

レチノイン酸の皮膚内濃度モニタリングと 新規アンチエイジング分子の同定への応用

滋賀医科大学解剖学講座生体機能形態学部門

岡野 純子

It has been noted that retinoic acid (RA) is effective for the anti-aging action in the skin. Topical treatment with RA on the skin improves tension and elasticity by decreasing wrinkles, however, its mechanism has not been fully determined. The one of impediments in this research field is that we cannot visualize endogenous RA level in the skin. Since RA is not a molecule but a compound, it is impossible to establish a mouse model by delete directly RA. Thus, we aimed to determine key molecule(s) associated with RA signaling in the skin and then attempted to establish mice in which we can visualize endogenous RA level by making use of the molecule(s). Targeting vector was designed and homologous recombination was performed in zygotes. As a result, chimera mice were delivered. This mouse model will be a powerful tool to analyze anti-aging actions of RA as well as effects of other anti-aging products on the skin.

1. 緒 言

レチノイン酸 (Retinoic acid : RA) は表皮細胞においてターンオーバーを促進し、真皮細胞においてコラーゲン生成を増加させるため、小皺、ハリ改善作用がある。従って昔からアンチエイジング物質として注目されてきた¹⁾。しかし、レチノイン酸の皮膚におけるアンチエイジングのメカニズムは依然不明である。分子生物学の進歩により、レチノイン酸セレプターが次々クローニングされた。またその後、トランスジェニックマウス作成技術が発展し、次々とレセプターノックアウトマウスが作られたが、1つあるいは2つのレチノイン酸セレプターをノックアウトしても、予想した如く皮膚に著明な表現型は現れず、RAの皮膚における機能解析は困難であった。これは、レチノイン酸セレプターは大きく2種類 (Retinoic acid receptor : RAR, Retinoid X receptor : RXR) に分けられるが、それぞれアイソタイプ (-α, -β, -γ) を持ち、さらにそれぞれのアイソタイプにサブタイプ (-1, -2, -3) が存在し、それぞれが相補的な働きをするため、標的のセレプターをノックアウトとしても他のセレプターが失われた分子の働きを補ってしまうためであると考えられている。一方、レチノイン酸シグナリングに関わるセレプター以外の分子の皮膚における解析は未だ十分とはいえない。そこで、本研究においては、まずRAシグナリングに関わる分子のうち、皮膚において豊富に発現している分子を探査した。次に、皮膚におけるRA濃度をRAセレプターを用いて再検証した。最後に皮

膚においてRA濃度を可視化することを目標とし、現在この課題に取り組んでいる。

2. 方法および結果

2. 1.

2. 1. 1. レチノイン酸シグナリングに関わる分子の、皮膚における遺伝子発現解析

レチノイン酸が皮膚においてアンチエイジング作用を持つということは、皮膚をレチノイン酸で処理するとレチノイン酸シグナリングに関わる分子の発現変化があると予想できる。そこで、どの分子が皮膚の正常発生において豊富に発現しているかを検討した。まずレチノインセレプター (Retinoic acid receptor : RAR, Retinoid X receptor : RXR) の発現を免疫染色およびin situ hybridizationを用いて調べたが、はっきりとした特異的発現パターンは見られなかった。これは、レチノインセレプターに対する抗体はRARおよびRXRのサブタイプを判別することはできないことが原因と考えられた。次に、RARあるいはRXRの個々のアイソタイプのRNA in situ hybridizationのprobeを作成し、in situ hybridizationを試みた。しかし調べたセレプターのうちで、皮膚に特異的に発現するものを見つけることはできなかった。

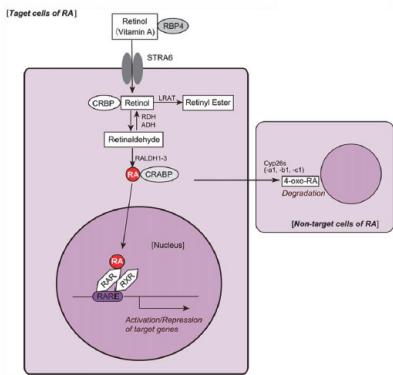
よって、従来の活性リガンド (RA) が存在する部位にセレプターがありき、という概念では解析が難しいと考え、RAは、合成酵素 (retinaldehyde dehydrogenase : Raldh1, -2, -3) と分解酵素 (Cyp26 : Cyp26a1, -b1, -c1) のバランスによってその局在が決定される、という観点から解析を行うことにした (図1)。そこでRaldh1, -2, -3, Cyp26a1, -b1, -c1のin situ probeを作成し、in situ hybridizationを行ったところ、Cyp26b1のみに真皮および毛乳頭細胞に特異的な発現パターンが観察された(図2)。



Monitoring of endogenous retinoic acid levels in the skin to elucidate the anti-aging role of retinoic acid

Junko Okano

Department of Anatomy and Cell Biology,
Shiga University of Medical Science

図1 レチノイン酸シグナリングのシェーマ³⁾

RA 標的細胞(左)において、レチノール / RBP 4 複合体は STRA6 から細胞質内に入る。細胞内に入ったレチノールは CRBP (cellular retinol-binding protein) に結合し、LRAT (lecithin retinol acyltransferase) によってエステル化されて、細胞質内に貯蔵される。あるいは、RDH/ADH (retinol dehydrogenase/alcohol dehydrogenase) によって Retinaldehyde に酸化される。さらに Retinaldehyde は Raldh1-3 によって RA に変換される。CABP (cellular retinoic acid binding protein) と結合した RA は核に移行し、ダイマーを形成する転写因子 RAR/RXR と結合する。RAR-RAR/RXR は RA 応答配列 (RA responsive element) に結合して標的分子の活性化および抑制化を行う。

RA の非標的細胞(右)においては、RA は Cyp26s に分解されてしまう。

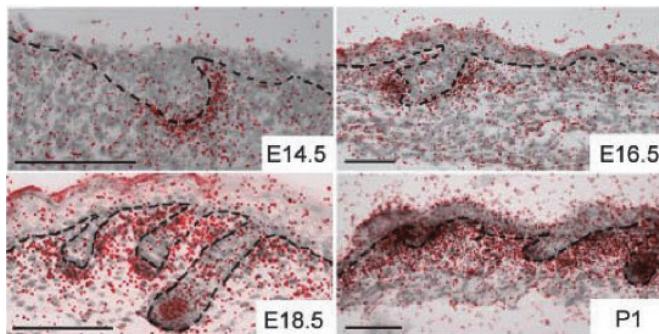


図2 皮膚発生および分化における Cyp26b1 の発現

Cyp26b1 の発現(赤)を示す。皮膚発生が開始する胎生 14.5 から毛包周囲の間葉細胞に発現し、発生が進むに従い真皮、毛乳頭に強い発現を認める。

2.1.2. 皮膚のレチノイン酸の濃度の検証

レチノイン酸は分子ではなく化合物であり、分子量 300 と非常に小さいので、直接可視化するのは非常に困難である。多くは、レチノイン酸の direct target である RARβ の遺伝子発現をレチノイン酸の濃度とみなしている。そこで、マウスの胎児皮膚を経時に採取し、正常発生および出生後の皮膚分化におけるレチノイン酸の発現を検証した。その結果、皮膚が発生・分化を開始する胎生 15.5 日から皮膚が成熟する胎生 18.5 日まで持続的に有意な RARβ の発現を認めた(図3、青)。次に皮膚において特異的発現が観察された Cyp26b1 を全身で欠損させたマウス (Cyp26b1-/マウス) の RARβ の発現を調べたところ、正常マウスと

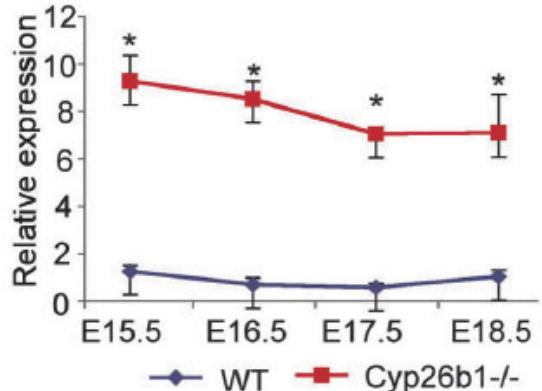


図3 皮膚発生・分化における RARβ の発現を示す。青：野生型マウスから採取した皮膚における RARβ の発現、赤：Cyp26b1-/-マウスから採取した皮膚における RARβ の発現。

比較して 8 – 10 倍ほど発現が上昇していた(図3、赤)。Cyp26b1-/-マウスの皮膚は野生型マウスと比べて表皮の肥厚、毛包の分化停止が見られたことから、これは RA を分解する Cyp26b1 が皮膚組織で欠損しているために起こったと考えられる。すなわち、適切な RA 濃度は正常皮膚および毛包発生に必要であり、その調節は Cyp26b1 が担っていることが判った。

2.2. レチノイン酸濃度の可視化

2.2.1. レチノイン酸シグナリングに関わる分子の、皮膚における遺伝子発現解析

皮膚においてレチノイン酸を可視化するために、まず 2.1. に倣って RARβ の RARE を 3 回リピートした上流に hsp68 プロモーターおよび LacZ 配列をつないだ配列をゲノム内に持つトランジェニックマウスの利用を試みた(以下 RARE-lacZ マウスと称する)。このマウスは、個体発生早期のマウスで、Raldh が発現する領域に LacZ が重複し、Cyp26s が発現する領域には決して重複しないことから、組織内の RA 濃度を反映することが過去の文献から判っている⁴⁾。皮膚は、個体発生の後期から発生・分化を始めることから、RARE-lacZ マウスの使用は今まで検証がなされていなかった。そこで RARE-lacZ マウスを用いて胎生 15.5–18.5 日の皮膚を用いて LacZ 染色を行った。また、RARE-lacZ マウスと Cyp26b1+/-マウスを交配させて RARE-lacZ : Cyp26b1-/-マウスを作成し、Cyp26b1 を欠損することで体内 RA 濃度をあげた場合の皮膚 RA 濃度を検証した。その結果、正常皮膚では、胎生 15.5 日では皮内筋、胎生 16.5 日では皮内筋および periderm(周上皮)、胎生 18.5 日では皮内筋および真皮に強い LacZ の局在が観察された。また、RARE-lacZ : Cyp26b1-/-マウスの皮膚の発現パターンは胎生 15.5, 16.5 日は野生型と比べて同様な染色パターンを示し、胎生 18.5 日においては、真皮内に LacZ 発現が見られなかった(図4)。

これは、2. 1. の *in situ hybridization* に相反する結果である。すなわち、Cyp26b1 の発現する部位は RA が分解されているので RA は存在しないことが大原則だからである。従って、Cyp26b1 を欠損させたマウスでは基本的に RA 濃度が上昇するため、RARE-lacZ ; Cyp26b1-/- マウスでは LacZ 染色が Cyp26b1 の発現領域に観察されることが他の臓器・組織で既に発表されている。試しに正常皮膚を用いて表皮と真皮とを分けた後、Cyp26b1 のリアルタイム PCR を行ってみたが、真皮に優位な発現を認め、*in situ hybridization* の結果を支持するものであった。従って、RARE-lacZ マウスは少なくとも皮膚においては、RA 濃度を正確に反映していないことが判り、当マウスを用いて RA 濃度を可視化することはできないと結論した。

2. 2. 2. Cyp26b1 レポータートランスジェニックマウスの作製

そこで、免疫染色にても曖昧な結果しか出なかった

RAR β ではなく、真皮に豊富に発現していた Cyp26b1 を可視化すれば、皮膚における RA 濃度を正確に観察できると考えた。まず、技術的に操作しやすい Cyp26b1 レポータートランスジェニックマウスの作製を試みた。Cyp26b1 を含む BAC clone を購入し、LacZ を下流に持つ targeting vector を作製した。これをマウス受精卵にインジェクションし、偽妊娠マウスに移植して数種類のラインを作製した。4 ラインが得られ、発現を確認するため LacZ 染色を行った。このうち、1 ラインにおいて皮膚に強い発現が見られたため、詳細に検討した。しかし、LacZ 発現は真皮より表皮に強く発現しており、これは Cyp26b1 の発現パターンと矛盾する。従って、この方法では Cyp26b1 の発現を再現することはないと考え、次の 2. 2. 3 の実験に移行した。

2. 2. 3. Cyp26b1 レポーターノックインマウスの作製

よって、今度は蛍光タンパクに IRES (Internal

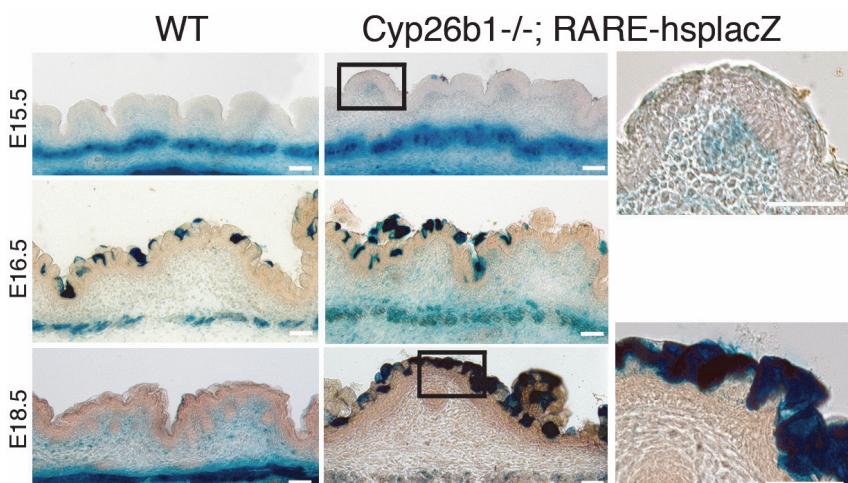
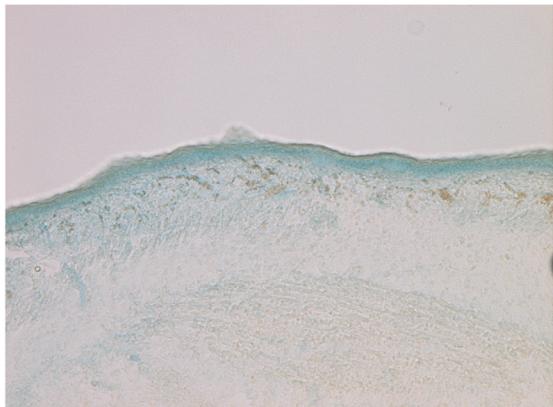


図4 RARE-lacZ マウスを用いた皮膚の RA 濃度可視化の試み

ライン# 31 トランスジェニック+



ライン# 31 トランスジェニック -

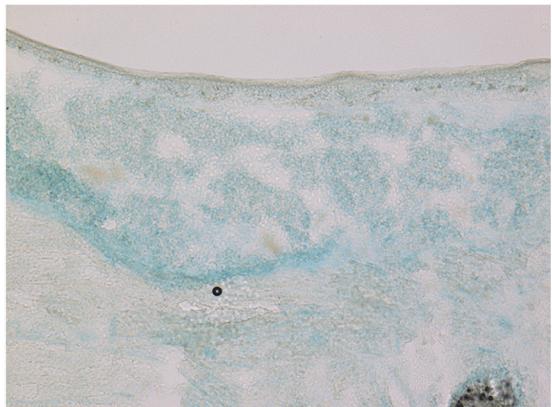


図5 左の Cyp26b1 に LacZ が入った胎児個体（胎生 16.5）では、真皮より表皮に強い LacZ の発現を認めた。さらに右の Cyp26b1 に LacZ が入っていない個体（同じ偽妊娠マウスから産まれた対照群の個体）においても真皮に LacZ の発現を認めた。この発現強度は、左の真皮における LacZ 発現と強度が類似しており、従って左の真皮における LacZ 発現は非特異的と考えられる。

Ribosome Entry Sites)をつけ、Cyp26b1 の3'UTRにノックインしてレポーターマウスを作製することにした。この方法を用いると確実にCyp26b1 の発現を蛍光タンパクにて再現することができる。DT、Ires-Venus、pgk-neo、FRTのカセットが入った標的ベクターと、ポジティブコントロールベクターを作成した。ポジティブコントロールベクターをES細胞に導入し、薬剤選択したコロニーからスクリーニングプライマー検定用ゲノムDNAを調整した。次に短腕側プライマーを3種類デザインしてPCRによるスクリーニングの条件を最適化した。

標的ベクターをES細胞に導入して、ネオマイシンで選択後、100 クローンを取り出して増殖させ、スクリーニング用ゲノムDNAを調整した。これにPCRを施行して相同組換え体をスクリーニングした。相同組換え体が6 クローン採取できたので、さらに長腕側のサザンプロットを行い、短腕と長腕の両側で正しく相同組換えが起こっていることを確認した。このうちの2 クローンのES細胞を胚細胞期にインジェクションし、仮親に移植した。1回目の移植ではキメラマウスが得られなかったので、もう一度クローンを取り直して移植した。今回はキメラマウスが生まれたので、現在交配して生殖細胞への寄与を確認中である。

3. 考 察

レチノイン酸はリガンドなので、そのレセプターを解析するのが王道であり、本研究もそこから着手したが、免疫染色や *in situ hybridization* ではどのレセプターも皮膚におけるクリアカットな発現を得ることができなかつた。レチノイン酸シグナリングの場合非常にレセプターが多くかつ機能的に重複していることが、解析の大きな壁になっていると考えられた。そこで視点を変え、レチノイン酸合成・分解の観点から発現解析を行い、合成または分解酵素の中で皮膚においては分解酵素であるCyp26b1のみが特異

的に発現していることを明らかにすことができた。

次に、皮膚発生および分化におけるRA濃度を明らかにするため、再度レセプターを利用した解析を行ったが、この実験は上手くいき、RAは皮膚発生が始まる時期から一定の濃度で安定して皮膚に存在していることが判った。

さらにRA濃度を可視化するため、まずすでに発表されたマウスを用いたが、皮膚のRA濃度を正確に反映しているとは言いがたいことが上記の実験から判断することができた。よって、BAC（人工染色体）を用いたノックインレポーターマウスを作成する戦略に切り換えた。最初の仮親からはキメラマウスが産まれなかつたので、もう一度同じ工程を繰り返すことになり結局非常に時間がかかってしまったが、次の試みで産まれたので、現在世界初のレチノイン酸可視化マウスを作るべく努力している段階である。

(引用文献)

- 1) Darienski R, Surber C, Fluhr JW: Topical retinoids in the management of photodamaged skin: from theory to evidence-based practical approach, *Br J Dermatol.* 163 (6), 1157-65, 2010.
- 2) Ross S, McCaffery P, Drager U et al.: Retinoids in embryonal development, *Physiol. Reviews.* 80 (3), 1021-54, 2000.
- 3) Okano J, Shiota K: Roles of retinoic acid signaling in normal and abnormal development of the palate and tongue, *Congenital Anom.* 54 (2), 69-76, 2014.
- 4) Rossant J, Zirngibl D, Cado M et al.: Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes & Dev.* 5 (8), 1333-344, 1991.