

皮膚老化・美容に関わる生体内ヒアルロン酸代謝機構の解明

東京慈恵会医科大学病理学講座

下田 将之

Hyaluronic acid (HA) is a type of extracellular matrix (ECM) composed of linear glycosaminoglycans, which are present in tissues and body fluids and are actively involved in tissue formation and homeostasis. The mechanism of hyaluronan metabolism is of great importance in understanding the tissue microenvironment in pathological tissues. However, the landscape of the *in vivo* hyaluronan-degradation system has not yet been elucidated. In this study, we investigated the role of HYBID (HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization) that plays a central role in hyaluronan degradation *in vivo*, and to elucidate the role of the HYBID-HA degradation system in skin and intestinal homeostasis, aging, and biological defense using *Hybid*-deficient mice. The results of this research are significant in that they may provide new insights into skin and intestinal homeostasis, aging, and biological defense, contributing to the search for new anti-aging and anti-inflammatory drugs focusing on the HYBID-HA degradation system.

1. 緒言

ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid = HA) は、グリコサミノグリカンからなる細胞外マトリックスの一種で、組織や体液中に存在し、組織形成や恒常性維持に重要な役割を担っている。高分子量HAは皮膚、硝子体、関節滑液、軟骨組織などに高濃度で含まれており、皮膚では老化に伴うHAの合成低下および分解による低分子化がシワやたるみの形成と深く関連していることが報告されている。また、低分子化したHAは種々のシグナルカスケードを惹起して血管新生や炎症を促進することが知られていることから、皮膚組織におけるHA代謝メカニズムの解明は高齢者の皮膚健康維持・美容・老化防止において必須と考えられるものの、生体内におけるHA分解機構の詳細なメカニズムについては十分解明されていないのが現状である。

本研究テーマであるHA代謝研究は歴史が古く、ヒトではこれまでに6つのHA分解酵素(様)遺伝子(HYAL1 (hyaluronidase 1), HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1, SPAM1)が見出されている。現在までに提唱されているHA分解仮説モデルとして、CD44 (HA受容体)と2種類のHA分解酵素 (HYAL1およびHYAL2)が共同的に働くというCD44/HYAL1/HAYL2-HA分解仮説が有力であるが、CD44/HYAL2/HYAL1-HA分解系は線維芽細胞では十分機能しないほか、*Hyal1*あるいは*Hyal2*遺伝子欠損マウスでは組織での顕著なHAの蓄積が認められない

など問題点も多く、これまで生体内HA代謝系の全貌は不明であった。申請者所属の研究室では、本仮説に代わる生体内HA分解に中心的役割を果たす新規糖鎖分解酵素としてHYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization (HYBID; 別名KIAA1199)を世界に先駆けて見出し、皮膚線維芽細胞および変形性関節症の滑膜線維芽細胞でHA分解に必須であることを実証した¹⁾。さらに、代表研究者が中心となって*Hybid*遺伝子欠損マウスの開発に成功し、骨端板での高分子HA蓄積によりVEGF誘導性血管新生が抑制されることを示すとともに²⁾(図1)、ヒト変形性関節症での関節軟骨ではTNF- α で過剰発現したHYBIDが関節軟骨HA分解に関わることを証明してきた³⁾。*Hybid*遺伝子欠損マウスでの実験では、HAが海馬における神経幹細胞維持に重要であり、HA代謝異常で記憶障害が出現することも明らかにしており^{4,5)}、これらのデータはHYBIDが生体内での高分子HA分解に深く関与している可能性を示唆している。また、共同研究者の岡田ら

HYBIDは生体内のHA分解に関与し、HYBID-HA分解系は骨や脳の発達に関与する

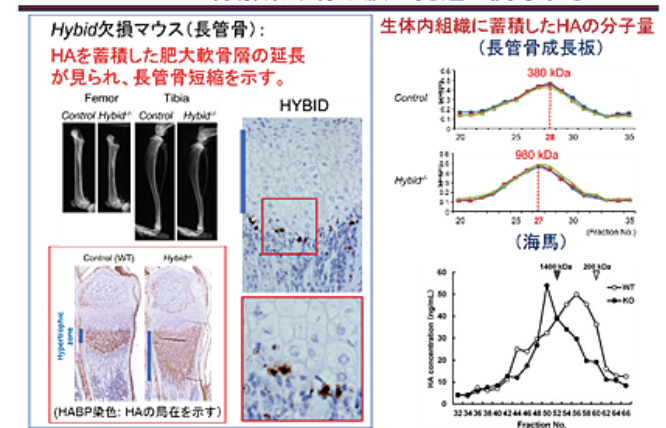


図1



Involvement of hyaluronic acid metabolism in skin aging and cosmetics

Masayuki Shimoda

Department of Pathology, The Jikei University School of Medicine

は光老化皮膚シワ形成に真皮でのHYBID発現亢進によるHA分解・減少が重要であることを示しているとともに^{6,7)}、早老症の一つである Werner 症候群の患者皮膚線維芽細胞はHYBIDを高発現し、HAを低分子化し、血中や尿中に低分子化HAが高濃度で蓄積することから^{8,9)}、HYBIDによるHA分解が皮膚を含む生体内での老化機序に深く関わっていることが推測される。

本研究では、*Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いて、皮膚の恒常性維持・美容や老化現象に関わるHYBID-HA分解系の役割を明らかにすることを目的とする。本研究成果は、未だ十分に解明されていない皮膚の恒常性維持・美容・老化現象の理解に新知見を提供するとともに、HYBID-HA分解系に着目したこれまでとは異なるアプローチによる新しい皮膚老化防止医薬の探索、コスメトロジーの進歩・発展、さらには国民の健康維持・増進に貢献する可能性がある点で研究意義があると考えている。

2. 方 法

本研究では、以下の3主要研究項目 (I)「*Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いた加齢と皮膚表現型およびHA代謝解析」、(II)「皮膚老化におけるHYBID-HA分解系を介した皮下脂肪生成制御の解析」、(III)「HYBID-HA分解系を標的とした皮膚恒常性維持・抗皮膚老化薬の探索」を立てて、計画を遂行している。

① *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いた加齢と皮膚表現型およびHA代謝解析：

本項目では、幼若・高齢 *Hybid* 遺伝子欠損マウスの皮膚形状やその組織学的な形態変化を明らかにするとともに、皮膚老化に関わる各種遺伝子発現解析を行い、HYBIDと皮膚老化との関連を解析した。また、免疫染色法などを用いて、HYBID発現細胞の同定やHA沈着部局在解析を行った。また、老化では皮下組織の菲薄化や皮下脂肪の減少が見られ、たるみが生じることが知られているが、高齢 *Hybid* 遺伝子欠損マウスでの皮下組織内 HA代謝と脂肪生成との関連について解析を行った。

② HYBID-HA分解-脂肪細胞分化制御と生体防御作用機序の解析：

本項目では、野生型および *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いて、上皮バリア破綻をきたす黄色ブドウ球菌表皮感染モデルあるいはDSS大腸炎モデルを作製し、炎症の重症度、皮下組織あるいは粘膜下層の脂肪組織変化や上皮バリア機能等を比較・検討した。また、炎症組織中のHA量・分子量をELISAやHPLC法を用いて解析するとともに、免疫染色法やreal-time PCR法を用いて、HYBID-HA分解系による脂肪細胞分化制御と生体防御機序との関連を検討した。

③ HYBID-HA 分解系を標的とした抗皮膚老化薬の探索：

本項目では、これまで同定した数種のHYBID阻害候補物質を用いて、DSS誘導性腸炎に対する薬効を評価した。具体的には、DSS投与中の野生型マウスにHYBID阻害候補物質を持続的に経肛門投与し、体重減少の改善および腸管内HA蓄積量を比較・検討した。

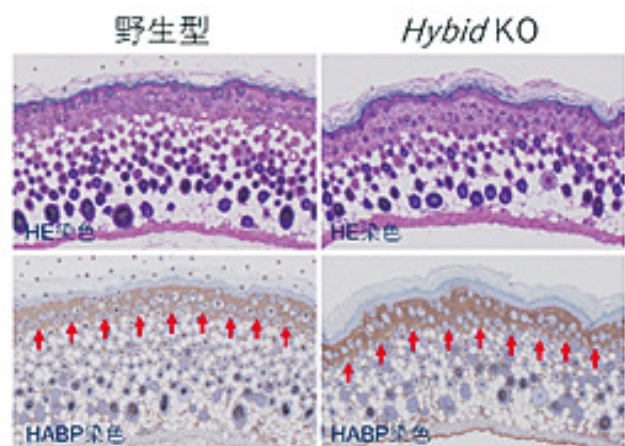
3. 結 果

① *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いた加齢と皮膚表現型およびHA代謝解析：

生後早期の幼若 *Hybid* 遺伝子欠損マウスでは、皮膚真皮内に高分子 HA 蓄積増加が見られる (図2)。また、これまでの実験では、野生型と *Hybid* 遺伝子欠損マウスの寿命には大きな差は見られないものの、加齢に伴いマウスの皮膚形状や体重に違いが見られ、組織学的に皮下組織内 HA代謝と脂肪生成との関連を見出し、さらに研究を継続している。

② HYBID-HA分解-脂肪細胞分化制御と生体防御作用機序の解析：

野生型および *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いて、上皮バリア破綻をきたす黄色ブドウ球菌表皮感染モデルを用いた解析では、HYBID-HA分解系が脂肪細胞分化を制御し細菌感染防御に関わることを報告した¹⁰⁾。一方、ヒト潰瘍性大腸炎のマウスモデルであるDSS誘導性大腸炎モデルを用いた解析では、*Hybid* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して体重減少が軽度であるとともに、生存率の改善傾向が認められた。組織学的解析では、*Hybid* 遺伝子欠損マウスにおいても大腸に潰瘍性病変が見られたものの、腸管組織内のHA蓄積量の増加や炎症細胞浸潤数に変化が



Hybid KOマウスでは、野生型マウスと比べて、真皮における高分子ヒアルロン酸沈着増加が認められる (茶色部：矢印)。

図2 幼若マウスの皮膚

認められた。また、高分子蛍光標識デキストラン (FITC-Dextran) の腸管から血中へのトランスロケーションを用いた腸管透過性評価では、*Hybid* 遺伝子欠損マウスでは DSS 投与後も上皮細胞障害および腸管バリア破綻が抑制されていることが示された。さらに、DSS 誘導性大腸炎組織およびヒト潰瘍性大腸炎手術検体を用いた組織学的な検討から、HYBID は主に間質細胞に発現していることを見出した。*Hybid* 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスより間質細胞を単離・培養し、ゲル濾過カラムを用いて培養上清中の HA 蓄積量・分子量を解析すると、*Hybid* 遺伝子欠損間質細胞ではより高分子量 HA が培養上清中に蓄積している傾向が認められた。以上の結果から、HYBID-HA 代謝系が大腸炎の進展に寄与している可能性が示唆された。

③HYBID-HA分解系を標的とした抗皮膚老化薬の探索:

本項目では、HYBID 阻害候補物質の DSS 誘導性腸炎に対する薬効を評価した。DSS 投与中の野生型マウスに数種の HYBID 阻害候補物質を持続的に経肛門投与し比較・検討したところ、一部の植物抽出物に関して、コントロールマウスと比べて、体重減少の改善および腸管内 HA 蓄積量の増加傾向が認められた。今後、さらに HYBID 阻害候補物質を野生型マウス皮膚に定期的に塗布後皮膚形状やその組織学的な形態変化などを解析し、皮膚のシワ・たるみ形成を抑制する予防的な抗皮膚老化医薬としての可能性を検討する予定である。

4. 考 察

HA は、グリコサミノグリカンからなる ECM の一種で、組織や体液中に存在し、組織形成や恒常性維持に深く関わっている。近年 ECM の分解産物が腫瘍進展などに関わる分子として注目されており、低分子 HA はその代表的分子として知られている。ハダカデバネズミにおいて高分子 HA は発がん抑制に関与する一方で、低分子化した HA は種々のシグナルカスケードを惹起して血管新生や炎症を促進することが知られており、生体内における HA 産生・分解は組織内微小環境を理解する上で非常に重要と考えられる。近年研究代表者所属の研究室では HA 分解に中心的役割を果たす新規糖鎖分解酵素として HYBID を同定し¹⁾、研究代表者が中心となって *Hybid* 遺伝子欠損マウスの作製に成功した。*Hybid* 遺伝子欠損マウスは外見上の大きな異常は示さないものの、長管骨の骨端板肥大軟骨層延長や記憶障害をきたし、そのメカニズムとして、HYBID が生体内での HA 代謝において中心的な役割を果たしている可能性を見出している²⁾。さらに、近年 *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いて、マウス変形性関節症モデルの作製・検討を行い、HYBID が関節軟骨破壊における HA 分解に関わることを証明してきた¹⁾。本研究では、高齢 *Hybid* 遺伝子欠損マウスでの皮下組織内 HA 代謝と脂肪生成との関連を見

出すとともに、上皮バリア破綻をきたす黄色ブドウ球菌表皮感染モデルを用いて、HYBID-HA 分解系が脂肪細胞分化を制御し細菌感染防御に関わることを明らかにした。また、ヒト潰瘍性大腸炎のマウスモデルである DSS 誘導性大腸炎モデルおよびヒト潰瘍性大腸炎手術検体を用いて、HYBID-HA 分解系が大腸炎進展に寄与することを見出した。腸管内脂肪組織代謝変化が大腸炎の進展や腸内細菌叢変化に影響を与えている可能性も考えられる。一部の HYBID 阻害候補物質が DSS 誘導性大腸炎マウスモデルにおける体重減少の改善および腸管内 HA 蓄積量の増加傾向を誘導することから、本物質は抗炎症性作用を有している可能性が考えられる。今後さらに詳細な解析を進めていく予定である。

現在高分子 HA は変形性関節症治療薬剤、皮膚シワ改善用注射剤などとして実用化されており、細胞外マトリックス成分の中では実用化に成功した分野である。従って、生理的・病的状態において多岐にわたる作用を発揮することが示唆される HYBID-HA 分解系機構の解明は、生理的現象のみならず、炎症や癌を含めた様々な疾患の治療や予防に役立つ可能性があると考えられる。今回見出した *in vivo* における HYBID 阻害候補物質に関しても、HA 分解に関わる炎症や老化などに対する新規創薬となりうる可能性がある。生理的・病的組織での HYBID-HA 分解機構の解明は、今後様々な分野の疾患の理解にインパクトを与え、HA 代謝制御に基づく治療法開発の基礎的データとなりうる可能性があると考えている。

5. 総 括

皮膚真皮の主要な細胞外マトリックス成分である HA は、その優れた保水性・粘弾性・膨潤性や生体適合性(安全性)の高さが注目され、化粧品だけでなく、変形性膝関節症や肩関節周囲炎の治療を目的とした関節内注射薬、内視鏡的粘膜下組織切除術時の粘膜隆起剤、白内障手術補助剤にも応用されている。また、シワの改善やリフトアップを目的とした HA 注入が美容医療分野でも広く実施されていることから、近年その知名度は老若男女を問わず高まっており、細胞外マトリックス成分の中でも大きく実用化に成功した分野といえる。しかしながら、HA の生体内での代謝機構は今なお神秘的なベールに包まれており、基本的な HA の分解を担う分子実体すら十分に明らかにされていないのが現状である。近年申請者が明らかにした HYBID が司る新規の生体内ヒアルロン酸分解機構はこれまで立ち遅れていた HA 分解研究の急展開を引き起こす可能性が十分に考えられる。従って、我々が独自に解析を進めている HYBID-HA 分解機構解明は HA 研究分野で注目されているきわめて重要な課題であり、阻害剤探索・開発研究はなお挑戦的研究ではあるが、成功すれば基礎・臨床医学研究に留まら

ず、コスメトロジーへのインパクトも大きいと考えられる。また、生理的・病的状態において多岐にわたる作用を発揮することが示唆されるHYBID-HA分解系機構の解明は、皮膚の健康維持・老化防止のみならず、生活習慣に関連した癌、関節疾患、神経疾患などの様々な疾患の治療や予防に役立つ可能性があると考えられる。今回の研究において、一部の植物抽出物が腸炎におけるHA代謝を制御する可能性を見出したことから、今後皮膚老化を予防する新規医薬となりうるかについても検証を行い、皮膚のシワ・たるみ形成を抑制しうる新たな抗皮膚老化薬・化粧品としての可能性を検討したいと考えている。

(引用文献)

- 1) Yoshida H, Nagaoka A, Kusaka-Kikushima A, et al. KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 612-617, 2013.
- 2) Shimoda M, Yoshida H, Mizuno S, et al. Hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization controls endochondral ossification through hyaluronan metabolism. *Am J Pathol* 187:1162-1176, 2017.
- 3) Shimizu H, Shimoda M, Mochizuki S, et al. Hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization is up-regulated and involved in hyaluronan degradation in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 188:2109-2119, 2018.
- 4) Yoshino Y, Ishisaka M, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshida H, Inoue S, Shimoda M, Okada Y, Hara H. Distribution and function of hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization (HYBID, KIAA1199) in the mouse central nervous system. *Neuroscience* 347: 1-10, 2017.
- 5) Yoshino Y., Shimazawa M., Nakamura S., Inoue S., Yoshida H., Shimoda M., Okada Y., Hara H. Targeted deletion of HYBID (hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization/KIAA1199/CEMIP) decreases dendritic spine density in the dentate gyrus through hyaluronan accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 503: 1934-1940, 2018.
- 6) Yoshida H, Nagaoka A, Komiya A, Aoki M, Nakamura S, Morikawa T, Ohtsuki R, Sayo T, Okada Y, Takahashi Y. Reduction of hyaluronan and increased expression of HYBID (alias CEMIP and KIAA1199) correlate with clinical symptoms in photoaged skin. *Br J Dermatol* 179: 136-144, 2018.
- 7) Yoshida H., Komiya A., Ohtsuki R., Kusaka-Kikushima A., Sakai S., Kawabata K., Kobayashi M., Nakamura S., Nagaoka A., Sayo T., et al. Relationship of hyaluronan and HYBID (KIAA1199) expression with roughness parameters of photoaged skin in Caucasian women. *Skin Res Technol* 24: 562-569, 2018.
- 8) Michishita E, Garcés G, Barrett JC, Horikawa I. Up-regulation of the KIAA1199 gene is associated with cellular mortality. *Cancer Lett* 239: 71-77, 2006.
- 9) T Nakamura, et al., Hyaluronate synthesized by cultured skin fibroblasts derived from patients with Werner's syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1139, 84-90, 1992.
- 10) Dokoshi T, Zhang LJ, Li F, Nakatsuji T, et al. Hyaluronan degradation by cemip regulates host defense against staphylococcus aureus skin infection. *Cell Rep* 30:61-68.e4, 2020.
- 11) Momoeda M, de Vega S, Kaneko H, et al. Deletion of hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization (HYBID) results in attenuation of osteoarthritis in mice. *Am J Pathol* 191: 1986-1998, 2021.