

# 加齢に伴う皮膚のステロイド合成系の変容が皮膚機能に及ぼす影響

昭和大学医学部生化学講座

原口 省吾

The sex steroids, androgens and estrogens, play essential roles in many health conditions of men and women. However, the level of circulating sex steroids decreases with advancing age, mainly due to the aging of gonads in both sexes. Moreover, in men, a decline in testosterone is associated with many physiological signs of aging, such as a decrease in muscle mass and strength, bone mass, skin thickness, and hair; poor wound healing; and an increase in fat mass, especially visceral adipose tissue. However, the changes in the production and secretion of sex steroids with age in several steroidogenic organs, muscle, bone, skin in men are not well documented.

Therefore, to uncover the changes in steroidogenesis in skin with age, we analyzed the changes in the levels of sex steroids in young and aged male mice. First, we demonstrated that cutaneous testosterone levels were higher in aged mice than in young mice. Then, we demonstrated that Hsd17b3 localized in sebaceous glands is responsible for the upregulation of cutaneous testosterone levels in aged mice. Inhibition of hyperproduction of cutaneous testosterone by treatment with an inhibitor of Hsd17b3 increased the hair length of aged mice. Finally, we demonstrated that the suppression of hair length by elevated testosterone levels was mediated by ZIP9, but not by the androgen receptor, in hair follicle cells of aged mice.

## 1. 緒言

加齢に伴う生殖腺の機能低下により、男性では血中の性ステロイドであるアンドロゲンが40代後半から漸減し、男性更年期障害と言われる加齢性腺機能低下症(late-onset hypogonadism: LOH症候群)が発症する。LOH症候群は、うつをはじめとした様々な精神症状や、性機能低下をはじめとした様々な身体症状が出る。そこで、アンドロゲン補充療法が行われるが、その治療効果には疑問の声も多い。それは、LOH症候群の病態が複雑であり、アンドロゲンの低下だけでは説明できない症例が多いことに起因すると考えられている。そのため、より効果的な治療法開発に向けて、世界的に加齢時の体内ホルモン環境に対するエビデンスの蓄積が求められている<sup>1-3)</sup>。

生殖腺や副腎以外にステロイドを産生する器官として皮膚が知られている。皮膚で産生されたステロイドは、生殖腺や副腎から血流を介して皮膚に到達するステロイドと協働し、皮膚の生理機能を精緻に制御している。皮膚におけるステロイドの代表的な作用として、発毛や皮脂分泌、コラーゲン産生の制御がある<sup>4-6)</sup>。LOH症候群の徴候の一つに「体毛と皮膚の変化」があり、体毛量の変化、皮膚の乾燥や異常な発汗等が症状として現れる。

そこで研究代表者は、加齢時の精巣由来アンドロゲンの

減少が、皮膚局所のステロイド産生系へどのような変化を引き起こすのか高齢マウスを用いて解析した。その結果、高齢の雄マウスでは、若齢の雄マウスに比べて、血中テストステロン濃度は低下していた。一方で、高齢マウスは皮膚のテストステロン濃度が上昇していた(図1)。これまで、加齢に伴う性腺機能の低下によって、体内のテストステロン濃度は低下する一方であると考えられてきたが、皮膚局所では加齢に伴いテストステロン濃度が上昇することがわかった。さらに、研究代表者はイメージング質量分析法により、加齢時の皮膚テストステロンの増加は真皮層で生じていることを明らかにした。この加齢時の皮膚テストステロンの増加は、テストステロン合成酵素の一つである17β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素タイプ3(*hsd17b3*)が責任遺伝子であり、HSD17B3タンパク質は皮脂腺細胞に高発現していることを明らかにしている。

このように研究代表者は、加齢時の皮膚にはテストステロンが高濃度に存在し、その責任遺伝子が*hsd17b3*であることを明らかにしていた。しかし、加齢に伴い皮膚で増加するテストステロンにどのような生理的・病態生理学的意義があるのかは不明である。そこで、本研究では、次の2つの研究項目を設定し、それらを明らかにすることを目的とした。**研究項目① 高齢時に皮膚でテストステロンの過剰産生・蓄積が生じる分子機構の解明**

研究代表者は「加齢に伴う精巣機能の低下・老化はテストステロン産生の低下を引き起こし、血中テストステロンの減少を引き起こす。しかし、皮膚には性腺とは独立したステロイド産生系がある。従って、血中テストステロンが減少すると、皮膚ステロイド産生系が皮膚機能を維持するために(恒常性維持のために)亢進し、皮膚局所でステロイド供給を増やそうとするのではないか?」との仮説を立て



The effects of changes in cutaneous steroidogenesis with advancing age on the function of skin

Shogo Haraguchi

Department of Biochemistry, Showa University School of Medicine

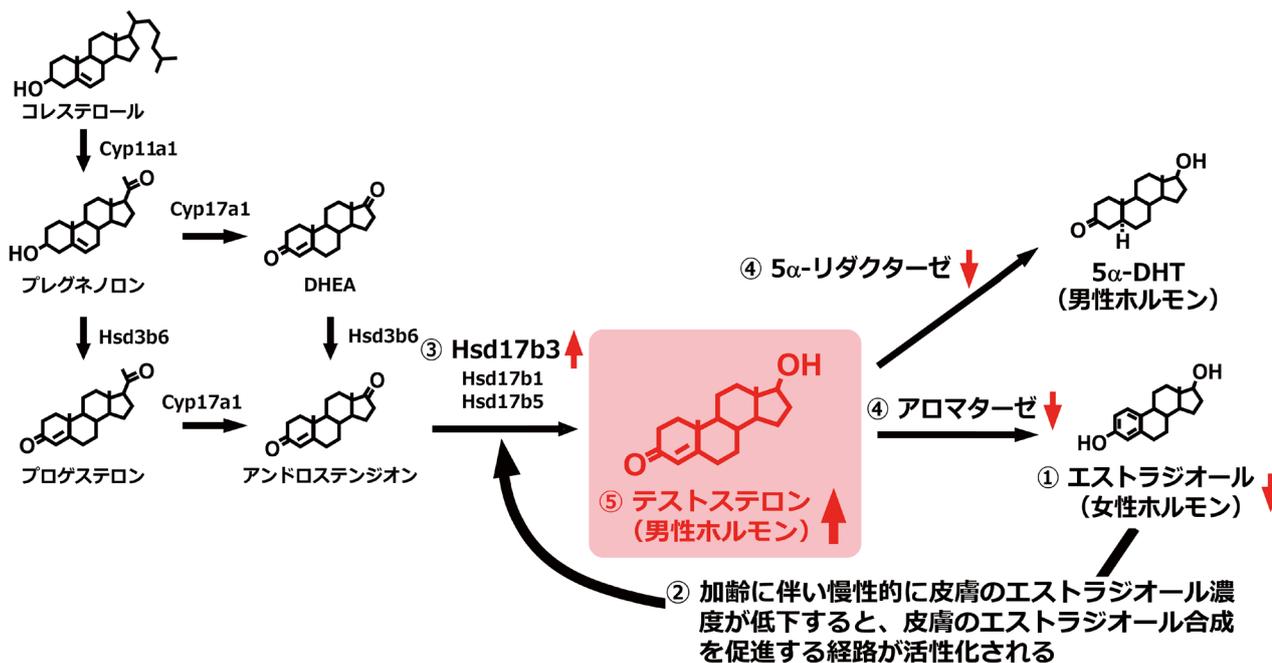


図1 高齢マウス皮膚におけるホルモン恒常性の破綻によるテストステロン過剰産生機構  
加齢に伴い血液由来のテストステロンやエストラジオールは慢性的に少ない状態になる(①)。しかし、皮膚ではホルモン環境を維持するために、エストラジオール産生を促すようにフィードバック機構が働き(②)、テストステロン合成酵素Hsd17b3の発現が誘導される(③)。しかし、テストステロン代謝に関わるアロマトラーゼや5α-リダクターゼ等のステロイド代謝酵素の発現が老化に伴い低下しているため(④)、皮膚でテストステロンの過剰産生・蓄積が生じる(⑤)。

た。本研究項目では研究代表者の仮説の妥当性を検討した。  
研究項目② 高齢時の皮膚に存在する高濃度テストステロンが関与する皮膚疾患の解明

上述のように皮膚においてステロイドホルモンは、発毛や皮脂分泌の制御、コラーゲン産生等に関わる。高齢者皮膚でも発毛周期の変容や脱毛、皮脂成分の変化、コラーゲン産生の低下等が知られている。そこで皮膚局所に高濃度で存在するテストステロンが、これらへ影響を与え皮膚疾患に関与するの解析した。

## 2. 方法

### 2.1. 動物

実験にはマウスC57BL/6J(若齢3ヵ月齢)とC57BL/6J-Aged(高齢22ヵ月齢)の雄を日本チャールス・リバー社から購入して用いた。3ヵ月齢は個体として成熟しており、ヒトにおける20歳程度、22ヵ月齢はヒトにおける65歳程度に相当する。若齢・高齢マウスは各種疾患の発症が見られない健康な加齢個体を用いた。

### 2.2. 血清中・皮膚組織中のステロイド濃度の測定

血清と皮膚組織は、それぞれメタノール中でホモジナイズ後、ISOLUTE SLE+(Biotage社)によるステロイドの抽出・精製を行い、AB Sciex社のLC/MS/MS(TripleTOF 4600)で解析を行った。

### 2.3. 皮膚組織中のステロイド合成酵素 mRNA の測定

マウスの皮膚全層を採取後、total RNAを抽出し逆転写を行った。皮膚組織中のmRNAはリアルタイムPCR(StepOnePlus, Applied Biosystems社)で測定した。

### 2.4. 毛包幹細胞の単離とアポトーシスの解析

マウス背部皮膚全層を採取したのち、PBSで軽く洗浄後、60分間酵素処理を行った。酵素処理後、皮膚表面をメスでかきとり、皮膚の細胞群を回収した。この皮膚の細胞群の中から毛包幹細胞の特徴を示す細胞(Sca-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞)を磁気細胞分離法(ミルテニー社; Sca-1抗体, #14-5981-82, eBioscience社; CD34抗体, #14-0341-82, eBioscience社)により回収した。この細胞に対して、6時間のテストステロン処理を行い、6時間後のアポトーシスをELISA法(ApoStrand ELISA アポトーシス検出キット, Enzo社)により測定した。

### 2.5. 皮膚組織を用いた免疫組織化学染色による解析

マウス皮膚は4%PFAで固定後、定法に従いパラフィンブロックとし、10μm厚の組織切片を作製した。脱パラフィン後、自家蛍光低減処理(TrueBlack リポフスチン自家蛍光クエンチャー, Biotium社)を行い、免疫組織化学染色に用いた。ZIP9抗体は、#17607-1-AP, Proteintech社を用いた。Hsd17b3抗体は川崎医科大学解剖学講座 嶋雄

一教授より分与頂いた抗体を用いた。

### 3. 結果

#### 3.1. 高齢時に皮膚でテストステロンの過剰産生・蓄積が生じる分子機構の解明

加齢に伴い血中のテストステロンやエストラジオールが減少する。一方、皮膚ではテストステロンの増加が見られた。従って、皮膚ではエストラジオールやその他の性ステロイドの減少が、テストステロン増加の引き金となっていると考えられた。

そこで高齢マウス皮膚へエストラジオール、プロゲステロン、5 $\alpha$ -DHT等の主要な性ステロイドを塗布し、皮膚のテストステロン産生に変化が見られるかを解析した。この際、皮膚局所のステロイド産生系の作用であることを確認するために、血中の性ステロイド濃度には影響を与えないことを確認した。その結果、エストラジオールを塗布した場合に高齢マウス皮膚のテストステロン濃度が低下した。従って、高齢マウス皮膚のテストステロン産生の増加は、皮膚におけるエストラジオール低下が引き金となっていることが考えられた。

そこで次に、ヒト皮脂腺細胞 (SZ95細胞) を用いて長期的なエストラジオール欠乏がHsd17b3発現を変化させるのかを解析した。その結果、通常のFBSを用いた細胞に比べて、チャコール処理 (活性炭にステロイド等を吸着させ、FBS中のステロイド等を除いた) FBSでは、SZ95細胞でHsd17b3 mRNAとHSD17B3タンパク質の発現量が増加した。さらに、チャコール処理FBSで培養したSZ95細胞へエストラジオールを添加すると、Hsd17b3発現が抑えられた。加えて、これらの変化は皮脂腺細胞に発現するエストロゲン受容体を介した作用であることも明らかにした。

次に、長期的なエストラジオールの欠乏がHsd17b3発現を増加させるのか、エストラジオール合成酵素アロマターゼをノックアウトしたマウス (Aromatase Knockout; ArKO) を用いて解析した。その結果、ArKOマウスでは皮膚のHsd17b3発現が増加するとともに、皮膚テストステロン濃度がワイルドタイプマウス (WT) に比べて著しく高かった。

これらの結果から、加齢に伴う皮膚でのエストラジオールの減少が、皮膚のステロイド産生系を皮膚ステロイド量を維持しようとする方向に働かせ、その結果、皮膚におけるテストステロンの過剰産生・蓄積を引き起こしたと考えられる。

#### 3.2. 高齢時の皮膚に存在する高濃度テストステロンが関与する皮膚疾患の解明

次に、高齢マウス皮膚に蓄積したテストステロンが皮膚機能へどのような変化を引き起こすのか、それが老人性

の皮膚疾患の発症に関与し得るのかを解析した。高齢マウス皮膚へHSD17B3阻害剤を塗布し、高齢マウス皮膚の皮膚厚変化 (組織学的解析)、コラーゲン産生量 (Collagen I mRNA変化)、細胞増殖量の変化 (Ki67発現変化)、体毛の長さの変化等を解析した。その結果、高齢マウス皮膚においてHSD17B3の働きを阻害することで、テストステロン合成を抑制すると体毛の伸長が見られた。従って、高濃度のテストステロンは体毛の成長を抑制的に制御すると考えられた。男性型脱毛症AGAでは毛乳頭細胞に発現するアンドロゲン受容体を介したアンドロゲンの作用が頭髪の成長を抑制することが知られている<sup>7)</sup>。そこで、高齢時のテストステロンの作用機序を明らかにするためにアンドロゲン受容体の局在解析を行った。しかし、高齢マウスの毛包細胞・毛乳頭細胞にはアンドロゲン受容体の発現が見られなかった。これに関しては先行研究でも同様の結果が報告されている<sup>8)</sup>。従って、テストステロンはアンドロゲン受容体以外の何らかの情報伝達経路を介して体毛の成長を抑制していることが考えられた。最近、前立腺がん細胞を用いた研究から、テストステロンが亜鉛トランスポーターZIP9に作用し、アポトーシスを誘導する作用を発揮することが報告されていた<sup>9)</sup>。そこで、高齢マウスの皮膚におけるZIP9の局在解析を行ったところ、体毛の成長の制御に関わる毛包幹細胞にZIP9の発現が見られた。従って、高濃度テストステロンは毛包幹細胞に発現しているZIP9を介して、体毛の成長に抑制的なシグナルを伝えていることが示唆された。そこでマウス毛包幹細胞を単離し、高濃度テストステロン処理を行ったところ、アポトーシス誘導因子の発現量が増加するとともに、アポトーシスの誘導作用が見られた。

### 4. 考察

男性型脱毛症AGAでは、思春期以降に精巣で合成・分泌されたテストステロンが、頭皮に発現する5 $\alpha$ -リダクターゼにより5 $\alpha$ -DHTへと代謝され、前頭部や頭頂部の毛乳頭に高発現するアンドロゲン受容体へ作用する。毛乳頭では5 $\alpha$ -DHTの働きにより、TGF- $\beta$ などの発現が誘導され、それらが毛母細胞の増殖を抑制することで、毛の成長が阻害され男性型脱毛症が発症する (図2)。

一方で、加齢に伴うびまん性の脱毛、老人性脱毛症ではエストラジオールの低下に应答した皮膚ステロイド産生系の亢進により、テストステロン濃度が増加する。このテストステロンが毛包幹細胞に発現するZIP9を介して体毛の成長を妨げるために、前頭部や頭頂部に限局されないびまん性の脱毛が生じると考えられる (図2)。

本研究によって、男性型脱毛症と老人性脱毛症の発症にはどちらの場合も性ステロイドであるアンドロゲンが関わることが分かったが、その発症機序は全く異なるものであ

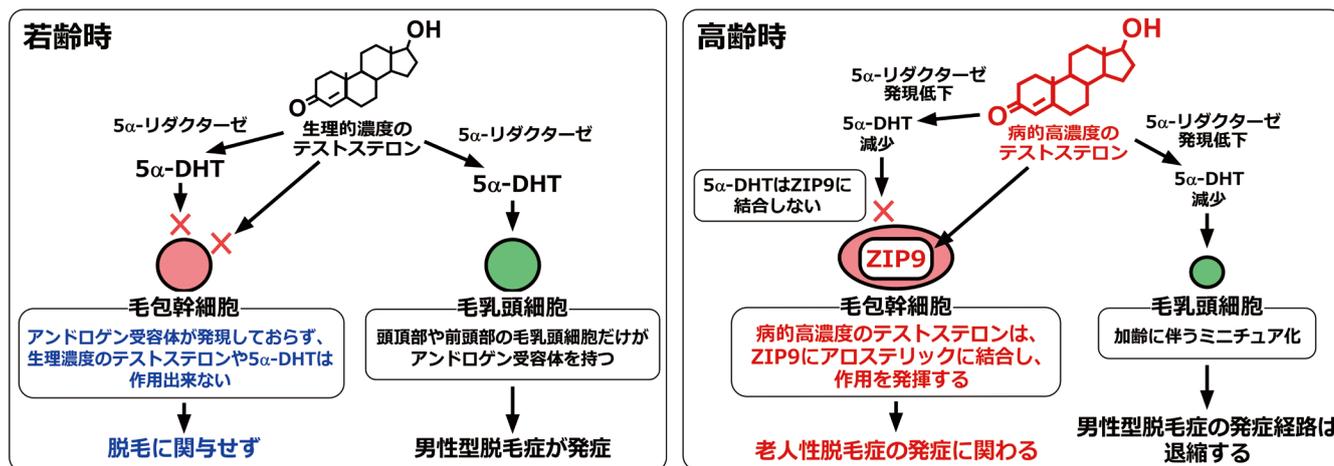


図2 若齢時と高齢時の脱毛症発症機序の違い

加齢に伴い皮膚局所でテストステロンが過剰産生・蓄積され出す(図1)。病的な高濃度に達したテストステロンは、本来の受容体ではない亜鉛トランスポーター (ZIP9) に作用し、毛包幹細胞の細胞死を誘導することで老人性(びまん性)の脱毛を引き起こす。

った。男性型脱毛症では5α-リダクターゼの阻害剤であるフィナステリド、あるいはデュタステリドが治療に用いられるが、これらが老人性脱毛症に対しても有効であるという報告は殆どない。これは本研究成果を考えれば当然であり、5α-リダクターゼを介さない発症機序である老人性脱毛症では5α-リダクターゼ阻害剤の効果は少ないと考えられる。

### 5. 総括

加齢に伴う生殖腺の機能低下・老化により、血中の性ステロイドが減少することはヒトでもマウスでもよく知られている。しかし、体内には様々な内分泌器官があり、生殖腺由来のホルモンと協働しつつ、各器官が独自の機能を発揮することで生体機能を精緻に制御している。また、生殖腺機能は、加齢に伴う細胞老化などの影響を受けて低下すると考えられているが、本研究で対象とした皮脂腺細胞は全分泌という特殊な分泌様式により皮脂を供給しているため、高齢になっても活発に増殖を続けている。従って、加齢に伴う生殖腺の機能低下により、血中の性ステロイドレベルが大きく低下するが、各内分泌器官は必ずしも器官老化・細胞老化を起しているわけではなく、それぞれの持つ特性に基づいてそれぞれの臓器の機能的な恒常性を保つように働いていると考えられる。

本研究の成果から、高齢になっても元気に働いている器官・細胞が体内に多く残っていることが示唆された。従って、今後の老化研究では臓器や細胞が衰える面にばかり着目するのではなく、体内の器官・細胞が正常に働けるように補助するような新たな観点からのアンチエイジング医学の発展が期待できる。

### 謝辞

今回の助成により得られた結果は、原著論文として投稿中であり、本報告書では個々のデータにつきましては掲載を見送らせて頂きました。ここまで研究をまとめることが出来たのは公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団よりご助成頂いたおかげであり心より感謝申し上げます。

### (引用文献)

- 1) 「加齢男性性腺機能低下症候群診療の手引き」日本泌尿器科学会/日本Men's Health医学会編
- 2) Snyder PJ, Bhasin S, Cunningham GR, Matsumoto AM, Stephens-Shields AJ, Cauley JA, Gill TM, Barrett-Connor E, Swerdloff RS, Wang C, Ensrud KE, Lewis CE, Farrar JT, Cella D, Rosen RC, Pahor M, Crandall JP, Molitch ME, Cifelli D, Dougar D, Fluharty L, Resnick SM, Storer TW, Anton S, Basaria S, Diem SJ, Hou X, Mohler ER 3rd, Parsons JK, Wenger NK, Zeldow B, Landis JR, Ellenberg SS. Testosterone Trials Investigators: Effects of Testosterone Treatment in Older Men. *N. Engl. J. Med.*, **374**, 611-624 (2016).
- 3) Yeap BB, Page ST, Grossmann M. Testosterone treatment in older men: clinical implications and unresolved questions from the Testosterone Trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, **6**, 659-672 (2018).
- 4) Smith QT, Allison DJ. Changes of collagen content in skin, femur and uterus of 17β-estradiol benzoate-treated rats. *Endocrinology*, **79**, 486-492 (1966).
- 5) Nikkari T, Valavaara M. The production of sebum in young rats: effects of age, sex, hypophysectomy and treatment with somatotrophic hormone and sex

- hormones. *J. Endocrinol.*, **43**, 113-118 (1969).
- 6) Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exp. Dermatol.*, **11**, 487-502 (2002).
- 7) Inui S, Fukuzato Y, Nakajima T, Yoshikawa K, Itami S. Identification of androgen-inducible TGF- $\beta$ 1 derived from dermal papilla cells as a key mediator in androgenetic alopecia. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **8**, 69-71 (2003).
- 8) Cottle DL, Kretzschmar K, Schweiger PJ, Quist SR, Gollnick HP, Natsuga K, Aoyagi S, Watt FM. c-MYC-induced sebaceous gland differentiation is controlled by an androgen receptor/p53 axis. *Cell Rep.*, **3**, 427-441 (2013).
- 9) Thomas P, Pang Y, Dong J, Berg AH. Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: II. Role of human ZIP9 in testosterone-induced prostate and breast cancer cell apoptosis. *Endocrinology*, **155**, 4250-4265 (2014).