

A-4. 紫外線の増加が人の健康に及ぼす影響に関する研究

(1) 点突然変異等を指標とした紫外線量と皮膚癌との相関に関する疫学的研究

研究代表者 国立がんセンター研究所 渡辺 昌

研究グループ

基礎的研究

国立がんセンター研究所 宗像信生

群馬大学医学部 中島 孝

金沢大学薬学部 二階堂修

臨床的研究

北海道大学形成外科 大浦武彦

横浜市立医大皮膚科 中島 弘

九州大学皮膚科 堀 嘉昭

(委託先)

埼玉医科大学皮膚科 池田重雄

神戸大学皮膚科 市橋正光

鹿児島大学皮膚科 田代正昭

海外:

サンパウロ大病理 Kiyoshi Iriya

平成2-4年合計予算額 37,459千円

「要旨」

日本人の皮膚がんが紫外線の影響をどれくらい受けているかを、過去30年間の死亡率の変化、また過去10年間の都道府県別皮膚癌およびメラノーマの標準化死亡比を検討した。皮膚癌の死亡率の減少は見られるが、それは皮膚科領域の診断、治療の進歩が寄与するところが多いと思われた。県別標準化死亡比をみると沖縄、鹿児島、高知などが高く、紫外線との関連が示唆された。罹患率の把握は困難であるが、長崎、広島の罹患率とブラジル日系人の罹患率を比較すると、ブラジル日系人の方が5倍近く、日光暴露の違いが皮膚癌を増加させている可能性が示唆された。

紫外線の影響をさらに遺伝子レベルで把握するため、ピリミジンダイマー、p53蛋白、p53遺伝子異常を紫外線による皮膚癌の前癌病変とみなされる日光角化症で研究した。すでに前癌病変でp53遺伝子の異常がおきていることが発見できた。これは皮膚癌検診の良い指標になる可能性がある。

「キーワード」

皮膚癌、日光角化症、ピリミジンダイマー、p53、死亡率、罹患率

1. 序

紫外線の人への影響は、皮膚癌、白内障、免疫能低下の3つである。地球環境問題の中でオゾンホール拡大は大きな問題になっているが、それはオゾンホール拡大によって紫外線量がふえ、皮膚がんの増加が予測されるからである。皮膚がんには主たるものとして比較的良性の基底細胞がん、悪性の扁平上皮がん、メラノーマがある。これら皮膚腫瘍のうち前2者は明らかに紫外線に影響されている。しかし、日本人でどれほど影響を受けているかという実態を明らかにすることが必要である。

また、紫外線曝露の指標となる物質を遺伝子レベルでみつけることが緊急の要となっている。平成2年度から4年度の研究費により実態の把握と、紫外線による皮膚癌前癌病変の発見および癌化の指標となる生体指標の発見を目指して研究を行った。

2. 研究目的

紫外線と皮膚癌の関係をあきらかにするために皮膚癌死亡率の経年変化、都道府県別標準化死亡比を比較検討する必要がある。厚生省統計情報部の人口動態統計にもとずいて検討する。また緯度の異なる札幌、埼玉、前橋、神戸、福岡、鹿児島、那覇の各大学の皮膚科受診患者の動向を調査し、紫外線関連疾患の増加が窺えるか調査する。

紫外線の皮膚がん発症モデルに色素性乾皮症が良く研究されているが、一般の皮膚癌の発生機序と同じかどうか不明である。日光曝露による皮膚病変として日光角化症があるが、紫外線曝露の指標となる生物学的マーカーを前癌病変である日光角化症を例に検討する。DNA付加体としてのT-T dimerおよびp53がん抑制遺伝子を主に研究した。

3. 研究方法

紫外線と皮膚癌の関係をあきらかにするために皮膚癌死亡率の経年変化、都道府県別標準化死亡比を厚生省統計情報部の人口動態統計にもとずいて検討した。また緯度の異なる札幌(北緯43度)、埼玉、前橋(36度)、神戸、福岡(33.5度)、鹿児島(31.5度)、那覇(26度)の各大学の皮膚科受診患者の過去10年間の動向を調査し、日光角化症、基底細胞癌、扁平上皮癌、メラノーマおよび脂漏性角化症等の統計をとる。

T-T dimerとp53遺伝蛋白の蓄積の有無、p53遺伝子変化については以下のように行った。症例は各地病院から凍結状態でおくられてきた光線角化症生検組織である。年齢は67歳から85歳(平均78.6歳)である。部位は頬部11例、側頭部2例、鼻部2例、胸部2例、頸部1例である。凍結切片は4%パラホルムアルデヒドで数秒間固定した。

T-T dimerについてはヌードマウスを用いて紫外線照射し、その後、種々の固定条件を検討した。ヌードマウスにたいする照射は0, 1, 2, 5, 10 minimal erythemadoses行った。T-T dimerにたいする抗体は紫外線照射をしたサーモン精子DNAをもちいて家兎を免疫することによって作成した。免疫染色前に2N塩酸処理をおこなった。

p53蛋白についてはpAb1801モノクローナル抗体をもちい、Avidin Biotinyl peroxidase免疫

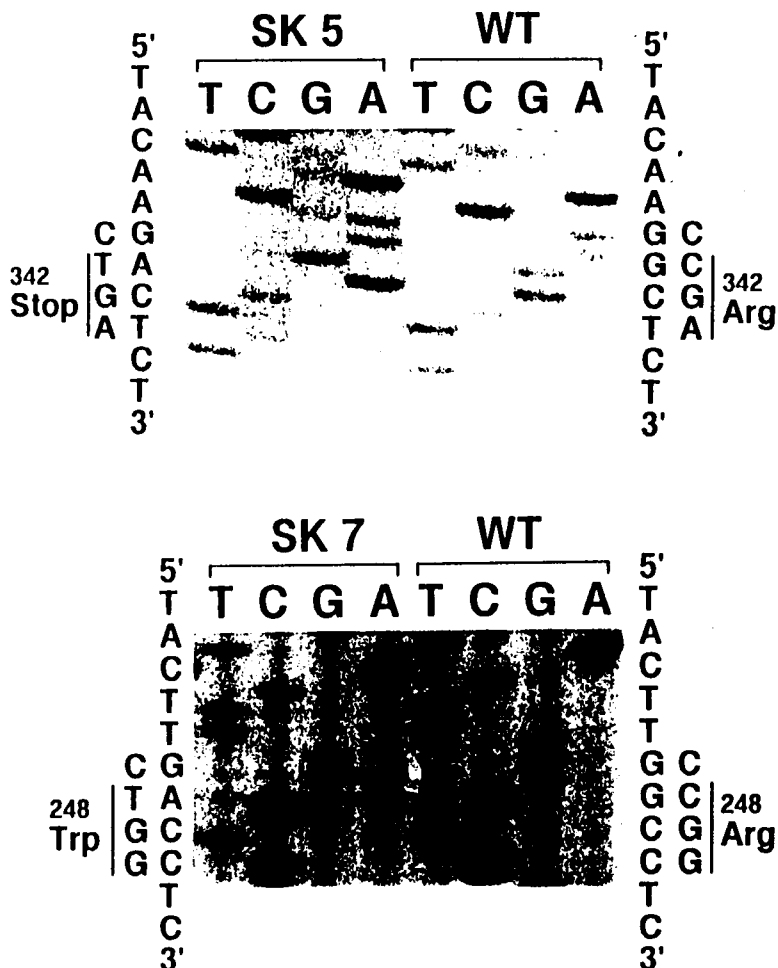
染色法をもちいてAMeX固定、凍結切片の両方を検討した。

日光角化症14例18病巣（凍結切片9例、AMeX切片9例）については各切片から抽出したDNAに関し、p53遺伝子のエクソン2-11の領域をPCR-SSCP法により検索した。各プローブは全領域をカバーしている。

さらに紫外線のDNA障害性を細菌の胞子を用いて生物学的に定量する試みを行った。

4. 研究結果

皮膚癌死亡率の変遷、都道府県皮膚癌標準化死亡比について以下に示す。皮膚癌死亡の低下は見られるが、地域的には鹿児島、高知、沖縄等紫外線が強いと思われる地域に皮膚癌死亡の多い傾向があった。鹿児島大学、九州大学、神戸大学、横浜大学、埼玉医大などの施設で外来を受診した皮膚癌および前癌病変の頻度をみると日光角化症の頻度とともに日光角化症由来の扁平上皮癌の増加がみられた。



紫外線曝露が関係すると思われる皮膚癌の前駆段階で曝露量を推定する生体指標について染色結果を表にしめすが、T-T dimerはヌードマウスでは染色されてもヒト皮膚では染色されなかった。おそらくDNA修復酵素の働きにより通常の曝露では検出できるだけのT-T dimerが残存しない為と思われる。それに対し、p53蛋白は光線角化症全体で28%の症例が陽性を示した。とくに組織型別にみるとボーエン型が57%、萎縮型が14%でその他の型は陰性であった。これら陽性例は細胞異型がとよく前がん期にあるといえる。

Table 1. Staining results of T-T dimer and p53 protein.

	T-T dimer	p53 protein
Nude mice 0 MED	0/2	NA
2 MED	4/4	NA
5 and 10 MED	2/2	NA
Solar keratosis		
Bowenoid type	0/7	4/7 (57%)
Atrophic type	0/7	1/7 (14%)
Other type	0/4	0/4 (0%)

日光角化症18例中6例(33%)にP53遺伝子の変異が検出された。これらの変異の内訳は、点突然変異5例(ミスセンス変異4例、ノンセンス変異1例)と4塩基対の欠失1例であった(Table 2)。一塩基置換を示した5例中4例(80%)は、ピリミジン塩基が2個並んだ位置に限局していた。前癌状態である日光角化症においてすでにP53遺伝子のジピリミジン位置に変異の存在が示されたことから、この遺伝子変化は扁平上皮癌発生過程の初期の段階に関与している可能性が示唆された。

Table 1 Aberrations of p53 gene and p53 protein in epithelial skin tumors

Case	Histological	Tumor site	IHC staining	Aberration of p53 gene	p53 alteration		
					Exon	Codon	Base change / Amino acid
Solar keratosis							
SK5	atrophic	cheek	+	-			
SK40	bowenoid	head	+	-			
SK19	bowenoid	cheek	+	+	4	109	TTC - TCC :T-C Phe - Ser
SK18	atrophic	cheek	+	+	4	110	cC*GT - cTGT :C-T Arg - Cys
SK33	bowenoid	nose	-	+	6	194	CTTATCCG - CTG 5base deletions
SK25	atrophic	temple	-	+	6	215	AGT - AGG :T-G Ser - Arg
SK7	bowenoid	chest	+	+	7	248	cC*GG - cTGG :C-T Arg - Trp
SK27	bowenoid	temple	-	+	8	271	GAGGTGC - GGC 4base deletions
SK8	bowenoid	chest	+	+	8	278	TCCT - tACT :C-A Pro - Thr
SK4	bowenoid	cheek	-	+	10	342	cC*GA - cTGA :C-T Arg - Stop
Squamous cell carcinoma							
SCC1		lower lip	+	-			
SCC3		cheek	+	+	7	247-248	AAC C*GG - AAG TGG :CC-GT Asn Arg - Lys Trp
SCC4		head	+	+	7	248	acC*GG - acTGG :C-T Arg - Trp

* : mutation at CpG methylation site
IHC : Immunohistochemical

細菌の胞子を用いて紫外線のDNA障害性を測定する系は良い検量直線が得られ、簡便なバイオメータとできる可能性が開けた。

5. 考察

日本人の皮膚癌発症率は世界でも低い方に属するが、国内での皮膚癌標準化死亡比をみると紫外線が多いと思われる沖縄、鹿児島、高知などが高く、紫外線の皮膚癌発生への影響が日本人においても無視できない。これはブラジルへ移民した日系人の皮膚癌罹患率が5倍ほどにもなることから窺える。

紫外線による発がんの生体指標として利用可能なものにp53遺伝子の変化が発見できた。核内p53蛋白の蓄積のみられる場合はp53遺伝子に突然変異のあることが報告されている。今までに皮膚の扁平上皮癌、肺癌、乳癌などでp53遺伝子産物の異常蓄積が報告されている。p53遺伝子はがん抑制遺伝子として多くのがんの発生に関係していることが明かにされてきたが、がん以外の病変での報告はない。今回の研究でp53遺伝子の全領域をカバーするプローブを用いて検討した結果、日光角化症のp53変化のかなりの部分は紫外線特異的な変化をしめすことがわかった。従来紫外線曝露の指標としてDNAのdimer形成がとりあげられてきたが、ヌードマウスで照射直後には検出されたが、ヒト光線角化症例の皮膚での検出は感度以下と思われ、実用性は低いと思われた。

6. まとめ

紫外線増加と皮膚癌発症は日本においても将来大きな問題になる可能性が認められた。紫外線照射にからんだ前癌病変をしめす遺伝子変化はいままで知られていなかったが、p53遺伝子の突然変異のあることが発見でき、今後遺伝子変化の同定、紫外線曝露量との関係を組織像と関係させて分析できるという可能性を開いた。

7. 本研究により得られた成果

紫外線による皮膚病変の代表的なものは光線角化症であるが、その亜型の分布をみると北海道では萎縮型が多く、鹿児島ではポーエン型、あるいは過形成型が多い。ポーエン型は平上皮がんへの移行が多い。このような型にp53蛋白の核内異常蓄積が発見できたことは今後、紫外線曝露の生体指標として有用であることがわかった。

8. 発表論文

- 1) Watanabe S, Arimoto H. Standardized mortality rates of cancer by prefecture in 1979-1981 and 1984-1986 in Japan. *Jpn J Clin Oncol* 20: 316-337, 1990
- 2) Tsugane S, Gotlieb SLD, Laurenti R, DeSouza JM, Watanabe S. Cancer mortality among Japanese residents of the city of Sao Paulo, Brazil. *Int J Cancer* 45: 436-439, 1990
- 3) Tsugane S, deSouza JMP, Costa ML, Mirra AP, Gotlieb SLD, Laurenti R, Watanabe S. Cancer incidence rates among Japanese immigrants in the city of Sao Paulo, Brazil, 1969-78. *Cancer Causes Control* 1: 189-193, 1990
- 4) Munakata N, Saito M, Hieda K. Inactivation action spectra of bacillus subtilis spores in extended ultraviolet wavelengths (50-300 nm) obtained with synchrotron radiation. *Photochem Photobiol* 54:761-768, 1991
- 5) Matsunaga K, Hieda K, Nikaiado O. Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4)photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm, *photochem. photobiol.*,54,403-410(1991)
- 6) Mori T, Nakane M, Hattori T, Matsunaga T, Ihara M, Nikaido O. Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or(6-4)photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA, *Photochem.Photobiol.*,54,225-232(1991)
- 7) Mizuno T, Matsunaga T, Ihara M, Nikaido M. Establishment of a monoclonal antibody recognizing cyclobutane-type thymine dimers in DNA:A comparative study with 64M-1 antibody specific for (6-4)photoproducts, *Mutation Res.*, 254,175-184(1991)
- 8) Amanai K, Sakai M, Sakurai S, Mori T, Nikaido O, Ohtaki T. Occurrence of lectin in the silkgland of the silkworm, *Bombyx mori*, *Develop. Growth & Differ.*,33,421-427(1991)
- 9) Suzuki K, Suzuki F, Nikaido O, Watanabe M. Suppression of differentiation phenotypes in myogenic cells:Association of aneuploidy and altered regulation of c-myc gene expression, *Exptl.Cell Res.*, 195,416-422(1991)
- 10) Munakata N, Hieda K, Usami N, Yokoya A, Kobayashi K. Inactivation action spectra of Bacillus subtilis spores with monochromatic soft X rays of synchrotron radiation. *Radiat Res* 131: 72-80, 1992
- 11) Taguchi M, Watanabe S, et al. Immunohistochemical examination of tumor suppressor gene p53 product and thymine-thymine dimer in solar keratosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 119: 260-262, 1993
- 12) Munakata M, et al. Biologically effective dose of solar ultraviolet radiation estimated by spore dosimetry in Tokyo since 1980. *Photochem Phtobiol* (in press)

9. 国際共同研究等の状況

ブラジルで開かれた環境サミットに基づき、WHOとIARCは共同で紫外線による疾患としてメラノーマを含む皮膚癌、白内障、免疫能低下を世界的に調査する計画をたて1993年から施行する予定である。日本においても世界的共同研究の一環として調査に参加することは極めて意義が大きい。紫外線と皮膚癌の関係に関するアジア地域のデータはオーストラリアを除き、全く無い状態なので黄色人種のデータをだす必要がある。本研究でブラジル側と共同研究をおこない、日系人の皮膚癌は本邦の5倍近いことが明かになった。