

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860939

研究課題名(和文) 生薬誘導HSP70がUVB誘導DNA傷害に及ぼす影響

研究課題名(英文) Alkannin regulates HSP70 expression in human keratinocytes exposed to UVB

研究代表者

竹上 與志昌 (TAKEGAMI, Yoshiaki)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：30420326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Heat shock protein (HSP) は温熱処理(HT)により誘導されるタンパク質であり、HSP70は紫外線によるストレスから細胞を防御する。Alkanninは皮膚において抗炎症作用を有することが知られている。本研究ではUVB刺激前後の温熱誘導HSP70がアポトーシスに及ぼす影響とalkannin誘導HSP70がUVB誘導アポトーシスに及ぼす影響について検討した。UVB照射前の温熱誘導HSP70は、UVB誘導アポトーシスを抑制した。また、alkanninはHaCaT細胞においてHSP70生成を誘導し、これによりUVB誘導アポトーシスを抑制することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Alkannin is an active constituent from the root extract of *Alkanna tinctoria* of the Boraginaceae family and it may have utility as HSP70 inducer in living organisms. Here, the effects of alkannin-induced HSP70 on UVB (40 mJ/cm²)-induced apoptosis were investigated in human keratinocyte HaCaT cells. Pretreatment of the cells with alkannin (1 μM) caused significant inhibition of UVB-induced apoptosis in HaCaT cells. Moreover, pretreatment with alkannin decreased UVB-induced cleavage of caspase-3. On the other hand, the stimulation of HSP70 inhibitor (KNK437) increased UVB-induced apoptosis in a dose-dependent manner. In addition, differences in gene expression were investigated using a genechip, associated with the suppression of UVB-induced apoptosis in presence of alkannin. The results indicate that alkannin suppress UVB-induced apoptosis via the induction of HSP70 in human keratinocytes, and therefore, this result suggests the usefulness of the compound as antiaging agent.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ultraviolet radiation, alkannin apoptosis HSP70 keratinocytes

1. 研究開始当初の背景

我々の皮膚は、常に物理的・化学的・温度変化、紫外線 (UV) 曝露など、外界からの様々な刺激に曝されている。そのひとつである UV 曝露は、皮膚癌の発生率を高める誘因として知られていると同時に、皮膚の形態変化を引き起こす誘因ともなっている。UV は、遺伝子を傷つけ、安定性を乱す。中でも特に UVB (290~320 nm) は、表皮角化細胞で遺伝情報を含むシクロブタン型ピリミジンダイマー (二量体) (CPD) や (6-4) 光産物などの DNA 損傷を介してアポトーシスを引き起こす。

Heat shock protein (HSP) は、細胞に温熱をはじめとする種々のストレスがかかったとき、一時的に急激に合成誘導される一群のタンパク質である。その分子量によって複数のファミリーに分類され、細胞内のタンパク質を凝集・変性から防御し、修復する役割を担っている。中でも HSP70 ファミリーにおいては非常に広く研究されており、温熱を含む多くのストレス状態に反応して広範で誘導・発現すること [Aufrecht, 2005]、細胞のストレスマーカーとして使用されること [Flanagan et al., 1995, Goldbaum and Richter-Landsberg, 2001, Tomanek and Sanford, 2003]、細胞の apoptosis 開始を調整する中心的な役割を果たすこと [Garrido et al., 2001, Parcellier et al., 2003, Takayama et al., 2003]、温熱誘導 HSP72 が UVB 誘導の細胞死を抑制すること [Merwald H et al., 2005] などが報告されている。一方、一部の生薬に HSP 誘導効果を有するものがある。近年 Mizushima らは、ヤバツイの抽出物が表皮細胞において強力に HSP を誘導することを見出した [Mizushima et al., 2006]。

2. 研究の目的

我々はこれまでに紫外線誘導光老化に関する研究に積極的に取り組み、多くの成果を挙げ、ヒトリンパ腫細胞において数種類の生薬成分が HSP70 を誘導したデータを持っている。さらに我々は、温熱誘導 HSP70 が UVB 誘導アポトーシスを部分的な抑制効果を示したことを確認した。

3. 研究の方法

ヒト不死化ケラチノサイトである HaCaT 細胞を用いて、各種生薬の HSP70 誘導効果を DNA 断片化およびフローサイトメトリーによるアポトーシスの測定、HSP70 のタンパク質産生量の測定、caspase-3 activity の測定、HSP70 inhibitor を用いた実験において評価する。さらに GeneChip による網羅的発現遺伝子解析法およびバイオインフォマティクスによるネットワーク解析法を用いた検討も行った (図 1)。

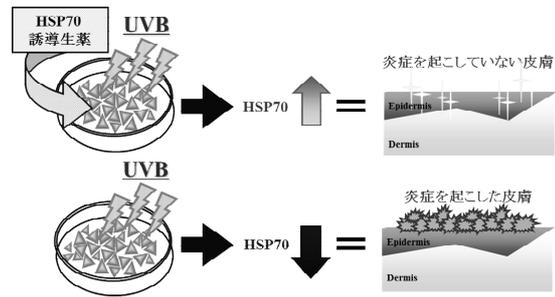


図 1. 生薬誘導 HSP70 が HaCaT 細胞における UVB 誘導 DNA 傷害に及ぼす影響

4. 研究成果

Alkannin (1 μM) の前培養は、HaCaT 細胞において UVB (40 mJ/cm²) 誘導アポトーシスを調べた時、それを有意に抑制した。フローサイトメーターを用いて caspase-3 のタンパク質発現の変化を検討したところ、alkannin の前培養により UVB 誘導 cleaved caspase-3 のタンパク質発現を有意に抑制した。一方、HSP70 の阻害剤である KNK437 は添加濃度依存的に HSP70 のタンパク質発現を抑制し、UVB 誘導アポトーシスを促進した。遺伝子発現レベルは、UVB 照射により大きな変動を示した。さらに、alkannin の UVB 誘導アポトーシスに対する細胞保護機能に關与する可能性のある遺伝子ネットワークが明らかになった。

以上の結果から、alkannin は、HaCaT 細胞において HSP70 生成を誘導し、UVB 誘導アポトーシスを抑制することから、抗老化において有効であることが示唆された。

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 8 件)

Matsui K, Makino T, Takegami Y, Murayama S, Seki Y, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu T.: Bullous pemphigoid with IgG anti-LAD-1 antibodies. *Eur J Dermatol.*, 24:275-276, 2014.

Mori N, Makino T, Matsui K, Takegami Y, Murayama S, Shimizu T.: Successful treatment with UVA rush hardening in a case of solar urticarial. *Eur J Dermatol.*, 24:117-119, 2014.

Shimizu K, Makino T, Ueda C, Takegami Y, Matsui K, Mizawa M, Shimizu T.: Detection of hypohidrosis in Japanese patients with pigmentary mosaicism. *Eur J Dermatol.*, 23:913-914, 2013.

Seki Y, Makino T, Ueda C, Takegami Y, Matsui K, Shimizu T.: Successful treatment with PUVA in a Japanese patient with photosensitive mycosis fungoides: Case report and review of the literatures. *Eur J Dermatol.*

23:559-560, 2013.
Murayama S, Mizawa M, Takegami Y, Makino T, Shimizu T.: Two cases of keratosis follicularis squamosa (Dohi) caused by swimsuit friction. *Eur J Dermatol.*, 23:230-232, 2013.
Takegami Y, Makino T, Matsui K, Ueda C, Fukuda S, Hashimoto T, Shimizu T.: Coexistence of antilaminin-332-type mucous membrane pemphigoid, lamina lucida-type linear IgA bullous dermatosis and Sjogren syndrome. *Clin Exp Dermatol.*, 38:194-196, 2013.
吉久陽子, 竹上與志昌, 近藤 隆, 清水忠道. 皮膚表皮細胞において HSP70 が UVB 誘導アポトーシスに及ぼす影響. 加齢皮膚医学セミナー. 2014; 9:33-36.
上田智恵子, 牧野輝彦, 下村 裕, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 清水忠道. LIPH 遺伝子変異を同定した autosomal recessive woolly hair / hypotrichosis. *臨床皮膚*. 2013; 67: 8-11.

[学会発表](計 23 件)

山腰高子, 村山翔太郎, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 牧野輝彦, 清水忠道. ロスバスタチン(クレストール®)による紫斑型薬疹の一例. 第 441 回日本皮膚科学会北陸地方会; 2014 Feb 23; 金沢.
清水教子, 牧野輝彦, 上田智恵子, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 三澤 恵, 清水忠道. Pigmentary mosaicism 患者の脱色素斑における発汗低下. 第 113 回日本皮膚科学会総会; 2014 May 30-Jun 1; 京都.
竹上與志昌, 牧野輝彦, 関 友里, 松井恒太郎, 清水忠道. Mycobacterium abscessus による皮膚非結核性抗酸菌症の 1 例. 第 442 回日本皮膚科学会北陸地方会; 2014 Jun 22; 金沢.
松井恒太郎, 牧野輝彦, 森 直哉, 上田智恵子, 竹上與志昌, 清水忠道, 花川博義, 八田尚人. Cowden 病に合併した乳房外 Paget 病の 1 例. 第 30 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術集会; 2014 Jul 4; 東京.
鹿児山 浩, 関 友里, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 牧野輝彦, 清水忠道. 結節性紅斑を契機に診断に至った Crohn 病の 1 例.

第 443 回日本皮膚科学会北陸地方会; 2014 Sep 6; 富山.

鹿児山浩, 牧野輝彦, 関 友里, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 清水忠道. 結節性紅斑を契機に診断に至った Crohn 病の 1 例. 第 78 回日本皮膚科学会東部支部学術大会; 2014 Oct 4-5; 青森.

渋谷高子, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 牧野輝彦, 清水忠道. ロスバスタチン(クレストール®)による紫斑型薬疹の一例. 第 78 回日本皮膚科学会東部支部学術大会; 2014 Oct 4-5; 青森.

牧野輝彦, 竹上與志昌, 上田智恵子, 松井恒太郎, 傍島光男, 庵 弘幸, 清水忠道. リポ PGE1 製剤と和温療法の併用が奏効した MCTD による足趾潰瘍. 第 24 回北陸 MMC 研究会; 2014 Oct 18; 金沢.

竹上與志昌, 牧野輝彦, 関 友里, 松井恒太郎, 清水忠道. Mycobacterium abscessus による皮膚非結核性抗酸菌症の 1 例. 第 65 回日本皮膚科学会中部支部学術大会; 2014 Oct 25-26; 大阪.

村山翔太郎, 牧野輝彦, 上田智恵子, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 清水忠道. Neutrophilic panniculitis の 1 例. 第 437 回日本皮膚科学会北陸地方会(熊切教授退官記念地方会); 2013 Feb 24; 福井.

牧野輝彦, 上田智恵子, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 清水忠道. CD56 陰性芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍の 1 例. 第 81 回日本皮膚科学会茨城地方会(大塚教授退官記念地方会); 2013 Mar 9-10; つくば.

村山翔太郎, 牧野輝彦, 上田智恵子, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 清水忠道. Neutrophilic panniculitis の 1 例. 第 112 回日本皮膚科学会総会; 2013 Jun 14-16; 横浜.

森 直哉, 牧野輝彦, 松井恒太郎, 竹上與志昌, 村山翔太郎, 清水忠道. UVA rush hardening therapy が奏功した日光蕁麻疹の 1 例. 第 438 回日本皮膚科学会

北陸地方会 ; 2013 Jun 23 ; 金沢 .

原 寛, 牧野輝彦, 松井恒太郎, 竹上與志昌, 古賀浩嗣, 福田俊平, 石井文人, 橋本 隆, 清水忠道. 好中球優位の細胞浸潤を認めた水疱性類天疱瘡の 2 例 . 第 438 回日本皮膚科学会北陸地方会 ; 2013 Jun 23 ; 金沢 .

原 寛, 牧野輝彦, 松井恒太郎, 竹上與志昌, 古賀浩嗣, 福田俊平, 石井文人, 橋本 隆, 清水忠道. 好中球優位の細胞浸潤を認めた水疱性類天疱瘡の 2 例 . 第 9 回加齢皮膚医学研究会 ; 2013 Jul 6-7 ; 宇部 .

吉久陽子, 竹上與志昌, 近藤 隆, 清水忠道. 皮膚表皮細胞において HSP70 が UVB 誘導アポトーシスに及ぼす影響 . 第 9 回加齢皮膚医学研究会 ; 2013 Jul 6-7 ; 宇部 .

森 直哉, 牧野輝彦, 松井恒太郎, 竹上與志昌, 村山翔太郎, 清水忠道. UVA rush hardening therapy が奏功した日光蕁麻疹の 1 例 . 第 35 回日本光医学・光生物学会 ; 2013 Jul 12-13 ; 浜松 .

竹上與志昌, 牧野輝彦, 松井恒太郎, 清水忠道. 慢性腎不全の悪性黒色腫患者におけるダカルバジンの体内動態の検討 . 第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 ; 2013 ; Aug 9-10 ; 甲府 .

牧野輝彦, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 清水忠道. 腫瘍細胞の FACS 解析が診断に有用であった blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm . 第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 ; 2013 ; Aug 9-10 ; 甲府 .

上田智恵子, 牧野輝彦, 松井恒太郎, 竹上與志昌, 関 友里, 清水忠道. プレミネントによる光線過敏型蕁疹の組織学的検討 . 第 439 回日本皮膚科学会北陸地方会 ; Sep 8 ; 富山 .

21 松井恒太郎, 森 直哉, 上田智恵子, 竹上與志昌, 牧野輝彦, 清水忠道. 胆嚢転移をきたした頸部の巨大悪性黒色腫 . 第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 ; 2013 Nov 2 - 3 ; 名古屋 .

22 関 友里, 牧野輝彦, 原 寛, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 清水忠道. 紫外線曝露により増悪した紅斑性天疱瘡の 2 例 . 第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 ; 2013 Nov 2 - 3 ; 名古屋 .

23 清水教子, 牧野輝彦, 上田智恵子, 竹上與志昌, 松井恒太郎, 三澤 恵, 清水忠道. Pigmentary mosaicism 患者の脱

色素斑における発汗低下 . 第 440 回日本皮膚科学会北陸地方会 ; 2013 Dec 8 ; 金沢 .

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
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

竹上與志昌 (TAKEGAMI Yoshiaki)
富山大学・大学病院・助教
研究者番号 : 30420326

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :