

A-4

(2) 紫外線による免疫機能等生体防御機能の低下に関する研究

②発がんリスクの促進影響

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 青木康展、藤巻秀和、遠山千春、三浦 卓

平成2-4年度合計予算額 28,899千円

〔要旨〕紫外線量の増加にともなう皮膚癌の発症リスクの予測のために、生体防御機能の低下についてその影響を鋭敏に検知する検出系の確立、またその有用性について検討した。その結果、蛋白・遺伝子レベルでは、HSV-TK遺伝子を用いた染色体変異の検出系、MTをふくめたストレス蛋白のmRNA検出系が開発され、UVB照射によりその有用性が確認できた。細胞・個体レベルでは、T細胞依存性の肥満細胞増殖・分化系の確立とUVBの影響について、また、ヘアレスマウスをもちいての皮膚癌発症モデル系の確立と有用性が明らかとなった。

〔キーワード〕皮膚癌、染色体変異、遺伝子、細胞増殖、蛋白合成

1. 序

オゾン層の減少に伴う、生体に有害な紫外線 (UVB、280-315 nm) 量の増加により皮膚癌の発症率が増加することが危惧されている。

皮膚癌に限らず、癌の発症には多段階の過程が関与している事が明らかになりつつある。それらは、i) 遺伝子 (DNA) 本体あるいは染色体に生じた変異 (イニシエーション)、ii) 変異の生じた細胞を無秩序に増殖させる因子 (プロモーション)、iii) 癌細胞が発生したホストの個体の生体防御機能の低下、などが挙げられる。これらの過程に紫外線がどの様に係わっているかを明らかにする事は、紫外線による皮膚癌の発症のリスクを明らかにする上で必須な事項である。UVB波長領域の増加により免疫機能の抑制がおき直接、あるいは間接的に皮膚癌の発症増加につながる事が予測されている。しかしながら、最近UVBの波長領域のなかでも免疫機能抑制効果に差異のあることが報告され、免疫機能抑制の機構をさぐることに波長特性を調べることも重要な課題になってきた。生体防御機能の低下の研究は端緒がつけられたばかりであり、これから大

いに研究を進めなければならない事項である。

2. UVB照射による、細胞増殖に関わる遺伝子の活性化

紫外線の照射による発ガンの機構は十分に明らかにされているとはいえない。UVBは直接的あるいは間接的な作用により遺伝子上に変異を引き起こすことが知られ、これが紫外線による発ガン作用と一般に考えられている。しかしその一方、UVBあるいはより長波長(315-380nm)のUVAは発ガンプロモーター作用を持つと考えられている。発ガンプロモーター作用の実態は不明であり解明が進められているところであるが、現在では一応この作用は細胞増殖の促進作用と理解されている。従って、紫外線の持つ細胞増殖に関連する作用を明らかにすることは、紫外線特にUVBの発ガン作用を理解する上で重要である。

(1) UVB照射による皮膚癌の実験的発症

紫外線による発がん機構の詳細は不明であるが、UVBはイニシエーターとして、UVAはプロモーターとして作用していると考えられている。本研究課題内の個々の研究に用いるために、UVB照射による皮膚癌の動物実験モデルの作成を試みた。

方法：ヘアレスマウスに UVB を $2\text{kJ}/\text{m}^2$ 、週3回25週間にわたって照射した。皮膚の外見所見及び病理組織学的所見を定法により検索した。

結果：2回の照射で紅斑が生じ、2週後に消失し、皮膚は乾燥・肥厚した。2ヶ月後に小さな突起状の日光角化症が発生し始め、さらに照射を続ける病変部分が肥大し、出血と潰瘍が認められた。6ヶ月後には、明確な腫瘍が発生しているマウスも散見された。病理組織学的所見から、扁平上皮がんであると考えられた(図1)。

(2) 細胞増殖にともなって発現される遺伝子の検出法の検討

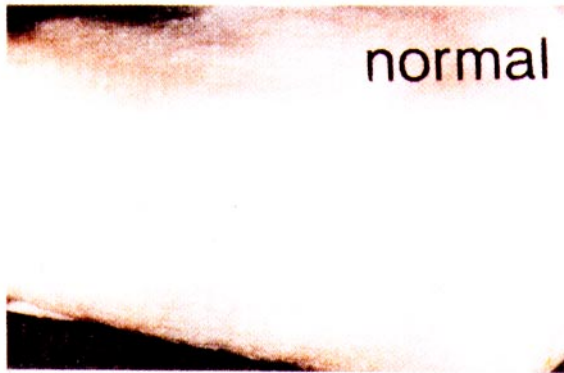
紫外線の照射により発ガンプロモーター作用が発揮されたときには、他の発ガンプロモーター物質の暴露と同様に、細胞増殖にともなって発現される幾つかの遺伝子が発現されることが予想される。これらの遺伝子のうち、前癌遺伝子であるc-Jun、細胞増殖時の重金属代謝に関与しているタンパク質であるメタロチオネイン(MT)、及び細胞が環境よりのストレスを受けたときに発現されるタンパク質であるヒートショックタンパク質(HSP-90、HSP-70、HSP-27)の検出法を検討した。

方法：遺伝子の発現はmRNAはノーザンブロット法により、タンパク質の検出はウェスタンブロット法および免疫沈降法によった。

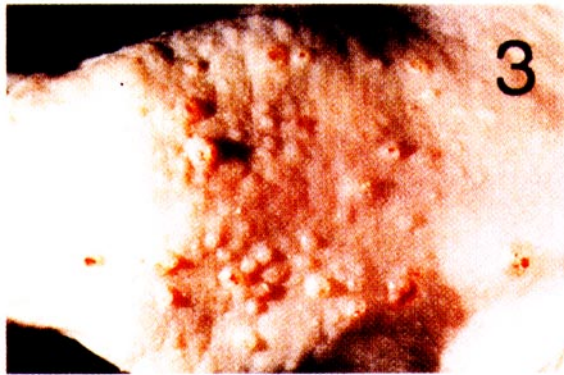
結果：c-JunはmRNAを検出することにより、既知の細胞増殖因子の作用を検出するのに十分な感度を得られた。また、protein Aを用いた免疫沈降法によりc-Junタンパク質そのものの定量も可能となった。MTについてはmRNAおよびタンパク質の定量とも良好な結果が得られた。特に後者はウェスタンブロット法により $0.06\mu\text{g}$ のMTが検出可能となった。HSP-90、HSP-70、およびHSP-27ともにmRNAの定量が可能となったのと同時に、HSP-70はウェスタンブロット法による検出が容易に出来るようになった。

(3) UVB照射によるHSP-70のin vitroおよびin vivoにおける誘導

図1 UV-B照射後の皮膚の外見的变化



正常ヘアレスマウス



日光角化症の発生



腫瘍の発生

(2) 項の手法を利用してHSP-70が実際にUVBで誘導され得るかについて検討を行った。In vitroの実験はヒト由来の培養細胞であるHeLa S3細胞を用いて行った。

方法：HeLa S3 細胞に UV-B を照射した後、一定時間培養を続け、さらに新生タンパク質を³⁵S-メチオニンで標識した。細胞のタンパク質を界面活性剤で可溶化し、2次元ゲル電気泳動で分離して UV-B 照射により生合成が促進されるタンパク質を検出した。

結果：300J/m² の UV-B を照射した後、12時間で分子量約 70kD のタンパク質の誘導が認められた。このタンパク質は細胞を 45°Cで熱処理することによっても誘導された。ゲル上のタンパク質をウエスタンブロッティング法により PVDF 膜上に転写し、免疫化学的に同定したところ、分子量 70kD のタンパク質は HSP70 であることが判った。UV-B 照射により HSP70 以外にもいくつかのタンパク質の合成が促進されたが、それらのタンパク質の同定は今後の課題である。

一方in vivoの照射実験は(1)項と同様にヘアレスマウスを用いて行った。

方法：マウスの皮膚にUVBを15kJ/m²を1回照射した後に表皮組織を可溶化し同様に2次元ゲル電気泳動をおこなった。ゲル上で分離されたタンパク質は染色により検出した。

結果及び考察：ウエスタンブロッティング法によりHSP-70と同定されたタンパク質がUVB照射により増加していることが示された。HSP-70がUVB照射の生体への影響のマーカーになることが示唆された。しかし、これらは短期の照射の影響を反映したものであり、人の健康影響を考えるとときに重要であるUVB長期照射の影響は今後検討を進める必要がある。

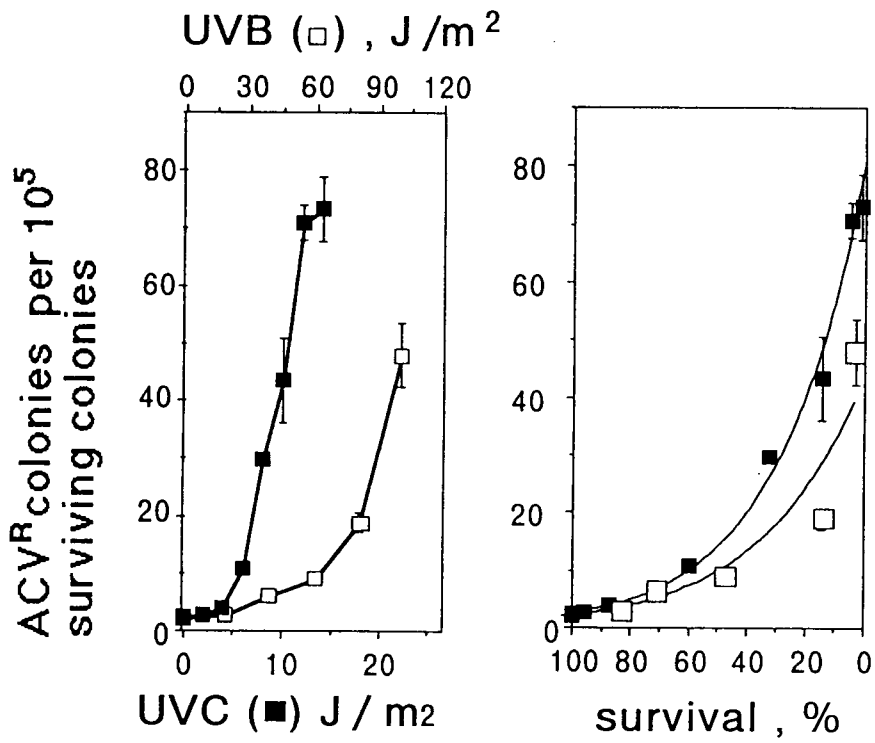
3. HSV-TK遺伝子を用いた新しい染色体変異検出系の開発

目的：様々な波長の光線が、動物細胞に対してどのような生物活性を示すのかを調べるために、まず生細胞の DNA に対する障害活性を検出するシステムの開発を試みた。

方法と結果：単純疱疹ウイルス(HSV)のチミジンキナーゼ(TK)遺伝子を発現している細胞は、抗ヘルペス剤アシクロビル(ACV)に対して感受性になる、という事実に着目し、HSV-TK と別の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 (図1)を構築した。LTK-15 ウイルスを感染させた細胞は ACV 存在化で成育できないが、何等かの原因で HSV-TK 遺伝子が不活性化するとACV 存在化でも成育できるようになるため、単独遺伝子の不活性化がコロニーの成育としてポジティブに検出できる。また、生じたコロニーが G418 耐性か否かを調べることにより、変異の規模を推測することもできる。

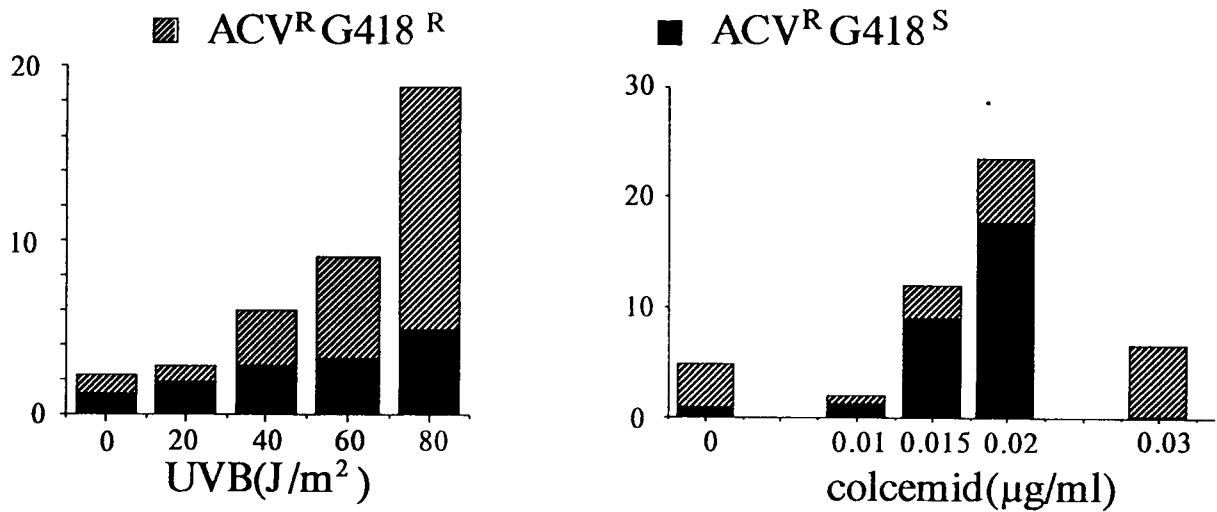
LTK-15 ベクターを細胞あたり平均1コピー組み込ませたラット線維芽細胞株 CREF を 90mm シャーレ当たり10⁶蒔き、一晚培養後 PBS 中又は直接紫外線で照射した。培養液中で3日間培養後、適当な濃度(生存細胞数に従って 1:5-1:20)で継代又は液換(生存細胞数が少ない場合)し、さらに3日間培養後 90mm シャーレ当たり10⁵の濃度で 100uMACV を含む培養液中に蒔き、約一週間後にコロニー計数した。照射源として殺菌灯と健康ランプ用いた予備実験では、UV-B が UV-C よりも高い dose で変異原活性を示す事(図2)、またこの場合、変異は HSV-TK 遺伝子内に限局されているのに対し、低濃度のコルセミド処理では2つのマーカーが同時に不活性化する頻度が高いこと(図3)、等が示され、このベクター系の有用性が確認された。

☒2



☒3

ACV^RG418^R or ACV^RG418^S colonies per 10⁵ surviving colonies



考察：従来、動物細胞における染色体変異の検出は、特殊なマーカー遺伝子（例えば、性染色体上の HGPRT 等）の不活性化を指標とした細胞生物学的な方法や、染色体分析を利用した方法等によって行われてきた。しかし、これらは、起こった変異の特徴を分子レベルで解析するために適した方法とは言えない。その点、外来性のコンパクトなマーカー遺伝子を用いた系が優れているが、遺伝子の不活性化を選択の手段として用いるには、細胞当たり1コピーのマーカーを挿入する必要があり、その目的にはレトロウイルスが適している。シカゴ大学の Charles Ashman は、Eco-gpt 遺伝子を持ったレトロウイルスと HGPRT 細胞の組み合わせを用いて、1986年頃から原理的には同様の研究を行っているが、我々の系は、宿主細胞として HGPRT 等のマーカーを持った細胞を用いる必要がなく、様々な細胞への応用が可能な点でより優れている。現在、環境研 BIOTRONIC 紫外線照射装置を用いて、300nm、320nm、340nm などの、より限定された波長を持つ紫外線の変異原性を調べる実験を進めている。

4. UVB照射による肥満細胞の増殖・分化への影響

UVB照射による免疫系細胞の分化・増殖に関しては、不明な点が多い。これまでにUV-B領域の波長は遅延型過敏反応、接触過敏反応の抑制、抑制性T細胞の誘導その他免疫系の抑制を導くことが指摘されているが、その波長特性との関連は不明である。ところで、肥満細胞は、皮膚をはじめ生体のほとんどあらゆる臓器の粘膜あるいは結合組織部位に存在し、I型の即時型過敏反応の誘導のみならず腫瘍壊死因子(TNF α)、インターフェロン γ (IFN γ)、インターロイキン(IL)1、3、5、6など多くのサイトカインを産生して免疫応答の調節にも関与していることが最近報告されている。

本研究は、T細胞依存性の肥満細胞が増殖、分化する系を用いて量-作用関係を明らかにし、この波長特性とUVBの影響との関連を明らかにする目的で、まず、300nmのUVBの肥満細胞への影響を検索した。

方法：マウス骨髄細胞をとり出し、0、5.6、28、140、700J/m²のUVBを照射して、IL-3を含むWEHI-3培養上清の存在下で培養した。1週、2週、3週後に細胞数、肥満細胞の指標であるアルシアンブルー陽性率を算定した。ヒスタミン含量についてはフルオロメトリック法で、IgE受容体の発現についてはFITCラベル抗体で、TNF α 産生についてはELISA法で調べた。

結果及び考察：肥満細胞が含まれる非付着細胞群における細胞数においては、1週、2週、3週後いずれも対照群との間に差はみられなかった。3週目のアルシアンブルー陽性の細胞数(肥満細胞)においては140J/m²で対照群の67%へ、700J/m²で対照群の58%へと濃度に依存した有意な低下がみられた。細胞内のヒスタミン含量については低下の傾向がみられたが、有意ではなかった。細胞表面上におけるIgE受容体の発現については、28J/m²から濃度に依存した増加が認められた。L929細胞を標的とした肥満細胞におけるTNF α の産生量では、照射群と対照群との間に有意な差はみられなかった。次に、分化した肥満細胞への照射の影響をみるために、マウス骨髄細胞をIL-3の存在下で5-6週間培養してアルシアンブルー陽性になった肥満細胞に300nmのUVBを照射した。その結果、1週後の肥満細胞数については140と700J/m²照射で

対照群と比べて有意な低下がみられた。I g E受容体の発現では増加がみられたが、細胞内ヒスタミン含量、T N F α 産生については照射群と対照群との間に有意な差はみられなかった。これらの結果は、骨髓細胞から肥満細胞の増殖、分化する系では肥満細胞の増殖抑制が、また、I g E抗体の細胞表面上での受容体発現の増強が 300nm UVBの影響として認められ、細胞表面上での情報伝達系における影響を示唆していると考えている。

5. 活性酸素が原因と考えられる障害を軽減する手法の検討

(1) 紫外線の増加が何らかの因子を介して発がんの促進に影響を及ぼしているかどうかを解明するため、我々はまず紫外線照射の細胞及び個体への影響を活性酸素を介在因子として考慮した。この介在因子による生体影響とこれを防御する生体側要因についてメタロチオネイン (MT) 及びグルタチオン (G S H) に着目して個体レベルで検討した。

方法： 紫外線の照射には、紫外線Bランプ (N I S社、F L 1 5 E、極大波長310nm) を用いた。1回照射実験：個体レベルの検討ではヘアレスマウス (5週齢) を1群6匹ずつ次の3群に分けた。(1) 未処置群、(2) UVB照射群、(3) Z n投与群、(4) Z n+UVB群、(5) G S Hエステル+UVB群、(6) G S Hエステル群、(4) G S H群、(5) G S H+UVB群。第3群及び第4群のマウスには、硫酸亜鉛を10mg/kg体重となるように、24時間ごとに2回投与し、最終投与後24時間目にUVBを照射した。還元型グルタチオンとグルタチオンイソプロピルエステルは、20mg/kg体重と15mg/kg体重の量で照射2時間後に腹腔に投与した。UVB照射は、6ないし12KJ/m²の強度で1回、四肢を固定したマウスの背部に照射し、24時間後に皮膚を採取して分析に用いた。

繰り返し照射実験：ヘアレスマウスにUVBを2KJ/m²/日の強度で、週3回、25週間照射した。これらのマウスをグルタチオン (G S H) 投与、グルタチオンエステル投与群、亜鉛 (Z n) 投与により、次の5群に分けた。(1) 未処置群、(2) UVB照射群、(3) Z n投与群、(4) Z n+UVB群、(5) G S Hエステル+UVB群、(6) G S Hエステル群、(4) G S H群、(5) G S H+UVB群。還元型グルタチオンとグルタチオンイソプロピルエステルをそれぞれ7.5mg/kg体重と10.0mg/kg体重の量で照射後に腹腔に投与した。25週後に皮膚を採取して、分析を行った。

結果： 紫外線照射を1回照射した実験では、マウス皮膚には紅斑が認められ、浮腫に伴うと考えられる皮膚組織重量の増加が観察された。皮膚組織中の非タンパク性S H基、ならびに総G S H及び還元型G S Hの量は、照射強度に依存して減少していた。これとは対照的に、脂質過酸化の指標であるM D Aは、照射量に依存して増加する傾向が認められた。これらのことから、紫外線照射に伴って細胞内で生じる活性酸素種の除去に細胞中のS H基が関与していることが予想された。

亜鉛を投与し紫外線を照射した群のマウスの皮膚においては、無処置群に比べてM Tが誘導されていた。この皮膚組織の重量の上昇の抑制、紅斑の軽減が観察されていた。さらに、皮膚組織中の非タンパク性S H基の上昇、並びに総G S H及び還元型G S Hの減少が有意に抑制されており、さらに、紫外線照射により生じるM D Aの顕著な増加も抑えられていた。G H Sエステルを

投与しUVBを照射した群のマウスにおいては、照射によるGSHの減少が抑えられていたが、GSHを投与しUVBを照射した群においては、GSHの減少は抑制されていなかった。さらに、UVB照射に伴うMDAの増加について、GSHエステルがMDAの増加を抑える効果があることが判明した。これらの結果から、紫外線照射1回の実験の場合には、細胞内SH基のうち、グルタチオン及び誘導合成されたMTが紫外線照射の影響を弱める作用があることが推測された。

繰り返し照射の場合には1回照射の場合とは異なり、皮膚組織中のMDA量の変化は無かった。細胞内GSHは、1回照射の場合とは反対に、繰り返し照射によりむしろ上昇する結果を示した。この上昇は、GSHエステル群のみにおいて抑制が観察された。

(2) 培養細胞を用いて、上述の個体レベルのメタロチオネインに関する実験結果について検討した。

方法： 培養細胞として、正常新生児線維芽細胞(NB1RGB)及びヒト子宮ガン由来細胞(HeLaS3)を用いた。上述の紫外線ランプを用いて1回照射をした後、48時間後に生細胞数を算定し、細胞を採取して分析を行った。

結果： 無照射の場合、NB1RGB細胞はHeLa細胞に比べてグルタチオン量が20分の1しか無く、他方7倍近いMTが存在していた。HeLa細胞は250J/m²の照射で増殖率が2分の1に低下したが、NB1RGB細胞では、600J/m²でも紫外線に対して耐性であった。このNB1RGB細胞に750J/m²の紫外線を照射すると増殖率が40%に、1,250J/m²を照射すると生存率が40%に低下した。ところが、あらかじめ亜鉛またはデキサメタゾンでMTを人為的に誘導しておくとその低下が抑えられる傾向が認められた。

考察： 紫外線照射により、ヒドロキシラジカル等の活性酸素が細胞内で発生することが知られている。UVBの1回照射の場合には、紅斑、浮腫、並びに活性酸素の発生によると考えられる細胞内GSHの減少や脂質過酸化の増加が観察された。MTの誘導や、グルタチオンイソプロピルエステル投与によってこれらの変化が抑制された事実は、活性酸素がグルタチオンやMTなどのSH基を含むペプチドにより除去された結果であると考えられる。しかしながら、繰り返し照射実験の場合には、活性酸素によると考えられる上述の変化は認められず、これらの変化は一過性の変化であると考えられた。

繰り返し照射の場合には1回照射とは異なり、細胞内GSHの上昇が認められたが、これがGSH合成の上昇によるためかどうかは、不明である。少なくとも、MDAの増加が認められないことから、酸化ストレスに起因するGSHの消費の可能性は小さいと考えられる。

Matsui and DeLeoの報告にあるように、UVBの繰り返し照射によってヘアレスマウスに日光角化症及び腫瘍を作成することができた。今後この実験モデルは、紫外線による遺伝子発現や紫外線刺激応答タンパクの解析に用いることができるであろう。

6. まとめ

(1) 紫外線の発がん実験モデルとして、ヘアレスマウスのモデルを作成した。

- (2) ストレス蛋白の影響指標としての有用性が認められ、またその遺伝子検出系が確立できた。
- (3) UVB照射による障害活性を染色体変異として検出する系を確立し、その有用性が明らかとなった。
- (4) T細胞依存性の肥満細胞の増殖・分化の系を確立し、300nmUVB照射によってその抑制がみられたが、細胞膜上のIgE抗体受容体発現では増強がみられた。
- (5) UVB照射により発生する活性酸素の生体影響は、1回照射の場合にはMTやGSHを人為的に増やすことにより抑制できる可能性があることが示された。しかし、長期照射の場合にはGSHの減少及びMDAの増加が抑えられており、これは生体の適応による可能性が高い。

7. 研究発表の状況

- (1) Aoki, Y., Tohyama, C. and Suzuki, K.T. A western blotting procedure for detection of metallothionein. *J. Biochem. Biophys. Methods* 23, 207-216(1991).
- (2) 弘田裕美子、鈴木純子、竹鼻 眞、小林静子、遠山千春、西村久雄、西村典子、*生化学* 63, 779(1991).
- (3) 井澤勝彦、鈴木純子、高坂真理子、佐藤陽炎、横田恵理子、竹鼻 眞、小林静子、遠山千春、西村久雄、原 一夫、*紫外線照射による腫瘍形成とグルクチオン誘導体*、日本薬学会第113年会(1992).
- (4) 片山 昇、野原 修、今井 透、森山 寛、藤巻秀和、*X線照射によるマウス骨髄由来細胞の分化・増殖に及ぼす影響*、第42回日本アレルギー学会(1992).
- (5) 野原 修、片山 昇、藤巻秀和、*紫外線及びX線照射の骨髄由来肥満細胞分化・増殖に及ぼす影響の比較*、第33回大気汚染学会(1992).
- (6) Katayama, N., Nohara, O., Moriyama, H., and Fujimaki, H. (1994) Comparison of the effects of UV-B and X ray irradiation on mast cell differentiation from mouse bone marrow cells. *Toxic Substance J.* (in press)
- (7) Kobayashi, S., Hirota, Y., Suzuki, J. S., Takehana, M., Nishimura, H., Nishimura, N., and Tohyama, C. (1994) *Photochemistry and Photobiology.* (in press).
- (8) S. Murata, T. Matsuzaki, H. Yaoita & M. Noda: A new retroviral vector for detecting chromosomal mutations and genomic instability in a wide variety of cultured mammalian cells. *Mutation Res.* submitted