

称号及び氏名	博士 (応用生命科学)	竜 瑞之
学位授与の日付	平成30年2月28日	
論文名	Study on the Role of Lactoferrin in Expression of Extracellular Matrix Proteins in Human Dermal Fibroblasts (ヒト皮膚線維芽細胞の細胞外マトリックスタンパク質発現におけるラクトフェリンの役割に関する研究)	
論文審査委員	主査	山地 亮一
	副査	阪本 龍司
	副査	片岡 道彦

## 論文要旨

### 序章

ヒトの皮膚は表皮と真皮から構成されている。表皮は外部刺激から身体を保護し、真皮は皮膚の全体的な形状および弾性を維持する働きをしている。真皮は細胞外マトリクスから構成されており、真皮中に存在する線維芽細胞が ECM の構成成分であるコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸を産生し、皮膚の形状維持や弾力性保持などに重要な役割を果たしている。エラスチンは皮膚中の ECM 成分の 2～5% だけしか占めないが、皮膚の弾力性を維持するのに特に重要である。紫外線や加齢によってエラスチンが変性したり、減少したりすると皮膚の弾力性が失われ、しわやたるみを生じることから、エラスチンの変化は皮膚の老化と深く関わっていると推測される。エラスチンのターンオーバーは ECM タンパク質の中では比較的遅く、失ったエラスチンの再構築は非常に困難であるとされている。エラスチンは前駆体であるトロポエラスチン (TE) として線維芽細胞より生成される。細胞外へ分泌された TE は lysyl oxidase (LOX) によって架橋されてから、fibulin-5 (FBLN5) と結合する。この結合物は fibrillin-1 (FBN1) を足場として集合蓄積することでエラスチンを形成する。生体内において、TE の発現調節は TGF- $\beta$ 1 によって行われていることが知られている。その調節機構に Akt と Smad が関与していることが肺線維芽細胞において報告されている。これまでに、線維芽細胞におけるコラーゲンやヒアルロン

酸合成酵素（HAS）に関する多くの研究があるが、エラスチンの発現調節機構や TGF- $\beta$ 1 以外のエラスチン発現促進に寄与する物質に関する報告はほとんどない。

ラクトフェリン（Lf）は、ヒトとウシの乳より精製され、アミノ酸配列が決定された 80 kDa の糖タンパク質である。Lf は母乳以外に、羊水、涙液、および唾液などに存在し、抗菌、抗炎症、および抗癌活性などの様々な機能を有する。Lf は 2 つの鉄結合部位を有しており、鉄を結合していない apo-Lf と鉄を結合している holo-Lf として存在するが、Lf の機能における apo-Lf と holo-Lf の役割に関してはほとんどわかっていない。一方で、Lf は羊水中にも存在し、胎児の皮膚と接していることから、皮膚に対し何らかの作用を有すると推測されてきた。これまでに Lf は皮膚の線維芽細胞の増殖および細胞遊走を活性化することが示されているが、エラスチンなどのような ECM タンパク質の発現におよぼす影響は不明である。そこで、本研究では、Lf が ECM タンパク質の発現におよぼす影響について評価し、特に Lf によって発現レベルの変動した TE に着目し、Lf による TE 発現調節の分子機構を解明することも目的とした。

## 第 1 章 Lf の ECM タンパク発現に対する増強効果

本章では、ヒト真皮線維芽細胞におけるコラーゲンやエラスチンのような ECM 構成タンパク質やヒアルロン酸のような ECM 構成因子の合成に寄与する HAS の発現におよぼす Lf の作用を評価した。その結果、Lf によってコラーゲン、HAS2、およびエラスチン形成に関わる成分である LOX、FBLN5、FBN1、TE などの mRNA 発現が有意に増加することが判明した。これらの Lf によって誘導されたタンパク質のうち、TE の mRNA 発現が最も顕著であり、0.1 mg/mL で約 2.2 倍、1 mg/mL で約 61 倍であり、濃度依存的であった。また、Lf の TE 発現における時間依存性を調べた結果、Lf は TE の mRNA およびタンパク質レベルを処理時間依存的に増加させた。以上のことより、Lf はヒト真皮線維芽細胞の ECM 構成タンパク質や構成因子の合成酵素の発現を促進し、特にエラスチン形成に関わる TE の発現を促進することが判明した。

## 第 2 章 経皮吸収促進剤による Lf の ECM タンパク発現増強

本章では、*in vitro* の皮膚モデルである Testskin LSE-high を用いて Lf の経皮吸収促進を評価し、さらに Lf の ECM タンパク質発現促進効果におよぼす影響も検討した。Testskin LSE-high は皮膚と同様な構造を示し、一般的に経皮吸収試験に用いられているモデルである。皮膚表皮の最表面にはバリアを担う角層が存在し、外部刺激などから体を守り、物質の透過を制限するため、分子量が大きい Lf は皮膚表面のバリア層を透過しにくいと思われる。そこで真皮中の線維芽細胞に対する Lf の効果を発揮するためには、Lf の経皮吸収を高める必要がある。本研究では、経皮吸収促進剤として発酵によって酵母が作る糖脂質型界面活性剤であるソホロースリピッド（SL）に着目した。SL はリポソームに類似したベシクル構造を形成し、有効成分をベシクル中に内包して経皮吸収を高めることができると期待されている。そこで、Testskin LSE-high を用いて SL による Lf の経皮吸収におよぼす影響を測定

した。その結果、SLはLfの経皮吸収量を最大で1.7倍までに増加し、Lfの皮膚透過性を高めることが判明した。さらにSL存在下におけるLfのECMタンパク質発現促進効果を調べた。その結果、LfによるECM構成タンパク質であるコラーゲン、LOX、FBLN5、FBN1およびECM構成因子の合成に寄与するHASのmRNA発現に対する増強効果は、SLの共存下で維持されたが、増強されなかった。一方で、LfとSLの共存下では、TEのmRNA発現が顕著に増加した。さらに、第1章において、LfによってLOX、FBLN5、FBN1、TEのmRNA発現が促進されたことから、エラスチン形成も促進されると予想された。そこで、エラスチン線維中の可溶性フラグメントである $\alpha$ -エラスチンを免疫染色にて観察したところ、Lfによって、 $\alpha$ -エラスチン量が増加し、線維芽細胞のエラスチン形成が促進された。TEの発現増加に連動し、Lfによる線維芽細胞の $\alpha$ -エラスチン量もSLによって増強された。以上のことから、SLはLfの経皮吸収を高め、ヒト真皮線維芽細胞のLfによるTE発現を増強し、さらにLfのエラスチン形成促進効果を高めることが判明した。

### 第3章 LfのTE発現促進機構

本章では、LfがTEの発現を促進する分子機構を検討した。LfによるTE発現促進にPI3K/Akt1シグナル経路またはMEK/ERKシグナル経路が関与するかを測定したところ、LfがAkt1とERK1/2のリン酸化を促進することが判明した。PI3K阻害剤LY294002とMAPK阻害剤U0126はLfによるAkt1とERK1/2のリン酸化をそれぞれ阻害したのに対して、LY294002はLfによるTE発現促進を阻害したが、U0126は阻害しなかった。従って、LfのTE発現促進はPI3K/Akt1シグナル経路を経由していることが明らかとなった。Lfに対するレセプターは複数存在するので、ヒト真皮線維芽細胞が発現しているLfレセプターをRT-PCRによって検討した。ヒト真皮線維芽細胞はlipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1)とToll-like receptor 4を発現していたので、LRP-1がLfによるTE発現に関与するかを検討するため、LRP-1阻害剤RAPの存在下でヒト真皮線維芽細胞をLfで刺激した。RAPはLfによるTE発現促進を阻害した。さらにLRP-1をノックダウンしたところ、LfによるTE発現促進は抑制され、またLfによるAkt1のリン酸化も阻害されたことから、LfのTE発現促進はLRP-1を介していることがわかった。次にヒト真皮線維芽細胞においてLfによるTE発現におよぼすTGF- $\beta$ 1の影響を測定した。LfによるTE発現はTGF- $\beta$ 1によって増強された。TGF- $\beta$ 1によるTE発現の調節機構を調べたところ、TGF- $\beta$ 1によるTE発現はLY294002によって抑制されたが、Akt1のリン酸化を促進せず、アイソフォームであるAkt2のリン酸化を促進した。LfはAkt2のリン酸化を促進しなかったことから、LfとTGF- $\beta$ 1は異なるPI3K/Aktシグナル伝達経路を介していると推測された。さらにTE発現における鉄含量の影響を調べたところ、holo-Lfはapo-LfよりもAkt1のリン酸化を顕著に促進し、TEタンパク質発現促進効果も高かった。以上から、ヒト真皮線維芽細胞においてholo-LfとTGF- $\beta$ 1はそれぞれPI3K/Akt1シグナル経路とPI3K/Akt2シグナル経路を活性化してTE発現を促進することが推測された。

## まとめ

本研究において、Lfがヒト真皮線維芽細胞のECMタンパク質発現を促進する効果を有することがわかった。このうち、LfのLOX、FBLN5、FBN1、TEのmRNA発現促進効果は今までにない知見であった。LOX、FBLN5、FBN1、TEはエラスチン形成に必須であることから、Lfがエラスチン形成を促進すると予想した。そこで、 $\alpha$ -エラスチンを染色し、エラスチン形成を確認したところ、Lfによってエラスチン形成が促進されていることを確認した。一方、ECMのうち、TE発現が特に顕著に促進されることから、LfのTE発現メカニズムを検討した。その結果、LfがLRP-1を介してTE発現を促進することが判明し、さらにその分子機構にPI3K/Akt1シグナル経路の活性化が関与することが示唆された。本研究において、Lfがしわ改善などの皮膚外用剤の応用が期待できることが示唆された。

## 審査結果の要旨

ヒトの真皮中に存在する線維芽細胞は、細胞外マトリクス（ECM）の構成成分であるコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸を産生し、皮膚の形状維持や弾力性保持などに重要な役割を果たしている。エラスチンは皮膚におけるECM成分のうち2～5%だけしか占めないが、紫外線や加齢によって変性あるいは減少すると、しわやたるみを発生させることから、皮膚の老化と深く関わっていると推測されている。エラスチンは前駆体であるトロポエラスチン（TE）として線維芽細胞によって生成される。細胞外へ分泌されたTEはリシルオキシダーゼ（LOX）によって架橋されてから、フィブリン-5（FBLN5）と結合し、さらにフィブリン-1（FBN1）を足場として集合し蓄積することでエラスチンを形成する。生体内におけるTEの発現調節は主にトランスフォーミング増殖因子（TGF）- $\beta$ 1によって行われていると考えられており、TEの発現促進に寄与する他の因子に関する報告はほとんどない。ラクトフェリン（Lf）は母乳、羊水、涙液などに存在する80 kDaの糖タンパク質であり、抗菌、抗炎症、抗癌活性などの様々な機能を有する。Lfは皮膚の線維芽細胞の増殖および細胞遊走を活性化するが、ECMタンパク質の発現におよぼす影響は不明である。そこで、本研究では、Lfがヒト由来真皮線維芽細胞のECMタンパク質発現におよぼす影響について評価し、さらに特に発現レベルの変動したTEに着目し、LfがTE発現を調節する分子機構を解明することも目的とした。

第1章では、真皮線維芽細胞におけるコラーゲンやエラスチンのようなECM構成タンパク質やECM構成因子であるヒアルロン酸を合成する酵素（HAS）の発現におよぼすLfの作用を評価した。その結果、Lfによってコラーゲン、HAS2、LOX、FBLN5、FBN1、TEなどのmRNA発現が有意に増加することが判明した。このうち、TEのmRNA発現が最も顕著であり、Lfの濃度に依存して増加した。またTE

のタンパク質レベルは、Lfの処理時間と濃度に依存して増加した。以上の結果より、Lfが真皮線維芽細胞のECMタンパク質の発現を増加させ、特にTEの発現を促進することを示した。

第2章では、*in vitro*の皮膚モデルであるTestskin LSE-highを用いてLfの経皮での吸収およびLfのTE発現におよぼす効果を評価した。Lfが真皮中の線維芽細胞に対する効果を発揮するためには、皮膚表面のバリア層における経皮吸収を高める必要がある。経皮吸収促進剤として糖脂質型界面活性剤であるソホロースリピッド(SL)によるLfの経皮吸収におよぼす影響を検討した。その結果、SLはLfの経皮吸収量を最大で1.7倍までに増加した。また、SL存在下でもLfによるコラーゲン、HAS2、LOX、FBLN5、FBN1、TEのmRNA発現増強効果は維持された。さらに、Lfはエラスチン線維の可溶性フラグメントである $\alpha$ -エラスチン量を増加してエラスチン形成を促進し、SLはLfによる $\alpha$ -エラスチン増加効果を促進した。以上の結果から、SLがLfの経皮吸収を高め、真皮線維芽細胞のLfによるTE発現を増強し、エラスチン形成促進効果を高めることを示した。

第3章では、LfがTE発現を促進する分子機構を検討した。真皮線維芽細胞においてLfがAkt1とERK1/2のリン酸化を促進したが、MEK阻害剤ではなく、PI3K阻害剤がLfによるTEの発現促進を阻害すること明らかにした。さらにLfレセプターとしてこれまで同定されている複数のタンパク質のうち、真皮線維芽細胞でリポタンパク質受容体関連タンパク質-1(LRP-1)が発現していることを見出した。LRP-1に対する阻害剤とsiRNAを利用して、LRP-1がLfによるTE発現に関与することを明らかにした。TE発現の主要な調節因子であるTGF- $\beta$ 1はAkt1ではなく、Akt2のリン酸化を促進した。一方、LfはAkt2のリン酸化を促進しなかったことから、LfとTGF- $\beta$ 1によるTE発現調節機構は異なるPI3K/Aktシグナルを介していると推測した。以上の結果から、真皮線維芽細胞においてLfはLRP-1を介してPI3K/Akt1シグナル経路を活性化し、TE発現を促進することを示唆した。

以上、本研究は、Lfが真皮線維芽細胞におけるECMタンパク質の発現を促進する効果を有しており、特にTE発現の増加に寄与することを証明した。また*in vitro*の皮膚モデルを利用して、SLがLfの経皮吸収促進効果をもち、TE発現をより促進させることを明らかにした。さらにLfによるTEの発現促進機構として、LRP-1を介したPI3K/Akt1シグナル経路の関与の可能性を示した。これらの成果は、生化学、細胞生物学、生理学の分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。