

令和元年6月7日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11366

研究課題名(和文)皮膚の光シグナル変換機序の解明とその機能の探索

研究課題名(英文) Investigation of the light signal conversion mechanism of the skin and the function

研究代表者

榊原 俊介 (Sakakibara, Shunsuke)

神戸大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：50444592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの皮膚は他の哺乳類と異なり、大半が無毛であるため体の組織の中で最も外界の光を受容する。われわれはヒトの皮膚が光を受容した場合、その光シグナルが細胞内シグナルへと変換され、利用されるのかを調べた。これまでにわれわれはOPN4という光受容タンパク質が皮膚に発現していることを明らかとしたが、本研究ではこのOPN4を介して受容した光シグナルが細胞内シグナルへと変換された結果、1) 細胞内カルシウム濃度の上昇、2) ERK1/2のリン酸化の光量依存的亢進、3) サーカディアンリズムの形成を行うことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでヒトの体内で光シグナルを細胞内シグナルに変換する器官は網膜のみとされてきた。一方で皮膚は体表を覆い最大の組織である。この皮膚において光受容機序を明らかとした。変換されたシグナルの表現形の一つはサーカディアンリズムであるが、われわれは現在、これはいくつかの表現形のうちの一つであると考えている。ERKのリン酸化の亢進は細胞増殖シグナルとリンクしており、光照射により細胞増殖を制御できる可能性も示した。これまで創傷治癒に対して様々な波長の光線を照射することが提案されてきたが、われわれの研究成果は根拠を持って波長選択的に光照射を行うことの意義を示唆するものである。今後の医療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The human skin, unlike other mammals, is mainly hairless and therefore the most receptive to external light in body tissues. We explored whether light signals received by human skin could be converted into intracellular signals and used. Thus far, we have shown that a photoreceptor protein called OPN4 is expressed in the skin. In this study, the light signal received via OPN4 was converted into an intracellular signal, which resulted in 1) an increase in intracellular calcium concentration and 2) a dose-dependent increase in ERK 1/2 phosphorylation, 3) forms peripheral circadian rhythm.

研究分野：形成外科学

キーワード：光受容 皮膚 メラノブシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上の生命の多くは一日のうち一定の時間、外的環境を形成する一つである“光”にさらされる。特に高等脊椎動物では環境から受容した光エネルギーは網膜において細胞内シグナルへと変換され、これが高次中枢へと神経を介して伝達されることで視覚として空間の認識を行っている。

高等脊椎動物における最大の表面積をもつ器官は皮膚であり、皮膚を介して環境と固体とはシグナルの伝達を行うが、現在のところ、温度や化学物質の暴露に対する皮膚の細胞応答などが知られている。一方で、皮膚は最も光線に暴露されながらもその光情報の変換機序は紫外線暴露に反応するメラニンの産生のみが理解されており、さらにはどのように光を受容するのか、については明確に示されていなかった。とくにわれわれヒトは進化の過程で体毛を失い、皮膚は直接、光線に暴露される。われわれは網膜に発現する視物質のうち、下等脊椎動物の皮膚で発現が認められた GPCR に属する OPN4 (メラノプシン) に注目し、皮膚での発現を探った。これまでにわれわれは、OPN4 という本来網膜神経節細胞に発現し、体内リズムを作り出すとされているタンパク質が皮膚において発現している事を明らかにした。また、皮膚付属器内での発現を詳細に解析した所、外毛根鞘や脂腺、血管内皮、末梢神経においてもその発現が確認された。OPN4 は 450nm と 570nm の 2 つの波長の光に感受性をもつ 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であるが、セカンドメッセンジャーとして G タンパク質ファミリーである Gnaq と共役することが明らかとなっている。われわれは、さらに皮膚の各部位において、この OPN4 と Gnaq とが共発現していることも確認した。これは OPN4 を発現している細胞内で何らかのシグナル伝達が生じている事を間接的に示唆する。次にわれわれは、シグナル伝達の直接的根拠を検証するため、培養線維芽細胞をモデルとして酵素結合免疫測定法 (ELISA 法) により、本シグナル伝達系のさらに下流にある細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase、ERK) 1/2 のリン酸化が 450nm の光照射により促進されることも確認した。

2. 研究の目的

本研究開始時点では、ヒト皮膚の各細胞に OPN4 が発現していることを明らかとしており、また、光照射により ERK のリン酸化が亢進することを示していたが、光量と比較した定量的な評価を行なっておらず、また、他の細胞内シグナルへの変換については示していなかった。

右図に示す通り、GPCR である OPN4 (Melanopsin) は光を受容することにより MAP キナーゼ系を活性化するよりも前に細胞内カルシウム濃度を上昇させることが知られている。ただ、本現象は OPN4 が発現・機能していると考えられている神経系細胞において確認されている現象であり、系統が全く異なる皮膚の細胞において同様の機序が保存されているのかについては不明であった。そこでまず、本研究では実際に細胞に光照射を行なった場合に細胞内カルシウム濃度が上昇するのかについて検討を行うこととした。

次に、細胞内カルシウム濃度が上昇した場合、確かに光エネルギーが細胞内シグナルへと変換されていることを示すが、これがどのような表現形を持つのか、特に OPN4 は概日リズム形成に関与するとされているため、末梢性の時計を刻むのかどうか、を検証することとした。

3. 研究の方法

細胞内カルシウムの取り込みの検証

In vivo:

ヒト皮膚組織を採取 (これについては神戸大学医学倫理委員会で承認済み) し、ディスペラーゼ (in DMEM + 10% FBS) に浸漬した。表皮と真皮とを分離したのち、37℃、5% CO₂、暗条件下で 24 時間静置した。表皮は表層を上にし、ガラスボトムディッシュに接着させた。

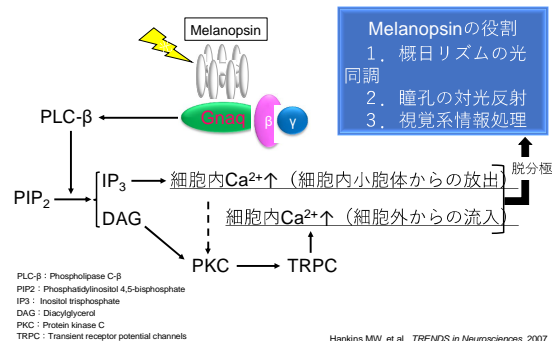
In vitro:

Fibroblast、keratinocyte、melanocyte をそれぞれ選択培地下に 5x10⁴ 細胞程度を播種した。培養を継続し、subconfluence になった時点で 24 時間の暗順応を行なった。

カルシウムイメージング

Calcium Kit II - Fluo 4 に添付されているプロトコルに従い試薬を調節した。細胞ないしは組織を血清を含まない培地下に 1 時間静置したのち、Fluo4 を含む試薬を添加した。9-cis レチナールの添加群と非添加群とにわけ実験を行なった。さらに OPN4 の選択的阻害薬である opsinamide の添加の有無、Gnaq の選択的阻害薬である YM-254890 の添加の有無で群をわけた。蛍光顕微鏡を用いて B 励起下でタイムラプス撮影を行なった。Fluo4 の検出は B 励起であること、また、OPN4 の励起波長が 480nm であることから本波長下で同時に励起と観察が行える。ま

Melanopsinからのシグナル伝達



たフィルターを挿入することで light intensity を 3.7, 4.9, 7.3, 14.3, 34.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に調整した。Image J を用いて F/F0 (F は測定値、F0 はバックグラウンド値) を測定・解析した。

光照射実験

青色光 (480nm) を発する LED 装置ないしは蛍光顕微鏡の G 励起 (488nm) を光源として用いた。細胞ないしは皮膚を暗順応したのち、これらの光源により光を照射した。カルシウムイメージングでは蛍光顕微鏡のステージ上でタイムラプス撮影を行った。また以下の ERK1/2 のリン酸化およびサーカディアンリズム実験においてはアクリル板上に培養皿を乗せ、下方より LED 装置を用いて光照射を行なった (この時、基本的には $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、10 分の照射を行なった)。

サーカディアンリズムへの影響

ヒト皮膚線維芽細胞を暗条件下に培養を行なった。a) opsinamide (OPN4 選択的阻害剤) 添加群、b) DMSO (opsinamide の溶剤) のみの添加群とにわけた。いずれの群にも 9-cis retinal を添加した。その後、両群ともに 6 時間毎に total RNA を回収した。7 日間の培養ののち、a), b) 両群ともに LED 装置を用いて 10 分間の青色光照射を行なった。さらに 6 時間毎に total RNA の回収を行った。

qPCR

PER2 および BMAL1 に対する PCR プライマーを作成し、TaqMan probe 法により定量的 PCR を行なった。本データを統計解析した。

4. 研究成果

1) 青色光照射による細胞内カルシウム取り込み

蛍光顕微鏡下に 488nm 光を照射したところ、速やかに細胞内カルシウムイオン濃度が上昇した。また、この時の細胞内カルシウム濃度のピークは 1 峰性であった。光量 (photon 数) を変化させたところ、細胞内カルシウム濃度は変化しなかったがピークまでの速度が光量依存性に早くなった。

次に OPN4 の核となる retinal を添加する群としない群とで比較したところ、retinal を添加しなかった場合、細胞内カルシウム濃度の上昇は有意差をもって低くなった。OPN4 における retinal との競合的阻害剤 (opsinamide) を添加したところ、細胞内カルシウム取り込みは抑制された。さらに OPN4 のセカンドメッセンジャーである Gq タンパク質の選択的阻害剤 (YM-254890) を添加したところ、同様にカルシウム取り込みが阻害された。以上より、青色光を線維芽細胞に照射することにより OPN4 を介した細胞内カルシウム濃度の上昇が生じることが強く示唆された。Keratinocyte や melanocyte においても同様の所見が得られた。

次に生理的条件下でのカルシウム濃度上昇を検討するため、皮膚を表皮・真皮に分離したのち、同様に青色光を照射、細胞内カルシウム濃度の検討を行なったところ、一部の細胞において細胞内カルシウム濃度の上昇を認めた。しかしながらそのフェーズは多層であった。

2) 青色光照射による ERK1/2 リン酸化の亢進

GPCR の一つである OPN4 のシグナルカスケードの一つは MAP キナーゼ系の活性化を行うことが知られている。そこで青色光を照射することにより ERK のリン酸化が活性化するのか否かについて検討を行なった。10 分間の青色光照射を行なったところ、ERK1/2 のリン酸化が亢進した。また、このリン酸化の程度は光量依存性を示した。OPN4 の選択的阻害剤である opsinamide を添加したところ、青色光照射による ERK1/2 のリン酸化は抑制された。さらに OPN4 のもう一つの感受性波長である 560nm 光 (ただしこれはこの GPCR に対して抑制的に作用する) を照射したところ、リン酸化の亢進は認めなかった。以上より、カルシウムアッセイと同様に OPN4 を介して ERK1/2 のリン酸化が行われ、光シグナルが細胞内シグナルへと変換されることが示された。

3) 青色光照射による細胞内サーカディアンリズムの形成

線維芽細胞を暗条件下に 7 日間培養したのち、コントロール実験としてデキサメタゾンを追加したところ、BMAL1 および PER2 (いずれも時計遺伝子) の発現にリズム形成を認めた。次にデキサメタゾンの代わりに青色光を 10 分間照射したところ、同様に約 23 時間周期のリズム形成を認めた。ただし、BMAL1 の発現形態はデキサメタゾンの添加により認められたフェーズとは異なるフェーズを示した。また opsinamide を添加したところ、BMAL1、PER2 のいずれも mRNA の発現レベルは有意に低下したが、フェーズが消失することはなかった。このことは、opsinamide が十分に OPN4 を抑制できなかったか、あるいは他の光受容機序も並列して存在していることを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

現在査読中

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 口腔粘膜における外的刺激受容体 (TRPV チャンネル) の発現

榊原 俊介、榊原 晶子、楠元 順培、橋川 和信、寺師 浩人

第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会
2016.9.15-16 (大阪)

2) 皮膚の光受容と創傷治療への可能性
榊原 俊介、楠元 順培、橋川 和信、寺師 浩人
第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会
2017.10.19-20 (大阪)

3) ヒト皮膚は光を受容するー第 3 報ー
楠元 順培、榊原 俊介、橋川 和信、寺師 浩人
第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会
2017.10.19-20 (大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究代表者：橋川 和信
ローマ字氏名：HASHIKAWA KAZUNOBU
研究機関名：神戸大学
部局名：医学部付属病院
職名：准教授
研究者番号：90403237

研究分担者：野村 正
ローマ字氏名：NOMURA TADASHI
研究機関名：神戸大学
部局名：医学部付属病院
職名：特命講師
研究者番号：30529566

研究分担者：高須 啓之
ローマ字氏名：TAKASU HIROYUKI
研究機関名：神戸大学
部局名：医学部付属病院
職名：特定助教
研究者番号：40566022

研究分担者：藤井 美樹
ローマ字氏名：FUJII MIKI
研究機関名：神戸大学
部局名：医学研究科
職名：医学研究員
研究者番号：80444602

研究分担者：寺師 浩人
ローマ字氏名：TERASHI HIROTO
研究機関名：神戸大学
部局名：医学部付属病院
職名：教授
研究者番号：80217421

(2) 研究協力者

該当なし

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。