

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

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

氏名 伊吹愛

### 序論

近年の食生活等の変化により、我が国の肥満者の数は増加している。肥満は、糖尿病、心血管系疾患等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影響を及ぼす。皮膚は表皮、真皮、皮下脂肪組織の3層から成り、とりわけ真皮は最も厚みがある層で、その主成分はコラーゲン線維である。コラーゲン線維は真皮中に様々な方向に走行する密な線維束を形成し、皮膚の外力に対する抵抗性、即ち機械的強度を担っている。肥満はコラーゲン線維の合成低下および分解促進に関与し、コラーゲン密度を低下させる。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やスキンテアなどの発生を招き、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。

これまで筆者らは、肥満がコラーゲン密度低下をもたらすメカニズムの解明を試みてきた。その結果、肥満マウスの皮下脂肪組織では酸化ストレスの上昇に加え、コラーゲン分解酵素の発現上昇、およびコラーゲン密度の低下が認められた。抗酸化薬の投与は、コラーゲン分解酵素の発現を抑制し、コラーゲン密度を改善したことから、酸化ストレスがこれらの引き金であることが示された。次に、健常成人を対象とし、Body Mass Index (BMI) とコラーゲン密度に関する実態調査を行った。その結果、BMIの上昇に伴いコラーゲン密度が低下することが明らかとなった。しかし、肥満者の約60%においてコラーゲン密度低下が認められた一方で、残りの約40%にはコラーゲン密度低下が認められなかった。この結果は、肥満者の中でもコラーゲン密度には個人差が存在することを示しており、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。

酸化ストレスは活性酸素種 (ROS) 生成と抗酸化能のバランスから成る。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、抗酸化能との関連は不明であった。抗酸化酵素の一つであるヘムオキシゲナーゼ (HMOX1) は、近年、生体の抗酸化能の指標として注目されている。HMOX1 の発現量は、HMOX1 プロモーター多型 (GT 反復数) によって規定され、GT 反復数と発現量は反比例関係を示す。即ち HMOX1 プロモーター多型は個人の抗酸化能の違いを反映している。そこで本研究は、肥満者におけるコラーゲン密度低下と HMOX1 プロモーター多型との関連を明らかとすることを目的とし、以下2つの研究を実施した。

## 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

### 背景

生体の抗酸化酵素の代表例として、ROS を直接消去するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、ヘムを分解するヘムオキシゲナーゼ (HMOX) 等がある。

これまでに紫外線 (UV) 照射後の皮膚において、SOD1 は短期的な UV 照射 (急性的酸化ストレス) により発現が上昇し、長期的 UV 照射 (慢性的酸化ストレス) では発現が低下すると報告されてきた。これらの結果は、急性的酸化ストレスと慢性的酸化ストレスとでは、反応する抗酸化酵素が異なることを示している。しかし、慢性的酸化ストレス下で皮膚組織に作用する抗酸化酵素は明らかになっていない。

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な酸化ストレス状態にある。近年、肥満マウスの脂肪組織に生じる虚血・低酸素に応答して発現する抗酸化酵素として HMOX1 が同定された。そこで本研究では、HMOX1 が肥満による皮膚の慢性的酸化ストレスに鋭敏に反応する抗酸化酵素であると仮説をたてた。

本章では、肥満マウスと UV 照射マウスをそれぞれ慢性的および急性的酸化ストレスモデルとして、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 が肥満による皮膚の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。また、比較対象として SOD1 の発現解析を同時に行った。

### 方法

対照群 (+/+マウス)、肥満群 (*ob/ob* マウス)、UV 照射群 (+/+マウス+UV 照射) の3群を設定した。組織学的解析を HE 染色、抗酸化酵素 (*Sod1*, *Hmox1*) の mRNA 発現解析をリアルタイム RT-PCR 法、蛋白質発現を免疫組織化学 (酵素抗体法) にて解析した。各解析においては、対照群と肥満群あるいは UV 照射群の比較を行った。mRNA 発現における統計解析には Dunnett 検定を用いた。

### 結果

組織学的解析の結果、対照群の真皮層と比較して肥満群の真皮層では、コラーゲン密度の低下が認められた。一方で、UV 照射群の表皮および真皮層では、対照群と比較して明確な組織学的差異は認められなかった。

mRNA 発現解析の結果、*Hmox1* の発現量は、対照群と比較して肥満群で 2.01 倍 ( $p=0.021$ ) と有意に高値であった。一方で、UV 照射群は対照群と比較して、有意な差は認められなかった。*Sod1* の発現量は、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。

免疫組織化学の結果、HMOX1 陽性細胞は肥満群の表皮、皮下脂肪層、UV 照射群の表皮の一部において認められた。一方で、対照群では陽性細胞がほとんど認められなかった。SOD1 陽性細胞は対照群、肥満群、UV 照射群の表皮および真皮層において観察されたが、その数は対照群と比較して肥満群および UV 照射群でより多かった。

## 考察

*ob/ob* マウスの皮膚は対照マウスと比較して、コラーゲン密度低下が観察された。この結果は TSOD マウスを用いた先行研究の結果と一致しており、*ob/ob* マウスの皮膚は肥満に伴うコラーゲン密度低下を示す妥当なモデルであることを示している。UV 照射マウスの皮膚は、対照マウスと比較して明らかな炎症所見は認められなかった。この結果は同じ照射条件を用いた先行研究の結果と一致していた。本研究の UV 照射群の皮膚で認められた遺伝子発現の変化は、炎症に起因するものでなく、UV 照射によって生じた ROS に皮膚組織が反応した結果を表しており、急性的酸化ストレスモデルとして妥当であったと考えられる。

*Hmox1* mRNA 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 照射群の両者において有意に高かった。さらに、HMOX1 および SOD1 の蛋白質発現は上記 mRNA 発現解析の結果と一致していた。これらの結果は、SOD1 は急性的・慢性的酸化ストレスのいずれにも反応し、HMOX1 は肥満に伴う慢性的酸化ストレスのみに反応する抗酸化酵素であることを示している。以上より、HMOX1 は肥満による皮膚の酸化ストレスに反応し発現する抗酸化酵素であることが明らかとなった。

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

### 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抗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 (多型) があり、*HMOX1* の mRNA 発現量はこの GT 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。先行研究において、*HMOX1* 多型は、酸化ストレスの生成要因を有する集団において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が示されているが、皮膚疾患における関連はまだ明らかになっていない。そこで本章では、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* 多型と肥満者の皮膚におけるコラーゲン密度低下との関連を明らかにすることを目的とし、以下 2 点の仮説を検証した。

- ① *HMOX1* 遺伝子 GT 繰り返し数が長い場合 (Long アリルを有する場合)、*HMOX1* mRNA 発現量が低下する。
- ② 肥満者における *HMOX1* 多型の Long アリルの保有は、コラーゲン密度低下と関連する。

### 方法

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健常成人男性を対象とした横断的観察研究を行った。調査項目は基礎情報、身体計測、超音波画像診断装置を用いたコラーゲン密度の評価、体毛採取による *HMOX1* 遺伝子の GT 反復数 (ダイターミネーター法) および mRNA 発現量 (Real-time RT-PCR 法)、酸化ストレスレベル (8OHdG) を解析した。BMI $\geq$ 25 を肥満群、BMI $<$ 25 を非肥満群とした。真皮コラーゲン密度は先行研究の分類に

基づき、正常群およびコラーゲン低密度群に分類した。本調査は東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の承認を得て行った。

## 結果

解析対象者 53 名のうち、BMI $\geq$ 25 の肥満者は 26 名 (49.1%)、そのうちコラーゲン低密度の者は 21 名 (80.7%) であった。GT 繰り返し数と *HMOX1* mRNA 発現量の関連の結果、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 ( $\rho = -0.669$ ,  $p < 0.01$ )。GT 反復数は、mRNA 発現量の解析から、27 回未満を Short (S) アリル、27 回以上を Long (L) アリルとした。遺伝子型と *HMOX1* mRNA 発現量の解析の結果、S/S は S/L ( $p < 0.001$ )、L/L ( $p < 0.01$ ) と比較して有意に高値であり、S/S を Long アリル非保有者、S/L および L/L を Long アリル保有者とした。非肥満・肥満で層化解析を行った結果、非肥満群においては超音波画像タイプと Long アリルの保有割合に差が認められなかった一方で、肥満群ではコラーゲン低密度群の中に Long アリルを保有する者の割合が有意に高かった ( $p = 0.016$ )。

## 考察

本研究は、肥満者における *HMOX1* 多型の GT 反復数とコラーゲン密度低下の関連を明らかにした初めての研究である。本研究の結果、肥満という ROS 生成要因に加えて、*HMOX1* 多型の Long アリルを持つことが、コラーゲン低密度と関連があることを明らかにした。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密度低下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。

## 結論

本研究は、① *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抗酸化酵素であること、② 肥満者において *HMOX1* 多型の Long アリルの保有は、コラーゲン密度低下と関連がある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。