

## 線維芽細胞が産生するコラーゲンの構造に及ぼす細胞老化の影響 Effect of Cellular Senescence on the Structure of Collagen Produced by Fibroblasts

足立 浩章 , 奥野 凌輔 , 田中 浩  
Hiroaki Adachi , Ryosuke Okuno , Hiroshi Tanaka

日本メナード化粧品 (株) 総合研究所  
Research Laboratories, Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.

化粧品の有効性を評価することを目的として、現在様々な試験が行われているが、真皮における「コラーゲンの質」を評価する方法は十分に確立されていない。我々はこれまでに、線維芽細胞の広角・小角 X 線散乱を測定し、これに含まれるコラーゲンの三重らせん構造、分子間距離、長周期構造に由来する散乱について観察してきた。本研究では、老化させた線維芽細胞について観察することにより、コラーゲンに由来する散乱が細胞老化に伴い変化するかを検討した。その結果、継代培養を繰り返して老化させた線維芽細胞においては、若い細胞と比べてコラーゲンに由来する散乱の強度が低くなったものの、観察される散乱に変化は見られなかった。しかし、最も老化させた線維芽細胞においては、これらのコラーゲンに由来する散乱とは異なる散乱が観察された。一方、5-ブロモデオキシウリジンを処理して細胞老化を誘導した線維芽細胞では、散乱の変化は見られなかった。

キーワード：コラーゲン、長周期構造、線維芽細胞

### 背景と研究目的：

コラーゲンは、皮膚や骨、腱等の生体組織の構造を支える主要な線維成分であり、動物の体内に最も多く存在する必要不可欠なタンパク質である。それ故、皮膚や軟骨等を対象とする化粧品や健康食品の開発において、コラーゲンは最も重要な標的物質の一つとされる。また、2009年3月より EU において化粧品開発に関わる動物実験が禁止されたことを受け、化粧品の有効性評価のためには、動物に代わり培養細胞や三次元培養皮膚モデルを用いた方法が主流となった。このような時代背景の中、培養系を用いたコラーゲンの評価方法をより拡充していくことは、化粧品業界として重要な課題であると考えられる。

しかし現在のところ、培養系を用いたコラーゲンの評価方法として、「コラーゲンの量」を評価する方法が多用される一方、「コラーゲンの質」を評価する方法は十分に確立されていない。そこで我々は、これまでに本郷らと共に、SPring-8 (BL40B2) を利用して、培養細胞が産生する微量なコラーゲンの構造情報を X 線散乱により評価するための技術について検討し、試料周囲および試料-検出器間に真空パスを使用することで、乾燥試料の三重らせん構造と分子間距離、長周期構造に由来する回折が幅広く観察できることを見出した (研究課題 2014B1276、2015A1314、2016A1065、2016B1318)。なお、コラーゲンは階層構造を有し、分子、線維、線維束と様々な大きさの構造を作るが、ここに挙げた三重らせん構造、分子間距離、長周期構造は分子および線維の構造である (図 1)。これまで検討してきた測定方法を検証し、化粧品や健康食品の開発に応用していくために、本研究では培養細胞の老化に関する検討を実施した。

培養細胞は、継代培養を繰り返して一定回数分裂すると、細胞分裂能が低下し老化する。この細胞老化は、多くの場合、細胞機能の低下を伴う。特に線維芽細胞においては、コラーゲン自体の産生低下およびコラーゲンを分解する酵素の産生上昇により、「コラーゲンの量」が減少することが良く知られている [1], [2]。また、加齢した動物やそこから取り出した細胞・コラーゲンをを用いた研究から、老化によってコラーゲン分子が架橋され、強度や分解性が変わることが古くから示唆されており、近年では、最終糖化産物がコラーゲン分子を架橋して、コラーゲンの可動性を失わせることが報告されている [3]。一方で、老化した培養細胞から産生される微量なコラーゲンの構造を、X 線散乱等を用いて直接的に評価した例は見られない。本研究では、培養細胞として線

維芽細胞を用い、老化させた線維芽細胞について X 線散乱を観察し、コラーゲンに由来する散乱が細胞老化に伴い変化するかを検討した。

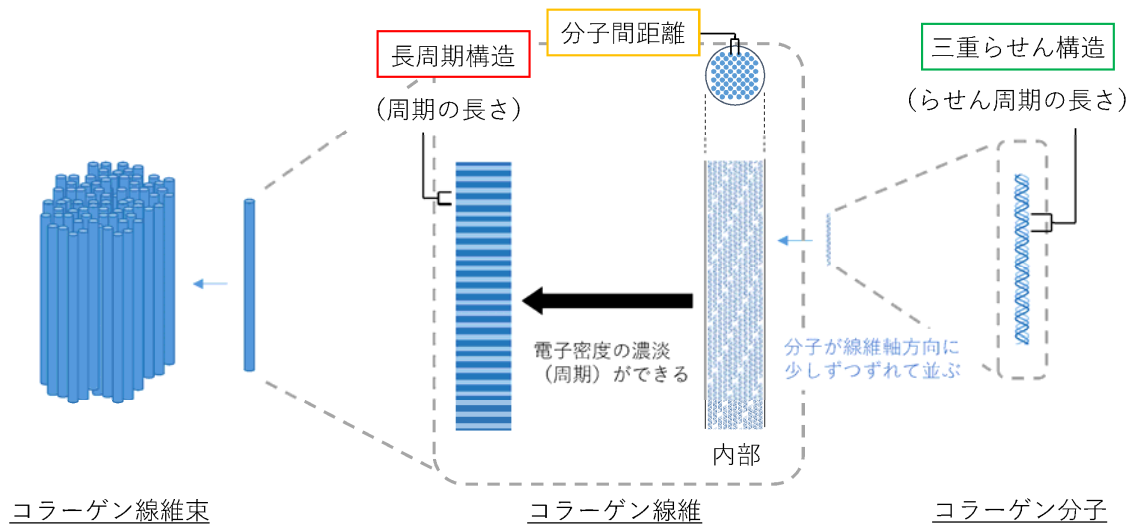


図 1. X 線散乱測定により観察された培養細胞由来のコラーゲン構造

**実験：**

本研究では、測定サンプルとしてヒト皮膚線維芽細胞 (NB1-RGB 細胞) を使用した。まず、継代培養を繰り返すことで老化させた細胞 (PDL (Population Doubling Level) =40.9、52.8、64.6) を準備した。PDL は細胞の分裂回数を示す値であり、数値が大きいほど多く分裂して老化した細胞であることを意味する。ここでは、PDL=40.9 を若い細胞、PDL=52.8 をやや老化した細胞、PDL=64.6 を老化した細胞として用いた。これらの細胞を高密度になるようにシャーレ上に播種し、更に 2、4 および 6 週間培養してコラーゲンを産生させた後、フィルム状 (10 mm 角、厚さ 0.5–1 mm 程度) に成形して乾燥させた。なお、2 週間培養した試料はコラーゲンの産生が少なく、フィルムを形成しなかったため測定試料から除外し、4 および 6 週間培養したものを測定試料とした。また、これら試料に対して細胞老化の影響を解析するために、DNA に作用することで細胞老化を促すとされる 5-ブロモデオキシウリジン (BrdU) を処理して老化を誘導した細胞 (終濃度 5、50 μM) を準備し [4]、先と同様に高密度になるようにシャーレ上に播種して更に 4 および 6 週間培養した後、フィルム状に成形して乾燥させ、測定試料とした。比較試料として、乾燥処理したニワトリ腱由来コラーゲンおよびブタ皮膚真皮を用いた。

X 線散乱測定 (WAXS および SAXS) は BL40B2 ビームラインにて行った。X 線波長は 0.0708 nm (17.5 keV) および 0.191 nm (6.5 keV)、二次元検出器には X 線検出素子にイメージングプレートを用いるリガク製の R-AXIS を用いた。空気散乱を低減するため、試料周囲および試料-検出器間は真空パスを使用した。ベヘン酸銀で校正したカメラ長は 558 mm であった。露光時間は、線維芽細胞が 300 秒、ブタ皮膚真皮が 100 秒、ニワトリ腱由来コラーゲンが 10 秒にて測定した。

**結果および考察：**

線維芽細胞の各試料および比較試料の測定結果について、広角散乱像とこれらを円環平均した一次元プロファイルを図 2 に、小角散乱像とこれらを円環平均した一次元プロファイルを図 3 に示した。なお、4 および 6 週間培養で同様の結果が得られたので、ここには 6 週間培養した細胞の結果を示した。比較試料であるニワトリ腱由来コラーゲンについては、65 nm の長周期構造に由来する回折 (図 2 および 3 の赤破線枠内、2–9、数字は回折次数)、分子間距離に由来する散乱 (図 2 および 3 の黄破線枠内)、三重らせん構造に由来する散乱 (図 2 および 3 の緑破線枠内) がそれぞれ観察された。ニワトリ腱由来のコラーゲンは一方向に揃って並んでいるため、長周期構造および三重らせん構造に由来する散乱が子午線上に、分子間距離に由来する散乱が赤道線上に別れて観察された (図 2 および 3 の散乱像)。一方、ブタ皮膚真皮および線維芽細胞に含まれる

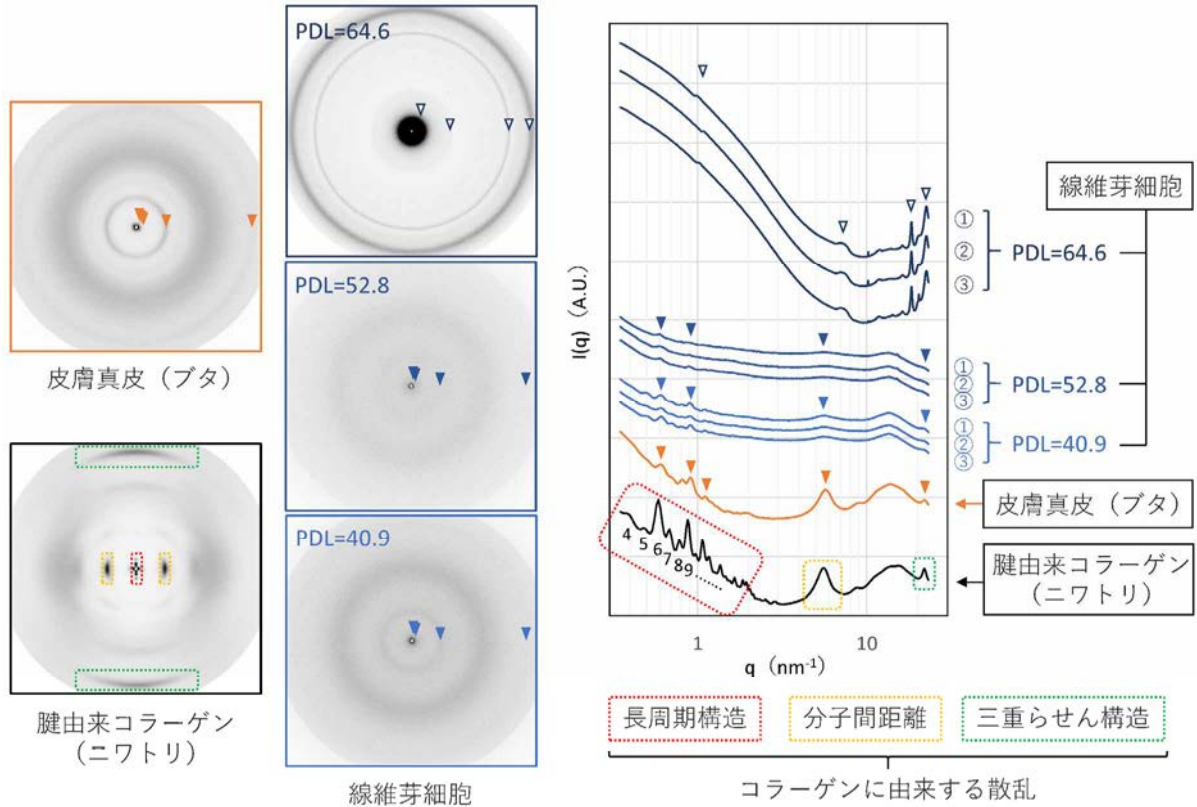


図2. 線維芽細胞、ブタ皮膚真皮、ニワトリ腱由来コラーゲンの広角散乱像とこれらを円環平均した一次元プロファイル

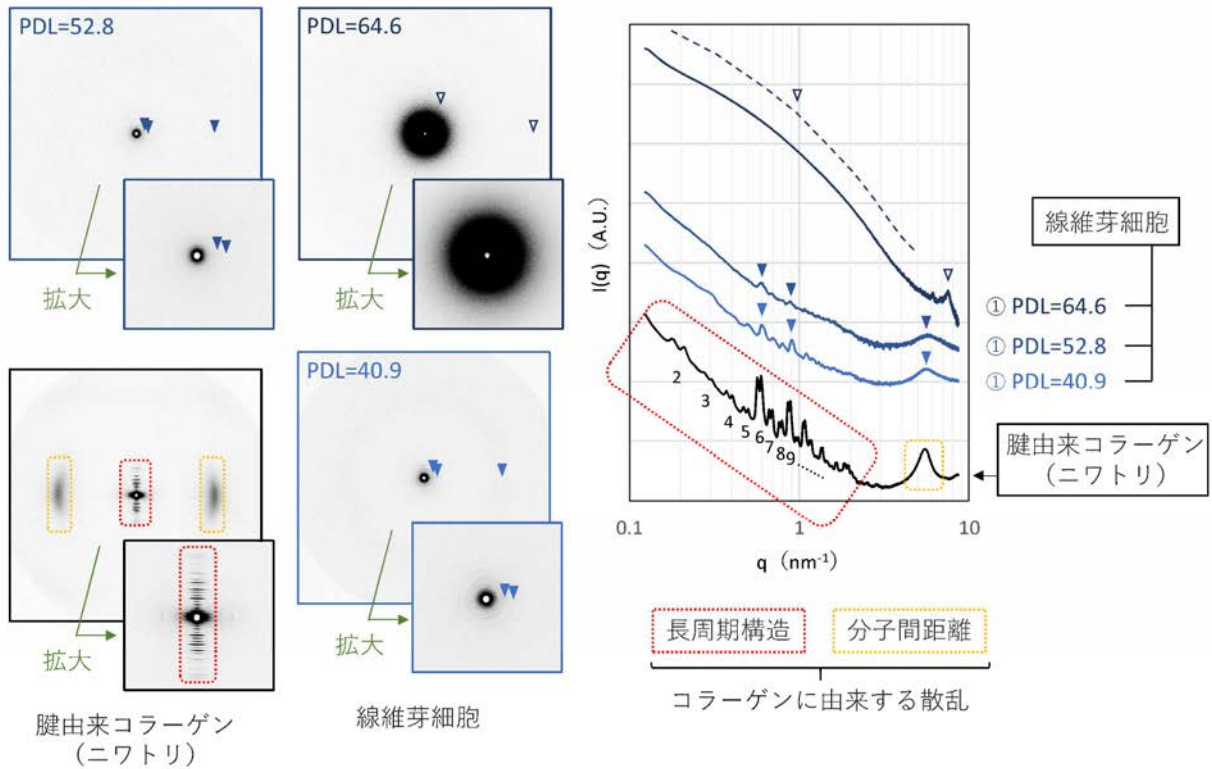


図3. 線維芽細胞、ニワトリ腱由来コラーゲンの小角散乱像とこれらを円環平均した一次元プロファイル

コラーゲンは組織内でランダムに並んでいるため、これらの散乱は円環上に重なって観察された。ブタ皮膚真皮および線維芽細胞 (PDL=40.9、52.8) については、ニワトリ腱由来コラーゲンと同じ位置に長周期構造、分子間距離、三重らせん構造に由来する散乱が観察された (図 2 および 3 の矢頭)。PDL=40.9 と PDL=52.8 の線維芽細胞についてコラーゲンに由来する散乱を比較すると、ピーク位置には変化が見られなかったことから、コラーゲン分子や線維に由来する構造のサイズに変化はないと考えられた。一次元プロファイルを並べて比較すると、コラーゲンに由来する散乱の強度は PDL=52.8 の線維芽細胞においてやや低いことから、細胞老化により分泌されるコラーゲン量が減ったと考えられた (図 4 の矢頭)。線維芽細胞 (PDL=64.6) については、コラー

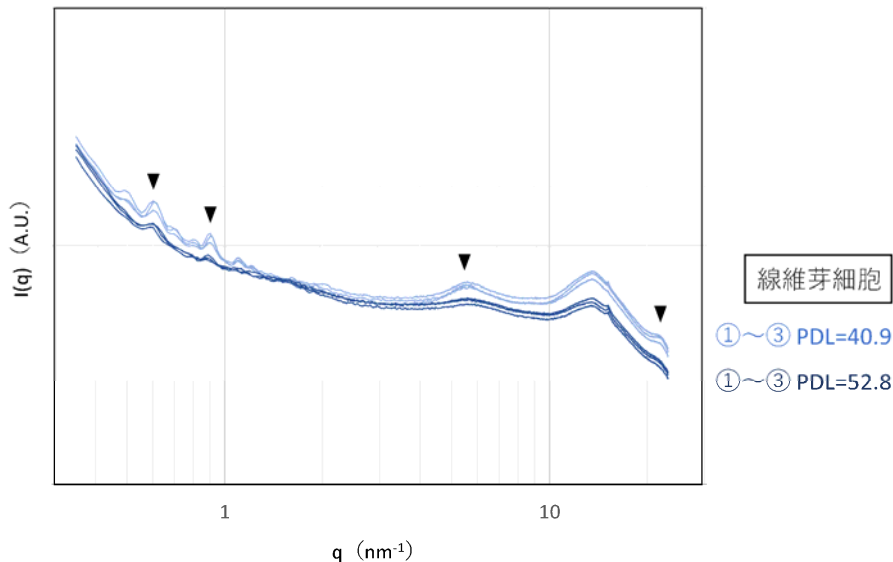


図 4. PDL=40.9 と PDL=52.8 の比較 (線維芽細胞、広角散乱、一次元プロファイル)

ゲンの長周期構造、分子間距離、三重らせん構造に由来する散乱とは異なる位置に散乱が観察された。すなわち、 $q=18.5 \text{ nm}^{-1}$  付近と  $q=22.5 \text{ nm}^{-1}$  付近にそれぞれピーク、 $q=7.5 \text{ nm}^{-1}$  付近にブロードな肩ピーク、 $q=0.17\text{--}3.5 \text{ nm}^{-1}$  領域に更にブロードな肩ピークが観察された (図 2 および 3 の白抜矢頭)。これらの散乱は、より若い線維芽細胞 (PDL=40.9、52.8) において観察されるコラーゲンに由来する散乱とは明らかに異なり、散乱強度もかなり強いことから、最も老化させた線維芽細胞を用いた試料にはコラーゲンの長周期構造、分子間距離、三重らせん構造とは異なる新たな構造が出現したと考えられた。また、BrdU を処理して細胞老化を誘導した線維芽細胞については、老化を誘導していないコントロールの細胞と比べて、コラーゲンに由来する散乱 (長周期構造、分子間距離、三重らせん構造) に変化は見られなかった (図 5)。なお、4 および 6 週間培養で同様の結果が得られたので、ここには 6 週間培養した細胞の結果を示した。

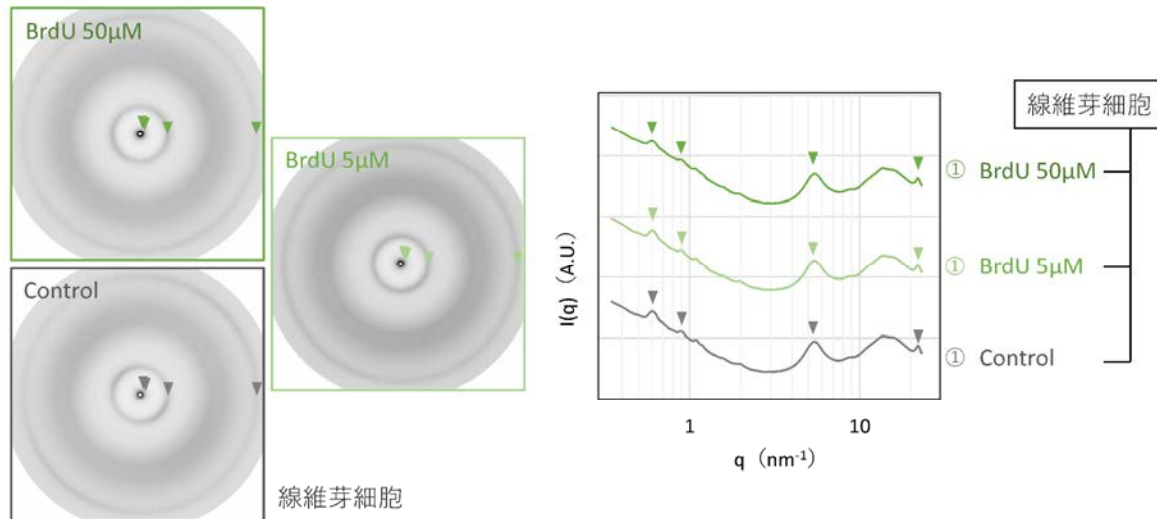


図 5. BrdU を処理した線維芽細胞の広角散乱像とこれらを円環平均した一次元プロファイル

今後の課題：

本研究においては、老化させた線維芽細胞および若い線維芽細胞の乾燥試料中に含まれるコラーゲンの散乱を比較し、細胞老化に伴うコラーゲンの産生低下を示唆するデータが得られた。コラーゲンの定量性を含めた散乱強度の規格化については今後検討を進めたい。最も老化させた線維芽細胞においては、長周期構造、分子間距離、三重らせん構造とは異なる構造に由来すると考えられるいくつかの散乱が出現した。この最も老化させた細胞にのみ観察された散乱は、細胞老化の程度を評価するための一つの指標となる可能性があるため、その由来について今後も検討していきたい。一方、コラーゲンの長周期構造、分子間距離、三重らせん構造に由来する散乱のピーク位置に変化がなかったことから、乾燥時のコラーゲン構造のサイズには細胞老化による変化がないと考えられた。しかし、特に長周期構造や分子間距離といったタンパク質分子の会合による高次構造の情報は、乾燥試料においては失われていた可能性がある。今後、コラーゲンの高次構造について水和した試料を用いた評価を行い、細胞老化に伴う X 線散乱像の変化を引き続き検討していきたい。また、本評価法が活用されるためには、細胞だけでなく生体組織における構造変化の具体的事例を示すことも必要であると考えられるので、加齢や外部刺激等による皮膚変化に伴う X 線散乱像の変化も併せて検証したい。

参考文献：

- [1] J. N. Hildebran *et al.*, *In Vitro.*, **19**, 307 (1983).
- [2] J. Sottile *et al.*, *J. Cell Physiol.*, **138**, 281 (1989).
- [3] M. Kubo *et al.*, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43**(Suppl 1), 66 (2008).
- [4] E. Michishita *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 877 (2002).