

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21217

研究課題名（和文）アンチエイジング製品開発を目指したin vitro光老化リンパ管モデルの確立

研究課題名（英文）Development of an in vitro model of lymphatic vessels in photoaging for anti-aging product

研究代表者

奥山 勝揮（Okuyama, Katsuki）

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20967799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：Ⅰ型コラーゲンに対する紫外線B照射は照射エネルギー依存的に変性(カルボニル化)・断片化を促進した。そこで、リンパ管内皮細胞に対する紫外線照射コラーゲンの影響を検討した。紫外線照射コラーゲン存在下では、リンパ管内皮細胞での細胞遊走および管腔形成が抑制された。また、正常コラーゲンと比較して紫外線照射コラーゲンのコート上およびゲル中でのリンパ管内皮細胞の $\beta 1$ -integrinのタンパク質産生は抑制される傾向を示した。したがって、光老化コラーゲン存在下でのリンパ管内皮細胞における細胞遊走および管腔形成の抑制作用は、 $\beta 1$ -integrin依存的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、光老化したコラーゲンによるリンパ管形成機構の一端を明らかにした。コラーゲン光老化コラーゲンとリンパ管形成との関連性を明らかにしたことは、しわ・たるみを兆候とした光老化の分子機構解明に繋がるものと示唆された。さらに、本研究でのin vitro光老化リンパ管モデルを用いて新規素材のスクリーニングをすることは、リンパ管を標的としたアンチエイジング製品の新規開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：UVB irradiation augmented degradation and carbonylation of type I collagen in an irradiation energy-dependent manner. We investigated the effect of UVB-irradiated type I collagen on the lymphatic actions of human dermal lymphatic vessel endothelial cells (HDLECs) in vitro. HDLECs were inhibited the cell migration and tube formation in UVB-irradiated collagen. In addition, $\beta 1$ -integrin production in HDLECs were decreased under these conditions. Therefore, the inhibition of cell migration and tube formation of HDLECs in the presence of UVB-irradiated collagen was attributed to a $\beta 1$ -integrin dependent manner.

研究分野：皮膚科学

キーワード：光老化 細胞外マトリックス リンパ管形成 皮膚科学

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

太陽光中、特に紫外線波長領域の長期曝露は、皮膚において深いしわ・たるみの形成を兆候とする光老化を促進させる。その原因の一つとして、皮膚真皮層におけるⅠ型コラーゲンの分解や変性などが挙げられ、これらの蓄積は、皮膚構成細胞における足場形成を抑制し、しわ・たるみ形成に繋がると考えられている。近年では、皮膚真皮層に存在するリンパ管が、紫外線曝露により機能低下し、リンパ浮腫を起因とした光老化を生じることが知られているが、その分子機構や分解・変性コラーゲンとの相互作用は十分理解されていない。また、真皮中のリンパ管は、光老化と密接に関連することが近年報告されている。しかしながら、紫外線照射により分解・変性したコラーゲンがリンパ管形成に与える影響については明らかとなっていない。これまで申請者は、解剖学的所見より、リンパ管がⅠ型コラーゲンで豊富な真皮層に囲まれていることから基底膜成分ではなくⅠ型コラーゲンを使用した Collagen sandwich model を構築した⁽¹⁾。コラーゲンは、紫外線照射により変性・分解を引き起こすことから⁽²⁾、Collagen sandwich model を用いた評価において、Ⅰ型コラーゲンを予め紫外線照射することにより、光老化の生理的条件を模倣した *in vitro* 光老化リンパ管モデルの培養系を確立できると考えた。

2. 研究の目的

上記背景に基づき、本研究は、分解・変性したⅠ型コラーゲンをを用いて *in vitro* 光老化リンパ管モデルの培養系を確立し、光老化生理的条件下におけるリンパ管形成機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

紫外線照射コラーゲンの作製と物性評価

Ⅰ型コラーゲン (1 mg/mL) に対して、紫外線 B を 0-300 J/cm² のエネルギーにより照射し、紫外線照射コラーゲンを作製した。SDS-PAGE 電気泳動により、紫外線照射コラーゲンの分解能を評価した。また、2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を用いた比色法によりコラーゲン中のカルボニル化測定を行った。

紫外線照射コラーゲンによるリンパ管内皮細胞 (HDLECs) の機能評価

i) 紫外線照射コラーゲン存在下におけるリンパ管の管腔形成評価

Collagen sandwich model に基づき実施した。すなわち、正常および紫外線照射コラーゲン溶液 (1 mg/mL) と酢酸 (5 mM) を 1:9 で混合して 48 well plate にコートした。その後、HDLECs (5.0 × 10⁴ cells/200 μL/well) を播種し、EBM-MV2 を用いて 24 時間、37 °C で培養した。ゲル化促進のため、氷冷下において、正常コラーゲンおよび紫外線照射コラーゲン (1 mg/mL) を正常コラーゲン (3 mg/mL) と 3:1 で混合し、75 % 正常コラーゲンおよび紫外線照射コラーゲンを調製した。その 75 % 正常コラーゲンおよび光老化コラーゲンと 5 × Dulbecco's Modified 4 Eagle's Medium (DMEM) の混合液 (4:1) を細胞上に添加した。コラーゲン溶液が固まった後、EBM-MV2 (1 % FBS 含有) を添加した。HDLECs の管腔形成は、顕微鏡 (ECLIPSE Ti2 microscopy, Nikon 社製) 下にて経時的に観察した。

ii) 紫外線照射コラーゲン存在下におけるリンパ管内皮細胞の遊走評価

細胞遊走試験は、Vang Mouritzen と Jenssen の方法に準じて実施した⁽³⁾。すなわち、予め上記の方法 2 に準じて正常および光老化コラーゲンでコートした 96 well plate に Oris Cell Migration Assay Kit 付属のシリコン樹脂製ストッパーを各 well に装着し、HDLECs (3.0 × 10⁴ cells/well) を播種した。24 時間後、ストッパーを除去し、Mitomycin C (5.0 μg/mL) を添加して 1 時間、37 °C でインキュベートした。細胞を EBM-MV2 (1% FBS 含有) で洗浄後、calcein-AM (0.1 μM) を添加して 30 分、37 °C でインキュベートした。EBM-MV2 (1% FBS 含有) で洗浄後、同培地にて処理した。ストッパー装着による無細胞エリアに遊走してくる蛍光標識した HDLECs を顕微鏡 (ECLIPSE Ti2 microscopy) 下において 24 時間経時的に観察した (励起波長: 490 nm、蛍光波長: 515 nm)。HDLECs の移動面積は Image J software を用いて定量的に測定した。

iii) 紫外線照射コラーゲン存在下におけるリンパ管内皮細胞での β1-integrin のタンパク質産生

正常および紫外線照射コラーゲン溶液 (1 mg/mL) と酢酸 (5 mM) を 1:9 で混合して 24 well plate にコートした。その後、HDLECs (5.0 × 10⁴ cells/200 μL/well) を播種し、EBM-MV2 を用いて 24 時間、37 °C で培養した。培地を EBM-MV2 (1% FBS 含有) に置換し、24, 48 時間後に Lysis Buffer を用いて細胞を回収し、Western Blotting により β1-integrin のタンパク質産生を解析した。

4. 研究成果

紫外線照射コラーゲンの作製

UVB 照射エネルギー依存的にコラーゲンに相当するバンドが消失することが確認された (Fig. 1)。また、DNPH assay 法によるカルボニル測定では、UVB 照射エネルギー依存的にコラーゲン中のカルボニル化が有意に促進された。したがって、紫外線照射は、エネルギー依存的に直接的なコラーゲンの断片化のみならず、そのカルボニル化を促進することで、光老化でのコラーゲンを生成するものと示唆された。

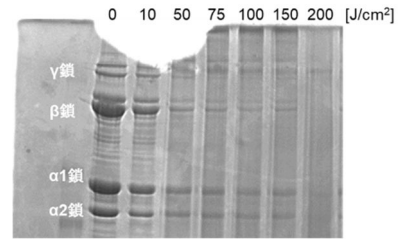


Fig. 1 紫外線照射によるコラーゲン分解

リンパ管内皮細胞に対する紫外線照射コラーゲンの作用

i) 紫外線照射コラーゲンによるリンパ管の管腔形成評価

正常コラーゲン存在下と比較し、紫外線照射コラーゲン (10-200 J/cm²) 存在下ではリンパ管管腔形成抑制が観察された (Fig. 2A)。画像解析の結果、管腔の数は、24 時間後において紫外線照射コラーゲン存在下では減少した。また、48 時間後においては紫外線照射コラーゲン存在下では管腔形成遅延に伴ってその数が有意に増加した。一方で、正常コラーゲンでは 48 時間時点において管腔が崩壊した。したがって、紫外線照射コラーゲン存在下では管腔を緩徐に形成する可能性が示唆された。

ii) 紫外線照射コラーゲンによる細胞遊走評価

正常コラーゲン存在下と比較して紫外線照射コラーゲン存在下では、Gap Closure Assay での検出領域における細胞数の減少が観察された。また、画像解析の結果、紫外線照射コラーゲンコート上 (200 J/cm²) では有意に細胞遊走活性を抑制することが判明した (Fig. 2B)。したがって、HDLECs の細胞遊走は、紫外線照射コラーゲンの存在によって減弱されるものと考えられた。

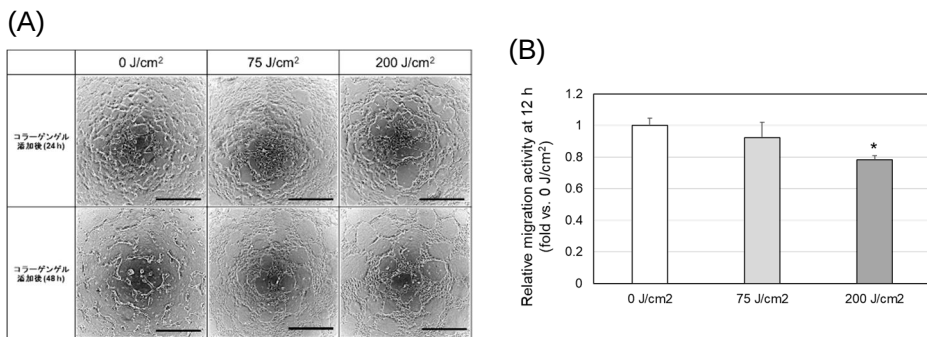


Fig. 2 HDLECs に対する紫外線照射コラーゲンによる管腔形成および細胞遊走への影響

iii) 紫外線照射コラーゲン存在下におけるリンパ管内皮細胞での $\beta 1$ -integrin のタンパク質産生

i), ii) の結果より、紫外線照射コラーゲンは、リンパ管内皮細胞の管腔形成、細胞遊走を抑制させた。すなわち、紫外線による細胞外マトリックス改変は、リンパ管の機能に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。細胞表面にはコラーゲンを認識する受容体として細胞接着因子である integrin が存在し、細胞の接着、移動、増殖、組織修復などの様々な生理作用を示すことが知られている⁽⁴⁾。型コラーゲンにおけるリンパ管の出芽や管腔形成の促進には、細胞接着因子である $\alpha 1\beta 1$ および $\alpha 2\beta 1$ -integrin が関与することが報告されている^(5,6)。したがって、紫外線照射コラーゲン存在下でのリンパ管内皮細胞において、 $\beta 1$ -integrin の局在発現を検討することは非常に重要であると考え、本分子に着目した。紫外線照射コラーゲン存在下におけるリンパ管内皮細胞の $\beta 1$ -integrin のタンパク質産生について Western Blotting を用いて解析した。その結果、正常コラーゲン存在下と比較して紫外線照射コラーゲン存在下では、リンパ管内皮細胞における $\beta 1$ -integrin のタンパク質産生が抑制される傾向を示した。

以上の結果から、紫外線照射は 型コラーゲンの変性・断片化、 $\beta 1$ -integrin のタンパク質産生減少を介してリンパ管管腔を緩徐に形成する可能性が示唆された。本研究結果として、光老化におけるコラーゲンとリンパ管形成との関連性を明らかにしたことは、しわ・たるみを兆候とした光老化の分子機構解明およびリンパ管を標的としたアンチエイジング製品の新規開発に貢献するものと期待される。

<引用文献>

1. Okuyama K. et al. *Microvasc Res.* 2022
2. Watanabe K. et al. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1999
3. Vang Mouritzen M, Jenssen H. *J Vis Exp.* 2018
4. Takada Y et al. *Genome Biol.* 2007
5. Kumaravel S et al. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020
6. Hong YK et al. *FASEB J.* 2004

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 奥山勝揮、佐藤 隆
2 . 発表標題 環状ホスファチジン酸および血管内皮細胞増殖因子Cによるリンパ管形成調節の分子機構
3 . 学会等名 第95回 日本生化学会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Katsuki Okuyama and Takashi Sato
2 . 発表標題 Augmentation of lymphangiogenic actions by cyclic phosphatidic acid through LPA 1/3/6 pathways in human dermal lymphatic endothelial cells
3 . 学会等名 日本研究皮膚科学会 第47回年次学術大会・総会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Katsuki Okuyama, Kohei Yamazaki and Takashi Sato
2 . 発表標題 Inhibition of the lymphangiogenic actions of human dermal lymphatic endothelial cells in UVB-denatured type I collagen in vitro
3 . 学会等名 25th World Congress of Dermatology Singapore 2023（国際学会）
4 . 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------