

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461668

研究課題名(和文) 紫外線 活性酸素由来のDNA損傷における皮膚発癌メカニズム；炎症はどう関与する？

研究課題名(英文) Mechanism of photo-skin-carcinogenesis induced by ultraviolet/reactive oxygen species/DNA damage; how associated with inflammatory response?

研究代表者

国定 充 (Kunisada, Makoto)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80566969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線によって生じる活性酸素によるDNA損傷における修復機構が破綻すると皮膚発癌を生じやすくなり炎症関連遺伝子が上昇することが知られている。その仕組みについてOgg1ノックアウトマウス胎児から樹立した線維芽細胞を用いて検討し炎症関連の遺伝子の中でもパーシカンおよびケモカインであるCxcl1が著しく上昇しお互いの上昇を調節していることが確認できた。また珪藻類であるスピルリナが如何に紫外線発癌抑制効果を来すかについて紫外線照射後の炎症反応の抑制作用が強く関連することがOgg1マウスを用いて示され、紫外線により上昇する細胞内シグナル蛋白のリン酸化の抑制もスピルリナ添加により抑制されることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that Ogg1 enzyme, repair DNA damage caused by reactive oxygen species by UVB has an important role for developing UV-induced skin cancers. Among up-regulated genes in Ogg1 knock-out mice by UVB, inflammatory response pathway genes are key gene group in highly susceptible to skin tumors. We this time studied precise mechanism using isolated fibroblasts from Ogg1 mice and found that Cxcl1, chemokine gene and Versican, proteoglycan sulfate coding gene dramatically up-regulated in Ogg1 knock-out mice derived fibroblasts after UVB exposure. Furthermore, those two genes were regulating each other with validation using siRNA system. Another study was about the anti-photo-carcinogenesis effects on mice by algae Spirulina administration. Spirulina showed anti-inflammatory response after UVB exposure and inhibit of phosphorylation of signal protein regarding UVB irradiation-associated protein of Ogg1 mice as well as wild type counterpart mice.

研究分野：皮膚科学

キーワード：紫外線発がん DNA損傷 活性酸素 Ogg1マウス スピルリナ 炎症反応

1. 研究開始当初の背景

(a) 本研究前に明らかにしていた紫外線による活性酸素から生じる DNA 損傷を修復できない系において動物実験では有意に発癌が生じること<sup>1)</sup>、およびそれら関わる重要な遺伝子として炎症関連遺伝子が上昇していること<sup>2)</sup>などが基となりそれらの具体的なメカニズム解明が次の重要なテーマとなっていた。

(b) スピルリナという珪藻類が抗酸化作用を有し、その紫外線皮膚癌抑制作用をも有していることを予備実験にて確認していたのでそれらについても具体的な抗発癌の仕組みの解明を目指していた。

2. 研究の目的

(a) 紫外線/活性酸素/DNA 損傷を修復できない *Ogg1* ノックアウトマウス、またそれらから単離した線維芽細胞を用いて紫外線 UVB 照射後の反応における遺伝子での調節機構を明らかにする。

(b) スピルリナを *Ogg1* ノックアウトマウスおよび野生型に投与し、UVB の単回照射にての遺伝子発現の変化、および(a)の実験結果で関連があると思われる遺伝子および蛋白の発現などを検討する。

3. 研究の方法

(a-1) まず *Ogg1*-線維芽細胞(MEFs)にて野生型と比較して動物実験で認められたと同じ遺伝子の強発現が認められるかと確認する。

(a-2) 強発現が認められた遺伝子についてリアルタイム PCR 法にて確認する。

(a-3) 確認できた遺伝子についての相互関係を siRNA 系の系にて検証する。

(b-1) 実際マウスでの結果を基に特に発癌に寄与しているかもしれない炎症反応に着目し紫外線照射後の反応をスピルリナ投与群と通常飼料投与群とでマウスの耳介の腫脹などで評価する。

(b-2) 炎症関連遺伝子あるいは紫外線で重要とされる細胞内シグナル蛋白に着目し、それぞれリアルタイム RT-PCR 法、ウエスタンブロット法にて検証する。

(b-3) 実際マウスに対してスピルリナを投与して紫外線発がんが抑制されるかを野生型マウスと *Ogg1* マウスにて検討した。

4. 研究成果

(a-1) 野生型 MEFs(WT-MEFs)と *Ogg1*KO-MEFs とで発現比較するとマウスで得られたような炎症関連遺伝子が *Ogg1*KO-MEF で発現上昇が認められた。個々の遺伝子に着目するとサイトカインの遺伝子が軒並み上昇し特に *Cxcl1* というケモカインが上昇していた。

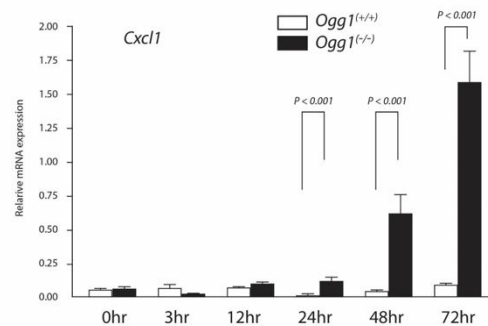
Supplemental Table 2. Up-regulated inflammatory associated genes in *Ogg1*<sup>+/+</sup> MEFs 48hr after UVB exposure

Inflammatory associated gene name	Symbol	Refseq ID	Fold change ( <i>Ogg1</i> <sup>+/+</sup> / <i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup> )
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	NM_008176	6.5
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Cxcl10	NM_021274	3.0
chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12	NM_001012477	2.0
chemokine (C-X-C motif) ligand 15	Cxcl15	NM_011339	2.5

Up-regulated inflammatory response-associated genes in *Ogg1*<sup>+/+</sup> 48hr after UVB exposure. Extracted RNA for each *Ogg1* genotype MEFs was performed with 35K CodeLink Mouse Whole Genome Bioarray. Data were analyzed using the Microarray Data Analysis Tool software (version 3.2; Filgen). After screening out weakly labeled genes (i.e., those with a weak signal), we analyzed only strongly labeled genes. Genes with a fold difference (DO/WI) of >1.5 were considered significant. The following link has been created to allow review of record GSE80362 while it remains in private status: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=gnussccsctchlofacc=GSE80362>

(表)

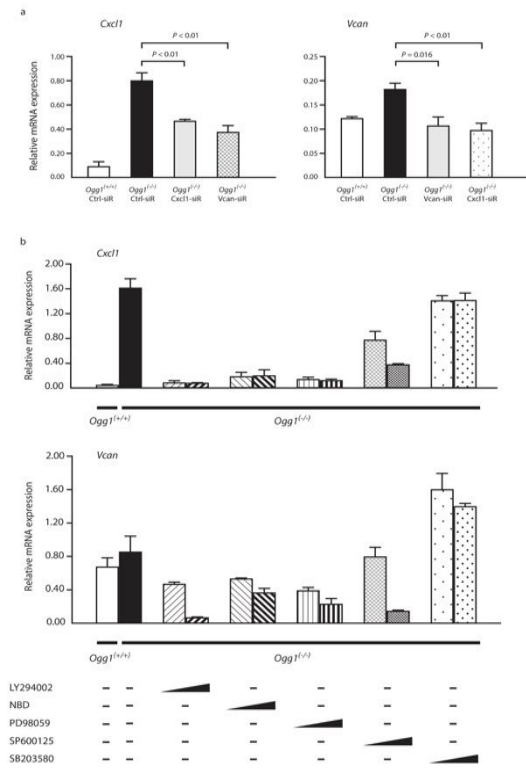
(a-2) それらをリアルタイム RT-PCR 法で検討すると UVB 照射後時間を追うごとに強発現



が見られた。さらに前回の検証にてパーシカンという遺伝子が動物実験にて *Ogg1* マウスにて上昇できていることが確認できていたが、この遺伝子についても UVB 照射後において同様の強発現が認められた(図)

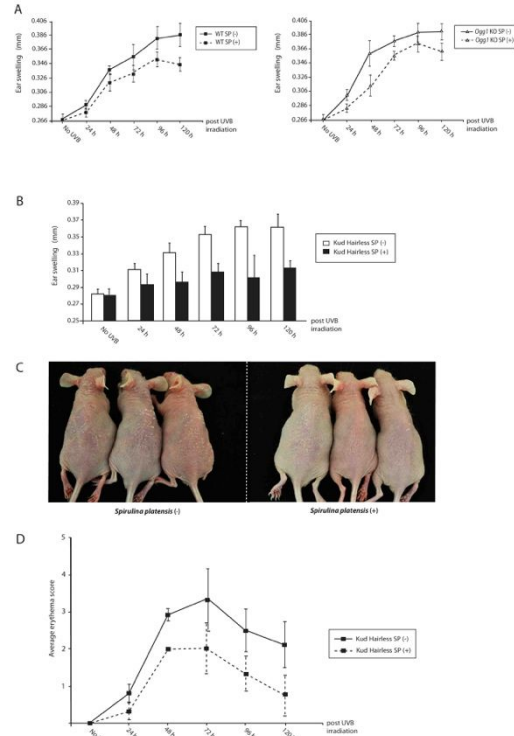
(a-3) パーシカンは紫外線により皮膚において発現が上昇することが確認できていたので次にパーシカンとケモカインであり強発現が見られた *Cxcl1* が如何に関与し合っているかを検討した。さらに *Cxcl1* はシグナルとして NF-kappa B の系で動いているとさえあるが、それらの各種シグナル抑制因子を加えてパーシカンや *Cxcl1* の発現上昇が抑えられるかを検討した。結果パーシカンと *Cxcl1* は互いに発現が関連し合っていることが確認され、抑制因子での NF-kappa B のシグナルだけでなく他の経路にて制御されていることが分かった(図)。

Figure 2



(b-1) UVB による皮膚発癌が *Ogg1* マウスにてスピルリナ投与により抑えられるが、その抑制作用が抗炎症反応によるのかもを検討した。その結果スピルリナ+*Ogg1* マウスにて UVB 照射後の紅斑反応や耳介腫脹反応が有意に抑制されることが分かった (図)。

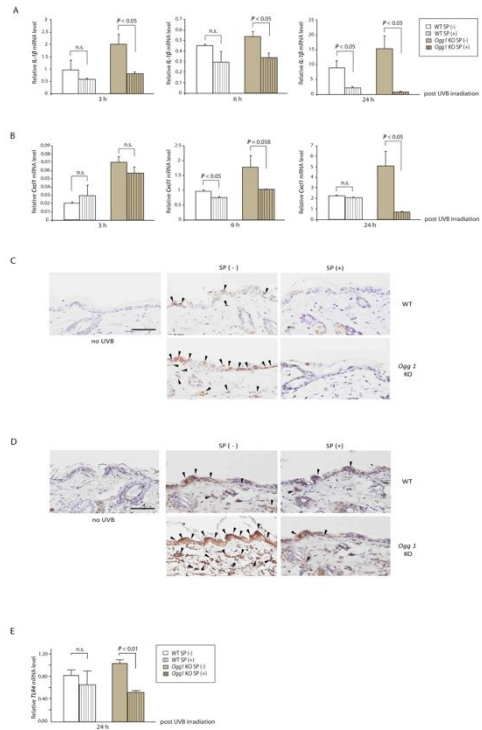
Figure 2



(b-2)

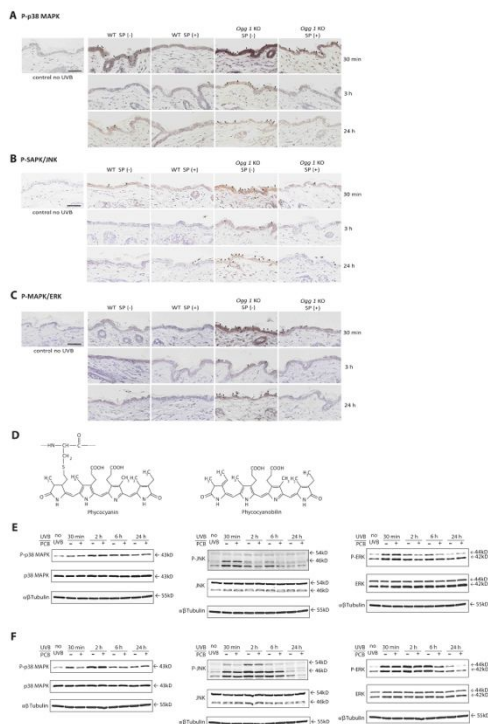
炎症反応関連遺伝子については *IL1-* や *Cxcl1*, *TLR4* などがリアルタイム RT-PCR 法や免疫染色法で主に UVB 照射 24 時間以降の反応で野生型および *Ogg1* マウスいずれにおいてもスピルリナ投与群にて有意な発現抑制が認められた。さらにマウス胎児より単離した線維芽細胞を用いて細胞の系にてウエスタンブロット法にて紫外線照射に関連するといわれるシグナル蛋白のリン酸化について以下に変化するかを検討し、結果 p38, JNK, ERK などすべての検討した蛋白のリン酸化がスピルリナ投与において抑制されることが確認できた (図)。

Figure 3



特にシグナル蛋白において p38 においてはスピルリナ添加に於いて強い抑制効果が認められた。これは紫外線によるシグナルに関与するとされているシグナルの中でも特に重要とされる p38 にスピルリナが抑制効果をもたらすことを証明している (図)。

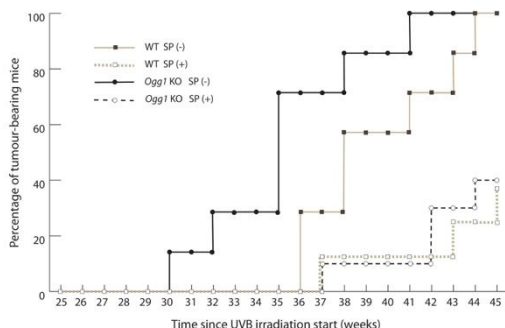
Figure 5



(b-3)

実際にスピルリナを野生型マウスと *Ogg1* マウスに投与し紫外線発がんの抑制が認められるかと検討した。その結果、スピルリナ投与群では野生型、*Ogg1* マウスともに皮膚腫瘍発生時期が遅くなることが確認できた。これらはスピルリナが抗炎症作用を介して抗発がん作用を来す証明となった(図)

Figure 1



#### 引用文献

- 1) Kunisada et al. *Cancer Res.* 65, 6006-10: 2005
- 2) Kunisada et al. *Am J Pathol.* 179, 3056-65: 2011

#### 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3件)

1. Goto N, Bazar C, Kovacs Z, Kunisada M. et al. *Sci Rep.* 5, 11808: 2015 査読あり、doi: 10.1038/srep11808.
2. Yogianti F, Kunisada M, Nakano E, et al. *J Invest Dermatol.* 134, 2610-19: 2014 査読あり、doi: 10.1038/jid.2014.188.

3. Kunisada M, Masaki T, Ono R, et al. *Photochem Photobiol.* 89, 649-54: 2013 査読あり、doi: 10.1111/php.12048.

[学会発表](計3件)

1. Aquaphotomics を利用した近赤外線分光法による CPD 形成の定量的計測の試み 後藤典子、ジョージ バザール、コバチ ゾルタン、国定 充、森田 博之、木崎 誠一郎、杉山 弘、チェンコバルミアナ、錦織 千佳子 第 37 回日本光医学・光生物学会 シーガイヤコンベンションセンター(宮崎県) 2015年7月17日 口頭発表
2. Kunisada M. Molecular mechanisms of UVB carcinogenesis 15th World Congress of Cancers of the Skin 2014年10月5日 エディンバラ(スコットランド)口頭発表
3. *Spirulina platensis* における抗炎症反応を介しての UVB 長期照射によるマウス皮膚発癌抑制作用の検討 国定 充、Flandiana Yogianti、小野 竜輔、作見 邦彦、岡 素雅子、中別府 雄作、錦織 千佳子 第 35 回日本光医学・光生物学会 アクトシティー浜松コンgresセンター(静岡県) 2013年7月12日 口頭発表

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

国定 充 (KUNISADA Makoto)  
神戸大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：80566969

(2)研究分担者：なし  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者：なし  
( )

研究者番号：