

論文の内容の要旨

論文題目 栄養と内分泌因子による皮膚中コラーゲンおよびヒアルロナンの代謝制御機構の解析

氏名 大石 祐一

ヒトは、何十兆という細胞によって構成されている。これらの細胞は、細胞間基質（細胞外マトリックス）によってお互いに結合し、サイトカイン、ホルモン等によって相互に連絡し、高度に分化した細胞が臓器・器官を構成している。この臓器として成人で 1.8m² もの面積を有しているのが皮膚である。皮膚には2つの大きな役割がある。1つは、生体内の水分の蒸散を抑制することであり、もう1つは、外界から生体を防御することである。

この役割を果たすために皮膚に存在する細胞は、コラーゲン、ヒアルロナンなどの細胞外マトリックスを合成、産生している。これらは、細胞の足場となり、また、細胞膜に存在するインテグリンを介して細胞を刺激し、これら細胞外マトリックスの合成の促進あるいは、これらを分解する酵素の合成を促進したりする。

とくにコラーゲンは、皮膚においては 75%を占めるが、タンパク質栄養条件やホルモンの影響について、分子レベルでの研究はなされていない。また、ヒアルロナンは、最近合成酵素がクローニングされたのみである。そこで、本研究は、タンパク質栄養条件の悪化およびホルモンの1つで皮膚疾患の治療薬として使用されているグルココルチコイドの投与が、コラーゲン、ヒアルロナン代謝にどのような影響を与えるのかについて分子レベルで解析することを目的とした。

(1) タンパク質栄養の悪化が皮膚コラーゲン代謝に与える影響

タンパク質栄養が真皮コラーゲンにどのような影響を与えるのかについて、12%カゼイン食(C食)をコントロールとして、12%グルテン食(G食)および無タンパク質食(PF食)で7日間給餌したラット背部皮膚を用いて、合成して間もないコラーゲンであるトロポコラー

ゲンと線維性コラーゲンに分けてそれらの量を western blotting 法にて測定し、皮膚一定面積当たりで検討した。

その結果、I型トロポコラーゲンおよびIII型トロポコラーゲン量は、PF食によって顕著に減少した。しかし、I型およびIII型線維性コラーゲンは減少しなかった。また、G食においてもC食に比してIII型トロポコラーゲン量は減少傾向を示した。

トロポコラーゲン量の減少の原因を検討するため、 $\alpha 1(I)$ および $\alpha 1(III)$ コラーゲンの mRNA 量を lysate RNase protection assay 法にて、コラーゲンのタンパク質量と同様に、皮膚一定面積当たりで測定した。その結果、C食に比してPF食で、有意な減少を示した。G食では $\alpha 1(III)$ コラーゲンで減少した。これらの結果からIII型コラーゲンの方がI型コラーゲンよりもタンパク質栄養の影響を受けやすいと考えられた。III型コラーゲンは、創傷治癒の際、I型コラーゲンよりも先に合成されるコラーゲンであることから、タンパク質栄養の悪化によって、III型コラーゲン合成量は減少し、創傷治癒の遅延の原因になっていることが示唆された。

一方、分解系であるコラーゲン分解酵素コラゲナーゼは不活性型(60 kDa)で分泌され、細胞外で活性化されるので(48 kDa)、それぞれについて western blotting 法にて測定したところ、PF食給餌により減少または減少傾向を示した。また、コラゲナーゼ mRNA 量も減少傾向を示した。コラゲナーゼの阻害物質 TIMP-1、-2、および-3のうち、TIMP-1 および-2 の mRNA 量は PF 食給餌によって有意に減少した。これら分解系分子の減少率は合成系分子の減少率よりも小さく、タンパク質栄養条件の悪化はコラーゲン合成系により大きな影響を与え、トロポコラーゲン量を減少させることが示唆された。

また、タンパク質栄養条件の悪化により皮膚重量は減少するが、トロポコラーゲン量は線維性コラーゲン量に比して非常に小さいので、皮膚重量の減少をコラーゲン代謝で説明することはできなかった。

(2) グルココルチコイド投与が皮膚コラーゲン代謝に与える影響

グルココルチコイドは、皮膚疾患の治療に頻繁に使用されるが、皮膚の萎縮など多くの副作用がある。そこで、グルココルチコイドが真皮コラーゲン代謝にどのような影響を与えるのかについて、デキサメタゾン(1 mg/kg body weight)を7日間毎日投与したラット背部皮膚を用いて、トロポコラーゲンと線維性コラーゲンに分けて皮膚一定面積当たりで検討した。

その結果、I型トロポコラーゲンおよびIII型トロポコラーゲン量は顕著に減少した。III型線維性コラーゲン量も減少したが、I型線維性コラーゲン量は変化なかった。本結果は、タンパク質栄養条件の悪化と類似していたが、より顕著な減少だった。また、III型コラーゲンの方がI型コラーゲンよりもデキサメタゾン投与の影響が大きかった。

$\alpha 1(I)$ および $\alpha 1(III)$ コラーゲンの mRNA 量は、lysate RNase protection assay 法にて、皮膚一定面積当たりで測定したところ、デキサメタゾン投与により、ほとんどバンドとして認められない程に顕著に減少した。

一方、分解系であるコラーゲン分解酵素コラゲナーゼおよびその阻害物質 TIMP-1,2,3 についても検討したところ、TIMP-3 の mRNA 量以外は、減少あるいは減少傾向を示した。しかし、その減少率は合成系よりも小さく、グルココルチコイドの皮膚コラーゲン代謝へ

の影響は、合成系への方が大きいと考えられた。グルココルチコイド投与は、創傷治癒を遅延させることが知られているが、その原因としてタンパク質栄養条件の悪化と同様にコラーゲン合成量の顕著な減少が考えられた。

(3) III型コラーゲン遺伝子発現の制御機構の検討

III型コラーゲンは、タンパク質栄養条件の悪化やグルココルチコイド投与により顕著に減少したが、 $\alpha 1(\text{III})$ コラーゲンの上流域のシークエンスは不明であり、プロモーター、エンハンサーについても不明である。そこで、なぜタンパク質栄養条件の悪化やグルココルチコイドの投与がIII型コラーゲン合成を抑制するのかを解明する目的で、まず $\alpha 1(\text{III})$ コラーゲン遺伝子の上流域のシークエンスを決定することにした。

上流域-2649塩基まで決定することができ、-400塩基まではマウスとの相同性が約80%と高かった。また、-25から-30の領域の位置にはマウスやヒトと同様にTATAボックスが存在した。さらに、AP-1あるいはそれに類似するタンパク質結合部位、SP-1siteなどが存在したが、有効なsiteであるか否かは更なる研究が必要であった。

(4) タンパク質栄養条件の悪化が皮膚ヒアルロナン代謝に与える影響

タンパク質栄養が皮膚ヒアルロナン代謝にどのような影響を与えるのかについて、C食をコントロールとして、G食およびPF食で7日間飼育したラット背部皮膚を用いて検討した。

その結果、ヒアルロナン量は、G食およびPF食ともにC食に比して顕著に減少した。この原因を検討するために、ヒアルロナン合成酵素2および3(*rhas2*, *rhas3*)のmRNA量を測定したところ、ヒアルロナン量と同様に顕著に減少した。また、合成系の減少がヒアルロナン減少に重要なのかについて、さらに検討するため、給餌1日間のラット皮膚を用いて検討した。その結果、1日間給餌によってヒアルロナン量には変化がなかったが、*rhas2*および*rhas3* mRNA量は顕著に減少した。皮膚でのヒアルロナンの半減期は半日であり、ヒアルロナン合成酵素の半減期は数時間であるので、本結果は、タンパク質栄養条件の悪化によるヒアルロナン量の減少には、ヒアルロナン合成系の影響が大きいことを示唆した。

また、タンパク質栄養条件の悪化により皮膚重量は減少する。ヒアルロナンは1gで何リットルもの水分を保持できる能力を有するので、上記結果は皮膚重量の減少に、ヒアルロナンが大きく関わることを示唆した。

(5) タンパク質栄養条件の悪化およびグルココルチコイド投与によるコラーゲン合成、ヒアルロナン合成減少のメカニズム

本研究により、タンパク質栄養条件の悪化やグルココルチコイド投与によって、I型およびIII型トロポコラーゲン量、各mRNA量、ヒアルロナン量、およびその合成酵素(*rhas2*, *rhas3*)のmRNA量が減少することがわかった。このメカニズムにはインスリン様成長因子-I (IGF-I) およびその結合因子IGFBP-1の関与が考えられた。IGF-Iは、コラーゲン合成量の増加、ヒアルロナン合成酵素のmRNA量を増加させるとの報告がある。タンパク質栄養条件の悪化やグルココルチコイド投与によって血中のIGF-Iの減少およびIGFBP-1の増加が認められており、その結果、活性のあるIGF-I量が減少し、コラーゲン合成量の減少、ヒアルロナン合成量の減少、さらにヒアルロナン量の減少が考えられた。

(6) 総括

本研究で得られた結果を下表にまとめた。タンパク質栄養条件は皮膚の機能に影響を与えることは知られていたが、その分子機構は不明な点が多い。本研究によって、III型コラーゲンや rhas 2 および 3 の分子がタンパク質栄養に対する皮膚の応答において鍵となることが明らかとなった。これらの現象から、タンパク質栄養条件の悪化やグルココルチコイド投与は皮膚機能を低下させ、皮膚の老化や免疫機能の低下を引き起こすことが考えられた。本研究のアプローチにより、皮膚の機能を理想的に維持するという観点から、新しい食餌摂取の基準設定の一助になることが期待される。

Summary of the Protein Malnutrition and Dexamethasone on Collagen Metabolism and Hyaluronan Metabolism.

		12% Gluten Diet	Protein-free Diet	Dexamethasone
Skin Weight		→ or ↓	↓	↓
Protein Level	Type I tropocollagen	→	↓	↓↓
	Type I fibril collagen	→	(↑)	→
	Type III tropocollagen	(↓)	↓↓	↓↓
	Type III fibril collagen	→	→	↓
	Latent collagenase	Nd	(↓)	↓
	Active collagenase	Nd	↓	↓
Hyaluronan Level	Hyaluronan	↓↓	↓↓	Nd
mRNA Level	α1(I) collagen	(↓)	↓↓	↓↓↓
	α1(III) collagen	↓↓	↓↓	↓↓↓
	Collagenase	Nd	(↓)	(↓)
	TIMP-1	Nd	↓↓	↓↓
	TIMP-2	Nd	↓↓	↓↓
	TIMP-3	Nd	→	→
	rhas2	↓↓	↓↓↓	Nd
	rhas3	↓↓	↓↓	Nd

Nd, Not determined; (↓), decrease, not significantly; (↑), increase, not significantly