

皮膚老化におけるエクソソームの働きの解明と 治療応用の可能性の検討

和歌山県立医科大学皮膚科

神人 正寿

Skin senescence may be induced by various factors including intrinsic aging and extrinsic aging. In this study, we compared the expression of exosome and microRNAs in the serum and skin between young and senescent people. Exosome expression was determined using ELISA and immunostaining. microRNA expression was evaluated by PCR array, real-time PCR analysis, and in situ hybridization. microRNA was forcedly overexpressed using microRNA mimics. Cell senescence was examined by senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal).

We could not find significant correlation of age with exosome expression of serum or skin in young and senescent people. However, according to the result of microRNA PCR array, miR-124 was the most increased microRNA in senescent skin when compared to young skin. in situ hybridization revealed that the signal for miR-124 was evident in keratinocytes of senescent skin, but not in the young skin.

Cultured normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) overexpressed with miR-124 mimic changed their morphology to an enlarged and irregular shape. In addition, SA- β -Gal positive NHEKs were significantly increased by the transfection of miR-124 mimic.

The expression of miR-124 was increased in the UVB-irradiated NHEKs compared to control cells in a dose-dependent manner. Taken together, our results indicated that miR-124 is increased by UV irradiation in keratinocytes, which causes cell senescence.

1. 緒言

他臓器の老化と比しての皮膚の老化の特徴として、intrinsic aging (内因性老化) と extrinsic aging (外因性老化) の2つの要因が存在する点がある。前者では加齢による細胞の機能低下により皮膚の萎縮や細かいシワの形成がみられる一方で、後者の主な原因は紫外線の影響により生じる photoaging (光老化) であり、表皮の肥厚と深いシワ、シミ、さらには毛細血管拡張などをきたす。しかしこのような複雑な老化に対する科学的アプローチは進んでおらず、シワ・シミなどの変化のそれぞれに特異的に関与する分子メカニズムは未だ分かっていない。

皮膚老化には上記のように遺伝素因と環境素因が発症に関与すると考えられているが、研究代表者らはその環境素因を媒介するものとして non-coding RNA に注目してきた。ヒトの細胞には蛋白質をコードしていない non-coding RNA が存在しこれまで「ゴミ」と思われてきたが、実は DNA (遺伝素因) を後天的に修飾することで環境因子として DNA-mRNA-蛋白質発現をオン/オフする機構であるエピジェネティクスに関わる (図1)。小分子RNAを主体とするものと比較的長いRNAを主体とするものに分類され、前者の代表が平均22塩

基程度の microRNA であり、様々な mRNA の three prime untranslated regions (3' UTRs) の相補的配列に結合し翻訳を阻害することで蛋白発現調節をしている。ヒトゲノムには2,000種類以上の microRNA が存在することが分かっており、60%以上の遺伝子を制御しようと考えられている¹⁾。近年、microRNA が生体内で様々な遺伝子発現を調節することで細胞増殖や分化において重要な働きをしていることが明らかになっているが、microRNA の各疾患における役割も検討されつつある。例えば、全身性強皮症では miR-29a が低下しており、target であるコラーゲン遺伝子などの発現を増加させることで線維化に関与している²⁾。microRNA 関連の研究論文は H31.2月現在 Pubmed 上で約 82000 編と急速に増加しており、研究代表者らも microRNA と皮膚疾患に関してこれまで46編の研究論文を発表している。その中で我々は皮膚老化と microRNA の関連についての研究報告を他の研究室にさきがけて行ってきた。具体的には老化皮膚にみられる血管異常である cherry angioma では血管内皮細胞が増殖しているが、その血管内皮細胞で miR-424 の発現が減少しており、そのために MEK1 と cyclin E1 が増加することで細胞増殖能が活性化し内皮細胞の腫瘍性増加をきたすことを見出し、このような経路の阻害が本腫瘍の新しい治療につながる可能性を示した³⁾。さらに老化皮膚・紫外線暴露で多く出現する有棘細胞癌における microRNA の関与も明らかにしている⁴⁾。

一方、H29年7月に国立がん研究センターが血液1滴に含まれる microRNA から13種類の癌を早期発見する新しい検査法を開発したことがプレスリリースされ注目された。従来、microRNA を含む RNA は体液中では RNase の働きにより直ちに分解されると考えられてきたが、実際には体液中の



The role of exosome in skin aging and its implications to therapy

Masatoshi Jinnin

Department of Dermatology, Wakayama Medical University Graduate School of Medicine

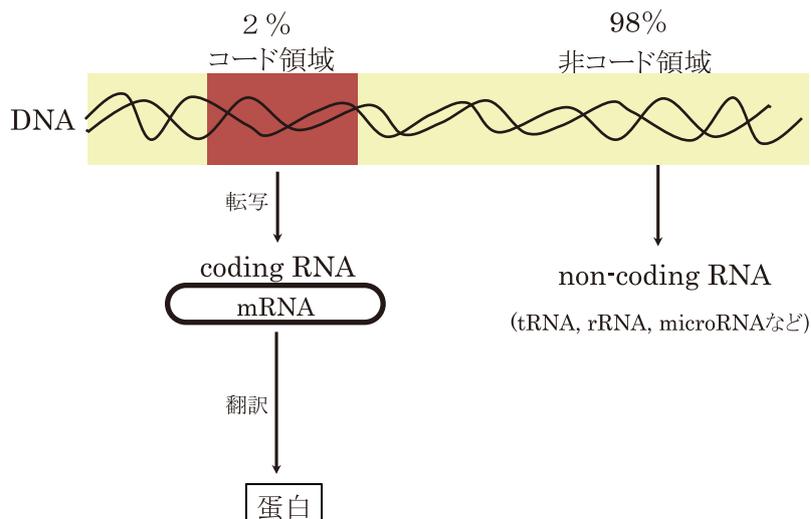


図1 coding RNA と non-coding RNA の相関

microRNAは比較的安定して検出できる。近年の研究により、その理由はmicroRNAがエクソソームなどに保護されているからではないかと考えられている。エクソソームは細胞から細胞外に分泌される0.1 μ m以下の小胞で、血液、唾液、尿、関節液、さらには乳汁など様々な体液中に存在し、脂質二重膜で形成されているため非常に安定している(4 $^{\circ}$ Cで2週間保存が可能)。内部にはmicroRNAのほか、蛋白質やmRNAを含有している。その後分泌元の細胞の情報を持つエクソソームがほかの細胞に取り込まれることによって細胞間コミュニケーションが行われていることも判明しており、様々な疾患の病態における役割が積極的に研究されるようになった。例えば悪性腫瘍において腫瘍細胞の転移先の臓器特異性を決定するメカニズムはこれまで不明であったが、エクソソームに含まれるインテグリンにより規定されていることが報告され⁶⁾、エクソソーム解析による早期癌の検出・診断やエクソソーム治療などの可能性が示唆されている。

我々もこれまでmicroRNAが多数の皮膚疾患の病態に関わるのみならず、その血中あるいは毛髪中濃度が全く新しい診断あるいは病勢マーカーになりうると同時に、治療のターゲットとなる可能性を明らかにしてきた。たとえば尋常性乾癬においては表皮の増殖をcyclin E1やMEK1を介して制御するmiR-424の血清濃度がバイオマーカーとなることをみいだした⁷⁾。また、重症薬疹の皮疹部表皮ではmiR-124が増加し、アポトーシスに抑制的に働くBCL2L10発現を抑えて皮膚のアポトーシスを誘導するとともに、血清中miR-124濃度が重症度と相関することを明らかにした⁸⁾。同様に、全身性強皮症の硬化皮膚ではlet-7aの発現が低下しており、皮膚線維芽細胞においてtargetであるコラーゲン発現を増加させることで線維化に寄与している⁹⁾。さらに血清let-7a濃度は疾患の活動性と逆相関し、またマウスの腹腔内にlet-7aを注

射することで皮膚に強発現させるとプレオマイシンによる線維化を抑制できることを示した。

さらにエクソソームそのものについても、我々は最近全身性強皮症の皮膚線維化にエクソソームが関係することを初めて証明する¹⁰⁾とともに、現在難治性皮膚潰瘍に対するエクソソームの臨床試験を行っている(NCT02565264)が、これは現時点で国内唯一のエクソソームの臨床応用の試みである。

以上のような取り組みを経て、本研究計画において我々は、皮膚老化においてもmicroRNAやエクソソームの量、あるいはエクソソームの質(microRNA、蛋白質、あるいはmRNAの発現プロファイル)が変化し、皮膚を構成する各細胞(角質細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など)の変化を誘導している可能性に注目し、皮膚老化と血液中・皮膚組織中のmicroRNAあるいはエクソソームの量および質の相関を調べた。

2. 方法

2.1. 血清および皮膚組織

血清サンプルは、13名の27～56歳の正常人から採取した。また、0～10歳の若年者と80～100歳の高齢者の顔面の手術時の余剰皮膚をそれぞれ3例収集しホルマリン固定・パラフィン包埋したものを研究に使用した。また、非露光部の正常皮膚サンプルもそれぞれ3例ずつ用意した。

2.2. エクソソーム解析

血清中のエクソソームはExoQuick(SBI社)を用いて収集した。さらにそれぞれのサンプルについてExoELISA kit(SBI社)を用いたenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)を行い、定量を行った。

2. 3. microRNA PCR Array

PCR アレイには細胞の分化および発生に関する 88 種類の microRNA に対するプライマーがセットされた 96-well RT² miRNA PCR Array Kit (SABioscience 社) を使用した。Kit に含まれる house keeping gene を用い比較 Ct 法で解析した。

2. 4. real-time PCR

Takara Thermal Cycler Dice (TP800) により real-time PCR 法を行った。プライマーとしては miR-124 および U6 を使用した。

2. 5. in situ hybridization

miR-124 に相補的な配列を持つ 5' -locked digoxigenin-labeled nucleic acid probe (Exiqon 社) を使用して、4 μm に薄切したパラフィン包埋組織に対して in situ hybridization を施行した。

2. 6. senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) 染色

Cellular Senescence Assay Kit (Chemicon International Inc 社) を用いて行った。細胞に fixing solution を投与し 15 分間室温でおいた後、SA-β-gal Detection Solution を加え、37 度で 1 晩培養した。

2. 7. in situ hybridization

正常ヒト表皮角質細胞 (normal human epidermal keratinocytes; NHEK) は Lonza 社から購入した。KGM-Gold Bullet Kit を用いて、5% CO₂ インキュベーターで培養を行った。

2. 8. microRNA mimic

内在性 microRNA の機能を模倣するようにデザインされた合成二本鎖 RNA である microRNA mimic は Qiagen 社から購入した。本研究では miR-124 に特異的な microRNA mimic および control microRNA mimic を使用し、transfection reagent としては lipofectamine RNAiMAX (invitrogen 社) を用いて細胞に導入した。

2. 9. 細胞数測定

細胞数測定に際しては、接着細胞をトリプシン処理で浮遊させ、Coulter Particle Counter (Beckman Coulter 社) で細胞数をカウントした。

2. 10. 統計解析

統計解析として、中央値の比較には Mann-Whitney test を使用し、p 値 < 0.05 を統計学的に有意とした。

3. 結果

3. 1. 年齢とエクソソーム量の相関

最初に、27 ~ 56 歳の正常人から血清中のエクソソームを抽出し、その抽出物を ELISA 法にて定量した。年齢と血清中エクソソーム量の相関を調べたが、明らかな相関を認めなかった (R=0.18, P=0.55, 図 2)。また、免疫染色を施行したが老化皮膚とエクソソーム発現量を見いだすことができなかった (data not shown)。

そこで次に老化皮膚における microRNA 発現の検討を行った。

3. 2. 老化皮膚と microRNA の検討

まず、若年者 (0 ~ 10 歳) と高齢者 (80 ~ 100 歳) の顔面

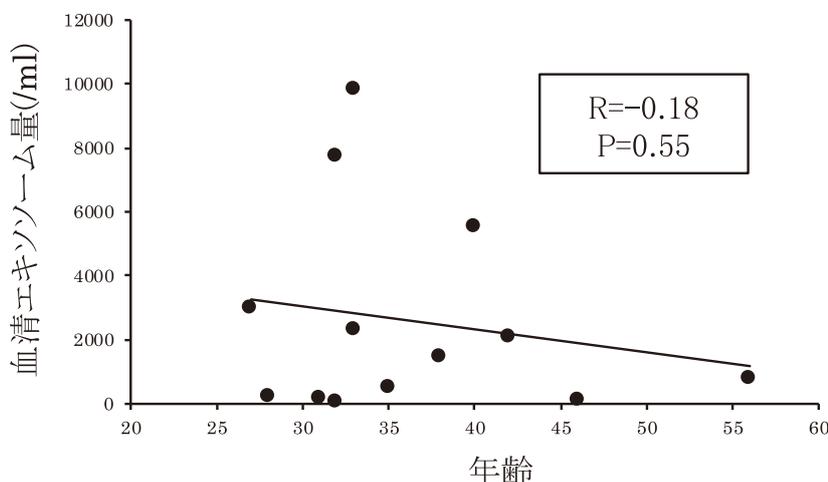


図 2 正常人における、年齢と血清中エクソソーム量の相関

皮膚組織3例ずつから抽出したmicroRNAを等量混合したサンプルを用意し、それぞれの皮膚におけるmicroRNAの発現パターンをPCRアレイで評価した。アレイに含まれる88種類のmicroRNAの中で若年者に比べ高齢者の顔面皮膚で発現が増加しているものとして、let-7a, miR-18a, miR-124, miR-192, miR-196a, miR-206, miR-208, miR-215, miR-219-5p, miR-302c, miR-488, およびmiR-518bがリストアップされた。この中で最も発現の差が大きかったmiR-124に注目した。アレイの結果をvalidateするためにサンプル数を増やし、miR-124に特異的なプライマーを用いてreal-time PCRを行ったところ、miR-124は若年者に比べて高齢者の顔面の皮膚において発現が上昇しており、統計学的な有意差もみられた(図3)。そのため、PCRアレイの結果が再現されたと考えられた。

次に、miR-124が老化皮膚のどの細胞で増加しているか局在を調べた。若年者および高齢者の正常顔面皮膚組織のin situ hybridizationでは、高齢者の表皮基底層がmiR-124のプロープで染色されたが、若年者のほうでは染色されなかった(図4)。つまり、miR-124は老化皮膚の表皮基底層で増加していると考えられた。

続いて、老化皮膚におけるmiR-124の機能を調べた。miR-124 mimicを強発現させると培養ヒト正常表皮角

化細胞の形態が大型化し細胞老化の兆候を示した(図5)。SA-β-galにて老化細胞の核を染色するとmiR-124 mimicを導入した細胞ではコントロール細胞よりもSA-β-gal陽

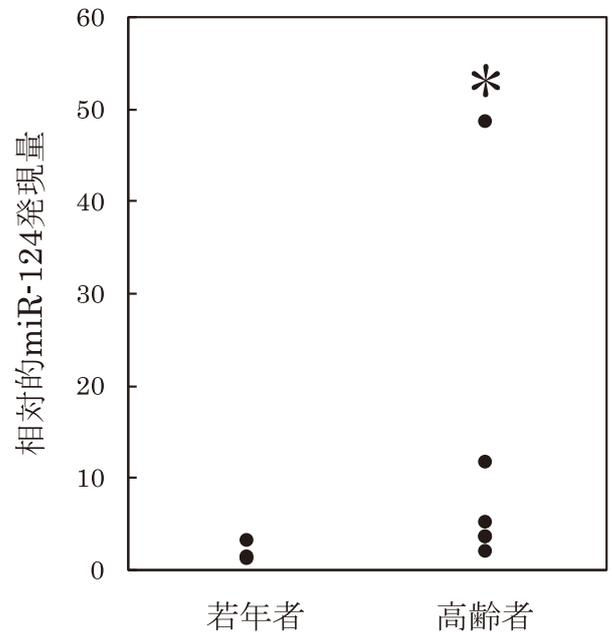


図3 若年皮膚(n=3)と高齢者皮膚(n=6)におけるmiR-124発現量の比較 *p<0.05

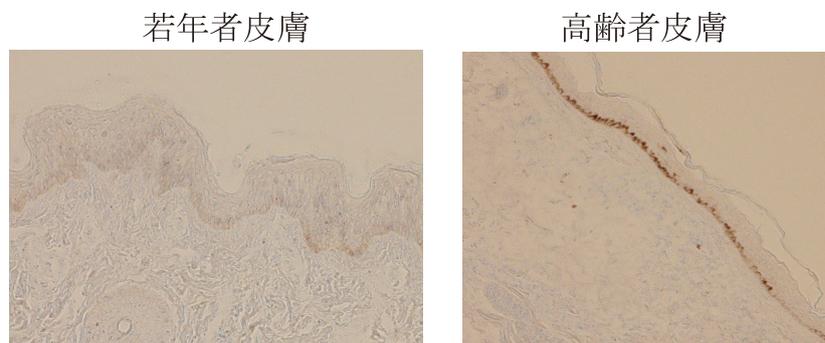


図4 in situ hybridization法による、若年者および高齢者の正常顔面皮膚組織のmiR-124発現の比較

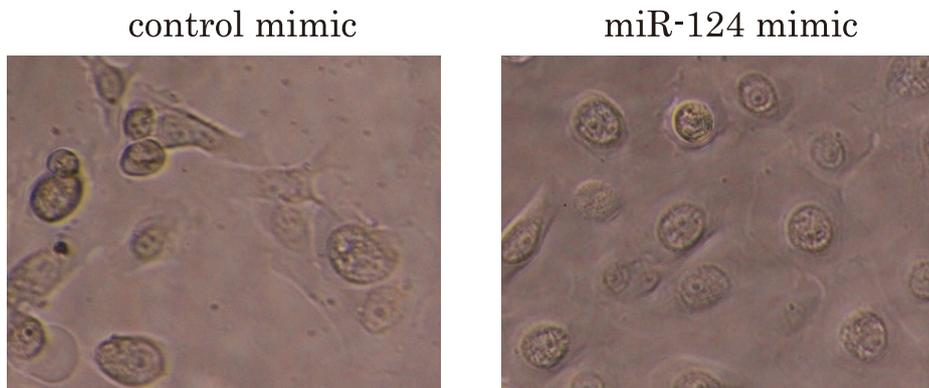


図5 miR-124強発現下での、細胞形態の変化

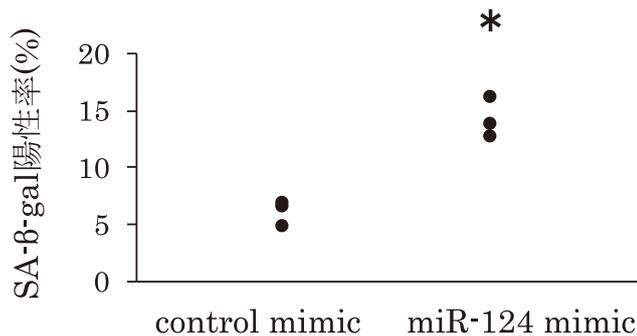


図6 miR-124 強発現下での、培養正常表皮角化細胞の SA-β-gal 染色率の変化 *p<0.05

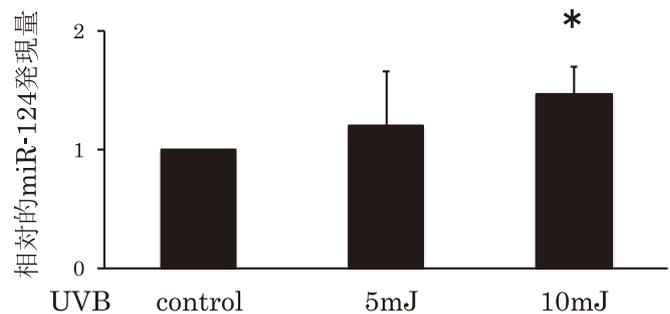


図7 培養正常表皮角化細胞における、miR-124 発現量に対する UVB 照射の影響 *p<0.05

性細胞の率が有意に高くなった(図6)。つまり、miR-124 は表皮角化細胞において細胞の老化を誘導している可能性が示唆された。

最後に、miR-124 が老化皮膚で増加するメカニズムを検討した。培養正常表皮角化細胞にUVB照射を3日間連続で行い、その24時間後に細胞からmicroRNAを回収した。miR-124の発現は、UVBの照射量に比例して上昇し、コントロール群と10mJ照射群では有意差が見られた(図7)。逆に、非露光部の正常皮膚組織を用いてreal-time PCRを行ったが、若年者と高齢者でmiR-124発現に有意差は認めなかった(data not shown)。この結果により、紫外線暴露が老化皮膚でのmiR-124の発現上昇に関係していると示唆された。

4. 考 察

本研究において我々はmicroRNAのうちmiR-124が老化皮膚において紫外線の影響で増加し、それによって細胞老化を誘導していることを示した¹¹⁾。皮膚老化の予防・改善はコスメトロジーの重要なテーマである。これまで我々は基礎研究として、例えば老化の原因となる活性酸素を除去するSuperoxide dismutaseの皮膚疾患における研究歴を有する¹²⁻¹⁴⁾。そして、この研究により皮膚老化のmicroRNAを介した分子機序が明らかになれば、microRNAによる皮膚老化・肌年齢の定量化や客観的評価に加え、microRNAによる皮膚老化のコントロールが可能になる可能性がある。さらに、microRNAによる皮膚老化の予防は美容という観点のみならず、皮膚老化に伴う様々な疾患(皮膚癌や皮膚掻痒症など)の予防につながる可能性もある。今後、miR-124のターゲットの同定も必要となるが、たとえばweb上のプログラムであるTargetscan(http://www.targetscan.org/vert_72/)ではERK2など細胞増殖に関わる分子がターゲットと予測されている。

一方、エキソソームについても今後さらに皮膚および血清サンプル数を増やして実験を繰り返すことで、将来的に

皮膚老化における関与の有無を再度確かめたいと考えている。

本報告書は文献11の内容をもとに作成した。

(引用)

- 1) Friedman, R.C., *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92-105 (2009).
- 2) Maurer, B., *et al.* MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **62**, 1733-1743 (2010).
- 3) Nakashima, T., *et al.* Down-regulation of mir-424 contributes to the abnormal angiogenesis via MEK1 and cyclin E1 in senile hemangioma: its implications to therapy. *PLoS One* **5**, e14334 (2010).
- 4) Yamane, K., *et al.* Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK. *J. Mol. Med. (Berl)* **91**, 69-81 (2012).
- 5) Shimozono, N., *et al.* NUP160-SLC43A3 Is a Novel Recurrent Fusion Oncogene in Angiosarcoma. *Cancer Res.* **75**, 4458-4465 (2015).
- 6) Hoshino, A., *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329-335 (2015).
- 7) Ichihara, A., *et al.* microRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *Br. J. Dermatol.* **165**, 1003-1010 (2011).
- 8) Ichihara, A., *et al.* Upregulation of miR-18a-5p contributes to epidermal necrolysis in severe drug eruptions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 1065-1074 (2014).
- 9) Makino, K., *et al.* The downregulation of microRNA let-7a contributes to the excessive expression of type

- I collagen in systemic and localized scleroderma. *J. Immunol.* **190**, 3905-3915 (2013)
- 10) Nakamura, K., *et al.* Altered expression of CD63 and exosomes in scleroderma dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* **84**, 30-39 (2016).
- 11) Harada, M., *et al.* The expression of miR-124 increases in aged skin to cause cell senescence and it decreases in squamous cell carcinoma. *Biosci. Trends* **10**, 454-459 (2017).
- 12) Jinnin, M., *et al.* Elevated serum levels of manganese superoxide dismutase in patients with eosinophilic fasciitis. *Clin. Rheumatol.* **22**, 505 (2003).
- 13) Jinnin, M., *et al.* Serum levels of manganese superoxide dismutase in patients with localized scleroderma. *Exp. Dermatol.* **13**, 357-360 (2004).
- 14) Jinnin, M., *et al.* Serum levels of manganese superoxide dismutase in patients with mixed connective tissue disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* **23**, 549-550 (2005).