

卵殻膜ペプチドによるケラチノサイト分化促進シグナル経路 およびその構造解析の検討

東京大学大学院農学生命科学研究科・特任准教授 賈 慧娟

■ 緒 言

皮膚老化は、しわや乾燥などの加齢性変化や皮膚がんなどの細胞障害を引き起こす。しかし、皮膚老化に対する身近で安全な予防法は確立されていない。本研究グループでは、抗炎症作用や創傷治癒の促進などの様々な健康効果が報告されている卵殻膜に着目した。我々の先行研究において、卵殻膜の経口投与によって皮膚老化モデルマウスの皮膚の薄化を改善することや、細胞実験において卵殻膜ペプチド(eESM)がケラチノサイトの分化マーカーおよびカルシウムの取り込みに関わる遺伝子の発現量を増加させることができた¹⁾。これらの結果から、卵殻膜が皮膚のターンオーバーを促進し、皮膚の恒常性を保つ可能性が示唆され、皮膚への健康効果は十分に期待できると考えられる。

一方で、卵殻膜は卵加工過程で産業廃棄物として廃棄される食品由来の天然素材であり、先行研究によってその安全性も認められているため、皮膚への塗布や経口摂取といった安価で簡便な利用方法を提案できる可能性がある。本研究では、eESMは皮膚老化への予防効果と具体的なメカニズムを検討することで、皮膚疾患における新たな予防法としての卵殻膜の有用性を示すことを目的とした。

■ 方 法

1. 卵殻膜ペプチドのケラチノサイト分化促進効果の検討

eESMを正常ヒト表皮角化細胞(NHEK-Neo細胞)に添加して形態観察により、分化が進み基底層、有棘層、顆粒層、角化層へ移行するにつれて細胞の形態変化(扁平化)を確認した。また、eESMは濃度依存的に分化マーカーであるKRT1(Keratin 1)、KRT10、IVL(Involutin)、KRT13における発現解析を行った。さらに、ケラチノサイトの分化に重要な制御因子であるカルシウムの取り込みに関わるTRPV3等と分化マーカーの発現量を比べ、eESMの添加によるカルシウム濃度の増加が分化促進に関わるか調べた。

2. 卵殻膜ペプチドによるケラチノサイト分化促進シグナル経路の検討

eESMのケラチノサイト分化促進のメカニズムに、カルシウムの取り込みが関与していることが示唆されたことから、細胞内カルシウム濃度の上昇によって活性化されるPKCシグナル経路およびPI3K-AKTシグナル経路、細胞外カルシウムによって活性化されるNotchシグナル経路に着目した。すなわち、ケラチノサイトの分化に関わる遺伝子(PKC経路:RIPK4、IRF6、GRHL3、OVOL1、KLF4、Notch経路の下流:HES1、ROCK1)の発現量をRT-PCRで測定し、タンパク質(PI3K-AKT経路:mTORC1を活性化するリン酸化Akt(Thr308)、mTORC2によって活性化されるリン酸化Akt(Ser473)およびmTORC2経路の下流のリン酸化ERK1、ERK2)のレベルをウエスタンブロットで解析を行った。さらにメカニズムをより明確にするために、各シグナル経路の阻害剤(GF109203X、LY294002等)を用いて、eESMによるケラチノサイトの分化促進効果が抑制されるかを検討した。

3. 卵殻膜特異的に含まれるペプチドの構造解析

超高性能液相クロマトグラフ(HPLC)Nexera X2によりeESMに含まれるペプチドの分子量および数を分析した。また、飽和濃度のα-シアノ-4-ヒドロキシケイ酸とeESM溶液を1:1で混合し作製したマトリックス溶液をMTP 384 target plate ground steel(Bruker、8280784)に滴下し、autoflex[®] maX MALDI-TOF-MSでペプチドの分子量や配列断片の同定を行った。

■ 結 果

1. ESMがケラチノサイトの形態変化に及ぼす影響

ケラチノサイトは分化の進行によって細胞の形態が立方体から円柱状、さらに扁平状に変化する。本実験の培養1日目では目視で確認できる変化は見られなかったが、5日目にはコントロール群と比べて、eESM群における増殖速度の顕著な低下が確認でき、9日目にはeESM群において細胞が周り

の細胞と接着し、細長く扁平化する様子が観察された。(Fig. 1)。

2. ESM が分化マーカーの遺伝子発現に及ぼす影響

eESM のケラチノサイト分化促進効果を検討したところ、初期分化マーカー(*KRT1*、*KRT10*、*IVL*、*KRT13*)に加えて、終期分化マーカーである *FLG* および *TGM1* の発現量はコントロール群と比較し、eESM の濃度依存的に高かった。また、カルシウムの取り込みに関わる *TRPV3* の発現量も分化マーカーと同様に eESM の濃度依存的に高く、2.0 および 4.0 mg/ml の eESM 群でコントロール群と比べ有意な高発現が見られた(Fig. 2)。

3. eESM によるケラチノサイト分化促進シグナル経路の関連遺伝子発現の変化

Notch シグナル経路に関連する遺伝子発現には有意な変化は認められなかったが、PKC シグナル経路(Fig. 3)および PI3K-AKT シグナル経路(Fig. 4)の遺伝子およびタンパク質レベルに、eESM 無添加細胞と比較して有意な差が認められた。

4. 阻害剤添加が eESM の分化促進効果に及ぼす影響

10 μ M の GF または LY を添加した群において、eESM 添加群と比較して分化マーカー(*KRT1*、*KRT10*、*IVL*、*KRT13*、*FLG*、*TGM1*)の発現量は有意に低かった。5 μ M の GF および LY を添加した群での *IVL* の発現量、5 μ M の LY を添加した群での *FLG* の発現量については有意な差は見られなかった(Fig. 5)。

5. 卵殻膜ペプチドの構造解析

HPLC および MALDI-TOF-MS 分析の結果、eESM には分子量約 1000 のペプチドが多く含まれることが明らかとなった。また、LC-MS 分析および解析ソフト PEAKS STUDIO により *de novo* 解析を行なったところ、eESM のアミノ酸配列として複数の候補が挙げられ、信頼度が上位 19 番目までの候補ペプチドは全て 8 個のアミノ酸から構成され、後半の配列が一致していた。したがって、eESM には 8 個のアミノ酸から構成される分子量約 1000 のペプチドが含まれている可能性が高いと考えられる。

■ 考 察

本研究では、予防方法の選択肢が少ない皮膚老化に対して eESM の有効性を示すため、ケラチノサイトの分化促進効果およびペプチドの有効構成成分の 2 つの観点から eESM の機能性を検討した。コントロール群と比較して eESM 添加群で細胞増殖速度の低下と、周囲の細胞と接着し、細長く扁平化する形態変化が確認された。これらの変化はケラチノサイトが分化によって基底細胞から有棘細胞に、有棘細胞から顆粒細胞に変化する際の特徴であると考えられ、eESM による分化促進効果が示唆された。加えて、eESM は濃度依存的にケラチノサイトの初期分化、終期分化の両方を促進することが明らかとなった。また、カルシウムの取り込みに関わる *TRPV3* の発現量も濃度依存的に高かったことから、eESM はカルシウムの取り込みを介してケラチノサイトの分化を促進している可能性が示唆された。

eESM のケラチノサイト分化促進効果にはカルシウムシグナルが関与していると推測し、細胞内カルシウムによって活性化される 3 つのケラチノサイトの分化を促進する経路に着目し、関連する遺伝子発現への eESM の影響について検討した。その結果、eESM の添加により PKC シグナル経路および PI3K-AKT シグナル経路の関連遺伝子およびタンパク質は高い発現量を示し、また PKC または PI3K の阻害剤を添加すると eESM 添加による分化マーカーの高発現が見られなくなったことから、eESM のケラチノサイト分化促進メカニズムに PKC シグナル経路および PI3K-AKT シグナル経路が関与していると考えられた。eESM 添加によって PKC シグナル経路および PI3K-AKT シグナル経路が活性化された理由としては、*TRPV3* の高発現による細胞内へのカルシウムの取り込み促進によるものと考えられる。それに対して、Notch シグナル経路の活性化が見られなかったのは、eESM 添加培地中のカルシウム濃度が先行研究で提唱されている²⁾分化を促進する濃度(1.20 および 2.00 mM)まで達していないためだと考えられる。

PI3K-AKT シグナル経路に関して、mTORC1 を活性化するリン酸化 AKT(Thr308)/AKT の値は eESM によって変化しなかったのに対して、mTORC2 によって活性化されるリン酸化 AKT(Ser473)/AKT の値はコントロール群と比べて、4.0 mg/ml eESM 群で有意に高いことが確認された。加えて、mTORC2

経路の下流でリン酸化され、ケラチノサイトを分化すると報告されているリン酸化 ERK2/ERK2 の値もコントロール群と比べて、4 mg/ml eESM 群で高かった。Ding らの先行研究によると、マウス表皮の mTORC1 または mTORC2 を特異的に阻害した実験から、mTORC1 は主に表皮の基底層での初期分化に関与し、mTORC2 は主に後期分化に関与する可能性が示唆された³⁾。加えて、mTORC1 はケラチノサイトのカルシウムによる分化促進の際に、分化の初期に活性化し、分化が進むにつれて不活性化したという報告もある⁴⁾。これらの知見から 4.0 mg/ml eESM 群は今回細胞を回収したタイミングでは後期分化に移行している可能性が示唆されたが、分化の進行度によっては mTORC1 の活性化が見られる可能性も十分にある。しかし、ケラチノサイトの分化における mTOR の働きは未解明な部分が多く、そのことも含めて今後さらなる解明が求められる。

eESM がケラチノサイト分化促進効果を持ち、皮膚老化に対して効果的である可能性が示唆されたが、実際に、皮膚への局所投与が可能であるかは非常に重要な点である。eESM の分子量および構成成分を検討した結果、eESM には 8 つのアミノ酸により構成された分子量約 1000 のペプチドが多く含まれていることが明らかとなり、また構成成分の分子量が 2 万以下であったことから、eESM は十分に皮膚に浸透する可能性があると考えた。この結果をもとに、今後、マウスの皮膚に eESM を塗布し、その発毛促進効果を検討する必要があると考える。また今後はデータベースを利用してこのアミノ酸配列を持つペプチドがどのようなタンパク質由来であるか解析したい。

■要約

本研究は eESM のケラチノサイトの分化促進効果を検討するとともに、そのメカニズムに関しても検討し、PKC シグナル経路および PI3K-AKT シグナル経路の関連性を初めて示唆した。eESM 中に 8 つのアミノ酸により構成される分子量約 1000 のペプチドが多く含まれていたことから、このペプチドが eESM 特異的なケラチノサイト分化促進効果に寄与しているか今後検討していきたい。

■ 文 献

- 1) Furukawa, K., Kono, M., Kataoka, T., Hasebe, Y., Jia, H., Kato, H. 2021, Effects of eggshell membrane on keratinocyte differentiation and skin aging in vitro and in vivo. *Nutrients*, 13, 2144.
- 2) Sharpe, G.R., Fisher, C., Gillespie, J.I., Greenwell, J.R. 1993, Growth and differentiation stimuli induce different and distinct increases in intracellular free calcium in human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, 284(8), 445.
- 3) Ding, X., Bloch, W., Iden, S., Ruegg, M.A., Hall, M.N., Leptin, M., Partridge, L., Eming, S.A. 2016, mTORC1 and mTORC2 regulate skin morphogenesis and epidermal barrier formation. *Nat Commun*, 7, 13226.
- 4) Buerger, C., Shirasath, N., Lang, V., Berard, A., Diehl, S., Kaufmann, R., Boehncke, W.H., Wolf, P. 2017, Inflammation dependent mTORC1 signaling interferes with the switch from keratinocyte proliferation to differentiation. *PLoS One*, 12(7), e0180853.

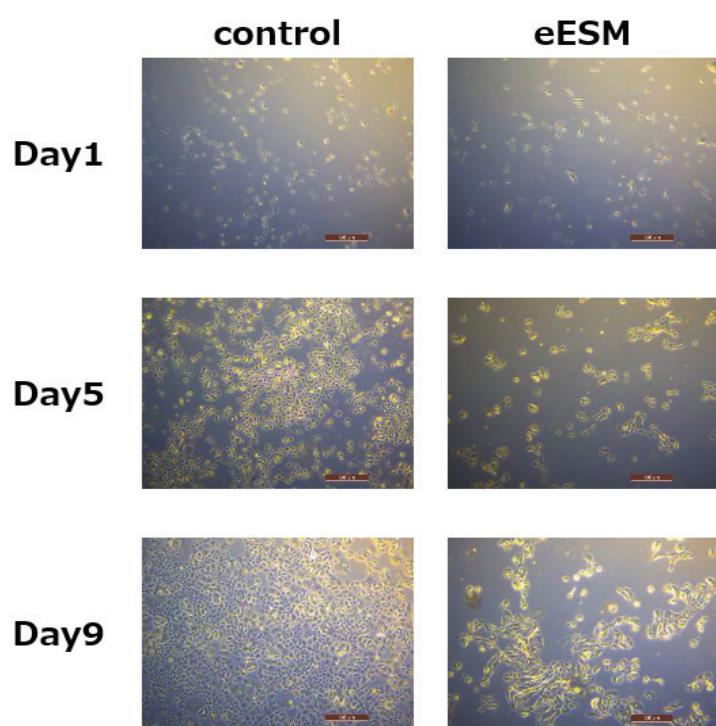


Fig. 1 eESM 添加培地に交換後の細胞形態

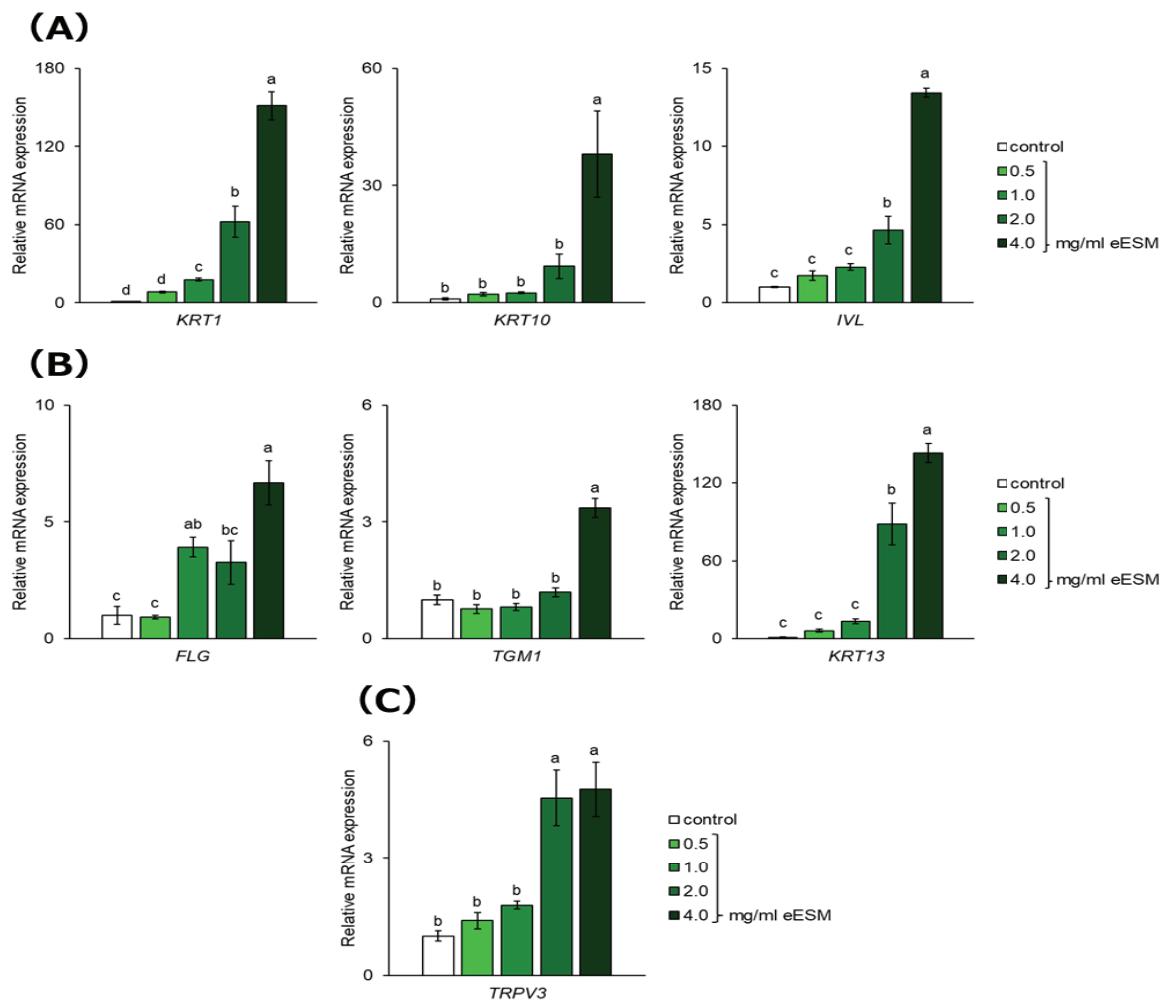


Fig. 2 eESM によるケラチノサイトの分化マーカーおよび *TRPV3* 遺伝子発現の変化
 (A) 初期分化マーカーである *KRT1*、*KRT10*、*IVL*、(B) 終期分化マーカーである *FLG*、*TGM1*、*KRT13*、(C) *TRPV3* の結果を示す。Means \pm SE ($n=4$)、Turkey's test、異符号間で有意差あり ($p<0.05$)。

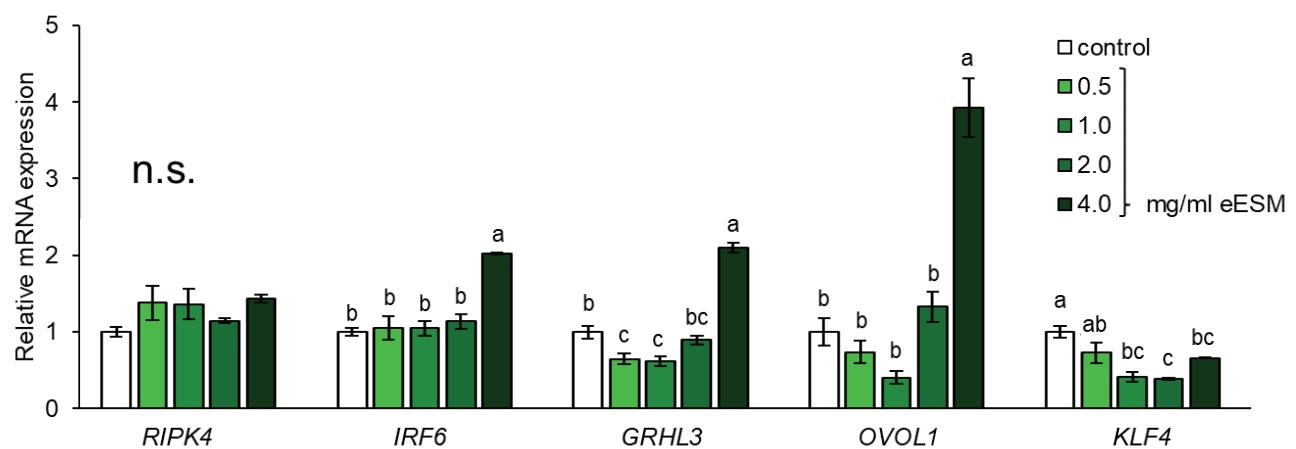


Fig. 3 eESM による PKC シグナル経路 (RIPK4-IRF6 シグナル経路) 関連遺伝子発現の変化
Means \pm SE ($n=4$)、Turkey's test、異符号間で有意差あり ($p<0.05$)、n.s.=not significant。

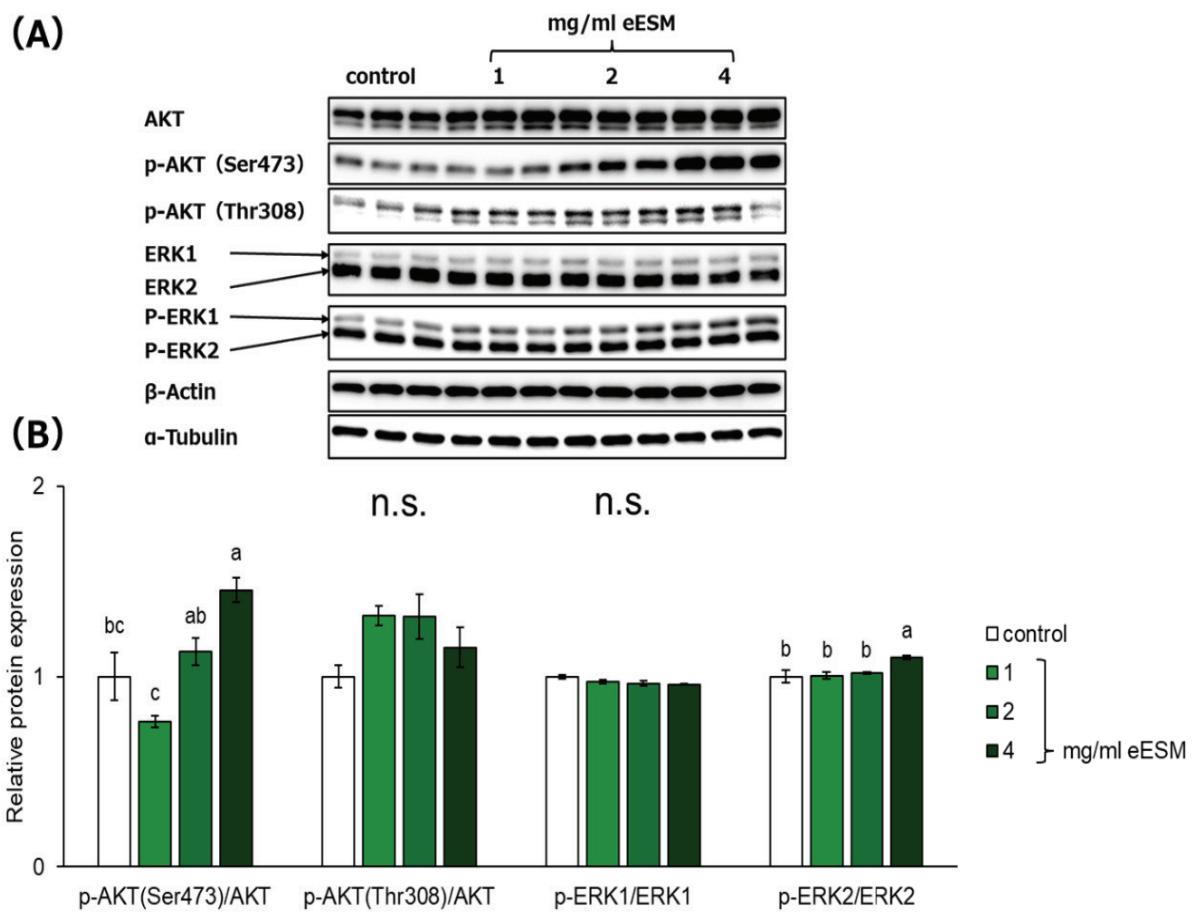


Fig. 4 eESM による PI3K-AKT シグナル経路関連タンパク質レベルの変化
Means \pm SE ($n=4$)、Turkey's test、異符号間で有意差あり ($p<0.05$)、n.s.=not significant。

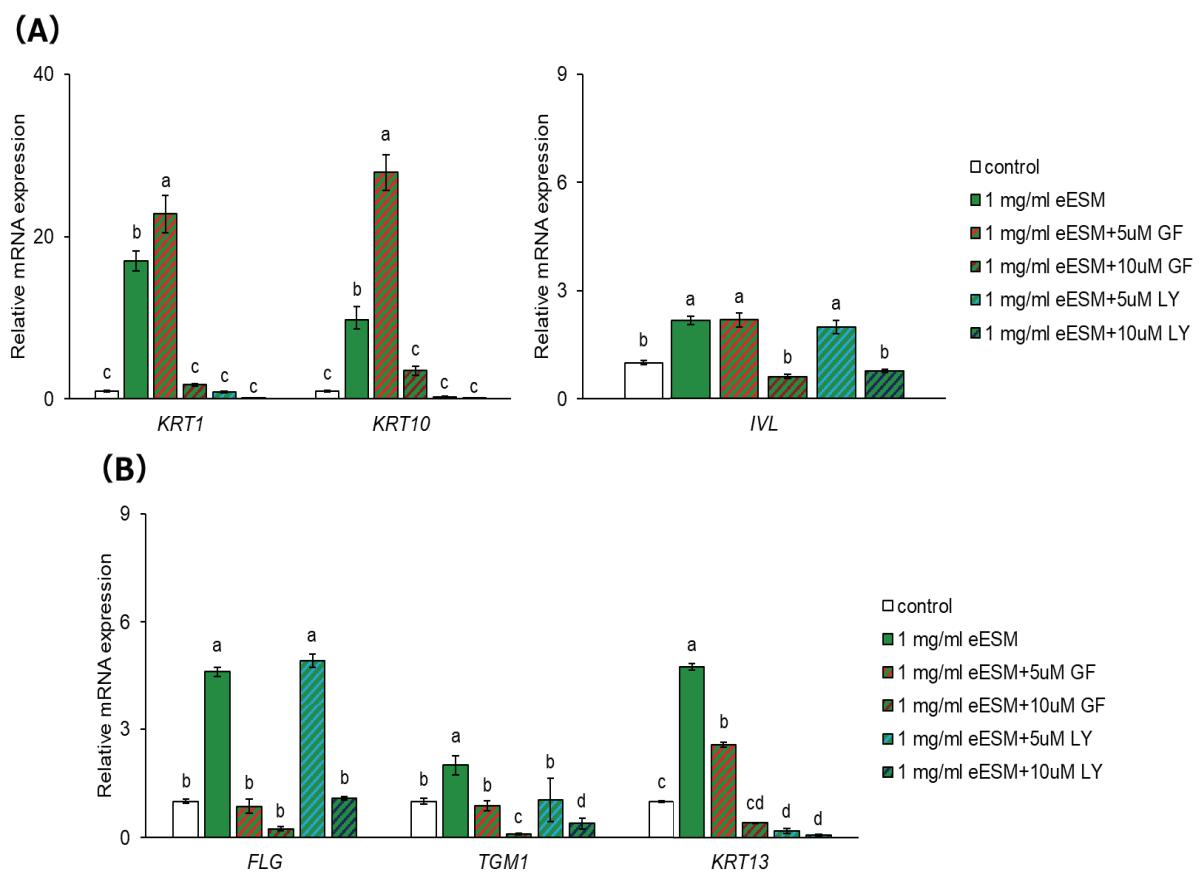


Fig. 5 阻害剤添加による分化マーカーの遺伝子発現の変化
Means \pm SE ($n=4$)、Turkey's test、異符号間で有意差あり ($p<0.05$)。