

## 2022年度 北陸大学特別研究助成【 奨励課題研究 】 報告書

代表者	所属	薬学部	職位	講師	氏名	佐藤 安訓
-----	----	-----	----	----	----	-------

研究課題名	ビタミンCのエピジェネティクス制御を介した表皮の老化制御
-------	------------------------------

交付額	1,000,000 円
-----	-------------

**研究成果の概要**

エピジェネティクスは配列変化を伴わない遺伝子発現制御機構である。近年、この機構にビタミンC(VC)が関与することがわかってきた。そこで、VCがエピジェネティクス制御を介して表皮の老化を制御できるか明らかにするため、本研究では成人の正常ヒト表皮角化細胞を重層培養した成人ヒト三次元培養表皮の構築を目的とした。成人の正常ヒト表皮角化細胞を単層培養後、可能な限り増殖回数が少なく細胞生存率が高い条件で凍結保存した。凍結保存した細胞を重層培養して成人ヒト三次元培養表皮の構築を試みた結果、三次元培養の条件下で成人ヒト表皮角化細胞の生存を確認することができた。今後、表皮層の形成確認などと同時並行でVCによるエピジェネティクス制御を介した表皮の老化制御について知見を深めていく。

**研究目的**

## (1)本研究の学術的背景

エピジェネティクスは配列変化を伴わない遺伝子発現制御機構である。代表例のDNAメチル化は5'-CG-3'配列のシトシンがメチル化する反応である。DNAがメチル化されると転写因子が結合せず遺伝子発現を抑制するが脱メチル化で回復する。近年、加齢に伴うDNAメチル化の蓄積が老化に伴う機能低下の一因であるとわかってきた<sup>1)</sup>。2013年、VCはDNA脱メチル化酵素Ten-eleven translocation(Tet)の補酵素と判明した<sup>2)</sup>。これはVCがTetの酵素活性を介して加齢に伴うDNAメチル化の蓄積を除去できることを示す。すなわち、VCは抗酸化やコラーゲン重合など従来の作用に加えてDNA脱メチル化による老化制御という新たな生理作用を持つ。実際ヒト造血幹細胞はVC濃度を高く保ちDNAメチル化を防ぐことで高齢期での白血病発症を抑制する<sup>3)</sup>。しかし、VCのDNA脱メチル化に関する知見は癌などの疾患にほとんど限定しており、疾患を有さない正常な老化組織では未解明という問題点がある。

## (2)着想に至った経緯

古くからエピジェネティクスは癌や分化・発生段階を研究領域とする場合が多い。VCがエピジェネティクスに関与すると判明したにも関わらず、VCとエピジェネティクスを結びつける研究は少ない。本研究で得られる成果および手法はビタミンA・D・B<sub>12</sub>・葉酸などエピジェネティクスに関する様々なビタミンに応用が可能である。そこで海外に先行して研究される前にVCがDNA脱メチル化を介して老化制御することを明らかにして、VCとエピジェネティクスに関する研究活性化と日本のビタミン研究の活性化の一助としたいという着想に至った。

## (3)本研究の目的

そもそも本奨励課題研究の基本方針は、科研費をはじめとする外部研究資金を獲得するための研究活動を基礎的かつ補完的に支援することを目的とした助助的研究資金である。そこで本研究は、高齢者の正常ヒト表皮角化細胞を重層培養した成人ヒト三次元培養表皮の構築を目的とする。得られた成果を外部の競争的研究資金申請時の予備的な知見として活用することで、奨励課題研究の基本方針である外部資金獲得達成を目指す。

**研究の方法**

三次元培養表皮構築に要する細胞数は約5,000,000 cellsである。しかし初代成人ヒト正常表皮角化細胞は約500,000 cells/本であり、必要細胞数を満たしていない。また市販の細胞は1本で約100,000円するため、細胞購入のみで構築を試みると1実験あたり約1,000,000円必要となり現実的ではない。そこで(1)初めに初代成人ヒト正常表皮角化細胞を単層培養して必要細胞数まで増殖を試みる。次に、(2)三次元培養表皮構築における至適条件(細胞生存率、細胞集団倍化回数(population doubling level, PDL)の検討を行い、(3)安定した三次元培養表皮構築を試みる。

## (1)成人ヒト正常表皮角化細胞の単層培養

初代成人ヒト正常表皮角化細胞を購入後、三次元培養に必要な細胞数まで細胞継代および単層培養を行う。必要細胞数まで増殖後、細胞を凍結保存する。細胞を凍結保存しておくことで、①実験計画の作成～②細胞の購入・納品～③実験の実施という一連の実験フローが①実験計画の作成～②実験の実施へと時間短縮できる。

## (2)細胞集団倍化回数(population doubling level, PDL)および細胞生存率の測定

初代培養から細胞凍結保存に至るまでのPDLおよび細胞生存率をトリパンブルー染色法にて測定する。

## (3)成人ヒト三次元培養表皮の構築

単層培養後に凍結保存した細胞をセルカルチャーインサート内で重層培養することで成人ヒト三次元培養表皮を構築する。

## 研究成果

### (1)成人ヒト正常表皮角化細胞の単層培養

購入した成人男性由来の表皮角化細胞をシャーレに播種した。播種時の細胞数は平均161,833 cells/dishだった。適宜培地交換を行い3~4日間経過後、80%コンフルエントに達する前に細胞数を計測した結果、成人由来の表皮角化細胞は平均1,548,332 cells/dishまで増殖していた。これらの細胞を至適細胞密度で培養用フラスコに継代し、さらに適宜培地交換を実施した。フラスコ内の細胞が80%コンフルエントに達する前に細胞数を計測した結果、平均43,785,000 cells/flaskまで増殖を認めた。

増殖した細胞は、細胞数500万個/本になるように希釈後、クライオチューブにて三次元培養表皮の構築用に液体窒素下で凍結保存した。

### (2)細胞集団倍化回数(population doubling level, PDL)および細胞生存率の測定

初代培養から細胞凍結保存に至るまでのPDLおよび細胞生存率をトリパンブルー染色法にて測定した。細胞播種時の生存率はそれぞれ82.6%と94.1%だったが、シャーレにて増殖後80%コンフルエントに達する前に生存率を測定した結果、それぞれ死亡していた細胞はごく僅かだった。また細胞数500万個/本で凍結する直前の生存率も測定したが死亡していた細胞はごく僅かであった。なお生細胞数は測定しているが、死細胞を測定している間に細胞の生存率は低下する。生存率の測定は組織構築後にも行うため、単層培養における死細胞数の測定は顕微鏡下での観察にて行った。

PDLを計算した結果、播種時のPDLを0としたとき、最終的にPDL=6.2と6.7の2種類の条件で成人ヒト三次元培養表皮構築用の細胞を調製することができた。

以上、細胞数500万個、PDL=6.2と6.7、細胞生存率90%以上の条件で成人ヒト三次元培養表皮構築用の細胞を2種類用意できた。

### (3)成人ヒト三次元培養表皮の構築

単層培養にて作成した成人ヒト三次元培養表皮構築用のヒト表皮角化細胞を用いて、実際に三次元培養が可能か構築を試みた。凍結保存した細胞を解凍後、セルカルチャーインサートと呼ぶ底面がメッシュ状の培養用カップ内に細胞を播種した。その後、24時間CO<sub>2</sub>インキュベーター内で静置した。播種直後に細胞数を測定した結果、生細胞数500万個、生存率90%以上を確認できた。すなわち成人ヒト三次元培養表皮構築用のヒト表皮角化細胞は凍結保存することで、今後の実験実施の時間短縮が可能であることがわかった。

インサート内に播種した細胞は24時間静置後、インサート内の培地を吸引除去して気相-液層界面で細胞を引き続き培養した。培地はインサート底面のメッシュから供給される。すなわち播種した細胞の底面は液相と接触しているが細胞の上部は気相に曝されることで気相-液相界面での培養が可能となる。気相-液相界面で7日間培養後、培地中に黄色のテトラゾリウム塩(3-(4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド)を添加して培養した結果、紫色のホルマジン色素の生成を確認できた。黄色のテトラゾリウム塩は生細胞の代謝反応によって紫色のホルマジン色素に還元されるので、細胞の生存を評価することができる。すなわち、成人ヒト表皮角化細胞の生存を三次元培養で確認することができた。

これらの結果から、少なくともPDLが6.7以下であれば、市販の成人由来ヒト表皮角化細胞を増殖させて、三次元培養表皮の構築に至れることが示唆された。今後、表皮を構成する層(基底層、有棘層、顆粒層、角質層)の形成確認など表皮の構築検証と同時にVICによるエピジェネティクス制御を介した表皮の老化制御について知見を深め、外部の競争的研究資金獲得に向けて研究を進めていく。

### <引用文献>

1. Lu, Y et al. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. Nature 588, 124-129 (2020).
2. Minor, EA et al. Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. J Biol Chem 288, 13669-13674 (2013).
3. Agathocleous, M et al. Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis. Nature 549, 476-481 (2017).

## 主な発表論文等

【論文】

佐藤安訓：ビタミン・バイオフィクターとエピジェネティクス。ビタミン 96：347-353, 2022

【発表】

佐藤安訓：皮膚でのビタミンCのはたらき。第2回ビタミンC研究委員会シンポジウム, 東京, 2022.8

佐藤綾美、松井美緒、滝野有花、佐藤安訓、斉藤紀克、大澤肇、石神昭人：ビタミンCによる表皮角化過程でのエピジェネティクス制御。日本ビタミン学会第74回大会, 福岡, 2022.6

Ayami SATO, Mio MATSUI, Kanoe URASAWA, Nanako MAEDA, Yuka Takino, Yasunori SATO, Jaewon LEE, Akihito ISHIGAMI: Epigenetic regulation by vitamin C in epidermal keratinization. 第45回日本基礎老化学会大会, 京都, 2022.7