

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310036

研究課題名(和文)紫外線のゲノム毒性に対する皮膚組織レベルの防衛機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of tissue-specific protection of skin against the genotoxicity of ultraviolet radiation

研究代表者

池畑 広伸 (IKEHATA, Hironobu)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90250737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線ゲノム毒性に対する皮膚組織レベルの防衛応答である変異誘発抑制(MIS)応答の機構についてアポトーシスに基づく組織交代修復モデルを立て、組織学的解析により証明した。また紫外線特異的DNA損傷の生成作用スペクトルを解析し、MIS応答の作用スペクトルとの比較、およびMIS応答の波長間相互作用の解析により6-4光産物とDewar異性体がMIS誘発に寄与していることを示した。更にDNA修復欠損マウスを用いた解析で、転写共役修復系がMIS応答に関与することを示した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of mutation induction suppression (MIS), which is a skin tissue-specific protective response to the genotoxicity of ultraviolet radiation (UV), by histological analyses and demonstrated that a tissue repair mechanism based on the apoptotic turnover of an epidermal layer was relevant. We further found that pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and their Dewar valence isomers mainly contributed to the induction of MIS response among UV-specific DNA photolesions, based on the comparative analysis between action spectra of photolesion production and MIS response and on the analysis of the interaction of MIS responses among wavelengths. We also suggested that the transcription-coupled repair pathway of nucleotide-excision DNA repair would be involved in the MIS response through genetic studies using DNA repair-deficient mice.

研究分野：紫外線生物影響

キーワード：紫外線 皮膚 MIS応答 アポトーシス 突然変異 DNA損傷 遺伝子組換えマウス

### 1. 研究開始当初の背景

強い変異原性があり発癌能もある紫外線に対し、皮膚は DNA 損傷の修復・回避といった細胞レベルの反応だけでなく組織レベルでもアポトーシスなどの防衛応答を示すが、その統一的制御機構は解明されていない。我々は突然変異検出用トランスジェニックマウスを用いた研究で UVB、UVA、日光紫外線が皮膚に突然変異をよく誘発することを実際に示してきたが (Ikehata *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.* 41: 280-292, 2003; Ikehata *et al.*, *Mutagenesis* 18: 511-519, 2003; Ikehata *et al.*, *Mutat. Res.* 556: 11-24, 2004; Ikehata *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 128: 2289-2296, 2008)、この研究過程で「表皮では一定線量以上の紫外線照射では突然変異の誘発が抑えられ、それ以上変異頻度が上昇せず横ばいになる」という現象を発見し (Ikehata & Ono, *Mutat. Res.* 508: 41-47, 2002)、「変異誘発抑制 (mutation induction suppression, MIS)」と名付けた (図 1)。MIS は大量の DNA 損傷が生成した時に発動されるゲノム防衛反応と推定され、DNA 損傷量の多い細胞を選択的に排除するアポトーシス機構の関与が予想された。

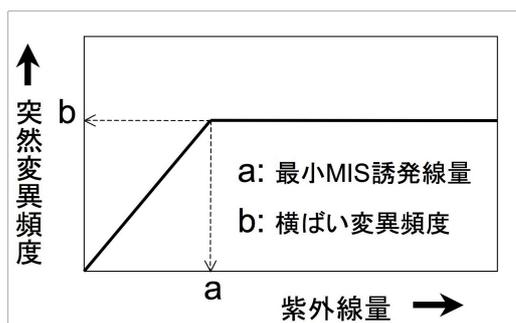


図 1：突然変異誘発の線量効果曲線に現れる MIS 応答。紫外線による皮膚表皮での突然変異誘発動態を模式的に示す。突然変異頻度は紫外線量 a までは線量に依存して直線的に増加するが、それを越えると一定値 b になり上昇しなくなる。この突然変異誘発の抑制が MIS 応答である。グラフに示された最小 MIS 誘発線量 (a) と横ばい変異頻度 (b) は MIS 応答を特徴付ける重要な指標になる。

### 2. 研究の目的

MIS 応答の機構として「損傷を受けた表層表皮層の集団アポトーシスと深層表皮の hyperplasia の同時誘導」というアポトーシスに基づく組織交代修復モデルを想定し、本研究ではその証明を目指した。同時に、応答を規定する原因 DNA 損傷及び応答発動に必要なその損傷量を明らかにして MIS 発動機構の解明にも取り組んだ。更に想定モデルに基づき、遺伝的に DNA 修復等を欠損する紫外線感受性疾患の皮膚病態が MIS 応答異常から説明できか検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 実験動物：本研究では皮膚でアポト

シス・細胞増殖・DNA 損傷・突然変異を検出する必要があるが、特に突然変異検出は通常のマウスでは困難なため、突然変異研究用に開発されたトランスジェニックマウスを利用して、これらの全ての指標を解析した。このマウスはトランスジーンとして再回収可能なベクターに組み込まれた大腸菌 *lacZ* 遺伝子を有し、これを突然変異検出用マーカー遺伝子として利用する。我々はこれまでの研究でこのマウスを用いて皮膚における紫外線誘発突然変異と DNA 損傷の解析技術を確立させ、既に多くの成果を上げている (上記引用文献に加え、Ikehata *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.* 48: 1-13, 2007; Ikehata *et al.*, *DNA Repair* 6: 82-93, 2007; Ikehata *et al.*, *Mutagenesis* 25: 397-405, 2010)。このトランスジェニックマウスと *Xpa*, *Xpc*, *Xpv*, *Csb* の各遺伝子欠損マウスを交配・繁殖して使用した。*Xpa*, *Xpc*, *Xpv* はヒト遺伝病の色素性乾皮症 xeroderma pigmentosum (XP) の、*Csb* はコケイン症候群 Cockayne syndrome (CS) の原因遺伝子のマウス相同遺伝子で、これらの遺伝子産物は紫外線誘発 DNA 損傷の修復や回避 DNA 合成に関わっている。

(2) 紫外線照射：UVB 照射には研究室で所有する広帯域 UVB ランプ (FL20S.E、東芝) を使用した。作用スペクトル解析に必要な単波長紫外線の照射は、大型で動物照射も可能な、愛知県岡崎市の自然科学研究機構・基礎生物学研究所に設置されている全国共同利用施設・大型スペクトログラフ装置を利用した。年 1~2 回の出張で予定の照射実験を行った。

(3) DNA 損傷量・突然変異パターン解析：DNA 損傷の検出・定量は、紫外線照射した皮膚の表皮・真皮各々から抽出したゲノム DNA について、シクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD)、6-4 型光産物 (64PP)、Dewar 異性体 (Dewar) 各々に対するモノクローナル抗体を用いた免疫化学的方法 (ELISA 法) で行う。CPD と 64PP の抗体は研究分担者の森らが既に開発済みの高感度のものを利用する。Dewar 抗体も以前に作成されているが感度に問題があったので、森が新たに改良した方法を用いた。突然変異パターン解析は、皮膚ゲノム DNA から回収・検出した変異 *lacZ* 遺伝子の塩基配列変化を DNA シークエンサ (ABI Prism3100) で解読して行った。

(4) 免疫組織学的解析：皮膚組織切片を作成し、アポトーシスは抗活性化カスパーゼ 3 抗体を、細胞増殖は抗 Ki67 抗体を利用して免疫組織学的に染色し、各々の紫外線照射後の出現動態を顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

(1) MIS 応答機構を説明する組織修復モデルの証明：マウス皮膚に MIS 誘発線量である

UVBを照射し、照射後のアポトーシスと細胞増殖の誘発動態を、経時的に皮膚組織切片を作成して免疫組織学的に画像解析した。その結果、集団的アポトーシスと細胞増殖(hyperplasia)が照射後36時間前後で短時間のうちにいっせいに起こることを認め、モデルの証明に成功した。

(2) MIS 応答を規定する原因 DNA 損傷の同定と最少 MIS 発動損傷量の推定: 基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを用い、260, 280, 290, 295, 300, 307, 313, 319, 325, 330, 334, 364 nm の各波長の紫外線をマウス皮膚に照射し、生成する CPD や 64PP について DNA 損傷量の線量効果関係を解析した。CPD は解析した全波長域で検出できたが、64PP は 319 nm を越える長波長側では検出できなかった。Dewar はこれら単波長紫外線で調べた範囲の線量では十分な生成を検出できなかった。得られた結果に基づき、CPD と 64PP のマウス皮膚表皮・真皮それぞれにおける生成作用スペクトルを明らかにした(図2)。

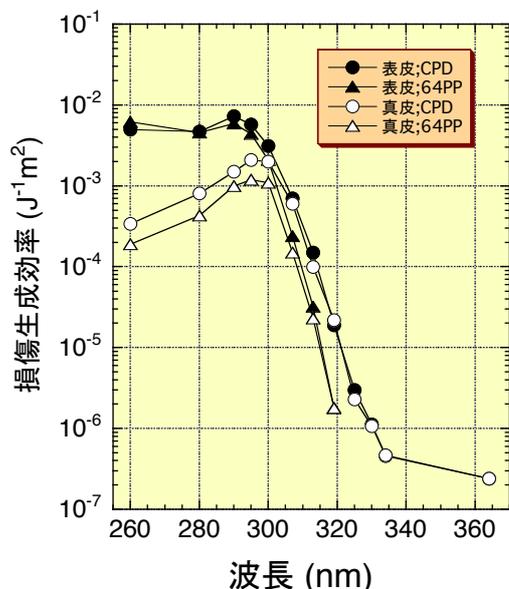


図2: 紫外線特異的 DNA 損傷の生成作用スペクトル。CPD (丸) と 64PP (三角) のマウス皮膚表皮(黒)と真皮(白)における生成作用スペクトルを示す。

得られた損傷生成作用スペクトルを我々の以前の研究で明らかにしている突然変異関連の作用スペクトル(Ikehata *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 133: 1850-1856, 2013)と比較したところ、変異原性作用スペクトルは CPD 生成作用スペクトルとよく一致し、MIS 作用スペクトルは 64PP 生成作用スペクトル(表皮)と比較的よく一致した。これらの結果から MIS 応答を誘発する原因損傷として、少なくとも短波長側では、64PP の寄与が大きいと推測した。

更に 64PP が UVB により Dewar に異性体変化することを利用し、64PP の MIS 誘発損傷

としての特異性を検討した。マウス皮膚に 295 nm の短波長紫外線を照射し 64PP を誘発したのち、313 nm 以上の長波長紫外線により Dewar 変換し、その効果を解析したが、MIS 応答に変化は認められなかった。この結果は 64PP だけでなく Dewar も同程度に MIS 応答誘発に寄与する DNA 損傷であることを示唆している。

最少 MIS 誘発線量より、各波長での MIS 誘発に必要な最少 64PP 量を推定したところ、300 nm 付近まではほぼ一定の値を示した。300 nm を越えると減少したが、この付近から Dewar 化に有効な波長域に入ることと前記の結果を考え合わせると、300 nm 以上では 64PP と Dewar の両損傷が MIS 応答に寄与している可能性が高い。

(3) DNA 修復欠損による皮膚病態と MIS 応答異常との関連性の遺伝学的解析: *Xpa*, *Xpc*, *Xpv*, *Csb* の各遺伝子欠損マウスに UVB を照射し、MIS 応答を解析した。*Xpc* と *Xpv* の欠損マウスでは横ばい変異頻度の上昇は認められたものの、MIS 応答に野生型マウスと大きな差は認められなかった。一方、*Xpa* と *Csb* 欠損マウスでは最少 MIS 線量と横ばい変異頻度の著しい低下が認められ、強い MIS 応答が起こることが明らかとなった。これらの結果は XP-A 群や CS 患者で、XP-C 群やバリエーション患者に比べ著しく高い日光感受性が認められる結果とよく一致し、これらの日光感受性が MIS 応答の昂進によることを示している。また XPA と CSB に共通する機構である転写共役型ヌクレオチド除去修復系が MIS 応答と密接に関係していることを示唆するものである。

また一部の遺伝子欠損マウスで MIS 誘導時のアポトーシス誘発を免疫組織学的に解析し、アポトーシス感受性の増大が MIS 応答の昂進につながっていることが示唆された。

更に各欠損マウスの皮膚表皮に MIS 誘発紫外線量で誘発される突然変異のスペクトルを解析したが、MIS 応答の昂進による変動は特に認められなかった。

#### 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9件)

1. H. Ikehata, Y. Chang, M. Yokoi, M. Yamamoto & F. Hanaoka (2014) Remarkable induction of UV-signature mutations at the 3'-cytosine of dipyrimidine sites except at 5'-TCG-3' in the UVB-induced skin epidermis of xeroderma pigmentosum variant model mice. *DNA Repair* 22:112-122. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.07.012. 査読あり
2. T. Iwamoto, P. J. Brooks, T. Nishiwaki, K. Nishimura, N. Kobayashi, S. Sugiura & T. Mori (2014) Quantitative and in situ detection

- of oxidatively generated DNA damage 8,50-cyclo-20-deoxyadenosine using an immunoassay with a novel monoclonal antibody. *Photochem. Photobiol.* 90: 829–836. DOI: 10.1111/php.12239. 査読あり
3. 池畑広伸 (2014) マウス皮膚における紫外線突然変異作用スペクトルの解析. *放射線生物研究* 49: 1-13. <http://rbrc.kenkyuukai.jp>. 査読あり
  4. H. Ikehata, N. Munakata & T. Ono (2013) Skin can control solar UVR-induced mutations through the epidermis-specific response of mutation induction suppression. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12:2008–2015. DOI: 10.1039/c3pp50158b. 査読あり
  5. H. Ikehata, J. Kumagai, T. Ono & A. Morita (2013) Solar-UV-signature mutation prefers TCG to CCG: extrapolative consideration from UVA1-induced mutation spectra in mouse skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12:1319–1327. DOI: 10.1039/c3pp25444e. 査読あり
  6. H. Ikehata, S. Higashi, S. Nakamura, Y. Daigaku, Y. Furusawa, Y. Kamei, M. Watanabe, K. Yamamoto, K. Hieda, N. Munakata & T. Ono (2013) Action spectrum analysis of UVR genotoxicity for skin: the border wavelengths between UVA and UVB can bring serious mutation loads to skin. *J. Invest. Dermatol.* 133:1850–1856. DOI: 10.1038/jid.2012.504. 査読あり
  7. H. Ikehata (2013) Comparison of the solar-UV-signature mutations detected in the *p53* gene between mouse and human skin cancers. *Photomed. Photobiol.* 35:23–24. <http://square.umin.ac.jp/jspp>. 査読なし
  8. H. Ikehata, S. Higashi & Y. Kamei (2012) Significance of Erythema for the Response of Mutation Induction Suppression in UV-exposed Skin. *Photomed. Photobiol.* 34:39–40. <http://square.umin.ac.jp/jspp>. 査読なし
- [学会発表] (計 13 件)
1. 池畑広伸、色素性乾皮症バリエーション群モデルマウス皮膚における UVB 誘発突然変異スペクトルの解析、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1 日、かごしま県民交流センター (鹿児島市)
  2. H. Ikehata, Wavelength-dependent antigenotoxic response to UVR in skin epidermis. 第 16 回国際光生物学学会議、2014 年 9 月 11 日、コルドバ (アルゼンチン)
  3. H. Ikehata, Why do solar-UV signature mutations occur preferentially at TCG context? アメリカ光生物学学会第 37 回大会、2014 年 6 月 19 日、サンディエゴ (米国)
  4. H. Ikehata, M. Yokoi, M. Yamamoto, F. Hanaoka, In vivo UVB-induced mutation spectrum in the skin epidermis of XP variant model mice. 色素性乾皮症と関連疾患に関する国際シンポジウム: DNA 損傷応答障害-基礎から臨床まで、2014 年 3 月 6 日、神戸国際会議場 (神戸市)
  5. 池畑広伸、紫外線の皮膚ゲノム毒性-マウスを用いた解析、日本環境変異原学会第 42 回大会、2013 年 11 月 30 日、岡山コンベンションセンター (岡山市)
  6. H. Ikehata, Action spectrum analysis of UVR-induced mutation in mouse skin. アジア・オセアニア光生物学学会議、2013 年 11 月 13 日、シドニー (オーストラリア)
  7. 池畑広伸、森俊雄、東正一、亀井保博、山本雅之、マウス皮膚における紫外線特異的 DNA 損傷誘発の作用スペクトル解析、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月 19 日、ホテルクラウンパレス青森 (青森市)
  8. 池畑広伸、皮膚がん p53 遺伝子変異に見られる日光紫外線特異的突然変異の特徴、第 35 回日本光医学・光生物学学会、2013 年 7 月 12 日、アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県浜松市)
  9. 池畑広伸、MIS 応答波長依存性に基づく紫外線治療法デザインの提案、第 2 回光皮膚科学研究会、2013 年 2 月 17 日、ホテルサンルートプラザ名古屋 (名古屋)
  10. H. Ikehata, Identification and characterization of the response of mutation induction suppression (MIS) in mouse epidermis. 第 8 回 3R シンポジウム、2012 年 11 月 25–28 日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)
  11. 池畑広伸、生体皮膚における紫外線ゲノム毒性に対する応答、日本放射線影響学会第 55 回大会、2012 年 9 月 6 日、東北大学川内キャンパス (仙台市)
  12. 小村潤一郎、池畑広伸、小野哲也、M 期の凝縮した染色体における DNA 二本鎖切断の修復とその影響、日本放射線影響学会第 55 回大会、2012 年 9 月 8 日、東北大学川内キャンパス (仙台市)
  13. 池畑広伸、東正一、亀井保博、皮膚における紫外線に対する変異誘発抑制応答と紅斑反応の関連、第 34 回日本光医学・光生物学学会、2012 年 7 月 27 日、神戸商工会議所会館 (神戸市)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
池畑 広伸 (IKEHATA, Hironobu)  
東北大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 9 0 2 5 0 7 3 7
  - (2) 研究分担者  
小村 潤一郎 (KOMURA, Junichiro)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 1 0 2 1 5 4 1 0

森 俊雄 (MORI, Toshio)  
奈良県立医科大学・医学部・研究教授  
研究者番号：10115280

(4) 研究協力者

相場 節也 (AIBA, Setsuya)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授

亀井 保博 (KAMEI, Yasuhiro)  
基礎生物学研究所・光学解析室・特任准教授

東 正一 (HIGASHI, Shoichi)  
基礎生物学研究所・光学解析室・技術職員