

#### A-4 紫外線の増加がヒトの健康に及ぼす影響に関する研究

##### (1) 紫外線が皮膚ガン発症の素過程に及ぼす影響に関する研究

研究代表者 国立環境研究所 青木康展

環境庁 国立環境研究所

環境健康部	部長	遠山千春
	生体機能研究室	藤巻秀和
	病態機構研究室	青木康展
(委託先)	京都大学医学部	野田 亮
共同研究者	共立薬科大学	小林静子

平成5-7年度合計予算額 25,482千円  
(7年度予算額 6,697千円)

[要旨] 本課題においては紫外線(UV-B)照射が引き起こす遺伝子変異、プロトオンコジーンなどの遺伝子発現および免疫系への影響を実験動物や培養細胞を用いて明らかにした。

[キーワード] 皮膚ガン、癌遺伝子発現、免疫担当細胞、遺伝子変異

#### 1. UV-Bによる動物細胞の遺伝子変異

まとめ

2つの選択マーカー(HSV-tk、neo)を持ったレトロウイルス・ベクターを用い、ラット線維芽細胞CRE-F株における各種紫外線の影響(細胞障害及びtk遺伝子の変異)を検討した。その結果、254nm、300nmにおけるこれらの作用は、以前に報告されている大腸菌での結果と良く一致したが、320nmにおいては大腸菌の場合に比べて、ほぼ一桁高い値が得られた。また、320nmにおいては、チミンダイマー形成に伴って一般的に見られるtransition変異に加え、tandem double mutation、複数変異の群発等、特徴的な変異の頻度上昇が見られた。

はじめに

オゾン層の破壊に伴い、地表に達するUV-Bが増加されている。特に300-320nmの紫外線量の増加が予測されている。これまで、各波長の紫外線の持つ生物作用に関して

は、大腸菌を用いた詳しい研究が為されており<sup>1)</sup>、また動物細胞においても、UV-Bの効果については、これまでにいくつかの報告がある<sup>2-4)</sup>が、動物細胞において、純粋な波長を持った紫外線を用いて、各波長における線量-活性特性(アクションスペクトル)を調べた例は無い。このアクションスペクトルは紫外線による発がんなどのリスク評価を行う際に必須である。また、各波長で起こる変異の質に関する情報も不足している。そこで、本研究においては、我々が開発した、動物細胞変異検出系(LTK15/CREF細胞)<sup>5)</sup>を用いて、254, 290, 300, 及び320nmの紫外線の細胞障害及び変異誘発効果を検討した。

## 研究方法

LTK15/CREF細胞を用いた細胞障害活性、及び変異原性の測定は、既に報告した方法によった<sup>5)</sup>。まず、単純疱疹ウイルス(HSV)のチミジンキナーゼ(TK)遺伝子とポジティブ選択マーカーneoとを組み込んだレトロウイルス・ベクターLTK-15をラット線維芽細胞株CREFに感染させた後G418選択を行うことにより、大多数が細胞当たり1コピーのLTK-15プロウイルスを含む細胞集団を作成した。

このLTK15/CREF細胞を60 mmシャーレの200細胞(細胞傷害活性用)あるいは100mmのシャーレに $1 \times 10^6$ 細胞(変異誘導活性用)の濃度で培地(10%ウシ胎仔血清などを含むDulbecco modified Eagle's medium)と共にまき込んだ。24時間後に紫外線を照射し、さらに培養を続けた。60 mmシャーレの場合、照射後3日目に細胞の濃度に応じて培地を交換するか、5-10倍に植え継いだのち、6日目にギムザ染色によりコロニー数を数えた。100 mmシャーレ中の細胞は照射後6日目に、60 mmのシャーレに200細胞を同じ培地で植え継ぎ、同時に、100 mmのシャーレに $1 \times 10^6$ 細胞を100  $\mu$ Mのアシクロビルを含む培地で植え継いだ。60 mmシャーレ中のコロニー数は1週間後、100 mmシャーレ中のアシクロビル耐性のコロニー数は10-14日後にギムザ染色の後に数えた。紫外線源としては、Vilber Lourmat社製 Biotronic (290, 300, 320nmフィルター(Barr社製)使用、フィルターより細胞までの距離は約5cm)及び、東芝製殺菌灯GL-15 (254nm、中央10cmを残してアルミホイルにて覆ったものを使用、細胞までの距離は60cm)を用いた。Biotronicの各波長における実効線量の補正は標準光源(Optronic Laboratory社製)を用いて行った。また、Biotronic照射は、PBS (5ml/100mm dish, 2ml/60mm dish)を加えたプラスチック・シャーレ(Corning)のフタをした状態で行い、この条件下で細胞付着面に到達する紫外線量を実測し照射線量とした。また、殺菌灯照射は、液を除きフタをはずした状態で行った。

HSV-tk遺伝子の塩基配列は、300 nmおよび320 nmの紫外線を照射後得られたG418及びアシクロビル耐性細胞クローンの全DNAより、蛋白コーディング領域全体を含む1261塩基対のDNA断片をPCR法によって増幅後、蛍光標識プライマーを用いたcycle sequencing法によってラベルし、自動sequencer (ABI 373S)を用いて解析した。HSV-tk遺伝子全体が増幅できないサンプルについては、別のPCRプライマーを用いてHSV-tkの一部あるいはneo遺伝子の

存在を確認した。また、殺菌灯照射 ( $0.8\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) 細胞より生じた耐性コロニーを8クローン単離し、ゲノム DNA より PCR-SSCP 法及びdirect sequencing 法を用いて、HSV-tk 遺伝子 coding region 内の変異の種類を解析した。

## 結果

### ①細胞障害活性

各波長の紫外線を様々な線量照射した際の、LTK15/CREF細胞のコロニー形成頻度を測定した(図1)。また、これらのデータより、コロニー数が無処理コントロールに比し50%に減ずる時のエネルギーを求め、一定エネルギー当たりの細胞障害活性の比としてプロットした(図2)。調べた波長領域では、一定エネルギー当たりの細胞障害活性は波長が長くなるに従って減少した。

### ②変異誘導活性

前項と同様の紫外線照射を行った後、アシクロビル耐性細胞の出現頻度を測定した(図3)。290nmでは $1\text{mJ}/\text{cm}^2$ で弱い変異誘導活性が認められたが、それ以上の線量では検出できなかった。254、300及び320nmにおいては良好なdose-response curveが得られたため、 $10^5$ 細胞当たり10個のアシクロビル耐性コロニーを与える線量を図3より求め、一定エネルギー当たりの相対的な変異誘導活性としてプロットした(図4)。

### ③254nm, 300nm及び320nm紫外線による変異の種類

254nm, 300nm又は320nmの紫外線を照射後、得られたG418及びアシクロビル耐性コロニーをクローニングし、ゲノム中の HSV-tk遺伝子の塩基配列を決定した。254 nmでは8例中6例に SSCP レベルでの変異が見つかり、その内2例は dipyrimidine 部分における C→T transition であり、古典的なチミンダイマー・モデルで説明できるものであった。また、CT→TC tandem double mutation という稀な変異が1例見い出された(表1)。他の3例は、比較的小さな DNA 欠失であった。なお、このうちの2例は同一の変異であったが、独立なクローンである保証はない。

300nmでは、2個のチミンが並んだ部位での transition と高線量(長時間照射)時の比較的大きな欠失が高頻度に見られたが、一方320nmでは transition 及び tandem double mutation の頻度が上がり、また、複数の変異が数塩基から十数塩基の間に群発して起こった例が4例見出された。

図1 LTK15/CREF細胞のコロニー形成能に対する各波長紫外線の効果

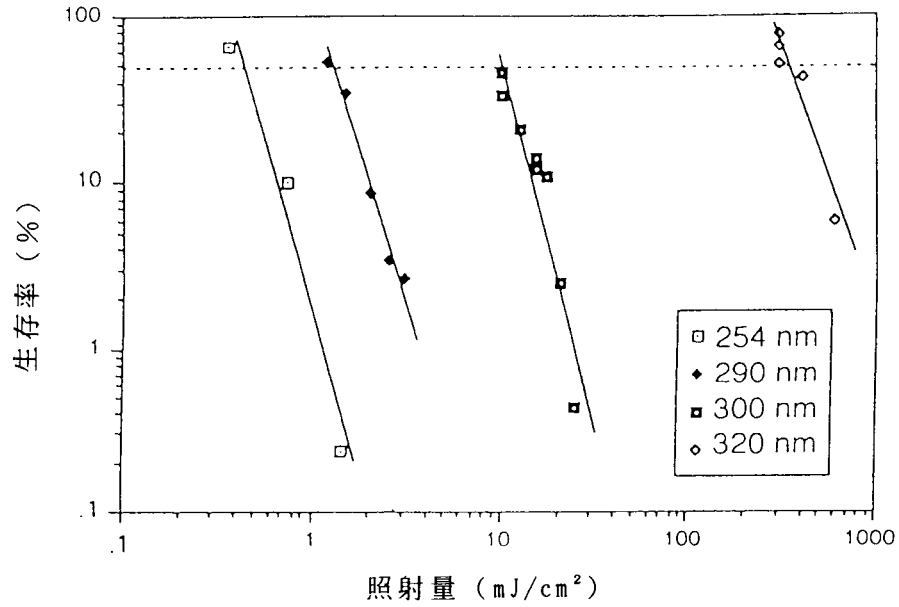


図3 LTK15/CREF細胞中のHSV-tk遺伝子に対する各波長紫外線の変異誘発効果

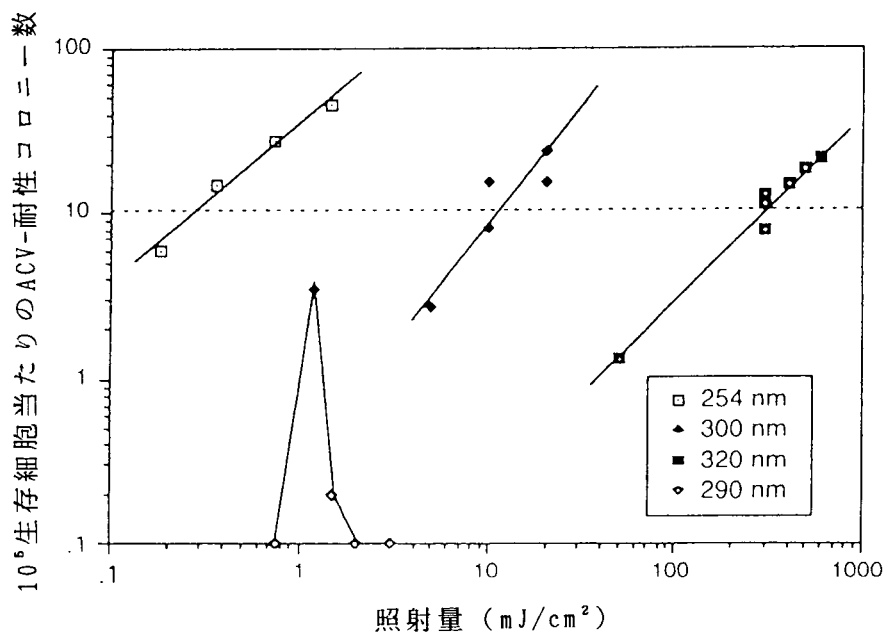
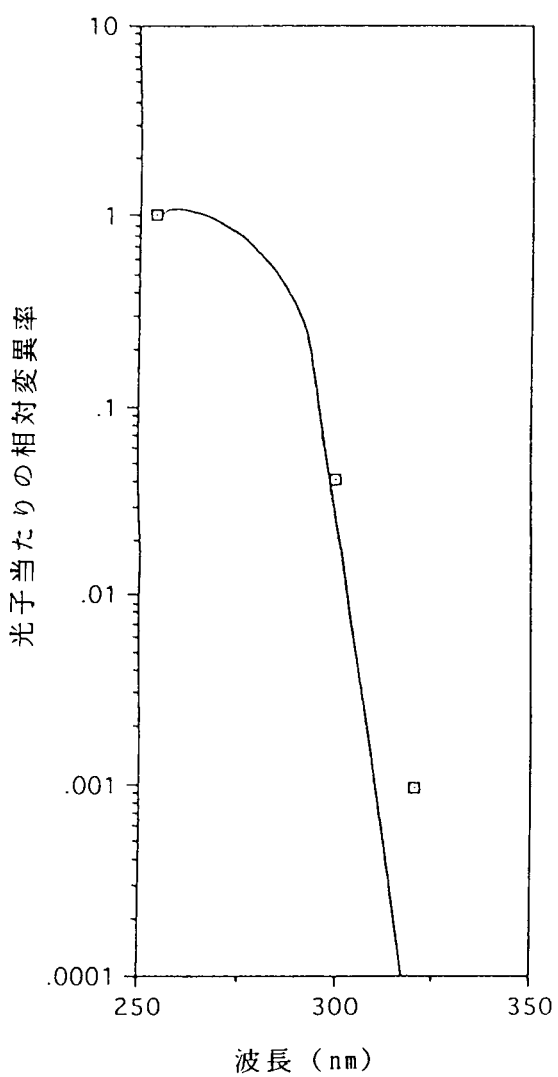
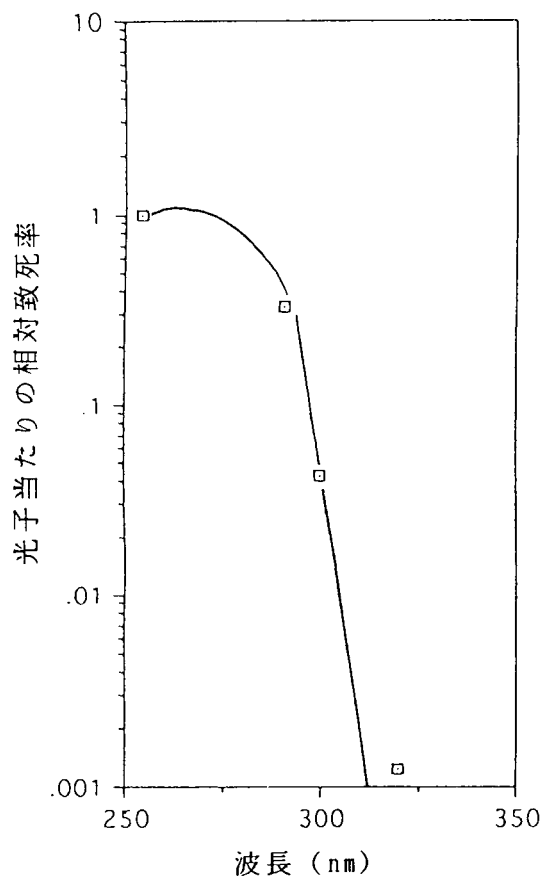


図2 (左) 紫外線がLTK15/CREF細胞に対して示す細胞傷害活性のアクションスペクトル  
 図4 (右) 紫外線がLTK15/CREF細胞中のHSV-tk遺伝子に対して示す変異誘発活性のアクションスペクトル



対照として大腸菌を用いて得られた曲線を図中に示した (文献1より)

## 考察

これまで、波長特異的な紫外線の細胞障害効果及び変異誘発活性に関しては、主に大腸菌を用いて測定された結果に基づいた議論がなされてきた。今回、HSV-tk遺伝子を含むレトロウイルスベクターを導入したラット線維芽細胞を用いた実験において、320nm紫外線が細胞障害、変異誘発共に、大腸菌で検出した場合よりもほぼ一桁高い活性が検出された。320nm付近の紫外線量はオゾン層の変化によって特に大きく影響を受ける事が知られているが、この変化が生体に及ぼす効果については従来の推計が、under-estimationであった可能性が今回の結果から示唆された。

一方、今回の実験においては、290nm紫外線の有意な変異誘導活性を検出することが出来なかった。その理由は現在のところ不明であり、今後の検討を要する。

320nmにおいて、複数変異の群発など、非典型的な変異が多く見られた事は興味深い。大腸がん細胞における自然変異において、複数変異の群発あるいは散発が報告されているが<sup>6)</sup>、このような複雑な変異と発がんとの関係については、今後さらに検討を加える必要が有ろう。

## 文献

1. Peak, M. J. et al. : Photochem. Photobiol. 40, 613-620 (1984)
2. Suzuki, F. et al. : Cancer Res. 41, 6400-6403 (1981)
3. Armstrong, J. D. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9005-9009 (1990)
4. Kress, S. et al. : Cancer Res. 52, 4916-4924 (1992)
5. Murata, S. et al. : Mutation Res. 334, 375-383 (1995)
6. Harwood, J. et al. : Mol. Cell. Biol. 11, 3163-3170 (1991)

表1 殺菌灯の照射によってHSV-tk遺伝子内に引き起こされた変異の種類

Type of mutation	Site <sup>a</sup>	Sequence <sup>b</sup>	Amino acid change	Number of isolates
Single transition	490	gatgg <b>G</b> gaaaa → A	Gly → Glu	1
	836	cgcg <b>c</b> Ggtacc → A	Arg → Gln	1
Tandem double transition	587-	egggg <b>CT</b> tccga → TC	Ala → Val	1
Small deletion				
7 bases	1210-	ccc <b>AACGGCGA</b> acc → cccAcc	Asn-Asp → Thr <sup>c</sup>	1
28 bases	1237-	gcc <b>TGG(N<sub>21</sub>)CGCCT</b> cc → gccTcc	Trp-Arg → Ser <sup>c</sup>	2 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Nucleotide position according to GenBank accession no. V00470.

<sup>b</sup> Only the sense strand sequence is shown. Altered nucleotide residue(s) are indicated by capital letter(s) and the affected codon(s) by bold letters.

<sup>c</sup> Frameshift mutation.

<sup>d</sup> Isolated from a single dish.

## 2. ヘアレスマウス皮膚における紫外線照射による扁平上皮がん形成と遺伝子発現

### まとめ

紫外線B波をマウス背部皮膚に1回照射すると、皮膚細胞で野生型P53タンパク質の誘導が起き、核内での蓄積が観察された。また、照射16~24時間後に皮膚細胞で核の凝縮、DNA断片化が観察され、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。照射によるp53タンパク質の誘導とアポトーシス誘導が関連していることが、*in vivo*の実験で示された。UVB連続照射によって形成されたマウス皮膚扁平上皮がん組織では、一過性照射とは異なり、変異型p53の誘導とその細胞質での蓄積が認められた。23例のがん組織の内11例にExon 5, 7, 8にSSCPレベルでの変異が認められた。変異を同定した結果、紫外線照射による変異に多く見られるC→TあるいはCC→TT置換の他にA→Gへの置換がcodon 141, 161, 232, 236で検出された。A→G置換はUVB照射に特異的な変異である可能性がある。

### はじめに

株化細胞に紫外線を照射した実験によってがん遺伝子およびがん抑制遺伝子等、様々な遺伝子の発現及びその変異が観察されている。しかし、実際に紫外線照射によって形成された扁平上皮がんにおける遺伝子発現や遺伝子変異についての報告は少ない。紫外線や放射線照射によりDNAが損傷を受けた時、DNA修復やDNA合成、細胞周期の調節に関与する種々の遺伝子の発現が報告されている<sup>1, 2)</sup>。その中のひとつであるがん抑制遺伝子p53がDNA損傷に対して応答し、ゲノムを保護する役割を果たしていると考えられている<sup>3)</sup>。また、p53は放射線などの変異原によって核内で蓄積されると同時に細胞にアポトーシスを誘発させることが知られている。すなわち、野生型p53は傷害を受けたDNAが修復されるまで細胞がS期に入らないようにG1チェックポイントで止めることにより傷害によって起きる変異が固定されないようにする、あるいは、傷害を受けた細胞をアポトーシスを誘発することによって排除する役割を担っていると考えられている。一方、高発がん性遺伝性腫瘍において配偶子を経由するp53の変異が見い出されること<sup>4)</sup>や、非遺伝性腫瘍においても極めて高率に変異が検出されていること<sup>5)</sup>から、がん形成においてp53タンパクは中心的役割を持つと考えられている。ヒト日光角化晶症<sup>6)</sup>、皮膚がん<sup>7)</sup>や紫外線照射したXeroderma pigmentosum患者皮膚がん<sup>8, 9)</sup>からもいくつかのp53の点突然変異が見い出されている。しかし、これまでの紫外線とp53に関する実験的研究の多くは、紫外線C波、あるいは培養細胞を用いており、紫外線B波照射による*in vivo*の実験はほとんどない。私達は、オゾン層破壊により増加が予想される紫外線B波(UVB)に焦点をあて、マウスを用いた*in vivo*の実験でp53遺伝子発現をはじめがん原遺伝子について検討した。すでに確立したUVB照射によるマウス皮膚扁平上皮がんにおける遺伝子発現や変異に関して検討した。

## 研究方法

紫外線照射： UVBランプ（290–320 nm、極大波長 312 nm）を用いてヘアレスマウス（Shk系、雌性、実験開始時に5週齢）の背部皮膚に1回もしくは長期照射を行った。1回照射；5週齢雌性Skh性ヘアレスマウス背部皮膚に3あるいは15 kJ/m<sup>2</sup>のUVB（290–320 nm, max. 312 nm）を照射、一定時間後に皮膚を採取した。長期照射；5週齢雌性Skh性ヘアレスマウス背部皮膚に2 kJ/m<sup>2</sup>のUVBを週3回25週間照射した。

遺伝子発現： 皮膚を採取後、Total RNAを抽出し、c-myc、c-jun、c-fos、c-H-rasの発現についてノーザンブロット法を行なった。オルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）活性についても測定した。

アポトーシスの検出： DNA断片化により生じた3'-OH endを標識するin situ end labelling法により行った。DNA断片化は総DNAを抽出後、アガロースゲルによる電気泳動法により確認した。

p53タンパク質の検出： p53タンパク質の検出は、マウスモノクローナル抗体であるPAb240を用いたウエスタンブロット法、並びにPAB240及びPAB246を用いた免疫組織染色法により行った。皮膚組織はHE染色後に顕微鏡で形態観察を行った。

点突然変異の検出： PCR-SSCP法によりp53のExon 5, 7, 8における変異について検出し、その変異の同定、位置の決定はcycle sequencing法によって行った。

## 結果

一過性照射： ヘアレスマウス背部に3 kJ/m<sup>2</sup>のUVBを1回だけ照射した皮膚組織では3時間後にc-myc、c-jun、c-fosの発現が3–9倍に増加していた。このmRNAレベルの上昇はその後下降し、24時間後には元のレベルに戻った。しかし、p53タンパク質は24時間後に核内で3 kJ/m<sup>2</sup>照射では2倍に、15 kJ/m<sup>2</sup>照射では5倍に増加していた。また、ODC活性は3倍上昇した。

UVBを照射後16時間目に皮膚を採取し、HE染色により皮膚組織の形態を観察すると、アポトーシスを起こしている細胞と考えられる核の凝縮したsun burn cellsが検出され、時間の経過とともに増加した。In situ end labelling法によりアポトーシスの検出を行った結果、核が強く染色された表皮細胞が出現し、DNAの断片化が起きていることが示唆された（図1）。照射した皮膚組織からDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動を行った結果、180 bpの整数倍のDNA断片がラダー状に検出された。以上の結果はいずれもUVB照射によって皮膚組織細胞でアポトーシスが誘発されることを示唆している。

UVB照射24時間後のマウス背部皮膚におけるp53タンパク質の発現をウエスタンブロット法で検出した（図2）。抗体は野生型P53タンパク質と反応するマウスp53抗PAb240を使用した。照射24時間後に皮膚の核を含む細胞可溶化画分で未照射の5倍の野生型p53タンパク質の発現が認められた。皮膚表皮細胞の凝縮された核中にp53タンパク質の免疫染色が観察さ



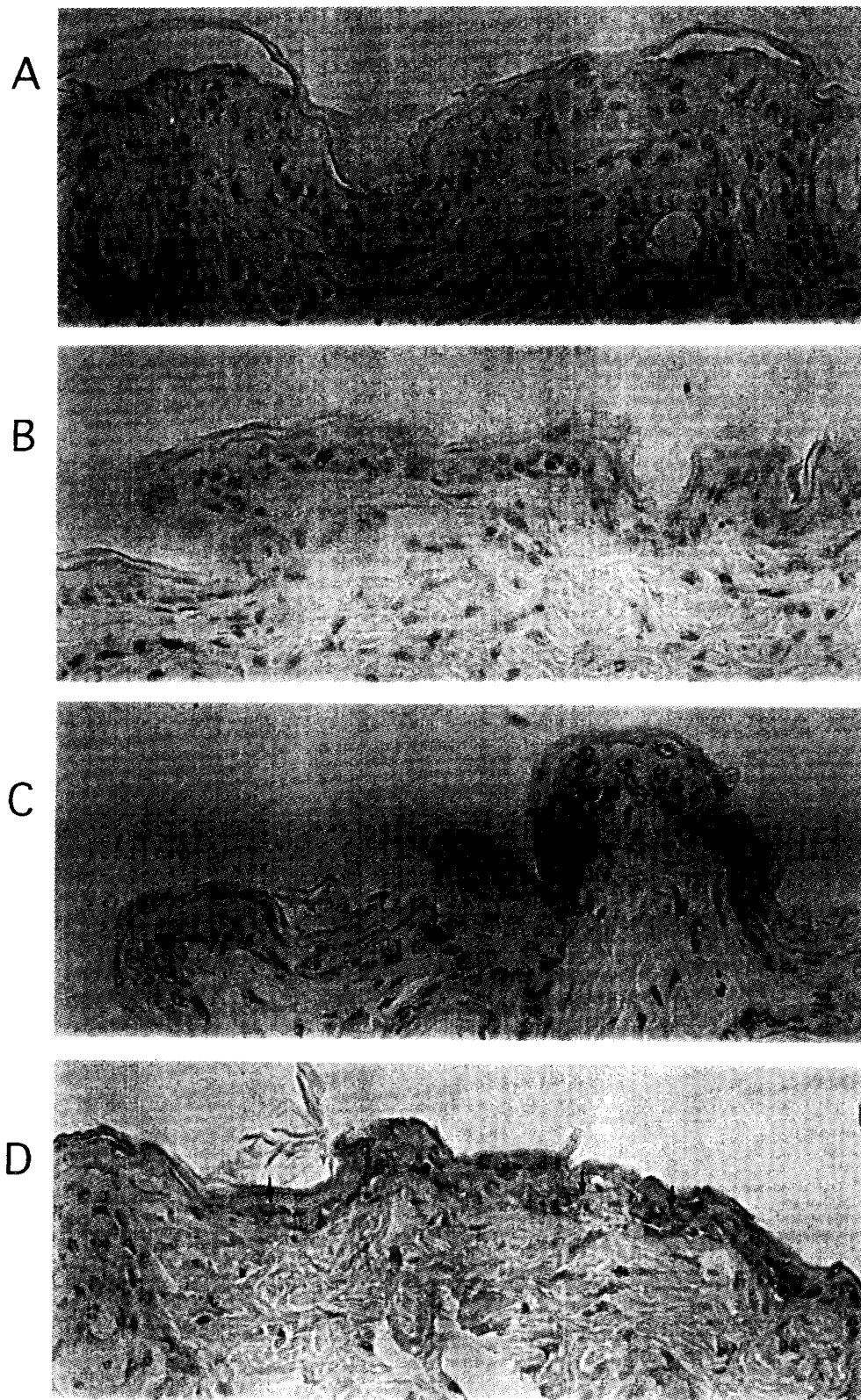


図1 UVB一過性照射におけるマウス皮膚 *in situ* でのアポトーシスの検出 (×100)

A : control

B : UVB 2kJ/m<sup>2</sup> 照射, 9h後

C : UVB 2kJ/m<sup>2</sup> 照射, 16h後

D : UVB 2kJ/m<sup>2</sup> 照射, 24h後

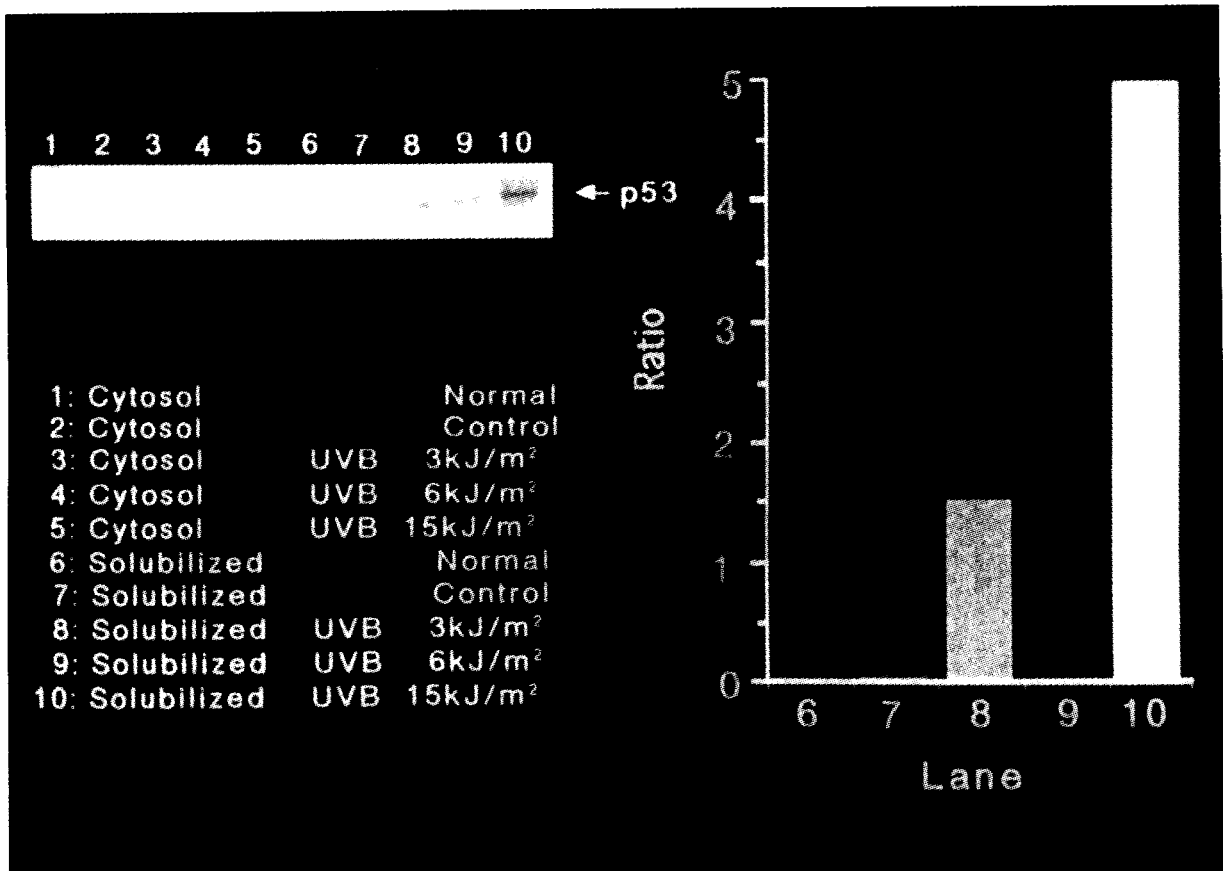


図2 UVB一過性照射におけるマウス皮膚での野生型P53タンパクの発現 (ウエスタンブロット法)

れた。以上の結果、UVBを照射した皮膚組織ではアポトーシスが誘発されている細胞が出現し、その凝縮した核では野生型p53タンパク質の蓄積が起きていることが示された。

連続照射による扁平上皮がん： 2 kJ/m<sup>2</sup> のUVBを連続照射すると10 週後から乳頭腫（日光角化症）が発生し始め、25 週目には扁平上皮がんが形成され始めることが病理組織学的所見から確かめられた。25 週後にはすべてのマウスの背部皮膚に直径1 mm以上の乳頭腫が認められ、このうち1/3以上のマウスの組織には3 mm以上の扁平上皮がんが病理組織学的に認められた。25週後に腫瘍が出現している皮膚組織では、c-myc、c-fos、c-H-rasの発現が2 - 2.5 倍に増加していることが観察された。またODC活性は6倍に増加していた。1回照射と同様にウエスタンブロット法によりがん腫内でのp53タンパク質の発現を検討すると、1回照射の場合とは異なり、細胞質画分にp53タンパク質の発現・蓄積が観察された。すなわち、がん組織内での変異型p53の誘導が示唆された。

p53遺伝子の突然変異： UVB連続照射により形成された皮膚がん組織細胞で変異型p53タンパクの発現が示唆されたので、p53遺伝子の突然変異について分析した。変異の検出はp53遺伝子の変異が多発しているExon 5, 6, 7, 8について検討した。23例のがん組織の内11例にExon 5, 7, 8 にSSCPレベルでの変異が認められ、Exon 6には変異は認められなかった。それぞれのSSCPレベルでの変異を同定した結果（表1）、Exon 5では、176 codonのC→Aへの置換（His→Arg）、141 codonのA→Gへの置換（Gln→Arg）、161 codonのA→Gへの置換（Lys→Arg）が検出出来た。Exon 7では、232 codon のA→Gへの置換（Lys→Arg）、236 codon のA→Gへの置換（Asn→Ser）、238 codonのC→Tへの置換（Ser→Ser）、243 codonのG→Aへの置換（Met→Ile）が検出できた。Exon 8では275 codonのCT→TCへの置換（Pro→Leu）およびC→Tへの置換（Pro→Ser）、270 codonのC→Tへの置換（Arg→Cys）、C→Gへの置換（Arg→Cys）が検出された。

## 考察

UVBの1回照射によって、c-myc、c-jun、c-fos等の細胞増殖に係わるシグナル伝達に関与する遺伝子の一過性の増加が認められた。これらの遺伝子発現の増加は照射による細胞傷害に対して防御的に働くことが推測される。UVBの長期間連続照射による上皮性皮膚がん形成の過程で、c-myc、c-fos、c-H-ras等の、がん遺伝子の発現が上昇していることが認められた。また、細胞質でp53タンパク質の増加が認められたことからこのがん抑制遺伝子の変異が示唆された。これらの遺伝子の発現、あるいは変異は、皮膚がんとは異なる種類の腫瘍でも広く認められているものである。

本研究の結果、UVBを1回照射することによっても、皮膚組織内でアポトーシス誘発と野生型p53タンパク質の誘導とが相関して起きることが判明した。照射によって誘導された野生型p53タンパク質は核に蓄積していた。UVC照射や放射線など多くの報告にあるように、UVB照射においても野生型p53は照射によるDNA傷害の修復のため細胞周期をG1期で止め、あ

表 1 マウス皮膚がんでのp53遺伝子の突然変異の同定

Exon 5

No	Codon	Sequence	Base change	Amino acid change
4	176	cccac <b>C</b> atgag	C ---> A	His ---> Arg
15	141	tgtgc <b>A</b> gttg	A ---> G	Gln ---> Arg
24	161	tctaca <b>A</b> gaag	A ---> G	Lys ---> Arg

Exon 7

No	Codon	Sequence	Base change	Amino acid change
17	232	ctaca <b>A</b> gtac	A ---> G	Lys ---> Arg
	236	gtgta <b>A</b> tagct	A ---> G	Asn ---> Ser
	238	gctc <b>C</b> tgca	C ---> T	Ser ---> Ser
	243	gcat <b>G</b> aacc	G ---> A	Met ---> Ile
18	236	tgta <b>A</b> tagc	A ---> G	Asn ---> Ser
	238	gctc <b>C</b> tgca	C ---> T	Ser ---> Ser
	243	gcat <b>G</b> aacc	G ---> A	Met ---> Ile
24	236	tgta <b>A</b> tagc	A ---> G	Asn ---> Ser
	238	gctc <b>C</b> tgca	C ---> T	Ser ---> Ser
	243	gcat <b>G</b> aacc	G ---> A	Met ---> Ile

Exon 8

No	Codon	Sequence	Base change	Amino acid change
8	275	gcctgcc <b>CT</b> gggag	CT ---> TC	Pro ---> Leu
12	275	gcctgc <b>C</b> ctggg	C ---> T	Pro ---> Ser
15	270	ggtt <b>C</b> gtgtt	C ---> T	Arg ---> Cys
19	270	ggtt <b>C</b> gtgtt	C ---> T	Arg ---> Cys
25	270	ggtt <b>C</b> gtgtt	C ---> G	Arg ---> Cys

るいは修復不能の細胞にBcl-2/Bax経路でアポトーシスを起こさせてゲノムの保護することにより、生体を脅かす突然変異などの危険回避を行っていると考えられる。

ヒト皮膚がんには高頻度で変異を生じるホットスポット (175, 245, 248, 249, 273, 282) が存在し、その変異はチミンダイマー・モデルで説明できるC→Tへの置換が多い。Kress らのUVB照射によって発症したマウス皮膚扁平上皮がんにおいても同様の変異がホットスポットに起きていた<sup>7)</sup>。本研究においてもC→Tへの置換がcodon 238, 270, 275に検出され、そのほとんどがホットスポットであった。本研究ではその他にA→Gへの置換がcodon 141, 161, 232, 236に検出された。この変換はマウスUVB照射による皮膚がん、ヒトの日光角化症<sup>6)</sup>皮膚がん<sup>10)</sup>、色素性乾皮症患者の皮膚がん<sup>8, 9)</sup>では見つかっていない。活性酸素種のヒドロキシラジカルにより生じた2-Hydroxyadenine がin vitroのDNA合成においてAやCとミスペアを起こすと報告されている<sup>11)</sup>。今回見いだされたA→Gへの置換は照射の結果細胞内で発生したヒドロキシラジカルが、p53のホットスポットを構築しているcodonにA→Gへの置換を起こさせたとも考えられる。

本研究のUVB照射による点突然変異の結果は、アミノ酸レベルでMet→IleやArg→Cysのような大きな変化があり、その結果タンパク質の構造や機能に大きく影響を与えていると考えられる。このような突然変異がどうしてp53のDNA結合ドメインに集中しているのか解からないが、そのために他の遺伝子の発現を調節出来なくなり、p53の転写調節遺伝子としての機能が失われ、腫瘍形成へとつながると考えられる。

## 文献

1. Herrlich, P. : Adv. Enzyme Regul. 25, 485-504 (1984)
2. Holbrook, N.J. and Fornace A.J. : New Biol. 3, 825-833 (1991)
3. Kasstan, M.B. et al. : Cancer Res. 51, 6304-6311(1991)
4. Kuerbitz, S.J. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7491-7495 (1992)
5. Greenblatt, M.S. et al. : Cancer Res. 54, 4855-4878 (1994)
6. Taguchi et al. : J. Invest. Dermatol. 103, 500-503 (1994)
7. Kress, S. et al. : Cancer Res. 52, 6400-6403 (1992)
8. Dumaz, N. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10529-10533 (1993)
9. Sato et al. : Cancer Res. 53, 2944-2946 (1993)
10. Ziegler, A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4216-4220 (1993)
11. 葛西 宏 : 第27回放医研シンポジウム、活性酸素・フリーラジカル研究の新展開、予稿集、14-15

### 3. UVB照射による免疫担当細胞への影響

#### まとめ

①培養肥満細胞への異なる波長領域の紫外線照射の影響比較により、320nmや340nmより300nmの波長の影響が顕著であった。②In vitroでの300nm UVB照射により、APCへの照射はT細胞からのIL-4産生を増強したが、T細胞への直接照射はIL-4産生を逆に抑制した。③In vivoでの300nm UVB照射は、マウスの抗原特異的IgE抗体産生を抑制し、脾臓リンパ球からのIFN- $\gamma$ 産生も抑制した。

#### はじめに

UVBによる皮膚ガンの発症リスク因子として遅延型過敏反応の抑制やサプレッサーT細胞の誘導など免疫応答系の抑制を示唆する報告<sup>1-3)</sup>がみられているが、その影響機構については十分に解明されていない。本研究では、(1)紫外線の波長領域の違いによる影響を比較するために即時型過敏反応や寄生虫感染防御に重要な役割を果たしている肥満細胞増殖反応への300nm, 320nm, 340nmの作用の比較、また、(2)免疫応答の制御を担うためにリンパ球などの免疫担当細胞から産生される細胞間情報伝達物質、サイトカインレベルのUVB照射による影響についてin vivo, in vitroで検討した。

#### 研究方法

(1)肥満細胞増殖反応への影響検索では、4-6週令のBALB/cマウスより骨髓細胞を取り出し、インターロイキン3を含むRPMI 1640培地(10%FCS、2mM L-グルタミン、5mM HEPES、ペニシリン-ストレプトマイシン、0.1mM非必須アミノ酸含)で毎週新しい培地でプラスチックシャーレ非付着細胞群を交換しつつ培養した。培養開始5-6週後に肥満細胞の指標であるアルシアンブルー陽性細胞数が99%以上になった時点で実験に使用した。BIOTRONIC紫外線照射装置を用いて0, 28, 140, 700J/m<sup>2</sup>(300nm)、0, 98, 490, 2450 J/m<sup>2</sup>(320nm)、0, 25, 126, 630J/m<sup>2</sup>(340nm)のUVB照射を行った。照射後肥満細胞数を $5 \times 10^6$ /wellに調整して培養した。1週後にトリパンブルー染色で生細胞数を算定し、肥満細胞のヒスタミン含量の変動はフルオロメトリック法で、IgE受容体の発現はFITCラベル抗体を用いての免疫蛍光法で測定した。

(2)サイトカインレベルへのin vitroでの影響検索では、BALB/cマウスをsugi basic protein (SBP)あるいは卵白アルブミン(OA)で3週間間隔で3回免疫し、局所リンパ節細胞を採取した。細胞数を $6 \times 10^6$ /mlに調製後、脾臓細胞をマイトマイシンC処理、あるいはX線処理した細胞( $6 \times 10^6$ /ml)を抗原提示細胞(APC)として抗原と共に加え培養した。その後は、1-2週間間隔で培養T細胞に毎回新しいAPCを加えて抗原刺激した。培養T細胞あるいはAPCを0, 28, あるいは140J/m<sup>2</sup>で300nm UVB照射した。再び

抗原刺激48時間後、上清を集めELISA法でインターロイキン4 (IL-4)、インターロイキン10 (IL-10)、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 量を測定した。

In vivoでの影響検索では、BALB/c, WBB6F1+/+, WBB6F1w/wvマウス背部に2kJ/m<sup>2</sup>の300nmUVBを照射し、照射部位とは異なる部位である鼻からOA抗原刺激した。同様の処置を3週間おきに3回繰り返す、最終照射1週後に採血を行い、血清中の抗原特異的IgE抗体価をラット皮膚を用いての受動皮膚過敏 (PCA) 反応で測定した。また、脾リンパ球を抗原刺激して産生されるサイトカインについてもELISA法で測定した。

## 結果

(1) 紫外線照射1週後の肥満細胞の増殖を波長間で比較すると、320nmでは対照(0J/m<sup>2</sup>)で  $13.3 \times 10^6$  を示したのに対して、98, 490, 2450J/m<sup>2</sup>ではそれぞれ  $11.3 \times 10^6$ ,  $12.7 \times 10^6$ ,  $12.0 \times 10^6$  を示し対照群と照射群との間に差はみられなかった。340nmでは、対照群で  $13.4 \times 10^6$  に対して25, 126, 630J/m<sup>2</sup>ではそれぞれ  $12.0 \times 10^6$ ,  $11.8 \times 10^6$  ( $p < 0.05$ ),  $11.6 \times 10^6$  ( $p < 0.05$ ) を示し照射群での低下がみられた。照射1週後の肥満細胞内のヒスタミン含量の変動において、320nmと340nmの波長では照射群でやや増加の傾向がみられたが、有意な差ではなかった。

細胞表面上のIgE受容体の発現については、320nmでは対照群に比べ98J/m<sup>2</sup>で低下が、2450J/m<sup>2</sup>で増強がみられた。340nmでは25, 126, 630J/m<sup>2</sup>で照射量に依存した有意な増強がみられた。以上の結果を以前の300nmの結果とともにまとめたのが、表1である。肥満細胞数への影響では、300nmと340nmで減少がみられたが、340nmの126J/m<sup>2</sup>で対照の88%へ、630J/m<sup>2</sup>で86%へと有意ではあったが比較的減少の程度は少なかった。他方、300nmでは、140J/m<sup>2</sup>で60%へ、700J/m<sup>2</sup>で3%へと著しい減少がみられた。

表1 骨髓由来培養肥満細胞へのUVBの影響

nm	J/m <sup>2</sup>	No. of BMNC	Histamine content	Expression of IgE receptor
300	0	100	100	100
	28	88	112	156**
	140	60**	117	191**
	700	3***	-	-
320	0	100	100	100
	98	85	115	64*
	490	95	125	100
	2450	90	113	132**
340	0	100	100	100
	25	90	94	124**
	126	88*	113	136**
	630	86*	121	192**

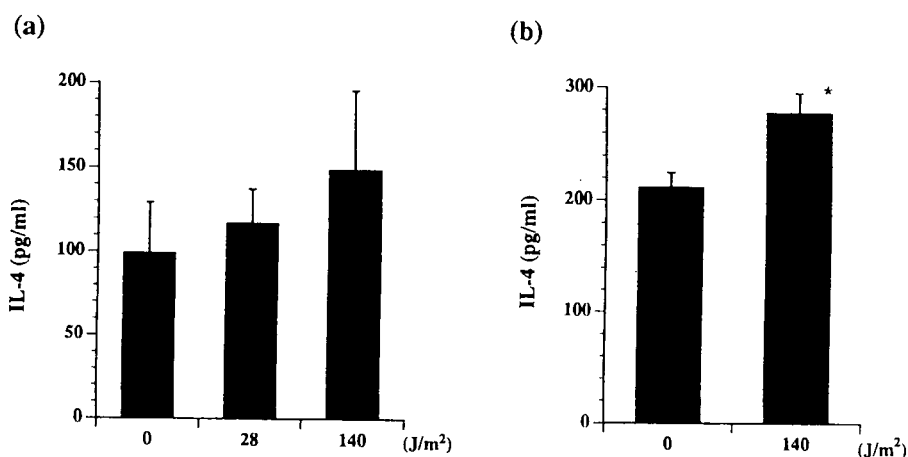
a: % of control  
 \*P<0.05  
 \*\*P<0.01  
 \*\*\*P<0.001

ヒスタミン含量では、いずれの波長でも差はみられなかった。IgE受容体の発現では、320 nmの98J/m<sup>2</sup>をのぞいて増強がみられた。300nmでは、28J/m<sup>2</sup>で対照の156%へ、140J/m<sup>2</sup>では191%へ増加した。320nmでは、2450J/m<sup>2</sup>で132%へと増加し、340nmでは、25J/m<sup>2</sup>で124%へ、126J/m<sup>2</sup>では136%へ、630J/m<sup>2</sup>では192%へと増加した。

(2) 免疫応答のUVBによる抑制機構を明らかにするために、*in vitro*で免疫担当細胞にUVB照射してサイトカイン産生について検討した。

脾臓細胞より調製したAPCに0, 28, 140J/m<sup>2</sup>の300nmUVB照射して無照射のSBP抗原特異的T細胞と2 μg/ml SBP抗原と共に培養して上清中のIL-4を測定すると、UVB照射量に依存したIL-4産生の増加がみられた(図1 a)。同様に、0, 140J/m<sup>2</sup>照射したAPCをOA抗原特異的T細胞と50 μg/ml OA抗原と共に培養した上清中でもIL-4産生の増強がみられた(図1 b)。

図1 UVB照射APCと無照射T細胞の培養によるIL-4産生



OA抗原特異的T細胞に0, 28, 140J/m<sup>2</sup>の300nmUVB照射し、無照射のAPCと共に培養するとUVB照射量に依存したIL-4産生の抑制がみられた(図2)。

図2 UVB照射T細胞と無照射APCの培養によるIL-4産生

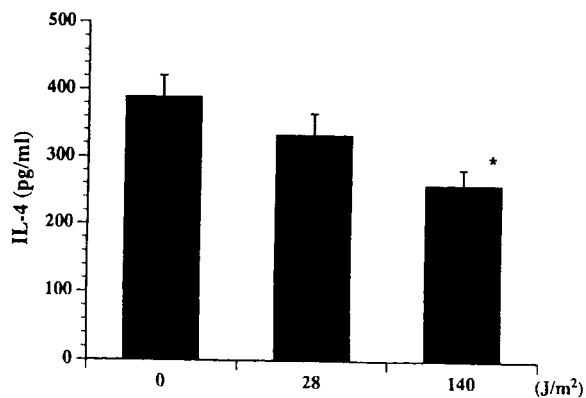
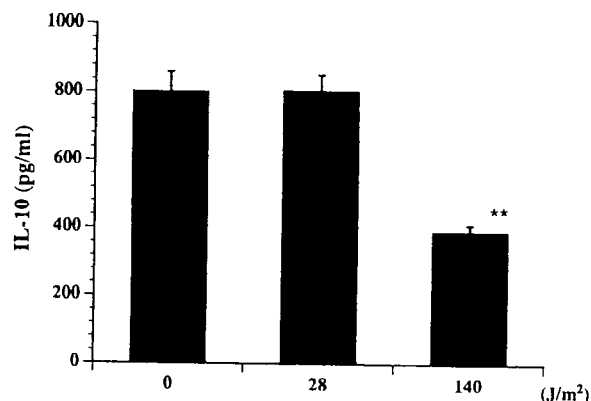


図3 UVB照射T細胞と無照射APCの培養によるIL-10産生





IL-4産生の変動と比較するために、IL-4と類似の作用を示すTh2タイプのヘルパーT細胞で産生されるIL-10について検討した。0, 28, 140J/m<sup>2</sup>の300nmUVB照射したAPCをOA抗原特異的T細胞と抗原と共に培養したときの、上清中のIL-10産生は、140J/m<sup>2</sup>照射群で579 ± 20 (pg/ml)、対照群で577 ± 10 (pg/ml) で差はみられなかったが、OA抗原特異的T細胞にUVB照射して無照射のAPCと抗原と共に培養すると、IL-10産生の有意な抑制がみられた(図3)。Th1タイプのヘルパーT細胞からのIFN-γ産生にはUVB照射による影響がみられなかった。

次に、in vivoでマウスにUVB照射し、血清中の抗原特異的抗体価と脾臓リンパ球からのIL-4, IFN-γ産生について調べた。その結果、表2に示されているように抗原特異的IgE抗体価は抑制され、特にWBB6F1+/+, w/wvマウスでは顕著な抑制がみられた。IgE抗体産生機構において重要な働きをしているIL-4とIFN-γについて脾臓リンパ球からの産生を調べた。その結果、IL-4産生においては、UVB照射マウスと無照射マウスで差がみられなかったが、IFN-γ産生ではUVB照射マウスにおける抑制がみられた(図4)。

表2 UVB照射マウスの抗OA IgE抗体産生

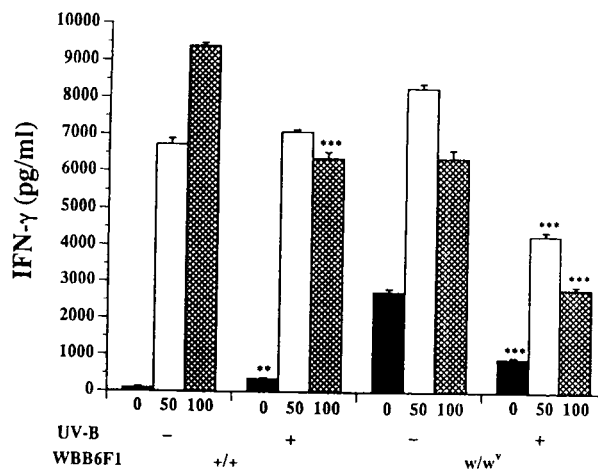
mice	UV-B (2KJ/m <sup>2</sup> )	log <sub>2</sub> PCA titer
BALB/c	-	3.4 ± 0.5
	+	2.3 ± 0.0
WBB6F1	-	5.9 ± 0.6
	+	2.8 ± 0.5**
W/W <sup>v</sup>	-	6.4 ± 0.9
	+	3.6 ± 0.8*

n = 4-7  
\*P<0.05 \*\*P<0.01

### 考察

過敏反応や寄生虫感染、免疫応答の調節作用を有する肥満細胞を用いてUVB領域とそれに近い領域での異なる波長のそれぞれの特性を比較する実験を行った。これまでの影響評価には、UVBの広い領域の波長を照射した結果を用いていたが、今回300nm, 320nm, 340nmの単波長について、細胞増殖、ヒスタミン合成、細胞表面での蛋白発現について検討した。前回の300nmの肥満細胞への影響

図4 UVB照射マウスの脾臓におけるIFN-γ産生



と今回の結果とを比較すると、ヒスタミン含量において差がみられないというのは、同じ結果であった。IgE受容体の発現については、低照射量での増強が、300nm>340nm>320nmの順に顕著であった。肥満細胞の増殖への影響については、300nmで顕著な増殖抑制がみられ、340nmでも有意な増殖抑制がみられた。320nmでは、有意な増殖抑制はみられなかった。これらの結果が、培養肥満細胞に特異な影響か否かは不明であるが、骨髓細胞への300nm UVB照射により分化した培養肥満細胞数の減少がみられている<sup>4)</sup>。300nmの波長領域が今回の培養肥満細胞の指標においては影響が著しいことが明らかとなった。

UVB照射による免疫応答系での抑制を明らかにするために免疫担当細胞からのサイトカイン産生への照射の影響を検索した。In vitroでのUVB照射において、APCへの照射は、T細胞からのIL-4産生を増強したが、T細胞への直接のUVB照射はIL-4、IL-10の産生を抑制した。これまでの他の研究者の報告では皮膚にあるランゲルハンス細胞などのAPC活性を有する細胞へのUVB照射の影響により腫瘍壊死因子(TNF)やIL-10などのサイトカインが産生されることが免疫応答の抑制の誘導に関与していることが報告<sup>5,6)</sup>されていた。また、IFN- $\gamma$ 産生の抑制についても報告され、その機構としてTNFやIL-10などがTh1タイプのT細胞活性を抑制することによりIFN- $\gamma$ のようなTh1タイプのT細胞からのサイトカイン産生の抑制が示唆された。免疫応答系は、少なくとも2種類のヘルパーT細胞からのサイトカインの制御をうけており、それがTh1とTh2タイプのT細胞と呼ばれている<sup>7)</sup>。今回のAPCにUVB照射したときのT細胞からのIL-4産生の増強は、Th2タイプのT細胞の活性亢進を示していると思われた。

そこで、Th1タイプのT細胞の抑制、Th2タイプのT細胞の亢進がおこるならば、Th1、Th2タイプのT細胞調節の変動を受けやすいといわれているIgE抗体産生系は亢進するであろうと考え、in vivo UVB照射の影響を調べた。しかしながら、その結果はIgE抗体産生の抑制を示し、サイトカインレベルではIL-4産生にはあまり変化なくIFN- $\gamma$ 産生を抑制していた。IgE抗体産生の抑制結果はこれまでにみられていない結果であり、IL-4やIFN- $\gamma$ の不均衡では説明がつかない結果であった。いまだ、抑制機構に関連するIFN- $\gamma$ 以外のTNFやトランスフォーミング増殖因子などの活性について調べていないが、このようなサイトカインがUVB照射によるIgE抗体産生抑制に関与している可能性は十分考えられる。

## 文献

1. Pamphilon, D.H. et al. : Immunol. Today 12, 119-123 (1991).
2. Noonan, F.P. and De Fabo, E.C. : Immunol. Today 13, 250-254 (1992).
3. Goettsch, W. et al. : Thymus 21, 93-114 (1993).
4. Katayama, et al. : Toxic. Substances J. 13, 85-95 (1994).

5. Rivas, J.M. and Ullrich, S.E. : J. Immunol. 149, 3865-3871 (1992).
6. Moodycliffe, A.M. et al. : Immunology 81, 79-84 (1994).
7. Mossman, T.R. et al. : J. Immunol. 136, 2348-2357 (1986).