

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591446

研究課題名（和文） 紫外線による酸化ストレス障害に应答するシグナル伝達抗酸化システムの役割

研究課題名（英文） Signaling in response to oxidative stress disorder caused by ultraviolet

研究代表者

小澤 明 (OZAWA AKIRA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20096209

研究成果の概要（和文）：慢性光刺激に暴露されたヒト皮膚組織を対象に、酸化ストレス傷害、抗酸化酵素の発現、酸化ストレスシグナルについて解析を行った。その結果、活性酸素種による核酸傷害のマーカーである酸化型 DNA は変化が認められなかった。一方、脂質過酸化反応のマーカーとなる HNE が増加し、この HNE はエラスチンと共局在するがコラーゲンとは共存しないことが判明した。また、種々の抗酸化酵素の中でも、非誘導型である HO-2 の発現誘導がなされることが初めて明らかとなった。さらに我々は皮膚疾患モデルとして乾癬の皮膚病変を用いて検討を行った。酸化ストレス障害を起こしている細胞は CyclinE や NF $\kappa$ B と共局在し、乾癬皮膚病変の指標（BSA）に相関関係にあることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Intended for human skin tissue was exposed to sunlight long period of time, we analyzed that oxidative stress injury, the expression of antioxidant enzymes and oxidative stress signaling. As a result, oxidative DNA is a marker of nucleic acid damage by reactive oxygen species showed no change. On the other hand, HNE become a marker of lipid peroxidation was increased. HNE is not co-localized with collagen, but co-localized with elastin. Also, in a variety of antioxidant enzymes, induction of HO-2 expression is non-inductive type is made for the first time became clear. In addition, we were investigated by using the skin lesions of psoriasis skin disease as a model. Cells were co-localized with A and B had failed oxidative stress. The failed cell oxidative stress was correlated with BSA which is a measure of the skin lesions of psoriasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の背景：皮膚組織における酸化ストレス応答・防御システムの重要性

皮膚は体表の最外層にあり常に外界からの様々な刺激にさらされている。太陽光線の紫外線は、表皮では有棘細胞癌、基底細胞

癌などの皮膚の光発癌の原因となり、真皮では solar elastosis (光老化の主体) を引き起こす傷害性刺激である。表皮の光発癌の原因は紫外線および紫外線に由来する活性酸素種による DNA 損傷であると考えられており、また真皮の solar elastosis の発生にも紫外線により誘導される活性酸素種が重要な役割を果たしていることが判ってきている。このような「紫外線曝露→酸化ストレス→光発癌、光老化」に対して皮膚組織は、superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、glutathione peroxidase (GPx) などの抗酸化酵素を恒常的に発現することにより対応していると考えられている。

## (2) 本研究の着想に至る経緯：

我々は紫外線露光部および非露光部のヒト皮膚組織を対象に DNA マイクロアレイによる発現解析を行った。その結果、Heme Oxygenase-1 (HO-1) が紫外線により誘導されることを見出した。上記の SOD、CAT、GPx などの抗酸化酵素が恒常的に皮膚に発現しているのに対して、HO-1 などの誘導性抗酸化酵素群は紫外線などの酸化ストレス刺激に応答して発現誘導される点が極めて特徴的である。ヒト皮膚組織における HO-1 を含む抗酸化酵素群の発現誘導の分子機構および酸化ストレスに対する応答機構の詳細は不明である。酸化ストレス応答性シグナル伝達経路としては、Keap1-Nrf2 系、Thioredoxin 系、NF- $\kappa$ B 系の重要性が注目されており、種々の臓器由来の培養細胞株あるいは実験動物を用いた実験が行われ、酸化ストレス病態との関連性について分子レベルで明らかになりつつある。しかし、実際のヒト皮膚組織における紫外線誘導性酸化ストレスとこれらシグナル伝達経路との関連性についての検討・報告は少なく、特に抗酸化酵素群の発現誘導にまで着目した報告は見あたらない。ヒト皮膚における紫外線(酸化ストレス)防御システムにおいて、シグナル応答による抗酸化酵素群の発現誘導は必須の生体防御系であり、その分子機構の解析は重要な課題であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、紫外線露光部(耳前部)、と同一症例の非露光部(耳後部)のヒト皮膚組織の病理組織標本および凍結材料を対象に、(1)組織化学的手法および分子病理学的手法(レーザーマイクロダイセクション法による特定細胞、組織の分子生物学的解析法)を用いた紫外線応答シグナル伝達分子群(Nrf2-Keap1、I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B等)とその下流で誘導される HO-1 をはじめとする抗酸

化酵素群の発現部位・発現量を蛋白、mRNA レベルで精査する、また、(2)酸化ストレスにより引き起こされる脂質過酸化、DNA 損傷(光発癌の原因)の指標である HNE(脂質過酸化産物)、8-OHdG(DNA 酸化産物)を免疫組織学的に検出し、光老化による組織化学的变化(elastosis等)に観察・評価する。

(3)紫外線および種々の活性酸素種をヒト皮膚繊維芽細胞、ケラチノサイトに作用させた際に HO-1 等の抗酸化酵素群が誘導されるかを解析する。以上の検討により、①HO-1 の発現量と皮膚の DNA 損傷/elastosis との関連性、②SOD、CAT、GPx などの他の抗酸化酵素群の発現と DNA 損傷/elastosis との関連性、③HO-1 誘導に関わる活性酸素種、を明らかにし紫外線による光発癌、光老化に応答する酸化ストレス防御システムにおける HO-1 をはじめとする抗酸化酵素群発現誘導の分子機構を追求する。

(4)さらに、皮膚疾患モデル(乾癬、アトピー性皮膚炎、有棘細胞癌・基底細胞癌・日光角化症などの光に誘導される皮膚癌など)を用いて紫外線に誘導される酸化ストレス障害とこれに対応する抗酸化システム、シグナル伝達がどのように応答するかを検討し、光に応答する病因を追及していく。

乾癬は著明な角化と表皮の増殖変化をきたす皮膚疾患であり、免疫細胞が産生するサイトカインによる持続的な炎症反応による酸化ストレス障害が病因の1つであると考えられている。実際、乾癬患者の血中や尿中で酸化ストレスマーカーである MDA や 8-OHdG の上昇が報告されており、また、抗酸化作用を持つビタミンEやセレン含有化合物の摂取により症状の改善が確認されている。しかし酸化ストレスが病変部の細胞増殖を促す作用の詳細は未だ不明であり、本研究では「乾癬における酸化ストレスとその増殖シグナル伝達に及ぼす作用を検討することで標的分子を特定し、これを利用した新規治療を確立すること」を目的とした。

## 3. 研究の方法

これまで酸化ストレス誘導性シグナル伝達、抗酸化酵素解析の検討は主として組織全体を用いた発現解析が中心であったが、本研究の対象となるヒト皮膚組織は角質、表皮、真皮、基底層からなる heterogeneous な組織であり、紫外線によるシグナル伝達がオンになっている組織部位を特定することが特に重要であると考えられる。そこで、まずレーザーマイクロダイセクション法(LM法)により角質、表皮、真皮、基底層を個々に採取し、各部位について個別に real time RT-PCR 法による解析を行い、シグナル伝達に応答して発現誘導される抗酸化酵素群の発現部位

を特定する。既に紫外線による発現誘導が明らかとなっている HO-1 を中心に解析を進め、また、協調して機能すると考えられる他の抗酸化酵素に関しても同様の解析を施行する。次に HO-1 の発現誘導と DNA 損傷/elastosis の強さとの関連性を紫外線露光部、非露光部のヒト皮膚組織を用いて検討し、本分子の紫外線への応答反応 (DNA 損傷抑制、elastosis 抑制) を実証する。

また、乾癬病変部の組織標本を用いて、抗酸化酵素である SOD, CAT、細胞増殖に関わる cyclinE, NF- $\kappa$ B、分化マーカーである Notch1, keratin10/14 について免疫組織学的手法によりその発現を解析する。さらに病変部位の重症度と、各分子の発現との相関関係についても検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 紫外線応答シグナル伝達分子の解析

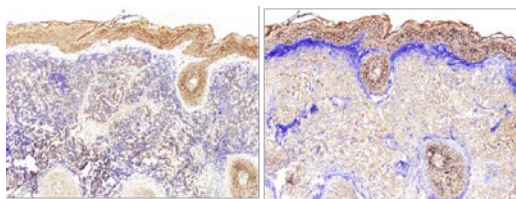
酸化ストレスの標的経路である MAPK を用いて検討した。抗リン酸化 MAPK 抗体による免疫組織化学を施行し、リン酸化 p38MAPK、リン酸化 JNK、リン酸化 ERK の局在を観察した。その結果、リン酸化 p38MAPK は耳後部に比較して、光露光部である耳前部真皮において強い発現が認められた。また、リン酸化 JNK は耳前部表皮において特に強い染色性が観察された。リン酸化 ERK は炎症細胞、表皮血管内皮細胞内に観察された。リン酸化 ERK は、耳前部・耳後部においてその発現性に違いは認められなかった。

##### (2) 脂質過酸化、DNA 損傷の解析

DNA 損傷は DNA と核酸酸化物の指標である 8-OHdG を用い、脂質の過酸化は HNE を用いて検討した。すべての症例 (耳前部、耳後部) において 8-OHdG の染色性は認められなかった。耳前部皮膚 (露光部) では、耳後部皮膚 (非露光部) に比較して表皮・真皮ともに HNE の染色性が高かった。エラスチンおよびコラーゲンと HNE との 2 重染色を施行した結果、耳前部皮膚では HNE とエラスチンが共局在していた (図 1 A)。耳後部皮膚では共局在は見られなかった。いっぽう、コラーゲンと HNE の共局在は全く観察されなかった (図 1 B)。

図 1 A

図 1 B



共焦点レーザー顕微鏡でも HNE とコラーゲンは主として別々の部位に観察された。

### (3) 抗酸化酵素の解析

#### ① HO-1 の発現量解析

HO-1 は、酸化ストレスに応答して発現が亢進し、細胞の保護に働く誘導型 HO 分子である。いっぽう、HO-2 は、構成的 (constitutive) に発現する非誘導型 HO であると報告されている。免疫染色の結果、HO-1 は耳前部・耳後部とも発現し差を認めなかった。しかし、HO-2 は耳前部・耳後部表皮の細胞質で発現していた。HO-2 は、耳後部真皮層と比較して耳前部真皮層において発現が著明に増加していた。この免疫組織化学の結果を確認するために、laser microdissection 法を用いて耳前部、耳後部の表皮、真皮の組織をマイクロダイセクションし、得られた組織から RNA を抽出し、quantitative real time RT-PCR 法を施行し mRNA の定量を行った。その結果、耳後部に比較して耳前部真皮では HO-2 の mRNA の発現が有意に高いことが判明した (図 2)。

ヒト皮膚組織を用いた HO-2 の吸収試験を行ったところ、HO-2 の免疫反応性は吸収の度合いにより徐々に低下しており、HO-2 の免疫組織化学の特異性が確認された。

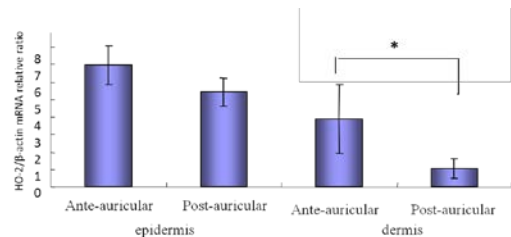


図 2

#### ② 抗酸化酵素群の解析

Mn-SOD は真皮の付属器周囲に特に強い局在性を認めた。また、Mn-SOD は耳後部真皮の線維芽細胞および付属器周囲の炎症細胞の細胞質に顆粒状の染色像を示したが、耳前部、耳後部で差を認めなかった。Cu/Zn-SOD は表皮と付属器に染色されたが、耳前部、耳後部で差を認めなかった。CAT は真皮の脂腺の核、表皮顆粒層の細胞質に顆粒状の局在性を示した。Real-time RT PCR を用いて定量も行ったが有意差を認めなかった。

### (4) 皮膚疾患モデル (乾癬) での解析

#### ① 酸化ストレスマーカーの発現解析

乾癬の病変部において、免疫染色の結果、HNE は表皮上層を中心に発現の亢進を認め、抗酸化酵素 (SOD) は発現が低下しており、乾癬では酸化ストレスが増加していると判明した。

#### ② 増殖・炎症マーカーの発現解析

酸化ストレスが亢進している細胞では、細胞周期の G1/S 期に重要な分子である cyclinE

がHNEと共局在を認め、さらにHNEはNF-kBとも共局在を認めた。さらに、cyclinE/NF-kB陽性細胞数は乾癬の病変面積 (Body surface area:BSA) と相関していた (図3)

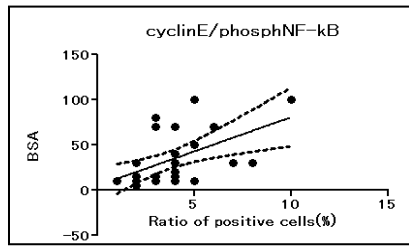


図3

### ③分化マーカーの発現解析

病変部では基底細胞のマーカーであるkeratin14と有棘細胞のマーカーであるkeratin10の両者を発現する異常な細胞が認められた。また、分化マーカーであるNotch1は病変部の表皮下層で発現が低下しており、酸化ストレス亢進している病変部では分化異常が存在し、正常な表皮細胞増殖が妨げられていることが明らかになった。

## 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)

- ① Akasaka E, Takekoshi S, Horikoshi Y, Toriumi K, Ikoma N, Mabuchi T, Tamiya S, Matsuyama T, Ozawa A. Protein oxidative damage and heme oxygenase in sunlight-exposed human skin: roles of MAPK responses to oxidative stress, Tokai J Exp Clin Med, 査読有、Vol. 35、No. 4、2010、pp. 152-64

[学会発表] (計4件)

- ① Tomoko Kojima, Emiko Akasaka, Masayuki Kato, Tomotaka Mabuchi, Norihiro Ikoma, Takashi Matsuyama, Akira Ozawa, Yosuke Horikoshi, Kentarou Toriumi, Hideyo Henzan, Susumu Takekoshi, Naoya Nakamura, Oxidative stress mediated NF-kB activation regulates epidermal cell proliferation and differentiation in psoriasis, 36<sup>th</sup> The Japanese Society for Investigative Dermatology、2011.12.09-10 京都国際会議場(京都市)
- ② Emiko Akasaka, Susumu Takekoshi, Shoutarou Tsutiya, Kentarou Toriumi, Tomotaka Mabuchi, Norihiro Ikoma,

Shiho Tamiya, Takashi Matsuyama, Muneo Miyasaka, Yoshiyuki Osamura and Akira Ozawa, Relationship between antioxidative enzymes and oxidative stress using immunohistochemical analysis in chronic UV-exposed human skin, 19th Congress of the EADV、2010.10.06-10 Swedish Exhibition Centre (ヨーテボリ)

- ③ Emiko Akasaka, Susumu Takekoshi, Shoutarou Tsutiya, Kentarou Toriumi, Mabuchi Tomotaka, Norihiro Ikoma, Shiho Tamiya, Takashi Matsuyama, Muneo Miyasaka, Yoshiyuki Osamura, Akira Ozawa, The relationship between antioxidative enzymes and oxidative stress using immunohistochemical analysis in chronic UV exposed human skin clinically, 34<sup>th</sup> The Japanese Society for Investigative Dermatology, 2009.12.04-05 JALリゾートシーホークホテル福岡(福岡市)
- ④ 赤坂江美子、竹腰 進、鳥海健太郎、土屋翔太郎、宮坂宗男、長村義之、小澤 明 皮膚組織における紫外線・酸化ストレス障害に応答するシグナル伝達と抗酸化システムの検討、第98回日本病理学会総会、2009.05.03 国立京都国際会館(京都市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小澤 明 (OZAWA AKIRA)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：20096209

### (2) 研究分担者

竹腰 進 (TAKEKOSHI SUSUMU)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：70216878

生駒 憲広 (IKOMA NORIHIRO)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：40407979