

## 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 15 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791100

研究課題名（和文） 振動・伸展刺激が皮膚に及ぼす影響についての研究

研究課題名（英文） The effect of mechanical stretching on the skin.

研究代表者

矢野正一郎（YANO SHOICHIRO）

国際医療福祉大学・大学病院・講師

研究者番号：70525245

研究成果の概要（和文）：

表皮細胞に機械的伸展収縮刺激を加えることにより、IL-8、PGE2、IL-33 などの分子が誘導された。これらの分子の誘導は、ERK 阻害剤によって阻害された。以上から、IL-8、PGE2、IL-33 の機械的伸展収縮刺激による誘導は ERK 依存的事であることが明らかとなった。分化型ケラチン K10 の発現が亢進した表皮細胞に伸展収縮刺激を加えると、正常表皮細胞に比べ DNA アレイによって発現が変動する分子数が減少した。以上から、分化型ケラチンを発現誘導することで伸展収縮刺激に対する耐性が誘導できると考えた。すなわち、表皮細胞の分化を誘導するような薬剤の外用により、表皮細胞は伸展収縮刺激に対して反応しにくくなると考えられた。これが皮膚老化などにどのように関与するのかを今後検討したい。

研究成果の概要（英文）：

Several cytokines, IL-8, PGE2, and IL-33, were induced by mechanical stretching on epidermal keratinocytes. Those induction were inhibited using ERK inhibitors. I suggested that the induction of IL-8, PGE2, and IL-33 by mechanical stretching was depend on ERK signals. Epidermal keratinocytes overexpressed keratin 10, which is differentiated marker, were mechanically stretched. The number of molecules effected by DNA microarray decreased compared with normal keratinocytes. Those results showed that differentiated keratin acquire the resistance against the stimuli of mechanical stretching. And the drugs which induce epidermal differentiation will stop the stimuli of mechanical stretching. I further investigate the skin aging using those results.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：表皮細胞・伸展刺激・炎症性サイトカイン・シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚の表面を覆っているのは表皮細胞であり、表皮細胞は常に外界の刺激にさらされている。表皮には種々のストレス、例えば細菌やウイルスの侵入、熱や化学物質への暴露、紫外線照射、機械的刺激などが加わっている。細菌やウイルスに関しては **Toll like receptor** が関与して免疫学的反応が惹起されることが報告され、化学物質に対しては一次刺激反応やアレルギー反応などの面から研究されている。紫外線照射に対しては **EGF** 受容体の活性化や **NF $\kappa$ B** 経路の活性化などの報告がある。しかしながら、表皮細胞に対する機械的刺激がどのような影響を及ぼすのかについては、ほとんど研究されていない。

一方、皮膚以外の組織については、いくつかの器官と物理的伸展刺激との関わりが詳しく研究されている。ヒト横紋筋はストレッチやトレーニングによって筋線維が増加し、太くなることが以前から広く知られており、筋力トレーニングやリハビリテーションの理論的裏付けとなっている。また、コラーゲンゲル内で培養した骨組織に対して伸展刺激を加えることによって骨芽細胞・破骨細胞の活性化が認められ、骨新成や骨再生促進に関与することが明らかになっている。ラット血管平滑筋細胞では、機械的伸展刺激を加えることによって細胞接着分子や細胞骨格の変化が見られることが報告されており、最終的には細胞増殖が亢進することも知られている。ウシやヒト血管内皮細胞では **shear stress** (流れ刺激) によって **myosin light chain** のリン酸化、**MAPK** のリン酸化亢進、細胞外カルシウムイオンの流入、**DNA** の合成促進、**VCAM-1** や **GM-CSF** などの産生増加、細胞増殖・遊走の亢進・アポトーシスの抑制がみられるという報告がある。血管系に関するこれらの現象は臨床的には高血圧による血管壁、血管内膜の肥厚の重要なメカニズムの1つとして考察されている。

### 2. 研究の目的

皮膚に対する振動刺激、伸展収縮刺激が皮膚の細胞外マトリックス産生の増加を生じることにより、加齢にともなう細胞外マトリックスの減少を補う効果、いわば“若返り”の効果があることを示し、そのメカニズムについて検討する。さらに、その他の加齢に伴

う変化を抑制ないし逆行させるような変化が生じるか否かを検討する。一般的に振動刺激や圧迫刺激などの物理的刺激を顔面などに加えることによって、皮膚の新陳代謝が促進され、血行も促進されることにより肌が丈夫になる、若返りなどといわれている。しかしこれらには特段の科学的根拠はないことが多い。そこで **in vitro** で皮膚に対する振動刺激のモデルを構築し、科学的な検証を試みる。これらの実験は経験的に知られている美肌マッサージ効果に対して科学的な裏付けを与えることができる点、振動等の物理的刺激を **in vitro** で再現できる点、さらに皮膚に“若返り”を生じさせる可能性がある点で独創的であると考えている。

### 3. 研究の方法

我々はこれまでに、機械的伸展刺激を表皮角化細胞に加える実験モデルを確立している。具体的には、伸縮可能なシリコン製の培養皿をコラーゲンにてコーティングし、その上に表皮角化細胞を播種する。細胞がコンフルエントに達した後、ステンレス製のチャンバーにシリコン培養皿を装着して引き伸ばして固定する、という方法で+10, +20, +30%の長軸方向の伸展を持続的に可能とした。これによって細胞の増殖が反応性に促進されることを **5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)** の取り込み増加によって示した。また、その過程で細胞上の **EGF** レセプターが伸展刺激開始から1分-5分のうちにリン酸化され、カルシウムチャンネルが作動し、**ERK1/2** のリン酸化を経て **AP-1** が活性化されることや細胞増殖を示すケラチン6が発現することを機序として初めて見いだした。これらの結果は皮膚科の臨床領域における腫瘍進展防御のための周辺部表皮細胞増殖、あるいは **Tissue expander** による皮膚伸張、あるいは創傷治癒における創収縮と創部の表皮増生、といった現象の有力な理論的裏付けとなると考えている。

今回はまず皮膚のモデルとしてヒト表皮角化細胞及びヒト皮膚線維芽細胞の各単層培養シートを利用する。これらに振動や伸展収縮刺激が伝わるように細胞は可動性のシリコン製培養皿の上で培養される。刺激後細胞が増殖するかを測定し、細胞からどのような物質が分泌されてくるかを検索・測定する。

細胞内シグナル伝達についても考察する。細胞内シグナル伝達の中でも細胞増殖に深く関与している MAPK pathway である ERK1/2, JNK1/2, p38 と PI 3-kinase の 1 つである Akt に着目する予定である。さらに、老化に伴って生じる変化を抑制させるような現象が生じるかを分子レベルで検討する。予想される結果として、以前に単回刺激で示された細胞増殖がより有意差を持って示されると考えている。また、表皮角化細胞・線維芽細胞ともに細胞増殖因子や細胞外マトリックスを多数分泌することを予想している。そしてこれらは MAPK pathway の活性化などのシグナル伝達系を介するものと考えている。更には幹細胞マーカーの増強、老化関連因子の減少も予想している。次に、表皮角化細胞は培養条件を変更すれば単層から重層表皮へと変化する。また、コラーゲンゲル内で線維芽細胞を培養し、その上に表皮角化細胞を播種すれば付属器を除いた人工的皮膚モデルが完成する。これらの培養条件に対しても同様の実験を施行して結果を比較する。さらにマウス皮膚を用いて in vivo での同様の検討を行う。

#### 4. 研究成果

表皮細胞に機械的伸展収縮刺激を加えた際に変化する分子について検討を行った。表皮細胞に機械的伸展収縮刺激を加えることにより、IL-8、PGE2、IL-33 などの分子が誘導された。以前の検討から、伸展刺激によって、ERK の活性化が認められることから、これらの阻害剤によって誘導が抑制されるか否かを検討したところ、機械的伸展収縮刺激によるこれらの分子の誘導は、ERK 阻害剤によって阻害されることが分かった。このことから、IL-8、PGE2、IL-33 の機械的伸展収縮刺激による誘導は ERK 依存的であることが明らかとなった。

分化型ケラチンであるケラチン K10 遺伝子を強制発現させた表皮細胞およびコントロール表皮細胞に機械的伸展収縮刺激を加えて RNA を抽出し、DNA アレイによって発現が変動する分子について検討した。野生型ケラチン K10 の発現が亢進した表皮細胞に機械的伸展収縮刺激を加えると、強制発現しない表皮細胞に比べて発現が変動する分子数が減少した。このことから、分化型ケラチンを発現誘導することで、機械的伸展収縮刺激に対する耐性が誘導できると考えた。すなわち、表皮細胞の分化を誘導するような薬剤を外用することによって、表皮細胞は機械的伸展収縮刺激に対して反応しにくくなると思

われた。このような外用剤は、機械的伸展収縮刺激による表皮細胞の炎症を抑制する可能性があると考えられ、これが皮膚老化などにどのように関与するのかを今後検討したい。また、伸展収縮の強度や頻度を変化させることによって、表皮細胞に与える影響がどのように変化するのかを、今後検討する予定である。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

矢野正一郎 (YANO SHOICHIRO)

国際医療福祉大学・大学病院・講師

研究者番号：70525245