培養ヒト角膜上皮細胞の ultraviolet B 障害に対する
フラビンアデニンジヌクレオチドの効果

阪元明日香,* 中村 雅胤

Effect of Flavin Adenine Dinucleotide on Ultraviolet B Induced Damage
in Cultured Human Corneal Epithelial Cells

Asuka Sakamoto* and Masatsugu Nakamura

Ophthalmic Research & Development Center, Santen Pharmaceutical Co., Ltd.;
8916-16 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0101, Japan.

(Received November 29, 2011; Accepted April 27, 2012; Published online May 9, 2012)

This study evaluated the effects of flavin adenine dinucleotide (FAD) on ultraviolet B (UV-B)-induced damage in cultured human corneal epithelial (HCE-T) cells. The cultured HCE-T cells were treated with 0.003125–0.05% FAD before exposure to 80 mJ/cm² UV-B. Cell viability was measured 24 h after UV-B irradiation using the MTS assay. Reactive oxygen species (ROS) were detected 30 min after UV-B irradiation using 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester. Apoptosis was evaluated 4 h after UV-B irradiation in the caspase-3/7 activity assay. UV-B irradiation reduced cell viability and stimulated ROS production and caspase-3/7 activity in HCE-T cells. Pretreatment of UV-B irradiated HCE-T cells with FAD significantly attenuated cell viability reduction and inhibited the stimulation of both ROS production and caspase-3/7 activity due to UV-B exposure compared with those with vehicle (0% FAD). These results clarified that FAD inhibits ROS-mediated apoptosis by UV-B irradiation in HCE-T cells and suggest that FAD may be effective as a radical scavenger in UV-B-induced corneal damage.

Key words—flavin adenine dinucleotide; corneal epithelium; UV-B damage; apoptosis

緒 言

眼表面を構成する角膜は、外界と直接接している組織であり、常時種々のストレスに曝露されている。外的ストレスの1種である紫外線には、ultraviolet A (UV-A, 320–400 nm), ultraviolet B (UV-B, 290–320 nm), ultraviolet C (UV-C, 200–290 nm) の3種類の波長があり、UV-B 及び UV-C が角膜障害に関連すると考えられている。しかしながら、UV-C の大半はオゾン層により吸収され地球表面に到達しないため、臨床的に角膜障害で問題となる波長は UV-B である。¹⁾ 細胞及び組織レベルにおいて、紫外線は角膜上皮の DNA 損傷、酵素不活性化、活性酸素種 (ROS) 発生、アポトーシスを誘発することが数多く報告されており、^{2,3)} 紫外線がリスクファクターの1つとして考えられる眼疾患には、角膜障害以外に翼状片、白内障、眼瞼皮膚がんなどが

報告されている。^{4,5)}

フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) は、活性型ビタミン B₂ の1種で、生体内では種々の酸化還元酵素の補酵素として機能し、エネルギー産生、糖質、タンパク質、脂質の代謝に関与している。⁶⁾ 眼科疾患において角膜炎及び眼瞼炎は、ビタミン B₂ の欠乏又は代謝障害が関与していると考えられており、これらに対して FAD の医療用点眼液あるいは眼軟膏が古くから使用されている。近年では、一般用点眼液にも FAD は角膜の代謝機能を高める成分として配合されている。また、ビタミン B₂ は脂質に対する抗酸化作用を有し、眼組織においてはウサギ網膜ホモジェネートに紫外線を照射することで増加した過酸化脂質に対して、いくつかのビタミン B₂ が分解作用を示している。⁷⁾ 本研究では、FAD が UV-B 照射による角膜障害を抑制する機序を明らかにするために、角膜上皮細胞に UV-B を照射した際に起きる ROS の産生やアポトーシスに対する FAD の効果について検討した。

参天製薬株式会社眼科研究開発センター

*e-mail: asuka.sakamoto@santen.co.jp

実験材料及び方法

1. 実験材料 SV40 不死化ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T) は、理化学研究所・バイオリソースセンターより購入し、コレラトキシン不含 SHEM 培地 (supplemented hormone epithelial medium: 15% fetal bovine serum (FBS), 5 μ g/mL insulin, 10 ng/mL human epidermal growth factor, 40 μ g/mL gentamicin 含有 DMEM/F-12) 中で継代培養した。FAD は参天製薬社製を使用した。

2. 実験方法 継代培養した HCE-T を 96 ウェルプレートに播種し (1 $\times$ 10⁴ cells/well), 10% FBS 含有 DMEM/F-12 中で培養した。播種の翌日にウェルを D-PBS (−) で洗浄後, D-PBS (−) で調製した FAD (0.003125–0.05%) を HCE-T に処置し, CO₂ インキュベーターで 1 時間培養した。培養後, UV-B ランプ (CSL-6B, 波長 312 nm, コスモバイオ) を用いて, UV-B を 80 mJ/cm² の強度で照射した。非照射群は蛍光灯下に静置した。なお, UV-B ランプの強度は, 紫外線照度計 (CSV-312, コスモバイオ) を用いて測定し, 照射距離 15 cm で約 680 μ W/cm² であった。

生細胞数測定には MTS assay 法を用いた。UV-B 照射後, 培地を 10% FBS 含有 DMEM/F-12 に置換し, CO₂ インキュベーターで 24 時間培養した。その後 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) の方法に準じて生細胞数を測定した。

ROS は検出プローブである 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA, Invitrogen) を用いて測定した。CM-H₂DCFDA は, 生細胞の細胞内エステラーゼにより加水分解され, さらに ROS が存在すると酸化されて, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) になり蛍光を発する。HCE-T に対して 5 μ M CM-H₂DCFDA を処置し, 37°C で 1 時間培養した。続いて, FAD の処置及び UV-B の照射を行い, 培地をフェノールレッド不含 DMEM/F-12 に置換し, CO₂ インキュベーター中で 30 分間培養した。その後, DCF の蛍光強度 (励起 485 nm, 発光 530 nm) を測定した。

Caspase-3/7 活性を測定する実験においては, HCE-T に UV-B を照射後, 培地をフェノールレ

ド不含 DMEM/F-12 に置換して, CO₂ インキュベーター中で 4 時間培養した。その後, Apo-ONE[™] Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega) の方法に準じて caspase-3/7 活性を測定した。

3. データ処理及び統計解析 測定値を用いて 0% FAD (UV-B 非照射) 群に対する変化率 (%) を次式で算出した。なお, Blank は細胞未播種のウェルを設定した。

$$\text{変化率 (\%)} = \text{OD}_s / \text{OD}_c \times 100$$

OD_s: 各ウェルの測定値 (−Blank 値)

OD_c: 0% FAD (UV-B 非照射) 群の平均測定値 (−Blank 値)

結果はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計解析には, 生物実験データ統計解析システム EXSUS (シーエーシー) を用いて, UV-B 照射条件と FAD 濃度条件を要因とした二元配置分散分析を行った。5% を有意水準として解析した。

結 果

1. ヒト角膜上皮細胞の生存率に対する UV-B 照射及び FAD の効果 UV-B 照射及び FAD の生細胞の減少に対する影響を Fig. 1 に示す。UV-B を照射した HCE-T の 24 時間後の生存率は, 非照射群の約 40% を示し, 著しく低値であった。UV-B 照射群に FAD を前処置すると濃度依存的に生存率は増加した。0.05% FAD 群では生存率は約 80% まで回復した。UV-B 照射の有無と FAD 濃度での二元配置分散分析の結果, UV-B 照射条件, FAD 濃度条件の主効果及び交互作用のいずれも有意であった (Table 1)。すなわち, UV-B 非照射群では FAD は生存率に影響を及ぼさなかったが, UV-B 照射群では減少した生細胞数に対する FAD の細胞死抑制作用が認められた。

2. ヒト角膜上皮細胞の ROS 産生量に対する UV-B 照射及び FAD の効果 Figure 2 に示すように, HCE-T に UV-B を照射すると ROS 産生量は非照射群の約 300% を示し, 著しく高値であった。UV-B 照射群に FAD を前処置すると濃度依存的に ROS 産生量は減少した。UV-B 照射の有無と FAD 濃度での二元配置分散分析の結果, UV-B 照射条件, FAD 濃度条件の主効果及び交互作用のいずれも有意であった (Table 2)。すなわち, UV-B 非照射群の ROS 産生量に FAD は影響を及ぼさなかったが,

Fig. 1. Effects of UV-B and FAD on Cell Viability in HCE-T Cells
Each value represents mean $\pm$ S.E. ($n=3$).

Fig. 2. Effects of UV-B and FAD on ROS Production in HCE-T Cells
Each value represents mean $\pm$ S.E. ($n=4$).

Table 1. Statistical Analysis by Two-way ANOVA for Fig. 1

Source of variation	df	Sums of squares	Mean square	F statistic	p value
UV-B	1	11241.5474	11241.5474	296.7207	0.0000
FAD	3	1787.6151	595.8717	15.7280	0.0000
UV-B $\times$ FAD	3	1638.8193	546.2731	14.4189	0.0001
Error	16	606.1753	37.8860		

Table 2. Statistical Analysis by Two-way ANOVA for Fig. 2

Source of variation	df	Sums of squares	Mean square	F statistic	p value
UV-B	1	186649.8077	186649.8077	208.8191	0.0000
FAD	3	8814.6710	2938.2237	3.2872	0.0380
UV-B $\times$ FAD	3	17004.7276	5668.2425	6.3415	0.0025
Error	24	21452.0368	893.8349		

UV-B 照射群では増加した ROS 産生量に対する抑制効果を示した。

3. ヒト角膜上皮細胞の caspase-3/7 活性に対する UV-B 照射及び FAD の効果 HCE-T のアポトーシスに対する UV-B 照射及び FAD の影響を Fig. 3 に示す。HCE-T に UV-B を照射すると caspase-3/7 活性は非照射群の約 170%を示し、著しく高値を示した。UV-B 照射群に FAD を前処置すると濃度依存的に caspase-3/7 活性は減少し、0.05% FAD 群では、ほぼ非照射時と同じ程度であった。UV-B 照

射の有無と FAD 濃度での二元配置分散分析の結果、UV-B 照射条件、FAD 濃度条件の主効果及び交互作用のいずれも有意であった (Table 3)。すなわち、FAD は UV-B 非照射群の caspase-3/7 活性に影響を及ぼさなかったが、UV-B 照射群では増加した caspase-3/7 活性に対する抑制作用を認めた。

考 察

紫外線障害によるアポトーシスのシグナル経路は、ROS に代表される紫外線ストレス産物がミトコン

Fig. 3. Effects of UV-B and FAD on Caspase-3/7 Activity in HCE-T Cells
Each value represents mean $\pm$ S.E. ($n=4$).

Table 3. Statistical Analysis by Two-way ANOVA for Fig. 3

Source of variation	df	Sums of squares	Mean square	F statistic	p value
UV-B	1	16946.8653	16946.8653	107.6477	0.0000
FAD	3	4498.9704	1499.6568	9.5259	0.0003
UV-B $\times$ FAD	3	5138.0276	1712.6759	10.8790	0.0001
Error	24	3778.2954	157.4290		

ドリアを刺激する経路、紫外線が直接 DNA を損傷する経路、及び CD95 (Fas, APO-1) 受容体を介した経路の 3 つに大きく分けられる。^{8,9)} 本研究では、角膜上皮細胞において多く報告されている^{3,10)} ミトコンドリアを介したカスパーゼ依存型アポトーシスに対する FAD の効果を検討した。その結果、FAD は ROS 産生及び caspase-3/7 活性化を抑制することで、UV-B による角膜上皮細胞のアポトーシスを抑制することが明らかになった。本研究では、FAD を UV-B 照射前に処置しており、FAD の予防効果を評価している。FAD の照射後処置、すなわち治療効果についても、生存率を指標として検討したが、予防効果よりも弱い作用しか認められなかった (データ未発表)。したがって、FAD は ROS を消去することにより、結果的に caspase-3/7 の活性化を抑制するものと推測される。なお、紫外線の照射量が非常に強い条件では、角膜上皮細胞はネクローシスを起こすことが報告されている³⁾ が、今回の照射条件は、これまでに報告されているアポトーシス研究の照射条件と同程度であることから、ネクローシスはほとんど誘発されていないと考えられる。

眼表面は絶えず紫外線に晒されているので、角膜

上皮に障害が認められず、目の痛みや乾き、不快感などの自覚症状がない場合においても細胞・組織レベルではなんらかのダメージを受け、それが蓄積されていると考えられる。World Health Organization (WHO) は 2009 年に、18 歳未満の日焼けは、その後の皮膚がんや白内障の発症リスクを高めると報告している。¹¹⁾ 臨床的には、白内障患者を対象とした疫学調査において、白内障有所見率と太陽紫外線被曝に相関性があることが示唆されている。⁴⁾ さらに翼状片の発症頻度についても紫外線曝露と相関があることが報告されている。⁵⁾ 紫外線がリスクファクターである眼疾患は、その発症までに時間がかかるため、長期的に予防対策を講ずることが重要である。実際に、サングラスや帽子の着用で翼状片の発症は抑制される報告⁵⁾ があり、日常ケアの重要性は科学的にも証明されている。今回、FAD は紫外線照射した角膜上皮細胞において、ROS が関与するアポトーシスを抑制することが明らかになった。したがって、紫外線から眼表面を保護するために FAD 配合の一般用点眼薬を使用することも、日常ケアとして有用であることが期待される。また、ROS は紫外線だけでなく、乾燥や創傷など、種々の物理的ストレスによっても産生されるため、FAD は ROS が関与するドライアイやコンタクトレンズによる角膜障害などに対しても予防的作用を示す可能性が考えられる。

謝辞 FAD のサンプルを調製して頂いた参天製薬製剤分析開発センター川島嘉子氏に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Shimmura S., Suematsu M., Shimoyama M., Tsubota K., Oguchi Y., Ishimura U., *Exp. Eye Res.*, **63**, 519–526 (1996).
- 2) Čejková J., Štípek S., Crkovská J., Ardan T., Pláteník J., Čejka Č., Midelfart A., *Physiol. Res.*, **53**, 1–10 (2004).
- 3) Shimmura S., Tadano K., Tsubota K., *Curr. Eye Res.*, **28**, 85–92 (2004).
- 4) Sasaki H., *Journal of the Eye*, **26**, 17–24 (2009).
- 5) Ohira A., *Environment and Health*, **22**, 419–427 (2009).
- 6) Ohishi N., *Modern Physician*, **27**, 1198–1200 (2007).
- 7) Hirata K., *Folia Ophthalmol. Jpn.*, **27**, 15–20 (1976).
- 8) Di Girolamo N., *Curr. Pharmaceut. Des.*, **16**, 1358–1375 (2010).
- 9) Kulms D., Schwarz T., *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 837–841 (2002).
- 10) Ciuffi M., Pisanello M., Pagliai G., Raimondi L., Franchi-Micheli S., Cantore M., Mazzetti L., Failli P., *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **71**, 59–68 (2003).
- 11) World Health Organization. “Protecting children from ultraviolet radiation—archived 11 December, 2009.”: <http://www.who.int/uv/resources/archives/fs261/en>, cited 14 June, 2012.