

細胞の老化による培養細胞産生コラーゲン線維構造への影響 The effect of cellular senescence on collagen fibril structure 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。本課題では、これまでの研究課題において検討してきた評価技術を活かし、「コラーゲンの質」における加齢変化を明らかにすることを目標として、老化細胞の産生したコラーゲン線維と若い細胞の産生したコラーゲン線維を比較し、コラーゲン線維に由来する散乱がどのように変化するかを検討した。その結果、老化させた線維芽細胞が産生したコラーゲン線維においては、若い細胞と比べて、コラーゲン構造に由来する散乱が弱まり、新たな別の散乱が観察された。したがって、細胞老化によりコラーゲンの構造が変化したか、コラーゲンとは別の成分に由来する構造が出現したことが考えられた。

キーワード： コラーゲン、ミクロフィブリル、らせん構造、長周期構造、細胞老化

背景と研究目的：

コラーゲンは、皮膚や骨、腱など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ターゲットの一つとされる。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為に、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線維の構造情報をX線散乱により評価する為の技術について検討し、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観察できることを見出した(研究課題 2014B1276、2015A1314、2016A1065、2016B1318)。本研究では、これまでの評価技術を活かし、老化細胞の産生したコラーゲン線維と若い細胞の産生したコラーゲン線維を比較し、三重らせん構造や分子間距離、長周期構造がどのように変化するかを検討することにより、「コラーゲンの質」における加齢変化を明らかにすることを目標とした。

実験：

本研究では、試験には正常ヒト皮膚線維芽細胞(NB1-RGB)を使用した。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、6週間培養してコラーゲンを産生させた後、フィルム状に成形した。また、DNAに作用することで老化を促すとされるプ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[1]、4週間培養した後、フィルム状に成形した。比較試料として、腱由来コラーゲン(マウス尾)および真皮由来コラーゲン(ブタ皮膚)を用いた。

X線散乱測定は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)とし、二次元検出器にはリガク製イメージングプレートR-AXIS(カメラ長558 mm)を用いた。空気散乱を低減する為、サンプル周りおよびサンプル-検出器間は真空パスを使用した。

結果および考察：

培養細胞フィルムおよび比較試料について広角散乱像を円環平均した一次元プロファイルと、PDL=40.9 および 64.6 の線維芽細胞サンプルの広角散乱像を図 1 に示した。比較試料において、三重らせん構造や分子間距離、長周期構造に由来する回折が観察された。培養細胞フィルムにおいても、同様の回折が観察された。PDL=40.9 および 52.8 の線維芽細胞では、これらの回折に大きな変化はなかったが、PDL=64.6 の線維芽細胞では明らかに様子が異なった。具体的には、三重らせん構造に由来する回折がややブロードに広がって強度を増し、その近傍の $q=18.403 \text{ nm}^{-1}$ ($d=0.341 \text{ nm}$) の位置に新たな別の回折が出現した(図 1▽)。また、 $q=5.642 \text{ nm}^{-1}$ ($d=1.113 \text{ nm}$) の位置にあった分子間距離に由来する回折が見えなくなり、少しずれた $q=7.494 \text{ nm}^{-1}$ ($d=0.838 \text{ nm}$) の位置に回折が観察された。加えて、 $q<5.0007 \text{ nm}^{-1}$ ($d>1.254 \text{ nm}$) の領域で傾きが増し、長周期構造に由来する回折が観察されなくなった。一方、BrdU 処理では散乱像に変化が見られなかった。培養細胞フィルムおよび比較試料について小角散乱像を円環平均した一次元プロファイルを図 2 に示した。広角散乱像では途中で途切れていたため良く分からなかったが、 $q=0.200 \text{ nm}^{-1}$ ($d=1.113 \text{ nm}$) から $q=4.101 \text{ nm}^{-1}$ ($d=1.531 \text{ nm}$) の領域にブロードなピークが観察され、長周期構造に由来する回折が見えなくなった。

これらの結果より、継代培養を繰り返すことで老化させた線維芽細胞(PDL=64.6)においては、より若い細胞と比べて、X 線散乱像が大きく異なることが明らかとなった。この原因としては、糖化やカルボニル化[2]等のコラーゲン自体の変性やコラーゲン以外の成分に由来する構造の出現が考えられたが、詳細については更なる検討が必要である。また、今回の BrdU 処理では、X 線散乱像における老化形質の再現には至らなかったが、老化細胞と同様の変化を示すような老化誘導処理を見つければ、細胞老化とコラーゲン構造変化との関連性を明らかにする一助となると期待された。

今後の課題：

本課題において、継代培養を繰り返し老化させた線維芽細胞を用いると、若い線維芽細胞では観察されないいくつかの散乱が出現した。今後は、この新たな散乱の出現がどのような構造的変化に起因しているのかを検証することが必要である。変性させたコラーゲンや加齢に伴い増加するような成分について X 線散乱を測定することにより、「コラーゲンの質」における加齢変化を明らかにしていきたい。

参考文献：

- [1] E. Michishita, N. Matsumura, T. Kurahashi, T. Suzuki, H. Ogino, M. Fujii, D. Ayusawa, *Biosci Biotechnol Biochem.*, **66**(4), 877-879, (2002).
- [2] T. H. Fleming, P. M. Humpert, P. P. Nawroth, A. Bierhaus, *Gerontology*, **57**(5), 435-443, (2011).

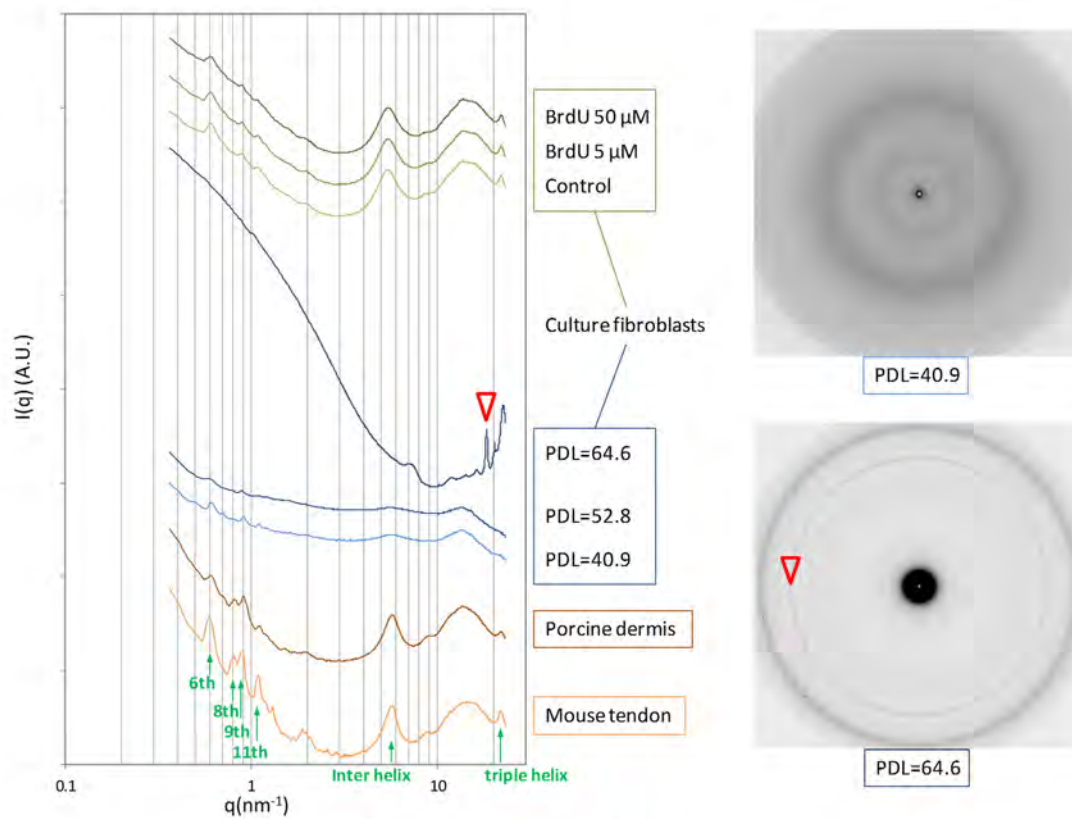


図1 広角散乱像を円環平均した一次元プロファイルと PDL=40.9および64.6の線維芽細胞サンプルの広角散乱像

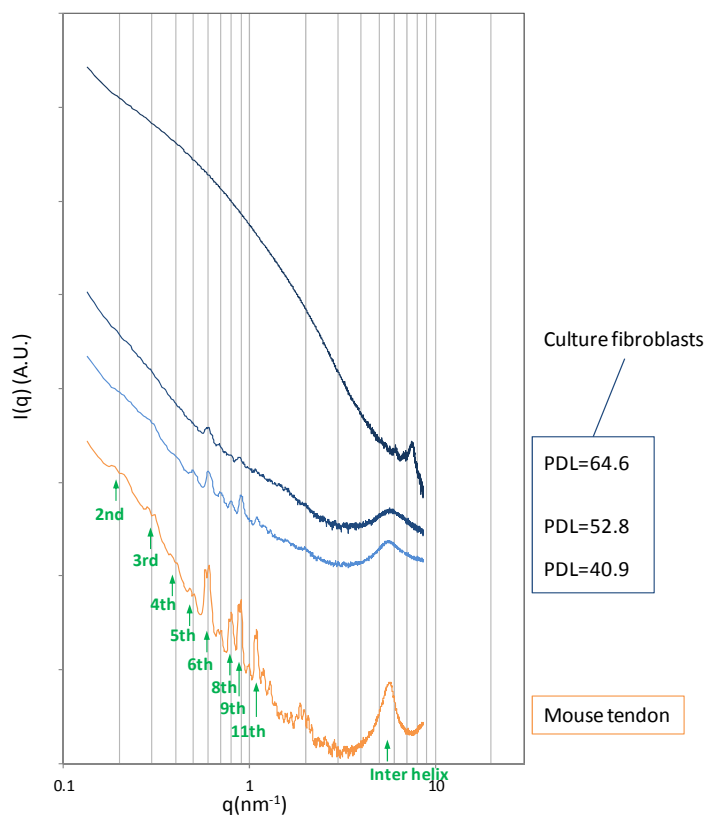


図2 小角散乱像を円環平均した一次元プロファイル