

デオキシリボ核酸ナトリウム塩による皮膚保護作用 機序の解明

劉, 佳黛

<https://hdl.handle.net/2324/1931858>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

デオキシリボ核酸ナトリウム塩による皮膚保護作用機序の解明

病態生理学分野 3PS15021N 劉 佳黛

【目的】

活性酸素種 (ROS) と活性窒素種 (RNS) は生体に酸化ストレスを与え、細胞構成を壊すこともできる[1,2]。ヒトの皮膚は最も大きな器官であり、体重の約 15%を占め[3]、常に外部の刺激 (紫外線や赤外線被曝、熱ストレス、加齢等) の影響で ROS、RNS を産生し、皮膚炎症の発生、皮膚がんの進行、または皮膚の機械的損傷回復の遅延が引き起こされる[4]。抗酸化剤は、ROS、RNS によって活性化した病態分子の発現異常を回復し、疾患を緩和・治療できる[4]。

近年、オゾン層の破壊に伴い地上に到達する紫外線量が増え、皮膚の老化、炎症やがんの原因となっている[5]。紫外線には、大気を透過できる A 波 (UVA、波長 315-380 nm) と B 波 (UVB、波長 280-315 nm) がある。そのうち、UVB の方は高いエネルギーを持ち、より皮膚の障害を引き起こす[6,7]。UVB 被曝により、細胞における炎症性サイトカインの発現量が増加し、ROS の蓄積が誘発され、皮膚の老化、炎症やがんが引き起こされる[8-10]。また、ROS による他の皮膚障害として、虚血再灌流 (IR) 障害 (皮膚の圧迫と解放の繰り返し) による褥瘡性潰瘍がある。臨床的には、患者が長時間に同じ体勢で臥床、糖尿病等での体位変換不能、または車いす等の利用で、体重の圧迫により接触局所の血行が不全となり、周辺組織が壊死する[11]。このような褥瘡性潰瘍では、炎症性経路の活性化、創傷形成が起こる[12]。

ロシア及び一部のヨーロッパ諸国では、臨床現場において、ロシア産チョウザメの精巣から抽出された核酸製剤であるデオキシリボ核酸ナトリウム塩 (Derinat) [13]は、すでに外傷性ショックや化膿性感染症に対する治療薬として幅広く使われているが、その作用メカニズムについては不明な点が多い。これまでに、台湾・高雄医科大学と共同で、正常ヒトケラチノサイト (KCs) の UVB 照射後の細胞障害に及ぼす Derinat の影響を発表した。Derinat は、濃度依存的に KCs の酸化ストレスによる細胞活性低下をレスキューでき、TRP チャネルと細胞内への Ca^{2+} 流入を阻害することで、UVB 照射による細胞内の ROS の蓄積と DNA ダメージを減少させた[14]。また、Derinat の前処置は、UVB 照射マウスにおける皮膚ダメージを軽減できた[14]。

そこで、本研究では、紫外線照射や機械的損傷による皮膚障害に着目し、正常ヒト表皮角化細胞培養細胞 (HaCaT 細胞) を用いた UVB 照射モデルおよび IR 障害による褥瘡性潰瘍マウスモデルを確立し、Derinat の皮膚保護作用機序を調べた。また、褥瘡治療薬として使われている塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 製剤[15]、プロスタグランジン E_1 (PGE_1) 製剤[16]と比較しながら、Derinat とサケ由来の DNA 製剤 (salmon-DNA) による抗炎症・抗酸化作用を比較検証した。

【方法】

HaCaT 細胞生存率の測定

96 ウェルプレートに播種した HaCaT 細胞 (1×10^4 cells/ウェル) を UVB (50 mJ/cm^2) で照射し、0、1、

3、6、12、24、48時間後に、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を 10 μ l/ウェルで加え、1.5時間培養し、マイクロプレートリーダー (Bio Rad) にて 450 nm 吸光度を測定し、細胞生存率を計算した。

HaCaT細胞のUVB照射、H₂O₂処置とmRNA、タンパク量定量

HaCaT細胞 (5 \times 10⁵ cells/ウェル) を 37 °C、5% CO₂条件下で培養した。5日間に1回培養液を交換した。UVB照射の際は、予め細胞培養液に 10 v/v %の Derinat (終濃度 150 μ g/ml) を加えたもので HaCaT細胞を 24時間培養した。その後、培養液を滅菌 PBS と交換し、6ウェルプレートの培養皿の蓋を外してから照射波長 312 nm の紫外線 (UVB) 照射装置 (DF-312, ATTO) を用い、50 mJ/cm²の強度で HaCaT細胞を照射した。UVB照射後、改めて培養液に交換した。H₂O₂処置は、H₂O₂ (100 μ M) を加えた培養液 (37 °C) で HaCaT細胞を培養した。3時間後、UVB照射・H₂O₂処置した HaCaT細胞を回収し、続いてリアルタイム RT-PCR 法を用い、Matrix Metalloproteinase (MMP)-3、MMP-9、interleukin (IL)-8、IL-6、IL-1 α 、cyclooxygenase (COX)-2、tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA の発現変化を調べた。また、UVB照射した HaCaT細胞をウェスタンブロット法で COX-2 タンパクの発現変化を調べた。

IR障害による褥瘡性潰瘍マウスモデルの作成

BALB/c-nu/+マウス (8週齢、日本 SLC より入手) に三種混合麻酔薬 (150 μ l/animal) を投与し、軽く麻酔した。背中の中毛をシェーバー (THRIVE) で剃って、70%エタノールを用いて消毒した後、2枚の非侵襲性磁石板 (直径 15.0 mm、厚さ 4.0 mm、重量 3.5 g、磁束密度 1000 ガウス) を設置し、虚血を起こした。24時間後、磁石をはずしてマウス皮膚の再灌流を起こさせた[17] (図 1)。IR の途中では、マウスを固定せず、且つ麻酔もしなかった。水と餌は自由に摂取させた。Derinat (15 μ g/ml) 入り 0.3% 寒天ジェルを一日 2回、五日間投与した後、マウス背部皮膚を摘出し、ウェスタンブロット法や免疫組織染色法を用いて p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、extracellular signal-regulated kinase (Erk)、protein kinase B (Akt) タンパクの発現やリン酸化レベル変化、COX-2、IL-6、IL-6 receptor α (IL-6R α) タンパクの発現変化を調べた。

本研究では、このような 24時間虚血、24時間再灌流させたマウスモデルを軽度褥瘡として定義した。また、虚血 16時間後、8時間再灌流させることを 3回繰り返すことによって重度褥瘡マウスモデルを作成した (図 1)。Derinat (15 μ g/ml) 入り 0.3% 寒天ジェル、Salmon-DNA (15 μ g/ml) 入り 0.3% 寒天ジェル、0.003% PGE₁ 入り 0.3% 寒天ジェルを 1日 2回、5日間投与した。また、ミニスプレーに bFGF (100 μ g/ml) 入り 5 mmol/L Tris-HCl を入れ、患部に 1日 1回、5日間噴霧した。薬物投与 5日後、マウス背部の褥瘡深達度ステージ評価、面積測定を行い、ウェスタンブロット法を用いて COX-2 タンパクの発現変化を調べた。

スクラッチアッセイ (wound healing assay)

6ウェルプレートの底に、マーカーペンで 1 cm 間隔で縦横各 3本線/ウェルになるように線を書いた。HaCaT細胞を 5 \times 10⁵ cells/ウェルで 6ウェルプレートに播種し、一晚培養した。200 μ l チップを用いて底にある線に従ってスクラッチした後、滅菌 PBS で 3回洗浄後、Derinat (150 μ g/ml)

を含有させた培養液を加え 6、12、24 時間培養した後、HS オールインワン蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, Keyence) で観察し、ImageJ で画像処理を行った[18]。

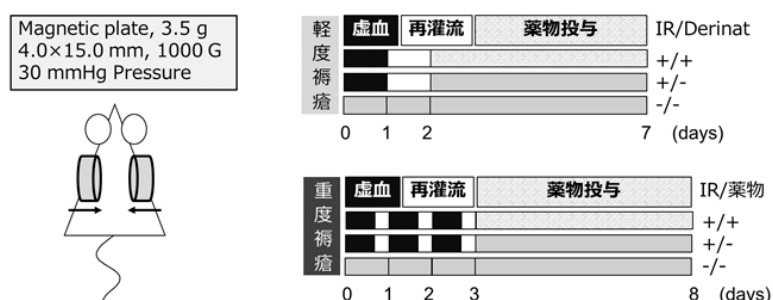


図1 虚血再灌流障害による褥瘡マウスモデルの作成

マウス背部皮膚に2枚の磁石板を設置することによって軽度褥瘡（虚血24時間、再灌流24時間）および重度褥瘡（虚血16時間、再灌流8時間を3サイクル繰り返し）モデルを作成した。

【結果】

UVB (50 mJ/cm²) を照射した HaCaT 細胞では、3 時間後の時点で最も生存率が低下し、その後、細胞生存率が徐々に回復した。

HaCaT 細胞を UVB (50 mJ/cm²) で照射した 3 時間後に、MMP-3、MMP-9、IL-8、IL-1 α 、COX-2、IL-6 mRNA 発現が顕著に増加した。Derinat (150 μ g/ml) の 24 時間前処置はそれらの mRNA 発現増加を抑制し、UVB 照射による ROS 産生の下流シグナル因子の増加を抑制した。しかしながら、Derinat (150 μ g/ml) の 24 時間前処置は、H₂O₂ (100 μ M) で 3 時間処置した HaCaT 細胞における MMP-3、COX-2、IL-6 mRNA の発現増加を抑制しなかった (図 2)。

褥瘡モデルでは、磁石板を 24 時間設置したところ、マウスの背部に創傷ができた。Derinat を処置したマウスでは、巨視的な観察により、より創傷が回復していることが確認された。また、褥瘡マウスモデルの背部表皮のダメージや真皮における浮腫、表皮と真皮の肥厚、皮下組織の菲薄化も、Derinat によって改善された。また、褥瘡マウス・背部皮膚の 8-OHdG の蓄積や COX-2 タンパク質の発現量増加も、Derinat によって有意に抑制することができ、Derinat の抗炎症作用の一部を説明することができた。さらに、褥瘡マウス・背部皮膚では、MAPK ファミリーの p38 MAPK と Erk のリン酸化/トータルタンパク比が増加したが、Derinat はそれらを有意に抑制した。一方、Derinat は Akt のリン酸化には影響を及ぼさず、Derinat の褥瘡性潰瘍治療作用は PI3K/Akt 経路を介さないことがわかった。また、Derinat は有意に IR による IL-6R α 発現上昇を阻害する作用も示した (図 2)。

最後に、褥瘡治療薬として使われている bFGF 製剤、PGE₁ 製剤と比較しながら、Derinat と salmon-DNA による抗炎症・抗酸化作用を比較検証した。また、bFGF 製剤は傷の上皮化を促進することで損傷の治癒期間を短縮させているので、HaCaT 細胞を用いてスクラッチアッセイにより Derinat の上皮化過程における作用を調べた。その結果、Derinat は HaCaT 細胞進展 (上皮化) を促進しなかったが、Salmon-DNA と同等な効果を持ち、両者とも褥瘡治療薬として使われている製剤 (bFGF 製剤、PGE₁ 製剤) と比較しても遜色のないものであった。

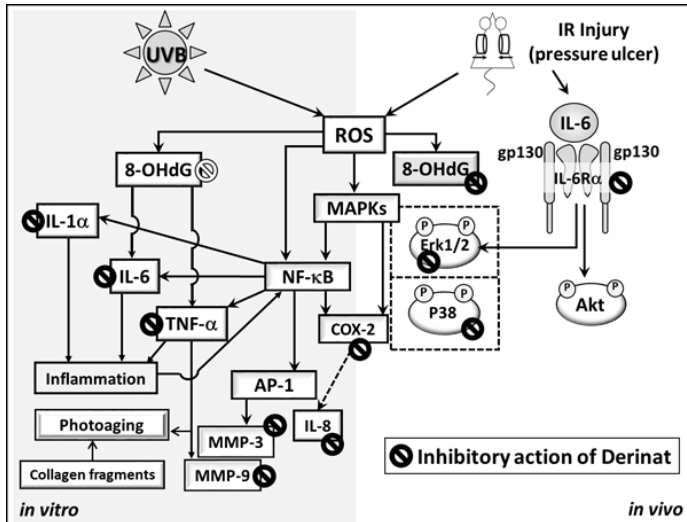


図2 Derinatの作用メカニズム

Derinatは、UVB照射による炎症性サイトカインIL-1α、IL-6、IL-8、COX-2、TNF-αの発現上昇、核内8-OHdGの蓄積、およびMMPsの発現上昇を有意に抑制することで*in vitro*における皮膚保護作用を示した。また、Derinatは、IR障害による褥瘡性潰瘍マウス背部皮膚において、Akt経路ではなく、MAPKのリン酸化、COX-2およびIL-6Rの発現上昇を抑制することによって褥瘡を緩和させた。

【考察】

本研究は UVB 照射や IR による皮膚障害を Derinat が保護する作用を *in vitro* および *in vivo* で検証したものである。Derinat や salmon-DNA のような核酸製剤の外用は、皮膚障害を抑制することが示されたことから、今後、皮膚保護作用をもつ安全かつ安価な外用核酸製剤の開発により、褥瘡など新たな臨床現場への応用または医薬部外品として使用の可能性が期待される。

【引用文献】

1. Chen AF, et al. (2012) Clin Sci 123: 73-91.
2. Yorek MA (2003) Free Radic Res 37: 471-480.
3. Kanitakis J (2002) European Journal of Dermatology : EJD 12: 390-399.
4. Afanas'ev I (2010) Curr Drug Metab 11: 409-414.
5. Young AR (1990) Semin Dermatol 9: 25-31.
6. Damiani E, et al. (2016) Prog Lipid Res 63: 14-27.
7. Halliday GM, et al. (2011) Seminars in cutaneous medicine and surgery 30: 214-221.
8. Lee C, et al. (2013) Evid Based Complement Alternat Med 2013: 747846.
9. Feehan RP, et al. (2016) Biochem J 473: 2973-2994.
10. Lopez-Camarillo C, et al. (2012) Int J Mol Sci 13: 142-172.
11. Edlich R, et al. (2004) J Long Term Eff Med Implants 14: 285-304.
12. Cui FF, et al. (2016) Int J Mol Sci 17.
13. Fomicheva EE, et al. (2010) Neurosci Behav Physiol 40: 397-401.
14. Hsu WL, et al. (2015) Molecules 20: 20297-20311.
15. Akita S, et al. (2005) BURNS 31: 855-858.
16. Tondi P, et al. (2004) Dermatol Surg 30: 1113-1117.
17. Stadler I, et al. (2004) J Invest Surg 17: 221-227.
18. Nunes JPS, et al. (2017) Biotechniques 62: 175-179.