

老化による皮膚セラミド産生の低下に対するマグネシウムの改善効果

五十里 彰, 吉野 雄太

岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室

概要

【目的】世界的な超高齢社会の到来とともに、医療・介護費の高騰が大きな社会問題になっている。高齢者の7割以上が肌トラブルを抱えているといわれ、皮膚疾患患者の増加が懸念される。皮膚の表皮は角質層、顆粒層、有棘層、基底層の4層で形成され、外部からの異物の侵入や体内からの水分の蒸散を防ぐバリアとしての機能を有する。このバリア機能の形成には、角質層におけるヒアルロン酸、セラミド、コラーゲンといった保湿因子と顆粒層における細胞間密着結合が重要な役割を果たす。老化や紫外線・酸化ストレスへの暴露により、角質層における保湿因子の産生量や皮脂の分泌量が減少し、バリア機能が低下する。そのため、保湿因子の産生を亢進する因子は、高齢者における皮膚バリア機能の増強作用が期待できる。また、皮膚バリア機能の維持には、物理的創傷に対する修復機構も重要な役割を果たす。マグネシウムには、皮膚創傷治癒の促進作用があることが報告されているが、その詳細な機序は不明なままである。本研究では、老化によるマグネシウムチャネルの発現低下機構、およびマグネシウムとセラミド産生の関係を検討することにより、皮膚バリア機能の維持におけるマグネシウムの役割を分子レベルで検討した。さらに、老化による *NIPAL4* の発現低下に対し、改善作用をもつ食品素材を探索した。また、マグネシウムが創傷治癒の促進に関与することが報告されているため、その作用機序を検討した。

【方法】実験にはヒト表皮ケラチノサイト由来の HaCaT 細胞および NHEK 細胞を使用した。遺伝子とタンパク質発現は、それぞれリアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法で解析した。細胞内遊離マグネシウム濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) は、蛍光指示薬の mag-fura 2 を用いて測定した。*NIPAL4* の転写活性は、ルシフェラーゼ活性を指標として測定した。創傷治癒アッセイでは、ピペットチップによる創傷領域を測定し、その閉鎖率を比較した。

【結果】HaCaT 細胞に老化促進剤を処理したところ、老化因子である p53 のアセチル化量が増加し、*NIPAL4* mRNA 量が減少した。また、老化促進剤処理により静止状態の $[Mg^{2+}]_i$ が減少した。さらに、細胞外マグネシウム濃度の低下や siRNA を用いた *NIPAL4* のノックダウンにより、 $[Mg^{2+}]_i$ の低下が観察された。以上の結果から、ケラチノサイトが老化刺激を受けると、*NIPAL4* の発現低下を介して、 $[Mg^{2+}]_i$ が低下することが示唆された。老化促進剤処理や細胞外マグネシウム濃度の低下により、スフィンゴミエリンの産生に関与する酵素の発現量が減少した。また、セラミド合成の材料となるスフィンゴミエリンの濃度が減少した。化合物ライブラリーを用いて *NIPAL4* の転写活性化作用をもつ食品素材を探索し、レスベラトロールを同定した。レスベラトロールは老化促進剤によるセラミド合成酵素の発現低下とスフィンゴミエリンの濃度低下を改善した。次に、創傷治癒におけるマグネシウムの役割を検討し、matrix metalloproteinases 7 (MMP7) の発現増加作用を見出した。マグネシウムによる MMP7 の発現増加は、MEK/ERK 経路阻害剤の U0126 の共処理により阻害されたため、本シグナル伝達経路の関与が示唆された。

【考察】老化刺激により *NIPAL4* マグネシウムチャネルの mRNA 発現が低下し、セラミド合成酵素の発現量が減少したため、老化による皮膚バリア機能の低下に、マグネシウム代謝異常の関与が示唆された。*NIPAL4* のプロモーター領域に老化関連因子である p53 の推定上の結合部位が存在するため、p53 は転写活性の抑制作用をもつことが示唆された。レスベラトロールが老化促進剤の効果を改善したため、抗老化食品としての利用に向けた研究が期待される。

1. 研究目的

世界的な超高齢社会の到来とともに、医療・介護費の高騰が大きな社会問題になっている。高齢者の7割以上が肌トラブルを抱えているといわれ、皮膚疾患患者の増加が懸念される。皮膚の表皮は角質層、顆粒層、有棘層、基底層の4層で形成され、外部からの異物の侵入や体内からの水分の蒸散を防ぐバリアとしての機能を有する。このバリア機能の形成には、角質層におけるヒアルロン酸、セラミド、コラーゲンといった保湿因子と顆粒層における細胞間密着結合が重要な役割を果たす。老化や紫外線・酸化ストレスへの暴露により、角質層における保湿因子の産生量や皮脂の分泌量が減少し、バリア機能が低下する。そのため、保湿因子の産生を亢進する因子は、高齢者における皮膚バリア機能の増強作用が期待できる。

マグネシウムは伝承的にデトックス、疲労回復、美肌効果を有するといわれ、エプソムソルト、死海の海水、ヴィシーミネラル 89 などの商品が化粧品や入浴剤として利用される。また、疾患との関係が検討され、アトピー性皮膚炎の改善作用⁽¹⁾が報告されている。しかし、肌の保湿やアンチエイジングにおけるマグネシウムの作用メカニズムは大部分が不明である。顆粒細胞では、NIPA like protein 4 (NIPA4) を介して、マグネシウムが細胞内へ取り込まれると考えられている。表皮細胞や上皮細胞の細胞内遊離マグネシウム濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) は、約 0.5 mM で一定に保たれている。常染色体劣性遺伝性魚鱗癬の皮膚疾患患者において NIPAL4 の遺伝子変異が同定され、マグネシウム濃度の低下とケラチノサイトの分化抑制との関係が報告された⁽²⁾。

NIPA like domain containing 4 (NIPAL4) 遺伝子によってコードされる NIPA4 タンパク質は 466 個のアミノ酸残基からなり、分子量が約 50 kDa である。生体内では皮膚に高発現しており、他の組織における発現量は低い。NIPA4 はマグネシウムチャンネルとして機能するが、バリウムやマンガンなどの 2 価カチオンを輸送することもできる⁽³⁾。NIPAL4 ノックアウトマウスは新生児致死であるため⁽²⁾、NIPA4 は皮膚バリアの維持に不可欠であると考えられる。遺伝性魚鱗癬の患者では、G142V, A176D, S208F などの多数のミスセンス変異体が報告されている⁽⁴⁾。しかし、他の疾患との関係はほとんど検討されていない。

最近我々は、NIPA4 発現の低下により、ヒアルロン酸合成遺伝子の発現およびヒアルロン酸産生量が低下することを解明した⁽⁵⁾。また、マグネシウムはポリアミン産生を亢進し、紫外線暴露による細胞障害を軽減することを発見した⁽⁶⁾。しかし、老化による皮膚バリア機能の低下とマグネシウムの関係は、不明な点が多い。予備検討において、DNA マイクロアレイ解析によりマグネシウムがセラミド合成酵素の発現調節に関与することを見出した。また、老化に伴い NIPA4 マグネシウムチャンネルの発現量が低下することを発見した。セラミドは 16~20 の炭素鎖長の長鎖アミノアルコールと 16 以上の炭素鎖長の長鎖脂肪酸がアミド結合した構造である。この基本骨格をもとに、1 位の水酸基が糖化したスフィンゴ糖脂質やリン酸化したスフィンゴリン質が生成する。セラミドは脂肪酸やコレステロールとラメラ構造体を作り、表皮の物理的バリアを形成する。また、セラミドは脂質メディエーターとしての機能を有する。

皮膚バリア機能の維持には、物理的創傷に対する修復機構も重要な役割を果たす。マグネシウムには、皮膚創傷治癒の促進作用があることが報告されているが⁽⁷⁾、その詳細な機序は不明なままである。

本研究では、老化によるマグネシウムチャンネルの発現低下機構、およびマグネシウムとセラミド産生の関係を検討することにより、皮膚バリア機能の維持におけるマグネシウムの役割を分子レベルで検討した。さらに、老化による NIPAL4 の発現低下に対し、改善作用をもつ食品素材を探索した。また、マグネシウムが創傷治癒の促進に関与することが報告されているため、その作用機序を検討した。

2. 研究方法

2.1 細胞培養とトランスフェクション

ヒト表皮ケラチノサイト由来の HaCaT 細胞および NHEK 細胞を用いて各種検討を行った。HaCaT 細胞は 5% ウシ胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle Medium を用いて、NHEK 細胞は正常ヒト表皮角化細胞増殖用無血清液体培地 (Lifeline Cell Technology 社) を用いて、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養した。0.5% trypsin-EDTA 溶液を用いて 3~4 日ごとに継代し、実験に用いた。

プラスミド DNA のトランスフェクションには、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher 社) を使用した。siRNA のトランスフェクションには、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher 社) を使用した。

2. 2 動物実験

実験には C57B/6N マウス(雄性 5 週齢, 36 週齢)を使用し、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会の承認を得て、「岐阜薬科大学における動物実験に関する規程」にもとづいて実施した。

2. 3 RNA 抽出とリアルタイム PCR

TRI reagent (Molecular Research Center 社) を用いて細胞から total RNA を抽出した。ReverTra Ace (東洋紡社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調製した。定量的リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) では、Real time PCR Eco (アズワン社) を用いて mRNA 量を測定した。付属のソフトウェアで Ct 値を算出後、各遺伝子の発現量を β -actin mRNA 量で標準化した。

2. 4 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロット法

7×10^4 個/ウェルの濃度で細胞を 6 well plate に播種し、4 日間培養した。セルスクレイパーを用いて細胞を回収した。Lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) を用いて細胞内タンパク質を可溶化し、遠心により可溶性画分を抽出した。10%または 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルにタンパク質サンプルをアプライし、30 mA で 90 分間電気泳動した。ゲルを PVDF 膜に転写後、2%スキムミルクで 30 分間処理し、ブロッキングを行った。各種一次抗体を 4°C で一晩処理した。Tris Buffered Saline with Tween 20 溶液で PVDF 膜を洗浄後、HRP 標識二次抗体を室温で 60 分間反応させた。EzWestLumi plus (アトー社) またはイムノスター LD (富士フイルム和光純薬社) を用いてタンパク質のバンドを検出した。タンパク質のバンドは、C-DiGit 化学発光スキャナー (LI-COR 社) を用いて撮影し、各タンパク質の発現量を β -actin 量で標準化した。

2. 5 $[Mg^{2+}]_i$ の測定

5×10^3 個/ウェルの濃度で細胞を 96 well black plate に播種し、4 日間培養した。マグネシウム感受性蛍光指示薬の mag-fura 2/AM を 37°C で 30 分間負荷した。Infinite F200 蛍光マイクロプレートリーダー (テカン社) を用いて、mag-fura 2 の蛍光強度を測定した。 $[Mg^{2+}]_i$ は、励起波長 340 nm と 380 nm の蛍光強度比によって算出した。

2. 6 レポーターアッセイ

5×10^3 個/ウェルの濃度で細胞を 96 well plate に播種し、24 時間培養した。NIPAL4 のプロモーター領域を組み込んだレポーターベクターと、標準化のため分泌型アルカリホスファターゼ発現ベクターをトランスフェクションした。Secreted Pair Luciferase Assay Kit (GeneCopocia 社) を用いて、ルシフェラーゼとアルカリホスファターゼの活性を測定した。

2. 7 創傷治癒アッセイ

7×10^4 個/ウェルの濃度で細胞を 6 well plate に播種し、コンフルエントの状態まで培養した。ピペットチップを用いて創傷を形成後、0.5% FBS 含有培地でインキュベーションした。BZ810 顕微鏡 (キーエンス社) を用いて指定時間に明視野画像を撮影した。

2. 8 蛍光免疫染色

7×10^4 個/ウェルの濃度で細胞を 6 well plate (底面にカバーガラスを設置) に播種し、4 日間培養した。培地を除去後、冷メタノールで固定した。0.2% Triton X-100 溶液で細胞膜を可溶化後、4% ブロックエース溶液を用いてブロッキングを行った。一次抗体を 4°C で一晩処理後、Alexa Fluor 546 標識二次抗体を室温で 2 時間インキュベートした。核染色には DAPI を使用した。カバーガラスをスライドガラスにのせ、LSM700 共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss 社) を用いて、蛍光画像を撮影した。

3. 研究結果

3.1 表皮マグネシウムチャネルの発現に対する老化促進剤の影響

HaCaT 細胞に老化促進剤の tenovin-1 または leptomycin を処理したところ、老化因子である p53 のアセチル化量が増加した (Fig. 1)。また、NIPAL4 マグネシウムチャネルの mRNA 量が減少した。老化とマグネシウム不足の関係が示唆されたため、 $[Mg^{2+}]_i$ に対する老化促進剤の効果を検討した。その結果、tenovin-1 または leptomycin の処理により、静止状態の $[Mg^{2+}]_i$ が減少した。また、細胞外マグネシウム濃度の低下や siRNA を用いた NIPAL4 のノックダウンにより、 $[Mg^{2+}]_i$ の低下が観察された。以上の結果から、セラチノサイトが老化刺激を受けると、NIPAL4 の発現低下を介して、 $[Mg^{2+}]_i$ が低下することが示唆された。

3.2 セラミド合成酵素の発現に対する老化促進剤の影響

顆粒層のセラチノサイトは、10 種類以上の分子種のセラミドを合成する。セラミド分子の多様性は、セラミドを構成する脂肪酸とスフィンゴシン塩基の多様性によることが知られている。セラチノサイトで合成されたセラミドの大部分は、グルコシルセラミド合成酵素 (GCS) によりグルコシルセラミドとアシルグルコシドセラミドへ、スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) によりスフィンゴミエリンへ代謝される。さらに角質細胞間に放出されたグルコシルセラミドとスフィンゴミエリンは、それぞれ β -グルコセレブロンダーゼ (GBA) とスフィンゴミエリナーゼ (ASM) によって加水分解され、セラミドに変換される。これらの過程で生成したセラミドは、脂肪酸やコレステロールとラメラ構造体を作り、表皮バリアを形成する。

HaCaT 細胞に老化促進剤を処理したところ、GCS, SMS, GBA の mRNA 量が有意に減少した (Fig. 2)。一方、ASM mRNA 量は変化しなかった。細胞外マグネシウム濃度の低下や NIPAL4 のノックダウンにより、同様の結果が得られた。以上より、 $[Mg^{2+}]_i$ の低下によって GCS, SMS, GBA の発現量が低下することが示唆された。

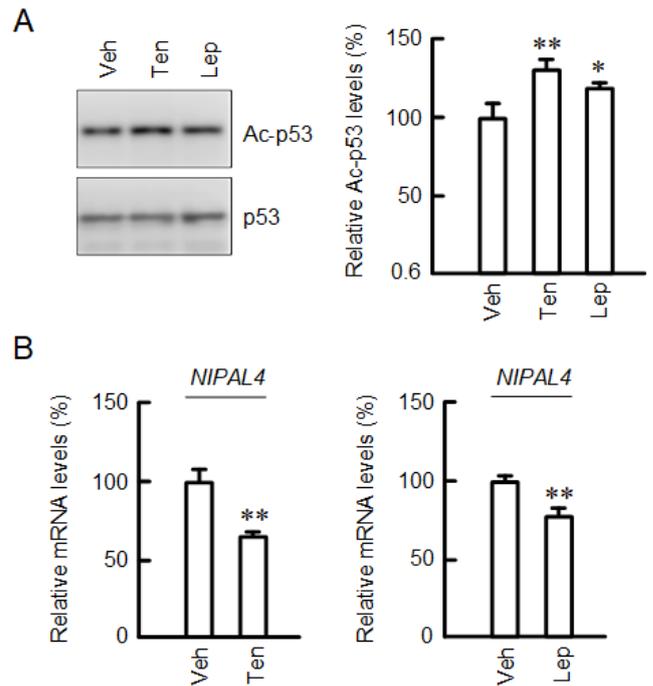


Fig. 1 Effect of p53 activator on the expression of Ac-p53 and NIPAL4 mRNA.

HaCaT cells were treated with vehicle (Veh), 10 μ M tenovin-1 (Ten) or 10 μ M leptomycin (Lep) for 6 h. (A) The protein levels of Ac-p53 and p53 were investigated by Western blotting and represented as a percentage of vehicle (Veh). (B) The mRNA levels of NIPAL4 were investigated by real-time PCR and represented as a percentage of vehicle. ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ vs Veh.

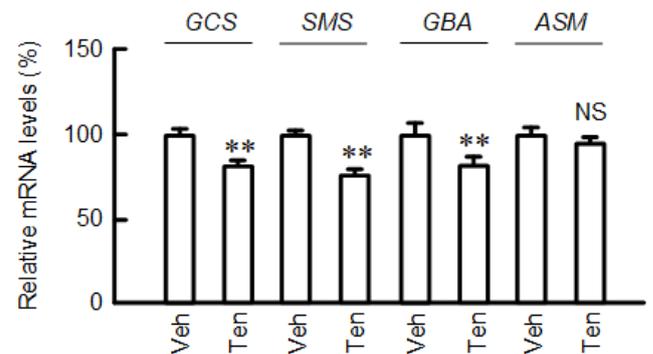


Fig. 2 Effect of p53 activator on the expression of ceramide synthesis enzymes.

HaCaT cells were treated with vehicle (Veh) or 10 μ M tenovin-1 (Ten) for 6 h. The mRNA levels of GCS, SMS, GBA, and ASM were investigated by real-time PCR and represented as a percentage of vehicle. ** $P < 0.01$ and ^{NS} $P > 0.05$ vs Veh.

3.3 スフィンゴミエリン産生に対する老化促進剤の影響

老化促進剤処理や細胞外マグネシウム濃度の低下により、スフィンゴミエリンの産生に関与する *SMS* の発現量が減少したため、細胞内スフィンゴミエリン濃度に対する影響を検討した。その結果、tenovin-1 処理または細胞外マグネシウム濃度の低下により、細胞内スフィンゴミエリン濃度が有意に減少した。

3.4 *NIPAL4* の発現調節における E2F1 の関与

転写調節因子である E2F1 は、p53 の活性化作用をもつことが知られている。siRNA を用いて E2F1 の発現をノックダウンしたところ、GCS, SMS, GBA の mRNA 量が増加した。この効果は、p53 による *NIPAL4* 発現の抑制が解除されたためと考えられる。

3.5 老化促進剤による *NIPAL4* mRNA 量の発現低下機構

NIPAL4 による $[Mg^{2+}]_i$ の調節が、セラミド合成酵素の発現調節に関与することが明らかになったため、老化促進剤による *NIPAL4* mRNA の発現低下機構を検討した。mRNA 量は転写活性と安定性によって制御される。ガウシアルシフェラーゼの発現を指標として *NIPAL4* の転写活性を測定したところ、tenovin-1 処理により転写活性が低下した。そのため、老化促進剤による p53 シグナルの活性化により、*NIPAL4* の転写阻害を介して mRNA 量が減少することが示唆された。

3.6 老化によるセラミド合成酵素の発現変化

セラミド合成酵素の発現に対する老化の影響を解明するため、6 週齢と 36 週齢のマウスの皮膚から RNA を抽出した。36 週齢のマウスでは、GCS, SMS, GBA の mRNA 量が減少した (Fig. 3)。また、*NIPAL4* mRNA 量も減少していたため、両者の関係が示唆された。

3.7 *NIPAL4* の発現増加作用をもつ化合物の探索

老化細胞では *NIPAL4* の発現低下を介してセラミドの産生量が減少することが推察されたため、*NIPAL4* の発現増加作用をもつ化合物を探索することにした。評価化合物としてセレックバイオテック社のフラボノイドライブラリーと研究室に所有する食品素材を使用した。その結果、tenovin-1 による転写活性の低下に対し、数種類の化合物が改善効果を示した。本研究では、ブドウなどに含まれるポリフェノールのレスベラトロールに着目し、その効果を検討することにした。

HaCaT 細胞において、tenovin-1 処理によるアセチル化 p53 量の増加が、レスベラトロールの共処理により阻害された。また、tenovin-1 処理による *NIPAL4* 発現の低下は、レスベラトロールの共処理によって阻害された (Fig. 4)。

以上の結果から、老化促進剤による p53 シグナルの活性化をレスベラトロールは阻害し、*NIPAL4* 発現の低下を抑制することが示唆された。Tenovin-1 による $[Mg^{2+}]_i$ の低下もレスベラトロールの共処理によって改善したため、*NIPAL4* の発現だけでなく、細胞内へのマグネシウム取り込み量も改善することが示された。

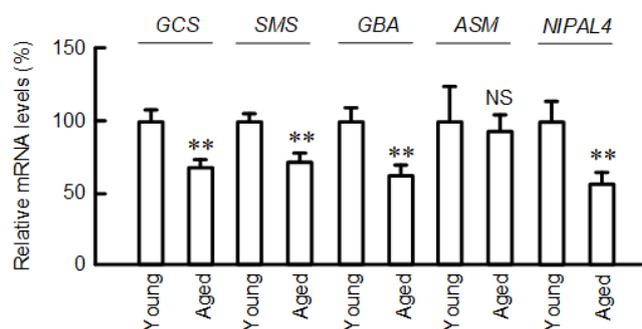


Fig. 3 Effect of aging on the expression of ceramide synthesis enzymes. Total RNA was isolated from the skin of 6- and 36-week mice. The mRNA levels of *GCS*, *SMS*, *GBA*, *ASM*, and *NIPAL4* were investigated by real-time PCR and represented as a percentage of young mice. ** $P < 0.01$ and ^{NS} $P > 0.05$ vs young.

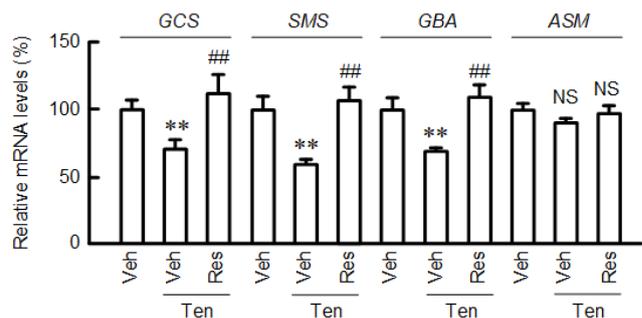


Fig. 4 Effect of resveratrol on tenovin-1-induced reduction of the expression of ceramide synthesis enzymes. HaCaT cells were treated with vehicle (Veh), 10 μ M tenovin-1 (Ten) or 10 μ M resveratrol (Res) for 6 h. The mRNA levels of *GCS*, *SMS*, *GBA*, and *ASM* were investigated by real-time PCR and represented as a percentage of young mice. ** $P < 0.01$ vs Veh. ## $P < 0.01$ vs Ten. ^{NS} $P > 0.05$ vs Veh or Ten.

3. 8 Tenovin-1によるセラミド合成酵素の発現低下に対するレスベラトロールの効果

Tenovin-1 処理による *GCS*, *SMS*, *GBA* の mRNA 量の減少に対し、レスベラトロールは改善効果を示した。一方、tenovin-1 とレスベラトロールは *ASM* の mRNA 量を有意に変化させなかった。以上の結果から、老化により *GCS*, *SMS*, *GBA* の発現量が減少するが、レスベラトロールはマグネシウム代謝異常の改善を介して、セラミド合成酵素の発現量を増加させることが示唆された。

3. 9 ケラチノサイトの遊走に対するマグネシウムの効果

スクラッチアッセイ法により、HaCaT 細胞の遊走に対するマグネシウム添加の影響を検討した。なお、細胞増殖の影響を除くため、培地中の血清濃度を 5% から 0.5% へ低下させて実験を行った。ピペットチップで形成した創傷領域は時間経過とともに減少し、この効果は塩化マグネシウム添加により促進した。同様の結果が硫酸マグネシウムの添加により観察された。以上の結果から、マグネシウムの添加により表皮細胞の遊走能が亢進することが明らかになった。

細胞遊走に対するマグネシウムの作用機序を解明するため、細胞内シグナル伝達因子に対する効果を検討した。遊走能の調節に関与する ERK1/2 のリン酸化量がマグネシウム添加により増加した。カルシウムキレート剤の BAPTA 存在下でも同様の結果が得られたため、マグネシウムの作用に細胞内カルシウムは関与しないことが示唆された。また、細胞周期の進行に関与する cyclin D の発現量がマグネシウム添加によって変化しなかったため、細胞増殖の影響は無視できると考えられた。

3. 10 遊走調節因子の発現に対するマグネシウムの効果

細胞遊走能は matrix metalloproteinases (MMPs) によって調節される。表皮細胞での発現が確認されている MMP1, MMP2, MMP7, MMP9 の発現に対するマグネシウムの効果を検討したところ、マグネシウム添加により HaCaT 細胞における *MMP1* と *MMP7* の mRNA 量が増加した。一方、*MMP9* は変化せず、*MMP2* は減少した。NHEK 細胞において、マグネシウム添加により *MMP7* は増加したが、*MMP1* は変化しなかった。細胞遊走の亢進に *MMP7* の関与が示唆されるため、詳細に検討することにした。

ウェスタンブロットおよび蛍光免疫染色において、マグネシウム添加により、*MMP7* のタンパク質量の増加が確認された。また、マグネシウム添加による *MMP7* mRNA 量の増加は、MEK/ERK 経路の阻害剤である U0126 の共処理により阻害された。以上の結果から、マグネシウムは MEK/ERK 経路を介して *MMP7* の発現量を増加させ、細胞遊走を亢進させることが示唆された。

siRNA を用いて *MMP7* の発現をノックダウンしたところ、マグネシウム添加による *MMP7* の発現増加も有意に阻害された。本条件下で、マグネシウム添加による創傷治癒が *MMP7* のノックダウンで阻害された。以上の結果から、マグネシウム添加による細胞遊走の亢進において、*MMP7* が重要であることが明らかになった。

3. 11 ケラチノサイトの分化に対するマグネシウムの効果

表皮細胞の増殖や遊走は細胞分化と密接に関与するため、分化マーカーである *Tumor protein p63 (TP63)*, *Desmoglein 3 (DSG3)*, *Late Cornified Envelope 1E (LCE1E)*, *FOS Like 2 (FOSL2)*, *Wnt Family Member 5A (WNT5A)*, *Semaphorin (SEMA) 3C*, *SEMA5A* mRNA 量に対するマグネシウム添加の効果を検討した。その結果、すべての分化マーカーの発現量がマグネシウム添加によって減少した。さらに、表皮細胞の特異的な分化マーカーである *filaggrin*, *keratin 1*, *loricrin*, *involucrin* の mRNA 量もマグネシウム添加によって減少した。同様の結果が、ヒト表皮由来 NHEK 細胞で観察された。以上の結果から、マグネシウムの添加により表皮細胞の分化が抑制されることが示唆された。

4. 考察

魚鱗癬とは魚のうろこのように皮膚の表面が硬くなり、鱗屑や落屑が生じる病態のことである。遺伝子異常による皮膚表面角質の形成障害が原因と考えられており、*NIPAL4* を含め数種類の原因遺伝子が同定されている。古くから皮膚機能の維持におけるマグネシウムの重要性が提唱されてきたが、肌の保湿やアンチエイジングにおける作用メカニズムは大部分が不明である。我々は老齢マウスの皮膚組織を用いた解析により、*NIPAL4* の発現低下を見出しており、*NIPAL4* が抗老化剤の新たな標的分子になると考えている。

最近我々は、NIPA4 の発現低下によりヒアルロン酸合成遺伝子である HAS2/3 の発現量が減少することを見出した⁶⁾。さらに、マグネシウムによる HAS2/3 の調節機構として、MEK/GSK3 β /CREB 経路の関与を解明した。ヒアルロン酸は細胞移動を促進する働きがあり、創傷治癒アッセイにおいて NIPA4 の発現低下により創傷部位の修復が抑制された。また、マグネシウムがポリアミン産生に関与することを見出し、紫外線や酸化ストレスによる細胞障害に対し、マグネシウムが保護効果をもつことを解明した。本研究では、新たにマグネシウムがセラミド合成に関係することを見出しており、マグネシウムは多様な機序を介して皮膚バリア機能を維持することが明らかになってきた。

p53 は細胞ストレスやがん遺伝子シグナルなどにより、リン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けて活性化後、標的遺伝子の転写調節領域内に存在する特異的塩基配列(5'-C(A/T)(T/A)G-3')に結合し、転写を活性化する。TFBIND を用いてヒト NIPAL4 プロモーター領域への p53 の結合部位を探索したところ、-20, -185, -992 番目付近に結合配列が見つかった。p53 は NIPAL4 の転写調節領域に結合し、その転写活性を阻害することが示唆される。

最近当研究室では、顆粒層の細胞間バリアを担うクラウジン-1 (CLDN1) に着目し、その発現と機能に対する紫外線照射や酸化ストレスの影響を検討した。これらのストレス刺激により、細胞間接着部位における CLDN1 の分布量は低下したが、タンパク質量は変化しなかった。この CLDN1 の局在変化は、エンドサイトーシス阻害剤の処理によって改善した。また、CLDN1 のリン酸化セリン量が減少したため、CLDN1 のリン酸化阻害とエンドサイトーシス促進の関与が示唆された。細胞間バリア機能の解析において、紫外線照射や酸化ストレスにより電解質イオン透過性が一時的に亢進し、48 時間後には元の状態に回復した。CLDN1 の細胞局在が、紫外線照射や酸化ストレスによって調節されることが明らかになった。CLDN1 発現のノックダウンにより、保湿因子の産生に関わる酵素の発現量が変化する予備知見を得ており、CLDN1 による顆粒層バリアと保湿因子による角質層バリアとの関係も検討する必要がある。

皮膚創傷治癒は止血、炎症、増殖、リモデリングの 4 つの段階に分けられる⁸⁾。止血段階では、血小板が周囲の血球系細胞を集めてフィブリンを形成し、創傷領域を覆う。

その後、血小板は成長因子などのサイトカインを放出し、免疫系細胞や線維芽細胞の遊走を引き起こす。続いて、数時間以内に炎症期へ移行する。免疫系細胞はプロテアーゼや活性酸素種を産生し、細菌などの感染に対して防御する。さらに、免疫系細胞によって過剰産生されるサイトカインは、ケラチノサイトや線維芽細胞の増殖・遊走を促進する。最終的に、創傷部位が完全に塞がり、表皮細胞は分化状態になる。このような創傷治癒の過程で、表皮ケラチノサイトの分化が適切に制御される必要がある。表皮の分化は TP63, DSG3 などの様々な分化関連因子によって調節されることが報告されている。本研究で検討したすべての分化関連因子の発現量は、マグネシウム添加によって減少したため、皮膚創傷治癒の後期段階における表皮の再分化に対し、マグネシウムが阻害的に寄与することが示唆された。

5. 今後の課題

老化と NIPAL4 発現の解析において、p53 が NIPAL4 遺伝子のプロモーターに作用し、遺伝子発現を負に調節することが示唆された。しかし、結合部位が不明なため、クロマチン免疫沈降法などを用いて、p53 と NIPAL4 の転写調節領域との結合を調べる必要がある。また、レスベラトロールが老化促進剤による NIPAL4 とセラミド合成酵素の発現低下を改善することを見出したが、作用機序、セラミド産生に対する効果、生体での効果が不明なため、さらなる検討が必要である。

6. 文献

- 1) Koppes, S.A., Charles, F., Lammers, L., Frings-Dresen, M., Kezic, S., Rustemeyer, T., Efficacy of a Cream Containing Ceramides and Magnesium in the Treatment of Mild to Moderate Atopic Dermatitis: A Randomized, Double-blind, Emollient- and Hydrocortisone-controlled Trial, *Acta Derm Venereol*, 96, 948-953 (2016).
- 2) Honda, Y., Kitamura, T., Naganuma, T., Abe, T., Ohno, Y., Sassa, T., Kihara, A., Decreased Skin Barrier Lipid Acylceramide and Differentiation-Dependent Gene Expression in Ichthyosis Gene Nipal4-Knockout Mice, *J Invest Dermatol*, 138, 741-749 (2018).
- 3) Lefevre, C., Bouadjar, B., Karaduman, A., Jobard, F., Saker, S., Ozguc, M., Lathrop, M., Prud'homme, J.F., Fischer, J., Mutations in ichthyin a new gene on

- chromosome 5q33 in a new form of autosomal recessive congenital ichthyosis, *Hum Mol Genet*, 13, 2473-2482 (2004).
- 4) Palamar, M., Onay, H., Ertam, I., Ates, E.A., Dereli, T., Ozkinay, F., Yagci, A., Genotype and Anterior Segment Phenotype in a Cohort of Turkish Patients with Lamellar Ichthyosis, *Ophthalmic Genet*, 36, 229-233 (2015).
- 5) Marunaka, K., Shu, S., Kobayashi, M., Goto, M., Katsuta, Y., Yoshino, Y., Ikari, A., Elevation of hyaluronan synthase by magnesium supplementation mediated through the activation of GSK3 and CREB in human keratinocyte-derived HaCaT cells, *Int J Mol Sci*, 23, (2021).
- 6) Shu, S., Kobayashi, M., Marunaka, K., Yoshino, Y., Goto, M., Katsuta, Y., Ikari, A., Magnesium Supplementation Attenuates Ultraviolet-B-Induced Damage Mediated through Elevation of Polyamine Production in Human HaCaT Keratinocytes, *Cells*, 11, (2022).
- 7) Wolf, F.I., Cittadini, A., Magnesium in cell proliferation and differentiation, *Front Biosci*, 4, D607-617 (1999).
- 8) Werner, S., Grose, R., Regulation of wound healing by growth factors and cytokines, *Physiol Rev*, 83, 835-870 (2003).

Improvement Effect of Magnesium on Aging-Induced Decrease in Ceramide Production in the Skin

Akira Ikari, Yuta Yoshino

Gifu Pharmaceutical University

Summary

Over 70% of elderly people may have skin problems, and the patients with skin diseases will increase in the future. The epidermis of the skin is made up of four layers: stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, and stratum basale, and functions as a barrier to prevent the invasion of foreign substances from the outside and the evaporation of water from within the body. Moisturizing factors such as ceramide and collagen in the stratum corneum, and intercellular tight junctions in the granular layer play important roles in forming the barrier function. The barrier function is reduced by aging and exposure to ultra violet rays and oxidative stress. Therefore, factors that enhance the production of moisturizing factors can be expected to enhance the skin barrier function in elderly people. In addition, repair mechanisms for physical wounds also play an important role in maintaining skin barrier function. Magnesium has been reported to have a promoting effect on skin wound healing, but the detailed mechanism remains unclear. In this study, we investigated the effect of magnesium on ceramide production and wound healing. Furthermore, we searched for food materials that can improve the aging-induced barrier dysfunction.

HaCaT cells and NHEK cells derived from human epidermal keratinocytes were used in the experiment. The gene and protein expression were analyzed by real-time PCR and Western blotting, respectively. Intracellular free magnesium concentration ($[Mg^{2+}]_i$) was measured using the fluorescent indicator, mag-fura 2. The transcriptional activity of (*NIPA like protein 4*) *NIPAL4*, a magnesium channel coding gene, was measured using luciferase assay. In the wound healing assay, the area of the wound caused by the pipette tip was measured and the closure rate was compared.

Tenovin-1, a sirtuin inhibitor, increased the amount of acetylation of p53, an aging factor, and decreased the amount of *NIPAL4* mRNA. The resting level of $[Mg^{2+}]_i$ was decreased by tenovin-1 and knockdown of *NIPAL4* using siRNA. These results suggest that tenovin-1 decreases the resting level of $[Mg^{2+}]_i$ mediated via the reduction of *NIPAL4* expression. The expression levels of enzymes involved in the production of sphingomyelin, which is a material for ceramide synthesis, were decreased by tenovin-1. Using a compound library, we searched for food materials which activate a transcriptional activity of *NIPAL4* and identified resveratrol. Resveratrol improved the decrease in ceramide synthase expression and sphingomyelin concentration caused by tenovin-1. Next, we investigated the role of magnesium on wound healing and found that it increases the expression of matrix metalloproteinases 7 (MMP7), which enhances cell migration. The increase in MMP7 expression was inhibited by U0126, a MEK/ERK pathway inhibitor, suggesting the involvement of this signal transduction pathway.

In conclusion, we suggest that magnesium deficiency is involved in the aging-induced dysfunction of skin barrier. Resveratrol improved the tenovin-1-induced reduction of *NIPAL4* expression and paracellular barrier. Resveratrol may be a candidate for an antiaging food material.