

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19838

研究課題名(和文) 表皮ケラチンを用いた非侵襲的環境エクスポゾーム解析法の構築

研究課題名(英文) Development of non-invasive environmental exposome analysis using epidermal keratins

研究代表者

大江 知行(Oe, Tomoyuki)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：10203712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：表皮タンパク質ケラチンを、外部刺激(UV、環境化学物質)の暴露の記録媒体としての利用を試みた。その結果、ケラチン上の化学修飾解析法の確立によりUV照射や化学物質暴露による変動を確認できた。一方、表皮上の低分子の解析は、大量に存在する内因性脂質の変動は見られたものの、表皮に保持された低濃度の外因性低分子の解析は困難であった。しかしながら4-bromophenylhydrazineによる揮発性アルデヒド類の誘導体化と特徴的な同位体パターンを用いたスクリーニング系、更には表皮に存在する求核性ペプチドGHK付加体としての検出系の可能性を確認でき、今後の展開が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、表皮ケラチンの「多様な化学修飾を受ける」、「疎水性低分子を保持できる」、「短周期で置き換わる」、「非侵襲的に採取できる」特徴を生かし、外部刺激の暴露の記録媒体としての利用を試みたものである。今回の成果である「ケラチンの化学修飾解析法の構築」と「表皮上の低分子化合物の検出系開発」は、環境中の化学物質の暴露量を、環境濃度のみならず、個々人の暴露状況(暴露時間・濃度)などを評価できる可能性を示したものであり、『エクスポゾーム』の方法論として意義がある。

研究成果の概要(英文)：Epidermal proteins, keratins, were used as recording media to estimate exposure of external stimuli (UV, environmental chemicals, etc.). As a result, analytical method to screen chemical modifications on keratins was developed. Furthermore, the variation due to UV irradiation and chemical exposure were confirmed. On the other hand, concentrations of exogenous small molecules retained on skin were too low to be detected under co-existence of the large amount of endogenous lipids. Therefore, derivatization with 4-bromophenylhydrazine followed by mass spectrometric screening using characteristic isotope patterns was developed for targeting analysis of volatile aldehydes. Furthermore, a nucleophilic peptide GHK present in the epidermis was found to be a possible trapping reagent for these electrophilic chemicals. Those detection systems developed here are expected to help for exhaustive exposome in future.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：エクスポゾーム ケラチン

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、反応活性種(活性酸素種、紫外光、過酸化脂質由来アルデヒド、環境物質由来エポキシド、薬物の反応性代謝物)のDNA、タンパク質に対する暴露研究を化学毒性の観点で研究している<sup>[1-30]</sup>。従来、タンパク質との付加体を解析する暴露研究では、生体内半減期が長く高濃度に存在するアルブミン(19日)、ヘモグロビン(120日)が汎用されて来たが、逆に経時的かつ網羅的解析は困難であった。

一方、申請者は10年ほど前から化粧品の安全性研究を始める過程で、外部刺激に直接かつ恒常的に暴露されている表皮ケラチンの情報源としての有用性に着目している。ケラチンは、難溶性で取り扱い困難なタンパク質であり、生理活性が無い事も相まって、当時、研究対象・生体試料として分析例が殆どなかった。その後、申請者らにより、表皮ケラチンの採取・可溶化の最適化・on-tape消化法による修飾解析法を開発し、「酸化修飾を指標とした紫外線による皮膚ダメージの評価法」、更には「アトピー性・薬物性皮膚炎で顕著増加する修飾の多変量解析法」を開発した<sup>[27-30]</sup>。

そこで本申請では、表皮ケラチンの分析資料としての有用性から、『ケラチン上の付加修飾(共有結合)解析』のみならず、『非共有結合性(保持)低分子の解析』を加えて、新規の網羅的環境エクスポゾーム解析法の開発構想に至った。

ちなみに、特定タンパク質上の網羅的修飾解析は『化学修飾オミクス』として方法論を既に報告している<sup>[18]</sup>。

## 2. 研究の目的

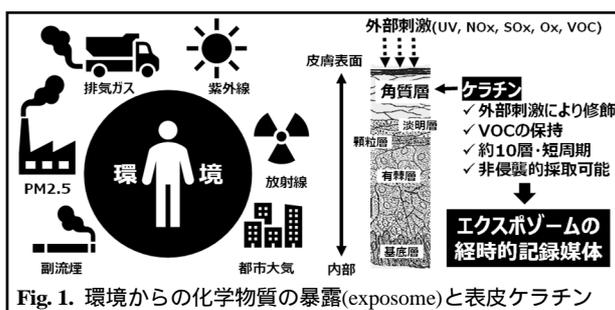
近年、化学物質の環境濃度のみならず、個々人の暴露(exposure)を定性・定量的に俯瞰する『エクスポゾーム』の概念が提唱されている。その方法論として、尿・血液試料を用いたヘモグロビン、アルブミン、グルタチオン、DNA上の付加体解析が主である。しかしながら、いずれも体内での長期内部暴露を見るものであり、代謝・排泄、生体内半減期などの影響にも左右される。更に、環境からの化学物質の暴露は、環境濃度のみならず滞在時間・時期・防御など様々な要因があり、従来法では個々人の環境暴露の経時的・短期的な網羅的解析は困難であった。

一方、表皮は生体の防護壁として外部刺激に直接かつ恒常的に暴露されており、取り分けその角質層を構成する疎水性タンパク質『ケラチン』は、『エクスポゾーム』の経時的・短期的な記録媒体として以下の可能性と有用性を有する(Fig. 1)。

- (1) 多様な化学修飾を受ける：UVによる酸化修飾、環境中親電子化合物(アルデヒド類)・窒素酸化物(NOx)・硫黄酸化物(SOx)・光化学オキシダント(Ox)による修飾など。
- (2) 環境中の揮発性有機化合物(VOC)を保持できる：薬物と同様VOCも、経皮吸収するが吸収促進剤が無いため深部へ浸透しにくい。
- (3) 暴露の経時変化を追える：角質層は10層程度、ターンオーバーが1か月程度とヘモグロビン、アルブミンと比較して短く、暴露時期を特定できる。
- (4) 非侵襲的かつ容易に採取できる：テープストリッピング法などで採取できる。

それ故、表皮ケラチンに共有結合(化学修飾)および非共有結合(保持)している物質の解析基盤を共に構築する事は、環境由来の新規エクスポゾーム解析を達成する上で、極めて有用である。

そこで申請者は、質量分析法(MS)を駆使して、『表皮ケラチン上の化学修飾』、『ケラチン結合型低分子』の網羅的解析手法を構築し、新規エクスポゾーム解析の方法論を提供する事を目的とする。



## 3. 研究の方法

本研究に関連するヒト表皮検体の収集は、東北大学大学院薬学研究科「人を対象とする医学系研究に関する倫理委員会」の中で承認済みである(アバンドントプロテインの化学修飾オミクス、承認番号12-03、令和5年度まで)。

また申請者・共同研究者は、東北大学で科研費申請に必要な「研究倫理教育(座学、令和元年12月15日)を受講済みである。

- (1) 表皮ケラチンの修飾解析：表皮ケラチンはテープストリッピング法にて採取した。*in vitro*実験では採取後の試料にUVA(315–380 nm, a dose rate of 4.5 mW/cm<sup>2</sup>)またはUVB(290–315 nm, a dose rate of 2.0 mW/cm<sup>2</sup>)を照射し、当研究室で開発したon-tape digestion法で処理後、LC/ESI-SRM/MSに付した。また*in vivo*実験を健常人16名(男性9名、女性7名)を対象に5月13日から10月15日までの5か月間行った。被験者には、手首甲側に日焼け

止めクリーム (sun protection factor, SPF 50+/protection grade of UVA, PA++++) を毎朝塗布してもらい、該当部分(UVc\_+)、不塗布の手首甲側(UVc\_-)、上腕外側(Upper arm)の3か所(Fig. 2)から2週間毎に表皮を採取し、同様に消化・測定した。また採取と同時に皮膚色の濃淡も色度計(TE5-135A)で測定した。LC-MS には、逆相系 C12 カラム、0.1% ギ酸含有水-アセトニトリル系移動相とトリプル四重極型 MS(ESI、正イオンモード、SRM)の組み合わせを用いた。

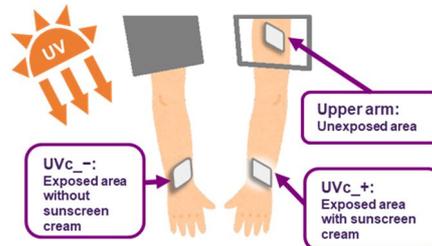


Fig. 2. Conditions for *in vivo* experiments.

- (2) 表皮脂質の変動解析：テープストリッピング法で採取し表皮脂質を、UVB(305–315 nm, a dose rate of 3.2 mW/cm<sup>2</sup>)で48時間照射後、メタノール/クロロホルム(1:2)溶液中で脂質を抽出し、Bligh-dyer法を用いて分離した。LC-MS には、逆相系 C18 カラム、5 mM 酢酸アンモニウム含有アセトニトリル/メタノール/水(1:1:3)-2-プロパノール系移動相と Kingdon trap 型 MS(ESI、正・負両イオンモード、データディペンデント MS/MS)の組み合わせを用いた。データは、リポミクス用ソフトの LIQUID(ver. 7.5.7860)と付属のデータベースから脂質クラス・脂肪酸側鎖(炭素数・不飽和度)を解析した。
- (3) 毛髪ケラチンの修飾解析：性別や処理の異なる毛髪試料を、光学顕微鏡 OLYMPUS IX71 での観察に加え、DTT・IAA による還元アルキル化後のキモトリプシン消化後に LC-MS に付し化学修飾の変化を測定した。さらにボランティア 19 人から毛髪を収集し、性別とカラーリングの有無による群分け後、酸化修飾率をもとに College Analysis を用いて判別分析を行った。LC-MS には、逆相系 C12 カラム、ギ酸/水-アセトニトリル系と Kingdon trap 型 MS(ESI、正イオンモード、データディペンデント MS/MS)の組合せを用いた。
- (4) 環境中アルデヒドのスクリーニング系：環境中揮発性アルデヒドとして、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アクロレイン、クロトンアルデヒド、ベンズアルデヒドを用い 4-bromophenylhydrazine と誘導体化した。LC-MS には、逆相系 C18 カラム、ギ酸/水-アセトニトリル系移動相と Paul ion trap 型 MS(ESI、正イオンモード、データディペンデント MS/MS)の組合せを用いた。
- (5) 表皮ペプチドによるアルデヒド類の捕捉：ペプチドには、内因性の GHK および類似物質(スキンケア製品に用いられるパルミトイル化した pal-GHK、pal-GQPR、pal-KTTKS)を用い、脂質過酸化で生じる 4-oxo-2(E)-nonenal をモデルアルデヒドとしてリン酸緩衝液(pH 7.4)中 37°C、24 時間、濃度比 1:1 (mM)で反応させ。LC-MS には、逆相系の C18 カラムとギ酸/水-アセトニトリル系移動相と Paul ion trap 型の MS(正イオン ESI モード、データディペンデント MS/MS)の組合せを用いた。

#### 4. 研究成果

- (1) 表皮ケラチンの化学修飾解析：表皮ケラチンの *in vitro* 実験では、紫外線暴露に伴いメチオニンの酸化が高比率(11.2% ~)で増加し(例 Met<sup>296</sup>/K1)、紫外線暴露マーカーと期待された。一方、糖化・脂質化などの修飾は、低比率(~0.57%)で検出限界近くであり、経時の変化も明確でなかった。また *in vivo* 実験での酸化修飾比率は、7、8 月に向けた増加と梅雨期の減少、夏期の被覆部位での抑制が見られた(Fig. 3)。他の化学修飾に関しては、検出限界に近い修飾比率と個人差により、マーカーとして応用可能な物はなかった。
- (2) 表皮脂質の変動解析：一方、表皮脂質の *in vitro* 実験では、UVB 暴露の結果、正負両イオンモードで検出されたセラミドと phosphatidylethanolamine (PE) は種類が増加し (Fig. 4)、また各イオンモードで異なったリン脂質の種類が増減も見られ、UVB が表皮脂質種の構造に影響を及ぼす可能性が示唆された。しかし、二重結合の位置・異性化・酸化など

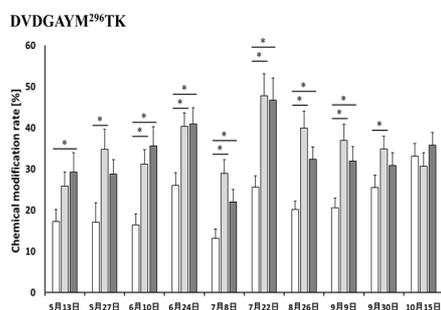


Fig. 3. Chemical modification (oxidation) rate (%) of DVDGAYM<sup>296</sup>TK (K1) obtained from upper arm (white bars) and back of the wrist with (gray bars) or without (dark gray bars) applying sunscreen cream after exposure to sunlight (May to October). Data are presented as means  $\pm$  SEM (error bars) from triplicate samples. \*,  $p < 0.05$  ( $p$  values were determined by an unpaired Welch's  $t$ -test).

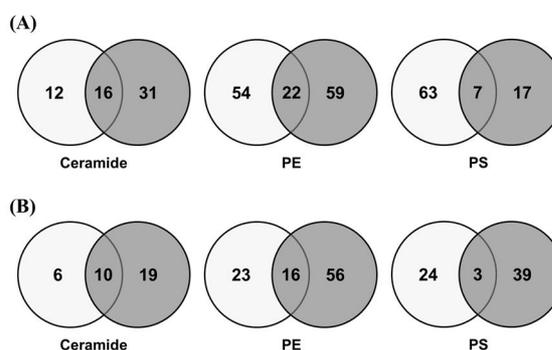


Fig. 4. Venn diagrams illustrating the numbers of epidermal lipid species (ceramide, PE, and PS) detected in (A) positive and (B) negative ion mode, with (right circle) or without (left circle) exposure to UVB for 48 h.

構造の特定までは至らなかった。

- (3) 毛髪ケラチンの修飾解析：DTT・IAAによる還元アルキル化後のキモトリプシン消化により9種のケラチンを同定し、K31、K81、K85、K86の配列カバー率は75%以上であった。光学顕微鏡による観察では、試料A(男性)、B(女性)とも消化後にcuticleが消失し、試料Bでは毛髪の原型を失うほど消化された。この時の重量変化で求めた消化率は、試料Aで37.0%、試料Bで消化率90.9%であった。また、未処理の毛髪の修飾解析では、cortex及びcuticle特異的ケラチンからMet酸化と修飾部位を同定できた(Table 1)。こ

Table 1. Oxidized peptides identified from control hair.

|         | Peptide (*: oxidation site) | Protein       | Relative oxidation (%) |
|---------|-----------------------------|---------------|------------------------|
| Cortex  | NM*DCIIAEIKAQY              | K81, K85, K86 | 13.3                   |
|         | NM*DCIVAEIKAQY              | K83           | 21.4                   |
|         | LM*KADLETNAEAL              | K82           | 58.0                   |
| Cuticle | TM*TPDYQSHF                 | K32           | 86.3                   |
|         | AM*RQLVEADINGL              | K32           | 88.3                   |
|         | QCM*ITNVEAQL                | K32           | 56.0                   |

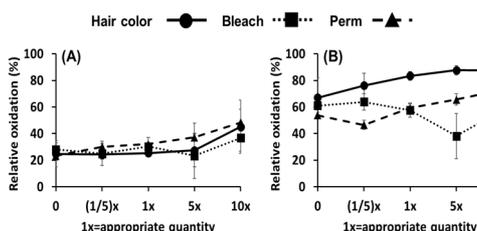


Fig. 5. Changes in relative oxidation (%) after hair treatment with incremental amount. (A) NMDCIVEIKAQY (K83 in cortex), (B) LMKADLETNAEAL (K82 in cuticle).

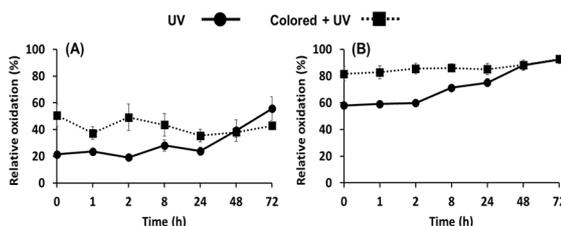


Fig. 6. Changes in relative oxidation (%) of peptides present at the cortex and cuticle after exposure to UVB or color treatment followed by UVB. (A) NMDCIVEIKAQY (K83 in cortex), (B) LMKADLETNAEAL (K82 in cuticle).

のMetの酸化修飾率を指標に、各種処理した毛髪を解析するとNMDCIVAEIKAQY(in cortex)とLMKADLETNAEAL(in cuticle)において、カラーリング、パーマ、UV処理後に修飾率が上昇し(Figs. 5 and 6)。薬品量及びUV照射時間依存的であり、毛髪の酸化ダメージの指標の可能性を示唆した。また、カラーリング処理後のUV照射では、NMDCIVAEIKAQY(in cortex)で酸化修飾率は上昇しない一方、LMKADLETNAEAL(in cuticle)では上昇し(Fig. 7)、毛髪ダメージの定量的評価をcuticleとcortexで分別できる事も示唆された。次いでボランティア19人の毛髪の酸化修飾率を、判別分析で解析したところ、性別とカラーリングの有無で分けた群が分離されることを散布図によっても視覚的に確認できた(Fig. 7)。

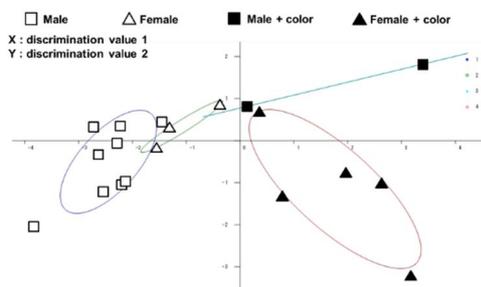


Fig. 7. Scatter plots with oxidative modification rate as a variable for each peptide.

- (4) 環境中アルデヒドのスクリーニング系：各種アルデヒドの4-bromophenylhydrazineによる誘導体は、臭素の同位体比(Br<sup>79</sup>:Br<sup>81</sup> 1:1)を反映した2Daの1:1のダブルピークを示し、データディペンデントスキャンによる選択的スクリーニングの可能性が示された。
- (5) 表皮ペプチドによるアルデヒド類の捕捉：脂質過酸化で生じる4-oxo-2(E)-nonenalモデルアルデヒドに用い、GHK及びそのpal誘導体の反応性アルデヒド捕捉能の評価した結果、GHKが最も効率的にONEを捕捉し6種の付加体ピークを確認した。その中で、最も高強度のピークは、*m/z* 459 [GHK+ONE-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>であり、ONEとヒスチジン側鎖とのMichael付加体(1,4-dicarbonyl体)が、リジン側鎖とPaal-Knorr反応した構造と考えた。

## 5. 引用論文

- ブタジエン活性代謝物-DNA付加体  
[1] *HEI Res. Reports*, **92**, 151-190 (2000), [2] *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 247-257 (1999).
- カテコールアミン酸化体-DNA付加体  
[3] *J. Health Sci.*, **47**, 339-345 (2001).
- 薬物の活性代謝物-アルブミン・ヘモグロビン付加体  
[4] *Anal. Biochem.*, **449**, 59-67 (2014), [5] *Curr. Drug Metab.*, **7**, 897-911 (2006), [6] *J. Toxicol. Sci.*, **44**, 559-563 (2019).
- 過酸化脂質分解物-DNA付加体  
[7] *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 780-786 (2005), [8] *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 893-900 (2003), [9] *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 300-304 (2002).
- 過酸化脂質分解物-アルブミン・ヘモグロビン等付加体  
[10] *Int. J. Mass Spectrom.*, **468**, 116651 (2021), [11] *J. Proteomics*, **166**, 101-114 (2017), [12] *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **31**, 27-34, (2016), [13] *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 5379-5392 (2016), [14] *Chem.-Biol. Interact.*, **239**, 87-99 (2015), [15] *Int. J. Mass Spectrom.*, **373**, 72-80 (2014), [16] *Chem. Res. Toxicol.*, **26**, 1926-1936 (2013),

- [17] *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 7383-7395 (2013), [18] *Anal. Methods*, **4**, 1945-1952 (2012), [19] *Chem. Res. Toxicol.*, **23**, 1771-1785 (2010), [20] *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 2237-2244 (2008), [21] *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1008-1018 (2007), [22] *Biochem. J.*, **393**, 343-349 (2006), [23] *J. Mass Spectrom.*, **40**, 754-764 (2005), [24] *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 1598-1605 (2003), [25] *J. Biol. Chem.*, **278**, 42098-42105 (2003).
- (6) 過酸化脂質分解物-イミダゾールジペプチド付加体  
[26] *J. Peptide Sci.*, **8-9**, e3097- (2018).
- (7) 表皮ケラチンの酸化修飾解析  
[27] *J. Proteome Res.*, **19**, 3837-3845 (2020), [28] *J. Proteomics*, **133**, 54-65 (2016), [29] *Data in Brief*, **7**, 100-106 (2016), [30] *J. Proteomics*, **75**, 435-449 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>保栖大暉、幡川祐資、李宣和、大江知行           |
| 2. 発表標題<br>LC/MSによる毛髪ケラチンの化学修飾解析法の開発    |
| 3. 学会等名<br>第81回分析化学討論会、2021年5月22日、オンライン |
| 4. 発表年<br>2021年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>保栖大暉、幡川祐資、李宣和、大江知行                    |
| 2. 発表標題<br>LC-MSによる毛髪ケラチンの化学修飾解析                 |
| 3. 学会等名<br>新アミノ酸分析研究会第11回学術講演会、2021年11月12日、オンライン |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>○Tomoyuki OE  |
| 2. 発表標題<br>Alternative analytical approach for biomarker discovery: Chemical modifications on a target protein |
| 3. 学会等名<br>令和4年度化学系学協会東北大会、2022年9月17-18日、盛岡（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中龍生、幡川祐資、李宣和、大江知行                |
| 2. 発表標題<br>皮膚修復ペプチドによる反応性アルデヒドの捕捉機構と付加体の構造解析 |
| 3. 学会等名<br>第61回日本薬学会東北支部会、2022年11月27日、オンライン  |
| 4. 発表年<br>2022年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学研究者紹介  
[https://www.r-info.tohoku.ac.jp/index.php?action=pages\\_view\\_main&active\\_action=cvclient\\_view\\_main\\_init&cvid=read0138585&display\\_type=cv&block\\_id=442#\\_442](https://www.r-info.tohoku.ac.jp/index.php?action=pages_view_main&active_action=cvclient_view_main_init&cvid=read0138585&display_type=cv&block_id=442#_442)  
東北大学大学院薬学研究科臨床分析化学分野HP  
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~bunseki/bunseki.html>  
Researchmap  
<https://researchmap.jp/read0138585>  
Tohoku University Scholars at Elsevier  
<https://tohoku.pure.elsevier.com/ja/persons/tomoyuki-oe>  
ORCID id  
<https://orcid.org/0000-0002-3893-0815>  
Scopus id  
<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7004967951>

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-----------|--|---------------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 李 宣和<br><br>(LEE Seon Hwa)<br><br>(60519776)     | 東北大学・薬学研究科・准教授<br><br><br><br>(11301) |    |
| 研究<br>分担者 | 幡川 祐資<br><br>(HATAKAWA Yusuke)<br><br>(30878351) | 東北大学・薬学研究科・助教<br><br><br><br>(11301)  |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|