

論文の内容の要旨

論文題目「光老化皮膚で発現増加するCartilage Oligomeric Matrix Proteinに関する研究」

学位申請者 小林 雅樹

キーワード: 紫外線、コラーゲン線維、弾性線維、Cartilage Oligomeric Matrix Protein、TGF- β

《目的》 Cartilage oligomeric Matrix Protein (COMP) は軟骨の主要な構造タンパク質のひとつである。皮膚における最近の研究では、強皮症やケロイドに代表される、線維症を伴う皮膚疾患でコラーゲンの沈着を促進する病原因子としてCOMPが注目されている。光老化皮膚ではコラーゲンは減少すると考えられているが、光老化皮膚の真皮乳頭層ではコラーゲン線維が密に配向される様子が観察されており、その構造が癍痕での所見と似ているという報告もなされている。本研究では、光老化皮膚で生じる組織変性部位として露光部皮膚である耳前部皮膚、対照として非露光部である耳後部皮膚を用いて、紫外線長期暴露によるCOMP発現及び局在変化について検討を加えた。また、光老化皮膚で見出されたCOMP発現増加のメカニズムを明らかにするため、ヒト皮膚線維芽細胞に紫外線を照射しCOMP発現が誘導されるか解析を行った。

《対象・方法》 研究には手術で取得した余剰皮膚を用いた。生検は同じ被験者の耳前部及び耳後部皮膚を採取した（男性10名、女性15名（1-96歳）。Digoxigenin (DIG) で標識したCOMP mRNAに対する anti-senseおよびsense probeを作製し、in situ hybridizationを実施した。また、PLP固定凍結ヒト皮膚切片を用いてCOMPの免疫電顕を行った。正常ヒト真皮由来線維芽細胞（NHDF）を用いて紫外線照射のCOMP発現誘導の実験を行った。UVA照射には光源としてブラックライトを使用し、照射量は2.5、5あるいは10J/cm²で実施した。UVB照射には光源として紫外線ランプを使用し、照射量は20、40あるいは60 mJ/cm²で実施した。抗TGF- β 1/2抗体（コントロール群には正常ニワトリ抗体）の添加実験、及びSB431542（濃度10ng/ml）の添加実験では、UVA照射後、それらを含む新しい0.6% FBS含有MEM培地と培地交換し、1日培養することで、その影響を評価した。皮膚組織及び培養ヒト皮膚線維芽細胞のCOMP、TGF- β 1, 2, 3の遺伝子発現解析はリアルタイムPCRによって実施した。内部標準遺伝子にはGAPDHを用いた。培養ヒト皮膚線維芽細胞の培養上清中のCOMPタンパク質の定量はウェスタンブロッティング、またはELISAにて実施した。

《結果》 露光部皮膚である耳前部皮膚と非露光部皮膚である耳後部皮膚を用いて、リアルタイムPCRによりCOMPのmRNA発現を比較した結果、露光部皮膚においてCOMP mRNA発現が高いことがわかった。露光部皮膚である耳前部皮膚のサンプルを用いて光老化進行度とCOMP mRNA発現との関連性をin situ hybridizationにより解析した結果、耳前部皮膚（露光部皮膚）で光老化進行とともにCOMP mRNA陽性細胞の数が有意に増加していた。同様に免疫染色によるCOMPの局在解析では、真皮乳頭層だけでなく、光老化によって起こる弾性線維様物質の蓄積が起こっている真皮網状層でCOMPのシグナルが増加していた。さらに免疫電顕によりCOMPの局在を詳細に観察した結果、真皮乳頭層ではCOMPはコラーゲン線維と共局在すること、真皮網状層ではCOMPはコラーゲン線維だけでなく弾性線維様物質とも共局在することが明らかとなった。

単層培養系を用いたメカニズム解析では、UVA 照射によってヒト皮膚線維芽細胞のCOMP発現を増加させることが確認された。抗TGF- β 抗体またはTGF- β I 型受容体のリン酸化阻害剤（SB431542）を培養系に添加することでUVA照射によるCOMP発現誘導が抑制された。

UVA照射によるCOMP発現誘導にTGF- β が関与するメカニズムを詳細に解析するため、UVA照射によるTGF- β 発現変化を検討した。その結果、UVA照射によってTGF- β 1及び2のmRNA発現が高まることが判明した。

またUVA照射した培養ヒト皮膚線維芽細胞の培養上清中のTGF- β 量を定量したところ、UVA照射によってTGF- β の活性型が増加傾向を示した。

《考察》In situ hybridization及び抗COMP抗体を用いた免疫染色により、光老化の進行とともにCOMP発現が増加することが確認されたことから、皮膚におけるCOMP発現には紫外線の暴露量が影響を及ぼすと考えられた。また光老化皮膚におけるCOMPの機能を推定するために免疫電顕を実施したが、COMPは光老化皮膚で変性することが知られているコラーゲン線維及び弾性線維様物質と共局在する様子が観察された。これらより、COMPが光老化皮膚で生じる真皮での結合組織変性に関与していると考えられた。また、培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いた解析により、UVA照射によって誘導されたTGF- β がCOMP発現を高めることが作用機序の一つであると考えられた。

《結論》今後、皮膚の結合組織におけるCOMPの詳細な役割と光老化皮膚でのTGF- β の挙動に関する更なる研究の深耕が必要となるが、今回見出したCOMPは光老化皮膚における診断マーカーとして、あるいは光老化予防のターゲット分子として有用なものになると考えられた。