

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659833

研究課題名（和文） 光照射による創傷治癒のメカニズムを解明する

研究課題名（英文） Analysis of expression of Melanopsin in human skin

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

研究成果の概要（和文）：

Melanopsin の発現はヒト皮膚表皮および毛包、真皮において認められた。ウェスタンブロッティング法においてもその発現が確認された。培養線維芽細胞に対して 450nm の光線を照射した場合、非照射群に比して 2 分、5 分、10 分では経時的に ERK のリン酸化は亢進した。一方、570nm の光では光照射による ERK のリン酸化の亢進は 450nm の照射に比して小さく、むしろリン酸化の程度は減弱した。これらの波長の光を同時に照射した所、リン酸化は 450nm の時に比してさらに更新した。

研究成果の概要（英文）：

The expression of Melanopsin in human skin were detected. The localization of its expression were; keratinocyte, melanocyte in epidermis, fibroblast in dermis. Irradiation of 450nm of LED light cause the up regulation of phosphorylation of ERK and degree of phosphorylation were related to the irradiation time. On the other hand, irradiation of 570nm light cause the down regulation of phosphorylation of ERK. Irradiation of both lights causes the more phosphorylation of ERK.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒学、光応答

1. 研究開始当初の背景

体が光からのエネルギーを細胞内シグナルへと変換する上で唯一解明されているのは視覚に関する分野である。網膜の視細胞では視物質（オプシン）と呼ばれるタンパク質が光シグナルを受け、そのタンパク質の立体構造を変化させることで細胞内へとシグナルを伝える。オプシンのファミリーは脊椎動物タイプと無脊椎動物タイプに大別される。これは生物進化の過程を表している。ところが 1998 年にカエルの皮膚に存在する色素胞から光感受性タンパク質が同定され、melanopsin(opsin 4)と命名された。このアミ

ノ酸配列は無脊椎動物のオプシンと相同であり、生物進化の過程において保存されたものであろうと考えられる。その後、ヒトを含む脊椎動物全般において、melanopsin が保存されていることが明らかとなった。Melanopsin の果たす役割として、網膜における解析が進んでおり、体内時計の調節や網膜神経節細胞における細胞の維持に関与していることが報告されるようになった。ところが神経系以外での発現分布の同定やその機能の解明には至っていない。これら生物進化の過程を考えると、melanopsin が高等脊椎動物である哺乳類の皮膚においても発

現している可能性が高い。実際に、これまでの報告では、継代されたマウスのメラノサイトでは melanopsin が発現していたとされており、この仮説を支持するものである。ただしヒトの皮膚におけるその発現については明らかにされていないばかりか、哺乳類の正常皮膚における発現についても不明である。次に melanopsin が光シグナルを受けた後、シグナル伝達系として ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) および PI3 K/Akt Pathway を介することが明らかとなっている。これらの pathway はいずれも bFGF などの細胞増殖因子からのシグナル伝達系で活性化される経路である。

これらを生化学的な見解と、生物進化から得られる見解を併せると、ヒトの皮膚において melanopsin が発現してれば、このタンパク質が光シグナルを受け取り細胞内のシグナル伝達系を活性化し、細胞増殖およびアポトーシスの抑制を行う事で創傷治癒を誘導できる可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

背景に記載した通り、melanopsin が皮膚の細胞に発現していた場合、その感受性波長を受ける事で ERK シグナル伝達系が活性化される可能性がある。研究開始当初、melanopsin を発現している細胞の同定は行っておらず、メラノサイトを始めとするいずれかの細胞における発現が予測された。

本研究課題では、ヒトの皮膚に melanopsin が発現しているのか、また、発現しているのであればどの細胞に発現しているのか、また、発現している細胞に光を照射した場合、どのような反応を生じるのか(増殖するのか、メラニン産生を行うのか、アポトーシスを引き起こすのか)、についての探索を目的とした。

3. 研究の方法

①ヒト皮膚におけるmelanopsinの発現の検索

①-1 免疫組織化学

手術時に破棄される予定の余剰皮膚をサンプルとした。ホルマリン固定を行ったのち、10%→20%のスクロース PB に置換した。

20%スクロース : OCT コンパウンド (2:1) に包埋した後、凍結ブロックを作成した。クライオスタットを用いて 6-10 μm 厚の切片を作成し、スライドガラスに貼付した。風乾のち、一次抗体に抗 Melanopsin 抗体を用いて、ABC 法または蛍光免疫染色法により免疫染色を行った。光学顕微鏡を用いて観察を行った。

①-2 ウェスタンブロッティング

上記と同様に得られた皮膚サンプルを細かく破碎したのち、SDS を用いて可溶化した。遠心分離により溶解出来なかった debris を

除去し、上清をサンプルとして用いた。

SDS ゲルにサンプルをアプライし、電気泳動を行った後、PVDF メンブレンに転写を行った。これに対して、抗 Melanopsin 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。検出は HRP を用いた化学発光法を利用し、ケミルミ検出器を用いて半定量的解析を行った。

①-3 RT-PCR

上記と同様に得られた皮膚サンプルを細かく破碎したのち、溶解バッファー中でホモジェナイズした。このサンプルより total RNA を抽出した。得られた total RNA のうち、一部は poly-T ビーズ法により mRNA の抽出を行い、さらに逆転写酵素を用いて cDNA の作成を行った。また一部は、そのまま直接法により RT-PCR を行った。プライマーは 25mer 程度で複数種、作成を行ったが、最終的に結果に述べるプライマーの組み合わせとした。

①-4 クローニング

上記で得られた PCR 産物は約 350mer であった。これらが実際に melanopsin をコードする遺伝子の一部であることを確認するため、アガロースゲルより切り出し、フラグメントの抽出を行った。これをプラスミドベクターに組み込み、大腸菌に導入した。カラーセレクションにより得られたコロニーに対して PCR を行い、目的とする長さが得られたコロニーを培養し、プラスミドを回収、シーケンシングを行った。

②光照射によるERKリン酸化の検討

②-1 培養線維芽細胞における Melanopsin の発現解析

①-2、3 と同様に培養線維芽細胞からタンパク質および RNA を抽出し、Melanopsin の発現解析を行った。結果の項目に示す通り、発現が認められたため、以後の研究には培養線維芽細胞を用いる事とした。

②-2 光照射下での培養細胞の挙動

光照射には LED ライトを用いる事とした。Melanopsin の感受性波長は、450nm と 570nm とされているが、ヒト Melanopsin については明確な波長は示されていないため、便宜上、これらの波長を用いる事とした。

培養線維芽細胞を培養皿に播種したのち、5 日間の暗順応を行った。つまり、CO₂ インキュベータは暗室内に設置し、播種後は光の照射は一切、遮断した。5 日の後、赤色灯の下、以下の操作を行った。

まず、培養皿にリン酸化酵素阻害剤を添加し、10 分の静置の後、PBS で洗浄を行った。すみやかに 450nm の波長の光を照射し、細胞を回収した。照射時間は 0 分、2 分、5 分、10 分、20 分とした。照射後、速やかに可溶化溶液を添加し、細胞を溶解させた。

同様に 570nm の光を照射し、細胞溶解液を回収した。また、450nm と 570nm の光を同時に照射した群、bFGF を添加した群も作成し、

それぞれ回収を行った。

②-3 ウェスタンブロッティング

②-2で得られたサンプルを用いてSDSゲルにアプライした。これをPVDFメンブレンに転写した。抗リン酸化ERK抗体および抗ERK抗体、コントロールにはアクチンを用いた。化学発光法により検出器で定量的解析を行った。

4. 研究成果

①ヒト皮膚における Melanopsin の発現の検索

①-1 免疫組織化学

ヒト皮膚では、表皮のケラチノサイトおよびメラノサイトにおいて Melanopsin の強い発現を認めた。真皮線維芽細胞においてもその発現は認められた。また、色素性母斑においては母斑細胞にも強い発現が認められた。さらに、毛包においても強く発現していた。

①-2 ウェスタンブロッティング

ヒト皮膚、母斑、培養線維芽細胞、培養ケラチノサイト、培養メラノサイトのそれぞれにおいて、Melanopsin の発現が認められた。特に正常皮膚においてその発現が強く認められた。

①-3 RT-PCR

total RNA を鋳型とした RT-PCR において、目的とする約 350bp のフラグメントが増幅された。

①-4 クローニング

①-3 で得られたフラグメントの塩基配列解析を行った所、Melanopsin であることが突き止められた。一方で、splicing variant の発現も認められた。なお、今回、設計した PCR プライマーはイントロンを挟む形で作成しており、ゲノムに対する増幅ではない事が明らかである。

②-1 培養線維芽細胞における Melanopsin の発現解析

①-2, 3, 4 と同様の実験を培養細胞に対して行い、次の結果を得た。

- ・ 線維芽細胞において、Melanopsin は発現している。
- ・ メラノサイトにおいて Melanopsin は発現している。
- ・ ケラチノサイトにおいて Melanopsin は発現している。

②-2 光照射下での培養細胞の挙動

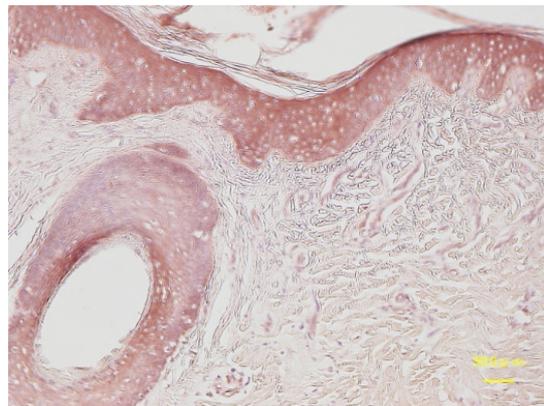
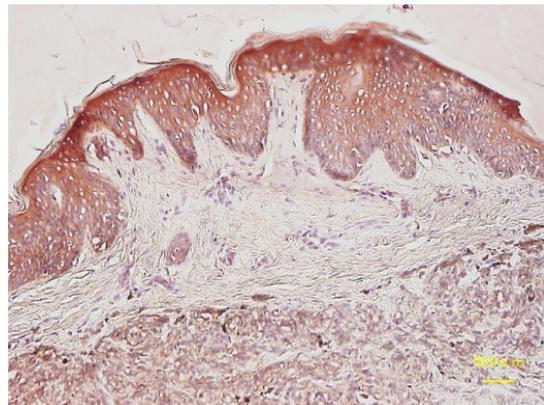
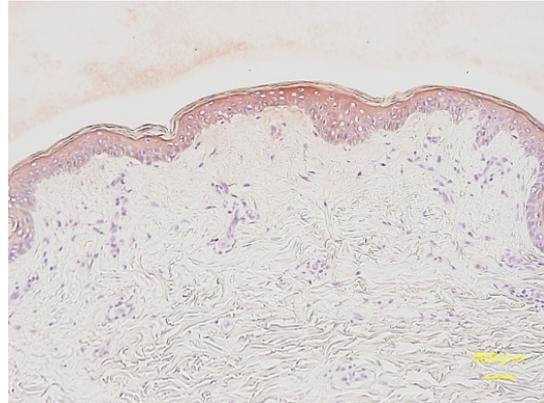
線維芽細胞を研究対象とした。線維芽細胞に 450nm の LED を照射した所、0分→2分→5分→10分の順にリン酸化は亢進した。一方、20分ではリン酸化は減弱した。

570nm の LED を照射した所、若干のリン酸化の亢進は経時的に認められた物の、有意差なく、ほぼ一定であり、光反応は生じていない事が示唆された。

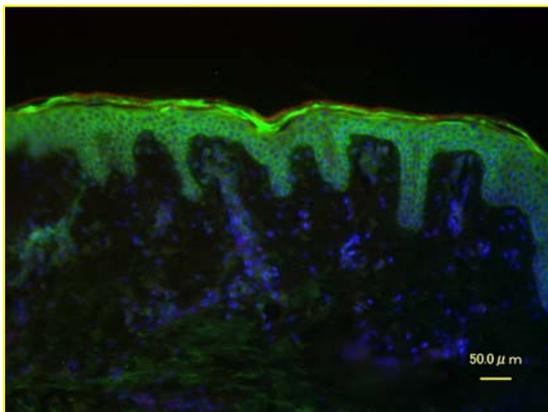
450nm の光照射における ERK のリン酸化の

程度は bFGF の添加における ERK のリン酸化の程度と同等であった。

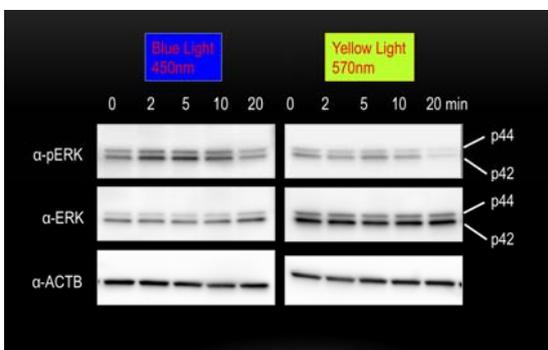
次に、Melanopsin は double stable である事が知られており、両方の波長を照射する事で、生理的には光シグナルの増感に関与することが明らかとなっている。そこで、450nm と 570nm の光を同時に照射する事とした。その結果、ERK のリン酸化は 450nm 単独の照射よりも亢進しており、線維芽細胞においても Melanopsin が double stable であることが示唆された。



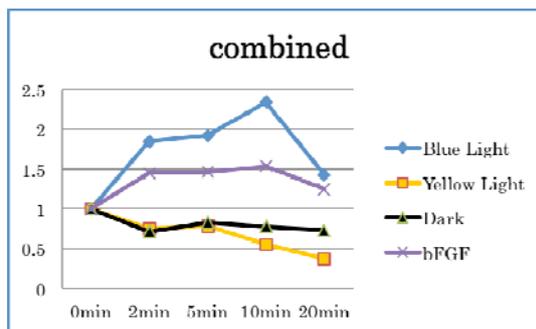
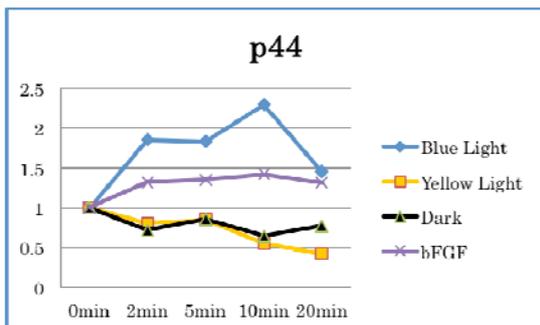
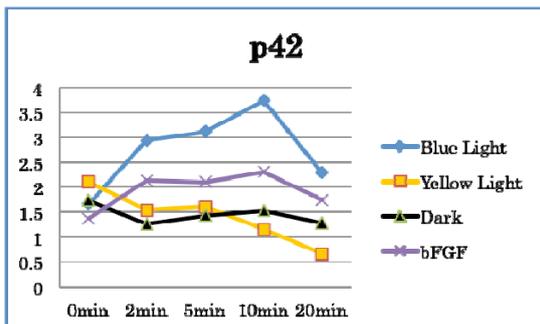
上図より正常皮膚、母斑、頭皮における Melanopsin の発現。



蛍光免疫組織化学による Melanopsin の発現（緑色の蛍光として表示）。表皮に多く発現しており、また、真皮にも一部発現が認められる。



450nm および 570nm の光照射を行った後の ERK のリン酸化。450nm の光照射下では 10 分までは経時的にリン酸化が亢進する。一方、570nm の光照射ではリン酸化の亢進は認められなかった。



培養線維芽細胞における ERK リン酸化。Blue light (450nm) の光を照射する事で ERK のリン酸化は亢進する。その程度は bFGF の添加を上回る。一方、Yellow light の照射はリン酸化を低下させる。

以上より、線維芽細胞は光に反応する事が明らかとなった。また、光受容タンパク質である Melanopsin の発現も認められ、この感受性波長の照射によりリン酸化が亢進することから、Melanopsin が何らかの光受容に関与している事が示唆される。その光応答の結果は未知であり、今後の研究課題となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

榊原俊介 他
皮膚の光受容メカニズム
第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会
2012 年 10 月 04 日～2012 年 10 月 05 日
福島

榊原俊介 他
線維芽細胞の光応答の検討
第 4 回日本創傷外科学会学術集会
2012 年 07 月 26 日～2012 年 07 月 27 日
福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)
神戸大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80217421

(2) 研究分担者

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)
神戸大学・医学研究科・特定助教
研究者番号：50444592

藤井 美樹 (FUJII MIKI)
神戸大学・医学研究科・医学研究員
研究者番号：80444602

櫻井 沙由理 (SAKURAI SAYURI)
神戸大学・医学研究科・特定助教
研究者番号：20594534