

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659527

研究課題名(和文)皮膚表皮老化メカニズムの新概念 phosphate toxicity の解明

研究課題名(英文) Impact of phosphate toxicity on skin aging

研究代表者

小川 靖(Ogawa, Yasushi)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10567754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：高リン血症を伴う慢性腎不全などの疾患では表皮の老化様変化が認められる。本研究では、高リン血症が表皮ケラチノサイトに老化様変化を引き起こす可能性を検討した。成人皮膚ケラチノサイトを様々なリン濃度で培養した結果、4 mMの濃度において、最も長く増殖を続けることが判明した。至適濃度以外では細胞分裂回数が低下し、表皮分化マーカーの発現が亢進した。しかし、老化関連分泌タンパクの発現上昇は認めなかった。本研究により、過剰な高リン濃度はケラチノサイトへの分化ストレスとなり、早期の細胞老化をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hyperphosphatemia is caused by several diseases including chronic renal failure, and is often accompanied by skin manifestations that mimic aging. The "phosphate toxicity" hypothesis suggests that hyperphosphatemia induce aging like symptoms of the body, however, the direct consequence of the high phosphate condition on keratinocytes was not well studied.

In this study we verified that normal human epidermal keratinocytes (NHEK) are driven into early cellular senescence if cultured under non-optimum phosphate condition. NHEK showed highest population doubling levels (PDL) when cultured in 4 mM phosphate and the concentration lower or higher than this level resulted in decreased PDL. The decrease in PDL was accompanied by increased expression of keratinocyte differentiation markers. No increase in senescence associated secreted proteins was observed. It may be suggested that high phosphate condition may drive NHEK to differentiated state leading to accelerated aging-like phenotype.

研究分野：医歯薬学

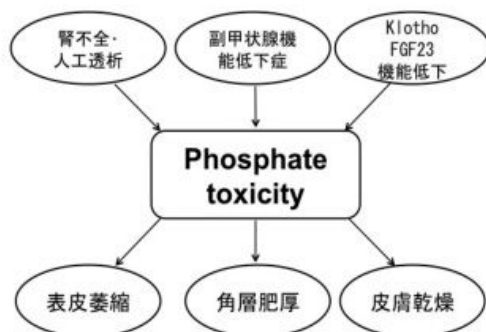
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ケラチノサイト 老化 リン代謝

1. 研究開始当初の背景

表皮の老化は、高齢者のQOLを脅かす大きな問題であり、65歳以上の人口の実に80%で著しい乾燥症状が生じ、強い掻痒を伴う。皮膚の早期老化を来す疾患は、様々なものが挙げられるが、表皮の乾燥症状をよく模倣する疾患として、慢性腎不全に伴う皮膚変化が挙げられる。慢性腎不全、及び人工透析中の患者では、91%に皮膚の乾燥症状が認められ、その皮膚では、角質の構築の異常、水分保持機能の異常について、皮膚老化に非常に近い変化が起きる事が知られている。このような変化の発症因子や細胞生物学的な発症機序はよく知られていない。

単一遺伝子異常による老化モデルである *klotho* マウスにおいて、老化を模した表皮の萎縮と角層の肥厚が生じることが知られている。この老化様病態の本体はカルシウム、リン、ビタミンDの代謝異常にある事が知られていた。最新の研究で、この *klotho* マウスの老化様症状の発現が血中のリンの濃度のみ依存すること、カルシウム、ビタミンDが高値を示しても、高リン酸血症が補正されるだけで、表皮及び角質の構造が正常化する事が示された。このような背景から、「phosphate toxicity」による老化促進メカニズムの存在が示唆されつつある。(図1)



Phosphate toxicity とは、高リン酸血症により全身の各種器官にもたらされると考えられる、病理学的に加齢現象に類似した組

図1 Phosphate Toxicity の概念図

織変化をさす概念である。実際に老化様皮膚変化をきたす慢性腎不全患者及び人工透析中の患者においても、血中のカルシウム、リンが高値を示す。また、抗リン酸血症を生じる代表的な疾患である、副甲状腺機能低下症においても、皮膚の乾燥、角化の亢進が特徴的な症状として知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は慢性腎不全患者における老化様皮膚の形成機構を、全身のリン代謝、臓器間のクロストーク異常による皮膚老化

という新たな観点から解明する事であった。老化に伴う表皮ケラチノサイト(KC)の機能異常について、高齢者の皮膚に特徴的なこれら症状をきたす分子メカニズムを、慢性腎不全および人工透析患者皮膚との比較という新たな観点から解明する事を目的とした。本研究ではこの phosphate toxicity の概念を基盤として、腎不全患者の臨床像に則した表皮ケラチノサイトの新しい老化モデルを樹立しすることを試みた。

皮膚の老化の研究は、これまで特に真皮の光老化、酸化ストレス、喫煙などのテーマで進められてきており、表皮細胞についての研究は未だ発展の余地が大きい。本研究によって、表皮における全く新しい老化メカニズム「phosphate toxicity」を確立し、研究領域自体の萌芽をもたらすことと、包括的な老化現象の理解をもたらす事を目的とした。

3. 研究の方法

Phosphate toxicity が皮膚表皮細胞に及ぼす影響を解析するため、*ex vivo* から *in vivo* までの3つの異なる実験系において、系統的に高リン環境の影響を検討した。具体的には、ヒトケラチノサイト初代培養細胞における実験系において様々なリン濃度での培養下における変化を検討した。

形態変化、老化関連 ガラクトシダーゼ活性、分裂回数その他、表皮老化様フェノタイプの発現機序として、senescence associated secretory phenotype (SASP) 関連サイトカインとして、GM-CSF、IL6、IL8、MMP3、ICAM1、GROα の測定を行った。また、ケラチノサイトの分化傾向を調べる為、ケラチノサイト分化マーカーである、ロリクリン、インポルクリン、ABCA12 の mRNA の発現を測定した。

ヒトケラチノサイト初代培養細胞の三次元培養による organotypic culture における実験系において、異なるリン濃度の影響の検討を試みた。

また、マウス生体における実験系、において B6 マウスを通常食、及び高リン酸食により飼育して高リン血症マウスの作成を試みた。

4. 研究成果

最初に、高リン環境が表皮ケラチノサイトに与える影響を検討する為、高齢者の正常ヒト表皮ケラチノサイトを用いた実験を行った。

通常の培地は約 2mM のリン濃度であるが、これを 15mM に増加させると、ケラチノサイトは直ちに分裂を停止し、大型の細胞質をもつ、扁平な形態を示した。(図2)

細胞老化のマーカーである SA-beta gal 活性を発現している事を確認した。これにより、急性の超高リン環境下による細胞ストレスではケラチノサイトが細胞老化を起こす事

が確認された。この反応は正常ヒトケラチノサイトでは認められたが、不死化した子宮頸癌由来細胞である HeLa 細胞では認められなかった。

リン濃度を 2mM、4mM、6mM、10mM の各濃度で培養した。(図 3)

全ての濃度で、細胞分裂は 2 ヶ月以内に停止

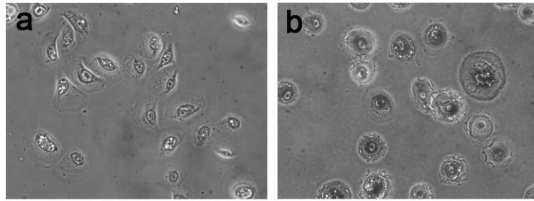


図 2 超高リン濃度培地における成人皮膚初代培養ケラチノサイトの形態変化
a 標準的培地(リン濃度 2 mM)、b 超高リン濃度(15 mM)

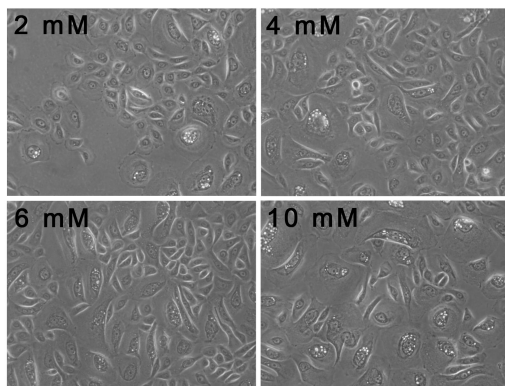


図 3 各種リン濃度の培養下における成人皮膚初代培養ケラチノサイト変化
それぞれのリン濃度で 1 ヶ月間培養した際の像を示す

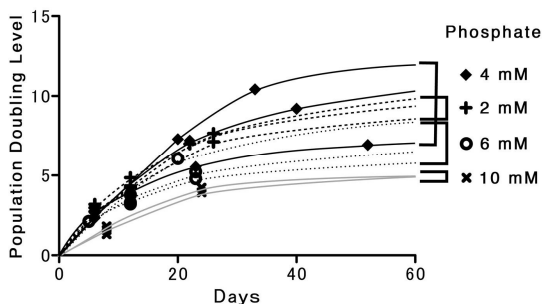


図 4 各種リン濃度で培養した成人皮膚初代培養ケラチノサイトの累計分裂回数
それぞれのリン濃度で培養し、増殖が停止するまで PDL を検討した。
(2 mM; n=3, 4 mM; n=3, 6 mM; n=3, 10 mM; n=2)

し、SA-gal 活性を発現して細胞老化に至ったが、population doubling time は 4mM で最も高く、次に 2mM、6mM と低下し、10mM では最低であった。(図 4)

これにより、ヒト表皮ケラチノサイトは至適リン濃度以外では早期に細胞老化を起こす事が確認された。この現象を説明する分子的機序として、高リン環境によって老化関連分泌蛋白質の発現亢進等で特徴づけられる細胞老化が起きている可能性と、ケラチノサイトの終末分化への促進が起きている可能性が考えられた為、それぞれについて検討した。老化関連分泌蛋白質として、細胞老化時に発現が亢進することが知られている、GMCSF、IL6、IL8、MMP3、ICAM1、GROalpha について、培地中の濃度を測定したが、一定の傾向は認められなかった。(図 5)

一方で、各種の表皮分化マーカーであるインボルクリンとロリクリンについて、その発現を定量 PCR で検討したところ、4 mM のリン濃度下で培養した細胞において最低であった。また、同じく分化マーカーである ABCA12 についても同様の傾向を示した。(図 6)

このように、細胞外リン濃度が、表皮角化細胞の分化を誘導する事で、老化様フェノタイプを形成するという、新しい皮膚老化概念を示す結果が得られたされたことが本研究の成果である。

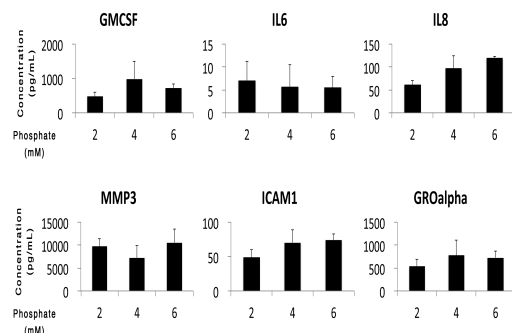


図 5 各種リン濃度で培養した成人皮膚初代培養ケラチノサイトにおける老化関連分泌蛋白質の測定

それぞれのリン濃度で細胞を 24 時間培養し、培地中の各種蛋白質濃度を測定した。

(GMCSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor, IL6; interleukin 6, IL8; interleukin 8, MMP3; matrix metalloproteinase 3, ICAM1; intercellular adhesion molecule 1, GROalpha; melanoma growth stimulating activity alpha)

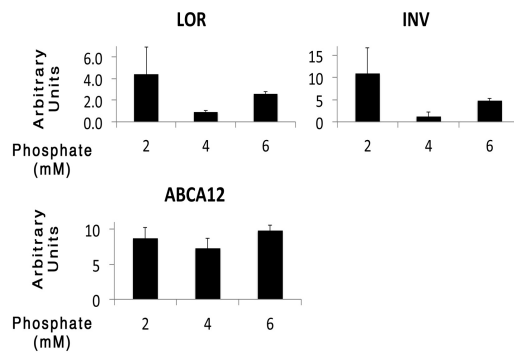


図6 各種リン濃度で培養した成人皮膚初代培養ケラチノサイトにおける表皮分化マーカーの発現
それぞれのリン濃度で細胞を24時間培養し、定量PCRによりmRNA発現量を測定した。
(LOR;ロリクリン, INV; インポルクリン, ABCA12; ATP-binding cassette subfamily A member 12)

(2) 一方で、3次元表皮組織モデルについては、ケラチノサイトの老化に伴う技術的困難の為、再現性のある結果を得ることができ無かったことが、今後の課題となった。また、皮膚表皮老化モデルマウスについては、研究期間内において表皮の老化様フェノタイプを再現性をもって確認することができなかつた。これは高リン食のみで血中リン濃度が十分に上昇しない為と考えられた。このため、マウス年齢の選択、腎損傷の導入による腎不全マウスモデルの併用、更なる長期計画下における実験の施行などが、今後の課題とされた。

(3) 本研究より、新たに興味深い研究課題が抽出された。成人の正常な血中リン濃度は0.81~1.45 mM (2.5~4.5mg/dL)、乳幼児では1.6~2.4 mM (4.8-7.4 mg/dl)程度といわれている。従って、4 mMは血中の濃度としては高リン血症にあたる。従って、本研究の立脚点となった、慢性腎不全における高リン血症による皮膚老化の発症、という仮説を直ちには支持しないようにも考えられる。一方で、ケラチノサイトにおけるリンの細胞内トランスポートがどのように制御されているについては、未だ不明な点が多い。リンの生体に対する影響はカルシウム濃度等の他の因子によっても左右される。また、近年ではリンの毒性が、fetuin-Aとカルシウムとともに形成するcalciprotein particles (CPPs)により発生するという説も有力である。このため、生体と違う培養環境では、至適なリン濃度が異なる

っている可能性も考えられた。培地中のリン濃度によりケラチノサイトの分化マーカーの発現が変化しする一方で、老化関連分泌蛋白質の発現に一定した傾向が認められなかったことから、過剰な高リン環境がケラチノサイトに分化ストレスをもたらし、終末分化を促進することで、結果的に細胞集団内での細胞老化を促進する可能性が示唆された。ウシ大動脈血管内皮細胞を用いた研究では、高リン環境がPKCの活性を亢進すること、活性酸素の産生を亢進し、また、高リン環境が内皮機能を低下させることが報告されている。ケラチノサイトについても、同様の機構により分化が促進する可能性も考えられるが、今回の研究では調べられなかった。この点については今後の課題であり、実際にこのリン酸化シグナルの活性化に至るレセプター機構の解明が今後の大きな課題である。結論として、今回の研究で、リン濃度はヒト表皮ケラチノサイト培養系の増殖停止時期を左右する因子であることが示された。その機序の一つとして高リン濃度が細胞の分化ストレスとして働く可能性が考えられた。

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1件)

小川 靖、秋山 真志、Phosphate toxicityによるケラチノサイトの細胞老化への影響の検討、加齢皮膚医学セミナー、査読有、8巻、2013、pp.33-38

〔学会発表〕(計1件)

小川 靖、慢性腎不全患者における老化様皮膚の形成機構の解明、第8回加齢皮膚医学研究会、2012年7月7日~7月8日、高知市総合あんしんセンター(高知市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 靖(OGAWA, Yasushi)

名古屋大学医学部附属病院・助教

研究者番号: 10567754

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし