

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05829

研究課題名(和文)非視覚組織の皮膚への光線曝露が調節する神経ペプチドの活性化機構の解明

研究課題名(英文)Activation of neuropeptides in skin after light-exposure

研究代表者

山本 博之(Yamamoto, Hiroyuki)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10433210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「非視覚組織である皮膚由来の細胞が光をどのように認識し、生理活性ペプチドの産生を調節しているのかを明らかにすること」を目的に実施してきた。その結果、皮膚の細胞において、眼の網膜と同様の光を受け取る受容体のオプシン類が発現していることやオプシンが活性を維持する仕組みが眼と同様に皮膚組織も持つことを明らかにした。さらに、光の曝露によって生成するペプチドのうち、活性を有すると予想される候補ペプチドを見出した。これらの結果は、非視覚組織である皮膚も眼と同様に光によって応答する仕組みが存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚は最も外界に位置する器官であり、様々な物理的な刺激を受けている。特に、光線の曝露は生活する上で避けることができないものであり、皮膚は浴びた光線の波長によってさまざまな応答を取っている。本研究で得られた成果は、非視覚組織が光の波長を認識する仕組みの一端を明らかにしたものであり、光線の曝露によって起きる生体応答の予測を可能にするものと考えられる。近年、光を利用して美容や医療での施術が行なわれているが、本研究成果を基盤として、より安全で高い治療効果を持った光線治療への応用を目指している。

研究成果の概要(英文)：The skin reacts differently depending on the wavelength of light irradiated. Our purpose of this study is “clarify how cells derived from skin, a non-visual tissue, recognize light and regulate the production of bioactive peptides”. In this study, we found that opsins, which are light receptors, are expressed in skin cells and that skin tissue have a mechanism to maintain their activity. These results indicate that skin, a non-visual tissue, also has a mechanism that responds to light in the same way as the eye.

研究分野：光生物学

キーワード：レチナル代謝 光応答反応 光受容体 オピオイドペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚は最も外界に位置する器官であり、様々な物理的な刺激を受けている。特に、光線の曝露は生活する上で避けることができないものであり、皮膚は浴びた光線の波長によってさまざまな応答を取っている。非視覚組織である皮膚において、ペプチドの産生やセラミド合成、メラニン産生などの細胞応答が波長によって異なることが古くから報告されている。近年、光線の生体応答を利用した医療や美容分野での応用が進められている。これらの光線の利用には、局所に高いエネルギーを照射できる紫外光や生体の深部まで到達可能な近赤外光が多く利用されている。このように細胞が光線の曝露を受けて細胞応答が起きるためには、光線刺激により細胞内で何かしらのシグナル応答が起きていることが考えられるが、皮膚における光応答の仕組みは不明な点が多く残っている。

## 2. 研究の目的

皮膚に発現する生理活性ペプチドの探索の過程で、紫外領域から青色領域の短波長の「光線の曝露刺激が複数の生理活性ペプチド前駆体の産生・分泌を亢進すること」や「光線の曝露により放出されたプロテアーゼによって、生理活性ペプチド前駆体が切断されて活性化すること」を明らかにしている。しかしながら、光線曝露から生理活性ペプチドが産生・分泌される機序や活性化に関わるプロテアーゼの発現機序に関わる細胞内のシグナル応答がどのようになっているのかは明らかになっていない。

私たちはこれまでに皮膚に対する光線の曝露によって生理活性ペプチドの前駆体の産生が亢進し、産生されたペプチド前駆体はプロテアーゼによって細胞外で活性化される新しい活性化機構を報告してきた。また、特に角化細胞は多くの生理活性ペプチドを発現することを明らかにしている。そこで本研究では、角化細胞や肥満細胞に光線を曝露することによって発現する生理活性ペプチドやプロテアーゼがどのように発現調節されているのかを明らかにすることを目的とした。また、皮膚由来の非視覚細胞が可視光線を感じて細胞内シグナルに変換される仕組みを探索する過程で、皮膚由来細胞に光受容体であるオプシンが発現することを見出した。一方、オプシンの活性の維持には光線曝露後にトランス体となったトランスレチナールをシスレチナールに変換する視サイクルが必要である。そこで、皮膚において視サイクルと同様にトランスレチナールがシスレチナールに変換する代謝機構が存在するかを検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) レチナール代謝

ラットの皮膚組織や角化細胞より total RNA を抽出し、レチナール代謝に関わる酵素 (RDH8、RDH12、RDH11、LRAT および RPE65) の mRNA 発現を RT-PCR 法により検出した。また、光線曝露後の角化細胞からレチナール代謝産物を経時的に回収し、角化細胞内のレチナール代謝産物を逆相カラム高速液体クロマトグラフィにより分離・検出することで、光線曝露後のレチナール代謝機構を評価した。

### (2) 新規ペプチドフラグメントの探索

角化細胞および肥満細胞培養細胞を共培養しているシャーレに UVB を照射した。照射後 48 時間培養した後、培養上清を回収した。回収した培養上清を抗  $\beta$ -エンドルフィン抗体を用いた免疫沈降によりアフィニティ精製を行った。回収した試料は MALDI-TOF 質量分析により  $\beta$ -エンドルフィン関連ペプチドの検出および構造解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) レチナール代謝

皮膚組織や角化細胞に発現する光受容体が活性を維持するためには、光線曝露後にトランス体となったトランスレチナールが再びシスレチナールに変換される必要がある。そこで、シスレチナールへの返還に関わる酵素が皮膚組織に発現しているかを RT-PCR 法にて検討した。その結果、ラットの皮膚組織において眼組織と同様にシスレチナールへの変換に関わる酵素の RDH8、RDH12、RDH11、LRAT および RPE65 mRNA の発現が認められた。この結果は光の曝露により光受容体から遊離したトランスレチナールがトランスレチナール、11-シスレチナールを介して 11-シスレチナールに変換されるのに必要なすべての酵素が発現していることを示している。また、視サイクルに関わる酵素の発現が週齢やラットの系統により違いがあるのかについても検討を行ったところ、SD ラットおよび弘前小眼球ラットのいずれの系統においても、視サイクルに関わる酵素の発現は認められた。また、酵素の発現は 1 週令から 4 週令にかけて大きな変化は認められなかった。さらに、トランスレチナールを 11-シスレチナールに変換する RPE65 タンパク質の発現をウエスタンブロット法にて検出した。その結果、ラット皮膚においても眼組織と同様に RPE65 が発現していることが示された。

つぎに、角化細胞が光線の曝露を受けたときに、細胞に発現する光受容体が活性化されている

のか、また、光受容体の活性が維持されるためにレチナール関連分子が代謝を受けているのかを明らかにするために、光線曝露後のレチナール代謝産物の経時変化を解析した。その結果、光線の曝露によって、トランスレチナールが検出されたのち、トランスレチノール、11-シスレチナールへと順に変換されていることが示された。

## (2) 新規生理活性ペプチドの探索

角化細胞と肥満細胞の共培養系に紫外線で曝露した培養上清から活性ペプチドを単離するために、抗  $\beta$ -エンドルフィン抗体により免疫沈降法により精製した後、MALDI-TOF 質量分析により、その構造を解析した。その結果、 $\beta$ -エンドルフィンの N 端断片が検出された。また、その配列にはメチオニン-エンケファリンと共通する配列を有していた。単離されたペプチド断片は、 $\beta$ -エンドルフィンやメチオニン-エンケファリンと同様に、オピオイド受容体と結合して作用することが予想された。また、私たちはこれまでにアトピーモデルマウスにおいて  $\beta$ -エンドルフィンがアトピー様症状を改善することを報告している (Dermatol Aspect, 2013)。これらのことから、紫外線により産生された新規オピオイド様ペプチドもアトピー様症状に対して影響を及ぼしていることが示唆された。しかしながら、今回単離されたペプチド断片とオピオイド受容体との結合活性は不明であることから、今後、新規ペプチド断片のオピオイド受容体に対する親和性を明らかにすることにより、皮膚における新たな生理作用を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Hiroyuki, Yamaguchi Haruko, Yamada Toshiyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Vinculin Migrates to the Cell Membrane of Melanocytes After UVB Irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 126 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.3.4_126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Hiroyuki, Tanaka Chiho, Okada Momo, Sawaguchi Yoshikazu, Yamada Toshiyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Membrane translocation of vinculin after UVA exposure facilitates melanosome trafficking	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 293 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2022.01075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本博之、山口陽子、山田俊幸
2. 発表標題 紫外線曝露後のピンキュリンの細胞膜移行とメラノソーム輸送への関与
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本博之、山口陽子、山田俊幸
2. 発表標題 メラノサイトに発現するピンキュリンの膜移行とメラニン放出
3. 学会等名 第43回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角化細胞に発現する光受容体発現と光応答反応
2. 発表標題 山本 博之、小野原 葵、安藤 沙樹、山田 俊幸
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 博之、鹿村 知令、板橋 美奈、山田 俊幸
2. 発表標題 光線曝露による線維芽細胞のトリプシン-2発現亢進
3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Yamamoto, Kazuaki Iguchi, Kiyotaka Tanaka, Arunasiri Iddamal goda
2. 発表標題 Activation mechanism of $\alpha$ -MSH(1-8) after UVB-irradiation
3. 学会等名 The 31st IFSCC Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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	山田 俊幸  (Yamada Toshiyuki)  (20183981)	日本薬科大学・薬学部・教授    (32425)	

6. 研究組織（つづき）

	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	澤口 能一  (Sawaguchi Yoshikazu)  (20735477)	桐蔭横浜大学・医用工学部・講師     (32717)	

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