

報 文

反復UVA1曝露にตอบสนองするヒト真皮線維芽細胞と
ヒト表皮角化細胞のプロテオーム解析Comparative proteome analyses of normal human dermal fibroblasts and immortalized
human epidermal HaCaT keratinocytes in response to repetitive UVA1 exposures

牧野 正知*, 太田 ゆかり*, 中川 れい子**

皮膚は紫外線によって老化し、その結果生じた表現系変化を光老化という。我々は光老化度を推定するためのバイオマーカー候補蛋白質の同定を見据え、紫外線曝露により発現変動するヒト培養皮膚細胞のプロテオーム解析を試みた。本研究では紫外線の種類および曝露量について検討し、皮膚への透過率の高い長波長紫外線 (UVA1) を用いることにした。正常ヒト真皮線維芽細胞 (NHDF 細胞) と不死化ヒト表皮角化細胞 (HaCaT 細胞) にそれぞれ1日あたり 5.0 J/cm² で一定期間反復曝露させ、これらを測定試料とした。蛋白質の同定ならびに相対定量解析には、安定同位体標識を用いた定量的ショットガンプロテオミクスを採用した。強陽イオン交換カラムによる分画を経て nano-LC/MS/MS 分析したところ、NHDF 細胞試料を分析したデータセットと HaCaT 細胞試料を分析した。それから、それぞれ 1,472 蛋白質と 1,582 蛋白質を同定し、そのうち比較定量解析から発現変動蛋白質としてそれぞれ 62 蛋白質と 16 蛋白質を見出した。このうちコラーゲンやヘムオキシゲナーゼ 1 などは他の研究で報告されている変動方向と一致していた。今回新規に見出した蛋白質は今後 *in vivo* で光老化した皮膚を検証する上での手がかりになると考えられる。

1. はじめに

皮膚は体の表面全体を覆うことで境界を形成するとともに、外部刺激に対しての感知・応答、熱の交換、物質の透過排泄といった多機能性を有する人体最大の臓器組織である¹⁾。他の臓器と同様に経時的に老廃物の蓄積、遺伝子の損傷・変異、機能性蛋白質の劣化、細胞内シグナル伝達の破綻などから皮膚の生理機能は低下し、やがて組織障害を惹起し形態異常を伴った退行性変化に至る。その原因の一つは酸化代謝の過程で発生する活性酸素種 (以下 ROS と略す) による内因性ダメージの蓄積と考えられている²⁾。一方、皮膚は外界に露出している特徴上、外的ストレスに直接的に曝されるため、環境要因に依存した老化現象が上乘せされる運命にある。代表的な環境因子は、タバコの煙、環境ホルモンやホルムアルデヒドなど化学因子と、乾燥や気温の変化、電離放射線、赤外線や紫外線 (以下 UV と略す) への曝露といった自然因子である³⁾。

皮膚への UV 曝露はビタミン D 生合成における 7-デヒドロコレステロールからプレビタミン D への変換に必須であることから生体にとって有益である反面⁴⁾、そのエネル

ギーは皮膚内部の核酸や蛋白質、脂質など様々な生体高分子に吸収されラジカルや ROS を惹起する。これらは、二次的に多くの生体高分子を傷つけた結果、DNA 損傷に基づく変異ダメージの発生、持続的なメラニン合成刺激、細胞膜機能障害、酸化障害、糖化の促進、脂質過酸化によるリポフスチンの蓄積、真皮エラスチン・コラーゲンの変性などに至る。また UV は MAPK 経路を刺激し、マトリックスメタロプロテアーゼ類 (以下 MMPs と略す) の発現を亢進するとともに、コラーゲン生合成量を下方制御する⁵⁻⁷⁾。これら複数の要因から出現する局所的な色素沈着、小色素斑やシワ、弾性線維症といった表現系変化は光老化と呼ばれる⁸⁾。

UV は長波長側から UVA1 (340-400 nm), UVA2 (320-340 nm), UVB (280-320 nm), UVC (100-280 nm) に分類され、この中で最もエネルギーが高い UVC は、大気中のオゾン層や酸素分子によって吸収されるため地表には届かず光老化には寄与しない。一方、UVB は UVA よりエネルギーが 1,000 倍程度高く、核 DNA を直接的に酸化損傷する⁹⁾。また表皮角化細胞や真皮線維芽細胞において誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS), オルニチン脱炭酸酵素, シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) などの蛋白質や腫瘍壊死因子 (TNF- α), インターロイキン, プロスタグランジンといった炎症性サイトカインの発現を誘導する。それらは皮膚炎症や免疫抑制, ひいては皮膚癌を引き起こすことから¹⁰⁾, UVB

* 高齢化社会対応の機能性素材開発プロジェクトチーム (現: 生物機能応用技術開発プロジェクトチーム), ** 理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター (現: 理化学研究所 生命機能科学研究センター)

は皮膚老化の主要因だと考えられてきた。一方、UVAのエネルギーはUVBのそれと比較して低いため、UVBほど直接的かつ急性的な反応を惹起することはない。しかし真皮組織においてROSを発生させ、間接的に真皮蛋白質の変性、脂質過酸化反応やDNA損傷などを誘発するほか、ROS感受性シグナル伝達経路を刺激して蛋白質分解酵素群の発現を誘導するため、幾分か光老化に寄与していると考えられている¹¹⁾。しかし近年になってUVAの特徴である皮膚透過力の高さ¹²⁾、緯度、天候、オゾン層の厚みなどに対する輝度の影響の受けにくさ¹³⁾、太陽光中のUVAの豊富さなどを考慮して皮膚への影響が見直された結果、UVAによる光老化は無視できないと考えられるようになってきた¹⁴⁾。

島根県産業技術センターでは2013年度から5年間取り組んだ高齢化社会対応の機能性素材開発プロジェクトと、それを発展させ2018年度からスタートした生物機能応用技術開発プロジェクトにおいて、スキンヘルスケアに関連する素材開発を進めている¹⁵⁾。その中で我々は皮膚内部で潜在的に進行している光老化の新規推定法の開発を念頭に、ショットガンプロテオーム解析によって反復UVA1曝露の影響を受ける培養皮膚細胞中の蛋白質を明らかにしたので報告する。

2. 試料および方法

2.1 細胞および培養方法

本研究ではヒトの真皮線維芽細胞と表皮角化細胞として、それぞれ正常ヒト真皮線維芽細胞（以下NHDF細胞と略す、ロンザ）とヒト不死化表皮角化HaCaT¹⁶⁾細胞（以下HaCaT細胞と略す、German Cancer Research Center (DKFZ)）とを選択した。それぞれの細胞は、10% (v/v) 牛胎児血清(GIBCO)を含有したMEM培地(Sigma-Aldrich)とD-MEM培地(4.5 g/L glucose含有, Cell Lines Service)とを用い、CO₂インキュベータ(5% (v/v) CO₂, 37度)内で培養した。

2.2 UVA1 ランプと分光分布測定

本研究ではUVA1の光源としてブラックライト(USHIO, F15T8BLB)を選択した。そのスペクトル分布は小型ファイバ光学分光器(USB2000, Ocean Optics)で測定し、365 nmにおける輝度は、細胞へ照射する直前に毎回Radiometer Sensor UVX-36 (UVP)を用いて測定した。

2.3 UVA1 単回曝露による活性酸素量の推定

皮膚におけるUVA曝露の影響は、これまで培養細胞や三次元再構成皮膚モデル試料を対象に、蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法やDNAマイクロアレイ法などで評価されてきた¹⁷⁻²⁰⁾。本研究では、Wondrakらの研究¹⁷⁾で実施された実験条件である培養新生児包皮由来線維芽細胞に対する1日あたりのUVA1(320-400 nm)曝露量9.9 J/cm²を参考とし、安全をみて1日あたり5.0 J/cm²と設定した。

5.0 J/cm²の単回曝露によるNHDF細胞あるいはHaCaT細胞内で発生するROS量は、ジヒドロエチジウム（以下DHEと略す、Life technologies）を用いたハイコンテントイメージングで評価した。すなわち96穴プレートにてそれぞれの細胞をコンフルエントまで培養したのち、培地によるUVA1吸収効果を除くため細胞を200 μLのリン酸緩衝生理食塩水（以下PBSと略す、Takara）で一度洗い、再び100 μLのPBSで保護したのち細胞の上方からUVA1を5.0 J/cm²曝露させた。曝露後は速やかに30 μMのDHEを含むPBSに置換し、遮光して30分間CO₂インキュベータ内で静置した。なおUVA1を曝露させず10 mMの過酸化水素(Wako)を含むPBSに30分間置換したものと、同じくUVA1を曝露させずにPBSに置換しただけのものを用意し、それぞれを陽性、陰性対照とした。その後、細胞個々の蛍光強度をCytellで測定し、ソフトウェアIN Cell Investigator（いずれもGE healthcare）で解析した。

2.4 UVA1 反復曝露と細胞生存率の関係

NHDF細胞およびHaCaT細胞のUVA1反復曝露に対する影響はヨウ化プロピジウム（以下PIと略す、Dojindo）染色法による細胞生存率により評価した。96穴プレートにコンフルエントまでそれぞれの細胞を培養し、上記と同様にPBSで処理してからUVA1を5.0 J/cm²曝露させた。引き続き速やかに培地に置換して4時間CO₂インキュベータで保持した後、細胞生存率を評価する細胞においては既報²¹⁾と同様にヘキスト33342(Dojindo)とPIを含む培地に交換したのちハイコンテントイメージングにより細胞生存率を求めた。なお、一度細胞生存率を評価した細胞においては以後用いないこととし、この操作を9日間繰り返した。陰性対照は培養プレートをアルミ板で覆うことでUVA1を遮光し、上記と同様の操作を9日間繰り返したものとした(shamと略す)。0 mJ/cm²の試験区における細胞生存率とUVA1曝露区(Shamを含む)のそれらとの比較は、Dunnettの多重比較法により検定することとし、 $p < 0.05$ の場合を有意とした。

2.5 UVA1 を反復曝露させた細胞試料の調製

はじめにNHDF細胞とHaCaT細胞を150 mmディッシュ(住友ベークライト)上でコンフルエントまで培養した。このとき細胞数は単層で 5×10^6 cells以上であった。次に細胞を10 mLのPBSで一度洗浄したのち再び20 mLのPBSで保護してから、速やかに上方から一日あたりUVA1を5.0 J/cm²となるよう細胞に曝露させた($n = 4$)。陰性対照はアルミ板を用いてUVA1の曝露を避けた細胞とした($n = 4$)。UVA1曝露後は直ちに細胞を保護していたPBSを培地に置換しCO₂インキュベータで再び培養した。この操作をNHDF細胞とHaCaT細胞で毎日繰り返したところ、それぞれ9日目と7日目にわずかな細胞肥大が目視で認められたため、細胞への反復曝露は同日までとした。このとき累積曝露量はそれぞれ45 J/cm²と35 J/cm²と

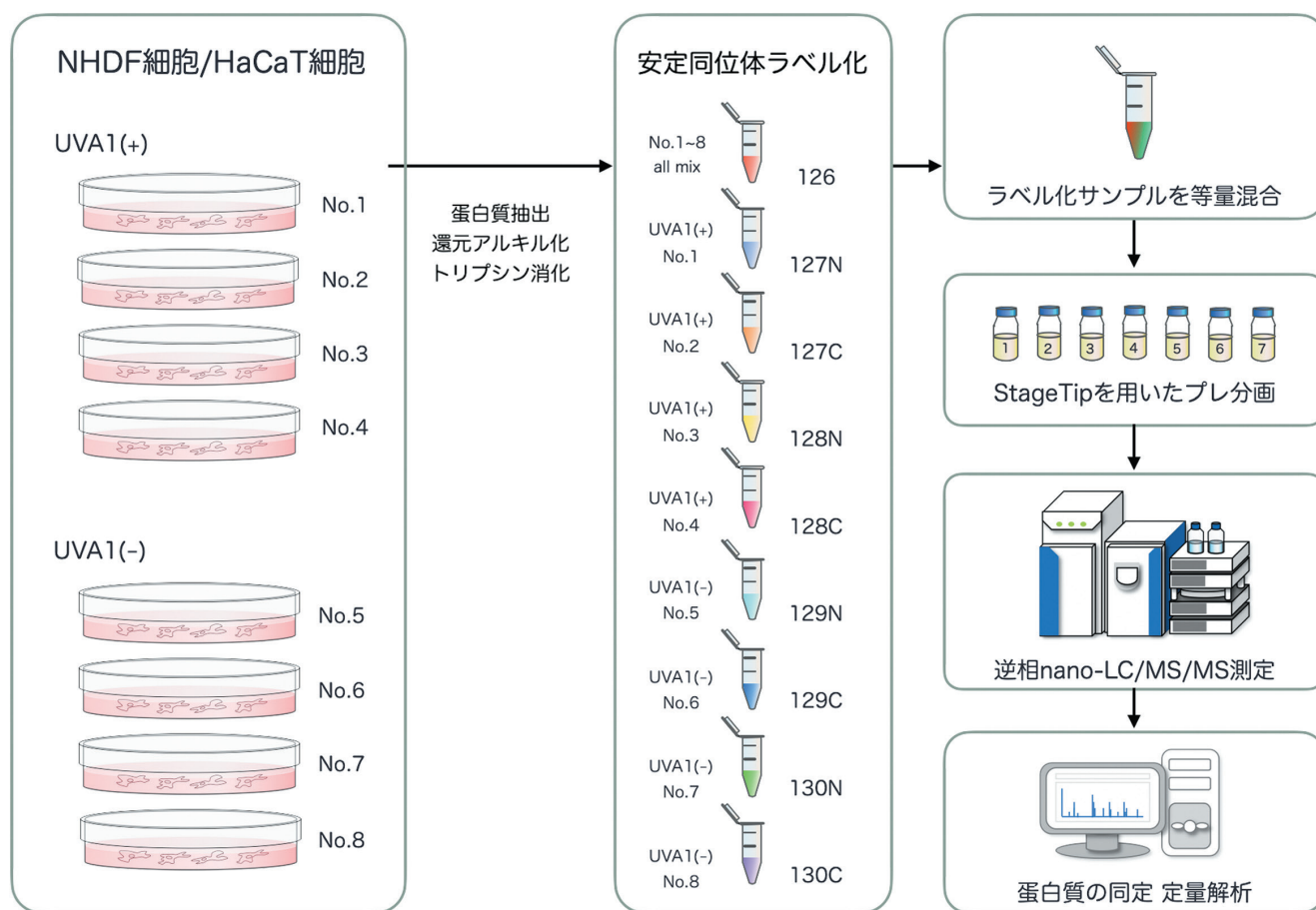


図 1 実験スキーム

NHDF 細胞と HaCaT 細胞とも UVA1 曝露 (No. 1 ~No. 4) と UVA1 非曝露 (No. 5 ~No. 8) の 4 連 2 グループの試料調製とした。培養プレートごとに蛋白質を抽出・還元アルキル化したのちトリプシン消化しペプチド試料とした。図中 126~130C は TMT 試薬における同位体ラベルを表している。コントロール (同位体ラベル 126) は No. 1 ~No. 8 のペプチド試料を等量混ぜ合わせたものとした。ペプチド試料ごとに TMT ラベル化したのち混合し、StageTip によるプレ分画を経て nano-LS/MS/MS 測定を行った。

なった。最終日は UVA1 を曝露してから 4 時間後に CO₂ インキュベータから培養ディッシュを取り出し、速やかに氷上で 5 mL の氷冷 PBS で 3 回洗浄してから 0.05% (w/v) トリプシン (Wako) を用いて細胞を剥離させたのち遠心管に回収し、125 × g, 3 分間遠心して細胞ペレットを得た。さらに 10 mL の氷冷 PBS で細胞ペレットを懸濁してから遠心する洗浄操作を 3 回繰り返す。得られた細胞ペレットを細胞試料として -80 度で保管した。

2.6 蛋白質の同定に用いた試薬

使用した試薬は以下のとおりである。PTS 緩衝液 (12 mM デオキシコール酸ナトリウム (Wako), 12 mM ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (Nacalai), 50 mM 重炭酸アンモニウム (以下 ABC と略す, Sigma Aldrich), 1 × protease inhibitor cocktail Complete EDTA-free (Roche)), ジチオトレイトール (以下 DTT と略す, Wako), ヨードアセトアミド (以下 IAA と略す, Wako), BCA Protein Assay (Pierce), Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade (Promega), 酢酸

エチル (Wako), 脱水アセトニトリル (Sigma Aldrich), トリエチル重炭酸アンモニウム (以下 TEAB と略す, Sigma Aldrich), ヒドロキシアミン (Wako), 尿素 (Wako), TMT10plex isobaric label reagent kit (Thermo Fisher Scientific), トリフルオロ酢酸 (以下 TFA と略す, Wako)

2.7 蛋白質の同定方法および比較定量方法

本研究では UVA1 曝露・UVA1 非曝露の 4 連 2 グループの比較とした (図 1)。冷凍保存しておいた細胞試料は相間移動可溶化法 (PTS 法²²⁾) により可溶化した。すなわち NHDF 細胞ペレットと HaCaT 細胞ペレットにそれぞれ 300 μL の PTS 緩衝液を加えて懸濁・攪拌したのち、95 度で 5 分間処理と超音波処理 (VP-15S, TAITEC) してから遠心分離し上清を回収した。BCA Protein Assay にて蛋白質定量を行い、各試料あたり 25 μL の PTS 緩衝液に 50 μg の蛋白質が含まれるよう濃度調製してから、1 μL の 250 mM DTT を加えて 30 分間常温で還元したのち、3.3 μL の 325 mM IAA を添加して 20 分間常温遮光

表1 蛋白質同定パラメーター一覧

項目	設定値
Database	UniProtKB/Swiss-Prot (2016_03)
MS tolerance	10 ppm
MS/MS tolerances	0.8 Da (CID) 20 mmu (HCD)
Fixed modifications	TMT 6-plex (K) Carbamidomethyl (C)
Dynamic modifications	Oxidation (M) Acetyl (Protein N-term) TMT 6-plex (N-term)
Enzyme	Trypsin/P
Max. missed cleavage sites	2

下でシステインのチオール基をアルキル化した。次に100 μ Lの50 mM ABCを加えてからTrypsin/Lys-C Mixを1 μ g加えて37度で一晩消化した。

トリプシン消化後、試料液に125 μ Lの1% (v/v) TFA含有酢酸エチルを加えて攪拌・遠心し液液分離させ、界面活性剤を含む上層を除去した。消化ペプチドを含む下層は減圧下で乾固させ、1%のTFAを含有する2.0 M尿素を200 μ L加えて再溶解した。このとき各試料から等量ずつ採取し混合して相対比較のための基準試料（コントロール）を得た。引き続き消化ペプチドを含む試料液を固相抽出（OASIS HLB, Waters）により脱塩し、再び減圧下で溶媒を留去してから、100 μ Lの100 mM TEABで溶解した。ここに脱水アセトニトリルに溶解したTMT試薬を10 μ L加え、1時間常温で反応させラベル化を行った。8 μ Lの5% (v/v) ヒドロキシアミンを含有する100 mM TEABの添加によりラベル化反応を停止したのち、等量ずつ全てのラベル化試料を混合した。足立らの方法²³⁾に従い強陽イオン交換カラムを保持したStageTip (GL-Tip SDB-SCX, GL Science)に供し、TFAグラジエント法によって7分画した。減圧下で溶媒を留去してから再び0.1% (v/v) TFAに溶解させ、それぞれnano-LC/MS/MS分析試料とした。

2.8 nano-LC/MS/MS分析

測定機器はAdvance UHPLC/HTSxt-PAL (AMR)を接続したOrbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific)を用いた。カラムはL-column 2 ODS (プレカラム0.3 \times 5 mm, 分析カラム0.1 \times 150mm C18, CELI)で、分析条件は、オープン45度、0-135分にかけてA液:0.1% (v/v) TFA含有水、B液:0.1% (v/v) TFA含有アセトニトリルによるグラジエント溶出 (B液0-35%)とした。質量分析はData Dependent Acquisitionとし、MS/MSスペク

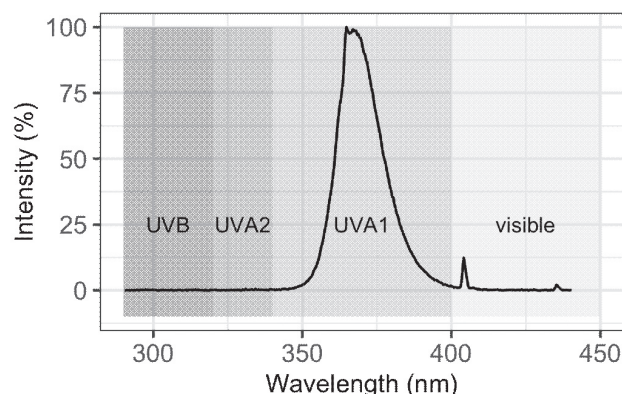


図2 UVA1ランプの分光分布

UVB (280-320 nm), UVA2 (320-340 nm), UVA1 (340-400 nm), 可視光 (400 nm-) の範囲を図中に示した。

トルはFTMSスキャンにより検出される2価、3価および4価のシグナルのうち強度の強い順に3つシグナルをプレカーサーイオンとして選択、引き続き衝突誘起解離及び高エネルギー衝突解離によって取得した。なおFTMSとHCD-MS2の分解能は両者とも60,000で、スキャンレンジはそれぞれ400-2,000 m/zと100-2,000 m/zとした。

2.9 蛋白質の同定と相対定量

蛋白質の同定と相対定量は、それぞれMASCOT (version 2.4.1, Matrix Science) と Proteome Discoverer (version 1.4.0, Thermo Fisher Scientific) を用いた。蛋白質同定に適応したパラメータは表1に示した。同定された各ペプチドのうち、false discovery rate (以下FDRと略す)が1%を超えるものまたはTMTレポーターイオンが一つでも欠損しているものについては以後の解析から除外した。相対定量値はMS/MSスペクトルに記録されたTMTレポーターイオン強度に基づき、コントロール試料 (ラベル126) のそれと各試料のそれらとの相対比とした。発現変動比 (fold change, 以後FCと略す) は、平均強度 (UVA1曝露群) / 平均強度 (UVA1非曝露群) とした。有意差検定はWelch t-testを採用し、Benjamini-Hochberg²⁴⁾の調整を行った。

2.10 統計解析

統計処理ならびにグラフの作成には統計解析言語R (version 3.6.2)²⁵⁾を用いた。

3. 結果

3.1 UVA1の輝度特性

本研究で使用したUVA1ランプの相対強度 > 5%における波長範囲は352-392 nmであり、輝度ピークは364.8 nmで半値全幅は16.4 nmであった (図2)。また輝度は 2.78 ± 0.11 mW/cm² (平均値 \pm 標準偏差) であった。

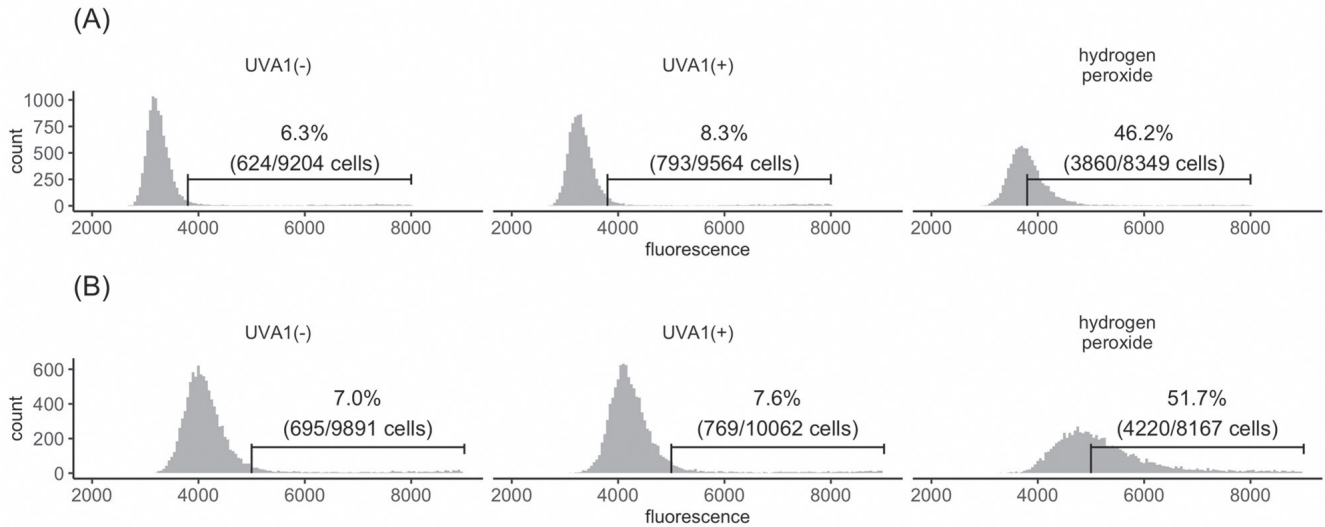


図3 DHE 蛍光強度ヒストグラム

UVA1 非曝露条件における相対累積度数 95%を下限としたゲートとゲート中の細胞数の割合を図中に示した。(NHDF 細胞(A), HaCaT 細胞(B)).

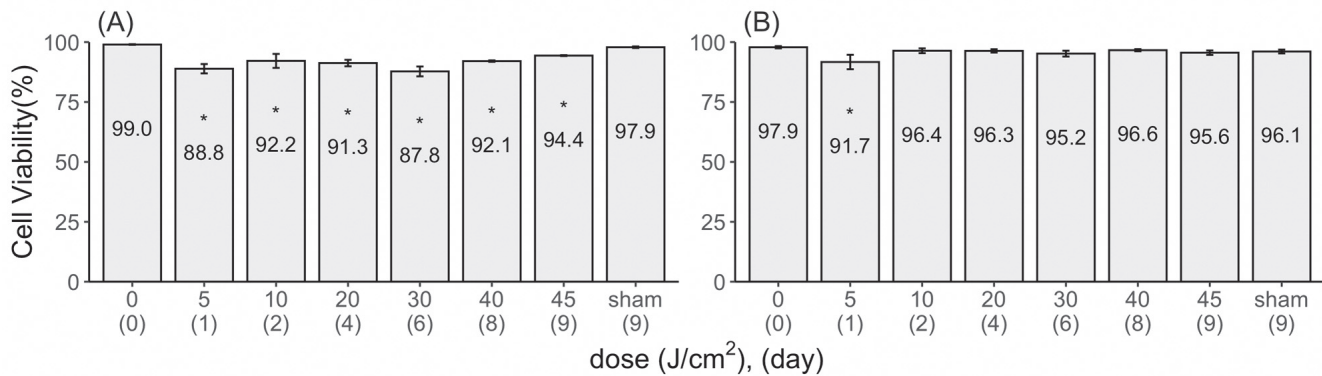


図4 UVA1 曝露量と細胞生存率

曝露量と細胞生存率の関係を示した. sham は UVA1 非曝露であることを除いて 45 J/cm²の試験条件と同様の操作を行った. 細胞生存率はハイコンテツイメージングによって求めた全細胞数に対する PI 透過細胞の割合 (%) を示した. * $p < 0.05$, 0 mJ/cm²の試験区との比較 (NHDF 細胞(A), HaCaT 細胞(B)).

3.2 UVA1 曝露による ROS の影響

5.0 J/cm²の UVA1 曝露による NHDF 細胞と HaCaT 細胞との影響を明らかにするため, ハイコンテツイメージングの手法により細胞内で発生した ROS を評価した. 陽性対照は過酸化水素 (10 mM, PBS で希釈) を 30 分間作用させた条件とした. 図 3 A, 図 3 B に示すように NHDF 細胞および HaCaT 細胞における蛍光強度の分布は, UVA1 非曝露と比較して 10 mM 過酸化水素水の作用で増大方向にシフトすることを確認した. 次に NHDF 細胞と HaCaT 細胞のそれぞれ影響を評価するため, UVA1 非曝露における蛍光強度のヒストグラムから蛍光強度の下限値を相対累積度数 95%, 上限値をそれぞれ 8,000 と 9,000 としたゲートを設定した. 解析の結果, UVA1 5.0 J/cm²の単回曝露による閾値超過細胞の割合はわずかに増加傾向に

あるものの, 有意差は認められなかった ($p < 0.05$, $n = 3$, Student's *t*-test).

3.3 UVA1 反復曝露と細胞生存率の関係

UVA1 の反復曝露による UVA1 累積曝露量と細胞生存率の関係を図 4 に示した. 初日の曝露によって NHDF 細胞の細胞生存率と HaCaT 細胞のそれは, それぞれ 88.8% と 91.7% に低下したが, その後 45 J/cm²にかけて曝露量依存的に低下する傾向は観察されなかった. 陰性対照 (図 4 では sham と表記) の細胞生存率はそれぞれ 97.9% と 96.1% であった. なお 35 J/cm²の時点で HaCaT 細胞においては若干の細胞肥大が観察されたものの, NHDF ではこのような形態変化は観察されなかった.

3.4 蛋白質同定の結果

図 1 の実験ワークフローに従い, UVA1 を反復曝露させ

たNHDF細胞とHaCaT細胞からそれぞれ蛋白質を抽出し、相対定量解析に必要なTMTレポーターイオンラベルを付与してから、質量分析計に供した。Proteome Discovererにより測定データを統合してから蛋白質同定ソフトウェアMASCOTにてデータベースサーチしたところ、NHDF細胞から取得したデータセット（以下NHDFデータセットと略す）及びHaCaT細胞から取得したデータセット（以下HaCaTデータセットと略す）から、それぞれ1,472蛋白質と1,582蛋白質を同定した。そのうちTMTレポーターイオンの完全性とFDRの基準でフィルターをかけ、それぞれ1,397蛋白質と1,479蛋白質を定量解析することとした。観測したMS/MSスペクトルやペプチド数などは表2にまとめた。

3.5 相対定量解析結果

NHDFデータセットとHaCaTデータセットで同定された蛋白質のうち、相対定量値が得られた各蛋白質と \log_2FC と \log_{10} （補正 p 値（以下 q -valueと略す））の分布をそれぞれボルケーノプロットで示した。このときカットオフ・クライテリアを q -value < 0.05かつ $FC \geq 1.3$ または ≤ 0.77 と設定した（図5）。カットオフ・クライテリアに従い反復UVA1曝露により影響を受けた蛋白質を抽出したところ、NHDF細胞において62蛋白質（上方制御29, 下方制御33）、HaCaT細胞において16蛋白質（上方制御11, 下方制御5）が見出された。図6にこれら蛋白質一覧をFCの順に示した。

4. 考 察

本研究では皮膚浸透性の高いUVA1による光老化現象に焦点を絞り、蛋白質レベルにおける表現系の理解を目指してTMT同位体ラベルを用いたショットガンプロテオーム解析を実施した。測定対象は*in vitro*モデルとし、真皮細胞と表皮細胞のモデルとしてそれぞれNHDF細胞とHaCaT細胞を選択した。なおUVA1の曝露により分泌型蛋白質における発現変動も当然予想されるものの、本研究では細胞のみを回収して試料としたため、それらについては検出できていない可能性が高い。

光源として用いたUVA1ランプの分光分布は352–392 nm（輝度 > 5%）であった。このことからUVA2（320–340 nm）やUVB（280–320 nm）領域の光をほとんど含んでいないと判断される。一方、可視光領域の光（>400 nm）が一部含まれていたが、そのエネルギーはUVA1ランプが照射する全エネルギーの1.86%（図2の分光分布強度をヤコビヤン変換して計算²⁶⁾）であったため、細胞に対する影響は極めて小さいものと考えられる。なお本光源の分光分布と太陽光のそれとの違いについて述べると、クエートにおける冬季8ヶ月にわたる測定結果からUVA（320–400 nm）に対するUVB（280–320 nm）の照射量比は5%程度で、290 nmから330 nmにかけて輝度が5桁増大し、330 nmから400 nmにかけてはほぼ一定の輝度であることが示されている²⁷⁾。

UVA1ランプを用いて5.0 J/cm²を単回曝露させたNHDF細胞とHaCaT細胞のそれぞれのROSレベルは、非曝露

表2 同定結果一覧

Dataset	Search inputs	peptide spectrum		merged proteins	protein groups	
		matches	peptides		identified	quantified
NHDF	110,375	88,632	23,378	11,914	1,472	1,397
HaCaT	111,844	93,257	23,991	12,018	1,582	1,479

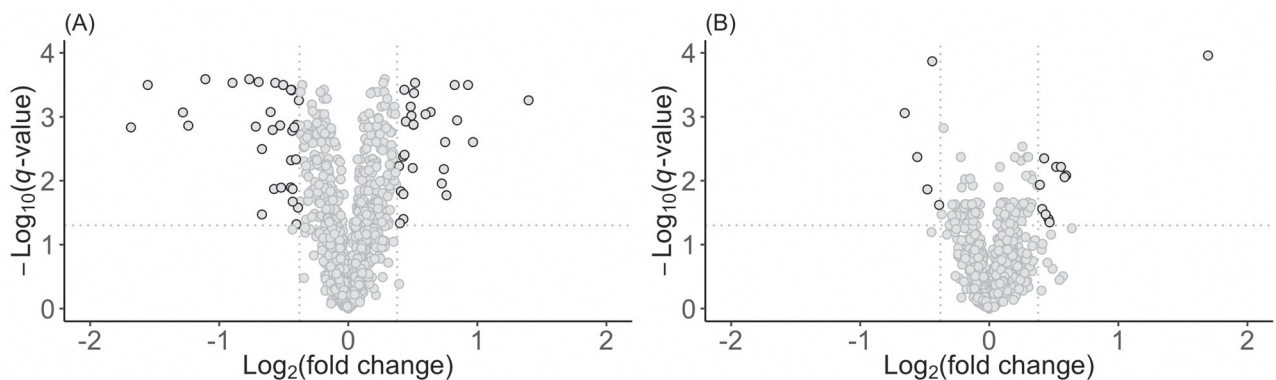


図5 ボルケーノプロット

(A) NHDFデータセット, (B) HaCaTデータセット

点線はカットオフ・クライテリアである $FC=1.3$ と q -value = 0.05を示した。

のそれらと有意差がなかった。これらのことから両細胞に対する 5.0 J/cm² の UVA1 単回曝露は、シクロピリミジンダイマー²⁸⁾ や 6-4 光産物²⁹⁾ といった直接的な酸化的損傷を惹起しないか、惹起してもその程度は小さいと推定される。しかし一方で 5.0 J/cm² の UVA1 単回曝露は NHDF 細胞と HaCaT 細胞の生存率をそれぞれ 1 割程度低下させた。PBS への置換を 9 日間繰り返した陰性対照 (sham) の

NHDF 細胞と HaCaT 細胞の細胞生存率は、0 J/cm² (非曝露, 0 日目) のそれらと比較して有意差は認められなかったことから、本研究で採用した PBS への置換など実験操作による細胞への影響は極めて小さく、それゆえ細胞生存率の低下は主に UVA1 の曝露に起因すると判断される。ただし累積曝露量依存的に生存率は悪化しなかったことから、UVA1 の致死的影響は限定的であるといえる。また曝露初

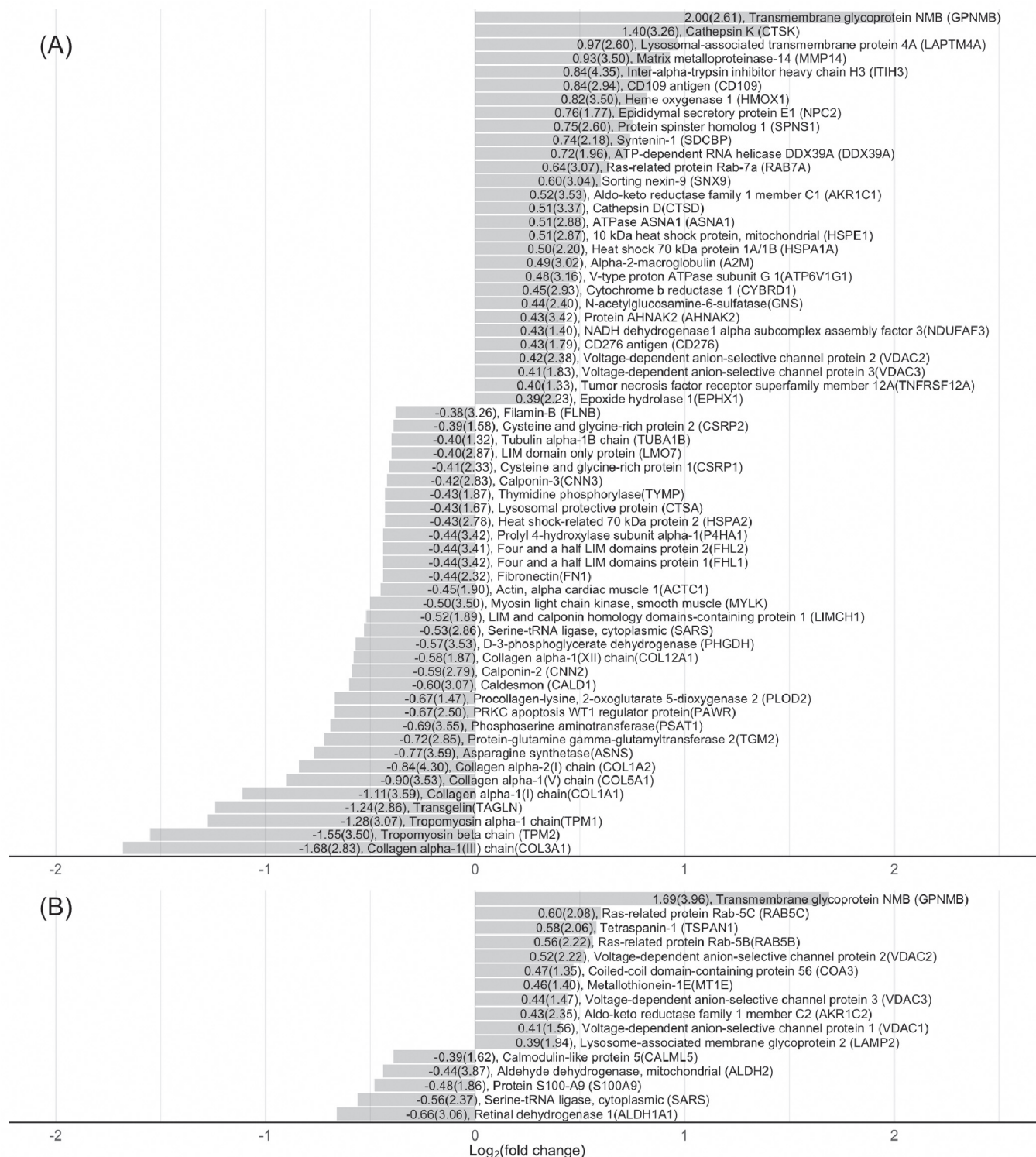


図 6 変動蛋白質一覧 (A) NHDF 細胞, (B) HaCaT 細胞

カットオフ・クライテリアに従って蛋白質を抽出した。図中ラベルは順に FC, log₁₀ (q-value), 蛋白質名, 遺伝子名である。

日から2日目にかけてNHDF細胞の細胞生存率とHaCaT細胞のそれともそれぞれ上昇する傾向が見られたが、これらは細胞内でストレス応答が誘導され、UVA1曝露に対する耐性の高まりが反映されていると推定される。

NHDF細胞に45 J/cm²のUVA1を蓄積させ、非曝露の陰性対照と比較して注目すべき蛋白質を抽出したところ、カテプシンK、ヘムオキシゲナーゼ(HMOX1)の発現上昇やコラーゲン(COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1)の発現減少が確認された(図6A)。これらの蛋白質の発現変動は、UVAを曝露させた培養線維芽細胞を用いた免疫組織化学染色研究や三次元再構成皮膚モデルを用いたDNAマイクロアレイ解析などでも報告されており^{20,30,31)}発現の方向(上方/下方制御)は一致した。このことは本研究で採用した実験系が適切に機能したことを支持するものである。膜貫通型糖蛋白質NMB(GPNMB)もまた発現上昇した蛋白質として同定された。この蛋白質は特にメラノソーム細胞の表面において発現していることが報告されており、UVA曝露量依存的に発現増強される³²⁾。またGPNMBは老化あるいは老化関連疾患に関与する蛋白質の候補として提唱されており³³⁾、その細胞外ドメインとインテグリンとの相互作用によって免疫抑制や血管新生が誘導されることや、チロシナーゼレセプターやインテグリンシグナリングへの関与から、下流にあるキナーゼシグナリングを刺激することによってMMPsやサイトカインの発現を促進する³⁴⁾。今回の解析ではMMPsのうち膜貫入型マトリックスメタロプロテアーゼ14(MMP-14)の発現上昇が認められており、上記発現制御系と関連しているのかもしれない。一方でこれまでMMPsの発現は、皮膚へのUV曝露に刺激された転写因子AP-1やNF- κ Bによって誘導されることが知られているが¹⁰⁾、この制御系とMMP-14との関係性においてはこれまで知見がないため、UVA1によって誘導される新たな現象の一面を捉えた可能性もある。

HaCaT細胞由来試料から見出された発現変動蛋白質の数はNHDF細胞由来試料のそれと比較すると少なく(図5B, 図6B)、ボルケーノプロットでは原点のわずか上方に集中する結果となった。表皮は皮膚の最外層に位置する組織であるため、エネルギーの高いUVBに曝される運命にあり、そのためカタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼ(SOD-1, SOD-2)といった抗酸化酵素群の発現レベルや脂溶性・水溶性抗酸化物質の存在量が真皮組織のそれらと比較して高いことが知られている^{35, 36)}。それゆえ表皮組織ではUVの直接的あるいは間接的な酸化ストレスに応答する蛋白質間ネットワークや修復システムが真皮組織より優れており、それらが今回の実験結果であるHaCaT細胞のUVA1に対する感受性の低さの一つの原因であるかもしれない(図4B)。なお変動が小さくともUVA1の影響を受けた蛋白質は存在すると思われるが、

本研究で採用したカットオフ・クライテリアによって除外されている可能性もあり、それらの検出には別の検出手法やUVA1曝露量を上げるなどの工夫が必要であろう。興味深いことに今回の研究で見出された発現変動蛋白質のうちGPNMB, SARS, VDAC2, VDAC3は両細胞試料に共通して見出された。このことがどのような意味を持つのか不明であるものの、共通のシグナル伝達系で発現制御されていることも想定される。光老化度の推定には、本研究で見出した各々の蛋白質の生理機能の解明やそれらの発現制御メカニズム、また表皮組織と真皮組織間でのクロストークに対する理解など今後の研究が必要で、それらはまたUVA1曝露に起因する光老化現象の根底にある分子メカニズムに対して新たな洞察を与えるであろう。

5. ま と め

本研究は培養皮膚細胞を用いて、UVA1による光老化に関係すると予想される蛋白質の探索まで行った。今回の研究より新規に発現変動蛋白質として同定されたものについては、真にUVA1の反復曝露に起因した生理状況を反映しているのか、別の研究手法や*in vivo*試料などを用いて検証されなければならない。今後の研究の進展によって、UVA1との関係について裏付けされた蛋白質は真皮組織や表皮組織における光老化度の判定指標の候補となり、実用的な応用研究への展開が期待される。

6. 謝 辞

本研究は、JSPS科研費(若手研究B, 課題番号26860909)の助成を受けて実施した。細胞培養や実験デザインについては島根県産業技術センター前第二技術部長・故勝部拓矢博士にご指導・ご助言いただいた。また測定試料調製方法については日本プロテーム学会平成27年度第2回トレーニングコースを参考にしたほか、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所プロテオームリサーチプロジェクト足立淳博士にご助言いただいた。ここに謝意を示します。

7. 文 献

- 1) 清水宏. あたらしい皮膚科学. 第2版, 中山書店, 2011, p.1-36.
- 2) Gilchrist, B. A.; Krutmann, J. *Skin Aging*, Springer, 2006, p.1-53.
- 3) Marina, L. *Environmental Factors in Skin Diseases*. Current Problems in Dermatology, Basel, Karger, 2007, vol.35, p.1-13.
- 4) Esvelt, R. P.; Schnoes, H. K.; DeLuca, H. F. Vitamin D3 from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1978, vol.188, p.282-6.
- 5) Rittié, L.; Fisher, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews* 2002, vol.1, p.705-720.
- 6) Fisher, G. J.; Kang, S.; Varani, J.; Bata-Csorgo, Z.; Wan, Y.; Datta, S.; Voorhees, J. J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of dermatology*. 2002, vol.138, p.1462-70.
- 7) Fisher, G. J.; Voorhees, J. J. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet

- irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings.* 1998, vol.3, p.61-8.
- 8) Kligman, L. H. Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Clinics in geriatric medicine.* 1986, vol.4, p.235-51.
 - 9) Matsumura, Y. ; Ananthaswamy, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2004, vol.195, p.298-308.
 - 10) Yaar, M. ; Gilchrist, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology.* 2007, vol.157, p.874-887.
 - 11) Berneburg, M. ; Plettenberg, H. ; Krutmann, J. Photoaging of human skin. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine.* 2000, vol.16, p.239-244.
 - 12) Battie, C. ; Jitsukawa, S. ; Bernerd, F. ; Del Bino, S. ; Marionnet, C. ; Verschoore, M. New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. *Experimental Dermatology.* 2014, vol.23, p.7-12.
 - 13) Midelfart, K. ; Moseng, D. ; Kavli, G. ; Volden, G. One-year measurements of solar UVB and UVA radiation at latitude 70 degrees north. *Photo-dermatology.* 1984, vol.1, p.252-4.
 - 14) Battie, C. ; Jitsukawa, S. ; Bernerd, F. ; Del Bino, S. ; Marionnet, C. ; Verschoore, M. New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. *Experimental dermatology.* 2014, vol.23 Suppl 1, p.7-12.
 - 15) 牧野正知. ; 太田ゆかり. ; 勝部拓矢. クロモジ枝抽出物によるヒト真皮線維芽細胞の紫外線損傷 DNA に対する修復効果. 鳥根県産業技術センター報告. 2019, vol.55, p.10-15.
 - 16) Boukamp, P. ; Petrussevska, R. T. ; Breitkreutz, D. ; Hornung, J. ; Markham, A. ; Fusenig, N. E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology.* 1988, vol.106, p.761-71.
 - 17) Lamore, S. D. ; Qiao, S. ; Horn, D. ; Wondrak, G. T. Proteomic identification of cathepsin B and nucleophosmin as novel UVA-targets in human skin fibroblasts. *Photochemistry and Photobiology.* 2010, vol.86, p.1307-1317.
 - 18) Lamore, S. D. ; Wondrak, G. T. UVA causes dual inactivation of cathepsin B and L underlying lysosomal dysfunction in human dermal fibroblasts. 2013, vol.123, p.1-12.
 - 19) Marionnet, C. ; Pierrard, C. ; Lejeune, F. ; Sok, J. ; Thomas, M. ; Bernerd, F. Different oxidative stress response in keratinocytes and fibroblasts of reconstructed skin exposed to non extreme daily-ultraviolet radiation. *PLoS ONE.* 2010, vol.5,
 - 20) Marionnet, C. ; Pierrard, C. ; Golebiewski, C. ; Bernerd, F. Diversity of Biological Effects Induced by Longwave UVA Rays (UVA1) in Reconstructed Skin. *PloS one.* 2014, vol.9, p.e105263.
 - 21) Makino, M. ; Katsube, T. ; Ohta, Y. ; Schmidt, W. ; Yoshino, K. Preliminary study on antioxidant properties, phenolic contents, and effects of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut) seed shell extract on in vitro cyclobutane pyrimidine dimer repair. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology.* 2017, vol.6, p.414-419.
 - 22) Masuda, T. ; Tomita, M. ; Ishihama, Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *Journal of proteome research.* 2008, vol.7, p.731-40.
 - 23) 足立淳. ; 佐藤彩子 ; 朝長毅. ペプチド分画用陽イオン交換カラムの性能比較. *日本プロテオーム学会誌.* 2016, vol.1, p.19-24.
 - 24) Benjamini, Y. ; Yosef, H. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* . 1995, vol.57, p.289-300.
 - 25) R Core Team ; R: A language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>. 2019.
 - 26) Mooney, J. ; Kambhampati, P. Get the Basics Right: Jacobian Conversion of Wavelength and Energy Scales for Quantitative Analysis of Emission Spectra. *The Journal of Physical Chemistry Letters.* 2013, vol.4, p.3316-3318.
 - 27) Kollias, N. ; Ruvolo, E. ; Sayre, R. M. The value of the ratio of UVA to UVB in sunlight. *Photochemistry and photobiology.* 2011, vol.87, p.1474-5.
 - 28) Setlow, R. B. Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science (New York, N.Y.)* . 1966, vol.153, p.379-386.
 - 29) Rycyna, R. E. ; Alderfer, J. L. UV irradiation of nucleic acids: formation, purification and solution conformational analysis of the '6-4 lesion' of dTpdT. *Nucleic acids research.* 1985, vol.13, p.5949-5963.
 - 30) Codriansky, K. A. ; Quintanilla-Dieck, M. J. ; Gan, S. ; Keady, M. ; Bhawan, J. ; Rüniger, T. M. Intracellular degradation of elastin by cathepsin k in skin fibroblasts - A possible role in photoaging. *Photochemistry and Photobiology.* 2009, vol.85, p.1356-1363.
 - 31) Keyse, S. M. ; Tyrrell, R. M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989, vol.86, p.99-103.
 - 32) Tomihari, M. ; Hwang, S.-H. ; Chung, J.-S. ; Cruz, P. D. ; Ariizumi, K. Gpnmb is a melanosome-associated glycoprotein that contributes to melanocyte/keratinocyte adhesion in a RGD-dependent fashion. *Experimental dermatology.* 2009, vol.18, p.586-95.
 - 33) Cardoso, A. L. ; Fernandes, A. ; Aguilar-Pimentel, J. A. ; de Angelis, M. H. ; Guedes, J. R. ; Brito, M. A. ; Ortolano, S. ; Pani, G. ; Athanasopoulou, S. ; Gonos, E. S. ; Schosserer, M. ; Grillari, J. ; Peterson, P. ; Tuna, B. G. ; Dogan, S. ; Meyer, A. ; van Os, R. ; Trendelenburg, A.-U. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. *Ageing research reviews.* 2018, vol.47, p.214-277.
 - 34) Taya, M. ; Hammes, S. R. Glycoprotein Non-Metastatic Melanoma Protein B (GNMB) and Cancer: A Novel Potential Therapeutic Target. *Steroids.* 2018, vol.133, p.102-107.
 - 35) Sander, C. S. ; Chang, H. ; Salzman, S. ; Müller, C. S. L. ; Ekanayake-Mudiyanselage, S. ; Elsner, P. ; Thiele, J. J. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *The Journal of investigative dermatology.* 2002, vol.118, p.618-25.
 - 36) Shindo, Y. ; Witt, E. ; Packer, L. Antioxidant Defense Mechanisms in Murine Epidermis and Dermis and Their Responses to Ultraviolet Light. *Journal of Investigative Dermatology.* 1993, vol.100, p.260-265.