

脂肪組織をターゲットにした新たな抗老化戦略の開発

－皮膚における皮下脂肪組織の新たな機能解明－

【助成対象者】

Department of Dermatology, University of California San Francisco (USA)

金 英一

【共同研究者】

Department of Dermatology, University of California San Francisco

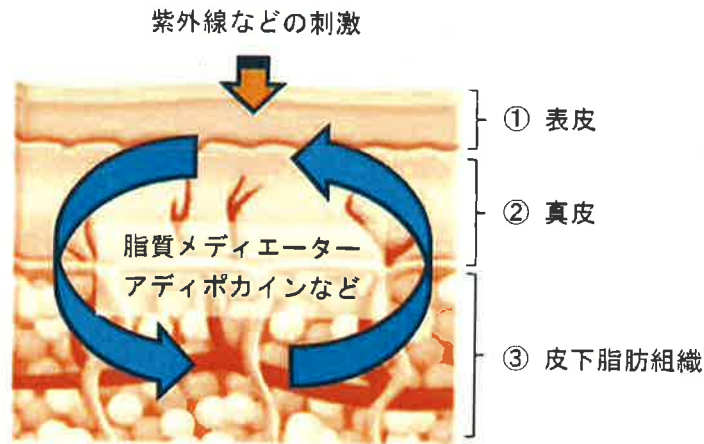
Yoshikazu Uchida

【研究の目的】

「いつまでも若々しく健康で在りたい」。これは人々の願いであり、高齢化社会となった現在、老化に対する問題は深刻な社会的課題である。特に、皮膚は多様な外部環境やストレスに速やかに反応し、生体の恒常性維持に貢献するバリア組織であることから、老化に伴う皮膚機能の破綻は、見た目だけでなく生体内部の機能破綻にもつながる。したがって、「皮膚の抗老化」は極めて重要な研究課題である。

皮膚は、①表皮、②真皮、③皮下脂肪組織の3層から構成されている（概略図）。表皮および真皮は、スフィンゴ脂質を始めとする様々な脂質を分泌し、その脂質メディエーターを介して皮膚の恒常性維持に深く関与することが知られている。一方、皮下脂肪組織は、最近まで皮膚において単なるエネルギー貯蔵庫として考えられてきた。しかし近年、脂肪組織（特に内臓脂肪組織）は、アディポカインと総称される生理活性物質を分泌して、生体の代謝機能を積極的に制御する組織であることが明らかになってきた。これら事実から、皮下脂肪組織が皮膚の恒常性維持に関与する可能性が新たに推察される。しかし、その関与は未解明な部分が多い。

そこで本研究では、皮膚の恒常性維持における皮下脂肪組織の新たな機構を解明することを目的とした。これらの研究成果から、皮下脂肪細胞をターゲットとした新たな抗老化戦略の立案を目指す（概略図）。



【概略図】脂質メディエーターを介した皮膚における恒常性の維持機構の解明
表皮/真皮-皮下脂肪組織の新たな相互作用機構の解明を行い、皮下脂肪組織を
ターゲットとした新たな抗老化戦略の立案を目指した。

【研究の成果】

研究1：皮膚における脂肪細胞の生理作用の解明

＜研究目的＞

前述の通り、脂肪細胞はアディポカインと称される様々なサイトカインや液性因子を分泌することで、他組織における代謝を制御する。このような研究から、皮膚（表皮や真皮）に対しても脂肪細胞が作用・制御しうる事が推察されるが、皮下脂肪細胞のこのような役割については明らかにされていない。そこで、皮膚（表皮および真皮）においては、未だ明らかにされていない皮下脂肪の生理的役割を解明することを目標とした。肥満（皮下脂肪組織の増加）に伴い皮膚の弾性が減少するとの研究から、本研究1では、特に皮膚の弾性に関わる因子の一つであるコラーゲンに注目し、脂肪細胞（脂肪細胞が分泌する液性因子）がコラーゲン発現に与える影響を検討した。

＜研究方法＞

○ 細胞培養および共培養

細胞はマウス由来培養前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞、マウス由来培養マクロファージ (Mφ) 株 RAW 細胞、およびマウス由来繊維芽細胞株 NIH-3T3 細胞を用いた。3T3-L1 細胞は常法により分化させ、十分に脂肪滴を蓄積させた。分化誘導後 20 日目に無血清培地に交換し、その 24 時間後培養上清を回収した。この培養上清を Conditioned Medium with L1（以下、CM-L1）とする。

○ 共培養

分化誘導後 20 日目の 3T3-L1 細胞と RAW 細胞を無血清培地下で 24 時間共培養した。この培養上清を Conditioned Medium with co-culture（以下、CM-Co）とする。

○ mRNA 測定

NIH-3T3 細胞を各培養上清 (CM-L1 および CM-Co) にて 24 時間培養し、リアルタイム定量 PCR 法によりコラーゲン遺伝子 *Collagen-1a (Col1a)* mRNA の発現量を測定した。

○ 培養上清のフィルター処理

本研究では、陽イオン交換や陰イオン交換フィルターなど、以下の 5 種類のフィルターを用い、培養上清 (CM-Co) に含まれる液性因子の解析を試行した。①ゲル濾過フィルター、②シリカゲルフィルター、③糖鎖吸着フィルター、④陽イオン交換フィルター、⑤陰イオン交換フィルター。

【結果と考察】

1-1) 脂肪細胞は液性因子を介して融持芽細胞のコラーゲン発現を制御する

真皮コラーゲン産生に及ぼす脂肪組織の影響を調べるため、CM-L1 を繊維芽細胞に処理し、*Colla* mRNA 発現量を測定した。その結果、CM-L1 添加により、*Colla* mRNA 発現が顕著に減少した (図 1A)。この結果から、脂肪細胞は何らかの液性因子を介して繊維芽細胞のコラーゲン発現を遺伝子レベルで制御することが示唆された。

次に、過度な肥満状態が繊維芽細胞のコラーゲン発現に与える影響を検討した。過度な肥満状態では、脂肪組織に Mφ が浸潤し、慢性的な炎症状態が惹起する事が明らかになっている。そこで、3T3-L1 脂肪細胞と RAW マクロファージ細胞との共培養を用いた *in vitro* での炎症状態を作成し、この共培養した培養上清 (CM-Co) を繊維芽細胞に処理した。その結果、CM-Co を処理した *Colla* mRNA 発現は、CM-L1 処理よりもさらに減少した (図 1B)。以上の結果から、過度な肥満状態 (特に Mφ が浸潤し炎症状態を惹起するような肥満状態) では、繊維芽細胞のコラーゲン発現が抑えられることが示唆された。

さらに、培養上清に含まれ、コラーゲン発現に影響を及ぼす液性因子の解析を行なった。用いた培養上清 (CM-Co) を様々なフィルター (“研究方法” を参照) に通し、コラーゲン発現抑制作用に対する影響を調べた。その結果、陽イオン交換フィルターを通した培養上清では、*Colla* mRNA 発現が抑制されなかった。一方、その他のフィルターを通した培養上清では、*Colla* mRNA 発現の抑制が認められた。この結果から、脂肪細胞から分泌される液性因子は、陽イオンを帯びた分子である可能性が推察された (図 2)。現在、液性因子を同定するべく、さらなる解析を行っている。

1-2) 脂肪細胞によるコラーゲン発現抑制に対するカテキンの作用

本研究では、緑茶に含まれるカテキン類に着目し、肥満によるコラーゲン発現抑制に対し有効な緑茶成分の探索を行なった。そこで、培養上清 (CM-Co) と共に 8 種のカテキン類 (Catechin (C), Catechin Gallate (Cg), Gallocatechin (GC), Gallocatechin Gallate (GCg), Epicatechin (EC), Epicatechin Gallate (ECg), Epigallocatechin (EGC), Epigallocatechin Gallate (EGCg)) を繊維芽細胞に添加し、*Colla* 発現に対する効果を評価した (図 3A)。その結果、EGC および EGCg を添加した群において、培養上清による *Colla* 抑制の阻害作用が認められた (図 3B)。一方、その他のカテキン類では効果は認められなかった (data not shown)。この結果から、カテキン類中 EGC および EGCg が、繊維芽細胞のコラーゲン発現抑制に有効であることが示された。

研究 2 : 抗菌ペプチド β -defensin 3 発現機構の解明

〈研究目的〉

皮膚は、セラミドを主成分とした細胞間脂質膜による物理的防御とともに、抗菌ペプチドを分泌する事で、外界からの様々な病原菌に対し化学的にも防御機能を果たしている。この抗菌ペプチドの中でも、特に human β -defensin 3 (hBD3) は幅広い種の細菌、真菌等に対し強い抗菌活性を示すことが知られており、hBD3 の発現異常が各種疾患に関与すると考えられている。例えば、アトピー性皮膚炎での皮膚患部では hBD3 の産生能が低下しているため細菌感染症が併発しやすい。さらに、老化に伴う hBD3 発現の減衰が、生体防御機能の低下に関与することが近年明らかにされつつある。そのため、感染防御を司る「hBD3 産生」は、「生体防御機能を強化」の面で、最も注目されている課題である。しかし、hBD3 の産生メカニズムについては、未だ十分に解明されていない。そこで、本研究 2 では、hBD3 発現メカニズムの解明を目的とした。

〈研究方法〉

細胞培養および解析方法

本研究 2 では、ヒト表皮由来初代ケラチノサイト (KC 細胞) を用いた。また、qPCR 法、ウエスタンブロット法、免疫染色法を用いて解析を行なった。

【結果と考察】

2-1) Ceramide-1 phosphate は hBD3 発現を制御する

皮膚は外的ストレス (紫外線など) に応じて、hBD3 発現を誘導することが以前より知られている。一方、我々の研究から、外的ストレスにより皮膚におけるセラミド含量が増加することが明らかになり、これら報告から、セラミドが hBD3 発現に関与する可能性が推察された。そこで、KC 細胞にセラミドを添加したところ、hBD3 mRNA 発現の増加が認められた (図 4A)。

生体内において、セラミドは Ceramide-1 phosphate (C1P) などに代謝されるが、これら代謝物も脂質メディエーターとして機能する事が近年明らかにされつつある。そこで、セラミドによる hBD3 発現増加が、セラミド自身であるのか、あるいは代謝物によるものかを調べるため、ceramide kinase (CERK、セラミドを C1P に代謝する酵素) の阻害剤をセラミドとともに KC 細胞に添加した。その結果、CERK 阻害剤は、セラミドによる hBD3 発現増加を顕著に抑えた (図 4B)。一方、直接 C1P を添加したところ、C1P の添加濃度依存的に hBD3 発現が増加した。以上の結果から、C1P は hBD3 発現を促進する事が示唆された。

2-2) C1P による hBD3 発現制御メカニズムの解明

次に、C1P による hBD3 発現制御メカニズムの解析を行なった。これまでの研究から、C1P は cytosolic phospholipase A2a (cPLA2a) を直接活性化し、アラキドン酸産生を促進することが明らかに

されている。このアラキドン酸は、cyclooxygenase (COX) により、さらに prostaglandin (PG) にまで代謝され、これら脂質メディエーターは細胞内シグナル伝達において重要な役割を担っている。そこで、hBD3 発現における cPLA2a および COX の関与を調べるために、cPLA2a および COX に対する各阻害剤を C1P とともに添加し、hBD3 発現に対する影響を調べた。その結果、cPLA2a および COX 阻害剤は、C1P による hBD3 発現増加を顕著に抑制した (図 4C)。これらの結果から、cPLA2a→COX 経路により産生される PG の関与が考えられたので、続いて hBD3 発現に対する各種 PG の作用を検討した。その結果、15-deoxy-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) 添加群でのみ hBD3 発現増加が認められた (図 4D)。以上一連の結果から、C1P は cPLA2a→COX→15d-PGJ₂ 経路を介して hBD3 発現を制御する事が示唆された。

さらに下流の hBD3 発現機構の解明を行なった。15d-PGJ₂ は peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) の内因性リガンドとして機能することが明らかとなっている。PPARs にはリガンド要求性転写因子であり、3つのサブタイプ(α、δ、γ)が存在する。そこで、hBD3 発現に対する PPARs の関与を検討するため、各 PPARs アンタゴニストを C1P とともに添加した。その結果、PPAR α および PPAR δ アンタゴニストは、C1P による hBD3 発現増加を顕著に抑制した (図 4E)。一方、PPAR γ アンタゴニストによる変化は認められなかった。以上の結果から、C1P は、cPLA2a→COX→15d-PGJ₂→PPAR α/δ 経路を介して hBD3 発現を制御する事が示唆された。

hBD3 遺伝子のプロモーター上には、signal transducer and activator of transcription3 (STAT3) を含む転写因子結合領域が存在する (PPAR 結合領域の存在は報告されていない)。そこで、hBD3 発現における STAT3 の関与を検討するため、STAT3 阻害剤を C1P と共に添加した。その結果、STAT3 阻害剤は、C1P による hBD3 発現増加を抑制した (図 5A)。STAT3 活性化にはチロシン残基のリン酸化が必要であり、リン酸化した STAT3 は核内へ移行、標的遺伝子の転写を促進する。そこで、ウエスタンブロッティング法および免疫染色法を用いて、C1P が STAT3 リン酸化および核内移行に与える影響を検討した。その結果、C1P により STAT3 のリン酸化および核内移行が認められた (図 5B、C)。さらに、STAT3 に対する C1P の作用は、PPAR α および PPAR δ アンタゴニストにより阻害された (図 5B、C)。以上の結果から、C1P は、cPLA2a→COX→15d-PGJ₂→PPAR/δ→STAT3 経路を介して hBD3 発現を制御する事が示唆された。

2-3) C1P-hBD3 発現の抗菌作用

C1P により発現増加した hBD3 が実際に抗菌作用を示すか検討した。そこで、C1P を処理したケラチノサイトの培養上清を *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌、皮膚の感染に関わる代表的なグラム陽性菌) に処理し抗菌性を評価した。その結果、C1P により抗菌作用が顕著に増加した (図 6A)。実際、C1P により培養上清中の hBD3 量が増加していたことから (図 6B)、C1P は hBD3 分泌を増加させる事により、皮膚において *Staphylococcus aureus* に対する抗菌作用を促進することが示唆された。

【今後の課題】

研究 1 : 皮膚における脂肪細胞の生理作用の解明

本研究では、皮下脂肪組織に注目し、真皮コラーゲン産生に与える脂肪細胞の影響とそのメカニズムの解明を目指した。その結果、①脂肪細胞は繊維芽細胞のコラーゲン産生を負に制御し、②過度な肥満においてはさらにコラーゲン産生が減少させ、③それは脂肪細胞から分泌される液性因子を介していることが明らかになった。さらに、④フィルター実験から、液性因子は陽イオンを帯びた分子である事が推察された。現在、この液性因子の単離・同定を行なっている。さらなる研究・解析が必要であるが、本研究成果は、皮下脂肪細胞が、皮膚老化において新たなターゲットとなりうることを示している。

また、本研究では、上記モデルを用いて有効な食品機能成分の探索も行なった。その中で、主要な茶カテキンである EGC および EGCg に肥満に伴うコラーゲン産生低下を阻害する興味深い効果が認められた。本成果は、構造活性相関の点から見ても興味深い。さらなるメカニズム解明が必要であるが、カテキンによるこのような効果は新たな発見であり、今後の展開が期待される。

研究 2 : 抗菌ペプチド B defensin 3 発現機構の解明

皮膚における抗菌ペプチドは、生体内への病原菌の侵入を第一線で防ぐ重要な防御物質である。疾患や老化において発現異常が認められる事から、抗菌ペプチドの産生メカニズム解明は重要である。本研究では、抗菌ペプチドの中でも、特に抗菌活性の強い hBD3 に着目し、その発現制御機構の解明を目指した。その結果、皮膚に含まれる C1P が hBD3 の発現を制御することが明らかになった。さらに、その詳細な制御機構（細胞内シグナル経路）を明らかにする事ができた。

これまでの先行研究から、肝臓において肥満に伴いセラミド含量が変化するとの報告があり、皮膚においても肥満に伴うセラミド含量の変化により、hBD3 発現に異常をきたす可能性が考えられる。今後の課題として、疾患や老化、肥満における C1P-hBD3 制御について、脂肪細胞を含めたさらなる研究が必要である。

【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

YI Kim et al. Mol Cell Biol. 2014. Dec;34(24):4368-78.