

令和 4 年 10 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16602

研究課題名(和文)細胞老化解析による汗腺老化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of sweat gland aging mechanism by cellular senescence analysis

研究代表者

早川 智久(Hayakawa, Tomohisa)

大阪大学・薬学研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：60773132

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)：本研究課題は汗腺老化のメカニズムの解明を目指すものである。1.汗腺の老化原因因子を明らかにし、汗腺老化の原因となる分子的变化を解明する。2.汗腺器官を模した評価モデルを利用して汗腺老化のメカニズムを明らかにする。

1.汗腺組織における老化因子の変化を解明するにはRNAの発現解析の必要があると分かった。今後、汗腺の機能低下に関わっている可能性が高い因子の発現解析を行なう。2.汗腺の老化メカニズム解析のための評価系として性質が安定している不死化汗腺細胞を樹立した。樹立した不死化細胞は生体内での汗腺の筋上皮細胞の性質を保持していた。現在その細胞を用いて老化因子の機能を検討する手法について構築中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは身体の冷却機能を汗腺に依存している。その機能低下あるいは損失は体温の調節機能の損失を引き起こし、各種疾病を誘発する。高齢者において熱中症になる割合が多い原因のひとつとして老化に伴う汗腺の機能低下がある。本研究は汗腺の老化に伴う分子、細胞レベルでの変化を明らかにすることで老化に伴う汗腺機能低下のメカニズムを解明することを目的としている。本研究成果は汗腺老化を抑制し、熱中症の発症、重篤化を防ぐ新規治療法を確立するためのターゲット、作用機序の候補を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research project aims to elucidate the molecular and cellular mechanisms underlying sweat gland aging. (1)Elucidating the cause of sweat gland aging, and reveal the molecular modification in sweat gland aging. (2)Establish a sweat gland evaluation model mimicking sweat gland organ. After that, reveal the aging mechanisms in sweat gland by elucidating molecular change through sweat gland aging using the evaluation model.

(1)It was revealed that RT-PCR analysis is needed to examine the aging factors modification in sweat gland tissues. In the future, we will analyze the aging factors that may be relate to sweat gland dysfunction with aging. (2)We generated immortalized sweat gland myoepithelial cells as a stable experimental systems. Established immortalized cells maintained the in vivo phenotypes of myoepithelial cell. Now, I am constructing the methods to investigate aging factors using immortalized sweat gland cells.

研究分野：老化基礎科学

キーワード：老化 汗腺

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

・ヒトは身体の冷却機能を汗腺に依存している。その機能低下あるいは損失は体温の調節機能の損失を引き起こし、各種疾病を誘発する。高齢者において熱中症になる割合が多い原因のひとつとして老化に伴う汗腺の機能低下がある。近年、高齢化人口の増加に伴い熱中症を発症する高齢者の数が増加している。

2. 研究の目的

本研究は汗腺の老化に伴う分子、細胞レベルでの変化を明らかにすることで老化に伴う汗腺機能低下のメカニズムを解明し、新規の熱中症治療法の確立に寄与することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究は主要な2つの研究プロセスから成る。

(1). 汗腺の老化因子の同定

各年齢の組織を比較解析することにより汗腺の老化原因因子を明らかにし、汗腺老化の原因となる分子的、細胞的变化を明らかにする。

(2). 汗腺評価モデルの構築

汗腺評価モデルを構築し、その評価モデルを利用して汗腺老化における分子動態を解明することで汗腺老化のプロセスを明らかにし、汗腺機能の回復方法の開発へ発展させる。

4. 研究成果

(1). 汗腺の老化因子の同定

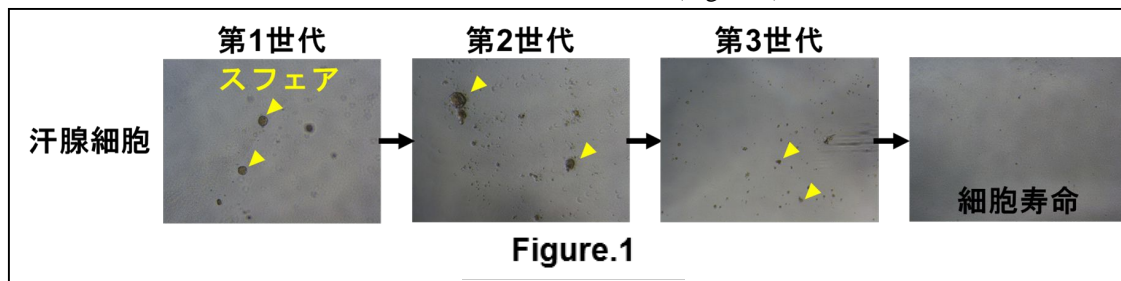
各年齢の汗腺組織の分子的解析(RT-PCRによる遺伝子発現解析)、細胞的解析(分化、老化マーカーの免疫染色による解析)により加齢に伴う汗腺の老化関連遺伝子の発現変化、あるいは分化、細胞老化の変化を明らかにしようと試みた。過去の研究から、汗腺では細胞老化マーカーの β -Galを染色した場合、年齢非依存的に管腔細胞が染まることが知られている。私は今回、 β -Galを蛍光で染色する方法を用いて、細胞老化の発現(β -Galの発現)を検出できるか、また加齢による変化があるかを検討した。しかしながら蛍光染色を用いても β -Gal発現の加齢による変化は汗腺で検出できなかった。

以上のことから汗腺における老化因子の発現、老化細胞の発生を検出するには別の方法を用いる必要がある。具体的な手法としてはRNA発現をRT-PCRで解析し、老化因子の発現を検出する方法である。各年齢の皮膚組織から取り出した汗腺組織からRNAを抽出し、p16、p21、Ki67の老化因子の発現差を検討する。現在、若年齢組織からのサンプルおよび高齢組織からのサンプル両方を取得している。各グループで十分な量の検体数が確保できたら、RNAの発現の解析を行なう。また、汗腺は幹細胞の枯渇による老化を引き起こしている可能性が高いため、幹細胞の枯渇を誘導するプロテアーゼ分泌についても検討する。今後、収集した各年齢組織のサンプル解析により汗腺組織での老化因子の変化とその影響を検討していく。

(2). 汗腺評価モデルの構築

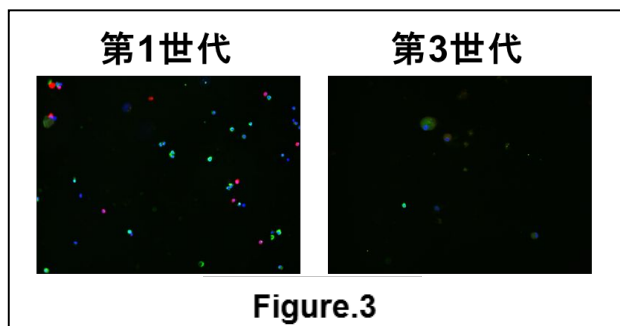
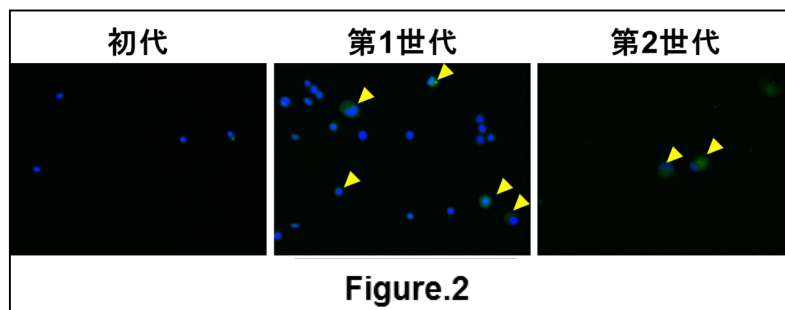
汗腺老化のメカニズムを解明する上で、安定した汗腺評価系の作成が必要であった。既存の汗腺の培養細胞は分化を誘導する接着環境で培養されているため、分化が進行し、汗腺の幹細胞である筋上皮細胞を保持していないことが示唆されていた。最近、汗腺細胞をスフェロイド状態で浮遊培養することにより、筋上皮細胞を保持して汗腺細胞を培養できることが明らかになった。私はこのスフェロイド培養の汗腺細胞系を更に発展させることで安定した汗腺評価モデルの構築を目指した。

スフェロイド培養による汗腺細胞の変化の検討を行なった。多くのプライマリー細胞は長期間培養を行なうと、その増殖を停止させる。私は汗腺のプライマリー細胞がスフェロイド培養下で、どの程度の期間、培養可能かを検討した。複数の検体由来の汗腺細胞でスフェロイド培養を行なったところ、スフェロイド培養下で汗腺細胞は3-4回程度の継代培養で細胞の増殖およびスフェロイドの形成を止めることが明らかになった(Figure.1)。

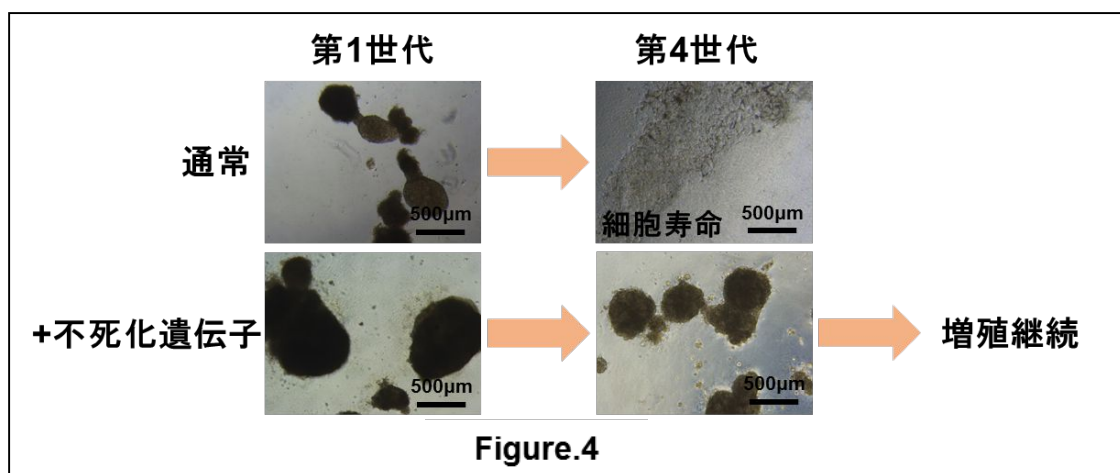


スフェロイド培養を行なった汗腺細胞が培養を停止する原因を検討した。一般的にプライマリー細胞が細胞増殖を停止させる原因は増殖ストレスによる細胞老化の誘導である。継代に伴う汗腺細胞の細胞老化の進展を老化細胞マーカーである β -Galを指標に解析した。継代培養を進めると共に汗腺細胞内の β -Galポジティブ細胞の比率が増えることが明らかになった

(Figure.2)。このことから汗腺細胞の増殖停止は細胞老化の進行が原因の1つであると考えられる。また継代に伴う分化の進展を調べたところ、増殖が停止する寸前では培養細胞のほとんどが分化していた(Figure.3)。継代に伴い、汗腺細胞の分化と細胞老化の進行が増殖を停止させるものと考えられる。今後汗腺における細胞老化と分化の相互関係を検討する必要がある。



スフェロイド培養下で筋上皮細胞としての性質を維持しながら無制限に増殖できる不死化筋上皮細胞の樹立を目指した。筋上皮細胞は幹細胞としての性質を持つ、筋上皮細胞の不死化細胞を樹立できれば汗腺の構造と機能を再現した評価系の作成が可能になる。第一に筋上皮細胞を含む汗腺細胞に対してレンチウイルスを用いて不死化遺伝子を導入し、継代寿命の延長を試みた。複数種の不死化遺伝子を単独あるいは複合的に用いて継代寿命の変化検討したところ、hTERTとSV40を複合導入することでスフェロイド培養下の汗腺細胞の継代寿命および増殖回数の増加に成功した(Figure.4)。このことからhTERTとSV40の複合使用によってスフェロイド培養下の汗腺細胞の不死化が可能である。また不死化した汗腺細胞は筋上皮細胞特有のマーカーを発現していた。従って、不死化筋上皮細胞の樹立に成功した。こうして樹立した不死化筋上皮細胞を用いることで汗腺老化関連因子の効果および細胞内での動態を明らかにできる。今後、樹立した不死化筋上皮細胞から作成する評価系により汗腺老化因子の作用メカニズムを明らかにし、その知見から新規の汗腺機能の制御法を確立していく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

早川 智久 他、汗腺機能評価モデル構築に向けた不死化汗腺筋上皮細胞の樹立、第 26 回日本発汗学会総会 神戸 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：不死化汗腺筋上皮細胞

発明者：早川智久、倉田隆一郎、藤田郁尚、岡田文裕、関口清俊

権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2018/029594
出願年：平成29年
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。