

皮膚細胞間バリアの破壊に関わる光センサーの解明と予防薬の開発

岐阜薬科大学薬学部

五十里 彰

In this study, we focused on red light, which may have a protective effect against ultraviolet ray (UVB) light, a light associated with skin barrier dysfunction. Red LED light irradiation did not alter the expression level of tight junction barrier-related factor claudin-1 (CLDN1), cellular localization of CLDN1, or cell proliferation signals including Akt and ERK. Irradiation with red LED light significantly suppressed the increase in reactive oxygen species (ROS) production induced by UVB irradiation. Pre-irradiation with red LED light significantly suppressed the increase in *NFE2L2*, *SFN* and *PPAR- δ* mRNA expression induced by UVB irradiation. Moreover, red LED light also significantly ameliorated the UVB irradiation-induced suppression of *PPAR- γ* mRNA expression. Red light, which has been considered to have little biological effect, has been shown to enhance the skin stress response and to attenuate oxidative stress, one of the mechanisms by which red light can attenuate oxidative stress. In human epidermis-derived cells, irradiation with red LED light was also shown to reduce UVB-induced increase in ROS production, which is associated with skin barrier disruption.

The establishment of scientific evidence may lead to the future development of technologies and devices that use red light to enhance the skin's stress response. Since it is becoming clear that light has different physiological effects depending on its wavelength, it is expected that new concepts for cosmetic materials will be developed that maintain the positive effects of sunlight on the skin while preventing only the negative effects on the skin barrier.

1. 緒言

皮膚において、脂質膜による角質層と細胞間接着因子による顆粒層の二種類のバリアが存在し、体内からの水分・イオンの漏出や外界からの微生物などの侵入を防いでいる^{1,2)}。過度の紫外線を受けると炎症や核酸損傷による皮膚がん発症リスクの増加だけでなく、乾燥などの皮膚バリア破綻を伴う光老化が生じる。光老化において、角質層の天然保湿因子との関与が明らかになっているが、顆粒層バリア破綻におけるメカニズムは不明である。

顆粒層バリアは隣接細胞の接着を担うタイトジャンクション (tight junction: TJ) によって形成される。TJは膜貫通型タンパク質であるクローディン (CLDN) や足場タンパク質であるZO-1などによって形成される。これまでに我々は、微弱紫外線照射や活性酸素種 (ROS) によって細胞間バリアが破綻する際に、CLDN1のリン酸化やニトロ化などの翻訳後修飾状態が変化し、クラスリン依存性エンドサイトーシスの促進によって内在化することを報告した^{3,4)}。さらに、微弱紫外線による皮膚バリア破綻において、光センサー受容体であるオプシントランスポーターおよび下流のカシウム流入を伴う細胞内シグナルの関与を明らかにしており、光センサーを介する皮膚バリア破綻の細胞内シグナル

を標的として、新たな予防法の開発に繋がることが期待される。

光線照射を用いた生体へのアプローチはフォトバイオモジュレーションと呼ばれ、基礎から臨床まで幅広く研究が行われ、様々な有益な作用が報告されている⁵⁾。皮膚細胞において紫外線や可視光の中でも青色光などの短波長光はオプシンなどの光受容体タンパク質に受容されると考えられるが、赤色光をはじめとした長波長光の受容と作用機序については不明な点が多い^{6,7)}。興味深いことに、健康者皮膚に赤色LED光の前照射により紫外線誘発紅斑形成が抑制されることが知られ⁸⁾、皮膚バリア保護に関わる波長の光の存在が示唆されているため、赤色光による作用メカニズムの科学的エビデンスの確立が必要不可欠である。

本研究では、皮膚バリア破綻に関わる光である紫外線に対して保護的に作用する可能性のある赤色光に着目し検討した。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒト表皮ケラチノサイト由来のHaCaT細胞を用いて各種検討を行った。細胞は5% ウシ胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle Mediumで培養した。5% CO₂ インキュベーターを用いて、37℃にて培養を行った。0.5% trypsin-EDTA溶液を用いて3~4日ごとに継代し、実験に用いた。

2.2. 紫外線および赤色LED光の処理

7 × 10³ 個/ウェルの濃度で細胞を96ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific社) に播種し、3日間培養した。



Elucidation of photosensors involved in the breakdown of the skin intercellular barrier and development of prophylactic agents

Akira Ikari

Gifu Pharmaceutical University

検討時に培地を Hanks' Balanced Salt Solution に置換し、LED array driver (バイオリサーチセンター株式会社) を用いて赤色 LED 光 (630 nm, 5-100 J/cm²) を照射後、UVP cross linker (Analytik Jena) を用いて紫外線 (UVB, 波長 302 nm, 50 mJ/cm²) を照射した。無血清培地に置換してさらに培養後、各種検討を行った。

2.3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウェスタンブロット法

7 × 10⁴ 個/ウェルの濃度で細胞を 6 well plate に播種し、3 日間培養した。赤色 LED 光 (630 nm, 10 J/cm²) を照射した 24 時間後、セルスクレイパーを用いて細胞を回収した。Lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH7.4) を用いて細胞内タンパク質を可溶化し、遠心により可溶性画分を抽出した。10% または 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルにタンパク質サンプルをアプライし、30 mA で 80 分間電気泳動した。ゲルを PVDF 膜に転写後、2% スキムミルクで 30 分間処理し、ブロッキングを行った。各種一次抗体 (抗 CLDN1 抗体、抗 phospho-Akt (Ser473) 抗体、抗 Akt 抗体、抗 phospho-ERK1/2 抗体、抗 ERK 抗体) をそれぞれ 4℃ で一晩処理した。PVDF 膜の洗浄後、HRP 標識二次抗体を室温にて 60 分間反応させた。EzWestLumi plus (ATTO 社) を用いて各タンパク質のバンドを検出した。

2.4. 蛍光免疫染色法

カバーガラス上に培養した細胞に赤色 LED 光 (630 nm, 100 J/cm²) を照射してから 6 時間後、メタノールによる固定後、0.5% Triton X-100 含有 PBS で可溶化処理を行った。4% ブロックエースを用いてブロッキング処理を行った後、一次抗体 (抗 CLDN1 抗体) を 4℃ で一晩処理した。一次抗体を洗浄後、AlexaFluor 546 標識二次抗体を室温で 90 分間反応させた。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を反応させ、細胞の核を可視化した。カバーガラスをスライドガラスに固定し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss 社) を用いて CLDN1 タンパク質の細胞局在を解析した。

2.5. 細胞生存率、細胞内 ROS 産生量、ミトコンドリア膜電位の解析

96 ウェルプレートに培養した HaCaT 細胞に、ROS 蛍光指示薬である 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) またはミトコンドリア膜電位の蛍光指示薬である MT-1 MitoMP Detection Kit (Dojindo) を取り込ませ、各種光源の照射 1 時間後に蛍光プレートリーダー (Infinite F200, Tecan) を用いて蛍光強度を測定した。また、cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo) を用いて 24 時間後における細胞生存率を測定した。

2.6. RNA 抽出とリアルタイム PCR

赤色 LED 光および UVB 照射から 6 時間後、TRI reagent (コスモバイオ社) を用いて細胞から total RNA を抽出した。ReverTra Ace (東洋紡社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調製した。定量的リアルタイム PCR 法では、Real time PCR Eco (アズワン社) を用いて mRNA 発現量を測定した。各遺伝子の発現量は、β-actin mRNA の発現量で標準化した。使用したプライマーを表 1 に示す。

3. 結果

3.1. 赤色 LED 光照射による CLDN1 タンパク質の発現および細胞局在

CCK-8 を用いた比色解析によって赤色 LED 光照射後の細胞生存率を検討したところ、顕著な細胞毒性は見られなかった。次に、表皮における TJ バリア形成に対する作用を解明するため、ウェスタンブロット法により皮膚 TJ 構成の必須因子 CLDN1 タンパク質の発現量を測定した。赤色 LED 光照射によって、CLDN1 タンパク質発現量は変化しなかった (図 1A)。蛍光免疫染色法により、CLDN1 タンパク質の細胞内局在を検討したところ、細胞接着領域における局在様式に変化は認められなかった (図 1B)。また、赤色 LED 光照射が細胞増殖能に及ぼす影響を明らかにするため、細胞生存・増殖シグナルである Akt および ERK1/2 のリン酸化量を検討したところ、いずれも変化は認められなかった (図 1A)。以上の結果から、赤色 LED 光照射による直接的な細胞増殖シグナルや TJ 形成能への作用はないことが示された。

表 1 リアルタイム PCR で使用したプライマー

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>NFE2L2</i>	CACCATGGGAATGGACTTG	TCATACTCTTTCCGTCGCTG
<i>Stratifin</i>	AGATGCCGCCACCAA	ATCTCGTAGTGAAGACGGAAAAG
<i>PPARδ</i>	CTCTATCGTCAACAAGGACG	GTCTTCTTGATCCGCTGCAT
<i>PPARγ</i>	CGACCAAGTAACTCTCCTCA	GTTCCGTGACAATCTGTCTG
<i>β-Actin</i>	CCTGAGGCACTCTCCAGCCTT	TGCGGATGTCCACGTCACTTC

3.2. 紫外線照射誘発 ROS 産生に対する赤色 LED 光照射の作用

UVB の照射によって細胞内 ROS 産生量が亢進し、細胞毒性が惹起されると、細胞間バリア機能も障害される³⁾。一方、赤色光を予め照射することで、紫外線暴露による紅斑形成が抑制されることが報告されている⁸⁾。そこで、我々の実験条件においても、赤色 LED 光の前照射によって UVB 照射による皮膚細胞へのダメージを減弱できるかどうかを検討した。我々のこれまでの検討において、5mJ/cm² 以下の線量の UVB 照射では ROS 産生量は増加しないが、50mJ/cm² 以上の線量では顕著に増加することを明らかにしているため³⁾、UVB 50mJ/cm² の照射条件を用いた。ROS 特異的な蛍光指示薬 H₂DCF を用いた ROS 産生量の解析を行った。UVB 50mJ/cm² の照射によって、Control (無処置サンプル) と比較して顕著に増加した ROS 産生量は、赤色 LED 光 (10J/cm²) の前照射によって有意に抑制された (図 2)。一方で、赤色 LED 光単独照射細胞において、

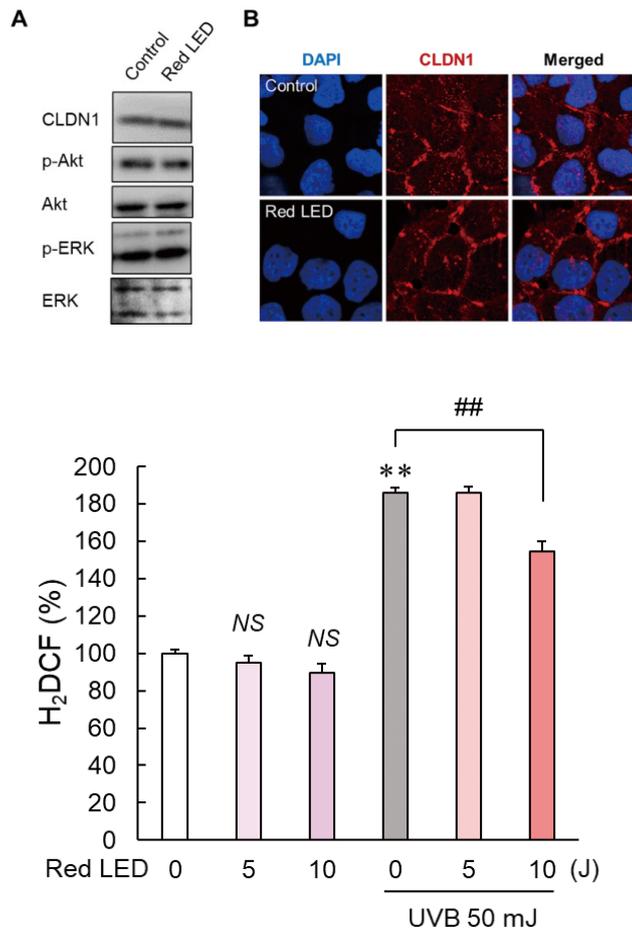


図 2 紫外線照射誘発 ROS 産生に対する赤色 LED 光照射の作用
赤色 LED 光照射 (5 or 10J/cm²) および紫外線 (UVB 50mJ/cm²) の照射 1 時間後の細胞における H₂DCF の蛍光強度を測定し、赤色 LED 光・紫外線未照射の細胞における蛍光強度を 100% とした。***P* < 0.01 and NS *P* > 0.05 vs control (non-UVB). ## *P* < 0.01 vs UVB only. n = 5-6.

ROS 産生量は減少しなかった。この結果から、赤色 LED 光の前照射によって、UVB 照射誘発 ROS 産生が抑制されることが示された。

3.3. ミトコンドリア膜電位に対する各種光源照射の作用

赤色 LED 光前照射による ROS 産生抑制のメカニズムを解明するため、細胞内の ROS 産生に関わる細胞内小器官でもあるミトコンドリアに着目した。特異的蛍光指示薬 MT-1 を用いて、ミトコンドリア膜電位を測定したところ、各種光源照射条件において、ミトコンドリアの膜電位は変化せず、赤色 LED 光による作用も認められなかった (図 3)。両光源照射によってミトコンドリアの膜電位が減少しており、何らかのダメージが生じた可能性があるが、原因は不明である。以上の結果から、紫外線照射に誘発される ROS 産生亢進および赤色 LED 光による改善作用はミトコンドリアを介さない機序によるものと考えられる。

図 1 赤色 LED 光照射後の CLDN1 タンパク質の発現量および細胞局在
(A) ウェスタンブロット法における結果。未処理または赤色 LED 光照射 (10J/cm²) の照射 24 時間後、各タンパク質の発現量を測定した。CLDN1、phospho-Akt (Ser473)、Akt、phospho-ERK1/2、ERK に対する一次抗体を用いた。
(B) 蛍光免疫染色法における蛍光撮影画像。赤:CLDN1、青:DAPI (核を染色)。赤色 LED 光照射 (10J/cm²) の照射 6 時間後の細胞を用いて、蛍光免疫染色を行った。

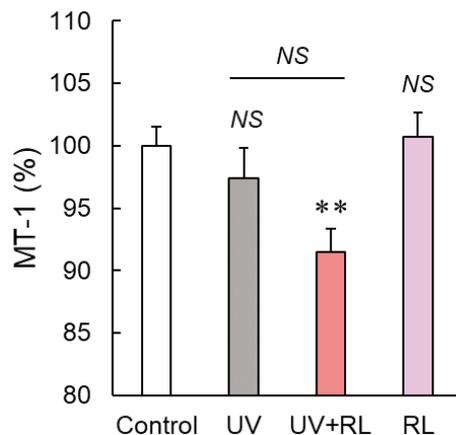


図 3 ミトコンドリア膜電位に対する各種光源照射の作用
赤色 LED 光照射 (10J/cm²) および紫外線 (UVB 50mJ/cm²) の照射 1 時間後、蛍光プレートリーダーを用いて MT-1 の蛍光強度を測定し、ミトコンドリア膜電位の指標とした。
***P* < 0.01 and NS *P* > 0.05 vs control (non-irradiated). Control: non-irradiated, UV: UVB (50 mJ/cm²), UV+RL: UVB(50mJ/cm²) +Red LED(10J/cm²), RL: Red LED(10J/cm²). n = 5-6.

3.4. ストレス応答因子の発現に対する各種光源照射の作用

赤色LED光前照射による酸化ストレスの抑制メカニズムを解明するため、ストレス応答に関わる因子のmRNA発現量をリアルタイムPCR法によって解析した。

酸化ストレス応答の主要因子であるNrf2は、抗酸化酵素であるヘムオキシダーゼ-1やキノン酸化還元酵素-1などの発現を制御する⁹⁾。Nrf2をコードする遺伝子である*NFE2L2* mRNAは紫外線照射によって増加傾向を示し、赤色LED光前照射によって顕著に減少した(図4A)。赤色LED光単独照射でも発現抑制の傾向がみられた。以上の結果から、紫外線照射による細胞内ROS産生の亢進は、Nrf2シグナルによる酸化ストレス応答を惹起することが示された。赤色LED光単独ではNrf2発現への影響が認められなかったため、赤色光によるNrf2発現誘導抑制作用は、ROS産生抑制による間接的な影響である可能性が考えられる。

14-3-3タンパク質ファミリーの一種であるstratifin(SFN)は、ヒト皮膚のケラチノサイトから分泌され、他の細胞の遺伝子発現に影響を与える¹⁰⁾。近年、紫外線照射によって光老化と呼ばれるヒト皮膚の早期老化が起

ることが知られ、紫外線照射されたケラチノサイトにおいて増加する*SFN* mRNA発現が、光老化皮膚の保水力やバリア機能の低下に関与することが報告された¹¹⁾。そこで、ストレス感受性因子として*SFN*の発現量を検討したところ、紫外線照射によって*SFN* mRNA発現量が増加し、赤色LED光前照射によって紫外線誘発効果は抑制された(図4B)。一方、赤色光単独では*SFN* mRNA発現量に影響を与えなかったため、*SFN*は赤色LED光の直接の標的分子ではないと考えられる。

核内受容体であるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)- δ は、酸化ストレスに対する細胞応答に必須な役割を果たすことが知られている。皮膚線維芽細胞において、抗酸化酵素カタラーゼをコードする遺伝子は、PPAR- δ の標的であることが報告されている¹²⁾。紫外線照射によって*PPAR- δ* mRNA発現量が顕著に増加したが、赤色LED光前照射により抑制されなかった(図4C)。以上の結果から、赤色LED光はカタラーゼを含む遺伝子制御には影響を与えないことが示された。

紫外線照射は、PPAR- γ の発現抑制を介して、シクロオキシゲナーゼ-2発現やプロスタグランジンE2産生を亢進させ、皮膚に炎症反応を誘導することが知られている¹³⁾。

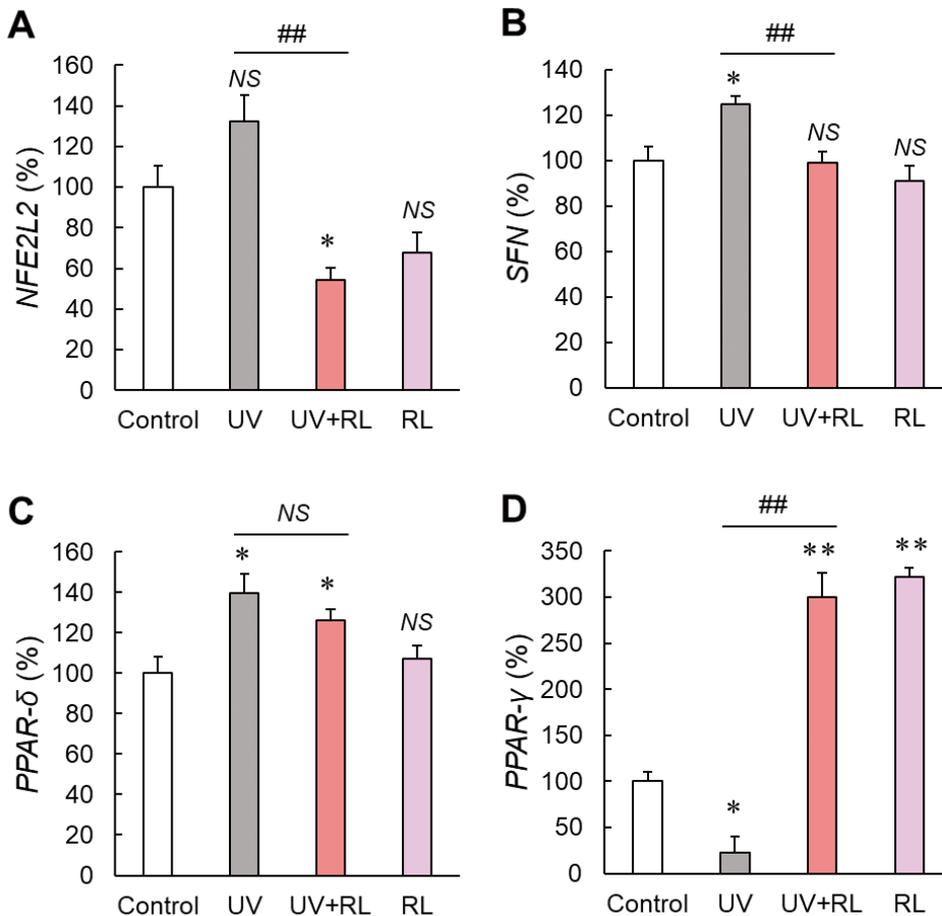


図4 各種光源照射におけるストレス応答因子 mRNA 発現量解析
赤色LED光照射(10J/cm²)および紫外線(UVB 50mJ/cm²)の照射6時間後の細胞における*NFE2L2*、*SFN*、*PPAR- δ* 、*PPAR- γ* mRNA発現量を、リアルタイムPCR法により解析した。各mRNA発現量は β -actin mRNA発現量で補正した。
* $P < 0.05$ vs control (non-UVB). # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ vs UVB only. NS $P > 0.05$ vs control or UVB only. Control: non-irradiated, UV: UVB (50mJ/cm²), UV+RL: UVB (50mJ/cm²) + Red LED (10J/cm²), RL: Red LED (10J/cm²). n=3-4.

本検討においても、紫外線照射によってPPAR- γ mRNA発現量が顕著に減少した(図4D)。赤色LED光の前照射によりPPAR- γ mRNA発現量が顕著に増加し、紫外線による発現抑制作用を抑制した(図4D)。興味深いことに、赤色LED光単独照射細胞において、PPAR- γ mRNA発現量が3倍程度に増加した。PPAR- γ のアゴニストは紫外線による皮膚損傷を軽減することが報告されており¹⁴⁾、赤色LED光による作用点の一つである可能性が示された。

4. 考 察

赤色LED光を照射された表皮細胞において、皮膚バリア破綻に関わる紫外線誘発ROS産生増加を軽減することが示された。過去の報告において、黒色腫A2058細胞においてチトクロームcオキシダーゼが赤色光の受容体として機能して、ミトコンドリア膜電位が上昇することが細胞増殖促進の機序の一つであると提案されている¹⁵⁾。しかし、本検討において赤色LED光はミトコンドリア膜電位を増加させなかったことから、ミトコンドリア障害に対する保護作用ではないと考えられる。そのため、赤色光によるROS産生抑制のメカニズムは不明である。UVB照射によりNADPHオキシダーゼの活性化を介してROS産生が増加することが報告されているため、今後NADPHオキシダーゼなどの関与を検討する必要がある¹⁶⁾。遺伝子発現解析の結果、紫外線照射と赤色LED光照射による発現制御が逆方向となる因子としてPPAR- γ を同定した。今後、皮膚バリアを破壊する光(紫外線)の細胞内シグナルと、逆に保護する光(赤色光)の作用メカニズムとの関連を解析することで、光線による皮膚バリア制御の科学的エビデンスの確立に寄与していきたい。

5. 総 括

これまでに我々は、皮膚細胞間のバリア機能の破壊に関わる光センサーとして、紫外線の受容に関わるセンサーとその機序を解明した³⁾。本検討では、その細胞内メカニズムとは異なる光受容を介して保護的に作用する可能性のある赤色光に着目した。赤色光は皮膚に対して有益とする報告はあるが^{5, 6)}、詳細なメカニズムは不明なままである。本研究により、PPARを含む数種類のストレス応答因子が赤色光照射による皮膚生理作用の一端を担う可能性が示された。

また、慢性的な太陽光の暴露によって生じる乾燥肌や肌トラブルに対する予防というコスメトロジーの観点から、光の受容から始まる細胞内シグナルとCLDN1を起点とした皮膚バリアの制御メカニズムの解明が必要である。加えて、紫外線照射によってもたらされる皮膚細胞への負の影響を打ち消す方法は、抗酸化剤の使用が有効と考えられるものの、全身性の影響を鑑みると未だ現実的ではない。特

定の波長の光線を照射することで皮膚疾患の症状を緩和させる方法は一部臨床でも用いられている。科学的エビデンスが確立されることによって、赤色光を用いて皮膚のストレス応答を高めるような技術・デバイスなどが将来発展していく可能性がある。光は波長によりそれぞれ異なった生理作用を持つことが解明されつつあるため、太陽光の持つ皮膚にとって良い影響を維持しながら、皮膚バリアにとって悪い影響のみを予防する新しいコンセプトの化粧品素材の開発に繋がることが期待される。

謝 辞

本研究の遂行にご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2, 285-293 (2001)
- 2) Tsukita S, Tanaka H, Tamura A. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends Biochem. Sci.*, 44, 141-152 (2019)
- 3) Kobayashi M, Shu S, Marunaka K, Matsunaga T, Ikari A. Weak ultraviolet B enhances the mislocalization of claudin-1 mediated by nitric oxide and peroxynitrite production in human keratinocyte-derived HaCaT cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 7138 (2020)
- 4) 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, 3869 (2019)
- 5) Mosca RC, Ong AA, Albasha O, Bass K, Arany P. Photobiomodulation therapy for wound care: A potent, noninvasive, photochemical approach. *Adv. Skin Wound Care*, 32, 157-167 (2019)
- 6) 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.*, 36, 329-338 (2020)
- 7) Olinski LE, Lin EM, Oancea E. Illuminating insights into opsin 3 function in the skin. *Adv. Biol. Regul.*, 75, 100668 (2020)
- 8) Barolet D, Boucher A. LED photoprevention: reduced MED response following multiple LED exposures. *Lasers Surg. Med.*, 40, 106-112 (2008)
- 9) Ryšavá A, Vostálová J, Rajnochová Svobodová A.

- Effect of ultraviolet radiation on the Nrf2 signaling pathway in skin cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 97, 1383-1403 (2021)
- 10) Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A. The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol. Cell Biochem.*, 305, 255-264 (2007)
- 11) Lai A, Ghaffari A, Li Y, Ghahary A. Paracrine regulation of fibroblast aminopeptidase N/CD13 expression by keratinocyte-releasable stratifin. *J. Cell. Physiol.*, 226, 3114-3120 (2011)
- 12) Hur J, Kang ES, Hwang JS, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ -mediated upregulation of catalase helps to reduce ultraviolet B-induced cellular injury in dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.*, 103, 167-175 (2021)
- 13) Yoshizaki N, Fujii T, Masaki H, Okubo T, Shimada K, Hashizume R. Orange peel extract, containing high levels of polymethoxyflavonoid, suppressed UVB-induced COX-2 expression and PGE2 production in HaCaT cells through PPAR- γ activation. *Exp. Dermatol.*, 23, 18-22 (2021)
- 14) Ramot Y, Mastrofrancesco A, Camera E, Desreumaux P, Paus R, Picardo M. The role of PPAR γ -mediated signalling in skin biology and pathology: new targets and opportunities for clinical dermatology. *Exp. Dermatol.*, 24, 245-251 (2015)
- 15) Hu WP, Wang JJ, Yu CL, Lan CC, Chen GS, Yu HS. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J. Invest. Dermatol.*, 127, 2048-2057 (2007)
- 16) Peloi KE, Ratti BA, Nakamura CV, Neal CJ, Sakthivel TS, Singh S, Seal S, Lautenschlager S. Engineered nanoceria modulate neutrophil oxidative response to low doses of UV-B radiation through the inhibition of reactive oxygen species production. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 109, 2570-2579 (2021)