

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580199

研究課題名(和文)紫外線被曝シグナルによるメタボリックシンドロームへの影響の網羅的解析

研究課題名(英文)The effects of UVB irradiation to the skin on metabolic syndrome

## 研究代表者

大石 祐一(Oishi, Yuichi)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00313073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：UVB照射シグナルは、皮膚でのcalcitonin gene-related peptide (CGRP)の発現と放出を増加させることで、そのシグナルを肝臓、脂肪組織に伝える。このシグナルは血中Adiponectin量を減少させ、皮膚機能を低下させる可能性が示唆された。肝線維化の増悪化に関わるplasminogen activator inhibitor (PAI)-1の発現を減少させることで、肝線維化の進展を遅延させる可能性があるポジティブな効果も認められた。すなわち、UVB照射による皮膚以外の臓器への影響は、皮膚と同様にネガティブな効果とポジティブな効果の両方が認められた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms that the irradiation of ultraviolet B (UVB), which is a major environmental factor that affects the structure and function of the skin, decreases the blood adiponectin level and plasminogen activator inhibitor (PAI)-1. Our results showed that the exposure of skin to UVB decreased the blood protein and adipose mRNA levels of adiponectin through the endocrine action of serum amyloid A increased by the activation of calcitonin gene-related peptide (CGRP) signals possibly via the skin-brain-liver axis. Furthermore, CGRP inhibited TGF- $\beta$ 1-induced expression of PAI-1 by decreasing the phosphorylation status of the MAP kinase pathway through activating the cAMP/protein kinase A pathway. UVB signals have both negative and positive effects such as a decline of skin function and alleviation of hepatic fibrosis, respectively. Therefore, our study would contribute to the elucidation of mechanisms underlying the endocrine and neuroendocrine functions of skin.

研究分野：栄養生化学 皮膚科学

キーワード：紫外線 皮膚 CGRP TGF- $\beta$ 1 急性期タンパク質 インターロイキン-6 アディポネクチン PAI-1

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚は独立した人体最大の臓器で、他の臓器と有機的に関わりながら一個体を形成している。皮膚と他の臓器をつなぐメカニズムには、内分泌経路と自律神経、神経ペプチドを介する神経系の経路がある。皮膚への刺激は、皮膚に限られたものだけでなく、他臓器とネットワークを形成し、身体へさまざまな影響を及ぼすことが考えられる。

我々の皮膚は常に外界から様々な刺激にさらされている。その刺激の代表的なものとして太陽光線中の紫外線が挙げられる。紫外線は、UVA (320-400 nm)、UVB (280-320 nm)、UVC (<280 nm) に分けられ、UVA はオゾン層に吸収されることなく地表に届き、波長の短いUVCは地表に届かない。UVBだけが成層圏のオゾン層量によってその照射量変動する。現在、熱帯地域を除き長期的・全地球的にオゾン層の減少傾向が続いている。特に顕著なのは南極上空のオゾン層の減少であるが、日本においても、晴天時のUVBの地上照射量とオゾン全量との間には負の相関があることが確認されている。オゾン全量の減少の結果、地表に降り注ぐようになったUVBにより、皮膚では炎症や色素沈着、皮膚の老化、光アレルギー、皮膚癌、DNA損傷などが引き起こされ、皮膚に対して大きなダメージを与えることが知られている。一方で、UVBによる変性には違いないが、皮膚にとってプラスの効果も存在する。その一つに、UVBの照射は、皮膚に蓄えられたプロビタミンDを、活性ビタミンD3に変化させることがある。ビタミンD3は、脂溶性ビタミンの1つであり、カルシウム代謝において中心的な役割を果たすとともに、細胞の分化や増殖の根幹にも関わるプロセスなどでも多彩な作用を有している。つまり、過度のUVBは皮膚にとって悪影響であるが、身体の健康を維持するためには最小限のUVBは必要である。このように、皮膚に対するUVBの影響については、多くの報告があり、UVBの危険性と重要性、双方の面でよく理解されている。

## 2. 研究の目的

上記のように、UVBの皮膚への影響はよく研究されているが、皮膚以外の臓器に対するUVBの暴露の影響を検討した報告は極めて少ない。そこで本研究では、UVB照射シグナルが、皮膚以外の臓器にどのような影響を与えるのか、またそれはどのようなメカニズムであるのかについて検討した。

## 3. 研究の方法

(1) UVB照射ヘアレスマウスにおける血清アディポネクチン濃度に及ぼす影響

これまでの報告で、UVBを照射されたマウスの血中アディポネクチン量は、減少することがわかっている。しかし、UVB照射により、血中アディポネクチン量が減少する理由はわかっていない。そこで、(1)では、UVB

の照射の血中アディポネクチン量減少に繋がるメカニズムについて検討した。実験動物には、Hos:HR-1ヘアレスマウス(6週齢、雌)を用いた。飼料にはMFを与え、自由摂食とした。マウスは7日間の馴化飼育後、UVB(-)群(n=6)とUVB(+)群(n=6)に群分けを行った。UVB(-)群は、馴化飼育と同様の条件下で飼育を行い試験に用いた。UVB(+)群に関してはUVB照射試験を行った。UVBのエネルギー量は $1.6 \text{ J/cm}^2$ とした。UVB(-)群、UVB(+)群ともに試験24時間後、解剖を行い、皮膚、視床下部、肝臓、内臓脂肪組織の摘出および採血を行った。各摘出臓器は、群ごとにサンプルをプールし、cDNAマイクロアレイを行った。各摘出臓器のmRNA量は、Real time PCR法にて測定した。各mRNA量は、 $\beta$ -actinのmRNA量当たりの相対値として求めた。また、視床下部、肝臓、血清中の各タンパク質濃度はELISA法にて測定した。なお、本研究における動物実験は、東京農工大学の倫理委員会によって定められた、実験動物の飼育および取扱ガイドラインに従って行った。

(2) HepG2細胞における、Calcitonin gene-related peptide (CGRP)の急性期タンパク質(Serum amyloid-A, SAA)発現に及ぼす影響

in vitroの肝臓モデルとして知られるHepG2細胞を用いて、CGRPの肝臓におけるSAA発現に対する影響を検討した。HepG2細胞を10% FBSを含むDMEM-F12 HAM培地でサブコンフルエントまで培養し、24時間のスタベーション後、CGRP(100 nM)を培地に添加し、SAAのmRNA量、タンパク質量、IL-1、IL-6、TNFのmRNA量をreal time PCR法あるいはELISAにて測定した。

(3) UVB照射がヘアレスマウスの肝臓TGF-1とPlasminogen activator inhibitor (PAI)-1遺伝子発現に及ぼす影響

実験動物には、Hos:HR-1ヘアレスマウス(6週齢、雌)を用いた。飼料にはMFを与え、自由摂食とした。マウスは7日間の馴化飼育後、UVB(-)群(n=6)とUVB(+)群(n=6)に群分けを行った。UVB(-)群は、馴化飼育と同様の条件下で飼育を行い試験に用いた。UVB(+)群に関してはUVB照射試験を行った。UVBのエネルギー量は $1.6 \text{ J/cm}^2$ とした。UVB(-)群、UVB(+)群ともに試験24時間後、解剖を行い、皮膚、視床下部、肝臓、内臓脂肪組織の摘出および採血を行った。なお、本研究における動物実験は、東京農工大学の倫理委員会によって定められた、実験動物の飼育および取扱ガイドラインに従って行った。細胞実験は(2)と同様に行ったが、TFG1を5ng/mL添加し、PAI-1を強制発現させる群も設けた。

#### 4. 研究成果

(1) UVB 照射ヘアレスマウスにおける血清アディポネクチン濃度に及ぼす影響

血清アディポネクチン量および内臓脂肪組織中のアディポネクチン mRNA 量は、UVB(-)群に比して UVB(+)群で有意な減少を示した。また、内臓脂肪組織においてアディポネクチンの発現情報制御に関わる Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)、CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)、C/EBP、Fatty acid binding protein 4 (aP2) の mRNA 量は、UVB(-)群に比して UVB(+)群で有意に減少した。一方、下方制御に関わる Interleukin (IL)-6、Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 の mRNA 量は有意に増加した。これらのことから、UVB 照射による血清アディポネクチン量の減少は、内臓脂肪組織での PPAR、C/EBP、C/EBP、aP2 の減少と IL-6 と MCP-1 の増加によるアディポネクチン発現の低下が要因であることが考えられた。

これまでに、SAA は、脂肪細胞において PPAR、C/EBP、C/EBP、aP2 の mRNA 量の減少と IL-6、MCP-1 mRNA 量の増加を引き起こすことが報告されている。そこで、SAA に着目したところ、主要な合成臓器である肝臓において、UVB(-)群に比して UVB(+)群で、SAA の mRNA 量が顕著に増加した。また、血清 SAA 量も、UVB(-)群に比して UVB(+)群で有意な増加を示した。よって、本研究において、血中で増加した SAA が脂肪細胞に働きかけ、アディポネクチンの発現を抑制したことが考えられた。また、これらのことから UVB 照射のシグナルは、何らかの経路を介し、肝臓を刺激していることが示唆された。

これまでの報告で、CGRP の局所増加は、脳を介した神経経路を介して、全身の CGRP 発現と放出を増加させることが報告されている。そこで、cDNA マイクロアレイによる皮膚、肝臓、視床下部の CGRP の遺伝子発現の結果を検討した。その結果、摘出臓器のすべてで CGRP の遺伝子発現の増加が認められた。これらの結果を Real time PCR 法にて確認したところ、皮膚、肝臓、視床下部で、UVB(-)群に比して UVB(+)群で CGRP mRNA 量は有意な増加を示した。また、組織中の CGRP のタンパク量を測定したところ、視床下部、肝臓で有意な増加を示した。よって、本研究においても UVB の刺激が、皮膚中で CGRP の発現を増加させ、その増加が引き金となり、脳を介して肝臓の CGRP の発現と放出を促したことが推察された。

(2) HepG2 細胞における、CGRP の SAA 発現に及ぼす影響

CGRP (100 nM) を培地に添加後、SAA の mRNA 量は、4 時間で有意な増加を示した。また、CGRP (10 or 100 nM) を培地に添加し、24 時間後に、SAA ELISA kit を用いて培地中の SAA 量を測定したところ、100 nM で SAA

量が有意に増加した。さらに、SAA の上流に存在する IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF  $\alpha$  は、IL-6 のみ 2 時間で mRNA 量の有意な増加が認められ、IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  の mRNA 量には変化が認められなかった。これらのことから、CGRP による SAA の増加は、IL-6 の作用を介していることが考えられた。そこで、この仮説を証明するために、IL-6 中和抗体 (0.1 or 1  $\mu$ g/mL) を添加し、CGRP による SAA の mRNA 量の変動を確認した。その結果、CGRP により誘導された SAA mRNA 量の増加が IL-6 中和抗体により抑制された。したがって、CGRP は IL-6 の作用を介して SAA の発現を促進していることが考えられた。

以上の結果より、(1) で認められた UVB 照射による肝臓中での SAA の増加は、CGRP により増加した IL-6 の作用に起因することが考えられた。

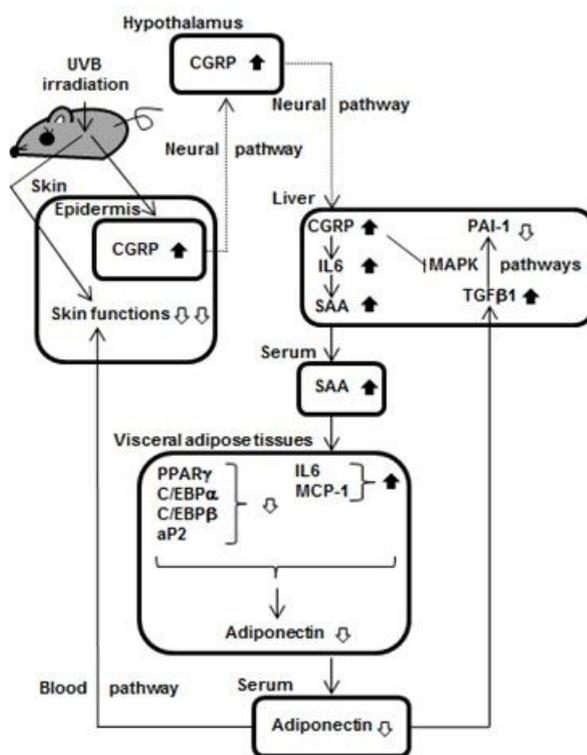
(3) UVB 照射がヘアレスマウスの肝臓 TGF-1 と PAI-1 遺伝子発現に及ぼす影響

血中アディポネクチンと負の相関を示すことが知られている、肝臓中の TGF- $\beta$ 1 と、その下流に存在し、細胞外マトリックスの沈着、蓄積を促進し、線維化を主体とする組織病変の進展に深く関与する PAI-1 の発現に着目した。肝臓中の TGF- $\beta$ 1 mRNA 量は、UVB(-)群に比して UVB(+)群で有意な増加を示したのに対し、PAI-1 の mRNA 量は UVB(-)群に比して UVB(+)群で有意な減少を示した。この結果は、TGF- $\beta$ 1 の下流に PAI-1 が存在する点から矛盾が生じる。これまでに、CGRP の働きの一つに、肝線維化の進行を緩和させる効果が報告されている。すなわち、UVB 照射により、線維化に対して重要な因子である PAI-1 の遺伝子発現が減少したのは、CGRP の肝臓線維化の緩和作用に起因するものではないかと推測した。そこで、この仮説を証明するために、HepG2 細胞を用いて CGRP の PAI-1 の発現に対する効果を検討した。TGF- $\beta$ 1 により誘導された PAI-1 の培地中タンパク量は、CGRP (10 or 100 nM) 添加により TGF- $\beta$ 1 のみ添加した群に比して、24 時間で有意に減少した。また、CGRP (100 nM) 添加により、TGF- $\beta$ 1 が誘導した PAI-1 の mRNA 量は、TGF- $\beta$ 1 のみ添加した群に比して 4、8 時間で有意な減少を示した。これまでに、CGRP は、神経細胞で cAMP/PKA pathway を活性化させることが報告されている。そこで、PKA の阻害剤の一つである H89 (10  $\mu$ M) を添加した。その結果、TGF- $\beta$ 1 により誘導された PAI-1 の遺伝子発現を抑制していた CGRP の効果が阻害された。また、TGF- $\beta$ 1 pathway には、Smad と Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway が良く知られているが、cAMP/PKA pathway は、MAPK (Extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-jun N-terminal kinase (JNK)、p38) の活性を抑制することが知られている。そこで ERK、JNK、p38 のリン酸化を MAPK ELISA kit

を用いて測定したところ、TGF- $\beta$ 1 により引き起こされた ERK、JNK、p38 のリン酸化のレベルが、CGRP 添加により基礎培地で培養した HepG2 細胞のリン酸化レベルまで戻ることが明らかとなった。これらのことから、UVB 照射により肝臓で増加した TGF- $\beta$ 1 による PAI-1 の発現を増加させる効果は、肝臓で増加した CGRP の cAMP/PKA pathway を介した MAPK (ERK、JNK、p38) pathway の阻害作用により、抑制されたことが示唆された。

#### (4) まとめ

(1)より UVB 照射による血中アディポネクチン濃度の減少は、肝臓で合成された SAA が主要な要因であることが考えられた。また、臓器間の情報伝達に重要な役割を担う CGRP の mRNA 量が、皮膚、視床下部、肝臓で増加していたことから、CGRP の増加を介して、UVB 照射のシグナルが皮膚から脳を介して肝臓に伝わることを示唆された。(2)より肝臓における CGRP の作用は、IL-6 の発現を増加させ、SAA の合成を間接的に制御していることが明らかとなった。これら2つの実験から、UVB 照射のシグナルには CGRP が重要な役割を担っていることが明らかとなった。(3)では、UVB 照射による血中アディポネクチン量の減少による肝臓への影響を検討した結果、肝臓中の TGF $\beta$ 1 が増加していた。このことは、PAI-1 が減少する点と矛盾を生じたが、これらの矛盾の原因の一つに、CGRP が MAPK pathway の活性を抑制することが考えられた。ただし、CGRP の PAI-1 発現の抑制効果は顕著ではなかったため、他の因子も関与することが示唆された。本研究では、UVB 照射による臓器間のシグナルは、皮膚-脳-肝臓 axis を介して CGRP の発現と放出の増加という形で伝わることを提案した。さらに、その情報が身体に伝わることで、脂肪組織におけるアディポネクチン mRNA 量の減少、および血清アディポネクチン量の低下を招くことが示唆された。その結果、皮膚に対する UVB 照射の影響は、直接の皮膚に対する障害に加え、皮膚構成分子の合成に大きく関わる血中アディポネクチン量の減少という形で、内部からも皮膚に悪影響を及ぼすことが示唆された。一方、UVB 照射は肝臓中の CGRP を増加させ、肝線維化の増悪化に重要な役割を担う PAI-1 の発現を減少させる効果を有した。すなわち、UVB 照射シグナルは、CGRP が重要な働きを担い、その効果は、血中アディポネクチン量の減少というネガティブな効果と、肝臓 PAI-1 発現の減少というポジティブな効果、双方の影響を示すことが明らかとなった。



#### 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)

[雑誌論文](計9件)

Yamane T, Nakagami G, Yoshino S, Shimura M, Kitamura A, Kobayashi-Hattori K, Oishi Y, Nishijima Y, Minematsu T, Sanada H., Hydrocellular foam dressings promote wound healing associated with decrease in inflammation in rat periwound skin and granulation tissue, compared with hydrocolloid dressings., *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, 79 巻, 2015, 185-189  
DOI: 10.1080/09168451.2014.968088

Matsui S, Yamane T, Kobayashi-Hattori K, Oishi Y, Ultraviolet B irradiation reduces the expression of adiponectin in ovarian adipose tissues through endocrine actions of calcitonin gene-related peptide-induced serum amyloid A., *PLoS One*, 査読有, 9 巻, 2014, e98040

DOI: 10.1371/journal.pone.0098040

Matsui S, Yamane T, Kobayashi-Hattori K, Oishi Y, Calcitonin gene-related peptide regulates mitogen-activated protein kinase pathway to decrease transforming growth factor 1-induced hepatic plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in HepG2 cells., *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, 78 巻, 2013, 787-790

Hydrocellular foam dressing promotes wound healing along with increases in hyaluronan synthase 3 and PPAR gene expression in epidermis. Yamane T, Nakagami G, Yoshino S, Muramatsu A, Matsui S, Oishi Y, Kanazawa T, Minematsu T, Sanada H., *PLoS One*, 査読有, 8 巻, 2013, e73988  
DOI: 10.1371/journal.pone.0073988

Matsui S, Yamane T, Kobayashi-Hattori K, Oishi Y, Calcitonin gene-related peptide upregulates serum amyloid A synthesis through activation of interleukin-6., *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, 77 巻, 2013, 2151-2153  
DOI: 10.1271/bbb.130450

Matsui S, Yamane T, Takita T, Oishi Y, Kobayashi-Hattori K, The hypocholesterolemic activity of *Momordica charantia* fruit is mediated by the altered cholesterol- and bile acid-regulating gene expression in rat liver., *Nutr. Res.*, 査読有, 33 巻, 2013, 580-585  
DOI: 10.1016/j.nutres.2013.05.002

[学会発表](計6件)

Yamamoto J, Tadaishi M, Yamane T, Oishi Y, Shimizu M, Kobayashi-Hattori K, Hot water extract of edible *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Exert antidiabetic effects in obese diabetic KK-Ay mice., 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 14 日 ~ 18 日、パシフィコ横浜

Iwatsuki K, Aihara E, Jiang P, Kimura A, Yamane T, Oishi Y, Hattori K, Tkahashi N, Shimizu M, Characterization of ex vivo expanded taste-like cells derived from small intestine, 日本農芸化学会、2015 年 3 月 26 日 ~ 29 日、岡山大学

松居翔、服部一夫、大石祐一、UVB ヘアレスマウスの肝臓 IGF-1 と IGFBP-1 遺伝子発現に及ぼす影響、日本栄養・食糧学会、2013 年 5 月 24 日 ~ 26 日、名古屋大学

松居翔、服部一夫、大石祐一、UVB ヘアレスマウスにおける臓器間ネットワークを介した脂肪細胞分化制御因子に及ぼす影響、日本農芸化学会、2013 年 3 月 24 日 ~ 28 日、東北大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 祐一 (Oishi, Yuichi)  
東京農業大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号: 00313073

(2) 研究協力者

松居 翔 (Matusi Sho)