

## 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 13 日現在

機関番号：21102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20300225

研究課題名（和文）ヒアルロン酸ノックダウンマウスの老化機構の解明及び抗加齢医薬開発への活用

研究課題名（英文）Elucidation of aging mechanism of hyaluronan knock-down mouse and its application to the evaluation for effect of anti-aging reagents.

研究代表者

今 淳 (KON ATSUSHI)

公立大学法人 青森県立保健大学・健康科学部・教授

研究者番号：60271798

研究成果の概要（和文）：マウスに 4-メチルウンベリフェロン(MU)を経口投与すると、アンチエイジング物質である高分子多糖のヒアルロン酸(HA)の合成が特異的に抑制され、HA ノックダウンマウスを作製することができる。本マウスの皮膚には皺及び乾燥の老化症状を認め、老化モデルマウスである。本研究では HA ノックダウンマウスの病態形成の分子機構を解析した。最初に HA ノックダウンマウスの臓器の HA 含量を解析した。その結果、皮膚の HA 含量は著明に減少していた。また HA の減少による角層水分含量の低下も著明であった。しかも脳を除く他の臓器の HA 含量も同様に減少していた。次に皮膚における HA 合成酵素(HAS1～3)、HA 分解酵素(Hyal1～4)及び HA レセプター(CD44, RHAMM)の発現変動を解析した。その結果、HA ノックダウンマウスの表皮及び真皮における HAS-2、表皮における RHAMM の各遺伝子の転写は何れも抑制していた。その際、HAS-2 では転写因子の *de novo* な合成を必要とせず、既存の転写因子のリン酸化の関与が考えられた。RHAMM 遺伝子の転写の抑制には、*de novo* の転写因子の合成が必要であった。また HA ノックダウンマウスの皮膚に発現する遺伝子の網羅的解析を行った結果、発現が有意に変動するもの 61 種を見出した。特に toll-like receptor 3 の減少は著しく、炎症誘発による皺形成への関与の可能性を考えた。チロシン脱リン酸化酵素、サイクリン Y、Rho 等の癌遺伝子も著明に減少していた。すでに我々は腫瘍細胞の増殖と転移が MU により抑制することを報告しており、各癌遺伝子の発現減少はその病態に関わると考えた。一方、ストロメライシン 3 は著明に亢進し、細胞外マトリックスの分解を促進し、皺形成を促進すると考えた。最後に、各種分子量の HA 及び網羅的解析で見出した老化関連遺伝子を生体皮膚に投与し、本マウスの皮膚の老化の治療を行った。経口摂取、外用及び皮内注入した結果、高分子 HA を皮内に注入した場合のみアンチエイジング効果を認め、内服や外用効果は全く老化症状の軽減は認められなかった。老化関連遺伝子(V 型及び VII 型コラーゲン, RHAMM, toll-like receptor 3, サイクリン Y, Sir7 等)のタンパクの生体皮膚への導入もアンチエイジング効果を全く示さず、単独での導入は治療に直結せず、幾つかの遺伝子の組み合わせによるカクテル療法が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Hyaluronan (HA), a non-sulfated glycosaminoglycan of high molecular mass, presents in various tissues as a major component of the extracellular matrix and plays an important role in regeneration, wound healing, and anti-aging of organs. We have previously reported that 4-methylumbelliferone (MU) specifically inhibits HA synthesis. In this study, we first investigated the expression of HA-related gene, such as HA synthase (HAS-1, HAS-2, HAS-3), hyaluronidase (Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4), and HA receptor (CD44, RHAMM). We have demonstrated that HAS-2 gene transcription in both epidermis and dermis, and RHAMM transcription in epidermis were reduced in HA-knock-down mice. These data suggested that MU treatment specifically downregulates gene expressions of HAS-2 and RHAMM induced the HA production, resulting in skin aging, such as wrinkle formation and skin dehydration in HA knockdown mice. Next, we have detected sixty one kinds of HA knock-down mice specific genes by using DNA microarray analysis. Specifically,

toll-like receptor 3 gene was strongly down-regulated in HA knock-down mice, suggesting induction of inflammation resulted in skin aging characterize by wrinkle formation. Oncogene expressions such as of tyrosine phosphatase, cyclin Y, and Rho were also down-regulated in HA-knock down mice. Our previous studies have demonstrated MU suppressed the metastasis of malignant tumor cells by inhibiting of HA production. Therefore, these results suggested that down-regulation of these oncogene expression, at least in part, were involved in inhibition of metastasis. On the other hand, gene expression of stromelysin 3, depredeating enzyme of extracellular matrix components such as proteoglycan and collagen, strongly up-regulated. These data suggested that the degradation of extracellular matrix resulted in wrinkle formation of HA knock-down mice. Finally, we have administered HA and its oligosaccharides with various molecular weight. As the result, only intradermal injection of high molecular HA decreased skin aging, whereas no change was observed in aged skin by orally or topically administration. Also, skin aging was not reduced by introduction of aging-related gene which was down-regulated in HA knock-down mice, such as COL5A1, COL7A1, RHAMM, toll-like receptor 3, suggesting alone administration of each gene was not effective and cocktail therapy, the combination of multiple genes, was necessary of treatment of skin aging in HA knock-down mice.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：ヒアルロン酸，糖鎖，アンチエイジング，老化，発現制御

#### 1. 研究開始当初の背景

高分子多糖のヒアルロン酸(HA)は生体のアンチエイジングにとって非常に重要な物質である。しかしながら、HAの重要性は認識されているものの、アンチエイジングの作用に関する分子機構の詳細は不明な部分が多く、アンチエイジング研究及びその他のHA関連研究の進歩を遅らせている。

本研究者らは、これまで存在の知られていなかったHA合成の阻害剤の探索を行い、4-メチルウンベリフェロン(MU)という物質がHA合成を特異的に阻害することを先駆けて突き止めた。しかもMUをマウス投与して、HA合成が特異的に抑制され、皮膚の菲薄・粗造化及び乾燥の老化症状を認めるマウス「HAノックダウンマウス」を作製した。更にMUを悪性腫瘍細胞に作用させたり、HAノックダウンマウスに悪性腫瘍細胞を注入させたり

すると、悪性腫瘍細胞の転移が抑制できることを突き止めた。

#### 2. 研究の目的

本研究では、このマウスを新規老化モデル動物と位置づけ、更にその病態の分子機構を解明した。最終的には、このマウスを各種物質のアンチエイジング効果を判定する評価動物として活用し、新規アンチエイジング医薬の発掘・開発を目指した。具体的には、  
 1)HAノックダウンマウスの臓器及び組織所見の解析。器官や組織の病理組織学解析、生理学的解析を行い、老化所見を明らかにした。  
 2)HAノックダウンマウス特異的遺伝子の網羅的解析。MU投与によって新たに発現する或いは発現が消失する遺伝子をmicroarrayによって網羅的に解析した。  
 3)HAノックダウンマウスの治療。2)で確認さ

れた遺伝子を HA ノックダウンマウスに導入し、老化を抑制できるか否か解析した(遺伝子治療)。また、本マウスは HA の発現が低下することから、様々な分子サイズの HA も生体皮膚に投与し、老化症状の抑制の有無を解析した(糖鎖治療)。

### 3. 研究の方法

#### 1) HA ノックダウンマウスの皮膚の解析

ヘアレスマウスに MU を経口摂取(3 mg/g 体重, 1日2回, 3か月)させ、各種臓器の HA 含量を定量化した。また、皮膚に関しては、皮膚の菲薄、粗造化、及び乾燥を確認した。

(1) HA 含量の定量: 臓器における HA 含量は、各臓器からグアニジン塩酸抽出法によって HA を抽出し、ヒアルロン酸定量キット(生化学工業)で定量化した。

(2) 生理学的解析: 角層水分量、弾性、及び炎症の程度をマルチ皮膚測定器(Integral 社)で定量化した。

(3) 病理組織学的解析: HA ノックダウンマウスの皮膚を採取し、老化関連タンパク質(コラーゲン, デコリン, アグリカン, エラスチン, マトリックスメタロプロテイナーゼ)及び糖鎖(HA)の発現を免疫組織学的解析した。

(4) 生化学的解析: 老化関連タンパク質(コラーゲン, デコリン, アグリカン, エラスチン, マトリックスメタロプロテイナーゼ)や HA 代謝酵素(HA 合成酵素, ヒアルロニダーゼ), ヒアルロン酸レセプターの各遺伝子発現変動は real time PCR 法によって定量化した。

#### 2) HA ノックダウンマウス特異的に発現変動する遺伝子の解析

(1) HA ノックダウンマウス及び MU 非投与コントロールマウスの皮膚を採取する。各マウスで発現している遺伝子(mRNA)の網羅的解析を microarray 法により行う。皮膚に発現する全遺伝子の同定と MU による発現変動を定量的に解析した。

(2) (1)で抽出した遺伝子候補の発現機構を更に詳細に解析した。real time PCR によって発現の経時変化、器官・組織特異性等を定量化すると共に、この際に発現を調節するモジュレーターの見いだす。またルシフェラーゼアッセイ法及びゲルシフトアッセイ法等によって転写レベルの機構(転写調節機構)を含め詳細を解析した。

#### 3) HA ノックダウンマウスの治療

治療方法として以下の項目を行った。

(1) 遺伝子治療: microarray 法の結果から、(a) HA ノックダウンマウスで著明に発現促進

している遺伝子、(b) HA ノックダウンマウスで著明に発現が抑制した遺伝子を取り上げ、その遺伝子発現ベクターを構築する。(a)の各遺伝子ベクターをコントロールマウスに naked DNA を用いて導入し、老化の症状が誘発されるか、また、(b)の各遺伝子ベクターを HA ノックダウンマウスに naked DNA を用いて導入し、老化症状が軽減する、いわゆる抗加齢効果が見られるかを評価した。

(2) 糖鎖治療: 以下の各種 HA を HA ノックダウンマウスの生体皮膚に外用剤(親水軟膏への混合)及び水溶液のイオントフォーシス法で導入し、老化症状の軽減の有無を解析した。(a)各種分子サイズの HA(分子量 200 万~7 万(紀文)), (b) HA を牛精巢ヒアルロニダーゼで低分子化させ、カラムクロマトグラフィー及び HPLC で単離精製した主に 4~10 糖までの HA オリゴ糖。

### 4. 研究成果

MU を経口投与して作製したノックダウンマウスの皮膚では、HA の含量が著明に減少していた。また、角層水分含量の低下も著明であり、これは、ヒアルロン酸は非常に高分子で、包水性を有する糖鎖であるため、この減少によって皮膚内に水分子を保つことができなくなったためと考えられた。一方、皮膚の弾性には変化は無く、しかも炎症症状も誘発されなかった。この結果は、病理組織学的観察において HA の染色性は減少していたが、弾性に関わるエラスチンの染色性が減少していないことから、支持するものであった。また、HA ノックダウンマウスの皮膚以外の臓器における HA 含量を定量化した結果、脳以外の殆どの臓器のヒアルロン酸含量は著明に低下していた。脳には血管脳関門が存在し、MU の移行が行われないために HA が減少しない可能性を考えた。

本マウスにおける皮膚の変化は全臓器の中で最も著明なものであり、以下皮膚を中心にして解析した。特筆すべきことは、表皮の角化の亢進を認めたことであった。事実、病理組織学的には、表皮分化マーカーのケラチン 5/14 は増強しており、一方より未分化なマーカーのケラチン 1 は低下していた。また、V 型及び VII 型コラーゲンの発現低下も認めた。我々は VII 型コラーゲン低下が皮膚老化(皺形成)に関与することを見出しており、本マウスの皮膚の老化症状にも影響していると考えた。

HA ノックダウンマウスの HA 合成抑制機構及びそれに関連した老化症状の分子機構解析のため、HA ノックダウンマウス生体皮膚に

おける HA 代謝関連酵素 (HA 合成酵素 (HAS1~3), HA 分解酵素 (Hyal1~4) 及び HA レセプター (CD44, RHAMM) の発現変動を解析した。その結果, 生体皮膚の表皮及び真皮とも HAS-2 の遺伝子発現が本マウスでは有意に減少していた。また表皮の RHAMM 遺伝子の発現も抑制していた。しかし真皮における RHAMM 遺伝子の発現は全く不変であり, RHAMM 遺伝子に関しては MU による組織特異的な制御機構が HA ノックダウンマウスに存在すると考えられた。HAS-2 及び RHAMM の抗体による免疫染色の結果でも抑制効果を認め, 遺伝子のみならずタンパク質レベルにも抑制効果を HA ノックダウンマウスに認めた。一方 HAS-1, HAS-3, Hyal-1, Hyal-3, Hyal-4 及び CD44 の各遺伝子はコントロールマウスと同等に発現しており, MU 刺激による影響を全く受けなかった。

HAS-2 及び RHAMM に対する MU の抑制効果の詳細を更に明らかにするため, 培養系 (培養マウス表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞) に MU を添加し, 各遺伝子の発現変動を解析した。その結果 MU は反応時間依存性及び濃度依存性に HAS-2 と RHAMM の各遺伝子発現を抑制した。更にウエスタンブロット法の解析から, MU の抑制効果は HAS-2 及び RHAMM のタンパク質の発現に対しても抑制効果を有することが明らかになった。そこで, これまでの結果を踏まえ, MU による HAS-2 及び RHAMM の発現抑制が転写の段階で制御されるか否か, しかもその場合に転写因子がどの様に制御する可能性があるのかを解析した。最初に *de novo* のタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) で各培養細胞を予め刺激し, 次いで MU を添加して各遺伝子発現の変動を解析した。その結果 CHX を添加しても HAS-2 遺伝子の発現は依然として MU により抑制された。次に転写阻害剤であるアクチノマイシン D (AcD) で各細胞を予め処理した場合には, MU による抑制効果が完全に失われた。以上から, MU は HAS-2 遺伝子の転写を抑制し, しかもその際にタンパク質である転写因子を新生する必要のないことが明らかになった。従って可能性の一つとして, MU で刺激する前に既に存在していた転写因子がリン酸等の修飾を受けてプロモーター領域に作用していることが考えられた。RHAMM 遺伝子に関しては, CHX は MU の抑制作用を完全に消失させた。また AcD を添加した場合も MU による RHAMM 遺伝子の発現抑制効果が失われた。従って MU は転写レベルで表皮における RHAMM 遺伝子の転写を抑制しており, その際 MU は新たにタンパク質を発現・誘導させ, これが転写因子

となって RHAMM 遺伝子のプロモーター領域と結合して抑制する機構が存在すると考えられた。

HA ノックダウンマウスの更なる病態の解析のため網羅的解析を行った。その結果, MU により発現が変動する有意なもの 61 種を見出した。特に toll-like receptor 3 の減少は著しく, 本マウスでは明らかな発赤, 腫脹, 発熱等の出現は認めなかったが, 皰形成や炎症誘発に何らかの関与の可能性を考えられた。また, チロシン脱リン酸化酵素, サイクリン Y, Rho 等の癌遺伝子も著明に減少していた。すでに我々は腫瘍細胞の増殖と転移が MU により抑制することを報告しており, 各癌遺伝子の発現減少はその病態に関わると考えた。一方, ストロメライシン 3 は著明に亢進し, 細胞外マトリックスの分解を促進し, 皰形成を促進すると考えた。

HA, HA オリゴ糖及び網羅的解析で見出した老化関連遺伝子を生体皮膚に投与し, 老化治療実験を行った。各 HA を内服, 外用及び皮内注入した結果, 高分子 HA の皮内投与のみアンチエイジング効果を認め, 世間で言われるような内服, 外用効果は全く認められなかった。しかも網羅的解析から見出された老化関連遺伝子 (V 型及び VII 型コラーゲン, RHAMM, toll-like receptor 3, サイクリン Y, Sir7 等) のタンパクの生体皮膚への導入も効果を全く示さず, 単独での導入は治療に直結せず, 幾つかの遺伝子の組み合わせによるカクテル療法が必要と考えられた。

## 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 8 件)

①Ohshika S, Ishibashi Y, Kon A, Kusumi T, Kijima H, Toh S: Potential of exogenous cartilage proteoglycan as a new material for cartilage regeneration. *Int Orthop*, 36, 869-877, 2012.

DOI : [10.1007/s00264-011-1335-2](https://doi.org/10.1007/s00264-011-1335-2)

②Kon A: Hyaluronan in the skin and its correlation with dermatopathology. *Trends in Glycosci Glycotechnol*, 22, 68-79, 2011.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/tigg/22/124/22\\_124\\_68/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/tigg/22/124/22_124_68/_pdf)

③Yoneda K, Demitsu T, Manabe M, Igarashi J, Kosaka H, Inagaki N, Takahashi H, Kon

A, Kakurai M, Kubota Y: Expression of wild-type, but not mutant, loricrin causes programmed cell death in HaCaT keratinocytes. *J Dermatol*, 37, 956-964, 2010.

DOI:10.1111/j.1346-8138.2010.00932.x.

- ④ Yamaguchi M, Takagaki K, Kojima K, Hayashi N, Chen F, Kakizaki I, Kon A, Endo M : Novel proteoglycan glycol-technology: chemoenzymatic synthesis of chondroitin sulfate-containing molecules and its application. *Glycoconj J*, 27, 189-198, 2010.

DOI: DOI: 10.1007/s10719-009-9252-y

- ⑤ 今 淳: 胎仔創傷治癒機構 (scarless wound healing), *日皮会誌* 119:1971-1977, 2009.

<http://www.dermatol.or.jp/Journal/JpnJD/full/119101971j.pdf>

- ⑥ Kon A: Hyaluronan knockdown mice : application to analysis of hyaluronan-mediated patho- physiology: inflammation and Regeneration 28: 41-46, 2008.

[http://www.jsir.gr.jp/past\\_journal/2801/0041-0046.pdf](http://www.jsir.gr.jp/past_journal/2801/0041-0046.pdf)

- ⑦ Kon A : Recent advances in skin aging research: *Fragrance J* 36: 18-25, 2008.

- ⑧ Kakizaki I, Itano N, Kimata K, Hanada K, Kon A, Yamaguchi M, Takahashi T, Takagaki K : Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation, *Arch Biochem Biophys* 471 : 85-93, 2008.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2007.12.004>,

[学会発表] (計 8 件)

- ① 今 淳, 板先解子: 4-メチルウンベリフェロンによるヒアルロン酸関連遺伝子の発現調節について, 2011 年度青森県保健医療福祉研究発表会, 2012 年 2 月, 青森市
- ② 今 淳: 皮膚から全身に向けてのアンチエイジング, 青森県栄養士会平成22年度生涯学習カリキュラム, 2010年10月, 青森市
- ③ 乗鞍敏夫, 数馬恒平, 渡部朋子, 渡部一郎,

山口真範, 今 淳: 4-メチルウンベリフェロンによる皮膚のヒアルロン酸合成の抑制機構について. 第42回日本結合組織学会学術大会, 第57回マトリックス研究会大会合同集会 2010年8月, 秋田

- ④ Kon A, Watanabe T, Norikura T, Watanabe I, Kazuma C: 4-methyl-umbelliferone-mediated inhibition of hyaluronan expression in epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts, 第34回日本研究皮膚科学会年次学術大会, 福岡, 2009年12月.

- ⑤ 今 淳, 渡部朋子, 乗鞍敏夫, 渡部一郎, 数馬浩平: 4-メチルウンベリフェロンによる皮膚のヒアルロン酸合成抑制機構について, 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10月.

- ⑥ 今 淳: 閉経後女性のヘルシアのための新展開-皮膚の老化, 第24回日本更年期医学会学術集会, 青森, 2009年10月.

- ⑦ Kon A: Skin aging and extracellular matrix. Korean photobiology meeting, Seoul, June 20, 2009

- ⑧ 今 淳, 数馬恒平, 渡部朋子, 渡部一郎, 五十嵐愛美, 高垣啓一: 4-メチルウンベリフェロンによるヒアルロン酸の合成抑制機構. 第9回日本抗加齢医学会総会, 横浜, 2009年5月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今 淳 (KON ATSUSHI)

青森県立保健大学・健康科学部・教授  
研究者番号: 60271798

### (2) 研究分担者

澤村 大輔 (SAWAMURA DAISUKE)

弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 60196334