

# 加齢および創傷治癒に伴う皮膚真皮細胞外マトリックスの組成変化： バーシカン発現に注目して

京都大学大学院医学研究科皮膚科学

室賀 絵里

Versican is a chondroitin sulphate proteoglycan that is present in the dermis of the skin as one of the extracellular matrices (ECMs). Here we investigated the role of versican in the maintenance of skin integrity by examining how its expression is regulated on wounding and skin aging. On skin wounding, versican expression was transiently upregulated in the dermis and gradually disappeared. In the aged skin, versican was almost absent from the upper dermis, while in the reticular dermis more versican was found associated with the degenerated elastic fibers undergoing solar elastosis. Versican is considered to play a role in skin wound healing and also in the age-related changes of skin texture.

## 1. 緒言

皮膚は体表面にあって老化が如実に現れる臓器であり、その状態はQOLをも左右しうる。特に真皮成分の減少は皺とたるみをもたらす主原因であるため、真皮細胞外マトリックスの加齢変化は老化機構およびアンチエイジング研究の発展において重要な位置を占める。

真皮のボリュームを規定する細胞外マトリックス成分には、コラーゲンや弾性線維などの線維性成分のほか、プロテオグリカンやグリコサミノグリカンがある。プロテオグリカンの中でも真皮線維芽細胞が細胞外に分泌するバーシカンはコンドロイチン硫酸鎖を多数有し、またヒアルロン酸結合部位を持つことから、真皮の水分量とボリュームを保持する上で重要な役割を担っていると考えられる。また、間質に存在するバーシカンが皮膚線維芽細胞そのものを取り巻く微小環境として、細胞のマトリックス産生機能やviabilityを調節している可能性がある。

国内外においてバーシカンは動脈硬化などの血管病変や悪性腫瘍との関連では盛んに研究されており、近年血管平滑筋細胞における詳細な発現機構が解明されている<sup>1)</sup>。皮膚におけるバーシカンは表皮の基底層と真皮弾性線維のmicrofibril周囲に分布し<sup>2)</sup>、また毛乳頭細胞においては毛包の成長期の維持に関与していることが報告されている<sup>3)</sup>。日光弾性線維症の皮膚においてバーシカンがヒアルロン酸との結合能を失っていることがHasegawaらにより明らかにされており<sup>4)</sup>、光老化によりバーシカンに質的变化が生じている可能性が指摘される。

我々はこのバーシカンに注目し、皮膚線維芽細胞におけるその調節機構、創傷における発現の変化、および加齢変化との関連を研究した。

## 2. 実験

### 2-1 創傷治癒におけるバーシカンの発現変化

C57BL6/Jマウスの背部皮膚を除毛後、1cm長の全層皮膚欠損創を作成、創表面をポリエチレンフィルムにて保護した。1日後、2日後、3日後、5日後、7日後、10日後の皮膚組織を採取、4%パラホルムアルデヒドにて固定後パラフィン切片を作成した。脱パラフィン後抗マウスバーシカン抗体で染色、蛍光顕微鏡で観察した。

### 2-2 加齢におけるバーシカンの発現変化

10歳代から70歳代までの女性の顔面良性皮膚腫瘍の摘出時の手術標本を用い、非病変部のパラフィン切片を作製した。脱パラフィン、95度10分間オートクレーブによって抗原活性化処理を行った。ブロッキング後、マウスモノクローナル抗ヒトバーシカン抗体で染色、核染色をTOTO 3にて行い、蛍光顕微鏡で観察した。

## 3. 結果

### 3-1 (図1)

非創傷部では毛包周囲と毛乳頭のみにはバーシカンは局在し、真皮には染色されなかった。創傷作成後、バーシカンの発現が創傷部の真皮に出現、経時的に増強し、5日目～7日目に最大となった。その後徐々に減少し、約2週間で消失した。

### 3-2 (図2)

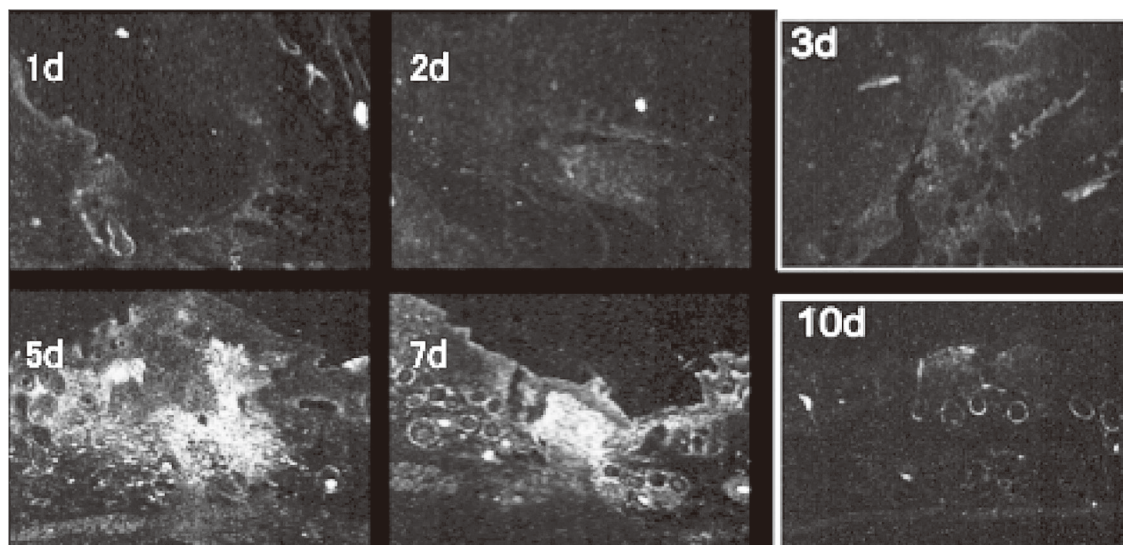
19歳女性では真皮全体に張り巡らされた繊細な弾性線維ネットワークが表皮直下まで及んでいた。37歳女性では真皮中層の弾性線維束が19歳に比較して肥厚がみられ、solar elastosisの始まりがみられたものの、弾性線維ネッ



Changes in versican expression in skin wound healing and aging

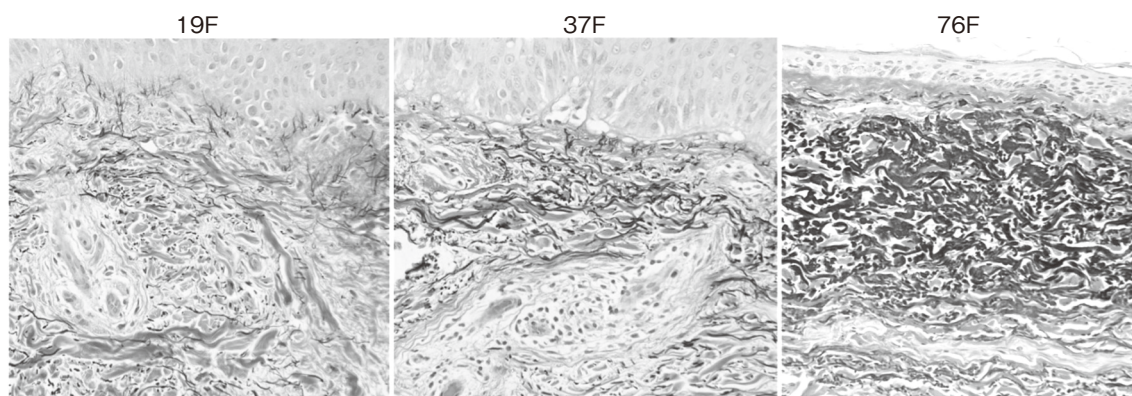
Eri Muroga

Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine



5～7日後をピークとして創傷部の真皮浅層に強いシグナルが観察される。

図1 マウス創傷におけるパーシカン発現の経時的推移



19F (19歳女性)、37F (37歳女性)、76F (76歳女性)。19歳女性では真皮全体に張り巡らされた繊細な弾性線維ネットワークが表皮直下まで及ぶ。37歳女性では真皮中層の弾性線維束が19歳に比較して肥厚がみられ、solar elastosisの始まりがみられるが、ネットワークは表皮直下まで分布している。76歳女性では表皮は平坦化し、真皮浅層の弾性線維が消失し、連続性が失われる。中層から網状層に日光変化によるsolar elastosisが塊状にみられる。

図2 ヒト顔面皮膚のエラスティカ・ファン・ギーソン染色。弾性線維が茶色で染色される。

トワークは表皮直下まで分布していた。76歳女性では表皮は平坦化し、真皮浅層の弾性線維が消失し、連続性が失われていた。また、中層から網状層に日光変化によるsolar elastosisが塊状にみられた。

### 3-3 (図3)

サンプル1：19歳皮膚の真皮浅層には弾性線維と関連してパーシカン染色が豊富に観察され、細線維状にoxytalan fiberに一致して表皮直下にまで分布していた。真皮深層では成熟した弾性線維ネットワークと一致してfiber状に染色が観察された。

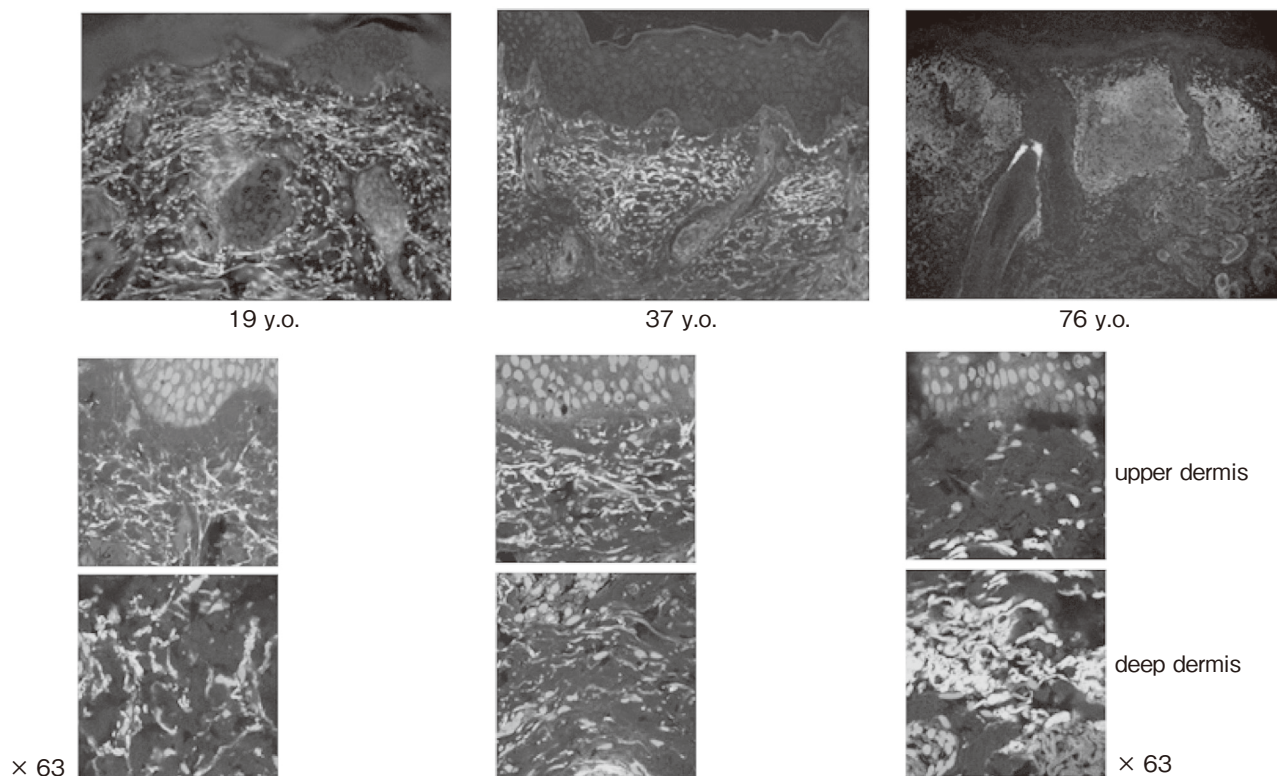
37歳皮膚では真皮浅層および真皮深層のパーシカン強度に変化はみられなかったが、表皮直下の細線維状のパー

シカンが19歳皮膚に比較して減少していた。

75歳皮膚では真皮浅層のパーシカンが著減していた。一方で真皮深層にはパーシカンが塊状に分布し、増加していた。

## 4. 考察

マウス創傷での分析により、パーシカンは創傷治癒過程における欠損部の修復に大きくかかわっている分子であることが明らかとなった。パーシカンは創傷真皮の線維芽細胞で一過性に発現が上昇し、2週間後には消失する。我々のケロイド病変部由来の組織および初代培養細胞による研究では正常皮膚線維芽細胞に比較してパーシカンの発現がメッセジレベルでも蛋白レベル双方において増強してお



deparaffin, 95°C 10min autoclave in 10mM citrate buffer (ph6), washx3, 1% BSAinPBS block 30min, 1st anti-human versican (2B1) x500 4°C o/n, 2nd anti-mouse Cy3 x300 TOTO3 x900 37°C 30min

19歳および37歳女性皮膚では弾性線維周囲に一致して線維状の染色が真皮浅層まで観察される。76歳では真皮浅層のパーシカンが完全に失われ、真皮中層から網状層に solar elastosis に一致した染色が観察される。

上段：蛍光顕微鏡で撮影 中・下段：共焦点顕微鏡で撮影 下段：青は核染色 (TOTO3)

図3 ヒト顔面皮膚 (図2と同一組織) のパーシカン染色

り、創傷治癒機転の異常でECMの産生が持続的に過剰となっているケロイドのような状態においてパーシカンが何らかの役割を担っていることが推察された。

こうしたケロイドや肥厚性瘢痕のような真皮ECMの増加が問題となる病態に対し、真皮ECMの減少が問題となる状態の代表として皮膚老化が上げられる。特に美容的に問題となる皮膚のたるみと皺には皮膚ボリュームの減少および皮膚弾性の低下の両側面が関与する。加齢に伴う皮膚ボリュームの減少をきたすECM成分としてはコラーゲンやヒアルロン酸がよく研究されているが、プロテオグリカンに関する研究は少ない。皮膚に存在するプロテオグリカンであるパーシカンが関与している可能性に着目した。パーシカンは真皮浅層の弾性線維と関連して存在し、多数のコンドロイチン硫酸鎖を側鎖として有していること、またヒアルロン酸との結合能もあることから、皮膚浅層の保水を担っていると考えられる。本研究の露光部皮膚の免疫組織学的分析で、加齢皮膚においては真皮浅層のパーシカンが著減していた。保水作用のあるパーシカンの減少は弾性線維の減少と相まって、皮膚の弾力の消失、張りの喪失といった皮膚老化に関与していることが推察される。また老

化皮膚での solar elastosis は真皮中層から深層の弾性線維とパーシカンの量的増加であるものの、パーシカンはヒアルロン酸結合能を失っており、また弾性線維は変性して弾力を失った状態であるため、機能的な喪失といえる。

我々はパーシカンの制御にインターフェロン $\beta$ が関与していることを培養皮膚線維芽細胞を用いた実験で確認している (未公開データ)。パーシカンの発現を増強させる因子を解明すればアンチエイジングの有効な手段となりえる。血管平滑筋細胞でのパーシカン発現増強因子として血小板由来成長因子 (Platelet Derived Growth Factor:PDGF) が報告されており<sup>5)</sup>、皮膚においてもPDGFが創傷でのパーシカン発現のトリガーとなっている可能性がある。皮膚創傷刺激でパーシカンの発現が増強することは、レーザー治療やケミカルピーリング、自己血小板などの美容皮膚科的侵襲によって皮膚の張りが蘇るという現象の一部分を説明しているのかもしれない。こうした手技でパーシカン発現がどのように変化するかにつき、今後の検討が必要である。

皮膚において毛乳頭と外毛根鞘に特異的にパーシカンが存在すること、また一部の腫瘍細胞と関連して発現が増強

するという事実は、組織または腫瘍幹細胞を取り巻くECMとしての細胞への関与を示唆している。創傷においても、バーシカンはこの真皮浅層の間質に一過性に存在することで局所の皮膚線維芽細胞や表皮角化細胞、さらにはそれらの幹細胞を取り巻く微小環境として増殖や分化、蛋白合成などの細胞機能を調節している可能性がある。バーシカンの皮膚老化との関連が明らかとなれば、皮膚老化機構およびアンチエイジング研究の発展に大きく貢献するだけでなく、有効な皮膚老化防止法の開発への寄与も期待される。

#### (引用文献)

- 1) Rahmani M, Read JT, Carthy JM, McDonald PC, et al : Regulation of the versican promoter by the beta-catenin-T-cell factor complex in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem*, 280(13):13019-28, 2005.
- 2) Bode-Lesniewska B, Dours-Zimmermann MT, Odermatt BF, et al: Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *J Histochem Cytochem*. ;44 (4) :303-12, 1996
- 3) Soma T, Tajima M, Kishimoto J: Hair cycle-specific expression of versican in human hair follicles. *J Dermatol Sci*, 39 (3) :147-54, 2005
- 4) Hasegawa K, Yoneda M, Kuwabara H et al.: Versican, a major hyaluronan-binding component in the dermis, loses its hyaluronan-binding ability in solar elastosis. *J Invest Dermatol*, 127 (7) :1657-63, 2007
- 5) Schönherr E, Kinsella MG, Wight TN.: Genistein selectively inhibits platelet-derived growth factor-stimulated versican biosynthesis in monkey arterial smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys*. 1997 Mar 15;339 (2) : 353-61.