

# 皮膚老化予防に寄与する新規オートファジー制御機構の解明

近畿大学薬学総合研究所

森山 博由

We have shown that skin tissue aging is caused by normalized chronic skin stress, such as exposure of the skin to ultraviolet light in sunlight and repair (wound healing) of the skin from abrasions and lacerations. Ultraviolet rays (UV) from sunlight exposure can cause cell apoptosis in the skin epidermis, resulting in the disruption of the barrier. Previously, we have demonstrated that BNIP3 stimulates autophagy in epidermal keratinocytes and has a protective effect in these cells upon UVB irradiation. In this study, we found that the accumulation of reactive oxygen species (ROS) by UVB irradiation was sufficient to trigger the activation of JNK and ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK) in human primary epidermal keratinocytes. In turn, activated JNK and ERK MAPK mediated the upregulation of BNIP3 expression. Treatment with an antioxidant reagent or a specific inhibitor of MAPK, U0126, and a JNK inhibitor significantly attenuated the expression of BNIP3 triggered by UVB, followed by the induction of cell death by apoptosis. Furthermore, UVB-induced apoptosis was significantly stimulated by chloroquine or bafilomycin A1, an inhibitor of autophagy. Moreover, BNIP3 was required for the degradation of dysfunctional mitochondria upon UVB irradiation. These data clearly indicated that BNIP3-induced autophagy, which occurs via UVB-generated ROS-mediated JNK and ERK MAPK activation, has a crucial role in the protection of the skin epidermis against UVB irradiation.

## 1. 緒言

加齢とともに物理的ストレスは蓄積し、体を構成する組織にダメージを与え続ける。その影響を最も受け続けている組織の一つが体表面を被う皮膚である。皮膚は加齢とともに構造変化をきたし変容する、いわゆる老化する組織である。その皮膚構造の変化・変容そのものが外見に反映される唯一の臓器といえる。加齢とともに表層化し易くなる皮膚ダメージは、心身快活な長寿ライフを阻害する直接的な発現要因(悩みの種)として捉えることができる。それゆえ、皮膚の正常な新陳代謝メカニズム(皮膚恒常性)をポイントアウトすることが囑望されている。

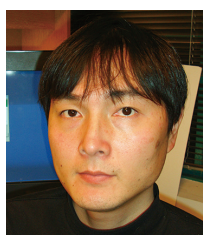
我々はこれまで、太陽光に含まれる紫外線の皮膚への照射、皮膚が擦過傷や裂傷から修復(創傷治癒)などの常態化した慢性皮膚ストレスにより皮膚組織の老化が引き起こされることを明らかにしてきた。このとき、皮膚を構成する細胞間のシグナル伝達に必要な Notch シグナルの標的分子(Hes1 転写因子)の発現が上昇することも報告してきた。また、Hes1 が細胞内の恒常性を司ると考えられるオートファジーを促進する因子(Bnip3)の発現を抑制することで、オートファジーが抑制されることも見出してきた。しかしながら、これらの役者が寄与する皮膚老化の仕

組みの鍵となるメカニズムの提示には至っていない。そこで我々は、皮膚老化予防に寄与する新規オートファジー制御機構を解明すべく、UV ストレスや創傷などの皮膚の恒常性を破綻させる各種ストレス暴露における、Notch-Hes1 の発現パターンの解析をおこない、ストレス暴露時における Notch-Hes1 経路のオートファジー誘導能に与える影響および Hes1 ノックアウトマウスにおける表皮ストレス耐性解析をおこなった。その結果、Notch-Hes1 経路は UVB の照射量が強くなるほど活性化し、それにとまってアポトーシスによる細胞死が増えること、また、生体における全損欠損創ストレス下では、創傷部位の表皮において Hes1 の発現が上昇していることを見出した。これらの結果は、皮膚恒常性を破綻させる日常ストレスに対する皮膚が有する恒常性維持メカニズムについての新知見である。これらの知見は、皮膚恒常性維持の分子機構に基づく新たな機能性化粧品研究開発にも活用が可能であり、老いに付帯する不安要因の緩和や老化にとまなう皮膚脆弱性からの寛解・堅牢性の再獲得など、これからの長寿社会にも大きく寄与できるものと考えられる。

## 2. 方法

### 2.1. ヒト表皮ケラチノサイトにおける Notch-Hes1 および関連因子の解析

初代ヒト表皮ケラチノサイトは CELLnTec 社より購入し、CnT-PR (CELLnTec 社) で培養した。培養にて安定化させたヒト初代表表皮ケラチノサイトに UVB の照射強度を変化させ照射した後、4 時間後にタンパク質を回収してウェスタンブロッティング法をおこない、活性化型 Notch1、Hes1、Bnip3、Cleaved Caspase 3 の発現量を確



Elucidation of the novel regulation mechanism in autophagy that contributes to the prevention of skin aging

Hiroyuki Moriyama

Pharmaceutical Research and Technology Institute, KINDAI University

認した。また、Bnip3、Hes1 発現用アデノウイルスベクターを感染させた後、UVB照射をおこない、LC3Bに対する免疫染色をおこない、オートファジー活性を測定した。

## 2.2. 生体でのストレス応答時におけるHes1の発現解析

全損欠損創は以下のように作成した。マウスはイソフルランによる麻酔下のもと、背部皮膚に直径5mmの生検トレパンで全損欠損創を作成し、シリコンリングを創の周辺に縫い付けた。創はテガダーム™トランスペアレントフィルム(3M)と包帯で保護し、5日ごとに創を撮影した。創傷治癒率はImage Jで傷の大きさを測定し、算出した。

マウス皮膚は4%PFA/PBSで固定した後、20%ショ糖/PBS溶液に一晩つけてからOCT compoundで包埋した。10μm厚で凍結切片を作成した後、PBSMT(2%スキムミルク, 0.1% TritonX-100含有PBS)でブロッキングし、1次抗体としてラット免疫抗Hes1抗体、ニワトリ免疫抗ケラチン14抗体、ウサギ免疫抗ケラチン10抗体を使用した。2次抗体としてAlexa488標識抗ラットIgG抗体、Alexa555標識抗ウサギIgG抗体を用いた。封入にはProlong Gold Antifade Kit with DAPI(LifeTechnologies社)を用いた。撮影はLSM800共焦点顕微鏡(Zeiss)でおこなった。

## 3. 結果

ヒト表皮ケラチノサイト(HPEK)を用いて、UVB照射におけるNotch-Hes1経路の活性化についての発現解析をおこなった。まず、UVB照射後Notch-Hes1経路が活性化するUVB照射量を調べたところ、20mJ/cm<sup>2</sup>で活性化のピークを迎えていることがわかった(図1)。対して、

BNIP3の発現量を調べたところ、10mJ/cm<sup>2</sup>で発現量のピークを迎えることがわかった(図1)。また、Cleaved Caspase 3の発現量は20mJ/cm<sup>2</sup>から急激に増加することが判明した(図1)。つまり、Notch-Hes1経路はUVBの照射量が強くなるほど活性化し、それにとまってアポトーシスによる細胞死が増えることが示唆された。

一方、BNIP3とHES1のオートファジー活性について調べたところ、HPEKにBNIP3を強制発現させると、我々の以前の報告どおりオートファジーが誘導された<sup>1)</sup>(図2)。しかし、HES1を強制発現させると、オートファジーの誘導が抑制されていることが明らかとなった(図2)。以前の結果より、UVB照射時によるBNIP3の発現増加は、オートファジー誘導による損傷ミトコンドリアの除去により、抗アポトーシスとして働くことが示唆されている<sup>1)</sup>。また、Notch-Hes1経路の活性化は、BNIP3の発現を抑制する働きがあることも突き止めている<sup>2)</sup>。このことから、10mJ/cm<sup>2</sup>のUVB照射量では、BNIP3の発現が優位に働くため、紫外線照射によるアポトーシスがあまり誘導されないものの、20mJ/cm<sup>2</sup>のUVB照射量ではNotch-Hes1経路の活性化によりBNIP3の発現量が抑制され、オートファジーも抑制されることからアポトーシスによる細胞死が増えていることが示唆された。また、損傷ミトコンドリアの除去により、活性酸素も除去されていることが予想される。このことから、Notch-Hes1経路の阻害が、抗老化につながることも期待される。このように皮膚恒常性を脅かすストレスは、Notch-Hes1経路に影響を及ぼしていることがわかる。このことは、皮膚恒常性ストレスにおいて、Notch-Hes1経路が重要な役割を担うことを大いに示唆するものである。そうであれば、それは他のストレス要因でも観察される現象に他ならない。そこで、生体におけ

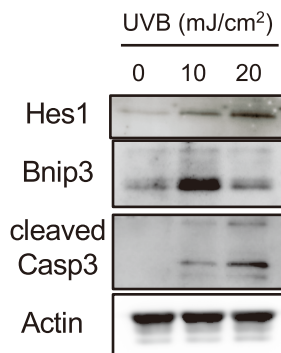


図1

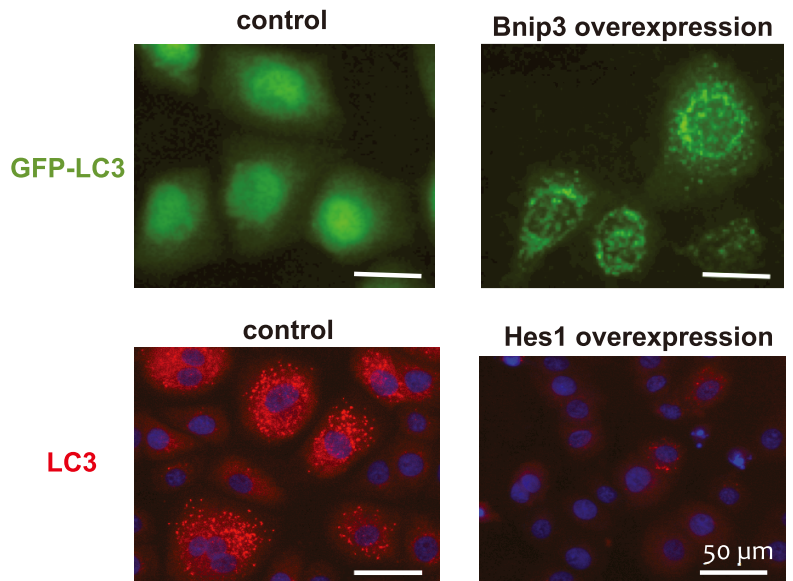


図2

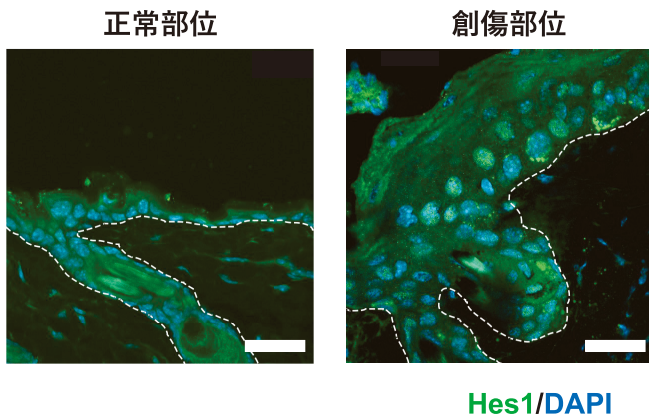


図 3

る Hes1 のストレス応答を観察するために、マウスに全損欠損創を作成し、Hes1 の発現解析をおこなった。全損欠損創を作成した 2 日目に皮膚を回収し、Hes1 に対する免疫染色をおこなったところ、図 3 に示すように、創傷部位では非創傷領域と比べ、表皮での Hes1 の発現が優位に上昇していることを見出すに至った(未発表データ)。

#### 4. 考 察

UVB 照射が皮膚に与える分子制御機構について、ヒトの表皮ケラチノサイトでは Notch-Hes1 経路の活性化が起こり、それにもないアポトーシス細胞の増加が顕著となった。これらを誘起する UVB 照射量は  $20\text{mJ}/\text{cm}^2$  でピークを迎えることもわかった。これは日常生活で受ける照射量の範疇であり、特に夏場には UVB 照射量はこれを大きく超える時間帯もあることから、皮膚構成細胞のうち特に表皮ケラチノサイトにおける Notch-Hes1 経路が、その後引き起こされるアポトーシスによる細胞死の抑制に寄与することが考えられる。面白いことに、一般にアポトーシス誘導などに関連する BNIP3 の発現は、UVB 照射量が  $10\text{mJ}/\text{cm}^2$  でピークを迎えることもわかった。これらの分子間での発現制御機構とバランスが、皮膚のターンオーバーにおける皮膚恒常性を制御する鍵となるかもしれない。それゆえ、我々は皮膚恒常性にとって鍵となる生命現象を広く捉え、その因子のひとつとしてオートファジー制御機構に着目した。実際、BNIP3 と HES1 のオートファジー活性について調べたところ、HPEK に BNIP3 を強制発現させるとオートファジーが誘導される(図 2)<sup>1,2)</sup>。しかし、HES1 の強制過剰発現は、オートファジー誘導を抑制した(図 2)。さらに、我々のこれまでの研究成果より、UVB 照射時に引き起こされる BNIP3 の発現増加は、オートファジー誘導による損傷ミトコンドリアの除去を誘導するなど抗アポトーシス作用因子として働くことも示している<sup>1,2)</sup>。これらの結果は、紫外線照射による Notch-Hes1 経路の活性化により BNIP3 の発現量が抑制され、オートファジー

も抑制されることからアポトーシスによる細胞死が増えていることを示唆する。またこの時、損傷ミトコンドリアの除去により、活性酸素などの細胞老化因子も除去されていることも予想されるため、Notch-Hes1 経路は抗老化作用の主要な細胞内シグナル伝達経路と捉えられ、この経路の効果的な阻害が新たな抗老化の作用点となることが期待される。

このように、Notch-Hes1 経路には皮膚の恒常性に広範に寄与する新たなキーマカニズムの可能性が見出された。皮膚の恒常性を即座に脅かす外的ストレス要因の筆頭は、皮膚が傷ついて破綻する作用、いわゆる創傷作用である。そこで、生体における Hes1 のストレス応答を観察するためにマウスに全損欠損創を作成し、Hes1 の発現解析をおこなったところ、創傷部位の表皮において Hes1 の発現が大きく上昇していることがわかった。創傷早期に誘起される Hes1 の発現上昇とその生理的・分子生物学的メカニズムについては、解析を進めているところであるが、Notch シグナルや Hes1 およびその関連分子が皮膚恒常性に係る現象をいくつか発見するに至っている。これらを総じて、今回の研究成果は、基礎皮膚科学や臨床皮膚研究などの医療の観点のもとより、人々の心身の健康をひろく支える化粧品の評価機材の開発<sup>3)</sup>や新規機能性化粧品の創製、さらには長寿社会を支える新たな社会基盤研究の一助に通じる萌芽的成果として捉えることができる。

#### 5. 統 括

昨今の一億総活躍社会実現の積極的推奨の観点からも拙速に進みつつある使役勤労長寿社会化において、心身のストレスを背景にした老化の問題はつぶさに喫緊に対処すべき深刻な社会的課題である。唐突ではあるが、この課題に踏み込む切り口のひとつが「皮膚の恒常性と老化」、その科学的探究と考える。体表を被う皮膚は、多様な外部環境やストレスに速やかに応答する直接的な防御壁である。皮膚は身体的健康を維持する生体恒常性を維持するバリア装置である。それとともに、外見として他者の視覚的意識にも反映される臓器ゆえ、精神的な健康にも影響を及ぼす心理的なバリア装置ともなり得る。老化に伴う皮膚機能の破綻は、理想とする容貌や容姿の破綻だけでなく、生体内部の機能破綻、強いては生命の破綻までつながるトリガーでもある。圧倒的な長寿人口社会の負の問題のリスクヘッジとして「皮膚の抗老化」は極めて重要な研究課題として捉えることができる。

我々の求める研究成果は、老いに付帯する不安要因の緩和や老化にともなう皮膚脆弱性からの寛解・堅牢性の再獲得など、これからの長寿社会に寄与できるものと考えられる。これらの観点は終局的に、(1) 我が国が初となるオートファジー皮膚恒常性機構の解明、(2) 長寿社会での社会



保障費・医療費の削減、(3) 予防医療受診への啓蒙、(4) 褥瘡や加齢皮膚疾患等に対する特効薬開発や治療法の開発に波及的な効果を及ぼすことが期待できるものと考えている。

(引用文献)

- 1) Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2014.134(6):p.1627-35.
- 2) Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Kubo H, Nakajima Y, Goto A, Morita T, Hayakawa T. BNIP3 upregulation via stimulation of ERK and JNK activity is required for the protection of keratinocytes from UVB-induced apoptosis. *Cell Death Dis*, 2017. 8 (2) : p. e2576.
- 3) Moriyama M, Sahara S, Zaiki K, Ueno A, Nakaoji K, Hamada K, Ozawa T, Tsuruta D, Hayakawa T, Moriyama H. et al., BAipose-derived Stromal/Stem Cells Improve Epidermal Homeostasis. *Sci Rep*, 2019. 9 (1) : p. e18371.