

UVA照射で惹起される正常ヒト由来線維芽細胞の小胞体ストレスからのアポトーシス誘導と海洋深層水の添加効果

Induction of apoptosis via endoplasmic reticulum stress in normal human fibroblasts by UVA irradiation and supplementation effects of deep seawater

山田勝久・柴田雄次

Katsuhisa YAMADA and Yuji SHIBATA

Abstract

There are many clinical reports describing symptoms improving with deep seawater (DSW) supplementation in various kinds of diseases today. However, we have not been able to find any information about this improving mechanism yet. On the other hand, it has been well known recently that ER stress is present as the foundation of every disease. In our past study concerning the calcification of normal human dermal fibroblasts (NHDF) caused by UVA irradiation, we reported the suppressive effect of DSW on the calcification. As its functional mechanism, it is postulated that apoptosis of NHDF induced by ER stress stimulation would be suppressed by DSW supplementation. Therefore, this study aims to analyze the pathway from the stimulated ER stress to the induction of apoptosis in NHDF by UVA irradiation. Furthermore, the supplementation effect of DSW was also analyzed in that pathway. As a result, it was suggested that ER stress of NHDF was induced by UVA irradiation, leading to apoptosis of NHDF. In addition, it was suggested that the apoptosis was suppressed by DSW supplementation, although the ER stress was not suppressed by it. From these results, it was suggested that the improvement mechanism of a clinical condition by DSW in many clinical reports might be based on the suppression of apoptosis induced by ER stress.

Key Words: apoptosis, deep seawater, disease, endoplasmic reticulum stress, fibroblast

要 旨

今日、海洋深層水 (DSW) の摂取により様々な疾患が改善するという臨床報告が多数あるが、その改善メカニズムについての情報はまだ見当たらない。一方近年、多くの疾病の原因として、小胞体ストレス (ERストレス) の存在が知られるようになってきている。これまでのUVA照射による線維芽細胞 (NHDF) 石灰化の研究で、DSWの石灰化抑制効果を報告した。その作用機序として、UVA照射によりNHDFに惹起されたERストレスから誘導されるアポトーシスをDSWが制御した可能性が推察された。そこで本研究は、UVA照射されたNHDFのERストレスの惹起とアポトーシスの誘導に至る経路について検討することを目的とした。さらにその経路におけるDSW添加の効果についても検討した。その結果、NHDFに対するUVA照射はERストレスを惹起し、アポトーシスが誘導されることが示唆された。またこれに対してDSWの添加は、ERストレスは制御しなかったが、アポトーシス誘導は制御することが示唆された。これらの結果から、臨床的所見に報告されているDSW補給による疾患改善効果の機序として、それらの根底にあるERストレスで誘導されるアポトーシスの抑制による可能性が認識された。

キーワード: アポトーシス, 海洋深層水, 疾病, 小胞体ストレス, 線維芽細胞

1. 緒 言

最近の社会情勢の急激な変化から、持続可能な自然エネルギー資源に大きな注目が集まっている。太陽光、風力、地熱等多様な自然エネルギー資源の中でも海洋深層水 (DSW) は、再生可能な冷熱エネルギー資源としての価値のみに留まらず、エネルギー利用後の海水中に、まだ人類の社会生活に役立つ多様な資源が含まれていることが大きな特徴である。この特徴を基盤として、これに含まれるミネラル類に着眼して多様な疾病に対してDSW摂取することによる症状改善効果の臨床的知見がある。竹内 (2019) は、DSW飲料の臨床的知見に関するレビューの中で、血液凝集抑制、免疫賦活、アレルギー性皮膚炎改善、骨代謝回転抑制、降圧、肥満などの生活習慣病の改善、脂質代謝改善、疲労回復促進など、多岐にわたる疾病の改善に関する知見の存在を述べている。また著者らも生活習慣病をはじめ、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、消化性潰瘍、便秘、白内障、癌に至るまで、DSWに関して実に幅広い分野の疾病に対するDSWの応用研究と成果の存在をDSWの未病・予防医学分野における総説としてまとめた (山本ら, 2018)。これらはいずれも非常に多様な疾病に関するDSWの臨床的知見であり、このことはDSWには多様な疾病に対して呼応する多様な作用機序を持っていることを推察させるものであるが、いずれの臨床的知見においてもDSWの作用機序に言及した報告はみられない。また、このように多様な疾病に対して効果を示した臨床的知見の一つ一つに呼応するような多様で複雑な作用機序をDSWが持っているということは常識的には考えにくい。そこで著者らは、DSWは多様な疾病に共通する根本的な原因に対して何らかの作用を与えている可能性を推察した。最近、生活習慣病をはじめ、循環器疾患、皮膚疾患、神経・精神疾患など多様な疾患の根底には、小胞体 (Endoplasmic reticulum, ER) ストレスが存在することが数多く報告されるようになってきた (金本・今泉, 2018)。環境ストレスを受けた細胞の小胞体内では折り畳み不良タンパク質が蓄積してERストレスが生じる。同時に、これを解消するための反応

(Unfolded protein response, UPR) が活性化される。しかしUPRでも解消できないほどの過度のERストレスに対してはFig. 1に示すように、C/EBP homologs protein (CHOP) 発現亢進に伴うカスパーゼ系の活性化により、アポトーシスが誘導されることが知られている (下家・池内, 2007; Schönthal, 2012; Furmanik and Shanahan, 2017)。また著者らの先行研究でも、UVAを照射した細胞の石灰化現象がDSWの添加により制御されることを確認しており (山田ら, 2017)、動脈由来平滑筋細胞におけるアポトーシスに伴う細胞の石灰化知見 (塩井, 2010) も鑑みて、ERストレスの惹起からアポトーシス誘導に至る経路におけるDSWの影響について検討する必要性が感じられた。そこで本研究では、NHDFを用いてUVA照射という環境ストレスを細胞に負荷してERストレス惹起からアポトーシス誘導に至る経路の活性化について検討するとともに、この経路に対するDSW添加の影響を検討することを目的とした。その結果、若干の知見が得られたので本報で報告する。

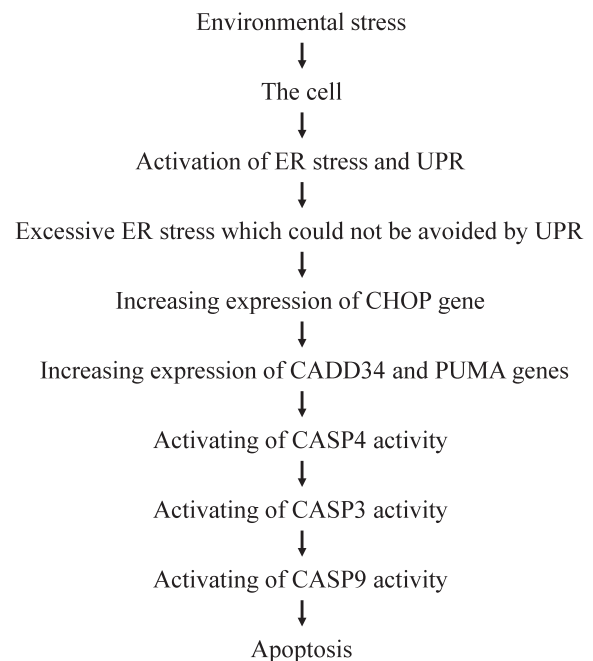


Fig. 1 A pathway model of apoptosis induction through ER stress in the cell. This figure was drawn as one of the simplified pathway in apoptosis induction through ER stress in the cell based on some typical references related to the pathway of apoptosis induction via ER stress (Oyadomari and Mori, 2004; 遠山・今泉, 2008; Schönthal, 2012; Furmanik and Shanahan, 2017).

2. 材料と方法

2.1 NHDFに対するUVA照射によるERストレスの惹起

NHDFに紫外線(UV)を照射すると表現型としてERストレスが惹起されることが山羽ら(2016)の報告にあることから、本研究では日常生活においてヒト皮膚に負荷される環境ストレスの一つとしてUV曝露を想定して、本研究では皮膚細胞にUVを照射して、ERストレスの惹起からアポトーシス誘導に至る経路について、分子生物学的な手法を用いて検討した。予め10%FBS含有イーグルMEM培地で培養したNHDF(NB1RGB細胞, RCG0222, 理化学研究所バイオリソースセンター)をマイクロプレートに2万個/穴になるように播種し、2日間培養(5%炭酸ガス, 37°C)した。次に培地を除去して新たにD-PBS(-)(ナカライテスク)を50 μ L/穴ずつ加えたのち、照射装置(VL-215.LM, コスモバイオ)を用いて1.0 J/cm²を目安(1.0 \pm 0.2 J/cm²)にUVAをNHDFに照射した。照射後、2 mM CaCl₂(富士フィルム和光純薬)および1 mM MgCl₂(富士フィルム和光純薬)を含有するように調製した10%FBS含有イーグルMEM(評価培地)に交換(200 μ L/穴)し、6時間培養(5%炭酸ガス, 37°C)したのち、NHDFのERストレスの惹起およびアポトーシスの誘導を後述の分子生物学的手法を用いて検討した。

2.2 UVA照射によるERストレスの惹起とアポトーシスの誘導

2.1でUVAを照射後、評価培地で6時間培養したNHDFから市販のキット(SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR, 東洋紡)を用いてERストレス惹起からアポトーシス誘導に至る各ストレスマーカー遺伝子のcDNAを合成した。次にPCR溶液(THUNDERBIRD SYBER qPCR Mix, 東洋紡)を調製し、リアルタイムPCR装置(StepOnePlus, Applied Biosystems)で定量PCRを行い、UVA照射によるERストレス惹起およびアポトーシス誘導を検討した。ERストレスマーカーとしては、CHOP, growth arrest and DNA damage inducible gene 34 (GADD34), p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA)の発現変動について検討した。またERストレス惹起で誘導されるアポトーシス、いわゆるCHOP誘導アポトーシスとは異なる経路の遺伝毒性ストレスに誘導されるアポトーシスのストレスマーカーとして、H2A histone family member X (H2AX)の発現変動を検討した。次にアポトーシスマーカーとしては、Caspase-3 (CASP3), Caspase-4 (CASP4)およびCaspase-9 (CASP9)の発現変動を検討した。なおこれらの遺伝子のmRNA量は、全サンプルのcDNA混合液から作製した希釈系列(検量線)を基に相対発現量として算出し、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内在性対照として解析した($n=4$)。またCt値が35以上のデータについては、非特異的な増幅が懸念されるので未検出(N. D.)とした。得られた各マーカー遺伝子の発

Table 1 Primers list

Gene name	Oligonucleotide sequence		Reference
	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	
CHOP	GGAAACAGAGTGGTCATTCCC	CTGCTTGAGCCGTTTCATTCTC	PrimerBANK (ID: 304282228c1)
GADD34	ATGATGGCATGTATGGTGAGC	AACCTTGCAGTGTCTTATCAG	PrimerBANK (ID: 157674362c1)
PUMA	GACCTCAACGCACAGTACGAG	AGGAGTCCCATGATGAGATTGT	PrimerBANK (ID: 13785990a1)
BAX	CCCAGAGGTCTTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	PrimerBANK (ID: 163659849c1)
BCL-2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC	TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC	Börzsönyi <i>et al.</i> (2013)
GADD45A	GAGAGCAGAAGACCGAAAGGA	CACAACACCAGTTATCGGG	PrimerBANK (ID: 4503287a1)
H2AX	CAACAAGAAGACGCGAATCA	CGGGCCCTCTTAGTACTCCT	Zare <i>et al.</i> (2019)
CASP3	TGCAGTCATTATGAGAGGCAAT	AAGGTTTGAGCCTTTGACCA	Heravi <i>et al.</i> (2012)
CASP4	CAAGAGAAGCAACGTATGGCA	AGGCAGATGGTCAAACCTCTGTA	PrimerBANK (ID: 73622124c1)
CASP9	CTGTCTACGGCACAGATGGAT	GGGACTCGTCTTCAGGGGAA	PrimerBANK (ID: 312596928c3)
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	ATGGTGGTGAAGACCCAGT	Baba <i>et al.</i> , (2006)

現量については、UVA未照射のNHDFにおける発現量を「1.0」として相対値で表した。なお、本研究で対象とした各マーカー遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー (Table 1) の作製は、株式会社ジーンデザイン (大阪府茨木市) に依頼した。

2.3 アポトーシス実行因子「CASP3活性」

UVAで惹起されたERストレスにより誘導されるアポトーシスについて、その実行因子の一つであるCASP3の活性変動を検討するために、2.1でUVAを照射後6時間培養 (5%炭酸ガス, 37°C) したNHDFを150 μ L/穴のD-PBS (-) で1回洗浄後、市販のキット (Apo-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay, Promega) のマニュアルに従って操作し、マイクロプレートリーダー (MTP-810 Lab, コロナ電気) を用いてOD₄₉₂値を測定した。得られた値は、UVA未照射の細胞におけるOD₄₉₂測定値を「1.0」として相対値で表した。

2.4 UVA照射によるERストレス惹起からアポトーシス誘導経路におけるDSW添加の影響

2.1でUVAを照射後、1% (v/v) DSW (静岡県伊東市, 34°50'19"N, 139°08'11"E, 取水深度800 m, 2021年6月取水分, Table 2) を含む評価培地で6時間培養 (5%炭酸ガス, 37°C) したほかは、2.1および2.2と同様に操作して、ERストレスマーカーの発現変動および2.3と同様に操作してアポトーシスの実行因子の一つであるCASP3の活性に及ぼすDSW添加の影響について検討した。また、1% (v/v) DSWの代わりに精製水を添加した外は、同様に操作したものを陰性対照とし、同様に1% (v/v) DSWの代わりに、

Table 2 Concentration of major mineral elements contained in two kinds of seawater of Izu-Akazawa

Mineral element	Concentration (mM)	
	DSW	SSW
Na	443.5	393.5
K	9.0	9.3
Ca	9.5	8.7
Mg	50.6	46.5

Each concentration of major mineral elements was calculated as the average value on three times analyzed results.

1% (v/v) 表面海水 (SSW, 静岡県伊東市, 34°50'19"N, 139°08'11"E) およびケミカルシャペロンである0.1 mM 4-phenylbutyric acid (4-PBA, Sigma-Aldrich) を添加した外は、同様に操作したものを陽性対照とした。なお得られた値は、陰性対照の値を「1.0」として相対値で表した。

2.5 UVA照射による細胞生存能の変化と石灰化に及ぼすDSW添加の影響

2.1でNHDFにUVAを照射後、1% (v/v) DSWを含むERストレス評価培地で18時間培養 (5%炭酸ガス, 37°C) したのち、細胞の活性をMTT assay (山田ら, 2007) で、石灰化度をアリザリンレッド-Sで染色後、鶴見ら (2009) の方法で石灰化度を測定した。なお1% (v/v) DSWの代わりに、精製水を添加した外は、同様に操作したものを陰性対照とし、また同様に1% (v/v) DSWの代わりに同濃度の表面海水 (SSW, 伊豆赤沢, 2021年6月取水) を用いた外は、同様に操作したものを比較対照とした。なお得られた値は、陰性対照の値を「1.0」として相対値で表した。

2.6 統計処理

本研究では、実験データは平均値 \pm 標準偏差で表し、二群の母集団間の差異の検定にはStudent's *t*-testによる解析、また三群以上の母集団間の差異の検定には、Tukeyによる多重解析により有意差を判定した。

3. 結果

3.1 UVA照射によるERストレスの惹起とアポトーシスの誘導

2.1の方法で惹起されるERストレスについて、各ERストレスマーカーの遺伝子発現変動を検討した結果、Fig. 2に示すようにERストレスからアポトーシスに至る経路の上流マーカーであるCHOPの発現が未照射に比べて顕著に ($p < 0.05$) 増大したが、その下流にあるGADD34の発現は顕著に ($p < 0.05$) 増大したにもかかわらず、PUMAの発現は有意に

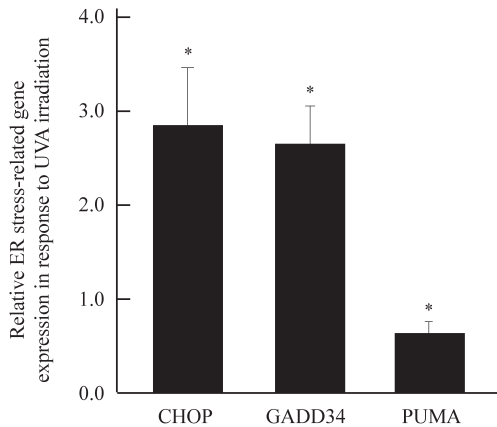


Fig. 2 Relative expression of ER stress-related genes in NHDF at six hours after UVA irradiation ($n=6$, mean \pm SD). The gene expression of NHDF irradiated by UVA was calculated, assuming the expression in the non-irradiated cells is "1.0". Asterisks indicate a significant difference between UVA-irradiated and non-irradiated cells ($n=6$, mean \pm SD, $*p<0.05$, Tukey test, ANOVA).

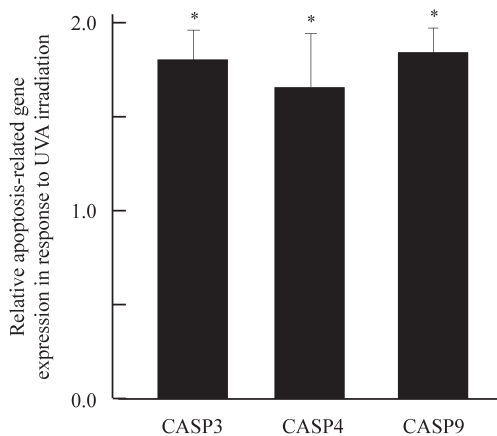


Fig. 3 Relative expression of three kinds of caspase genes which are apoptosis-related genes in NHDF at six hours after UVA irradiation. The gene expression of NHDF irradiated by UVA was calculated, assuming the expression in the non-irradiated NHDF is "1.0". Asterisks indicate a significant difference between UVA-irradiated and non-irradiated cells ($n=6$, mean \pm SD, $*p<0.05$, Tukey test, ANOVA).

($p<0.05$) 低下していた (Fig. 2). またカスパーゼ経路の活性化を介してアポトーシスを促進する BCL-2 (西頭, 2015) は, UVA 照射の有無にかかわらず, 発現自身がみられなかった (データ未提示). なお CHOP 誘導アポトーシスとは異なる経路で直接的に DNA に作用してアポトーシスに至る, いわゆる遺伝毒性ストレスマーカーである H2AX 遺伝子 (Halicka *et al.*, 2005) にも発現変動はみられなかった (デー

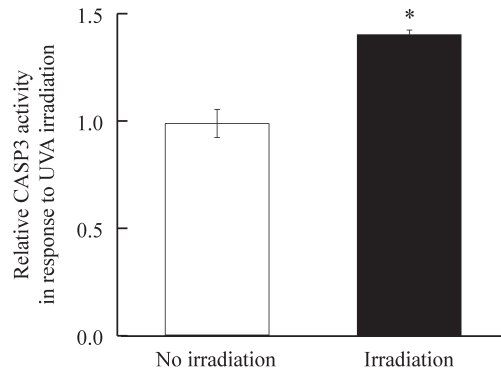


Fig. 4 Increase of caspase-3 activity of NHDF in response to UVA irradiation. The caspase-3 activity (CASP3 activity) was measured at six hours after UVA irradiation. CASP3 activity was calculated, assuming the activity in the non-irradiated NHDF is "1.0". Asterisk indicates a significant difference between UVA-irradiated and non-irradiated cells ($n=6$, mean \pm SD, $*p<0.05$, Tukey test, ANOVA).

タ未提示). 一方, ER ストレスの惹起により誘導されるアポトーシスのマーカーである CAPS3, CAPS4 および CAPS9 のいずれの遺伝子も, 未照射に比べて顕著に発現が増大 ($p<0.05$) していた (Fig. 3). 細胞内のカスパーゼ酵素群の中で酵素活性を計測できる市販キットを用いて CASP3 の活性を調べたところ, UVA 照射によりその活性が顕著に ($p<0.05$) 上昇することを確認した (Fig. 4).

3.2 UVA 照射による ER ストレス惹起からアポトーシス誘導に至る経路における DSW 添加の影響

2.1 の方法で UVA 照射後, 1% (v/v) DSW を含む評価培地で培養した NHDF では, UVA 照射後に発現が増大する CHOP 遺伝子に対する DSW 添加による抑制効果はみられなかった. またこれは陽性対照として供したケミカルシャペロンである 0.1 mM 4-PBA の添加にも, DSW と同様に発現抑制効果はみられなかった (データ未提示). 一方, ER ストレスに誘導されて活性化されるアポトーシスの実行因子である CASP3 活性に対しては, 陽性対照である 4-PBA 同様に SSW および DSW に CASP3 活性に対する抑制作用がみられた. なおその効果は, SSW よりも DSW の方が顕著 ($p<0.05$) であった (Fig. 5).

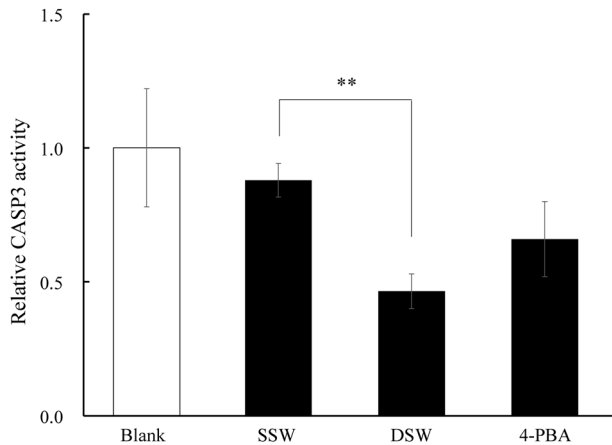


Fig. 5 Supplementation effect of DSW on relative CASP3 activity of NHDF at six hours after UVA irradiation. SSW as control to DSW, 4-PBA as positive control of well-known ER stress inhibitor and pure water as blank were prepared. Relative CASP3 activity of NHDF was calculated, assuming CASP3 activity of blank is "1.0". Double asterisk indicates a significant difference between DSW and SSW ($n=4$, mean \pm SD, $**p<0.01$, Student's *t*-test).

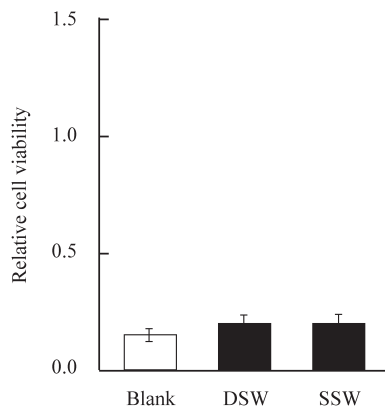


Fig. 6 Supplementation effect of DSW on decreasing cell viability of NHDF in response to UVA irradiation. The cell viability was measured at 18 hours after UVA irradiation. SSW as control to DSW and pure water as blank were prepared. Relative cell viability of NHDF was calculated, assuming the cell viability of NHDF non-irradiated UVA is "1.0" ($n=6$, mean \pm SD).

3.3 UVA照射による細胞生存能の変化と石灰化に対するDSW添加の影響

2.1の方法でUVA照射後に評価培地で培養(18時間)したNHDFの細胞生存能は、精製水、DSW、SSWのいずれの添加においても著しく低下していた(Fig. 6)。一方NHDFの石灰化に対しては、DSW添加は顕著な石灰化抑制効果($p<0.05$)を示したが、

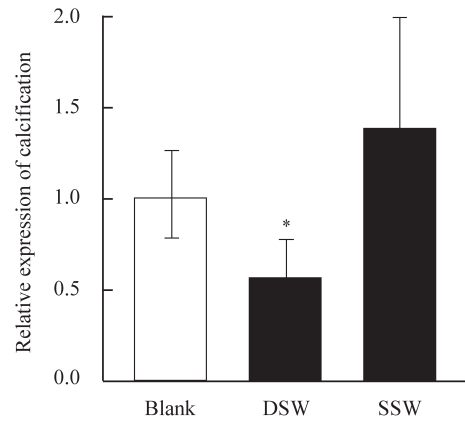


Fig. 7 Suppressive effect of DSW on expression of calcification in NHDF in response to UVA irradiation. Calcification degree was measured at 18 hours after UVA irradiation. SSW as control to DSW and pure water as blank were prepared. Relative expression of calcification was calculated, assuming the expression of calcification in NHDF of blank is "1.0". Asterisk indicates a significant difference between DSW and SSW ($n=6$, mean \pm SD, Tukey test, ANOVA).

精製水およびSSWにはその効果はみられなかった(Fig. 7)。

4. 考 察

近年、多くの疾病の根底には、ERストレスの存在が知られている。ERストレスとは、脂質やステロイドの合成、タンパク質の折りたたみや成熟化、カルシウム貯蔵および解毒を担う細胞小器官であるER内で、タンパク質が正常に折りたたまれなくなった場合や誤ったタンパク質(変性タンパク質)が蓄積したことによって引き起こされる現象である(遠山・今泉, 2008)。これに対して先ずUPR(Unfolded protein response)が活性化されてERストレスの回避に努める。しかしこのUPRで回避できないと判断された場合には、アポトーシスが誘導されて過度なERストレスに陥った細胞が組織から排除される(浦野, 2004)。従って過度なERストレスによりアポトーシスが進行した組織は、機能不全に陥ってしまう。今日ではこのERストレスが多くの疾病の原因と理解されるようになってきている(小見田ら, 2013)。金本・今泉(2018)は、糖尿病、高血圧症、代謝性疾患、循環器疾患、腎障害、骨格形成異常、神経変性

疾患から癌に至る多様な疾病の原因に、ERストレスが関連していることを述べている。特に超高齢化社会に突入した日本では、加齢に伴って何らかの疾患を持つ患者数は益々増加することが予想されている。また今日、疾患の原因と考えられるようになったERストレスに対して、その回避反応であるUPRの機能が老化に伴って低下するという知見もある(浅田・今泉, 2013)。こうした状況から、老化と疾患において、その原因とされるERストレスおよびUPRに着眼した研究は、非常に重要な課題の一つと考えられる。また近年の皮膚の分野における老化研究として、UV曝露という環境負荷に起因する光老化が注目されている。山羽ら(2016)は、この光老化の*in vitro*研究としてNHDFにUVAを照射したところ、ERストレスが惹起されたことを示した。細胞にUVを照射すると、酸化ストレスが負荷されることがよく知られており(川内, 2015)、またその酸化ストレスがERストレスを惹起する環境刺激であることも周知である(南野, 2018)。そこで本研究では、先の山羽ら(2016)の報告を参考に、NHDFにUVAを照射してERストレスが惹起されることを確認すると共に、ERストレスの惹起からアポトーシスが誘導される経路について新たに検討した。さらに本研究では、上述の経路を確認したのち、この経路にDSWを添加して、UVA照射に伴う細胞の石灰化に対するDSWの抑制作用(山田ら, 2017)の機序について検討した。UVA照射のような環境ストレスの負荷によって過度のERストレスが惹起された場合、CHOP遺伝子の発現が増大する。これに呼応して発現が増大するGADD34遺伝子やPUMA遺伝子を介して、CASP群が活性化されてアポトーシスが誘導される。いわゆるCHOP誘導アポトーシス経路である(Fig. 1; Oyadomari and Mori, 2004)。本研究ではFig. 2に示すように、NHDFにUVA照射したところ、ERストレスの惹起を示唆するCHOPおよびGADD34の各遺伝子の顕著な($p < 0.05$)発現増大が確認された。また同時に調べた遺伝毒性ストレスマーカーであるH2AX遺伝子(Halica *et al.*, 2005)には変動がみられなかった。この遺伝毒性ストレスとは、DNAが直接的にダメージを受けるストレスで

ある。これらの結果から、本研究のUVA照射条件は、DNA二本鎖の分断などの重篤な環境ストレス負荷条件ではなく、ERストレスを惹起させる程度の環境ストレス負荷条件であると推察された。この環境ストレスが負荷されたNHDF内では、ERストレスの惹起に伴うCHOP遺伝子と、その下流にあるGADD34遺伝子の発現が顕著に($p < 0.05$)増大した。しかしERストレスの惹起に伴ってCHOP遺伝子やGADD34遺伝子と共に増大することが知られているPUMA遺伝子の発現は増大せず、むしろ低下していた(Fig. 2)。この要因として、各種ERストレスマーカーの発現増大における時間的なズレ(タイムラグ)や他のERストレスマーカーの発現程度との相互関係が影響している可能性があり、遺伝子発現変動の観察でERストレスという現象(表現形)を解析することの難しさを改めて認識させられた。本研究ではNHDFに対するUVA照射により、Fig. 1に示したスキームに準拠する形でCHOP遺伝子の発現増大を介したGADD34遺伝子の発現増大に伴ってアポトーシスの実行因子であるCASP群(CASP3, CASP4およびCASP9)の各遺伝子も顕著な($p < 0.05$)発現増大が確認された(Fig. 3)。また、UVA照射によってCASP群の遺伝子発現が増大するだけではなく、アポトーシスの実行因子の一つであるCASP3の活性自身も顕著に($p < 0.05$)活性化することも示された(Fig. 4)。次に、本研究によって確認されたERストレスを介したCHOP誘導によるアポトーシスに至る経路にDSWを添加した。その結果、UVA照射によって発現が増大するCHOP遺伝子やGADD34遺伝子などのERストレスマーカーに対して、DSWはその発現増大を抑制しなかった。また、DSWの代わりに陽性対照として供したケミカルシャペロンであるの4-PBAを添加した場合でも、同様に抑制効果はみられなかった。これは先にも述べたように、遺伝子発現変動の観察でERストレスという現象(表現形)を解析することの難しさを改めて認識させられるものであった。一方、ERストレスに誘導されるアポトーシスの実行因子の一つであるCASP3の活性に対して、DSWの添加はケミカルシャペロンの4-PBA同様、その酵素活性を低減させた(Fig. 5)。

さらにその作用は、比較対照であるSSWに比べて顕著に ($p < 0.01$) 強かった。Cao *et al.* (2016) のマウスを用いた研究報告にあるように、4-PBAはストレス負荷(高グルコース負荷)で誘導されたCASP3およびCASP12の活性化阻害を介したアポトーシスの防止効果を有することが知られている。この報告では、ERストレス反応の関連転写因子であるXボックス結合タンパク質の発現の減少によることが確認されていることから、4-PBAのアポトーシス防止効果の作用機序は、その上流のERストレスの回避によるものと推察している。DSWの添加によって、特異的にCASP3活性が低下したこと、また同時に試験したケミカルシャペロンの4-PBAにも同様の効果が確認されたことを包含して考察すると、DSWの作用機序も4-PBA同様、ERストレスの回避によるアポトーシスの制御という機序が推察される。しかしながら結果3.2で述べたように、DSWはUVA照射によるCHOP遺伝子の発現増大を抑制しなかった(このことは、同時に試験した4-PBAでも同様であった)ので、結論として、本研究ではERストレスに対するDSWによる直接的な影響確認には至っていない。今後UVA照射によるERストレス誘導アポトーシスの経路を研究するにあたり、特にERストレスおよび遺伝毒性ストレスを介する以外のアポトーシス経路が存在する可能性も含めて、慎重に検討を重ねて行く必要がある。なお本研究では、アポトーシスに伴って生じることが知られている細胞の石灰化(塩井, 2010)に対しても、Fig. 7に示すように、SSWの添加に比べて顕著な ($p < 0.05$) 石灰化抑制効果が、DSWの添加で確認された。このことをERストレス惹起によるCHOP誘導アポトーシスの制御という観点から考察すると、UVA照射に伴うNHDFの石灰化に対するDSWとSSWの抑制効果の違いは、アポトーシス実行における一因子であるCASP3の制御に対するDSWとSSWの効果の違いに起因している可能性がある。しかし同じ海水でありながら、DSWに特異的にみられたCASP3活性の制御作用およびこれに起因する石灰化抑制に関する本質成分の解明については、今後の課題である(Table 2)。またUVA照射18時間培養後の細胞生存能は、精製

水、DSWおよびSSWの全ての試験区で極端に低下していたので、各試料の添加による特異的な影響は示されなかった。これについては、DSWの添加によりCASP3の活性が抑制されていることから、DSWの添加によりアポトーシスが制御された結果として、顕著な ($p < 0.05$) 石灰化抑制作用が発現したものと推察される。今後、NHDFの石灰化に対する抑制作用およびERストレス惹起からアポトーシスに至るいわゆるCHOP誘導アポトーシス経路においてDSW添加の影響を研究する場合には、環境ストレス負荷後のERストレスマーカーやアポトーシスマーカー等の発現変動を中心とした分子生物学的パラメーターの変動とCHOP誘導アポトーシス経路を介した石灰化や細胞生存能などの表現型の変動について、タイムコースを視野に入れた検討が必要と思われる。加えて本研究では環境ストレスの負荷方法としてUVA照射を選んだが、これに代えて活性酸素等で酸化ストレスを負荷した普遍的な環境ストレス負荷モデルによるCHOP誘導アポトーシス経路のモデルを検討し、そのモデルを基に、DSWの添加による影響を検討することで、緒言で述べた各種臨床報告におけるDSWの普遍的な作用機序を追及できると考えられる。これについても今後の課題として検討を計画している。

参考文献

- 浅田梨絵・今泉和則 (2013) 疾患における小胞体ストレスの役割. 基礎老化研究, 37, 9-16.
- Baba, H., A. Masuyama and T. Takano (2006) Effects of *Lactobacillus helveticus*-fermented milk on the differentiation of cultured normal human epidermal keratinocytes. *J. Dairy Sci.*, 89, 2072-2075.
- Börzsönyi, B., C. Demendi, J. Rigó Jr., I. Szentpéteri, A. Rab and J. G. Joó (2013) The regulation of apoptosis in intrauterine growth restriction: A study of Bcl-2 and Bax gene expression in human placenta. *J. Matern-Fetal Neonatal Med.*, 26, 347-350.
- Cao, A. L., L. Wang, X. Chen, Y. M. Wang, H. J. Guo, S. Chu, C. Liu, X. M. Zhang and W. Peng (2016) Ursodeoxycholic acid and 4-phenylbutyrate prevent endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic nephropathy. *Lab. Invest.*, 96, 610-622.

- Furmanik, M. and C. M. Shanahan (2017) Endoplasmic reticulum stress in arterial smooth muscle cells: A novel regulator of vascular disease. *Curr. Cardiol. Rev.*, 13, 94-105.
- Halicka, H. D., X. Huang, F. Traganos, M. A. King, W. Dai and Z. Darzynkiewicz (2005) Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: Relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle*, 4, 339-345.
- Heravi, R. E., F. Hadizadeh, M. Sankian, J. T. Afshari, J. Behravan (2012) Cyclooxygenase-2 inhibition by novel bisaryl imidazolyl imidazole derivatives increases Bax/Bcl-2 ratio and upregulates caspase-3 gene expression in Caco-2 colorectal cancer cell line. *Genes Genom.*, 34, 199-204.
- 金本聡自・今泉和則 (2018) 小胞体ストレスと疾患. *生化学*, 90, 51-59.
- 川内康弘 (2015) 皮膚の酸化ストレス. *東京医科大学雑誌*, 73, 244-251.
- 小見田真理・奥山陽太・神 久予・磯野史朗・青江知彦 (2013) 小胞体ストレスと疾患. *千葉医学*, 89, 87-94.
- 南野哲男 (2018) 心不全は不良タンパク質蓄積疾患である!—心不全発症・進展における小胞体ストレス応答の役割. *日本心不全学会eLetter*, 冬号, 1-3.
- 西頭英起 (2015) 小胞体におけるタンパク質の品質管理の分子機構および中枢神経系における小胞体ストレス応答の役割. *領域融合レビュー*, DOI: 10.7875/leading.author.4.e009.
- Oyadomari, S. and M. Mori (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.*, 11, 381-389.
- Schönthal, A. H. (2012) Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica*, DOI: 10.6064/2012/857516.
- 下家浩二・池内俊彦 (2007) 小胞体ストレス誘導型アポトーシスとその細胞内防御機構—脳神経細胞の死による疾患とその治療戦略案の可能性—. *関西大学理工学会誌*, 14, 39-43.
- 塩井 淳 (2010) 血管石灰化・リモデリングと糖尿病. *脈管学*, 50, 561-567.
- 竹内啓晃 (2019) 海洋深層水飲料の健康増進効果 = 腸内環境への影響 =. *日本海水学会誌*, 73, 19-23.
- 遠山正彌・今泉和則 (2008) ERストレス. *血管医学*, 9, 325-330.
- 鶴見亜有子・小林 誠・村山怜一郎・臼井通彦・小出容子・山本松男 (2009) ヒト歯根膜細胞中に存在するアルカリフォスファターゼ陽性細胞と陰性細胞の特徴. *Dent. Med. Res.*, 29, 28-39.
- 浦野文彦 (2004) 小胞体ストレス伝達システム. *化学と生物*, 42, 178-182.
- 山羽宏行・田中 浩・八代洋一・中田 悟 (2016) 紫外線による真皮線維芽細胞における小胞体機能変化と皮膚光老化との関連性. *日本化粧品学会誌*, 40, 87-92.
- 山田勝久・今田千秋・土屋孝弘・宮本勝城・辻坊裕・小林武志・濱田 (佐藤) 奈保子 (2007) 海洋環境より分離された糸状菌培養液の美白素材への応用研究. *日本化粧品技術者会誌*, 41, 254-261.
- 山田勝久・柴田雄次・野村道康・今田千秋 (2017) UVA照射により誘導される正常ヒト線維芽細胞の石灰化に対する海洋深層水の抑制効果. *海洋深層水研究*, 18, 1-7.
- 山本 樹・山田勝久・鈴木信孝・許 鳳浩・高橋正征 (2018) 海洋深層水の未病・予防医学分野における展望. *日本補完代替医療学会誌*, 15, 67-77.
- Zare, T., Fardid, R., Naderi, S. (2019) Synergetic effect of silver nanoparticles and UVC irradiation on H2AX gene expression in TK6 cells. *Cell J. (Yakhteh)*, 21, 204.
- (2022年12月12日受付; 2023年1月23日受理)