

ヒト脂腺細胞に代るハムスター脂腺細胞を用いた 皮脂代謝に関する基盤研究

東京薬科大学 薬学部第1生化学教室

佐藤 隆

Sebaceous gland is one of important skin appendages and sebum excretion is considered to associate with maintaining normal cutaneous functions. Development of sebaceous glands is dependent on androgens in vivo and sebocytic differentiation sequentially occurs with accumulating abundant cytoplasmic lipids. In addition, the abnormal augmentation of lipogenesis causes the sebaceous gland disorder such as acne vulgaris. However, the regulation of lipid metabolism in sebaceous glands remains unclear. We have recently established the culture system of hamster sebocytes from the auricles, and investigated the regulation of lipid metabolism in the cultured hamster sebocytes. Insulin, interleukin 6 (IL-6) and prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) were found to augment the accumulation of intracellular lipid droplets, whereas epidermal growth factor (EGF) suppressed in hamster sebocytes. The regulation of lipogenesis by these factors was due to the alteration of intracellular triglyceride (TG) level. On the other hand, perilipin, which is located exclusively at the surface of intracellular lipid, mainly TG, and may participate in the lipid metabolism in adipocytes, was found to be expressed on the surface of lipids accumulated in hamster sebocytes. Furthermore, the expression of perilipin was augmented by insulin and IL-6 along with the lipid formation. These results suggest that insulin, IL-6 and PGF $_{2\alpha}$ are endogenous modulators for lipogenesis in hamster sebocytes, and that perilipin may be involved in the formation of lipid droplets and the regulation of lipid metabolism in hamster sebocytes.

1. 緒言

皮膚は生体の最も外側に位置する器官であり、外界の刺激から体を保護するためのいくつかの機能を備えている。皮脂腺からの皮脂の分泌も皮膚機能のひとつに挙げられ、皮膚表面を覆う弱酸性の脂質層を形成し、外的物質の侵入防止や脂溶性有害物質の排泄など重要な役割を担っていると示唆されている¹⁾。また、皮脂はその過剰分泌により、脂漏性皮膚炎やニキビの発症、肌のでかりといった健康および美容上の好ましくない現象を引き起こすことが知られている²⁾。一方、皮脂腺における脂質生合成調節に関しては、脂腺細胞の単離培養が困難なことから、動物実験を用いた組織学的検討や皮表脂質の組成分析がなされてきた^{3~5)}。最近になり、ヒトおよびラットの脂腺細胞が単離培養され^{6, 7)}、細胞レベルでの研究が進みつつある。しかしながら、脂腺細胞における皮脂産生調節の詳細に関しては、ほとんど明らかにされていないのが現状である。

我々は、ハムスターの耳介部より自発的に脂質を細胞内に蓄積し、継代かつ長期培養が可能な脂腺細胞を樹立した。また、その細胞特性がヒト脂腺細胞と類似していることから、皮脂腺の研究においてヒト脂腺細胞に代る有用な細胞

であると考えている。一方、多様な皮膚機能調節には増殖因子、サイトカインやホルモンなど種々の生理活性物質が寄与することが示唆されており^{8~10)}、これら因子が皮脂産生調節に対しても何らかの作用を示すことが推察される。そこで、本研究ではハムスター脂腺細胞を用いて、1) 上皮成長因子 (EGF)、インスリン、インターロイキン6 (IL-6) やプロスタグランジン (PG) 類の皮脂産生に対する影響を検討した。また、脂肪細胞において同定された細胞内の脂質蓄積の調節分子であるペリリピン^{11,12)}に着目し、2) 脂腺細胞における皮脂の蓄積とペリリピンの発現制御について検討した。

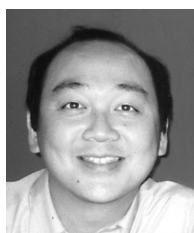
2. 実験

2.1 細胞調製と処理方法

ハムスター脂腺細胞を定法¹³⁾により5週齢の雄ゴールデンハムスターの耳介部より単離し、6%ウシ血清と2%ヒト血清を含むDMEM/F-12培養液において培養した。細胞を播種後、翌日にEGF (10ng/mL)、インスリン (20nM)、IL-6 (5ng/mL) またはPGF $_{2\alpha}$ (10 μ M) を添加した培養液で培養した。培養液は3日ごとに交換し、11日間培養した。

2.2 Oil red O 染色とペリリピンの免疫染色法

細胞内に脂質を蓄積した細胞を4%中性ホルマリン溶液で固定して、oil red O 染色液で細胞内脂質を染色した。また、細胞内のペリリピン局在は、同様に固定した細胞においてマウスペリリピン抗体 (愛媛大学医学部 澄田道博博士より供与) を用いて蛍光抗体法により検出した。



Molecular mechanism of intracellular lipid metabolism in hamster sebocytes in vitro

Takashi Sato

Department of Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, School of Pharmacy

2.3 細胞内トリグリセリド量の定量

ハムスター脂腺細胞の細胞内脂質の組成としては、トリグリセリド (TG) が総脂質量の約 70% を占めることを確認していることから、薬物処理した細胞中の TG 量を測定した。すなわち、0.25% トリプシン / 0.02% EDTA 溶液を用いて回収した細胞を超音波細胞粉碎装置により細胞を破壊して試料とし、細胞内の TG 量を市販の TG 測定キットを用いて定量した。

2.4 ウエスタンブロット法によるペリリピン発現調節の解析

薬物処理した細胞を 1% nonidant P-40 10.1% SDS で溶解し、10,000rpm で遠心した後の上清を試料として、マウスペリリピン抗体を用いて ECL-ウエスタンブロット法によりペリリピン発現調節を解析した。また、試料中のタンパク質量を Lowry 法¹⁴⁾ により定量した。さらに、ペリリピンは脂肪細胞でその発現が報告されていることから、インスリン処理により分化させたマウス 3T3L1 細胞の試料をペリリピンのポジティブコントロール¹⁵⁾ とした。

3. 結果

3.1 培養ハムスター脂腺細胞の脂質産生調節

ハムスター脂腺細胞は自発的に脂質を細胞内に蓄積し (図 1 A)、その割合は全細胞数の約 40% であることをフローサイトメトリーにより確認している。細胞をインスリン (20nM) で処理すると細胞内脂質の蓄積に依存して oil red O 染色陽性細胞数の増加が観察された (図 1 B)。また、IL-6 (5ng/mL) および PGF_{2α} (10μM) の処理においても同様の結果が観察された (図 1 D および E)。しかしながら、EGF (10ng/mL) を処理した細胞では細胞内脂質の減少が観察された (図 1 C)。一方、各処理における細胞内 TG 量を測定したところ、インスリン (20nM) 処理により細胞内量は 3.3 倍に増加し、IL-6 (5ng/mL) および PGF_{2α} (10μM) 処理においてもそれぞれ 2.0 倍増加することが明らかとなった。また逆に、EGF (10ng/mL) 処理では細胞内 TG 量は未処理群の 10% まで減少した (図 2)。

3.2 ハムスター脂腺細胞におけるペリリピン発現

細胞内脂肪の代謝に寄与するペリリピンは、脂肪細胞

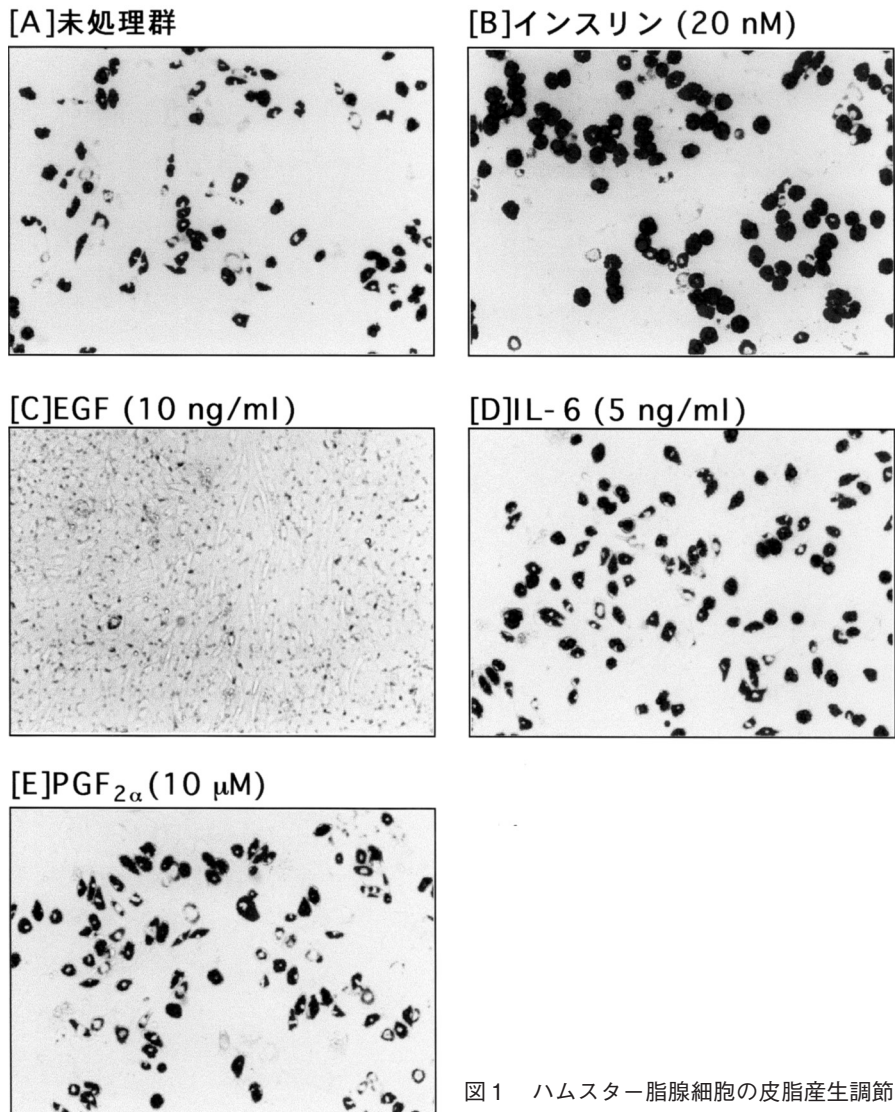


図1 ハムスター脂腺細胞の脂質産生調節

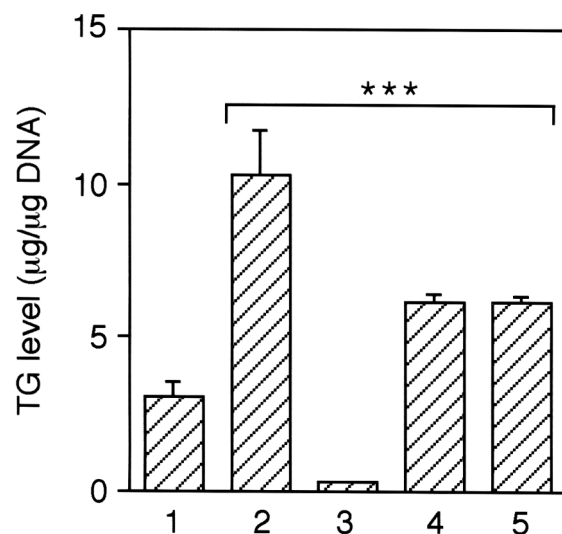


図2 インスリン、EGF、IL-6 および PGF_{2α} によるハムスター脂腺細胞の脂質産生調節

Lane 1, 未処理群; lane 2, インスリン (20nM); lane 3, EGF (10ng/mL); lane 4, IL-6 (5ng/mL) および lane 5, PGF_{2α} (10 M). ***p<0.001 (vs control).

11, 12, 15) や副腎皮質細胞^{16, 17)} においてのみその発現が認められているが、脂腺細胞の皮脂形成にも寄与するか否かについては全く不明である。そこで、ハムスター脂腺細胞におけるペリリピン発現を蛍光染色法により検討した。その結果、インスリン処理により皮脂産生を促進させた細胞において、細胞内脂肪滴の周囲にリング状のペリリピンの染色が認められた (図3)。この結果より、ハムスター脂腺細胞において細胞内の脂質蓄積とともにペリリピンが発現することが初めて明らかとなった。また、そのタンパク質の局在が脂肪細胞と同様に脂肪滴周囲であることが判明した。

3.3 ハムスター脂腺細胞のペリリピン産生調節

ハムスター脂腺細胞の皮脂産生調節に寄与するインスリン、EGF、IL-6 および PGF_{2α} のペリリピン産生に対する作用を検討した。その結果、ハムスター脂腺細胞において恒常的にペリリピンが発現しており、分化したマウス 3T3-L1 脂肪細胞に発現されたペリリピンと免疫学的に同一であることが判明した (図4 および5)。また、この脂腺細胞のペリリピンはウエスタンブロット法により分子量が約 57-kDa であることから、現在報告されている4つのペリリピンアイソタイプのペリリピン A^{12, 16)} であることが明らかとなった。一方、インスリン (20nM) 処理によりその発現は 1.4 ~ 2.0 倍増加した (図4 および5)。ま

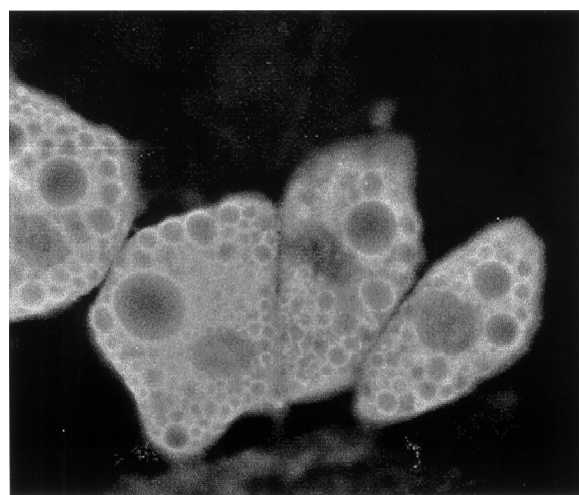


図3 ハムスター脂腺細胞におけるペリリピン発現

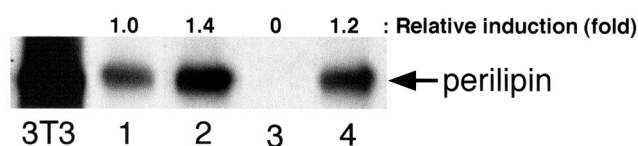


図4 インスリン、EGF および IL-6 によるハムスター脂腺細胞のペリリピン発現調節

Lane 1, 未処理群; lane 2, インスリン (20nM); lane 3, EGF (10ng/mL) および lane 4, IL-6 (5ng/mL). 3T3, 分化誘導したマウス 3T3 細胞.

た、IL-6 (5ng/mL) 処理においてもペリリピン発現は促進される傾向を示した (図4)。しかしながら、EGF (10ng/mL) 処理では皮脂産生抑制に比例してペリリピン発現は抑制された (図4)。一方、皮脂産生を促進した PGF_{2α} はインスリンおよび IL-6 とは異なり、ペリリピン発現には全く影響を及ぼさなかった (図)。これらの結果より、ハムスター脂腺細胞のペリリピン発現はインスリンおよび IL-6 により促進されること、また EGF 処理により抑制されること初めて明らかとなった。

4. 考 察

皮脂腺における皮脂の産生は、男性ホルモンにより促進的に、ビタミン A (レチノイン酸) により抑制的に調節されることが周知の事実である^{1, 3, 4)}。また、ヒトおよびラット脂腺細胞においても同様の報告がなされている^{6, 7)}。皮膚機能調節にはホルモンやサイトカインといった様々な生理活性物質が寄与すると示唆されることから⁸⁻¹⁰⁾、皮脂腺の脂質代謝調節にもこれら因子が関与することが推察される。本研究において、インスリン、IL-6 および PGF_{2α} がハムスター脂腺細胞の皮脂産生を促進すること、また EGF は皮脂産生を抑制することが判明した。したがって、インスリン、IL-6 および PGF_{2α} は皮脂産生促進因子として、EGF は皮脂産生抑制因子として機能するものと示唆される。

ペリリピンの機能は十分に明らかにされていないが、脂肪細胞においてその発現促進と細胞内の脂質蓄積が相関することが報告されている^{11, 15-17)}。また、ペリリピンは cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) によりリン酸化されることが知られており¹⁸⁾、このペリリピンのリン酸化によりホルモン感受性リパーゼによる細胞内脂質の分解が促進されることが報告されている^{19, 20)}。すなわち、ペリリピンは脂肪細胞の細胞内脂質の蓄積と代謝を制御する機能タンパク質であると示唆される。本研究において、ハムスター脂腺細胞内に形成された脂肪滴の周囲にペリリピンが発現していることを初めて明らかにした。このことは、脂肪細胞と同様にハムスター脂腺細胞においてもペリリピンが細胞内の脂質代謝に関与することを示唆するものである。

ペリリピンの発現調節に関しては、脂肪細胞において腫瘍壊死因子 (TNF- α) がその発現を抑制し、それに伴い細胞内脂質分解が誘導されるという報告のみである²⁰⁾。本研究において、脂質合成を促進するインスリンや IL-6 が

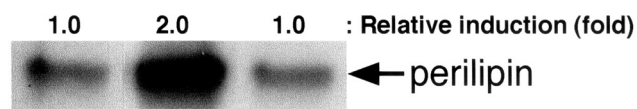


図5 PGF_{2α} によるハムスター脂腺細胞のペリリピン発現調節
Lane 1, 未処理群; lane 2, インスリン (20nM); および lane 3, PGF_{2α} (10M).

ペリリピン発現を促進すること、逆に脂質合成を抑制するEGFではその発現が抑制されることを初めて明らかにした。すなわち、ハムスター脂腺細胞において、これらサイトカインや増殖因子によるペリリピン発現制御に起因して皮脂産生が調節されているものと示唆される。

一方、ハムスター脂腺細胞においてPGF_{2α}は皮脂産生を促進したもののペリリピン発現には影響を及ぼさないことが判明した。ペリリピンは、その発現制御のみならずPKA 依存的リン酸化による分子修飾により脂質分解が促進される¹⁸⁾。逆に、細胞内脂質分解を制御する分子機序として、プロテインホスファターゼによるペリリピンの脱リン酸化機構が存在することも報告されている²¹⁾。したがって、現時点では皮脂産生を促進するPGF_{2α}がペリリピン発現に影響を及ぼさない理由は不明であるが、PGF_{2α}がペリリピンのリン酸化機構を制御することで皮脂産生を調節している可能性が示唆される。

5. 総括

ハムスター脂腺細胞の皮脂産生は、インスリン、EGFおよびPGF_{2α}により促進的または抑制的に制御されることが示唆される。また、ハムスター脂腺細胞において細胞内脂質の代謝調節分子であるペリリピンが細胞内脂肪滴周囲に発現していることを初めて明らかにした。さらに、このペリリピン発現がインスリンやEGFにより促進的または抑制的に制御され、その結果、脂腺細胞の皮脂産生が調節されるものと示唆される。

(引用文献)

- 1) Thody AJ, Shuster S, : Control and function of sebaceous glands, *Physiol. Rev.*, 69, 383-416, 1989.
- 2) 北村謙始, 小山純一, : オイリースキンの発生要因とその特徴/乳液, クリーム, 保湿剤, 宮地良樹編, : 臨床医のためのスキンケア入門, 先端医学社, 東京, 1997, 146-155 頁
- 3) Strauss JS, Kligman AM, Pochi PE, : Effects of androgens and estrogens on human sebaceous glands, *J. Invest. Dermatol.*, 39, 139-155, 1962.
- 4) Thody AJ, Cooper MF, Bowden PE, et al., : Effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone and testosterone on cutaneous and modified sebaceous glands in the rat, *J. Endocrinol.*, 71, 279-288, 1976.
- 5) Plewig G, Luderschmidt C, : Hamster ear model for sebaceous glands, *J. Invest. Dermatol.*, 68, 171-176, 1977.
- 6) Zouboulis ChC, Korge B, Akamatsu H, et al., : Effects of 13-cis-retinoic acid, all-trans-retinoic acid and acitretin on the proliferation, lipid synthesis and keratin expression of cultured human sebocytes in vitro, *J. Invest. Dermatol.*, 96, 792-797, 1991.
- 7) Rosenfield RL, Eplewski D, Kentsis A, et al., : Mechanisms of androgen induction of sebocyte differentiation, *Dermatology*, 196, 43-46, 1998.
- 8) Birnbaum JE, Sapp TM, Moore JB, : Effects of reserpine, epidermal growth factor, and cyclic nucleotide modulators on epidermal mitosis, *J. Invest. Dermatol.*, 66, 313-318, 1976.
- 9) Kupper TS, Min K, Sehgal P, et al., : Production of IL-6 by keratinocytes. Implications for epidermal inflammation and immunity, *Ann. NY Acad. Sci.*, 557, 454-465, 1989.
- 10) Sato T, Kirimura Y, Mori Y, : The co-culture of dermal fibroblasts with human epidermal keratinocytes induces increased prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 activity in fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, 109, 334-339, 1997.
- 11) Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, et al., : Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets, *J. Biol. Chem.*, 266, 11341-11346, 1991.
- 12) Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, et al., : Isolation of cDNAs for perilipin A and B: Sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 12035-12039, 1993.
- 13) Ito A, Sakiguchi T, Kitamura K, et al., : Establishment of a tissue culture system for hamster sebaceous gland cells, *Dermatology*, 197, 238-244, 1998.
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, et al., : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- 15) Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Barber T, et al., : Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes, *J. Lipid Res.*, 36, 1211-1226, 1995.
- 16) Servetnick DA, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, et al., : Perilipin are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells, *J. Biol. Chem.*, 270, 16970-16973, 1995.
- 17) Brasaemle DL, Barber T, Kimmel AR, et al., : Post-translational regulation of perilipin expression: Stabilization by stored intracellular neutral lipids, *J. Biol. Chem.*, 272, 9378-9387, 1997.
- 18) Egan JJ, Greenberg AS, Chang M-K, et al., : Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by

- insulin and beta-adrenergic stimulation, *J. Biol. Chem.*, 265, 18769-18775, 1990.
- 19) Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, et al., : Perilipin: Unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells, *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 611-615, 1995.
- 20) Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, et al., : BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor- α : a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones, *Diabetes*, 47, 691-695, 1998.
- 21) Clifford GM, McCormick DKT, Londos C, et al., : Dephosphorylation of perilipin by protein phosphatases present in rat adipocytes, *FEBS Lett.*, 435, 125-129, 1998.