

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860144

研究課題名(和文)脂質メディエーターのヒアルロン酸合成促進作用の機序解明と細胞老化についての検討

研究課題名(英文) Analysis of lipid mediator signaling that increases hyaluronic acid synthesis and the effect of lipid mediator on cell senescence

研究代表者

後藤 真里 (GOTOH, Mari)

お茶の水女子大学・ヒューマンライフイノベーション研究所・特任准教授

研究者番号：80467050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、環状ホスファチジン酸(cPA)が皮膚繊維芽細胞や滑膜細胞に対しヒアルロン酸産生を促進する作用を持つことを見出していた。本研究課題では、皮膚線維芽細胞を用いて、cPAがLPA受容体を活性化し、ヒアルロン酸合成酵素2の発現を上昇させ、ヒアルロン酸合成量を上昇させていることを明らかにした。

また、様々な年齢ドナー由来の細胞を使用し、ヒアルロン酸合成調節に関与している遺伝子の発現を網羅的な解析を行った。その結果、老化した細胞においてもヒアルロン酸合成酵素の発現は減少していないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have found that cyclic phosphatidic acid (cPA) has the function of promoting hyaluronic acid production on skin fibroblasts and synoviocyte. In this research project, we revealed that the expression of hyaluronan synthase 2 messenger RNA and protein is up-regulated by cPA treatment.

In addition, we clarified the mRNA expression of hyaluronic acid-related proteins in human skin fibroblasts from donors of various ages (range, 0.7-69 years). As a result, it was revealed that the exertion of hyaluronan synthase did not decrease also in aged cells.

研究分野：脂質生化学、細胞生物学

キーワード：ヒアルロン酸 環状ホスファチジン酸 繊維芽細胞 老化

1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸(LPA)は、細胞増殖促進、がん細胞の浸潤・転移促進、発毛など多彩な作用をもつ脂質メディエーターである。LPAの作用を制御することは、がんの転移抑制や各種治療につながる可能性があり、LPAに関する研究は世界の脂質メディエーターの研究の中で最も盛んに行われてきた。その結果、LPA受容体の探索研究も国内外で飛躍的に進み、現在までに6種類のLPA受容体の存在が報告されている。LPA受容体の細胞内情報伝達系に関する多くの知見も数多く蓄積されつつある。

LPAは生体内でリゾホスホリパーゼD活性を持つAutotaxin(ATX)により生合成され、血清中に存在しているが、我々の研究室では、ATXはその反応の場の条件を変化させることによって、LPAとは異なる環状リン酸構造を持つ環状ホスファチジン酸(cPA)を産生することを発見した(Tsuda, S., et al., *J. Biol. Chem.*, 2006)。cPAが持つ独特の環状リン酸構造は生体の脂質類に例をみず、その生理活性は未解明であった。

そこで、我々はcPAの活性を探索するために、生体内、特に哺乳類細胞での活性解明、作用機序の解明に焦点を絞った研究を進めてきた。そして近年、cPAが皮膚繊維芽細胞や滑膜細胞のヒアルロン酸の産生量を増加させることを明らかにした(図1)。

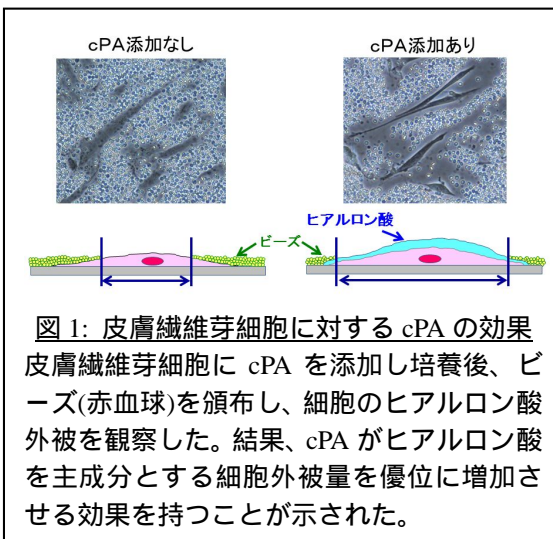


図1: 皮膚繊維芽細胞に対するcPAの効果
皮膚繊維芽細胞にcPAを添加し培養後、ビーズ(赤血球)を頒布し、細胞のヒアルロン酸外被を観察した。結果、cPAがヒアルロン酸を主成分とする細胞外被量を優位に増加させる効果を持つことが示された。

2. 研究の目的

本研究課題では、cPAが皮膚繊維芽細胞や滑膜細胞に対しどのように働きかけヒアルロン酸産生量を増加させるのか、その細胞内情報伝達系について明らかにすることを目的とした。

また、皮膚組織においては紫外線の影響や、

老化現象に伴いヒアルロン酸量を減少させることが知られている。しかし、加齢が引き起こすヒアルロン酸の合成能の低下の機構は未だ明らかにされていない。そこで、本研究課題では、様々な年齢ドナー由来(0.7-69歳)の皮膚線維芽細胞を用いて、老化によりどのようにヒアルロン酸合成調節機構が変化しているのかを解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究計画では下記4項目の実験を行った。

cPAが皮膚繊維芽細胞や滑膜細胞でヒアルロン酸の産生量を増加させる細胞内情報伝達系を明らかにするために、まずはcPAがヒアルロン酸合成酵素1-3のどの酵素発現に影響を与えているのかを調べた。リアルタイムRT-PCR法やウエスタンブロッティング法など生化学的手法を用いた。

cPAはLPA受容体を活性化する。cPAのヒアルロン酸産生促進にLPA受容体が関与しているのか否かを調べるために、GPCR、その下流に対する各種シグナル伝達阻害剤を用いた解析やレポーター遺伝子アッセイなどの手法を取り入れ、cPAが活性化しているLPA受容体の特定、またその下流でヒアルロン酸合成酵素の発現に関わる細胞内情報伝達系について解析を行った。

様々な年齢ドナー由来の皮膚線維芽細胞におけるヒアルロン酸合成酵素1-3、分解酵素(ヒアルロニダーゼ1, 2)、結合タンパク質(パーシカン)の発現をリアルタイムPCR法により解析した。

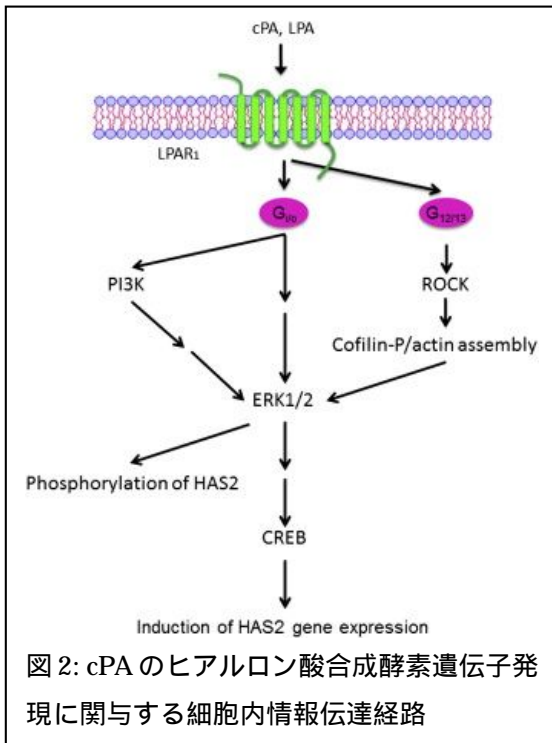
様々な年齢ドナー由来の皮膚線維芽細胞に対するcPAのヒアルロン酸合成促進作用について調べた。

4. 研究成果

cPAは3種類あるヒアルロン酸合成酵素のうちヒアルロン酸合成酵素2の発現を上昇させることが明らかになった。またその発現にはLPA1受容体が関与しており、LPA1受容体の下流では図2に示すような因子が関与していることが示された。

この結果から、cPAはヒアルロン酸合成酵素2の発現を上昇させることで、細胞外のヒアルロン酸量を増加させていることが明らかになった。

皮膚はヒトの身体表面のほとんどを覆っており、身体の中で最も大きく、自身や他人の目に触れるため、身体の健康や老化の状態を外から観察することが容易な器官である。



皮膚の印象は健康の指標や年齢の判断基準とされることが多く、老化に伴って現れる皮膚のシワは、アンチエイジングの対象となっている。シワの原因としては、真皮のヒアルロン酸の減少が一因として挙げられており、ヒアルロン酸を直接皮膚に注射し、皮膚の弛みを抑制する施術が行われている。

一方、ヒアルロン酸は関節においては細胞外マトリックスを構成し、関節液の柔軟性保持に寄与している。現在、関節軟骨の老化変性による変形性関節症を抱える患者は社会の高齢化に伴って年々増加しているが、有効な治療法は未だ確立されておらず、高分子ヒアルロン酸の関節内注入が痛みを抑える対症療法として行われている。しかし、ヒアルロン酸は生体物質であるために徐々に代謝され、ヒアルロン酸関節内注入を定期的に行う必要があり、患者にとっては心身のみならず経済的にも大きな負担となっている。

本研究で扱った cPA は、ヒアルロン酸の合成を自身の生体内で促すことが可能になり、皮膚のアンチエイジングやロコモティブシンドロームである変形性関節症の治療の分野に大きく貢献できるものである。

実際に、膝関節におけるヒアルロン酸の減少は変形性膝関節症の病状の悪化と相関していることが知られており、我々が発見した cPA のヒアルロン酸合成促進作用に変形性膝関節症の病態を緩和させる効果があるか否かについて、cPA の誘導体を変形性膝関節症モデルウサギに投与して調べた。その結果、

cPA 誘導体は膝関節に投与することで、変形性膝関節症の病態を緩和することが示された。この結果は cPA 誘導体を変形性膝関節症の治療薬として利用できる可能性を示す。

また、皮膚の加齢がどのようにヒアルロン酸産生の減少をもたらすのかについて明らかにするために、様々な年齢ドナー由来の皮膚線維芽細胞におけるヒアルロン酸合成酵素 1-3・分解酵素(ヒアルロニダーゼ 1, 2)・結合タンパク質(パーシカン)についての発現解析を行った。その結果、興味深いことに加齢に伴いヒアルロン酸合成酵素 2 の発現は低下せず、むしろ加齢とともに発現が上昇していることが示された。ヒアルロニダーゼ 1, 2 の発現量に関しては加齢との相関はみられなかった。一方、ヒアルロン酸と相互作用するパーシカンに関しては、加齢とともにその発現が減少していることが示された。この結果から、皮膚組織においてヒアルロン酸量が加齢に伴い減少することの原因は細胞のヒアルロン酸合成能の低下に起因するものではなく、ヒアルロン酸と結合するタンパク質の量が減少することによるものだと考えられた。あるいは、ヒアルロン酸の分子量が老化に伴い変化している可能性も考えている。

次に、cPA の様々な年齢ドナー由来(0.7-69 歳)の皮膚線維芽細胞へのヒアルロン酸合成促進効果について調べた。その結果、どの細胞に対してもヒアルロン酸合成促進作用を示し、特に老化している細胞に高いヒアルロン酸合成促進効果を示すことが明らかになった。この結果から、我々は皮膚組織では加齢に伴うパーシカンの減少を抑制することが最も重要であると考え、cPA もまた老化した皮膚組織に対してアンチエイジング効果を持つ可能性があると考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Yoshibumi SHIMIZU, Masaki ISHIKAWA, Mari GOTOH, Shinji YAMAMOTO, Kensuke IWASA, Keisuke YOSHIKAWA, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI

“Quantitative determination of cyclic phosphatidic acid and its carba analog in mouse organs and plasma using LC-MS/MS”

J. Chromatogr. B, 1076:15-21, 2018 (査読有)

Katsura SANO†, Mari GOTOH†, Kyoko DODO, Noriaki TAJIMA, Yoshibumi SHIMIZU, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI, †These authors equally contributed to this study.

“Age-related changes in cyclic phosphatidic acid-induced hyaluronic acid synthesis in human fibroblasts”

Human Cell, 31: 72-77, 2018 (査読有)

Md. Khayrul BASHAR, Kei HASHIMOTO, Kanako ENOYOSHI, Kimiko YAMASHITA, Mari GOTOH, Hiroshi KORI

“Quantification of interaction between human skin fibroblasts and collagen by image texture analysis”

Journal of Bioinformatics and Neuroscience, 1:31-37, 2015 (査読有)

Mari GOTOH†, Aya NAGANO†, Ryoko TSUKAHARA, Hiromu MUROFUSHI, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI, †These authors equally contributed to this study.

“Cyclic Phosphatidic Acid Relieves Osteoarthritis Symptoms”

Mol. Pain, 10, 52, 2014 (査読有)

Katsura MAEDA-SANO†, Mari GOTOH†, Toshiro MOROHOSHI, Takao SOMEYA, Hiromu MUROFUSHI, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI, †These authors equally contributed to this study.

“Cyclic phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce hyaluronic acid synthesis via CREB transcription factor regulation in human skin fibroblasts”

Biochem Biophys Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids, 1841(9):1256-1263, 2014 (査読有)

後藤真里、吉川圭介、塚原涼子、室伏きみ子

脂質メディエーター・環状ホスファチジン酸の変形性関節症と多発性硬化症への効果とその医療応用への展望

Effects of lipid mediator, cyclic phosphatidic acid on osteoarthritis and multiple sclerosis, and its future prospects in medical applications

脂質栄養学 2015年、3月号 (査読無)

〔学会発表〕(計 8 件)

Md. Khayrul BASHAR, Kei HASHIMOTO, Mari GOTOH, and Hiroshi KORI

Analyzing Orientation Patterns of Human Skin Fibroblasts using Image Gradient Information

The 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology

Society (EMBC'17), JeJu Island, Korea, 2017/7/11-15

Katsura SANO, Mari GOTOH, Kyoko DODO, Yoshibumi SHISMIZU, Noriaki TAJIMA, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI
Aging effects on hyaluronan production in human skin fibroblasts

The International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC2016)

Florida, USA, 2016/10/30-11/2

Md. Khayrul BASHAR, Kei HASHIMOTO, Mari GOTOH, Hiroshi KORI

Orientation Quantification of Human Skin Fibroblasts using HOG Feature Descriptor

The 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC 2016)

Florida, USA, 2016/8/16-20

Md. Khayrul BASHAR, Kei HASHIMOTO, Kanako ENOYOSHI, Kimiko YAMASHITA, Mari GOTOH, Hiroshi KORI

“Pattern Quantification from Human Skin Fibroblast Images”

ICIIBMS (The International Conference on Intelligent Informatics and Biomedical Sciences) Okinawa, Japan, 2015/11/28-30

Katsura MAEDA-SANO, Mari GOTOH, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI

“Cyclic phosphatidic acid induces hyaluronic acid synthesis via CREB transcription factor regulation in human skin fibroblasts”

The International Federation of Societies of Cosmetic Chemists forum (IFSCC 2014), Paris, France, 2014/10/27-30

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-w.cf.ocha.ac.jp/ihli/member/goto/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

後藤 真里 (GOTOH, Mari)

お茶の水女子大学・ヒューマンライフイノベーション研究所・特任准教授

研究者番号：80467050