

表皮細胞老化において細胞膜リン脂質の果たす役割の解明

東京理科大学創域理工学部

中村 由和

Aging research has increasingly focused on molecular mechanisms, with the 2023 "Hallmarks of Aging" listing twelve key factors but omitting lipid-related contributors. The role of lipids in aging remains unclear, particularly in skin aging, which has both medical and social implications. Our study investigates the role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P₂] in epidermal aging. We previously observed that DNA damage stress, a primary factor in extrinsic aging, reduces PI(4,5)P₂ levels in keratinocytes. Overexpression of PI(4,5)P₂-degrading enzymes induces cellular senescence phenotypes, while increasing PI(4,5)P₂ synthesis enhances resistance to stress-induced senescence. However, *in vivo* evidence remained limited. Here, we generated transgenic (TG) mice expressing a PI(4,5)P₂-degrading enzyme under the K15 promoter (K15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TG). At 9 months, these mice exhibited a reduction in hair follicles and decreased type XVII collagen expression, suggesting potential premature hair follicle aging. Additionally, *in vitro* analysis using HaCaT cells revealed that PI(4,5)P₂ depletion disrupted plasma membrane localization of the scaffold protein Par3, which interacts with the exocyst complex to regulate exocytosis. By expressing a plasma membrane-targeted Par3 exocyst-binding domain (Lyn-hPar3(710-1089)-V5), we partially rescued PI(4,5)P₂ depletion-induced cellular senescence phenotypes, including increased cell area, SA-β-gal activity, and p21 expression. Our findings suggest that PI(4,5)P₂ plays a critical role in cellular senescence of keratinocytes by modulating exocytosis through PAR3. While *in vivo* phenotypes were mild at 9 months, long-term studies are needed to determine the full extent of PI(4,5)P₂'s role in epidermal and hair follicle aging in mice. These results highlight PI(4,5)P₂ as a potential target for interventions against skin aging and provide novel insights into lipid-mediated aging mechanisms.

1. 緒言

ホスファチジルイノシトール (PI) は生体膜を構成するリン脂質のひとつであり、グリセロール骨格にリン酸を介してイノシトール環が結合している。PIのイノシトール環の3位、4位および5位の水酸基が異なるパターンのリン酸化を受けることにより7種類のリン酸化体が存在しており、これらはPhosphatidylinositol phosphates (PIPs) と総称される¹⁾。PIPsの一つであるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂] は、PIのイノシトール環の4位と5位の水酸基がリン酸化されたリン脂質である。我々は、以前より、PI(4,5)P₂を加水分解する酵素ホスホリパーゼC (PLC) の皮膚における機能について研究を行ってきており²⁻⁵⁾、その過程で、PLCの基質であるPI(4,5)P₂が表皮に豊富に存在することを明らかにしてきた⁶⁾。また、培養細胞を用いた解析においても、ヒト表皮細胞株 HaCaT 細胞には形質膜のPI(4,5)P₂が豊富に存在することも確認してきた。

近年、老化の制御機構についての研究が活発に進められており、老化を規定する要因がHallmarks of Agingとし

て2023年にCell誌に報告されている⁷⁾。Hallmarks of AgingにはゲノムDNA、タンパク質、エピゲノムに関連するものなど12個の要因が挙げられているが、脂質に関する要因は含まれておらず、老化制御における脂質の役割には不明な点が多い。皮膚は加齢の影響が外観に現れるため、皮膚老化の制御は医学的観点のみでなく、社会的観点からも重要な課題であり、皮膚老化を抑制するための安全で有効な方法の開発が求められる。皮膚の老化には、加齢による内因性老化と環境因子による外因性老化がある。我々は、外因性老化の主な誘因となるDNA損傷ストレスを表皮細胞に与えた際にPI(4,5)P₂の量が減少することを発見した。また、PI(4,5)P₂を分解する酵素を表皮細胞に過剰発現させた際には、細胞老化に特徴的な表現型が誘導されるという結果を得ていた。さらに、PI(4,5)P₂を合成する酵素を表皮細胞に過剰発現した際には、表皮細胞がDNA損傷ストレスによる細胞老化誘導に対して抵抗性を示すことを示唆する結果も得ている。これらのことから、PI(4,5)P₂は表皮細胞の老化に対して抑制的に働く可能性が高く、PI(4,5)P₂を増加させることは、表皮細胞の細胞老化を抑制し、皮膚老化の予防や改善に繋がる可能性が考えられる。しかしながら、これまでの知見は培養表皮細胞を用いた研究により得られたものであり、生体内においてもPI(4,5)P₂の減少が表皮細胞の老化に関与するかは不明である。また、PI(4,5)P₂の減少が表皮細胞老化を誘導する機構は不明である。そこで、本研究では、PI(4,5)P₂がマウス個体の表皮老化の制御に関わるのかについて明らかにすることを目的とした。また、PI(4,5)P₂が表皮細胞の



Elucidating the Role of Plasma Membrane Phospholipids in Cellular Senescence of Keratinocytes

Yoshikazu Nakamura

Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science

細胞老化に対して抑制的に働く分子機構を明らかにすることも目指した。

2. 方 法

2. 1. PI (4,5) P₂代謝酵素トランスジェニックマウスの作成と解析

K15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウスは、毛包幹細胞で活性化するK15プロモーターの下流にLynのN末端配列およびGFPと融合させたINPP5Eの酵素活性ドメインをコードするcDNA (Lyn-INPP5Ecat-GFP) を導入した遺伝子を用いて作製した。本実験では9ヶ月齢のオスのマウスを使用し、皮膚パラフィン切片を用いたHE染色と皮膚凍結切片を用いた免疫蛍光染色を行った。

2. 2. 形質膜標的化Par3およびPI (4,5) P₂分解酵素を導入したHaCaT細胞の解析

HaCaT細胞にLyn-INPP5Ecat-GFPおよびLyn-hPar3 (710-1089)-V5をレトロウイルスベクターを用いて発現させた。これらの細胞において細胞面積の測定、SA-β-gal活性を示す細胞の検出、免疫蛍光染色によるp21の検出を行った。

3. 結 果

3. 1. PI (4,5) P₂代謝酵素遺伝子改変マウスの解析

表皮細胞におけるPI (4,5) P₂の減少がマウスの表皮にどのような影響を及ぼすかは不明であった。そこで、PI (4,5) P₂の5位のリン酸基を脱リン酸化できる活性を持つ酵素の酵素活性ドメインを形質膜に発現させたK15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウスを作成した。現在のところ9ヶ月齢までの飼育を行っている。これらのマウスの皮膚の

組織切片を観察し、表皮、真皮の厚さと毛包の数を調べたところ、表皮、真皮の厚さに変化は見られなかったものの、K15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウスでは毛包の数の減少が観察された (図1)。また、毛包の老化と関与することが報告されている17型コラーゲンの減少が毛包において観察された。

3. 2. PI (4,5) P₂による表皮細胞老化制御機構の解析

我々は、以前、形質膜PI (4,5) P₂の減少はPI (4,5) P₂結合タンパク質であるPar3の形質膜局在を抑制し、このことがPI (4,5) P₂減少時の細胞形態変化に関わることを報告してきた⁶⁾。形質膜のPar3はエキソサイトーシス小胞上に存在するエクソシスト複合体と結合し、エキソサイトーシス小胞を形質膜へ係留し、エキソサイトーシスを促進する働きを持つ⁸⁾。そこで、Par3のエクソシスト複合体結合部位を形質膜に標的化して発現させることで、PI (4,5) P₂分解酵素導入によるPI (4,5) P₂減少に伴う細胞老化誘導を抑制できる可能性を考えた。Par3をPI (4,5) P₂の量に依存せずに形質膜に発現させるために、Par3のエクソシスト複合体結合部位に形質膜標的化配列とV5タグを付加した遺伝子であるLyn-hPar3 (710-1089)-V5を用いた。PI (4,5) P₂分解酵素としてはPI (4,5) P₂の5位のリン酸基を脱リン酸化できる活性を持つ酵素の酵素活性ドメインを形質膜に標的化したLyn-INPP5Ecat-GFPを用いた。細胞老化の特徴として細胞の扁平化に伴う細胞面積の増加が挙げられるため細胞面積について解析したところ、Lyn-INPP5Ecat-GFPのみを発現させた細胞と比較してLyn-INPP5Ecat-GFPと同時にLyn-hPar3 (710-1089)-V5を発現させた細胞では細胞面積の増加が抑制されることが明

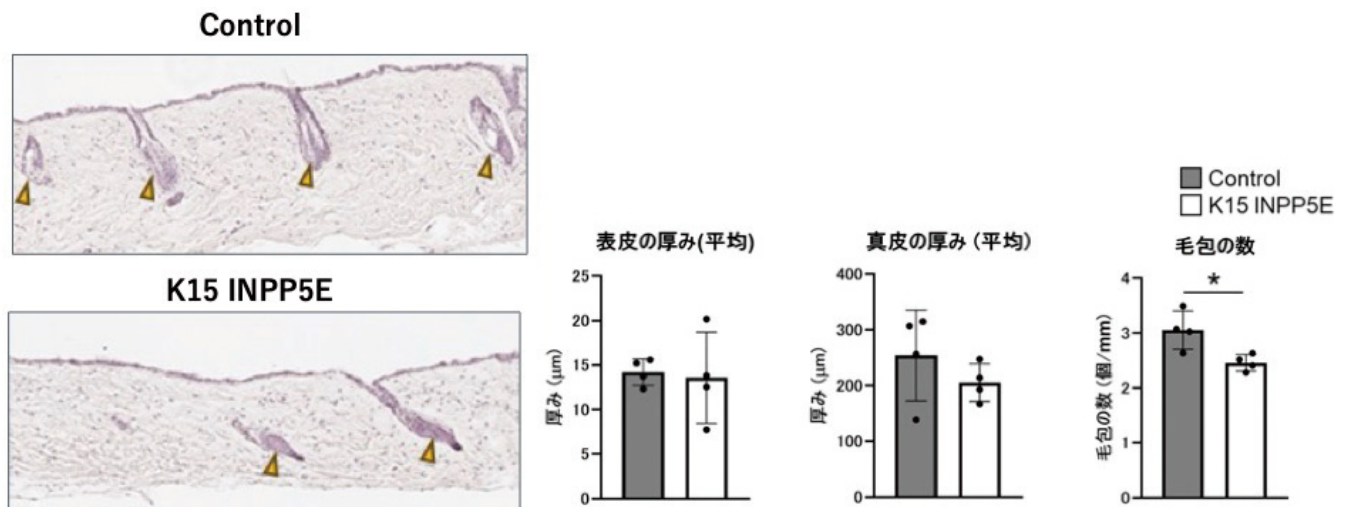


図1 毛包幹細胞におけるPI (4,5) P₂分解酵素発現は毛包の数を減少させる

9ヶ月齢のK45::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウス (K15 INPP5E) の背部皮膚のHE染色と真皮、表皮の厚みと毛包の数。*p < 0.05。

らかになった。続いて細胞老化時に観察されるSA- β -gal活性を示す細胞の増加が見られるかを検討したところ、Lyn-INPP5Ecat-GFPのみを発現させた細胞と比較してLyn-INPP5Ecat-GFPと同時にLyn-hPar3(710-1089)-V5を発現させた細胞ではSA- β -gal活性を示す細胞の割合の増加が抑制されることが明らかになった。続いて、細胞老化時に発現が増加するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子p21の検出を行ったところ、Lyn-INPP5Ecat-GFPのみを発現させた細胞と比較してLyn-INPP5Ecat-GFPと同時にLyn-hPar3(710-1089)-V5を発現させた細胞ではp21のシグナルを示す細胞の数が少ないことが明らかになった(図2)。

4. 考 察

毛包幹細胞にPI(4,5) P_2 分解酵素を発現させたK15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウスでは毛包の数の減少が観察されたが、その程度は軽度なものであった。本研究期間内では作成したマウスを長期間飼育して老齢マウスを得た上での解析にまでは至らなかったため、今後、加齢したマウスを用いた解析を行い、今回、観察された表現型がより明確に見られるようになるのかを検討する必要がある。

と考えている。

本研究では、形質膜標的化Par3のエクソシスト複合体結合部位を発現させることでPI(4,5) P_2 減少により誘導される細胞老化関連表現型の一部を抑制できることが示唆された。最近になり形質膜の損傷が細胞老化を誘導することが報告されている⁹⁾。興味深いことにPI(4,5) P_2 を減少させた細胞では、細胞膜非透過性蛍光物質の細胞外部から細胞内への侵入が増加するなど、形質膜損傷が起きていることを示唆する表現型も観察されている。また、PI(4,5) P_2 はPar3の形質膜局在に必要であることや、エキソサイトーシスによる膜供給が形質膜損傷の修復機構として重要であることを考えると¹⁰⁾、PI(4,5) P_2 の減少によるPar3の形質膜局在不全が形質膜損傷を介して細胞老化誘導に関わる可能性も考えられる。今後、PI(4,5) P_2 の減少、Par3の形質膜局在、細胞膜損傷、細胞老化の関連について解析を進める必要がある。

本研究によりPI(4,5) P_2 がマウス個体においても表皮の老化制御に関わることを示唆され、PI(4,5) P_2 による細胞老化制御にはPar3の形質膜局在に関わる可能性が示された。今後、PI(4,5) P_2 量の操作やPar3の形質膜移行が表皮細胞老化抑制のための標的となる可能性が考えられる。

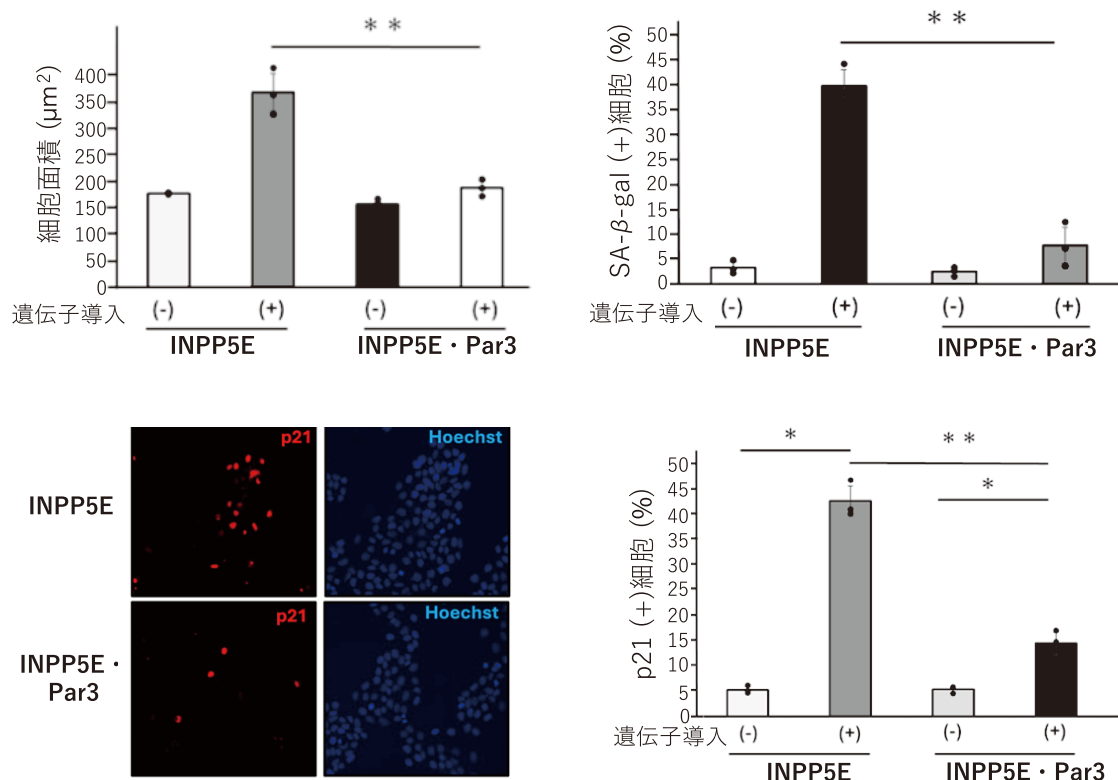


図2 形質膜標的化Par3はPI(4,5) P_2 分解酵素の発現による表現型を抑制する
Lyn-INPP5Ecat-GFP単独発現(INPP5E)またはLyn-INPP5Ecat-GFPとLyn-hPar3(710-1089)-V5の同時発現(INPP5E+Par3)細胞において細胞面積、SA- β -gal活性を示す細胞の割合、p21陽性細胞の割合を測定した。同じサンプルの中の遺伝子導入がされていない細胞を(-)、遺伝子導入がされている細胞を(+)として、それぞれ測定を行った。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ 。

謝 辞

本研究の遂行にあたり貴重なご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝を申し上げます。K15::Lyn-INPP5E-GFP TGマウスをご作製いただいた東京理科大学生命医科学研究所 小川修平先生に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Sasaki T, Takasuga S, Sasaki J, Kofuji S, Eguchi S, Yamazaki M, Suzuki A. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog. Lipid Res.* 48, 307–343 (2009)
- 2) Nakamura Y, Fukami K, Yu H, Takenaka K, Kataoka Y, Shirakata Y, Nishikawa S, Hashimoto K, Yoshida N, Takenawa T. Phospholipase Cdelta1 is required for skin stem cell lineage commitment. *EMBO J.* 12, 2981–2991 (2003)
- 3) Nakamura Y, Ichinohe M, Hirata M, Matsuura H, Fujiwara T, Igarashi T, Nakahara M, Yamaguchi H, Yasugi S, Takenawa T, Fukami K. Phospholipase C-δ1 is an essential molecule downstream of Foxn1, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. *FASEB J.* 3, 841–849 (2008)
- 4) Kanemaru K, Nakamura Y, Sato K, Kojima R, Takahashi S, Yamaguchi M, Ichinohe M, Kiyonari H, Shioi G, Kabashima K, Nakahigashi K, Asagiri M, Jamora C, Yamaguchi H, Fukami K. Epidermal phospholipase Cδ1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. (2012) *Nat. Commun.*, 3, 963.
- 5) Kanemaru K, Nakamura Y, Totoki K, Fukuyama T, Shoji M, Kaneko H, Shiratori K, Yoneda A, Inoue T, Iwakura Y, Kabashima K, Fukami K. Phospholipase Cδ1 regulates p38 MAPK activity and skin barrier integrity. (2017) *Cell Death Differ.* 24 (6) ,1079–1090.
- 6) Kanemaru K, Shimozawa M, Kitamata M, Furuishi R, Kayano H, Sukawa Y, Chiba Y, Fukuyama T, Hasegawa J, Nakanishi H, Kishimoto T, Tsujita K, Tanaka K, Itoh T, Sasaki J, Sasaki T, Fukami K, Nakamura Y. Plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is critical for determination of epithelial characteristics. *Nat. Commun.* 13, 2347 (2022)
- 7) López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186, 243–278 (2023)
- 8) Ahmed SM, Macara IG. The Par3 polarity protein is an exocyst receptor essential for mammary cell survival. *Nat. Commun.* 8, 14867 (2017)
- 9) Suda K, Moriyama Y, Razali N, Chiu Y, Masukagami Y, Nishimura K, Barbee H, Takase H, Sugiyama S, Yamazaki Y, Sato Y, Higashiyama T, Johmura Y, Nakanishi M, Kono K. Plasma membrane damage limits replicative lifespan in yeast and induces premature senescence in human fibroblasts. *Nat. Aging* 4, 319–335 (2022)
- 10) Andrews NW, Corrotte M. Plasma membrane repair. *Curr. Biol.* 28, R392–R397 (2018)