

COL7A1 遺伝子の転写調節機構の解明及び老化迅速診断法開発への適用

今 淳¹⁾, 乗鞍敏夫¹⁾, 向井友花¹⁾, 澤村大輔²⁾

1) 青森県立保健大学, 2) 弘前大学

Key Words ①VII 型コラーゲン ②光老化 ③サイトカイン ④レチノイン酸

I. はじめに

皮膚は生体を被う最大の免疫臓器であり、外界の有害因子から生体を真っ先に防御する。しかし長年に渡る太陽光の UV に皮膚が曝されると、老化して免疫機能は低下する。その結果有害因子は皮膚を超えて体内深く侵入し、全身の健康が損なわれて死に至る。従って若々しい丈夫な皮膚の保持が全身の健康に必須である。

申請者らは、1)皮膚の VII 型コラーゲンの遺伝子 (COL7A1) の発現が老化皮膚で著明に抑制し、2)UV により誘導されるサイトカイン (TGF- β , TNF- α , IL-1 β) が COL7A1 の転写を抑制することを見出した。即ち COL7A1 は皮膚老化マーカー遺伝子であり、その発現抑制は皺を出現させる可能性を見出した¹⁻⁶⁾。しかし、その後の詳細な研究は、本学に着任した時期と重なり着手できず、着任後の設備も不十分であり困難であった。最近漸く研究開始可能となり、本研究をスタート研究に位置付け、1)UV, サイトカイン, アンチエイジング医薬のレチノイン酸 (RA) による COL7A1 発現機構の解析, 2)1)の結果を活用した皮膚老化の新規評価方法の確立に関する研究に着手した。

II. 目的

平成 22 年度は研究の初期段階であり、以下の 2 点について行った。

1. COL7A1 の転写調節機構の解析

UV, サイトカイン (TGF- β , TNF- α , IL-1 β) 及び RA による COL7A1 遺伝子発現解析, 特に転写制御機構を解析する。COL7A1 の応答配列と応答配列に結合する転写因子を同定する。

2. 皮膚老化の評価方法の確立

各応答配列と蛍光タンパク質 GFP の遺伝子を融合させたベクターを構築し、培養細胞に導入する。この細胞を UV, サイトカイン, RA で刺激して、細胞が発現する GFP 量を定量化する。

III. 研究方法

1. COL7A1 の応答配列及び応答配列に結合する転写因子の同定

COL7A1 のプロモーター領域 (-1804~+92 (転写開始点を+1 とする)) の挿入された ルシフェラーゼベクターを調製した。またプロモーター領域の一部を欠失させた deletion mutant も調製した。これらをヒト表皮角化細胞 (HaCaT) と真皮線維芽細胞 (HSF) に導入し、次いで UV, サイトカイン (TGF- β , TNF- α , IL-1 β), RA で刺激した。ルシフェラーゼアッセイ法で転写活性と応答配列を解析し、ゲルシフトアッセイ法で応答配列に結合する転写因子を同定した。

2. 皮膚老化の評価方法の確立

各応答配列が挿入された GFP 発現ベクターを HaCaT 及び 3T3 に導入した stable transfectant を作製した。次いで UV, TGF- β , TNF- α , IL-1 β , RA で刺激し、GFP の蛍光強度の変動を解析した。

IV. 結果・考察

1. COL7A1 の応答配列及び結合する転写因子の同定

ルシフェラーゼアッセイ法の結果から, HaCaT の COL7A1 の転写は TGF- β により促進し, UV, TNF- α , IL-1 β , RA により抑制していた。各種 deletion mutant によるルシフェラーゼアッセイ法及びゲルシフトアッセイ法の解析から, それぞれの応答配列と結合する転写因子が同定された。HSF では UV, TGF- β , TNF- α 及び IL-1 β は COL7A1 の転写を促進し, RA は抑制した。同様に応答配列と転写因子を同定した。実際の老化皮膚では UV, TNF- α , IL-1 β のために COL7A1 の発現は減少し, VII 型コラーゲンを主成分とするアンカーリングフィブリル(AF)の形成が低下して皺を形成される。今回の研究で示したように HaCaT と HSF では UV, TNF- α , IL-1 β に関する全く逆の制御機構が存在する。これは実際の皮膚には HaCaT が豊富に存在し, HSF が少ないため, HaCaT の影響がより大きくなり,最終的に COL7A1 の発現が抑制されて AF の形成は低下し,皺が形成されると考えられた。

2. 皮膚老化の評価方法の確立

1. の研究結果を基にして UV, TGF- β , TNF- α , IL-1 β , RA の各応答配列を組み込んだ GFP 発現ベクターを作製し, これらが導入された stable transfectant を調製した。次いで UV, TGF- β , TNF- α , IL-1 β , RA で刺激し, 細胞が発現する GFP の蛍光量の変動を観察した。その結果各刺激によって GFP の蛍光強度は 1. の結果と同様のパターンで変動した。今後はこの細胞を活用して未知のアンチエイジング物質/医薬の発掘を行う。

V. 文献

- 1) Vindevoghel L, Kon A, Lechleider RJ et al: J Biol Chem 273: 13053-13057, 1998.
- 2) Vindevoghel L, Lechleider RJ, Kon A et al: Proc Natl Acad Sci 95: 14769-14774, 1998.
- 3) Kon A, Vindevoghel L, Kouba DJ et al: Oncogene 18: 1837-1844, 1999.
- 4) Sasaki H, Kon A, Takeda H et al: J Dermatol Sci 32: 239-242, 2003.
- 5) Takeda H, Kon A, Ito N, Sawamura D et al: Exp Dermatol 14: 289-295, 2005.
- 6) Kon A, Takeda H, Ito N et al: J Dermatol Sci 1, 29-35, 2006.

VI. 発表

- 1) Kon A: Hyaluronan in the skin and its correlation with dermatopathology. Trends in Glycosci Glycotec 122: 68-79, 2010.

*連絡先: 〒030-8505 青森市浜館間瀬 58-1 E-mail: a_kon@auhw.ac.jp