

女性ホルモンが皮膚のターンオーバーに及ぼす影響の検討

— 表皮細胞の生成・成熟・剥離過程に及ぼすエストラジオールの効果 —

萩原 康子^{*1} 西田 昌司^{*2}

Effects of Female Hormone on Turnover of Epidermis:

Analysis on Production, Maturation, and Desquamation of Keratinocytes

HAGIHARA Yasuko^{*1} NISHIDA Masashi^{*2}

*1 神戸女学院大学大学院 人間科学研究科 博士前期課程 修了生、大阪大学大学院 医学系研究科 技術補佐員

*2 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 教授

連絡先：西田昌司 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
mnishida@mail.kobe-c.ac.jp

要 旨

女性ホルモンのエストロゲンの増減が引き起こす皮膚の変化として、表皮の再生能力（ターンオーバー）の変化が挙げられる。従来、エストロゲンが増加すると表皮細胞の増殖が促進し、ターンオーバーが早まると考えられてきた。しかし、表皮のターンオーバーは、基底層での細胞増殖、有棘層でのケラチン（K10）合成、顆粒層での細胞死（アポトーシスとネクローシス）、角質層での蛋白分解酵素（KLK8）による切断というように、表皮を作る各細胞層に特徴的な分子機構が存在しているにもかかわらず、細胞増殖以外に及ぼすエストロゲンの効果については解明されていなかった。

そこで、エストロゲンが表皮ターンオーバーにどのように関与するかを調べるため、胎児ラット表皮由来細胞株で作成した培養モデルにおいて、代表的なエストロゲンである 17β エストラジオールが、ターンオーバーの各過程にどのような影響を及ぼすかを検討した。

17β エストラジオールは、培養表皮細胞の細胞増殖とK10合成、細胞死、KLK8活性の何れをも促進した。また、エストロゲン受容体阻害剤 ICI182780 を添加すると、 17β エストラジオールによって促進した細胞増殖とアポトーシス、KLK8活性が抑制されたことより、これらの過程は細胞内のエストロゲン受容体を介して起こって居ることが明らかとなった。さらには植物エストロゲンであるイソフラボン類のダイゼインを用いて同様の検討を行ったところ、細胞増殖とアポトーシス、KLK8活性が促進されることも確認できた。

これらの知見を総合すると、女性ホルモンが表皮細胞の生成、成熟、剥離のいずれにおいても重要な役割を果たし、表皮ターンオーバーの促進に関与していることが明らかになった。また、ダイゼインがエストロゲンと類似の効果を示したことより、イソフラボンを含む食事を摂取することによって、閉経等における女性ホルモンの減少を補充することが出来る可能性が示唆された。

キーワード：表皮、角化細胞、ターンオーバー、エストロゲン、イソフラボン

Abstract

Estrogen, one of the female hormones, accelerates cellular movement from the basal to the horny layer of female skin by activating turnover of epidermal cells. Turnover consists of four steps; 1) cell division on basal membrane, 2) desmosome formation in stratum spinosum, 3) cell death via apoptosis at stratum granulosum, and 4) detachment from stratum corneum. We examined whether estrogen can activate each step of turnover using cellular models of cultured epidermal cells.

We added 17β estradiol (0~1nM), the most abundant estrogen in human blood, to cultured fetus rattus skin keratinocytes (FRSK) and measured mitochondrial activity by WST-1 method as a maker of cell division, keratin 10 expression by immune-staining as a marker of desmosome formation, nuclear staining with fluorescent dye, Hoechst 33342, as a marker of apoptosis, and kallikrein 8 activity as a marker of proteolytic detachment.

17β estradiol (0~1nM) increased cell division of cultured FRSK as reported previously. Additionally, 17β estradiol increased keratin 10 production, apoptotic cell number and kallikrein 8 activity of FRKS in a dose dependent manner. When FRSK were incubated for 30 minutes with ICI182780 (1uM), a competitive inhibitor of estrogen receptors, prior to the addition of 17β estradiol, augmentation of each marker of epidermal turnover by estrogen was abolished effectively, indicating that estradiol activates epidermal turnover via receptor-mediated pathway. We examined the effects of daidzein, one of the typical phytoestrogens contained in soybeans, on these cellular models. Daidzein (0~1uM) also increased cell division, apoptosis and kallikrein 8 activity of FRSK.

These results suggest that turnover of epidermis is regulated by female hormones via the estrogen receptor, and estrogen augments epidermal turnover. A decreased level of estrogen after menopause can be supplemented with a diet containing a high amount of phytoestrogens and the diet may also improve the reduction of turnover in the skin of elderly women.

Key words: epidermis, keratinocyte, turnover, estrogen, isoflavone

1 背景

1.1 表皮の構造と機能¹⁾

皮膚は体内と外界の環境を隔て、人体の恒常性を維持する重要な役割を担っている。中でも表皮は、皮膚の最外層として外界と直に接し、水分の蒸発や異物の侵入、紫外線照射などの外部環境のストレスから人体を防御する。表皮を構成する細胞の95%はケラチノサイト（角化細胞）であり、皮膚の深部から順に成熟段階の異なる細胞が4つの層状に配列している。

最も深部に存在する基底層は、表皮細胞の幹細胞を含む1層の基底細胞からなる。基底細胞は立方体から円柱状の細胞であり、細胞質内に存在するケラチン線維が束となり、核周辺に分布する細胞骨格を形成している。その上部にある有棘層は、下層では多角形であるが上層へ向かうに従い扁平となる。その際、細胞質内のケラチン線維がさらに合成される。3番目に位置する顆粒層は、核も含めてさらに扁平となり、細胞死を起こす。最上層の角質層は、脱核した死細胞が重層化し、表層から順にいわゆる“垢”として剥離する。

1.2 表皮のターンオーバー機構

このように皮膚の四層構造は、基底層で表皮細胞が生成し、上層へ向かって移動しながら成熟し、角質層で剥離することによって形成されるが、この過程をターンオーバーと呼ぶ。皮膚組織の中で増殖できる細胞は、基底層に存在しする基底細胞のみであり、真皮に接した基底膜上で未分化な幹細胞として振る舞う (Fig. 1①)²⁾。基底細胞の分裂には方向性があり、基底膜に対して平行あるいは垂直に分裂する。平行分裂は対称分裂であり、2つの娘細胞は共に基底膜に接するために増殖能を維持する。一方、垂直分裂は非対称分裂であり、1つの娘細胞は表皮の幹細胞として基底膜にとどまり、基底膜から解離したもう1つの娘細胞は増殖を停止して上層へ移動して行く³⁾。

基底層から離れた細胞は、角化細胞に強度を与え、バリアとしても働くケラチン蛋白質を合成する (Fig. 1②)。ケラチン蛋白の合成は、表皮の基底膜直下まで達している毛細血管より供給されるアミノ酸を材料とし、遺伝情報に従って転写・翻訳される。ターンオーバーの過程において、表皮の各層では特異的なケラチンが形成される。有棘層ではケラチン1 (K1) とケラチン10 (K10) が発現することが報告されている。K1やK10の遺伝子に異常が存在すると、ケラチンの網目構造の崩壊と滴状化を引き起こすことが報告されている⁴⁾。

顆粒層では、表皮細胞の細胞死が起こる (Fig. 1③)。細胞死には、アポトーシスとネクローシスの2種類がある。アポトーシスはプログラムされた死であり、まず核の断片化が起こり、核と細胞が縮小する。一方のネクローシスは外的な要因による死であり、細胞全体もミトコンドリアも徐々に膨化する。その後細胞質が変化し、最終的には細胞膜が破裂する。表皮ではアポトーシスとネクローシスの両方が起こり、これによって表皮細胞は消失してケラチンのみが残る。従って表皮が正常なバリア機能を有するためには、分裂する細胞の数と死滅する細胞

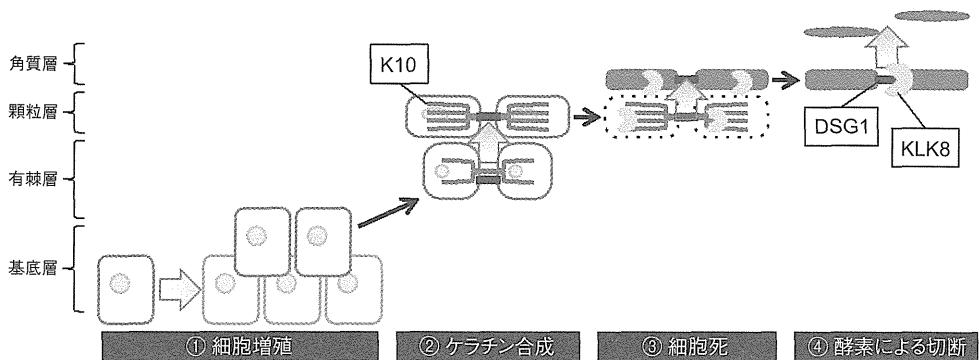


Fig. 1 ターンオーバーの分子機構

(死細胞) の数を平衡化させ、細胞数を恒常的に維持しなくてはならない。顆粒層でアポトーシスが誘発されると、死細胞は押し出されて細胞数が制御される⁵⁾。

このようにして顆粒層で死細胞となった表皮細胞が積み重なり、蛋白質同士が結合して角質層となる。さらに蛋白分解酵素が細胞の「死骸」を繋ぐ接着分子を切断することで、垢となって剥離する (Fig. 1④)。表皮細胞間の接着構造は、細胞内のケラチンと細胞間接着分子であるデスマogleイン (DSG) からなるデスマosomeによって形成されている。角質層のコルネオデスマosomeは DSG1からなり、これを切断する酵素は、表皮に発現するトリプシン様活性を持つセリンプロテアーゼ、カリクレイン (KLK) である⁶⁾。一定期間が過ぎると、角質層のコルネオデスマosomeが分解され、細胞の死骸が体表より順次剥離することにより、角質層の厚さが一定にたもたれる。ヒトおよびマウス皮膚では、顆粒層から角質層に局在する KLK8が DSG1を分解することにより、剥離が生じると考えられている⁷⁾。

1.3 表皮ターンオーバーの評価法

このように、細胞レベルでのターンオーバーは、①細胞増殖、②ケラチン合成、③細胞死、④蛋白分解酵素による切断の四段階によって行われているにも関わらず、先行研究では表皮細胞の細胞増殖や細胞面積のみを指標としてターンオーバーの速度や程度を評価してきた。この様な評価法では、細胞増殖の促進によって細胞数が増加し、細胞面積が減少した場合にはターンオーバーが亢進したと判断する。しかし、たとえ細胞増殖が促進してもケラチンの合成が減少すれば、表皮の構造が維持できずにしわやたるみを生じる。また、細胞死が減少すれば細胞数の恒常性が維持できなくなり、KLK が減少すれば剥離が阻害されて表皮が肥厚すると予測される。実際、表皮のターンオーバーの変化は様々な皮膚疾患を引き起こす。早いターンオーバーでは、未熟な表皮細胞が角質にならないうちに外界にさらされることになる。さらに過剰なターンオーバーは、アトピー性皮膚炎の病態を引き起こす。一方、遅いターンオーバーでは、垢となって剥がれるべき角質が残留して肥厚する。さらに異常な遅延は、乾癬や角化症などを引き起こす。よって、細胞増殖以外の指標も、正常なターンオーバーを考える上で必要不可欠な因子である。ケラチン合成と細胞死、蛋白分解酵素による切断は、尋常性乾癬やアトピー性皮膚炎などの原因解明やそれに対する治癒法の研究において個別に検討されているが、包括的

な皮膚ターンオーバーの評価法としては確立されていない。

1.4 女性ホルモンと表皮のターンオーバー

これらのターンオーバー異常の一因として数多く研究されているのが、女性ホルモンのエストロゲンである。人の血中エストロゲンには、エストロン、エストラジオール、エストリオールの三種があるが、その血中濃度は性成熟期では約1 nMまで増加し、老年期では約0.01nMまで減少するとされている。女性の思春期から性成熟期におこるエストラジオールの増加はターンオーバーを促進し、閉経期から老年期に生じるエストラジオールの減少はターンオーバーを抑制することにより、皮膚の生理的な新陳代謝を制御すると考えられている。

エストラジオールは、細胞内に存在するエストロゲン受容体に結合して作用する。エストロゲンと結合したエストロゲン受容体は2量体を形成し、遺伝子上のエストロゲン応答配列(ERE)に結合して標的遺伝子の発現量を転写レベルで制御する⁸⁾。表皮細胞におけるエストラジオールの作用として報告されているのは、表皮細胞の細胞増殖の促進である⁹⁾。エストラジオールがエストロゲン受容体に結合すると、細胞分裂を制御する遺伝子や転写因子などを活性化し、細胞増殖を促進することが報告されている¹⁰⁾。しかし、正常な皮膚の表皮ターンオーバーでみられるケラチン合成と細胞死、蛋白分解酵素による切断に対するエストラジオールの効果は報告されていない。

1.5 植物エストロゲンと表皮

エストラジオールは内分泌系によって内因性に産生されるエストロゲンであるが、植物エストロゲンも、エストラジオールと同様にエストロゲン受容体に結合して細胞に作用することが知られている。典型的な植物エストロゲンとしてはイソフラボンが挙げられるが、なかでも大豆の主要成分であるダイゼインはエストラジオールと構造が似ているため、動物やヒトのエストロゲン受容体に結合して作用する。ただし、受容体への結合能は、エストラジオールの1000分の1程度である¹¹⁾。

従ってダイゼインは、女性ホルモンと同様に乳癌や骨粗鬆症、さらには動脈硬化、虚血性心疾患、2型糖尿病などの疾患に効果があると期待されている。アメリカの心臓病学会の栄養委員会は、虚血性心疾患の予防にダイズの摂取を推奨する宣言を出した。最近、中国で行われた大規模臨床試験では、ダイズ摂取の多い人に虚血性心疾患の発症が少なく、ダイズ摂取が虚血性心疾患の発症を減らすことが報告された。またダイズには高脂血症改善作用があり、骨粗鬆症や2型糖尿病にも有効とされている¹¹⁾。

食事による植物エストロゲンの摂取で女性ホルモンの不足を補うことが期待されるため、表皮ターンオーバーに及ぼすダイゼインの効果を検討することは有意義である。しかし、ダイゼインがエストロゲン受容体活性を有するヒト乳癌細胞株であるMCF-7細胞の増殖を促進させることは先行研究で確認されているが¹²⁾、皮膚の表皮細胞に対する効果は確認されていない。また、ケラチン合成、細胞死、蛋白分解酵素による切断についてもまだ検討されていない。

2 目的

従って本研究では、女性のライフステージにおける女性ホルモンの変化が皮膚の表皮ターンオーバーに及ぼす影響を、表皮細胞の生成、成熟、剥離の視点から検討するとともに、構造の類似したイソフラボンでも同様の効果が得られるかを検討することで、食生活習慣によって皮膚ターンオーバーを改善する可能性を検討する。そのため、下記の三つの観点から、実験を進めていく。

I. ターンオーバーモデルの作成

培養表皮細胞を用いて、従来から検討されていた①細胞増殖のみではなく、②ケラチン合成、③細胞死、④細胞剥離までを含むターンオーバーの4つのメカニズムを再現した包括的な細胞モデルを作成する。

II. エストラジオールの効果とエストロゲン受容体阻害の検討

作成したターンオーバーモデルを用いて、①②③④に及ぼすエストラジオールの影響を検討する。さらに、ICI182780を使用したエストロゲン受容体の阻害実験を行い、エストラジオールの作用機序を証明する。ICI182780は、エストロゲン受容体に対する拮抗阻害剤として働く。そのため、ICI182780添加によってエストラジオールはエストロゲン受容体に結合できなくなり、細胞はエストラジオールの作用を受けなくなる。そのため、エストラジオールの作用がエストロゲン受容体を介したものであるかを検討する際には、ICI182780を用いる。

III. ダイゼインの効果の検討

作成したターンオーバーモデルを用いて、①②③④に及ぼす植物エストロゲン、ダイゼインの影響を検討し、エストラジオールの効果と比較する。

3 ターンオーバーモデルの作成

本研究では、表皮細胞として Fetus Rattus Skin Keratinocyte (FRSK) と呼ばれる胎児ラット表皮由来細胞株を用いた。FRSK は10%牛胎児血清 (FBS) を含むダルベッコの改変最少培地 (DMEM) で培養し、継代を繰り返すことで半永久的に細胞を増殖させることができる。まず、安定した培養と細胞増殖を行うための播種密度を、WST-1試薬法 (TAKARA MK400 Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System) を用いた細胞増殖能の測定により決定した¹³⁾。一方、組織としての表皮は、基底層で細胞増殖が行われ、上層に移行するにつれて細胞増殖が停止して分化する。その原因として、表皮細胞は真皮の毛細血管から栄養を供給されるが、上層に行くほどその濃度が低下する事が挙げられる。この状況を培養細胞で再現するために、本研究では、FRSK を高栄養の10% FBS/DMEM で培養した後に低栄養の0.5% FBS/DMEM に変更し、細胞増殖と細胞増殖の停止、分化が再現できているかを、WST-1試薬法で確認した。

まず、培養表皮細胞を 3.1×10^4 個/cm²で播種すると対数増殖を開始し、培養42時間後にコンフルエント状態となることが顕微鏡の観察で確認できた (Fig. 2a)。また、WST-1試薬法で細胞増殖を定量すると、培養42時間後に増殖のピークがくることが確認できた。培養42時間以

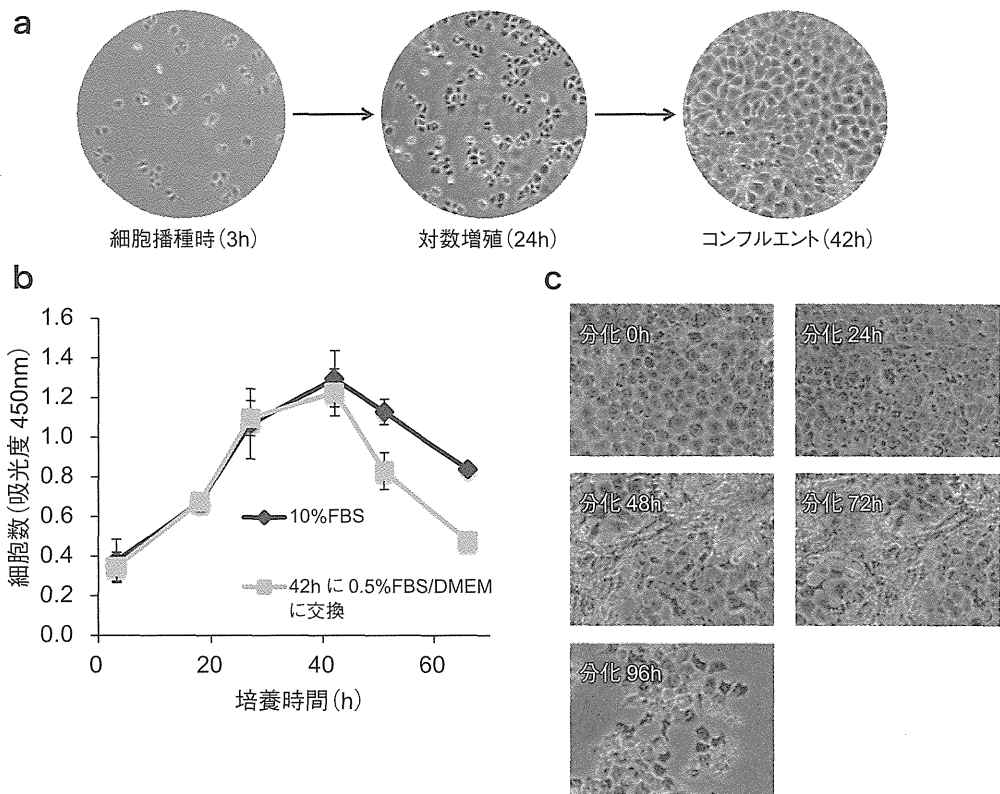


Fig. 2 ターンオーバーモデルの作成

- a, FRSK の細胞増殖 (顕微鏡観察) b, 表皮の細胞増殖に及ぼす培地中の FBS の影響 (n=3)
c, 0.5% FBS/DMEM に培地交換後の細胞形態

降では、細胞増殖が低下していった。

次に、細胞を 3.1×10^4 個/cm² で播種後、10% FBS/DMEM で培養を続ける場合と培養42時間に0.5% FBS/DMEM に交換して培養を続ける場合の二つの条件において、培養3、18、27、42、51、66時間毎の細胞増殖能を測定した。10% FBS/DMEM で培養を続けた場合、42時間にピークを迎え、それ以降の増殖能は徐々に落ちていくが、増殖が活発な培養18、27時間と同じ値であるため、ゆるやかな増殖が続いていると考えられる。一方、培養42時間に0.5% FBS/DMEM に交換して培養した場合では、培地交換の24時間後には細胞が増殖を開始する播種後3時間の値と同じであるため、細胞増殖能が抑制されたことが示唆される (Fig. 2b)。

細胞密度 3.1×10^4 個/cm² で播種して42時間後に0.5% FBS/DMEM に培地交換をし、細胞増殖能が落ちた24時間後を分化0時間とした。分化0、24、48、72、96時間に顕微鏡による細胞観察を行うと、分化24時間までは細胞に変化は見られないが、分化48時間から72時間にかけて細胞の凝集が観察され、分化96時間には細胞が浮遊したことから、剥離状態となることが確認できた (Fig. 2c)

本実験で細胞分裂能の測定に用いた WST-1法は、生細胞の持つミトコンドリア活性を定量する。従って、細胞分裂が盛んに生じている状態ではミトコンドリア活性が細胞数に比例するため、WST-1法は細胞数の指標となる。本実験での播種後42時間まではこの状態を表す。一方、細胞が培養容器の全面を占めるコンフルエント状態を過ぎると、細胞は分裂を停止するため、WST-1法はミトコンドリア活性の指標となる。本実験の42時間以降はこの状態に相当しており、細胞の分化状態を表していると考えられる。

本研究では、42時間培養してコンフルエント状態となる 3.1×10^4 個/cm²の播種密度を実験に用いる。1日でコンフルエントになる高い播種密度や、逆に低い播種密度で実験を行うことも可能であるが、細胞接着率や成長率に影響を及ぼすため、 3.1×10^4 個/cm²を最も安定した播種密度として培養を行う。

培養表皮細胞を播種して42時間後にコンフルエント状態となり、10% FBS/DMEM から0.5% FBS/DMEM に交換することで、その24時間後には細胞増殖が完全に止まることが確認できた。よって、播種してコンフルエント状態までを基底層での細胞増殖期とし、0.5% FBS/DMEM に交換した24時間後以降を有棘層から角質層への分化過程としてプロトコールを設定することで、ターンオーバーモデルを作成する。さらに分化96時間に培養表皮細胞がディッシュの底から剥がれて浮いてきている様子が確認できたため、分化96時間には角質層が再現できていると考えた。また、予備実験でこのターンオーバーモデルを用いて表皮細胞のケラチン合成と細胞死を検討したところ、分化0時間から48時間に有棘層で特異的な K10が合成され、分化72時間で急激にアポトーシスとネクローシスが起これ、分化96時間では細胞が剥離してほぼ見られなかった。よって、本研究では、0.5% FBS/DMEM に交換した24時間後を分化0時間とし、分化0から48時間までを有棘層におけるケラチン合成、分化0から72時間までを顆粒層における細胞死、分化0から96時間までを角質層における蛋白分解酵素による切断のモデルとして扱っていく。

4 細胞増殖に及ぼすエストラジオールの影響

皮膚組織の中で増殖できる細胞は、基底層で基底膜に接している細胞であり、上層へ分化していく細胞は増殖を停止する。FRSK は細胞密度 3.1×10^4 個/cm²で播種した場合、播種後48時間をピークに細胞増殖能が低下することが明らかとなった。従って、48時間までを基底層モデルとして、エストラジオール (0 ~ 1 nM) が細胞増殖に及ぼす影響を WST-1試薬法で検討した。また、その作用が、エストロゲン受容体を介したものであるかを確かめるため、エストロゲン受容体阻害薬で前処理した条件下で、エストラジオールの作用を検討した。

エストラジオール0.1nM と 1 nM は培養18時間から細胞増殖の促進が見られ、ピークが培養42時間よりも早く来ることが確認できた (Fig. 3a)。また、培養27時間にはエストラジオール 0 nM に対してエストラジオール0.1nM と 1 nM で有意な増殖の促進が見られた。その結果を受けて、ICI182780によるエストロゲン受容体阻害下でのエストラジオール0.1nM が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。エストラジオール0.1nM は、エストラジオール 0 nM と比べて

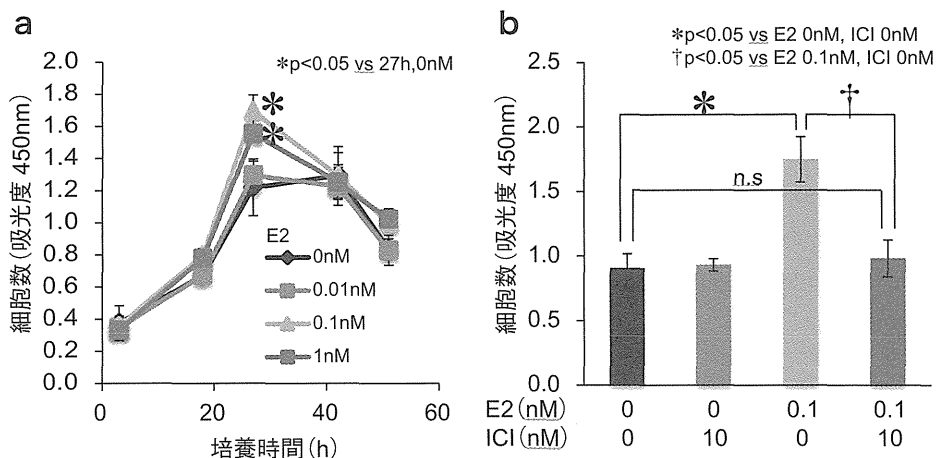


Fig. 3 細胞増殖に及ぼすエストラジオールの影響

a, E2濃度が細胞増殖に及ぼす影響 (n=3) b, ER 阻害下の細胞増殖に及ぼす E2の影響 (n=3)

培養27時間で細胞増殖を有意に促進させたのに対し、ICI182780 10nM 阻害下では、エストラジオール0.1nM 添加による細胞増殖の促進は有意に抑制された (Fig. 3b)。

作成したターンオーバーモデルにおいて女性ホルモンの影響を検討していく際には、細胞を播種した3時間後にエストラジオール0、0.01、0.1、1 nMを添加した。このプロトコルを用いることによって、基底層でエストラジオールを受けた細胞が、基底層での細胞増殖のみならず、その後のケラチン合成、細胞死、蛋白分解酵素にどのような影響を受けるかが実験できるため、1サイクルのターンオーバーを通しての女性ホルモンの影響を検討可能である。

基底層を模擬した培養表皮細胞においては、エストラジオール0.1nMと1 nMは細胞増殖を有意に促進させたが、これは先行研究の結果と一致する。さらに、ICI182780によってエストロゲン受容体を阻害してエストラジオールの影響を検討したところ、細胞増殖の促進が抑制されたため、エストラジオールによる作用はエストロゲン受容体を介して行われていることが証明された。よって、表皮では、毛細血管からエストラジオールを受けた基底層の細胞が増殖を促進させることで、表皮細胞の生成を早めることが示唆される。

エストラジオールは細胞周期調節タンパク質の発現を誘導してヒト表皮細胞の生成を高めるという報告がある。細胞周期では、S期に移行する前のG1期に細胞周期を進めるか否かのチェックポイントが存在し、CDK-サイクリンD2(細胞周期調節タンパク質)によって制御されている。エストラジオールは、ヒト表皮細胞におけるサイクリンD2 mRNAの発現とS期の細胞の割合を増加させること、また、サイクリンD2の発現は転写因子のc-fosによって誘導され、エストラジオールによって活性化されることが確認されている¹⁴⁾。したがって、エストラジオールは表皮細胞のエストロゲン受容体と結合すると、核内に移行して転写因子として働いてc-Fosの発現を誘導し、c-Fosによって発現が亢進するサイクリンD2が細胞周期を進行させることで細胞増殖を促進させるという機序が考えられる。

5 ケラチン合成に及ぼすエストラジオールの影響

K10発現の亢進は、ターンオーバーにおいて角質細胞が基底層から有棘層に移り、分化が進行した指標となる。従って、エストラジオールがケラチン合成に及ぼす影響を、免疫染色法 (NVC NB100-91839 Anti-K10 Rabbit-Poly, SCB SC-2030 Anti Rabbit IGG GoatHRP) で検討した。また、その作用がエストロゲン受容体を介したものであるかを確認するため、培養表皮細胞のエストロゲン受容体を阻害し、エストラジオールによる K10合成量の増加が抑制されるかを検討した。

0.5% FBS/DMEM へのメディウムチェンジの24時間後を分化0時間とし、24時間ごとに分化48時間まで細胞の蛋白を回収した。SDS-PAGE ウェスタンブロットリング法を用いて蛋白質を分離した後、回収したサンプルにおける表皮の分化マーカーである K10を上記の抗体を用いて検出した。最も合成量が亢進する分化48時間の K10合成量を、画像分析によって検討した。エストラジオール 0 nM と比べ、エストラジオールは濃度依存性に K10合成量を増加させる傾向が見られ、エストラジオール 1 nM では有意に合成量が増加した (Fig. 4a)。次に、ICI182780によるエストロゲン受容体阻害下でのエストラジオール 1 nM が K10合成に及ぼす影響を検討した。最も合成量が亢進する分化48時間の K10合成を検討したところ、エストラジオール 0 nM に対して、ICI 100nM が K10合成量を増加する傾向が見られたため、阻害剤自体がケラチン合成に影響を及ぼす可能性が示唆される。それに対し、ICI182780 100nM 阻害下でのエストラジオール 1 nM は K10合成量を抑制する傾向が見られるが、有意差は認められなかった (Fig. 4b)。

有棘層を模擬した培養表皮細胞において、エストラジオール 1 nM は K10の合成量を有意に

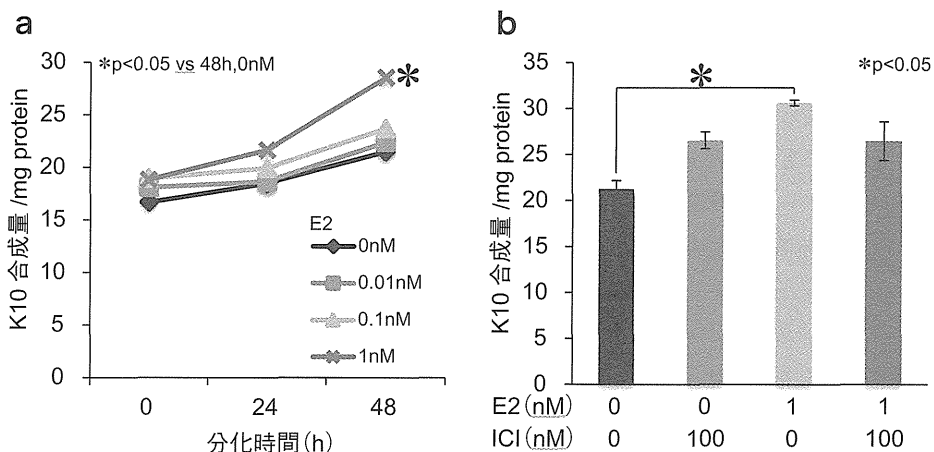


Fig. 4 ケラチン合成に及ぼすエストラジオールの影響

a, E2濃度が K10合成に及ぼす影響 (n=3)

b, ER 阻害下の分化48h の K10合成に及ぼす E2の影響 (n=3)

促進した。従って、毛細血管からのエストラジオールを受けとった表皮細胞は、基底層での細胞増殖の促進を経て、有棘層ではK10合成が亢進する事が示唆される。しかし、ICI182780によってエストロゲン受容体を阻害してエストラジオール 1 nM 添加の影響を検討したところ、ケラチン合成が抑制される傾向は見られるが有意差は認められなかった。ICI182780自体が部分的にケラチン合成を促進したことから、エストラジオールによるケラチン合成の促進が従来の核内エストロゲン受容体を介して行われているかいないかについては、今回の検討から明らかにすることは出来なかった。

エストロゲンが作用するその他の機構としては、細胞膜上のエストロゲン結合部位の存在があげられる。近年、Gタンパク質共役受容体の一種である GPR30が膜上に存在するエストロゲン受容体であり¹⁵⁾、ERK/JNK シグナル調節キナーゼに関与している可能性や、ERK/JNK シグナルを介して生成される AP-1転写因子によって K10の遺伝子発現を誘導させることが確認されている¹⁶⁾。今後、表皮細胞の膜上にある受容体を介したシグナル伝達に及ぼすエストラジオールの作用を検討する必要がある。

6 細胞死に及ぼすエストラジオールの影響

基底層での細胞分裂、有棘層でのケラチン合成を経て上昇してきた表皮細胞は、さらに扁平となっていき、顆粒層では細胞死によってケラチンのみの角質となり、角質層を形成する。従って、エストラジオールが細胞死に及ぼす影響を、蛍光色素 PI (DOJINDO P378-Cellstain- PI solution) による核染色でネクローシス、Hoechst33342 (MP Biomedicals, Inc. 190305) による核染色でアポトーシスを、それぞれ検討した¹⁷⁾。また、その作用が、エストロゲン受容体を介したものであるかを確かめるため、エストロゲン受容体阻害薬の共存下で、エストラジオールによる細胞死の促進が抑制されるかを検討した。

0.5% FBS/DMEM にメディアウムチェンジして細胞増殖を止めた後、分化0時間から72時間まで、24時間毎の死細胞を蛍光色素による核染色で観察した。最も細胞死が多く見られた分化72時間のアポトーシスは、エストラジオール 0 nM と比べてエストラジオール 0.1 nM と 1 nM で有意な促進が見られた (Fig. 5a)。一方のネクローシスについては、エストラジオール 0 nM と比べてエストラジオール 1 nM で有意な促進が見られた (Fig. 5c)。その結果より、ICI182780によるエストロゲン受容体阻害下での細胞死を検討した。エストラジオール 1 nM で増加したアポトーシスは、ICI182780 100 nM による前処理で有意に抑制された (Fig. 5b)。一方のネクローシスについても、エストラジオール 1 nM での細胞死の増加は、ICI182780 100 nM による前処理で抑制される傾向は見られるが、有意差は認められなかった (Fig. 5d)。

顆粒層を模擬した培養表皮細胞においてエストラジオール 1 nM は分化72時間で有意にアポトーシスとネクローシスによる細胞死を増加した。さらに、ICI182780によってエストロゲン受容体を阻害してエストラジオール 1 nM 添加の影響を検討したところ、アポトーシスが抑制されたため、エストラジオールによるアポトーシスの促進はエストロゲン受容体を介して行わ

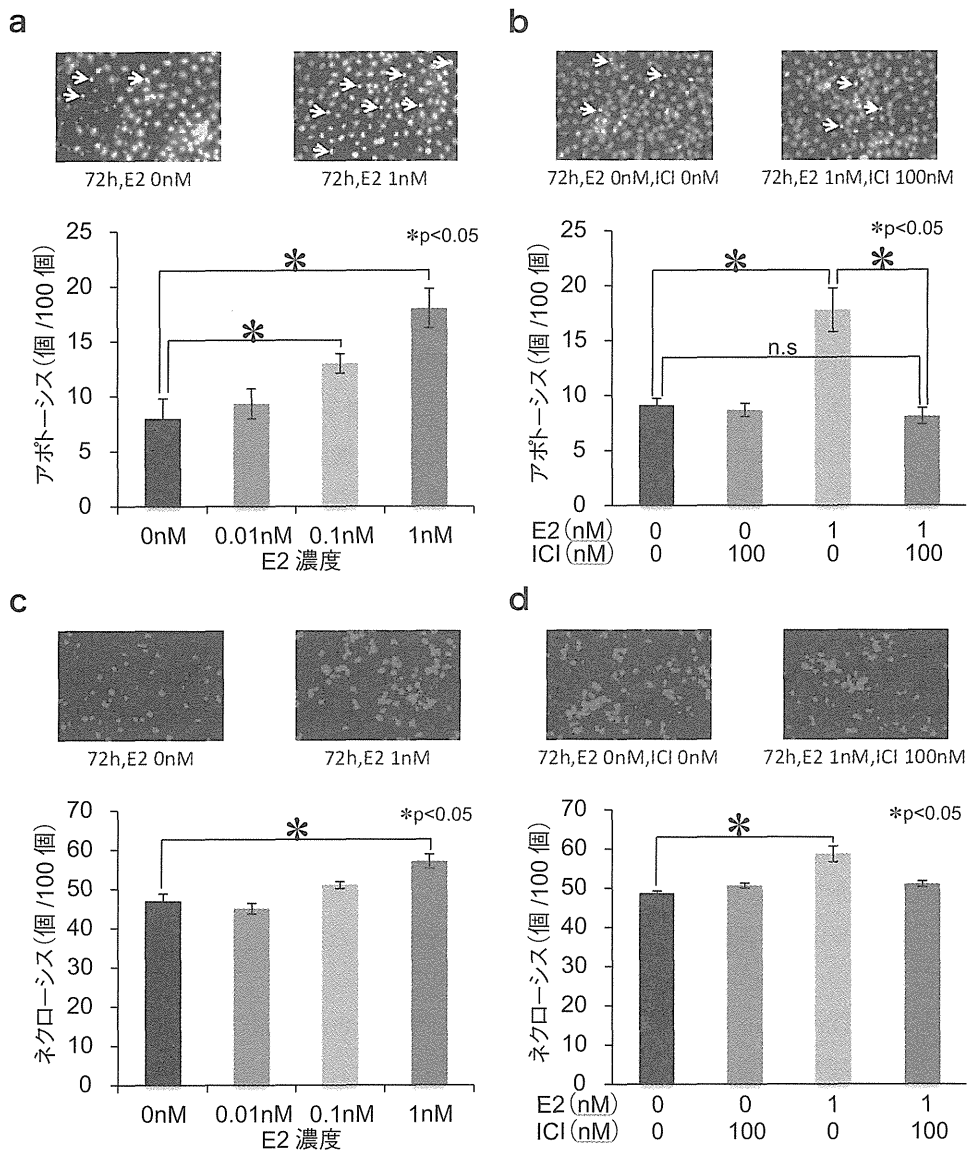


Fig. 5 細胞死に及ぼすエストロジールの影響

- a, E2濃度が分化72hのアポトーシスに及ぼす影響 (n=3)
- b, ER 阻害下の分化72hのアポトーシスに及ぼす E2の影響 (n=3)
- c, E2濃度が分化72hのネクローシスに及ぼす影響 (n=3)
- d, ER 阻害下の分化72hのネクローシスに及ぼす E2の影響 (n=3)

れていることが証明された。一方のネクローシスでは有意な抑制を認めなかったことより、エストロゲン受容体を介した作用ではないと考えられる。以上より、エストロゲンで刺激された培養表皮細胞は、基底層での細胞増殖と有棘層でのケラチン合成を経て、顆粒層におけるアポトーシスとネクローシスによる細胞死を有意に増加させることが示唆された。

アポトーシスが進行する過程では、カスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼが働いて

いる。表皮では、基底層上層で合成されたカスパーゼ14が顆粒層で活性化され、アポトーシスを誘導する¹⁸⁾。よって、アポトーシスとエストラジオールの関係について、エストラジオールはエストロゲン受容体を介してエストロゲン応答配列 ERE に結合し、カスパーゼ14の発現を誘導させることでアポトーシスが促進した機構が推測される。このことを証明するためには、今後カスパーゼ14発現と活性化に及ぼすエストラジオールの影響を検討する必要がある。

阻害実験より、エストラジオールによるネクローシスの促進はエストロゲン受容体を介したのではないことが示唆される。表皮の顆粒層で細胞死が起こると細胞に様々な変化が起こる。接着分子の働きの低下もその一つで、その結果として顆粒層の pH が変動し、ネクローシスの要因となっているのではないかと考えられる。また、エストラジオール 1 nM は 0 nM より細胞増殖を約24時間早めていることも関係している可能性もある。細胞増殖を24時間早めることにより、エストラジオール 1 nM 添加後の分化48時間には、エストラジオール 0 nM の分化72時間のネクローシスに到達していたとも考えられる。

7 蛋白分解酵素に及ぼすエストラジオールの影響

ターンオーバーの最終段階として角質層から「細胞の死骸」が垢となって剥がれる過程は、接着分子 DSG1が蛋白分解酵素であるカリクレイン 8 (KLK8) によって消化されることによって起こる。表皮細胞の剥離はターンオーバーの最終段階として重要であるため、包括的なターンオーバーモデルの作成には、KLK8の活性を検討する必要がある。

これまでの実験と同様に、FRSK を 3.1×10^4 個/cm² で播種した48時間後に FBS 濃度を下げた分化モデルとし、エストラジオールが KLK8の活性に及ぼす影響を蛍光性ペプチド基質 (Boc-Val-Pro-Arg-MCA) を用いた酵素活性測定法で検討した^{19,20)}。

0% FBS/DMEM へのメディアウムチェンジ後の分化 0 時間から96時間まで、24時間毎の KLK8活性を測定した。FRSK は分化96時間に最も高い KLK8活性を示し、エストラジオール 0 nM と比べて 1 nM で有意な促進が見られた (Fig. 6a)。ICI182780によるエストロゲン受容体阻害下での KLK8活性を検討すると、ICI182780 100nM での前処理により、エストラジオール 1 nM で亢進した KLK8活性は有意に抑制された (Fig. 6b)。

表皮のターンオーバーを模擬した培養細胞において、エストラジオール 1 nM は分化96時間で有意に KLK8活性を促進させた。さらに、ICI182780によってエストロゲン受容体を阻害してエストラジオール 1 nM の影響を検討したところ、KLK8活性が抑制されたため、エストラジオールによる KLK8活性の促進はエストロゲン受容体を介して行われていることが証明された。よって、エストラジオールで刺激された表皮細胞は、細胞増殖とケラチン合成、細胞死を経て、蛋白分解酵素による切断が促進されることが示された。

KLK8は有棘層から顆粒層にかけて細胞内で合成され、角質層で細胞外に放出されることによって DSG1を切断する。分化 0 時間の時点でエストラジオールは KLK8活性を亢進することから、エストラジオールは有棘層での KLK8合成をも促進させることが示唆される。今後、

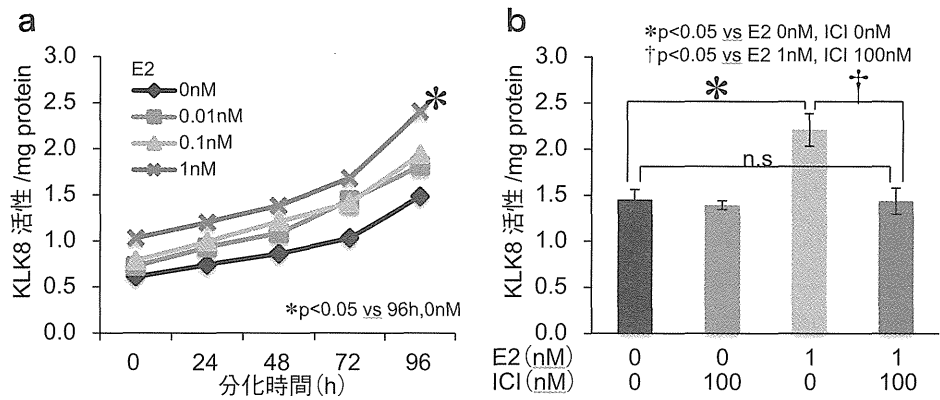


Fig. 6 蛋白分解酵素活性に及ぼすエストラジオールの影響 (n=3)

a, E2濃度がKLK8活性に及ぼす影響 (n=3)

b, ER阻害下の分化96hのKLK8活性に及ぼすE2の影響 (n=3)

KLK8遺伝子上にエストロゲン-エストロゲン受容体が結合するEREが存在するか否かを確認する必要がある。

8 表皮ターンオーバーに及ぼすダイゼインの効果

エストラジオールと類似の構造を持つために、エストロゲン受容体に結合して細胞に作用する物質として植物エストロゲンがある。植物エストロゲンは女性ホルモンと同様に乳癌や骨粗鬆症などの疾患に効果があるとも報告されており、閉経などで低下したエストロゲンを食事から摂取して補うことができると期待されている。その代表例はイソフラボン類のダイゼインであり、ダイズの主要な成分である。表皮ターンオーバーに関係するダイゼインの作用としては、細胞増殖の促進が報告されているが、ケラチン合成、細胞死、蛋白分解酵素による切断についてはまだ検討されていない。本研究では、エストラジオールの検討と同じターンオーバーモデルを用いて、ダイゼイン添加の検討を行った。ダイゼインのエストロゲン受容体への結合能はエストラジオールの1000分の1であるので、ダイゼインは最終濃度0 μ M、0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ Mとなるように、細胞密度 3.1×10^4 個/cm²で播種後3時間のFRSKに添加した。その後、エストラジオールと同様に、細胞増殖、ケラチン合成、細胞死、蛋白分解酵素活性におよぼす影響を検討した。

ダイゼインは、添加濃度依存性にFRSKの細胞増殖を促進した。1 μ Mのダイゼインでは培養18時間から細胞増殖の促進が見られ、培養27時間にはダイゼインを加えない場合と比べて有意に細胞増殖が促進された (Fig. 7a)。また、培養42時間に0.5% FBS/DMEMにメディアウムチェンジをした後、24時間ごとに分化48時間まで回収した蛋白サンプルを用いてケラチン合成量を検討した。ダイゼインを加えない場合と比べて、0~1 μ MのダイゼインはK10合成量を増加させなかった (Fig. 7b)。0.5% FBS/DMEMにメディアウムチェンジをした後、蛍光色素による核染色で細胞死を観察したところ、分化72時間に最も細胞死が見られた。分化72時間の

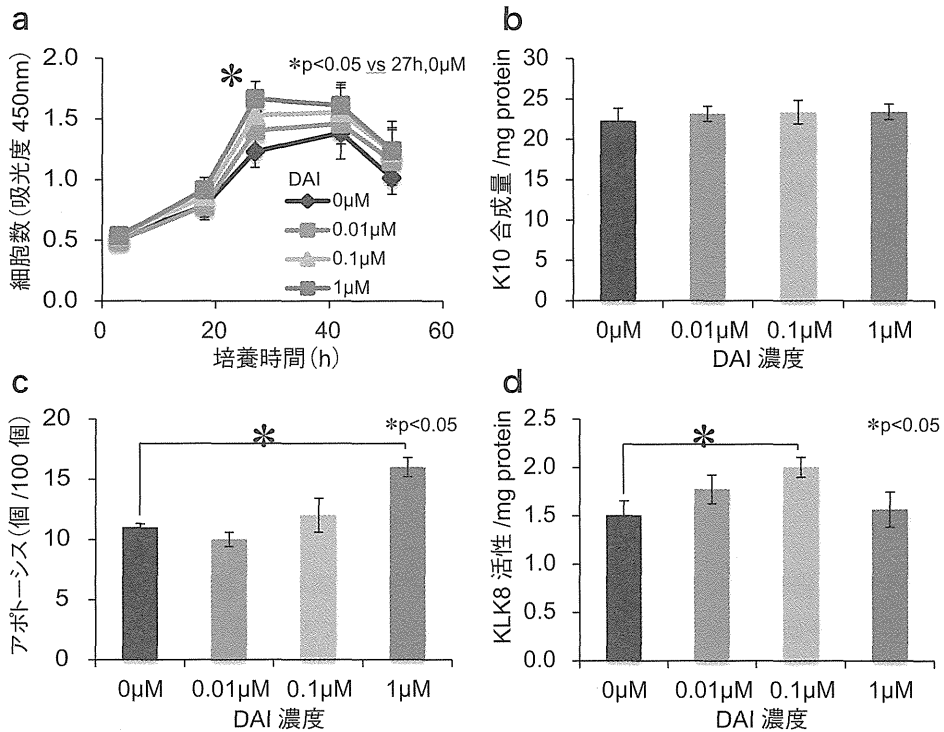


Fig. 7 ターンオーバーに及ぼすダイゼインの影響

- a, 細胞増殖に及ぼすダイゼインの影響 (n=3)
- b, 分化48hのK10合成に及ぼすダイゼインの影響 (n=3)
- c, 分化72hの細胞死(アポトーシス)に及ぼすダイゼインの影響 (n=3)
- d, 分化96hのKLK8活性に及ぼすダイゼインの影響 (n=3)

アポトーシスは、1 μMのダイゼインによって、ダイゼイン0 μMと比べて有意に促進された (Fig. 7c)。ネクローシスについては、ダイゼイン0 μMと比べてダイゼイン1 μMで促進の傾向が見られたが、有意差は認められなかった。さらに、0.5% FBS/DMEMにメディウムチェンジをした後の分化0、24、48、72、96時間に細胞の蛋白を回収し、KLK8活性を蛍光性ペプチド基質を用いて検討した。分化後の時間経過とともにKLK8活性が増加し、最も活性の高い分化96時間では、ダイゼイン0 μMと比べて0.1 μMでKLK8活性の有意な促進が見られた (Fig. 7d)。

以上のようにダイゼインは、基底層を模擬した培養表皮細胞の細胞増殖、顆粒層を模擬した細胞死を、1 μMの濃度で有意に促進した。しかし、有棘層を模擬したケラチン合成は促進しなかった。一方、角質層を模擬した細胞間接着の切断に関しては、ダイゼインは0.1 μMから蛋白質分解酵素のKLK8を有意に活性化した。

このようにダイゼインは、ターンオーバーにおける細胞増殖と細胞死、蛋白質分解酵素による切断において、エストラジオールと類似の作用を示した。その作用機構としては、エストラジオールと同様に毛細血管から基底層の表皮細胞に移行したダイゼインはエストロゲン受容体に

結合し、細胞周期、アポトーシス、KLK8を制御する遺伝子発現を誘導して、それぞれを促進させる機構が考えられる。今後、ICI182780を用いたエストロゲン受容体阻害下でのダイゼインの影響を検討する必要がある。

また、KLK8の活性に関しては、ダイゼインはより低濃度の0.1 μ Mから活性化した。エストロゲン受容体が結合する遺伝子のEREには複数の種類が存在するため、ダイゼイン-エストロゲン受容体の高次構造の結合効率が、細胞増殖、細胞死に関連する遺伝子と比較して高いことが考えられる。

ターンオーバーにおけるケラチン合成に関しては、エストラジオールとダイゼインは異なる結果となった。K10合成は、エストラジオールが細胞膜に存在する受容体GPR30を介してシグナル調節キナーゼを活性化し、その結果として促進される機構が示唆されることから、ダイゼインはGPR30に結合できないためにK10合成に影響を及ぼさなかったと考えられる。

9 総括

本研究では、細胞増殖、ケラチン合成、細胞死、蛋白分解酵素による剥離からなる表皮のターンオーバーの評価法を確立するため、培養表皮細胞を用いてそれぞれのステップを模擬するターンオーバーモデルを作成した。次に、各ステップの指標となる細胞増殖、K10合成、細胞死（アポトーシスとネクローシス）、KLK8活性に対する女性ホルモン（エストラジオール）、およびエストロゲン受容体阻害剤の影響を検討した。また、植物エストロゲンであるダイゼインが、エストラジオールと同様の作用を有するか否かについても検討した。

培養表皮細胞は、コンフルエント状態で培地の血清濃度を下げると、その24時間後には細胞増殖が停止し、さらに6日後には細胞の剥離が観察できたため、これをターンオーバーモデルとして用いた。エストラジオールは、卵胞期の生理的濃度に近い1 nMで、有意に細胞増殖、K10合成量、アポトーシスとネクローシス、及びKLK8活性を促進した。一方、エストロゲン受容体阻害剤のICI182780は、エストラジオールによる細胞増殖、アポトーシス、蛋白分解酵素活性の促進を有意に抑制した。しかし、K10合成量の促進は抑制しなかった。

以上の結果より、表皮細胞のターンオーバーにおけるエストラジオールの作用機構については以下のように考えることが出来る。細胞増殖、アポトーシス、蛋白分解酵素による切断に関しては、エストラジオールがエストロゲン受容体を介してそれぞれ細胞周期を制御する蛋白質、カスパーゼ14、KLK8の遺伝子発現を活性化することによって促進される。一方、ケラチン合成に関しては細胞内のエストロゲン受容体を介していないことから、細胞膜上に存在する他のエストロゲン受容体GPR30を介し、シグナル調節キナーゼを活性化することによって促進される可能性が考えられる。このようなメカニズムにより、女性ホルモンは基底層での表皮細胞の生成と有棘層での細胞接着の強化や顆粒層での細胞死による細胞の成熟、角質層での剥離を亢進し、ターンオーバーを促進させる可能性が示唆された。

同じくエストロゲン受容体を介する細胞増殖、アポトーシス、KLK8活性に対するエストラジオールの効果にも至適濃度の差が生じている。これはエストラジオールが結合する標的遺伝

子のエストロゲン応答配列 (ERE) の違いが関係していると考えられる。エストロゲン受容体はエストラジオールと結合して活性化されると、遺伝子上にある ERE に結合し、標的遺伝子の転写を調節して発現した蛋白によってエストロゲン作用が生じる。この ERE は数種類あるとされており、細胞増殖の促進を誘導する c-fos 遺伝子上にあるエストロゲン応答性シスエレメントと、細胞死の促進を誘導するカスパーゼ14遺伝子上にある ERE、蛋白分解酵素による切断の促進を誘導する KLK8遺伝子上にある ERE ではエストラジオールの結合能が異なる可能性が示唆される。よって、c-fos の ERE は0.1nM、カスパーゼ14と KLK8の ERE は1 nM のエストラジオールの濃度で結合したと推測される。今後、これらの遺伝子上にどのような ERE が存在するかを確認する必要がある。

一方、女性ホルモン様作用をもつとされる植物エストロゲンのダイゼインは、細胞増殖、アポトーシス、KLK8活性を促進したが、K10合成量に影響は及ぼさなかった。従って、ダイゼインは基底層での表皮細胞の生成と顆粒層での細胞死による細胞の成熟、角質層での剥離を促進させ、ターンオーバーを促進させる可能性が示唆された。さらに、女性ホルモンの作用機序としてエストラジオール、ダイゼインともに細胞増殖とアポトーシス、KLK8活性についてはエストロゲン受容体を介した作用機序が考えられる。なかでも KLK8に関してはより低濃度で活性化が起こる事から、異なる結合特性を持つ ERE が KLK8遺伝子の調節領域に存在することが示唆される。今後、エストロゲン受容体阻害下でのダイゼインの影響を検討することにより、確認する必要がある。また、ケラチン合成にダイゼインが影響を及ぼさなかった原因としては、エストロゲンでの検討から示唆されるように、膜受容体である GPR30を介するメカニズムが考えられるため、ダイゼインが結合できなかったと考えられる。

本研究により、表皮細胞の生成にばかり着目されてきた皮膚の表皮ターンオーバーにおいて、表皮細胞の成熟と剥離も指標として取り入れたことで、女性ホルモンが四つの段階に分かれるターンオーバーを通じて、促進に働くことが示唆された。ターンオーバーが関与する皮膚疾患の研究においても、表皮細胞の生成・成熟・剥離の視点から検討が行われることに期待したい。また、表皮ターンオーバーに関してダイゼインも女性ホルモンと類似した効果を発揮したことによって、食事という生活習慣による女性ホルモンの補充が可能であると考えられる。実際、豆腐なら半丁、納豆なら一パックでダイゼインの血中濃度を1 μ M にすることが可能である。女性のライフステージにおける女性ホルモンの変化が表皮のターンオーバーに及ぼす影響を、イソフラボンを摂取することによって生活習慣から改善することが期待される。

参考文献

- 1) 清水宏『あたらしい皮膚科学』(2009) 中山書店 p.1-9
- 2) Elizabeth Clayton "A Single Type of Progenitor Cell Maintains Normal Epidermis." (2007) *Nature* 446 185-189
- 3) Terry Lechler "Asymmetric Cell Divisions Promote Stratification and Differentiation of Mammalian Skin."

- (2005) *Nature* 437 275-280
- 4) 片方陽太郎『ケラチン蛋白質の生化学』(1993) 蛋白質核酸酵素 38(16) 2711-2722
 - 5) George T. Eisenhoffer “Crowding Induces Live Cell Extrusion to Maintain Homeostatic Cell Numbers in Epithelia.” (2012) *Nature* 484 542-545
 - 6) 北鳥康雄『皮膚バリア機能とその制御』(2007) *Drug Delivery System* 22(4) 424-432
 - 7) Mari Kishida “Kallikrein 8 Is Involved in Skin Desquamation in Cooperation with Other Kallikreins.” (2007) *Journal of Biological Chemistry* 282 5834-5841
 - 8) 池谷雄二『現代医療エストロゲンの基礎と臨床』(1997) 現代医療 29(10) 2-40
 - 9) Susan Stevenson “Effect of Estrogens on Skin Aging and the Potential Role of SEMs. (2007) *Clinical Interventions in Aging* 10(4) 283-297
 - 10) S. Verdier-Sevrain “Estradiol Induces Proliferation of Keratinocytes via a Receptor Mediated Mechanism.” (2004) *The FASEB Journal* 18(11) 1252-1254
 - 11) 関沢純『植物エストロゲン物質の日本人の健康への定量的リスク・ベネフィット解析』(1999) 日本リスク研究学会誌 11(1) 75-82
 - 12) 山田耕路, 韓 達昊, 宮崎義之他『ヒト乳がん MCF-7細胞の増殖に及ぼすイソフラボンの作用』(2000) 大豆たん白質研究 3(21) 54-58
 - 13) タカラバイオ株式会社『Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System 説明書』(2012) http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFFiles/MK400_j.pdf
 - 14) Naoko Kanda “17 β -Estradiol Stimulates the Growth of Human Keratinocytes by Inducing Cyclin D2 Expression.” (2004) *Journal of Investigative Dermatology* 123 319-328
 - 15) CS Liverman “Role of the Estrogen Receptors GPR30 and ERalpha in Peripheral Sensitization: Relevance to Trigeminal Pain Disorders in Women.” (2009) *Cephalalgia* 29(7) 729-41
 - 16) E J Filardo “Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF.” (2009) *Mol Endocrinol* 14(10) 1649-60
 - 17) 株式会社同仁化学研究所『細胞染色プロトコル』(2007) <http://www.dojindo.co.jp/technical/pdf/catalog-project.pdf>
 - 18) Geertrui Dencker “Caspase-14 Reveals Its Secrets.” (2007) *The Journal of Cell Biology* 180 451-458
 - 19) Takashi Morita “New Fluorogenic Substrates for α -Thrombin, Factor Xa, Kallikreins, and Urokinase.” (1977) *The Journal of Biochemistry* 82(5) 1495-1498
 - 20) Shunichiro Kawabata “Difference in Enzymatic Properties between α -Thrombin Staphylocoagulase Complex and Free α -Thrombin.” (1985) *The Journal of Biochemistry* 97(4) 1073-1078

(原稿受理日 2013年3月4日)