

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08697

研究課題名（和文）細胞外セラミド受容体によるカスパーゼ14発現上昇を介した皮膚保湿能向上機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the skin moisturizing ability mechanism by caspase-14 expression with extracellular ceramide receptor

研究代表者

長原 礼宗（Nagahara, Yukitoshi）

東京電機大学・理工学部・教授

研究者番号：80385484

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本申請課題では、細胞外セラミドによる新規な皮膚細胞でのシグナル伝達機構を明らかにした。まず、細胞外に分泌されて存在するC22セラミドは、細胞外セラミド受容体の1つ、CD300bの発現を上昇させることを示した。また、C22セラミドはCD300bを介して細胞内のリン酸化酵素である、SykとAktを活性化させた。C22セラミドのような細胞外セラミドは、CD300bを介し、細胞内シグナル伝達の結果、皮膚保湿に関与していることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、細胞外セラミドが皮膚においてこれまで知られていない、受容体を介して細胞内に作用するしくみを解明した点に学術的意義が存在する。今後、CD300bを介した経路の解明により、皮膚細胞の細胞内シグナル伝達機構が保湿に及ぼす影響の解明が進むと考えられる。

また、一般的に長鎖セラミドは短鎖セラミドとは違い、低毒性であるので、長鎖セラミドによりカスパーゼ14を発現上昇させることができれば、化粧品としての利用を始め、皮膚保湿機構の破綻によって生じるアトピー性皮膚炎や乾癬などの皮膚疾患の治療剤へと応用展開できる。これが本研究成果の社会的な意義である。

研究成果の概要（英文）：In this application proposal, we revealed a novel keratinocyte signaling mechanism by extracellular ceramide. First, we showed that C22 ceramide, which is secreted extracellularly, upregulates the expression of CD300b, one of the extracellular ceramide receptors. C22 ceramide also activated the intracellular phosphatases Syk and Akt via CD300b. Thus, it is clear that extracellular ceramides such as C22 ceramide are involved in skin moisturization as a result of intracellular signaling via CD300b.

研究分野：生化学

キーワード：CD300b 細胞外セラミド カスパーゼ14 皮膚保湿

1. 研究開始当初の背景

(1) セラミドは、細胞増殖・分化・アポトーシスといった生体制御に重要な役割を果たす脂質の一種であり、スフィンゴシン骨格にアシル基がさまざまな長さで結合した構造を有する。アシル基が短鎖のセラミドは細胞膜を透過することができ、細胞内シグナル伝達機構を直接刺激する。しかし、細胞外に分泌されて存在する長鎖セラミドは、細胞膜を透過しないため、細胞機能には影響を与えず、細胞間脂質として細胞間の隙間を埋め、バリア機能の維持のみに関与すると考えられてきた。

(2) ところが近年になり、長鎖セラミドを白血球に作用させたところ、接着因子 CD300 受容体ファミリーの 1 つ、CD300f と結合し、白血球の機能を抑制することが報告された。このことは、これまで考えられなかった、細胞外セラミドが受容体を介して細胞膜を隔てて細胞内にシグナルを伝達できうることを示すものである。そこで我々はこれまでに、長鎖セラミドを皮膚細胞に作用させたところ、細胞内天然保湿因子(NMF)生成の元となるフィラグリンの分解酵素、カスパーゼ 14 の発現上昇を引き起こすことを明らかにした。このことは、長鎖セラミドが皮膚細胞でも細胞内へとシグナルを伝達できることを示唆している。

(3) しかし、細胞膜を通過できない長鎖セラミドが、なぜ細胞内の保湿成分生成酵素のカスパーゼ 14 を発現上昇させるのか不明であること、また長鎖セラミドが結合する細胞膜上受容体が、果たして皮膚細胞上に存在し、そしてその下流のシグナル伝達機構が明らかになっていない。

2. 研究の目的

上記背景から、細胞外セラミドの受容体を介した細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることで、本研究により最適化された細胞外セラミド構造による皮膚保湿応用へと発展することを目的とした。まず、皮膚細胞にてカスパーゼ 14 発現に適した細胞外セラミド構造を特定した。そして、細胞外セラミドを作用させることで、発現上昇する CD300 受容体を特定し、ヒト皮膚細胞における CD300 受容体の発現を確認する。最後に、細胞外セラミドによる CD300 受容体を介したカスパーゼ 14 発現上昇機構を解明した。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞株の培養

本研究にはヒト角化細胞 HaCaT をモデル細胞として用いた。細胞は 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で培養し、対数増殖期の細胞を実験に供した。

(2) RT-PCR 法による CD300 ファミリーの mRNA 発現レベル解析

HaCaT 細胞から RNA を抽出し、逆転写反応(RT)による cDNA 合成を行った。cDNA を鋳型とし、Polymerase chain reaction (PCR)反応で DNA を増幅、アガロースゲル電気泳動法にて CD300 ファミリー遺伝子の発現を検出した。

(3) ウェスタンブロッティング法によるタンパク質の解析

HaCaT 細胞よりタンパク質を可溶化した。可溶化液中のタンパク質濃度は BCA 法を用いて測定し、各サンプルを一定濃度のタンパク質に調整後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、PVDF 膜に転写した。一次抗体としてカスパーゼ 14、CD300b、リン酸化(p-) Syk、Syk、p-Akt、Akt、また対照として GAPDH に結合する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、化学発光法にてそれぞれのタンパク質バンドを検出した。

4. 研究成果

(1) 細胞外セラミドによるカスパーゼ 14 の発現上昇

まず、本研究ではどのような細胞外セラミドがカスパーゼ-14 の発現上昇を引き起こすかどうかを検討した。角化細胞のモデルとして、ヒト角化細胞株 HaCaT を用いた。

種々の細胞外セラミドについて MTT 法による細胞生存率の測定を行い、HaCaT 細胞にほとんど細胞傷害性を与えないことがない作用濃度を検討した。

次に、細胞傷害性が全く起こらない、数 μM の濃度で細胞外セラミドを HaCaT 細胞に 48 時間作用させ、カスパーゼ 14 の発現を検討した。その結果、C22 セラミドによりカスパーゼ 14 のタンパク質発現が上昇した。この結果、C22 セラミドはカスパーゼ 14 の発現を増強させることを明らかにした。

(2) 細胞外セラミド受容体の探索

HaCaT 細胞に存在する細胞外セラミド受容体を探索するため、これまで細胞外セラミドを含む脂質と結合する報告がある接着因子、CD300 受容体ファミリーの mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。その結果、CD300b の発現が HaCaT では多く発現しており、これまで白血球上に存在し、細胞外セラミドと結合すると報告された CD300f の発現は低いことが明らかになった。また、HaCaT に C22 セラミドを作用させたところ、CD300b のタンパク質発現が顕著に増加した(図 1)。この結果、C22 セラミドは CD300b の発現を増加させることで、下流のシグナルを増強させることが示唆された。

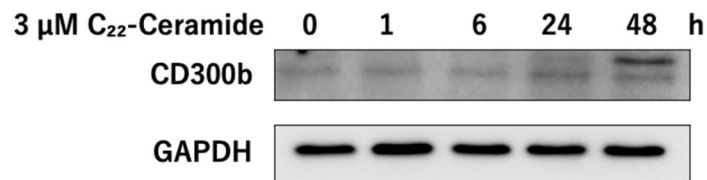


図 1. HaCaT 細胞における C22 セラミド作用による CD300b の発現変動

(3)C22 セラミドによる CD300b を介した細胞内シグナル伝達機構

C22 セラミドによる角化細胞の細胞内シグナル伝達機構について検討した。HaCaT に C22 セラミドを作用させたところ、CD300b の下流キナーゼである p-Syk, p-Akt のレベルが上昇した。また、Syk 阻害剤 R406 により、C22 セラミドによる p-Syk と p-Akt 量が減少した。よって、C22 セラミドは CD300b 下流のシグナリングに関与していることが明らかとなった(図 2)。

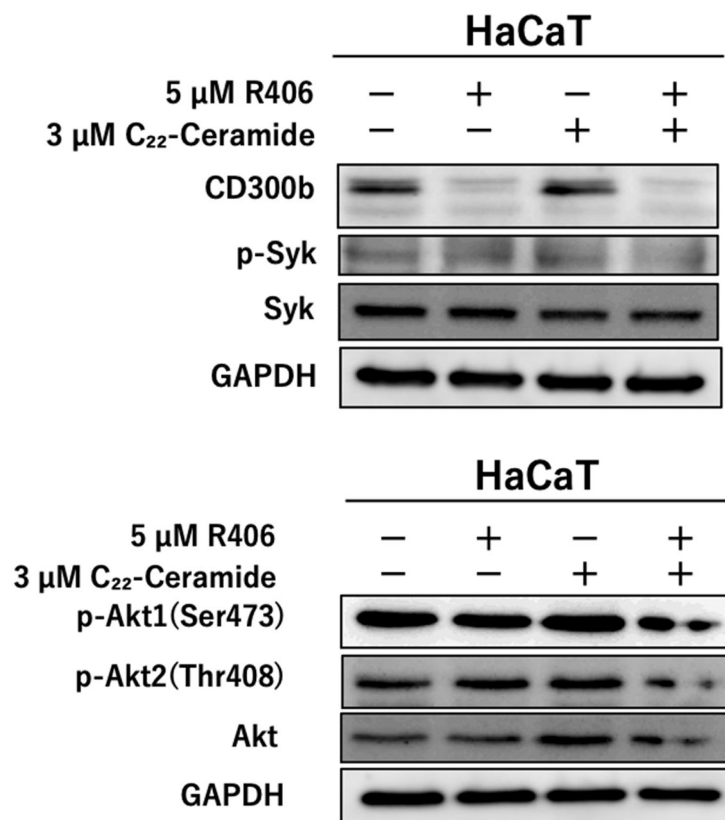


図 2. p-Syk, p-Akt の C22 セラミドによるレベル上昇

以上の結果より、C22 セラミドのような細胞外セラミドは、CD300b の発現上昇を介した刺激授受によって、下流の Syk や Akt のシグナルを介したカスパーゼ 14 を発現上昇させる。そして、カスパーゼ 14 の基質であるフィラグリンを分解することで、皮膚保湿機能を上昇させるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山 莉那, 高橋 俊介, 四宮 貴久, 長原 礼宗
2. 発表標題 HaCaT細胞における長鎖セラミド作用時のCD300b受容体を介した細胞内シグナル伝達機構
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

・Bio Japan 2021プレゼンテーション, 2021年（パシフィコ横浜） ・研究室ホームページ（ https://www.b.dendai.ac.jp/~biochem/ ）

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------