

日光老化について ―とくに日光弾性線維症の発症機構 ならびに UV^s 症候群の病態に関する研究―

熊本大学 医学部皮膚科

小 野 友 道

Long-term incubation of proteins with glucose leads to the formation of advanced glycation end products (AGEs), which are characterized by fluorescence, brown color, and cross-linking. AGEs are thought to be involved in aging and age-enhanced diseases. Chronic exposure of the skin to sunlight induces hyperplasia of the elastic tissue in the upper dermis known as actinic elastosis.

Herein we used a monoclonal anti-AGE antibody (6D12) and a rabbit polyclonal anti-AGE antibody, which are shown to recognize N ϵ -(carboxymethyl)lysine (CML) as those epitope. Fifty-seven skin samples of sun-exposed and -unexposed areas were obtained from 51 patients aged 9–100 years. Immunohistochemically, CML deposition was observed in the elastic materials from all these specimens showing actinic elastosis with marked elastic-tissue changes. In contrast, CML deposition was not found in the specimens from sun-unexposed areas without significant actinic elastosis. Immunoelectron microscopic examination demonstrated that CML accumulated predominantly in elastic fibers especially in the amorphous electron-dense materials corresponding to photo-induced degenerated area rather than the electron-lucent region. Immunochemical analyses with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of elastase-soluble fractions demonstrated that the CML levels of the sun-exposed area were significantly higher than those of the sun-unexposed area.

These results indicate that elastin in actinic elastosis lesions of photoaged skin is modified by CML which has been proposed as a potential biomarker of oxidative damage of tissue proteins *in vivo*. Although it is not clear whether AGE accumulation in the skin *per se* is a cause of the disease or simply its effect, it could at least serve as a biomarker for the duration and severity of oxidative damage to the skin *in vivo*. To support this idea, further studies are needed to elucidate direct effects of UV irradiation on the formation of AGEs *in vivo* and *in vitro*.

1. 緒 言

太陽から限り無い恩恵を享受され、その太陽を神と崇めて来たヒトが、太陽の陰の部分で認識しはじめたのはそう古い話ではない。1970年代のオゾン層の破壊と皮膚がんの関連が指摘され、急速に紫外線による皮膚への障害が注目を浴びたのである。我々はこの紫外線の皮膚への影響を、二つの観点に焦点を当てて研究を進めている。すなわち慢性日光障害としての日光弾性線維症の発症機構、そして遺伝性日光過敏性疾患の発症解明と診断システムの開発である。

日光弾性線維症については、皮膚真皮の弾性線維の変化が主体であるが、その変性にメイラード反応が関与する事を我々ははじめて明らかにした¹⁾。すなわち、メイラード反応後期反応生成物 (AGE: Advanced Glycation Endproducts) の弾性線維への沈着を確認し、現在種々の抗 AGE 抗体を作成し²⁾、その詳細を検討している。また後者に関しては、新しい疾患概念 UV^s 症候群を確立し、また遺伝性日光過敏性疾患診断フローチャートの作成を試みている。



Photoaging – Studies on the pathogenesis of actinic elastosis and the diagnostic method for UV^s syndrome –

Tomomichi Ono

Department of Dermatology, Kumamoto University School of Medicine

今回は日光弾性線維症の発症機作について検討する。

2. 実 験

2.1 日光弾性線維症について

2.1.1 材料および方法

腫瘍などの外科的に切除された皮膚の周辺正常部を、ホルマリン固定ならびに -80°C で凍結保存された9歳から100歳の51名57件体を用いた。免疫組織学的検索に用いた抗体は堀内らが開発した抗 AGE ポリクローナル抗体³⁾、抗 CML 抗体 (6D12)⁴⁾ を用いた。

免疫組織学的観察：凍結切片を用いて AGE の存在および分布を検索した。新鮮凍結組織に凍結組織包埋剤 (OCT-compound, TISSUE-TEK 社) を加えた後、クリオスタットで、 $6\mu\text{m}$ に薄切し、gelatin-coated glass slide に貼付、室温で24時間風乾した。その後 4°C アセトンで10分固定、メタノール処理後3%過酸化水素水に10分浸し、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。PBSで10分間、3回洗浄後、一次抗体として5%ウマ血清アルブミンを含んだPBSで1000倍に希釈した CML (carboxymethyl lysine protein) をエピトープとした polyclonal、および monoclonal anti-AGE antibody、および4000倍に希釈した mono-clonal anti-bovine alpha-elastin antibody (Elastin Product Company) を用いて、 4°C で一昼夜反応させた。次に PBS で10分間、3回洗浄後ビオチン化抗マウス IgG、抗体にて30分間反応させた。さらに PBS で5分間3回洗浄後 avidin-biotinylated peroxidase complex (Vectastain

社)にて45分間反応させた。DAB・H202にて発色、Hematoxylinで核染色を行い脱水封入した。対照試験には monoclonal anti-AGE antibody を AGE-BSA で吸収して用いる吸収試験を行った。

電顕観察：通常電顕用はKarnovsky液で前固定、PB洗浄後2%オスミウム酸で固定した。エタノール系列で脱水、Epon812で包埋した。薄切後クエン酸鉛と酢酸ウラニウムで二重染色および一部の切片についてはタンニン酸染色を行った。免疫電顕用にはpost-embedding法を用いた。LR White resin包埋後超薄切片を、金コロイド法で、抗CML抗体を15nm、抗エラスチン抗体には6nmで標識した。

動物実験：ヘアレスマウス(Hos:Hr-1,雄、試験開始時7週齢)を用いた。紫外線照射はタイマーを用いて8:00～20時の間、15週、30週および45週毎日照射した。紫外線強度は紫外線照度計(UVR305/365D II, TOPCON製)でヶ月ごとに補正した。肉眼的観察、病理組織学および免疫組織学的検討を行った。

3. 結果と考察

3.1 背景

紫外線は長波長(320–400nm)、中波長(290–320nm)および短波長に区分されている。それぞれUVA、UVBそしてUVCと略記される。UVCはオゾン層が破壊されなければ地上に届くことはない。一方、UVAはその地表への到達量はUVBの10倍以上である。幸いUVAの光生物学的効果はUVBの1/1000とみなされている。つまりUVAは安全な紫外線と思われて来たのである。小麦色に焼けた肌が健康のシンボルとされていたのである。いわゆる「日焼けサロン」はその一つの現象である。しかし、最近UVAの皮膚への影響が注目され始めている。一つはUVBとの相乗的に作用し、それは日光発がんに関係すること。もう一方でUVAが真皮深く到達するために、線維芽細胞にまでその影響をおよぼし、光老化のフリーラジカル説からも、その影響を無視できないことである。さらに高齢社会の今日、日光老化による発がんと皮膚の老化が社会生活において、そのQOLを著しく低下させていることが認識されねばならない。

我々はこのような観点から、日光老化、なかんずくそのもっとも顕著な病理学的変化である「日光弾性線維症」のについて検討している。

さて、日光弾性線維症は病理組織学的に真皮網状層に好塩基性に染まる彎曲・ちじれ・膨化した線維として観察される。高度になるとそれは一塊となり、無均質な塊状物質として観察される。この断列した線維あるいは塊は、1) 光顕的に弾性線維染色陽性、2) 抗エラスチン抗体陽性、3) 弾性線維周囲micro-fibrilを認識する抗amyloid P com-

ponent抗体⁵⁾ならびに抗HB-8抗体陽性⁶⁾、4) 電顕的に弾性線維構造を示す部分があること、また酸オルセイン染色陽性であることなどから本物質が弾性線維由来であることが示唆され、elastotic materialとも呼ばれている。その産生機序として、既存の弾性線維の変性あるいは紫外線の影響で変化した線維芽細胞が異常な弾性線維前駆物質分泌により、異常な弾性線維形成などの説⁷⁾がある。またelastotic materialがその増加が顕著なのは、lysozymeによるelastaseの分解抑制がおこるとの説⁸⁾もある。いずれにせよelastotic material形成の機序は全く不明である。

3.2 日光弾性線維症とメイラード反応後期生成物(AGE)

3.2.1 メイラード反応後期生成物(advanced glycation endproducts, AGE)について⁹⁾

多くの蛋白質が生体内で非酵素学的修飾、メイラード(Maillard)反応を受ける。この反応は古く1912年Maillard¹⁰⁾が、アミノ酸と還元糖を加熱すると黄褐色色素が生成されることを発見したことから始まる。蛋白質のアミノ酸と還元糖のカルボニル基とが反応し、シッフ塩基、さらにアマドリ転位生成物を形成する前期反応と、これらの前期反応生成物がさらに酸化、脱水、縮合、環状化などの反応を経由して、メイラード反応後期生成物(advanced glycation end-products, AGE)にいたる後期反応がある。すなわち、AGEは蛋白の非酵素的糖付加反応によって不可逆的に生成された構造の総称である。現在迄に明らかにされてきたAGE構造体は、CML(カルボキシメチルリジン)、ピラリン、ペントシジン、クロスリン、X1、ピロピリジンなどである。当初、本反応は食品化学領域で重視されてきた。しかし、1960年代に入りアマドリ転位生成物としてのヘモグロビンA1cが血糖コントロールの指標として応用されるようになり、生体でのメイラード反応が注目されるようになった。すなわち、老化あるいは粥状動脈硬化症、糖尿病などとの関連が知られて来た。特にCML形成において、酸化が重要な意義を有することが明らかとなるにつれ、CMLがglycoxidation products(GOP)として提唱され、生体蛋白質の糖化および酸化を反映する指標となることが示唆されて来た。CMLsはその産生過程で、活性酸素が産生され、それが生体分子を損傷し、またさらにAGE形成を促進したりするのである。

3.2.2 日光弾性線維症におけるAGE局在

光顕・免疫組織学的レベルでの局在：我々は堀内らが作成したポリクローナルおよびモノクローナル抗AGE抗体(6D12, CMLをエピトープ)を用いて、日光弾性線維症病変部にAGEが局在することを免疫組織学的に確認した。そして、抗エラスチン抗体局在部とその沈着がほぼ一致す

ることを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。すなわち9歳から100歳までの51人からの露光部あるいは非露光部皮膚57検体を材料として検討を行った。HE染色で明らかに日光弾性線維症の所見を認めた28検体は53歳以上であったが、それらはいずれも凍結切片で免疫組織学的に、病変部に一致してCML陽性であった(図1)。28歳から42歳の5検体においては、HE染色にて明らかな日光弾性線維症所見は見られなかったが、免疫組織学的に僅かに線状にCML陽性が認められた。10代4検体では完全に陰性であった。非露光部20検体は年齢に関わらずHE染色で陰性であった。免疫組織学的には2例で僅かな陽性を呈した。さらに皮膚組織内におけるCMLの存在を確認するために、薄切した凍結組織をエラスターゼで消化後、エラスターゼ可溶性分画をCMLを用いたELISA法で測定した。71歳から91歳の5例の、それぞれの露光部および非露光部皮膚での比較では全例露光部の値が非露光部より高値を示した。また露光部あるいは非露光部の一方から採取され

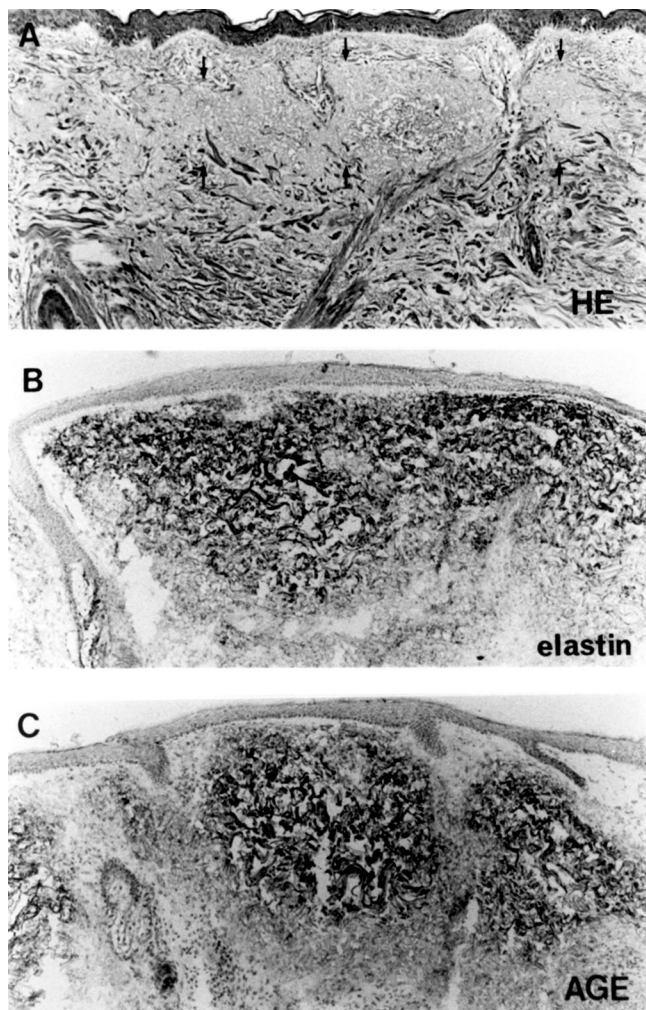


図1 日光弾性線維症： A) HE；真皮に好塩基性に染色される塊状の物質(←)が認められる、 B) 抗 elastin 抗体での免疫染色；日光弾性線維症部に一致して陽性、 C) 抗 CML 抗体での免疫染色；日光弾性線維症部に一致して陽性

た13検における群間比較でも、露光部に優るCMLレベルは高いことが判明した。

免疫電顕レベルでの局在：通常日光老化部の真皮に観察される高電子密度部の増加した弾性線維においては、エラスチンを示す6nm金粒子は弾性線維低電子密度部に限局する傾向がみられた(図2)。一方、CMLの局在を示す15nm金粒子は高電子密度部に存在した。なお同一症例の非露光部弾性線維には、高電子密度部がほとんど観察されず、CMLの局在も認められなかった。

なお、電顕的にも明確に弾性線維と断定できない amorphous material には、CML がエラスチンと混在して認められた。一方、コラーゲン線維には明らかなCMLの局在は確認できなかった。

以上の結果から日光老化皮膚に認められる日光弾性線維症病変部の elastotic material は弾性線維がCMLの修飾を受けていること、日光により変化した弾性線維の高電子密度部の発現にはCMLが関与していることが明らかにされたと考えている。

マウスにおける日光老化とAGE: UVA,UVBおよびUVA+UVB照射をそれぞれ5匹ずつ行った。UVA+UVB群が肉眼的に顕著なしわ、皮膚肥厚がみられ、日光老化の所見を呈したが、それでもヒトにみられる日光弾性線維症は確認できなかった。また免疫組織学的にもAGEの局在は確認できなかった。

3.3 今後の展望

前述したようにAGE, なくなくCMLの生成には酸化過程は活性酸素産生をともなうことが明らかになって来た。このことは日光老化が紫外線誘発の酸化ストレスと深く関

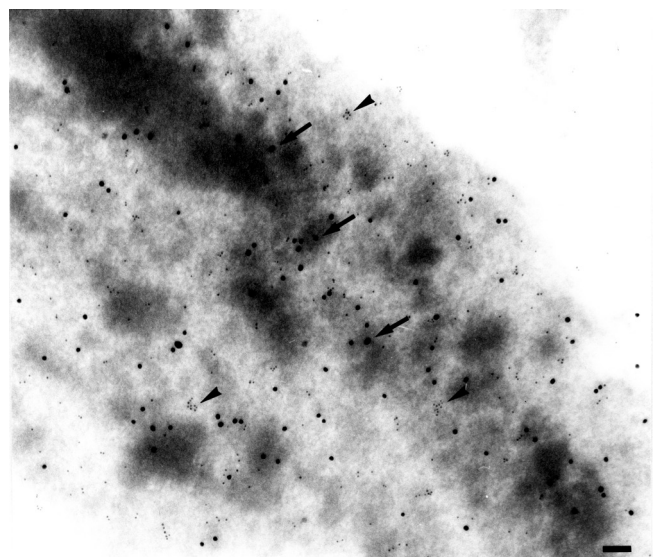


図2 日光弾性線維症；二重免疫染色電顕像：弾性線維の高電子密度部に一致して15nmの金粒子(←)が存在し、CMLの局在を示す。また6nm金粒(◄)は低電子密度部に認められるエラスチンの局在を示す(Bar: 100nm)

わっていることの傍証にもなる。この点で我々の研究は日光老化のきわめて重要なポイントを捉えている可能性が強い。

今後、他の AGE, たとえばペントシジンなどについても検討を予定しているが、我々は光顕レベルではやはり日光弾性線維症部にその局在していることを確認している。なお、我々の観察ではコラーゲ線維には CML は確認されなかった。その理由が判明すると、さらに日光老化の解明が進むと考えている。またマウスでの実験で日光弾性線維症が発症しにくいことの原因を解明することも、動物側の因子のみならず、日光弾性線維症の発症に紫外線のみならず、他の日光成分の影響も含めて検討されねばならないと考えている。

(文 献)

- 1) Mizutani K, Ono T, Ikeda K, et al. : Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N^ε-(carboxymethyl)lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction, J. Invest. Dermatol., 108, 797-802, 1997.
- 2) Itoh T, Fujiwara Y, Ono T, et al. : UV^S syndrome, a new general category of photosensitive disorder with defective DNA repair. Is distinct from xeroderma pigmentosum variant and rodent complementation group 1, Am. J. Hum. Genet., 56, 1267-1276, 1995.
- 3) Horiuchi S, Araki N, Morino Y. : Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction ; evidence for the presence of a common structure, J. Biol. Chem., 266, 7329-7332, 1991.
- 4) Ikeda K, Higashi T, Sano H, et al. : N^ε-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction, Biochemistry, 35, 8075-8083, 1996.
- 5) Mera SL, Lovell CR, Jones RR, et al. : Elastic fibers in normal and sun-damaged skin; an immunohistochemical study, Br. J. Dermatol, 117, 21-27, 1987.
- 6) Matsuta M, Izaki S, Ide C, et al. : Light and electron microscopic immunohistochemistry of solar elastosis; a study with cutis rhomboidalis nuchae, J. Dermatol, 14, 364-374, 1987.
- 7) Bouissou H, Pieraggi MT, Julian M, et al. : The elastic tissue of the skin, a comparison of spontaneous and actinic (solar) aging, Int. J. Dermatol, 27, 327-335, 1988.
- 8) Albrecht S, From L, Kahn HJ. : Lysozyme in abnormal dermal elastic fibers of cutaneous aging, solar elastosis and pseudoxanthoma elasticum, J. Cutan. Pathol, 18, 75-80, 1991.
- 9) Horiuchi S. : Advanced glycation end products (AGE)-modified proteins and their potential relevance to atherosclerosis, Trends Cardiovasc. Med, 8, 163, 1996.
- 10) Maillard LC. : Action des acides amines sur les sucres ; formation des melanoidines par voie methodique, CR. Acad. Sci. (Paris), 154, 66-68, 1912.