

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：85202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860909

研究課題名(和文)角質層から求める皮膚老化度 -新規老化マーカーの探索と評価方法の確立-

研究課題名(英文)A Proteomics Approach to Explore the Indicators of Photo-Aging from Human Skin: Identification of Novel Biomarker Candidates and Development of an Estimation Method for Photo-Damaged Levels.

研究代表者

牧野 正知(MAKINO, MASATOMO)

島根県産業技術センター・生物応用科・主任研究員

研究者番号：30529582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚は太陽光UVによって老化し、その結果生じた表現系変化を光老化という。本研究では培養した表皮角化細胞と真皮線維芽細胞にUVA1を照射し、発現変動する蛋白質の同定を試みた。定量的ショットガンプロテオミクス解析の結果、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞からそれぞれ16蛋白質と62蛋白質が同定できた。このうち幾つかについてはこれまで報告のない新規変動蛋白質であった。本研究で見出された変動蛋白質は、ヒト皮膚から光老化指標を探索する上での一助となる。

研究成果の概要(英文)：Aging of the skin is promoted by exposure of solar UV radiation, a process accordingly termed photo-aging. Despite the well-documented effects of short wave UVB, the biological impacts of long wave UVA1 rays on human skin have not been investigated so far. The author hypothesized that photo-aging related proteins exist in experimentally UVA1 irradiated both cultured human epidermal keratinocyte and cultured dermal fibroblast, which will be clinically used to estimate photo damaged levels. In order to identify such proteins, quantitative shotgun proteomics studies with isobaric labelings were performed. Total 1479 and 1397 proteins were identified and statistical comparison showed clear UVA1 molecular signatures with modulations of expression of 16 and 62 proteins in epidermal keratinocyte and dermal fibroblast, respectively, some of which have not been reported before. These newly discovered proteins will help to explore the indicators of photo-aging levels from human skin in vivo.

研究分野：蛋白質科学、食品工学、蛋白質結晶学

キーワード：老化 紫外線 バイオマーカー 皮膚 プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚は、外部刺激に対しての感知・応答、熱の交換、物質の透過排泄といった多機能性を有し、体の表面全体を覆うことで境界を形成する人体最大の臓器組織である。内臓と同様に経時的に老化し、老廃物の蓄積、機能性蛋白質の劣化、細胞内シグナル伝達の破綻などから組織障害を惹起し退行性変化するという、プログラムされた老化プロセスをたどる。また外界に露出している特徴上、外的ストレスに直接的に曝されるため、存在環境に依存した老化現象が上乘せされることになる。

皮膚老化を進行させる外的ストレスは、タバコの煙、環境ホルモンやホルムアルデヒドなど化学物質のほか、電離線、乾燥なども含まれる。そして最も深刻でかつ避けられないストレスが太陽光に含まれる紫外線(UV)への曝露である。それによって受ける分子レベル、細胞レベルでのダメージの蓄積から生じたシワやシミ、たるみなどの表現系変化を光老化という。

一般に皮膚の老化度は、シワの数や深さ等の外観、皮膚の水分量、脂質量及びその組成、皮膚の pH 測定といった物理的計測によって評価することができる。また光老化度に限っては、日常的に日光に曝されている部位と曝されていない部位(例えば顔面と臀部など)の比較により推定することもできる。しかしこれらの方法は表現系を調べるため、皮膚内部で進行している老化状況を評価することは困難であった。そのため細胞・分子レベルでの老化の兆候、特に UV 曝露に伴う蛋白質レベルでの変化を捉えることで光老化の度合いを評価できると考え、本研究計画を想起するに至った。

UVは波長によってUVA(320–400 nm)、UVB(290–320 nm)、UVC(100–290 nm)に分類される。この中で最もエネルギーが高く、人体にとって危険なUVCは、大気中のオゾン層や酸素分子によって吸収され地表には届かず光老化には寄与しない。一方、UVBはUVAと比較して1000倍程度エネルギーが強く、日光曝露に引き続き起こるサンタンやサンバーンのほか、皮膚の炎症、免疫抑制、核DNAの直接的な損傷などが知られており、ひいては皮膚ガンを誘導すると考えられている。そのためこれまでにUVB曝露によって影響を受ける蛋白質やサイトカイン(COX-2、NOS、VEGF、PG、PGE2、ラミニン、インテグリン、インターロイキンなど)、関連するシグナル伝達経路などの詳細について研究が進んできた。一方、UVAはそのエネルギーの低さのため、UVBほどこれまで注目されてこなかったが、真皮組織において活性酸素種(Reactive Oxygen Species, ROS)を発生させ、間接的に真皮蛋白質の変性やDNA損傷を誘発するほか、ROS感受性シグナル伝達経路を刺激して蛋白質分解酵素群の発現を

誘導することから、やはり光老化への関与が示唆されてきた。さらに近年になって①UVAは皮膚透過力が強いこと、②UVAの輝度は緯度や天候に左右されにくいこと、③太陽光にはUVAが豊富にふくまれていることなどの特徴のため、直接的かつ急性的な反応を誘導するUVB曝露よりも、むしろ間接的かつ慢性的な反応を誘導するUVA曝露の方が、光老化に深く関与すると考えられるようになってきた。このような状況にあるにも関わらずUVA曝露によって影響を受ける蛋白質に関する知見は限られていた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、培養した表皮角化細胞と真皮線維芽細胞にUVAを曝露させ、プロテオミクス的手法により網羅的発現変動解析し、光老化に関連する蛋白質を明らかにすること、引き続きその結果を非侵襲的手法で取得可能なヒト表皮、ひいては角質層といった*in vivo*試料に展開して検出を試みること、最終的にその検出方法について開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料調製

表皮角化細胞と真皮線維芽細胞として、それぞれHaCat細胞(DKFZより入手)とNormal human dermal fibroblast (NHDF, Lonza)を用いた。それぞれの細胞を150 mm dishでコンフルエントになるまで培養し、UVAを5 J/cm<sup>2</sup>/day曝露して人工的に光老化させたものと、比較のためUVAを曝露させなかったものをそれぞれ調製した(それぞれn=4で実施)。UVAは波長により340–400nmのUVA1と320–340 nmのUVA2に分類されるが、本実験では、エネルギーのより低いUVA1による影響を評価するため、図1に示す輝度分布を持ったランプを選択した。後述する細胞生存率の検討から最終的にHaCat細胞とNHDF細胞に対してそれぞれ35 J/cm<sup>2</sup>と45 J/cm<sup>2</sup>の曝露量を設定した。

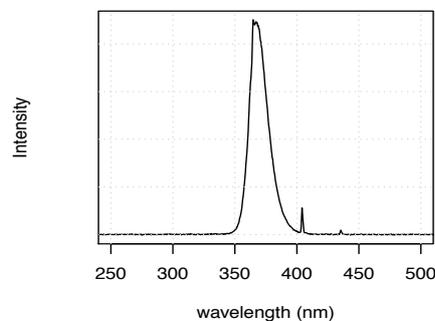


図1 実験に使用したUVA1ランプの輝度分布

### (2)UVA1曝露による細胞ダメージの評価

5 J/cm<sup>2</sup>のUVA1をHaCat細胞とNHDF細胞にそれぞれ暴露した際に発生するROSを、dihydro ethidiumによる蛍光染色を用いたハイコンテンツ解析法で評価した。またUVA1暴露量と細胞生存率の関係についてもPropidium iodideを用いた同様の蛍光染色法で評価した。

### (3)UVA1 暴露による発現変動蛋白質の同定

#### ①試料調製方法

UVA1 暴露により、発現変動する蛋白質を同定するために、本研究では、定量的ショットガンプロテオミクスの手法を採用した(図2)。細胞試料は相間移動可溶化法により可溶化し、これを還元アルキル化したのち、トリプシン消化した。得られたトリプシン試料に含まれる界面活性剤を除去したのち、安定同位体標識試薬としてサーモフィッシャー社のTMT10plex isobaric label reagent kitを使用して、ラベル化を行った。各ラベル化された試料を等量ずつ混合したのち、強陽イオン交換カラムを保持したStage Tipに供し、TFAグラジエント法により7分画したものをLC-MS/MS分析試料とした。

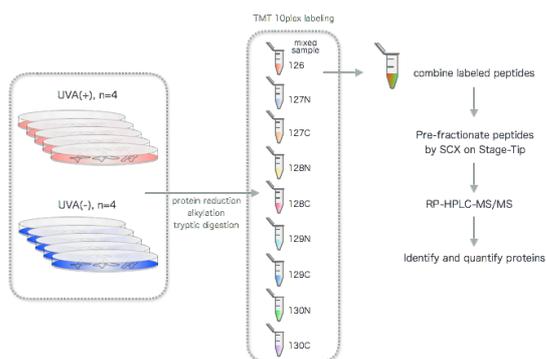


図2 実験ワークフロー

#### ②蛋白質の同定と定量解析

分画したペプチド試料の質量データはnanoLC-MS/MSで測定した。蛋白質の同定はマトリクスサイエンス社のMASCOTを用い、レポーターイオン強度による定量解析はサーモフィッシャー社のProteome Discovererを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1)UVA1 暴露が与える細胞への影響

5 J/cm<sup>2</sup>のUVA1暴露により発生するROS量は、UVA1非暴露の場合のそれと比較して有意差はなかった(図3)。次にUVA1暴露量と細胞生存率を評価したところ45 J/cm<sup>2</sup>までの暴露量において、HaCat細胞、NHDF細胞ともそれぞれ細胞生存率は若干低下した(図4)。またUVAを暴露させなかった9日目のものと比較するとNHDF細胞においては有意に細胞生存率が下がっていた。一方HaCat細胞において有意差は見られなかったが35 J/cm<sup>2</sup>の時点で若干の細胞肥大が観察された。このことより5 J/cm<sup>2</sup>の暴露で検

出できるほどのROSは発生しないが、繰り返し暴露させることによってダメージが蓄積していると考えられた。

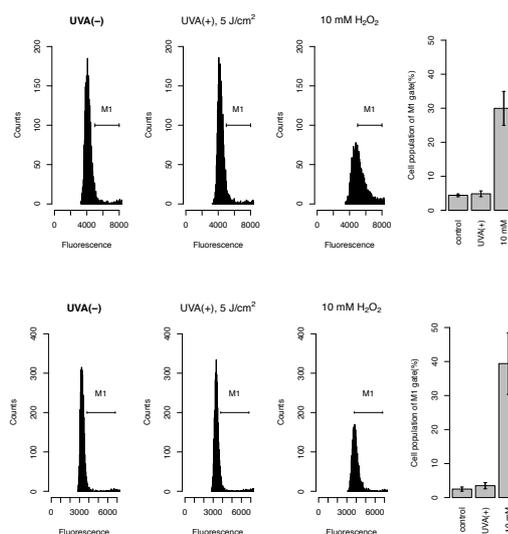


図3 活性酸素量(上図, HaCat細胞、下図, NHDF細胞) 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はポジティブコントロールとして添加

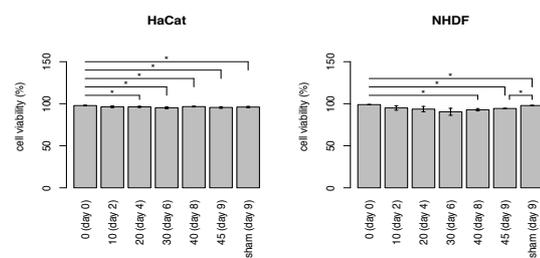


図4 UVA1 暴露量と細胞生存率

\*は有意差( $p < 0.05$ )があることを示す。横軸の数値はUVA1暴露量である(J/cm<sup>2</sup>)。

#### (2)発現変動する蛋白質

図2の実験ワークフローに従いHaCat細胞由来試料とNHDF細胞由来試料から、それぞれ1582蛋白質と1472蛋白質を同定した(それぞれ12018ペプチドと11914ペプチド(FDR<0.01))。そのうちTMTレポーターイオン強度の相対比較から1479蛋白質と1397蛋白質において定量情報が得られた。Welch検定を用いた2群比較から有意に変動した蛋白質としてHaCat細胞由来試料で16蛋白質、NHDF細胞由来試料から62蛋白質を同定するに至った(adjusted  $p$ -value<0.05, fold change1.3以上あるいは0.77以下, 図5)。

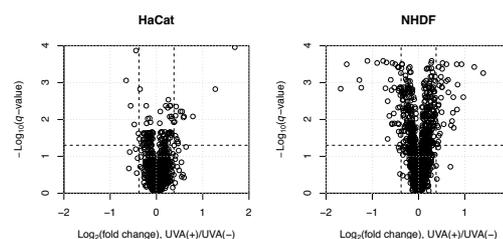


図5 volcano plot

このうち NHDF においてコラーゲンの発現減少、膜貫入型 MMP-14、Heam oxygenase-1 の発現上昇が確認され、これらの現象は既に報告のあるとおりであった。一方で今回の研究より新規に発現変動蛋白質として同定されたものも幾つかあり、今後別の実験手法により検証を進めたい。そして UVA1 による影響の裏付けされた変動蛋白質については、真皮組織における光老化度の判定指標としての活用に向けての研究へ展開したいと考えている。

HaCat 細胞由来試料から見出された発現変動蛋白質数は NHDF 細胞由来試料のそれと比較すると少ない結果となった。表皮はエネルギーの高い UVB に曝される運命であり、そのためカタラーゼや SOD-1、SOD-2 といった抗酸化酵素の発現レベルが真皮線維芽細胞のそれらと比較して高いことが知られており、それゆえ酸化ストレスに応答する蛋白質間ネットワークや修復システムも整っていることが予想されている。これらの要因が今回の実験結果である、表皮角化細胞の UVA1 に対する感受性の低さに反映されたのではないかと考えている。あるいは蛋白質の発現変化量自体が小さく、本研究で採用した手法では検出できなかったとも考えられるため、UVA1 負荷量や検出方法などについては再検討する必要がある。興味深いことに今回の研究で見出された UVA1 暴露により HaCat 細胞において発現が変動する蛋白質には、NHDF 細胞におけるそれと共有のものもあり、真皮細胞での光老化が表皮細胞へ与える影響についても今後検討されなければならない。

本助成事業によって、培養皮膚細胞から光老化に関係すると予想される蛋白質の探索まで行った。今後、本結果の検証を進めるとともに *in vivo* における評価を行い、最終的には表皮や、表皮角質層といった非侵襲的に採取できる生体皮膚試料から光老化度を判定できる仕組みの開発まで展開したいと考えている。

## 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牧野正知 (MAKINO MASATOMO)  
島根県産業技術センター・生物応用科・  
主任研究員

研究者番号 : 30529582