

皮膚角化及びメラニン沈着と毛髪中 microRNA 量の関連性解析

芝浦工業大学システム理工学部生命科学科分子細胞毒性研究室

矢嶋 伊知朗

Skin is exposed to various environmental factors and various stresses in addition to natural aging, which in turn causes various types of damage to the skin. Ultraviolet rays are one of the environmental factors well known to cause skin damage, and are known to induce skin keratinization and melanin pigmentation, resulting in adverse effects such as wrinkles, spots, and freckles. It is also known that various heavy metals contained in drinking water and food can adversely affect the skin. In particular, arsenic is contained in large amounts in marine products (especially hijiki) that Japanese people consume on a daily basis, and many cases of chronic exposure of arsenic inducing skin keratinization and melanin pigmentation have been reported in the whole world. The purpose of this study was to 'clarify the expression pattern of miRNAs related to skin keratinization and melanin pigmentation in body hair and the relationship between UV irradiation and arsenic-induced skin keratinization and melanin deposition'. We focused on 11 miRNAs and analyzed their expression patterns in mouse body hair and cultured cell lines derived from skin tissues. In body hairs, miRNAs showed characteristic expression patterns in response to UV and arsenic exposure, and common expression patterns were also observed. In the cell culture experiments, a human skin keratinocyte cell line (HaCaT) and a melanocyte-based cultured cell line (B10F10) were used to analyze miRNA expression patterns. Keratinocyte-specific or melanocyte-specific expression patterns were identified, as well as miRNAs which expression was significantly altered by combined exposure to UV light and arsenic. These results suggest that analysis of miRNA expression patterns using body hair may contribute to the prevention and therapy of skin diseases caused by UV and arsenic exposure.

1. 緒言

皮膚は様々な環境因子に曝され、加齢などの自然老化に加えた様々なストレスを受け、それにより皮膚は様々なダメージを受けている。例えば紫外線は誰もが知る皮膚ダメージを引き起こす環境因子の一つであり、皮膚角化やメラニン沈着を誘導し、しわ・シミ・ソバカスなどの悪影響を引き起こすことが知られている。我々もこれまでの研究において、紫外線照射が皮膚ダメージ、特にDNA損傷を誘発することをヒト及びマウスのレベルで実証している¹⁾。

また、飲用水や食品に含まれる様々な重金属が体内から皮膚に悪影響を及ぼすことも知られている。特にヒ素は、例えば日本人が日常的に摂取する海産物(特にヒジキ)に多量に含まれており、海外ではヒ素の慢性的な摂取が皮膚角化やメラニン沈着を誘発するケースが多数報告されている。我々の研究でも、ヒ素曝露と皮膚疾患、皮膚メラニン沈着の関連性をヒトレベルで明らかにし、さらにマウスモデルの樹立にも成功している^{2,3)}。

これまでの様々な研究により、環境因子による皮膚のしわ・シミ・ソバカスなどの発症機構が明らかにされつつあ

るものの、同じしわ・シミ・ソバカスであっても、環境因子によってその発症機構には大きな違いが存在し、発症原因とその機構をあらかじめ知っておくことが、より良い予防や治療には必要不可欠である。

近年、リボ核酸(RNA)の一種で極めてサイズの小さい、マイクロRNA (microRNA, miRNA) が体内で数千種類発現しており、様々な疾患の発症や抑制に作用していることが明らかにされている、様々なmiRNAの組み合わせで検出することにより、多種の疾患を診断、或いは予知することが可能となっている。また、毛髪中(非侵襲的に採取可能)に含まれるmiRNAの量と種類のパターンが、様々な皮膚疾患の診断に利用可能であることが近年報告されている。

我々はこれまでの実験マウスを用いた予備的検討から、紫外線曝露・ヒ素曝露によって体毛中のmiRNA発現(正確には「含有量」だが、ここでは「発現量」に統一する)パターンに変化が生じ、特に皮膚角化やメラニン沈着に關与するmiRNAが大きく変化していることを発見した(図1参照)。

我々は、他研究者による研究や、我々自身の予備的検討結果から、非侵襲的に毛髪を採取(毛根は含まない)しmiRNA発現パターンを明らかにすることで、皮膚に現れている(或いはこれから現れるであろう)しわ・シミ・ソバカスの発症原因やその発症機構をオーダーメイドで明らかにすることが可能となり、様々な予防法や治療法を提供可能になるのではないかと着想した。この将来的なゴールを見据え、本研究では、皮膚角化やメラニン沈着関連miRNAの体毛での発現パターンと紫外線照射及びヒ素誘



Analysis of the relationship between skin keratinization and melanin pigmentation and microRNA levels in hair

Ichiro Yajima

Molecular and Cellular Toxicology, Department of Bioscience and Engineering, College of Systems Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology

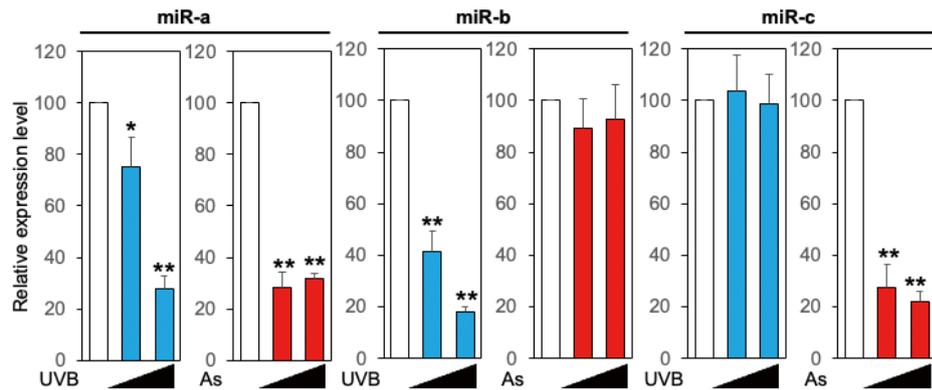


図1 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNAの体毛中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As) による変化 (QPCRによる解析)。同じmiRNAでも、環境因子によって体毛中レベルの変化は異なっている。

発性皮膚角化及びメラニン沈着の関連性を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1. マウス体毛からのmiRNA精製

マウス背側体毛を剪毛し、エタノールにて洗浄・乾燥後1.5ml tubeに移し、凍結保存した。miRNAの精製はHigh Pure miRNA Isolation Kit (Roche)及びTRIzol RNA Isolation Reagents (Thermo Fisher)を使用し、プロトコールに沿って精製を行った。精製したmiRNAは -80°C にて保存した。

2.2. 培養細胞と培養方法

細胞はヒト正常皮膚角化細胞株 (HaCaT)、マウスメラノーマ細胞株 (B10F10) を用いた。HaCaTの培養液はDMEM+10% FBS、B16はRPMI-1640+10% FBSで 37°C 、 CO_2 5%の環境下で培養を行った。曝露試験においては6-well plateまたは24-well plateに細胞を規定量播種し、24時間後に1% FBS入り培養液に置換した。その24時間後より曝露を開始した。ヒ素曝露については100mM stock溶液を作成、培養液にて希釈して曝露を行った。紫外線曝露では、細胞をPBSで洗浄後、PBSを2ml/well加え、紫外線照射 (UVB (365nm) $15\text{mJ}/\text{cm}^2$ または $20\text{mJ}/\text{cm}^2$) を行った。紫外線照射後、PBSをアスピレーターで吸収し、1% FBS入り培養液に置換した。その後 37°C 、 CO_2 5%の環境下で24時間培養を行った。

2.3. 細胞生存率測定とメラニン量測定

細胞生存率測定はCell Counting Kit-8 (DOJINDO) を用いて行った。メラニン量測定は以下の通り。曝露試験を行った細胞をPBSで2回洗浄しPBSを吸引後PBSを500 μl ずつ加え、スクレイパーで細胞を1.5ml tubeに回収する。2000g, 1minの条件で遠心を行い、上清を捨て500 μl の

1N NaOH/10% DMSOを加え、軽くボルテックスをおこなった後、 80°C で2時間処理を行う。2時間後、96well plateに各チューブから100 μl ずつ分注し、405nmで吸光度を測定、メラニン産生量を算出する。細胞生存率データによる補正を行うことで、細胞あたりのメラニン量を計算する。

2.4. cDNA合成とQPCR

細胞からのmiRNAを含むtotal RNAの精製はHigh Pure miRNA Isolation Kit (Roche) を用いて行った。miRNAのcDNA及びQPCRはMir-X™ miRNA qRT-PCR TB Green® Kit (TaKaRa)を使用した。

3. 結果

3.1. 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNAの毛髪中発現量の測定

我々の予備的検討結果より、皮膚角化とメラニン沈着両方に関与するmiRNA (miR-a, -b, -cが紫外線及びヒ素曝露によって体毛中のパターンに変化が起きることが明らかとなっている (図1参照)が、まだ未解析の同様の機能を有する他のmiRNA (miR-d, -e, -fなど)の解析を行った。マウスに対し、脱毛部への紫外線照射またはヒ素飲水投与を6ヶ月間実施し、回収した体毛 (毛根は含まないため抜毛ではなく剪毛。非侵襲的)を用いて、QPCRによって目的のmiRNA量及びパターンをQPCR法にて解析を行った (図2-1, 2-2)。miR-dは紫外線曝露及びヒ素曝露によって有意に減少し、濃度依存的な傾向が観察された。miR-eは紫外線曝露及びヒ素曝露によって有意に減少し、濃度依存的な傾向が観察された。miR-fは紫外線曝露では有意に減少し、ヒ素曝露によって有意に上昇した。miR-gは紫外線曝露によって非常に強く発現量の上昇が観察されたが、ヒ素曝露では変化は認められなかった。miR-hは紫外線曝露では紫外線強度依存的に有意に減少したが、ヒ素曝露では濃

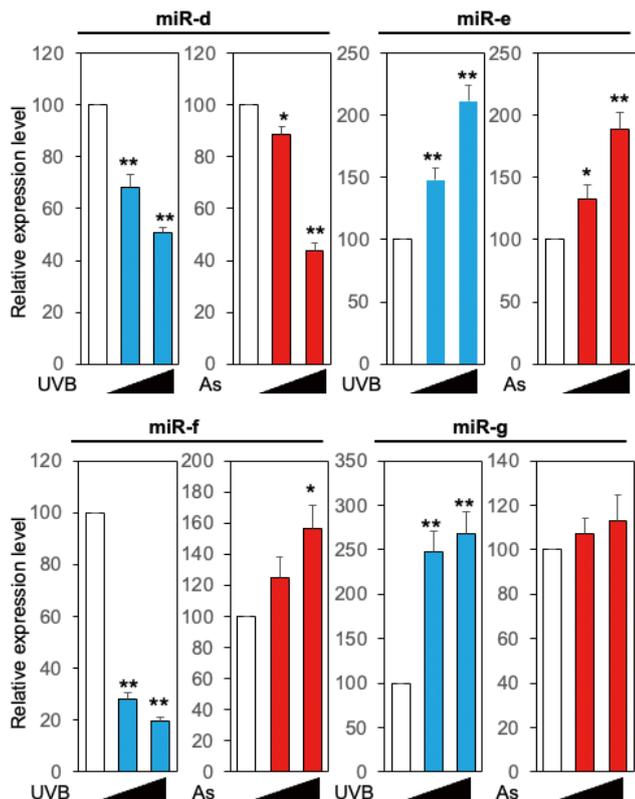


図 2-1 皮膚角化・メラニン沈着関連 miRNA (miR-d, -e, -f, -g) の体毛中 miRNA の紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As) による変化。

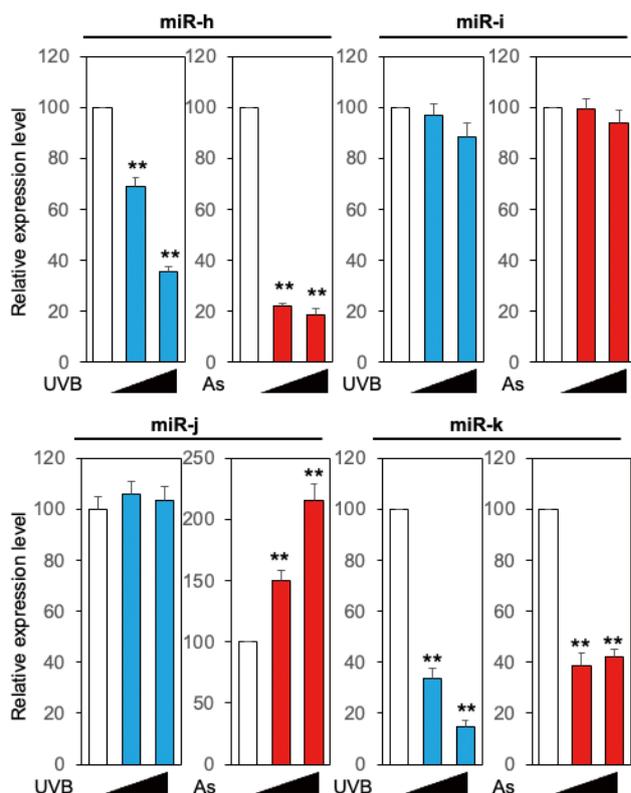


図 2-2 皮膚角化・メラニン沈着関連 miRNA (miR-d, -e, -f, -g) の体毛中 miRNA の紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As) による変化。

度に関係なく、強い発現低下が観察された。miR-iでは紫外線曝露、ヒ素曝露ともに発現量の有意な変化は認められなかった。miR-jは紫外線曝露による発現変化は認められなかったが、ヒ素曝露では有意な濃度依存的発現上昇が観察された。miR-kは紫外線曝露による濃度依存的発現上昇が観察され、ヒ素曝露では濃度に関係なく、強い発現低下が観察された。

3. 2. 培養細胞株における紫外線曝露及びヒ素曝露によるmiRNA発現パターン解析

in vivo 実験より同定された体毛中の miRNA がどのような機構で発現制御されているのかを、培養細胞を用いて解析をおこなった。紫外線曝露やヒ素曝露による皮膚疾患は皮膚角化細胞及びメラノサイトでの発症が大きく、本研究ではそれらの影響を細胞レベルで解明するために、ヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT) 及びマウス B16F10 メラノーマ細胞株に対して紫外線及びヒ素を個別及び複合曝露し、miRNA の発現パターンを解析した (図 3, 4)。まず、メラノサイトへの影響を調査するためにメラノサイトのモデル細胞として多用されている B16F10 細胞株を用いた発現パターン解析を行った (図 3-1, 3-2)。なお、本実験では 3. 1. で調査した miRNA のうち、発現パターンに大きな

変化が観察された miR-a, b, c, d, e, f, h, k の 8 種類を対象とした。miR-a は紫外線、ヒ素曝露ともに発現量が有意に低下し、複合曝露でも同程度の低下が観察された。miR-b は紫外線曝露によって発現量が有意に低下し、ヒ素曝露では有意な変化は観察されなかった。複合曝露では有意な低下が見られた。miR-c では、紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに有意な変化は観察されなかった。miR-d では、紫外線曝露によって有意な発現低下が観察され、ヒ素曝露では低レベルではあるが、有意な発現上昇が観察された。複合曝露では発現量に有意な減少が観察された。miR-e は紫外線曝露及びヒ素曝露とともにわずかな発現上昇が観察され、複合曝露では極めて強い発現の上昇が観察された。miR-f は、紫外線曝露では発現が強く抑制され、ヒ素曝露では変化は観察されなかった。複合曝露では発現が強く抑制された。miR-h では紫外線曝露、ヒ素曝露ともに発現量の有意な低下が観察され、複合曝露では最も強く発現が抑制された。miR-k では紫外線曝露、ヒ素曝露ともに発現量の有意な低下が観察され、複合曝露では最も強く発現が抑制された。

次に、皮膚角化細胞への影響を調査するために、角化細胞モデルである HaCaT 細胞を用いた発現パターン解析を行った (図 4-1, 4-2)。miR-a では、紫外線曝露、ヒ素曝露、

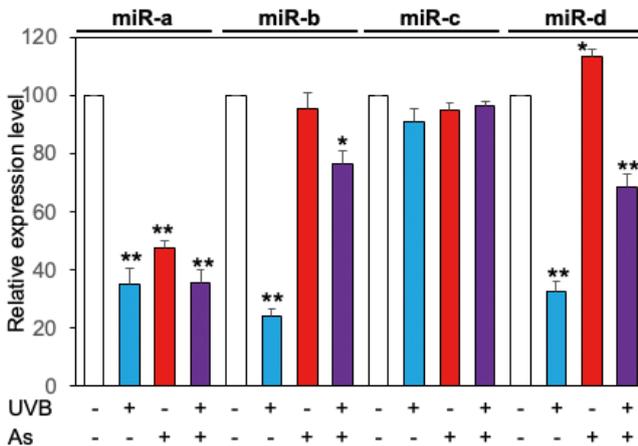


図3-1 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNA (miR-a, -b, -c -d) のB16細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化。

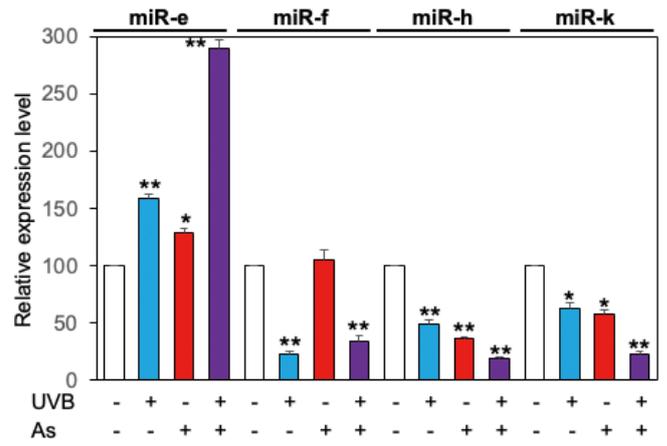


図3-2 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNA (miR-e, -f, -h, -k) のB16細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化。

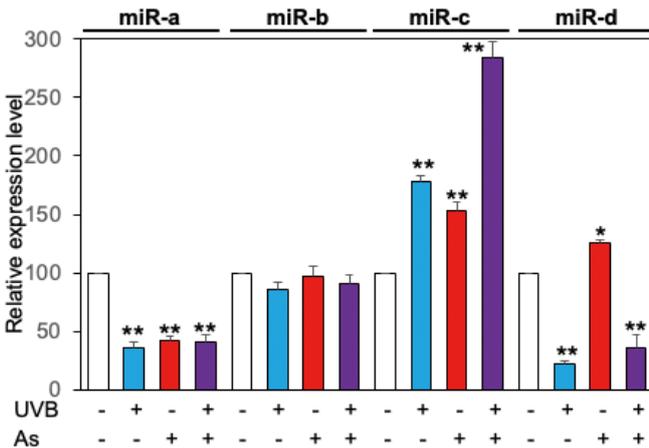


図4-1 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNA (miR-a, -b, -c -d) のHaCaT細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化。

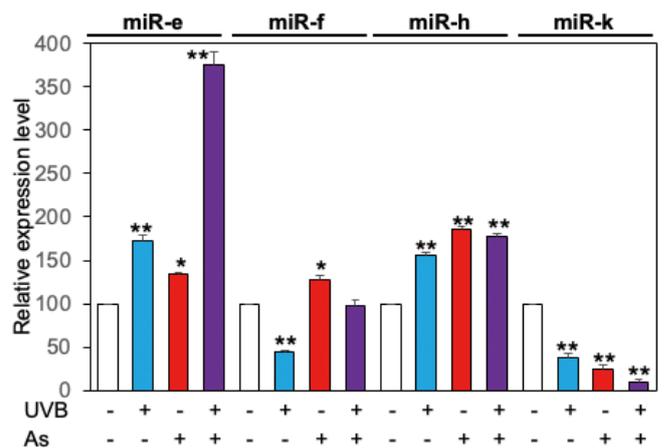


図4-2 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNA (miR-e, -f, -h, -k) のHaCaT細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化。

複合曝露ともに同レベルで有意な発現低下が観察された。miR-bでは紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに有意な変化は観察されなかった。miR-cでは紫外線曝露、ヒ素曝露ともに有意な発現上昇が観察され、複合曝露ではより強い発現上昇が観察された。miR-dでは、紫外線曝露では強い発現低下が観察され、ヒ素曝露ではわずかな発現上昇が観察された。複合曝露では強い発現低下が観察された。miR-eでは紫外線曝露、ヒ素曝露ともに僅かな発現上昇が観察され、複合曝露では非常に高いレベルでの発現上昇が観察された。miR-fでは紫外線曝露では有意に発現量が低下し、ヒ素曝露では有意に上昇した。複合曝露では有意な発現変化は観察されなかった。miR-kでは紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに発現量の有意な低下が観察された。その中でも、複合曝露が最も発現量の低下が観察された。

4. 考 察

4. 1. 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNAの体毛中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As) による変化

本研究では、皮膚角化やメラニン沈着関連miRNAの体毛での発現パターンと紫外線照射及びヒ素誘発性皮膚角化及びメラニン沈着の関連性を明らかにすることを目的として、曝露実験によるマウス体毛内のmiRNAの定量を行った。miRNAの種類によって紫外線曝露とヒ素曝露が同じ発現パターンを示す場合もあれば、逆のパターン(片方が発現上昇し、もう片方が発現低下)もあり、非常に多様な発現制御機構を持つことが考えられる。miR-eは今回の候補miRNAの中で唯一紫外線曝露でもヒ素曝露でも発現量

が上昇し、かつ濃度依存性を示していることから、miR-eは紫外線曝露とヒ素曝露による疾患の発症メカニズムに共通して関与している可能性を示唆している。一方で、miR-a, -d, -h, -kは紫外線曝露でもヒ素曝露でも発現量が有意に減少しており、紫外線曝露とヒ素曝露による疾患の発症に共通するメカニズムではこれらmiRNAの発現を減少させること、つまりはターゲット遺伝子の発現を阻害することが重要な役割を果たすと考えられる。miR-b, -gは紫外線曝露でその発現量をそれぞれ低下、上昇させるが、ヒ素曝露での変化は観察されなかったことから、これらのmiRNAは紫外線曝露関連疾患にのみ関与していることが示唆される。一方、miR-c, jはヒ素曝露でその発現量をそれぞれ上昇、低下させるが、紫外線曝露での変化は観察されなかったことから、これらのmiRNAはヒ素曝露関連疾患にのみ関与していることが示唆される。

4. 2. 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNAの培養細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化

皮膚及び体毛などを対象とした実験は個体への影響を解析するためには有用だが、細胞種ごとの解析には不適である。そのため我々は紫外線曝露やヒ素曝露による皮膚疾患で影響を受けやすい細胞である角化細胞とメラノサイト系譜細胞株を用いた細胞種特異的な発現パターン解析を行った。メラノサイト系譜であるB16F10細胞では曝露の種類や複合曝露による大きな変化が観察された。miR-a, -h, -kでは紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに発現量の有意な低下が観察され特にmiR-kは各単独曝露の影響が加算されて複合曝露に対する影響となって現れたと考えられた。これらのmiRNAは紫外線曝露、複合曝露関連疾患に共通し、メラノサイトを通じて関与している可能性が示唆された。miR-b, -d, -fは紫外線曝露では共通して発現量が大きく減少している一方、ヒ素曝露では変化しないあるいはわずかに発現上昇しているのみであることから、これらのmiRNAはメラノサイトでは紫外線曝露に対してのみ応答、機能している可能性が示唆される。miR-eは紫外線曝露、ヒ素曝露ともに発現が僅かに上昇している程度だが、複合曝露ではその発現量が大きく増大している。これらの結果は、miR-eが特に複合曝露によって発現誘導されること、複合曝露による疾患発症に特に関与している可能性を示唆している。

角化細胞系譜であるHaCaT細胞でもまた、細胞系譜特異的な発現パターンが観察された。miR-a, -hは紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに同程度のレベルで発現がそれぞれ減少、上昇していた。miR-bは変化が認められなかったことから、B16F10細胞での紫外線曝露特異的な発現変化という結果とともに考えると、紫外線曝露によるメラノ

サイトを起点とする疾患発症に関与していると考えられる。miR-d, -fはB16F10細胞におけるmiR-b, -d, fと類似したパターン、すなわち紫外線曝露による発現の減少に大きく寄与していることから、特にmiR-d, -fはメラノサイトと角化細胞の紫外線曝露に対する応答に共通して機能していることを強く示唆している。

4. 3. *in vivo*研究と*in vitro*研究の相違について

体毛は角化細胞からのケラチン産生とメラノサイトからのメラニン産生により構成されていることから、体毛でのmiRNAの量的パターンと角化細胞及びメラノサイトでのパターンには類似性が存在すると考えられる。本研究では、このような類似性についても検討した。miR-aは体毛、メラノサイト、角化細胞のいずれでも紫外線曝露、ヒ素曝露で発現低下が観察され、miR-e, -kは体毛、メラノサイト、角化細胞のいずれでも紫外線曝露、ヒ素曝露で発現上昇が観察されており、miR-a, -e, -kを体毛で検出、解析することは皮膚での各細胞の現象を検出することとなり、関連疾患マーカーとして有望であると考えられる。miR-bは体毛とメラノサイトでの発現パターンが類似していることから、体毛での検出によりメラノサイトでの現象のみを検出するマーカーとして有効であると考えられる。

4. 4. 複合曝露とmiRNA発現パターンについて

本研究では、培養細胞実験において紫外線曝露とヒ素曝露の複合曝露実験も実施した。ヒ素曝露は主に経口摂取より皮膚に蓄積し、紫外線曝露は屋外活動により日常的に引き起こされることから、ヒ素曝露地域では自ずと複合曝露が誘発されることになる。今回解析したmiRNAのうちmiR-eはメラノサイトでも角化細胞でも、単独曝露による効果よりも複合曝露による効果が非常に強く、両曝露に関連する疾患に共通するメカニズムに深く関与していることを示唆している。また、複合曝露が特定のmiRNAの発現を相乗的に変化させることを示しており、miRNAの解析においても複合曝露を念頭に置いた新たな解析手法が必要であることを示唆している。

4. 5. まとめ

今回用いた11種類のmiRNAに対する解析では、4種類の疾患マーカーとしての有望な候補が見いだされた。本研究では11種類であったが、他にも皮膚疾患に関連すると考えられるmiRNAは多数存在しており、これらの候補を網羅的に検証することでより多くの疾患マーカーの同定が可能となると期待できる。本研究で同定されたmiRNAは直接疾患発症に機能的に関与している可能性もあり、miRNAやmimic RNAを使用した研究を今後実施することで、機能との直接的な関わりを証明できると期待できる。

将来的には本研究と今後の応用的研究が皮膚疾患の余地・予防に大きく寄与することを期待している。

(引用文献)

- 1) Masashi Kato, Machiko Iida, Yuji Goto, Takaaki Kondo, Ichiro Yajima Kato M. and Yajima I. Sunlight exposure-mediated DNA damage in young adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20: 1622-1628. 2011.
- 2) Ichiro Yajima, Mayuko Y Kumasaka, Machiko Iida, Reina Oshino, Hiroko Tanihata, Aeorangajeb Al Hossain, Nobutaka Ohgami, Masashi Kato. Arsenic-mediated hyperpigmentation in skin via NF-kappa B/ endothelin-1 signaling in an originally developed hairless mouse model. *Arch Toxicol*. 91: 3507-3516. 2017.
- 3) Ichiro Yajima, Mayuko Y Kumasaka, Shoko Ohnuma, Nobutaka Ohgami, Hisao Naito, Hossain U Shekhar, Yasuhiro Omata, Masashi Kato. Arsenite-Mediated Promotion of Anchorage-Independent Growth of HaCaT Cells through Placental Growth Factor. *J Invest Dermatol*, 135: 1147-1156. 2015.