

小型魚類を活用した皮膚老化機構の解明と抗老化因子の探索

大阪大学微生物病研究所

石谷 太

In this study, we used small fish to elucidate the mechanism of skin aging and to explore for anti-aging factors. Animal tissues, including skin, are constantly exposed to external disturbances such as environmental changes and ultraviolet light, as well as internal disturbances such as replication errors and mutations, resulting in the frequent generation of a variety of pathological cells. However, it is poorly understood how animal tissues respond to the appearance of pathological cells. Therefore, to investigate this, we used zebrafish and mice as models. As a result, we found an immune cell-independent mechanism for eliminating pathological cells. Specifically, we showed that neighboring normal cells sense the appearance of pathological cells using intercellular tension and induce cell death, and that the elimination mechanism is conserved across species. In addition, we also explored the systemic mechanisms of skin aging. In previous skin aging studies, the slow aging rate of mice, a representative experimental model, has been a bottleneck. Therefore, in this study, we used the ultra-short-lived small fish *Nothobranchius furzeri*, which ages the fastest among all vertebrates that can be kept in captivity. We revealed that signals from germ cells suppress the synthesis of activated vitamin D in the liver in males, that this control promotes skin aging, and that administration of activated vitamin D can suppress skin aging. Thus, our research using small fish revealed new mechanisms for maintaining tissue homeostasis and skin aging.

1. 緒言

皮膚を若く保つことは、ヒトの健康増進のみならず豊かでアクティブな社会の実現に重要である。そのためには、皮膚の老化機構の解明と抗老化因子の同定は必須である。一方で、in vivoにおける老化機構と老化制御因子を解明するためには「動物を使った実験」が重要であるが、昨今、動物愛護の考え方からマウスなどの哺乳類モデルを使った研究が徐々に困難になってきている。そこで本研究では、新たな in vivo 皮膚老化研究のモデルとして小型魚類であるゼブラフィッシュとターコイズキリフィッシュ（本報告書ではキリフィッシュと略、学名 *Nothobranchius furzeri*）を提案する。これらの新たなモデルを用いた独自のアプローチにより、ヒトの皮膚のアンチエイジングにつながる脊椎動物共通の皮膚老化機構と抗老化因子を明らかにし、コスメトロジーの発展に寄与したい。

2. 方法

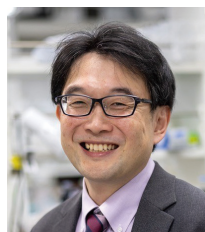
2.1. ゼブラフィッシュをモデルとした皮膚老化機構の解明

我々は最近、イメージングに適したモデル脊椎動物を用いた解析により、健康な皮膚組織において病的な細胞が出

現すると、隣接する正常細胞集団がその出現を感知して組織から排除することと、老化細胞が蓄積した皮膚組織ではこの排除機構が破綻することを発見した¹⁾。そこで本研究では、この病的細胞排除機構とその破綻を理解することで皮膚老化機構に迫る。

2.2. キリフィッシュをモデルとした皮膚老化機構の解明

in vivoの皮膚組織の老化機構を理解するためには、加齢（自然老化）に伴う皮膚組織の機能低下とそれを制御するメカニズムを理解する必要がある。しなしながら、代表的なモデル動物であるマウスはその老化に2～3年の時間を要するため、結果、老化機構の研究に膨大な時間が必要となっている。そこで本研究では、研究室で飼育可能な脊椎動物の中で最短の寿命を持つキリフィッシュに注目する。キリフィッシュは、アフリカの半乾燥地帯に生息する魚であり、卵から孵化して数週間で一気に成体になり、その後3ヶ月程度で急速に老化し、死に至る。このため、短期間で皮膚老化機構を解析できる。また、皮膚の老化を理解するためには血液や他の臓器との連関を無視することはできないが、キリフィッシュは脊椎動物であるため、ヒトとほぼ同様の細胞・臓器を備えており、皮膚老化における臓器間連関も解析可能である。我々は2017年よりキリフィッシュの大規模飼育系・解析系を立ち上げ、独自の老化評価系・ゲノム編集系の構築に成功している²⁾。そこで本研究では、このキリフィッシュの特長を活かした皮膚老化機構の解明と抗老化因子の探索を行う。



Exploring skin aging mechanisms and anti-aging factors using small fish

Tohru Ishitani

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

3. 結果

3. 1. ゼブラフィッシュをモデルとした皮膚老化機構の解明

3. 1. 1. Foxo3を介した細胞競合が病的細胞を排除する

皮膚を含む動物組織は、環境変動や紫外線などの外的攪乱や複製エラーや突然変異などの内的攪乱に常にさらされており、その結果、細胞の分化や増殖を制御するシグナルが破綻した細胞や、代謝が異常な細胞、細胞内小器官に異常が生じた細胞、染色体やDNAに異常が生じた細胞など様々な異常を持つ細胞が頻繁に生じてしまう。組織は、こうした多様な病的細胞に対してどのように対処するのだろうか？ 近年、細胞競合と呼ばれる細胞間コミュニケーションを介した病的細胞の感知・排除機構が注目されている。現在までに、Wntシグナル破綻やShhシグナル破綻、発がんシグナル活性化、リボソーム異常、多能性低下、ミトコンドリア異常を持つ細胞が隣接正常細胞によって感知・排除されることがわかっている。しかしながら、このように多様な異常に対して共通のメカニズムが働いているかはよくわかっていなかった。そこで我々は、トランスクリプトーム解析およびin situ hybridization解析を行い、排除される異常細胞において共通して発現誘導される遺伝子を探した。その結果、ゼブラフィッシュに生じたWntシグナル破綻細胞やShhシグナル破綻細胞、発がんシグナル活性化細胞、リボソーム異常細胞、マウスに生じた多能性低下、ミトコンドリア異常細胞のいずれにおいてもFoxo3遺伝子の発現が上昇することを見出した。重要なことに、Foxo3の発現上昇はこれらの病的細胞が正常細胞に囲まれた時だけに起きた。すなわち、正常細胞とのコミュニケーションの結果としてFoxo3が発現上昇することがわかった。さらに、少なくともWntシグナル破綻細胞とShh

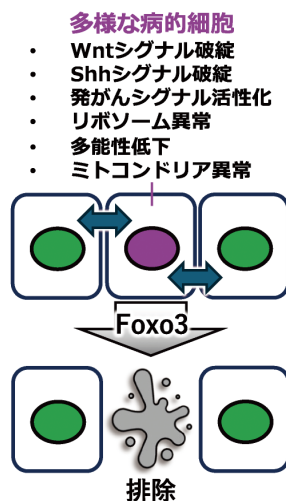


図1 Foxo3を介した細胞競合が病的細胞を排除する

シグナル破綻細胞の排除にFoxo3の発現上昇と活性化が必須であることもわかった。このように、Foxo3が魚類のみならず哺乳類でも働く細胞競合の普遍的制御因子であることがわかった(図1)³⁾。

3. 1. 2. 病的細胞は張力を介して隣接正常細胞に感知される

続いて、隣接正常細胞が病的細胞を感知し、排除する仕組みを詳細に調べた。正常な組織構成細胞は細胞膜に局在する細胞接着因子カドヘリンを使って互いに結合しており、また、各細胞内ではカドヘリンの細胞内ドメインにアクチン-ミオシン系が連結されており、結果として細胞同士が違いを引っ張り合っている。つまり、同種の細胞が存在する組織では、細胞間の引っ張り合う力(張力)はある程度釣り合っている状態となっている(図2上段)。そこで我々はこの細胞間張力に注目し、ゼブラフィッシュをモデルとした細胞イメージング解析を行ったところ、細胞間張力が病的細胞の感知に利用されていることを見出した³⁾。具体的には、正常な細胞集団に病的細胞が出現すると、病的細胞において細胞接着分子カドヘリンの細胞膜局在が変化した結果としてカドヘリンに関連するアクチン-ミオシン系の活性が変化し、隣接細胞との細胞間張力が変動すること、そして、この張力変動が隣接細胞のメカノセンシティブカルシウムチャネルPIEZOを活性化し、隣接細胞内へのCa²⁺イオンの流入を誘導して分泌タンパク質アネキシンA1(Anxa1)の発現を誘導し、分泌されたAnxa1が病的細胞内の転写因子Smadを活性化し、活性化したSmadが活性酸素の生成と細胞死抑制因子Bcl2の分解を引き起こすことで病的細胞に細胞死を誘導することを見出した(図2)³⁾。

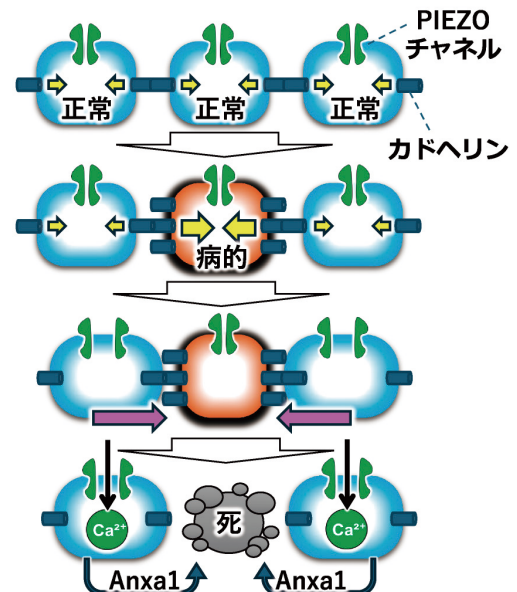


図2 病的細胞は張力を介して感知される

3. 2. キリフィッシュをモデルとした皮膚老化機構の解明

3. 2. 1. 老化により傷の治りがおかしくなるメカニズムの解析

傷の修復能力が加齢とともに低下するのはよく知られている。しかし、そのメカニズムはよくわかっていない。そこで、短期間で加齢変化を解析できるキリフィッシュをモデルとした。まず、若齢のキリフィッシュの尾ヒレを切断すると傷が修復され2週間ほどで元の形に戻るが、老齢になると2週間経っても完全には傷が治らないことを確認した(図3)。続いて、創傷治癒を制御するWntシグナルに注目してその動態を解析した。その結果、若齢では創傷後2日後にWntシグナルが強く活性化するが、老齢になるとWntシグナルの活性化が起きにくくなるだけでなく、誤った場所でWntシグナルが活性化し(図4)、結果として、切断前の形に再生しにくくなることがわかった⁵⁾。つまり、老化により傷の治りがおかしくなるメカニズムの一端を明らかにできた。

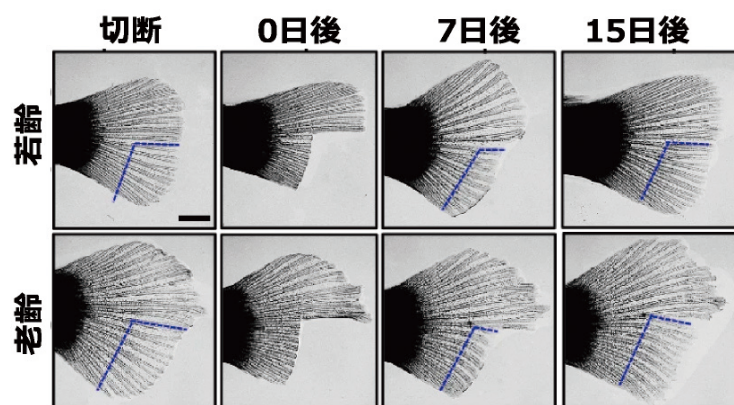


図3 加齢すると尾ヒレの創傷治癒能力が落ちる

3. 2. 2. 生殖細胞とビタミンDによる皮膚の老化制御

線虫などの無脊椎動物において生殖細胞を除去すると寿命が延伸することが知られているが、脊椎動物の寿命・健康寿命と生殖細胞の関係は不明である。そこで、これを検討するために、キリフィッシュをモデルとして使った。まず、キリフィッシュのオスにおいて生殖細胞を除去したところ、寿命が13%延伸した。また、加齢に伴って減少する皮膚のコラーゲン層が、老齢になっても分厚い状態で維持された(図5)。つまり、生殖細胞が寿命・健康寿命を負に制御することがわかった⁶⁾。続いて、メカニズムを解析したところ、生殖細胞除去により肝臓における活性化ビタ

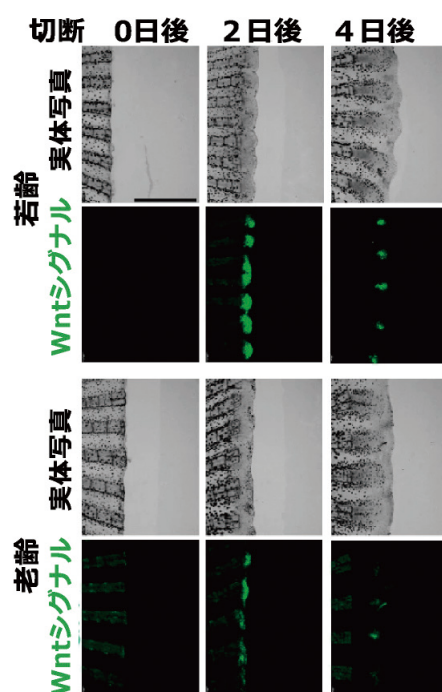


図4 加齢すると創傷治癒時のWntシグナル活性が低下する

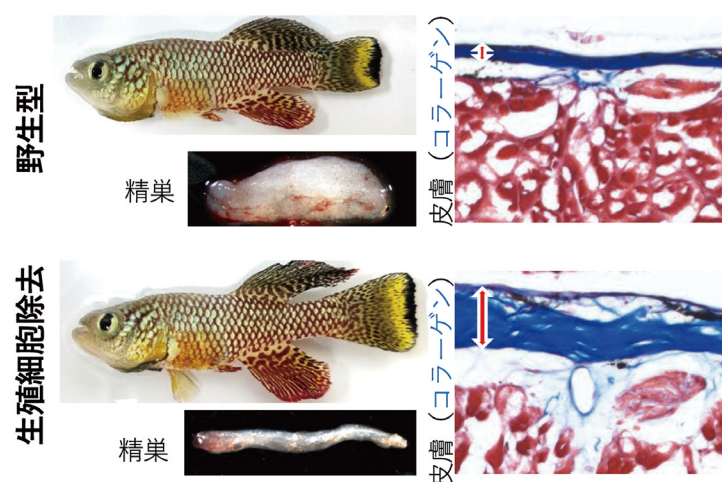
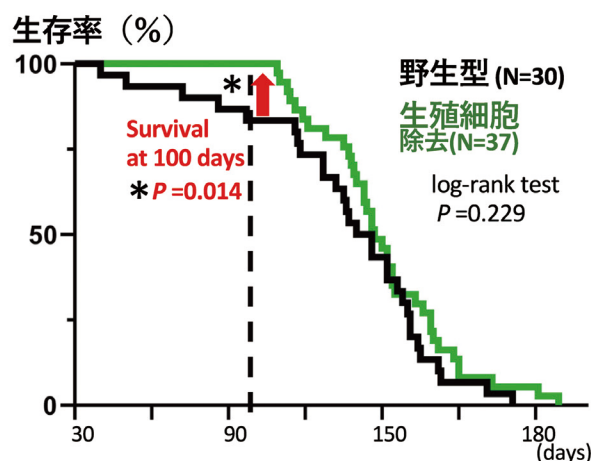


図5 生殖細胞を除去すると皮膚の老化が抑制されるだけでなく、寿命も延伸する



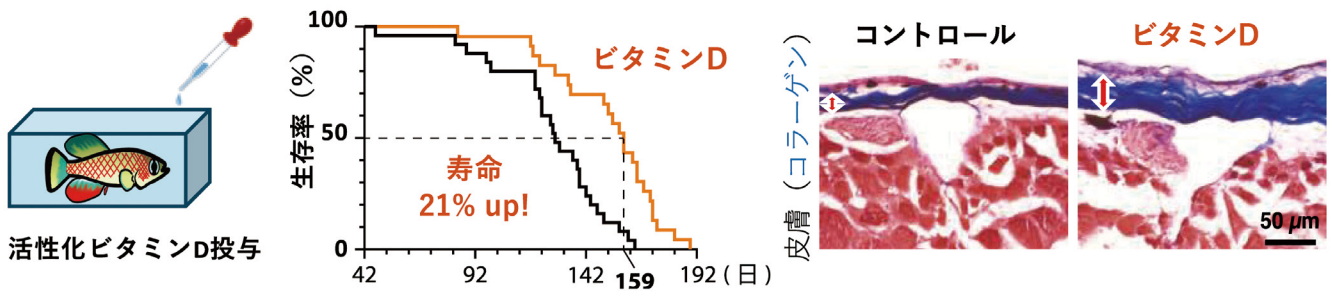


図6 活性化ビタミンDを投与すると、皮膚の老化が延命し、皮膚の老化も抑制される

ミンDの合成と、皮膚を含む多様な臓器でのビタミンDシグナルの標的遺伝子の発現増加が起きること、ビタミンDをキリフィッシュに投与すると寿命が延伸するのみならず、皮膚のコラーゲン層が老齢になっても若い状態で維持されることを発見した(図6)。すなわち、生殖細胞が肝臓での活性化ビタミンD合成を抑制しており、生殖細胞を除去するとビタミンDの合成が活性化して皮膚を含む組織の老化が抑制されることがわかった⁶⁾。

4. 考 察

ゼブラフィッシュを用いた解析により、皮膚の恒常性維持の理解にも寄与する「病的細胞排除機構」の一端を明らかにすることができた。また、病的細胞排除機構を破綻させる環境ストレスを複数同定しており(未発表)、今後はストレスによって排除機構が破綻するメカニズムとその疾患・老化との関連も明らかにしていきたい。また、キリフィッシュ解析により、生殖細胞からの信号が皮膚を含む全身の老化を促進すること、ビタミンDが脊椎動物の皮膚の老化を防ぎ健康寿命を延伸させることができる抗老化物質であることを突き止めることもできた。ヒトにおいても、生殖組織を除去した男性の寿命が長いことや⁷⁾、百寿者においてビタミンD受容体遺伝子に多型が検出されることが知られており⁸⁾、この制御がヒトまで保存されている可能性も期待できる。

5. 総 括

本研究により、魚を起点として皮膚の老化機構・抗老化物質を明らかにしつつある。今後は、これらがヒトでも同様に機能する機構・物質であるか、についても検証を行っていききたい。緒言で言及したように、動物愛護の考えから動物実験代替法の導入が叫ばれており、マウスなどの哺乳類モデルを使った研究が徐々に困難になってきている。本研究を継続発展させ「魚を使ってヒトの皮膚老化予防の技術シーズを創出する」ことで「魚モデルの皮膚疾患・老化研究、化粧品開発研究における有効性」をアピールし、これにより、この課題を打破し、コスメトロジー発展に寄与したい。

(引用文献)

- 1) Haraoka Y, Akieda Y, Nagai Y, Mogi C, Ishitani T. Zebrafish imaging reveals TP53 mutation switching oncogene-induced senescence from suppressor to driver in primary tumorigenesis. *Nat Commun.* 13: 1417, 2022
- 2) Oginuma M, Nishida M, Ohmura-Adachi T, Abe K, Ogamino S, Mogi C, Matsui H, Ishitani T. Rapid reverse genetics systems for *Nothobranchius furzeri*, a suitable model organism to study vertebrate aging. *Sci Rep.* 12 (1): 11628, 2022
- 3) Matsumoto K, Akieda Y, Haraoka Y, Hirono N, Sasaki H, Ishitani T. Foxo3-mediated physiological cell competition ensures robust tissue patterning throughout vertebrate development *Nat Commun.* 15: 10662, 2024
- 4) Aoki K, Higuchi T, Akieda Y, Matsubara K, Ohkawa Y, Ishitani T. Mechano-gradients drive morphogen-noise correction to ensure robust patterning. *Science Adv* 10 (46), 2024
- 5) Ogamino S, Yamamichi M, Sato K, Ishitani T. Dynamics of Wnt/ β -catenin reporter activity throughout whole life in a naturally short-lived vertebrate. *npj Aging* 10: 23, 2024
- 6) Abe K, Ino H, Niwa T, Semmy D, Takaochi A, Nishimura T, Mogi C, Uenaka M, Ishii M, Tanaka K, Ohkawa Y, Ishitani T. Sex-dependent regulation of vertebrate somatic growth and aging by germ cells. *Science Adv* 10 (24), 2024
- 7) Min KJ, Lee CK, Park HN. The lifespan of Korean eunuchs. *Curr Biol* 22 (18): R792-3, 2012
- 8) Gussago C, Arosio B, Guerini FR, Ferri E, Costa AS, Casati M, Bollini EM, Ronchetti F, Colombo E, Bernardelli G, Clerici M, Mari D. Impact of vitamin D receptor polymorphisms in centenarians. *Endocrine* 53 (2): 558-64, 2016