

インターロイキン 12 による紫外線防護に関する研究

長崎大学先端生命科学研究支援センター

松田 尚樹

Interleukin-12(IL-12), one of the cytokines produced in UV-irradiated human skin, has been reported to prevent UV-induced immunosuppression through the mechanisms involving enhancement of DNA repair. This fact let us to speculate on the potential use of IL-12 for biological protection against harmful solar UV radiation. We examined effects of exogenously-added IL-12 on UV-irradiated human epidermal keratinocytes, the expression of IL-12 in those cells, and UV-induced intracellular signaling molecules responsible for IL-12 production. The removal of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) from the genomic DNA in cells irradiated with 100J/m² of UV-B (80μ W/cm²) was accelerated by the presence of human recombinant IL-12 at doses of 50 or 100ng/ml. Treatment of the irradiated cells with IL-12 also resulted in elevated survival level following UV-B irradiation. When cells were irradiated with 200J/m² of UV-B, IL-12 concentration in conditioned medium for 24h post-irradiation was approximately 12pg/ml, which was 10 fold higher than that in unirradiated control. Expression for IL-12A(p35) mRNA was also increased to 2.4 fold over the control level in 16h following exposure. Both the IL-12 secretion and IL-12 mRNA expression were inhibited by a JNK inhibitor and by an antioxidant. These results suggested that UV-induced oxidative stress in the cells triggers activation of intracellular signaling, including a JNK pathway. Although the downstream signaling is to be determined, activated JNK would lead to secretion of IL-12 through upregulation of IL-12 mRNA expression. IL-12 then enhances elimination of CPD from damaged DNA. Thus, UV-induced signaling pathways toward production of IL-12 are possibly a positive autocrine regulation of DNA repair system. To potentate this mechanism may lead to a new approach toward biological protection against solar UV light.

1. 緒言

オゾン層破壊による太陽紫外線（以下 UV）被ばく量増加に伴う人体影響が危惧されている。UV の悪影響を低減するための UV 防護として、衣服、帽子、眼鏡等の着用や、サンスクリーン剤の塗布による物理的あるいは化学的な方法が用いられ、これらの方法はいずれも有効であるが、生体の UV 防御反応を促進するものではない。そのため、UV を浴びた後に適用しても有効な生物学的 UV 防護法が望まれている。

UV 被ばく後の表皮には DNA 損傷が生じており、その大部分は修復されるが、修復されない損傷や誤った修復を受けた損傷が、細胞死または突然変異を引き起こし、ひいては、短期的には重篤な日光皮膚炎、長期的には発がんを誘導する。したがって、生物学的 UV 防護のアプローチの一つとして、DNA 損傷の修復を促進する因子を適用することが考えられる。事実、DNA 損傷の修復に必要な遺伝子の機能を欠損した XP（色素性乾皮症）患者の臨床においては、DNA 損傷の除去修復の際に必須の UV-endonuclease V や、損傷の光回復を可能とする

photolyase の適用が既に試みられているが、健常者が日常生活で使用し得る生物学的防護法は未だ確立していない。

サイトカインの一種であるインターロイキン 12 (IL-12) は、免疫担当細胞により産生され、免疫ネットワークを制御する液性因子としてクローニングされたものである。その後、皮膚構成細胞も IL-12 を産生し、UV がこれを誘導すること^{1, 2)}、また IL-12 が UV による皮膚免疫抑制に対して拮抗的に働くこと³⁾ が報告されてきたが、この機構の一つとして、IL-12 による DNA 損傷の除去修復促進の可能性が示されている⁴⁾。このことは、IL-12 が免疫系に対して働くのみならず、UV を浴びた後の組織防護に働く可能性を示す。一方、UV 照射された細胞内では、DNA 損傷に起因する、あるいは起因しないシグナル分子群が活性化し、細胞の増殖、アポトーシス、また分化機能といった多様な細胞機能の発現に関わっているが⁵⁻⁷⁾、その IL-12 誘導との関連性については知られていない。

本研究では、UV による組織の損傷を低減し、組織の再生を促す新たな UV 防護因子としての IL-12 の可能性を探ることを目的とし、培養ヒト表皮角化細胞を用いて、中波長 UV (UV-B) 照射後の DNA 損傷修復と細胞死に対する exogenous に与えられた IL-12 の作用、および UV-B 照射による endogenous な IL-12 産生誘導と、それに関する UV-B 誘導細胞内シグナル分子群について検討した。

2. 材料と方法

細胞には初代培養正常ヒト表皮角化細胞 (normal human epidermal keratinocytes: NHEK)、またはヒト表



Biological protection from ultraviolet radiation by interleukin-12

Naoki Matsuda

Center for Frontier Life Sciences,
Nagasaki University

皮角化細胞由来樹立株 (HaCaT) を用い、培養液にはそれぞれ EpiLife-KG2 (Kurabo) または DMEM/10% FBS を用いた。なお NHEK は継代数 1 - 3 の細胞を実験に供した。UV-B 照射には、CO₂ インキュベータ内に設置した UVB ランプ (UVP F8T5 8W、波長ピーク 302nm、線量率 80μW/cm²) を用いた。

照射後の細胞より DNA を単離し、UVB による主要な DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) 及び 6-4 光産物 (6-4PP) を、抗 CPD 抗体 (TDM-2) または抗 6-4PP 抗体 (64 M-2) を用いて ELISA 法により測定した。また UVB 照射後の細胞生存率をコロニー形成法により求めた。一方、照射後の細胞による IL-12A (p35) mRNA の発現は等長プライマー伸長法 (IPE 法、TrimGen) により、また培養液中に分泌された IL-12 (p70) 量は ELISA (Endogen) により定量した。細胞内シグナル分子としてはすでに UV-B に応答することを報告している MAP kinase 群である ERK1/2、JNK1/2、および p38 に着目し、それぞれのシグナル伝達系の阻害剤である PD98059 (MEK inhibitor, 100μM)、SP600125 (JNK1/2 inhibitor, 20μM)、および SB203580 (p38 inhibitor, 25μM、以上 Calbiochem) による IL-12 発現量の変化を調べた。シグナル分子のリン酸化は western blot により検出した。

3. 結果

100J/m² の UV-B を照射された HaCaT における CPD 及び 6-4PP 量の経時変化を Fig. 1 に示す。CPD 量は照射後 8 時間で半減し、24 時間後にも約 20% が残存したのに対して、6-4PP は照射後 2 時間で急激に減少し、16 時間後にはほぼ未照射のレベル (OD=0) に達した。すなわち、CPD はゆっくりと、6-4PP は早く修復されることが示された。

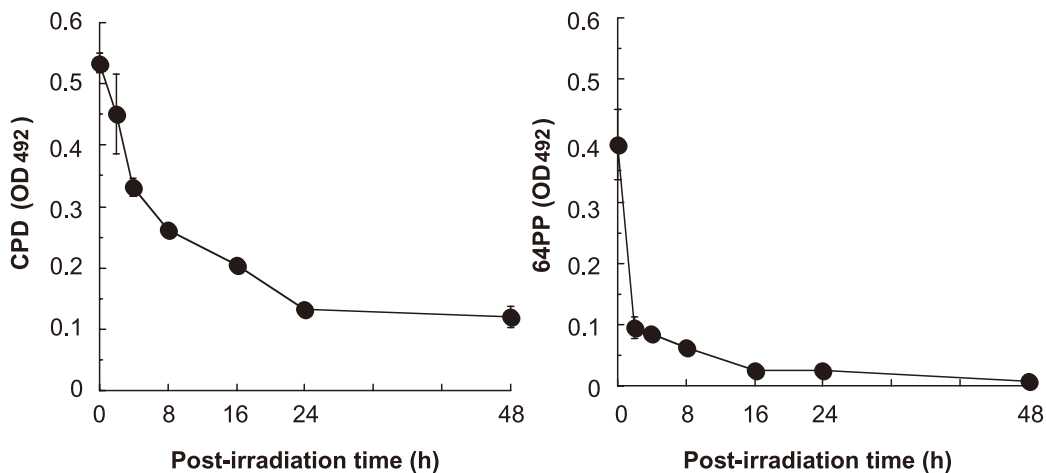
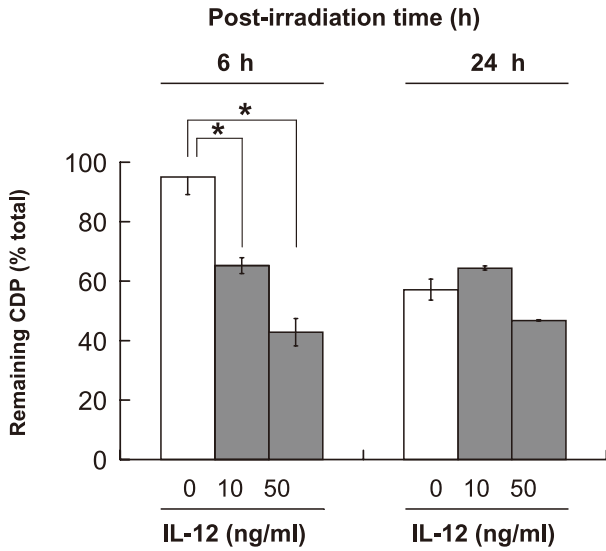


Fig.1 Repair kinetics of CPD (left) and 6-4PP (right) of HaCaT cells following exposure to UV-B (100J/m²).

そこで、あらかじめ細胞を IL-12 (ヒト・リコンビナント体, Sigma) で 1 時間培養した後に UV-B を照射し、さらに IL-12 存在下で培養を続け、CPD 及び 6-4PP 量を測定したところ、10ng/ml および 50ng/ml の IL-12 によって照射 6 時間後における CPD 量が有意に減少していた (Fig. 2)。しかし照射 24 時間後では IL-12 の作用は見られなかった。また、データには示さないが、IL-12 は 6-4PP の量には影響を与えなかった。さらに、UV-B 照射後の細胞の生存率は、IL-12 の存在により上昇した (Fig. 3)。以上を合わせると、exogenous に加えられた IL-12 は、CPD の修復のうち特に初期過程を促進し、その結果、UV-B による細胞死を防ぐことが考えられる。

次に、UV-B による IL-12 の産生誘導について検討したところ、NHEK 細胞では、200J/m² の UV-B 照射 16 時間後における IL-12 mRNA の顕著な発現 (非照射に対して約 2.4 倍, Fig. 4) と、24 時間後における培養液への IL-12 の分泌の線量依存的な増加 (200J/m² では約 12pg/ml, Fig. 5) が認められた。興味深いことに、HaCaT ではこのような UV-B による IL-12 の誘導は見られなかった (data not shown)。

この UV-B 誘導 IL-12 産生に関わる細胞内シグナル伝達経路を推定するために、UV-B で活性化することが確かめられている MAP kinase 群の阻害剤の存在下で UV-B を照射し培養を続けたところ、IL-12 分泌 (照射 24 時間後, Fig. 6) および IL-12 mRNA 発現 (照射 16 時間後, Fig. 7) のいずれもが、JNK1/2 の特異的阻害剤である SP600125 により非照射のレベルまで抑制された。また、抗酸化剤である N-acetyl-cysteine (NAC) は SP600125 と同様に IL-12 産生を抑制するとともに、UV-B による JNK1/2 のリン酸化を阻害していた (Fig. 8)。



* statistically significant difference ($p < 0.05$) by student t-test

Fig.2 Effect of exogenously-added IL-12 on removal of CPD in HaCaT cells in 6h or 24h following exposure to UV-B (100J/m^2).

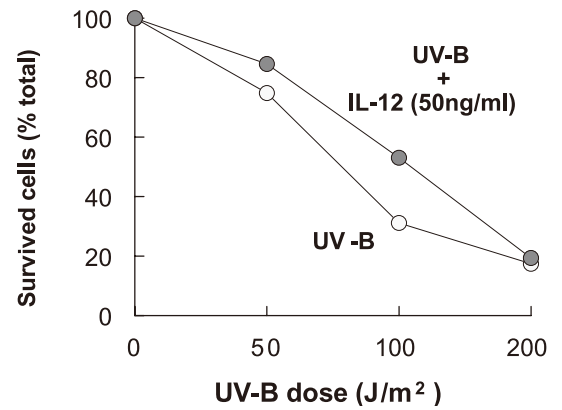
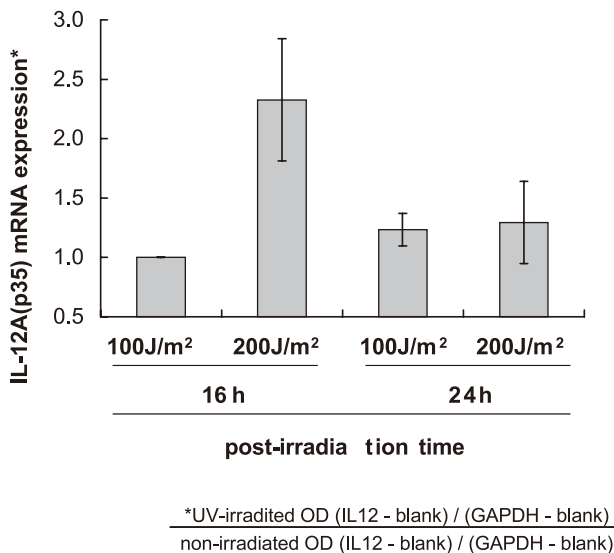


Fig.3 Clonogenic cell survival of HaCaT cells in the presence or absence of IL-12 following irradiation with UV-B at various doses.



*UV-irradiated OD (IL12 - blank) / (GAPDH - blank) / non-irradiated OD (IL12 - blank) / (GAPDH - blank)

Fig.4 mRNA expression for IL-12 (p35) in normal human epidermal keratinocytes in 16h or 24h following exposure to UV-B (100J/m^2 or 200J/m^2).

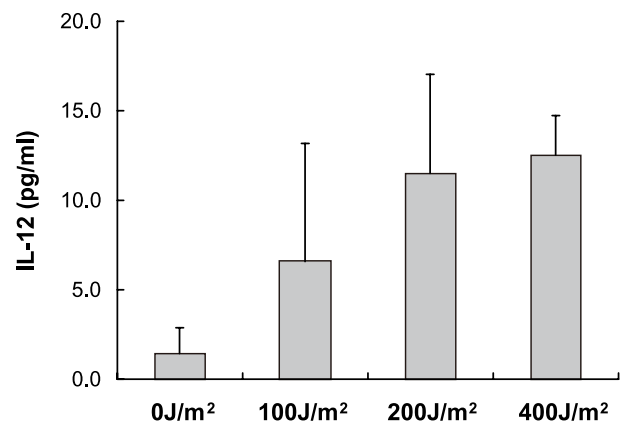


Fig.5 Secretion of IL-12(p70) by normal human epidermal keratinocytes in 24h following exposure to increasing doses of UV-B.

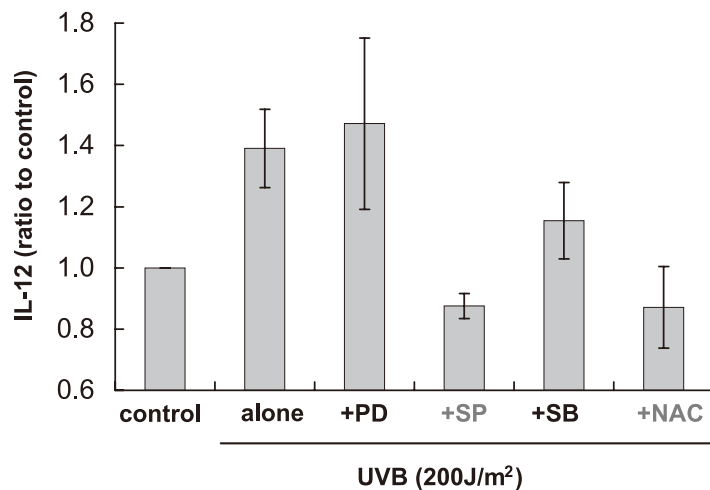


Fig.6 Inhibition of IL-12 secretion by various MAPK inhibitors and an antioxidant in 24h following irradiation with 200J/m² of UV-B. PD:PD98059 (MEK inhibitor, 100μM) , SP:SP600125 (JNK1/2 inhibitor, 20μM) ,SB:SB203580 (25μM) , NAC:N-acetyl cysteine (antioxidant, 1mM).

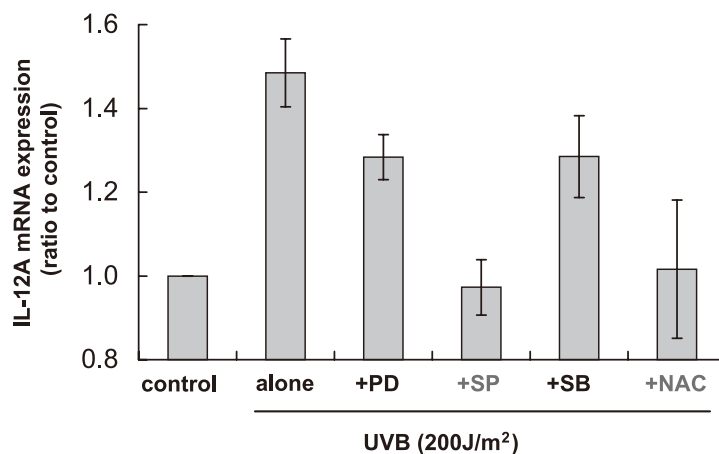


Fig.7 Inhibition of IL-12A mRNA expression by various MAPK inhibitors and by an antioxidant in 16h following irradiation with 200J/m² of UV-B.

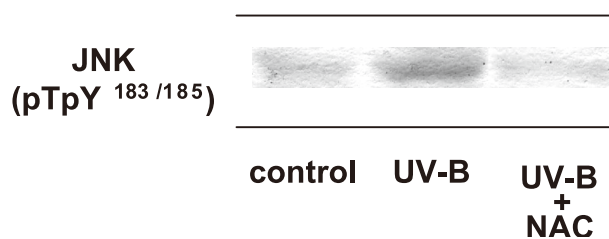


Fig.8 Phosphorylation of JNK and its inhibition by NAC in 24h following irradiation with 400J/m² of UV-B.

4. 考 察

UV-B はヒト表皮角化細胞による IL-12 の産生を誘導したこと、一方、exogenous に加えた IL-12 が CPD の修復を促進し UV-B による細胞死を抑制したことは、UV-B により放出誘導された IL-12 が DNA 損傷の修復を促進するという、一種の autocrine な upregulation 機構の存在を示唆する。しかし、exogenous に加えられた IL-12 の有効濃度域 (ng) は、培養液中に検出された IL-12 濃度 (pg) よりも高く、また IL-12 は CPD の修復のうち特に照射 6 時間以内の初期過程を促進したが、培養液中への IL-12 の分泌が確認されたのは照射 24 時間を経た後であった。そのため、この autocrine な regulation が生理的に生じているかという点について、IL-12 をノックダウン、もしくは強制発現させた細胞系での確認が必要である。

UV による IL-12 の誘導には細胞種波長依存性があり、HaCaT では UV-B による IL-12 の誘導は見られなかった (data not shown)。HaCaT には樹立化に伴い p53 等の遺伝子に変異が生じていることが知られており⁸⁾、正常な細胞とは異なる UV-B 応答性が関与しているのかもしれない。また波長依存性も存在し、IL-12 誘導能は UV-A が UV-B よりも高い。さらに UV-B 照射による immunosuppression は UV-A の共照射により抑制されることも報告されている⁹⁾。以上を合わせ考えると、太陽光紫外線の大部分を占める UV-A が、日常生活における UV-B 防衛的な働きをしている可能性もあろう。

UV を受けた表皮細胞の IL-12 の産生機構については明らかではなかったが、今回の結果は、UV-B により産生された活性酸素種が JNK1/2 経路を活性化し、その下流で IL-12 遺伝子発現が制御されていることを示唆する。JNK による IL-12 産生制御に関する同様の報告は、マクロファージにおける LPS 誘導 IL-12 産生系においても見られる¹⁰⁾。UV を照射され細胞内で活性化するシグナル伝達経路のうち、JNK1/2 経路は一般にアポトーシスに関連すると考えられてきた⁵⁾。今回の結果と合わせ考えると、JNK1/2 経路はアポトーシスによる損傷細胞の排除のみならず、IL-12 産生を介した DNA 損傷修復によっても UV 防衛的に働いているのかもしれない。

本研究では、ヒト表皮角化細胞における UV-B 照射→活性酸素種→JNK1/2→IL-12→CPD 修復→細胞生存の一連の autocrine regulation の機構の存在を示した。今後、生物学的な紫外線防護法開発へのアプローチの一つとして、この機構に変化を及ぼす薬物、因子、素材等の投与による IL-12 産生の間接的活性化が考えられよう。

(参考文献)

- 1) Kondo S, Jimbow K: Dose-dependent induction of IL-12 but not IL-10 from human keratinocytes after exposure to ultraviolet light A. *J Cell Physiol* 177, 493-498, 1998.
- 2) Werth VP, Bashir MM, Zhang W: IL-12 completely blocks ultraviolet-induced secretion of tumor necrosis factor from cultured skin fibroblasts and keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120, 116-122, 2003.
- 3) Schwarz A, Grabbe S, Aragane Y et al.: Interleukin-12 prevents UVB-induced local immunosuppression and overcomes UVB-induced tolerance. *J Invest Dermatol* 106, 1187-1191, 1996.
- 4) Schwarz A, Staender S, Berneburg M et al.: Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Biol* 4, 26-31, 2001.
- 5) Matsuda N, Horikawa M, Wang LH et al.: Differential activation of ERK 1/2 and JNK in normal human fibroblast-like cells in response to UVC under different oxygen tensions. *Photochem Photobiol* 72, 334-339, 2000.
- 6) Yanase H, Ando H, Horikawa M et al.: Possible involvement of ERK 1/2 in UVA-induced melanogenesis in cultured human epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res*, 14, 103-109, 2001.
- 7) Horikawa-Miura M, Matsuda N, Yoshida M et al.: The higher lethality of UVB radiation to cultured human cells is associated with the specific activation of a DNA damage-independent signaling pathway. *Radiat Res*, in press.
- 8) Lehman TA, Modali R, Boukamp P et al.: p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 4, 833-839, 1993.
- 9) Reeve VE, Domanski D, Slater M: Radiation sources providing increased UVA/UVB ratios induce photoprotection dependent on the UVA dose in hairless mice. *Photochem Photobiol* 82, 406-411, 2006.
- 10) Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T et al.: c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: Role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol* 171, 628-635, 2003.