

紫外線暴露による細胞傷害に及ぼす食品成分の影響

若 生 豊*・南 和貴子**

Inhibitory Effect of Nutritional Factors on Cell Damage by UV Irradiation

Yutaka WAKO* and Wakiko MINAMI**

Abstract

The skin, as the outermost barrier of the body, is continuously exposed to ultraviolet (UV) radiation. Sun exposure has been linked to several pathological processes, including sunburn, skin aging, and skin cancer. UV radiation produces cell damages not only directly but also through the generation of active oxygen species. It is now known that various types of inhibitors that act against oxidative stress exist in our daily foods, and they are believed to have an important role in reducing the risks of mutagenesis and carcinogenesis. Then many studies have concentrated on the ability of antioxidant nutrients to prevent tissue damage induced by UV irradiation. In this review, recent understanding about the roles played by several nutrients in keratinocytes is discussed. In particular, we will address the mechanisms accounting for protection against oxidative stress and the mechanisms involved in antioxidant nutrient maintenance.

Key words: UV radiation, skin cancer, antioxidant nutrients, bio-antiutagen

1. はじめに

太陽光線は今日までの地球の歴史に深く影響を及ぼし、とくに生命の進化や多様化の大きな推進力となった。生物の特性には、進化へ向かう変化を積極的に受け入れるシステムと個体の保存に重要な、環境変化を抑制し恒常性を保つシステムが併存している。太陽光に含まれる紫外線は遺伝子へ損傷を与え突然変異を誘発する役割を果たしているが、これに対し多かれ少なかれ全ての生物は紫外線から身を守る様々な手段を獲得してきた。やがて、光合成生物が酸素を作り出し、地球にオゾン層が形成され地上に降り注ぐ紫外線が和らげられるようになると、生物は陸上進出が可能となり陸上での進化が展開されることになった。しかし、近年オゾン層の破壊によってオゾンホールが生じ、有害な短い波長の紫外線の増大が懸念されている。皮膚ガンの発生率が徐々に高まるにつれて社会の意識は変化し、かつてはサンオイルを塗り黒く焼けた肌にするのがステータスと考えられていたものが、近年は女性のみならず、男性もサンスクリーンを塗り紫外線から肌を守ろうとする意識が広がっている。

紫外線とは 400 nm 以下の波長をさす。これらの紫外線が酸化ストレスとして DNA やタンパク質へ損傷を与え、皮膚の老化や発ガンに結びつくと考えられる。太陽紫外線のなかで地表にまで到達するものは UVA (320 nm~380 nm) と UVB (280 nm~320 nm) である。これまで、発ガンに関与するのは UVB と考えられてきた。遺伝

情報を担う核酸 (DNA) は 260 nm 付近に吸収スペクトルのピークを示し UVB の波長帯と重なるからである。UVB は直接 DNA の塩基を励起しピリミジン 2 量体や DNA 付加体などの光産物を生成し、紫外線発ガンを引き起こす大きな原因となっている。UVA については、より波長が長く真皮へ到達し結合組織のタンパク質へ損傷を与えしわをつくる原因とされている。しかし、近年 UVA についても発ガンへ関与していることが報告されている¹⁻³⁾。UVA によって、フラビン類、プテリン類、ポルフィリン類、NADH や葉酸などが励起され光増感分子としてはたらき、生成する活性種が間接的に DNA を損傷している可能性がある。

酸化ストレスはさまざまな疾病に関与している。われわれは発ガンに影響を与える環境要因とくに食物因子による抑制の可能性に関心を抱き検討を進めてきた。オゾン層破壊の進行が懸念される中、紫外線は皮膚の老化やガン発症を引き起こすことが強く意識されるようになり、効果的な対策としてサンスクリーンの塗布が浸透している。しかしガン発症は長期の照射の蓄積が引き起こすものであり、強い日差しを浴びると予期されるときにみに塗布されるサンスクリーンなどの対策は限定的なものであり、物理的紫外線の遮断のみならず、内因的な対策も必要と考えられる。この小文では、皮膚の発ガンの抑制に関する研究の準備段階として、これまでの研究経過と最近の知見を整理し、紫外線照射による細胞障害抑制について考察した。

2. 紫外線による DNA 損傷とヌクレチド除去修復

上記のように UVB は直接 DNA の塩基を励起し、ピ

平成 18 年 1 月 6 日受理

* 生物環境化学工学科・教授

** 生物環境化学工学科・4 年

リミジン核酸はこの領域の光を吸収することにより元と違った構造をとるようになる。この反応は圧倒的にピリミジンにおいて起こっており、隣り合って存在しているピリミジン間に形成されるシクロブタン型ピリミジン2量体(CPD)、(6-4)光産物がおもな反応生成物である^{4,5)}。太陽光に1時間曝露されれば細胞あたり10,000個のCPDができるともいわれている。CPDや(6-4)光産物のような光生成物はそのまま放置されると、転写やDNA複製という細胞機能を維持するために重要なDNA代謝反応の障害となり、細胞死や突然変異の原因となる。したがって、多くの生物はこれらのDNA損傷を効率良く修復する機構を発達させている。

紫外線によるDNA損傷の修復機構にはいくつかの種類があることが明らかにされているが、そのなかで代表的なものはヌクレオチド除去修復である。生じたチミン2量体を含むDNAを部分的にUvrABCエンドヌクレアーゼで除去修復が成されるものである。ヌクレオチド除去修復機構は、大腸菌からヒトまで生物界に広く保存されており、基本的には同じステップで行われている。また、除去修復機能欠損によっておこる病気があり、色素性乾皮症やCockayne症候群などが知られている。チミン2量体の修復にはこのほかにも、傷害部分をスキップしてDNAを複製し、その後で姉妹鎖交換というDNA鎖の組換え反応を通じて傷害を修復する組換え修復、光エネルギーを利用した酵素(フォトリアーゼ)反応による光回復、チミン2量体(T-T)部分をDNAポリメラーゼの校正機構を犠牲にして、強引にA-Aとして複製してしまうSOS修復を含め、計4種類の機構が知られている。SOS修復はSOS応答(DNAが熱や紫外線などで傷害を受けたときの緊急応答)の一つであり、recAタンパク質がDNAポリメラーゼIIIに結合して、酵素を強引に複製に向かわせる。次に述べるようにSOS修復では修復機構を犠牲にするので、突然変異率が上昇する。

3. 紫外線による突然変異誘発

発ガンは多くのステップを含む多段階過程を経ておこるが、それぞれのステップで遺伝子の突然変異が関与していると考えられている。紫外線によるDNA損傷は修復されずにそのまま残れば細胞死や突然変異を起こす。細胞死が引き起こされた場合は組織の中でその細胞は周りの細胞に置き換えられ、組織は傷害を乗り越えることになるが、むしろ突然変異を起こした細胞が死に至らず変異を残したまま生存し続けることは、発ガンにとって脅威となる。突然変異は次のような出来事の関与が示されている。DNA複製を司るほとんどのDNAポリメラーゼは、CPDや光産物のようなDNA損傷が存在すれば、そこで複製反応が止まる。複製が止まったままであれば、細胞死につながり、突然変異は引き起こされるこ

とはない。しかし、細胞はこれらの傷を乗り越えて複製反応を推し進める機構をもっている。この過程においてある比率で誤った複製が生じ突然変異が出現するものと考えられる。

大腸菌では、通常このDNA損傷の起きた細胞では複製反応は生じないが、紫外線照射などによりDNA損傷を乗り越えた複製反応がおこり突然変異の発生するチャンスが生じる。大腸菌では紫外線照射により数多くの遺伝子の発現が誘導されることが知られている。これは、レプレッサーとよばれるタンパク質により通常は発現が抑制されている遺伝子群が、紫外線照射をきっかけにレプレッサーが壊され、いっせいに発現されるようになるためである。この現象はSOS応答とよばれ、紫外線照射のシグナルによりrecAタンパク質が活性化されタンパク質分解活性をもつようになり、レプレッサーが壊されるというのが基本的メカニズムである。最終的には発現されたタンパク質がDNAポリメラーゼに作用し、その鋳型に対する忠実度を下げるはたらきをし、その結果DNAポリメラーゼはDNA損傷を乗り越えてDNA複製反応を行えるようになる。しかしながら、間違った塩基を取り込み、突然変異を誘発する可能性が高まる。

真核細胞である出芽酵母においても、大腸菌同様紫外線による突然変異誘発が見られなくなる突然変異体の解析から、突然変異誘発に関与する遺伝子群として、*Rev1*と*Rev3/7*遺伝子が明らかにされてきている。*Rev3/7*はこれまで知られていたDNAポリメラーゼ($\alpha \sim \gamma$)とは別のDNAポリメラーゼ(ϵ)であることが判明した。このDNAポリメラーゼ(ϵ)はDNA損傷を乗り越えて複製反応を起こすが誤りがちな複製を行うと考えられている。これらとは逆に、DNA損傷を乗り越えて複製反応を進めうが誤りを起こさないDNAポリメラーゼも発見されている⁶⁾。これは*Rad30*遺伝子産物でありDNAポリメラーゼ η とよばれている。これらのポリメラーゼ活性が生体の中でどのように制御され突然変異が誘発されるかについて研究が進行している。

4. DNA修復促進活性の検討

皮膚ガンをはじめとする紫外線による種々の傷害を防ぐ最も実用的かつ安全な手段は物理的な光防御である。紫外線が皮膚に到達しなければあらゆる光生物学的な反応は回避できる。しかし、通常の生活では紫外線を受け続ける現状にあり、将来的に修復促進を手助けし正常維持を図る取り組みが考えられる。既に遺伝子の損傷を未然に防いだり、あるいは生成した損傷をできるだけ早く修復する機能を促すような成分が知られている。紫外線照射による修復促進活性を実験的に評価する方法としては、培養細胞を用い紫外線照射によって誘起されるチミンダイマーの除去修復能を観察する方法がある。これに

より修復能を促進する物質の検索を行うことができ、白畑らはロシアのコーカサス地方で古くから飲用されている発酵ケフィアの成分の中には顕著なチミンダイマー除去修復促進活性を有する物質のあることを認め、紫外線の防御に有効な成分を有する可能性を示している⁷⁾。一方微生物を利用して遺伝子損傷修復能を検討する評価も成されている。カリフォルニア大学の Ames らによって開発された微生物を用いる突然変異検出法は高感度で操作が簡単で経済的なために、第1次スクリーニングの方法として活用されてきた。これは特定の変異を持つ変異株を利用して復帰変異率を調べることにより突然変異を評価するものである。このアッセイ法を応用し、遺伝子の損傷を修復する機能を高める物質の検索を行うことが可能である。松尾らは大腸菌の変異株 (*E. coli* B/rWP2, トリプトファン要求株) を用いて、この Ames テストの変法といえるアッセイ法により、150 種以上の漢方薬、植物や食品材料について、紫外線により誘発される突然変異の抑制活性を示す物質の検索を行った^{8,9)}。その結果、グアバ茶の材料であるグアバの葉のメタノール抽出成分、および十字花科の野菜であるカリフラワーの花蕾部のメタノール抽出成分に強い抗変異活性があることを見いだした。両活性分画を精製し、最終的に前者の活性物質は (+)-ガロカテキン、後者は MMTS (methylmethanethiosulfonate) であることを機器分析により同定した。次いで松尾らは、遺伝子損傷修復促進の機構を検討する目的でいくつかの大腸菌の DNA 修復欠損株を用いた実験を行ない、これら化合物は DNA 除去修復機能を高め、抗変異活性を示すことを明らかにしている。しかし、大腸菌のアッセイ系では MMTS はガロカテキンに比べて約 1/20~1/100 倍の低濃度で抗変異活性を示し MMTS とガロカテキンとでは活性を示す濃度域が大きく異なっていることより、除去修復系に対する作用点が異なることが推測されている。下位らの研究によると、エピガロカテキンの場合には UV 照射後の DNA 合成に遅延が見られることから、細胞分裂を遅らせて DNA 除去修復の機会を増大させ、suppressr mutation に関与する tRNA 遺伝子上の損傷を効率よく修復するために、結果として突然変異を抑制するものと考えられている。この反応ではエピガロカテキンは初期に細胞表面へ結合すると考えられており、その後何らかの情報伝達機構が作動して、複製が遅延されると推測されている。一方、MMTS は、MMTS 処理が除去修復酵素の発現制御系である SOS 系を介さず直接的に修復酵素そのもの (UvrA) を誘導していることを示す結果が得られており、この物質が修復活性を高める一つの機構はこの菌体内での UvrA の生成量の増加によるものと推測されている。しかし、MMTS については別の作用点も検討する必要がある。この他多くの成績が大腸菌より得られているが、MMTS が高等動物の細胞においても同様の活性を示す

か否かは興味深い問題である。

5. 中長波長紫外線による酸化ストレス

UVA に分類される中波長紫外線や光感作物質の存在下での長波長紫外線を皮膚に照射すると、各種フリーラジカルや活性酸素(スーパーオキシド)、ヒドロキシルラジカル、1 重項酸素などが産生されることが知られている。産生された活性酸素が、真皮成分の DNA タンパク質、コラーゲンやエラスチンなどのタンパク質のクロスリンク、抗酸化酵素の不活化、細胞成分の膜脂質過酸化とその結果としての細胞機能の劣化などを引き起こし、しわなどの原因となる。UVA は DNA を直接損傷しないが、近年 UVA にも発がん性のあることが報告された¹⁻³⁾。紫外線により基底状態から三重項状態に励起された光増感分子が直接基質を酸化する機構の他、上で述べられたように励起されて生成する活性酸素種が間接的に DNA を損傷すると考えられている。UVA の光生物学的効果は UVB の 1,000 分の 1 程度とされている。地表到達量が UVB の 10 倍以上ではあるが直接の影響ははるかに低いものである。しかし、酸素ストレスの面から見ると、UVA の脂質過酸化能は UVB の 10 分の 1 ほどであるため、地表到達量から換算すると UVB に匹敵する能力があると想定される。さらに、真皮深層にまで到達するため、NADH やフラビンを光増感分子として、表皮細胞のみでなく線維芽細胞にまで作用すると考えられ、酸素ストレス面から見るとその影響は大きいと考えられる¹⁰⁾。従って、UVA の有害性に対しては抗酸化物質が有効と考えられ、抗酸化物質による制御がどこまで実効を有するか基礎と臨床両面から検討されている。抗酸化剤の全身投与としては、ビタミン E、C、 β -カロテンなどが実際に経口投与され、局所投与には抗酸化酵素剤や鉄キレート剤などが試みられている。その他植物由来の天然型低分子抗酸化物質なども展望があろう。また、動物実験では、カドミウムの投与によりメタロチオネインを誘導するなど、内因性抗酸化能を賦活化する方法も模索されている。

6. ビタミンCの紫外線暴露による細胞傷害に対する防御機構

ビタミン C には皮膚に対し 2 つの異なった生物活性が知られている。光に対する防御効果とコラーゲン合成における役割である。最近、ビタミン C は酸化ストレスに対する抑制を転写過程、転写後の過程で制御している知見が明らかにされた。前節で示されたように活性酸素種による組織傷害に対する抗酸化栄養成分の作用に関する多くの検討がなされているが、最近抗酸化物質のより特異的な作用に関する知見が示された。ビタミン C は表

皮で生理的に役割を担っていると考えられている。コラーゲン合成を促進する作用は、傷害を受けた組織の修復に関与していると考えられ、一方、酸化ストレスに対しては活性酸素を打ち消す消去機能に加え、近年、紫外線 (UVB) が直接引き起こす細胞死やガンなどに対する防御作用をそのシグナル伝達過程で果たしていることが明らかにされている。遺伝子の発現には様々な調節遺伝子が多数存在することが明らかにされている。プロモーター領域や基本エンハンサー領域の他に、近年遠位の遺伝子特異的、シグナル依存性のエンハンサー領域が見つかり細胞外情報による遺伝子情報発現の調節の仕組みが解き明かされるようになった。各エンハンサー遺伝子の活性化はそれぞれの領域に結合する各共役因子によって引き起こされる。その共役因子の一つ AP-1(活性化タンパク質) は TPA (ホルボールエステル: 発ガン剤の一種) 応答配列に対応する共役因子であり、遺伝子の転写調節に必要な因子であるが、この場合細胞死プログラムの発動に関わるものであり、AP-1 の活性化は細胞死をもたらす。AP-1 は複合体となっており、Jun (c-Jun, JunB and JunB) と Fos ファミリー (c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2) の複数のタンパク質で構成され、Fra-1 と Fra-2 は AP-1 の活性を抑えるコンポーネントである。培養細胞に紫外線 (UV-B) を照射すると細胞死が引き起こされ、これはアポトーシス死誘導であることが分かっているが、紫外線照射後培養液にビタミン C を加えたグループでは細胞死がほとんど抑えられることが示された。この仕組みを解明する目的で行われた、試験管内の cDNA マイクロアレイによるハイブリダイゼーションの検討の結果、UVB の照射などの酸化ストレスの刺激は Fra-1 および Fra-2 の合成レベルを低下させこれにより AP-1 活性の抑制を解除するが、ビタミン C は

Fra-1 のメッセンジャーRNA のレベルを維持し UVB の作用に対抗する働きをすることが示されている¹¹⁾。この他 AP-1 は c-Jun のカスケードリン酸化による制御も成されているが、ビタミン C はこの制御過程にも関わり紫外線 (UVB) の照射に対抗する作用機構が示された。また、核移行転写因子の NF κ B は酸化ストレスに応答して細胞の生存を図るものであるが、ビタミン C はこの NF κ B を活性化することも明らかとなっている^{12,13)}。これらの最近の知見はビタミン C が種々のストレスで生じる活性酸素種を直接的に消去するだけでなく、UVB の照射などが引き起こす細胞傷害の抑制を遺伝子発現へ影響し抑制することや、ここでは紹介しないが細胞の分化や細胞周期に対する制御作用も明らかにされてきている。

7. 紫外線暴露による細胞傷害と食品成分の関わりに関する今後の研究

皮膚は光 (中でも紫外線) を暴露し続ける組織であることから、紫外線暴露による細胞傷害を考慮する必要がある。このことは、光に露出させていない部分の皮膚例えば顔など絶えず露出している皮膚とを比べてみると、露出部はしみやしわが多く紫外線曝露が明らかに組織傷害を起こすことが一目瞭然に認識でき納得することができる。紫外線は直接組織の成分に損傷を与えるほか、組

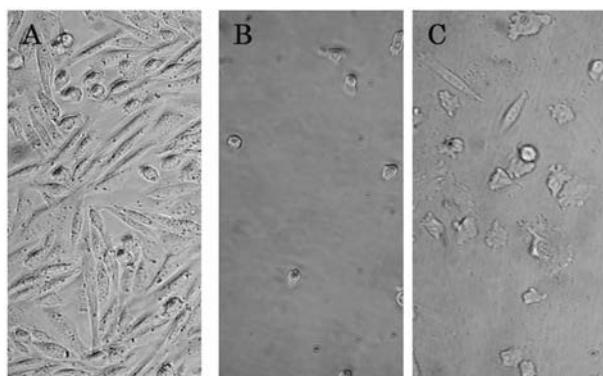


図1 UVB を照射した培養細胞の顕微鏡像とビタミン C の保護効果

A UV 照射前 B UV 照射後 C UV 照射後ビタミン C 添加

CHOK-1 細胞を A に示すコンフルエントの状態まで培養した後、312 nm の紫外線 (15 W の 6 本のランプを 5 cm の距離から 5 秒間点灯) を照射した。24 時間培養した後観察した顕微鏡像。C へは照射後ビタミン C を添加し培養を行う。

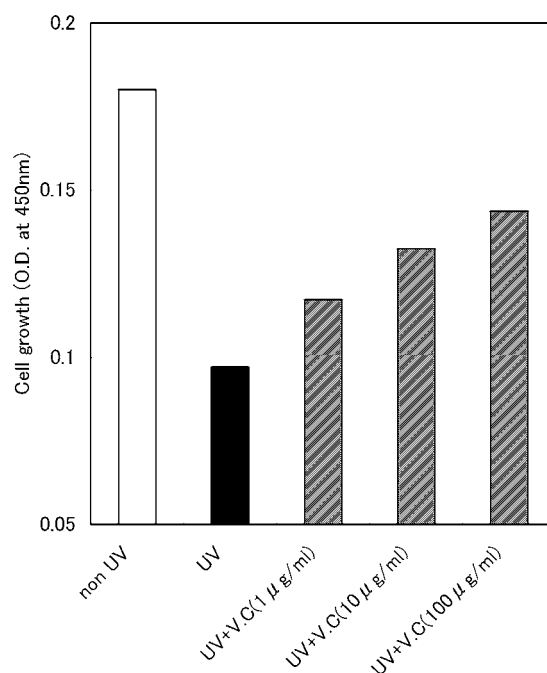


図2 UVB 照射による培養細胞の死とビタミン C による保護効果

細胞をコンフルエントの状態まで培養した後、UV を照射しない群、UV を照射した群、照射後ビタミン C をそれぞれ所定の濃度とした群を 24 時間培養し、その生細胞数を MTT 法により評価した。

織で活性酸素種を生成しこれらを介して傷害を与える。これらの傷害の修復は美容的な観点からも関心は高く様々な取組がなされている。今日オゾン層の破壊が進行する時代においては、紫外線暴露による組織傷害は美容的なレベルにとどまらず発ガンなど深刻な疾病の発症などを含む問題として捉えられ、心配される事態となっている。紫外線の暴露を回避する方法としては、物理的な手段が有効であり、既に幾つかの方法が生活に取り入れられ実施されている。一方、紫外線によって生じる活性酸素種を打ち消す抗酸化成分についても多くの検討が成されているが、即効的な効果では無いため対策としてはほとんど取り入れられていないのが現状であろう。しかし、長期のダメージの累積が引き起こす細胞の変異や発ガンに対しては持続的な内因性の防御対策は重要なものとなる。ビタミンCについては最近、直接的な活性酸素種の消去能力以外に、遺伝子の転写および転写後の経路に対する働きかけを通して紫外線照射による細胞死を回避する機構の存在することが示唆されている。ビタミンCは皮膚を正常に保つのに生理的役割を担っていると信じられて来たが、これらの検討により徐々にその生理作用の仕組みが解き明かされようとしている。しかし、化学物質によるガン抑制については精力的な検討が展開され様々なメカニズムによる抑制機構が提案されているところであるが、まだ核心的な知見を得るには至っていない。今後、紫外線照射による傷害を心配するとき、その中心的な問題としては発ガンが上げられるものと考えられ、内因的な防御を考える場合、ガンの予防に効果のある成分の特定が大きな目標となる。この小文では、紫外線暴露に伴う皮膚傷害に関する基本的問題を整理し、また最近の検討を概観した。われわれの研究室はガン予

防に関心を持って種々の検討を展開しているが、紫外線照射を最も受けやすい皮膚組織の傷害は重要な課題であることを改めて認識し、今後検討対象として行くことを考え、培養細胞を用いた実験系の構築を進めている。チャイニーズハムスター上皮由来の培養細胞を用い、紫外線照射による細胞死に対する保護効果を調べる実験系の検討を行い、この系で実際に確認したビタミンCの効果を、細胞の写真、グラフで示した。新規な成分による傷害予防効果の発見を目指し、紫外線暴露の問題解決に関わる基礎知見の得られることを期待している。

参考文献

- 1) Ito, K., Kawanishi, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, 268, 13221 (1993).
- 2) Ito, K., Kawanishi, S. *et al.*: *Biochemistry*, 36, 1774 (1997).
- 3) Hiraku, Y., Kawanishi, S. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251, 466 (1998).
- 4) Freidberg, E.C. *et al.*: DNA repair and mutagenesis, ASM Press, Washington, D.C. (1995).
- 5) Brash, D.E.: *Photochem. Photobiol.*, 48, 59 (1988).
- 6) Johnson, R.E. *et al.*: *Science*, 283, 1001 (1999).
- 7) Marionnet C. *et al.*: *Cancer Res.*, 58, 102 (1998).
- 8) T. Matsuo, N. Hanamura, *et al.*: *Phytochemistry*, 36, 1027 (1994).
- 9) Y. Nakamura, T. Matsuo, *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1439 (1996).
- 10) 宮地良樹: 日臨皮会誌, 55, 20 (1998).
- 11) Catani M.V., Rossi A, Costanzo A., *et al.*: *Biochem J.*, 77, 356 (2001).
- 12) Shang J., Schwarz C., *et al.*: *Physiol.*, 15: 353 (2002).
- 13) Tebbe B, Schwarz C., *et al.*: *J. Invest. Dermatol.*, 17, 154 (2001).