

博士論文

肥満の皮膚における真皮コラーゲン密度に対する
ヘムオキシゲナーゼ1プロモーター領域 GT 繰り返し配列の関与

伊吹 愛

肥満の皮膚における真皮コラーゲン密度に対する
ヘムオキシゲナーゼ1プロモーター領域 GT 繰り返し配列の関与

伊吹 愛

肥満の皮膚における真皮コラーゲン密度に対する
ヘムオキシゲナーゼ1プロモーター領域 GT 繰り返し配列の関与

所属：健康科学・看護学専攻 老年看護学分野

指導教員：真田 弘美 教授

申請者：伊吹 愛

目次

要旨

序論

1. 肥満による皮膚への影響	1
2. 肥満の皮膚におけるコラーゲン密度の低下	1
3. 肥満の皮膚のコラーゲン密度低下における酸化ストレスの関与	3
4. 目的	6

第1章 慢性および急性的酸化ストレス下の皮膚における HMOX1 の発現比較

1. 背景	8
2. 方法	10
1) 供試動物	10
2) 処理	11
3) mRNA 発現解析	11
4) 組織学的解析	13
5) 免疫組織化学	13
3. 統計解析	14
4. 結果	14
1) 組織学的解析	14
2) mRNA 発現解析	15
3) 免疫組織化学	15
5. 考察	16

第2章 肥満者における真皮コラーゲン密度に対する *HMOX1* プロモーター領域 GT
繰り返し配列の関与

1. 背景	20
2. 方法	22
1) 研究デザイン	22
2) 対象者	22
3) 調査項目	23
4) 解析	28
5) 倫理的配慮	29
3. 結果	29
1) 対象者の選定方法	29
2) 対象者の概要	30
3) 対象者のアリの分布	30
4) GT 繰り返し数と <i>HMOX1</i> mRNA 発現解析対象者の基本属性	31
5) GT 繰り返し数と <i>HMOX1</i> mRNA 発現量の相関	31
6) Long アリの有無と <i>HMOX1</i> mRNA 発現量との関連	31
7) 対象者の遺伝子型の分布	32
8) 遺伝子型と <i>HMOX1</i> mRNA 発現量との関連	32
9) Long アリ保有頻度の解析における対象者の基本属性	32
10) 肥満の有無による Long アリ保有割合の比較	33
11) 超音波画像タイプ別対象者の基本属性	34
12) 超音波画像タイプ別 Long アリ保有頻度の比較	34
4. 考察	35
1) 本研究のオリジナリティ	35
2) 本研究で明らかになった知見	35

3) 看護実践への提言	38
4) 本研究の限界と今後の課題	39
結論	42
謝辞	44
参考文献	45

図表

第1章

図 1-1. 組織学的解析

図 1-2. *Hmox1* mRNA 発現レベルの比較

図 1-3. *Sod1* mRNA 発現レベルの比較

図 1-4. HMOX1 の蛋白質発現

図 1-5. SOD1 の蛋白質発現

第2章

表 2-1. 対象者の基本属性

表 2-2. 2種類のアリルおよび *HMOX1* mRNA 発現量の測定が可能であった
33名の基本属性

表 2-3. Long アリルのカットオフ値による *HMOX1* mRNA 発現量

表 2-4. 対象者の遺伝子型の分布

表 2-5. 1種類のみアリルが測定できそのアリルが 27 回以上であった対象者を
含めた 60 名の基本属性

表 2-6. 肥満の有無による Long アリル保有割合の比較

表 2-7. 非肥満群における超音波画像タイプ別基本属性

表 2-8. 肥満群における超音波画像タイプ別基本属性

表 2-9. 非肥満群における超音波画像タイプ別 Long アリル保有頻度の比較

表 2-10. 肥満群における超音波画像タイプ別 Long アリル保有頻度の比較

図 2-1. 研究概念図

図 2-2. 左大腿部後面における超音波画像取得部位

図 2-3. 超音波画像タイプ

図 2-4. 解析対象者選定のフローチャート

図 2-5. 対象者のアリルの分布

図 2-6. GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量の相関

図 2-7. 遺伝子型と *HMOX1* mRNA 発現量との関連

要旨

肥満者における真皮コラーゲン密度低下のハイリスク者を同定することを目的とし、①抗酸化酵素 HMOX1 は肥満による皮膚の酸化ストレスに反応して発現するか否かの検討、②*HMOX1* プロモーター領域の GT 繰り返し数 (*HMOX1* 遺伝子多型) と真皮コラーゲン密度との関連の検討を行った。

その結果、①HMOX1 は肥満による皮膚の酸化ストレスに反応して発現上昇する抗酸化酵素であること、②肥満者における *HMOX1* 遺伝子多型の Long アリルの保有は、真皮コラーゲン密度低下と関連があることが明らかとなった。以上より、今後 *HMOX1* 遺伝子多型解析により、肥満者におけるコラーゲン密度低下のハイリスク者を同定できる可能性が示唆された。

序論

1. 肥満による皮膚への影響

近年の食生活、生活習慣の変容により、我が国の肥満者の数は増加している。肥満とは、「体脂肪が過剰に蓄積した状態」を指し、本邦では **Body Mass Index (BMI) 25** 以上と定義されている¹。本邦における肥満者の割合は、成人男性で **30.4%**、成人女性で **21.1%**にのぼる。また、年齢別でみると男性の **50** 代、女性の **60** 代に割合のピークがあり、今後、高齢者において肥満が問題になることが見込まれる²。

肥満は糖尿病、心血管系疾患、癌などの内科疾患のリスク要因であることにとどまらず、皮膚の生理機能にも変化を引き起こすことが知られている^{3,4}。皮膚は表皮、真皮、皮下脂肪組織の **3** 層から成る人体最大の臓器である。とりわけ真皮は最も厚みがある線維性結合組織であり、その主成分はコラーゲン線維である⁵。肥満は、このコラーゲン線維の構造、機能を変性させ皮膚を脆弱化させることが報告されている⁶⁻⁸。これまで私たちの研究グループは、肥満が真皮コラーゲンに及ぼす影響について研究を進めてきた。

2. 肥満の皮膚におけるコラーゲン密度の低下

コラーゲン線維は真皮乾燥重量の **75%**を占め、そのうちの **80%**を **I** 型コラーゲン線維が占めている⁹。I 型コラーゲン線維は、**2** 本の $\alpha 1$ ペプチド鎖と **1** 本の $\alpha 2$ ペプ

チド鎖がらせん状に絡み合ったコラーゲン分子の集合体であり、真皮中を様々な方向に走行する密な線維束を形成し、これにより皮膚に加わる引張力に対する抵抗力、即ち機械的強度を与える⁹。

コラーゲンの線維密度はコラーゲン線維の合成と分解のバランスを反映する。コラーゲン線維は、線維芽細胞がコラーゲン分子の前駆体であるプロコラーゲンを細胞外へ分泌し、細胞膜上のプロコラーゲンペプチターゼによって非らせん末端が切断されることで、成熟コラーゲン分子が産生される。一方で、コラーゲン線維の分解は、線維芽細胞等より分泌されたマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の作用によるものであり、断片化されたコラーゲン分子はマクロファージに貪食され、リソソームで消化される⁵。

これまでに、肥満マウスの皮膚の形態学的検討を行った先行研究では、皮下脂肪組織の著しい肥大、真皮層の菲薄化、コラーゲン線維密度の減少が特徴的な所見として観察された⁷。さらに、肥満マウスの皮膚では、線維芽細胞の減少¹⁰、タイプ I тропоコラーゲンの減少および $\alpha 1$ ペプチド鎖をコードする **Type1 Collagen $\alpha 1$ Chain (COL1A1)** の mRNA 発現の減少¹¹、コラーゲン構成要素であるヒドロキシプロリンの減少⁶などが報告されている。これらの結果は、肥満マウスの皮膚では、コラーゲンの合成が低下していることを示している。一方で分解に関しては、筆者らが真皮の直下に位置する皮下脂肪組織に着目し検討を行った。その結果、過剰に脂肪が蓄積し

た培養脂肪細胞では、MMP3 および 8 の発現が亢進し、その阻害因子である Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)3 の発現が抑制されること¹²、肥満 マウス (TSOD マウス)の皮下脂肪組織において、MMP2、 13 の発現が増加し、コラーゲン密度および引張強度が低下していることが明らかにされた⁸。

以上より、肥満マウスの真皮コラーゲンは、合成の低下および分解の促進により、コラーゲン密度が低下していることが示された。コラーゲン密度の低下は、外力に起因する創傷である褥瘡有病率の増加^{13,14}、スキントア (Skin Tear)の発生¹⁵を招き、肥満者の QOL を著しく低下させるため、肥満者におけるコラーゲン密度の低下のメカニズムを解明し、予防方法を確立することが重要な課題であると考えられる。

3. 肥満の皮膚のコラーゲン密度低下における酸化ストレスの関与

上記の筆者らの先行研究では、TSOD マウスの皮下脂肪組織における酸化ストレスマーカー、MMPs の発現が上昇していることが明らかとなった。さらに、抗酸化剤の投与により酸化ストレスマーカー、MMPs の発現の低下、コラーゲン密度および皮膚の引張強度が改善されることが示された。これらの結果は、肥満によるコラーゲン密度の低下は酸化ストレスの上昇に起因することを示唆している⁸。

酸化ストレスとは、「生体内で生成する活性酸素種の酸化損傷力と生体内の抗酸化システムによる活性酸素除去作用との間で均衡が崩れ、前者に傾いた状態」と定義さ

れている¹⁶。活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS)とは、酸素分子に由来する反応性に富む一群の分子を指し、酸素分子が 1 電子還元されて生成するスーパーオキシド (O_2^-)や 2 電子還元されて生じる過酸化水素 (H_2O_2)などが含まれる¹⁷。 O_2^- はスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)の作用ですみやかに H_2O_2 へと変換される。 H_2O_2 はカタラーゼの存在下で水と酸素分子になり無毒化される。このように、生体はROSによる酸化能と抗酸化酵素などのROS消去能により酸化ストレスのバランスを保っている。

肥満における酸化ストレスの上昇には、過剰な脂肪の蓄積により脂肪組織が肥大した状態が関与している。この肥大した脂肪組織では、脂肪組織の間隙にある毛細血管が閉塞し¹⁸、間質酸素分圧が低下することで虚血・低酸素状態になることが知られている^{19,20}。虚血・低酸素状態では代謝経路の変更や炎症反応を介してROSの産生が増加する²¹。これらの脂肪組織で生じたROSは近傍の皮膚組織に拡散し、また血液を介して全身の臓器に影響し、酸化ストレスを増加させる²²⁻²⁴。

私たちの研究グループは、肥満マウスの皮膚における真皮コラーゲン密度の低下を明らかとし、そのメカニズムとして酸化ストレスの関与を示してきたが、マウスの皮膚で観察された現象がヒトにおいても確認できるかは不明であった。そのため、健康成人を対象とし、肥満と真皮コラーゲン密度に関する実態調査を行った²⁵。その結果、BMIの上昇に伴い真皮コラーゲン密度が低下する所見が得られ、マウスの皮膚で得

られた結果と同様の知見が得られた。しかし、BMI 25-30 の対象者の約 60%、BMI30 以上の対象者の約 90%においてコラーゲン密度の低下が認められた一方で、コラーゲン密度の低下が認められない肥満者も存在していた。この結果は、肥満者の中でもコラーゲンの密度が低下する人とそうでない人が存在する可能性を示している。そのため、肥満者の中でもコラーゲン密度が低下するハイリスク者を同定する必要があると考えた。私たちはこれまで ROS 生成要因である肥満と真皮コラーゲン密度の低下との関連を明らかにしてきた。しかし酸化ストレスが ROS 生成と抗酸化能とのバランスから成り立つことを考えると、肥満者のように一定レベルの酸化ストレスが上昇した状態においては、個人のもつ抗酸化能に着目する必要がある。

抗酸化酵素のひとつであるヘムオキシゲナーゼ (HMOX)は、生体の抗酸化能の指標として近年注目を浴びている。HMOX には HMOX1 と HMOX2 の 2 種類のアイソザイムが同定されている²⁶。HMOX2 が定常的に発現している一方で、HMOX1 は細胞に加わるストレスに反応して発現が誘導される誘導型酵素であり、基質に対する感度が HMOX2 より数倍高く、生体に与える影響は大きいと言われている²⁷。HMOX1 は遊離ヘムをビリベルジン、鉄、一酸化炭素へ酸化分解する最初の、且つ律速段階を触媒する酵素である^{26,28}。ビリベルジンには抗酸化作用、一酸化炭素には抗炎症作用があることから、HMOX1 は酸化ストレスに対する生体防御に関与していることが知られている²⁹⁻³¹。さらに、この *HMOX1* の発現量は、*HMOX1* 遺伝子プロモーター領

域の多型によって規定されていることが近年明らかとなった^{32,33}。遺伝子多型とは、「同一集団内に遺伝子座の対立遺伝子（アレル）が2種類以上存在し、変異遺伝子の頻度が1%以上の割合で存在すること」と定義され、主に①反復配列の多型（ミニサテライト：15–100bp、マイクロサテライト：1–10bp）、および②一塩基多型（SNP）がある³⁴。これらは個人のもつ様々な体質の差を反映することから、遺伝子多型を調べることによって、各個人の遺伝的体質に合わせた医療、即ちテーラーメイド医療が可能になる。そこで本研究では、肥満者におけるコラーゲン密度低下の個人差に、*HMOX1* 遺伝子多型が関与している可能性に着目した。

しかし、肥満の皮膚における *HMOX1* の発現動態に関する知見は極めて少ない。そのため、本研究はまず、*HMOX1* が肥満による皮膚の酸化ストレスに反応して発現するか否かを明らかにすることにした。

4. 目的

本研究は、肥満者の皮膚における真皮コラーゲン密度低下のハイリスク者を同定することを目的とし、以下2つの研究を実施する。

- ① 肥満マウスを用いて *HMOX1* は肥満による皮膚の酸化ストレスに反応して発現するか否かを検討する。
- ② 次に、肥満者における *HMOX1* 遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型と真皮コラ

ーゲン密度との関連を検討した。

第 1 章「慢性および急性的酸化ストレス下の皮膚における HMOX1 の発現比較」
において①を、第 2 章「肥満者における真皮コラーゲン密度に対する *HMOX1* プロ
モーター領域 GT 繰り返し配列の関与」において②を検討した。

第1章 慢性および急性的酸化ストレス下の皮膚における HMOX1 の発現比較

1. 背景

皮膚は生体の最外層にあり、生体内の内的因子に加え、環境からの外的因子により、常に ROS にさらされている。外的因子のうち皮膚の酸化ストレスに最も影響を及ぼすのは紫外線 (UV) である。UV はその波長により、主に長波長の UVA (320-400 nm)、短波長の UVB (290-320 nm) に分類される。UV は波長が短いほどエネルギーが高いため、UVB は UVA よりも強い組織障害作用をもつ。皮膚がひとたび UVB に暴露する、即ち急性的な酸化ストレスに晒されると、 $O_2\cdot$ 、 H_2O_2 等の ROS が産生され、DNA、蛋白質、脂質の変性により組織障害がもたらされる³⁵。一方で、皮膚の酸化ストレスに寄与する内的要因としては、前述のとおり「肥満」が挙げられる。肥満は低レベルの酸化ストレスが慢性的に生じている状態であり^{22-24,36}、過剰な脂肪の蓄積により脂肪組織の間隙にある毛細血管が閉塞する¹⁸。このような虚血・低酸素状態は代謝経路の変化や炎症反応により酸化ストレスを増加させる¹⁹⁻²¹。

これらの急性的、慢性的酸化ストレスにより生じる ROS に対し、皮膚は各種の抗酸化物質および抗酸化酵素を含む抗酸化システムを駆使して、生体防御にあたっている。

生体の抗酸化システムには、非酵素系 (ビリルビン、ビタミン C、ビタミン E) と酵

素系の2つがあり、酵素系は非酵素系と比較し、ROS活性時に高い親和性と反応率を持つと言われている。生体には様々な抗酸化酵素が存在するが、SOD等の様にROSを直接消去する系と³⁷⁻³⁹、ヘムを酸化分解するヘムオキシゲナーゼ(HMOX)などの様に代謝産物が抗酸化能を発揮する系がある^{26,40}。

これまで、UV照射後の皮膚組織における抗酸化酵素の発現動態は数多く報告されている。先行研究では、UVBをマウスの皮膚に短期間照射し、急性的な酸化ストレスを負荷すると、SOD1の発現が増加することを報告した^{41,42}。一方、UVBを長期間にわたり照射すると、SOD1の発現が低下することが報告されている⁴²⁻⁴⁴。これらの結果は、慢性的な酸化ストレスに反応する抗酸化酵素は、急性的酸化ストレスに反応する抗酸化酵素とは異なることを示唆している。しかし、慢性的酸化ストレス下の皮膚組織で作用する抗酸化酵素は明らかにされていない。

近年、HMOX1は肥満マウス(*ob/ob*マウスおよび高脂肪食給餌マウス)の脂肪組織に生じる虚血・低酸素に応答して著しく発現が上昇する抗酸化酵素と同定された^{19,45}。肥満の皮膚は、長期にわたる脂肪組織の虚血・低酸素に起因する慢性的酸化ストレス状態にある。また、大腿部の毛包における*HMOX1*のmRNA発現レベルがBMIと関連することから²⁵、本研究ではHMOX1が肥満の皮膚の慢性的酸化ストレスに関与する抗酸化酵素であると仮説をたてた。

目的

そこで第1章では、肥満マウス（慢性的酸化ストレスモデル）とUV照射マウス（急性酸化ストレスモデル）の皮膚におけるHMOX1の発現をmRNAおよび蛋白質レベルで解析し、HMOX1が肥満による酸化ストレスに反応し発現するか否かを明らかにすることを試みた。皮膚に発現する抗酸化酵素には、SOD1、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシターゼなどが挙げられるが、本研究の目的は他の酵素との比較ではなく、HMOX1が肥満の皮膚で発現していることを確認することである。特に、肥満の皮膚は慢性的な酸化ストレスに晒されているという点に着目したため、短期的なUV照射、即ち急性な酸化ストレスにより発現する酵素と区別する必要がある。そのため、既に急性および慢性的酸化ストレスに対する動態が報告されているSOD1を比較対象として解析を行った。

2. 方法

1) 供試動物

C57BL/6JHam Slc- *ob/ob* マウス（7週齢、雄）5匹、C57BL/6JHam Slc- *+/+*マウス（7週齢、雄）10匹は日本エスエルシー株式会社（静岡、日本）より購入した。*ob/ob* マウスは摂食抑制作用を持つレプチン遺伝子の欠損に起因する肥満マウスである。*ob/ob* マウスはヘテロ動物 (*ob/+*)の交配により維持されており、生産される *+/+*マウスを対

照正常動物とした。マウスは室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の条件下で1週間馴化飼育を行った後、8週齢で実験に供した。本研究は、東京大学医学系研究科動物実験委員会の承認を得て実施した。

2) 処理

本研究では、下記3群を設定した。肥満群およびUV照射群をそれぞれ対照群と比較し、慢性的および急性的酸化ストレスの影響を解析した。

(1) UV照射群

ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル, 共立製薬, 東京, 日本)の腹腔内投与による麻酔下で、*+/+*マウスの背部皮膚を電動バリカンで剃毛したのち保定し、背部表面から20cmの距離から6WのUVB (290-320nm、最大312nm)を1分間照射した。

(2) 肥満群

ob/ob マウスにUV照射群と同様の剃毛を行ったのち、1分間保定し、ケージに戻した。

(3) 対照群

UV照射群および肥満群の対照群として、無処理の*+/+*マウスを用いた。UV照射群と同様に剃毛を行ったのち、1分間保定し、ケージに戻した。

3) mRNA発現解析

抗酸化酵素 (*Sod1*, *Hmox1*) の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。UV 照射群は UV 照射後 24 時間の時点で、ペントバルビタールナトリウム (共立製薬) の過剰投与により安楽死させた後、背部皮膚全層組織を採取した。無処理群、肥満群においても UV 照射群と同じタイミングで背部皮膚全層組織を採取した。採取した皮膚組織は半割し、一方を mRNA 発現解析に、他方を組織学的解析および免疫組織化学に用いた。mRNA 発現解析用の組織は細断後、RNA 保存液 (RNA Later, Life Technologies, NY, USA) に保存した。組織片を保存液から取り出し液体窒素で凍結した後、凍結破砕器 (SK-100, 株式会社トッケン, 千葉, 日本) にて破砕した。破砕した *ob/ob* マウスの皮膚組織は RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて、*+/+* マウスの皮膚は RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出した。その後、逆転写キット (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies) を用いて cDNA を合成し、RT-PCR に供した。RT-PCR はリアルタイム PCR システム (Mx3000P, Agilent, CA, USA) および PCR 酵素プレミックス (TaqMan Universal PCR Master Mix, Life Technologies) を用い、95°C (10 分間) のプレヒーティングの後、95°C (30 秒) および 60°C (1 分) の増幅サイクルを 50 サイクル繰り返した。プライマー・プローブには TaqMan Gene Expression Assay (*Sod1*: Mm01344233_g1, *Hmox1*: Mm00516005_m1, Life Technologies) を用いた。また、内部標準として *Eukaryotic 18S rRNA Endogeneous Control* (4310413E, Life Technologies) の解析を行っ

た。UV 照射群および肥満群における *Hmox1* および *Sod1* の mRNA 発現レベルは、比較 Ct 法にて対照群に対する相対値として算出した。

4) 組織学的解析

採取した皮膚組織は、ただちに 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、エタノール脱水、キシレン透徹後、パラフィンに包埋した。その後 5 μ m 厚に薄切し、パラフィン切片を作成した。パラフィン切片は、キシレン、エタノールにより脱パラフィンした後、マイヤー・ヘマトキシリン (武藤化学, 東京, 日本) に 2 分間、60°C の温湯に 10 分間、エオジン (武藤化学) に 15 秒間浸した。エタノール脱水、キシレン透徹後、標本用封入剤 MGK-S (松浪硝子工業, 大阪, 日本) で封入した。

5) 免疫組織化学

皮膚における HMOX1 および SOD1 の蛋白質発現を酵素抗体法にて解析した。パラフィン切片を脱パラフィンした後、0.01M クエン酸バッファー (pH6.0) に浸漬し、オートクレーブ (121°C、15 分) で抗原性賦活化を行った。ブロッッキングには、1% ウシ血清アルブミン (BSA)/リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いた (室温、10 分)。一次抗体としてウサギモノクローナル抗 HMOX1 抗体 (SPA-896、Enzo Life Sciences、NY、USA) およびウサギモノクローナル抗 Cu/Zn SOD 抗体 (SPC-116C、StressMarq Biosciences、VIC、カナダ) を用いた。抗体は 1% BSA/PBS を用いて、それぞれ 1:200 および 1:500 に希釈し、室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、二次抗体とし

てビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories, PA, USA) を 1% BSA/PBS で 1:1000 に希釈し、室温で 30 分反応させた。PBS で洗浄後、最後に HRP 標識アビジン・ビオチン複合体 (VECTASTAIN ABC Standard Kit, Vector Laboratories, CA, USA) を室温で 30 分反応させた。免疫反応は、3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (ナカライテスク、京都、日本) を基質として発色し、対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。染色後、各酵素における陽性細胞の局在を光学顕微鏡下で解析した。

3. 統計解析

統計解析には SPSS Version 21 (IBM, NY, USA) を使用した。mRNA 発現解析における対照群と肥満群、対照群と UV 照射群との比較には Dunnet 検定を用いた。データは平均値±SD で表し、有意水準は $p<0.05$ とした。

4. 結果

1) 組織学的解析

HE 染色により、対照群、肥満群、UV 照射群の皮膚組織像を解析した (図 1-1)。対照群 (図 1-1A) と比較して肥満群 (図 1-1B) では、真皮層の菲薄化と皮下脂肪の著しい蓄積が観察された。また、対照群の真皮層 (図 1-1D) と比較して肥満群の真皮層 (図 1-1E) では、コラーゲン線維の間隙が拡大しており、コラーゲン密度の低下が示

唆された。一方で、UV 照射群の表皮および真皮層(図 1-1C&F)では、対象群 (図 1-1 A&D)と比較して明確な組織学的差異は認められなかった。

2) mRNA 発現解析

(1) *Hmox1*

肥満群およびUV 照射群における *Hmox1* の mRNA 発現量を対照群の相対値として求めた (図 1-2)。肥満群では対照群と比較して 2.01 倍 ($p=0.021$)に増加しており、肥満群において有意に高値であった。一方で、UV 照射群の mRNA 発現量は、対照群と比較して 1.18 倍 ($p=0.661$) であり、有意な差は認められなかった。

(2) *Sod1*

肥満群およびUV 照射群における *Sod1* の mRNA 発現量を対照群の相対値として求めた (図 1-3)。*Sod1* の mRNA 発現量は、対照群と比較して肥満群で 6.68 倍 ($p<0.01$)、UV 照射群で 3.46 倍 ($p=0.047$)であり、両群ともに対照群より有意な増加が認められた。

3) 免疫組織化学

(1) HMOX1

表皮および真皮層において、対照群 (図 1-4 A)で HMOX1 の陽性細胞は認められなかった一方で、肥満群の表皮の角化細胞 (図 1-4 B、矢印)、UV 照射群 の表皮の角化細胞の一部 (図 1-4 C、矢印)に HMOX1 の陽性細胞が確認された。皮下脂肪層におい

ては、対照群 (図 1-4 D)、UV 照射群 (図 1-4 F)において陽性細胞が観察されなかった一方で、肥満群では脂肪細胞に陽性細胞が観察された (図 1-4 E 矢印)。

(2) SOD1

表皮の角化細胞 (矢頭)および真皮の線維芽細胞 (矢印)において、肥満群 (図 1-5B)、UV 照射群 (図 1-5C)で陽性細胞が確認された (図 1-5B-C, 矢頭, 矢印)。皮下脂肪層においては、対照群 (図 1-5D)、肥満群 (図 1-5E)、UV 照射群 (図 1-5F)の全てにおいて脂肪細胞 (矢印)に陽性細胞が観察された (図 1-5D-F, 矢印)が、その数は対照群と比較して、肥満群および UV 照射群においてより多かった。

5. 考察

組織学的解析の結果、肥満 (*ob/ob*)マウスの皮膚は対照マウスと比較して、真皮層の菲薄化およびコラーゲン線維の密度の低下が観察された。この結果は、TSOD マウスの皮膚組織を解析した先行研究の結果と一致しており^{7,8}、肥満に伴うコラーゲン密度の低下が系統を越えてマウスで共通する所見であることを示している。また、UV 照射群の表皮および真皮では、対照群と比較して、炎症性細胞の浸潤等、明らかな炎症所見は認められなかった。私たちの研究グループでは、同条件の UVB を 4 分間照射した場合には、1 週間以内に重度の皮膚損傷が顕在化するのに対し、1 分間の照射では、皮膚に何ら肉眼的異常をもたらさないことを報告している⁴⁶。明らかな炎症性

細胞の集積は認められなかったことから、本研究における 1 分間の照射を行った UV 照射群の皮膚組織における遺伝子発現の変化は、炎症に由来するものではなく、UV 照射によって発生した ROS に皮膚組織が反応した結果を示していると考えられる。

Hmox1 の発現量は、対照群と比較して、肥満群においてのみ有意な増加が認められた。一方で、*Sod1* の発現量は対照群と比較して、肥満群および UV 照射群において有意に高かった。この結果は、HMOX1 は肥満に伴う慢性的酸化ストレスのみに、SOD1 は急性的・慢性的酸化ストレスいずれにも応答する抗酸化酵素であることを示している。SOD1 は SOD の 3 つのアイソタイプのうち、細胞質に普遍的に存在し、皮膚内に生じるスーパーオキシドを迅速に過酸化水素へと変換する酵素である³⁷。本研究の UV 照射群において、*Sod1* の発現増加が認められたのは、短時間の UVB 照射が、皮膚内にスーパーオキシドを発生させ、ROS 還元経路の最も上流にある *Sod1* の発現を活性化させたものと考えられる。一方、肥満群においても、*Sod1* の発現上昇が認められた。Katiyar. *et al* (2007) は、22 週齢の ob/ob マウスの皮膚細胞質分画において、SOD1 の蛋白発現量を検討した結果、非肥満マウスと比較して両群に差はなかったと報告しており⁴³、本研究の結果と一致していなかった。Lim *et al.* (2011) は、加齢により抗酸化酵素の発現が減少することを報告している⁴⁷。本研究では 8 週齢の若齢マウスを用いたため、本研究と先行研究の差異は、加齢による抗酸化酵素の発現プロファイルの違いが影響した結果と考えられる。

免疫組織化学の結果、HMOX1 の蛋白質発現は、UV 照射群の表皮の一部に発現を認めただけで、肥満群においては、表皮、毛包および皮下脂肪層において陽性細胞が確認された。この結果は、肥満 (TSOD)マウスの皮膚および皮下脂肪組織において *Hmox1* mRNA 発現量が上昇しているとする先行研究の結果と一致していた^{8,48}。また、上記 mRNA 発現量の解析において、UV 照射群における HMOX1 の発現レベルは対照群と比較して、有意差には至らない上昇傾向にとどまった一方で、肥満群においては対照群と比較して、2.01 倍と有意差を認めた結果と一致していた。

SOD1 の蛋白質発現解析の結果、対照群、肥満群、UV 照射群のいずれの真皮層においても SOD1 陽性細胞を認めたが、その数は対照群と比較して、肥満群および UV 照射群で多かった。皮下脂肪層においても同様に、対照群、肥満群、UV 照射群のいずれにおいても陽性細胞を認めたが、その数は対照群と比較して、肥満群および UV 照射群で多かった。この結果は、上記 mRNA 発現レベルの解析において、肥満および UV 照射群において有意な上昇を認めたとする先行研究の結果と一致していた。

急性酸化ストレスを反映した UV 照射群、慢性酸化ストレスを反映した肥満群における各抗酸化酵素の発現結果を比較すると、*Sod1* は UV 照射群および肥満群の両者において発現が増加していた。この結果は、SOD1 が急性・慢性酸化ストレスに共通する幅広い酸化ストレスに対応する抗酸化酵素であり、肥満の皮膚特有の抗酸化酵素とはいえないことを示している。一方で、*Hmox1* は肥満群においてのみ発現が増加し

ており、肥満の皮膚特有の抗酸化酵素であった。前述のとおり、肥満の皮膚の酸化ストレス上昇には、脂肪組織における虚血・低酸素と、それに伴い生じる ROS が関与している。先行研究において、HMOX1 は肥満マウス(ob/ob マウスおよび高脂肪食マウス)の脂肪組織における虚血・低酸素に応答して発現が著しく誘導されることが報告されている⁴⁵。本研究における HMOX1 の免疫組織化学の結果においても、HMOX1 の陽性細胞は皮下脂肪層に多く認められた。この結果は、HMOX1 は肥満時の酸化ストレスに鋭敏に反応し発現する抗酸化酵素であることを示している。以上より、肥満の皮膚における慢性的酸化ストレス下では、SOD1 の経路だけではなく、HMOX1 の経路が重要な役割を担っていることが明らかとなり、HMOX1 は肥満による皮膚の酸化ストレスに反応して発現上昇する抗酸化酵素であることが示された。

第2章 肥満者における真皮コラーゲン密度に対する *HMOX1* プロモーター領域 GT 繰り返し配列の関与

1. 背景

第1章において、*Hmox1* は肥満による皮膚の酸化ストレスに反応して発現する酸化酵素であることが明らかとなった。ヒトの *HMOX1* 遺伝子プロモーター領域には、GT 繰り返し配列があり、マイクロサテライト多型を示す³²。*HMOX1* mRNA 発現量は、上記の GT 繰り返し配列の繰り返し数に依存しており、繰り返し数が長いほど転写活性が低い³³。つまり *HMOX1* 遺伝子プロモーター領域の GT 繰り返し数は、抗酸化能の個人差を規定していると考えられる。私たちはこれまで、ROS 生成要因である肥満と真皮コラーゲン密度の低下との関連を明らかにしてきた。しかし酸化ストレスが ROS 生成と抗酸化能のバランスから成り立つことを考えると、肥満者のように一定レベルの酸化ストレスが上昇した状態においては、個人のもつ抗酸化能、即ち *HMOX1* 遺伝子多型に着目する必要があると考えた。

先行研究において、*HMOX1* 遺伝子多型は、慢性閉塞性肺疾患、心血管系疾患、糖尿病等との関連が報告されている⁴⁹⁻⁵²。Yamada *et al* (2000)は、喫煙者における肺気腫罹患者と健常者において、*HMOX1* プロモーターの Long アリル (反復数 27 回以上)の保有頻度を比較した。その結果、肺気腫罹患者は健常者と比較して、Long アリルの保有頻度が有意に高く、肺気腫発症のオッズ比が 2.4 倍であったと報告してい

る⁴⁹。さらに、Kaneda *et al* (2010)らは、糖尿病患者における冠状動脈疾患の有無と、*HMOX1* 遺伝子多型 (27 回以上の Long アリルの保有)の保有頻度を検討した。その結果、糖尿病患者において、冠状動脈疾患罹患者の Long アリルの保有割合は 88%であり、非保有者の 66%と比較して有意に高かった⁵¹。これらの結果は、喫煙、糖尿病など酸化ストレスの生成要因を有する集団において、*HMOX1* 遺伝子多型は個人の抗酸化能の違いを顕著にし、疾患発症に寄与することを示唆している。

一方、皮膚疾患における *HMOX1* 遺伝子多型の関与についての報告は極めて少ない。Okamoto *et al* (2006)は、メラノーマ患者と健常者において、*HMOX1* プロモーターの Long アリル (反復数 25 回以上)の保有頻度を比較した。その結果、Long アリル非保有者は Long アリル保有者と比較して、メラノーマ発症リスクが 2.0 倍高いと報告した⁵³。また、Chang *et al* (2012)は、乾癬患者と健常者において、*HMOX1* プロモーターLong アリル (反復数 27 回以上)の保有頻度を比較した。その結果、乾癬患者と健常者において、Long アリルの保有頻度に差はなかったと報告した⁵⁴。これらの結果は、Long アリルの保有が低い抗酸化能を表し、酸化ストレスに関連する疾患の発症に寄与するとする他領域の結果と異なっている。しかし、これらの調査では対象者の酸化ストレス生成要因の保有状況が考慮されておらず、*HMOX1* 遺伝子多型との関連は未だ不明と言わざるを得ない。そこで本研究では、肥満という酸化ストレス生成要因を有する集団に着目し、*HMOX1* 遺伝子多型と真皮コラーゲン密度の減

少との間に関連があるか否かを検証することとした。

仮説と目的

第2章では、*HMOX1* 遺伝子多型 (GT 繰り返し数) と肥満者の皮膚におけるコラーゲン密度の低下との関連を明らかにすることを目的とし、以下2点の仮説を検討する。図2-1に概念図を示す。

① *HMOX1* 遺伝子 GT 繰り返し数が長い場合 (Long アリルを保有する場合)、

HMOX1 mRNA 発現量が低下する。

② 肥満者において *HMOX1* 遺伝子プロモーター領域の GT 繰り返し数が長い者は

真皮コラーゲン低密度を呈する。

2. 方法

1) 研究デザイン

研究デザインは、横断的観察研究であった。

2) 対象者

対象者は、石川県内の大学が主催するウォーキング教室に参加した20歳以上64歳以下の健常成人であった。本研究では大腿部の体毛を試料として採取したが、女性では体毛の採取が困難であったため、包含基準は男性とし、除外基準は1) 乾癬、アト

ピー性皮膚炎など全身性の慢性皮膚疾患を有する者、2) 調査部位（左大腿部後面中央部）に炎症所見などの皮膚病変を有する者とした。除外基準に該当する皮膚所見に関しては、皮膚疾患に関する問診と看護師有資格者である研究者が全身および調査部位である大腿後面の皮膚を観察し判断した。調査期間は、2013年5月から8月であった。

3) 調査項目

調査場所は調査施設である大学内の実験室であった。対象者は下着の上から調査用のショートパンツを着用し、基礎情報取得時以外は、ベッド上腹臥位となり調査へ参加した。調査項目は以下の通りである。

(1) 基礎情報

体重は、マルチ周波数体組成計 (MC-190, TANITA, 東京, 日本) により測定し、身長は調査日より過去1年以内の測定値を問診にて把握した。これらの値より、BMI (体重 kg/ 身長 m^2) を算出した。本研究では、日本肥満学会の定義¹に基づき、BMI25以上の者を肥満群、25未満の者を非肥満群に分類した。体脂肪率測定はマルチ周波数体組成計を用い、生体インピーダンス法により求めた。ウエスト周囲計は、呼気時に臍周囲を1人の看護研究者が計測した。現病歴、通院の有無、内服の有無、喫煙歴および現在の喫煙状況は問診にて把握した。

(2) 調査部位

肥満に伴う皮下脂肪の蓄積が観察されやすく、日光への暴露が少ない部位であり、かつ体毛の存在を認める左大腿部を調査部位として選択し、真皮コラーゲン密度の解析、および体毛サンプルの採取を行った。

(3) 真皮コラーゲン密度

本研究では、真皮コラーゲン構造の評価に 20 MHz のリニアプローブを備えた超音波画像診断装置 (DermaScan C[®], CortexTechnology, Hadsund, Denmark) を用いた。この超音波診断装置は、60×130 μ m の分解能、表層より約 10mm 深度までの超音波の到達度を有する。20MHz のリニアプローブは真皮のコラーゲンの評価に適している^{55,56}。また、先行研究において、イヌの皮膚のコラーゲン濃度が超音波の輝度と相関する ($r=0.80$) することが報告されていることから、コラーゲンが高濃度の場合、高輝度シグナルとして検出される^{57,58}。本研究では、図 2-2 に示す通り、ベッド上に腹臥位になった対象者の左大腿部後面の大転子と膝蓋骨中央の点を結ぶ直線の 1/2 の高さに相当する部位において、頭尾軸方向にプローブを当て、水平方向に 10mm ずつ撮影部位をずらしながら、各個人につき 3 画像を取得した (図 2-2)。撮影はすべてゲインキーを 3、ゲインレベルを 10 に固定して行った。先行研究²⁵ の分類を参考に、大腿部超音波画像を正常群およびコラーゲン低密度群の 2 群に分類した (図 2-3)。

正常群 (正常な真皮コラーゲン像) : 真皮深層に高輝度凝集域が存在し、かつ真

皮領域全体に斑点状の高輝度領域が散在する。

コラーゲン低密度群：真皮深層に高輝度凝集域が存在せず、真皮領域の高輝度領域の一部あるいは全体に欠落を認める。

エコー所見分類の信頼性を確保するために、研究者1名と超音波画像の研究に従事する看護研究者1名との間で評価者間信頼性を算出した。その結果、 $Kappa(\kappa)=0.72$ ($p<0.01$) であり、比較的高い信頼性が認められた。

(4) 体毛サンプルの採取と解析

皮膚組織を採取して皮膚の生化学的パラメーターを測定することは侵襲度がきわめて高いため、本研究では先行研究²⁵の手法に準じて、毛軸に付着する外毛根鞘細胞を試料として、①*HMOX1* 遺伝子プロモーター領域 GT 繰り返し配列、②酸化ストレスレベル、③*HMOX1* mRNA 発現レベルを測定した。

体毛サンプルは、ベッド上腹臥位になった対象者の大転子と膝蓋骨中央の点を結ぶ直線の1/2の高さに相当する大腿後面部において、電気クリッパー(3M™ サージカルクリッパー、3M、MN、USA)にて剃毛した後、体毛を3本抜毛し、毛根部に外毛根鞘細胞の付着を確認し、サンプルとした。採取した体毛は、1mLのRNA保存液(RNA Later, Life Technologies)に1晩浸して固定し、All Prep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen)を用いて、Genomic DNA および Total RNA を抽出した。なお、本研究の手法は低侵襲な反面、対象者によっては一定量の細胞を取得することが難しい場合があった。そのた

め、十分な Genomic DNA、Total RNA を抽出できなかつた者は、解析から除外した。これらの対象者を除外することがセレクションバイアスになる可能性も考慮し、予備解析において、解析から除外した群と解析対照群でコラーゲン密度およびその他の基礎情報を比較した。その結果、各群間でいずれの項目にも差が認められなかつたため、これらの対象者の除外が調査結果に偏りを生む可能性は低いと判断した。

(1) *HMOX1* 遺伝子プロモーター領域 GT 繰り返し配列

抽出した Genomic DNA より *HMOX1* 遺伝子プロモーター領域の GT 繰り返し配列 (-232~-172) を PCR 法によって増幅した。PCR 反応液には AmpliTaq Gold[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) を用いた。PCR 反応条件は、95°C (10 分間) のプレヒーティングの後、95°C (1 分) および 60°C (30 秒)、72°C (30 秒) の増幅サイクルを 50 サイクル繰り返した。PCR に用いたプライマーの塩基配列 (5'→3') は以下の通りである。

Forward: AGAGCCTGCAGCTTCTCAGA

Reverse: ACAAAGTCTGGCCATAGGAC

PCR 産物は NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を用いて精製し、DNA キャピラリーシーケンサー (3730xl DNA analyzer, Life Technologies) を用いた Dye terminator 法にて GT 繰り返し配列を解析した (マクロジェンジャパン, 東京, 日本)。ヒトは相同染色体を持つため、1 名につき 2 種類の繰り返し配列が検出される。

返し配列情報を取得した。

(2) 酸化ストレスレベル

8-hydroxy-2,-deoxyguanosine (8OHdG) とは、DNA を構成する deoxyguanosine が活性酸素によって酸化された産物で、生体内の酸化と抗酸化のバランスを示す酸化ストレスマーカーとして一般的に用いられている⁵⁹。

外毛根鞘細胞から抽出した Genomic DNA を 8OHdG 測定前処理試薬キット(和光純薬工業, 大阪, 日本) を用いて加水分解した。ELISA 法による 8OHdG の定量には、高感度 8OHdG Check (日本老化制御研究所, 静岡, 日本) を用いた。マイクロプレートリーダー (DTx 800 Multimode Detector, BECKMAN COULTER, CA, USA) を使用して、450nm の波長にて吸光度を測定した。検量線を用いて測定した吸光度から DNA 濃度を算出した。

(3) *HMOX1* mRNA 発現レベル

外毛根鞘細胞から抽出した Total RNA より逆転写キット (QuantiTect reverse transcription Kit, Qiagen) を用いて cDNA を合成した。*HMOX1* mRNA 発現の定量的解析には、Human *HMOX1* TaqMan gene expression assay (Hs01110205_m1, Life Technologies)および PCR 酵素プレミックス (TaqMan Universal Master Mix II, Life Technologies) を用い、リアルタイム PCR システム (Mx3000P, Agilent, CA, USA) にて 95°C (10 分間) のプレヒーティングの後、95°C (30 秒) および 60°C (1 分) の増幅

サイクルを 50 サイクル繰り返した。また、内部標準として *Eukaryotic 18S rRNA Endogeneous Control* (4310413E, Life Technologies) を用いた。*HMOX1* mRNA 発現レベルは、18S ribosomal RNA に対する相対値として算出した。

4) 解析

データの連続変数は平均値 (SD)、分類変数は N (%) で表した。統計解析には SPSS Version 21 (IBM, NY, USA) を使用し、有意水準は $p < 0.05$ とした。

肥満の有無およびコラーゲン低密度の有無における基本属性の比較において、連続変数は t 検定および Mann-Whitney U 検定、分類変数は Fisher の正確確率検定およびカイ二乗検定を行った。

2 種類のアリルが測定可能であった対象者を解析対象とし、GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量との関連を Spearman の順位相関係数にて求めた。先行研究において、*HMOX1* 遺伝子の GT 反復数は 25 回未満を Short アリル、25-30 回以上を *HMOX1* mRNA の転写活性が抑制される Long アリルと分類することが一般的である^{49,51,53}。

そこで本研究では、25 から 30 回の各アリルの有無と *HMOX1* mRNA 発現量の比較を Mann-Whitney U 検定を用いて検討した。まず、2 種類のアリルとも測定できた者で、且つ *HMOX1* mRNA 発現量の測定が可能であった対象者を解析対象とした。次に感度分析として、1 種類のみアリルが測定でき、そのアリルが 30 回未満であった対象者全てが 30 回以上のアリルを保有していたと仮定して解析を行った。遺伝子型と

*HMOX1*mRNA 発現量との解析には、Kruskal-Wallis 検定を行い、多重検定 (Steel-Dwass 法)にて各群の比較を行った。

5) 倫理的配慮

対象者に対し文書を用いて調査の目的および方法の説明を行い、書面にて同意を得た。その際、調査に参加しない場合でも不利益はないこと、同意後もいつでも撤回できること、遺伝子情報は原則開示しないことを説明した。データは個人情報管理者によって連結可能匿名化され、データおよび対応表は鍵のかかる場所で厳重に保管した。

本研究は、東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会 (G-3559-(1))、金沢大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会 (312) の承認を得て実施した。

3. 結果

1) 対象者の選定方法

図 2-4 に対象者選定のフローチャートを示す。調査期間中に石川県内の大学主催ウォーキング教室に参加した男性 92 名から調査参加の同意を得た。乾癬 (1 名)、アトピー性皮膚炎 (3 名)の計 4 名を除外した 88 名 (非肥満群 43 名、肥満群 45 名)のうち、*HMOX1* 遺伝子 GT 繰り返し配列が測定できた者は 69 名 (非肥満群 34 名、肥満群 35 名)であった。そのうち 2 種類のアリルとも測定できた者は 53 名 (非肥満群 27

名、肥満群 26 名) であった。そのため、本研究ではこの 53 名を解析対象者とした。

2) 対象者の概要

表 2-1 に対象者の基本属性を示す。対象者の年齢は非肥満群で 34.63 ± 11.9 歳、肥満群で 40.96 ± 12.5 歳であり ($p=0.045$)、非肥満群で年齢が有意に低かった。肥満群は非肥満群と比較して、肥満の指標である BMI ($p<0.01$)、体脂肪率 ($p<0.01$)、ウエスト値 ($p<0.01$) が有意に高かった。コラーゲン低密度に分類された者の割合は、非肥満群で 14 名 (51.8 %)、肥満群で 21 名 (80.7%) であり、肥満群でコラーゲン低密度である者の割合が有意に高かった ($p=0.042$)。酸化ストレスのマーカーである 8OHdG レベルは非肥満群で $0.087 \pm 0.05 \text{mg}/\mu\text{l}$ 、肥満群で $0.11 \pm 0.05 \text{mg}/\mu\text{l}$ であり、肥満群で 8OHdG レベルは高い傾向にあった ($p=0.093$)。

3) 対象者のアリの分布

解析には 2 種類のアリが測定できた 53 名 (106 アリ) を含めた。

対象者の GT 繰り返し数は、15-33 回の範囲に分布し、19-21 回、26-27 回にピークをもつ 2 峰性を示した (図 2-5)。

4) GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現解析対象者の基本属性

GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量の解析では、2 種類のアリとも測定できた者で、且つ *HMOX1* mRNA 発現量の測定が可能であった 33 名を解析対象とした。

表 2-2 に 33 名の解析対象者の基本属性を示す。対象者の年齢は非肥満群で 36.38 ± 12.3

歳、肥満群で 40.40 ± 11.8 歳であり、非肥満群で年齢が低い傾向があった ($p=0.130$)。肥満群は非肥満群と比較して、肥満の指標である BMI ($p<0.01$)、体脂肪率 ($p<0.01$)、ウエスト値 ($p<0.01$)が有意に高かった。真皮コラーゲン低密度に分類された者の割合は、非肥満群で 5 名 (38.5%)、肥満群で 16 名 (80.0%)であり、肥満群でコラーゲン低密度である者の割合が有意に高かった ($p<0.01$)。酸化ストレスのマーカである 8OHdG レベルは非肥満群で $0.088 \pm 0.05 \text{mg}/\mu\text{l}$ 、肥満群で $0.12 \pm 0.05 \text{mg}/\mu\text{l}$ であり、肥満群で 8OHdG レベルは高い傾向であった ($p=0.078$)。

5) GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量の相関

GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量との相関を解析した。解析対象者は、2 種類のアリルとも測定できた者で、且つ *HMOX1* mRNA 発現量の測定が可能であった 33 名とし、2 種類のアリルのうち長い配列を解析に含めた。その結果、GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量の間には負の相関が認められた ($\rho = -0.669, p < 0.001$, 図 2-6)。

6) Long アリルの有無と *HMOX1* mRNA 発現量との関連

HMOX1 遺伝子の GT 反復数は 25 未満を Short アリル、25-30 以上を Long アリルとして分類することが一般的である。本研究では、Long アリルを定義するため、25-30 回の各アリルの有無と *HMOX1* mRNA 発現量との関連を検討した。2 種類のアリルとも測定でき、且つ *HMOX1* mRNA 発現量の測定が可能であった 33 名を解析対照とした。表 2-3 に解析結果を示す。*HMOX1* mRNA 発現量は 27 回以上のアリルを持たないも

ので 0.101 ± 0.03 、27 回以上のアリルを持つもので 0.047 ± 0.03 であった。*HMOX1* の GT 反復数のカットオフ値を 25-30 の間で変化させた場合での Short と Long アリル間での *HMOX1* mRNA 発現量の違いに比べて、*HMOX1* 遺伝子の GT 反復数のカットオフ値を 27 にした場合は、Short と Long アリル間での *HMOX1* mRNA 発現量に最も有意な差が認められた ($z=-3.82$, $p<0.001$)。そのため本研究では、27 回未満を Short (S) アリル、27 回以上を Long (L) アリルと定義した。

7) 対象者の遺伝子型の分布

対象者の遺伝子型の分布は、S/S 24 名 (45.3%)、S/L 23 名 (43.3%)、L/L 6 名 (11.3%) であり、S/S、S/L の割合は、ほぼ同等であった (表 2-4)。

8) 遺伝子型と *HMOX1* mRNA 発現量との関連

遺伝子型により *HMOX1* mRNA 発現量には差が認められた ($p<0.01$)。各遺伝子型と *HMOX1* mRNA 発現量を比較した結果、S/S は 0.10 ± 0.03 、S/L は 0.049 ± 0.001 、L/L は 0.024 ± 0.009 であり、S/S は S/L ($p=0.002$)、L/L ($p=0.004$) と比較して有意に高値であった (図 2-7)。この結果は Long アリルを 1 つでももつことが *HMOX1* mRNA 発現量の減少に関連することを示している。そのため、本研究では、S/S の対象者を Long アリル非保有者、S/L および L/L の対象者を Long アリル保有者とした。

9) Long アリル保有頻度の解析における対象者の基本属性

本研究では、GT 繰り返し数 27 回以上を 1 つでも持つ者を Long アリル保有者とし

た。前述のとおり、本研究の解析対象者 88 名のうち、*HMOX1* 遺伝子 GT 繰り返し配列が測定できた者は 69 名 (78.4%)であり、そのうち 2 種類のアリルが測定できた者が 53 名 (60.2%)、1 種類のアリルのみ測定できた者が 16 名 (18.2%)であった。ここまでの解析においては、2 種類のアリルが測定できた者 53 名を解析対象としてきた。しかし、遺伝子型と *HMOX1* mRNA 発現量との解析から、27 回以上のアリルを 1 種類でも持つことが *HMOX1* mRNA 発現量の減少に関連することが明らかとなったため、1 種類のアリルのみ測定できた対象者 16 名のうち、その 1 種類が 27 回以上であった 7 名に関しては、Long アリル保有者として以後の解析に含めることとした。計 60 名の解析対象の基本属性を表 2-5 に示す。対象者の年齢は非肥満群で 36.56 ± 12.8 歳、肥満群で 41.93 ± 12.1 歳であり ($p=0.073$)、非肥満群で年齢が低い傾向があった。肥満群は非肥満群と比較して、肥満の指標である BMI ($p<0.01$)、体脂肪率 ($p<0.01$)、ウエスト値 ($p<0.01$)が有意に高かった。コラーゲン低密度に分類された者の割合は、非肥満群で 16 名 (53.3%)、肥満群で 24 名 (80.0%)であり、肥満群でコラーゲン低密度である者の割合が高かった ($p=0.05$)。酸化ストレスのマーカである 8OHdG レベルは非肥満群で $0.093 \pm 0.05 \text{mg}/\mu\text{l}$ 、肥満群で $0.12 \pm 0.05 \text{mg}/\mu\text{l}$ であり、肥満群で 8OHdG レベルは高い傾向であった ($p=0.115$)。

10) 肥満の有無による Long アリル保有割合の比較

非肥満群における Long アリル保有者 (S/L、L/L)は 15 名 (50.0%)、肥満群における

Long アリル保有者 (S/L、L/L)は 19 名 (63.3%)であり、肥満の有無による Long アリルの保有割合に差は認められなかった ($p=0.435$) (表 2-6)。

11) 超音波画像タイプ別対象者の基本属性

非肥満群では各属性に有意な差は認められなかった (表 2-7)。肥満群では、酸化ストレスマーカーである 8OHdG レベルが正常群で 0.082 ± 0.03 、コラーゲン低密度群で 0.123 ± 0.05 であり、コラーゲン低密度群で高い傾向がみられた ($p=0.113$) (表 2-8)。

12) 超音波画像タイプ別 Long アリル保有頻度の比較

超音波画像タイプと Long アリルの有無を解析した結果、正常群で Long アリルを保有する者は 7 名 (35.0%)であったのに対し、コラーゲン低密度群では 27 名 (67.5%)であり、Long アリルを保有する者の割合はコラーゲン低密度群において有意に高かった ($p=0.027$)。

非肥満群における Long アリル保有者は正常群で 6 名 (42.9%)、コラーゲン低密度群で 9 名 (56.3%)であり、保有割合に差はみとめられなかった ($p=0.715$) (表 2-9)。

肥満群における Long アリル保有者は正常群で 1 名 (16.6%)、コラーゲン低密度群で 18 名 (75.0%)であり、コラーゲン低密度群で有意に保有割合が高かった ($p=0.016$) (表 2-10)。

4. 考察

1) 本研究のオリジナリティ

本研究は、抗酸化酵素である *HMOX1* 遺伝子のプロモーター領域 GT 反復数と真皮コラーゲン密度の低下の関連を明らかにした初めての研究である。これまで私たちの研究グループは肥満に伴う ROS の過剰産生がコラーゲン低密度に関与すると考えて研究を進めてきた。しかし本研究の結果、肥満という従来から着目してきた要因に加えて、*HMOX1* 遺伝子の多型、即ち個人における抗酸化能の違いがコラーゲン低密度に影響を及ぼすことを明らかにした。今後、*HMOX1* 遺伝子多型を調べることで、肥満者におけるコラーゲン密度低下のハイリスク者の同定が可能になることを示した。

2) 本研究で明らかとなった知見

本研究の対象者（日本人成人男性 53 名）の *HMOX1* 遺伝子プロモーター領域の繰り返し数は、15-38 回の範囲に分布し、19-21、26-27 回にピークを持つ二峰性を示していた。この結果は、日本人男性 200 名を対象とした先行研究⁴⁹の結果とほぼ一致し、日本人男性の結果として代表性のあるものであった。

本研究では、*HMOX1* mRNA 発現量の解析から、*HMOX1* 多型の Long アリルを 27 回以上とした。Hirai *et al.* (2014) は、本研究と同様に繰り返し配列 27 回未満を Short、33 回以上を Long とし、ヒトリンパ芽球細胞の H₂O₂ への反応性を検討したところ、Short アリルを有する細胞では、Long アリルを有した細胞と比較し、*HMOX1* mRNA

発現量が 2.01 倍、HMOX1 酵素活性が 2.4 倍になったと報告している⁶⁰。さらに、*HMOX1* 遺伝子多型の関連論文においては、Long アリルのカットオフ値を 25-30 回の間で定めることが一般的であるが、特に、25 回と 27 回はカットオフ値として頻繁に用いられており^{51,61-65}、本研究において定めた 27 回は妥当なカットオフ値であったといえる。

酸化ストレスと関連する疾患であり、且つ肥満者に多く合併がみとめられる糖尿病においては、すでに *HMOX1* 多型との関連が報告されている⁵²。本研究の対象者においては、非肥満群に糖尿病患者はおらず、肥満者の中では 45 名中 2 名 (4.4%) であり、本研究の結果への影響は軽微であると考ええる。

非肥満群、肥満群における Long アリル保有の頻度を比較したところ、両群の保有割合に有意差は認められなかった。この結果は、*HMOX1* 多型と酸化ストレスに関連する疾患の発症リスクとの関連が報告されている中で、肥満と *HMOX1* 多型との間には関連が認められないことを示している。しかし、本研究の肥満者は平均 BMI が 27.81 ± 2.39 の軽度肥満者であったため、より酸化ストレスの関与が強い BMI 30 以上の肥満者における検討が今後必要である。

超音波画像タイプと Long アリルの有無を解析した結果、正常群で Long アリルを保有する者は 7 名 (35.0%) であったのに対し、コラーゲン低密度群では 27 名 (67.5%) であり、Long アリルを保有する者の割合はコラーゲン低密度群において有意に高か

った ($p=0.027$)。肥満群・非肥満群で層別解析を行ったところ、肥満群では同様に Long アリルを保有する者の割合はコラーゲン低密度群において有意に多かったが、非肥満群においては、Long アリル保有者の割合に差は認められなかった。これは、単に Long アリルを保有することがコラーゲン低密度のリスクとなるのではなく、ROS 生成要因である肥満を保有する集団において、Long アリルを併せ持つことが、コラーゲン密度低下のリスクとなることを示唆している。この結果は、喫煙者という ROS 生成要因を保有する集団において、慢性肺気腫の罹患者は、非罹患者と比較して *HMOX1* 遺伝子多型の Long アリルを持つ割合が有意に高いと報告する先行研究と一致している⁴⁹。一方で、皮膚疾患であるメラノーマ、乾癬の発症と *HMOX1* 遺伝子多型の Long アリルの保有割合に関連は認められなかった。この結果は、これらの研究の対象者は大学病院を受診した成人男女であり、ROS 生成要因を考慮していない集団であったことが一因であると考えられる。以上より、*HMOX1* 遺伝子多型は、酸化ストレスが上昇した集団において個人の抗酸化能の違いを顕著にすることを示しており、*HMOX1* 遺伝子多型の Long アリルの保有は、酸化ストレスが原因となるコラーゲン密度低下のハイリスク者の同定および治療への有用な情報になると考えられる。

本研究の結果、*HMOX1* 遺伝子の Long アリルをもつことが、コラーゲン低密度のリスクになることが明らかとなった。Nicolai, *et al.* (2009) は、肥満マウスの脂肪組織に *HMOX1* の発現を誘導すると、ROS および炎症性細胞の減少がおこること報告し

ている⁶⁶。また、慢性炎症性皮膚疾患である乾癬の皮膚で *HMOX1* を発現誘導すると、炎症性細胞の抑制、ケラチノサイトの過剰増殖の抑制がおこることが明らかとされている⁶⁷。*HMOX1* は、遊離ヘムをビリベルジン、鉄、一酸化炭素に分解したのち、ビリベルジンリダクターゼによって、ROS 消去作用をもつビリルビンを生成する^{28,68}。本研究において、肥満者が *HMOX1* 遺伝子の Long アリルをもつことが、コラーゲン低密度のリスクとなったことは、Long アリルによる *HMOX1* mRNA の発現減少および *HMOX1* 酵素の活性低下が生じ、ROS 分解作用をもつビリルビンの生成を抑制した結果と考えられる。それによって、肥満に伴い生じる ROS を十分に還元できず、MMP 発現上昇とそれに続くコラーゲン分解、即ちコラーゲン密度低下につながったと予想される。

3) 看護実践への提言

本研究では、遺伝子多型に加えて調査部位における酸化ストレスレベルを同時に測定したことから、大腿部の体毛を採取し、多型解析を実施した。しかし、多型は身体の中のどの細胞にも一律に解析可能であることから、今後は口腔粘膜からの細胞採取など、より侵襲の少ない方法で多型をアセスメントが可能であり、今後、看護学分野における実践において利用可能であると考えられる。

本研究の結果は、肥満者において遺伝子多型を調べることで、コラーゲン低密度のハイリスク者の同定が可能になることを示した。コラーゲン低密度は、外力に起因す

る創傷である褥瘡等の発生のリスクになると考えられる。従来、外力等により生じるスキントラブルに関しては、発赤、潰瘍等の症状を看護師が肉眼的に同定し、対処療法的に治療的スキンケアが実施されてきた。また、栄養状態や ADL など患者の内的コンディションの悪化が認められる場合には予防的スキンケアが行われる。しかし本研究の結果は、*HMOX1* 遺伝子多型という遺伝情報により患者個々人の皮膚の特性を把握し、予防的スキンケアの必要性を知ることが出来る可能性を示している。褥瘡やスキンテア (Skin Tear)等のスキンケアが必要となる場合において、個々の患者の多型情報つまり抗酸化能に応じて介入の要・不要を判断する、あるいは Long アリル保有者には抗酸化物質を高濃度に含有したスキンケア剤を使用する、介入回数を増やすなど、テーラーメイドスキンケアが可能になると考えられる。

4) 本研究の限界と今後の課題

本研究は、成人男性のみを対象とした。女性においては、女性ホルモンであるエストロゲンの影響が生体の酸化ストレスレベルに与える影響が大きいと報告されている^{69,70}ため、性周期を考慮した解析が今後必要である。

本研究の対象者の年齢は、非肥満者で 34.63 ± 11.9 歳、肥満者で 40.96 ± 12.5 歳であり、非肥満者は肥満者と比較して若い傾向にあった。一般的に皮膚のコラーゲン密度は 40 歳以降、加齢とともに低下するといわれており^{71,72}、各群におけるコラーゲン低密度の割合差に、年齢の影響があったことは否定できないため、今後サンプルサイズ

を増やした解析が必要である。

コラーゲン低密度群の超音波画像は、正常群の画像と比較して、真皮の肥厚が観察された (図 2-3)。この結果は、肥満マウスの皮膚の組織学的解析 (図 1-1)の結果、即ち肥満により真皮が菲薄化するという結果と矛盾していた。高周波超音波画像診断装置は、近年スキンアセスメントに広く用いられるようになった。これまで真皮コラーゲン密度と超音波画像の輝度が相関する⁵⁷ことは示されているものの、超音波画像が確かに真皮の構造を反映しているのか、その妥当性を証明した報告はない。従って、この矛盾の原因として、高周波超音波画像診断装置が肥満者の皮膚でその厚みを正確に測定できていない可能性が考えられる。一方で、肥満者の皮膚を高周波超音波画像診断装置で横断的に調査した先行研究²⁵では、肥満者の中にも真皮が肥厚する者と菲薄化する者があることが明らかとされている。両者の違いが生じる原因は明らかとなっていないが、肥満者では ob/ob マウスでは表現され得ない皮膚の変化があることが考えられるため、この点に関して今後検証していく必要がある。

HMOX1 遺伝子の Long アリルの保有は、コラーゲン代謝異常による線維化が一因となり発症する冠状動脈疾患、肺気腫とも関連することが報告されている⁴⁹⁻⁵¹。線維化は、コラーゲンの合成/分解のバランスのうち、分解系が主に障害された結果、コラーゲンが組織に過度に沈着することにより生じるといわれている⁷³。一方で、本研究で着目した真皮のコラーゲン低密度は、肥満によるコラーゲンの合成低下^{6,10,11} およ

び分解亢進^{8,12}がともに生じた結果であると考えられる。これらの結果は、線維化とコラーゲン低密度の間にはコラーゲンの代謝異常が関与しているという共通点があることを示している。しかし、その関連は未だ不明であるため、今後は *HMOX1* 遺伝子多型とコラーゲン代謝との関連をさらに詳細に検討していく必要がある。また、*HMOX1* の発現がコラーゲン代謝に与える影響に関して、近年、心血管系疾患へとつながる心筋の線維化に関する報告がなされている。Yu *et al* (2013)は、心線維芽細胞において Smad7 による *HMOX1* の発現活性が、ROS/MMP9 の発現増加によるコラーゲン過剰合成を抑制することを報告している⁷⁴。本研究において、*HMOX1* 多型による *HMOX1* の発現増加は、皮下脂肪細胞における ROS の抑制および1型コラーゲンの分解に働く MMP2,13 の発現増加を招き、直近の真皮のコラーゲン低密度を引き起こした可能性がある⁸が、このメカニズムに関する直接的因果関係は明らかになっていないため、この点に関する詳細な検討が今後の課題である。

結論

肥満の皮膚は酸化ストレスの上昇により、コラーゲン密度が低下した脆弱な状態である。しかし肥満者の中でもコラーゲン密度が低下する人とそうでない人が存在する。そのため、肥満者の中でも、コラーゲン密度低下のハイリスク者を同定する必要がある。

酸化ストレスは ROS の生成と抗酸化酵素のバランスであり、私たちはこれまで、ROS 生成要因である肥満とコラーゲン密度低下との関連を明らかにしてきたが、個人の抗酸化能との関連は不明であった。そこで本研究は、抗酸化酵素のひとつである HMOX1 に着目をし、①HMOX1 は肥満による皮膚の酸化ストレスに反応して発現上昇するか否か、②HMOX1 多型と真皮コラーゲン密度との関連があるか否かを検討した。

その結果、①HMOX1 は肥満による皮膚の酸化ストレスに反応して発現上昇する抗酸化酵素であること、②肥満者における HMOX1 多型の Long アリルの保有は、真皮コラーゲン低密度と関連があることを明らかとした。

このことは、HMOX1 多型は酸化ストレスが原因となるコラーゲン密度低下における個人の抗酸化能の違いを表し、肥満者におけるコラーゲン低密度のハイリスク者の同定を可能にすることを示唆している。今後、個々の患者の抗酸化能に応じたスキン

ケア、即ちテーラーメイドスキンケアの開発が期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の全過程において御指導を賜りました老年看護学/創傷看護学教授 真田弘美先生に厚く御礼申し上げます。

対象者として本研究に快くご協力頂きました皆様に心より感謝申し上げます。

本研究を実施するにあたり、多大なご理解とご協力を賜りました金沢大学医薬保健研究域附属健康増進科学センター長 須釜淳子先生、東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室准教授 馬淵昭彦先生、金沢大学医薬保健研究域保健学専攻 看護科学領域・臨床実践看護学講座 松本勝様に深く感謝申し上げます。

研究の過程において、専門的見地よりご指導くださいました老年看護学/創傷看護学特任講師 峰松健夫先生、ライフサポート技術開発学（モルテン）寄附講座特任助教 吉田美香子先生、老年看護学助教 飯坂真司先生に厚く御礼申し上げます。

試料解析にあたり、多大なるご協力を頂きました東京大学老年看護学/創傷看護学特任研究員 西島良美先生に深く感謝申し上げます。

最後に、研究活動をサポートしてくださいました老年看護学/創傷看護学教室の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

1. 日本肥満学会. 肥満症診断基準. *肥満研究 17 Extra Edition*. 2011:1-3.
2. 厚生労働省. 国民健康・栄養調査結果の概要について：肥満とやせの状況. <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/12/hl225.html>. 2008.12.
3. Yosipovitch G, DeVore A, Dawn A. Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. *J Am Acad Dermatol*. Jun 2007;56(6):901-916; quiz 917-920.
4. Shipman AR, Millington GW. Obesity and the skin. *Br J Dermatol*. Oct 2011;165(4):743-750.
5. Michael H. Ross WP. Ross 組織学. 南江堂、東京. 2012.
6. Enser M, Avery NC. Mechanical and chemical properties of the skin and its collagen from lean and obese-hyperglycaemic (ob/ob) mice. *Diabetologia*. Jul 1984;27(1):44-49.
7. Akase T, Nagase T, Huang L, et al. Aging-like skin changes induced by ultraviolet irradiation in an animal model of metabolic syndrome. *Biol Res Nurs*. Apr 2012;14(2):180-187.
8. Ibuki A, Akase T, Nagase T, et al. Skin fragility in obese diabetic mice: possible involvement of elevated oxidative stress and upregulation of matrix metalloproteinases. *Exp Dermatol*. Mar 2012;21(3):178-183.
9. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. Nov 28 2003;55(12):1531-1546.
10. Ezure T, Amano S. Increased subcutaneous adipose tissue impairs dermal function in diet-induced obese mice. *Exp Dermatol*. Oct 2010;19(10):878-882.
11. Yamane T, Kobayashi-Hattori K, et al. High-fat diet reduces levels of type I tropocollagen and hyaluronan in rat skin. *Mol Nutr Food Res*. May 2010;54 Suppl 1:S53-61.
12. Minematsu T, Huang L, Ibuki A, et al. Altered expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in matured rat adipocytes in vitro. *Biol Res Nurs*. Jul 2012;14(3):242-249.
13. VanGilder C, Amlung S, Harrison P, et al. Results of the 2008-2009 International Pressure Ulcer Prevalence Survey and a 3-year, acute care, unit-specific analysis. *Ostomy Wound Manage*. Nov 1 2009;55(11):39-45.
14. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, et al. Obesity, outcomes and quality of care: body mass index increases the risk of wound-related complications in colon cancer surgery. *Am J Surg*. Jan 2014;207(1):17-23.
15. LeBlanc K, Baranoski S, Christensen D, et al. International Skin Tear Advisory Panel: a tool kit to aid in the prevention, assessment, and treatment of skin tears using a Simplified Classification System (c). *Adv Skin Wound Care*. Oct 2013;26(10):459-476; quiz

- 477-458.
16. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* Sep 30 1991;91(3C):31S-38S.
 17. 岡本研, 西野武士. XORによる活性酸素生成機構: レドックスシグナル発生の分子基盤. 実験医学. 羊土社. 2006;24:1724-1730.
 18. Lijnen HR, Christiaens V, Scroyen I, et al. Impaired adipose tissue development in mice with inactivation of placental growth factor function. *Diabetes.* Oct 2006;55(10):2698-2704.
 19. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Oct 2007;293(4):E1118-1128.
 20. Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond).* Jan 2009;33(1):54-66.
 21. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Carreira MC, et al. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic Res.* Apr 2013;47(4):243-256.
 22. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct 2003;88(10):4673-4676.
 23. Keaney JF, Jr., Larson MG, Vasan RS, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Mar 1 2003;23(3):434-439.
 24. Khan NI, Naz L, Yasmeen G. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pak J Pharm Sci.* Jan 2006;19(1):62-65.
 25. 堀井素子, 須釜淳子, 大江真琴ら. 超音波画像診断装置を用いた男性肥満者の真皮および皮下脂肪組織の構造変化の抽出ならびに酸化ストレスとの関連性の検討. 日本創傷・オストミー・失禁管理学会誌. 2013;17(1):23-32.
 26. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* Jul 1988;2(10):2557-2568.
 27. 小園亮次 渡雄山, 大島哲也. ヘムオキシゲナーゼ(HO)に着目した酸化ストレスの臨床診断と動脈硬化性疾患. 臨床病理. 2007;55:758-763.
 28. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* Dec 10 1969;244(23):6388-6394.
 29. Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Jul 1996;15(1):9-19.
 30. Vogt BA, Alam J, Croatt AJ, et al. Acquired resistance to acute oxidative stress. Possible role of heme oxygenase and ferritin. *Lab Invest.* Apr 1995;72(4):474-483.
 31. Otterbein LE, Kolls JK, Mantell LL, et al. Exogenous administration of heme oxygenase-1

- by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J Clin Invest.* Apr 1999;103(7):1047-1054.
32. Kimpara T, Takeda A, Watanabe K, et al. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Hum Genet.* Jul 1997;100(1):145-147.
 33. Okinaga S, Takahashi K, Takeda K, et al. Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood.* Jun 15 1996;87(12):5074-5084.
 34. Robert L. Nussbaum RRM, Huntington F. Willard 編, 福嶋義光監訳. 遺伝医学. *メディカル・サイエンス・インターナショナル.* 2009.
 35. 吉川敏一編. 酸化ストレス フリーラジカル医学生物学の最前線 Ver.2. 別冊・医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社. 2006:339-344.
 36. Konukoglu D, Turhan MS, Ercan M, et al. Relationship between plasma leptin and zinc levels and the effect of insulin and oxidative stress on leptin levels in obese diabetic patients. *J Nutr Biochem.* Dec 2004;15(12):757-760.
 37. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* Aug 1 2002;33(3):337-349.
 38. Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem.* Oct-Nov 2006;387(10-11):1329-1335.
 39. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* Dec 2000;57(13-14):1825-1835.
 40. Haines DD, Lekli I, Teissier P, Bak I, Tosaki A. Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders. *Acta Physiol (Oxf).* Apr 2012;204(4):487-501.
 41. Svobodova AR, Galandakova A, Sianska J, et al. Acute exposure to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(4):471-479.
 42. Mulero M, Romeu M, Giralt M, et al. Oxidative stress-related markers and langerhans cells in a hairless rat model exposed to UV radiation. *J Toxicol Environ Health A.* Jul 2006;69(14):1371-1385.
 43. Katiyar SK, Meeran SM. Obesity increases the risk of UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signaling. *Free Radic Biol Med.* Jan 15 2007;42(2):299-310.
 44. Okada K, Takahashi Y, Ohnishi K, et al. Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. *J Dermatol Sci.* Dec 1994;8(3):183-186.
 45. Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, et al. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Feb

- 2009;296(2):E333-342.
46. Minematsu T, Oe M, Sugama J, et al. Skin Blotting: A Noninvasive Technique for Evaluating Physiological Skin Status. *Advances in Skin & Wound Care* In Press.
 47. Lim J, Luderer U. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol Reprod.* Apr 2011;84(4):775-782.
 48. Nagase T, Akase T, Sanada H, et al. Aging-like skin changes in metabolic syndrome model mice are mediated by mineralocorticoid receptor signaling. *Aging Cell.* Feb 2013;12(1):50-57.
 49. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet.* Jan 2000;66(1):187-195.
 50. Chen YH, Chau LY, Chen JW, et al. Serum bilirubin and ferritin levels link heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and susceptibility to coronary artery disease in diabetic patients. *Diabetes Care.* Aug 2008;31(8):1615-1620.
 51. Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 1 2002;22(10):1680-1685.
 52. Song F, Li X, Zhang M, et al. Association between heme oxygenase-1 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes in a Chinese population. *Am J Epidemiol.* Sep 15 2009;170(6):747-756.
 53. Okamoto I, Krogler J, Endler G, et al. A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with risk for melanoma. *Int J Cancer.* Sep 15 2006;119(6):1312-1315.
 54. Chang YC, Wu WM, Tsai HY, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter and the risk of psoriasis in Taiwanese. *Arch Dermatol Res.* Nov 2012;304(9):739-744.
 55. Moran CM, Bush NL, Bamber JC. Ultrasonic propagation properties of excised human skin. *Ultrasound Med Biol.* 1995;21(9):1177-1190.
 56. Christ C, Brenke R, Sattler G, et al. Improvement in skin elasticity in the treatment of cellulite and connective tissue weakness by means of extracorporeal pulse activation therapy. *Aesthet Surg J.* Sep-Oct 2008;28(5):538-544.
 57. Olerud JE, O'Brien W, Jr., Riederer-Henderson MA, et al. Ultrasonic assessment of skin and wounds with the scanning laser acoustic microscope. *J Invest Dermatol.* May 1987;88(5):615-623.
 58. de Rigal J, Escoffier C, Querleux B, et al. Assessment of aging of the human skin by in vivo ultrasonic imaging. *J Invest Dermatol.* Nov 1989;93(5):621-625.
 59. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a

- marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res.* Dec 1997;387(3):147-163.
60. Hirai H, Kubo H, Yamaya M, et al. Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood.* Sep 1 2003;102(5):1619-1621.
 61. Courtney AE, McNamee PT, Middleton D, et al. Association of functional heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism with renal transplantation outcomes. *Am J Transplant.* Apr 2007;7(4):908-913.
 62. Murakami A, Fujimori Y, Yoshikawa Y, et al. Heme oxygenase-1 promoter polymorphism is associated with risk of malignant mesothelioma. *Lung.* Jun 2012;190(3):333-337.
 63. Nakayama K, Kikuchi A, Yasuda H, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and decline in lung function in Japanese men. *Thorax.* Oct 2006;61(10):921.
 64. Kikuchi A, Yamaya M, Suzuki S, et al. Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism. *Hum Genet.* Apr 2005;116(5):354-360.
 65. Ozaki KS, Marques GM, Nogueira E, et al. Improved renal function after kidney transplantation is associated with heme oxygenase-1 polymorphism. *Clin Transplant.* Sep-Oct 2008;22(5):609-616.
 66. Nicolai A, Li M, Kim DH, et al. Heme oxygenase-1 induction remodels adipose tissue and improves insulin sensitivity in obesity-induced diabetic rats. *Hypertension.* Mar 2009;53(3):508-515.
 67. Listopad J, Asadullah K, Sievers C, et al. Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells. *Exp Dermatol.* Aug 2007;16(8):661-670.
 68. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med.* Mar 1970;75(3):410-421.
 69. Angoa-Perez M, Jiang H, Rodriguez AI, et al. Estrogen counteracts ozone-induced oxidative stress and nigral neuronal death. *Neuroreport.* Apr 24 2006;17(6):629-633.
 70. Mobley JA, Brueggemeier RW. Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis.* Jan 2004;25(1):3-9.
 71. Wojtysiak D. Effect of age on structural properties of intramuscular connective tissue, muscle fibre, collagen content and meat tenderness in pig longissimus lumborum muscle. *Folia Biol (Krakow).* 2013;61(3-4):221-226.
 72. Castelo-Branco C, Pons F, Gratacos E, et al. Relationship between skin collagen and bone changes during aging. *Maturitas.* Mar 1994;18(3):199-206.
 73. Arthur MJ. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion.* Jul-Aug 1998;59(4):376-380.

74. Yu H, Huang J, Wang S, et al. Overexpression of Smad7 suppressed ROS/MMP9-dependent collagen synthesis through regulation of heme oxygenase-1. *Mol Biol Rep.* Sep 2013;40(9):5307-5314.

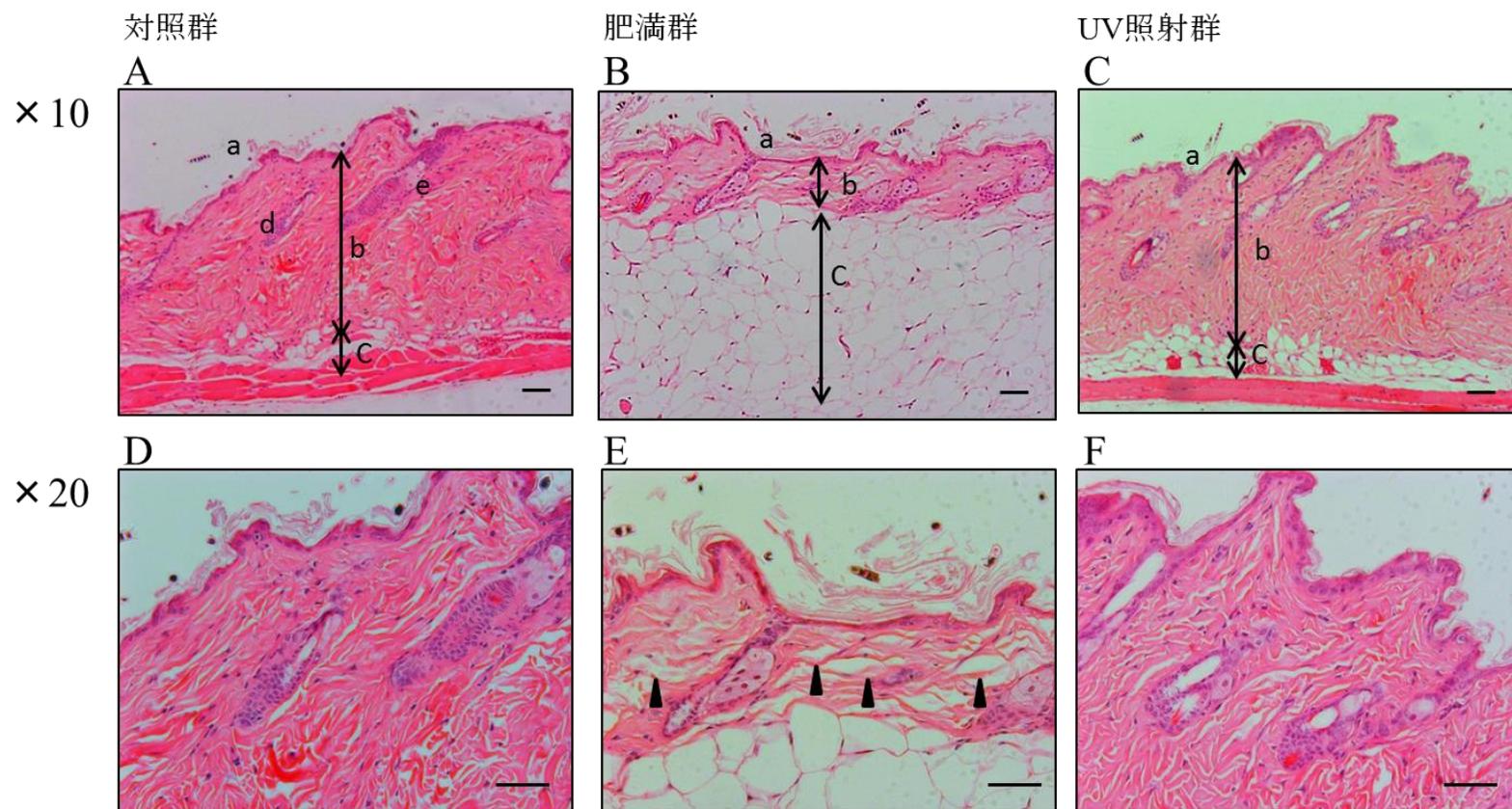


図 1-1. 組織学的解析

対照群、肥満群、UV 照射群の皮膚組織の構造を HE 染色にて解析した。a: 表皮、b: 真皮層、c:皮下脂肪層、d:毛包、e:脂腺。肥満群 (B) は、対照群 (A)、UV 照射群 (C)と比較して、真皮層 (b)が菲薄化し、皮下脂肪層 (c)が著しく蓄積していた。肥満群の真皮層 (E)は、対照群 (D)、UV 照射群 (F)と比較して、コラーゲン線維の間隙が拡大しており、コラーゲン密度の低下が示唆された (E、矢頭)。UV 照射群の表皮および真皮層は (C&F)、対象群 (A&D)と比較して明確な組織学的差異は認められなかった。スケールバー=50 μ m。

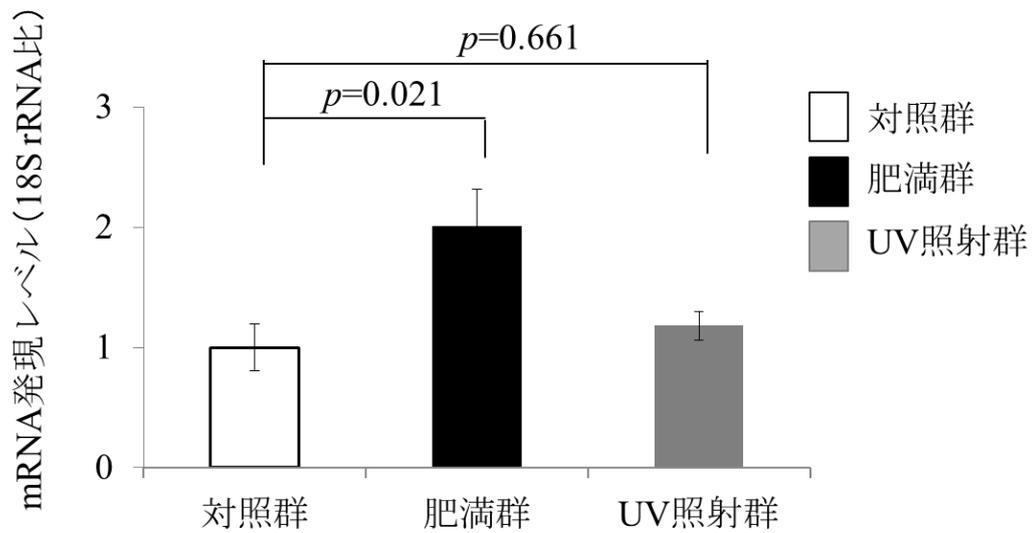


図 1-2. *Hmox1* mRNA 発現レベルの比較

対照群 (□)、肥満群 (■)、UV 照射群 (■)における *Hmox1* の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。内部標準には 18s rRNA を用いた。比較 Ct 法にて各抗酸化酵素遺伝子の mRNA 発現レベルを対照群に対する相対値として算出した ($n=5$, 平均値±SD, Dunnet 検定)。

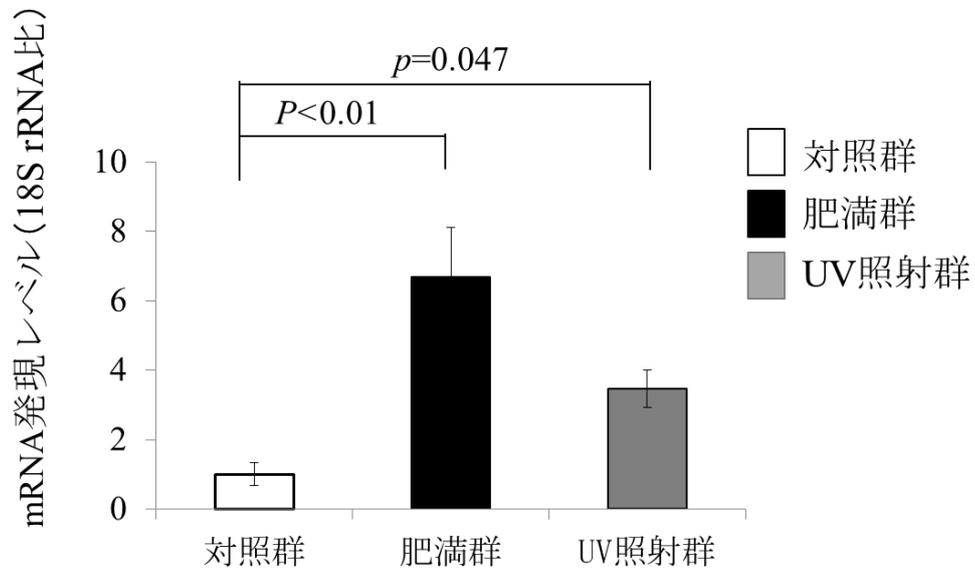


図 1-3. Sod1 mRNA 発現レベルの比較

対照群 (□)、肥満群 (■)、UV 照射群 (■)における *Sod1* の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。内部標準には 18s rRNA を用いた。比較 Ct 法にて各抗酸化酵素遺伝子の mRNA 発現レベルを対照群に対する相対値として算出した ($n=5$, 平均値 \pm SD, Dunnett 検定)。

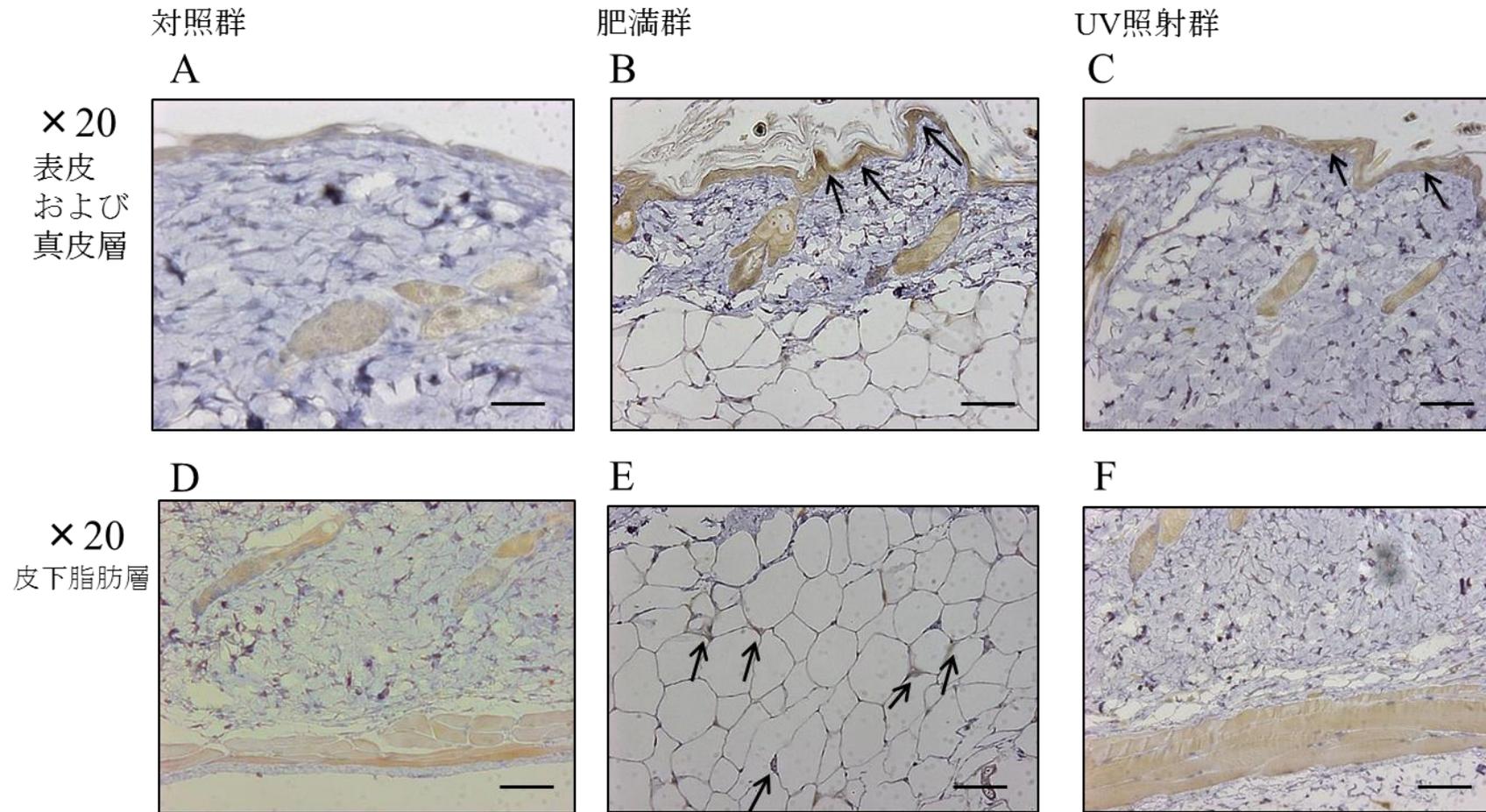


図 1-4. HMOX1 の蛋白質発現

対照群、肥満群、UV 照射群における HMOX1 蛋白質の局在を免疫組織化学 (酵素抗体法)を用いて解析した。表皮および真皮層において、対照群 (A)で HMOX1 の陽性細胞は認められなかった一方で、肥満群の表皮の角化細胞 (B, 矢印)、UV 照射群 の表皮の角化細胞の一部 (C, 矢印)に HMOX1 の陽性細胞が確認された。皮下脂肪層においては、対照群 (D)、UV 照射群 (F)において陽性細胞が観察されなかった一方で、肥満群では脂肪細胞に陽性細胞が観察された (E, 矢印)。スケールバー=50 μ m。

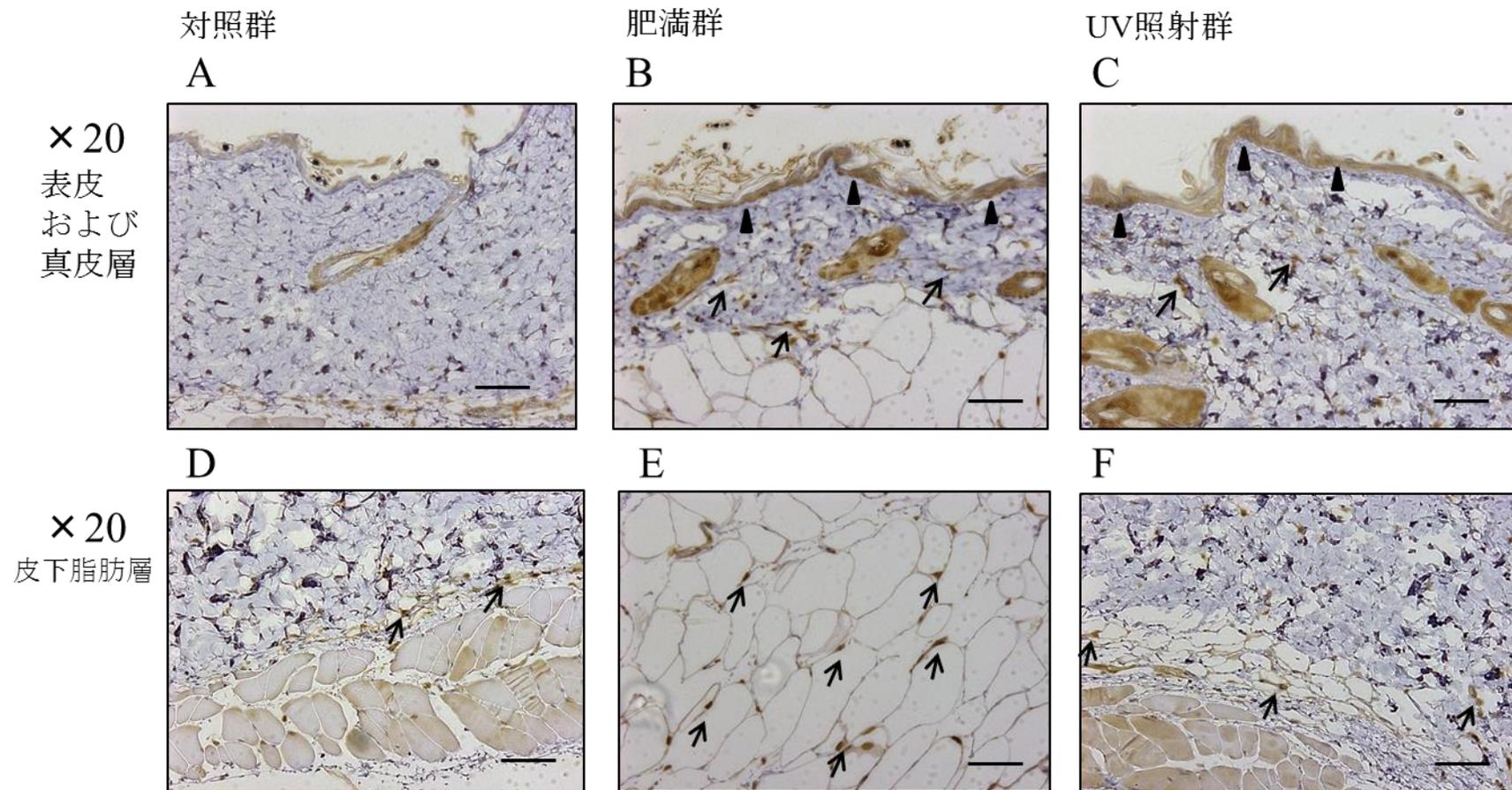


図 1-5. SOD1 の蛋白質発現

対照群、肥満群、UV 照射群における SOD1 蛋白質の局在を免疫組織化学 (酵素抗体法)を用いて解析した。表皮の角化細胞 (矢頭)および真皮の線維芽細胞 (矢印)において、肥満群 (B)、UV 照射群 (C)で陽性細胞が確認された (B-C, 矢頭、矢印)。皮下脂肪層においては、対照群 (D)、肥満群 (E)、UV 照射群 (F)全てにおいて脂肪細胞 (矢印)に陽性細胞が観察されたが (D-F, 矢印)、その数は対照群と比較して、肥満群および UV 照射群においてより多かった。スケールバー=50 μ m。

表2-1. 対象者の基本属性

n=53

属性	非肥満群 (n=27)	肥満群 (n=26)	p
年齢 (歳)	34.63 (11.9)	40.96 (12.5)	0.045 ^b
BMI (kg/m ²)	22.17 (1.8)	27.46 (2.1)	<0.01 ^b
体脂肪率 (%)	15.62 (4.4)	24.39 (3.7)	<0.01 ^b
ウエスト値 (cm)	82.59 (6.8)	95.84 (6.5)	<0.01 ^a
喫煙あり	4 (30.7)	4 (20.0)	0.681 ^c
糖尿病 ¹⁾	0 (0.0)	1 (0.05)	0.606 ^c
高血圧 ²⁾	0 (0.0)	3 (15.0)	0.209 ^c
高脂血症 ³⁾	2 (15.4)	2 (10.0)	0.519 ^c
メタボリックシンドローム ⁴⁾	0 (0.0)	2 (10.0)	0.259 ^c
コラーゲン低密度 ⁵⁾	14 (51.8)	21 (80.7)	0.042 ^d
HMOX1 mRNA発現量	0.069 (0.03)	0.062 (0.04)	0.298 ^b
8OHdG (mg/μl)	0.087 (0.04)	0.11 (0.05)	0.093 ^a

^a 対応のないt検定 ^b Mann-Whitney U検定 ^c Fisherの正確確率検定 ^d カイ二乗検定 平均 (SD)、n (%)

1) 空腹時血漿血糖値 \geq 110mg/dlかつ/または薬物治療中

2) 収縮期血圧 \geq 140mmHgかつ/または拡張期血圧 \geq 90mmHgかつ/または薬物治療中

3) 脂質血清トリグリセリド値 \geq 150mg/dlかつ/またはHDLコレステロール $<$ 40mg/dl

4) ウエスト周囲径 \geq 85cmかつ上記1)~3)の2項目以上

5) 真皮深層に高輝度凝集域が存在せず、真皮領域の高輝度域の散在に、一部あるいは全体に欠落を認める

表2-2. 2種類のアリルおよびHMOX1 mRNA発現量の測定が可能であった33名の基本属性

属性	非肥満群 (n=13)	肥満群 (n=20)	p
年齢 (歳)	36.38 (12.3)	40.40 (11.8)	0.130 ^b
BMI (kg/m ²)	21.69 (2.2)	27.62 (2.3)	<0.01 ^b
体脂肪率 (%)	15.53 (4.7)	23.82 (4.2)	<0.01 ^b
ウエスト値 (cm)	82.07 (8.8)	94.87 (6.6)	<0.01 ^a
喫煙あり	4 (30.7)	4 (20.0)	0.681 ^c
糖尿病 ¹⁾	0 (0.0)	1 (0.05)	0.606 ^c
高血圧 ²⁾	0 (0.0)	3 (15.0)	0.209 ^c
高脂血症 ³⁾	2 (15.4)	2 (10.0)	0.519 ^c
メタボリックシンドローム ⁴⁾	0 (0.0)	2 (10.0)	0.259 ^c
コラーゲン低密度 ⁵⁾	5 (38.5)	16 (80.0)	<0.01 ^d
HMOX1 mRNA発現量	0.069 (0.03)	0.062 (0.04)	0.285 ^b
8OHdG (mg/μl)	0.088 (0.05)	0.12 (0.05)	0.078 ^a

^a 対応のないt検定 ^b Mann-Whitney U検定 ^c Fisherの正確確率検定 ^d カイ二乗検定 平均 (SD)、n (%)

1) 空腹時血漿血糖値 \geq 110mg/dlかつ/または薬物治療中

2) 収縮期血圧 \geq 140mmHgかつ/または拡張期血圧 \geq 90mmHgかつ/または薬物治療中

3) 脂質血清トリグリセリド値 \geq 150mg/dlかつ/またはHDLコレステロール $<$ 40mg/dl

4) ウエスト周囲径 \geq 85cmかつ上記1)~3)の2項目以上

5) 真皮深層に高輝度凝集域が存在せず、真皮領域の高輝度域の散在に、一部あるいは全体に欠落を認める

表 2-3. Longアリのカットオフ値によるHMOX1 mRNA発現量

n=33

カットオフ値	Longアリ	n	HMOX1 mRNA発現量	Z	p
≥25	なし	n=8	0.194 (0.04)	-3.36	0.001
	あり	n=25	0.054 (0.03)		
≥26	なし	n=9	0.104 (0.04)	-3.36	0.001
	あり	n=24	0.050 (0.03)		
≥27	なし	n=11	0.101 (0.03)	-3.82	<0.001
	あり	n=22	0.047 (0.03)		
≥28	なし	n=19	0.081 (0.04)	-2.73	0.006
	あり	n=14	0.043 (0.03)		
≥29	なし	n=25	0.070 (0.04)	-1.89	0.059
	あり	n=8	0.042 (0.04)		
≥30	なし	n=28	0.071 (0.04)	-1.91	0.056
	あり	n=5	0.032 (0.01)		

カットオフ値; HMOX1 遺伝子繰り返し数 (回)

平均 (SD)

Mann-Whitney U検定

表2-4. 対象者の遺伝子型の分布 $n=53$

遺伝子型		
S/S	S/L	L/L
24 (45.3)	23 (43.4)	6 (11.3)
n (%)		

表2-5. 1種類のみアシルが測定できそのアシルが27回以上
であった対象者を含めた基本属性

	非肥満群 (n=30)	肥満群 (n=30)	n=60 p
年齢 (歳)	36.56 (12.8)	41.93 (12.1)	0.073 ^b
BMI (kg/m ²)	22.17 (1.8)	27.29 (2.0)	<0.01 ^b
体脂肪率 (%)	15.68 (4.4)	24.16 (3.8)	<0.01 ^b
ウエスト値 (cm)	82.78 (6.7)	95.53 (6.4)	<0.01 ^a
喫煙あり	10 (30.7)	7 (20.0)	0.567 ^c
糖尿病 ¹⁾	0 (0.0)	1 (0.05)	0.500 ^c
高血圧 ²⁾	1 (0.0)	3 (15.0)	0.612 ^c
高脂血症 ³⁾	2 (15.4)	2 (10.0)	0.694 ^c
メタボリックシンドローム ⁴⁾	0 (0.0)	2 (10.0)	0.246 ^c
コラーゲン低密度 ⁵⁾	16 (53.3)	24 (80.0)	0.050 ^d
<i>HMOX1</i> mRNA発現量	0.066 (0.03)	0.064 (0.04)	0.526 ^b
8OHdG (mg/μl)	0.093 (0.05)	0.12 (0.05)	0.115 ^a

^a 対応のないt検定 ^b Mann-Whitney U検定 ^c Fisherの正確確率検定 ^d カイ二乗検定 平均 (SD)、n (%)

1) 空腹時血漿血糖値 \geq 110mg/dlかつ/または薬物治療中

2) 収縮期血圧 \geq 140mmHgかつ/または拡張期血圧 \geq 90mmHgかつ/または薬物治療中

3) 脂質血清トリグリセリド値 \geq 150mg/dlかつ/またはHDLコレステロール $<$ 40mg/dl

4) ウエスト周囲径 \geq 85cmかつ上記1)~3)の2項目以上

5) 真皮深層に高輝度凝集域が存在せず、真皮領域の高輝度域の散在に、一部あるいは全体に欠落を認める

表2-6. 肥満の有無によるLongアレル保有割合の比較 *n* =60

Longアレル	非肥満群 (n=30)	肥満群 (n=30)	<i>p</i>
なし(S/S)	15 (50.0)	11 (36.7)	0.435
あり(S/L,L/L)	15 (50.0)	19 (63.3)	

カイ二乗検定

表2-7. 非肥満群における超音波画像タイプ別基本属性

n=30

	n	正常群 (n=14)	n	コラーゲン低密度群 (n=16)	p
年齢 (歳)	14	38.21 (13.32)	16	35.12 (12.65)	0.453 ^b
BMI (kg/m ²)	14	21.90 (2.01)	16	22.40 (1.57)	0.587 ^b
体脂肪率 (%)	14	16.01 (3.96)	16	15.40 (4.79)	0.943 ^b
ウエスト値 (cm)	14	82.07 (8.66)	16	83.41 (4.53)	0.594 ^b
喫煙あり	14	3 (40.0)	16	7 (38.8)	0.183 ^c
糖尿病 ¹⁾	14	0 (0.0)	16	0 (0.0)	
高血圧 ²⁾	14	1 (12.0)	16	0 (0.0)	0.252 ^c
高脂血症 ³⁾	14	2 (12.0)	16	0 (0.0)	0.209 ^c
メタボリックシンドローム ⁴⁾	14	0 (0.0)	16	0 (0.0)	
HMOX1 mRNA発現量	9	0.0723(0.04)	5	0.053 (0.03)	0.337 ^a
8OHdG (mg/μl)	14	0.079 (0.05)	16	0.104 (0.05)	0.221 ^a

^a 対応のないt検定 ^b Mann-Whitney U検定 ^c Fisherの正確確率検定

平均(SD)、n (%)

1) 空腹時血漿血糖値 \geq 110mg/dlかつ/または薬物治療中2) 収縮期血圧 \geq 140mmHgかつ/または拡張期血圧 \geq 90mmHgかつ/または薬物治療中3) 脂質血清トリグリセリド値 \geq 150mg/dlかつ/またはHDLコレステロール $<$ 40mg/dl4) ウエスト周囲径 \geq 85cmかつ上記1)~3)の2項目以上

表2-8. 肥満群におけるエコータイプ別基本属性

n=30

	n	正常群	コラーゲン低密度群		p
		(n=6)	n	(n=24)	
年齢 (歳)	6	44.33 (16.1)	24	41.33 (11.2)	0.597 ^b
BMI (kg/m ²)	6	26.55 (1.6)	24	27.43 (2.1)	0.321 ^b
体脂肪率 (%)	6	24.83 (3.6)	24	23.99 (4.0)	0.645 ^a
ウエスト値 (cm)	6	96.25 (6.4)	24	95.35 (6.5)	0.765 ^a
喫煙あり	6	1 (16.7)	24	6 (25.0)	0.567 ^c
糖尿病 ¹⁾	6	0 (0.0)	24	1 (5.4)	0.800 ^c
高血圧 ²⁾	6	1 (16.7)	24	1 (13.5)	0.644 ^c
高脂血症 ³⁾	6	1 (12.5)	24	1 (8.1)	0.366 ^c
メタボリックシンドローム ⁴⁾	6	1 (12.5)	24	1 (2.7)	0.366 ^c
HMOX1 mRNA発現量	3	0.086 (0.03)	20	0.060 (0.05)	0.230 ^b
8OHdG (mg/μl)	6	0.082 (0.03)	24	0.123 (0.05)	0.113 ^a

^a 対応のないt検定 ^b Mann-Whitney U検定 ^c Fisherの正確確率検定

平均(SD)、n (%)

1) 空腹時血漿血糖値 ≥ 110 mg/dlかつ/または薬物治療中

2) 収縮期血圧 ≥ 140 mmHgかつ/または拡張期血圧 ≥ 90 mmHgかつ/または薬物治療中

3) 脂質血清トリグリセリド値 ≥ 150 mg/dlかつ/またはHDLコレステロール < 40 mg/dl

4) ウエスト周囲径 ≥ 85 cmかつ上記1)~3)の2項目以上

表2-9. 非肥満群における超音波画像タイプ別 Longアリアル保有頻度の比較

	正常群 (n=14)	コラーゲン低密度群 (n=16)	<i>p</i>
Longアリアルあり	6 (42.9)	9 (56.3)	0.715

n=30

カイ二乗検定

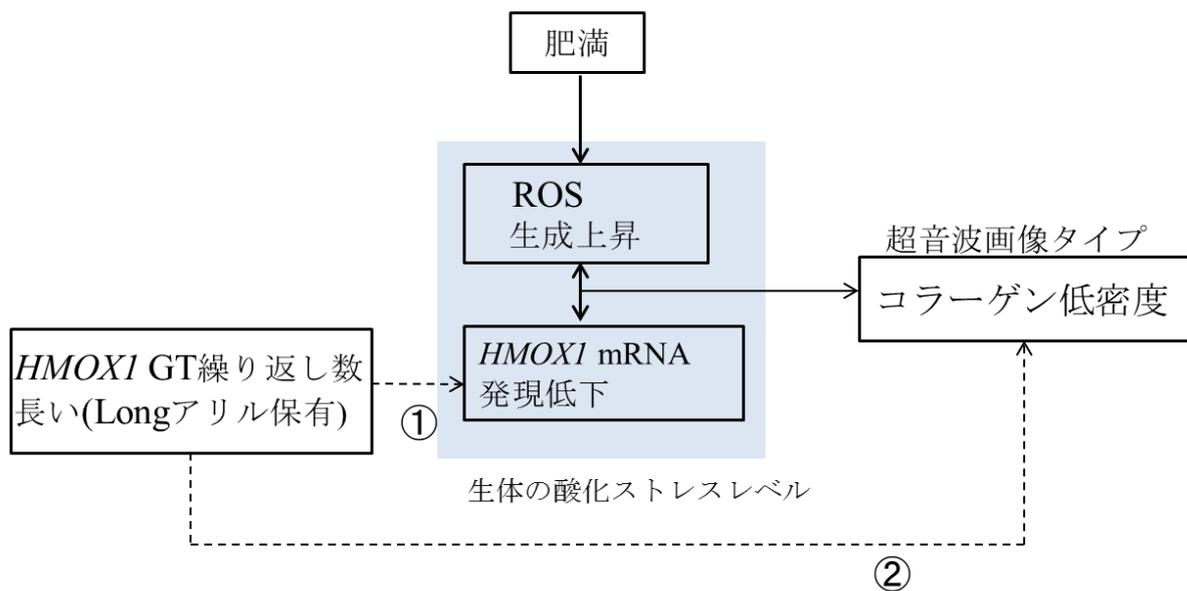


図 2-1. 研究概念図

第 2 章では、*HMOX1* 遺伝子多型 (GT 繰り返し数) と肥満者の皮膚におけるコラーゲン低密度との関連を明らかにすることを目的とし、以下 2 点の仮説を検討する。

- ① *HMOX1* 遺伝子 GT 繰り返し数が長い場合 (Long アリルを保有する場合)、*HMOX1* mRNA 発現量が低下する。
- ② 肥満者において *HMOX1* 遺伝子プロモーター領域の GT 繰り返し数が長い者は、真皮コラーゲン低密度であるリスクが高い。

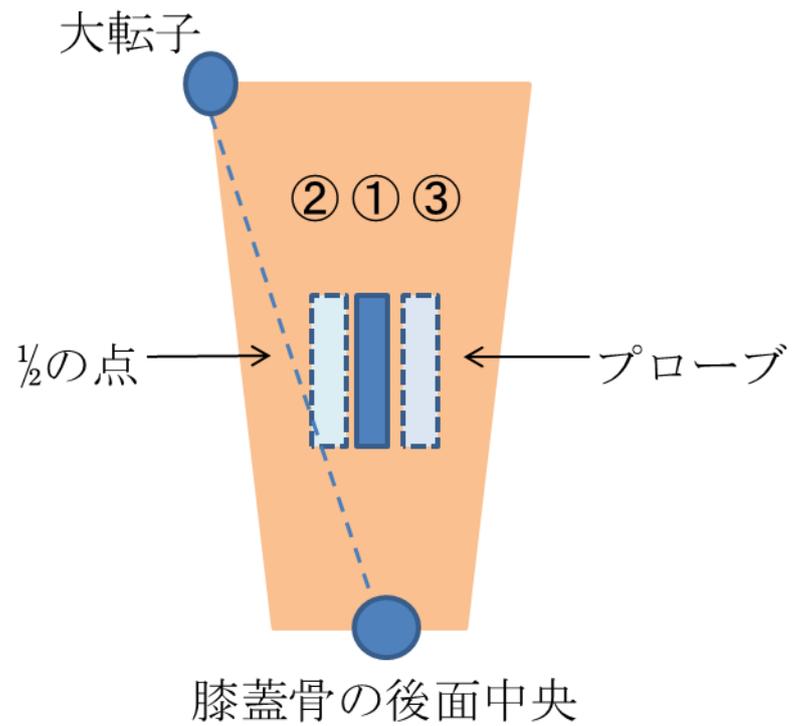


図 2-2. 左大腿部後面における超音波画像取得部位

対象者の左大腿部後面の大転子と膝蓋骨後面中央の点を結ぶ直線の 1/2 の高さに相当する部位において、研究者が頭尾方向にプローブを当て、水平方向に 10 mm ずつ撮影部位をずらしながら、各個人につき 3 画像取得した。

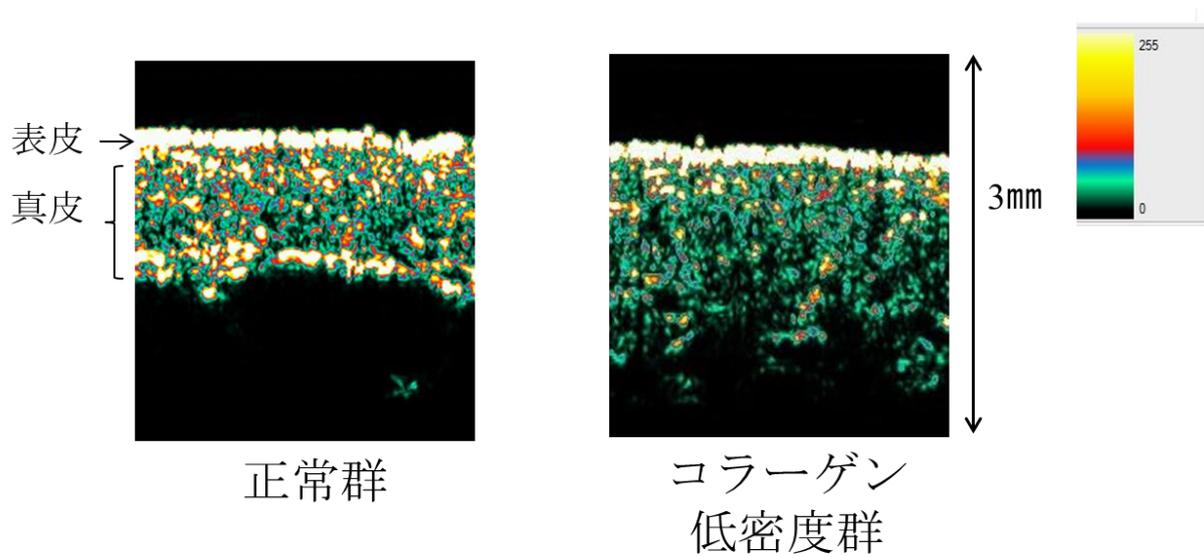


図 2-3. 超音波画像タイプ

対象者の左大腿部超音波画像を正常群およびコラーゲン低密度に分類した。

正常群(正常な真皮コラーゲン像):真皮領域全体に斑点状の高輝度域が散在し、かつ真皮深層に高輝度凝集域が存在する。

コラーゲン低密度群:真皮深層に高輝度凝集域が存在せず、真皮領域の高輝度域の散在に、一部あるいは全体に欠落を認める。

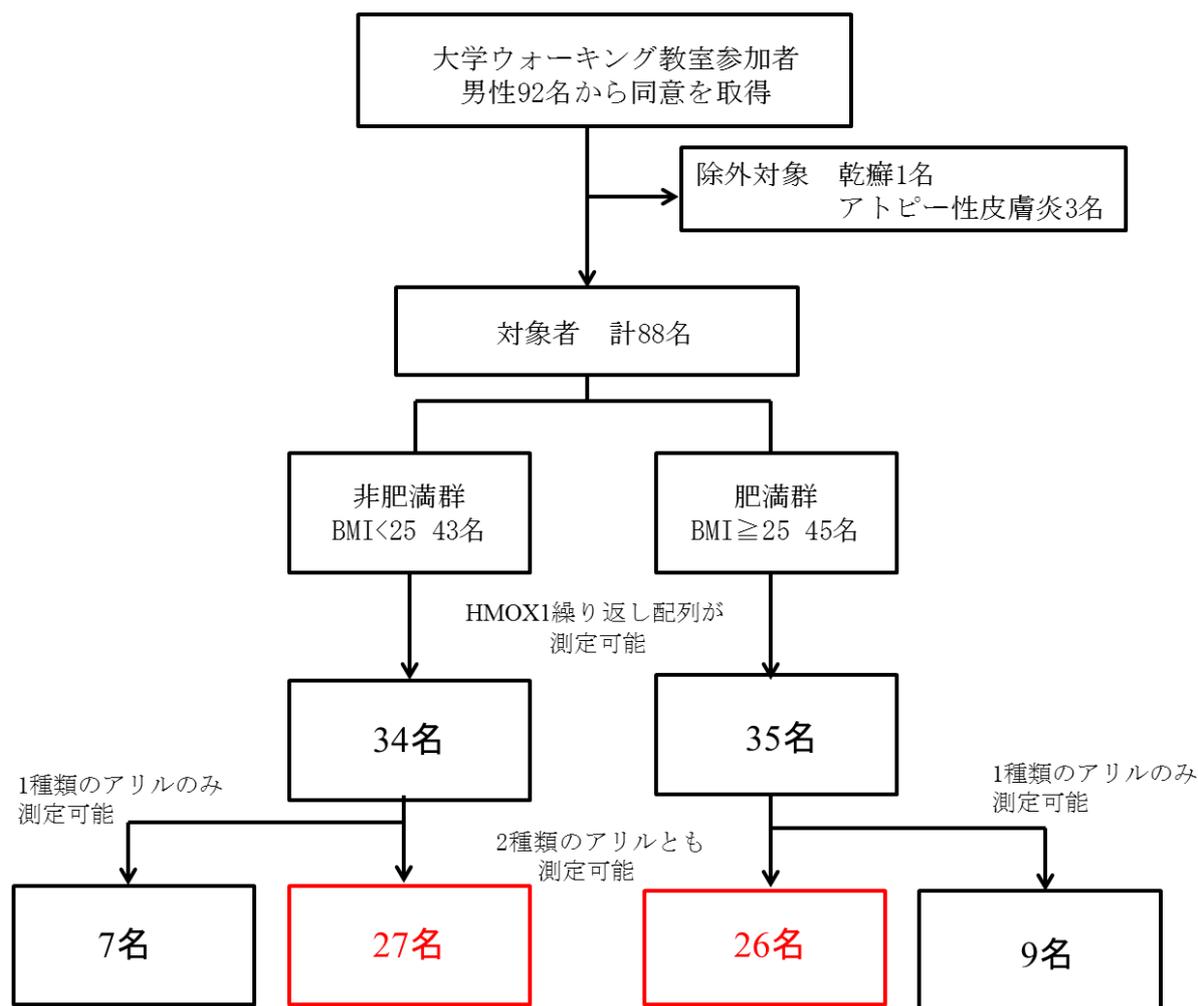


図 2-4. 解析対象者選定のフローチャート

調査期間中に石川県内の大学主催ウォーキング教室に参加した男性 92 名から調査参加の同意を得た。乾癬、アトピー性皮膚炎など全身性の慢性皮膚疾患を有する者 4 名を除外した 88 名 (非肥満群 43 名、肥満群 45 名) のうち、*HMOX1* 遺伝子 GT 繰り返し配列が測定できた者は 69 名 (非肥満群 34 名、肥満群者 35 名) であり、そのうち 2 種類のアレルが測定できたものは 53 名 (非肥満群 27 名、肥満群 26 名) であった (赤枠)。そのため、本研究では、この 53 名を解析対象者とした。

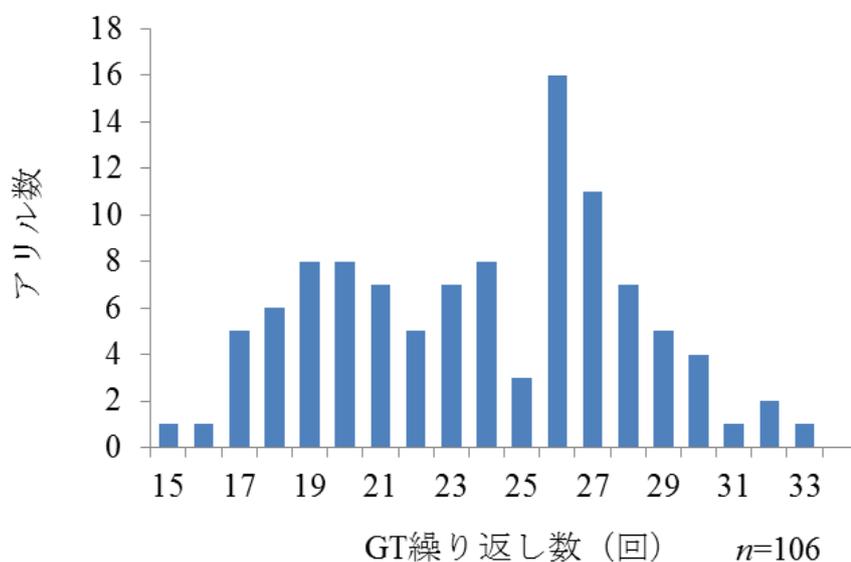


図 2-5. 対象者のアレルの分布

解析対象者 88 名のうち、*HMOX1* 遺伝子 GT 繰り返し配列が測定できた者は 69 名 (78.4%) であり、そのうち、2 種類のアレルが測定できた者が 53 名 (60.2%)、1 種類のアレルのみ測定できた者が 16 名 (18.2%)であった。そのため、解析には 2 種類のアレルが測定できた者 53 名(106 アレル)を含めた。対象者の GT 繰り返し数は、15-33 回の範囲に分布し、19-21 回、26-27 回にピークをもつ 2 峰性を示した。n=アレル数。

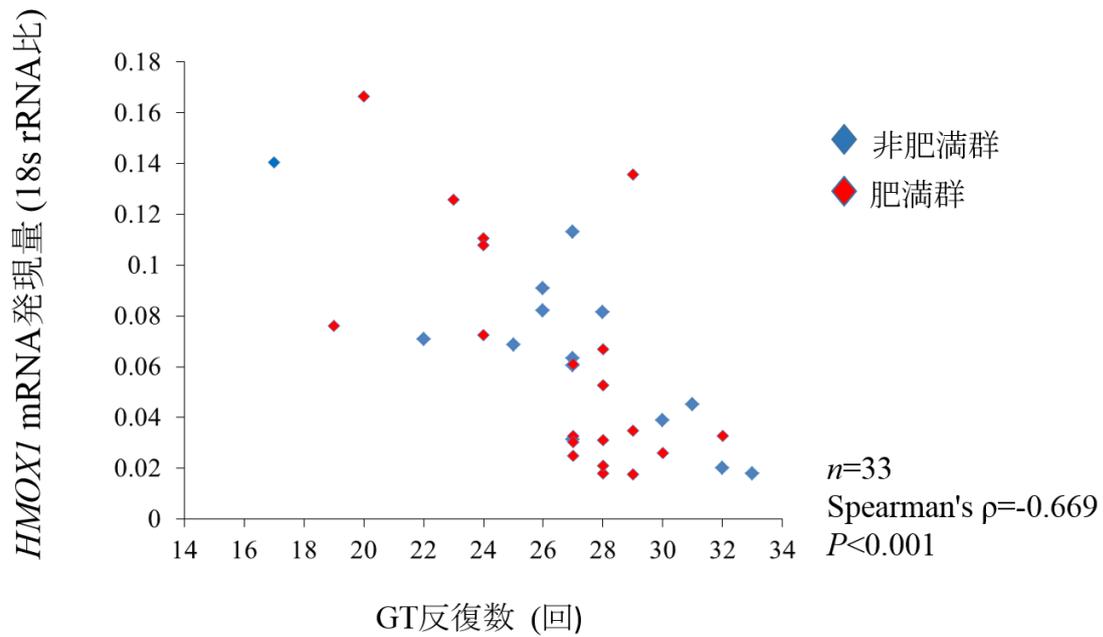


図 2-6. GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量の相関

GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量との相関を解析した。解析対象者は、2 種類のアリルとも測定できた者で、且つ *HMOX1* mRNA 発現量の測定が可能であった 33 名とし、2 種類のアリルのうち長い配列を解析に含めた。その結果、GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量の間には負の相関が認められた。

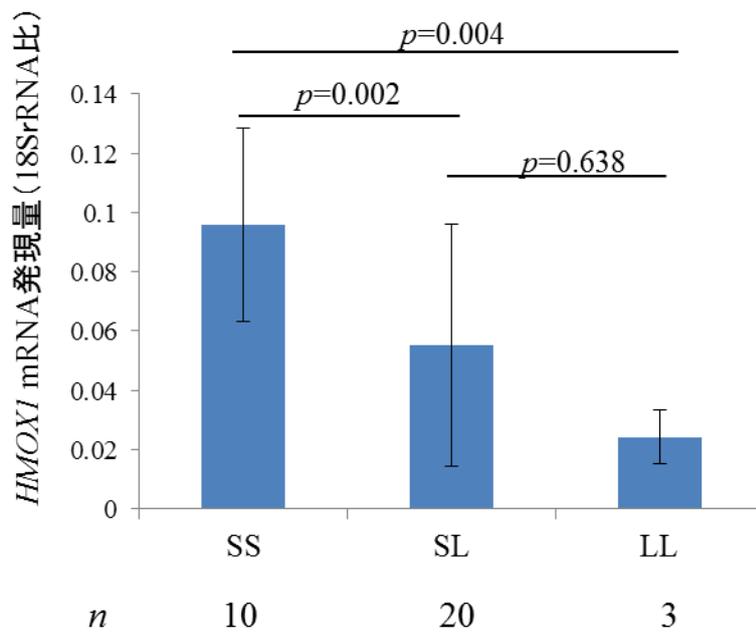


図 2-7. 遺伝子型と *HMOX1* mRNA 発現量との関連

各遺伝子型と *HMOX1* mRNA 発現量を比較した結果、S/S は 0.10 ± 0.03 、S/L は 0.049 ± 0.001 、L/L は 0.024 ± 0.009 であり、S/S は S/L ($p=0.002$)、L/L ($p=0.004$) と比較して有意に高値であった (Kruskal-Wallis 検定、Steel-Dwass 法)。