

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32639

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25740018

研究課題名(和文)高エネルギー可視光線であるブルーライトによる動物細胞障害過程の解明

研究課題名(英文)Effect of high-energy visible light on animal cells.

研究代表者

佐藤 一臣 (Sato, Kazuomi)

玉川大学・農学部・准教授

研究者番号：10554991

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)：本計画では、可視光線による細胞死誘導メカニズムを解明することを主たる目的として研究を進めた。その結果、青色光は細胞内活性酸素の蓄積、さらにミトコンドリア膜電位の脱分極を誘導した。さらに、青色光はフォスファチジルセリンの細胞膜外露を誘導した。ミトコンドリア膜電位はミトコンドリア依存性アポトーシスの指標である。以上の結果から、青色光はミトコンドリア機能障害を引き起こし、アポトーシスを誘導していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present work was to clarify the mechanism of cell death induced by visible light. Blue light induced mitochondrial membrane potential depolarization subsequent to elevation of intracellular superoxide production. Moreover, blue light induced cell surface exposure of phosphatidylserine. Mitochondrial membrane potential is an indicator of mitochondria-dependent apoptosis. Thus, blue light causes mitochondrial dysfunction and subsequent apoptosis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：アポトーシス 細胞死 可視光線 青色光 ミトコンドリア メラニン生成

1. 研究開始当初の背景

地表に到達する太陽光は主に、中長波長領域紫外線、可視光線、赤外線から構成される。中でも、特に紫外線の有害性についてはこれまでに多くの研究報告がなされており、細胞死の誘導はその代表的な例といえる。

アポトーシス、ネクローシス等の細胞死は種々の外的ストレスによって引き起こされる。前述したように紫外線は動物個体および動物細胞の生理活性に様々な影響を及ぼす。紫外線が誘導する細胞ストレスとして、細胞内の活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) の上昇やシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPDs; cyclobutane pyrimidine dimers)、6-4 光産物 (6-4PP; 6-4 photoproduct) 等の DNA 損傷誘導作用が知られている。損傷を受けた DNA はヌクレオチド除去修復 (NER; nucleotide excision repair) と呼ばれる機構を経て修復されるが、高強度または長期間にわたる紫外線暴露によって過度のゲノム損傷を受けた場合は細胞死が誘導される。さらに、紫外線は遺伝子変異や細胞ストレスを蓄積させることでガン、異常なメラニン生成亢進によるシミ、皮膚におけるしわ形成なども引き起こす。

一方で、可視光線が動物細胞に与える影響についての研究報告は少ないのが現状である。可視光線による照射は昼夜問わず受けており、その生理的影響について解明を試みることは重要な研究主題であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、可視光線による細胞障害誘導の波長特異性の確認、アポトーシス誘導機構の解明を進めることを主たる目的とした。研究代表者は予備的実験において、青色光がマウス由来の B16F1 メラノーマの生存率を顕著に低下させることを確認している。そこで本研究計画では、特に高エネルギー可視光線 (HEV light; high-energy visible light) である青色光に着目して研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 照射条件の検討

本研究ではマウス由来の B16F1 および B16F10 メラノーマ細胞を用いて実験を実施した。可視光線の照射は CO₂ インキュベーター内に LED 照射装置を構築して実施した。照射時は通常の細胞培養の条件と同様の 37 °C、5% CO₂ 条件下で行った。

照射した単色光の波長領域は、青色 (465 nm)、緑色 (520 nm)、黄色 (590 nm)、赤色 (640 nm) であり、コントロールは暗所で培養した。

照射強度は、本研究計画の前半においては、光量子束密度 (PFD; photon flux density) 150 μmol m⁻² s⁻¹ で照射を行い、研究計画の後半

では 0.5-50 W m⁻² に変更して実験を行った。

(2) 可視光線が細胞増殖能・細胞生存率に与える影響

可視単色光が細胞増殖能、細胞生存率に与える影響を明らかにするために実施した。細胞増殖能は、可視単色光を 15-120 分間照射し、照射停止後 72 時間 CO₂ インキュベーター内で暗所培養後、トリパンブルー色素排除試験法にて測定した。細胞生存率は、可視単色光を 6-48 時間照射し、照射終了後直ちにトリパンブルー色素排除試験法にて測定を行った。

(3) 可視光線が細胞内環境に与える影響

可視光線が細胞の生理活性に与える影響を明らかにするため、本研究計画では、細胞内活性酸素量、ミトコンドリア膜電位、カルジオリピンの酸化、caspase-3 活性化の有無について検討を行った。可視光線で細胞を処理後、検出用蛍光色素として、活性酸素の測定には hydroethidine (HE)、ミトコンドリア膜電位の測定には DiOC₆、カルジオリピンの検出には nonyl acridine orange (NAO)、caspase-3 活性は Phosphorimager でそれぞれ処理し、フローサイトメトリーで解析した。

(4) ゲノム DNA 損傷の検出

可視光線を照射後、propidium iodide で処理し、フローサイトメトリーで subG₁ 細胞の検出を試みた。また、コメットアッセイを実施し、ゲノム DNA の損傷を調査した。

(5) アポトーシス検出

アポトーシスが誘導されると、正常時は細胞膜の細胞質側に特異的に存在するフォスファチジルセリン (PS) が外膜に露呈する。さらに、アポトーシスの後期においては、細胞膜の破壊が誘導される。本研究では、Annexin V/PI 法によって可視光線のアポトーシス誘導について検出を試みた。

(6) 青色光によるメラニン生成促進効果の検討

B16F1 メラノーマ細胞はメラニン生成能を有する細胞株である。そこで、本研究では青色光がメラニン生成に関与する転写因子である CREB (cAMP response element-binding protein) のリン酸化に与える影響を調査した。さらに、CREB の標的遺伝子である小眼球症関連転写因子 (Mitf; microphthalmia-associated transcription factor) の転写に与える影響を RT-PCR で解明した。

4. 研究成果

本研究課題において、以下の研究成果を得た。

(1) 可視単色光が細胞増殖能・生存率に与える影響

B16F1およびB16F10メラノーマ細胞に対し、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の単色光を照射したところ、青色光を15分間照射した段階で顕著な細胞増殖能の低下が確認された。一方で、赤色光、黄色光照射群では、コントロールと比較して有意な差は確認されなかった。照射強度 10 W m^{-2} で実施した実験においても同様の結果が得られたことから、これらの結果から青色光が特異的に細胞の増殖を抑制していることが明らかとなった。

生存率の調査においても青色光が顕著に細胞死を誘導していることが明らかとなった。また、B16F1メラノーマに対して緑色光が長時間照射によって生存率の低下を導いていることも確認された。

(2) 細胞内 ROS の蓄積とミトコンドリア膜電位の崩壊

フローサイトメトリーによる解析によって、細胞内 ROS 量の検出を試みた。その結果、最短で $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の青色光を6時間照射した段階で活性酸素の顕著な上昇が確認された。一方で、赤色、黄色光照射群においては変化は確認されなかった。

細胞内の ROS の蓄積はミトコンドリア機能障害を誘導することが知られている。細胞ストレスの蓄積により引き起こされるミトコンドリア膜電位の崩壊によって、ミトコンドリアからシトクロム c の放出が誘導され、続いてアポトーシス関連タンパクの活性化、さらに関連遺伝子の転写が促進される。本研究では、細胞内 ROS 検出実験と同条件の照射を実施した。その結果、ROS 量の上昇が6時間後に確認されたのに対し、ミトコンドリア膜電位の脱分極はやや遅れて12時間後に検出された。これらの結果から、青色光が細胞ストレスを蓄積させ、ミトコンドリア依存性アポトーシスを誘導していることが示唆された。

(3) シトクロム c の放出と caspase-3 活性

アポトーシスにおいて、ミトコンドリア機能障害の後に誘導されるのが、シトクロム c の放出である。本研究では、シトクロム c のミトコンドリア係留に参与するカルジオリピンに注目した。カルジオリピンはミトコンドリア内膜に特異的に存在する脂質である。シトクロム c はカルジオリピンと結合した状態でミトコンドリアに係留されている。カルジオリピンが酸化されると、シトクロム c と

の親和性が崩れ、シトクロム c が細胞質に放出されると考えられている。各単色光をメラノーマに照射し、カルジオリピンの状態を調査したところ、青色光を照射した細胞の酸化カルジオリピンに著しい上昇が確認された。

また、青色光照射後の caspase-3 活性化の有無も調査したところ、照射によって活性化誘導が確認された。以上の結果から、青色光が一連のアポトーシス誘導カスケード促進に関与していることが強く示唆された。

(4) ゲノム DNA 損傷に与える影響

本研究の結果から、特に短波長領域の青色光が細胞死を顕著に誘導していることが明らかとなった。さらに、青色光がゲノム DNA の損傷におよぼす影響を調査するために、コメットアッセイとフローサイトメトリーによる subG1 細胞検出によって解明を試みた。青色光を24時間、 50 W m^{-2} の強度で照射後、コメットアッセイを実施した結果、著しいコメットテイルの伸長が確認された。さらに、フローサイトメトリーの分析では、subG1 細胞の増加が確認された。これらの結果から、青色光が DNA の損傷を誘導していることが明らかとなった。

(5) メラニン生成カスケードに与える影響

細胞内においてメラニン生成は、細胞内 cAMP 濃度上昇、protein kinase A (PKA) 活性化、CREB リン酸化、Mitf 発現の促進、tyrosinase 発現の誘導を経てメラノソームと呼ばれる細胞小器官内において生合成される。本研究では、これまでに得られた結果から、青色光がメラニン生成を誘導する可能性を考え、ウェスタンブロッティング法による CREB リン酸化の検出、RT-PCR 法による Mitf 転写量の検出を試みた。その結果、 10 W m^{-2} の青色光を3時間照射した細胞においてリン酸化 CREB の増加が確認された。一方で赤色光で処理した細胞群においては、リン酸化誘導は確認されなかった。

さらに、 10 W m^{-2} の青色光を24時間照射した細胞において、Mitf の転写促進も確認された。本研究計画で実施した手法においては、青色光が実際にメラニン生成を誘導するかは確認できなかったが、メラニン生成関連遺伝子の転写促進は検出されたことから、青色光がメラニン生成を誘導する効果を有すると考えられる。

(6) 結論

本研究計画では、可視光線の中でも高エネルギー可視光線に注目して、青色光の細胞障害メカニズムの解明を試みた。可視単色光が細胞増殖能や細胞生存率に与える影響を調査したところ、青色光が顕著に細胞分裂の抑制・細胞死を誘導していることが明らかとな

った。この結果から、青色光がメラノーマのアポトーシスを誘導していると判断し、一連の内因性アポトーシス経路の解析を試みた。その結果、青色光の照射によって、細胞内 ROS 量の蓄積、ミトコンドリア膜電位の脱分極、カルジオリピンの酸化誘導、caspase-3 の活性化が確認された。また、ゲノム DNA 損傷誘導、annexin V/PI 法によってアポトーシス細胞が検出されたため、可視光線である青色光がメラノーマのアポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらに、メラニン生成促進作用の検討も行ったところ、青色光の照射によって、メラニン生成のマスターレギュレーターである Mitf 遺伝子の転写促進が確認された。

以上の結果より、青色光は高強度ではメラノーマの細胞ストレスを蓄積させアポトーシスを誘導し、逆に低強度においてはメラニン生成を亢進させることが明らかとなった。

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1件)

Sato K., Minai Y., Watanabe H. Effect of monochromatic visible light on intracellular superoxide anion production and mitochondrial membrane potential of B16F1 and B16F10 murine melanoma cells. Cell Biol. Int. 33, 633-637, 2013. 査読あり. DOI: 10. 1002/cbin. 10069

[学会発表](計5件)

中村咲貴, 西尾貴史, 寺田千里, 渡邊博之, 葉袋裕二, 佐藤一臣. 可視単色光によるアポトーシス誘導メカニズムの解明. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日 岡山大学 (岡山県・岡山市)

西尾貴史, 佐藤一臣. ブルーライトによるメラニン生成促進効果の検討. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日, 岡山大学 (岡山県・岡山市)

Sato K., Nishio T., Mito T., Matsui K., Sato J., Watanabe H. The mechanism of blue light-induced cell death in melanoma cells. International Pigment Cell Conference 2014 (Singapore ·

Singapore)

佐藤一臣, 三戸拓磨, 松井克樹, 杉本幸浩, 葉袋裕二, 渡邊博之. 青色光による細胞死誘導メカニズムの解明. 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日 熊本市総合体育館 (熊本県・熊本市)

西尾貴史, 宇佐美舞, 淡路瑞樹, 篠原すみれ, 鳥山優, 佐藤一臣. アセチルサリチル酸によるメラニン生成抑制メカニズムの解明. 日本薬学会 134 年会, 2014 年 3 月 28 日 熊本市総合体育館 (熊本県・熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 一臣 (SATO KAZUOMI)

玉川大学・農学部・准教授

研究者番号: 10554991