

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02815

研究課題名(和文)皮膚組織レベルの紫外線ゲノム毒性防衛応答の制御機構

研究課題名(英文)Mechanistic analysis of a protective response of skin tissue to UV genotoxicity

研究代表者

池畑 広伸 (IKEHATA, Hironobu)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：90250737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(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応答である変異誘発抑制(MIS)応答の制御機構を解明するため、抗酸化ストレス応答を制御しているKeap1-Nrf2系が関与するモデルを立て解析を行った。MIS応答のトランスクリプトーム解析を行い、MIS応答に伴うアポトーシス発動遺伝子群の誘導、それに続く組織回復に関係する細胞増殖関連遺伝子群の誘導を認め、アポトーシスとハイパープラシアに基づくMIS応答の機構を確認し、紫外線傷害後の皮膚組織の回復過程におけるKEAP1-NRF2系の関与を認めた。またMIS誘導に必要なDNA損傷量も評価した。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of the response of mutation induction suppression (MIS), a protective response of skin tissue to UV genotoxicity, using a mechanistic model based on the Keap1-Nrf2 system, which controls antioxidative responses in mammalian cells. We performed an analysis of global gene expression changes in the MIS response and detected the induction of genes related to apoptosis and cell proliferation, which suggests that MIS is based on a tissue turnover mechanism with apoptosis and hyperplasia. The analysis has also suggested that the Keap1-Nrf2 system functions in the tissue recovery process from the skin damage produced after UV exposures. We also estimated the amounts of UV-induced DNA damage necessary for the MIS induction.

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 Nrf2

1. 研究開始当初の背景

皮膚に紫外線を照射すると突然変異が誘発されるが、表皮では一定の閾値線量を越えると炎症発生と同時に変異頻度の上昇が抑えられプラトーになる。私たちはこの応答現象をマウスで発見し、変異誘発抑制 (mutation induction suppression, MIS) と名付けた (H. Ikehata & T. Ono, 2002, *Mutat. Res.*; 図1)。MIS 応答は生体組織レベルの紫外線ゲノム毒性防御機構であり、アポトーシス誘発とその後の細胞増殖による組織更新により突然変異が抑えられる (Ikehata *et al.*, 2010, *Mutagenesis*)。MIS 応答は閾値線量から突然始まる事象なので、アポトーシスは一定以上の線量を被ばくした細胞集団に一斉に発生すると考えられる。しかしこの MIS 応答に伴うアポトーシス誘導の分子機構は未解明のままであった。

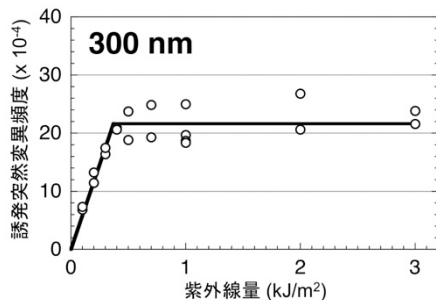


図1: MIS 応答の具体例. 300 nm 紫外線によるマウス皮膚表皮での突然変異誘発動態を示す。一定線量以上で変異頻度上昇が抑えられ横ばいになり (実線), 一定値を示す (プラトー-変異頻度)。○は各個体のデータ。

スクレオチド除去修復のうち転写共役修復 (transcription-coupled repair, TCR) に関わる修復因子 XPA や CSB を欠損したヒトやマウスの皮膚は紫外線に対し高い炎症・アポトーシス感受性を示す。これらの欠損マウスは MIS 応答にも高感受性で閾値線量の著しい低下が認められる (池畑, 未発表)。XPA や CSB の欠損細胞はミトコンドリア代謝に異常があり (Fang *et al.*, 2014, *Cell*; Cleaver *et al.*, 2014, *PNAS*)、酸化ストレスに対しアポトーシスを起こしやすいなど脆弱になっている。これらの事実に基づき、炎症・アポトーシスを伴う MIS 応答は酸化ストレスに対する細胞応答機構により制御されているのではないかと考えた。

生体は酸化ストレスに対し抗酸化物質の合成・蓄積 (グルタチオン、ビリベルジン、ビタミン C 等)、ROS の無毒化 (SOD、カタラーゼ等)、DNA 修復 (酸化型損傷特異的 DNA グリコシラーゼ等) と、重層的な耐性機構を有している。このうち抗酸化・ROS 耐性機構の誘導に広く関わり、中心的役割を果たしている転写因子として Nrf2 が存在する。Nrf2 は一群の抗酸化関連酵素の誘導 (抗酸化応答) を支配し、その活性は Keap1 という酸化ストレスセンサーでもあるユビキチンリガーゼ構成因子によって制御されている。Nrf2 は通常は細胞質に存在し Keap1 により分解さ

れるが、酸化ストレスにより Keap1 が失活すると核内に移行し、配下の遺伝子群の発現を誘導する。紫外線は強い酸化ストレス因子のひとつであるが、Nrf2 欠損マウスの皮膚は紫外線に対し炎症・アポトーシスの亢進を示す (Kawachi *et al.*, 2008, *JID*)。一方 Nrf2 活性の上昇したマウスでは紫外線による炎症・アポトーシスが抑制される (Schäfer *et al.*, 2010, *Genes Dev.*)。このように皮膚の紫外線に対する炎症・アポトーシス応答は Nrf2 によって制御されており、Nrf2 活性化は炎症・アポトーシスを抑制する。したがって MIS 応答発動時には、活性化 Nrf2 を抑制し ROS を増産させてアポトーシスを誘導する機構が働いていると予想された。実際、低線量の UVB 紫外線では Nrf2 活性化が認められるのに閾値を超える高線量では認められなくなることが報告されていた (Hirota *et al.*, 2005, *JID*; Kannan & Jaiswal, 2006, *Cancer Res.*; Durchdewald *et al.*, 2006, *JID*)。

2. 研究の目的

そこで本研究では紫外線照射後の Nrf2 活性化制御機構について、「低線量紫外線では発生した低レベルの ROS に対して活性化した Nrf2 抗酸化応答が対抗し、炎症・アポトーシスの発生を抑制するが、高線量では高レベルの ROS に対応しきれなくなり、何らかの形で Nrf2 抗酸化系の不活性化が起こり、ROS 産生が急激に促進されアポトーシスが誘導される」という仮説を立てた。これまでの内外の研究情報に基づきこれを説明できるいくつかの検証モデルを想定してこれらを解析していき、MIS 応答に伴うアポトーシスの制御の分子機構を解明することにした。Nrf2 系の不活性化機構には核内 Nrf2 の転写活性化能の失活あるいは分解・核外排出の促進、Klf9 や p53 の拮抗的活性化による抗酸化応答の阻害などの報告があり、これらの不活性化機構に異常が生じた時、Nrf2 活性化がどう変化するか、MIS 応答はどのように変化するか想定モデルで実験的に検証し、MIS 応答に関わるアポトーシス制御機構を解明することにより、上記の仮説を証明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

MIS 応答に伴うアポトーシス誘発が Nrf2 抗酸化応答の急激な不活性化によるという仮説を証明するために、内外の研究情報に基づき Nrf2 系不活性化機構モデルを想定し、その検証を行うことを計画した。まず遺伝子改変マウスを利用し MIS 応答の Nrf2 依存性を皮膚で解析した。Nrf2 欠損マウスの剃毛した背中の皮膚に照射線量を変えて UVB を照射し、誘発される突然変異頻度を測定して、変異誘発動態を解析した。また培養表皮細胞による *in vitro* 解析系で siRNA を用いて想定モデルの検証を試みた。HaCaT 細胞に UV を照射し誘発されるアポトーシスへの効果を解

析した。研究の途中で想定モデルに否定的なデータが得られたため、研究方針を修正し、MIS 応答に伴う遺伝子発現解析を RNA-seq 法により行った。また MIS 応答誘導機構について別の角度から検討するため紫外線誘発損傷量と MIS 誘導の関係を ELISA 法で解析した。

4. 研究成果

まず Nrf2 系の MIS 応答への影響を把握するため、Nrf2 または Keap1 を欠損した突然変異解析用突然変異マウスを用いて遺伝的解析を行った。Nrf2 欠損マウスでは UVB に対し野生型マウスより表皮で有意により強い MIS 応答を示し、プラトー変異頻度の低下が見られた。一方、Keap1 発現が低下し Nrf2 が高発現している Keap1 欠損マウスで検討したところ、MIS 応答に野生型と有意な差は認められなかった。更に Ref-1 欠損の影響を評価するため *in vitro* 細胞培養系で検討したが、Ref-1 発現抑制による UV 誘発アポトーシスの促進は見られず、当初予定していた Ref-1 flox マウスの開発は中止することにした。

このように当初のモデルでは十分に MIS 応答機構を説明できないことが判明したため、これまでの仮説を見直すことにし、UVB 照射後の MIS 応答時の遺伝子発現解析を行い、MIS 誘導条件下で変動する因子を詳細に検索・同定することにした。UVB 照射後の MIS 応答時の遺伝子発現解析を RNA-seq 法を用いて行い、MIS 誘導条件下で変動する因子を詳細に解析・検索した。その結果、紫外線により照射直後は皮膚表皮で多くの遺伝子の発現抑制が認められ、Keap1-Nrf2 系も発現が抑制された。しかし MIS 応答と平行してアポトーシス発動に関わる遺伝子群は強く誘導されることを確認し、また照射後 3 日目には組織回復に関係すると思われる細胞増殖関連遺伝子群の誘導が認められ、我々のこれまでのアポトーシスとハイパープラシアに基づく MIS 応答の機構モデルを裏付けることができた。Keap1-Nrf2 系はむしろアポトーシス後のこの組織回復過程での細胞増殖と平行して活性化し、細胞増殖に伴う炎症の発生を抑制していることを示唆するデータが得られ、紫外線傷害後の皮膚組織の回復過程における Keap1-Nrf2 系の重要性が見えてきた。またこの解析と平行して MIS 応答誘導に必要な DNA 損傷量の絶対定量も行い、誘導に必要なシクロブタン型ピリミジンダイマー及び 6-4 型光産物の最少量を明らかにし、同時にこれらの DNA 損傷の分子あたりの変異原性も評価できた (Ikehata *et al.*, 2018, PPS)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① H. Ikehata (2018) Mechanistic considerations on the wavelength-dependent variations of UVR genotoxicity and mutagenesis in skin:

Discrimination of UVA-signature from UV-signature mutation. Photochem. Photobiol. Sci., in press. 査読あり
DOI: 10.1039/c7pp00360a

- ② H. Ikehata, T. Mori, T. Douki, J. Cadet & M. Yamamoto (2018) Quantitative analysis of UV photolesions suggests that cyclobutane pyrimidine dimers produced in mouse skin by UVB are more mutagenic than those produced by UVC. Photochem. Photobiol. Sci. 17: 404–413. 査読あり
DOI: 10.1039/c7pp00348j
- ③ E. Yoshida, T. Suzuki, M. Morita, K. Taguchi, K. Tsuchida, H. Motohashi, M. Doita & M. Yamamoto (2018) Hyperactivation of Nrf2 leads to hypoplasia of bone *in vivo*. Genes Cells, in press. 査読あり
DOI: 10.1111/gtc.12579
- ④ T. Suzuki, S. Seki, K. Hiramoto, E. Naganuma, E. H. Kobayashi, A. Yamaoka, L. Baird, N. Takahashi, H. Sato & M. Yamamoto (2017) Hyperactivation of Nrf2 in early tubular development induces nephrogenic diabetes insipidus. Nat. Commun. 8: 14577. 査読あり
DOI: 10.1038/ncomms14577
- ⑤ T. Suzuki & M. Yamamoto (2017) Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. J. Biol. Chem. 292: 16817–16824. 査読あり
DOI: 10.1074/jbc.R117.800169
- ⑥ T. Hidaka, E. Ogawa, E. H. Kobayashi, T. Suzuki, R. Funayama, T. Nagashima, T. Fujimura, S. Aiba, K. Nakayama, R. Okuyama & M. Yamamoto (2017) The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of neurotrophic factor Artemin. Nat. Immunol. 18: 64–73. 査読あり
DOI: 10.1038/ni.3614
- ⑦ 池畑広伸 (2017) 紫外線の突然変異スペクトルと皮膚がん特異的突然変異. 太陽紫外線防御研究委員会学術報告 27(1): 55–58. 査読なし
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/dermat/jcsp/index.html>
- ⑧ H. Ikehata, (2016) Wavelength dependence of UVR-induced mutation spectrum in mouse skin. Photomed. Photobiol. 38: 1–2. 査読なし
<http://square.umin.ac.jp/jspp>
- ⑨ T. Iso, T. Suzuki, L. Biard & M. Yamamoto (2016) Absolute amount and status of Nrf2-Keap1-Cul3 complex within cells. Mol. Cell. Biol. 36: 3100–3112. 査読あり
DOI: 10.1128/mcb.00389-16
- ⑩ E. H. Kobayashi, T. Suzuki, R. Funayama, T. Nagashima, M. Hayashi, H. Sekine, N. Tanaka, T. Moriguchi, H. Motohashi, K.

- Nakayama & M. Yamamoto (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.* 7: 11624. 査読あり
DOI: 10.1038/ncomms11624
- ⑪ R. Saito, T. Suzuki, K. Hiramoto, S. Asami, E. Naganuma, H. Suda, T. Iso, H. Yamamoto, M. Morita, L. Biard, Y. Furusawa, T. Negishi, M. Ichinose & M. Yamamoto (2016) Characterizations of three major cysteine sensors of Keap1 in stress response. *Mol. Cell. Biol.* 36: 271–284. 査読あり
DOI: 10.1128/mcb.00868-15
- ⑫ H. Ikehata, T. Mori & M. Yamamoto (2015) *In vivo* spectrum of UVC-induced mutation in mouse skin epidermis may reflect the cytosine deamination propensity of cyclobutane pyrimidine dimers. *Photochem. Photobiol.* 91: 1488–1496. 査読あり
DOI: 10.1111/php.12525
- ⑬ H. Ikehata, T. Mori & M. Yamamoto (2015) Analysis of UVC genotoxicity for mouse skin. *Photomed. Photobiol.* 37: 29–30. 査読なし
<http://square.umin.ac.jp/jssp>
- ⑭ T. Suzuki & M. Yamamoto (2015) Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radical Biol. Med.* 88: 93–100. 査読あり
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006
- [学会発表] (計 2 2 件)
- ① 鈴木隆史, 関詩織, 長沼絵理子, 高橋信行, 佐藤博, 山本雅之 (2017. 12. 6-9) 尿細管発生期における転写因子 Nrf2 の恒常的活性化は腎性尿崩症を引き起こす. 第 40 回生命科学系学会合同年次大会
- ② 佐藤慶, 鈴木隆史, 長沼絵理子, 杉浦久敏, 一ノ瀬正和, 山本雅之 (2017. 12. 6-9) 骨髄球系細胞における転写因子 Nrf2 活性化がエラスターゼ誘導性肺気腫の形成を阻害する. 第 40 回生命科学系学会合同年次大会
- ③ 村松亜紀, 鈴木隆史, A. Dinkova-Kostova, 山本雅之 (2017. 12. 6-9) TBE-31 は Keap1 Cys151 を介して Nrf2 を活性化し抗炎症に働く. 第 40 回生命科学系学会合同年次大会
- ④ 井上仁, 村松亜紀, 鈴木隆史, 磯達朗, 小柴生造, 山本雅之 (2017. 11. 15) 酸化ストレス応答における Keap1 の構造・相互作用解析. 第 56 回 NMR 討論会
- ⑤ 鈴木隆史, 山本雅之 (2017. 10. 30) Keap1-Nrf2 系による酸化ストレス防御機構. 第 7 回日本分子状水素医学生物学会年会
- ⑥ 池畑広伸, 森俊雄, 山本雅之 (2017. 10. 26) マウス皮膚における紫外線 DNA 損傷量と誘発突然変異頻度の定量的関係の解析. 日本放射線影響学会第 60 回大会
- ⑦ 池畑広伸, 森俊雄, 山本雅之 (2017. 7. 21) マウス皮膚に対する広帯域および狭帯域 UVB のゲノム毒性の比較. 第 39 回日本光医学・光生物学会
- ⑧ 鈴木隆史, 山本雅之 (2017. 6. 20) Keap1-Nrf2 システムによる酸化ストレス応答機構. 第 17 回日本蛋白質学会大会
- ⑨ 鈴木隆史, 関詩織, 長沼絵理子, 高橋信行, 佐藤博, 山本雅之 (2017. 5. 27) 尿細管発生期における転写因子 Nrf2 の恒常的活性化は腎性尿崩症を引き起こす. 第 60 回日本腎臓学会学術会
- ⑩ 池畑広伸 (2017. 3. 17) 紫外線の突然変異スペクトルと皮膚がん特異的突然変異. 「太陽紫外線の生体影響研究: 現状と今後の展望」太陽紫外線防御研究委員会第 27 回シンポジウム
- ⑪ T. Suzuki, R. Saito, K. Hiramoto, S. Asami, E. Naganuma, H. Suda, T. Iso, H. Yamamoto, M. Morita, L. Biard, Y. Furusawa, T. Negishi, M. Ichinose & M. Yamamoto (2016, 5. 21) Characterization of three major cysteine sensors of Keap1 in stress response. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide
- ⑫ 鈴木隆史, 山本雅之 (2016. 8. 30) Keap1 センサーシステイン残基による多様なストレス感知機構. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会
- ⑬ 池畑広伸 (2016. 10. 26) 紫外線 DNA 損傷特異抗体を利用したマウス皮膚における損傷量と誘発突然変異頻度の定量的関係の解析. ワークショップ「UV 損傷モノクローナル抗体 25 年: 紫外線生物影響研究の今昔」日本放射線影響学会第 59 回大会
- ⑭ 池畑広伸, 山田亮太郎, 山本雅之 (2016. 9. 25) 紫外線ゲノム毒性に対する KEAP1-NRF2 系の皮膚防護能. 第 89 回日本生化学会大会
- ⑮ 鈴木隆史, 山本雅之 (2016. 9. 26) Keap1 の反応性システイン残基による多様なストレス感知機構. 第 89 回日本生化学会大会
- ⑯ 池畑広伸 (2016. 7. 22) マウス皮膚における UVC ゲノム毒性の解析-突然変異スペクトルの波長依存性-. 奨励賞受賞講演(生物化学領域) 第 38 回日本光医学・光生物学会
- ⑰ 斎藤良太, 平本圭一郎, 浅見颯一郎, 鈴木隆史, 山本雅之 (2015. 12. 1-4) 新規変異体創出によるストレスセンサー Keap1 のシステイン残基の機能解明. BMB2015
- ⑱ 浅見颯一郎, 斎藤良太, 平本圭一郎, 鈴木隆史, 山本雅之 (2015. 12. 1-4) ストレスセンサー Keap1 のシステイン変異体ノックインマウスの機能解析. BMB2015
- ⑲ H. Ikehata (2015. 9. 3) Wavelength dependence of UV photolesion formation and mutagenesis in skin. 第 16 回欧州光生物学会議

- ⑩ 池畑広伸, 森俊雄, 山本雅之 (2015. 7. 17)
マウス皮膚におけるUVCゲノム毒性の解析. 第37回日本光医学・光生物学会
- ⑪ H. Ikehata, T. Mori & M. Yamamoto (2015. 5. 26)
In vivo analysis of UVC-induced mutation in mouse skin: dose-dependent induction kinetics and mutation spectrum. 第15回国際放射線研究会議
- ⑫ 鈴木隆史 (2015. 4. 23) Keap1-Nrf2系による生体防御機構. 第64回脳研・高度先進合同セミナー

[図書] (計1件)

池畑広伸 (2016) 光と障害：紫外線による突然変異誘発. 「光と生命の事典」(日本光生物学協会編) 314-315, 朝倉書店.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池畑 広伸 (IKEHATA, Hironobu)
東北大学・医学系研究科・講師
研究者番号：90250737

(2) 研究分担者

鈴木 隆史 (SUZUKI, Takafumi)
東北大学・医学系研究科・講師
研究者番号：70508308

(3) 連携研究者

守田 匡伸 (MORITA, Masanobu)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10519094

山本 雅之 (YAMAMOTO, Masayuki)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50166823