

加齢に伴い皮膚での産生量が減少する新規皮膚ステロイドの機能解明

昭和大学医学部生化学講座

原 口 省 吾

The skin, like the gonads and adrenal glands, synthesizes steroid hormones on its own. Steroids synthesized in the gonads and adrenal glands circulate and exert their effects throughout the body. In contrast, those synthesized in the skin are thought to exert their effects locally in the skin. Although there have been many studies on steroid synthesis in the skin, we have newly identified two new cutaneous steroids synthesized in the human epidermis (let us call them Steroid X and Steroid Y). In this study, we aimed to reveal the functions of these two newly identified cutaneous hormones. First, transcriptome analysis was performed to determine what gene expression changes this new cutaneous steroid causes in epidermis-derived skin cell lines. The results suggest that steroid Y causes expression changes in a group of genes involved in the regulation of translation initiation and has a suppressive effect on translation initiation. On the other hand, Steroid X altered the expression of many long noncoding RNAs and transcripts of unknown function, but what kind of cellular functions are involved remains unknown. Therefore, we focused our analysis on steroid Y. We found that steroid Y repressively regulates translation initiation through the regulation of ribosomal protein small subunits (RPSs) and eukaryotic translation initiation factors (eIFs). Epidermal thickening was observed in mice in which this steroid Y synthase was knocked out in the epidermis. When epidermal tissue isolated from human skin was used to analyze the effects of steroid Y, changes in inhibitory regulation of translation initiation were observed. These results suggest that steroid Y suppresses excessive cell differentiation and proliferation in the epidermis, and thus helps to form an appropriate epidermal layer and to prevent skin cells from becoming cancerous.

1. 緒 言

性腺や副腎と同様に、皮膚でもコレステロールを材料にして様々なステロイドホルモンが合成されている。皮膚でステロイド合成を行っている細胞は、表皮の角化細胞や真皮の皮脂腺細胞、線維芽細胞などが知られている¹⁻³⁾。これらの細胞によって、皮膚は独自に男性ホルモン(テストステロンや5 α -ジヒドロテストステロンなど)や女性ホルモン(エストラジオールなど)を合成し、性腺で合成され循環して皮膚に到達する性腺由来の性ホルモンと皮膚において協働することで、皮膚機能を精緻に制御している(図1)。これらの研究成果を応用した例として、男性型脱毛症(androgenetic alopecia: AGA)の治療で用いられるフィナステリドや、美肌を目指した化粧品などに配合されるイソフラボン等がある。

しかしながら、性ホルモンはステロイド骨格をベースにした共通性の高い構造を示し、正反対の作用を示す男性ホルモン・テストステロンと女性ホルモン・エストラジオールであっても非常に似通った構造を持つ(図2)。さらに、皮膚で合成される性ステロイドと性腺で合成される性ステ

精巣と卵巣は、どちらも男性ホルモンと女性ホルモンを合成しており、その量・比が身体機能の性差・個人差を産み出す

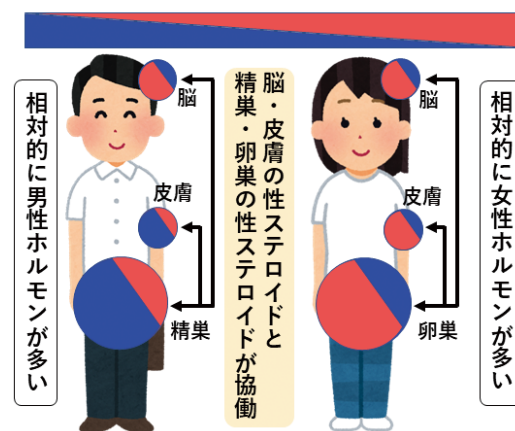


図1 性腺と脳・皮膚の性ステロイドが協働し、脳・皮膚の機能を精緻に制御しているが、加齢による性腺機能低下はバランスを崩壊させる

ロイドに構造的な違いはないため、皮膚で合成される性ステロイドの生理的意義に関しては不明確な点も多い。そこで性腺において性ステロイド合成量が減少する高齢時のマウスをモデルとして、皮膚ステロイド合成系の生理的意義解明を目的とした研究を行った。その結果、高齢時の皮膚機能低下を引き起こす要因の一端に、性腺で合成される性ステロイドと皮膚で合成される性ステロイドのバランスが乱れ、皮膚局所におけるホルモンの協調的な働きが崩壊することにあることを明らかにした(図1、投稿中)。

このように高齢時の皮膚内分泌系を詳細に解析する過程



Functional analysis of a novel epidermal steroid hormone decreasing in the skin with advancing age

Shogo Haraguchi

Department of Biochemistry, Showa University School of Medicine

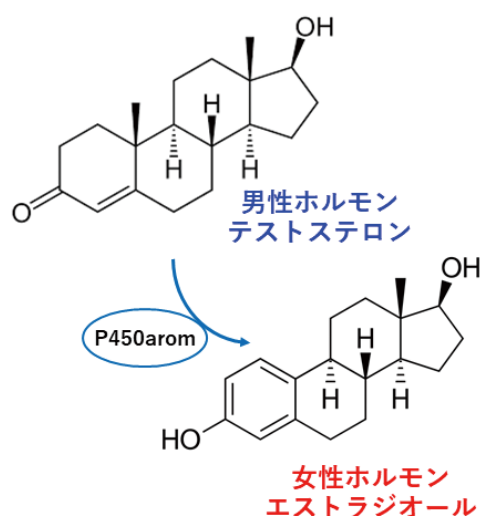


図2 生理作用は大きな違いを示すテストステロンとエストラジオールだが、代謝経路上で見ると隣り合っている

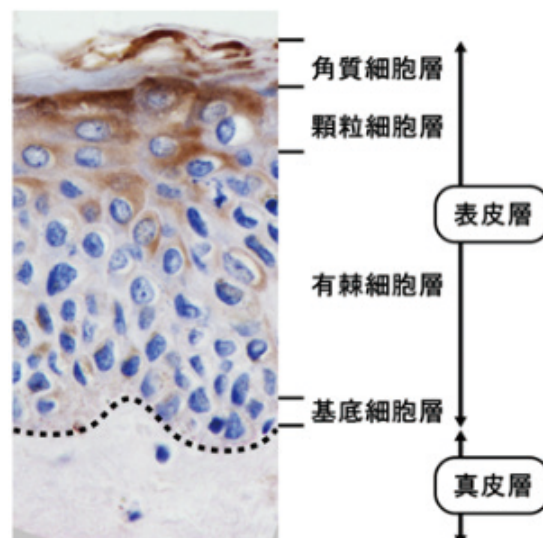


図3 ステロイド合成酵素Zはヒト表皮では主に有棘層から顆粒層に発現が見られた

で、ヒトの皮膚には未報告のステロイド合成経路が存在することを発見した。そこで、研究代表者のこれまでのステロイド研究の経験に基づき質量分析やメタボローム解析を駆使した解析を行い⁴⁻⁶⁾、ヒト表皮で合成される2つの新規ヒト皮膚ホルモン(便宜的に新規皮膚ステロイドXと新規皮膚ステロイドYとする)を同定した。この2つのステロイドは、同一のステロイド合成酵素(便宜的にステロイド合成酵素Zとする)により産生され、ステロイド合成酵素Zはヒト表皮の有棘層・顆粒層に発現していた(図3)。また、ステロイド合成酵素Zの発現量と表皮で合成されるステロイドXとステロイドYの量は加齢に伴い減少した。従って、この2つの新規皮膚ステロイドは表皮において、何らかの生理機能を持ち、その減少が高齢者の皮膚疾患や皮膚症状の発症や悪化に関わる可能性が考えられた。そこで、本研究は2つの新規皮膚ステロイドの機能解明を行うことで、老人性皮膚疾患に対する新たな治療法開発や、高齢者の皮膚の健康維持に関わる化粧品の開発を行うことを目的とした。

2. 方法

2.1. 皮膚由来細胞株に対する新規皮膚ステロイドの作用解析

ステロイドXとステロイドYの皮膚に対する作用は未知であり、受容体も未同定であり、どのような細胞に対して、どのような作用を働きかけるのかは推測が困難であった。しかし、組織局所で合成されるステロイドは一般的に循環しないため^{7,8)}、ステロイドXとステロイドYは合成部位である表皮、またはその近傍で機能しているであろうと考えられた。そこで、ヒト角化細胞株HaCaT細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、マウスメラノーマ由来のB16F10細胞に

対して、ステロイドXあるいはステロイドYを作用させ、発現変動を示す遺伝子を網羅解析することで作用解明の手掛かりとすることにした。

HaCaT細胞、線維芽細胞、B16F10細胞を培養し、それぞれの細胞に対して溶媒添加(コントロール群)あるいはステロイドX添加(実験群1)、ステロイドY添加(実験群2)を行った。3種類の細胞はステロイド処理後3時間で細胞の回収を行った。回収した細胞からtotal RNAを抽出し、トランスクリプトーム解析(受託解析)とバイオインフォマティクス解析(サントリー生命科学財団・佐竹炎主幹研究員らの支援を受けた)を行った。バイオインフォマティクス解析では、Gene Ontology (GO) 解析、GO エンリッチメント解析を行うことで、新規皮膚ステロイドがどのような皮膚機能に関与しているのか予測を行った。

2.2. ステロイドYによる翻訳活性制御、細胞代謝活性の解析

2.1. の解析より、ステロイドYはタンパク質の翻訳開始制御に関わる遺伝子群を大きく変動させ、さらにバイオインフォマティクス解析により翻訳開始を抑制する向きの作用を持つことが示唆された。そこで、HaCaT細胞を用いてステロイドYにより発現が抑制されることが示唆されたタンパク質に実際に発現変化が生じるのかをウエスタンブロットングにより解析した。細胞の調製は2.1. に従ったが、タンパク質レベルでの変化を検出するためステロイド処理の時間は48時間とした。ウエスタンブロットングは定法に従った(抗体は、Proteintech、Cell Signaling Technology、Abcamなどから購入した)。

加えて、タンパク質の翻訳が抑制され、細胞の代謝活性に変化が生じることが予測されたため、細胞の増殖(同仁

化学研究所)、グルコースと乳酸(同仁化学研究所)、ATP産生(同仁化学研究所)、ADP/ATP比(同仁化学研究所)、NADP/NADPH比(同仁化学研究所)などを解析した。

2. 3. ステロイドYの受容体探索

2. 1. の解析から、ステロイドYはタンパク質の翻訳開始制御に関わることが示唆された。この結果はHaCaT細胞の解析結果から得られたが、一方で、B16F10細胞ではタンパク質の翻訳開始制御に関わる遺伝子に発現変動は見られなかった。このことは、ステロイドYの受容体はHaCaT細胞に高発現し、B16F10細胞では発現量が低いことを示唆する。どのようなタイプの受容体がステロイドY受容体として機能しているのか不明であったが、従来からステロイド受容体として知られている核内受容体と、新たなステロイド受容体として報告が相次いでいるGタンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor : GPCR)を候補として考えた⁹⁻¹¹⁾。

そこでGPCRがステロイドYの受容体として機能するのか明らかにするために、HaCaT細胞にステロイドYを作用させ、1細胞イメージングにより細胞のカルシウム変化とcAMP変化を解析した。本解析では東京大学総合文化研究科・坪井貴司教授らの協力を得た。

また、2. 1. のトランスクリプトーム解析のデータから、HaCaT細胞で高発現する核内受容体かつB16F10細胞では発現量が低い核内受容体のリストアップを行った。

2. 4. ステロイド合成酵素Zの表皮特異的ノックアウトマウスの表現型解析

ステロイドXとステロイドYの合成に関わるステロイド合成酵素Zのコンディショナルノックアウトマウスを作製するために、ステロイド合成酵素Zのfloxマウスを作製した(Floxマウスの作製は先端モデル動物支援プラットフォームによる支援を受けた)。このfloxマウスをIvI-CreERT2マウス(The Jackson laboratory)あるいはK14-Creマウス(The Jackson laboratory)と掛け合わせて、表皮特異的ステロイド合成酵素Zのノックアウトマウスを作出した。このマウスを用いて、皮膚の形態学的解析を行った。

2. 5. ヒト皮膚組織を用いたステロイドYの作用解析

上記の2. 1. ～2. 4. は、ヒトやマウスの細胞株やマウス個体を用いた解析であるため、実際にヒトの皮膚でもステロイドYが翻訳活性制御に関わるような作用を発揮するのかを明らかにするために昭和大学整形外科と連携し、ヒト皮膚組織で解析を行った。

昭和大学病院より手術直後に得た余剰検体組織から、皮下組織を可能な限り目視で取り除き、表皮層と真皮層を含

んだ組織を4℃、オーバーナイトで酵素処理(Miltenyi Biotec)し、表皮層のみを回収し培養した。無血清培地で培養したヒト表皮は2つに切り分け、溶媒群とステロイドY添加群を作製した。表皮に発現するmRNAやタンパク質の発現変化は、48時間のステロイドY処理後に解析した。さらに1週間ステロイドY処理を行った表皮を用いて形態学的な解析も行った。

3. 結果

3. 1. 皮膚由来細胞株に対する新規皮膚ステロイドの作用解析

コントロール群とステロイドX添加群、あるいはコントロール群とステロイドY添加群で解析を行ったところ、ステロイドXのみ、あるいはステロイドYのみで変動する遺伝子群が見つかったが、一方で、ステロイドXでもステロイドYでも同様の発現変動を示す遺伝子群も見つかった。これは当初から想定していた結果であり、ステロイドはその高い構造的類似性から受容体への結合において、ほかのホルモンほど厳密な特異性は示さない¹²⁾。また、本実験を行う時点においては、ヒトやマウスの皮膚組織におけるステロイドXやステロイドYの生理的濃度に関しても断片的な知見しかなく、ほかのステロイドホルモンに関する研究例を参考にしていない段階であった。そこで、ステロイドXとステロイドYで同様の増減を示した遺伝子群は、ステロイド合成酵素Z依存的な部分構造による非特異的な変化だと想定して解析を進めた。

その結果、ステロイドXはHaCaT細胞やB16F10細胞に作用させた場合、多くの長鎖ノンコーディングRNA(long non-coding RNA : lncRNA)や機能未知の転写産物(transcripts of unknown function : TUFs)¹³⁾を増加させた。何かしら転写制御に関わるような機能がステロイドXにあるのかもしれないが、ステロイドXの機能解明に関しては行き詰まった。

一方で、ステロイドYはHaCaT細胞に作用させた場合、リボソームタンパク質小サブユニット(ribosomal protein small subunit : RPS)や真核生物翻訳開始因子(eukaryotic translation initiation factor : eIF)に顕著な発現変動が見られ、GOエンリッチメント解析でも翻訳開始制御をネガティブに制御することが示唆された。一方で、B16F10細胞にステロイドYを添加しても、このような翻訳開始に関連する因子群に変動は見られず、B16F10細胞はステロイドY受容体の発現が極めて低いことを示唆した。

3. 2. ステロイドYによる翻訳開始関連因子の発現抑制作用

前述のようにステロイドXはTUFsを変化させたが、その意義を解析するには更に十分な検討と予備的な解析など

が必要となると考えられた。そこで、これ以降はステロイドYの解析を主として進めた。ステロイドYの翻訳活性制御に関わる因子群に対する発現抑制作用がタンパク質レベルでも再現できるのかをウエスタンブロッティングにより解析を行い、ステロイドY処理後48時間でRPSsやeIFsの低下が検出された。さらに、同様の処理を行ったHaCaT細胞では48時間後に、細胞数に有意な差は認められなかったが、細胞中のグルコース消費量が40%以上減少し(図4)、ATP産生量が有意に減少していた。一方で乳酸に変化は認められなかった。

3. 3. ステロイドY受容体探索

詳細な機序は不明だが、ステロイドYはHaCaT細胞に対して作用すると翻訳開始関連因子の抑制と、グルコース消費量、ATP産生量の減少を引き起こしたため、何かしらのシグナルを介してHaCaT細胞に意味のある変化を引き起こしていると考えられた。そこで、次に受容体の探索に取り組んだ。解析では、ステロイドの作用標的として知られている核内受容体とGPCRを主たる解析対象とした。

トランスクリプトーム解析の結果から、ステロイドY処理により3時間でmRNA発現量が有意に変化するため、3時間以内に何らかの変化を細胞に引き起こすはずである。そこでGPCRを標的とした解析では、ステロイドYによってHaCaT細胞内のcAMPやカルシウムが3時間以内に変動を示すのかを1細胞イメージングにより解析を行った。その結果、1時間以内ではHaCaT細胞においてcAMPとカルシウムに変動は見られなかった。現在、ステロイド処理後3時間までの解析を進めている。

核内受容体に関しては、3. 1. の結果からステロイドY処理後3時間で発現量が3倍以上に増加する遺伝子が見つかったため、この遺伝子を核内受容体のスクリーニングを行う際の指標として用いることにした。HaCaT細胞とB16F10細胞に発現している核内受容体をすべてリストアップし、その中からmRNA発現量の比がHaCaT細胞/B16F10細胞で10以上の遺伝子をスクリーニング対象とした。その結果、リガンド既知の受容体が4つ、リガンド未同定のオーファン受容体が3つ候補として浮かび上がった。そこで、これらの受容体とステロイドYの結合試験、受容体のノックダウン、質量分析を用いたノンターゲットな受容体探索など、複数の手法を組み合わせることでステロイドY受容体の同定を目指して解析を進めている。

3. 4. ステロイド合成酵素Z表皮特異的ノックアウトマウス皮膚の形態学的解析

ステロイド合成酵素ZのfloxedマウスとIv1-CreERT2マウスを掛け合わせ、出生後4週目の雄マウスへ1日おきに1週間タモキシフェンの腹腔内投与を行った。雌マウスは

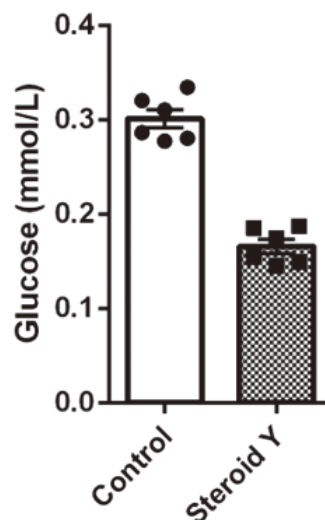


図4 ステロイドY処理を48時間行った細胞では、細胞中のグルコース消費量が顕著に減少していた

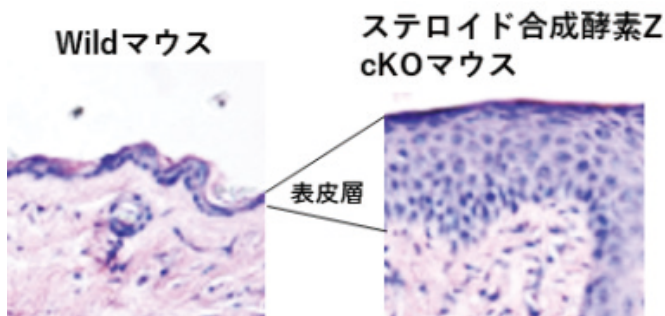


図5 ステロイド合成酵素Zの表皮特異的ノックアウトマウスでは、表皮が乾癬様に肥厚した

性周期を考慮する必要があるため、データの解釈が複雑になるため、現時点では解析を見送った。その後、6週齢になったマウスの皮膚を形態学的に解析した。その結果、タモキシフェン投与により表皮でステロイド合成酵素Zをノックアウトしたマウスでは、表皮が乾癬様に肥厚していた(図5)。

3. 5. ヒト皮膚組織におけるステロイドYの作用解析

3. 1. ~ 3. 4. の解析からステロイドYは、翻訳開始関連因子の発現を抑制し、その結果として表皮の肥厚を引き起こすことが示唆された。この結果が、ヒト表皮でも同様に起きるのかをヒト皮膚組織を用いて解析を行った。その結果、ヒト表皮においてもステロイドY処理48時間後に翻訳開始制御に関わる因子群の発現低下が見られた。一方で、ステロイドY処理を1週間行った表皮ではヘマトキシリンにより染色される細胞核の数の減少が見られた(図6)。

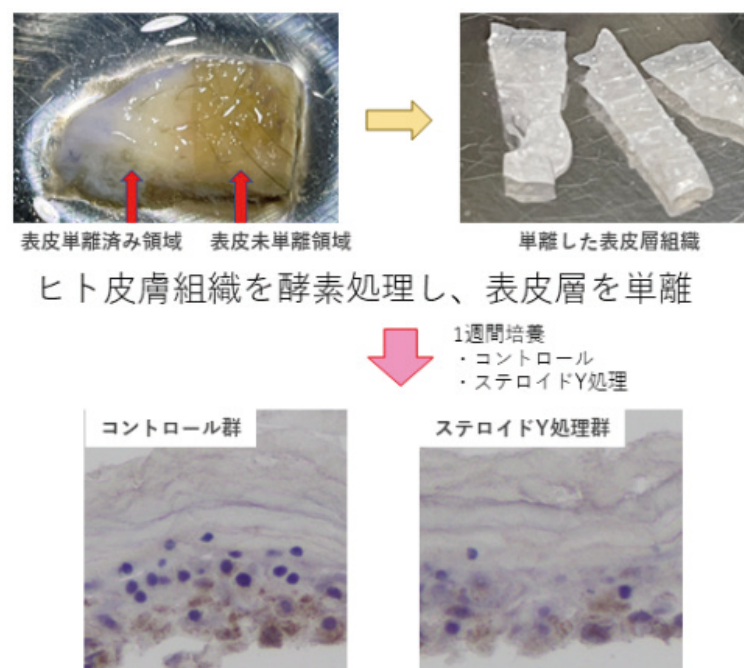


図6 単離したヒト表皮をステロイドY添加下で1週間培養し、形態学的変化を解析した

4. 考 察

本研究はヒト表皮には未報告のステロイド代謝経路が存在することを発見し、その発見に基づいて新規皮膚ステロイド2つを同定した研究結果に基づいて研究を行った。本解析からステロイドXが皮膚で何をしているのかは依然として不明ながら（何かしらの生理的に意味のある作用を持つのかも現時点では不明である）、ステロイドYに関してはRPSsやeIFsといった翻訳開始制御に関わる因子の抑制、ステロイド合成酵素Zをノックアウトすると表皮に肥厚が見られ、ステロイドYを添加した培養液で1週間培養したヒト表皮では細胞数の減少が見られた。

ステロイドYに関してはリボソームタンパク質の減少を引き起こすため、新たなタンパク質の合成を低下させる作用があると考えられる。ステロイドYはRPSsやeIFsであれば何でも減少させるわけではなく、特定のRPSsやeIFsの減少を引き起こす。そのため、ステロイドYにより合成量が減少するタンパク質は、特定のRPSが合成に関わるタンパク質群であることが推測される。従って、今後、この特定のRPSをノックダウンしトランスクリプトーム解析を行うことや、リボソームプロファイリング法による解析を行うことで、ステロイドYがRPSsやeIFsを介して細胞内のどのような機能を制御しているのか、より明快にできるのではないかと考えている。

また、核内受容体がステロイドYの受容体の可能性が高いと現時点では考えているが、核内受容体と翻訳開始制御

に関わる因子の間にどのようなシグナルが介在しているのかは不明である。受容体が同定できていない現状では、ステロイドYの表皮における標的細胞の同定や、詳細なシグナル伝達経路の解析は困難であり、現在、共同研究者らの知見や技術的な協力を得ながら解析を進めている。ステロイド受容体の研究に関しては、テキサス大学のPeter Thomas教授らが最も実績があるがコロナ禍において共同研究には限界があった。幸いにも今後は受容体同定に向けた共同研究を実施しやすくなると期待でき、受容体を同定することでステロイドYと翻訳開始制御因子間に介在する謎の解明に迫りたい。

翻訳開始を抑制的に制御するステロイドYが欠落した場合に、ノックアウトマウスでなぜ皮膚の肥厚が起きたのか？であるが、表皮基底層の幹細胞の過剰な分化・増殖は表皮の肥厚やがん化を引き起こす。従って、ステロイドYは有棘層・顆粒層で合成されると傍分泌(paracrine signaling)により表皮幹細胞に作用し、表皮幹細胞が適切なスピードで分化・増殖することを助け、適切な表皮層形成やがん化抑制に関わるホルモンなのかもしれない。最初に述べたようにステロイドYは高齢者で減少するため、高齢者に好発する表皮のバリア機能低下に起因した掻痒症や乾癬、あるいは基底細胞癌の治療に有効であるかもしれない。また、リボソーム機能の異常に起因した疾患であるリボソーム病(ribosomopathy)への関与も考えられる。現在、リボソーム病としての病態が明らかになっている疾患はダ

イアモンド・ブラックファン貧血(指定難病284)など一部に限られているが、リボソームの生合成機序は未だ研究が始まったばかりであり、表皮には未知のリボソーム病が潜んでおり、それが皮膚の難治性疾患とされる様々な病気の発症や悪化に関わっていることも考えられる。現在は、このような視点から、翻訳開始制御因子の抑制がどのような皮膚機能に関わる可能性があるのか検討を進めている。

引用文献

- 1) Thiboutot D, Jabara S, McAllister JM, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z, Clawson G. Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J Invest Dermatol.* 120, 905-914 (2003).
- 2) Slominski AT, Li W, Kim TK, Semak I, Wang J, Zjawiony JK, Tuckey RC. Novel activities of CYP11A1 and their potential physiological significance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 151, 25-37 (2015).
- 3) Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, Manna PR, Skobowiat C, Zmijewski M, Li W, Janjetovic Z, Postlethwaite A, Zouboulis CC, Tuckey RC. Steroidogenesis in the skin: implications for local immune functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 137, 107-123 (2013).
- 4) Haraguchi S, Hara S, Ubuka T, Mita M, Tsutsui K. Possible role of pineal allopregnanolone in Purkinje cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109, 21110-21115 (2012).
- 5) Ubuka T, Haraguchi S, Tobari Y, Narihiro M, Ishikawa K, Hayashi T, Harada N, Tsutsui K. Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat Commun.* 5, 3061 (2014).
- 6) Haraguchi S, Kamata M, Tokita T, Tashiro KI, Sato M, Nozaki M, Okamoto-Katsuyama M, Shimizu I, Han G, Chowdhury VS, Lei XF, Miyazaki T, Kim-Kaneyama JR, Nakamachi T, Matsuda K, Ohtaki H, Tokumoto T, Tachibana T, Miyazaki A, Tsutsui K. Light-at-night exposure affects brain development through pineal allopregnanolone-dependent mechanisms. *eLife.* 8, e45306 (2019).
- 7) Mellon SH, Griffin LD. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab.* 13, 35-43 (2002).
- 8) Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol.* 30, 259-301 (2009).
- 9) Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, de Vlieg J, Zhu Y, Tubbs C. Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterone membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology.* 148, 705-718 (2007).
- 10) Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologa CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol.* 5, 421-427 (2009).
- 11) Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 7, 715-726 (2011).
- 12) Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science.* 242, 583-585 (1988).
- 13) Gingeras TR. Origin of phenotypes: genes and transcripts. *Genome Res.* 17, 682-690 (2007).