, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Superficial malignant peripheral nerve sheath tumor arising from a solitary cutaneous neurofibroma in a non-NF1 patient. *Eur J Dermatol.* 2011; 21(1): 125-6. (査読あり)
- 06) Taguchi S, Kawachi Y (corresponding author), Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Xu X, Ikebe D, Kato M, Otsuka F. Overexpression of the transcription factor Yin-Yang-1 suppresses differentiation of HaCaT cells in three-dimensional cell culture. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(1): 37-45. (査読あり)
- 07) Kawachi Y, Ikegami M, Takase T, Otsuka F. Chronically Recurrent and Disseminated Tinea Faciei/Corporis-Autoinoculation from Asymptomatic Tinea Capitis Carriage. *Pediatr Dermatol.* 2010; 27(5): 527-8. (査読あり)
- 08) Nakamura Y, Nakamura Y, Hori E, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F. Complete long-term response of angiosarcoma of the scalp with cervical lymph node metastases treated with a combination of weekly and monthly docetaxel. *Br J Dermatol.* 2010; 163(6): 1357-8. (査読あり)
- 09) Fujisawa Y, Ito M, Nakamura Y, Furuta J, Ishii Y, Kawachi Y, Otsuka F. Perforated ischiogluteal bursitis mimicking a gluteal decubitus ulcer in patients with spinal cord injury: report of 2 cases. *Arch Dermatol.* 2010; 146(8): 932-4. (査読あり)

- 10) Kawachi Y, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Superimposed segmental dermatitis with chronic prurigo. Eur J Dermatol. 2009; 19(4): 337-340. (査読あり)
- 11) Fujisawa Y, Nabekura T, Nakao T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M. The induction of tumor-specific CD4+ T cells via major histocompatibility complex class II is required to gain optimal anti-tumor immunity against B16 melanoma cell line in tumor immunotherapy using dendritic cells. Exp Dermatol. 2009; 18(4): 396-403. (査読あり)
- 12) Kawachi Y, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Takahashi T, Otsuka F. Epidermal pseudocarcinomatous hyperplasia with underlying epidermal growth factor-producing cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorder. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009; 23(2): 181-3 (査読あり)

[学会発表] (計2件)

- 01) 川内康弘 : 酸化ストレス応答因子 Nrf2 が皮膚の紫外線反応に果たす役割、第21回太陽紫外線防御委員会シンポジウム、京都、3月11日、2011 (招待講演)
- 02) 川内康弘 : 転写因子による角化細胞の分化調節、第24回角化症研究会、基調講演、東京、8月6日、2009. (招待講演)

[図書] (計1件)

- 01) 川内康弘 : 「光と細胞 (角化細胞)」、からだと光の事典、朝倉書店、東京、140-143、2010 (著書)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川内 康弘 (KAWACHI YASUHIRO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号 : 00272196

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし