非視覚組織に発現する光受容体の機能の解析 一皮膚は色を識別できるのか?―

日本薬科大学薬学部生命科学薬学分野

山本博之

The skin is the most external part of the body and is strongly influenced by light. Previous study, the effects of light on the skin have been evaluated mainly in terms of the biological effects of UV light, which has high energy, but the mechanisms of skin tissue response to visible light are still unclear. In this study, we investigated the light response of skin, a non-visual tissue, focusing on photoreceptors. Photoreceptor expression in skin tissue and skin keratinocytes was evaluated by RT-PCR, and multiple opsin receptor mRNA expressions were found in rat skin tissue and FRSK cells. The expression of enzymes related to the visual cycle, which is involved in the maintenance of photoreceptor activity, was also examined by RT-PCR. The results showed that all enzymes involved in the visual cycle were expressed in rat skin tissue. Retinal metabolites in FRSK cells after light exposure were detected by HPLC. The results showed that 11cis-retinal was converted to all trans-retinal by exposure to light. These results indicates that photoreceptors expressed on keratinocytes are modulated in their activity by exposure to light.

1. 緒 言

皮膚は最も外側に位置する組織であり、外界から様々な 物理的刺激を受けている。それらの刺激の中でも光は生活 する上で避けることができないものである。生体に対する 光の影響は、エネルギーの大きな紫外線の影響を中心に評 価がされてきた。紫外線は組織において活性酸素種の増加 やDNA障害などを介して、色素沈着や細胞外マトリック スの分解、炎症の惹起などを引き起こす $^{1)}$ 。紫外線により 引き起こされるこれらの応答は、シミやしわといった皮膚 の老化現象と類似していることから光老化と呼ばれる。一 方、紫外線よりも長波長の可視光線は皮膚の美容領域で利 用されており、皮膚に存在する細胞は表1のように、浴び る光の波長によりペプチドやプロテアーゼの産生、セラミ ド合成、メラニン産生などの細胞応答が起こることが報告 されている。このような光線の曝露から細胞応答が起きる 反応には、光線の刺激が化学シグナルに変換されて細胞応 答が起こると考えられるが、皮膚における光応答の仕組み は不明な点が多い。皮膚が光を認識する機構として、光受 容体として機能するオプシンタンパク質の研究が進められ ている²⁾。オプシンタンパク質はGタンパク質共役型受容 体に分類され、サブタイプの違いによって認識する波長が 異なる。眼の網膜では、青、緑、赤の波長を受容するオプ シンタンパク質が網膜の錐体細胞に発現しており外界から の光の色の違いを識別している。また、その活性には、オ

Activation mechanism of photoreceptors expressed in skin tissue

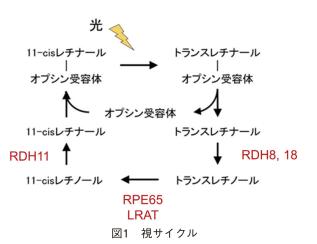
Hiroyuki Yamamoto

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nihon Pharmaceutical University

プシンタンパク質に11-cisレチナールが結合していることが重要である。オプシンタンパク質に結合する11-cisレチナールは光線の曝露によってall trans-レチナールに変換された後、オプシンタンパク質から解離される。そのため、11-cisレチナールを失ったオプシンタンパク質は失活する。眼では解離したall trans-レチナールが再び11-cisレチナールとなりオプシンタンパク質に結合する経路(図1 視サイクル)が存在し、オプシンタンパク質が活性を持続できる環境が整っている³。。そこで本研究では、光線の曝露による皮膚の活性化機構についてオプシンタンパク質に着目し、初めに皮膚に発現するオプシン類の探索を

表1 波長による皮膚由来細胞の応答の違い

	紫外	青色	緑色	赤色
コラーゲン合成	\downarrow			↑
プロテアーゼ産生	↑	\uparrow	\uparrow	
セラミド合成				\uparrow
ヒアルロン酸合成				\uparrow
メラニン産生	\uparrow	1		\downarrow



行った。また、皮膚に発現するオプシンが光を受けて活性を維持するために必要な視サイクルが皮膚においても存在しているのかを検証した。さらに、皮膚に発現するオプシンタンパク質が光を受けて活性を調整しているのかをレチナール代謝産物を検出することで評価した。

2. 方 法

2.1. 実験動物と培養細胞

実験には、Sprague-Dawley ラット(SDR)および弘前小眼球ラット (Hirosaki Small Eye Rat; HiSER)を用いた。 HiSER ラットは、SDRより自然突然変異により発生したラットであり、常染色体劣性遺伝性かつ進行性の水晶体の白濁や退縮、網膜の剥離などの異常を示すラットである 4 。 ラットの飼育は、室温 23 ± 1 $^{\circ}$ $^{\circ}$ 、湿度 50 $^{\circ}$ 、明暗を 12 時間サイクルに維持された飼育室にて、摂餌・飲水は自由に摂取できる環境で飼育した。本実験は日本薬科大学動物実験倫理委員会によって承認を受けて実施した。

また、実験に用いたラット胎児角化細胞 (FRSK) は、JCRB細胞バンク (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所) より分譲されたものを用いた。FRSK細胞は、10% FCSを添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で、 CO_2 インキュベーターを用いて5% CO_2 、37℃の条件で培養した。

2. 2. ラット胎児角化細胞に発現する光受容体および 視サイクル関連酵素mRNA発現の検討

FRSK細胞を10cmシャーレに1×10⁷細胞となるように播種した。24時間後、培地を除去した後、RNA抽出用試薬Isogenを用いてtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNAは、逆転写酵素 (ReverTra Ace、東洋紡)を用いてcDNAを合成した。また、SDRおよびHiSERより背部皮膚と眼組織を採取し、FRSK細胞と同様にcDNAを調製した。調製したcDNAを用いて、光受容体および視サイクル関連酵素遺伝子の発現をPCR法により検討した。光受容体は、OPN1-SW、OPN1-MW/LW、OPN2、OPN3、OPN4およびOPN5 mRNAの発現をPCR法により検討した。また、視サイクル関連酵素はレチノールデヒドロゲナーゼ (RDH)8、RDH12、RDH11、レシチン-レチノールアシルトランスフェラーゼ (LRAT)およびレチノイドイソメロヒドロラーゼ (RPE)65 mRNAの発現をPCR法により評価した。

2. 3. ラット胎児角化細胞に発現するRPE65タンパケ質の検出

FRSK 細胞を 10 cm シャーレに 1×10⁷ 細胞となるように 播種した。24 時間後、培地を除去した後、PBS で細胞を 洗浄後、RIPA 緩衝液で細胞を可溶化してタンパク質を抽 出した。抽出液は遠心分離後、上清を回収してウエスタンブロットの試料とした。ウエスタンブロットは、12% アクリルアミドゲルにて試料を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。転写したニトロセルロース膜は、スキムミルクでブロッキング後、抗RPE65 抗体(3,000 倍、GeneTex社)、2次抗体としてHRP標識抗ウサギIgG抗体(10,000 倍、SeraCare社)で反応させたのち、RPE65 タンパク質をイムノスターゼータ(和光純薬)で検出した。

2.4. レチナール代謝産物の検出

10 cm シャーレに 1×10^7 細胞となるように播種した。 24 時間培養後、細胞を 350 nm-850 nm の波長を含む LED 光で15分間、曝露した。曝露後、10分および30分の細 胞からレチナール代謝産物およびレチノール代謝産物を抽 出した。また、LED光で曝露していないものを非照射細 胞として用いた。レチナール代謝産物は、ホルムアルデヒ ド法⁵、レチノール代謝産物はヘキサン⁶⁾により抽出した。 すなわち、レチナール代謝産物は、PBSで洗浄後、6Mホ ルムアルデヒドで固定した後、レチナール代謝産物をジク ロロメタン/n-ヘキサンで分配抽出した。抽出物は遠心エ バポレーターにて乾固させた。また、レチノール代謝産物 は、PBSで洗浄後、エタノールで除タンパク質した後、ジ クロロメタン/n-ヘキサン溶液によりレチノールを抽出し た。抽出物は遠心エバポレーターにて乾固させた。抽出し たレチナール代謝産物とレチノール代謝産物はメタノール /リン酸緩衝液で溶解後、逆相カラム(コスモシール Cholesterカラム、ナカライテスク)を用いた高速液体クロ マトグラフィーにより分離し、溶出時間からレチノールお よびレチナール代謝産物の分子型を評価した。

3. 結果

3. 1. 角化細胞および皮膚組織に発現する光受容体の 探索

皮膚組織に発現する光受容体の探索を行った。その結果、ラット背部の皮膚組織にはOPN1-SW、OPN3、OPN4およびOPN5 mRNAの発現が認められた(図2-A)。ラットの皮膚に発現する光受容体の波長と活性の関連を図2-Bに示す。このことから、皮膚組織にはUV-Aに相当する380nm付近から緑色の550nm付近の波長に応答する光受容体が発現することが示された。紫外線や青色光などの短波長の光は組織への透過力が弱く表皮や真皮にまでしか到達しない。そこで、皮膚で最も外部に位置する表皮の主な細胞である角化細胞に与える影響が大きいと考え、角化細胞に発現する光受容体をRT-PCR法にて解析した。その結果、FRSK細胞にはOPN1-SW、OPN2、OPN3およびOPN5mRNAの発現が認められた(図2-A)。FRSK細胞に発現する光受容体と活性化される波長の関係から、皮膚組織と

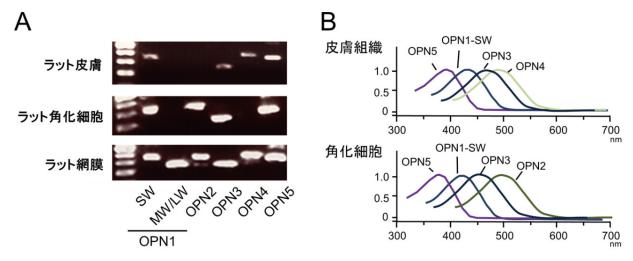


図2 ラット皮膚および皮膚角化細胞における光受容体遺伝子の発現検討

A: RT-PCR法によるラット皮膚およびラット角化細胞に発現する光受容体mRNAの検討

B:皮膚組織および角化細胞に発現する光受容体と応答する波長の関係

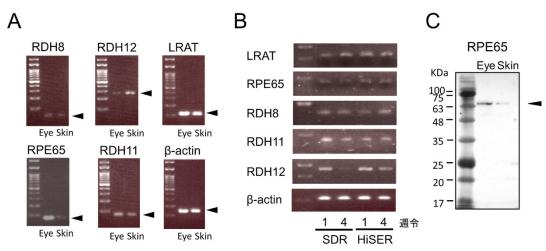


図3 ラット皮膚および皮膚角化細胞での視サイクル関連酵素の発現検討

A: RT-PCR法によるラット皮膚および眼組織に発現する視サイクル関連酵素発現の検討

B:皮膚に発現する視サイクル関連酵素発現の系統の違いに関する検討

C: ウエスタンブロットによるRPE65タンパク質発現の検討

同様にFRSK細胞は380nmから550nm付近の光線を認識する光受容体が発現していることが示唆された(図2-B)。

3.2. 皮膚組織に発現する視サイクル関連酵素の探索

ラットの皮膚組織や表皮角化細胞に複数の光受容体が発現していることが示唆された。そこで、光受容体が活性を維持するために必要な視サイクルに関わる酵素が皮膚組織に発現しているかを確認するために、RT-PCR法にて検討した。その結果、図3-Aに示すように眼組織と同等に皮膚組織においても視サイクルに関わるRDH8、RDH12、RDH11、LRATおよびRPE65 mRNAの発現が認められた。この結果は光の曝露により光受容体から遊離したall

trans - レチナールが all trans - レチノール、11 cis-レチナールを介して 11 cis - レチノールに変換されるのに必要なすべての酵素が発現していることを示している。また、視サイクルに関わる酵素の発現が週齢やラットの系統により違いがあるのかについても検討を行った (図 3-B)。その結果、SDR および HiSER ラットのいずれの系統においても、視サイクルに関わる酵素の発現が認められた。また、酵素の発現は1週齢から4週齢にかけて大きな変化は認められなかった。さらに、all trans - レチノールを 11 cis - レチナールに変換する RPE 65 タンパク質の発現をウエスタンブロット法にて検出した。その結果、ラット皮膚においても眼組織と同様に RPE 65 が発現していることが示された (図 3-C)。

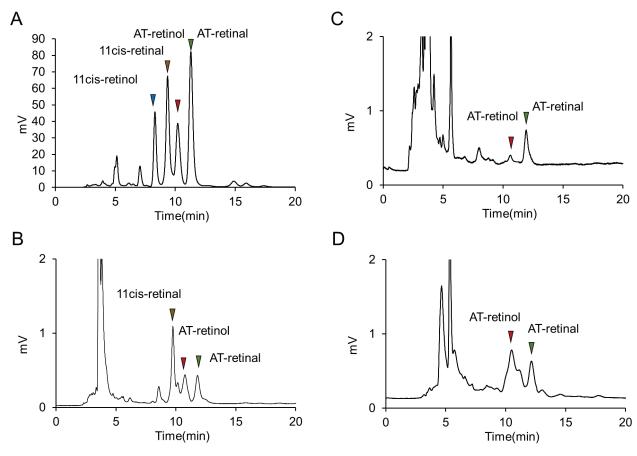


図4 光線曝露後の角化細胞内のレチノールおよびレチナール代謝産物の検出 A:標準物質の溶出位置、B:光線非曝露細胞、C:光線曝露10分後、D:光線曝露30分後

3.3. 角化細胞における光線曝露後のレチナール代謝

ラットの皮膚組織や表皮角化細胞に光受容体が発現して おり、その活性の維持に関わる視サイクルが存在している ことが示唆された。そこで、FRSK細胞が光線の曝露を受 けたときに、細胞に発現する光受容体が活性化されている のか、また、光受容体の活性を維持するためにレチノール およびレチナール関連分子が代謝を受けているのかを明ら かにすることを目的に光線曝露後のレチナール代謝産物の 経時変化を解析した。図4-Aに視サイクルで生成される レチナールおよびレチノール代謝産物の標準物質のクロマ トグラムを示す。本実験条件では11cis-レチナール、 11 cis - レチノール、all trans-レチナールおよびall trans-レチノールはそれぞれ、9.1分、8.1分、11.0分および 10.0 分付近に溶出された。LED光で細胞を曝露する前に は、11 cis - レチナールの存在割合が大きく、11 cis - レチノ ール、all trans-レチナールおよびall trans-レチノールは 検出されるものの存在割合は小さかった(図4-B)。次に、 LED 光線曝露 10 分後では、11 cis-レチナールはほとんど 検出されなくなり、all trans-レチナールの存在割合が最 も高くなった(図4-C)。さらに、LED光線曝露後30分に

なると、all trans-レチナールのピークは減少し、all trans-レチノールの割合が大きくなった(図 4-D)。

4. 考察

以上より皮膚組織においても眼と同様に光受容体である オプシンタンパク質の発現が認められ、可視光線を感受す ることが示唆された。皮膚組織に発現する光受容体の応答 波長をまとめると皮膚は紫外光から緑色光にわたり、広い 範囲の波長で光を受容することが可能であると考えられた。 これまでに、角化細胞や毛乳頭細胞において青色光により 活性化されるOPN3の発現が報告されており、角化細胞 では分化を抑制することにより表皮を厚くすることで皮膚 の保護作用を亢進すること 7) や毛乳頭細胞では毛髪の成長 速度を促進すること 8) が報告されている。紫外光や青色光 は短波長の光線に分類され、皮膚の透過性は小さく、組織 に与える影響が大きい波長である。そのため、これらの応 答は光線曝露からの生体の防御応答と考えられた。一方、 赤色光の長波長を認識する光受容体は検出されておらず、 オプシンタンパク質以外に光を認識する仕組みの存在が予 想された。

皮膚組織においてオプシンタンパク質の活性維持に必要な酵素の発現も認められ、皮膚に発現するオプシンタンパク質が機能していることが強く示唆された。また、皮膚角化細胞に光線を曝露すると一過性に all trans-レチナールが増加し、その後 all trans-レチノールの増加が見られたことから、皮膚角化細胞においても視サイクルと同様の代謝が行われていることが示された。さらに、光線の曝露によって all trans-レチナールが増加したことは、皮膚角化細胞に発現するオプシン受容体が曝露された光線に応答していることを示している。本研究では、350から850nmの波長を示すLED光を用いているため、いずれの波長がオプシン受容体の活性調節に関わっているかまでは明らかにできていない。今後は、単一波長のLED光で曝露した時のレチナール代謝産物を検出することにより、細胞が認識する波長の同定に取り組む予定である。

5. 総 括

近年は、光を利用した病気の治療や美容分野での応用が進んでいる。これらの治療には、局所に高いエネルギーを 照射できる紫外光や生体の深部まで到達可能な近赤外光が 利用されているが、その作用発現の機序は不明な点が多く 残っている。本研究を進めることにより、効果的で安全な 光の利用を可能にできるものと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団のご支援をいただきましたことに心より感謝申し上げます。また、ここで報告した研究は、当研究室のメンバーの協力による成果です。メンバー各位に御礼申し上げます。

(引用文献)

1) Moriwaki S. Light-emitting diodes as a new medical tool in aesthetic dermatology. *Photomed. Photobiol.*

2017, 39, 1-5.

- 2) Suh S, Choi EH, Atanaskova Mesinkovska N. The expression of opsins in the human skin and its implications for photobiomodulation: A Systematic Review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2020, 36, 329–338.
- Choi EH, Daruwalla A, Suh S, Leinonen H, Palczewski K. Retinoids in the visual cycle: role of the retinal G protein-coupled receptor. *J Lipid Res.* 2021, 62, 100040.
- 4) Yamada T, Nanashima N, Shimizu T, Nakazawa Y, Nakazawa M, Tsuchida S. Establishment of a recessive mutant small-eye rat with lens involution and retinal detachment associated with partial deletion and rearrangement of the Crybal gene. *Biochem J.* 2015, 471 (2), 293–305.
- 5) Suzuki T, Fujita Y, Noda Y, Miyata S. A simple procedure for the extraction of the native chromophore of visual pigments: the formaldehyde method. *Vision Res.* 1986, 26 (3), 425-9.
- 6) Kane MA, Folias AE, Napoli JL. HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal Biochem.* 2008, 378 (1), 71-9.
- 7) Buscone S, Mardaryev AN, Raafs B, Bikker JW, Sticht C, Gretz N, Farjo N, Uzunbajakava NE, Botchkareva NV. A new path in defining light parameters for hair growth: Discovery and modulation of photoreceptors in human hair follicle. *Lasers Surg* Med. 2017, 49 (7), 705-718.
- 8) Castellano-Pellicena I, Uzunbajakava NE, Mignon C, Raafs B, Botchkarev VA, Thornton MJ. Does blue light restore human epidermal barrier function via activation of Opsin during cutaneous wound healing? *Lasers Surg Med.* 2019, 51 (4), 370–382.