

表皮ケラチノサイトにおけるヒト細胞老化因子の研究

愛媛大学 医学部皮膚科

橋 本 公 二

Senescent cells are blocked in the G1 phase of the cell cycle. The proteins p21 and p16 are inhibitors of cyclin-dependent kinase and affect cell cycle progression and senescence. We have studied whether p21, p53 and p16 was associated with cultured keratinocytes senescence. Keratinocytes were isolated from normal human skin obtained from individuals aged from 1 to 70 years, and cultured under serum free condition. The cultures have been continued until the cell growth arrest. The expression of p21, p16 and p53 in the growing cells and the senescent cells was analyzed by Western blot. The keratinocytes obtained from the individuals aged 1 and over 40 years tend to survive longer periods than the cells from the other ages. The p21 expression has not been changed compared to the early passage while the cells were growing, but increased just before the growth arrest. The p16 expression on the 8th passage has been increased compared to the third passage in both growing cells and senescent cells. These data suggest that increased p21 followed by p53 play an important role in the growth arrest of senescent keratinocytes. Increased p16 is a co-factor for the growth arrest.

1 緒 言

表皮ケラチノサイトは皮膚における重要な構成細胞であり、その老化機構の解明はコスメトロジーにおける生物学的基礎研究の根幹をなすと言っても過言でない。1961年に、ヒト胎児繊維芽細胞を *in vitro* で継代培養すると常に決まった分裂回数後に、増殖を停止してしまうことが見出された¹⁾。このことより *in vitro* における培養細胞の有限増殖能は、細胞レベルでの老化であると考えられるようになった²⁾。正常ヒトケラチノサイトでも同様に、20 - 50代で増殖が停止し³⁾、また他の多くのヒトの細胞でも、同様に老化することが知られている。細胞の老化は、細胞死の一種であるアポトーシスへと向かう過程とは全く異なっており、細胞は老化するにつれて細胞周期をまわる時間が長くなり、完全に老化した細胞は G 1

期で停止する⁴⁾。

細胞周期を制御し、老化細胞の細胞増殖を抑えると考えられている p21 が、1993年に、いくつかの独立した研究グループから報告された⁵⁻⁸⁾。sdi 1 (senescent cell derived inhibitor 1) は Noda ら⁵⁾ が老化細胞由来の分裂抑制因子として、遺伝子を単離した。そのタンパク質の分子量は 21 kd で 164 個のアミノ酸からなる。線維芽細胞を用いた実験により、継代数の増加に伴い、sdi 1 mRNA が増加すること、あるいは、sdi 1 を細胞に過剰に発現させると細胞増殖の抑制がおこることが報告されている。一方、Harper ら⁸⁾ はサイクリン依存性キナーゼ (cdk 2) の阻害物として働く制御物質を見だし cip 1 (cdk-interacting protein) と名付け、その塩基配列を決定したところ、sdi 1 と同一であった。また、El-Deiry ら⁷⁾ は、野生型 p53 で発現が誘導され、変異型 p53 では発現が誘導されない遺伝子を単離し waf 1 (wild type p53-activated fragment) と名付け、その塩基配列を決定したところ、sdi 1 と同一であった。彼らはさらに waf 1 上流に p53 結合部位を見つけた。

細胞が G1 期から S 期へ移行する際に癌抑制遺伝子産物である RB タンパク質のリン酸化が必要



Senescence of cultured keratinocytes and the expression of p21, p53 and p16

Koji Hashimoto, M.D.

Department of Dermatology
Ehime University School of Medicine

であるが、p21 はリン酸化を行う種々の cdk と cyclin の複合体に結合することによりその活性を阻害し、さらに癌抑制遺伝子産物 p53 により誘導される。また、p16 は cdk と免疫沈殿で共沈するタンパク質として、見い出された⁹⁾。cdk と結合することにより cyclin との複合体形成を競合的に阻害し、その活性を抑え、細胞周期制御・細胞老化に関与していると考えられている。

そこでこの研究では、正常ヒトケラチノサイトを無血清培地で可能なかぎり継代し、細胞の老化と p21、p53、p16 が関連しているかどうか調べた。

2 実験

2.1 表皮ケラチノサイト培養

形成外科手術で、15 人の 1 才～70 才の人より得られた正常皮膚由来ケラチノサイトを下記のごとく無血清培地で培養し、増殖が停止するまで培養を続けた。細胞継代時には、細胞抽出物を -80℃ で保存した。

正常皮膚片を 250PU/mL Dispase-ダルベッコ変法イーグル培養液に浸し、4℃で一晩静置。翌日、表皮を真皮から剥離した。表皮片を、0.25% トリプシン液液中にひたし、37℃、5 分間静置した。表皮片を、プラスチックシャーレに移し、ほぐした。ほぐし終えたら表皮・溶液ともに遠心管に移し入れ細胞浮遊液をつくり、細胞数を数えた。遠心した後、細胞を無血清培地である MCDB153 に以下のアミノ酸を添加した培地（最終濃度：isoleucine 7.5×10^{-4} M、histidine 2.4×10^{-4} M、methionine 9.0×10^{-5} M、phenylalanine 9.0×10^{-5} M、tryptophan 4.5×10^{-5} M、tyrosine 7.5×10^{-5} M）で懸濁し、100mm プラスチックシャーレ（コラーゲンコート）のシャーレ）当たり $2 \sim 3 \times 10^6$ 細胞 / 10 mL medium の割合で播種した。翌日培地交換を行い、以後、培地交換は 2～3 日に一度おこなった。細胞密度が 70～80% 程度あるいは 1 週間毎に継代培養を行った。継代するときは、0.25% トリプシン、0.05% EDTA 混合用液を用い、37℃、5 分間処理を行い血清で、トリプシン・EDTA のはたらきを中和した後、細胞の回

収・分散を行った。播種密度は 100mm シャーレにつき $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞 / 10mL medium。なお、アミノ酸添加 MCDB153 培地にはインスリン 5.0μg/mL、モノエタノールアミン 0.1mM、ホスホリルエタノールアミン 0.1mM ハイドロコチゾン 0.5μM、牛脳視床下部抽出液 50～150μg 蛋白/mL を加えた。CaCl₂ の最終濃度は 0.1mM に調整。

2.2 Western blot 法

抽出したタンパク質 70μg を 15% SDS-PAGE にて分離後、nitrocellulose 膜に転した。以下の、膜の洗浄・抗体の希釈には 20mM tris-HCl pH 7.4、150mM NaCl、0.05% Tween-20 を用いた。膜を 5% BSA にて 1 時間ブロックした後、洗浄し、10μg/mL のモノクロナル抗 p21 (6B6; Pharmingen Co., San Diego, CA)、p53 (Pab1801; Oncogene Science Co., Cambridge, MA)、p16 (G175-405; Pharmingen Co.) 中で 2 時間インキュベートした。洗浄後、1 : 600 fluorescein 標識抗マウス IgG (Amersham, Buckinghamshire, England) 中にて、1 時間インキュベートした。洗浄後、さらに 1 : 2500 AP 標識抗 fluorescein 抗体 (Amersham) 中で 1 時間インキュベートした。洗浄後、AttoPhos (Amersham) と約 20 分間反応させ、蛍光は FluoroImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) にて検出し、それぞれのバンドの強度を測定し、定化を試みた。3 代目の細胞での発現を 1 としたときの 8 代目の値を示した。

3 結果

3.1 細胞増殖

図 1 は 7 種類のケラチノサイトの 100 日目までの細胞増殖を示した。50 日目頃、継代数で 10 代前後で増殖を停止するものが多かった。

さらに、増殖を続けるものがあったので、培養を続けた。15 種のケラチノサイトのうち、2 種は約半年間増殖を続け、継代数で 27 代まで、培養することができた (図 2)。それぞれ、1 才、45 才

の人より得た、ケラチノサイトであった。

図3に、増殖停止時の計算上の総細胞数と年齢の関係を示した。1才および中年以降のヒトから

得られたケラチノサイトの方が、それ以外の年齢のヒトより得た細胞より長期間増殖を続けることができる傾向があった。

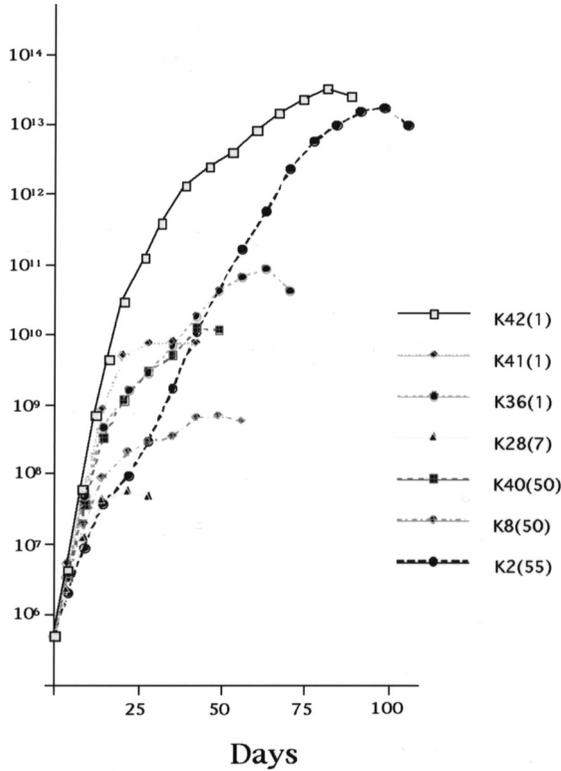


図1 100日目までの細胞増殖。15種のケラチノサイトのうち7種を示す。縦軸には計算上での総細胞数を示す。

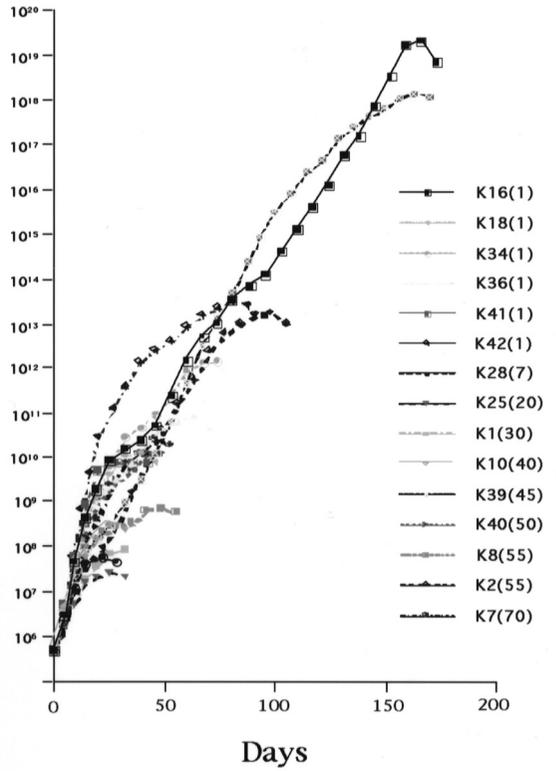


図2 200日目までの細胞増殖。15種のケラチノサイトを増殖停止時まで示す。縦軸には計算上での総細胞数を示す。

Cell number at the growth arrest

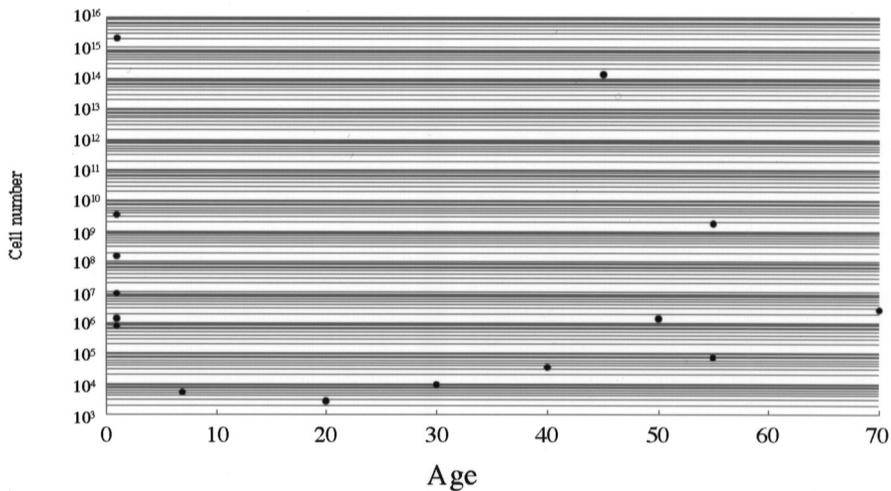


図3 増殖停止時の総細胞数と年齢との関係。

3.2 p21、p53、p16の発現

p21の発現をwestern blot法にて調べた。3代目と8代目のケラチノサイトを調べた(図4)。#16、#34、#39は8代以降も増殖を続けている細胞、#18、#1、#7は8代目直後に増殖停止した。増殖を続けている細胞ではp21の変化はみられないが、増殖停止直前の細胞では、それぞれ、3.5、2.0、1.9と増加していた。

次にp21を誘導するとされているp53の発現をWestern blot法にて調べた。増殖停止した細胞を図5に示す。8代目の細胞ではp53は増加しており、p21の発現増加と平行していた。増殖中の細胞ではp53の発現は一定しなかった(結果は示さない)。

次に、p21と同様にcdk inhibitorであるp16の発現を調べた(図6)。増殖停止した細胞では8代目でp16は増加していたが、増殖を続けている細胞でも、8代目では同様にp16は増加した。

4 考察

p21、p53、p16の変化のまとめを表1に示す。p21は増殖中の細胞では変化はなく、老化した細胞で増加していた。このことより、ケラチノサイトの老化に伴う細胞増殖停止にはp21が関与していると考えられる。p53は老化した細胞で増加しており、p21の増加と平行していた。p21はp53により誘導されるとされており、老化ケラチノサイトでも増加したp53によりp21が誘導されたものと考えられる。p21はcyclin dependent kinaseに結合してキナーゼ活性を阻害し細胞周期をG1期に停止させるものと考えられており、ケラチノサイトの老化による細胞増殖の停止は、増加したp21による細胞周期のG1期への停止が原因と考えられる。

p16は、増殖中あるいは老化した細胞、いづれでも継代を経るにしたがって増加しており、老化に伴う細胞増殖停止には直接は関与していないものと考えられる。

Western blot of p21

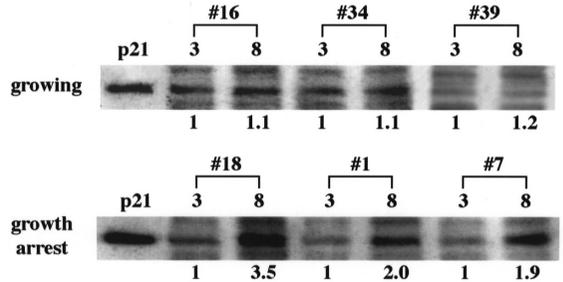


図4 Western blot法による3代目と8代目の細胞でのp21の発現。上段(#16、#34、#39)が8代目以降も増殖を続けている細胞、下段(#18、#1、#7)が8代目直後に増殖停止した細胞を示す。蛍光はFluorolmagerにて検出し、それぞれのバンドの強度を測定し、定化した。3代目の細胞での発現を1としたときの8代目の値を下端に示した。

Western blot of p53

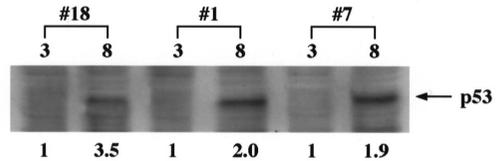


図5 Western blot法による増殖停止細胞(#18、#1、#7)でのp53の発現。それぞれのバンドの強度は図4と同様に定化した。

Western blot of p16

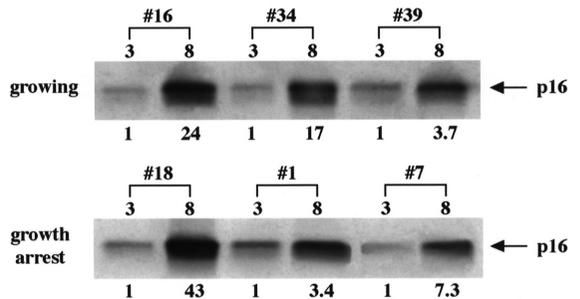


図6 Western blot法による3代目と8代目の細胞でのp16の発現。上段(#16、#34、#39)が8代目以降も増殖を続けている細胞、下段(#18、#1、#7)が8代目直後に増殖停止した細胞を示す。それぞれのバンドの強度は図4と同様に定化した。

表1 p21、p53、p16の発現のまとめ

	増殖中	増殖停止
p21	→	↑
p53	不定	↑
p16	↑	↑

図 4、5、6 の結 をまとめた。8代目の細胞での発現を3代目の細胞と比較した。

1才、および中年以降の個体より得た、ケラチノサイトは、より長期間細胞増殖を続けることができる傾向があった。若い個体より得たケラチノサイトの方が長期間培養が可能であるという報告³⁾はあるが、今回の実験のように中年以降の個体から得た細胞で再び長期間培養が可能になるという報告はない。その原因はよくわからないが、サンプル数を増やす必要がある。

5 結 論

in vitro における、老化ケラチノサイトでは p53 により誘導された p21 が細胞周期を G1 期に停止させて細胞増殖を停止させているものと考えられる。p16 は増殖中の細胞でも増加しており、細胞増殖停止の co-factor としては働く可能性があるが、直接は関与していないと考えられる。

文 献

- 1) Hayflick L, Moorhead PS: The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp Cell Res*, 25, 585-621, 1961.
- 2) Hayflick L: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp Cell Res*, 37, 614-636, 1965.
- 3) Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, *Cell*, 6, 331-344, 1975.
- 4) Yanishevsky R, Mendelsohn ML, Mayall BH: Proliferative capacity and DNA content of aging human diploid cells in culture: a cytophotometric and autoradiographic analysis, *J Cell Physiol*, 84, 165-170, 1974.
- 5) Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR: Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen, *Exp Cell Res*, 211, 90-98, 1994.
- 6) Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases, *Nature*, 366, 701-704, 1993.
- 7) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell*, 75, 817-825, 1993
- 8) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell*, 75, 805-816, 1993
- 9) Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4, *Nature*, 366, 704-707, 1993.