

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32202
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：20K17325
研究課題名（和文）体内リン貯留による皮膚老化の病態解明

研究課題名（英文）Skin aging and phosphate

研究代表者

神谷 浩二（Kamiya, Koji）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90790668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：老化モデルマウスのKlotho欠損マウスでは、組織学的に皮膚萎縮がみられた。コッサ染色では皮膚でのcalcioprotein particleの沈着はみられなかった。蛍光抗体法では、出生直後から表皮幹細胞で17型コラーゲンの発現が低下していた。また、真皮乳頭層で5型コラーゲンの発現が低下していた。定量的PCRでは、17型コラーゲンの分解、発現に關与するMMP9、ADAM9、ADAM10、TIMP1の発現が低下していた。さらに、HB-EGFの発現が低下していた。Klotho欠損マウスを3週齢で離乳後、6週齢まで低リン食で飼育した結果、表皮幹細胞での17型コラーゲンの発現が維持された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミネラル代謝異常などの内因性ストレスによる皮膚老化の病態は未解明で、これまで皮膚老化に対する有効な治療法はない。本研究では、老化モデルマウスを用いて、体内リン貯留による表皮幹細胞における17型コラーゲンの発現低下を確認した。また、体内リン貯留を抑えることで、表皮幹細胞における17型コラーゲンの発現が維持されることを確認した。ヒトの皮膚老化でも同様の病態が明らかになれば、新たな治療法の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：The klotho mouse shows multiple phenotypes resembling human aging caused by a defect in klotho gene expression. In the homozygous mutant klotho mice (KL-/-), epidermal and dermal atrophy and hair loss were observed by histopathological analysis. Calcioprotein particles were not detected in the skin by von Kossa staining. Immunofluorescence showed the decreased level of type 17 collagen in the epidermal stem cells and type 5 collagen in the papillary dermis. The relative mRNA expression of matrix metalloproteinase 9, a disintegrin and metalloproteinase 9 (ADAM9), ADAM10, and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 was decreased by quantitative PCR. The relative mRNA expression of epidermal growth factor receptor was not decreased, while that of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and transforming growth factor- β was decreased. Immunofluorescence showed that the expression level of type 17 collagen was maintained in KL-/- mice fed by low phosphate diet.

研究分野：皮膚老化

キーワード：皮膚老化 Klotho欠損マウス 17型コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長寿社会において、老化による皮膚障害、皮膚疾患は、生活の質を脅かす重大な問題である。皮膚の老化研究は、これまで紫外線や喫煙などによる外因性老化に着目して進められ、酸化ストレスによる真皮の老化の過程が明らかにされている。一方で、各臓器の老化による代謝異常などが誘因となる内因性老化については未解明で、現時点では有効な治療法がない。また、表皮細胞に関する研究も発展の余地が大きく、最近になり、表皮幹細胞での 17 型コラーゲンの発現低下による皮膚老化の病態が明らかになりつつある。

Klotho 遺伝子は、老化抑制遺伝子としてマウスで同定され、*Klotho* 欠損マウスは老化モデルマウスとして確立された。*Klotho* 欠損マウスは、生後 4 週齢には各臓器の老化症状をきたし、皮膚でも老化症状が確認される。*Klotho* タンパクは、リン利尿ホルモンの受容体 (fibroblast growth factor-23) として機能している。*Klotho* 欠損マウスの病態の本質は、リン排泄障害による体内リン貯留であり、高リン血症の改善によって老化症状が著明に改善する。ヒトでも、慢性腎不全患者では、皮膚の菲薄化、脆弱性、創傷治癒遅延、ドライスキンなどの皮膚老化症状が確認される。慢性腎不全患者はミネラル代謝異常を呈するが、腎臓からのリン排泄が低下することによって高リン血症をきたすため、体内リン貯留が皮膚老化につながっている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

Klotho 欠損マウスは、生後 3 週を過ぎた頃から各臓器における老化の表現型が明らかとなる。*Klotho* 欠損マウスの病態の本質はリン排泄障害によるリン貯留で、リン酸カルシウムを吸着する血清蛋白 fetuin-A との凝集体である calcioprotein particle (CPP) が血管石灰化や非感染性慢性炎症を引き起こす。これまでに *Klotho* 欠損マウスを用いた皮膚老化に関する研究報告はなく、*Klotho* 欠損マウスでの皮膚老化の病態は明らかでない。本研究では、*Klotho* 欠損マウスを用いて高リン血症による表皮幹細胞における 17 型コラーゲンの発現低下の過程を明らかにし、高リン血症の改善による 17 型コラーゲンへの影響と皮膚老化症状の改善の過程を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Klotho 欠損マウスは生後 3 週を過ぎた頃から老化の表現型が明らかとなり、平均寿命は約 60 日で、生後 100 日以内には全例が死亡してしまう。そのため、まず *Klotho* 欠損マウスの週齢毎の皮膚所見の変化を確認するために、4 週齢から 8 週齢までを観察期間とし、野生型と比較した。*Klotho* 欠損マウスを通常食で飼育し、経時的な皮膚所見の変化を組織学的に評価した。週齢によって、皮膚に CPP が沈着している可能性を考え、コッサ染色で調べた。皮膚における 17 型コラーゲンの経時的变化を、蛍光抗体法、定量的 PCR で評価した。

真皮幹細胞の維持に重要とされる 5 型コラーゲンについても同様に検討した。17 型コラーゲンの発現低下の過程を明らかにするため、17 型コラーゲンや 5 型コラーゲンの分解に関与する matrix metalloproteinase (MMP)、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)、a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) の発現を定量的 PCR で評価した。また、TIMP1 の発現に関与する epidermal growth factor receptor (EGFR) やそのリガンドの発現を定量的 PCR で評価した。*Klotho* 欠損マウスは、低リン食で飼育すると野生型と同様に成長し、老化の病態が著明に改善することがわかっている。リンの摂取を抑制することでの皮膚老化抑制効果を確認するために、3 週齢で離乳後、6 週齢まで低リン食で飼育し、皮膚における 17 型コラーゲンの経時的変化を、蛍光抗体法で評価した。

4 . 研究成果

最初に、*Klotho* 欠損マウスの皮膚組織を病理組織学的に検討した。*Klotho* 欠損マウスでは表皮、真皮の萎縮、毛包の退縮、脂肪織へのリンパ球を主体とした著明な炎症細胞浸潤、汗腺の萎縮などが組織学的な異常所見として確認された (図 1)。*Klotho* 欠損マウスでは、CPP が老化の病態に大きく関与しているが、コッサ染色では皮膚での CPP の沈着は確認されず、皮膚老化では異なる病態が考えられた。

次に、蛍光抗体法で表皮幹細胞における 17 型コラーゲンの発現を調べた。*Klotho* 欠損マウスでは、生直後から表皮基底層での 17 型コラーゲンの発現が低下していた (図 2)。一方で、定量的 PCR では、野生型と比較して *Klotho* 欠損マウスにおける 17 型コラーゲンの発現量に有意な差はみられなかった。*Klotho* 欠損マウスでは表皮幹細胞における 17 型コラーゲンの生成よりも局在に影響がみられる可能性が示唆された。

さらに、蛍光抗体法で真皮幹細胞における 5 型コラーゲンの発現を調べた。*Klotho* 欠損マウスでは、真皮乳頭層における 5 型コラーゲンの発現が低下していた (図 3)。定量的 PCR では、生直後の *Klotho* 欠損マウスにおける 5 型コラーゲンの発現量に有意な差はみられなかったが、6 週齢では発現量に有意な低下がみられた。

生直後では、野生型と *Klotho* 欠損マウスでは、MMP1、MMP2、MMP9、TIMP1、ADAM9、ADAM10 の発現に有意な差はみられなかった (図 4)。一方で、6 週齢では MMP1、MMP9、TIMP1、ADAM9、ADAM10 の発現は有意に低下していた。TIMP1 は EGFR が活性化すると発現し、17 型コラーゲンの安定化につながる。野生型と *Klotho* 欠損マウスにおける EGFR とそのリガンドの発現を定量的 PCR で比較したが、EGFR の発現に有意な差はみられず、EGF は検出されなかった。Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、transforming growth factor- (TGF-) は *Klotho* 欠損マウスで発現が低下していた (図 5)。

3 週齢で離乳後から 6 週齢まで低リン食で飼育し、蛍光抗体法で表皮幹細胞における 17 型コラーゲンの発現を調べた。*Klotho* 欠損マウスでは、表皮基底層での 17 型コラーゲンの発現が維持された (図 6)。

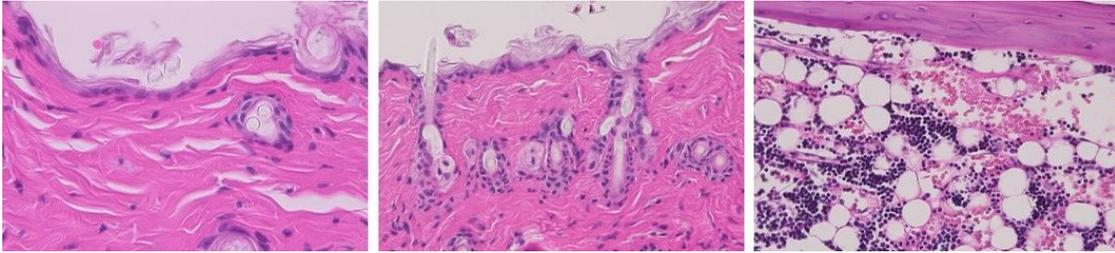


図 1 . *Klotho* 欠損マウスの病理組織学的所見

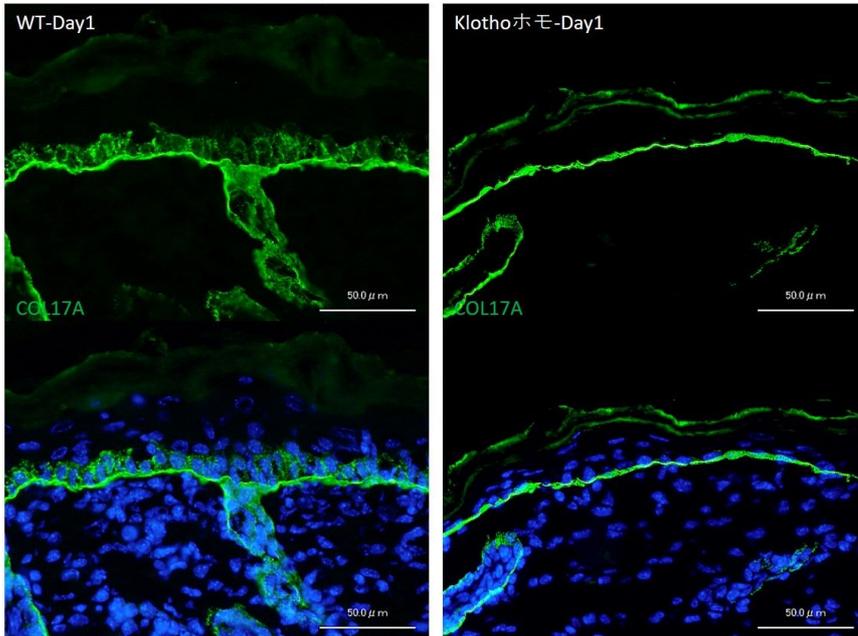


図 2 . *Klotho* 欠損マウスの 17 型コラーゲンの発現

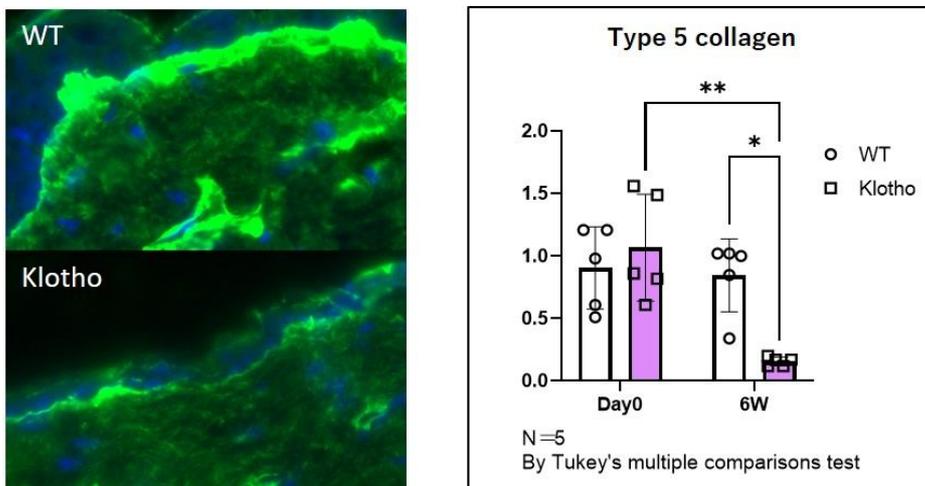


図 3 . *Klotho* 欠損マウスの 5 型コラーゲンの発現

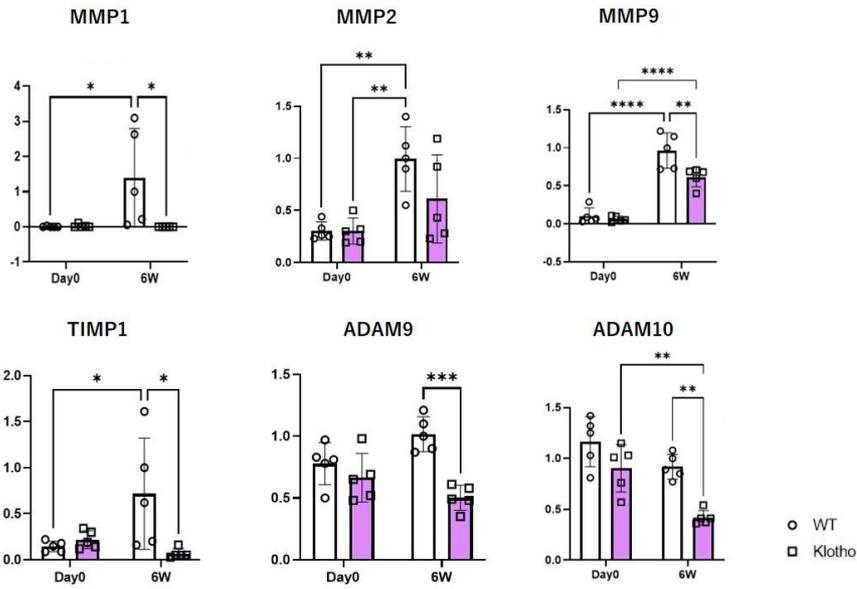


図 4 . *Klotho* 欠損マウスの MMP、TIMP、ADAM の発現

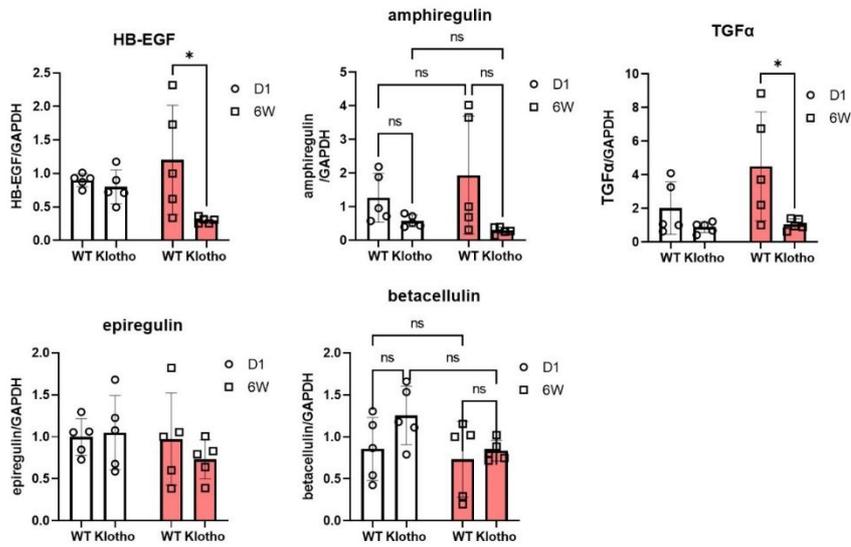


図 5 . *Klotho* 欠損マウスの EGFR リガンドの発現

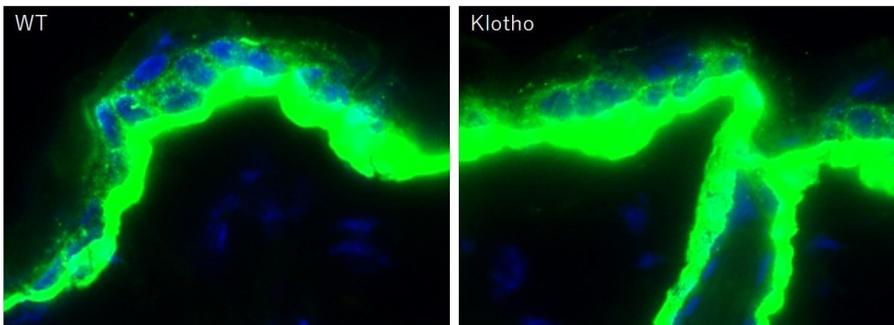


図 6 . 低リン食で飼育した *Klotho* 欠損マウスの 17 型コラーゲンの発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 3974
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22083974	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ansary TM, Kamiya K, Ohtsuki M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Keratinocyte stem cells: Role in aging.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IntechOpen.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5772/intechopen.102805	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ansary TM, Kamiya K., Kimura M., Hossain MR., Komine M., Ohtsuki M.
2. 発表標題 Induction of type 17 collagen decreases ultraviolet b-induced cellular senescence in human htert/ker-ct keratinocytes
3. 学会等名 Society for Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ansary TM, Kamiya K., Kimura M., Hossain MR., Komine M., Ohtsuki M.
2. 発表標題 The protective effects of Apocynin against ultraviolet B-induced cellular senescence in human keratinocytes
3. 学会等名 The European Society for Dermatological Research（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ansary TM, Kamiya K., Hossain MR., Komine M., Ohtsuki M.
2. 発表標題 The protective role of Apocynin on ultraviolet B-induced cellular senescence in human keratinocytes
3. 学会等名 Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ansary TM, Kamiya K., Kimura M., Hossain MR., Komine M., Ohtsuki M.
2. 発表標題 Induction of Type XVII collagen by Apocynin reduces cellular senescence both in-vitro and in-vivo.
3. 学会等名 加齢皮膚医学研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------