



Suppressive Effect of Recombinant Human Thioredoxin on Ultraviolet light-induced Inflammation and Apoptosis in Murine Skin

小野, 竜輔

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5614

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005614>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Suppressive Effect of Recombinant Human Thioredoxin on Ultraviolet light-induced Inflammation and Apoptosis in Murine Skin

リコンビナントヒトチオレドキシンのマウス皮膚における

紫外線炎症およびアポトーシスに対する抑制効果

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

皮膚科学

(指導教員：錦織千佳子教授)

小野 竜輔

【背景】

皮膚は外界のさまざまなストレスに晒されるが、中でも紫外線、特に UVB は最も有害なもののひとつであり、それに曝露することで sunburn 反応と呼ばれるアポトーシスを伴う皮膚の炎症反応が惹起される。臨床的には紅斑、腫脹から水疱形成といった様々な程度の皮膚症状が用量依存性に生じる。UVB が照射されると細胞内に活性酸素が生じるが、その活性酸素は sunburn 反応のシグナル伝達に大きく関与していると考えられている。活性酸素は種々の酸化ストレスシグナルを活性化して細胞死や炎症を惹起するため、抗酸化物質やシグナル伝達の投与により生体内の酸化還元バランスが変化すると紫外線に対する細胞の応答に大きく影響を与える。

チオレドキシン (TRX) は生体由来の酸化還元を担う 15kDa の比較的小さい蛋白質で、その投与や過剰発現が虚血性心疾患など多くの活性酸素に起因する疾患のモデルマウスに有効であることが示されている。TRX はそれ自体が活性酸素の除去能を有するほかに、還元型の TRX が様々な蛋白への水素供与体として働き細胞内の酸化還元シグナルの制御に重要な役割を果たしている。前述のように紫外線照射後に起こる皮膚の炎症反応やアポトーシスでは活性酸素が重要な役割を担うことが示されているが、それに対する TRX の効果はよく分かっていない。今回我々は TRX を過剰発現させた TRX・トランスジェニックマウス (TRX-Tg マウス) およびリコンビナントヒト TRX (rhTRX) を投与したアルビノヘアレスマウス (Hr-Kud) に紫外線を照射し、TRX の紫外線炎症およびアポトーシスに対する効果を調べた。

【方法】

TRX-Tg マウスおよび対照マウス (C57Bl6) に UVB を 5kJ/m² 照射を行い、紫外線照射後の炎症反応が抑制されるかを耳介の腫脹を計測することで調べた。また、紅斑などの紫外線炎症の肉眼的評価にはブラック性有毛性の C57Bl6 では適していないため、アルビノヘアレスマウス (Hr-Kud) を用いた。Hr-Kud マウスに PBS に溶解した rhTRX 40 µg を腹腔内に投与し、その 30 分後に UVB 750 J/m² を照射したのち経時的に皮膚を採取して皮膚の紫外線炎症およびアポトーシスが抑制されるかを PBS のみを投与した対照群と肉眼的、組織学的に比較検討した。皮膚に浸潤する好中球およびリンパ球数、真皮の血管径を計測し、統計学的解析を行った。また、主要な酸化ストレスマーカーである 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) の形成を免疫組織学的手法を用いて調べ、TRX の活性酸素除去効果について検討した。同時にシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) やピリミジン (6-4) ピリミドン光産物 (6-4PP) といった紫外線 DNA 損傷の形成に対する影響も調べた。アポトーシスに対する効果を皮膚組織の sunburn cell 形成 (HE 染色で核が断片化し、細胞質が好酸性に染まるアポトーシスに陥ったケラチノサイト)、活性化カスパーゼ 3 染色、

TUNEL 染色にて行った。また、同様に Hr-Kud マウスを用いて活性酸素が惹起する炎症およびアポトーシスの主要な経路である MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケードへの影響について検討した。rhTRX を照射 30 分前に投与し、照射後 0.5、2、12 および 24 時間後にマウス表皮を採取し、ウェスタンブロッティング法を用いて p38 MAPK と c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化について調べ、定量的評価を行った。

【結果】

①TRX-Tg マウスおよび TRX 投与群のヘアレスマウスで紫外線照射後の耳介腫脹が対照群と比較して有意に抑制された。肉眼的にはヘアレスマウスの TRX 投与群では対照群と比べて紅斑、血管拡張の抑制が認められた。組織学的にもヘアレスマウスで表皮の微小膿瘍形成や炎症細胞浸潤が抑制され、浸潤する好中球とリンパ球の数および紅斑の指標となる真皮浅層の血管叢は有意に抑制された。特に好中球の浸潤が rhTRX 投与により顕著に抑制された。②免疫組織学的に紫外線照射により生じる代表的な酸化的 DNA 損傷である 8-OHdG は TRX 投与群で著明にその形成が抑制された。一方で、紫外線による直接的 DNA 損傷であるシクロブタン型ビリミジンダイマーや 6-4 光産物は rhTRX 投与の影響を受けず、対照群と差がなかった。③マウスの表皮では rhTRX 投与により sunburn cell 数の減少、活性化カスパーゼ 3 陽性細胞数の減少、TUNEL 陽性細胞数の減少を認め、表皮細胞でのアポトーシスの抑制が認められた。④紫外線照射前後のマウス表皮を用いたウェスタンブロッティング解析では、チオレドキシン投与群で紫外線炎症およびアポトーシスに関わる p38 MAPK および JNK のリン酸化の抑制が認められた。定量的評価を行ったところ、p38 MAPK では早期では対照群と同様に活性化されるが 12 時間以降の持続的な活性化が抑制され、JNK では照射 0.5～2 時間後の早期の活性化が抑制された。

【考察】

今回の実験では TRX-Tg マウスおよび TRX 投与 Hr-Kud マウスにおいて紫外線照射後の炎症反応が抑制された。好中球は紫外線炎症で重要な役割を果たすが、今回 TRX 投与群において有意に皮膚への好中球浸潤が抑制された。細菌由来リポ多糖類の皮膚注射による局所への好中球浸潤が TRX 投与により抑制されることが知られており、今回の結果もそれに合致するものであった。一方、TRX の抗酸化作用が炎症の抑制に寄与したとも考えられた。活性酸素が炎症を惹起する主要な機序として、活性酸素が p38 MAPK カスケードを活性化し、インターロイキン-6、8 といった炎症性サイトカインの発現を上昇させることが知られている。様々な抗酸化剤が紫外線炎症を抑制することも実験で示されており、今回の実験で TRX により酸化ストレスマーカーの 8-OHdG の染色性の著明な低下を認めていることから、TRX 投与により活性酸素が除去され、その結果 p38 MAPK のカスケードが抑制されたと考えられた。

今回の実験では TRX 投与により紫外線のアポトーシスが抑制された。紫外線によるアポトーシスの主要経路は DNA 損傷、活性酸素および Fas を始めとするデスレセプターの活性化の 3 つと考えられている。今回の実験では紫外線直接的な DNA 損傷に対して TRX は影響しなかったことから、DNA 損傷からのアポトーシスシグナルには影響しなかったと考えられた。デスレセプターの活性化については、TRX の過剰発現は Bcl-2 の発現を増加させ、Fas などのデスレセプターのカスパーゼ 8 から Bcl-2 interacting protein (Bid) を介したアポトーシスを抑制することが知られているため、TRX 投与により抑制された可能性が示唆される。活性酸素は主に MAPK カスケードを活性化し、最終的に転写因子である AP-1 を活性化して種々のアポトーシス経路を活性化させる。MAPK のうち p38 MAPK と JNK はいずれもアポトーシスに関与するが、それらは共通の上流のカスケード蛋白である apoptosis signaling kinase-1 (ASK1) の制御を受けている。還元型 TRX は ASK1 と結合しこれを不活化されるが、紫外線により活性酸素が生じて TRX が酸化型となると、TRX は ASK1 から解離してカスケードが活性化される。今回の実験では TRX の前投与がされることで紫外線の活性酸素が除去され、ASK1 の活性化抑制に寄与したと推測される。

TRX-Tg マウスは酸化ストレスが原因とされる種々の疾患に対して耐性を示し、TRX の投与も同様に有用であることがこれまで示されているが、TRX を含めた抗酸化剤の長期の使用に関してはそのアポトーシス抑制効果に起因する潜在的発癌性について検討する必要がある。今回の実験では、TRX の前投与は紫外線照射後の表皮ケラチノサイトの CPD や 6-4PP といった DNA 損傷形成には影響しなかったが、ケラチノサイトのアポトーシスは抑制された。通常、DNA 損傷が多数形成された場合その細胞はアポトーシスに陥る機序が働くが、何らかの理由によりアポトーシスが抑制され DNA 損傷が修復されない状態で分裂増殖を続けると遺伝子変異が蓄積するため、将来的に細胞の癌化が生じやすくなることが懸念される。しかしながら、DNA 損傷だけでなく、活性酸素や慢性炎症も紫外線発癌の原因であることが知られている。紫外線による炎症反応が減弱する TNF α 欠損マウスでは紫外線発癌が抑制され、シクロオキシゲナーゼ-2 を過剰発癌させたマウスでは紫外線による発癌が促進されることが知られている。また、酸化的 DNA 損傷を修復する酵素のひとつである Ogg-1 欠損マウスは 8-OHdG の蓄積を示し、発癌を来しやすい。したがって、炎症や紫外線由来の活性酸素も発癌において重要な役割を果たしており、活性酸素をスカベンジし、炎症を抑制する TRX は、慢性炎症や酸化ストレスによって惹起される発癌に対しては抑制的効果を示す可能性が示唆される。

本研究はチオレドキシンの紫外線炎症に対する抑制効果を示した研究で、p38 MAPK と JNK を介する系をブロックする事で抗炎症効果を発揮していると推測した。光発癌に対するチオレドキシンの安全性については長期の照射試験において今後検証する必要がある。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2269 号	氏 名	小野 竜輔
論 文 題 目 Title of Dissertation	Suppressive Effect of Recombinant Human Thioredoxin on Ultraviolet light-induced Inflammation and Apoptosis in Murine Skin リコンビナントヒトチオレドキシンのマウス皮膚における紫外線炎症およびアポトーシスに対する抑制効果		
審 査 委 員 Examiner	主 査 林 祥剛 Chief Examiner 副 査 堀 田 博 Vice-examiner 副 査 崎 崎 尚 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

チオレドキシン (TRX) は生体由来の酸化還元を担う 15kDa の比較的小さい分子量の蛋白質で、その投与や過剰発現が虚血性心疾患など多くの活性酸素に起因する疾患のモデルマウスに有効であることが示されている。本研究は TRX を過剰発現させた TRX-トランスジェニックマウス (TRX-Tg マウス) およびリコンビナントヒト TRX (rhTRX) を投与したアルビノヘアレスマウス (Hr-Kud) に紫外線を照射し、TRX の紫外線炎症およびアポトーシスに対する効果を調べた。TRX-Tg マウスおよび TRX 投与 Hr-Kud マウスにおいて紫外線照射後の炎症反応が抑制された。TRX 投与群において有意に皮膚への好中球浸潤が抑制された。一方、TRX の抗酸化作用が炎症の抑制に寄与したとも考えられた。活性酸素が炎症を惹起する主要な機序として、活性酸素が p38 MAPK カスケードを活性化し、インターロイキン-6、8 といった炎症性サイトカインの発現を上昇させることが知られている。様々な抗酸化剤が紫外線炎症を抑制することも実験で示されており、本研究で TRX により酸化ストレスマーカーの 8-OHdG の染色性の著明な低下を認めていることから、TRX 投与により活性酸素が除去され、その結果 p38 MAPK のカスケードが抑制されたと考えられた。

本研究では TRX 投与により紫外線のアポトーシスが抑制された。紫外線によるアポトーシスの主要経路は DNA 損傷、活性酸素および Fas を始めとするデスレセプターの活性化の 3 つと考えられている。本研究では紫外線の直接的な DNA 損傷に対して TRX は影響しなかったことから、DNA 損傷からのアポトーシスシグナルには影響しなかったと考えられた。デスレセプターの活性化については、TRX の過剰発現は Bcl-2 の発現を増加させ、Fas などのデスレセプターのカスパーゼ 8 から Bcl-2 interacting protein (Bid) を介したアポトーシスを抑制することが知られているため、本研究において TRX 投与により抑制された可能性が示唆される。活性酸素は主に MAPK カスケードを活性化し、最終的に転写因子である AP-1 を活性化して種々のアポトーシス経路を活性化させる。MAPK のうち p38 MAPK と JNK はいずれもアポトーシスに関与するが、それらは共通の上流のカスケード蛋白である apoptosis signaling kinase-1 (ASK1) の制御を受けている。還元型 TRX は ASK1 と結合しこれを不活化されるが、紫外線により活性酸素が生じて TRX が酸化型となると、TRX は ASK1 から解離してカスケードが活性化される。今回の実験では TRX の前投与がされることで紫外線の活性酸素が除去され、ASK1 の活性化抑制に寄与したと推測される。

TRX-Tg マウスは酸化ストレスが原因とされる種々の疾患に対して耐性を示し、TRX の投与も同様に有用であることがこれまで示されているが、TRX を含めた抗酸化剤の長期の使用に関してはそのアポトーシス抑制効果に起因する潜在的発癌性について検討する必要がある。今回の実験では、TRX の前投与は紫外線照射後の表皮ケラチノサイトの CPD や 6-4PP といった DNA 損傷形成には影響しなかったが、ケラチノサイトのアポトーシスは抑制された。通常、DNA 損傷が多数形成された場合その細胞はアポトーシスに陥る機序が働くが、何らかの理由によりアポトーシスが抑制され DNA 損傷が修復されない状態で分裂増殖を続けると遺伝子変異が蓄積するため、将来的に細胞の癌化が生じやすくなることが懸念される。しかしながら、DNA 損傷だけでなく、活性酸素や慢性炎症も紫外線発癌の原因であることが知られている。紫外線による炎症反応が減弱する TNF α 欠損マウスでは紫外線発癌が抑制され、シクロオキシゲナーゼ-2 を過剰発現させたマウスでは紫外線による発癌が促

進されることが知られている。また、酸化的 DNA 損傷を修復する酵素のひとつである Ogg-1 欠損マウスは 8-OHdG の蓄積を示し、発癌を来しやすい。したがって、炎症や紫外線由来の活性酸素も発癌において重要な役割を果たしており、活性酸素をスカベンジし、炎症を抑制する TRX は、慢性炎症や酸化ストレスによって惹起される発癌に対しては抑制的効果を示す可能性が示唆される。

本研究は、従来明らかでなかった TRX の紫外線炎症に対する抑制効果についての研究であり、TRX の紫外線炎症に対する抑制効果の分子機序の一端を明らかにした。重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。