

太陽光紫外線誘発DNA損傷と ヒト細胞における修復

金沢大学薬学部

二階堂修

We analyzed the induction and repair of various kinds of DNA damage in human cells exposed to a solar UV-simulator, by means of an enzyme-linked immunosorbent assay or an immunoslot blot conjugated with enhanced chemiluminescence (ISB-ECL) system. When we irradiated normal human cells with up to $10\text{J}/\text{m}^2$ of UVC (germicidal lamps, predominantly 254nm), we could detect the induction of both cyclobutane thymine dimers (TT-dimers) and (6-4) photoproducts (64Ps) in their cellular DNA in dose-dependent manners. Normal human cells completely excised 64ps by 8hr after the exposure, whereas the cells excised only 50% of initial amount of TT-dimers by 24hr. On the other hand, the xeroderma pigmentosum cells belonging to complementation group A (XPA) could not excise both TT-dimers and 64ps.

We succeeded to detect the induction of the Dewar isomers of (6-4) photoproducts in human cells exposed to a solar UV-simulator (Oriel) by using a monoclonal antibody DEM-1 specific for Dewar photoproducts (Dewar-P) in DNA. Normal human cells excised Dewar-P from their DNA faster than TT-dimers, but slower than (6-4) photoproducts. However XPA cells defective in DNA repair could not excise any kinds of DNA damage at all.

1 序論

太陽光紫外線は295nm~400nmの波長の長波長紫外線を含むが、そこに含まれるUVB (295~320nm) とUVA(320~400nm) は、様々な人体影響、例えば免疫能の低下や皮膚がんの発生をもたらすことが知られている。太陽光紫外線は前述の様に極めて広範囲なスペクトルを有する長波長紫外線であるため、そこに含まれるUVBがDNAに様々な損傷を誘起すること、およびUVAが誘起された損傷の一つである(6-4) photoproductを光異性化する^{1, 2)}という特徴がある。即ち、太陽光紫外線の生物学的影響を調べる場合には、そこにふくまれる各種波

長の紫外線のDNAへの効果とともに、混在する他の波長の紫外線による複合効果をも併せ考慮する必要があることになる。これまでヒト細胞への紫外線の効果を調べるのに、専ら254nmの単一波長に近い紫外線を特異的に放射する殺菌燈が用いられてきたが、得られた効果は太陽光紫外線の効果を近似するものですら無いことが明らかである。従って、太陽光紫外線の生物・人体影響を解析する場合には、太陽光紫外線に特徴的な損傷を指標として研究をおこなうべきと思われる。

紫外線の照射によって種々の損傷がDNAに誘発されるが、前述の様に損傷の種類とその生成量は波長依存的である。図-1に代表的な損傷の構造式を示した。254nmの紫外線照射(UVC)によって、DNA中の隣合ったthymineがcyclobutane thymine dimer (TT-dimer) と(6-4) photoproduct (64P) に変換されるが、Dewar photoproduct (Dewar-P) は生成されない。一方、320nm付近の紫外線が照射されると、64PがDewar-Pに光異性化されるので、太陽光紫外線などの長波長紫外線によって生成さ

DNA damage and its repair in human cells exposed to solar light



Osamu Nikaido

Division of Radiation Biology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Kanazawa University

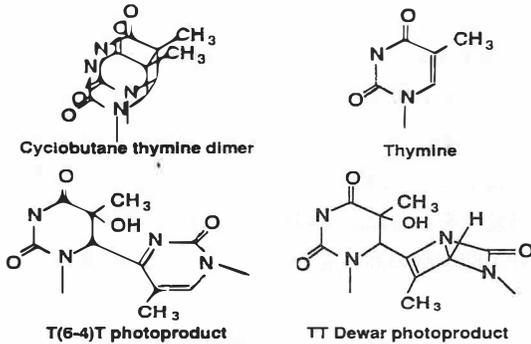


図-1. 紫外線で誘発される thymine を含む各種の損傷

れるのは主としてTT-dimerとDewar-Pとなる。

これまで我々は、紫外線によって誘発されるDNA損傷を特異的に分別検出するモノクローナル抗体の樹立を行って、ヒト細胞の損傷修復動態や修復の機構について解析してきた。本研究では、太陽光紫外線で特異的に誘発されるDewar-Pのヒト細胞での生成と修復の動態を解析することを目的とした。

2 実験

2.1 細胞

ヒト細胞としてGUN-2M(ヒト皮膚由来正常2倍体細胞)、WI38VA13(ヒト胎児肺由来SV40形質転換細胞)とHeLaS3(ヒト子宮頸がん由来細胞)を用いた。またA相補性群に属する色素性乾皮症患者由来細胞(XP1EH, XP2OSSV)を用いた。全ての細胞はダルベッコ変法MEM培地に10%の濃度に仔牛胎児血清を加えた培養液によって、37°CのCO₂インキュベータ内で培養された。

2.2 紫外線照射

各種の細胞10⁶個を直径10cmのプラスチックシャーレに培養して2日後、細胞を10mlの氷冷PBS(-)で2回洗浄し、細胞の乾燥を防ぐため厚さ1mmの石英ガラスをシャーレ上面にかぶせ、氷冷下で種々の紫外線を照射した、主として254nmの紫外線(UVC)を照射する殺菌燈(東芝GL-15)、太陽光

中の紫外線をシミュレートする照射装置(Oriel社81192型)、並びに太陽光紫外線そのものを紫外線源として実験に用いた。シミュレート照射装置の照射する紫外・可視域のスペクトル分布を図-2に示した。

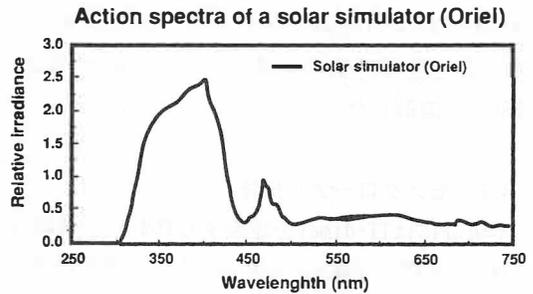


図-2. 太陽光紫外線シミュレート照射装置から照射される紫外・可視域のスペクトル分布

紫外線の線量率は、UVCの場合東京工学のトプコンUV-radiometerで、太陽光紫外線シミュレート照射装置による照射の際には、Mecam社(Scotland)のultraviolet digital radiometer(360nm)で測定した。紫外線照射直後、あるいは一定時間37°Cでインキュベート後、細胞を取り出しDNAを抽出した。

2.3 各種細胞の太陽光紫外線感受性の検討

100~200個の各種の細胞を直径10cmのシャーレに播種した後、6時間インキュベートした。ついで氷冷PBS(-)で細胞を洗浄し、氷冷浴下太陽光紫外線シミュレート照射装置で照射を行った。照射後加温した培養液を再び加え、37°Cで2週間インキュベートした。シャーレ上に形成されたコロニー数から生存率曲線を求めた。

2.4 損傷の検出

紫外線を照射後、一定時間インキュベートされた細胞からDNAを抽出し、DNA中に残存する各種損傷をモノクローナル抗体を用いて免疫化学的に定量検出した。

2.4.1 DNA抽出

水野等の方法によった³⁾。細胞をPBS(-)で洗浄後、EDTAとSDSを含む細胞溶解液で処理し、proteinase Kで一晩37°Cでインキュベートした。ついでphenol/chloroform:isoamylalcohol (P/CIA)でDNAを抽出した。抽出されたDNA標品をRNaseで37°C、1時間インキュベートした後、再びP/CIA処理によりDNAを抽出し、ethanol沈殿後、PBS(-)に溶解した。

2.4.2 モノクローナル抗体

本実験にはTT-dimerを認識するTDM-1³⁾。TDM-2抗体⁴⁾、64Pを認識する64M-2抗体⁴⁾とDewar-Pを認識するDEM-1抗体²⁾を用いた(各種抗体の認識するエピトープについては図-1を参照のこと)。

2.4.3 紫外線損傷検出法

各種のモノクローナル抗体を用いた酵素標識免疫抗体法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)⁵⁾とimmunoslot blotにenhanced chemiluminescence(ISB-ECL)を適用した方法で損傷を検出した。

3 結果

3.1 太陽光紫外線を照射されたヒト細胞の感受性の検討

太陽光紫外線シミュレート照射装置を用いて細胞の感受性を検討した結果を図-3に示した。

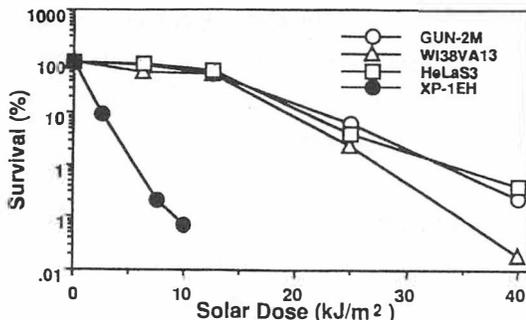


図-3. シミュレーター照射装置で照射された各種ヒト細胞の生存率曲線

正常ヒト由来GUM-2M、ヒト由来の無限増殖するWI38VA13細胞、子宮頸がん由来HeLaS3細胞では、共に太陽光紫外線に対する感受性に大きな違いは無い結果が得られたが、色素性乾皮症A相補性群に属するXP1EH細胞は、太陽光紫外線に対し高い感受性を示した。この結果はUVCを照射した際のXP1EH細胞の高感受性と矛盾しない(未発表)。

3.2 UVCを照射されたヒト細胞におけるDNA損傷の修復

図-4にUVCを照射された正常ヒト、XPA群細胞におけるTT-dimerと64Pの修復動態を調べた結果を示した。XPA(XP20SSV)細胞は両損傷の除去修復能力を示さない。正常ヒト細胞は64Pを6~12時間以内に完全に除去するが、TT-dimerは24時間を経過しても約40~50%が除去されるに過ぎないことが明らかである。なおつけ加えるならば、10J/m²のUVC照射ではDewar-Pは全く生成されない。

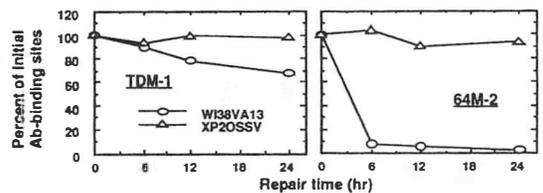


図-4. UVC10J/m²を照射された各種のヒト細胞における損傷の修復動態(左図はTDM-1抗体で検出されたTT-dimer, 右図は64Pを示す)

3.3 太陽光紫外線を照射されたヒト細胞におけるDNA損傷の誘発

太陽光紫外線シミュレート照射装置で各種のヒト細胞を照射し、その直後にDNAを抽出して各種の損傷を測定した結果を図-5に示した。左右両図の縦軸は異なっていることに注意されたい。なお、損傷の生成量をUVC(殺菌燈紫外線)等量で示した。TDM-2抗体で測定されたTT-dimerと比較し、64M-2抗体で検出された64Pは生成量が低いことが明らかである。その理由はシミュレート照射装置によって生成された64Pが光異性化されてDewar-Pに変化したことによる。事実、生成量は低いながら

も右に掲げた図からも明らかなようにDewar-Pの生成が認められる。

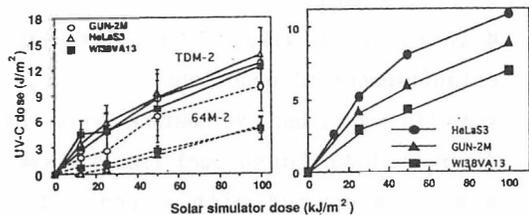


図-5. 太陽光紫外線シミュレート照射装置で照射されたヒト細胞における種々の損傷の誘発 (左図はTT-dimerと64Pを、右図はDewar-Pの誘発動態を示す)

3.4 太陽光紫外線シミュレート照射装置で照射されたヒト細胞におけるDNA損傷の修復

照射後、横軸に示した時間インキュベートした細胞よりDNAを抽出し、残存する損傷量を測定したところ、UVCで得られた結果と同様に64Pの除去はTT-dimerのそれより早いことが分かった(図-6)。一方、Dewar-Pの除去動態を見ると、正常ヒト細胞では24時間の間に約70%を除去する能力があることが分かった。

以上の結果から、正常ヒト細胞におけるDewar-Pの除去はTT-dimerより早く、64Pより遅いという結果が得られた。

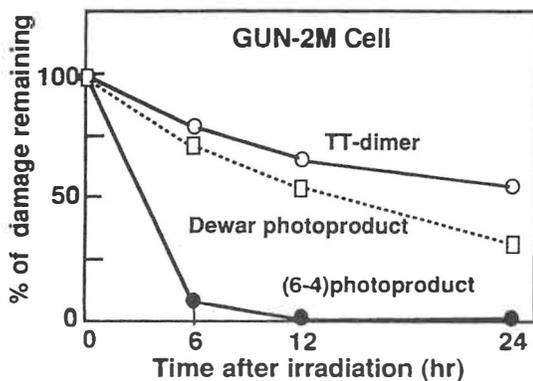


図-6. 正常ヒト細胞における各種損傷の修復

4 考察

これまでの細胞を用いた多くの研究がUVC(殺菌燈)を紫外線線源として用いたものであり、太陽光紫外線、もしくはシミュレート照射装置による長波長紫外線照射の効果を調べた実験は数える程しか無いのが現実である。我々がこれまで報告し、また本報告で明らかになったように、太陽光紫外線は、広範囲にわたる各種の波長の紫外線を含み、その複合効果が現われることから、太陽光紫外線の生物・人体影響をUVCを用いた実験から推定することは出来ないという結論が導かれる。本報告では、Dewar-Pの正常ヒト細胞における修復動態を解析した。一方、修復能の欠損を示すXPA 群細胞は何れの損傷をも除去できない結果が得られた(未発表)。

Dewar-Pは太陽光紫外線の照射によった生成される64Pが、同時に太陽光紫外線に含まれる320nmの波長によって効率よく光異性化されることによって生じる。今後は太陽光紫外線に照射されたヒト皮膚組織で、TT-dimerやDewar-Pがどの様に生成・除去されるかを明らかにする予定である⁶⁾。

5 総括

近年のオゾン層の減少に伴い、これまで我々が経験したことのない短波長紫外線が地表上に到達し、皮膚がんの多発する可能性が示唆されている。皮膚がんの原因の一つは、太陽光紫外線によって細胞遺伝子に誘発される様々なDNA損傷であることは疑いを容れない。短波長紫外線の増加はTT-dimerと64Pを生成し、64PはさらにDewar-Pに効率よく変換されることから、その修復動態を解析することが重要である。本研究の結果からDewar-Pの除去はTT-dimerと同様に遅滞することが明らかになったが、その変異原性についての詳細な研究が今後必要となると考える。また、コスメトロジーの観点から見ると、UVBのみならずUVAをも効率的に防護する製剤を開発することが急務となるであろう。

6 謝 辞

我々は長年にわたって太陽光紫外線生物学研究の樹立を訴えてきたが、今回コスメトロジー財団から研究助成を受けたことにより、その基礎を築く研究を完成させることが出来た。深く感謝すると共に貴財団の今後の発展を祈るものである。

引用文献

- 1) Taylor J. -S. and M. P. Cohrs, "DNA, light and Dewar pyrimidone: the structure and biological significance of TpT3", *J. Am. Chem. Soc.*, 109 2834-2835 (1987)
- 2) Matsunaga T., Y. Hatakeyama, M. Ohta, T. Mori, and O. Nikaido, "Establishment and characterization of a monoclonal antibody recognizing the Dewar isomers of (6-4) photoproducts", *Photochem. Photobiol.*, 57 934-940 (1993)
- 3) Mizuno T., T. Matsunaga, M. Ihara and O. Nikaido, "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. DNA Repair*, 254 175-184 (1991)
- 4) Mori T., M. Nakane, T. Hattori, T. Matsunaga, M. Ihara and O. Nikaido, "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)
- 5) Matsunaga, T., T. Mori and O. Nikaido. "Base sequence specificity of a monoclonal antibody binding to (6-4) photoproducts", *Mutation Res.*, 235 187-194 (1990)
- 6) Chadwick C. A., C. S. Potten, O. Nikaido, T. Matsunaga, A. R. Young, "The detection of cyclobutane thymine dimers, 6-4 photolesions and the Dewar photoisomer in sections of UV-irradiated human skin using specific antibodies, and the demonstration of depth penetration effects", *Photochem. Photobiol.*, in press.