

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K19698

研究課題名(和文)皮膚老化ホルモンの研究

研究課題名(英文)A study of a peptide which induces skin aging

研究代表者

國本 梨沙(Kunimoto, Risa)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20468094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SIRT1酵母ホモログは酵母寿命を延ばす。SIRT1と寿命や老化の関係を調べる為、DNAマイクロアレイ法を用いて、SIRT1活性化により抑制され、逆にSIRT1抑制により発現量が3倍に増加する分子プロラクチン様ペプチド 2c3(PrI2c3)を見出した。そこでPrI2c3を上皮でのみ過剰発現するトランスジェニックマウス(PrI-TGマウス)を作成した。このマウスは皮膚老化の兆候の1つである皮膚菲薄化と皮下脂肪の増加を起こした。このことから、肥満や皮膚老化の背景にホルモン様分子が存在する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでPrI2c3は細胞老化や脂肪の増加を起こすという報告はない。本研究により肥満や皮膚老化を誘導する体内分子が存在することが明らかになる可能性があり、PrI2c3と各種疾患や肥満との関係が明らかとなり、新たな病態メカニズムの解明や病態診断、治療法開発に繋がる可能性がある。皮膚老化の抑制は高齢者の皮膚脆弱による外傷の抑制や美容上の応用などが考えられる。これらのことは本研究の進展が医学・生物学的のみならず社会的にも貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：SIRT1, which is highly homologous to yeast silent information regulator 2, and is studied as the lifespan-extending gene. Using the DNA microarray method, we found prolactin like peptide 2c3(PrI2c3) which are controlled by SIRT1 activation, and expression increases to 3 times adversely by SIRT1 knockdown.

We thought that there were hormone-like molecules in the background of obesity and the skin aging.

研究分野：医歯薬学

キーワード：皮膚老化 SIRT1 PrI2c3 皮下脂肪 トランスジェニックマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚は年齢により進行していく老化に加えて紫外線による老化がおきる。老化では皮膚の菲薄化、皮下脂肪層の増加、皮下脂肪細胞の大型化と不整形、コラーゲンの断片化などが見られ、同時に皮膚の皺や着色、シミなどが見られるようになる。紫外線による皮膚老化は日に当たる顔や首などに起きやすく、紫外線により活性酸素種 (ROS) が増加することが老化に大きな役割を果たす (Rittie & Fisher, 2015)。

申請者はタンパク質脱アセチル化酵素 SIRT1 を研究している。SIRT1 が核と細胞質をシャトルする (Tanno ら JBC2007, citation 382) SIRT1 のシャトルが神経幹細胞の神経細胞分化に重要 (Hisahara ら PNAS2008, 表紙に採用, citation 157) ストレス下 SIRT1 は核に移行して FOXOs を介して抗酸化酵素の誘導に働き細胞を保護し (Tanno ら JBC2010, citation 213)、また、p53 を脱アセチル化して細胞死を抑制 (Hori ら PLOS ONE 2013, citation 129)、細胞質 SIRT1 活性化がオートファジーにより障害ミトコンドリアを除去し酸化ストレス低減 (Morselli ら JCB2011, citation 251、Kuno ら 2018, Sebori ら 2018)、SIRT1 活性化作用をもつレスベラトロールが筋ジストロフィー治療に有効 (Hori ら JPET2011, citation 75, 他)、SIRT1 が脱アセチル化を介して転写コファクター p300 を分解させ、心筋肥大や組織線維化を抑制 (Kuno ら JBC2013) SIRT1 がフォスファチジルイノシトール 3 リン酸の形成分解を介して、細胞膜の変形とがん細胞の移動に関与 (Kunimoto ら JID2014) などを研究してきた。

SIRT1 酵母ホモログは酵母寿命を延ばす。そこで、SIRT1 と寿命や老化の関係を調べる為、DNA microarray 法を用いて、マウス一次培養皮膚線維芽細胞 (MEF 細胞) において細胞老化により増加し、SIRT1 活性化により抑制され、逆に SIRT1 knockdown により発現量が増加する分子 Prolactin like peptide2c3 (PrI2c3) を見出した。

2. 研究の目的

酵母等で寿命を延ばす働きを示す長寿遺伝子 (サーチュイン) の 1 つ SIRT1 によって発現が制御されている Prolactin like peptide 2c3 (PrI2c3) の発現制御の仕組みや生理的な機能を調べ、そのことを目的とする。特に、皮膚に注目してその働きを調べる。

3. 研究の方法

PrI2c3 の発現系の構築。

PrI2c3 の cDNA を分離して発現ベクターに入れ、培養細胞系での発現系を作成する。また、大腸菌内での発現系を同様に構築する。

PrI2c3 の抗体の作成。

PrI2c3 とその配列を持つ合成部分ペプチドを抗原として、ウサギおよびモルモットを用いて抗体を作成する。

PrI2c3 の組織分布の検討。

RT-PCR を用いて、組織での発現を検討する。また、作成した PrI2c3 の抗体を用いた組織免疫化学的方法により組織での分布について検討する。特に皮膚組織について検討する。

PrI2c3 の機能の検討。

マウス胎児皮膚組織より mouse embryonic fibroblast (MEF) 細胞を分離して、MEF 細胞に対する機能を検討する。また、PrI2c3 を過剰に発現するトランスジェニックマウスを作成し、生体での機能を調べる。特に皮膚について検討する。

4. 研究成果

MEF 細胞の RNA を用いて PrI2c3 の全長 cDNA をクローン化した。この cDNA を pIRES-hrGFP ベクターを用いて培養細胞系で PrI2c3 を発現するプラスミドを作成した。また、PUC8 ベクターに cDNA を組み込み大腸菌での発現系を構築した。

上記の培養細胞系での発現系で PrI2c3 の発現を確認した。PrI2c3 は培養細胞 (COS 細胞) の細胞体とともに培養上清にも検出され、PrI2c3 が分泌タンパク質であることが判明した。

一方、大腸菌での発現も行ったが、大腸菌で発現された PrI2c3 の安定性が非常に悪く、精製が困難であることが判明した。

PrI2c3 の抗体はウサギを用いて作成した。この抗体は上記の発現系で作成した PrI2c3 のタンパク質を認識することを Western blot 法で確認した。また、モルモットで作成した抗体も機能することが判明した。

作成した PrI2c3 の抗体を用い、特に発現量が多いことが判明した皮膚組織にて免疫組織化学法でその発現を検討した。その結果、PrI2c3 の発現は皮膚の表皮に極めて限定的に発現することが判明した。発現細胞を詳細に解析したところ、PrI2c3 は 4 層からなる表皮の一番下に存在する基底細胞に発現することが判明した。

上記の培養細胞系で発現させた PrI2c3 の安定性は、大腸菌で発現させたものと同様に極めて悪いものであった。PrI2c3 に flag-tag を結合させたクローンをを用いて、flag 抗体レジンによる精製をおこなった。その収量は 1 L 培地から数十マイクログラム程度であった。

精製した PrI2c3 をマウス MEF 細胞に作用させて PrI2c3 の機能と制御機構を検討した。PrI2c3 は細胞増殖作用をもつペプチドの仲間であることから、細胞増殖について検討したが、細胞増殖作用は MEF 細胞で検出されなかった。一方、細胞老化について MEF 細胞は PrI2c3 の作用によ

て細胞増殖を停止し老化関連ガラクトシダーゼ (SA-β-gal) の発現が見られるようになった。RT-PCR 法で検討したところ、Pr12c3 は PAI1 と IL-6 の発現を極めて強く増強した。PAI1 と IL-6 は老化関連タンパク質とも言われていることから、SA-β-gal の発現増強も併せて、Pr12c3 は細胞老化を MEF 細胞に起こす可能性が考えられた。

Pr12c3 は SIRT1 により発現制御される可能性があるため、SIRT1 阻害薬のニコチンアミド、EX-527 を MEF 細胞に作用させると Pr12c3 の発現が有意に抑制された。一方、SIRT1 活性化作用をもつポリフェノールのレスベラトロールを MEF 細胞に作用させると、Pr12c3 発現は有意に減少した。このことから Pr12c3 は SIRT1 の活性を negative に制御することが判明した。さらにその制御機構を調べる為に Pr12c3 のコード領域上流 1kb をクローン化して、その発現制御の仕組みについてルシフェラーゼ遺伝子を下流に接続させたクローンを構築してルシフェラーゼアッセイを行った。しかし、SIRT1 の活性化薬、阻害薬共に作用が観察されず、1kb の上流領域には SIRT1 により制御を受ける機能がないと考えられた。

皮膚基底細胞に強い発現を Pr12c3 が示すことから、皮膚基底細胞で Pr12c3 を発現するプラスミドを構築した。基底細胞に発現することが知られている keratin 5 のプロモーター領域(約 1kb)の下流に Pr12c3 cDNA を持つプラスミドを構築して、理化学研究所との共同研究により Pr12c3 のトランスジェニックマウスを作成した。

flag 抗体を用いて、このマウスの皮膚に Pr12c3-flag が発現することを確認した。さらに、このマウスを用いてその発育、皮膚、毛について正常マウス (WT) と比較検討した。加齢による皮膚老化現象の指標として真皮層の菲薄化があるが、Pr1-TG マウスでは同年齢のコントロールマウスに比べて、HE 染色では表皮については特に正常マウスとの違いは見られなかったが、真皮層が有意に菲薄化することを認めた。また、皮下脂肪に増加を認めた。真皮層、皮下脂肪層については厚さに違いが生じていたので、さらに、マッソントリクローム染色、ペリリピン染色も行い比較検討した。皮下脂肪組織の個々の大きさについても比較検討した。真皮内については線維芽細胞数や蛍光試薬 - ガラクトシダーゼ染色による老化細胞の違いは見られなかった。今後、さらにこのマウスを調べて Pr12c3 の機能、特に老化との関連性を調べていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----