

# ケラチノサイトの発現するエラスチンと皮膚の老化との関連について

防衛医科大学校 皮膚科

多 島 新 吾

Tropoelastin polypeptide and mRNA were detected in cultured normal human keratinocytes (NHKs) by RNase protection and Western blot assays. The expression of elastin by NHKs was found to reach a maximum level at the quiescent phase of keratinocyte growth. When NHKs were cultured on tropoelastin-coated dishes, their growth potential was greatly suppressed compared with other matrix protein-coated dishes. These results suggest that cultured NHKs can actively synthesize elastin and that keratinocyte tropoelastin may act as a growth-regulator for keratinocyte.

## 1 緒 言

エラスチンは血管、靭帯、皮膚、肺など、ほぼ全身の臓器、組織に分布されている。心臓、消化器、眼球、生殖器、泌尿器、耳鼻咽喉、乳腺、胸腺、リンパ節などの臓器の基本的機能である弾性の保持に関与していると思われる。

皮膚は表皮、真皮の2層から構成される。皮膚真皮では弾力線維を認め主に皮膚線維芽細胞において産生されていることが知られていることが分かっている。

表皮は外胚葉に由来する重層扁平上皮で、この上皮細胞は角化するのを特徴とする。表皮角化細胞は type IV、type V、type VII コラーゲン、ラミニニン、フィブロネクチン等の様々なマトリックスタンパクを産生していることが既に報告されている。そこで、表皮角化細胞においてエラスチンの前駆体のトロポエラスチンの発現と表皮角化細胞の増殖との関連について研究した。

## 2 実 験

### 2.1 細胞培養法

ヒト表皮角化細胞 (NHKs) は無血清、低カルシウム (0.03mM)、表皮成長因子 (EGF)、インスリン、脳下垂体抽出液、ハイドロコルチゾンを含む培地 (K110type II) で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、95% air の条件下で培養した。プレコンフルント (80% of confluent) になったら 1 : 3 の割合で継体し、3代目、4代目の細胞を本実験で使用した。

ヒト皮膚線維芽細胞は 10% 子牛血清を含む DMEM で培養した。

静止期を得るための浮遊培養は Dike と Farmer の方法に準じて行った<sup>(1)</sup>。プレコンフルエント (80% of confluent) になったヒト表皮角化細胞を 0.02% EDTA を含む 0.25% トリプシンで 37°C、5 分間インキュベートし、細胞を剥離し 1 mL 当たり  $1.5 \times 10^5$  cells の密度で 1.3% メチルセルロースを含む K110type II 培地中に浮遊させ 37°C で 2 時間培養した (suspension-arrested)。また、ヒト表皮角化細胞を  $2 \times 10^5$  cells の密度で 35mm シャーレに播き 37°C で 6 時間、24 時間、72 時間 K110type II 培地中で培養した。6 時間後に細胞は petri dish の底にほとんど接着し (接着期)<sup>(2)</sup>、24 時間後には細胞は増殖していた (増殖期)。また、72 時間後には細胞はコンフルントになり分化 (角化) が始



Relation between epidermal elastin and skin aging

Shingo Tajima

Department of Dermatology,  
National Defense Medical College

まっていた (density - arrested) <sup>(3)</sup>。

細胞増殖に対する固相トロポエラスチンの影響を見るためにヒト表皮角化細胞を  $4.0 \times 10^4$  cells の密度で、予め type I コラーゲン、type IV コラーゲン、ラミニン、フィブロメクチン、トロポエラスチンをそれぞれコートしておいた 35mm シャーレに播き <sup>(4)</sup>、37°C、5% CO<sub>2</sub>、95% air の条件下で K110 type II 中で培養した。そして、3日目、5日目に細胞数を測定した。細胞数の測定は次のようにして行った。シャーレ内の培地を除去し、PBS で 2 回洗浄した。シャーレ内に 0.02% EDTA を含む 0.25% トリプシンを加え 37°C、5 分間インキュベートし、位相差倒立顕微鏡で細胞が剥離しているのを確認した後、コールターカウンターで細胞数を測定した。

## 2. 2 Northern blot assay

2. 1 の方法で培養した NHKs から全 RNA を Chomoczynski と Sacchi の方法 <sup>(5)</sup> に準じてグアニジンチオシアネートを用いて抽出し  $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  の濃度に調製して使用するまで -80°C で保存した。10  $\mu\text{g}$  の RNA を 1 M グリオキサールを含む 10mM リン酸緩衝液 (pH6.5) で 50°C、1 時間処理して変性させた後、1% アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写した。このフィルターを 50% ホルムアミド、0.1% filcoll400、0.1% polyvinylpyrrolidone、0.1% bovine serum albumin、0.1% SDS、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tRNA、5  $\times$  SSC を含む溶液で 42°C、24 時間プレハイブリダイズした後、32p で標識したプローブで 42°C、24 時間ハイブリダイズした。フィルターを 2  $\times$  SSC/0.1% SDS を含む溶液で 15 分間室温で洗浄した後、0.1  $\times$  SSC/0.1% SDS を含む溶液で 15 分間室温で洗浄した。mRNA の変動は、オートラジオグラフィにより観察し、オートラジオグラムをデンストメーターにより定量化した。尚プローブは GAPDH (glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase) <sup>(6)</sup> 合成オリゴヌクレオチドを 5 末端ラベル法を用いて [ $\gamma$  - <sup>32</sup>P] dATP で標識したものをを用いた。

## 2. 3 Ribonuclease protection assay (RNase protection assay)

2. 1 の方法で培養した NHKs から全 RNA を Chomoczynski と Sacchi の方法に準じてグアニジンチオシアネートを用いて抽出し  $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  の濃度になるように調製して使用するまで -80°C で保存した。エラスチンの N 末端領域を含むヒトのエラスチン cDNA (EcoR I /Sac I 424 bp) <sup>(7)</sup> を pGEM32Zf (-) vector に組み込み、T7 RNA polymerase を用いて鋳型の配列から anti-senseRNA プローブを転写し、このプローブを [ $\alpha$  - <sup>32</sup>P] UTP (16TBq/mmol) で標識した。そして、50  $\mu\text{g}$  の RNA とこのプローブを 80% ホルムアミド、40mM Piperrazinediethanesulphonic acid (pH6.4)、400mM 酢酸ナトリウム (pH6.4)、1 mM EDTA を含む溶液で 42°C、24 時間ハイブリダイズした後、RNase A (10units/mL)、RNase A (10units/mL)、RNaseT1 (200units/mL) を用いて 37°C、30 分間酵素消化した。そして酵素消化されなかった RNA は 8M 尿素を含む 6% アクリルアミドゲルで電気泳動した後、X 線フィルムに転写後 24 時間から 48 時間、-80°C に放置 <sup>(8)</sup> し、オートラジオグラフィにより観察し、デシトメーターにより定量化した。

## 2. 4 Western blot assay

ヒト表皮角化細胞がコンフレントになったときの培地を 200mL プールした。この培地をタンパク分解酵素阻害剤 (1 mM EDTA、1 mM NEM、1 mM PMSF) 存在下、硫酸アンモニウム (176mg/mL) を加え 4°C で攪拌しながら、1 晩放置し、タンパクを塩析した <sup>(9)</sup>。その後、4°C、10,000r.p.m 20 分間遠心し上清を除去し、沈殿物を 2M グアニジン塩酸を含む、50mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液に溶解し、4°C、10,000r.p.m 20 分間遠心し上清を、2M グアニジン塩酸を含む 50mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液で予め平衡化しておいた 4% アガロースカラムを用いてゲルろ過を行った <sup>(10)</sup>。そして各フラクションを 3 本 1 組にしてまとめ、上記の

タンパク分解酵素阻害剤を含む0.1%酢酸で4℃、3日間透析した透析内液を凍結乾燥後、sample buffer (10mM Tris-HCl pH7.4、1% SDS、5% Glycerol、0.01% BPB、1mMDTT) に溶解し、各試料を100℃、2分間煮沸した後、SDS-PAGE グラデIENTゲル(2~15%)で電気泳動し、ニトロセルロースフィルターに転写した<sup>(11)</sup>。抗エラスチン抗体による発色は、ECL<sup>TM</sup>-ウエスタンブロッティング検出システムを用いて以下のように行った。フィルターをT-TBS (50mM Tris-HCl pH8.0、0.9% NaCl、0.05% Tween20) 中で5分間洗浄後、5%スキムミルクを含むT-TBSで1時間ブロッキングした。T-TBS 中で30分間洗浄後、5,000倍希釈のモノクローナル抗エラスチン抗体<sup>(12)</sup>で1時間反応させた。T-TBS 中で30分間洗浄後、5,000倍希釈の抗マウスIgG抗体で1時間反応させた。T-TBS 中で1時間洗浄後、ECL 発光試薬と反応させ、X線フィルムにて観察した。

## 2.5 免疫染色

ヒト表皮角化細胞と皮膚線維芽細胞をガラスチ

ャンバースライドを用いて培養し、コンフルエントの状態になった後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、T-TBSで洗浄後、0.01%サポニンを含むT-TBSで5分間反応させた。1%ウシ血清アルブミンでブロッキング後、500倍希釈のモノクローナル抗エラスチン抗体で4℃で24時間反応させた。T-TBSで60分間洗浄後、500倍希釈のビオチン標識された抗マウスIgG抗体で30分間反応させた。T-TBSで洗浄後、ABC/AP kitを用いて反応させた後、倒立顕微鏡下で観察した。

## 3 結果

### 3.1 培養ヒト表皮角化細胞におけるトロポエラスチン遺伝子の発現

培養ヒト表皮角化細胞においてトロポエラスチン mRNA はノーザンブロット法では、含有量が少ないためか検出できなかった。しかし、RNase protection assay では、プローブに特異的なフラグメント(424bp)を、培養ヒト皮膚線維芽細胞に限らず、培養ヒト表皮角化細胞においても確認することができた(Fig. 1)。424bpのバンドをデシ

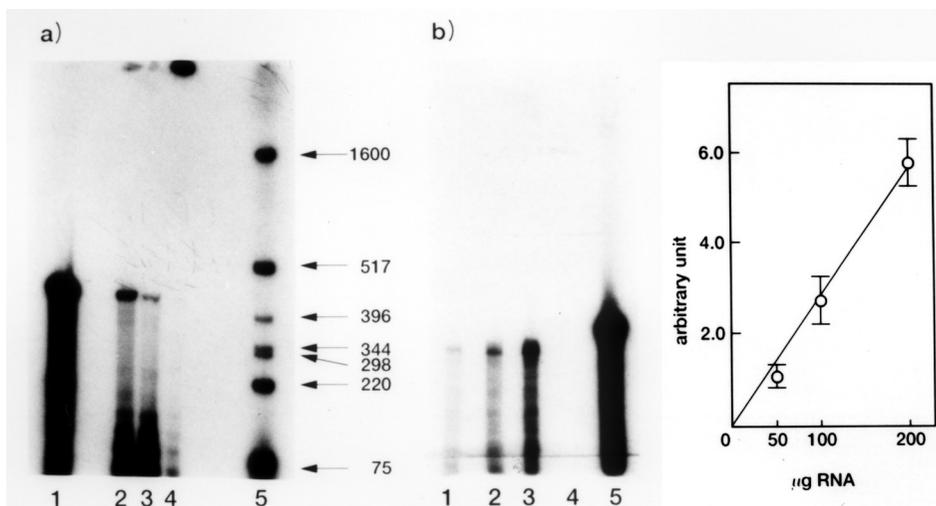


Figure 1 Tropoelastin mRNA is detected in cultured keratinocytes by RNase protection assays with a linear correlation between input sample RNA, and protected anti-sense probe.

Total RNA was isolated from cultured human keratinocytes of dermal fibroblasts. (a) RNase protection assays were performed without (lane 1) or with (lanes 2-4) RNase digestion, using dermal fibroblast RNA (1 µg per lane) (lane 2), keratinocyte RNA (50 µg per lane) (lane 1 and 3), or no sample RNA (lane 4). Molecular markers were Hinf I fragments of pBR322 DNA. (b) For quantitative assays, RNase protection assays were performed with a range of keratinocytes RNA (0-100 µg). Values are mean ± range from duplicate assays.

トメーターによって測定したところ培養ヒト表皮角化細胞のトロポエラスチン mRNA レベルは培養ヒト皮膚線維芽細胞のトロポエラスチン mRNA レベルの約 1/20 の量であった。また、予備実験としてヒト表皮角化細胞 RNA の量を 0~100 $\mu$ g の範囲で変化させたときプローブに特異的なフラグメントのデンシティーは RNA の量に比例して増加した。よってこれからの実験で使用する RNA の量を 50 $\mu$ g と決定した。

### 3.2 培養ヒト表皮角化細胞におけるエラスチンポリペプチドの発現

培養ヒト表皮角化細胞培養中のタンパクをゲルマトグラフィーで分画した。No.45~47 のフラクションに 68kDa の位置に抗エラスチン抗体に特異

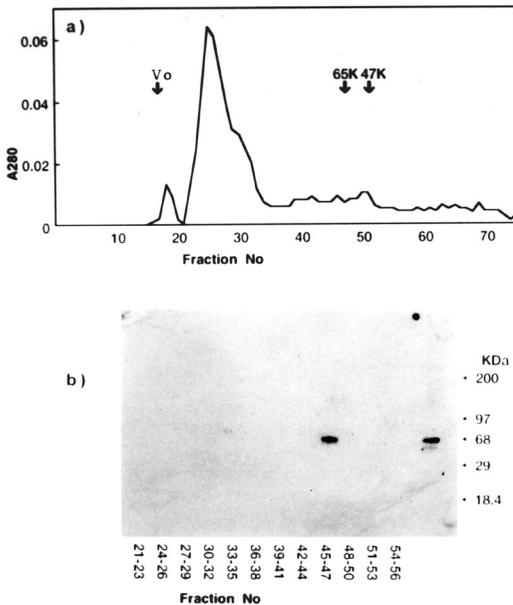


Figure 2 Tropoelastin polypeptide is detected in the medium of cultured keratinocytes.

(a) Conditioning media of cultured keratinocytes were pooled and the proteins were fractionated by gel chromatography equilibrated with 50mM Tris-HCl (pH7.5) containing 4M guanidine-HCl.

(b) Every three fractions were mixed and subjected to SDS-PAGE. Tropoelastin polypeptide was detected by western blot analysis using antibody. The right lane indicates tropoelastin secreted in the medium by cultured smooth muscle cells.

的なバンドを検出した。また他のフラクションではなにも検出されなかった (Fig. 2)。

また免疫染色において、ヒト皮膚線維芽細胞と同様にヒト表皮角化細胞において抗エラスチン抗体に対する陽性所見が得られた (Fig. 3)。

### 3.3 ヒト表皮角化細胞の細胞増殖とトロポエラスチンとの関連

50 $\mu$ g の RNA を使用した結果、プローブに特異的なフラグメントの発現は接着期、増殖期に比べて、細胞の分化誘導期のほうが発現量は多かった (Fig. 4)。

ヒト表皮角化細胞の増殖に対する固相エラスチ

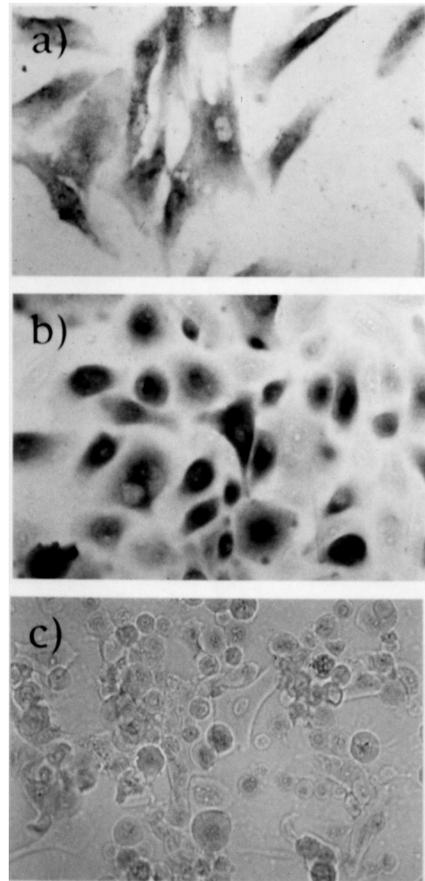


Figure 3 Cultured keratinocytes are immunostained with anti-elastin antibody.

Cultured skin fibroblasts (a) and NHKs (b and c) were fixed and stained with (a and b) or without (c) anti-elastin antibody at a 1 : 500 dilution. Scale bars, 40  $\mu$ m.

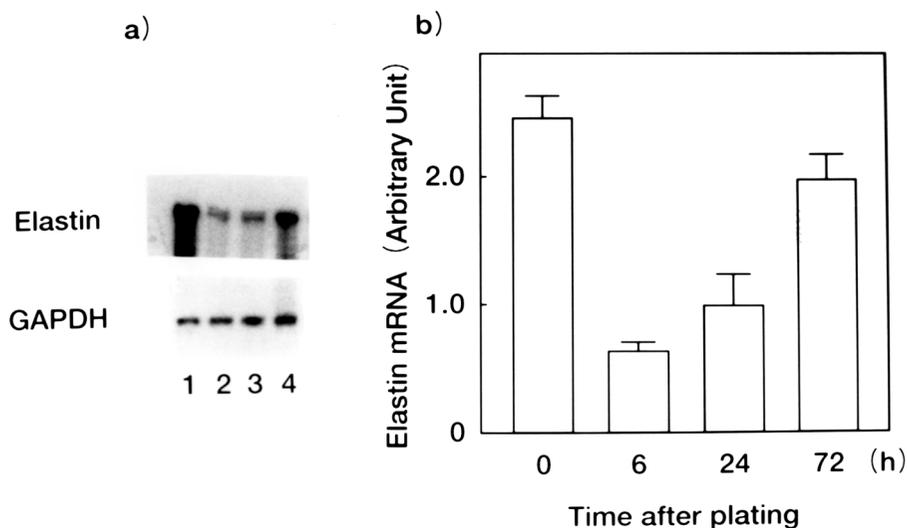


Figure 4 Tropoelastin expression is modulated during different phases of keratinocyte growth.

(a) Cells were trypsinized and suspended for 6h in 1.3% methylcellulose (designated as 0h) (lane 1; suspension-arrested phase) or plated at a density of  $2 \times 10^5$  cells per 35mm-diameter petri dish and cultured for 6h (lane 2; adhesion phase) or (lane 3: proliferating phase) or 72h (lane 4; growth-arrested phase) in K110Type II. RNA was extracted from the cells at the end of the culture, then tropoelastin mRNA content was assayed by means of RNase protection analysis. GAPDH mRNA level was determined by northern blot analysis. (b) The level of tropoelastin mRNA was determined by scanning the autoradiograms, and normalized by GAPDH mRNA level. Values indicate densitometric percentage relative to the mRNA level at 0h and mean  $\pm$  range from duplicate experiments.

の影響において、type I コラーゲン、type II コラーゲン、ラミニン、ファイブロネクチンをそれぞれコートしたシャーレにおいては3日目、5日目ともに、以前の報告通りコントロールのシャーレより細胞増殖を促進した。トロポエラスチンをコートしたシャーレにおいては前者のコートしたシャーレ及びコントロールのシャーレと比較して3日目、5日目ともに細胞増殖は抑えられていた (Fig. 5)。

#### 4 考 察

今回の実験の結果で培養ヒト表皮角化細胞においてトロポエラスチンが mRNA、タンパク両レベルで発現されていることが分かった。表皮角化細胞ではコラーゲン、ラミニン、プロテオグリカン、フィブロネクチンといった多くのマトリックスタンパクを発現していることが既に報告されているので、このことはそれほど不自然なことではない。

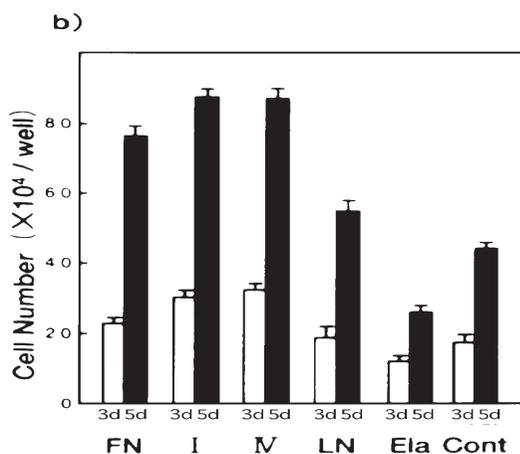


Figure 5 Effect of solid phase of tropoelastin on human keratinocytes proliferation.

NHKs were plated at a density of  $4 \times 10^4$  cells per 35mm-diameter petri dish on fibronectin coated (FN), laminin-coated (LN), type I collagen-coated (I), type IV collagen-coated (IV), of tropoelastin-coated (Ela), or plane (Cont) dishes. Cells were grown in K110Type II for 3, 5 days. At the termination of culture, cell number was counted. Values are mean  $\pm$  SD from triplicate experiments.

培養ヒト表皮角化細胞のトロポエラスチン mRNA レベルは培養ヒト皮膚線維芽細胞のトロポエラスチン mRNA レベルの 1/20 の量であった。今まで培養ヒト表皮角化細胞においてエラスチンが同定されなかったのは発現量があまりにも少なかったためだと考える。また、トロポエラスチンの発現は細胞増殖の状態に依存していて、固相トロポエラスチンが、ヒト表皮角化細胞の細胞増殖を調節していることが分かった。以上のことよりヒト表皮角化細胞のトロポエラスチンは細胞増殖に関連したいくつかの機能を持っていることが分かった。また、ヒト表皮角化細胞におけるトロポエラスチン発現は、静止期(分化期)において最も多くなった。このことは血管平滑筋細胞においてエラスチンは G<sub>0</sub> 期で発現されている<sup>(13)</sup> という報告に一致しているように思える。よってヒト表皮角化細胞のトロポエラスチンの発現はヒト表皮角化細胞の分化(角化)に関係していることが推測された。

#### 引用文献

- 1) Dike LE and Farmer SR: Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6792-6796, 1988.
- 2) Woodley DT, Kimberly S, Wynn BA et al: Type IV collagen and fibronectin enhance human keratinocyte thymidine incorporation and spreading in the absence of soluble growth factor. J. Invest. Dermatol. 94, 139-143, 1990.
- 3) Tajima S and Tokimitu I: Regulation of BPAG2(180 kDa) gene expression in spontaneously transformed murine keratinocytes. J. Biochem. (Tokyo) 118, 734-737, 1995.
- 4) Kubo N, Kan M, Isemura M et al: Effect of extracellular matrices on human keratinocyte adhesion and growth and on its secretion and deposition of fibronectin in culture. J. Invest. Dermatol. 88, 594-601, 1987.
- 5) Chomczynski P and Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159, 1987
- 6) Fort P, Marty L, Piechaczyk M et al: Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase mutigenic family. Nucleic. Acids. Res. 13, 1431-1442, 1985.
- 7) Azuma N, Izumi T, Tajima S et al: Expression type II collagen at the middle stages of chick embryonic and human fetal skin development. J. Invest. Dermatol. 102, 958-962, 1993.
- 8) Hayashi A, Suzuki T, Wachi et al: Minoxidil stimulate elastin expression in aortic smooth muscle cells. Arch. Biochem. Biophys. 315, 137-141, 1994.
- 9) Tajima S and Pinnell SR: Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture. Studies of fibroblast explanted from papillary and reticular dermis. J. Invest. Dermatol. 77, 410-412, 1981.
- 10) Towbin H, Staechelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354, 1979.
- 11) Hayashi A, Wachi H and Tajima S: Presence of elastin-related 45-kDa fragment in culture medium: Specific cleavage product of tropoelastin in vascular smooth muscle cell culture. Biochim. Biophys. Acta 1244, 325-330, 1995.
- 12) Yamane Y, Yaoita H and Couchman JR: Basement membrane proteoglycans are of epithelial origin in rodent skin. J. Invest. Dermatol. 106, 531-537, 1996
- 13) Wachi H, Seyama Y, Yamashita S et al: Cell cycle-dependent regulation of elastin gene in cultured chick vascular smooth muscle cell. Biochem. J. 309, 575-579, 1995.