

皮膚における弾性繊維形成とトロポエラスチンの細胞機能解析

星薬科大学薬学部臨床化学教室

輪 千 浩 史

Elastin (ELN) is an insoluble extracellular matrix protein and the core protein of the elastic fibers that provide elasticity to elastic tissues such as arterial, lungs, skin and ligaments. It is secreted from cells as a soluble protein of approximately 70-kDa referred to the extracellular space as tropoelastin.

The purpose of this study was to investigate the elastic fiber assembly in human skin fibroblast cells on two- or three-dimensional culture. We demonstrated elastic fiber assembly on the neonatal normal human dermal fibroblast cells (NHDF-Neo) or the adult normal human dermal fibroblast cells (NHDF-Ad). Immunofluorescence staining showed that NHDF-Ad is difficult to make elastic fiber in contrast to NHDF-Neo in two-dimensional culture resulting from the activity of tropoelastin degradation is high. Furthermore, the formation of cross-linking amino acid in NHDF-neo significantly increased by the addition of recombinant human tropoelastin (HTE). On the other hand, it was not able to observe the elastic fiber assembly on NHDF-Neo in three-dimensional culture. In addition, it revealed the gel greater contraction in the presence of HTE.

Taken together, these observations contributed to the clarification of mechanisms of elastic fiber assembly on the dermal fibroblast cells in two- or three-dimensional culture.

1. 緒 言

皮膚は表皮・真皮・皮下組織から構成されている。真皮は、厚い層で毛細血管、皮脂腺、汗腺など大切な付属器官があるが、組織の大部分は膠原繊維（コラーゲン）や弾性繊維、その他の細胞外マトリックスで構成されている。膠原繊維や弾性繊維は真皮の中に分散している繊維芽細胞から作られ、肌の張りや弾力のもとであるばかりでなく、皮膚の運動にも大きく関わっている。特に、エラスチンは皮膚、血管、肺などの組織や臓器に存在し、弾性力の源として重要な機能を果たしている。皮膚は身体の表面を被っており、常に外的刺激にさらされている。したがって、老化に伴い皮膚にたるみやしわが増加する。このような加齢による皮膚の変化が見られる時は弾性繊維の変化が著しいと考えられている。

エラスチンは、前駆体である可溶性トロポエラスチンとして細胞外に分泌された後、トロポエラスチン分子の自己集合、フィブリリン-1やフィブリリン-5と呼ばれる糖タンパク質との分子間相互作用、銅を補酵素とする Lysyl oxidase による分子内または分子間架橋形成の過程を経て不溶性のエラスチン繊維になると考えられている。トロポエラスチン遺伝子発現については様々な研究が報告されているが、エラスチン繊維形成における加齢の影響について

は、ほとんど報告されていない。近年、網膜上皮色素細胞（Pigmented Epithelial cells: PE 細胞）がエラスチンを産生せずマイクロフィブリルやリジロキシダーゼを産生している細胞にエラスチン遺伝子を導入の導入や組換えトロポエラスチンの添加により、エラスチン線維を免疫蛍光染色で確認すると共に、エラスチン線維固有の架橋アミノ酸であるデスマシンの形成もアミノ酸分析により明らかとなった¹⁻³⁾。そこで、本研究では、組換えトロポエラスチンを皮膚繊維芽細胞に処理し、2次元培養におけるエラスチン繊維形成に対する加齢の影響と3次元培養におけるトロポエラスチンの役割について検討した。

2. 実 験

2・1 抗体と試薬

抗体に関しては anti fibrillin-1 polyclonal antibody, anti His-G monoclonal antibody は Invitrogen (Carlsbad, USA) から、anti tropoelastin monoclonal antibody (MAB2503) は Chemicon International, Inc. (Temecula, USA) から、Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG は Molecular Probes (Eugene, USA) から HRP conjugated anti mouse IgG antibody は Amersham (Buckinghamshire, UK) から購入した。試薬に関しては、コラーゲンゲル培養キットは新田ゼラチンより、Human TGF- β 1 は和光純薬より、Protease inhibitor cocktail tablets は Roche Diagnostics K. K. (Japan) より購入した。

2・2 細胞培養

正常ヒト新生児皮膚細胞 (NHDF-Neo) および正常ヒト成人皮膚細胞 (NHDF-Ad) はタカラバイオより購入した。2次元培養は、NHDF-Neo および NHDF-Ad を FBS



Analysis of elastic fiber formation and the cell functions of tropoelastin on the skin.

Hiroshi Wachi

Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.

(Biowest)、L-glutamine、Penicillin-Streptomycin、MEM Non-Essential Amino Acids、Sodium pyruvate (Gibco) を含む 10% FBS-DMEM 培地で培養した。3 次元培養は、NHDF-Neo をコラーゲンゲルに包埋し、10% dialyzed-FBS DMEM で培養した。また、N 末端に 6×His が付加した大腸菌組換えヒトトロポエラスチン (HTE) は前報にしたがって作製したものをを用いた¹⁾。

2・3 蛍光免疫染色

4% Paraformaldehyde で固定した後、Block Ace (Roche) でブロッキングした細胞に、エラスチンに対する MAB2503 抗体 (モノクローナル抗体)、または抗エラスチン抗体 (ポリクローナル抗体)、V5-tag に対する V5 抗体 (モノクローナル抗体)、および Fibrillin-1 に対する抗 Fibrillin-1 抗体 (ポリクローナル) で処理し、Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG で処理し、蛍光位相差顕微鏡にて観察した。

2・4 RNA 抽出と reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

全 RNA は AGPC 法で抽出した⁴⁾。RT-PCR は、1 μ g/10 μ l の全 RNA に 10 mM dNTP、Oligo dT をそれぞれ 1 μ l ずつ加えたものを 65℃ で 5 分間 熱変性後、氷上で 5 分間冷却した。その後、これに 5×1st Strand buffer 4 μ l、100 mM DTT 2 μ l、RNase Inhibitor 1 μ l を加えた。2 分間 37℃ でプレインキュベートし、Reverse Transcriptase (M-MLV) を 1 μ l 加えて cDNA を合成し、各遺伝子に特異的なプライマーを用いて遺伝子を増幅した。

2・5 ウェスタンブロッティング

培養上清を 30% 硫酸アンモニウムで塩析した後、Laemmli sample buffer (1% SDS、5% glycerol、0.01% BPB、0.1 M DTT 含有 0.01M Tris-HCl pH7.4) を加えて溶解したものをサンプルとした。サンプルを 7.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ニトロセルロース膜に転写した後、5% スキムミルク含有の T-TBS (50mM Tris-HCl、pH 8.0、0.9% NaCl、0.05% Tween 20) で処理した。次に、抗 His-G 抗体で処理し、ECLTM キット (Amersham, Buckinghamshire, UK) で検出した。

2・6 架橋アミノ酸定量

培養細胞を剥離した後、6N 塩酸で 110℃、18 時間加水分解した。加水分解物を乾燥後、精製水に溶解し架橋アミノ酸測定試料とした。この資料中の架橋アミノ酸量は、テキサス大学 Starcher 博士に依頼し、前方に従ってラジオイムノアッセイ⁵⁾によって測定した。

2・7 エラスチカ・ワンギーソン染色

3 次元培養したゲルをマイルドホルムで固定後、パラフィン置換し切片を作製した。

脱パラフィン後、ヘマトキシリン液と塩化鉄液、ヨウ化カリウム液、滅菌精製水を 20:3:8:5 で混合した溶液を切片に添加した。滅菌精製水で洗い塩化鉄液と滅菌精製水を 3:37 の割合で混合した溶液を切片に添加し分別し、ワンギーソン液を添加後、脱水し乾燥して封入した。

3. 結果

3・1 NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養におけるエラスチン繊維形成

NEDF-Neo および NHDF-Ad の HTE の未添加、添加によるエラスチン繊維形成を、抗 Elastin 抗体と抗 Fibrillin-1 抗体を用いて蛍光免疫染色で確認した。HTE 未添加の場合、NHDF-Neo ではエラスチン繊維を確認することができたが、NHDF-Ad ではエラスチン繊維をほとんど確認することができなかった。しかし、NHDF-Ad に HTE を添加することでエラスチン繊維の確認できた (図 1)。また、NHDF-Neo において HTE を添加することで、

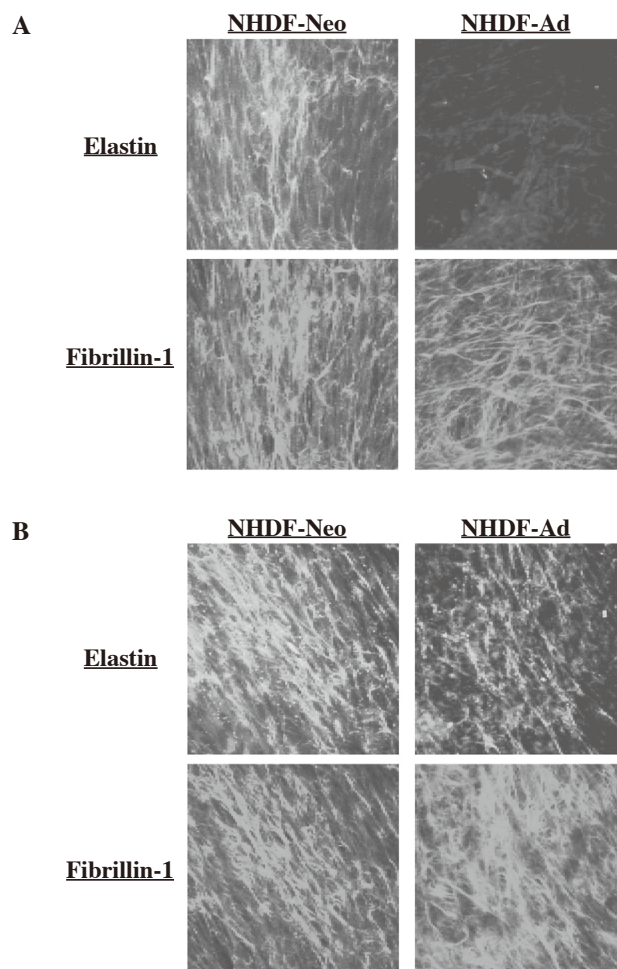


図1 NHDF-NeoとNHDF-AdにおけるHTE未添加(A)、添加(B)によるエラスチンおよびフィブリリン1の蛍光免疫染色

内因性と外因性のエラスチン繊維が確認でき、エラスチン繊維の指標である架橋アミノ酸の有意な増加も認められた。尚、エラスチンの足場タンパク質の一つであるフィブリリン-1 繊維に大きな変化は認められなかった。(図2)。

3・2 NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養におけるエラスチン繊維形成関連タンパク質の遺伝子発現

加齢によるエラスチン繊維形成能が低下する原因を検討するため、NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養におけるエラスチン関連タンパク質の遺伝子発現を RT-PCR 法にて確認した。エラスチン繊維の足場タンパク質として重要なフィブリリン-1 やフィブリリン-5、架橋形成に重要なリジロキシダーゼと各遺伝子発現に大きな変化は見られなかった(図3)。

3・3 NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養における添加 HTE の分解活性

次に、NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養添加

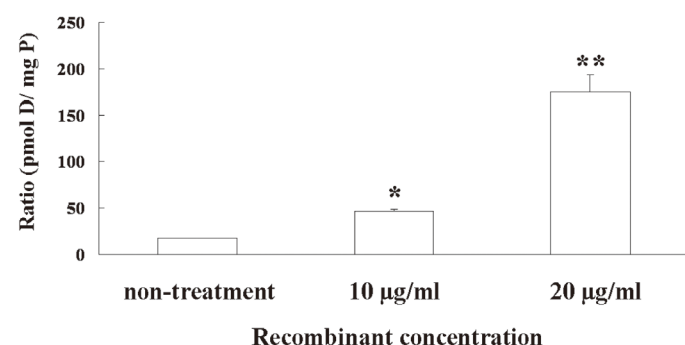


図2 NHDF-Neo の HTE 添加における架橋アミノ酸、Mean±S.E. (n=3)、* P<0.05、** P<0.01 (vs. non-treatment, Student's t-test)

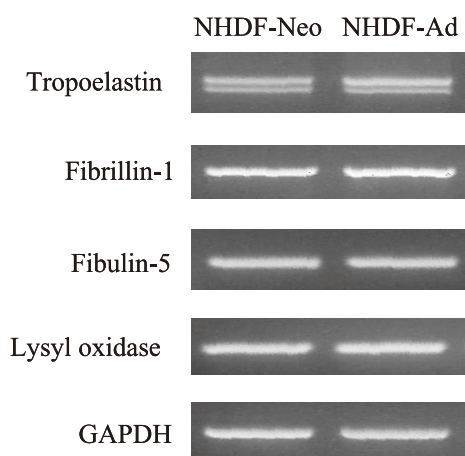


図3 NHDF-Neo と NHDF-Ad におけるエラスチン関連遺伝子発現

した HTE が、培養上背中でどの程度分解されるかを検討するため、HTE 添加後、経時的に培養上清を回収し、添加した HTE のみを検出するため、抗 His-G 抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析した。NHDF-Neo では培養時間による分解はみられませんでした、NHDF-Ad では HTE 添加後 48 時間で☆トロポエラスチンの顕著な低下が認められた。そして、この低下はプロテアーゼ阻害剤の存在下で認められなかった(図4)。

3・4 NHDF-Neo の 3 次元培養におけるエラスチン繊維形成

3 次元培養における皮膚繊維芽細胞のエラスチン繊維形成について、2 次元培養でエラスチン繊維形成できる NHDF-Neo を用いて検討した。2 次元培養と同様に 3 次元培養の NHDF-Neo に HTE を添加後、切片をエラスチカ・ワンギーソン染色した。その結果、HTE (20µg/ml) および TGF-β (10ng/ml) の添加に関わらず、エラスチン繊維は確認できなかった(図5)。

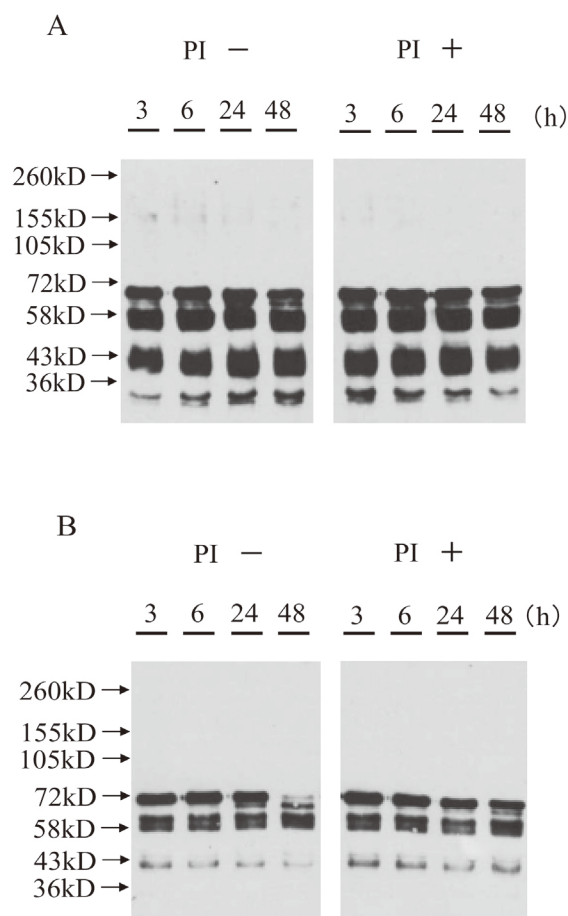


図4 NHDF-Neo (A) と NHDF-Ad (B) におけるトロポエラスチンの分解
PI: プロテアーゼインヒビター

3・5 NHDF-Neo の3次元培養におけるエラスチン関連タンパク質の遺伝子発現

3次元培養でのエラスチン繊維形成が確認できない原因を検討するため、2次元培養と3次元培養におけるエラスチン関連タンパク質の mRNA 発現について比較した。その結果、3次元培養は、2次元培養と比較して各 mRNA 発現の低下が認められた（図6）。

3・6 NHDF-Neo の3次元培養におけるトロポエラスチンの細胞活性作用

さらに、3次元培養の NHDF-Neo に対するトロポエラスチンの役割を検討するため、コラーゲンゲル収縮を指標とした細胞活性を測定した。コラーゲンゲルの中に HTE が存在することでゲルの収縮が増強することが認められた（図7）。

4. 考 察

弾性繊維は、皮膚や肺、動脈、靱帯などの軟部組織において、弾性の保持に大きく寄与しており、この組織の破綻は、様々な障害や病変を引き起こすことが知られている。弾性繊維は、複数の成分が集合、結合している“機能複合体”であり、その“コア”となる成分のエラスチンとエラスチンとのネットワークを形成する微細繊維（マイクロフィブリル繊維；フィブリリンや microfibril-associated glycoprotein、フィブリンなどから成る）から構成されている。近年、エラスチンノックアウトマウスにおいて大動脈では内皮傷害が引き起こされることがなく内膜肥厚が起これ、生まれて間もなく死亡することが報告された⁶⁾。このことより、エラスチンが生命の維持にとって必須のタンパク質であることが証明された。また先天性のエラスチン遺

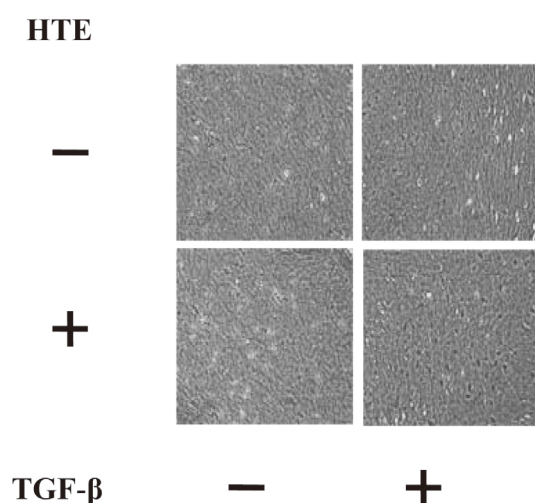
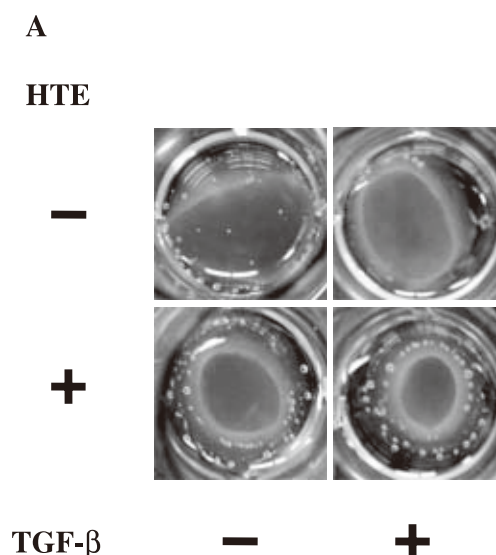


図5 3次元培養のエラスチカ・ワンギーソン染色



TGF-β

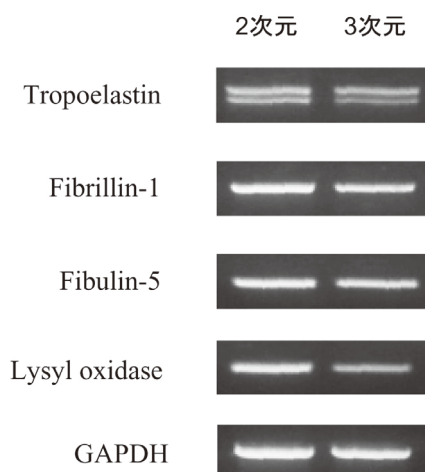


図6 NHDF-Neo の2次元培養と3次元培養におけるエラスチン関連遺伝子発現

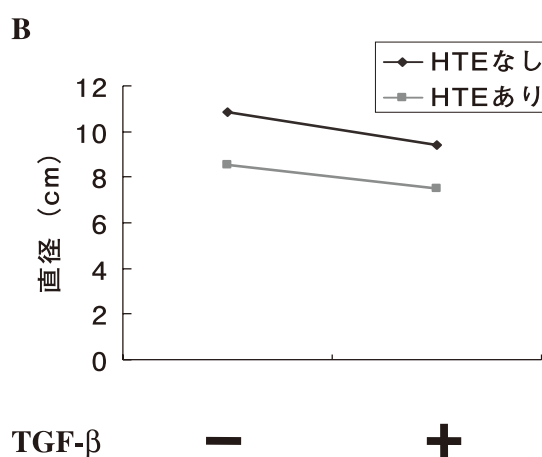


図7 コラーゲンゲル収縮における HTE の影響。

A：写真観察 B：収縮したゲルの直径

伝子異常疾患として大動脈弁上狭窄症 (SVAS)⁷⁾ や皮膚弛緩症 (Cutis laxa)⁸⁾ が知られており、SVAS ではエラスチン繊維の断片化を伴う動脈平滑筋細胞の異常増殖により冠動脈の狭窄が起こり、さらに Cutis laxa でもエラスチン繊維の断片化が原因となり皮膚の過伸展が引き起こされることが報告されている。これらの報告からエラスチン繊維形成不全が血管や皮膚における疾患の重要な病因を担っていると思われる。

筆者らは、2次元培養において、内因性のトロポエラスチンを発現していないヒト網膜色素上皮由来細胞に、外因性のトロポエラスチンを添加しエラスチン繊維を再構築する新たなエラスチン繊維構築モデルを確立した。本研究においても、HTE を NHDF-Neo および NHDF-Ad に添加することで、成熟エラスチンの指標である架橋アミノ酸の増加からもエラスチン繊維の再構築が確認できた。しかしながら、NHDF-Ad におけるエラスチン繊維構築量は著しく、この要因として、加齢に伴いトロポエラスチン分解酵素の関与が示唆された。皮膚繊維芽細胞をコラーゲンゲル内培養したものは真皮モデルとして用いられているが、そこにエラスチン繊維は存在していないため、より生体に近い状態でのエラスチンに関する検討が困難となっている。そこで、2次元培養でエラスチン繊維形成することができた NHDF-neo を用いて3次元培養でのエラスチン繊維形成を検討した。しかしながら、HTE の添加および未添加に関わらず、エラスチン繊維を確認することが出来なかった。この要因として、3次元培養では Elastin 関連タンパク質の mRNA 発現の低下によりタンパク質量が減少し、足場タンパク質の成熟が不十分であった可能性が示唆された。一方、NHDF-neo の細胞活性に対する HTE の影響を、3次元培養ゲル収縮を指標として検討した結果、ゲル内に HTE を加えることによりゲル収縮は増強された。このことから、HTE は細胞活性作用を有し、コラーゲンゲル内に存在することで、より生体に近い状態となる可能性が示唆された。

以上のことから、足場タンパク質の改良と HTE の分解を抑制することで、ヒト皮膚への HTE の処理が、機能的なエラスチン繊維の再構築を導く可能性が示唆された。本研究は、加齢に伴う皮膚のエラスチン繊維形成の解明だけ

でなく、HTE の生体応用とより生体に近いエラスチン繊維を含む3次元皮膚モデルの確立に大きく寄与するものと考ええる。

(引用文献)

- 1) Wachi, H., Sato, F., Murata, H., Nakazawa, J., Starcher, B. C. and Seyama, Y. (2005) Development of a new in vitro model of elastic fiber assembly in human pigmented epithelial cells, *Clin Biochem*, **38**, 643-653.
- 2) Kozel, B. A., Wachi, H., Davis, E. C. and Mecham, R. P. (2003) Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo, *J Biol Chem*, **278**, 18491-18498.
- 3) Robb, B. W., Wachi, H., Schaub, T., Mecham, R. P. and Davis, E. C. (1999) Characterization of an in vitro model of elastic fiber assembly, *Mol Biol Cell*, **10**, 3595-3605.
- 4) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- 5) Starcher, B. C. and Mecham, R. P. (1981) Desmosine radioimmunoassay as a means of studying elastogenesis in cell culture, *Connect Tissue Res*, **8**, 255-258.
- 6) Li, D. Y., Brooke, B., Davis, E. C., Mecham, R. P., Sorensen, L. K., Boak, B. B., Eichwald, E. and Keating, M. T. (1998) Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis, *Nature*, **393**, 276-280.
- 7) Urban, Z., Zhang, J., Davis, E. C., Maeda, G. K., Kumar, A., Stalker, H., Belmont, J. W., Boyd, C. D. and Wallace, M. R. (2001) Supravalvular aortic stenosis: genetic and molecular dissection of a complex mutation in the elastin gene, *Hum Genet*, **109**, 512-520.
- 8) de Schepper, S., Loeys, B., de Paepe, A., Lambert, J. and Naeyaert, J. M. (2003) Cutis laxa of the autosomal recessive type in a consanguineous family, *Eur J Dermatol*, **13**, 529-533.