

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591642

研究課題名(和文)酸化ストレス応答因子Nrf2が光老化および表皮角化に果たす役割の解明

研究課題名(英文)Role of Nrf2 in photoaging and epidermal keratinization

## 研究代表者

川内 康弘(Kawachi, Yasuhiro)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00272196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線は、皮膚に対して慢性期反応として老化、発癌を促進するが、その機序として酸化ストレス惹起が近年注目されている。一方、酸化ストレス応答系Nrf2-Keap1は、酸化ストレスに対する細胞の防衛システムとして最近同定された細胞内シグナル伝達系である。本研究では、このNrf2-Keap1システムが機能しないNrf2ノックアウトマウスにおけるUVB長期反復照射による光老化を野生型マウスと比較検討することにより、Nrf2-Keap1システムが、皮膚のUVBに対する慢性反応である光老化においてどのような役割を果たしているかを検討した。その結果、Nrf2は光老化を緩和することが明らかとなった。

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. Nrf2 and 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<sup>-/-</sup>) mice. Our results indicated that UVB-irradiated nrf2<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> mice also showed a significant decrease in cutaneous glutathione level. These findings indicate that Nrf2 plays the important role in the protection against UVB-induced photoaging.

研究分野：皮膚科学

キーワード：光老化 酸化ストレス Nrf2 紫外線

### 1. 研究開始当初の背景

活性酸素等の酸化ストレスは、多くは細胞障害性に作用し、細胞死や癌化、老化の原因になると考えられている。これに対し、生体は酸化ストレスを中和し、生体を酸化ストレスから保護するしくみも用意している。酸化ストレス応答系 Nrf2-Keap1 は、細胞が酸化ストレスに暴露されると活性化し、抗酸化・生体防御蛋白であるグルクロン酸転移酵素やグルタチオン S 転移酵素遺伝子等の発現を活性化する主要な経路として同定された。Nrf2 は、酸化ストレス応答遺伝子の転写調節領域 (抗酸化ストレス応答配列: ARE) に結合する転写因子であり、細胞がストレスにさらされていない平時には細胞質内で抑制蛋白である Keap1 と結合して分解・不活性化されているが、異物、毒物や酸化ストレスに暴露されると Keap1 との結合が解除されて活性化し、細胞質から核内移行し、上記の酸化ストレス応答遺伝子の転写を活性化させて酸化ストレスから細胞を防御する。

一方、紫外線 (以下 UV) は、細胞の DNA を直接傷害することにより、発癌や老化を引き起こすものと従来から考えられてきた。しかし、近年、UV 照射は、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、UV の 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注目されてきている。

### 2. 研究の目的

光老化は、UV によって生じる活性酸素種により促進される。本研究では、Nrf2 ノックアウトマウス背部皮膚に 36 週にわたり反復長期 UV 照射を行ない、光老化モデルマウスを作成する。Nrf2 ノックアウトマウスの照射野に形成される光老化皮膚を、野生型と比較解析することにより、Nrf2 による誘導的酸化ストレス消去機構が、光老化の抑制にどのような役割を果たしているかを *in vivo* で明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

背部皮膚を剃毛した Nrf2 ノックアウトマウスおよび野生型マウスに、 $200\text{mJ}/\text{cm}^2$  の UVB を週 3 回 X 3 6 週間照射し、光老化モデルマウスを作成した。照射が完了した各マウス群の背部皮膚に生じた「彫りの深いシワ形成」を、画像解析ソフトを用いて定量的に評価する。シリコンラバーを鋳型とした照射野皮膚のレプリカを作成し、その shade image を画像解析ソフト ASA-03 (アサヒ・バイオメッド) を用いて、単位面積あたりのシワ数、シワ深度、シワ面積、シワ体積を算出し、Nrf2 ノッ

クアウトマウスと野生型マウスと比較した。粘弾性と柔軟性を、Cutometer を用いて定量化し、Nrf2 ノックアウトマウスと野生型マウスと比較した。

### 4. 研究成果

(1) 図 1 に示すように、繰り返し UVB 照射を Nrf2 ノックアウトマウスおよび野生型マウスの背部皮膚に対して 36 週間行ない、光老化の程度を比較検討したところ、Nrf2 ノックアウトマウスにおいて、有意に多く光老化に特徴的な彫りの深いシワの形成がみられた。

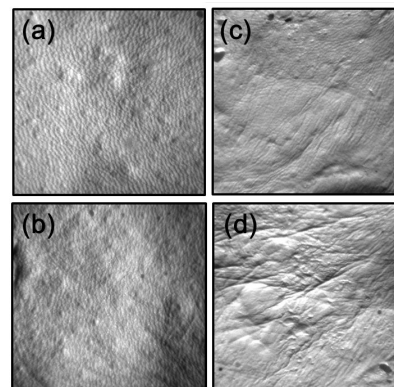


図 1 : (a) : 非照射野生型マウス、(b) : 非照射ノックアウトマウス、(c) : 照射野生型マウス、(d)照射ノックアウトマウス。

(2) 図 2 に示すように、画像解析ソフトを用いて各のシワの総面積、総体積、総数を定量的に比較したところ、UVB 照射 Nrf2 ノックアウトマウスにおいて有意に照射部位におけるシワの総面積、総体積、総数が増加していた。

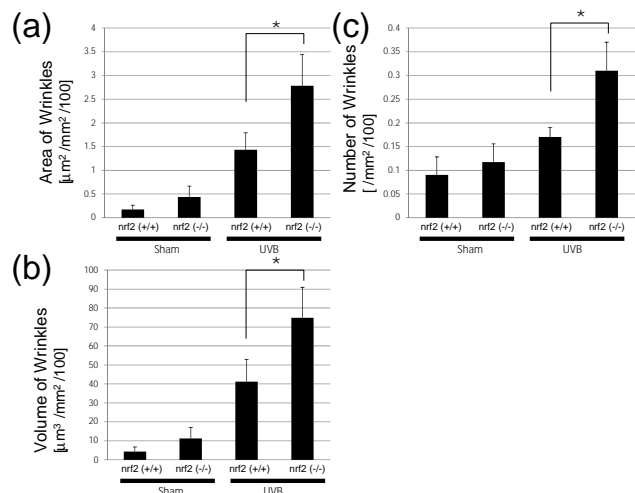
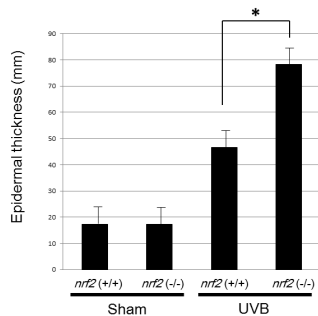


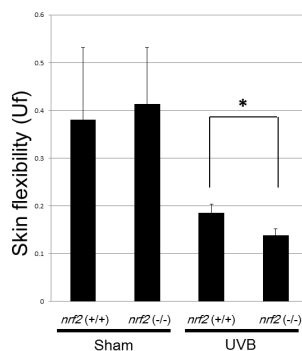
図 2 : (a) : シワの総面積比較、(b) : シワの総体積比較、(c) : シワの総数比較

(3) 図 3 に示すように、繰り返し UVB 照射による表皮肥厚を比較したところ、UVB 照射 Nrf2 ノックアウトマウスにおいて有意に照射部位における表皮肥厚が生じていた。



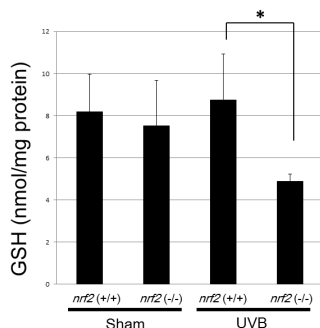
**図3 : 繰り返し UVB 照射による表皮肥厚を比較**

(4) 図4に示すように、キュートメーターによる機器計測により、Nrf2 ノックアウトマウスにおいて、有意にUVB照射部皮膚の柔軟性が失われていた。



**図4 : 繰り返し UVB 照射による皮膚柔軟性の変化比較**

(5) UVB 照射皮膚における抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) 濃度を測定したところ、図5に示すように、Nrf2 ノックアウトマウスにおいて、有意にUVB照射部皮膚のGSH濃度が減少していた。



**図5 : 繰り返し UVB 照射による GSH の濃度変化比較**

これらの結果により、Nrf2 ノックアウトマウスでは光老化が亢進し、Nrf2 は光老化を緩和

する働きをしていることが明らかとなった。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計20件)

1: Kubota N, Fujisawa Y, Nakamura Y, Tanaka R, Saito A, Maruyama H, Ishii Y, Furuta J, Kawachi Y, Fujimoto M. Angiosarcoma of the scalp in a patient with systemic sclerosis. *J Dermatol.* 2015 42(1):102-4. doi: 10.1111/1346-8138.12705. (査読有)

2: Fujisawa Y, Maruyama H, Furuta J, Ishii Y, Kawachi Y, Fujimoto M. Case of pigmented epithelioid melanocytoma with lymph node metastases. *J Dermatol.* 2014; 41(5):452-3. doi: 10.1111/1346-8138.12482. (査読有)

3: Fujisawa Y, Furuta J, Kawachi Y. Dermatofibrosarcoma protuberans mimicking cutaneous sarcoidosis in a patient with lung sarcoidosis. *Eur J Dermatol.* 2014; 24(2):276-7. doi: 10.1684/ejd.2014.2310. (査読有)

4: Maruyama H, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Sekido M, Kawachi Y. B-Myb enhances proliferation and suppresses differentiation of keratinocytes in three-dimensional cell culture. *Arch Dermatol Res.* 2014; 306(4): 375-84. doi: 10.1007/s00403-014-1450-1. (査読有)

5: Ito T, Kimura S, Seto K, Warabi E, Kawachi Y, Shoda J, Tabuchi K, Yamagata K, Hasegawa S, Bukawa H, Ishii T, Yanagawa T. Peroxiredoxin I plays a protective role against UVA irradiation through reduction of oxidative stress. *J Dermatol Sci.* 2014; 74(1):9-17. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.12.002. (査読有)

6: Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Docetaxel was effective in the management of metastatic angiosarcoma associated with disseminated intravascular coagulation syndrome. *Int J Dermatol.* 2014; 53(2):e138-40. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05671.x. (査読有)

7: Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Comparison between taxane-based chemotherapy with conventional surgery-based therapy for cutaneous angiosarcoma: a single-center experience. *J Dermatolog Treat.* 2014; 25(5): 419-23. doi:10.3109/09546634.2012.754839. (査読有)

8: Maruyama H, Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Penile preservation surgery in a case of erythroplasia of Queyrat involving the glans penis and distal urethra. *Int J Dermatol.* 2014; 53(3):e177-80. doi: 10.1111/ijd.

12103. ( 査読有 )

9: Taguchi S, Kawachi Y, Fujisawa Y, Nakamura Y, Furuta J, Otsuka F. Psoriasisiform eruption associated with graft-versus-host disease. *Cutis*. 2013; 92(3):151-3. ( 査読有 )

10: Nakamura Y, Nakamura Y, Saito A, Fujisawa Y, Kawachi Y, Otsuka F. High-grade mucoepidermoid carcinoma of the columella successfully reconstructed using bilateral nasolabial flaps set up in a sandwich shape and an auricular cartilage graft after surgical resection. *J Dermatol*. 2013; 40(11):911-4. doi: 10.1111/1346-8138.12274. ( 査読有 )

11: Nakamura Y, Kawachi Y, Nakamura Y, Ino Y, Fujisawa Y, Otsuka F. Linear lupus erythematosus profundus involving the muscle with an intractable deep ulcer, successfully treated with surgical excision. *Eur J Dermatol*. 2013; 23(4):535-6. doi: 10.1684/ejd.2013.2068. ( 査読有 )

12: Kawachi Y, Obara S, Nakamura Y, Fujisawa Y, Nakamura Y, Ishii Y, Ichikawa E, Otsuka F. Ischemic leg ulcer due to vasculopathy associated with neurofibromatosis type 1. *Eur J Dermatol*. 2013; 23(4):522-3. doi: 10.1684/ejd.2013.2064. ( 査読有 )

13: Ishitsuka Y, Kawachi Y, Maruyama H, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Pituitary tumor transforming gene 1 induces tumor necrosis factor- $\alpha$  production from keratinocytes: implication for involvement in the pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2013; 133(11): 2566-75. doi: 10.1038/jid.2013.189. ( 査読有 )

14: Nakamura Y, Fujisawa Y, Nakamura Y, Maruyama H, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F. Improvement of the sentinel lymph node detection rate of cervical sentinel lymph node biopsy using real-time fluorescence navigation with indocyanine green in head and neck skin cancer. *J Dermatol*. 2013; 40(6): 453-7. doi:10.1111/1346-8138.12158. ( 査読有 )

15: Kawachi Y, Maruyama H, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ichikawa E, Furumura M, Otsuka F. NF1 gene silencing induces upregulation of vascular endothelial growth factor expression in both Schwann and non-Schwann cells. *Exp Dermatol*. 2013; 22(4):262-5. doi: 10.1111/exd.12115. ( 査読有 )

16: Kawashima H, Kawachi Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Ichikawa E, Otsuka F. Circumscribed palmar hypokeratosis:

implication of suppression of early epidermal differentiation. *Eur J Dermatol*. 2013; 23(2): 261-2. doi: 10.1684/ejd.2013.1963. ( 査読有 )

17: Ishitsuka Y, Kawachi Y, Taguchi S, Maruyama H, Nakamura Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Pituitary tumor-transforming gene 1 as a proliferation marker lacking prognostic value in cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp Dermatol*. 2013; 22(5):318-22. doi: 10.1111/exd.12118. ( 査読有 )

18: Kawachi Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Ichikawa E, Otsuka F. The POU domain transcription factors Oct-6 and Oct-11 negatively regulate loricrin gene expression in keratinocytes: association with AP-1 and Sp1/Sp3. *Arch Dermatol Res*. 2013; 305(5):371-8. doi:10.1007/s00403-013-1317-x. ( 査読有 )

19: Fujisawa Y, Miyazono Y, Kawachi Y, Otsuka F. A case of sterile transient neonatal pustulosis presenting with large flaccid pustules. *Pediatr Dermatol*. 2013; 30(6):e238-9. doi: 10.1111/pde.12063. ( 査読有 )

20: Kawachi Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Otsuka F. GATA-3 regulates differentiation-specific loricrin gene expression in keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2012; 21(11):859-64. doi: 10.1111/exd.12023. ( 査読有 )

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

川内 康弘 (KAWACHI YASUHIRO)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00272196