

皮膚の老化によるⅦ型コラーゲンの代謝及び 遺伝子発現調節機構について

弘前大学 医学部生化学第1講座

今 淳

Type VII collagen is the major component of anchoring fibrils, attachment structures stabilizing the association of cutaneous basement membrane to the underlying dermis. Previous studies have shown that the reduction of type VII collagen expression and anchoring fibril formation may involve intrinsic-/photo-aging of the skin, including wrinkle formation, laxity, and roughness. In order to understand the molecular mechanisms underlie these clinical features, I investigated 1) the transcriptional mechanisms of type VII collagen gene (COL7A1) and 2) the effects of ultraviolet (UV) radiation-induced cytokines (TNF- α , IL-1 β) on COL7A1 expression. 1) Transient cell transfection assays with COL7A1 promoter/luciferase reporter gene construct into epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts revealed that a GC box (-155/-150) as well as a GT box (-512/-505) previously published are crucial for the high basal activity of COL7A1 promoter. Electrophoresis mobility shift assays revealed that transcription factors Sp1 and Sp3 bind to this region. Co-transfection experiments of COL7A1 promoter construct with Sp1 and Sp3 expression vectors demonstrated that Sp1 is essential for high COL7A1 expression, whereas Sp3 represses Sp1-mediated transcriptional activation. However, point mutation into -155/-150 site markedly reduced the activity of the promoter, suggesting -155/-150 is an Sp1-family-mediated cis-acting element involved in transcription of COL7A1. 2) Northern blot analyses demonstrated that both TNF- α and IL-1 β reduced COL7A1 mRNA levels in epidermal keratinocytes in a dose- and time-dependent manner, whereas they enhanced the expression of COL7A1 in dermal fibroblasts. The inhibitory effects were also observed at the protein level as well as at the mRNA level. In addition, nuclear run-on assays revealed that TNF- α and IL-1 β reduced the COL7A1 transcripts, suggesting that the inhibitory effects of TNF- α and IL-1 β on COL7A1 expression was occurred, at least in part, at the transcriptional level. Thus, COL7A1 regulation by these inflammatory cytokines is cell type-specific. Down-regulation of COL7A1 expression in epidermal keratinocytes may contribute to the reduction of anchoring fibrils formation, resulting in intrinsic-/photo-aging of the skin, characterized by wrinkle formation.

1. 緒 言

皮膚のⅦ型コラーゲンは、表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞により生合成され、細胞外に移動した後、基底膜 (BM) に結合してアンカーリングフィブリル(AF)を形成する(図1)。そして、このⅦ型コラーゲン/AFは、基底膜と真皮との結合を強固にし、皮膚の構築を維持する重要な役割を担っていると考えられている¹⁾。

皮膚の老化には、加齢に伴い全身の皮膚に生じる自然老化と、紫外線暴露により生じる露光部の光老化が存在するが、何れの老化した皮膚においてもAFの減少が認められ、しかも光老化皮膚ではその程度が更に増強していることから²⁾、所謂“皺”など皮膚の老徴出現にはⅦ型コラーゲンが何らかの関与をしていると考えられる。

本研究完了報告では、最終的に、いつまでも“皺”を生じない若々しい皮膚を保つ方法の確立を目的とし、その一端としてⅦ型コラーゲタンパク質及びコードする遺伝子

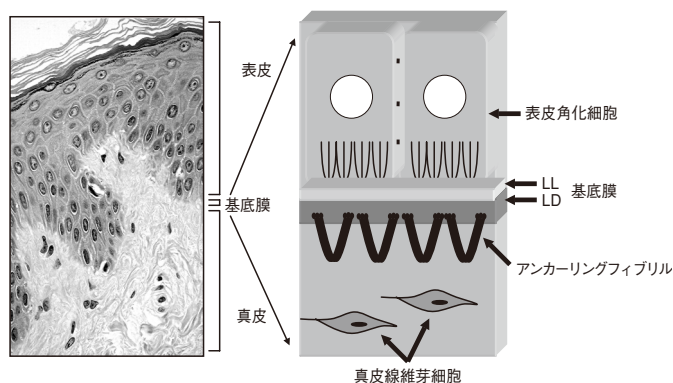


図1. 皮膚基底膜領域へのアンカーリングフィブリルの結合
表皮角化細胞と真皮線維芽細胞で生合成されたⅦ型コラーゲンは、lamina lucida (LL) 及び lamina densa (LD) からなる基底膜領域に移動・結合し、アンカーリングフィブリルを形成する。

COL7A1の発現と老化との関係について報告する。特に、1) 皮膚のCOL7A1基本転写調節機構、2) 光老化に関する各種炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) による皮膚のCOL7A1発現調節機構の解析結果を報告し、老化による皮膚の老徴との関連についても考察する。

2. 実 験

2.1 ルシフェラーゼアッセイ法

培養ヒト表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞における



Metabolism and gene regulation of type VII collagen in skin aging.

Kon Atsushi

Department of Biochemistry, Hirosaki University School of Medicine

COL7A1 の転写制御領域の解析・同定は、ルシフェラーゼアッセイ法を用いて行った³⁾。尚、ルシフェラーゼコンストラクト(-1804COL7A1-Luc) は、PCR 法により増幅した COL7A1 プロモーター領域 (-1804/+108) をインサートとし、これをルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み調整した。また、インサートの 5' 末端からプロモーター領域を順次欠失させた各種欠失変異体も同様に調製した。

2.2 ゲルシフトアッセイ法

COL7A1 の転写制御領域に結合する転写因子の解析・同定は、ゲルシフトアッセイ法を用いて行った³⁾。

2.3 ノーザンブロット法

炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) による、培養ヒト表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞の COL7A1 mRNA の発現変化は、ノーザンブロット法で解析した⁴⁾。

2.4 ウェスタンブロット法

炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) による、培養ヒト表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞のⅦ型コラーゲンタンパク質の発現変化は、ウェスタンブロット法で解析した⁵⁾。

2.5 核 run-on アッセイ法

炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) による COL7A1 の転写産物量の変化を、核 run-on アッセイ法によって解析した⁶⁾。

3. 結果及び考察

3.1 COL7A1 の基本転写調節機構

既に約 3.8kb のヒト COL7A1 プロモーター領域がクローニングされ、解析された。しかし、(1) COL7A1 が TATA-less 遺伝子であること、(2) プロモーター領域 -512/-505 (転写開始点を +1 とする) の GT box が基本転写の cis-element であり、Sp1 の結合する、こと以外明らかにされておらず³⁾、皮膚の COL7A1 基本転写調節機構の詳細を更に解析した。

-1804COL7A1/Luc 及びその欠失変異体を培養ヒト表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞にそれぞれ導入して、ルシフェラーゼアッセイ法を行った結果、両細胞とも、-458 まで欠失させると活性が 40% にまで低下した。これは、上記 -512/-505 の GT box が欠失したためであった。更に -230 までは変化しなかったが、-144 まで欠失させると活性が消失した。以上から、-230/-140 にも cis-element が存在すると考えられた。コンピューターによるモチーフ解析を行った結果、-155/-150 に Sp1 の結合し得る GC box が存在していた。ゲルシフトアッセイ法で確認したところ、この領域には Sp1-family の Sp1 及び Sp3 が結合していた (図 2)。次に、Sp1 及び Sp3 の発現ベクターを各細

胞に導入して co-transfection 実験を行った結果、Sp1 はルシフェラーゼ活性を促進し、Sp3 は Sp1 の作用を抑制した。そこで、上記 GT box 及びこの GC box に変異を入れた -524COL7A1/Luc を各細胞に導入して、同様にルシフェラーゼアッセイ法を行った結果、活性は著しく低下するものの完全には消失しなかった。即ち、これら GT/GC box は COL7A1 転写の initiation を制御する領域ではなく、エンハンサーとして互いに協同しながら COL7A1 の転写を制御していた (図 3)。

3.2 各種サイトカインによる皮膚の COL7A1 発現調節機構

皮膚が紫外線に暴露されると、“皴”などの老徴に代表される光老化が生じる。この光老化の生じた皮膚では、AF の形成が低下しており、この機構にⅦ型コラーゲンが

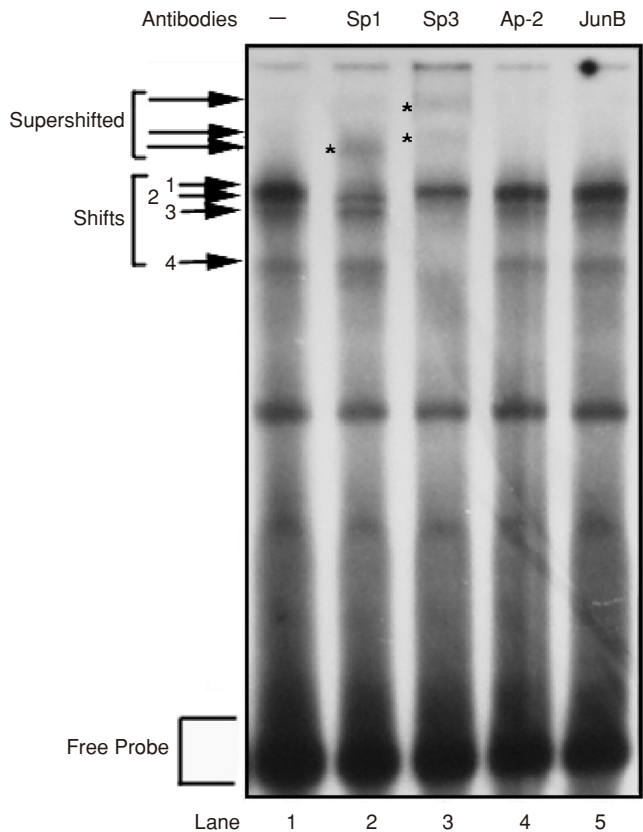


図 2. -155/-150 の領域への Sp1 及び Sp3 の結合
GC box である -155/-150 領域をプローブとしてスーパーシフトアッセイ法を行った結果、Sp-family の Sp1 及び Sp3 のスーパーシフトのバンド (Supershifted bands, ★印) を認めた。

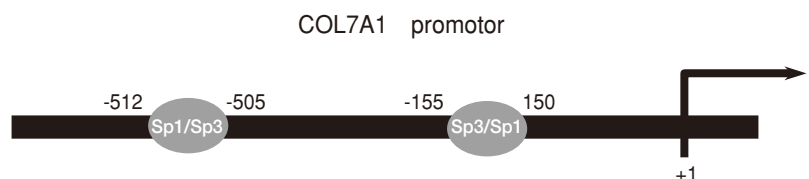


図 3. Ⅶ型コラーゲン遺伝子 COL7A1 の基本転写調節機構

関与するのではないかと考えられている²⁾。最近、紫外線 UVA による COL7A1 の発現調節に関する報告がなされ、表皮角化細胞における COL7A1 の発現を抑制し、逆に真皮線維芽細胞は促進することが明らかになった⁵⁾。更に、紫外線により誘導される炎症性サイトカイン TNF- α 、及び IL-1 β も、COL7A1 の発現を制御していることが報告され⁴⁾、真皮線維芽細胞における COL7A1 の発現を促進し、特に TNF- α は NF- κ B を誘導して、これが COL7A1 プロモーター領域の応答配列に結合、転写レベルで発現を促進することが明らかになった⁷⁾。しかし、表皮角化細胞に対する機構は全く不明であり、その詳細を解析した。

培養ヒト表皮角化細胞に TNF- α (10 ng/mL)、IL-1 β (100 U/mL) を添加して 24 時間培養し、次いで細胞を回収、COL7A1 の発現をノーザンブロット法で解析した。その結果、両炎症性サイトカインとも COL7A1 の発現を抑制した (図 4)。しかも、この抑制効果は濃度及び時間依存的であった。培地中にタンパク質合成阻害剤 cycloheximide を添加すると、この抑制効果が消失したことから、この反応には de novo のタンパク質新生を必要とした。次に、核 run-on アッセイでにより、各炎症性サイトカインの作用が転写レベルで行われているかを解析した。その結果、各炎症性サイトカインの刺激により転写産物量が減少し、抑制効果は転写レベルでの調節を受けていた。ウエスタンブロット法で、培地中に分泌されるⅦ型コラーゲンタンパク量を解析したところ、発現が抑制されており、遺伝子レベルのみならずタンパクレベルでも抑制効果を認めた。この様に、炎症性サイトカインの表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞における COL7A1 発現調節機構は全く異なっており、組織特異的発現調節機構の存在が示された。

以上から、光老化の原因となり紫外線で誘導される炎症性サイトカイン TNF- α 及び IL-1 β も、紫外線 UVA の場合と同様に表皮角化細胞の COL7A1 の発現を抑制しており、AF の低形成への関与が考えられた。AF の低形成は基底膜領域を脆弱にし、そこに外力が掛かることで深い溝ができ、皺形成に繋がる可能性が考えられた。しかしながら、真皮線維芽細胞における効果も UVA と同様促進的であり、発現したⅦ型コラーゲンがどのような機構で AF を形成するのか、今後更なる解析が必要である。事実、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の何れが AF を形成するのか、例えば表皮角化細胞由来のⅦ型コラーゲンが優位に形成するのかなど不明な部分が多い。更に、各炎症性サイトカインはⅦ型コラーゲンの異化分解酵素の一つである matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現も促進することが知られ⁸⁾、このことも AF の分

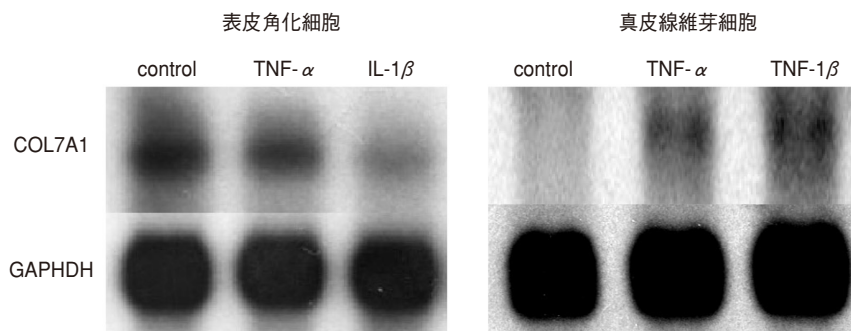


図 4. 表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞の COL7A1 の発現に対する、炎症性サイトカイン TNF- α 及び IL-1 β の影響

TNF- α (10 ng/mL) 及び IL-1 β (100 U/mL) で培養ヒト表皮角化細胞を刺激すると、COL7A1 の発現は抑制された。一方、真皮線維芽細胞では促進され、組織特異的発現調節機構が認められた。

解・低形成を引き起こしている可能性が否定できない。従って、皮膚の老徴出現の解析には、Ⅶ型コラーゲンの生合成、COL7A1 の発現調節機構のみならず、異化分解系の関与も検討する必要があると考えられた。

(参考文献)

- 1) 今 淳: 表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞におけるⅦ型コラーゲン遺伝子の発現調節機構について. *Connec Tissue* **34**: 127-135, 2002.
- 2) Craven NM, Watson RE, Jones CJ et al.: Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *Br J Dermatol* **137**: 344-350, 1997.
- 3) Vindevoghel L, Kon A, Lechlerider RJ et al.: Smad-dependent transcriptional activation of human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **273**: 13053-13057, 1998.
- 4) Chen YQ, Mauviel A, Ryynanen J et al.: Type VII collagen gene expression by human skin fibroblasts and keratinocytes in culture: influence of donor age and cytokine responses. *J Invest Dermatol* **102**: 205-209, 1994.
- 5) Chen M, Petersen MJ, Li HL et al.: Ultraviolet A irradiation upregulates type VII collagen expression in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **108**: 125-128, 1997.
- 6) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 7) Kon A, Vindevoghel L, Kouba DJ et al.: Cooperation between SMAD and NF- κ B in growth factor regulated type VII collagen gene expression. *Oncogene* **18**: 1837-1844, 1999.
- 8) Salo T, Makela M, Kylmaniemi M et al.: Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* **70**: 176-182, 1994.