

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02961

研究課題名(和文) 光による皮膚概日リズム形成の意義を探る

研究課題名(英文) Exploring the Significance of Skin Circadian Rhythm Formation by Light

研究代表者

寺師 浩人(Terashi, Hiroto)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80217421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはこれまでにヒトの皮膚に光受容タンパク質(OPN4)が発現していることを明らかとした。このOPN4は体内時計の形成に関与している。通常、末梢性circadian clockは中枢性に発信されたシグナルによりリセットされると考えられているが環境光により影響されるのか、について検討を行った。センシングシグナルを発するものとして中枢性にはコルチゾールを、末梢性には480nm光を利用した。それぞれにより刺激をおこなったのちに他方により刺激をおこなったところ、いずれの場合においてもリズムを調整することができなかった。一度形成されたリズムはしばらく記憶されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの皮膚は体内において最大の臓器であり、また、最も環境からの光を受容する。これまでに光を受容した場合におこる生理的な機能については解明されてこなかった。われわれは体内時計を司る光受容タンパク質の発現を明らかにした。皮膚が環境光を受容した場合に体内時計がリセットされるのかどうか、を探ることがこの研究の目的である。環境による応答があった場合、光による創傷治療や睡眠効果、腫瘍治療などに応用できる可能性があり、本研究の学術的意義となる。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that photoreceptor protein (OPN4) is expressed in human skin. OPN4 is involved in the formation of internal clocks. Peripheral circadian clock is usually thought to be reset by a central signal, but we investigated whether it is affected by environmental light. Cortisol was used as the central signal, and 480 nm light was used as the peripheral signal. After stimulation by each, stimulation by the other failed to adjust the rhythm in either case. It was suggested that the rhythm once formed is remembered for a while.

研究分野：形成外科学

キーワード：光受容 皮膚 メラノプシン

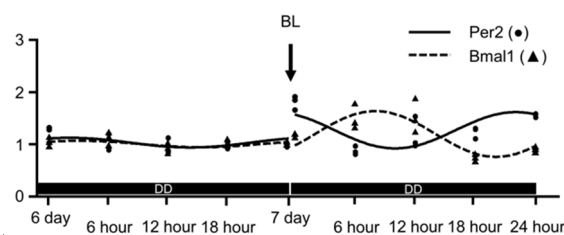
1. 研究開始当初の背景

ヒトは他の哺乳類とは異なり、皮膚の多くの部位は軟毛(いわゆる産毛)は生えるものの光を遮ることはできない。したがってヒト皮膚は生活の中で多くの光線に暴露している。過去の研究では膝窩に光を照射することで体内リズムがリセットされた(Campbell et al. 1998, Nature)ことが報告されたが、のちに否定された。その後も皮膚に光を照射することで創傷治癒や発毛の促進などの現象についてはいくつかの報告がなされたが、アウトプットのみが報告されており、光受容メカニズムについては一切の言及がなく、科学的根拠に乏しいものとされてきた。われわれの研究チームでは生物進化に着目し、下等脊椎動物の皮膚(特に色素胞)で理解されている光受容機序がヒト皮膚にも存在すると仮説を立て研究を展開した。

これまでに、われわれが皮膚での発現と機能を示してきた OPN4 は、従来、中枢神経細胞に発現し、外界の明暗を視交叉上核(SCN)に伝え、体内時計(circadian clock)を形成することがその主な役割とされている。そこで、新たに「皮膚は OPN4 を介して circadian clock に関与するのか?」という「問い」を持った。皮膚の細胞はこれまでに circadian clock を形成することが示されている。特に日中は UVB に暴露されることが多く、この時間帯に細部分裂を S 期にセッティングすると DNA の損傷を受けてしまうため、皮膚は circadian clock に同調して S 期を夜間にセッティングしている(Geyfman et al. 2012, PNAS)。これは、大気中の酸素濃度が低かった古代に生命が紫外線からの傷害を回避するメカニズムの名残であるとされている。また、毛髪の成長サイクルを変化させ(Plikus et al. 2013, PNAS)、ヒト以外の脊椎動物においては季節性の毛の生え変わり(Al-Nuaimi et al. 2014, JID)などに関与していることが示されている。皮膚を含む全身の各臓器の circadian clock は中枢性に SCN により分泌されるステロイドホルモンにより支配されるとされており(Balsalobre et al. 2000, Science)、皮膚から単離培養された線維芽細胞の circadian clock はデキサメタゾンでリセットされること、SCN を破壊した動物では皮膚の circadian rhythm が乱れること(Tanioka et al. 2009, JID)などから皮膚の circadian clock は中枢性に支配されるとされている。一方で、Geyfman らは皮膚が独自に circadian clock を形成する可能性について示唆している(Geyfman et al. 2012, PNAS, Plikus et al. 2013, PNAS, Al-Nuaimi et al. 2014, JID)。皮膚の circadian clock が中枢性に支配されているのか、あるいは独自の clock を刻むのか、現時点では論争の最中であるが、後者は circadian rhythm の形成を行える日常の環境に含まれる外的因子の特定に至っておらず、実験的根拠を示すことができなかった。われわれはこれまでに予備実験として、ヒト皮膚線維芽細胞に対して 480nm の青色光(OPN4 の感受性波長)を照射することにより circadian clock がリセットされることを示した。

2. 研究の目的

われわれはこれまで、皮膚に光受容タンパク質(OPN4)が発現していること、皮膚は OPN4 を介して 480nm 光を受容し細胞内シグナルへと変換すること、その結果、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼである ERK のリン酸化が亢進されること、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することを見出した。また、皮膚由来培養線維芽細胞の circadian clock は 480nm 光によりリセットされることを示した(右図:7日間の暗条件下での培養のち、480nm 光を 10 分照射、その後の時計遺伝子の発現量の定量解析を行った。その結果、リズム形成が認められた。)



本研究課題では、皮膚線維芽細胞の circadian clock の形成(いわゆる末梢性 clock)が中枢神経により支配されるのか、あるいは環境において支配されるのか、それともいずれによっても適宜支配されるのか、について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

予備実験では qPCR により時計遺伝子の mRNA の発現解析を行なった。本研究課題においてはルシフェラーゼを用いたリアルタイムレポーターアッセイにより、さらに精細に時計遺伝子の発現解析を行うこととした。

Mouse Bmal1 プロモーターとレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドベクターの構築

研究開始当初、human Bmal1 promoter を組み込んだプラスミドベクターを入手し、これをヒト線維芽細胞に導入し、リアルタイムレポーターアッセイを行なったが、発光量が小さく、また、luciferase の減衰時間が長かったため、リズム形成を観察することができなかった。そこで、mouse Bmal1 promoter および short life time 型の luciferase を組み込んだプラスミドベクターを構築した。

リアルタイムレポーターアッセイ

で構築されたプラスミドベクターを 35mm の培養皿に培養したヒト皮膚線維芽細胞に transfection 試薬を用いて導入した。

導入直後より完全に光を遮断し、細胞を暗順応させた (2 日間)。

暗室内において赤色光下に実験操作を行なった。

下記各群において luciferin を添加したのち、Kronos Dio (Atto 社) を用いて 5 日間の計測を行なった。

< 第 1 群：ネガティブコントロール 1 >

プラスミドベクターを挿入せず、2 日間の暗順応のみを行い、その後、発光量を測定した。

< 第 2 群：ネガティブコントロール 2 >

プラスミドベクターを挿入・2 日間の暗順応ののち、暗条件下に培養皿を Kronos Dio に移し 5 日間、発光量を測定した。

< 第 3 群：光照射群 >

プラスミドベクターを挿入・2 日間の暗順応ののち、5 分間、480nm 光を照射したのち培養皿を Kronos Dio に移し 5 日間、発光量を測定した。

< 第 4 群：ステロイド添加群 >

プラスミドベクターを挿入・2 日間の暗順応ののち、30 分から 2 時間、デキサメタゾンに暴露させたのち培養皿を Kronos Dio に移し 5 日間、発光量を測定した。

< 第 5 群：光照射 デキサメタゾン添加群 >

第 3 群と同様に測定を開始したのち、11-13 時間後にデキサメタゾンを添加し、さらに測定を継続した。

< 第 6 群：デキサメタゾン添加 光照射群 >

第 4 群と同様に測定を開始したのち、11-13 時間後に 5 分間の光照射を行い、さらに測定を継続した。

4. 研究成果

< 第 1 群：ネガティブコントロール 1 >

図 1 に示すように、発光を認めなかった。

< 第 2 群：ネガティブコントロール 2 >

第 1 群に比して微弱ながらも発光を認めたものの、リズム形成を認めなかった (図 2)。

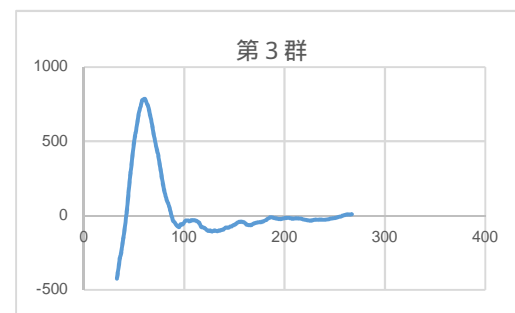
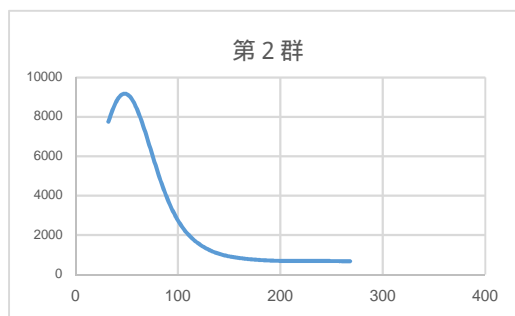
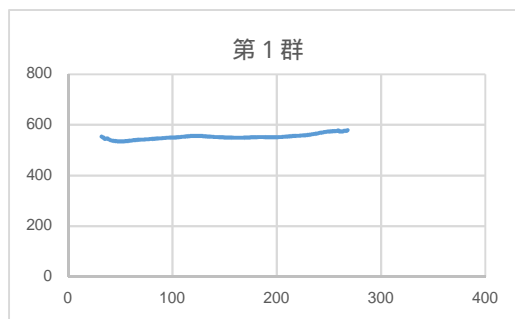
< 第 3, 4 群 >

われわれの行なった検討では、発光量はやや低値に推移したが、3, 4 群のいずれにおいても 22-25 時間の周期で circadian rhythm が認められた。ただし、発光量については、青色光の照射よりもデキサメタゾンを投与した群の方が強い傾向が見られた (図 3, 4)。

< 第 5, 6 群 >

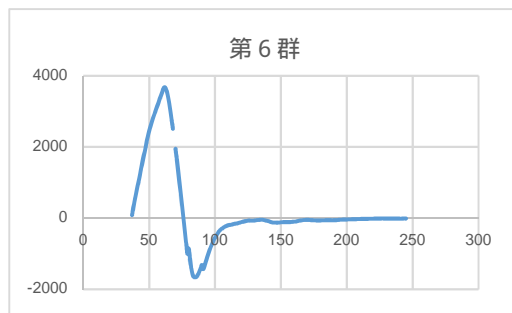
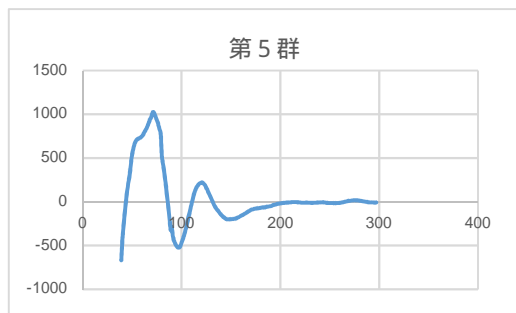
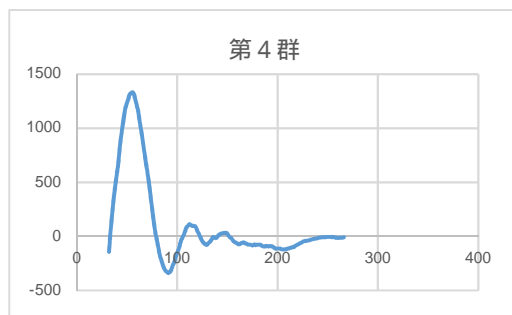
第 3, 4 群において機器にセッティング後、発光量は徐々に増加し、約 13 時間でピークを迎えることが明らかとなった。つまり、光照射およびステロイド処理により Bmal1 の発現量がまずは上昇に転じ、その後、リズムの形成を行う。このことは mRNA をもとに測定した予備実験と同様の結果であった。次に光照射によりリズム形成を開始したのち 13 時間において (つまりは発現量が下降に転じたのち) ステロイドの添加を行なった。また、第 6 群では、デキサメタゾンの添加により同様に発光量の増加から下降に転じた時点で光照射を行なった。いずれか (デキサメタゾンないしは青色光) により形成されたリズムがいずれかによって修正される場合、一旦下降に転じた Bmal1 の発現量は再度上昇に転じることが予測されたが、実際には下降を維持した結果となった。さらに、下降曲線はやや急峻となった。

これらの結果から、一旦、中枢性ないしは末梢性に形成された circadian rhythm はおよそ記憶されており、



二次的な刺激による修正が困難であることが示唆された。ただし、若干の phase shift が認められた。

本研究においては二次刺激のタイミングは13時間後に設定したが、リズム形成が経時的に弱くなることから、さらに細かく二次刺激の時間を調整しながら検討を行うことで、さらにリズム形成への影響について理解できる可能性がある。また、リズム形成に影響を及ぼし始める時間(日数)について知ることで、circadian clock のメモリー機能について知見が得られる可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kusumoto Junya, Takeo Makoto, Hashikawa Kazunobu, Komori Takahide, Tsuji Takashi, Terashi Hiroto, Sakakibara Shunsuke	4. 巻 25
2. 論文標題 OPN4 belongs to the photosensitive system of the human skin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 215 ~ 225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野村 正 (Nomura Tadashi) (30529566)	神戸大学・医学部附属病院・准教授 (14501)	
研究分担者	榊原 俊介 (Sakakibara Shunsuke) (50444592)	神戸大学・医学研究科・特命講師 (14501)	
研究分担者	橋川 和信 (Hashikawa Kazunobu) (90403237)	名古屋大学・医学部附属病院・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------