

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 8 年 6 月 8 日現在

機関番号： 3 2 6 5 7

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2014 ~ 2015

課題番号： 2 6 8 7 0 6 1 0

研究課題名 (和文) カスパーゼ14発現増強を介した皮膚保湿改善機構の開発

研究課題名 (英文) Development of novel skin moisturizer, activating Caspase 14 expression

研究代表者

長原 礼宗 (NAGAHARA, YUKITOSHI)

東京電機大学・理工学部・准教授

研究者番号： 8 0 3 8 5 4 8 4

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,100,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究ではスフィンゴイド塩基を介した皮膚保湿機能改善のしくみを明らかにすることを目指した。

まず、角化細胞に種々のスフィンゴイド塩基を作用させたところ、皮膚保湿に関与する酵素、カスパーゼ14の発現を増強させることが可能であった。このカスパーゼ14発現増強は、MAPキナーゼの一種であるJNKやp38のリン酸化亢進が関与していることが示唆された。また、スフィンゴイド塩基の塗布により、カスパーゼ14発現増強を介し皮膚保湿機能を向上できていることをin vivoにおいても明らかにできた。

研究成果の概要 (英文) : We evaluated the mechanism of skin moisture maintaining system involving sphingoid bases. Sub-micromolar doses of sphingoid bases treatment, that doses do not damage cells, were treated on human keratinocyte cells. Caspase-14 mRNA level and protein level was upregulated dose-dependently on HaCaT cells. Furthermore, sphingoid bases-induced caspase-14 was involved of MAPK, especially JNK and p38.

Affecting sphingoid bases to mouse skin resulted in upregulation of caspase-14, presuming that sphingoid bases could maintain skin barrier in vivo.

研究分野： 生化学

キーワード： カスパーゼ スフィンゴイド塩基 MAPキナーゼ 皮膚 保湿

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚の角質層は角化細胞が分化した角質細胞と、その隙間を埋めている細胞間脂質から構成され、外部からの異物侵入を防ぐバリア機能や水分保持機能を有する。角化細胞が角質細胞に分化する際、細胞中のタンパク質の一種フィラグリンが分解して天然保湿成分(NMF)が生成される。NMF は水を吸着する性質が強く、水分を角質層に保持する。NMF の生成向上は皮膚保湿能を上昇させる鍵となっており、そのためにはフィラグリンの産生上昇だけではなく、フィラグリンを分解する酵素の活性化が必須である。

(2) 一方細胞死の一種、アポトーシス時に活性化するタンパク質分解酵素、カスパーゼの中でもカスパーゼ 14 は角化細胞に豊富に存在し、アポトーシスとは無関係にフィラグリンを分解して NMF を生成し、角質層の水分保持機能の維持に関与する。つまり、カスパーゼ 14 を効果的に発現誘導、活性化させる物質は、皮膚保湿機能の改善につながる。しかしながら、どのような物質がカスパーゼ 14 発現促進を引き起こすのかについて、これまでほとんど検討が行われていなかった。

(3) スフィンゴイド塩基は細胞増殖・分化・細胞死(アポトーシス)といった生体制御に重要な役割を果たす脂質の一種である。これまでに、細胞死における細胞内情報伝達機構について研究が進んでいるが、細胞増殖や分化時における情報伝達機構は未だによくわかっていない。スフィンゴイド塩基による皮膚保湿改善策としてこれまで、脂質であることから NMF としての利用や、角化細胞に細胞死を引き起こし、ターンオーバー促進を狙う試みが中心であった。しかしながら、従来の利用法では NMF として皮膚に塗布する場合、洗い流されてしまい効果は一時的となってしまう。また、不要となった細胞のターンオーバー促進を引き起こす濃度でスフィンゴイド塩基を利用することは DNA 合成を阻害することになり、正常細胞までも傷害を誘導してしまう結果につながるため、問題が多かった。

2. 研究の目的

本研究ではカスパーゼ 14 発現増強を介して皮膚の保湿機能の衰えを予防および/または改善することを可能にすべく、まずカスパーゼ 14 発現増強作用を有するスフィンゴイド塩基の特定を行った。その後有意にカスパーゼ 14 発現増強を起こしたスフィンゴイド塩基を用いて、スフィンゴイド塩基のカスパーゼ 14 発現増強機構の解明を行った。また、実験動物へのスフィンゴイド塩基塗布の効果を検討することで、スフィンゴイド塩基を介した皮膚保湿機能改善のしくみを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞株の培養

本研究にはヒト角化細胞 HaCaT をモデル細胞として用いた。細胞は 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で培養し、対数増殖期の細胞を実験に供した。

(2) MTT 法による細胞傷害性の確認

HaCaT 細胞をプレートに播種してスフィンゴイド塩基を添加後、48 時間作用させて MTT 法によりコハク酸デヒドロゲナーゼ活性を測定することで細胞傷害性を検討した。

(3) リアルタイム RT-PCR 法によるカスパーゼ 14 の mRNA 発現レベル解析

HaCaT 細胞から RNA を抽出し、逆転写反応(RT)による cDNA 合成を行った。cDNA を鋳型とし、Polymerase chain reaction (PCR)反応で DNA を増幅、リアルタイム PCR 装置にセットし、リアルタイム PCR 反応を行った。反応終了後、 $\Delta\Delta C_t$ 法によってカスパーゼ 14、また対照として GAPDH 遺伝子の発現量を比較した。

(4) ウェスタンブロッティング法によるタンパク質の解析

HaCaT 細胞よりタンパク質を可溶化した。可溶化液中のタンパク質濃度は BCA 法を用いて測定し、各サンプルを一定濃度のタンパク質に調整後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、PVDF 膜に転写した。一次抗体としてカスパーゼ 14、リン酸化 JNK、JNK、リン酸化 p38、p38、リン酸化 ERK、ERK、また対照として β -actin に結合する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、化学発光法にてそれぞれのタンパク質バンドを検出した。

(5) マウス皮膚へのフィトスフィンゴシン塗布の影響解析

6~8 週齢の ICR マウス(♂)の背部を除毛した。除毛部位に 1 日 1 回、親水性ワセリンにフィトスフィンゴシンを混ぜたものを 3 日間塗布した。皮膚はその後切除して RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法によりカスパーゼ 14、また対照として GAPDH 遺伝子の発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) スフィンゴイド塩基によるカスパーゼ 14 の発現上昇

まず、本研究ではスフィンゴイド塩基として C2 セラミド、スフィンゴシン、スフィンガニン、フィトスフィンゴシンといった細胞内に透過するスフィンゴイド塩基、またセラミドにおいては、細胞内に透過しにくい側鎖長が長いセラミドも用いて、どのような構造がカスパーゼ-14 の発現上昇を引き起こすかどうかを検討した。

MTT 法による細胞生存率の測定により、ス

フィンゴイド塩基の濃度が 15 μM までは HaCaT 細胞にほとんど細胞傷害性を与えることがないことが判明した。特に、細胞内を透過しにくい長鎖のセラミドでは、全く HaCaT 細胞に傷害を与えることがなかった。

そこで、細胞傷害性が全く起こらない、数 μM の濃度でスフィンゴイド塩基を HaCaT 細胞に 48 時間作用させ、カスパーゼ 14 の発現を検討した。その結果、細胞透過性を有するスフィンゴイド塩基でカスパーゼ 14 の mRNA 発現が上昇した (図 1)。また、側鎖長が長く、細胞傷害性がかなり低いセラミドを作用させてもカスパーゼ 14 mRNA の発現上昇が観察された (図 2)。

また、各種スフィンゴイド塩基を作用することでカスパーゼ 14 のタンパク質発現上昇も検出された。

本研究において、もっともカスパーゼ 14 の発現上昇を促進させたフィトスフィンゴシンを今後の研究に用いることとした。

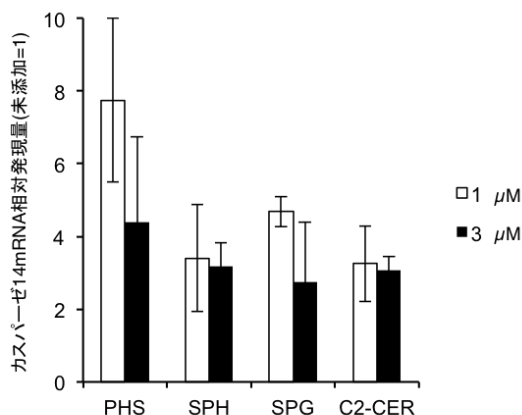


図1 スフィンゴイド塩基によるカスパーゼ14の増加(リアルタイムRT-PCR) (PHS=フィトスフィンゴシン、SPH=スフィンゴシン、SPG=スフィンガニン、C2-CER=C2セラミド)

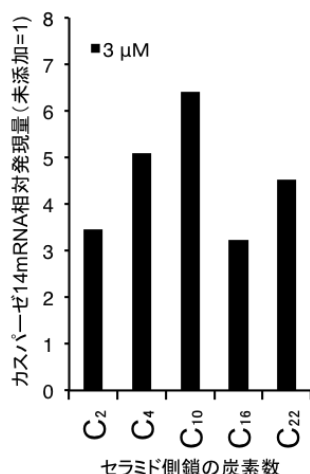


図2 セラミド側鎖長の違いによるカスパーゼ14の増加(リアルタイムRT-PCR)

(2) カスパーゼ 14 の発現に関与する酵素の探索

フィトスフィンゴシンによるカスパーゼ 14 の発現増強がどのように細胞内で制御されているのかを検討した。フィトスフィンゴシン作用によって発現が変化するタンパク質を網羅的に解析するとともに、タンパク質細胞内シグナル伝達経路の中で、これまでにフィトスフィンゴシン作用により影響があるとの報告のある、MAP キナーゼカスケードへの影響を検討した。

3 μM のフィトスフィンゴシンを 48 時間作用させることによって MAP キナーゼの一種である p38 のリン酸化量が増強したことがリン酸化部位特異的に反応する抗体を用いたウェスタンブロット法により明らかになった。JNK のリン酸化量は 48 時間作用後、フィトスフィンゴシン未添加対象と比べるとあまり変化はなかった。また、ERK のリン酸化量はフィトスフィンゴシン添加により減少した。

また、JNK、p38 に特異的な阻害剤を用いてリン酸化を抑制させるとカスパーゼ 14 の発現増強は抑制された。対して、ERK 阻害剤ではカスパーゼ 14 の発現に変動はなかった (図 3)。

(3) マウス皮膚へのフィトスフィンゴシン塗布によるカスパーゼ 14 の発現上昇

ICR マウスの背部を除毛し、除毛部位に 1 日 1 回フィトスフィンゴシンを塗布した。3 日後における皮膚でのカスパーゼ 14 mRNA 発現を検討した結果、優位にフィトスフィンゴシン塗布によってカスパーゼ 14 mRNA の発現上昇が起きた。

(4) まとめ

本研究の結果、スフィンゴイド塩基にはカスパーゼ 14 を発現増強させる効果があり、またその発現増強には MAP キナーゼの一種である p38 が関与していることが明らかになった。

スフィンゴイド塩基は顆粒層におけるオドランド小体の内容物であり、細胞間隙に放出され、角化における層状膜形成機構の制御や保湿に関与することが報告されてきた。それゆえ、これまでにスフィンゴイド塩基による皮膚機能改善効果は天然保湿因子としての効果が大いと考えられてきた。しかしながら、本研究ではスフィンゴイド塩基がそれ自身が細胞死を誘導することのない低濃度において、NMF の元となるタンパク質、フィラグリンを分解する酵素、カスパーゼ 14 を合成促進させることを明らかにし、スフィンゴイド塩基による皮膚機能改善の新たな側面を見いだすことができた。また本研究の結果、スフィンゴイド塩基は細胞内に透過してカスパーゼ 14 の発現を促す効果だけではなく、浸透せずに細胞膜状の受容体と結合することでカスパーゼ 14 の発現を上昇させている可能性が示唆された。

また本研究において、細胞内シグナル伝達経路関連酵素である MAP キナーゼの一種、p38

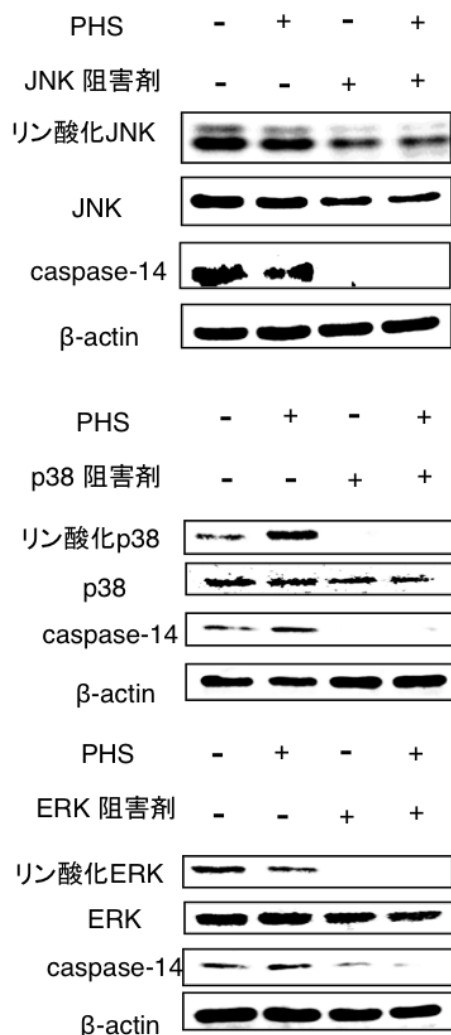


図3 フィトスフィンゴシンによる
カスパーゼ14とMAPキナーゼの関与(PHS=
フィトスフィンゴシン)

や JNK がカスパーゼ 14 の発現増強に関与することが解明できた。このことから、p38 や JNK を活性化する化合物はカスパーゼ 14 の発現増強を引き起こすことで皮膚機能改善に寄与する可能性が考えられる。

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 3 件)

Yukitoshi Nagahara, Kei Kawakami, Keisuke Sunaga, and Takahisa Shinomiya. Sphingolipids upregulated caspase-14 expression by involvement of MAPK. PACIFICHEM2015. Dec. 18 2015, Honolulu (USA).

川上慶、長原礼宗. 鎖長の異なる Ceramide 作用によるカスパーゼ 14 発現量

の変化. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回 日本生化学会合同学会 (BMB2015). 2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド(神戸).

Yukitoshi Nagahara, Ryo Nishikawa, Kei Kawakami, Keisuke Sunaga, and Takahisa Shinomiya. Ceramide analogs upregulated caspase-14 expression on HaCaT cells. 15th IUBMB 24th FAOBMB-TSBMB conference. Oct. 23 2014, Taipei (Taiwan).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.b.dendai.ac.jp/~biochem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長原 礼宗 (NAGAHARA Yukitoshi)

東京電機大学理工学部理工学科生命理工学系・准教授

研究者番号：80385484