

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390326

研究課題名（和文） タバコの喫煙と皮膚老化・皮膚疾患-大規模分子疫学調査から
分子メカニズム解析まで研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms and large-scale epidemiological
study for tobacco smoke-related skin aging and diseases

研究代表者

森田 明理（MORITA AKIMICHI）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30264732

研究成果の概要（和文）：

大規模分子疫学的調査：人種差による環境因子（喫煙、紫外線、大気汚染）に対する皮膚老化の差違（ドイツ・デュッセルドルフ大学環境医学研究所との共同研究）-JAGE project（JAGE = Study of extrinsic skin ageing of Japanese and German women）の疫学調査をすすめ、解析をすすめた。ドイツ人では早期にしわができやすく、日本人ではしみができやすいこと、しみに関しては大気汚染との関連が統計上明らかとなった。また、喫煙としわの関係が明らかとなった。JAGE2 として、都市と郡部での皮膚老化に対する違いを検討する予定である。また、喫煙者の TH17 が末梢血中に多いことが明らかとなり、乾癬、掌蹠膿疱症で TH17 が末梢血中で上昇していることが明らかとなり、タバコ煙抽出液で Th17 が誘導されることが明らかとなった。さらに、タバコの煙には 3800 以上の成分があるともいわれ、水溶性以外に水不溶性の成分が含まれる。その中には、Aryl hydrocarbon receptor (AhR) のシグナル伝達経路を活性化するのが含まれていることが推定されている。タバコ煙抽出液の水不溶性成分と AhR の関係を分析するために、ヘキサンに溶解するタバコの煙抽出液（ヘキサン抽出液）を作成し、培養人繊維芽細胞を使用した。ヘキサン抽出液は、AhR のシグナル伝達経路であることを示すチトクローム P1B1 (CYP1B1) 発現を有意に上昇させ、また有意に MMP-1 発現誘導した。また、AhR ノックダウンした細胞では、タバコ煙抽出液の添加で、MMP-1 の上昇はなく、AhR 経路の活性化によって MMP-1 表現を誘導することを明らかとなった。このことは、タバコ煙が AhR 経路を活性化することを示しただけでなく、AhR 経路が、環境因子による皮膚老化に関与することを示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

The JAGE study (study of the extrinsic skin aging of Japanese and German women) is a cross-sectional study to investigate the possible reasons for differences in the manifestation of extrinsic skin aging between Asian and Caucasian European women. Japanese women had significantly more pigment spots on their cheeks than German women. In contrast, Japanese women had fewer wrinkles. The pigmentation was related to smoking and air pollution. Tobacco smoking increases the risk of psoriasis, but the mechanisms are not clear. We evaluated the percentage of circulating Th17. More smokers than nonsmokers had high Th17 levels. Tobacco smoke extract induced Th17 generation from central memory T cells in vitro. Epidemiologic studies suggest a link between smoking and extrinsic skin aging, and we previously reported that matrix metalloproteinases (MMPs) mediate connective tissue damage in skin exposed to tobacco smoke extracts. Tobacco smoke contains more than 3800 constituents, including numerous water insoluble

polycyclic aromatic hydrocarbons that trigger the aryl hydrocarbon receptor (AhR; also called the dioxin receptor) signaling pathway. To analyze the molecular mechanisms involved in tobacco smoke-induced skin aging, we exposed primary human fibroblasts and keratinocytes to tobacco smoke extracts. Hexane- and water-soluble tobacco extracts significantly induced MMP-1 mRNA in both human cultured fibroblasts and keratinocytes in a dose-dependent manner. To clarify the involvement of the AhR pathway, we used stable knockdown cell lines for AhR in HaCaT cells. AhR knockdown abolished the increase in transcription of the AhR-dependent gene CYP1A1/CYP1B1 and MMP-1 upon treatment with either tobacco smoke extract. Likewise, treating fibroblasts with AhR pathway inhibitors blocked the induction of CYP1B1 and MMP-1. These findings suggest that the tobacco smoke extracts induced MMP-1 expression in human fibroblasts and keratinocytes via activation of the AhR pathway. Thus, the AhR pathway may be pathogenetically involved in extrinsic skin aging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：環境因子、喫煙、紫外線、皮膚老化、乾癬、掌蹠膿疱症

1. 研究開始当初の背景

環境要因でしわの形成に関与する因子として、紫外線が重要な因子であるが、喫煙も重要な環境因子であることが近年注目されている。タバコの喫煙と皮膚の老化に関与することは、1971年にDaniellによる大規模の疫学的調査の結果報告された。1991年Kadunceらの疫学的調査では、喫煙が、年齢・性別・日光暴露時間などの他の因子とは別に皮膚の老化に関与する因子であることが示された。私たちの研究室でも、本邦における喫煙と皮膚の老化、つまりしわ形成と関与するかを再度調査し、さらに正常人培養線維芽細胞を用いることで喫煙による皮膚老化の機序に関して解析を進めてきた。この機序の解析に関しては世界でも最も早くから研究を始め成果を発表した研究グループである(*Arch Dermatol Res*, 2000)。現在までに、本論文が広く引用(Scopus 引用回数：55)されるとともに、海外の雑誌、メディア(BBC, ABCなど)で広く紹介され、欧文原著論文、邦文・欧文著書、

総説を含め20報以上掲載した。

2. 研究の目的

タバコの喫煙と皮膚老化・皮膚疾患の関係性を明らかにするため、大規模分子疫学調査から分子メカニズム解析を予定する。そのため、(1)大規模分子疫学的調査：人種差による環境因子(喫煙、紫外線、大気汚染)に対する皮膚老化の差違(ドイツ環境医学研究所との共同研究)、(2)タバコ煙のヘキサン脂溶性分画-Aryl hydrocarbon receptor(AhR)を介した細胞応答、(3)タバコ煙が免疫系におよぼす影響-AhRによるTH17細胞誘導、(4)喫煙者、掌蹠膿疱症・乾癬・アトピー性皮膚炎患者における末梢血TH17細胞の解析を予定とした。本研究内容は、本邦のみならず国外でも検討されていない非常に特色のある皮膚老化・皮膚疾患に焦点をあてた研究を目的とした。

3. 研究の方法

人種間の差違を調べることで、人での Forward Genetics 的な方法を用いた解析である。遺伝的な感受性をよりよく理解する為に単一ヌクレオチド多型 (SNPs) とミトコンドリア DNA の common deletion に焦点を当てながら遺伝子的な相違の検討を行った。さらに、酸化ストレスと環境要因もあわせて検討を行った。末梢血白血球から DNA の抽出を行い、多種の遺伝子の SNPs を解析するため、ハイスループット・高精度となる方法 (たとえば、Invader 法を用いた (ドイツ・ミュンヘン大学との共同研究))。

ミトコンドリア DNA common deletion を解析するために、露光部 (うなじ部分) と非露光部 (臀部) の皮膚を 2-3 ミリ径で採取を行い、DNA 抽出を行った。解析は、nested PCR および real-time PCR を用いた解析を行った。血漿中の抗酸化能の総計量 (TAS) を調べた。喫煙、紫外線やディーゼルパーティクルなどの環境因子、食事、スキンケアを含む詳細な質問書を用いる (この質問表に关しては、20 ページにおよぶもので、日、独、英の三カ国語で各々対訳され、validation が終了している)。

毎日測定された州環境庁のデータ (ドイツ側)、定期的に測定された大気汚染データ (日本側) から、被験者の住所から近傍のデータを得ることで、NOx、ディーゼルパーティクルなどの大気汚染のデータを解析に加えた。非侵襲的な皮膚老化スコアによって顔と体の上部、腕を視覚的に調べた。シミに関してはロゴスキンアナライザー (Inforward, Tokyo, Japan) というしみの数や部分を計算する特別なソフトを用いて斜め 45 度の写真を撮り、デジタル皮膚解析を行った。

以上の結果から、両人種の皮膚老化のプロセス、光老化のバイオマーカーであるミトコンドリア DNA の違いから、環境因子、遺伝子背景、抗酸化能の何が重要であるか、まだ部分的であるが、明らかにした。なお、本プロジェクトはすでに、名古屋市立大学ヒト遺伝子解析研究倫理審査委員会で承認されたものである (平成 20 年 2 月 12 日承認、承認番号 69 号)。

4. 研究成果

大規模分子疫学的調査：人種差による環境因子 (喫煙、紫外線、大気汚染) に対する皮膚老化の差違 (ドイツデュッセルドルフ大学環境医学研究所との共同研究) -JAGE project (JAGE = Study of extrinsic skin ageing of Japanese and German women) の疫学調査をすすめて、解析をすすめた。ドイツ人では早期にしわができやすく、日本人ではしみができやすいこと、しみに関しては大気汚染との関連が統計上明らかとなった。また、

以前の疫学調査と同じように、喫煙としわの関係が明らかとなった。

これまでの研究では水溶性タバコの煙抽出物を使用した。タバコの煙には 3800 以上の成分があるともいわれ、水溶性以外に水不溶性の成分が含まれる。その中には、Aryl hydrocarbon receptor (AhR) のシグナル伝達経路を活性化しているものが含まれていることが推定されている。タバコ煙抽出液の水不溶性成分と AhR の関係を分析するために、ヘキサソールに溶解するタバコの煙抽出液 (ヘキサソール抽出液) を作成し、培養人繊維芽細胞を使用した。ヘキサソール抽出液は、AhR のシグナル伝達経路であること示すチトクローム P1B1 (CYP1B1) 発現の有意の上昇させ、また有意に MMP-1 発現誘導した。また、CYP1B1 と MMP-1 誘導は、AhR のアンタゴニストである 3-メトキシ-4-ニトロ・フラボンと α -ナフトフラボンで有意に抑制された。また、AhR ノックダウンした細胞では、タバコ煙抽出液の添加で、MMP-1 の上昇はなく、AhR 経路の活性化によって MMP-1 表現を誘導することが明らかとなった。すなわち、ヘキサソール抽出液によって、AhR 経路の活性化によって MMP-1 表現を誘導することを明らかとした。このことは、タバコ煙が AhR 経路を活性化することを示しただけでなく、AhR 経路が、環境因子による皮膚老化に關与することを示唆するものである。

露光部 (うなじ部分) と非露光部 (臀部) の皮膚を 2-3 ミリ径で採取を行った。ドイツの女性は、頸部皮膚で、日本人より CD 量が高い結果であった。また、50 歳以上ではさらに高い CD 量を示した。腰部皮膚に関して、両集団の CD 量は、非常に類似していた。このことから、日本人に比べ、ドイツ人の皮膚では、明らかに環境曝露、紫外線曝露が多いことが明らかとなり、紫外線曝露に関する行動と一致した。日本人では、CD 量と眼周囲および上嘴唇のシワが關連することが明らかとなった。ドイツ人では、ほうれい線やたるみとの關連がある一方、色素沈着とは陰性の關係であった。また、大気汚染とシミ (頬のシミ) の關連から、*SLC45A2*(rs26722) が重要であることが明らかとなった。さらに、日本人の方が血漿中カロテノイドレベルが高いこともあきらかになった。

喫煙者の TH17 が末梢血中に多く、乾癬、掌蹠膿疱症で TH17 が末梢血中で上昇していることが明らかとなり、タバコ煙抽出液で Th17 が誘導されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Natsumi Kaneko, Andrea Vierkoetter, Ursula Kraemer, Dany Perner, Dorothea Sugiri, Mary Matsui, Ai Yamamoto, Jean Krutmann and Akimichi Morita: Mitochondrial Common Deletion mutation in skin of German and Japanese women and extrinsic skin aging, *Exp Dermatol* 21 (Supple 1), 2012, 26-30
2. Yoko Sagawa^{1,2}, Mitsuru Futakuchi², Jiegou Xu^{2, 3}, Katsumi Fukamachi², Yuto Sakai^{2, 4}, Yoshiaki Ikarashi⁵, Tetsuji Nishimura⁵, Masumi Suzui², Hiroyuki Tsuda³, and Akimichi Morita^{1,6}: Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice. *J Toxicological Science* 37:2012, 317-327
3. Vierkötter A, Krämer U, Sugiri D, Morita A, Yamamoto A, Kaneko N, Matsui M, Krutmann J: Development of lentigines in German and Japanese women correlates with variants in the SLC45A2 gene, *J Invest Dermatol* 132: 2012, 733-736
4. J Xu, Y Sagawa, M Futakuchi, K Fukamachi, DB Alexander, F Furukawa, Y Ikarashi, T Uchino, T Nishimura, A Morita, M Suzui, H Tsuda: Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats, *Food and Chemical Toxicology* 49: 2011, 1298-1302
5. Kan Torii, Takuya Furuhashi, Chiyo Saito, Hiroshi Kato, Akiko Nishioka, Emi Nishida, Yoichi Shintani, and Akimichi Morita: Increased peripheral Th17 in patients with palmoplantar pustulosis, *Arch Dermatol Res* 303: 2011, 441-444
6. Dany Perner, Andrea Vierkötter, Dorothea Sugiri, Mary Matsui, Ulrich Ranft, Charlotte Esser, Stephane Ethève, Regina Goralczyk, Natsumi Kaneko, Ai Yamamoto, Akimichi Morita, Ursula Krämer and Jean Krutmann: Association between sun-exposure, smoking behaviour and plasma antioxidant levels with the different manifestation of skin ageing signs between Japanese and German women - a pilot study, *J Dermatol Sci*, 62:2011, 138-140
7. Kan Torii, Chiyo Saito, Takuya Furuhashi, Akiko Nishioka, Yoichi Shintani, Kana Kawashima, Hiroshi Kato, and Akimichi Morita: Tobacco smoke is related to Th17 generation with clinical implications for psoriasis patients, *Exp Dermatol* 20:2011, 371-373
8. Reiko Noborio and Akimichi Morita: Preferential induction of endothelin-1 in human epidermal equivalent model by narrow-band UVB light sources, *Photoderm Photoimmunol Photomedicin*, 26, 2010, 159-161
9. Seika Mitsui, Kan Torii, Hajime Fukui, Kunio Tsujimura, Akira Maeda, Mitsuhiro Nose, Akito Nagatsu, Hajime Mizukami, Akimichi Morita: The herbal medicine compound falcariindiol from *Notopterygii Rhizoma* suppresses dendritic cell maturation. *J Pharm Exp Therap*, 333, 2010, 954-960
10. Yuan-Hsin Lo, Kan Torii, Chiyo Saito, Takuya Furuhashi, Akira Maeda and Akimichi Morita: Serum IL-22 correlates with psoriatic severity and serum IL-6 correlates with susceptibility to phototherapy. *J Dermatol Sci*, 58, 2010, 225-227
11. Kan Torii, Chiyo Saito, Takuya Furuhashi, Akiko Nishioka, Yoichi Shintani, Kana Kawashima, Hiroshi Kato, and Akimichi Morita: Tobacco smoke is related to Th17 generation with clinical implications for psoriasis patients. *Exp Dermatol*, 20, 2010, 371-373
12. Yuji Yamaguchi¹, Vincent J. Hearing², Akira Maeda¹, Akimichi Morita: NQO1 as an enzyme that increases melanin synthesis. *J Invest Dermatol*, (commentary), 130, 2010, 645-647
13. Reiko Noborio, Emi Nishida, Akimichi Morita: Efficacy and advantage of low-energy double pass 1450nm diode laser treatments for acne in Asian patients. *Photoderm Photoimmunol Photomedicin*, 25, 2009, 3-7
14. Keiko Kobayashi, Yoko Yasuda, Yoichi Shintani, Taku Sumitomo, Takashi Saga, Makoto Kimura, Aya Yamamoto, Toshio Mori, Akira Maeda, Yuji Yamaguchi, Akimichi Morita: The development of a filter to enhance the efficacy and safety of excimer

light (308 nm) therapy. Photoderm Photoimmunol Photomedicin, 25, 2009, 30-36

15. Akimichi Morita, Yoichi Shintani, Emi Nishida, Hiroshi Kato, Hisashi Yoshida, Maki Minamoto, Yuji Yamaguchi, and Akira Maeda; Development of a hand-held apparatus to measure minimal erythema dose for narrow-band UVB using a new flat-type fluorescent lamp. Photoderm Photoimmunol Photomedicin, 25, 2009, 41-44

16. Isao Ishida, Yuji Yamaguchi, Atsushi Tanemura, Ko Hosokawa, Satoshi Itami, Akimichi Morita, Ichiro Katayama; Stage III melanoma treated with chemotherapy after surgery during the second trimester of pregnancy. Arch Dermatol, 145, 2009, 346-348

17. Chiyo Saito, Akira Maeda, Akimichi Morita; Bath-PUVA therapy induces circulating regulatory T cells in patients with psoriasis. J Dermatol Sci, 53, 2009, 231-233

18. Reiko Noborio, Mariko Kurokawa, Keiko Kobayashi, Akimichi Morita; An evaluation of the clinical and immunohistological efficacy of 585nm pulsed laser in the treatment of psoriasis. J Eur Acad Dermatol Venereol, 23, 2009, 420-424

19. Yuji Takahashi, Yuji Yamaguchi, Koichi Itoh, Shigetoshi Sano, Akimichi Morita, Ichiro Katayama; Intractable wounds caused by pyoderma gangrenosum in a patient with critical limb ischemia treated with cyclosporine and adjuvant sympathectomy. Dermatol Surg, 32, 2009, 699-703

20. Kan Torii, Akira Maeda, Chiyo Saito, Takuya Furuhashi, Yoichi Shintani, Yuji Shirakata, Akimichi Morita; UVB wavelength dependency of antimicrobial peptide induction for innate immunity in normal human keratinocytes. JDS, 56, 2009, 214-215

21. Yukari Nishimura, Yuji Yamaguchi, Kenichiro Hamada, Yasuhiko Tomita Akimichi Morita, Ichiro Katayama; Epithelioid sarcoma on the foot masquerading as an intractable wound for 24 years, in submission (27112008). J Exp Clin Dermatol, 35, 2009, 263-268

22. Yuji Yamaguchi, Akimichi Morita, Akira Maeda, Vincent J. Hearing; Regulation of skin pigmentation and thickness by dickkopf 1 (DKK1). J Invest Proc Symp, 14, 2009, 73-75

23. Akimichi Morita, Kan Torii, Akira Maeda, Yuji Yamaguchi; Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. J Invest Proc Symp, 14, 2009, 53-55

[学会発表] (計 12 件)

1. Akimichi Morita; Recent Advances in Skin aging, 22nd World Congress of Dermatology, 27th May, 2011, Seoul

2. Akimichi Morita; Daily photoprotection in the prevention of pigmentaiton disorders of Asian skin. 22nd World Congress of Dermatology, 26th May, 2011, Seoul.

3. Akimichi Morita; Role of aryl hydrocarbon receptors (AhR) in tobacco smoke extract induced-matrix metalloproteinase (MMP)-1 expression, Ancillary meeting of the 22nd World Congress of Dermatology, 24th May, 2011, Seoul.

4. Yuko Ono, Kan Torii, Ellen Fritsche, Emi Nishida, Yoichi Shintani, Yuji Shirakata, Josef Abel, Jean Krutmann, Akimichi Morita; Role of aryl hydrocarbon receptors (AhR) in tobacco smoke extract induced-matrix metalloproteinase (MMP)-1 expression. 日本研究皮膚科学会 第35回年次学術大会・総会, 2010年12月2日-4日, 和歌山 (和歌山県民文化会館)

5. Akimichi Morita; Daily photoprotection in the prevention of photoaging of Asina skin. 36th Annual Meeting of the Taiwanese Dermatological Association, 2010年11月20日-21日, 台湾 (台北医院国際会館中心)

6. 森田明理; 皮膚と紫外線—良いところと悪いところ—. 第31回日本レーザー医学会総会, 2010年11月13-14日、名古屋 (ウインクあいち)

7. Yuko Ono, Kan Torii, Ellen Fritsche, Emi Nishida, Yoichi Shintani, Yuji Shirakata, Josef Abel, Jean Krutmann, Akimichi Morita; Role of aryl hydrocarbon receptors (AhR) in tobacco smoke extract

induced-matrix metalloproteinase (MMP)-1 expression. 40th Annual European Society for Dermatological Research, 2010年9月8日-11日, フィンランド (スカンディックマリーナコンgresセンター)

8. Jean Krutmann, Andrea Vierkötter, Ulrich Ranft, Dorothee Sugiri, Mary Matsui, Regina Goralczyk, Natsumi Kaneko, Akimichi Morita; Ursula Kroemer: Nutritional Antioxidants and Extrinsic Skin Aging In Japanese and German Women. Society for Investigative Dermatology 70th Annual Meeting, 2010年5月5日-8日, US Atlanta (Hilton Atlanta)

9. Kan Torii, Chiyo Saito, Takuya Furuhashi, Akiko Nishioka, Yoichi Shintani, and Akimichi Morita; Clinical and experimental evidence that psoriasis is exacerbated by tobacco smoke via an enhanced generation of Th17 cells. 2010 Society for Investigative Dermatology Annual meeting, 2010年5月5日-8日, US Atlanta (Hilton Atlanta)

10. Akimichi Morita, Vierkötter, A. Krämer, U. Ranft, U. Sugiri, D. Momna, T. Kaneko, N. Yamamoto, A. Matusi, M. Krutmann, J.; Ethnic differences in skin ageing between Japanese versus Caucasian women: The JAGE study. 15th International Congress of Photobiology, June 18-23, 2009, Dusseldorf, Germany

11. A. Vierkötter, T. Schikowski, U. Ranft, D. Sugiri, M. Matsui, A. Morita, U. Krämer, J. Krutmann; Exposure to particle pollution is associated with skin aging in elderly women, 2009 Annual meeting of Society for Investigative Dermatology, May 6-9, 2009, Montreal, Canada

12. 森田明理, 活性酸素・UVAの働きから光老化のメカニズムをわかりやすく考える。日本皮膚科学会総会, 平成 21 年 4 月 24-25 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡市)

[図書] (計 6 件)

1. Akimichi Morita; Ultraviolet A and UV B Phototherapy, in Therapy of skin diseases. Springer, 5, pp87-91, 2010. 査読有

2. Jean Krutmann, Akimichi Morita, Craig A. Elmet; Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic methods (2nd ed),

(J. Krutmann, H. Hönigsmann, P.R. Bergstresser, C.A. Elmet, eds.). Springer, New York, pp16, 2009. 査読有

3. Jean Krutmann, Helger Stege, Akimichi Morita; Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic methods (2nd ed), (J. Krutmann, H. Hönigsmann, P.R. Bergstresser, C.A. Elmet, eds.). Springer, New York, pp16, 2009. 査読有

4. Jean Krutmann, Akimichi Morita; Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic methods (2nd ed), (J. Krutmann, H. Hönigsmann, P.R. Bergstresser, C.A. Elmet, eds.). Springer, New York, pp16, 2009. 査読有

5. Akimichi Morita; Therapy of skin diseases, (Krieg T, Bickers DR, Miyachi Y eds). Springer, New York, pp5, 2009

6. Akimichi Morita; Textbook of Aging skin. Springer, New York, pp1, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 明理 (MORITA AKIMICHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30264732

(2) 研究分担者

前田 晃 (MAEDA AKIRA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 00319708

(3) 連携研究者 該当者なし