

学 位 論 文 要 旨

真皮線維芽細胞由来エラスターゼの本体の同定と皮膚老化および
毛周期における役割

Identification of dermal fibroblast-derived elastase and its role in skin aging and
hair cycle

森崎 尚子

(Morisaki Naoko)

皮膚線維芽細胞は真皮を構成する主要な細胞であり、皮膚の構造や物性に影響を及ぼす細胞外マトリックス(ECM)の生成、代謝、維持に関与している。真皮を構成する主な ECM としては、組織の構造維持に重要な役割を果たしている膠原線維や弾力性に影響を与える弾性線維などがあり、紫外線暴露や老化によるその劣化が皮膚の弾力低下やシワの形成につながるということが知られている。弾性線維の主な構成成分はエラスチンであり、これを分解する酵素はエラスターゼと呼ばれるが、酵素本体は1種類ではなく何種類かの酵素の総称である。エラスターゼという名称で呼ばれる酵素だけでも、セリンプロテアーゼであるすい臓エラスターゼや好中球エラスターゼ、メタロプロテアーゼであるマクロファージ由来のメタロエラスターゼがあり、その他にもある種のマトリックス・メタロプロテアーゼやゼラチナーゼもエラスチンを分解する活性があることが知られていた。しかし皮膚でのエラスチン分解を主につかさどる酵素の本体については解明されていなかった。皮膚の線維芽細胞自体がエラスターゼ活性を持つことが報告されていたので、本研究ではその活性本体を明らかにし、皮膚での機能について検証することを目的とした。

はじめに活性本体未知のまま皮膚線維芽細胞の産生するエラスターゼ様酵素の性質を調べた。阻害剤プロファイルからはメタロプロテアーゼであることが、活性抽出の過程からは膜結合型の酵素であることが明らかとなった。ヘアレスマウスの皮膚に紫外線を照射するとヒトの皮膚同様にシワが形成されることが知られているため、このときのエラスターゼ活性の変化を調べたところ、紫外線照射により経時的にシワ形成と連動するように活性が上昇していた。そこで、

この酵素活性を抑制すると紫外線によるシワ形成に影響を及ぼすかどうか検討した。典型的なメタロプロテアーゼ阻害剤である **phosphoramidon** を、皮膚への浸透性を上げるよう誘導体化してマウス皮膚に塗布したところ、紫外線照射によるシワ形成が抑制され、真皮組織内での弾性線維分解も抑制されていることを確認した。

線維芽細胞由来エラスターゼ活性が紫外線誘導シワ形成に重要な役割を果たしていると考えられたので、次に酵素本体の同定を試みた。分子量や至適 pH、活性中心などの類似性から **neprilysin(NEP)** を候補酵素と考え、中和抗体による免疫沈降試験を行った。その結果、抗 NEP 抗体により線維芽細胞のエラスターゼ活性が阻害され、更に NEP を持たない COS-1 細胞に NEP 遺伝子を導入すると NEP 活性と共にエラスターゼ活性が発現することから線維芽細胞由来エラスターゼの活性本体は NEP であると結論付けた。実際に細胞の継代老化、マウスの自然老化、細胞の光老化時にもエラスターゼ/NEP 活性が上昇しており、真皮の自然老化・光老化における弾力性低下に NEP の持つエラスターゼ活性が重要な役割を果たしていると考えられた。

更に毛周期におけるエラスターゼ/NEP の役割についても検討した。毛周期とは、毛が成長、退行、休止を経て新しい毛が生え変わる自然なサイクルのことで、その調節には多くの生体因子が関わると言われている。毛周期に伴い毛包の形や大きさは劇的に変化するので、毛包を構成する上皮系、間葉系の細胞、毛包を取り囲む ECM も大きく変動することになり、一種の組織再構築の過程と考えられる。そこで ECM 代謝酵素類の毛周期における変動を調べたところ、エラスターゼ/NEP 活性は初期成長期に活性上昇し、退行期から休止期にかけて活性低下する変動を示した。NEP タンパク質、遺伝子発現も同様の変動を示し、免疫組織染色からは、毛周期のステージにより、NEP の発現部位も変動することが観察された。これらのことから、NEP が毛周期調節に何らかの役割を果たしている可能性が示唆されたので、NEP 阻害剤を除毛したマウス背部皮膚に塗布したところ、毛再生の遅延、および退行期の促進が認められた。このことから NEP は毛再生と成長期維持に作用しており、その抑制により発毛を遅らせ、成長期を短縮することができることが明らかとなった。

以上本研究により、真皮線維芽細胞が産生するエラスターゼの活性本体は、細胞膜結合型のメタロプロテアーゼである **neprilysin** であることが解明された。この酵素の皮膚における機能を明らかにするために、皮膚老化ならびに毛周期における影響を検討したところ(1)皮膚の紫外線照射により真皮線維芽細胞での発現が誘導され、弾性線維のエラスチンを分解することにより光老化によるシワ形成に関与すること、(2)毛周期のステージに連動して発現量と部位が変動することにより、毛包再生と成長期維持に関与していることが示された。本研究の成果は、真皮線維芽細胞由来エラスターゼが皮膚の老化や毛包組織の再構成、機能維持に重要な役割を果たしているという皮膚科学研究の新知見を提供するものであり、紫外線に起因する皮膚障害の治療や、育毛、体毛のむだ毛処理など美容医療分野への展開が期待される。