

# 微弱紫外線による皮膚タイトジャンクションバリアの破壊機構の解明と保護化合物の探索

岐阜薬科大学

五十里 彰

Human skin keratinocytes form a tight junction (TJ) in the lateral membrane between neighboring cells. The TJ restricts the paracellular flux of water, nutrients, and solutes. The architecture of TJ is composed of claudins, transmembrane proteins, and zonula occludens, adaptor proteins. Claudins have four transmembrane domains and comprise a multi-gene family with 27 members. Claudin-1 acts as a physiological barrier in the skin. Ultraviolet (UV) light may disrupt the TJ barrier, but the pathophysiological mechanism has not been clarified well. We found that UVB causes a mislocalization of claudin-1, decrease in transepithelial electrical resistance, and increase in paracellular permeability of lucifer yellow, a hydrophilic fluorescent marker, in human keratinocyte-derived HaCaT cells. Similarly, NOC, a NO donor, and SIN-1, a peroxyntirite donor, caused the mislocalization of claudin-1. PCR showed that opsin (OPN) 2 and 3 mRNAs are expressed in HaCaT cells. UVB increased intracellular  $Ca^{2+}$ , nitric oxide, and peroxyntirite concentration, which were inhibited by OPN2 siRNA. In addition, the elevation of  $Ca^{2+}$  concentration was inhibited by the siRNA of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1), suggesting that UVB enhances  $Ca^{2+}$  influx mediated through TRPV1. NOC increased the amount of tyrosine nitration and ubiquitination of claudin-1.

Our results indicate for the first time that UVB increases intracellular  $Ca^{2+}$ , NO, and peroxyntirite concentration, resulting in the mislocalization of claudin-1. Peroxyntirite may elevate the amount of nitration and ubiquitination of claudin-1. The compounds, which inhibit nitration and ubiquitination of claudin-1, may have a role in preventing the destruction of the TJ barrier caused by UV.

## 1. 緒言

皮膚は体外と体内の境界をなすバリアとして働き、体外からの病原菌や異物の侵入を防ぐとともに、体内からの水分子やイオンの漏出を防ぐ。皮膚にはコラーゲンなどによって形成される角質層と細胞間接着分子によって形成される顆粒層の二重のバリアが存在する。角質層にはヒアルロン酸、コラーゲン、セラミドが存在し、皮膚の保湿機能が維持される。一方、顆粒層バリアの形成には、タイトジャンクションに発現するクローディンが重要な役割を担う。クローディンは27種類のサブタイプが同定されており、組織選択的に各サブタイプが発現する<sup>1,2)</sup>。クローディン-1ノックアウトマウスは、脱水症状によって生後まもなく死亡するため、顆粒層バリアの形成にクローディン-1が重要な役割を果たすことが明らかになった<sup>3)</sup>。最近、クローディン-1の発現量がアトピー性皮膚炎の症状と逆相関することが報告され、皮膚疾患との関連も明らかになってきた<sup>4)</sup>。敏感肌・乾燥肌の保湿ケアにおけるコスメロジーの観点およびアレルギー性皮膚疾患の治療補助としてのファーマコロジーの観点から、クローディン-1を起点とした顆粒層バリアの構築および病態メカニズムの解明

が必要である。

クローディン-1は足場タンパク質のZO-1とともにタイトジャンクションに分布するが、傷害性ストレスなどの負荷によりタイトジャンクションから細胞内へ移行する。最近申請者はクローディン-1の細胞局在制御機構を検討し、タイトジャンクションへの分布に191 Thrのリン酸化が必要なこと、脱リン酸化クローディン-1がクラスリン依存性エンドサイトーシス機構を介して細胞内へ取り込まれることを解明した<sup>5)</sup>。しかし、リン酸化以外の翻訳後修飾の関与やその制御機構は不明である。本研究では、微弱紫外線照射によりクローディン-1がタイトジャンクションから解離することを見出したため、そのメカニズムを検討し、クローディン-1の局在異常を改善する化合物を探索した。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞培養

ヒト皮膚由来の不死化角化細胞株のHaCaT細胞を、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下の炭酸ガスインキュベーター内で培養した。増殖培地として5% 熱非働化牛胎児血清、100 U/ml penicillin-G potassium、100 μg/ml streptomycin sulfateを含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いた。トリプシン溶液を用いて培養皿から細胞を剥離させ、3～4日ごとに継代した。

### 2.2. RNA抽出とPCR

細胞を回収後、TRI reagentを用いてRNAを抽出した。ReverTraAceを用いて逆転写反応後、ロドプシン (OPN1、2、3、5) およびβ-アクチンに対するプライマーを用い



Search for protective compounds against weak ultraviolet light-induced dysfunction of tight junction barrier in skin

Akira Ikari

Gifu Pharmaceutical University

てPCRを行った。PCR産物をアガロースゲルに泳動し、OPNの発現を確認した。

### 2.3. 細胞内Ca<sup>2+</sup>、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度の測定

細胞を96ウェルプレートに播種し、72時間培養した。細胞内Ca<sup>2+</sup>、NO、パーオキシナイトライト濃度を測定するため、細胞にFluo-8、DAF-2またはNiSPYを負荷した。各指示薬の蛍光強度を、Infinite F200 PRO (テカン社)を用いて測定した。

### 2.4. 免疫沈降とウエスタンブロット

細胞を回収後、lysis bufferを用いて細胞膜を溶解した。遠心操作によって核画分を除去し、細胞抽出画分を調製した。免疫沈降の際には、細胞抽出画分、プロテイン-G セファロースビーズ、抗クロードイン-1抗体を混合し、4℃で16時間インキュベートした。サンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、トランスブロットセル (バイオラッド社)を用いてPVDF膜に転写した。PVDF膜を抗クロードイン-1抗体、抗ニトロ化チロシン抗体、抗ユビキチン抗体でプロットした。EzWestLumi Plus (アトー社)で発光後、C-DiGit (スクラム社)を用いてバンドを検出した。

### 2.5. 蛍光免疫染色と蛍光観察

カバーガラスを入れた35mm培養皿上に細胞を播種し、96時間培養した。UVBの照射直前または照射してから3時間後、細胞を冷メタノールで固定した。0.2% Triton X-100による細胞膜の透過処理と4% Block Aceによるブロッキング後、抗クロードイン-1抗体を4℃で16時間処理した。その後、DyLight 555標識二次抗体を室温で1時間処理した。LSM700 共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss社)を用いて、クロードイン-1タンパク質の細胞局在を解析した。

### 2.6. 細胞間透過性の評価

細胞をトランスウェルに播種し、96時間培養した。Volt ohm meter (Millipore社)を用いて、上皮膜間電気抵抗値 (TER) を測定した。また、トランスウェルの上層から下層へのlucifer yellow (LY、水溶性蛍光マーカー)の移行量を指標として、細胞間低分子透過性を評価した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. クロードイン-1の細胞局在に対するUVBの効果

共焦点レーザー顕微鏡を用いてクロードイン

-1の細胞局在を調べたところ、コントロール状態でクロードイン-1は細胞隣接部位 (タイトジャンクション) に分布していた。5mJ/cm<sup>2</sup>の微弱紫外線 (UVB) 照射により、細胞傷害率はほとんど変化しなかったが、クロードイン-1は主に細胞質に分布した。クロードイン-1がタイトジャンクションから消失することにより、細胞間バリア機能が低下することが示唆されるため<sup>6)</sup>、UVB照射によるクロードイン-1の局在異常メカニズムを検討することにした。

### 3.2. クロードイン-1の細胞局在に対するROSの効果

HaCaT細胞に紫外線を照射すると、一酸化窒素の産生量が増加する<sup>7)</sup>。そこで、クロードイン-1の細胞局在に対する一酸化窒素の影響を検討した。HaCaT細胞を一酸化窒素産生剤のNOCで処理したところ、タイトジャンクションに分布するクロードイン-1量が低下した (Fig. 1)。同様に、パーオキシナイトライト産生剤のSIN-1処理により、タイトジャンクションからクロードイン-1が消失した。細胞内の一酸化窒素量をDAF-2で測定したところ、NOC処理により増加が観察された (Fig. 2)。一酸化窒素はスーパーオキシドと反応し、パーオキシナイトライトを産生する。パーオキシナイトライト量をNiSPYで測定した

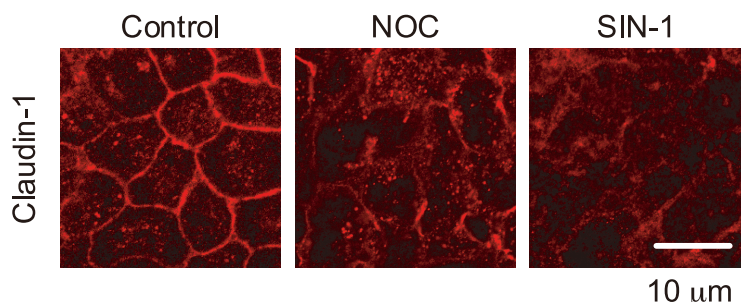


Fig. 1 Effects of NO and peroxynitrite donors on the localization of claudin-1

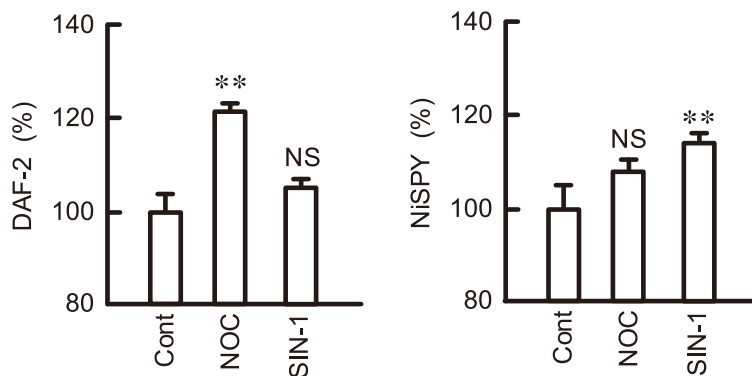


Fig. 2 Measurement of intracellular concentration of NO and peroxynitrite

ところ、NOCで増加傾向が、SIN-1で有意な増加が観察された。以上の結果から、クローデイン-1の局在異常に、一酸化窒素とパーオキシナイトライト濃度の増加が関与することが示唆された。

### 3.3. 細胞間バリアに対する一酸化窒素の影響

細胞をトランスウェルに培養し、TERとLY透過性を指標として細胞間バリア機能を評価した。NOCまたはSIN-1で処理したところ、コントロールに比べて有意にTERが低下し、LY透過性が増加した (Fig. 3)。そのため、一酸化窒素とパーオキシナイトライトは、クローデイン-1の局在異常を介して細胞間バリアを減弱させることが示唆された。一酸化窒素とパーオキシナイトライトの産生を抑制することにより、細胞間バリアの維持に繋がると考えられるため、そのメカニズムを検討することにした。

### 3.4. UVBによる一酸化窒素の産生におけるOPNの関与

紫外線などの光は、オプシン受容体によって感

知されることが報告されている<sup>8)</sup>。PCR法でOPN1、2、3、5の発現を調べたところ、HaCaT細胞にOPN2、3の発現が確認された (Fig. 4)。細胞に5mJ/cm<sup>2</sup> UVBを照射したところ、細胞内Ca<sup>2+</sup>、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度が増加した。これらの効果は、OPN2 siRNAの導入によって阻害されたが、OPN3 siRNAは阻害効果を示さなかった。以上の結果から、OPN2がUVBのセンサーとして働くことが示唆された。

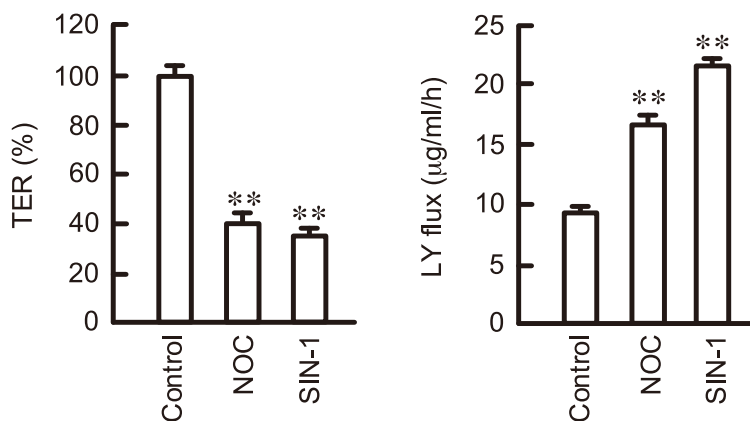


Fig. 3 Effects of NO and peroxynitrite donors on tight junction barrier

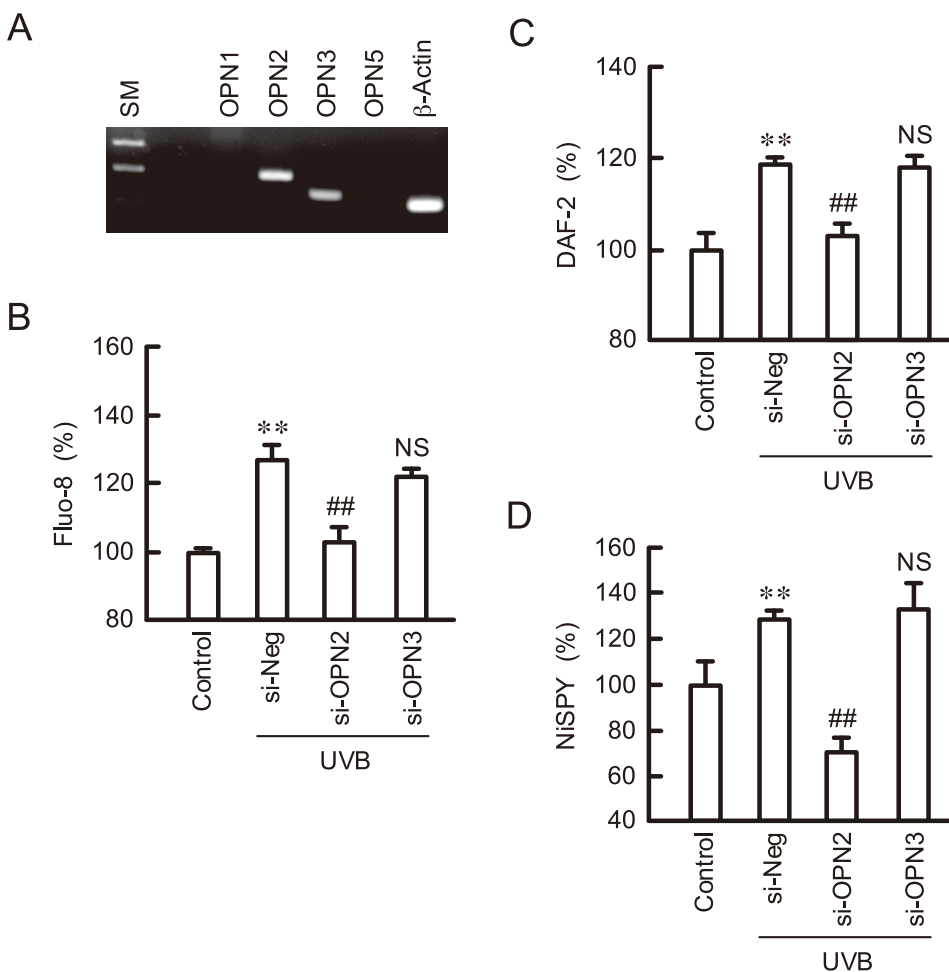


Fig. 4 Expression of OPN in HaCaT cells

### 3. 5. UVBによる一酸化窒素の産生におけるTRPVチャネルの関与

OPN受容体の活性化によるCa<sup>2+</sup>濃度の上昇機序を解明するため、一過性受容器電位チャネルであるTRPVチャネルの関与を検討した。皮膚にはTRPV1とTRPV4の発現が報告されているため<sup>9)</sup>、それぞれの選択的阻害剤であるAMG9810とRN1734の効果を調べた。UVB照射による細胞内Ca<sup>2+</sup>、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度の増加は、AMG9810処理によって阻害されたが、RN1734は阻害効果を示さなかった (Fig. 5)。また、Ca<sup>2+</sup>キレート剤のEGTAも、UVBによる細胞内Ca<sup>2+</sup>、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度の増加を阻害した。TRPV1ア

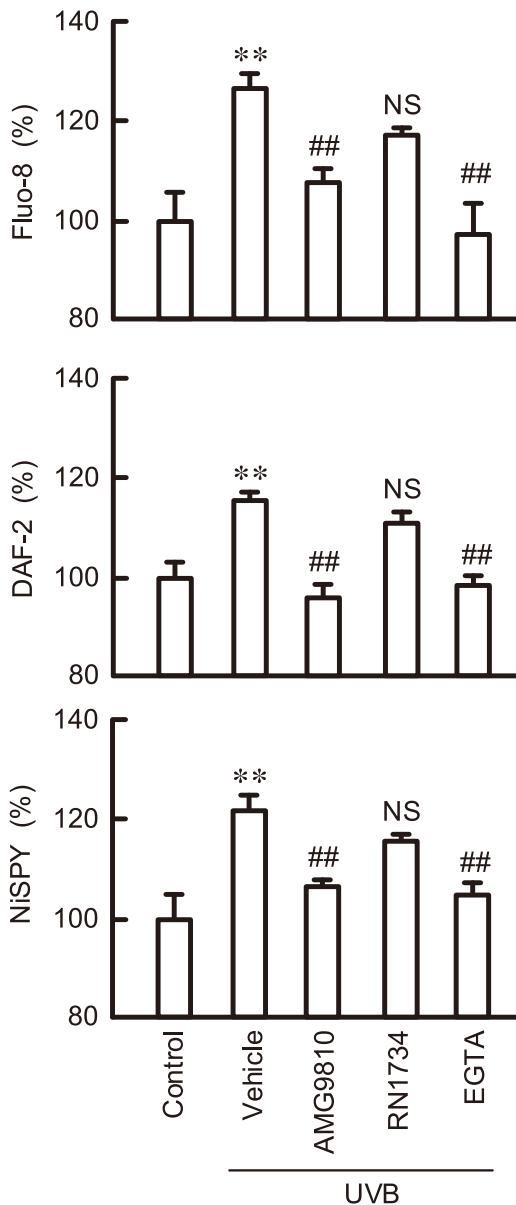


Fig. 5 Inhibition of UVB-induced elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup>, NO, and peroxynitrite concentration by AMG9810

ゴニストのolvanilは、UVBと同様に細胞内Ca<sup>2+</sup>、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度を増加させた。以上の結果から、UVB照射によってTRPV1を介したCa<sup>2+</sup>流入が増加し、それによって一酸化窒素とパーオキシナイトライトの濃度が増加することが示唆された。

### 3. 6. UVBによる一酸化窒素の産生におけるNOSの関与

一酸化窒素は恒常的に発現するNOS1、NOS3または誘導型のNOS2によってアルギニンから産生される<sup>10)</sup>。ウエスタンブロット法でNOSタンパク質の発現量を調べたところ、NOS1は検出限界以下であった (Fig. 6)。NOS2発現量はUVBやAMG9810処理によって変化しなかった。一方、UVB照射によってNOS3発現量が増加し、この効果はAMG9810共処理によって阻害された。また、olvanil処理によってNOS3発現量が増加した。次に、クロロゲン-1の細胞局在に対する効果を検討した。UVB照射により、タイトジャンクションにおけるクロロゲン-1の分布量が低下した、この効果はAMG9810共処理によって阻害された。また、olvanil処理によって、UVBと同様にタイトジャンクションからクロロゲン-1が消失した。以上の結果から、UVB照射によるクロロゲン-1の局在異常に、NOS3の発現増加が関与すると示唆された。これまでに最小紅斑量のUVB照射により、NOS1 mRNA量が増加することが報告されているが<sup>11)</sup>、我々の結果ではNOS1の増加が観察されなかった。UVBの照射量によって、NOSは異なる応答性を示す可能性がある。

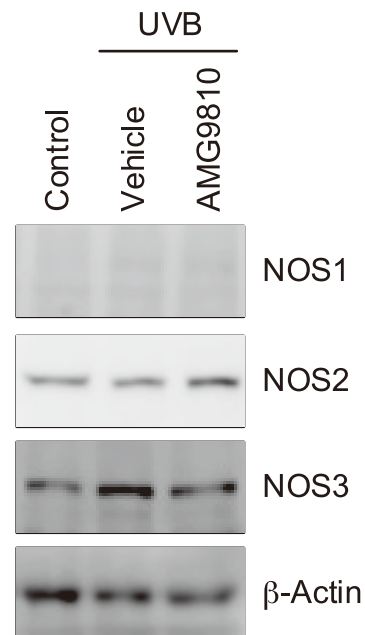


Fig. 6 Effects of UVB on NOS expression



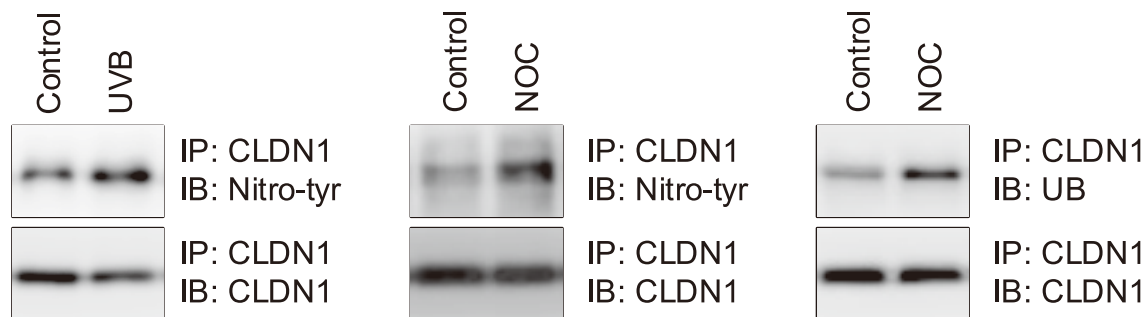


Fig. 7 Effects of UVB on nitration and ubiquitination of claudin-1

### 3. 7. クローディン-1の局在異常における翻訳後修飾の影響

UVB照射により、クローディン-1のニトロ化チロシン量が増加した (Fig. 7)。同様に、NOC処理により、クローディン-1のニトロ化チロシン量が増加した。クローディン-1の細胞局在はユビキチン化酵素によって制御されるため<sup>12)</sup>、ユビキチン化の関与を検討した。その結果、NOC処理により、クローディン-1のユビキチン化量が増加した。以上より、一酸化窒素濃度の増加により、クローディン-1のニトロ化とユビキチン化修飾量が増加し、エンドサイトーシスが促進されると示唆された。今後、クローディン-1のニトロ化およびユビキチン化部位を同定し、両者の関係を解明する必要がある。

### 3. 8. クローディン-1のニトロ化修飾に対する抑制因子の探索

UVB照射によるクローディン-1のエンドサイトーシスに、ニトロ化修飾の関与が示唆されたため、その阻害効果を有する食品成分を探索した。フラボノイドの効果を検討したところ、数種類のフラボノイドにニトロ化修飾の阻害効果が観察された (特許申請に関わるため化合物名は非公開)。

## 4. 総括

本研究において、強い細胞傷害を誘発しないUVB処理により、クローディン-1のタイトジャンクション局在量が低下することを見出した。これまでに我々は、クローディン-1の細胞局在の調節にリン酸化が関与することを報告したが<sup>5)</sup>、他の翻訳後修飾の関与は不明であった。UVB照射により、OPN2を介したTRPV1の活性化、Ca<sup>2+</sup>流入、一酸化窒素産生、パーオキシナイトライト産生といったシグナル伝達経路が活性化されることが示唆された。さらに、クローディン-1のニトロ化修飾やタイトジャンクションからの解離が観察されたため、これらが細胞間バリア機能の低下を誘発すると示唆された。紫外線による皮膚の保湿機能の低下に、細胞傷害だけでなく、クローディン-1の

局在異常が関与する可能性がある。UVB照射によるクローディン-1のニトロ化は、数種類のフラボノイドの処理によって阻害されたため、これらを皮膚に塗布することにより、紫外線による保湿機能の低下が抑制されることが期待される。

### (引用文献)

- 1) Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., Tsukita, S., Predicted expansion of the claudin multigene family, *FEBS Letters*, 585, 606-612 (2011).
- 2) Turksen, K., Troy, T.C., Barriers built on claudins, *J Cell Sci*, 117, 2435-2447 (2004).
- 3) Sugawara, T., Iwamoto, N., Akashi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., Sugai, M., Furuse, M., Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice, *J Dermatol Sci*, 70, 12-18 (2013).
- 4) Gruber, R., Bornchen, C., Rose, K., Daubmann, A., Volksdorf, T., Wladykowski, E., Vidal, Y.S.S., Peters, E.M., Danso, M., Bouwstra, J.A., Hennies, H.C., Moll, I., Schmuth, M., Brandner, J.M., Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis, *Am J Pathol*, 185, 2777-2789 (2015).
- 5) Marunaka, K., Kobayashi, M., Shu, S., Matsunaga, T., Ikari, A., Brazilian Green Propolis Rescues Oxidative Stress-Induced Mislocalization of Claudin-1 in Human Keratinocyte-Derived HaCaT Cells, *Int J Mol Sci*, 20, (2019).
- 6) Morita, K., Miyachi, Y., Furuse, M., Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization, *Eur J Dermatol*, 21, 12-17 (2011).
- 7) Liu, W., Wu, S., Differential roles of nitric oxide synthases in regulation of ultraviolet B light-induced apoptosis, *Nitric Oxide*, 23, 199-205 (2010).

- 8) Haltaufderhyde, K., Ozdeslik, R.N., Wicks, N.L., Najera, J.A., Oancea, E., Opsin expression in human epidermal skin, *Photochem Photobiol*, 91, 117-123 (2015).
- 9) Ho, J.C., Lee, C.H., TRP channels in skin: from physiological implications to clinical significances, *Biophysics*, 11, 17-24 (2015).
- 10) Mattila, J.T., Thomas, A.C., Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns, *Front Immunol*, 5, 478 (2014).
- 11) Kuhn, A., Fehsel, K., Lehmann, P., Krutmann, J., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V., Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus, *J Invest Dermatol*, 111, 149-153 (1998).
- 12) Takahashi, S., Iwamoto, N., Sasaki, H., Ohashi, M., Oda, Y., Tsukita, S., Furuse, M., The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells, *J Cell Sci*, 122, 985-994 (2009).