〈研究発表〉

植物由来物質による紫外線誘発細胞障害抑制効果について

牟礼　佳苗，竹下　達也

和歌山県立医科大学医学部　公衆衛生学（〒641-8509 和歌山市紀三井寺 811-1，E-mail: kana@wakayama-med.ac.jp）
Dept. of Public Health, Wakayama Medical University School of Medicine（〒641-8509 811-1 Kimiidera, Wakayama, E-mail: kana@wakayama-med.ac.jp）

概　要

オゾン層の減少による紫外線地上到達量の増加による環境への影響、皮膚がん等ヒトの健康への影響は、世界的に深刻な問題となっている。本研究は、UV-B による発がん誘発作用を、動物由来細胞を用いて、突然変異頻度および細胞死であるアポトーシスを指標として検出し、植物由来カロテノイドによる予防効果について検討した。その結果、突然変異、アポトーシスともに、紫外線照射量に応じて量依存的に増加し、また、植物由来カロテノイドにより抑制される結果を得た。

キーワード紫外線，細胞障害，突然変異，アポトーシス，植物由来物質

1. はじめに

人為起源物質によるオゾン層の破壊が世界的問題となっている中、モントリオール議定書による規定等により、オゾン層破壊物質濃度そのものは減少傾向を示しているものの、オゾン量は依然として低く、紫外線（UV-B : 280～315nm）の地上到達量は増加を続けている。また、大気汚染による雲の減少等の気象要素も地上到達量増加原因として挙げられている。国際連合環境計画の報告書によると、オゾン層の減少による紫外線の地上到達量は 10 年間で 2～5%増加しており、オゾン層が 1%減少することで、アメリカ人では悪性黒色腫（メラノーマ）が毎年 2%増加し、全世界で毎年 4.8 万人がその他の皮膚がんを発症するとされている [1]。日本においても、メラノーマは年々増加しており、国立がん研究センターの報告書では、毎年 10 万人に 5 人以上発生していると推測され、紫外線が環境に与える影響、健康に与える影響は全世界的に深刻化している [2]。

本研究では、植物由来カロテノイドによる紫外線誘発皮膚がんの予防効果について、動物由来細胞を用いて検討した。

2. 方法

2.1 細胞および培地

チャイニーズ・ハムスターの肺由来細胞 V79 細胞（理化学研究所，つくば市）を用いた。10%の牛胎児血清（Invitrogen 社，東京）含有 Minimum Essential Medium（MEM, Invitrogen）培地を用い、5% CO_2 存在下、37℃で培養した。細胞剥離には、Trypsin-EDTA（Invitrogen）を用いた。紫外線照射時には、培地による紫外線吸収作用を除外するため、無血清で透明な Earl's Balanced Salt Solution（EBSS, Invitrogen）を用いた。植物由来カロテノイドとして、トマト由来リコピンを選んだ。リコピン、HAT（100 μM hypoxanthine, 0.4 μM aminopterin, 16 μM thymidine）および 6-thioguanine（6-TG）は、Sigma 社製を使用した。紫外線は、UV Stratalinker 2400（Agilent 社, La Jolla, CA）を用いて照射した。

2.2 Clonal Survival Assay

実験に先立ち、Clonal Survival Assay を行い、突然変異は誘発するが、細胞を 50%以上死滅させない紫外線量を決定した。1000 個になるように MEM 培地で調整した細胞を一晩ディッシュで培養し、EBSS に換え、UV-B に曝露させた。MEM 培地に戻してさらに培養し、7 日後にメタノールで固定し、0.5%クリスタルバイオレット液で染色してコロニー数を数え、生存率を算出した。リコピンについては、すでに毒性を示さないことが明らかになっている濃度（5 μM）を用いた [3]。

2.3 突然変異試験

突然変異試験として、HPRT 試験を用いた。HAT 含有 MEM 培地で細胞を 10 日間培養してバックグラウンドの突然変異細胞を除去した後、リコピン含有および非含有 MEM 培地を用いて一晩培養した。培地を EBSS に換え、Clonal Survival Assay によって決定したエネルギー量の UV-B を照射した後、リコピン含有および非含有 MEM 培地でさらに 6 日間培養した。Trypsin-EDTA ですべての細胞を剥離して回収し、10^6 個になるように突然変異を起こした細胞のみが生存で

きる 6-TG（10 μg/ml）含有 MEM 培地で調整し、さらに２週間培養した。メタノール固定後、0.5%クリスタルバイオレット液で染色し、コロニー数（MC: Mutant Clones）を数えた。同時に、1000 個の細胞を 6-TG を含まない MEM 培地で培養し、６日後に同様に固定して染色し、コロニー数（PEC: Plating Efficiency Clones）を数え、突然変異頻度（Mutant Fraction）＝[MC / {10^6 × (PEC / 1000)}]を算出した。

2.4 アポトーシス試験

細胞全体の紫外線誘発ダメージの影響は、アポトーシス（細胞死）検出法により評価した。方法は、APOPercentage 法（Biocoler, Northern Ireland）を用いた。リコピン含有・非含有 MEM 培地でそれぞれ細胞数を 3 × 10^4 個/well になるように調整して 96 well plate にまき、一晩培養した後、培地を EBSS に換えて各エネルギー量の UV-B を照射した。リコピン含有および非含有 MEM 培地に戻し、さらに２時間培養した。その後、APOPercentage Dye 含有培地に換え、さらに 30 分間培養した後、顕微鏡下で赤色色素を取り込んだ細胞を観察した。画像解析ソフトウェアを用い、色素取り込み量を数値化して比較した。

3. 結果

3.1 Clonal Survival Assay

UV-B による V79 細胞の生存率を、Fig. 1 に示した。照射エネルギー量ごとの生存率は、50 J/m² では 95%、100 J/m² では 90%、200 J/m² では 70%であり、500 J/m² では 45%にとどまったため、突然変異試験、アポトーシス試験には、200 J/m² 以下の照射量を用いた。

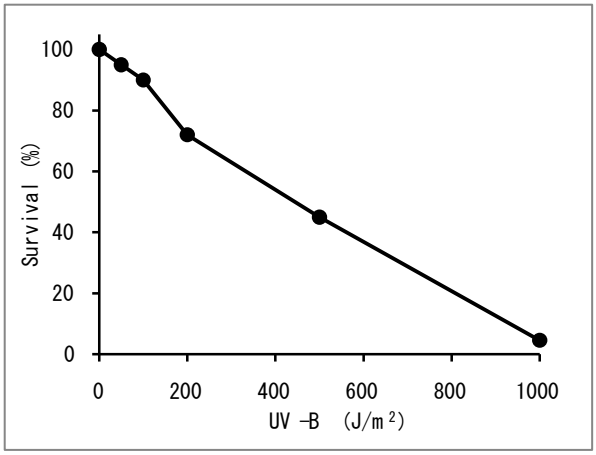


Fig.1: UV-B induced cytotoxities in V79 cells.

3.2 突然変異試験

V79 細胞において UV-B により誘発された突然変異頻度、およびトマト由来リコピンによる抑制効果を Fig. 2 に示した。UV-B の照射量に応じて、誘発される突然変異頻度は増加した。また、リコピンによる抑制率は、UV-B 50 J/m² では 22.1%、100 J/m² では 30.4%、200 J/m² では 30.4%であった。

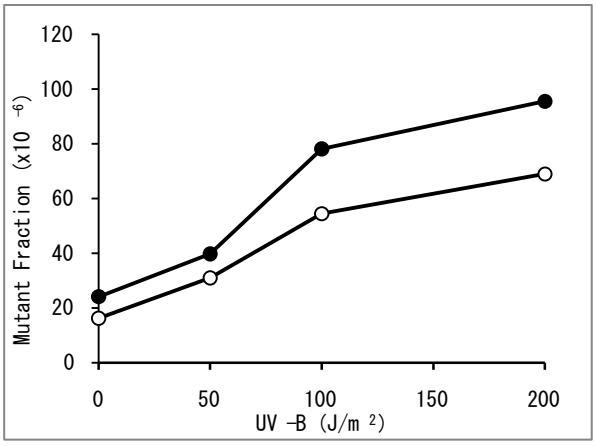
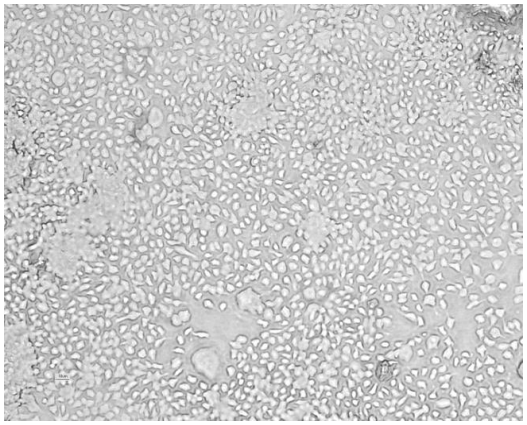


Fig.2: Dose-dependent UV-B induced mutant fractions were reduced by lycopene. Solid circle: control, Open circle: lycopene (5 μM).

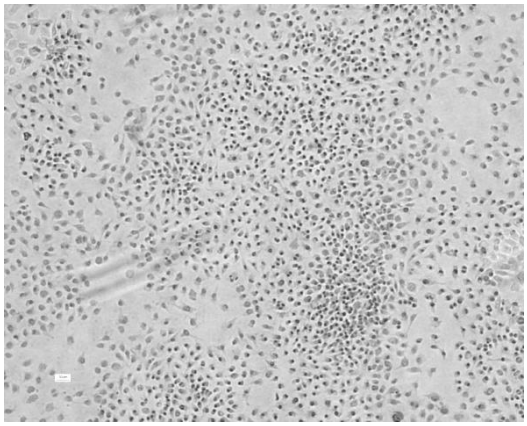
3.3 アポトーシス試験

アポトーシスを起こしている細胞を、顕微鏡下で観察した（Fig. 3）。UV-B 100 J/m² 照射では、control に比して赤色色素を取り込んだ細胞が多く観察され、UV-B によりアポトーシスが誘発されていることがわかった（Fig. 3-a および b）。一方リコピン処理群では、赤色色素を取り込んでいる細胞がほとんどなく、UV-B による細胞障害がリコピンにより抑制されていることがわかった（Fig. 3-c）。UV-B 200 J/m² 照射でも同様の傾向を得たが、赤色色素の取り込みは、100 J/m² 照射で最も多かった。

a. control



b. UV-B (100 J/m²)



c. UV-B (100 J/m²) + lycopene (5 μM)

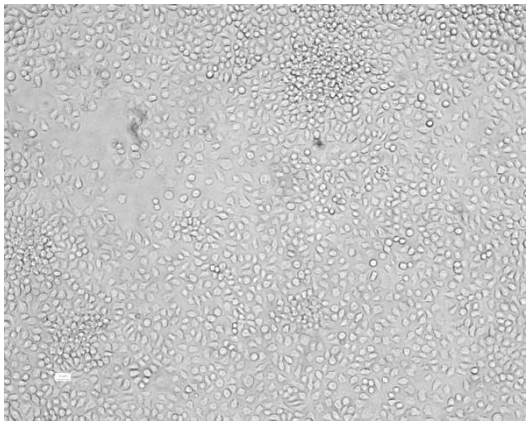


Fig. 3 UV-B induced apoptosis in V79 cells. a. control, b. Cells were exposed to UV-B (100 J/m²), c. Cells were treated with lycopene (5 μM) for 24 hrs prior to UV-B exposure.

画像解析ソフトにより赤色色素の取り込み量を数値化した結果をFig. 4に示した。未処理の細胞群（CONT）に比べ、100 J/m²のUV-B照射細胞群（UV-B）では1.8 倍程度赤色色素の取り込みが増加していたのに比して、リコピン処理群（UV-B LYC）では、UV-B照射によるアポトーシス誘発が抑制されていた。

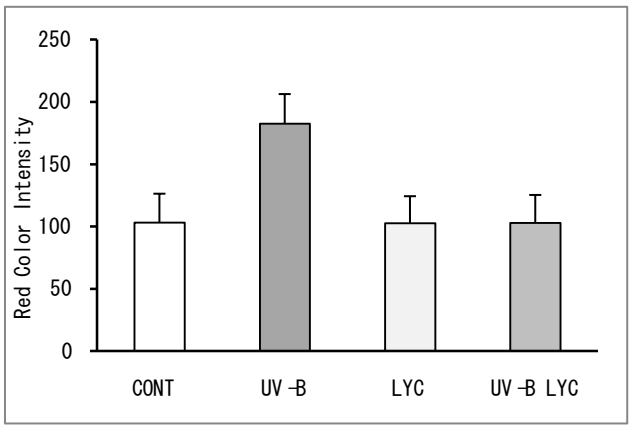


Fig. 4 UV-B induced apoptosis were reduced by lycopene in V79 cells. Data were shown as mean ±S.D. of triplicate experiments.

4. 考察

本研究により、UV-Bは、エネルギー照射量に比例して量依存的に突然変異を誘発し、トマト由来リコピンにより抑制される結果を得た。また、アポトーシス試験においては、UV-B 100 J/m²照射において最も強くアポトーシスを誘発しており、リコピンによる誘発抑制効果が観察された。UV-B 200 J/m²や500 J/m²照射では、コントロール群に比してアポトーシスは誘発されていたが、100 J/m²照射時よりは低くかった。これは、200 J/m²以上のUV-B照射量では、細胞の生存率が70%以下であったことから、細胞が障害を受けた場合に、個体が生き残る手段として障害を受けた細胞を死に至らしめるプログラム化された細胞死（アポトーシス）よりも、細胞構成成分および機能の物理的・化学的損傷による受動的な細胞死（ネクローシス）を起こしている可能性によることが示唆された。

紫外線による発がん誘発機構の代表的なものは、cyclobutane pyrimidine dimmers（CPDs）が挙げられる[4]。紫外線によりDNA分子が励起されることで、隣接する塩基同士が２量体（dimer）を形成することに起因し、このdimerによって複製のエラーが起こり、がん抑制遺伝子等に突然変異を誘発し、またアポトーシスを誘発することがわかっている[5-7]。また、紫外線照射により、細胞内に活性酸素群（ROS）が発生することも明らかにされており、紫外線曝露による皮膚がん発症の原因とされている[8]。本研究で用いたトマト由来リコピンは、13の２重結合を有することから強い抗酸化能を示すことが明らかとなっている[9, 10]。本研究において、紫外線が誘発した突然変異、アポトーシスがリコピンにより抑制されたのは、抗酸化作用によることが示唆される。一方、リコピンは抗酸化作用以外にも重要な突然変異抑制効果があることからも[11]、CPDs等紫外線により誘発されたDNA障害を修復する系が、リコピンにより活性化された可能性も示唆された。

5. まとめ

オゾン層減少による紫外線地上到達量の増加により、皮膚がん罹患率の上昇が懸念されている。本研究により、紫外線が誘発する突然変異やアポトーシスが、天然植物由来カロテノイドであるリコピンにより抑制される結果を得た。今後、リコピンによるUV-B誘発CPDs形成抑制作用について詳細な研究を行うことが重要であると考えられる。

参考文献

1) United Nations Environment Programme: Environmental

Effects of Ozone Depletion and Its Interactions with Climate Change (2006)

2) 国立がん研究センターがん対策情報センター, 地域がん登録全国推計によるがん罹患データ，国立がん研究センター (2006)

3) 牟礼佳苗，竹下達也： 動物およびヒト由来細胞を使った天然有機物質の突然変異抑制作用の評価，環境システム計測制御学会誌, Vol.10, pp.61-65 (2005)

4) YH. You, DH. Lee, JH. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui and GP. Pfeifer: Cyclobutane pyrimidine dimmers are responsible for the cast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells, Journal of Biological Chemistry, Vol.276, pp.44688-44694 (2001)

5) Z. Assefa, AV. Laethem, M. Garmyn and P. Agostinis: Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: On the role of cytosolic factors, Biochimica et Biophysica Acta, Vol.1755, pp.90-106 (2005)

6) P. Larsson P, E. Andersson, U. Johansson, K. Ollinger and I. Rosdahl I: Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis, Experimental Dermatology, Vol.14, pp.117-123 (2005)

7) J. Dahle, P. Noordhuis, T. Stokke, DH. Svendsrud and E. Kvam: Multiplex polymerase chain reaction analysis of UV-A- and UV-B-induced delayed and early mutations in V79 Chinese hamster cells, Photochemistry and Photobiology, Vol.81, pp.114-119 (2005)

8) AK. von Thale, Y. Kamenisch and M. Berneburg: The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis, Experimental Dermatology, Vol.19, pp.81-88 (2009)

9) K. Werts, U. Siler and R. Goralczyk: Lycopene: modes of action to promote prostate health, Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol.430, pp.127-134 (2004)

10) D. Gitenay, B. Lyan, M. Rambeau, A. Mazur and E. Rock: Comparison of lycopene and tomato effects on biomarkers of oxidative stress in vitamin E deficient rats, European Journal of Nutrition, Vol.46, pp.468-475 (2007)

11) K. Mure and TG Rossman: Reduction of spontaneous mutagenesis in mismatch repair-deficient and proficient cells by dietary antioxidants, Mutation Research, Vol.480-481, pp.85-95 (2001)