

皮膚老化における11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1の役割

大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学講座

寺尾 美香

Glucocorticoids (GCs) are one of the most effective anti-inflammatory drugs to treat acute and chronic inflammatory diseases. However several studies show that GCs alter collagen metabolism in the skin and induce skin atrophy. Cortisol is the endogenous GC that is released in response to various stressors. Over the last decade, extraadrenal cortisol production in various tissues is reported. Skin is also known to synthesize cortisol though *de novo* pathway and through activating enzyme. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1) is the enzyme that catalyzes the conversion of hormonally inactive cortisone into active cortisol in cells. We previously found that 11 β -HSD1 is negatively regulating proliferation of keratinocytes. To know the function of 11 β -HSD1 in dermal fibroblast and collagen metabolism, the effect of selective 11 β -HSD1 inhibitor was studied in mouse tissues and dermal fibroblasts. The expression of 11 β -HSD1 increased with age in mouse skin. Subcutaneous injection of selective 11 β -HSD1 inhibitor increased dermal thickness, and collagen content of the mouse skin. Proliferation of dermal fibroblasts significantly enhanced in cells derived from 11 β -HSD1 knockout mice compared with cells derived from wildtype mice. Taken together, these data suggest that 11 β -HSD1 is involved in collagen metabolism in the skin possibly by decreasing the proliferation of dermal fibroblasts. Our findings suggest that 11 β -HSD1 inhibition may reverse the decreased collagen content observed in intrinsically and extrinsically aged skin and in skin atrophy that is induced by GC treatment.

1. 緒 言

コルチゾールは身体的・精神的ストレス時に副腎から産生され、代謝・血圧・血糖をコントロールする生体に必須のホルモンである。血中のコルチゾール濃度は組織中の濃度を反映すると考えられているが、局所コルチゾール修飾酵素の発見より必ずしも組織中の濃度が血中の濃度と反映しないことが明らかにされつつある。近年、我々のグループと他グループより表皮ケラチノサイトもコルチゾールの再活性化酵素と*de novo*合成酵素をもつことが報告された¹⁻⁴⁾。

局所コルチゾール修飾酵素の一つである11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) は細胞内でコルチゾールを再活性化する酵素(図1)であり、2001年に脂肪細胞に特異的な発現上昇がメタボリック症候群を引き起こすと報告されて以降、肥満・高血圧やメタボリック症候群の原因の一つとして研究が進んでいる酵素である⁵⁾。特に、肥満の予防薬・高血圧の治療薬といった観点より、現在・多施設において、11 β -HSD1阻害薬の開発がなされている。また、2010年に高齢マウスにおける11 β -HSD1発現の上昇が骨粗鬆症にも関与することが報告されており、緑内障の発症病態に関わるという報告もある⁶⁾。肥満や骨粗鬆症、緑内障はその発症の原因の一つとしてコルチゾールが良く知られ

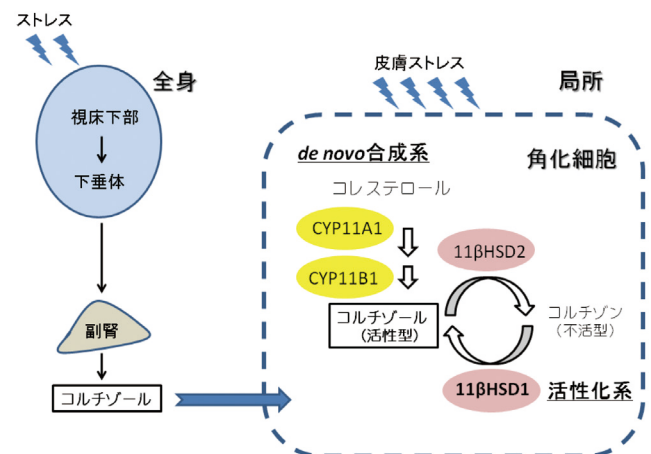


図1 局所コルチゾール制御機構

ており、組織中の11 β -HSD1の上昇が発症に関与することは興味深く、皮膚などの他臓器で同様の現象がおきていることを推測させる。

皮膚老化には内因性の老化(生理的老化)と外因性の老化があり、内因性の老化は遺伝的変異、外因性の老化は紫外線、喫煙、アルコール摂取などの影響を受ける⁷⁾。生理的老化により、肉眼的には、皺、たるみ、乾燥などが認められ、表皮-真皮の接合力が弱くなり、軽微な外傷や摩擦で両者が分離し容易に水疱やびらんが形成される。機能的には創傷治癒の遅延、刺激に対する炎症応答の減弱、易感染性などがみられる。病理組織学的には、表皮突起の短縮がおき、表皮-真皮の境界が扁平化する。また、真皮線維芽細胞の数が減少し、基質を形成するグリコサミノグリカンも減少する⁸⁾。高齢者の真皮線維芽細胞は若年者に比べてコラーゲン産生量が低いことも報告されている^{9, 10)}。



The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skin aging

Mika Terao

Department of Dermatology Osaka University Graduate School of Medicine

我々はこれらの生理的老化に伴う変化がグルココルチコイド過剰に伴う皮膚変化と類似することに注目した。

グルココルチコイド剤は強力な抗炎症作用のために、内服薬としても外用薬としても頻用される薬剤である。しかし、短期的にはグルココルチコイドの増加は組織の生存に働くが、ストレスに伴う慢性的な内因性のコルチゾール増加や外因性のグルココルチコイドは、糖尿病や高脂血症、白内障、骨粗鬆症を引き起こすことが知られている。また、長期間のグルココルチコイド剤の内服や外用の副作用の一つとして、皮膚の萎縮、脆弱化、易感染性、創傷治癒の遅延が引き起される。皮膚の萎縮は主にコラーゲン合成とグリコサミノグリカン合成の低下によるものであり¹¹⁾、ヒトの皮膚において、グルココルチコイドの全身投与や外用はタイプ1コラーゲンとタイプ3コラーゲン合成を低下させることが報告されている¹²⁾。このように、長期間のグルココルチコイド過剰に伴う皮膚萎縮は病理組織学的、分子生物学的に生理的老化と共通するところが多い。

本研究では、マウス皮膚における11 β -HSD1発現が年齢とともに上昇することに着目し、皮膚老化における11 β -HSD1の役割を11 β -HSD1阻害薬及び、ノックアウトマウス、表皮角化細胞・真皮線維芽細胞を用いて検討した。

2. 実験

2.1 細胞培養

生後1日のマウスから採取した皮膚組織を4 mg/ml PBSで調整したDispase (GIBCO, Carlsbad, CA) に浸し、37度1時間インキュベートの後、真皮から表皮を剥離した。得られた真皮を0.05% collagenase内で37度の恒温槽に40分間浸して振揺させた後、70 μ m filterを用いてろ過し、10% FBS添加Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) を用いて培養した。

2.2 RNAの抽出と逆転写反応・リアルタイムPCR

ST Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI) を用いて、プロトコールに従いマウスから得た皮膚組織からmRNAを回収した。RT-MLV (invitrogen, Lincoln Center Drive Foster City, CA) を用いてmRNAの逆転写を行い、cDNAを得た。cDNAをtemplateとし、試薬Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) にてサンプルを調整した。ハウスキーピング遺伝子としてGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を用いた。

2.3 ウェスタンブロット

マウスから背部の皮膚組織を採取し、液体窒素を用いて皮膚組織を粉碎し、更に超音波処理を行ったのちに、Lysis Buffer 2ml (0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidetp40, 0.1%

sodium dodecyl sulphate, 100 μ g/ml phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, protease inhibitor cocktail) で皮膚組織のタンパク質を4度over nightで攪拌しながら溶解させた。遠心分離した後、上清の蛋白溶解液をサンプルとした。

調製したサンプルを10%のポリアクアミドゲルにて0.02Aで80分間電気泳動した。電気泳動後のゲルを用いて、PVDFメンブレンへの転写を0.15Aで45分間行った。転写後のメンブレンを3%スキムミルクにて60分間ブロッキング後、一次抗体を4度over nightで反応させた。メンブレンを3%スキムミルクで3回洗浄した後、HRP標識二次抗体anti-rabbit IgG, anti-rat IgG, anti-mouse IgGを60分間反応させた。TBS-Tで洗浄した後、Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Fisher Scientific Inc) を用いて発色した。

2.4 MTSアッセイ

96 well plateに皮膚線維芽細胞を1 wellあたり細胞数1 $\times$ 10³個ずつ10%FBS添加DMEMで培養した。培養した翌日を1日後とし、2日後、3日後、6日後にMTS試薬 (Promega, Madison, WI, USA) を1 wellあたり20 μ lずつ添加し、2時間インキュベートした後、吸光計 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて吸光度 (490nm) で測定した。

2.5 免疫組織学的染色

ヒト健常皮膚組織 (パラフィン包埋) を薄切し、キシレンで脱パラフィン、エタノールで脱水を行った。クエン酸バッファー (pH6.0) による熱処理 (oil bath 110度) で抗原賦活処理を10分間行ったのちに常温まで冷却、蒸留水で洗浄した後、DAKO Protein Block Serum Free (Dako, Carpinteria, CA) で室温15分blockingを行った。Antibody Diluent (Dako) で1次抗体rabbit anti-11 β -HSD1 (Abcam) およびmouse anti-keratin14 (Abcam) を100倍希釈し、4度で12時間反応させた。TBS-T (50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 0.1% v/v Tween-20) で5分間2回洗浄した後に二次抗体を反応させた。

3. 結果

3.1 皮膚における11 β -HSD1の発現

表皮角化細胞における11 β -HSD1発現を図2Aに示す。健常皮膚では11 β -HSD1は有棘細胞を中心に発現しており、基底層ではその発現はほとんどみられなかった¹³⁾。また、表皮角化細胞における11 β -HSD1発現はIL-1 β やTNF α などの炎症性サイトカイン、ハプテンや紫外線などの炎症刺激により誘導されることがわかった (図2)¹⁴⁾。

3.2 マウス皮膚における11 β -HSD1の発現

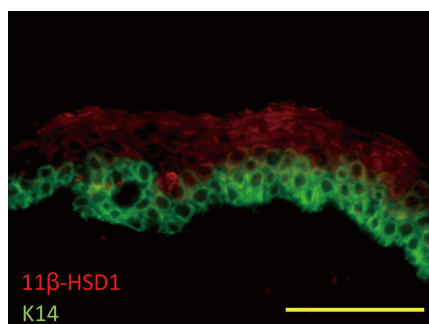
新生マウス、3週マウス、2ヶ月マウス、8ヶ月マウスの皮膚組織の11 β -HSD1発現をウエスタンブロットで検討したところ、成長とともにその発現の増加がみられた(図3A)。また、真皮線維芽細胞を単離し培養後RNAを抽出し、mRNAレベルでの11 β -HSD1発現を検討したところ、1年マウスより単離した真皮線維芽細胞では新生マウスより単離した真皮線維芽細胞に比べてその発現が有意に上昇し

ていた(図3B)。

3.3 11 β -HSD1阻害により表皮角化細胞および真皮線維芽細胞の増殖能が亢進した

マウスより表皮角化細胞、真皮線維芽細胞を単離し、増殖能をMTSアッセイで検討したところ、11 β -HSD1阻害により細胞増殖が有意に亢進することより、11 β -HSD1は細胞増殖を負に制御していると考えられる(図4)。

A



B

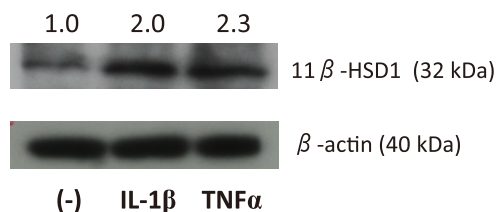
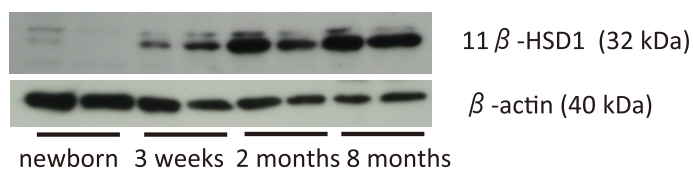


図2 ヒト健常皮膚における11 β -HSD1発現

A 免疫蛍光染色像。11 β -HSD1:赤、K14:緑
Bar=50 μ M

B 表角化細胞にIL-1 β 、TNF α 添加後の11 β -HSD1発現量(ウエスタンブロットティング)

A



B

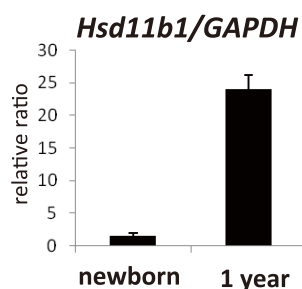


図3 マウス皮膚における11 β -HSD1発現

A 新生マウス、3週マウス、2ヶ月マウス、8ヶ月マウスの皮膚の11 β -HSD1発現量(ウエスタンブロットティング)

B 生後4日および1年マウス皮膚線維芽細胞における11 β -HSD1発現量(RT-PCR)

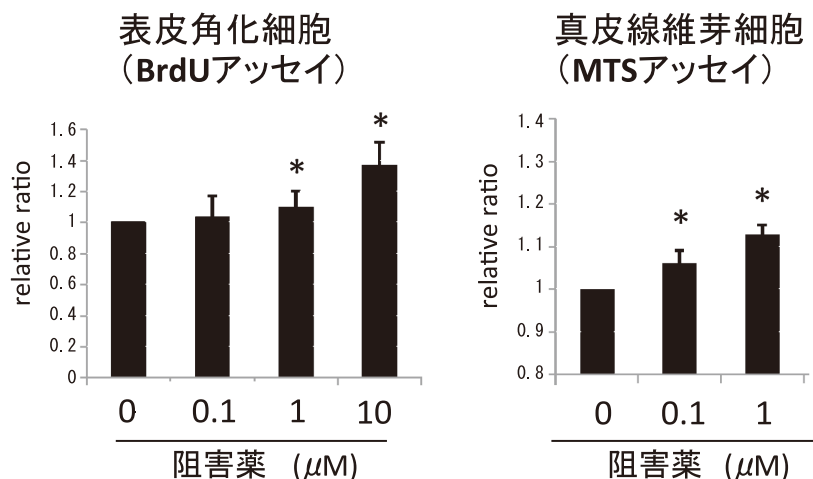


図4 11 β -HSD1阻害は表皮角化細胞、真皮線維芽細胞の増殖を促進した
11 β -HSD1阻害薬を投与72時間後にBrdUアッセイ(表皮角化細胞)、MTSアッセイ(真皮線維芽細胞)で細胞増殖能を測定した。

3.4 11 β -HSD1阻害は表皮過剰増殖を引き起こした

ヘアレスマウス(Hos : HR-1)に11 β -HSD1阻害薬(50 μ M)を5日間外用後の表皮を観察したところ、表皮の肥厚および、Ki-67陽性の増殖細胞の増加がみられた(図5)。この結果より、*in vivo*においても11 β -HSD1は表皮角化細胞の増殖を負に制御していることがわかる。

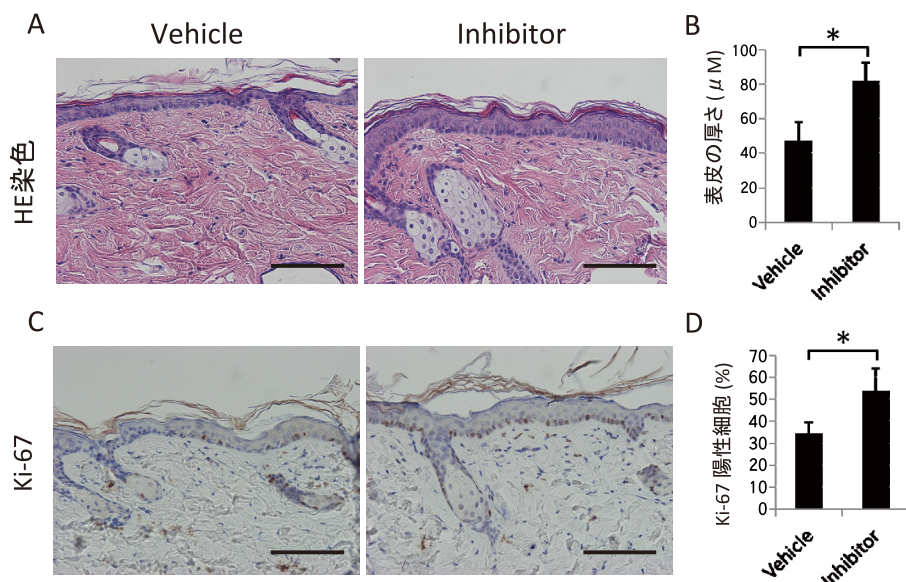


図5 11 β -HSD1阻害薬の外用は表皮を増殖させた

- A, C ヘアレスマウス(Hos : HR-1)に11 β -HSD1阻害薬(50 μ M)を5日間外用後のHE染色像(A)とKi-67免疫染色像(C) Bar=100 μ M
B 表皮の厚さ(N=5)
D Ki-67陽性細胞数(%) (N=5)

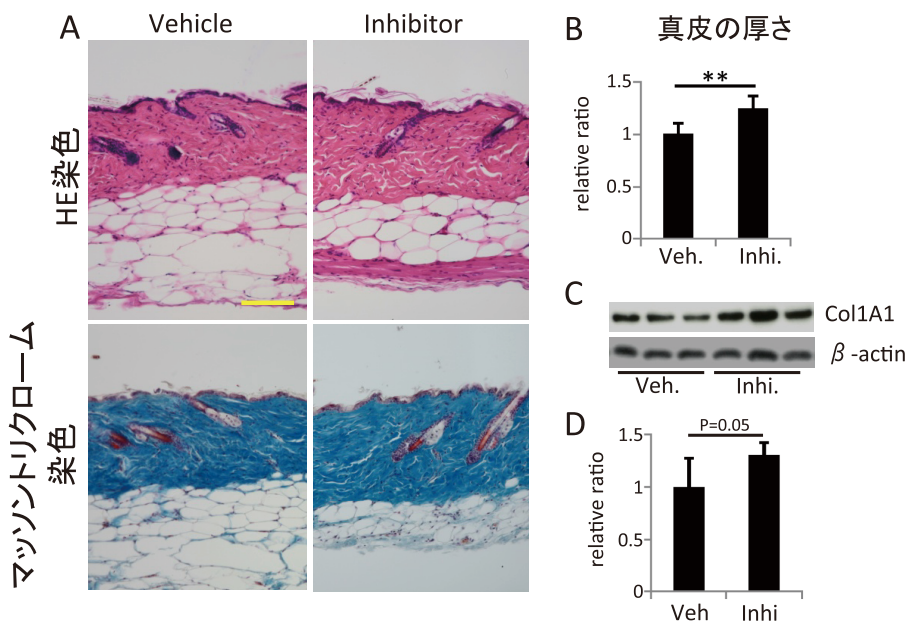


図6 11 β -HSD1阻害により真皮コラーゲンが増加した

- A 11 β -HSD1阻害薬(10 μ M)を21日間皮下投与後のHE像とマッソントリクローム染色像 Bar=100 μ M
B 真皮の厚み(N=6)
C, D コラーゲン1 α 1(Col1A1)の発現量(ウエスタンブロッティング)

果より、真皮のコラーゲン増生を 11 β -HSD1 は負に制御していることがわかる。

3.6 11 β -HSD1 阻害により創傷治癒が促進した

11 β -HSD1 阻害によるマウス皮膚の創傷治癒を検討した。C57BL/6 マウス背部に作成した 8 mm 大の創傷に 11 β -HSD1 ($10\mu\text{M}$) を 2 日毎に投与し、創傷面積を測定したところ、阻害薬投与群では有意に創傷治癒の促進がみられた (図 7)。

3.7 コルチゾールの濃度と炎症

グルココルチコイドは強い抗炎症作用を持つことより、様々な炎症疾患の治療に用いられているが、低濃度では、向炎症作用を持つことが報告されている。表皮角化細胞においても、低濃度コルチゾール (10^{-10}M) は IL-6 産生を誘導したが、高濃度コルチゾール (10^{-5}M) は抑制した (図 8)¹⁴⁾。

3.8 11 β -HSD1 による低濃度コルチゾールの誘導は炎症を正に制御した

培養表皮角化細胞の 11 β -HSD1 をノックダウンし、IL-1 β 、TNF α 誘導性の向炎症性サイトカインである IL-6、IL-8 を ELISA で測定したところ、11 β -HSD1 ノックダウン細胞では向炎症性サイトカイン産生が低下していた (図 9)¹⁴⁾。この結果より、11 β -HSD1 による低濃度コルチゾールの誘導は炎症を正に制御していることがわかる。

4. 考 察

本研究では、マウス皮膚における加齢に伴う 11 β -HSD1 増加が皮膚老化に及ぼす影響を 11 β -HSD1 ノックアウトマウスおよび 11 β -HSD1 阻害薬を用いて検討した。マウス皮膚ではヒトの非露光部皮膚と同様に、加齢とともに真皮のひ薄化がみられコラーゲンが疎となる。加齢とともに 11 β -HSD1 発現が上昇すること、加齢皮膚がコルチゾール

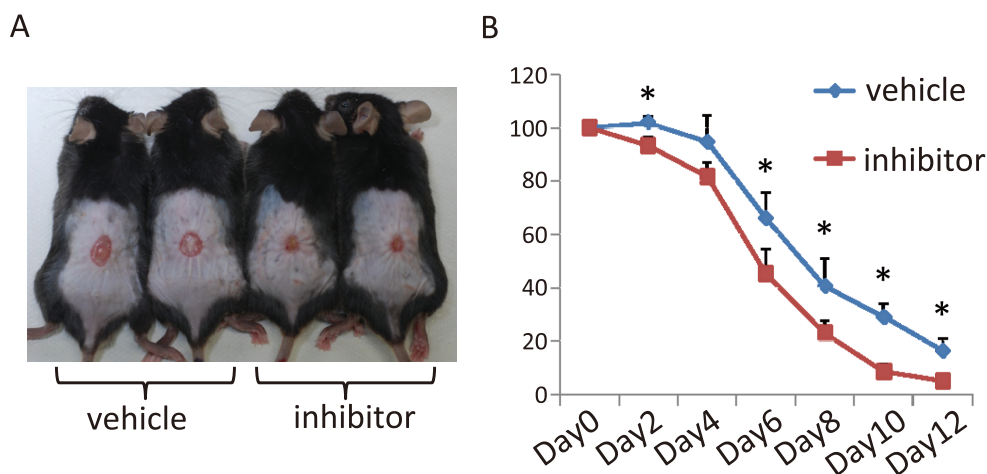


図 7 11 β -HSD1 阻害は皮膚創傷治癒を促進した
マウス皮膚に 8 mm 大の創傷を作成し、11 β -HSD1 阻害薬 ($10\mu\text{M}$) を 2 日毎に外用した。
A, B C57BL/6 マウス創傷作成後 10 日目の写真 (A) と創傷面積 (%) (B)。

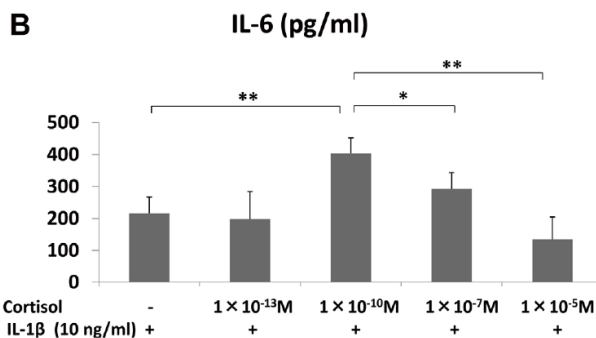


図 8 コルチゾール濃度と炎症
培養表皮角化細胞を様々な濃度のコルチゾールで培養し、IL-1 β 誘導性 IL-6 を ELISA で測定した。

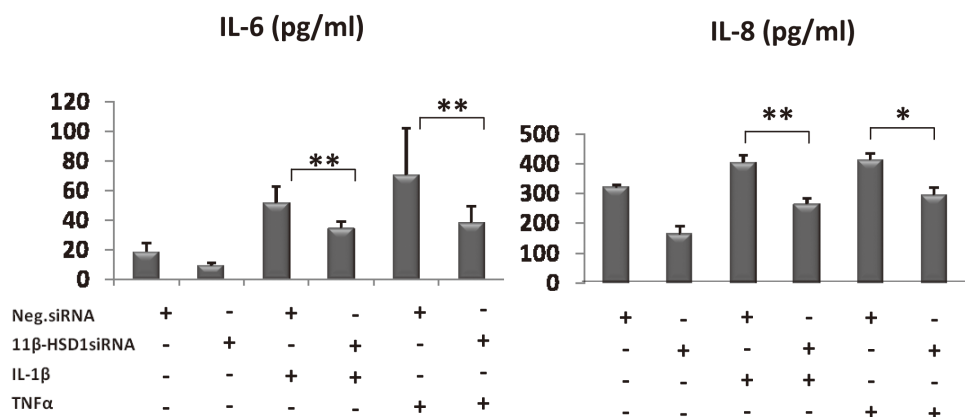


図9 11β-HSD1 阻害は炎症を抑制した
培養表皮角化細胞の11β-HSD1をsiRNAでノックダウンし、IL-1β、TNFα誘導性のIL-6、IL-8をELISAで測定した。11β-HSD1siRNA：11β-HSD1ノックダウン細胞、Neg.siRNA：コントロール細胞

投与に伴う副作用でみられる皮膚委縮と類似することより、11β-HSD1発現の上昇に伴う細胞内におけるコルチゾール濃度の上昇は、加齢でみられる真皮のひ薄化、コラーゲンの減少に影響を及ぼしているのではないかと考えさらに解析をすすめた。まず、真皮線維芽細胞の増殖に及ぼす11β-HSD1の影響をノックアウトマウス由来の真皮線維芽細胞で検討したところ、野生型マウス由来真皮線維芽細胞に比べて有意に上昇していたことより、11β-HSD1の発現上昇は真皮線維芽細胞の増殖に抑制的に働くことが示唆された。次に、11β-HSD1阻害薬を皮下投与したところ、真皮の厚みが増加し、コラーゲン1α1発現量が上昇したところより、11β-HSD1を阻害すると真皮のひ薄化、コラーゲンの減少が改善、すなわち、加齢に伴う変化を改善することがわかった。

このように加齢や肥満に伴う機能的変化に11β-HSD1が関与していることが考えられるが、加齢に伴う形態的变化における11β-HSD1の関与は定まった見解がない。最近、11β-HSD1ノックアウトマウスにおいて、加齢に伴う真皮コラーゲン量の減少が抑制されたと報告されたが¹⁵⁾、我々が作成した11β-HSD1ノックアウトマウスでは6ヶ月マウス皮膚、1年マウス皮膚においてそのような結果は得られなかった。

5. 総括

皮膚の生理的老化はグルココルチコイド過剰状態による皮膚変化と類似するために、細胞内コルチゾール再活性化酵素である11β-HSD1の皮膚老化における役割を解析した。

高齢者や肥満に伴う細胞増殖能の低下や創傷治癒の遅延には11β-HSD1に伴う局所コルチゾールの上昇が関与していると考えられ、高齢者にみられる難治性の潰瘍に

11β-HSD1阻害が有効ではないかと期待される。さらに、最近の我々の結果より、11β-HSD1は皮膚の炎症応答にも重要な役割を果たしていることがわかり、加齢に伴う炎症の増幅に関与している可能性が示唆される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、コスメトロジー研究振興財団より研究助成を頂きましたことを深謝致します。

(引用文献)

- 1) Terao M, Murota H, Kimura A, et al. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair. PLoS One 2011; 6: e25039.
- 2) Tiganeacu A, Walker E A, Hardy R S, Mayes A E, Stewart P M. Localization, age- and site-dependent expression, and regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skin. J Invest Dermatol 2011; 131: 30-36.
- 3) Cirillo N, Prime S S. Keratinocytes synthesize and activate cortisol: first characterisation of a novel epidermal glucocorticoid system. J Cell Biochem 2011.
- 4) Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, et al. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. J Biol Chem 2011; 286: 10265-10275.
- 5) Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. Science 2001; 294: 2166-2170.
- 6) Weinstein R S, Wan C, Liu Q, et al. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis,

- vascularity, hydration, and strength in aged mice. In: *Aging Cell*, 2010; 147-161.
- 7) Uitto J. Understanding premature skin aging. *N Engl J Med* 1997; 337: 1463-1465.
- 8) Naylor E C, Watson R E, Sherratt M J. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 2011; 69: 249-256.
- 9) Fisher G J, Quan T, Purohit T, et al. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am J Pathol* 2009; 174: 101-114.
- 10) Varani J, Dame M K, Rittie L, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol* 2006; 168: 1861-1868.
- 11) Haapasaari K M, Risteli J, Koivukangas V, Oikarinen A. Comparison of the effect of hydrocortisone, hydrocortisone-17-butyrate and betamethasone on collagen synthesis in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 1995; 75: 269-271.
- 12) Oikarinen A, Haapasaari K M, Sutinen M, Tasanen K. The molecular basis of glucocorticoid-induced skin atrophy: topical glucocorticoid apparently decreases both collagen synthesis and the corresponding collagen mRNA level in human skin in vivo. *Br J Dermatol* 1998; 139: 1106-1110.
- 13) Terao M, Itoi S, Murota H, Katayama I. Expression profiles of cortisol-inactivating enzyme, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2, in human epidermal tumors and its role in keratinocyte proliferation. *Exp Dermatol* 2013; 22: 98-101.
- 14) Itoi S, Terao M, Murota H, Katayama I. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 contributes to the pro-inflammatory response of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440: 265-270.
- 15) Tiganescu A, Tahrani A A, Morgan S A, et al. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase blockade prevents age-induced skin structure and function defects. *J Clin Invest* 2013; 123: 3051-3060.