

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08359

研究課題名(和文)エキシマレーザーの色素細胞活性化機序の解明

研究課題名(英文)Study for the effect of excimer laser on melanocyte activation

研究代表者

船坂 陽子 (Funasaka, Yoko)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：30209150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL6/Jマウスへのエキシマレーザー照射ではライトと異なり毛包下部にまでCPDが見られ、活性化したメラノサイトが見られた。不死化ヒトケラチノサイトHaCaT細胞への照射では、エキシマレーザーでは、ライトと同じ照射量ではCPDの形成が少なく、またcaspase活性の上昇が低かった。microarrayで遺伝子発現を解析したところ、エキシマライトではエキシマレーザーよりもapoptosisに関わるTNF- $\alpha$ 系の遺伝子発現がより強く誘導され、さらにエキシマレーザーではエキシマライトに比べ、DNA損傷修復遺伝子の発現低下が少なく、CPDの修復がより強力に働くことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同じ308nmの波長の光でありながら、エキシマレーザーとエキシマライトは異なる生物学的作用を有することがわかり、白斑に対する色素再生の優位性のメカニズムが毛包深部に効率よく到達することができるためであることを明らかにした。一方でDNA損傷修復遺伝子の発現低下はエキシマレーザーの方が少なく、皮膚深部にまで到達するものの皮膚癌誘発においてはより安全な光であることが判明し、光治療を行う上での重要な結果を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Irradiation by excimer laser on C57BL/6J mouse induced more CPD formation in the lower portion of hair follicle compared with that by excimer light. Irradiation on HaCaT cells induced less CPD formation and less activation of caspase in case of excimer laser. Microarray analysis showed that excimer laser irradiation induced less apoptosis-related gene sets. Excimer light suppressed the expression of DNA repair related genes, however excimer laser suppressed that of these genes at a less degree, which indicates that excimer laser might repair CPDs more efficiently compared with excimer light.

研究分野：皮膚科学

キーワード：エキシマレーザー エキシマライト DNA損傷 損傷DNA修復 メラノサイト アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

光生物学的分野では、1) 光生物反応は照射量に依存し、2) 照射量が同一であれば、紫外線の強度 (irradiance, 照射率、輝度) や照射時間とは無関係である、との reciprocity law (相反則) に基づくとされる。これは、UVB 照射によるヒトでの紅斑反応が、照射量が一定であれば高照射率の 1 秒間照射も低照射率の 1 時間照射も同程度であったことが観察されたことによる (Meanwell EF et al. Photo Dermatol 6:146, 1989)。すなわち、光生物反応は波長と照射量が同じであれば、同等の効果をきたすとされている。しかしながら、近年エキシマライト (波長 308 nm) よりもエキシマレーザー (波長 308 nm) の方が、尋常性白斑の色素再生に効果的である事が報告されている。我々もエキシマライトにて難治であった尋常性白斑患者に対し、エキシマレーザー治療を施行したところ、色素再生が有意に改善していることを観察している。

従来光生物学分野では、照射率の差が 100 倍未満の光を用いて比較検討がなされてきた。今回検討するエキシマレーザーは単一波長で位相が一致し、光の方向性が一方向性で、パルス発振であり、1 パルスの輝度 (照射強度、照射率) は約 8300 万 mW/cm<sup>2</sup> で、エキシマライトの約 50 万倍となり、従来 reciprocity law (相反則) にて検討されてきた照射強度とは明らかに異なるスケールである。また皮膚に対するレーザーの反応としては、主に選択的に細胞もしくは構造物を熱変性により破壊する事に関しての研究がなされてきた。すなわちヘモグロビンではなくメラニンにより吸収される波長を用いた Q スイッチルビーレーザー (694 nm) および Q スイッチアレキサンドライトレーザー (755 nm)、Q スイッチ Nd:YAG レーザー (1064 nm) により ns のパルス幅 (照射時間) にてメラノソームが選択的に熱変性を起こす事、そして照射量をあげることにより、メラノソーム含有細胞を選択的に壊死に導くことが検証されてきた。今回我々が用いるエキシマレーザーは波長 308nm で最大のクロモフォアは DNA であるが、ルビーレーザーやアレキサンドライトよりも高率にメラニンに吸収される波長である。パルス幅は 2.5ms で熱伝導は DNA やメラノソームに留まらず、表皮の厚さおよび毛包の構築物に熱拡散が見込まれるレーザーである。

エキシマレーザーを用いてエキシマライトとの比較で、DNA 損傷細胞の存在から光の深達度を、そして毛包のメラノサイト並びにメラノプラスト、およびメラノサイトの幹細胞の活性化機序について明らかにすることにより、表皮毛包ユニットにおけるメラノサイトの制御機構が明らかにされることが期待できる。

## 2. 研究の目的

ブロードバンド UVB の生物学的作用については、クロモフォアとして DNA の損傷をきたす以外に、細胞膜に存在する EGF receptor の dimerization, すなわち ligand である EGF の非存在化に EGF receptor が活性化されて下流のシグナル伝達が活性化されること、細胞膜やミトコンドリアに作用して酸化ストレスを誘導すること、これらを trigger として各種サイトカインの産生および分泌・放出が生じ、紅斑反応や色素沈着が生じること、外毛根鞘のメラノサイトが表皮に遊送してくること、細胞アポトーシスが生じることについての分子生物学的機序が明らかにされている。我々はこれらブロードバンド UVB で報告されている紫外線の生物学的作用について、エキシマライトならびにエキシマレーザーを用いて、特に DNA の損傷、細胞アポトーシスの誘導状況、メラノサイト (メラノプラスト並びにメラノサイト幹細胞) の活性化機序に的を絞って明らかにすることを目的としている。

現在行っているマウスを用いた実験結果からは、同じ波長のエキシマライトと比べ、エキシマレーザーでは、同じフルエンス(照射量)の照射にて毛包下部にまでその光の作用が影響を及ぼしていることを、CPD(cyclobutene pyrimidine dimer)の抗体を用いた組織染色により明らかにしている。そして、エキシマレーザーではエキシマライトに比べて表皮のCPD形成量が少なく、表皮細胞のアポトーシスが少なくも観察している。

光は反射、散乱、吸収のいずれかの過程をとることが知られているが、ブロードバンドUVBでは皮膚に対するこれら光生物学的機序として、反射は角層で、散乱はメラノソームや膠原線維にて、吸収は表皮上層ではtrans型ウロカニン酸、DNA、メラニン色素と考えられている。一方、レーザーの物理的理論では、レーザーとライトの違いは、レーザーでは方向が一致しているために、拡散・減衰がなく、光の強さが変わらないことが言われている。したがって我々のpreliminaryな結果はこのレーザーの物理的理論に則った結果であると推察している。

このように表皮と同等に毛包への作用が見込める紫外線B域の光を高い輝度で照射して毛包細胞への作用機序を解明していくことについては、いまだ論文としての報告はなされていない。

### 3. 研究の方法

#### 1. C57BL6/Jマウスにエキシマレーザーおよびエキシマライトを照射し、光到達度とその作用範囲、シグナル活性化機序について明らかにする

上記マウスを用いて、光到達度についてはDNA損傷マーカーであるCPDの抗体を用いた組織染色、細胞障害についてはTUNEL染色によるアポトーシスの状況、メラノサイト活性化についてはメラノblastおよびメラノサイト幹細胞の時点で発現するTRP-2抗体を用いて解析する。CPDとTUNEL染色は定量評価が必要なので、Image Jにて解析評価する。メラノサイトの幹細胞の同定にはTRP-2に加え、幹細胞マーカーである-cateninのダブル染色にて同定する。

#### 2. 培養細胞HaCaT(不死化ヒトケラチノサイト)にエキシマレーザー、エキシマライトを照射し、CPDおよびcaspase3のELISAによる定量評価

培養細胞にて1と同様の反応がみられるのかを定量的に評価する。

#### 3. 培養細胞HaCaT細胞にエキシマレーザー、エキシマライトを照射し、microarray, real time PCRにてサイトカイン、niche、メラノサイト活性化に関わる遺伝子発現のprofileを明らかにする

2の結果を踏まえて、エキシマレーザーが毛包細胞に作用した結果メラノサイト/メラノblast/メラノサイト幹細胞が活性化するのに関わる遺伝子発現のprofileを得る。

### 4. 研究成果

1. C57BL6/Jマウスにエキシマライト及びエキシマレーザーを照射し、経時的に組織を採取し、抗CPD抗体、TRP-2抗体、-catenin抗体を用いた免疫組織染色を施行、またTUNEL染色を施行し、エキシマレーザーでは毛包下部にまでCPDが見られ、また活性化したメラノサイトが見られることが判明した。すなわちエキシマレーザーは毛包深部にまで到達し、その光作用によりメラノサイトをより活性化する力が強いことが判明した。一方TUNEL染色では表皮ケラチノサイトのapoptosisはエキシマライトで顕著に見られ、表皮への作用が強く、また表皮細胞に吸収されるために毛包深部に到達できない可能性が示唆された。

2. 次に不死化ヒトケラチノサイトであるHaCaT細胞にこれら光を照射し、ELISA法にてCPD及びcaspase活性を調べたところ、エキシマレーザーではエキシマライトと比較すると、同じ照射量ではCPDの形成が少なく、またcaspase活性の上昇が低いことが判明した。すなわち照射強度

が異なると同じ308nmの光でもDNA損傷やアポトーシス誘導の度合いが異なることが明らかとなった。

3. この機序を検討するために培養HaCaT細胞にこれら光を照射しmicroarrayで遺伝子発現を解析したところ、エキシマライトではエキシマレーザーよりもapoptosisに関わるTNF- $\alpha$ 系の遺伝子発現がより強く誘導されることがわかった。

4. さらにエキシマレーザーではエキシマライトに比べ、DNA損傷修復遺伝子の発現低下が少なく、CPDの修復がより強力に働くことがわかった（microarrayとreal time PCRで検証）。

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 井瀨善聖、尾崎紗恵子、井上由貴、前島真帆、佐伯秀久、船坂陽子
2. 発表標題 エキシマレーザーとエキシマライトの光到達深度の差異、ならびに色素幹細胞へ活性化に関わる作用の検討
3. 学会等名 第39回日本美容皮膚科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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