

加齢による微小血管網異常と皮膚老化の関係性を解く

宮崎大学医学部血管動態生化学分野

西 山 功 一

This study aimed to clarify the relationship between age-related abnormalities in the microvascular network and skin aging. For this, we first developed a new method for quantitatively analyzing the three-dimensional microvascular network in mouse ear skin. Using this methodology, we found that induction of impairment of endothelial cell function reduced the microvascular network density and pericyte coverage. It was also suggested that the skin may begin to show some of the characteristics of aged skin tissue. We also established a mouse line (Col4a1/a2-flox mouse) that can simultaneously knock-out *Col4a1* and *Col4a2* genes in time- and cell-specific manner by crossing mouse carrying specific Cre driver and that is expected to intentionally reduce the density of the microvascular network due to impaired angiogenesis. Furthermore, by combining various *in vitro* and *in vivo* assays, we identified the Notch-TGF β 2 signaling axis as a candidate molecular mechanism by which the impairment of vascular basement membrane formation via the action of vascular endothelium and pericytes leads to abnormalities in the microvascular network. It is hoped by developing this research further that we will be able to pioneer future academic trends in cosmetology and contribute to the development of this field. Furthermore, I believe that this will provide a scientific foundation that will contribute to the prevention and improvement of skin aging and the development of new treatments for age-related skin diseases, and that will greatly contribute to improving people's health and beauty.

1. 緒 言

皮膚は加齢に伴い、表皮細胞の増殖能低下による表皮菲薄化、真皮の線維芽細胞減少によるコラーゲン・弾性線維の減少を介したシワやたるみ形成など、生理的老化に至る。また、頭皮の薄毛や脱毛は、毛包幹細胞の脱落により毛包がミニチュア化する、生理的な加齢変化によって生じることがわかってきた。毛髪を含む皮膚組織は、若々しさなどの“見た目”を決める重要な役割を担っている。また、外界からの刺激や外来物侵入から身を守るバリアとしても機能する。したがって、皮膚の生理的老化のしくみを十分理解し、その予防や改善、また加齢性皮膚疾患に対する医療の向上につなげ、人々の健康や美容の増進を図っていくことは、今後の重要な課題である。

体中に張り巡らされた微小血管は、ガス交換、栄養運搬、老廃物除去など、組織機能維持に重要である。加齢した皮膚では、血管密度の低下や血管形態異常など、微小血管網維持の変容が見られる。また、薄毛や脱毛は、皮膚の微小循環異常に起因する可能性が指摘されてきた。しかし、加齢で生じる微小血管網の変容が微小循環不全を来し、皮膚の生理的老化、そして、加齢性疾患に関与するか、十分わかっていない。



Unraveling the relationship between age-related microvascular abnormalities and skin aging

Koichi Nishiyama

Laboratory for Vascular and Cellular Dynamics, Faculty of Medicine, University of Miyazaki

微小血管網は、血管内皮細胞とそれを被覆するペリサイトとの相互作用、また、血流刺激下につくられる。また生理的範囲内の血管傷害では、血管新生にて修復され、微小血管網は維持される。我々は、血管新生が血流圧により抑制されることを最近見出した¹⁾。続いて、ペリサイトは、4型コラーゲン沈着による血管基底膜形成を促進し、血流圧による血管新生抑制作用をさらに抑制的に制御することがわかってきている。一方、加齢に伴い、ペリサイトの血管被覆は低下することが報告されている²⁾。

したがって本研究では、3次元微小血管網の定量解析法を開発し、また微小血管網異常を誘導するマウスを樹立する。この解析系を起点として、血管内皮-ペリサイト-血流の相互作用を介した血管基底膜形成の破綻による微小血管網異常が皮膚の生理的老化に関与するのかを明らかにする。さらに、そのしくみを解き、革新的な皮膚老化の予防や改善、そして加齢性疾患の治療法開発に資する科学的基盤を提供し、人々の健康と美容の増進に貢献することを目的とした。

2. 方 法

2.1. マウス耳介皮膚における3次元微小血管網の定量評価

マウス耳介背側の皮膚を実体顕微鏡下に採取し、微小血管網(毛細血管網)の内皮細胞とペリサイトをホールマント免疫染色にて同定後、共焦点レーザー顕微鏡にて3次元的に可視化した(内皮細胞:CD31など;ペリサイト:DESMIN, PDGFR β など)。同画像から、毛細血管密度とペリサイト被覆率を算出した。

2.2. マウスモデルを用いた微小血管網異常と皮膚老化の関係性の解析

血管内皮機能障害マウスは、既報に倣い³⁾、15-20週間の高脂肪食負荷および薬理的な一酸化窒素合成酵素(NOS)抑制にて誘導した。前述の方法にて、耳介皮膚の3次元微小血管網の定量評価を行うとともに、耳介皮膚の組織切片を用いて皮膚老化に特徴的な組織学的変化を定量評価し、両者の関係性を比較解析した。

2.3. 新規モデルマウス樹立による微小血管網異常と皮膚老化の因果関係の実証

これまでの検討から、ペリサイトとの相互作用を介した血管内皮細胞の4型コラーゲン(COL4)の発現が血管基底膜形成に重要であり、血管新生を促進することで微小血管網の形成と維持に必要であることが示唆されてきた。血管基底膜の構成成分であるマウス *Col4a1*、*Col4a2* 遺伝子は、プロモーターを共有する形で同遺伝子座に背中合わせでコードされている(図1)。したがってこれまで、*Col4a1* のエクソン1、プロモーター、そして *Col4a2* のエクソン1、2を含めて欠損させた、*Col4a1/a2* のコンベンショナルダブルノックアウトマウス(DKO)が作製されていた⁴⁾。しかし、同ノックアウトマウスは、E10.5-E11.5で胎生致死のため、成獣での解析はできない。したがって、*Col4a1* および *Col4a2* 遺伝子を同時に、細胞特異的かつ時期特異的にダブルノックアウト可能な *Col4a1/a2-flox* マウスを、新たに作製した(図1)。同 *flox* マウスでは、*Col4a1* のイントロン2および *Col4a2* のイントロン1に、LoxP配列をCRISPR-Cas9システムを用いて導入した。得られた *Col4a1/a2-flox* マウスと内皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する Tie2-Cre マウスとを交配することで、内皮細胞特異的な *Col4a1/a2* DKO マウスを作出した。続いて、血管基底膜形成や血管新生を含めた、フェノタイプを網膜血管新生評価系にて解析した。

2.4. 血管内皮-ペリサイト間作用によるCOL4血管基底膜形成機序の *in vitro* 解析

血管内皮細胞(HUVECs: ヒト臍帯静脈内皮細胞)とペリサイト(hPC-PL: ヒト胎盤由来ペリサイト)を、24時間接触共培養もしくは非接触共培養(カルチャーインサートで隔離)し、セルソーターにてそれぞれ内皮細胞、ペリサイトを単離し、qPCR法で遺伝子発現を調べた。また、共培養上清中における目的タンパク質をELISA法にて定量評価した。同2次元共培養系において、必要に応じて生化学的および薬理的介入を行い、また同様に遺伝子・タンパク発現の変化を解析することで、血管内皮-ペリサイト間作用により内皮細胞における *Col4a1/a2* 遺伝子が制御される分子実体候補を探索した。次に、オンチップ血管新生モデルを用いて、2次元共培養系で得られた候補分子軸の妥当性を評価した。オンチップ血管新生は、マイクロ流路デバイス上に、ヒト肺線維芽細胞との隔離共培養下に、HUVECs 単独もしくは hPC-PL を同時に培養することで、細胞外基質内に3次的に血管新生を誘導した¹⁾。2次元共培養系で得られた候補分子軸に生化学的・薬理的に介入し、新生血管枝の伸長度合いやCOL4基底膜形成度合いを定量的に評価した。

3. 結果と考察

3.1. マウスモデルを用いた微小血管網異常と皮膚老化の関係性の解析

内皮傷害負荷15週と20週のマウスの耳介皮膚の微小血管網(毛細血管網)変化を、同週齢のコントロールマウスと比較し、ホールマウント免疫染色による3次元評価系にて解析した。血管内皮機能障害誘導15週と20週の両方において、コントロール群と比較して、毛細血管網密度が減少し(図2)、加えて、毛細血管内皮細胞を被覆するペリサイト数が減少していることがわかった(図3)。また、血管内皮機能障害負荷20週の同部位のHE染色組織切片

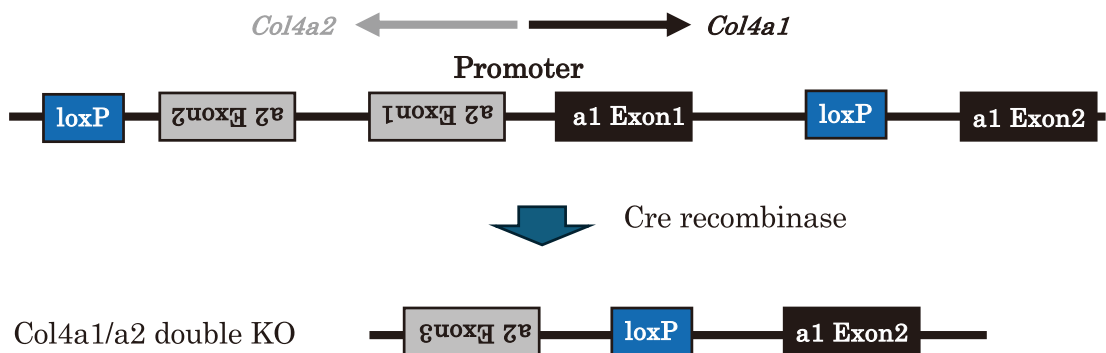
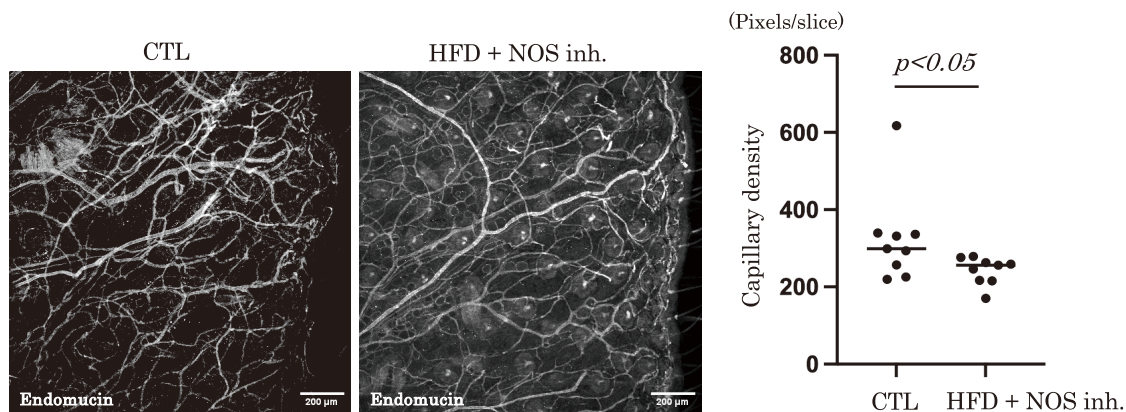


図1 マウスの *Col4a1* と *Col4a2* 遺伝子座とノックアウトストラテジー

やEVG染色組織切片において、皮膚表面構造の凹凸化や、皮膚内部のコラーゲン線維沈着の変容といった、老化皮膚の特徴を示す一部の变化が観察された(図4)。

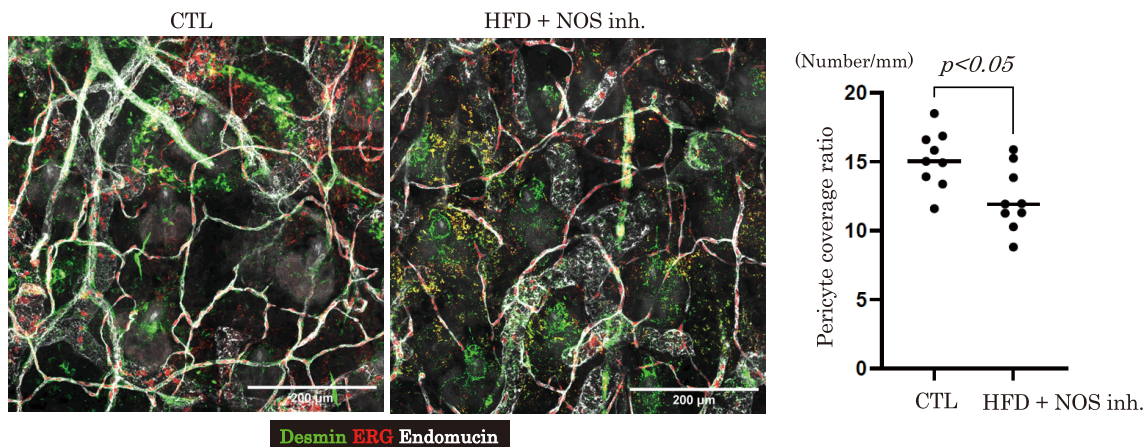
加齢に伴い、毛細血管網密度の低下や、ペリサイトの血管被覆率が低下していることが、これまで報告されている⁵⁾。今回、NOS阻害と高脂肪食負荷による血管内皮機能障害を惹起することで、加齢に伴う毛細血管網の変容が誘導さ

れた。このことは、加齢に伴う毛細血管網の変容は、内皮機能異常が一つの誘因となっていることを示唆している。では、毛細血管網密度の低下はどのような機序で起こっているのか、また、そこには血管新生不全による毛細血管網維持の破綻が関与しているのか、今後の検討が必要である。また、ペリサイトの被覆率の低下は、内皮細胞機能異常とどのように関連し、そして、どのように毛細血管密度の低



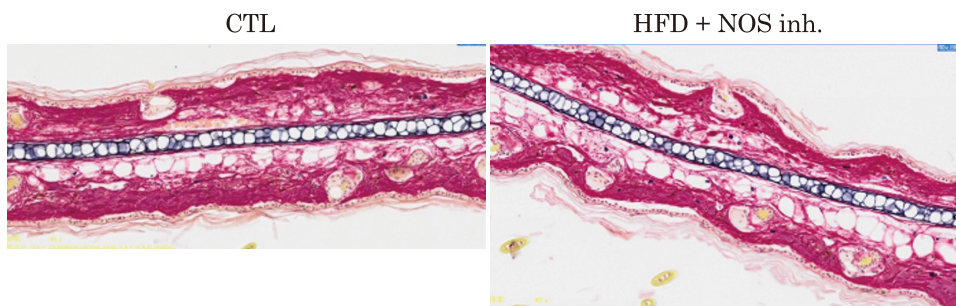
CTL : コントロール, HFD : 高脂肪食負荷, NOS inh. : 一酸化窒素合成酵素阻害

図2 内皮機能障害誘導有無でのマウス耳介皮膚における毛細血管密度



CTL : コントロール, HFD : 高脂肪食負荷, NOS inh. : 一酸化窒素合成酵素阻害

図3 内皮機能障害誘導有無でのマウス耳介皮膚毛細血管のペリサイト被覆率



CTL : コントロール, HFD : 高脂肪食負荷, NOS inh. : 一酸化窒素合成酵素阻害

図4 内皮機能障害誘導有無でのマウス耳介皮膚組織HE染色切片の典型画像

下と関連するのか、今後の課題として残されている。

今回の結果は、微小血管網異常と皮膚の加齢性変化の一部との関係性の存在を示唆する。つまり、毛細血管網機能の異常が、コラーゲンなどによる皮膚組織の支持構造の維持を脆弱化させ、老化皮膚で見られるいわゆるしわやたるみに関連している可能性がある。今後、本研究で得られた、血管内皮傷害→毛細血管網異常→線維芽細胞機能異常→コラーゲン線維異常→皮膚のたるみという一つの作業仮説は、同カスケードに関与する軸となる分子の同定、そして、その介入実験から、皮膚の硬さを測定する個体レベルでの生理学的な検討までを包括的にを行い、実証していく必要がある。また、実際のマウスの加齢変化として同様なしくみの下で皮膚老化が観察されるのか、経時的な検討も必要である。

3.2. Col4a1/a2-flox マウス樹立による微小血管網異常と皮膚老化の因果関係の実証

上記、3.1.の微小血管網異常と皮膚老化の関係性を観察するのみでは、両者の因果関係を問うことはできない。本研究では、微小血管網密度の低下が、皮膚老化の一因となっているかどうかを実証するため、意図した時期から微小血管網密度低下の異常を人工的に惹起し、それにより皮膚老化が誘発もしくは促進されるかどうか検討することで、両者の因果関係を実証することを試みた。これまでの研究から、COL4 血管基底膜の形成を阻害することで、血管新生を阻害できることがわかってきた。したがって、血管発生が終了した成獣にて、COL4 をノックアウトし血管新生を阻害することで、毛細血管網の修復・維持機構が破綻し、毛細血管密度の低下が意図的に誘導できると想定した。これまで、Col4a1/a2-flox マウスを数系統樹立することに成功した。次に、同マウスの機能性を確認するため、Tie2-Cre マウスと交配し、血管内皮細胞特異的な Col4a1/a2 DKO マウスを作成した。同マウスは、既報のコンベンショナル Col4a1/a2 DKO マウスとは違い胎生致死には至らなかった。したがって、生後4日目のマウスを使って、網膜血管新生への影響を観察したところ、COL4 血管基底膜の形成不全に合わせて、新生血管の伸長遅延と形態異常が観察され、Col4a1/a2-flox マウスの機能性が確認された。しかしながら、内皮細胞特異的な Col4a1/a2 DKO マウスは、成長障害に加えて、週齢数の増加とともに、出血が原因と思われる死に至る個体が出現してくることがわかってきた。

今後、血管発生が終了した成獣にて血管内皮特異的な Col4a1/a2 DKO を誘導するために、Cdh5-ERT2Cre マウスとの交配により、エストロゲン投与下に Col4a1/a2 DKO を誘導することを計画している。それにより、成獣にて血管新生を阻害し、毛細血管網密度の低下が誘導できるか検討する。さらに、毛細血管網密度とともに、皮膚老

化が出現するか、生理学的、組織学的解析により検討する。本 Col4a1/a2-flox マウスを用いて、意図的な毛細血管密度の操作が可能になれば、毛細血管機能と組織老化との関係性のみでなく、いかに毛細血管機能が組織構築や機能の発現、そして、その恒常性の維持に関与しているかを解析する良いモデルマウスとなると考えられる。

3.3. 血管内皮-ペリサイト間作用による COL4 血管基底膜形成機序の *in vitro* 解析

これまで、*in vitro* の血管形成モデルを使った解析にて、血管内皮細胞とペリサイトの相互作用は、血管内皮細胞とペリサイト両者において、血管基底膜成分 Col4a1 および Col4a2 を発現増強させることが報告されていた⁴⁾。さらに我々のこれまでの検討から、血管新生の際の血管基底膜形成には、内皮細胞による Col4a1/a2 の発現が重要であることがわかってきた。しかし、血管内皮細胞における Col4a1/a2 発現を制御する、血管内皮-ペリサイト間作用の分子実体は不明であった。本研究にて、内皮細胞とペリサイトとの2次元共培養を用いた検討にて、内皮細胞との相互作用を介して、ペリサイトにて TGFβ2 の発現が増強し、分泌増加した TGFβ2 が、内皮細胞の Alk5 受容体-Smad2/3 を介したシグナルを通して、Col4a1/a1 の発現を増加させるしくみが示されてきた。さらに、その上流として、内皮細胞の Jagged1 がペリサイトに Notch3 を介したシグナルを入れることで、ペリサイトの TGFβ2 の発現が増強される機序もわかってきた。次に、この候補分子軸経路が、実際に血管新生における Col4 血管基底膜形成と血管伸長に重要であるか、独自のオンチップ血管新生アッセイ系にて評価した。その結果、実際に、血管内皮-ペリサイト間相互作用として、Jagged1-Notch/TGFβ2-Alk5 経路を介して、COL4 血管基底膜形成を促進し、血管新生を進めていることが確認された。

本研究にて、初めて、COL4 血管基底膜形成を制御する血管内皮-ペリサイト間作用を担う実働分子軸の一つである、Notch-TGFβ2 分子軸が明らかとなった。同分子は、血管新生を制御可能なだけでなく、毛細血管密度を制御する一つの分子標的候補であると期待される。

4. 総 括

本研究では、新規に確立する大きく2つの解析系にて、微小血管網異常と皮膚の老化の因果関係を明らかにすることを意図した。まず、3次元微小血管網解析系を確立することで、従来の組織切片による解析では難しかった微小血管構造をネットワークレベルで捉え、かつ、ペリサイト被覆や4型コラーゲンによる血管基底膜評価など、血管の質的指標をも盛り込んだ包括的な微小血管網評価を可能にすることであった。まだその確立のための道半ばであるが、

ここまでの解析にて、血管内皮機能障害が起点となり、微小血管網密度の低下や、それを取り巻くペリサイトの被覆率の低下が生じていることがわかってきた。また、その微小血管網の異常と皮膚の加齢性変化の関連性があらためて示唆された。

2つ目として、微小血管網異常を意図的に誘導できるマウスモデルを構築し、微小血管ネットワーク異常から皮膚老化の促進に至る因果関係を直接的に証明することであった。本研究において、4型コラーゲンの血管基底膜沈着を消失させ血管新生を抑制することを通して、毛細血管密度を意図的に低下させることが期待できるCol4a1/a2-floxマウスを樹立し、その機能性を確認した。今後、この2つの方法論を駆使して、微小血管網異常に起因する皮膚老化という概念をあらためて提示し、今後のコスメトロジーの学問的潮流を先駆的に唱えることで、本領域の発展に貢献できると期待される。

さらに、血管内皮-ペリサイト作用を介した血管基底膜形成の破綻から微小血管網異常を来す分子機序として、Notch-Tgfb2シグナル軸を同定した。併せて、今後、微小血管網異常から皮膚老化が促進する分子機序を明らかにすることにより、皮膚老化の予防や改善策、加齢性皮膚疾患の新規治療法の開発に資する科学的基盤を提供し、人々の健康や美容の増進に大きく貢献できる。

(引用文献)

- 1) Yuge S, Nishiyama K, Arima Y, Hanada Y, Oguri-Nakamura E, Hanada S, Ishii T, Wakayama Y, Urara Hasegawa U, Tsujita K, Yokokawa R, Miura T, Itoh T, Tsujita K, Mochizuki N, Fukuhara S. Mechanical loading of intraluminal pressure mediates wound angiogenesis by regulating the TOCA family of F-BAR proteins. *Nat Commun* 13 (1): 2594, 2022.
- 2) Chen J, Sivan U, Tan SL, Lippo L, De Angelis J, Labella R, Singh A, Chatzis A, Cheuk S, Medhghalchi M, Gil J, Hollander, Marsden BD, Williams R, Ramasamy SK, Kusumbe AP. High-resolution 3D imaging uncovers organ-specific vascular control of tissue aging. *Sci Adv* 7 (6), 2021
- 3) Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, French KM, Villalobos E, Kim SY, Luo X, Jiang N, May HI, Wang ZV, Hill TM, Mammen PPA, Huang J, Lee DI, Hahn VS, Sharma K, Kass DA, Lavandero S, Gillette TG, Hill JA. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* 568 (7752): 351-356, 2019.
- 4) Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131 (7): 1619-28, 2024
- 5) Horton WB, Barrett EJ. Microvascular Dysfunction in Diabetes Mellitus and Cardiometabolic Disease. *Endocr Rev* 42 (1): 29-55, 2021.