

機関番号：12102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791060

研究課題名 (和文) 紫外線による皮膚発癌におけるストレスタンパク質 A170 の機能解析

研究課題名 (英文) Molecular function of stress protein A170 in skin carcinogenesis by UV radiation

研究代表者 石井 良征 (ISHII YOSHIYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：90455931

研究成果の概要 (和文)：

A170 タンパク質は酸化ストレス誘導タンパク質であり、その遺伝子ノックアウト (KO) マウスのフェノタイプは過食による肥満とインスリン抵抗性、脂肪肝、高レプチン血症を呈することが発見されている。我々は A170 KO 胎児線維芽細胞が UVB 照射に対して抵抗性でありアポトーシスが起きにくいこと、Bcl-2 の発現が上昇していることを発見している。本研究課題では、A170 がアポトーシスシグナルにどのように関わっているか、紫外線による皮膚発癌にどう関わるかを探ることを目的として以下の実験を行なった。まず、A170 KO と WT の MEF に UVB を照射し Annexin と PI の 2 重染色によるアポトーシスの程度を比較した。その結果、A170 KO 細胞はアポトーシスが顕著に抑制されることが明らかになった。この現象は、WT 細胞を siRNA 処理により A170 をノックダウンした細胞でも認められた。次に、アポトーシスの誘導に関わる様々なシグナル伝達因子の状態を、まずウエスタンブロットによりタンパク質レベルで調べた。その結果、KO 細胞では UVB 刺激による Bax, caspase 等のアポトーシス誘導因子のレベルが低下していた一方、アポトーシス抑制因子である src や Bcl-2 などのレベルが野生型細胞と比べ著しく上昇していた。そこで次に、これらのアポトーシス抑制因子の発現に重要な転写因子である Stat3 の状態について解析したところ、KO 細胞において活性化亢進が認められた。これらのことから、A170 は Stat3 の活性化を調節しており、欠損細胞内では Stat3 の活性化が亢進することでアポトーシス抑制因子の発現が上昇し、その結果として UVB 刺激によるアポトーシスが起きにくくなっていることが明らかとなった。さらに、個体レベルでの解析からも、A170 KO マウスは UVB による皮膚組織のアポトーシスを起こしにくいことが明らかになり、A170 はアポトーシスシグナルを調節する重要な因子であることを、培養細胞、個体レベルの両面で明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, the role of A170 in UVB induced apoptosis was investigated. A170 is known to stress inducible gene, and A170 deficient mice show mature onset obesity. We previously found mouse embryonic fibroblast (MEF) derived from A170 KO mice were resistant to UVB induced cell death. At first, we analyzed whether A170 knocked down wild type MEF show same characters as KO MEF against UVB radiation. The results shows knockdown cells are also resistant to UVB. Next, the proteins involved in the apoptotic signal were analyzed. Interestingly, pro-apoptotic protein levels such as Bax, caspase after UVB exposure were reduced in KO cells. In addition, anti-apoptotic protein mRNA levels were markedly increased in KO cells compared with WT. We found transcription factor Stat3 which is known to positively regulates anti-apoptotic gene induction was remarkably activated in KO cells. Moreover, in vivo analysis revealed that A170 KO mice skin tissue show relatively low damage by UVB radiation. These results suggest that A170 is novel important factor for regulating apoptotic signal by altering pro- and anti-apoptotic protein levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：紫外線障害

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫以外の皮膚癌（基底細胞癌、扁平上皮癌）の90%以上は、紫外線のうちUVBとの関連があると考えられている。世界保健機関(WHO)の推測によれば、全世界での紫外線の浴びすぎによる悪性黒色腫以外の皮膚癌での死亡者数は年間12,000人に上る。国連環境計画(UNEP)では、成層圏のオゾンが10%減少すると、全世界で悪性黒色腫以外の皮膚癌患者発生数が年間でさらに30万人増加すると推測しており、UVによる発癌は、環境問題とともに重要性を帯びてきている。

UVによる発癌は主として、現在、二つの発癌機序が考えられている。一つは1) UVBによる遺伝子損傷で、UVBが基底細胞のDNAに吸収されて産生したピリミジン二量体や活性酸素によるDNA損傷によるもの。もう一つは、2) 変異細胞を異物として認識する免疫監視機構をUVBが抑制し、修復機能や排除機能を抑制するもの。などである。1)の遺伝子損傷では、アポトーシスの異常が発癌の過程に重要となっている。細胞は老化・欠損して死滅する時に新しい細胞が生じて置き換わっているが、特定の遺伝子に突然変異が生じると、このプロセスの秩序を乱して死滅すべき細胞が死滅しなくなり、腫瘍が発症する。よって、UVBによる発癌では、アポトーシス関連遺伝子の異常についての報告が多数なされている。

A170/p62/sequestosome1 タンパク質は、A170として1996年に筑波大石井(哲)らによりマウスマクロファージからクローニングした酸化ストレス誘導タンパク質で、その機能が、徐々に明らかにされつつある。同研究室では、A170遺伝子ノックアウトマウスを制作し、そのフェノタイプ解析から過食による肥満とインスリン抵抗性、脂肪肝、高レプチン血症などを発見した。一方、酸化ストレスタンパク質の性質から、UVBによる細胞傷害について検討していたところ、その解析の過程で、ノックアウトマウス由来のA170

(-/-)胎児線維芽細胞がUVB照射に対して抵抗性でありアポトーシスが起きにくいこと、Bcl-2の発現が上昇していることを発見した。よって、今回、A170が、アポトーシスシグナルにどのように関わっているか、そして、紫外線による皮膚発癌にどう関わるかを探ることを目的として、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の2年間で、1) A170ノックアウトマウスを用いた*in vivo*の系で、A170欠損によるアポトーシスの抑制が皮膚発癌に結びつくかどうか検証する。2) A170(-/-)細胞を用いた*in vitro*の実験でA170がアポトーシスシグナル上のどこに位置しているかを調べる。

1)では、紫外線による発癌をノックアウトマウスを用いて、発癌の発生率に差があるか定量評価し、サンバーンによる皮膚の障害と浮腫の評価をおこない、2)では*in vitro*の実験でノックアウトマウス由来胎児線維芽細胞を用いて、FACSでアポトーシス抵抗性を確認し、リン酸化シグナルとシグナル上のどの部分の異常がA170の欠損によって引き起こされるかを調べる。

以上の解析をおこなうことによって、A170とアポトーシスの関連を探り、UVB照射による発癌の新しいメカニズムを明らかにするとともにアポトーシスにおけるA170の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

野生型(WT)、A170欠損(KO)マウスより調製した胎児繊維芽細胞(MEF)を実験に用いた。個体を用いた実験では、各種雄性8-10週齢のマウスを用いた。

(1) UVB誘導性アポトーシスにおけるA170の役割

各種MEFにUVBを照射し、一定時間経過後に起きるアポトーシスをFACS、MTTアッセ

イにより調べた。

(2) アポトーシス、抗アポトーシス関連遺伝子、タンパク質の解析

リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法により Src, Stat3, Bcl-2, Bcl-xL の発現量、およびリン酸化状態を解析した。

(3) UVB による DNA 障害の検出

DNA 修復応答遺伝子である ATM の発現量をリアルタイム PCR 法により定量することで評価した。

(4) 個体レベルにおける UVB による皮膚障害の評価

雄性マウスを除毛し、麻酔下で UVB を照射した後に皮膚病理切片を作製した。HE 染色により凝集した核を持つ表皮細胞をカウントすることでアポトーシスの度合いを調べた。

4. 研究成果

(1) UVB 誘導性アポトーシスにおける A170 の役割

A170 KO マウス由来 MEF は UVB 照射により誘導されるアポトーシスを起こしにくいことが明らかになった。この現象は、WT MEF を siRNA によりノックダウンした細胞においても確認され、UVB 誘導アポトーシスにおける A170 の関与が明確になった (図 1)。

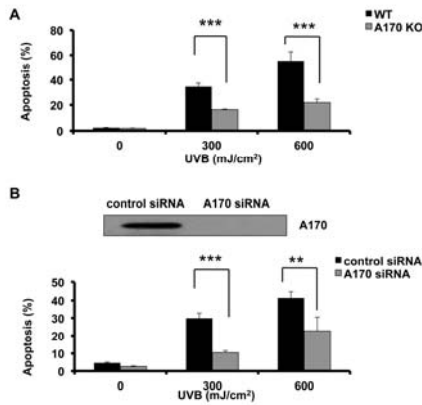


図1 UVB障害に対するWTとA170欠損MEFの比較

(A) WTとA170-KO MEFにUVBを300あるいは600 mJ/cm²それぞれ照射し、24時間後の細胞をAnnexinV/PIで染色しアポトーシス細胞をFACSで解析した。(B) siRNAによりA170をノックダウン(KD)したMEFとコントロールMEFにUVBを300あるいは600 mJ/cm²それぞれ照射し、24時間後に細胞をAnnexinV/PIで染色しFACSでアポトーシス細胞を定量化した。 ** P<0.01 *** P<0.005

(2) アポトーシス、抗アポトーシス関連遺伝子、タンパク質の解析

抗アポトーススに関わることが知られている因子についてウエスタンブロットによる解析を行なった。A170 KO 細胞は、Src のリン酸化、Stat3 のリン酸化が基底状態で亢進していた (図 2)。

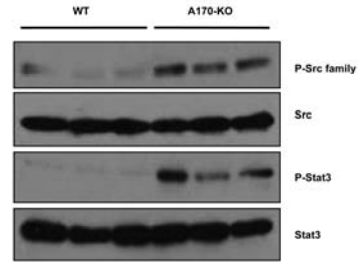


図2 WTとA170-KO MEFにおけるSrcとStat3のリン酸化レベルの比較

WTとA170-KO MEFでSrcとその基質の一つであるStat3のリン酸化レベルをそれぞれに特異的な抗体を使用しウエスタンブロットにより検出した。

また、Src の阻害剤を処理すると、KO マウスの UVB に対する感受性は顕著に高まった (図 3)。これにより、Src 経路の亢進が関与していることが明らかになった。さらに、KO MEF では抗アポトーシス因子である Bcl-2,xl の mRNA 発現量の亢進が見られた (図 4)。

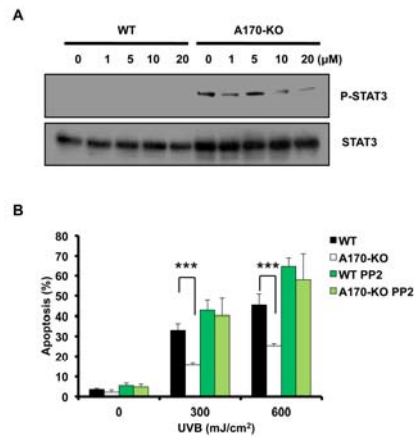


図3 Srcキナーゼ阻害剤PP2によるStat3のリン酸化阻害とUVB障害への影響

(A) WTとA170-KO MEFをSrc阻害剤PP2を1-20 μMで処理し、ウエスタンブロットによりStat3とP-Stat3を比較した。(B) WTとA170-KO MEFをPP2(20 μM)で12時間処理し、UVBを300と600 mJ/cm²それぞれ照射し、24時間後の細胞をAnnexinV/PIで染色しアポトーシス細胞をFACSで定量化した。 ***P<0.005

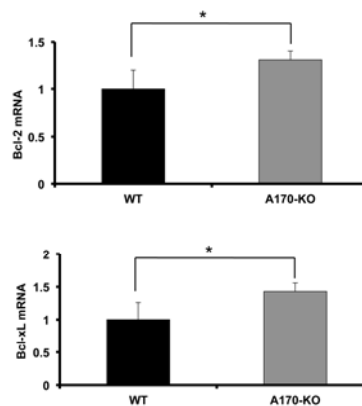


図4 WTとA170-KO MEFにおけるBcl-2とBcl-xL mRNA発現量の比較

WTとA170-KO MEFで転写因子Stat3によって転写誘導される抗アポトーシス因子であるBcl-2とBcl-xLのmRNAの発現量をリアルタイムPCRにより定量化した。 *P<0.05

(3) UVB による DNA 障害の検出
UVB による ATM の発現量は、WT と KO

で変わらなかったことから、UVB による DNA の障害は KO MEF でも同程度に起きると考えられた (図 5)。

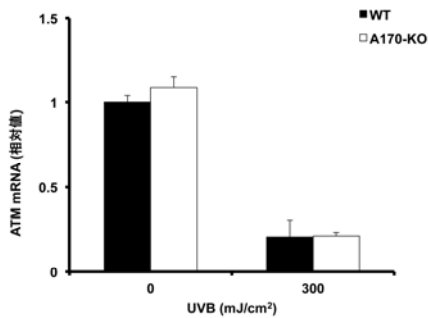


図 5 WTとA170-KO MEFにおける修復応答遺伝子ATM mRNAの相対的発現量

WTとA170-KO MEFにUVBを300 mJ/cm²照射し、12時間後のDNAダメージにより応答する遺伝子であるATMのmRNAの発現量をリアルタイムPCRにより検出した。

(4) 個体レベルにおける UVB による皮膚障害の評価

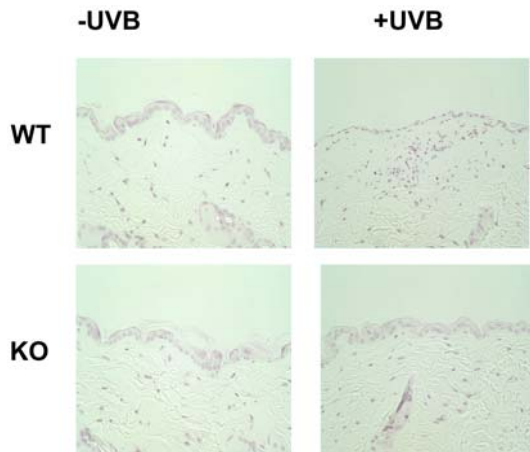


図 6 UVB皮膚障害の比較

WTとA170-KOマウスにUVBを200 mJ/cm²照射し、24時間後の皮膚をホルマリン固定後、切片をHE染色し光学顕微鏡で観察した。UVB照射したWTの表皮では核の凝縮が起こっているが、A170-KOの表皮では核の凝縮が見られない。

マウス個体に UVB を照射し、皮膚組織の障害の程度を組織学的に観察した。A170 KO マウスは培養細胞での検討の結果と同様に、障害がより軽微であった (図 6)

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)

Kimura S, Warabi E, Yanagawa T, Ma D, Itoh K, Ishii Y, Kawachi Y, Ishii T. Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from

UVA by quercetin. Biochem Biophys Res Commun. 387, 109-114, 2009 査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 良征 (ISHII YOSHIYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：90455931