九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

真皮線維芽細胞におけるオートファジーの加齢変化と真皮構造に及ぼす影響

南, 佳奈江

https://hdl.handle.net/2324/1485064

出版情報：九州大学, 2014, 博士（薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（4）

KYUSHU UNIVERSITY

真皮線維芽細胞におけるオートファジーの加齢変化と真皮構造に及ぼす影響

細胞生物薬学分野　3PS11023Y　南　佳奈江

【序論】

女性にとっての大きな悩みである皮膚の加齢変化のうち、“シワ”や“たるみ”などは真皮の構造変化に起因すると考えられている。真皮線維芽細胞は、真皮構造を支えているⅠ型コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸等のさまざまな細胞外マトリックス構成成分およびそれらの分解酵素を分泌することから、皮膚の加齢変化に関する研究は真皮線維芽細胞を用いて行われてきた。しかし、皮膚老化を引き起こす詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。

オートファジーはリソソームにおける自己構成成分の分解システムであり（図１）、栄養飢餓への適応、細胞内タンパク質やオルガネラの品質管理、発生、分化、細胞内侵入細菌の分解および抗原提示などの多彩な生命現象に寄与している (1)。また、オートファジーは、老化自体および老化関連疾患である神経変性疾患や癌との関係が示唆されている。しかし、皮膚、とりわけ真皮でのオートファジーの機能はほとんど知られておらず、皮膚老化との関係についても未知である。

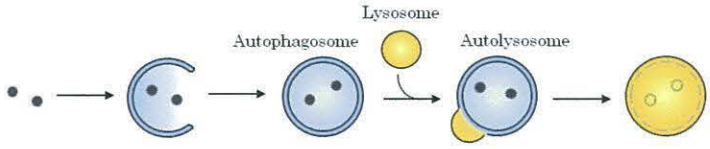

図 1. オートファジーのプロセス

隔離膜が形成されて伸長し、オートファゴソームが形成される。オートファゴソームはリソソームと融合することでオートリソソームになり、リソソーム内に含まれる酸性加水分解酵素によってオートファゴソーム内に取り込まれた生体高分子が分解される。

本研究では、皮膚の加齢変化メカニズムを解明するため、オートファジーに着目し、真皮線維芽細胞におけるオートファジーの加齢変化を解析するとともに、オートファジー変化が真皮成分に与える影響について検討した。さらに化粧品への応用を目指し、オートファジーを良化する植物抽出物の探索を行った。

【方法】

<u>加齢に伴うオートファジー変化の解析</u>

25、29、35、39、45、50、55 および 60 歳の白人女性腹部の皮膚組織を透過型電子顕微鏡にて観察し、オートファゴソーム／オートリソソーム（AVs; autophagic vacuoles）の数を比較した。また、若齢の白人女性腹部由来真皮線維芽細胞 2 種（ドナー年齢 23 歳および 27 歳、以降若齢細胞と記す）と高齢の白人女性腹部由来真皮線維芽細胞 2 種（ドナー年齢 68 歳および 70 歳、以降高齢細胞と記す）を用いて、免疫抗体染色によりオートファゴソームのマーカータンパク質である LC3 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、各細胞のオートファゴソーム膜結合型の LC3-II 量をウエスタンブロッティングにより定量解析した。

<u>オートファジー分解過程抑制による真皮構造への影響解析</u>

若齢細胞をLeu/Pep各100 μMを含む培地で24時間培養後、細胞および培地を回収した。回収した細胞からCOL1A1、ELN、およびMMP-1のmRNA発現量をRT-PCRにより定量し、また、培地に含まれるI型プロコラーゲン量、ヒアルロン酸量およびMMP-1活性を測定した。コラーゲン線維に対する影響は、コラーゲンゲル内で若齢細胞を培養し、Leu/Pep各100 μMを含む培地に交換して4日後に固定し、走査型電子顕微鏡で観察した。

オートファジーを良化する植物抽出物の探索

高齢細胞を各植物抽出物含有培地で24時間培養後、クロロキンを添加し、4時間後の細胞を回収した。ウエスタンブロッティングによりLC3-IIおよびβ-actinを検出し、クロロキン処理によるLC3-IIの増加の割合を算出した。

【結果】

加齢に伴うオートファジー変化の解析

25、29、35、39、45、50、55および60歳の皮膚組織中の真皮線維芽細胞1個あたりのAVs数は、それぞれ平均3.1、3.6、5.8、5、6.6、6.6、7.5および7.3個であり、年齢とともに増加する傾向を示した（図2）。

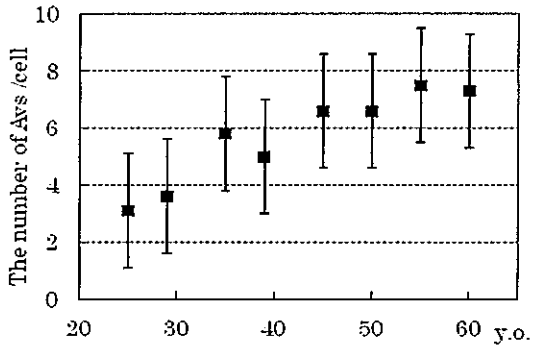

図2. 皮膚組織中の真皮線維芽細胞に含まれるAVs数の加齢変化

透過型電子顕微鏡観察により、各年齢ドナーの皮膚組織中の真皮線維芽細胞10個に含まれるAVs数をカウントした。横軸をドナー年齢、縦軸を細胞1個あたりのAVs数としてグラフ化した（平均±標準偏差、Spearmanの順位相関係数ρ=0.9461）。

培養真皮線維芽細胞の免疫抗体染色においては、高齢2細胞では若齢2細胞と比較し、LC3陽性の顆粒状シグナル数の増加が観察された。また、ウエスタンブロッティングによる解析でも、若齢2細胞に比べ、高齢2細胞でオートファゴソーム膜結合型のLC3-II量が増加することが判明した。これらの結果は、若齢2細胞と比較し、高齢2細胞でLC3-IIが局在するオートファゴソームが増加していることを示しており、皮膚組織の電子顕微鏡観察の結果と一致する。

オートファゴソーム数の増加は、オートファゴソーム形成が促進された場合とオートファゴソーム形成後の分解過程（すなわち、オートファゴソームとリソソームの融合以降のプロセス）が抑制された場合のいずれによっても引き起こされる。高齢の真皮線維芽細胞で認められたオートファゴソーム数の増加がどちらに起因するのかを明らかにするため、分解過程が抑制されている可能性についてクロロキンを用いて検討した。細胞をクロロキンで処理すると、オートファゴソームとリソソームの融合後の分解過程が抑制され、その結果、LC3-II量の増加が引き起こされる。

したがって、クロロキン処理によるLC3-II量の増加の程度が小さければ、その細胞では未処理の状態でも分解過程の活性が低いと考えられる。そこで、クロロキン存在下あるいは非存在下で培養した若齢2細胞および高齢2細胞においてLC3-II量をウエスタンブロット法で定量し、クロロキン処理によるLC3-II量の増加の割合（クロロキン処理細胞におけるLC3-II量／クロロキン未処理細胞におけるLC3-II量）を算出した。その結果、23歳細胞は1.9、27歳細胞は1.7、68歳細胞は1.4、70歳細胞は1.4であり、高齢2細胞それぞれの値と若齢2細胞のそれぞれの値の間に有意な差が検出された（図3）。これに対して、高齢2細胞および若齢2細胞間でオートファゴソーム形成に必要な因子の発現量に有意な差はなかったことから、高齢細胞でのオートファゴソームの増加は、オートファジーの分解過程の低下に起因することが示唆された。

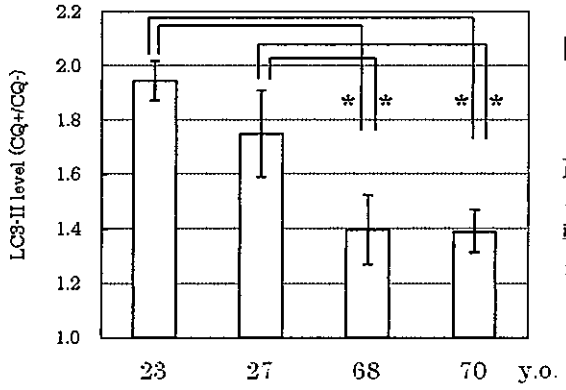

図3. 若齢および高齢細胞におけるクロロキンによるLC3-IIの増加の割合

クロロキン処理細胞のLC3-II定量値の未処理細胞のLC3-II定量値に対する比を算出し、クロロキン処理によるLC3-IIの増加の割合とした。横軸をドナー年齢、縦軸をクロロキン処理によるLC3-IIの増加の割合としてグラフ化した（平均±標準偏差）。

<u>オートファジー分解過程抑制による真皮構造への影響解析</u>

オートファジー分解過程の抑制が真皮構造に及ぼす影響を明らかにするため、真皮線維芽細胞によって産生される真皮構成成分の発現量をリソソームプロテアーゼ阻害剤（Leu/Pep）で処理した若齢細胞で解析した。その結果、Leu/Pep処理細胞において、α1プロコラーゲンおよびエラスチンのmRNA発現量が未処理細胞の約80%および約55%にそれぞれ減少した。これに対して、コラーゲン線維の断片化に関与することが示唆されているコラゲナーゼは、Leu/Pep処理細胞において、そのmRNA発現量が未処理細胞の約2倍に増加した。さらに、Leu/Pep処理24時間後の細胞培養液中に分泌されたI型プロコラーゲンおよびヒアルロン酸量を定量した結果、Leu/Pep処理細胞では未処理細胞の約65%および約40%にそれぞれ減少した。一方、Leu/Pep処理した細胞培養液中のコラゲナーゼの酵素活性は、未処理細胞の約1.3倍に増加した。

真皮の物性や構造を再現した実験モデルとして、コラーゲンゲル内で真皮線維芽細胞を培養する方法がある。コラーゲンゲル中でLeu/Pep処理細胞を培養し、4日間培養した後のコラーゲンゲルの線維状態を電子顕微鏡で観察したところ、コラーゲン線維に多数の切断箇所が認められた。

<u>オートファジーを良化する植物抽出物の探索</u>

高齢細胞のオートファジーの分解過程の抑制を改善する植物抽出物をスクリーニングした結果、ユキノシタ科アマチャ（*Hydrangea serrata var. thunbergii*）、イチョウ科イチョウ（*Ginkgo biloba*）、

シソ科コガネバナ（*Scutellaria baicalensis*）、フトモモ科テンニンカ（*Rhodomyrtus tomentosa*）、バラ科サクラ（*Prunus yedoensis*）の抽出物、およびラン科デンドロビウム、レリオカトレヤ、ブラッソカトレヤ（*Dendrobium HYBRID, Laeliocattleya Drumbeat, Brassocattleya Marcella Koss*）の混合抽出物に有意な改善効果が認められた。

【考察】

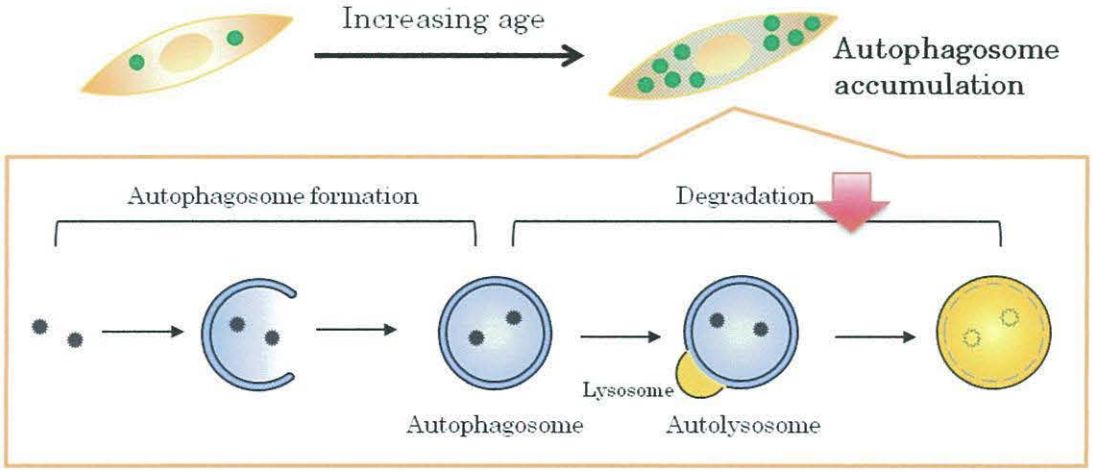

図 4. 真皮線維芽細胞における加齢に伴うオートファジーの機能低下

皮膚組織および培養真皮線維芽細胞を用いた検討から、加齢に伴いオートファゴソームが蓄積することが明らかになった。さらに、そのオートファゴソームの蓄積は、オートファジーの分解過程の抑制に起因することが示唆された（図 4）。

高齢皮膚線維芽細胞におけるオートファジーの分解過程の抑制は、真皮細胞外マトリックス構成成分の量的・質的変化を引き起こし、このような変化は、高齢の非露光部皮膚で報告されている変化と一致した(2)。したがって、加齢に伴うオートファジーの分解過程の抑制は、皮膚老化の進行に寄与している可能性が強く示唆された。また、高齢細胞のオートファジーの分解過程の抑制に対して改善効果が認められた 6 種の植物抽出物は、皮膚老化の予防・改善に役立つものと期待される。

【引用文献】

1. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., *et al.*, Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451 (2008) 1069-1075.
2. Fligiel, S.E., Varani, J., Datta, S.C., *et al.*, Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 120 (2003) 842-848.

【発表論文】

1. **Tashiro, K.**, Shishido, M., Fujimoto, K., Hirota, Y., Yo, K., Gomi, T., and Tanaka, Y. Age-related disruption of autophagy in dermal fibroblasts modulates extracellular matrix components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443 (2014) 167-172.