

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 19 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. 研究計画の概要

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、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依然として不明であり、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。

申請者らは、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・粗造化及び乾燥の皮膚老化症状と跛行など膝関節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。

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、その病態の分子機構を解明する。しかもこのマウスをアンチエイジング効果判定動物として活用し、新規アンチエイジング医薬の発掘・開発を行う。

2. 研究の進捗状況

本マウスの皮膚はHA減少のため角層水分含量の低下が著明であった。皮膚の弾力、メラニン産生能、炎症の誘発等に変化はなかった。関節軟骨は軽度で菲薄化し、膝の跛行を反映した。組織学的に表皮及び真皮のHAの著明な低下と、角化の亢進を認めた。事実、表皮分化マーカーのケラチン14は増強し、ケラチン1は低下した。真皮ではVII型コラーゲンの発現低下を認めた。我々はVII型コラーゲン低下は皮膚老化に関与することを見出しており、本マウスにも影響していると考えた。

MUによる老化症状の分子機構解析のため、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HAS2とRHAMMの発現のみがMUにより抑制されていた。しかも両遺伝子は転写レベルで発現が抑制していた。

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により発現が抑制するものの61種を見出した。toll-like receptor 3の減少は著しく、皺形成や炎症誘発に関与する可能性を考えた。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。申請者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。

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、外用効果は全くなかった。老化関連遺伝子の生体皮膚への導入も効果を示さず、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が必要と考えた。

3. 現在までの達成度

MUによるHAの産生抑制の根本がHAS2とRHAMMの発現抑制であることは明らかにできた。両遺伝子とも転写制御を受けており、完結はできなかったが、ある程度のMU応答配列と結合する転写因子の存在までは確認できた。また網羅的解析によって病態に強く関

わるとされる遺伝子の候補を見出すことができた。老化治療であるが、HAの内服、外用は全くアンチエイジングに無効であること、皮内投与のみ効果を認めることを見出した。しかし、本マウスの病態形成に関わる遺伝子の生体皮膚の導入ではアンチエイジング効果を見出すことができておらず、効果発現には複数の遺伝子の組み合わせが必要と考え、この点はこれまでも解決できておらず、平成23年度以降の課題としたい。

現在 luciferase assay 及び gel shift assay に MU の応答配列及び転写因子の解析を行っている。

4. 今後の研究の推進方策

①現在 MU によるケラチン 5/14, 1/10, 9 の発現変動の解析から表皮の分化促進機構の解明。

②HAS-2, RHAMM 遺伝子の転写調節機構の解明

③網羅的解析で見出した本マウス老化関連遺伝子の発現調節機構の解析

③老化治療に有効な導入遺伝子の検索、特に複数の遺伝子の組み合わせ方法

5. 代表的な研究成果

(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7件)

Yoneda 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.

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

Kon A: Hyaluronan in the skin and its correlation with dermatopathology. *Trends in Glycosci Glycotecnol*, 22, 68-79, 2010.

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

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.

今 淳: ヒアルロン酸ノックダウンマウスの開発及び病態解析への適用炎症再生 28:41-46, 2008.

今 淳: 最近の抗老化/抗酸化研究と抗老化剤の開発ー皮膚の老化研究の最新動向, *Fragrance J* 36:18-25, 2008.

[学会発表] (計9件)

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19-20日, 秋田

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. 12.

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.

山口真範, 高垣啓一, 柿崎育子, 今 淳, 遠藤正彦: 新規なプロテオグリカン糖鎖工学: コンドロイチン硫酸含有分子の化学-酵素的合成とその応用, 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10.

今 淳: 閉経後女性のヘルスケアのための新展開 皮膚の老化, 第24回日本更年期医学会学術集会, 2009.10 (ワークショップ)

Kon A: Skin aging and extracellular matrix. Korean photobiology meeting, Seoul, June 20, 2009 (招待講演)

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. 5. 28

今 淳, 五十嵐愛美, 諸橋 一: 4-メチルウンベリフェロン誘導体: 悪性腫瘍のヒアルロン酸合成及び転移に対する抑制効果の比較検討, 第29回日本炎症・再生医学会, 東京, 2008. 7.

大鹿周佐, 上里涼子, 石橋恭之, 今 淳, 楠美智巳, 鬼島 宏, 高垣啓一, 藤 哲: 組織

工学的手法を用いた関節軟骨修復への糖鎖
の応用, 第2回東北糖鎖研究会, 弘前, 2008.
9.