



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Assessment of ultraviolet toxicity depending on DNA-damage using cyclobutane pyrimidine dimer formation in ultraviolet irradiated cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Masuma, Runa
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第11338号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55363
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Runa_Masuma_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

環境起学専攻 博士（環境科学） 氏 名 Runa Masuma

審査委員	主査	教 授 田 中 俊 逸	
	副査	教 授 古 月 文 志	
	副査	准教授 沖 野 龍 文	
	副査	研究部長 奥 野 勉	(独立行政法人労働安全衛生総合研究所)
	副査	助 教 蔵 崎 正 明	

学 位 論 文 題 名

Assessment of ultraviolet toxicity depending on DNA-damage using cyclobutane pyrimidine dimer formation in ultraviolet irradiated cells

(UV照射細胞におけるシクロブタンピリミジンダイマーを用いたDNA損傷による紫外線毒性の評価)

紫外線(UV)は、その殺傷能力を活かし殺菌ランプとして利用され、またUVの抗アレルギー作用を、皮膚疾患の療法や臓器移植に利用するなど数多くのメリットもあるが、UV曝露によるDNA損傷や免疫抑制の結果、老化や発癌あるいは各種感染症に繋がるデメリットも数多く報告されている。これまでのUVに関する研究では、UV波長域を大きくUVA・UVB・UVCに分類し行われてきたが、250-260 nmの波長の光はDNAに吸収され、270-290 nmの波長の光はタンパク質に吸収される性質があることから、UV波長の違いによって生体への影響が異なることも予想され、各波長による様々な影響を把握することも重要であると考えられる。

UV曝露を受けた細胞ではシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)が生成される。健常人の細胞はこれを修復する機構が存在するが、その機構に突然変異が生じた遺伝性の皮膚疾患に色素性乾皮症があり皮膚癌に罹りやすくなることが知られている。しかし、これまで、UVの波長の違いによるCPD生成の違いを調べた研究はあまり行なわれていない。

本研究では、ラット副腎髄質腫細胞(PC12細胞)を用い250-310 nmの範囲から四つの波長(250 nm、270 nm、290 nm及び310 nm)を選択し、それらの波長が細胞生残率とCPD生成量に及ぼす影響を検討することをまず最初の目的とした。

方法としてPC12細胞に、照射量を2~8,000 mJ/cm²と変化させて照射した24時間後、あるいは一定量照射後10、30 分、1、2、4、24 時間後の細胞生残率を、トリパンプルー染色法を用いて、またCPD生成量を、免疫抗体法を用いて測定し、さらにDNA損傷度等をアガロース電気泳動法およびTUNEL変法を用いてUV照射波長の違いに関するDNA損傷への影響を調べた。その結果、UV照射後1時間では細胞死は殆ど起こらないが250 nm~290 nmの照射では主として24時間後に、310 nmの光の照射では時間経過に伴い細胞死が起こることが確認され

た。24時間後の細胞生残率より計算されるLD50は波長が増加するにつれ上昇し、CPD生成量はそれに伴い激減した。つまり250 nmにおいて最も低い細胞生残率と高いCPD生成、310 nmにおいて最も高い細胞生残率と低いCPD生成が認められた。既報の結果と比較すると、PC12細胞は10倍以上のUV耐性を示すことが明らかになった。また、各波長における修復能力をUV照射後の時間経過によるCPD生成量の変化により評価したところ、270 nmに次いで290 nmの光の照射が高い修復能力を示したが、310 nmの照射では修復能力は全く示されなかった。以上、波長及び照射線量により異なったUV毒性挙動を示すことが本研究により初めて明らかにされた。

次に得られたUV照射結果をもとに、化学物質等のUV照射保護効果を評価できるか否かを確かめた。インド医療に用いられる薬草*Tinospora cordifolia*のメタノール抽出物は高い抗酸化能力を有し抗ガン作用で知られているが、その抽出物をPC12細胞に添加し250、270及び290 nmの光の波長のLD50に相当する線量を照射し、細胞生残率、CPD生成量及びDNA損傷量の測定を行なった。その結果、*Tinospora cordifolia*の抽出物は、それ自体が細胞毒性を示すことはなかったが、低容量の曝露でUV照射による細胞生残率を上昇させ、DNA損傷及びCPD生成量を有意に低下させることが明らかになった。このことから、*Tinospora cordifolia*のUV照射による毒性の緩和効果が確認されるとともに、本研究で用いられた波長別UV照射法が、化学物質のUV照射に及ぼす影響評価にも有用であることが示された。

またPC12細胞の強いUV耐性に関して、2種の分化型細胞（ヒト血管内皮細胞およびヒト皮膚角化細胞）および2種の無限増殖能を有す細胞（PC12細胞およびCHO細胞）を用いて確かめた結果、ヒト皮膚角化細胞>> ヒト血管内皮細胞> CHO細胞 ≥ PC12細胞の順であり、無限増殖能を有する細胞の方が強い抗UV耐性を示すことが明らかになった。また、その耐性発現にmTORの活性化等が関与している可能性を示唆した。

以上、本論文により、UV照射によるDNA損傷はその照射される波長により違いがあることが明らかにされ、UVによる障害および毒性は、照射された波長分布を考慮に入れるべきであるとの考えが示された。次に本研究における紫外線照射法およびCPD測定法を用いることにより、化学物質の紫外線照射毒性に及ぼす影響を評価することが可能であることが示された。以上のことから本研究で示された成果は、UV毒性機構の解明とその影響評価系への構築に大きな貢献を為すことが期待された。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。