

有害物侵入を最前線で防ぐ新規な皮膚細胞機構の発見と皮膚保護剤創製への応用

岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

中村 元直

G-protein coupled receptors (GPCRs) are pivotal targets in medical and pharmaceutical research fields because a wide variety of disease-related processes are critically controlled by the signal transduction mediated by these receptors. Type 2 bitter taste receptors (TAS2Rs) comprise a large family of GPCRs with 25 distinct isoforms encoded in the human genome. Recent studies have shown that TAS2Rs are not only expressed in the taste buds of the tongue, but also in the skin. In the present study, we showed the functional expression of all human TAS2Rs in the human keratinocytes. Interestingly, these TAS2R proteins are not localized on the plasma membrane, mainly detected in the cytoplasmic regions in the immune-fluorescent staining experiments of the keratinocytes. The expressions of TAS2Rs in these cells were enhanced by the stimulation with bitter compounds, such as denatonium, diphenhydramine and saccharine. Furthermore, the stimulation of bitter compounds further increased the expression of three ABC-transporters, ABC-B1, ABC-C1 and ABC-G2, which are involving in the multidrug-resistance of various cancer cells. These results raise the possibility that the activation of TAS2Rs by the bitter compounds enhances the exclusion of these substances from the keratinocytes through the ABC-transporters. The analyses of the signaling pathway evoked by the TAS2Rs revealed the coupling of these receptors with G α i and/or G α 12/13, followed by the activation of NF- κ B. Together, these results suggest that the keratinocytes possess TAS2Rs in the cytoplasmic organelles, and recognize the infiltrated substances, including bitter compounds, resulting in the activation of the ABC-transporters, such as ABC-B1, ABC-C1 and ABC-G2, to exclude the substances.

1. 緒言

ヒトは自然界で生きる限り様々な有害物に触れる。生命をも脅かすこうした異物は2つに分類される。1つはウイルスや細菌などの病原微生物であり、もう1つは有害化合物である(図1)。ヒトは前者に対しては免疫防御システムで対抗する。しかし後者に対しては、苦味感覚による拒絶反応こそあるものの、皮膚などに侵入した有害物を感知し、排出する機構については十分解明されていない。我々は、苦味受容体が有害物排除に深く関わると予測している。即ち、皮膚に発現する苦味受容体は、細胞内に侵入した有害物をリガンドとして感受して活性化され、排除機構発動シグナルを惹起することで有害物を細胞外に排出するという仮説である(図2)。ところで、ヒト苦味受容体遺伝子には多様性があり、個々人で若干の配列差異が存在する。この配列多様性は異物排除能の個人差に直結する。ある苦味受容体が皮膚細胞内に侵入した炎症原因物質を感受できない配列の場合、当該物質を細胞外に排除できず、蓄積してしまうことで皮膚に悪影響を及ぼすであろう。これが有害物侵入に起因する皮膚炎の個人差と考える。こうした人のためには無害な苦味受容体賦活剤を創製し、これを炎症部位

に塗布することで排除機構を作動させ、蓄積有害物の排除を促進することで皮膚炎悪化を回避させることができるかもしれない。こうした奇抜な発想を実現化するために基盤的な知見を積み上げるのが本課題の目的である。

2. 方法

2.1. 苦味受容体の皮膚組織、細胞株での発現解析

ヒトケラチノサイト(-/+分化)、および、ヒト表皮角化細胞株であるHaCaT細胞での25種類の苦味受容体遺伝子の発現確認は、これら細胞よりRNAを調製してcDNAを合成後、これを鋳型としたRT-PCR法で行った。なお、ヒトケラチノサイトの分化誘導は、1mM塩化カルシウム添加下での3日間培養で行った。

2.2. ヒト皮膚組織での苦味受容体タンパクの発現解析

ヒト皮膚組織切片を用いた苦味受容体タンパク(25種類のうち、TAS2R14とTAS2R38を解析)の発現解析は、市販の抗TAS2R14抗体と抗TAS2R38抗体を用いて行った。本解析は、東京大学医学部皮膚科の住田隼一医師に依頼し、実施して頂いた。解析に用いたヒト皮膚組織切片は、健康人から作製した組織とアトピー性皮膚炎患者から作製したものの2種類を用いた。

2.3. 苦味受容体の細胞内局在解析

ϕ 35mmのディッシュ(glass bottom)で培養したHaCaT細胞を固定化し、透過処理後、一次抗体反応(抗TAS2R14抗体と抗calnexin抗体、抗transferrin receptor抗体、抗



Functional expression of the bitter taste receptors in human keratinocytes

Motonao Nakamura

Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science

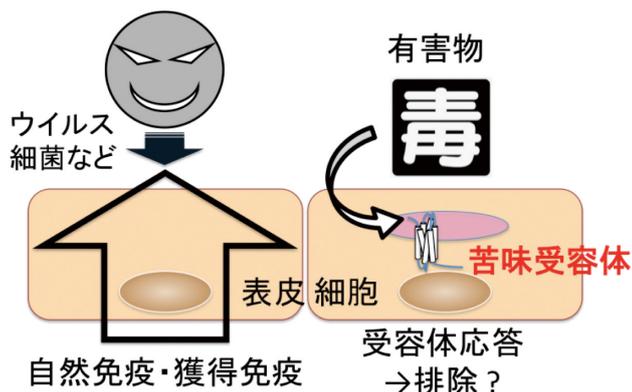


図1 ヒトが持つ2つの生体防御システム

生命を脅かす異物は2つに分類される。1つはウイルスや細菌等の病原微生物であり、もう1つは有害化合物である。ヒトは前者に対しては免疫防御システムで対抗する。しかし後者に対しては、皮膚などに侵入した有害物を感じ、排出する機構については十分解明されていない。我々は、苦味受容体が有害物排除に深く関わりと予想している。

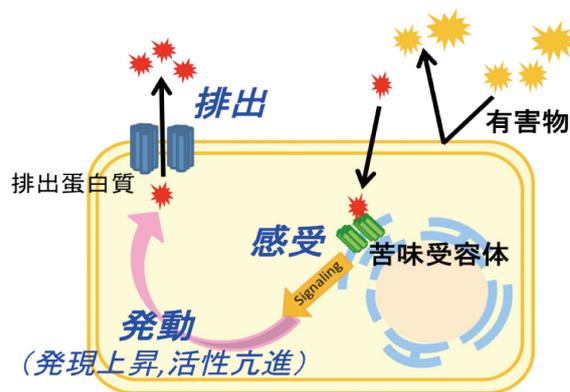


図2 皮膚細胞への有害物の侵入(作業仮説)

皮膚は様々な危険物質に曝される。大きい物質や親水性物質は角質層や脂質二重膜によって細胞内侵入を阻止できるが、疎水性低分子は細胞内に侵入する。苦味受容体の局在部位はどこか(感受)、リガンド(苦味物質)結合後、どのような情報伝達を発信するのか(発動)、受容体の活性化が有害物排除のトリガーとなるのか(排出)、本研究ではこの3つの課題に取り組む。

Golgin-97 抗体、抗EEA1 抗体、抗CD71 抗体、或いは、抗COX IV 抗体の組合せ)を行った。その後、二次抗体反応 (AF-546 標識抗ラビット IgG 抗体 [TAS2R14 抗体用] と AF-488 標識抗マウス IgG 抗体 [オルガネラマーカー抗体用]) を行い、PBS で洗浄後、共焦点蛍光顕微鏡を用いて苦味受容体とオルガネラマーカーの細胞内局在観察を行った。

2. 4. 分化ヒトケラチノサイトを苦味物質で刺激した際の苦味受容体遺伝子の発現上昇

ヒトケラチノサイトの分化誘導は、1mM 塩化カルシウム添加下での3日間培養で行った。分化ヒトケラチノサイト、および、線維芽細胞を1mM デナトニウムで15時間刺激後、これら細胞よりRNAを調製してcDNAを合成し、苦味受容体やABCトランスポーター (ABC-B1、ABC-C1、および、ABC-G2) の発現変動 (mRNA 量) を定量PCR法で行った。苦味受容体の解析は25種類の苦味受容体のうちTAS2R14 と TAS2R38 について実施し、β-アクチンをコントロールとして評価した。

2. 5. ルシフェラーゼレポーター系を活用した苦味受容体情報伝達解析

HEK293T 細胞にTAS2R38 と5種類いずれかのGPCR シグナル応答性レポーター (CRE、SRE、AP-1、NFAT、或いは、SRF エレメントのいずれかを連結した深海エビルシフェラーゼ [NanoLuc]) を導入し、TAS2R38 リガンド (フェニルチオカルバミド; PTC、或いは、6-n-プロピルチオウラシル; PROP) で刺激した際のルシフェラーゼ活性の上昇を評価した。リガンド刺激はいずれも1mM濃度で、

15時間刺激した。

2. 6. NF-κBの活性化の評価

1mM 塩化カルシウム添加下での3日間培養で分化誘導したヒトケラチノサイトを1mM デナトニウムで15時間刺激後、Hypotonic 緩衝液で細胞を破碎し、遠心分離により核画分を単離した (上清は細胞質画分として解析に供した)。その後、この核画分を核タンパク質抽出緩衝液に懸濁することで核タンパク質を抽出し、核タンパク質画分として解析に供した。本実験では古典的経路に着目し、検出はNF-κBの構成サブユニットのうち、p65に着目して解析を行った。即ち、細胞質タンパク質画分と核タンパク質画分に存在する total p65 比較と核内リン酸化p65の量をWestern blottingでの検出バンドの濃さで比較した。

3. 結果

ヒトはGタンパク質共役型受容体 (GPCR) に属する25種類の苦味受容体遺伝子を持つ。本研究ではまず、苦味受容体に関する以下の3つの知見を得ることを目指した。(i) この受容体群は皮膚細胞に発現する、(ii) この受容体は形質膜ではなく細胞内に局在する、(iii) 皮膚細胞を苦味物質で刺激すると異物排出に関わるABCトランスポーターの発現が増強する。

3. 1. 苦味受容体群のヒトケラチノサイトにおける発現解析

ヒトケラチノサイトにおける25種類の苦味受容体遺伝子の発現をRT-PCRにて解析した結果、1mM 塩化カルシウムでの分化誘導によって角化系細胞に分化後、いずれの

受容体も明らかな発現上昇が認められた(図3)。なお、この発現上昇は定量PCRでも確認している(data not shown)。また、同様の25種類の苦味受容体遺伝子発現はヒト表皮角化細胞株であるHaCaT細胞においてもRT-PCR法で確認している(data not shown)。

3. 2. ヒト皮膚組織での苦味受容体タンパクの発現解析

ヒト皮膚組織切片を用いた苦味受容体タンパク(25種類

のうち、TAS2R14とTAS2R38を解析)の局在解析は、市販の抗TAS2R14抗体と抗TAS2R38抗体を用いて行った。本解析は、東京大学医学部皮膚科の住田隼一医師に依頼し、実施して頂いた。解析に用いたヒト皮膚組織切片は、健常人から作製した組織とアトピー性皮膚炎患者から作製したものの2種類を用いた。解析の結果、両受容体とも表皮付近に高い発現が認められたが、健常人とアトピー性皮膚炎患者との間に特筆すべき差異は認められなかった(図4)。

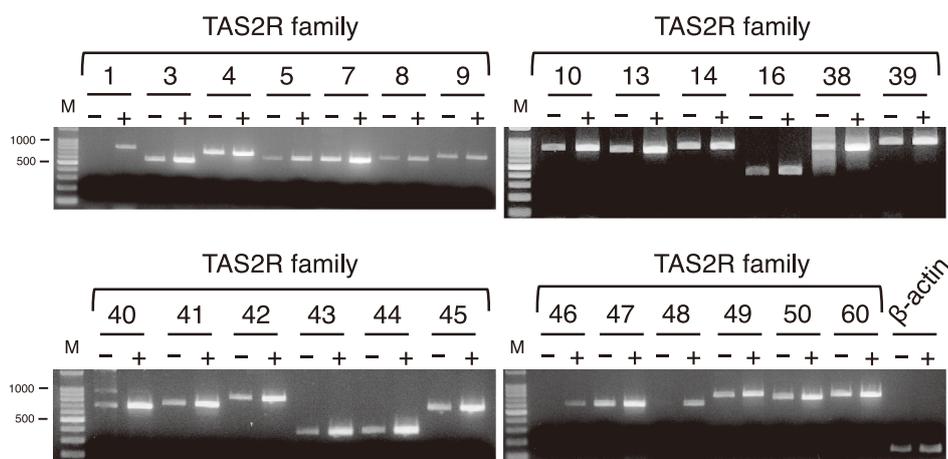


図3 ヒトケラチノサイトでの25種類の苦味受容体遺伝子の発現解析

ヒトケラチノサイト由来のcDNAを鋳型とした発現解析の結果を示す。ケラチノサイトは1mM 塩化カルシウム添加有無によって未分化(-)、分化(+)の2つの状態のものを用いた。これら細胞からRNAを調製し、このRNAから合成したcDNAを用いてRT-PCRを行った。いずれの細胞株からも25種類全ての苦味受容体の発現が認められた。

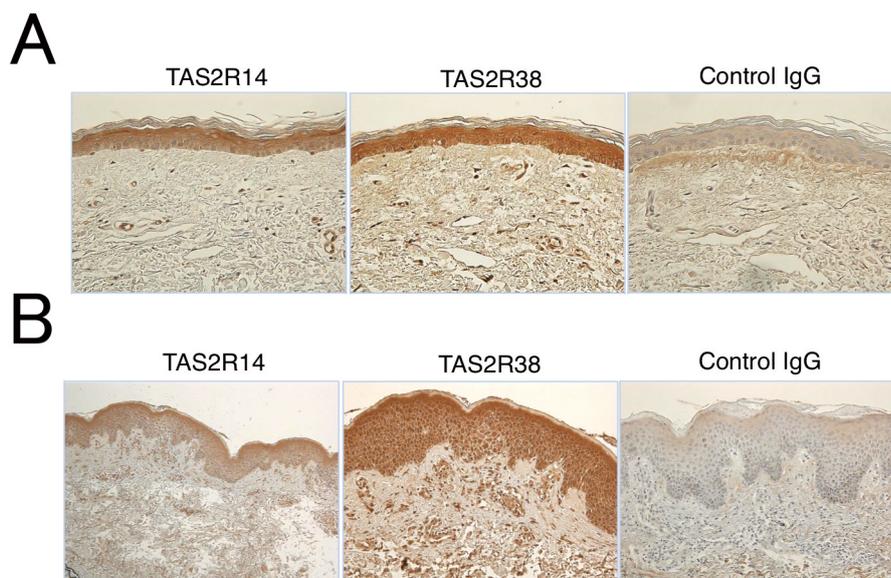


図4 ヒト皮膚組織におけるTAS2R14、および、TAS2R38タンパクの発現

ヒト皮膚組織におけるTAS2R14、および、TAS2R38タンパクの免疫染色実験の結果を示す。解析に使用したヒト皮膚組織切片は全て東京大学医学部にて倫理委員会の承認のもと、調整されたものである。Aは健常人から調整した皮膚組織、Bはアトピー性皮膚炎患者から調整した皮膚組織である(東京大学医学部皮膚科の住田隼一医師との共同研究)。

3. 3. 皮膚系細胞株における苦味受容体の細胞内局在解析

共焦点顕微鏡を用い、HaCaT細胞での当該受容体の細胞内局在を免疫染色で調べた結果、抗TAS2R14(図5)、抗TAS2R38(data not shown)のいずれの抗体を用いた解析でも受容体の局在は形質膜ではなく、細胞内を示唆するものであった。先行研究で皮膚組織における苦味受容体発現の報告はあるものの、細胞内局在への言及については全くない¹⁾。なお、小胞体(calnexin)、ゴルジ体(Golgin-97)、リサイクリングエンドソーム(transferrin receptor)、初期エンドソーム(EEA1)、リソソーム(LAMP-1)、ミトコンドリア(COX IV)などの局在マーカーを用い、共局在性を検討したが、何のマーカーに対しても有意な共局在性を示すものはなかった。なお、同様の細胞内局在はヒトケラチノサイトでも確認している(data not shown)。

3. 4. ヒトケラチノサイトを苦味物質で刺激した際の苦味受容体の発現増強

前述の分化ヒトケラチノサイトと線維芽細胞のそれぞれを1mMのデナトニウムで15時間刺激し、苦味受容体遺伝子発現量の変化を定量PCR法で調べた。図6に示すように、両受容体とも分化ヒトケラチノサイトでは苦味物質刺激で発現の上昇が認められたが、線維芽細胞では認められなかった。なお、同様の苦味物質刺激(1mMのデナトニウム、1mMサッカリン、0.1mM キニーネ塩酸塩など)による苦味受容体自身の発現増強はHaCaT細胞においても認めている(data not shown)。

3. 5. ヒトケラチノサイトを苦味物質で刺激した際のABCトランスポーターの発現増強

前述の分化ヒトケラチノサイトを1mMデナトニウムで

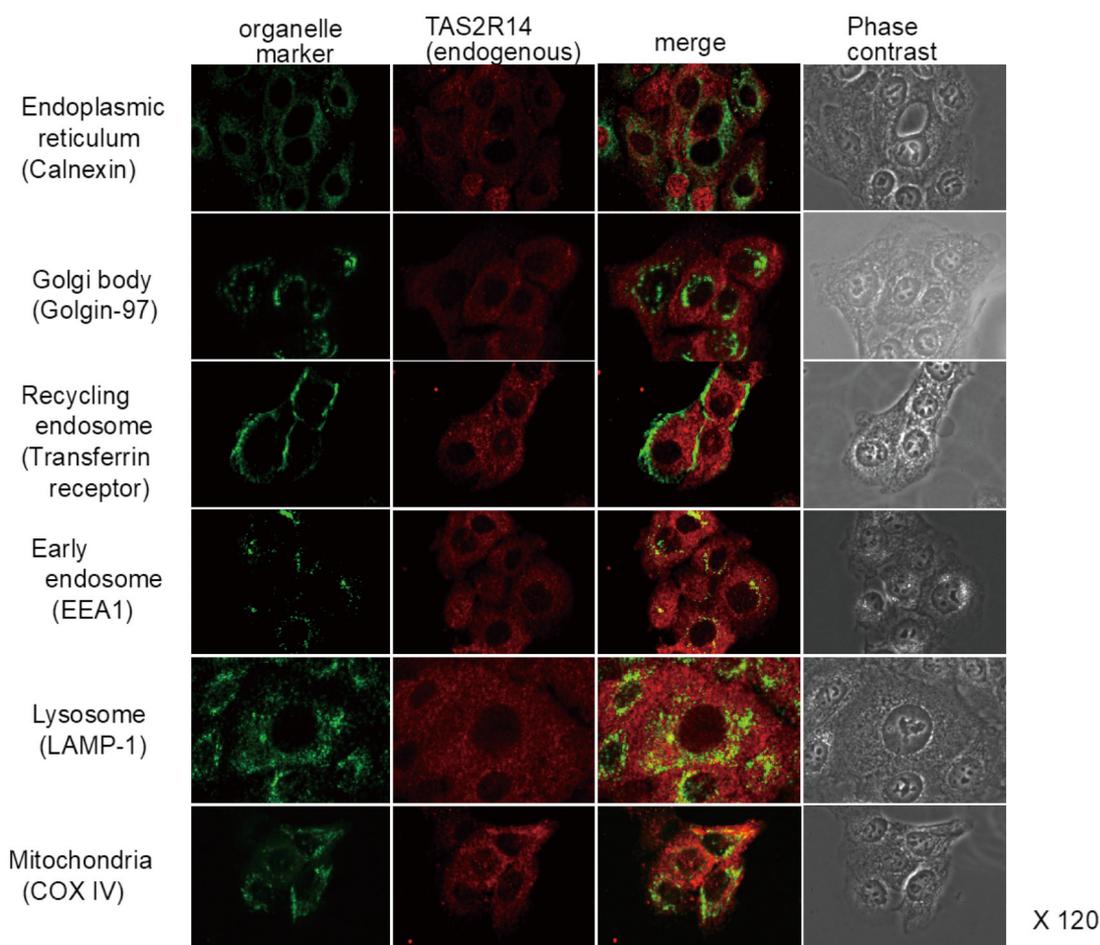


図5 HaCaT細胞における苦味受容体の細胞内局在解析

HaCaT細胞に発現しているTAS2R14と6つのオルガネラ(Endoplasmic reticulum、Golgi body、Recycling endosome、Early endosome、Lysosome、Mitochondria) 特異的タンパクを市販抗体で染色し、共焦点顕微鏡で共局在性を評価した。緑；抗オルガネラタンパク抗体で反応後、Alexa Fluor (AF) 488標識抗マウスIgG抗体で蛍光染色した。赤；抗TAS2R14抗体で反応後、AF546標識抗ウサギIgG抗体で蛍光染色した図。Merge；TAS2R14と各オルガネラマーカーの局在を重ね合わせた図。Phase contrast；明視野で細胞を観察した図。

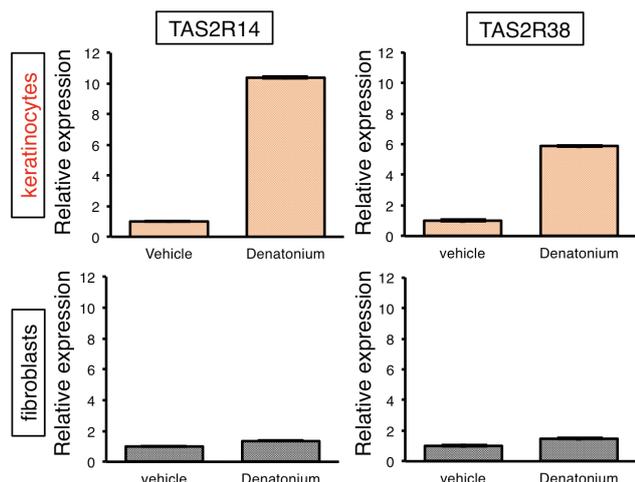


図6 ヒトケラチノサイトをデナトニウムで刺激した際の苦味受容体の発現上昇

分化ヒトケラチノサイトと線維芽細胞を1mMデナトニウムで15時間刺激した際の苦味受容体遺伝子(TAS2R14、TAS2R38)の発現上昇を定量PCRで調べた。 β -アクチン遺伝子の発現量をコントロールとした。

15時間刺激した細胞よりRNAを調製し、cDNA合成後、定量PCR法によりABCトランスポーターの遺伝子発現変動を解析した。なお、本実験では、ABCトランスポーターの中でも抗がん剤排出への関与が報告されている3つのトランスポーター、ABC-B1、ABC-C1、ABC-G2に着目し、これらの発現量変化を解析した。その結果、苦味物質刺激に伴い、ABC-B1、ABC-C1、ABC-G2いずれの遺伝子も発現が有意に上昇することが示唆された(図7)。なお、同様の苦味物質刺激(1mMのデナトニウム、1mM サッカリン、0.1mM キニーネ塩酸塩など)によるABC-B1、ABC-C1、ABC-G2の発現増強はHaCaT細胞においても認めている(data not shown)。

3.6. 苦味受容体から発信される情報伝達

苦味受容体群はGPCRファミリーに属する。この受容体群から発信される情報が何のGタンパク質を介したものかを知るために、以下の実験を行った。HEK293T細胞にTAS2R38と5種類いずれかのGPCR応答性レポーター(CRE、SRE、AP-1、NFAT、或いは、SRFエレメントを連結した深海エビルシフェラーゼ)を導入し、TAS2R38のリガンドとして認知されているフェニルチオカルバミド(PTC)、或いは、6-n-プロピルチオウラシル(PROP)で15時間刺激した際のルシフェラーゼ活性の上昇を評価した²⁾。その結果、どちらの刺激もSREおよびSRFエレメントを活性化させる結果が認められた(図8)。我々はこの実験によって苦味受容体に共役しているGタンパク質に関しては、 $G\alpha_i$ 型と $G\alpha_{12/13}$ 型の関与を予想した。

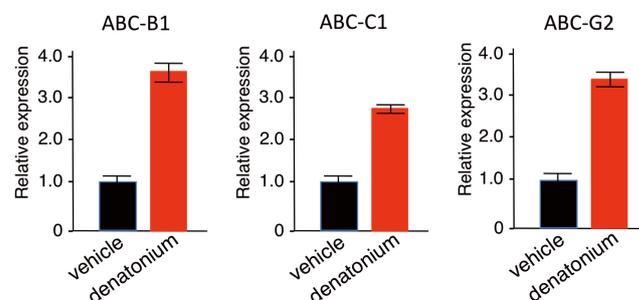


図7 苦味物質刺激による異物排出ABCトランスポーターの発現増強

分化ヒトケラチノサイトを1mMデナトニウムで刺激した際のABC-B1、ABC-C1、および、ABC-G2の発現上昇を定量PCRで調べた。 β -アクチン遺伝子の発現量をコントロールとした。

3.7. NF- κ Bの活性化評価

先行研究より、ABC-B1の発現にNF κ -Bの活性化が深く関与し、抗がん剤耐性回避の標的分子として注目されている³⁻⁶⁾。そこで、前述の分化ヒトケラチノサイトを1mMデナトニウム、1mM PTC、1mM サッカリン、1mM サリシン、或いは、0.1mM キニーネ塩酸塩で15時間刺激し、p65の核移行量や核移行p65のリン酸化度合いからNF κ -Bの活性化を評価した。その結果、これら苦味物質の刺激でNF κ -Bが有意に活性化されていることが示唆された(図9)。なお、同様の苦味物質刺激(1mMのデナトニウム、1mM サッカリン、0.1mM キニーネ塩酸塩など)によるNF κ -Bの活性化はHaCaT細胞においても認めている(data not shown)。

4. 考察

冒頭で述べたように、本研究では苦味受容体に関する以下の3つの知見の確保を目指した。(i)この受容体群は皮膚細胞に発現する、(ii)この受容体は形質膜ではなく細胞内に局在する、(iii)皮膚細胞を苦味物質で刺激すると異物排出に関わるABCトランスポーターの発現が増強する。(i)に関しては、ケラチノサイトや表皮角化細胞株での25種類全ての苦味受容体遺伝子の発現のみならず、ヒト皮膚組織での苦味受容体タンパクの確認などから、外界に最も接する表皮組織に苦味受容体が発現していることを示唆できた。(ii)興味深いことに、これら苦味受容体は形質膜ではなく細胞内に局在するが、本研究期間ではその局在部位を明確にすることはできなかった。細胞破碎後の分画で当該受容体は膜画分に検出されることからいずれかのオルガ

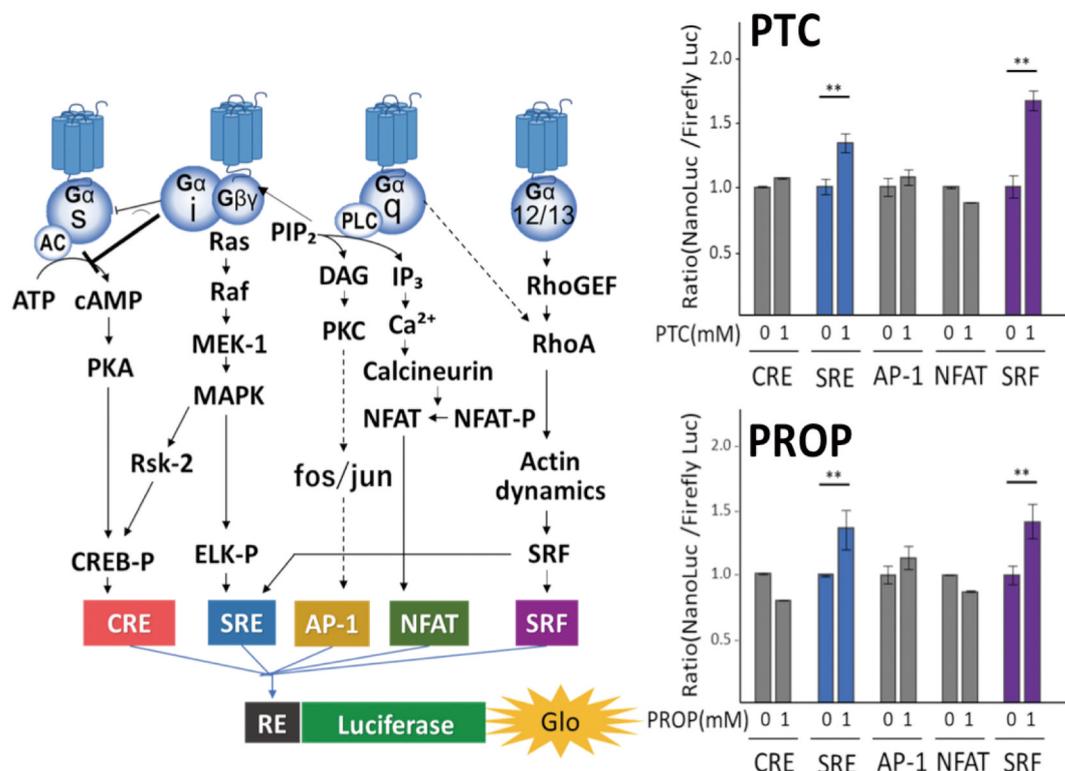


図8 GPCRシグナル応答性レポーターを活用した苦味受容体情報伝達経路の解析

HEK 293 TにTAS2R38と5種類いずれかのGPCRシグナル応答レポーター (CRE、SRE、AP-1、NFAT、或いは、SRFエレメントを連結した深海エビルシフェラーゼ) を導入し(左)、TAS2R38リガンド(PTC或いは、PROP) で刺激した際のルシフェラーゼ活性の上昇を評価した。どちらの刺激もSREおよびSRFエレメントの活性化が認められた(右)。

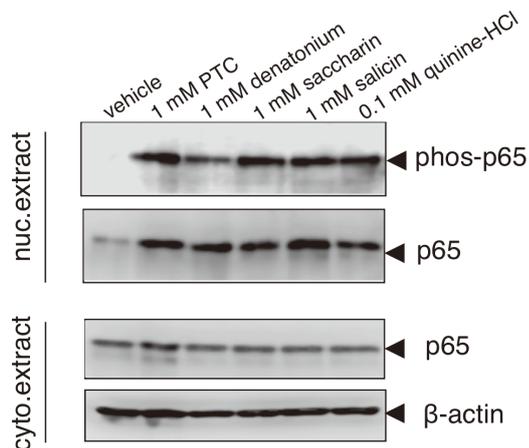


図9 分化ヒトケラチノサイトにおける苦味物質刺激後のNFκ-Bの活性化

分化ヒトケラチノサイトを1mM PTC、1mMデナトニウム、1 mM サッカリン、1mM サリシン、或いは、0.1 mM キニーネ塩酸塩で刺激した際のNFκ-Bの活性化。p65; NFκ-Bのp65サブユニット、phos-p65; NFκ-Bのp65サブユニットのリン酸化体

ネラ膜に局在するものと推察する。小胞体なのか? ゴルジ体なのか? 或いは、それ以外なのか? 解明が今後の大きな課題である。(iii) 図2に示す作業仮説からすれば、苦味物

質で刺激を受けたケラチノサイトや表皮角化細胞株では異物排出のためのタンパク質が増加/作動することが予想できる。我々はまずABCトランスポーターに着目し、その中でも異物排出能の報告があるABC-B1、ABC-C1、ABC-G2に関して解析を行った⁷⁾。なお、ヒト結腸腺癌細胞株であるCaco2細胞での苦味受容体を介したABC-B1の発現上昇や⁸⁾、皮膚組織でのABC-B1の発現については先行研究で既に報告されている⁹⁾。本研究において、我々は分化ケラチノサイトの苦味物質刺激に伴いABC-B1、ABC-C1、ABC-G2の発現が増加することを見出した。実際に細胞自体がこうしたタンパク質の発現増加で異物排出能を高めているか否かを今後行う予定である。例えば、蛍光ローダミンを細胞に取込ませ、苦味受容体刺激で排泄能が高まるか否かを調べる計画である¹⁰⁾。

本研究から、創薬に関して我々は以下の提案をする。苦味受容体遺伝子には配列多様性があり、これは異物排除能の個人差に直結する。皮膚炎原因物質を感受できない配列を持つ場合、当該物質を排除できず、蓄積によって皮膚炎が発症するであろう。こうした人のために、無害な苦味受容体賦活剤を創製し、これを炎症部位に塗布することで排除機構を作動させ、蓄積有害物の排除を促進することで皮

膚炎悪化を回避させる考えである(図10)。苦味受容体を創薬標的として捉えた点では前例のない研究である。GPCRは形質膜から情報発信すると考えられてきたが、本研究はこうした概念も覆す。細胞内GPCR情報伝達という新たな研究領域を提唱できる可能性も秘めている。生体防御の観点からも、こうした防御機構の提唱はこれまで全くなかった。本研究は新規創薬への挑戦でもある。

5. 謝 辞

ヒト皮膚組織切片を用いた苦味受容体の発現解析にご協力頂いた東京大学医学部皮膚科の住田隼一医師に感謝いたします。本研究の遂行にあたり、助成をしてくださった公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝いたします。助成金により遂行された本研究成果は、国内外の学会や国際学術雑誌に発表することで社会に還元し、貢献することをお約束します。

(引用文献)

- 1) Wolfle U., Elsholz FA, Kersten A, Haarhaus B, Muller WE, Schempp CM: Expression and functional activity of the bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R38 in human keratinocytes. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 28,137-146, 2015
- 2) Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M: The molecular receptive of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses.* 35, 157-170, 2010
- 3) Kuo MT, Liu Z, Wei Y, Lin-Lee Y, Tatebe S, Mills GB, Unate H: Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NK κ -B signaling. *Oncogene*, 21, 1945-1954, 2002
- 4) Sun J, Yeung CA, Co NN, Tsang TY, Yau E, Luo K, Wu P, Wa JCY, Fung K-P, Kwok T-T, Liu F: Clitocine reversal of P-glycoprotein associated multi-drug resistance through down-regulation of transcription factor NK κ -B in R-HepG2 cell line. *PLoS One*, 7, e40720, 2012
- 5) Davoudi Z, Akbarzadeh A, Rahmatiyamchi M, Movassaghpour A, Alipour M, Nejati-Koshki K, Sadeghi Z, Dariushnejad H, Zarghami N: Molecular target therapy of AKT and NK κ -B signaling pathway and multi-drug resistance by specific cell penetrating inhibitor peptides in HL-60 cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15, 4353-4358, 2014
- 6) Wu W, Yang J-J, Wang Y-L, Wang H, Tao M, Wang L, Gu J-J, Cai Y, Shi Y, Yao D-F: Reversal of multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells by metformin through inhibiting NK κ -B gene expression. *World J. Hepatol.*, 8 (23), 985-993, 2016
- 7) Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo A, Bates SE, Gottesman MM: Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18, 452-464, 2018
- 8) Jeon TII, Seo YK, Osborne TF: Gutbitter taste receptor signaling induces ABCB1 though a mechanism involving CCK. *Biochem J.*, 438 (1), 33-37, 2011
- 9) Skazik C, Wenzel J, Marquardt Y, Kim A, Merk HF, Bickers DR, Baron JM: P-glycoprotein (ABCB1) expression in human skin is mainly restricted to dermal components. *Experimental Dermatology*, 20, 450-452, 2011
- 10) Kim HG, Hein TT, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Kang KW, Kwon K-il, Kim B-H, Kim SK, Song GY, Jeong TC, Jeong HG, Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NK κ -B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *British J. Pharmacol.*, 162, 1096-1108, 2011

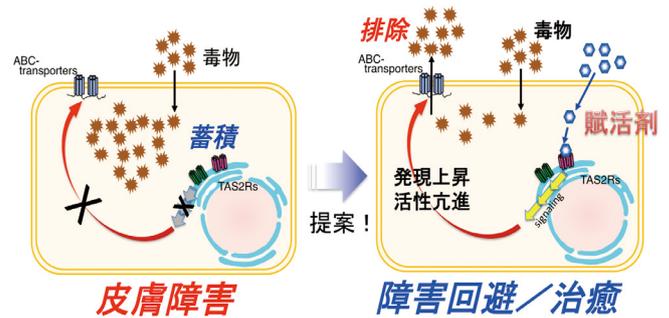


図10 苦味受容体を標的とした創薬アイデア

25種類の苦味受容体の中で配列個人差のない受容体を標的とし、これを活性化する無害な賦活剤を創製すれば、皮膚細胞内へ蓄積した有害物質を細胞外に排出させることができる。