

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860147

研究課題名(和文) ATP及びその受容体を標的とした新規光老化発症機構の探索

研究課題名(英文) Investigation on the involvement of purinergic signaling in the mechanism of photoaging

研究代表者

河野 鮎美 (KAWANO, AYUMI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：30631634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：UVA照射による炎症惹起や角化異常は光老化に大きな影響を及ぼす。本研究では、UVA曝露ケラチノサイトでの炎症性サイトカイン産生と分化異常へのATPの関与について検討した。培養表皮細胞にUVAを照射すると、一過的な細胞外ATP濃度の上昇が観察された。ATP分解酵素またはP2受容体阻害剤はUVA誘導性サイトカイン(IL-1 α , IL-6, IL-8)産生と分化異常を抑制した。これらの結果から、ATPはUVA曝露による光老化発症過程において重要な役割を担っている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The initiation of inflammatory response and dyskeratosis by UVA irradiation has large impact on photoaging. In this study, I examined the involvement of ATP in the production of cytokines and abnormal differentiation of UVA-irradiated keratinocytes. The concentration of extracellular ATP was transiently increased after UVA irradiation. UVA induced the production of cytokines (IL-1 α , IL-6 and IL-8), and changed the expression of differentiation markers, but these UVA-induced cellular responses were suppressed by pretreatment of apyrase and P2 antagonist. These results showed that ATP might be a key player in the onset of UVA-irradiation-induced photoaging.

研究分野：医歯薬学

キーワード：UVA ケラチノサイト ATP サイトカイン 分化

1. 研究開始当初の背景

皮膚老化は、年齢を重ねることによる自然老化と環境要因による老化が組み合わさって進行する。特に、日常的に太陽光に曝されている顔面のしわなどの皮膚老化は、紫外線を長期間浴びることにより進行する老化（光老化）の影響が大きいといわれている。紫外線に曝露された皮膚においては、炎症反応や表皮バリア機能の低下が起こり、乾燥や肌荒れを生じる。光老化は自然老化の進行を加速させるなど皮膚に大きな影響を及ぼすため、早期の解明が望まれている。しかし、光老化は様々な生体因子が密接に関連し、段階的プロセスを経て起こるため、そのメカニズムは複雑である。

地上に到達する紫外線は UVA と UVB の 2 種類である。光子エネルギーの強い UVB は紅斑や日焼けのような急激な反応を起こす一方で、UVA はそのような変化がないため、知らず知らずのうちに浴び続けてしまうことが多い。しかし、皮膚の奥深くまで達して肌内部の組織や機能に徐々にダメージを与えるのは UVA であるため、光老化には UVA がより強く関与していると考えられている。

ケラチノサイトに物理的・化学的刺激または有害物質による化学的刺激が加わると、細胞内から細胞外へと ATP が放出される。放出された ATP は細胞膜上に発現する ATP 受容体（P2 受容体）に結合し、様々な細胞間情報伝達に関与することが報告されている（プリナージックシグナリング）。皮膚に存在するその他の免疫細胞（樹状細胞、表皮ランゲルハンス細胞、肥満細胞など）や線維芽細胞においても、細胞外 ATP 刺激により免疫応答因子の産生を促進することが報告されており、ケラチノサイトから放出される ATP は、皮膚の恒常性

維持や免疫・炎症反応において重要な役割を担っていると考えられる。そのため、光老化過程にも細胞外 ATP が関与していると予測できるが、その詳細機構は不明である。

2. 研究の目的

ケラチノサイトから放出されるサイトカインは炎症・皮膚老化を促進させることが報告されている。

本研究では、培養表皮細胞を用いて、UVA 誘導性サイトカイン産生とケラチノサイト角化異常へのプリナージックシグナリングの関与について検討を行い、UVA 照射により誘導されるストレス応答における ATP の生理的役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト表皮角化細胞株 HaCaT を D-MEM 培地で、通常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を KGM 培地にて培養し、両者とも、常に 80 % コンフルエント以下の密度を保つように播種して継代を行い、実験に使用した。また、ハイドロコチゾンは NHEK におけるサイトカイン産生に影響を与えることが知られており、これを避けるために、UVA 照射 24 時間前にハイドロコチゾンのみを除いた培地に置換した。

(2) UVA 照射による ATP 放出の検討

細胞に UVA を照射し、数分後の培養上清を回収し、ATP 濃度を luciferin-luciferase 反応を用いて測定した。また、ATP 放出機構の各種阻害薬（ヘミチャネル、トランスポーターなど）を前処置することにより、ATP の放出経路を特定した。

(3) UVA 照射によるサイトカイン産生の検討

UVA 照射後のサイトカイン (IL-1 α , IL-6, IL-8) 産生量を ELISA 法にて測定した。また、各種 P2 受容体サブタイプ特異的阻害剤を添加した 30 分後に UVA を照射することにより、サイトカイン産生における責任受容体を同定した。

(4) サイトカイン産生のシグナル伝達経路の解析

MAPK や Akt のリン酸化をウェスタンブロットにて検出した。また、各転写因子リン酸化に対する P2 受容体阻害剤の効果を検討した。

(5) UVA 照射による分化バランス変動へのプリナージックシグナリングの関与の検討

分化マーカーであるケラチン 10、ロリクリン、インボルクリン発現についてウェスタンブロットを行い、UVA が分化に及ぼす影響を評価した。また、それらに対する P2 受容体阻害剤の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) UVA 曝露 HaCaT における結果

① UVA 照射による細胞外 ATP 濃度の上昇

HaCaT に細胞死を伴わないような低線量の UVA を照射したところ、照射直後をピークとして培養上清中の細胞外 ATP 濃度が上昇した。この ATP 放出はヘミチャネル阻害剤により抑制された。また、ヘミチャネル (connexin 43, pannexin 1) が隣接した細胞間のみならず、細胞表面にも発現していることを蛍光免疫染色にて確認した。これらのことから、UVA 照射により ATP はヘミチャネルを介して細胞外へ放出されることが示された。

② UVA 誘導性 IL-6 産生へのプリナージックシグナリングの関与

UVA 照射により、IL-6 産生量が継続的に増

加したが、この反応はヘミチャネル阻害剤、ATP 分解酵素前処置により顕著に抑制された。

また、各種 P2 受容体阻害剤を用いて IL-6 産生への関与を検討したところ、UVA 誘導性 IL-6 産生には P2Y11 並びに P2Y13 受容体が関与することが示唆された。そこで、P2Y11 及び P2Y13 受容体を介した IL-6 産生に関わるシグナル経路について検討した。P2Y11 受容体選択的阻害剤の前処置は UVA 誘導性細胞内 Ca²⁺濃度上昇を抑制し、Ca²⁺選択的キレート剤前処置は UVA 誘導性 IL-6 産生を抑制した。一方、P2Y13 受容体選択的阻害剤の前処置により UVA 誘導性 Akt 活性化は抑制され、PI3K 阻害剤の前処置により UVA 誘導性 IL-6 産生は抑制された。

以上の検討より、UVA 照射によりヘミチャネルを介して細胞外へ放出された ATP は、P2Y11 受容体と P2Y13 受容体を活性化させ、それぞれ細胞内 Ca²⁺濃度の上昇、Akt の活性化を介して IL-6 産生誘導に寄与することが明らかとなった (図 1)。

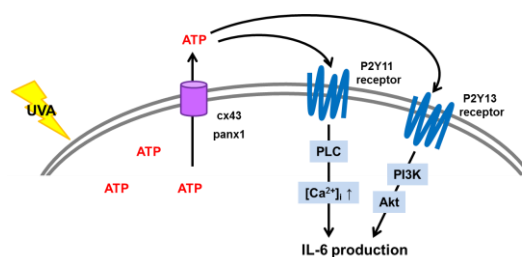


図 1. UVA 曝露 HaCaT におけるプリナージックシグナリングを介した IL-6 産生経路

(2) UVA 曝露 NHEK における結果

① UVA 照射によるサイトカイン産生へのプリナージックシグナリングの関与

NHEK においても、UVA 照射後の速やかな細胞外 ATP 濃度の上昇が観察された。また、UVA 照射は IL-6 のみならず、IL-1 α と IL-8

の産生も誘導した。この UVA 誘導性 IL-6, IL-8 産生は抗 IL-1 α 中和抗体、ATP 分解酵素及び P2Y6 受容体の前処置により抑制された (図 2, 3)。

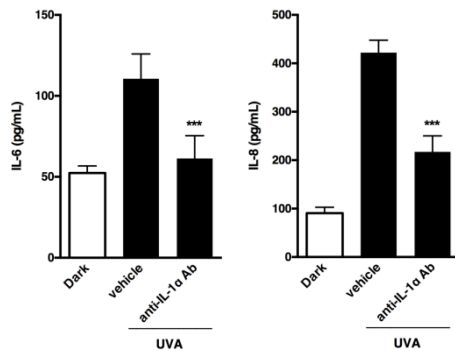


図 2. UVA 曝露 NHEK における IL-6, IL-8 産生に対する抗 IL-1 α 中和抗体の効果

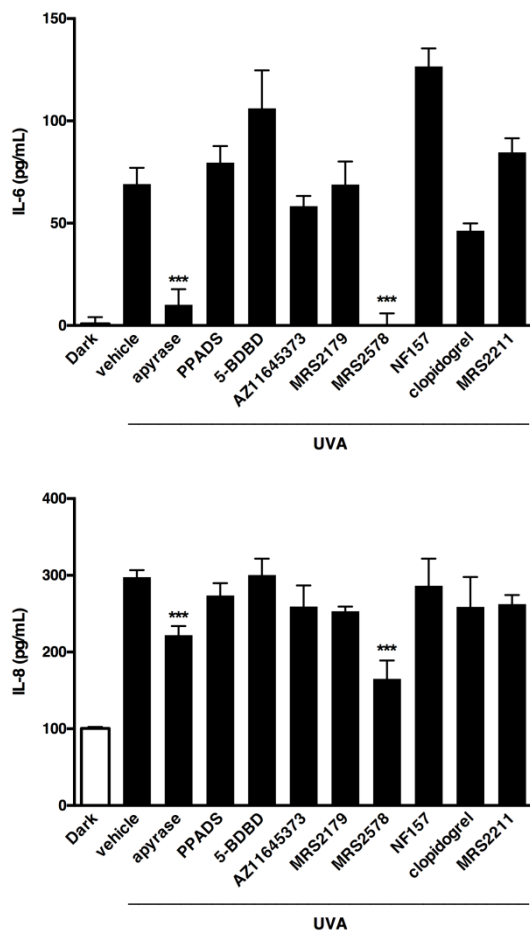


図 3. UVA 曝露 NHEK における IL-6, IL-8 産生に対する各種 P2 受容体阻害剤の効果

(apyrase: ATP 分解酵素, MRS2578: P2Y6 受容体阻害剤)

② UVA 照射による分化異常へのプリナージックシグナリングの関与

UVA 照射はケラチノサイト分化マーカーであるケラチン 10 とロリクリンの発現を減少させ、インボルクリンの発現を上昇させた。これら分化マーカーの発現変動は、ATP 分解酵素及び P2Y6 受容体阻害剤の前処置により抑制された。

以上の結果より、UVA 照射により細胞外に放出されたヌクレオチドは、P2Y6 受容体を活性化させ、炎症性サイトカイン産生と分化異常を誘導することが示された。

(3) 研究の総括

UVA 曝露により細胞内から ATP が放出され、P2Y 受容体の活性化を介してサイトカイン産生や分化異常が誘導されるという新規メカニズムが明らかとなった。UVA 誘導性サイトカイン産生における ATP 責任受容体が HaCaT と NHEK とで異なることが示されたが、HaCaT は NHEK と比較して分化能が劣ること、P2 受容体はケラチノサイト分化段階により発現様式が異なることが原因ではないかと推察される。

本研究結果により、ATP は UVA 曝露を起因とした皮膚疾患の予防・治療法の標的として有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ① Kawano, A., Kadomatsu, R., Ono, M., Kojima, S., Tsukimoto, M., Sakamoto, H.

Autocrine Regulation of UVA-Induced IL-6
Production via Release of ATP and
Activation of P2Y Receptors, *PloS one* 10 (6),
e0127919. 2015.
DOI:10.1371/journal.pone.0127919 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

① 原田 美香、河野 鮎美、田中 晴菜、小
島 周二、月本 光俊、坂本 光、UVA 曝露
ケラチノサイトにおけるプリナージックシグ
ナリングを介した炎症性サイトカインの産生、
日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、
パシフィコ横浜（神奈川）

② 田中 晴菜、河野 鮎美、小島 周二、月
本 光俊、坂本 光、UVA 誘導性ケラチノサ
イト分化異常への ATP シグナリングの関与、
日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、
デザイン・クリエイティブセンター神戸（兵
庫）

③ 河野 鮎美、門松 玲滯、小野 望有、月
本 光俊、小島 周二、坂本 光、ATP シグ
ナリングを介した新規 UVA 誘発性 IL-6 産生
機構の解析、2014 年 10 月 16 日、第 87 回日
本生化学会大会、国立京都国際会館（京都）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/RI/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 鮎美 (KAWANO, Ayumi)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：30631634