

スキン伝達物質 ATP と皮膚のアンチエイジングに関する研究

山梨大学医学部薬理学

小泉 修一

Skin cells release ATP that affects a big variety of functions of adjacent cells. However, the mechanisms underlying its release remain largely unclear. Here, focusing on VNUT (vesicular nucleotide transporter), we show that skins release ATP by a mechanism of Ca^{2+} -dependent exocytosis in normal human epidermal keratinocytes.

1. 緒言

老化は避けられない問題であるが、適切な処置で老化を遅らせる所謂「抗老化（アンチエイジング）」により、生活の質（QOL）を格段に高めることができる。皮膚は体を覆う最も大きな臓器であり、体内、細胞内を外界から守る重要な役割を果たすが、最外層に位置することから美容の側面からも、その老化は重要な問題となる。皮膚は老化により、表皮の代謝回転、角質層の機能不全によるバリア機能及び水分保持機能が低下し、さらに皮脂の分泌が減少する。こうした皮膚の質的な変化等により皮膚の乾燥、シミ、シワ及びたるみが生じる。現在、アンチエイジング効果を呈するとして頻用される外用剤に、レチノイドがある。レチノイドによるアンチエイジング効果の分子メカニズムには不明な点が多く、また、レチノイドによる、色素沈着、炎症等の負の作用も少なからず報告されている。申請者はこれまでに、細胞外 ATP 及びその受容体である P2 受容体が表皮ケラチノサイト間の情報連絡で最も重要な因子の一つであること、さらに、ATP/P2Y2 受容体シグナルが各種刺激及び炎症時に劇的に亢進すること、レチノイドが P2Y2 受容体の発現を亢進させることをこれまでに明らかとしてきた。レチノイドの副作用に、ATP/P2Y2 受容体シグナルの亢進が示唆されているが、これらのシグナルと皮膚の機能、老化にどのような影響を与えるかについては、殆ど解っていない。また、ATP シグナルの引き金となる ATP 放出のメカニズムは全く明らかとされていない。本研究では、皮膚から放出される「スキン伝達物質」である ATP 放出の分子メカニズム、さらに皮膚 ATP/P2Y2 受容体活性化が表皮ケラチノサイトの生理機能に与える影響及びその分子機序を精査することにより、新しい皮膚のア

ンチエイジング効果を有する薬物の開発に直接結びつく基礎データを提示することを目的とする。

2. 実験

2.1 細胞培養

ヒト正常表皮ケラチノサイト（NHEK）の培養は既報に従った^{1,2)}。ATP 放出は、既報によるルシフェリルシフェラーゼ法³⁾により行った。また、ATP 開口放出は、蛍光 ATP（MANT-ATP）及び quinacrine をプローブとして用い、それぞれ共焦点レーザー顕微鏡及び全反射蛍光顕微鏡（TIRF）解析により可視化した。

3. 結果及び考察

3.1 スキン伝達物質 ATP 放出の分子メカニズムの解明

申請者らは既に、NHEK を用いた研究から、NHEK は各種刺激に応じて ATP を細胞外に放出することを明らかとした（Koizumi et al. 2004）。そこで、先ず Ca^{2+} イオノフォア（ionomycin）により惹起される NHEK からの ATP 放出を luciferine-luciferase 法により観察した。図 1 のように、NHEK は ionomycin の濃度依存的に、細胞外に ATP を放出した。この放出は、細胞内 ATP キレート剤である BAPTA-AM により消失し、小胞型 H^+ ATPase の阻害剤 bafilomycin A1 によっても有意に抑制された（図 2）。これらは、NHEK からの ATP 放出が Ca^{2+} 依存的であること、酸性小胞依存的であることを意味し、ATP 放出が開口放出であることを強く示唆する。そこで、開口放出に関係する SNARE 蛋白質をボツリヌス毒素により切断したところ、やはり ATP の放出は有意に抑制された（データは示さず）。従って、NHEK は開口放出のメカニズムにより ATP を細胞外に放出していることが明らかとなった。

3.2 スキン伝達物質 ATP 開口放出の可視化

次に、NHEK における ATP 含有小胞の有無、またこの ATP 小胞が開口放出により放出される様子を可視化し、皮膚における ATP の開口放出の存在を直接明らかとした。NHEK を蛍光 ATP アナログである MANT-ATP と 8 時間インキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡（ex. 405nm）



Anti-aging of skin mediated by skin-transmitter ATP

Schuichi Koizumi

Department of Neuropharmacology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi

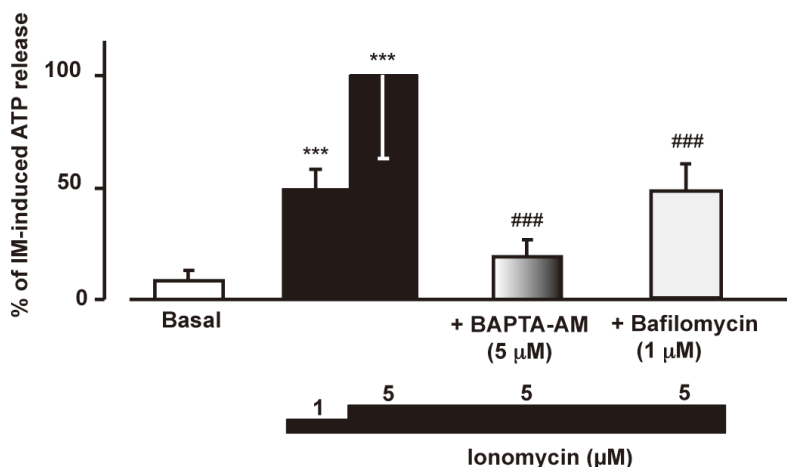
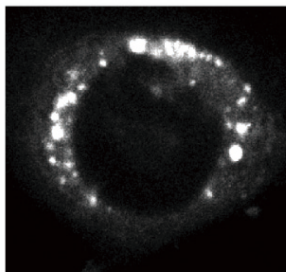


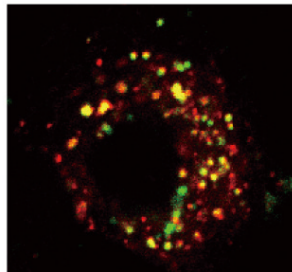
Figure 1 The effects of BAPTA-AM and bafilomycin A1 on ionomycin (IM)-induced release of ATP from NHEKs

ionomycin evoked an increase in extracellular ATP in a concentration-dependent manner. The ionomycin (5μM) -evoked release of ATP was significantly decreased by BAPTA-AM, an intracellular Ca²⁺ chelator or bafilomycin A1, an inhibitor of vesicular H⁺-ATPase. ***P<0.001 vs. Basal; ###P<0.001 vs. ionomycin (5μM).

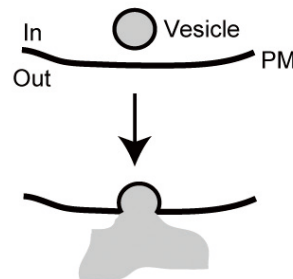
A. MANT-ATP



B. Quinacrine



C. Cartoon of exocytosis



D. De-staining of fluorescent signals of individual quinacrine vesicles

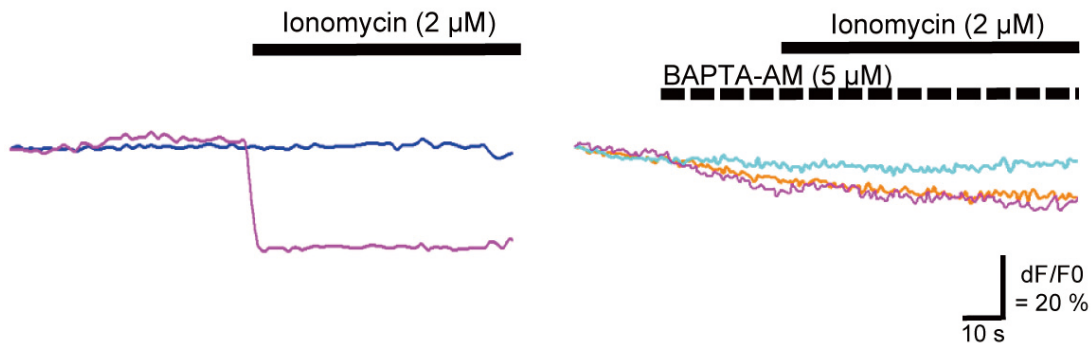


Figure 2 Visualization of exocytosis of ATP

ATP vesicles were visualized by the fluorescent ATP analogue MANT-ATP (A) and quinacrine (B) in NHEKs. MANT-ATP and quinacrine signals were obtained from confocal laser microscopy and TIRF microscopy, respectively. (C) Schematic cartoon of exocytosis of quinacrine-positive vesicles. (D) The time course of the de-staining of quinacrine-fluorescence by ionomycin in single-vesicles in the absence (left) and presence of BAPTA-AM (right).

を用い、蛍光ATPのシグナルを観察した。図2Aのように、蛍光ATPは小胞状の形態を呈し、細胞膜近傍に多く観察された。次に、このキネティックスを解析するため、NHEKをよりキネティックス解析に適したquinacrineと15分間インキュベートし、全反射顕微鏡 (TIRF) にてその挙動を観察した。図2Bのように、quinacrineシグナルも小胞状の形態を呈した。もし開口放出が惹起される場合には、図2Cにしめすように、このquinacrine蛍光が、細胞膜 (PM) に移動・ドッキング・開口することにより細胞外に出て行くため、quinacrine蛍光の消失が惹起されるはずである。Ionomycinを添加すると、quinacrine蛍光は、小胞毎にことなるキネティックスで消失し、これはBAPTA-AMによりほぼ消失した (図2D)。以上、NHEKはATPを放出すること、その放出メカニズムは開口放出であること、さらにその開口放出を可視化することが可能となった。

3.3 スキン伝達物質ATP開口放出の責任分子同定

ATPが開口放出されるためには、細胞内で細胞質のATPを小胞に取り込む小胞型ATPトランスポーターの存在が必要である。2008年、森山らのグループは、このトランスポーターとしてSLC17A9を見出し、VNUT (vesicular nucleotide transporter) と命名した⁴⁾。まず、我々は皮膚にVNUTが存在するか否かを確認した。VNUT抗体を用いた免疫染色法により皮膚切片 (図3a) 及びNHEK (図3b) にVNUT陽性シグナルを見出し、またこれはWestern blottingによっても特異的バンドとして確認できた (図3c)。このVNUTをRNA干渉法 (VNUT siRNA) によりノックダウンすると (図4a)、NHEKからのATP放出は有意に抑制された (図4b)⁵⁾。従って、VNUTが上述した皮膚のATP開口放出の責任分子であることが明らかとなった。

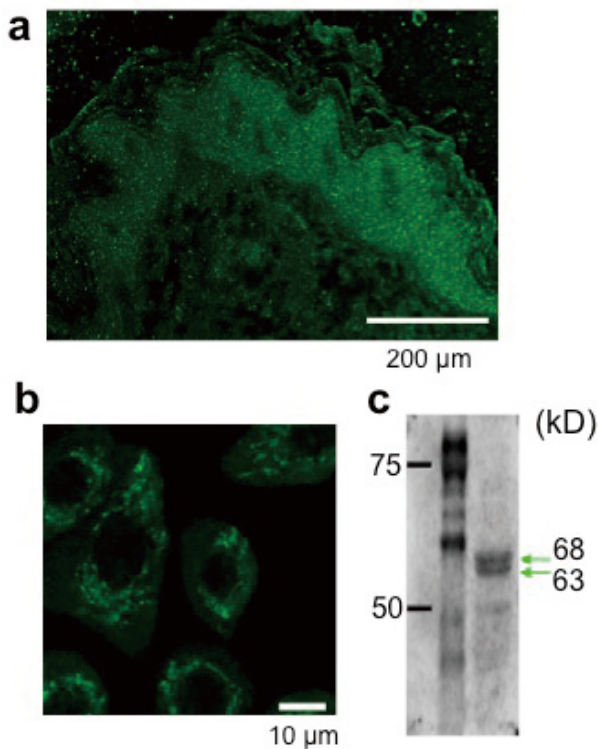


Figure 3 Expression of VNUT in the human epidermis and epidermal keratinocytes. Immunohistochemical and immunocytochemical staining of frozen section of human skin (a) and NHEK (b), respectively, with an anti-VNUT antibody. For western blot analysis, total cell lysates were prepared and separated by SDS-PAGE. The antibody that specifically recognizes VNUT protein detected major bands at 65 kDa and 68 kDa (c).

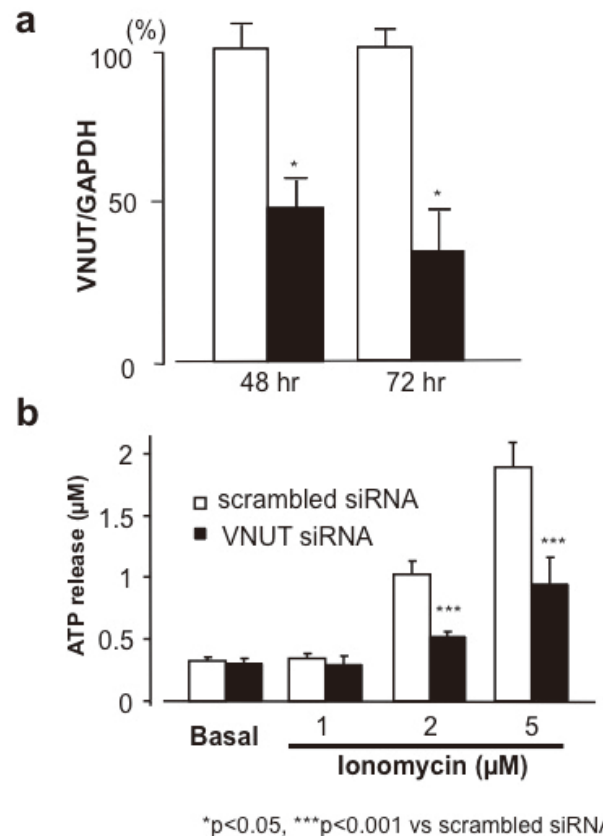


Figure 4 Inhibition of ionomycin-induced ATP release by VNUT siRNA. (a) VNUT mRNA was significantly reduced in a time-dependent manner in cells transfected with VNUT siRNA (n=3, black bar). (b) Transfection with VNUT siRNA for 72 hr (n= 3, black bar) significantly decreased ionomycin-evoked ATP release versus scrambled RNA-transfection at concentrations of 2 and 5µM of ionomycin. *p<0.05, ***p<0.001 vs. scrambled siRNA.

細胞外ATPが種々の疾患と関連すること³⁾、シワやシミの治療に用いられるレチノイン酸がATP受容体発現に影響すること⁶⁾等、これまでATP/P2受容体シグナルと皮膚の機能制御に重要な役割を果たすことを示してきた。今回、このATPが放出されるメカニズムの一端を明らかにすることが出来た。また、このATP放出の責任分子VNUTは、これまでの我々の脳における研究により、種々の炎症時に発現が著しく亢進することが明らかとなっている⁷⁾。今後、VNUTを切り口としてスキン伝達物質ATPが、老化や疾患とどのように関連性を明らかにする予定である。

謝 辞

本研究遂行にあたり、御助成頂いた公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心から感謝申し上げます。また、山梨大学医学部薬理学講座、井上かおり、小松龍平、柴田圭輔、藤下加代子の各氏に感謝致します。

本研究の一部は、すでに以下の様に公表した。

Inoue, K., Komatsu, R., Imura, Y., Fujishita, K., Shibata, K., Moriyama, Y. and Koizumi, S. (2014) Mechanisms underlying ATP release in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, in press.

(参考文献)

- 1) Koizumi S, Fujishita K, Inoue K, *et al.*: Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation. *Biochem J.*2004; 380: 329-338.
- 2) Inoue K, Denda M, Tozaki H, *et al.*: Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.*2005; 124: 756-763.
- 3) Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, *et al.*: Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *J Clin Invest.*2012; 122: 722-732.
- 4) Sawada K, Echigo N, Juge N, *et al.*: Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2008; 105: 5683-5686.
- 5) Inoue K, Komatsu R, Imura Y, *et al.*: Mechanism Underlying ATP Release in Human Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol.*2014; in press:
- 6) Fujishita K, Koizumi S & Inoue K: Upregulation of P2Y2 receptors by retinoids in normal human epidermal keratinocytes. *Purinergic Signal.*2006; 2: 491-498.
- 7) Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, *et al.*: Microglia release ATP by exocytosis. *Glia.*2013; 61: 1320-1330.