

皮膚機能のサーカディアンリズムと時計遺伝子によるその調節機構の解明

日本大学薬学部健康衛生学研究室

榛葉 繁紀

In this study, we examined if reactive oxygen species (ROS) level shows circadian rhythm in the skin and role of the molecular clock system in the process. ROS level and gene expression involved in ROS production showed clear circadian rhythm in the skin of mice. The rhythmicity was diminished in the skin of molecular clock deficient mice. Consequently, we are led to conclude that molecular clock system may regulate the skin homeostasis by controlling the cellular ROS level.

1. 緒言

皮膚は、水分の喪失や透過を防ぐ水分保持機能、体温を調節する体温保持機能、さらには微生物や物理化学的刺激から生体を守るバリア機能など、内的ならびに外的環境変化に適応してホメオスタシスの維持を行うための様々な機能を担っている¹⁾。これらの皮膚機能が睡眠不足等の生活時間の変化により低下することが数多く報告されている^{2,3)}。このような生活時間の変化による皮膚機能の変化は、皮膚においてサーカディアンリズムが存在することを示唆しており、事実、体温調節、皮脂の産生さらには水分蒸散量などに日内変動が存在することが知られている^{2,3)}。

各組織・細胞における生理機能の日内変動は、多くの時計遺伝子により転写レベルにおいて調節されており、その中心は転写因子Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) である。BMAL1 欠損 (KO) マウスは、行動のサーカディアンリズムの消失をはじめとして多くの生理機能の異常を示すが⁴⁾、中でも最も著しい表現型は寿命の短縮ならびに各組織における老化マーカーの増加である⁵⁾。BMAL1KO マウスの寿命は、平均 37 週であり、通常の C57BL/6J マウスのそれに比較して著しく短い⁵⁾。また生後 30 週以内にはほぼ全ての BMAL1KO マウスは白内障を生じる⁵⁾。これらに加えて、剃毛後の体毛の再伸長阻害さらには皮下脂肪の減少等、皮膚機能に関連した老化現象が観察される⁵⁾。BMAL1 欠損に伴うこれら老化現象の発現メカニズムは明らかではないが、BMAL1KO マウスでは各臓器において活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) 量が増加しており、このことが加齢促進に関係していると推察される⁵⁾。

上述したように皮膚機能においてサーカディアンリズムの存在が示唆されること、さらにはサーカディアンリズムのマスターレギュレーターである *Bmal1* の遺伝子欠損により皮膚機能の低下に基づく老化現象が観察されることなどから皮膚機能維持における BMAL1 の重要性が予想される。そこで、本研究では、皮膚機能におけるサーカディアンリズムを明らかにするとともにその調節における BMAL1 の役割を検討する

2. 実験

2.1. 実験動物

実験動物の取り扱い日本大学薬学部実験動物倫理規定に準じて行った。1 ケージ当たり 3-6 匹に分配し自由給餌、温度 23±1℃、相対湿度 50±10%、明暗 12 時間周期の条件で飼育した。BMAL1 ヘテロ欠損マウス同士の交配により BMAL1 ホモ欠損マウスを繁殖した。また同腹より得られた野生型マウスをコントロールマウスとした。恒暗条件下における実験では、サンプル採取の前にマウスを恒暗条件下で 5 日間馴化させた後に実験に用いた。

明暗条件下における実験では時刻を ZT (Zeitgeber time) で表示した。ZT0 は明期の開始を、また ZT12 は暗期の開始を示す。

恒暗条件下における実験では時刻を CT (Circadian time) で表示した。CT0 は明暗条件下における明期の開始に相当する時刻を示す。

2.2. Total RNAの抽出

組織を Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、凍結プレス破碎装置 クライオプレス (マイクロテック・ニチオン化(株)) で破碎した後、TRI REAGENT (シグマアルドリッチ(株)) を用いて、total RNAを抽出した。残存する DNA を除去するために total RNA10μg を DNase (RT-grade, 和光純薬工業(株)) 2units により 37℃、15 分間の処理を行った。反応後フェノール/クロロホルム抽出により RNA を抽出し、アルコール沈殿により精製した。



Regulation of skin functions by the molecular clock system

Shigeki Shimba

Department of Health Science, School of Pharmacy, Nihon University

2. 3. 逆転写反応

2. 2. で得られたRNAを0.8 μM oligo dTプライマー（インビトロジェン株）および1mM dNTP（インビトロジェン株）を含むReaction buffer（和光純薬工業株）中において60℃、5分間、次いで37℃、10分間反応させた。その後、Reverse Transcriptase（和光純薬工業株）200unitsを加えて37℃、60分間、次いで95℃、15分間反応させ、cDNAを得た。

2. 4. Real-time PCR法によるmRNAの定量

2. 3. で得られたcDNA（0.1 μg total RNA相当）ならびに各種プライマー（最終濃度0.2 μM）をPlatimun SYBR Green qPCR SuperMix-UDG（インビトロジェン株）と混合し、MX3000P Q-PCR system（ストラタジーン株）を用いて変性：94℃、30秒間、アニーリング：58℃、30秒間、伸長反応：72℃、30秒間を35～40サイクル条件下で反応を行い、各mRNAの発現量を測定した。

2. 5. ROS量の測定

組織をPBSで洗浄した後、凍結プレス破碎装置 クライオプレス（マイクロテック・ニチオン株）で破碎した。その後、PBS中にてホモジナイズし、次いで900×g、15分間（4℃）遠心分離して得られた上清を組織抽出液とした。

試料中のタンパク質量を定量するために、組織抽出液にプロテインアッセイCBB溶液（ナカライテスク株）を添加し、混合・発色させた後、595 nmの吸光度を測定した。同様にウシ血清アルブミン（BSA）（インビトロジェン株）を用いて作成した検量線から、タンパク質量を算出した。

タンパク質量で補正した組織抽出液にH2DCFDA（インビトロジェン株）を加え、37℃で30分間インキュベートした後、485 nmならびに520 nmにおける蛍光強度を測定した。

2. 6. 8-OHdG測定

組織を採取した後、DNAエキストラクター TISキット（和光純薬工業株）を用いてDNAを抽出した。得られたDNAを、8-OHdG測定前処理試薬セット（和光純薬工業株）を用いて前処理した後、含まれる8-OHdG量を高感度8-OHdG Check（日本老化研究所）を用いて測定した。

3. 結果

3. 1. マウス皮膚における時計遺伝子発現の日内変動（明暗条件飼育下）

マウス皮膚における時計遺伝子の発現ならびにその日内変動を確認するため、明暗条件下（明期：暗期=12h：12h）で飼育したマウス背部より皮膚を採取し、その時計遺伝子の発現を検討した（Fig. 1）。体内時計のマスター

レギュレーターである*Bmal1* 遺伝子の発現量は、暗期から明期（ZT22-ZT2）にかけて最大となり、明期から暗期（ZT10-ZT14）にかけて最小となる日内変動が認められた（Fig. 1）。BMAL1のパートナーである*Clock*の発現量は、他の組織と同様にリズム性は認められなかった（Fig. 1）。BMAL1/CLOCKの転写を負に制御する*Cry1*の発現量は暗期にピークを迎えた。BMAL1/CLOCKの標的遺伝子である*Rev-erbα*ならびに*D site albumin promoter binding protein*（Dbp）の発現パターンはBMAL1におけるそれと逆位相を示し、明期にピークを迎えた（Fig. 1）。また時計遺伝子関連転写因子であるRAR-related orphan receptor（Ror）の発現量には日内変動は認められなかった（Fig. 1）。

3. 2. マウス皮膚における皮膚機能関連遺伝子発現の日内変動（明暗条件下飼育下）

明暗条件下にてその発現量が日内変動する皮膚機能関連遺伝子を探索するために、各遺伝子発現量を検討し、片側ANOVA解析により日内変動の有無を判定した。活性酸素消去酵素*Catalase*（Cat）の発現はZT10にトラフが存在する日内変動を示した。また、Cu, Zn-スーパーオキシドジスムターゼならびにグルタチオンペルオキシダーゼの発現も弱いながら日内変動を示した。活性酸素産生酵素であるNADPHオキシダーゼのサブユニットに関して、測定したいずれの遺伝子発現量も、ZT6に最小値を示し、ZT14に最大値を示す日内変動が観察された。

3. 3. マウス皮膚における時計遺伝子発現のサーカディアンリズム（恒暗条件下）

マウス皮膚における自律的な遺伝子発現の日内変動（サーカディアンリズム）の存在を確認するために、マウスを恒暗条件下で飼育し、その際の皮膚における時計遺伝子発現を検討した。その結果、明暗条件下と同様、時計遺伝子発現に振幅が認められ、特に*Bmal1* および*Clock*は明暗条件下よりも大きな振幅を示した（Fig. 2）。また、明暗条件下にて振幅を示さなかった*Ror*の発現量は、ZT18において増加が認められ、*Cry1*と同様の発現パターンを示した。以上のことから、マウス皮膚における遺伝子発現にサーカディアンリズムの存在が確認された。

3. 4. マウス皮膚における遺伝子発現のサーカディアンリズム（恒暗条件下）

マウス皮膚において、その発現にサーカディアンリズムを持つ皮膚機能に関連した遺伝子を探索するため、恒暗条件下で飼育したマウス皮膚における各遺伝子の発現量を検討した。検討した遺伝子のうち、*Colla1*、*Mmp3*、*Foxo1*、*Cu-Zn-Sod*、*Mn-Sod*、*Gpx*、*p40^{phox}*ならびに*p67^{phox}*の発現量が、CT2~CT14にかけて低く、CT18~CT22に高い

発現の変動を示した。

3. 5. マウス皮膚における活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)量

活性酸素は細胞内代謝や遺伝子発現をはじめとする多くの分子反応を制御しており、様々な生理反応に影響を与え

る。そこで、マウス皮膚におけるROS量の日内変動を検討した。明暗条件下ではZT2およびZT10が高い傾向にあり、最大時と最小時で約2倍の量的違いが認められた(Fig. 3A)。恒暗条件下ではCT10が最も高く、最大時と最小時においては約5倍の量的違いが認められた(Fig. 3B)。これらの結果から、ROS量にサーカディアンリズムが存在

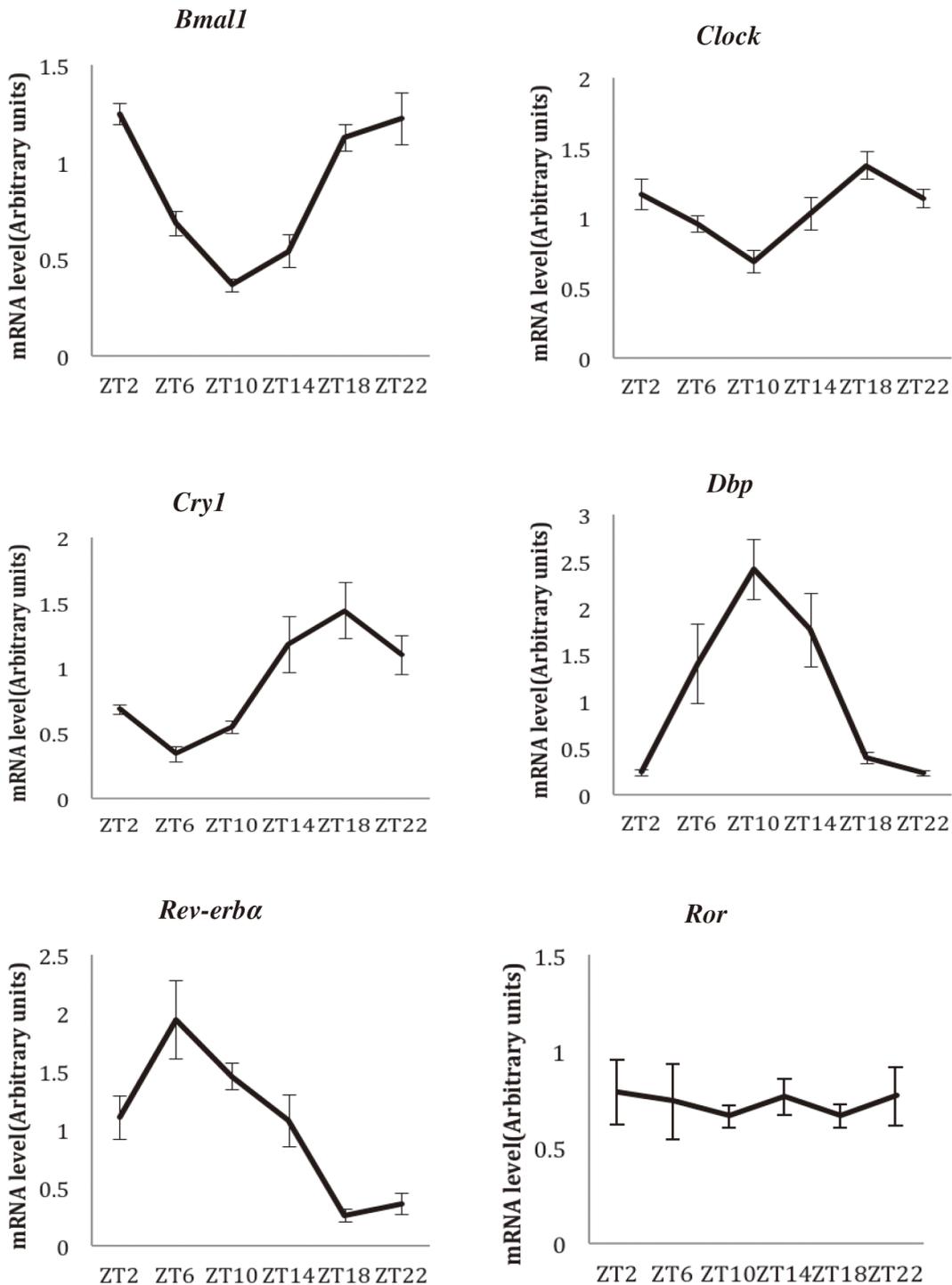


Fig. 1 マウス背部皮膚における時計遺伝子発現の日内変動
明暗条件下(12時間明期-12時間暗期条件下)にて飼育したマウス背部の皮膚を4時間ごとに採取し、mRNAの発現を、real-time PCR法を用いて検討した。Mean±SEM (n=5)

することが示された。

3. 6. BMAL1 欠損に伴うマウス皮膚における ROS 量

前節において、皮膚における ROS 量にサーカディアンリズムがあることが示された (Fig. 3B)。そこでコントロールマウスならびに BMAL1KO マウスの皮膚にお

ける ROS 量を測定し、ROS 産生における BMAL1 の関与を検討した。若齢 (10 週齢) においてコントロールマウスと BMAL1KO マウスの間に皮膚 ROS 量の違いは認められなかった (Fig. 4)。しかしながら、20 週齢において、コントロールマウス皮膚における ROS 量は 10 週齢時に比べて約 3 倍に増加したが、BMAL1KO マウスのそれは 10 週齢時

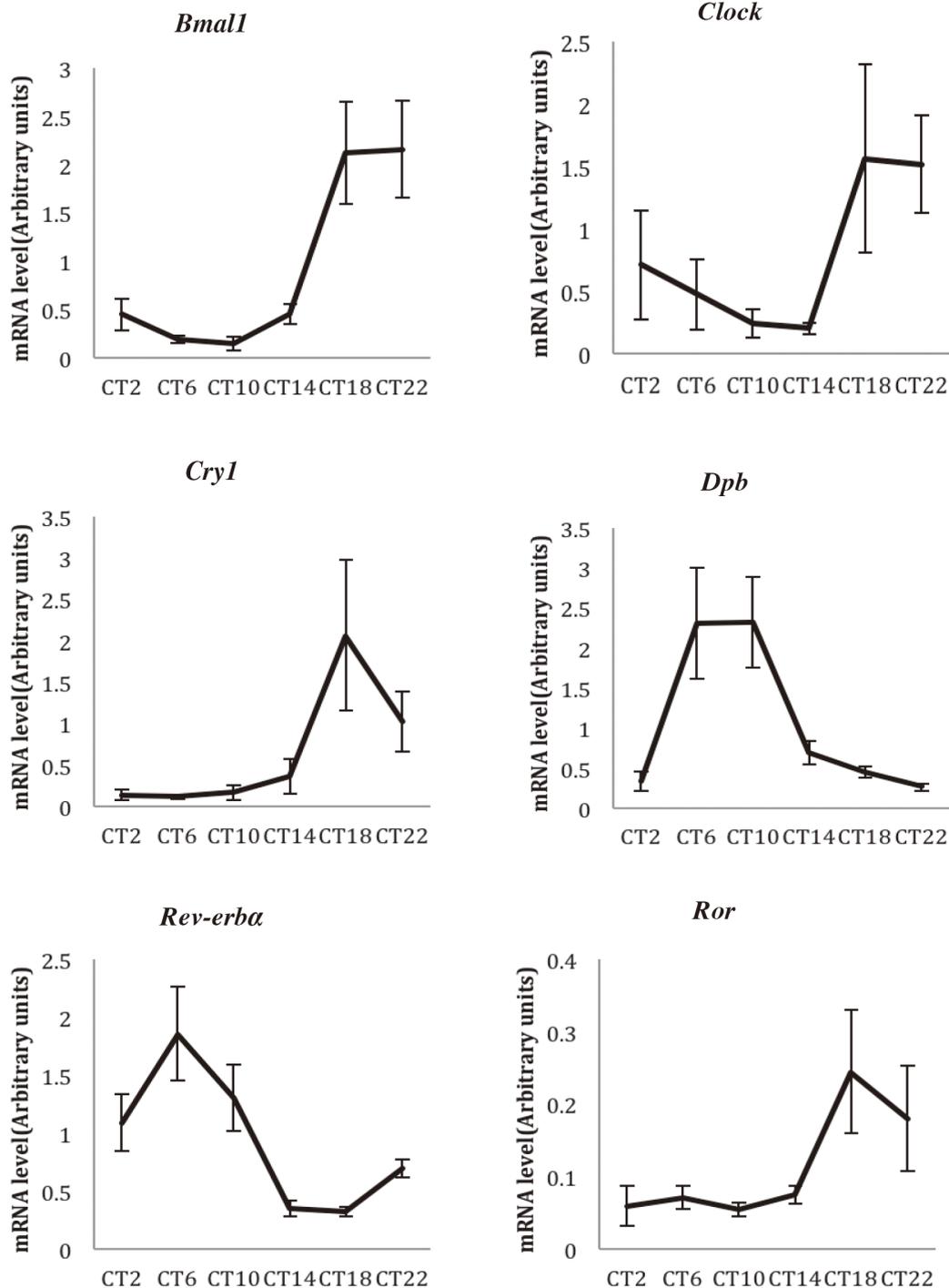


Fig. 2 マウス皮膚における時計遺伝子発現のサーカディアンリズム
 恒暗条件下にて馴化させたマウス背部の皮膚を4時間ごとに採取し、mRNAの発現を、real-time PCR法を用いて検討した。Mean±SEM (n=5)

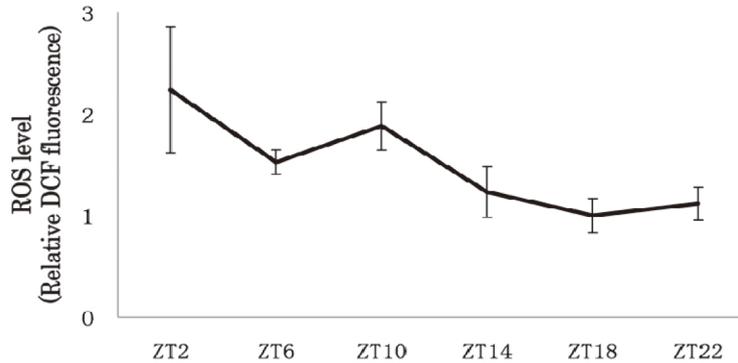
と同程度であった (Fig. 4)。

3. 7. DNA 酸化 損 傷 マーカ ー 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 量

細胞内 ROS による DNA の酸化損傷に伴い 8-OHdG が生

成する。そこで 3. 6. において ROS 量に差の生じた 20 週齢のコントロールマウスと BMAL1KO マウス皮膚を用いて、8-OHdG 量を検討した。その結果、BMAL1KO マウス皮膚において減少傾向が見られた (Fig. 5)。

(A) 明暗条件下



(B) 恒暗条件下

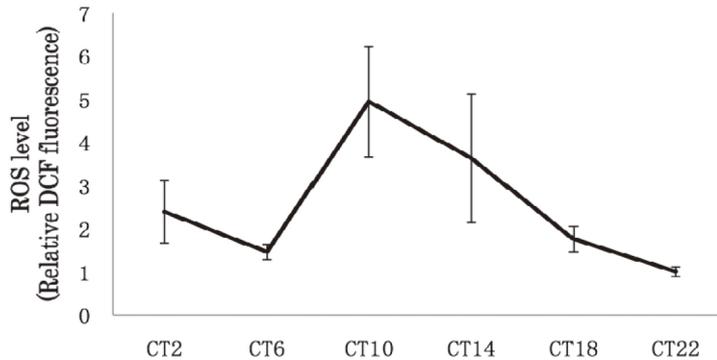


Fig. 3 マウス背部皮膚における ROS 量の日内変動およびサーカディアンリズム明暗条件下(12 時間明期 -12 時間暗期条件下)にて飼育したマウス(A)ならびに恒暗条件下にて馴化させたマウス(B)の背部皮膚を4時間ごとに採取し、その ROS 量を、 H_2DCFDA を用いて測定した。Mean \pm SEM (n=5)

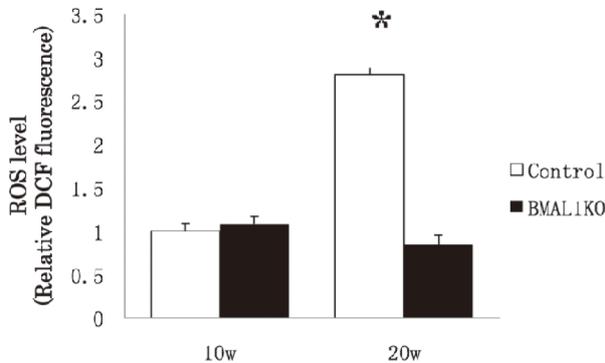


Fig. 4 マウス背部皮膚における ROS 量明暗条件下にて飼育した 10 週齢 (10w) ならびに 20 週齢 (20w) のコントロールマウスおよび BMAL1KO マウスから背部皮膚を ZT10 に採取し、その際の ROS 量を、 H_2DCFDA を用いて測定した。Mean \pm SEM (n=3) (* p <0.05)

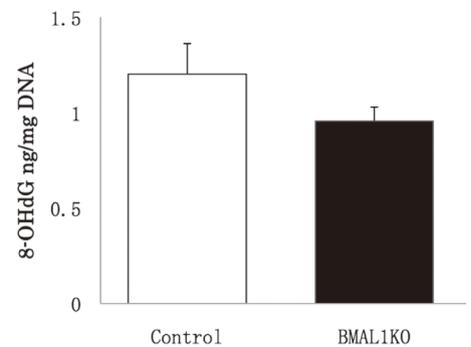


Fig. 5 マウス皮膚における 8-OHdG 量明暗条件下にて飼育した 20 週齢のコントロールマウスおよび BMAL1KO マウス皮膚を ZT10 に採取し、8-OHdG 量を、ELISA キットを用いて測定した。Mean \pm SEM (n=3)

3. 8. BMAL1KO マウス皮膚における活性酸素関連遺伝子の発現変化

BMAL1 による皮膚機能調節を検討するため、ZT10 および ZT22 においてコントロールマウスと BMAL1KO マウスの背部皮膚を採取し、その遺伝子発現を検討した。活性酸素消去系酵素の発現はいずれの時間においてもコントロールマウスと BMAL1KO マウスとの間に差異は認められなかった (Fig. 6A)。一方、活性酸素生成酵素である

NADPH オキシダーゼサブユニット類の発現は、検討したいずれの時間においても BMAL1KO マウスにおいて減少傾向が認められた (Fig. 6B)。

4. 考 察

皮膚機能におけるサーカディアンリズムを解明するためには、まず皮膚における時計遺伝子の発現パターンを明らかにする必要がある。明暗条件下で飼育したマウス皮膚を4時間ごとにサンプル採取し、時計遺伝子発現パターンを解析したところ、*Ror* を除くすべての時計遺伝子は日内変動を示した (Fig. 1)。そこで、これら明暗条件下における遺伝子発現変化が、光刺激により誘導される“日内変動”であるのか、あるいは自律的な“概日リズム (サーカディアンリズム)”の存在を反映しているものなのかを明らかにする目的で、恒暗条件下においてマウスを飼育し、その皮膚における遺伝子発現を解析した。その結果、時計遺伝子の発現は明暗条件下と同様の発現パターンを示し、さらには明暗条件下では変動しなかった *Ror* の発現量にもリズム性が生じていた (Fig. 2)。また、*Bmal1* や *Clock* の発現パターンを両飼育条件間で比較するとわかるように、恒暗条件下のほうが明暗条件下よりも、変動の幅が大きくなっていることがわかる (Fig. 1 および 2)。これらの結果から、皮膚における遺伝子発現にはサーカディアンリズムが存在すること、そしてその活性は光刺激の影響を少なからず受けることが示され、*Ror* の発現は、この光刺激によるサーカディアンリズムの抑制の一例であると考えられる。

恒暗条件下で飼育したマウス背部皮膚を用いた検討から皮膚における ROS 量にサーカディアンリズムの存在が示されたことから、皮膚における ROS 量制御への BMAL1 の関与が示唆された (Fig. 3B)。BMAL1KO マウスにおける ROS 量はコントロールマウスのそれに比較して、脾臓、心臓、腎臓は増加、その一方で肝臓では低下が報告されている⁵⁾。そこで皮膚における ROS 量を測定したところ、10 週齢時における ROS 量は、コントロールマウスと BMAL1KO マウスとの間で差異は認められなかった (Fig. 4)。さらにこの際、DNA 酸化損傷のマーカーである 8-OHdG の値も、BMAL1KO マウスにおいて減少傾向が見られた (Fig. 5)。これらの結果より、BMAL1 は皮膚における ROS 量、特に加齢に伴う皮膚における ROS 量の産生を制御していることが明らかとなった。

次いで ROS 量の制御に関与する因子の遺伝子発現量を検討した。これら因子の発現は、時計遺伝子により産み出されるサーカディアンリズム、そして明暗周期による、すなわち光刺激により誘導される日内変動のいずれの影響も受けることが示された。例えば、恒暗条件下飼育マウスを

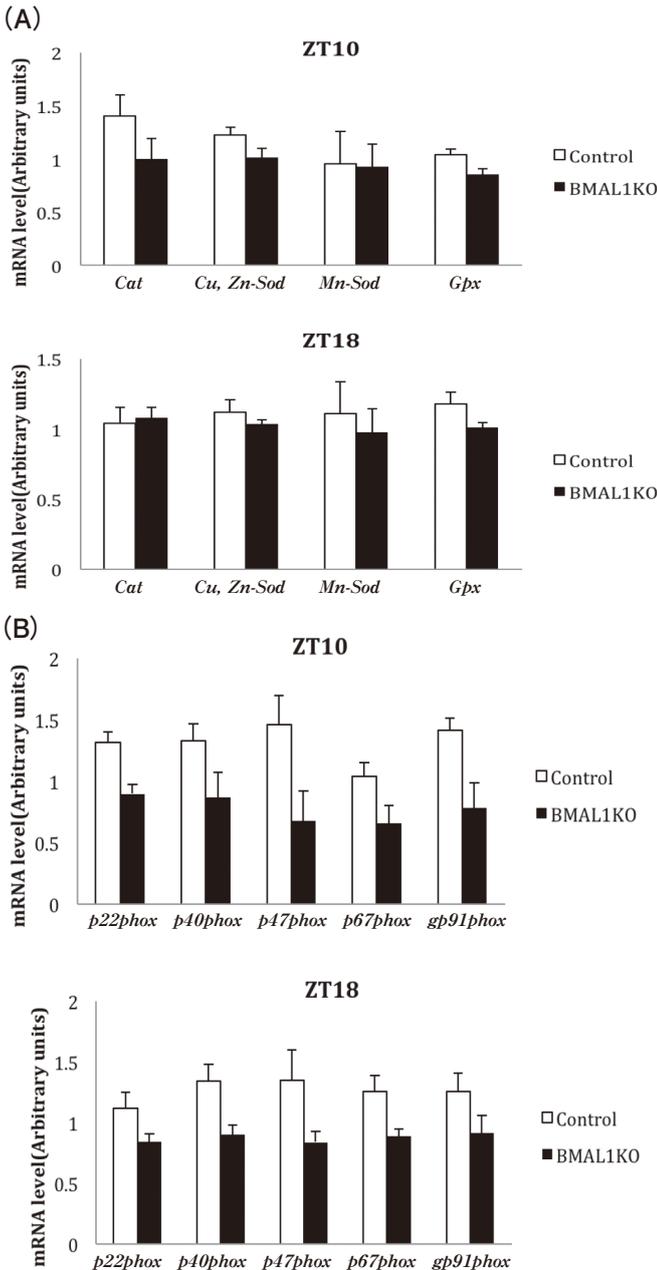


Fig. 6 BMAL1KO マウス皮膚における活性酸素関連因子の遺伝子発現
明暗周期条件下にて飼育した 10 週齢のコントロールマウスおよび BMAL1KO マウスから背部皮膚を ZT10 および ZT18 に採取し、その mRNA の発現を、real-time PCR 法を用いて検討した。(A) 活性酸素消去系 (B) 活性酸素産生系 Mean±SEM (n=7) (*p<0.05)

用いた検討により、*Cu*, *Zn-Sod*, *Mn-Sod*, ならびに *Gpx* の発現にサーカディアンリズムの存在が確認されたが、その一方で、明暗条件下で飼育した *BMAL1KO* マウスにおいて、これら遺伝子の発現に差が認められなかった。このことは、これら遺伝子の発現の制御は、*BMAL1* による制御を受けるものの、光刺激の影響が強いことを示している。他にも *Cat* あるいは *NADPH* オキシダーゼのサブユニットの一部の発現解析からも、光刺激による制御が支持される。

これらの結果から、皮膚において様々な機能が1日を通じて変動していることが示唆され、またその制御には時計遺伝子による制御のみならず、光刺激の関与も大きいことが明らかとなった。したがって本研究で得られたこれら知見は、生活時間の重要性を説くものであり、今後、化粧品開発をはじめとして、皮膚機能調節における概念に科学的エビデンスを与えるものである。

(引用文献)

- 1) 清水 広：あたらしい皮膚科学 中山書店 2011.
- 2) Yosipovitch G, Xiong GL, Haus E, Sackett-Lundeen L, Ashkenazi I, Maibach HI: Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. *J. Invest. Dermatol.*, 110, 20-23, 1998.
- 3) Le Fur I, Reinberg A, Lopez S, Morizot F, Mechkouri M, Tschachler E: Analysis of circadian and ultradian rhythms of skin surface properties of face and forearm of healthy women. *J. Invest. Dermatol.*, 117, 718-724, 2001.
- 4) Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA: *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103, 1009-1017, 2000.
- 5) Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP: Early aging and age-related pathologies in mice deficient in *BMAL1*, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.*, 20, 1868-1873, 2006.