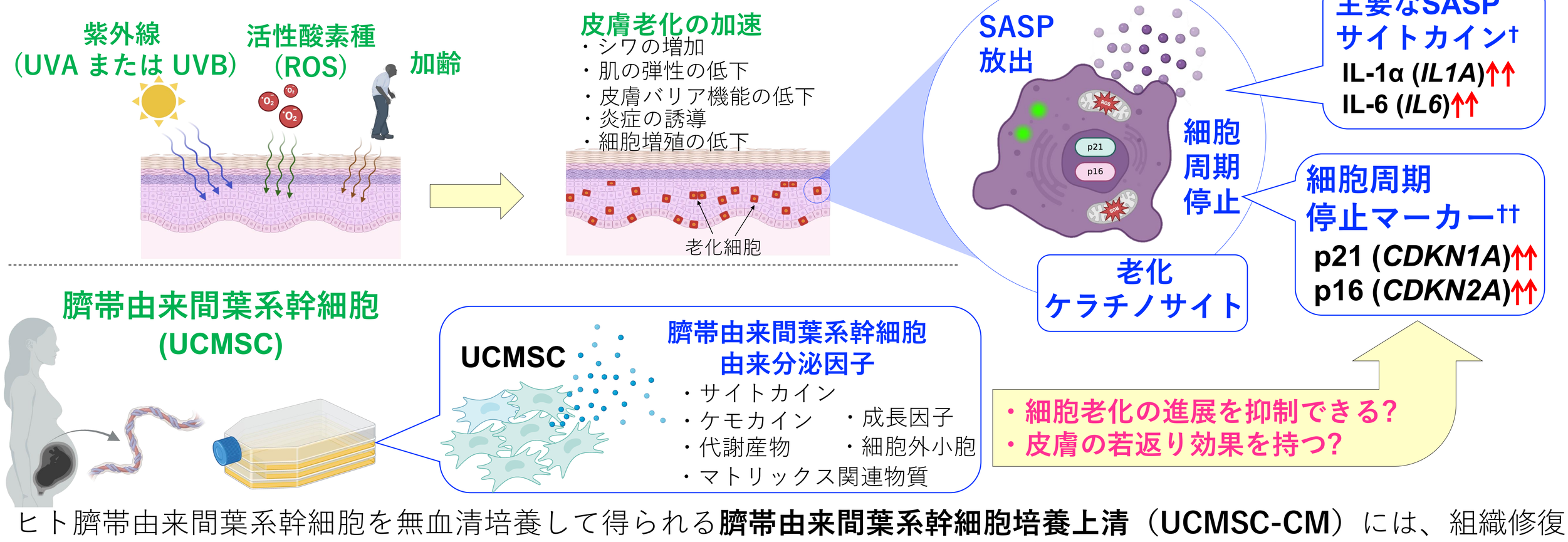
ヒト臍帯由来間葉系幹細胞培養上清液はヒト上皮細胞のUVA・酸化ストレス誘導性細胞老化を緩和する

胡哲宇[1], 吉川宗一郎[1,2], 山下亜矢子[1], 鎌田弥生[1,2], 河野美帆[1,3], 上田向勇[1,3], 松本隆明[1,3], 柳田康友[1,3], 冨永光俊[1,2], 髙森建二[1,2,4]

1. 順天堂大学大学院医学研究科 環境医学研究所 皮膚抗加齢再生医学講座
2. 順天堂大学大学院医学研究科 環境医学研究所 順天堂かゆみ研究センター
3. 株式会社エテルナム
4. 順天堂大学医学部附属浦安病院 皮膚科

背景と目的

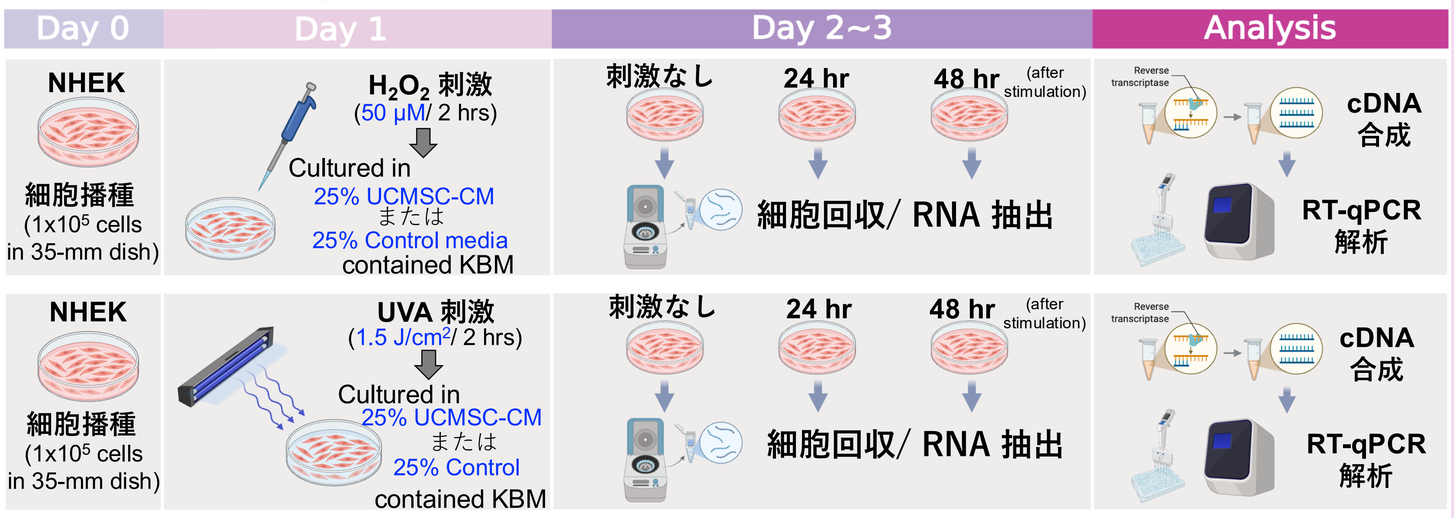
細胞老化は、不可逆的な細胞増殖停止と老化関連分泌表現型（SASP）の放出によって特徴づけられ、組織の環境を変化させ、さまざまな疾患に関与する。老化細胞は加齢に伴って増加する一方で、**UVAや活性酸素種（ROS）のような刺激によっても急速に誘導されうる。**
(Gurker et al. *Nature Aging* 2023; Wang et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024)



ヒト臍帯由来間葉系幹細胞を無血清培養して得られる**臍帯由来間葉系幹細胞培養上清（UCMSC-CM）**には、組織修復に有益と報告されている分泌因子が含まれている。そのため、皮膚の若返り（skin rejuvenation）への応用が期待されているが、皮膚細胞に対する作用はまだ十分には解明されていない。(Li et al. *Cell Prolif* 2023)

UCMSC培養上清液(UCMSC-CM) はヒトケラチノサイト（NHEK）において、UVA/ROS誘導性細胞老化を抑制できるか？

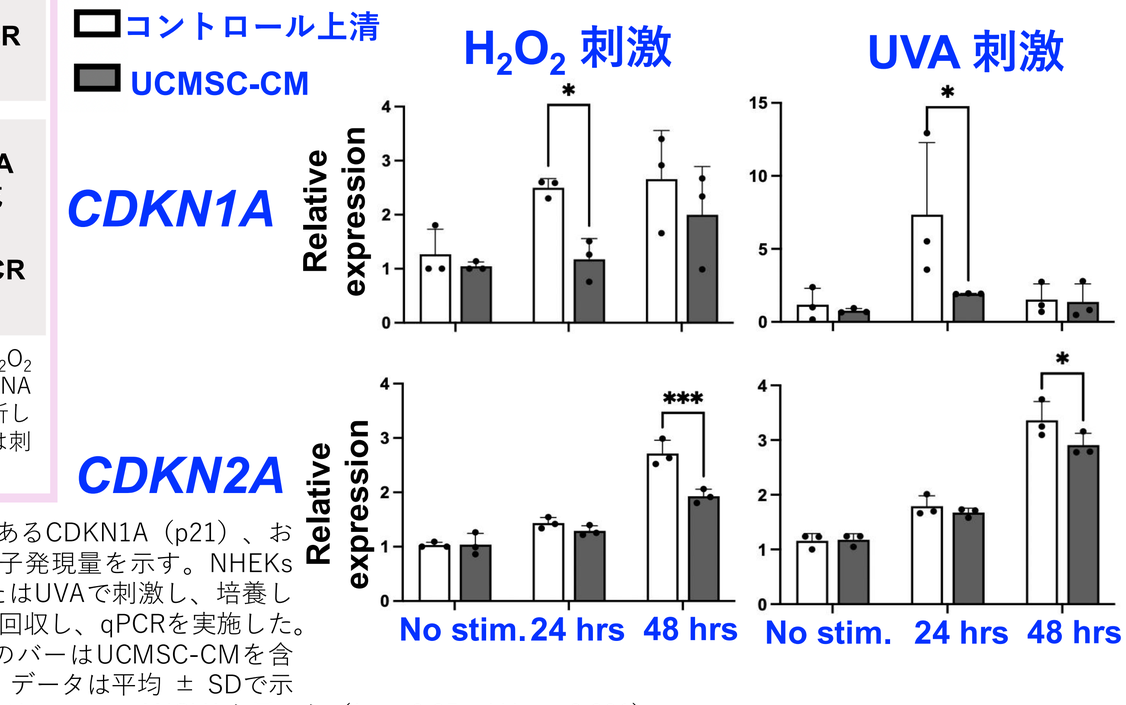
実験方法と結果



健常成人ドナー由来の正常ヒト表皮角化細胞（NHEKs）を35-mmディッシュあたり1×10^5 cellsで播種した。細胞には上図の条件でH_2O_2またはUVA刺激を行った。刺激後、細胞を25% UCMSC-CMまたは対照培地を含むkeratinocyte basal medium（KBM）で培養した。RNAはNHEKsから0時間（刺激なし）、刺激後24時間、および48時間の時点で回収した。回収したtotal RNAをcDNAに変換し、qPCRで解析した。細胞周期停止マーカー（CDKN1A、CDKN2A）およびSASP関連サイトカイン（IL6、IL1A）の発現を定量した。SA-β-Galの蓄積は刺激後96時間後にSPiDER-β-Galキット（Dojindo）を用いて解析した。

Figure 1.

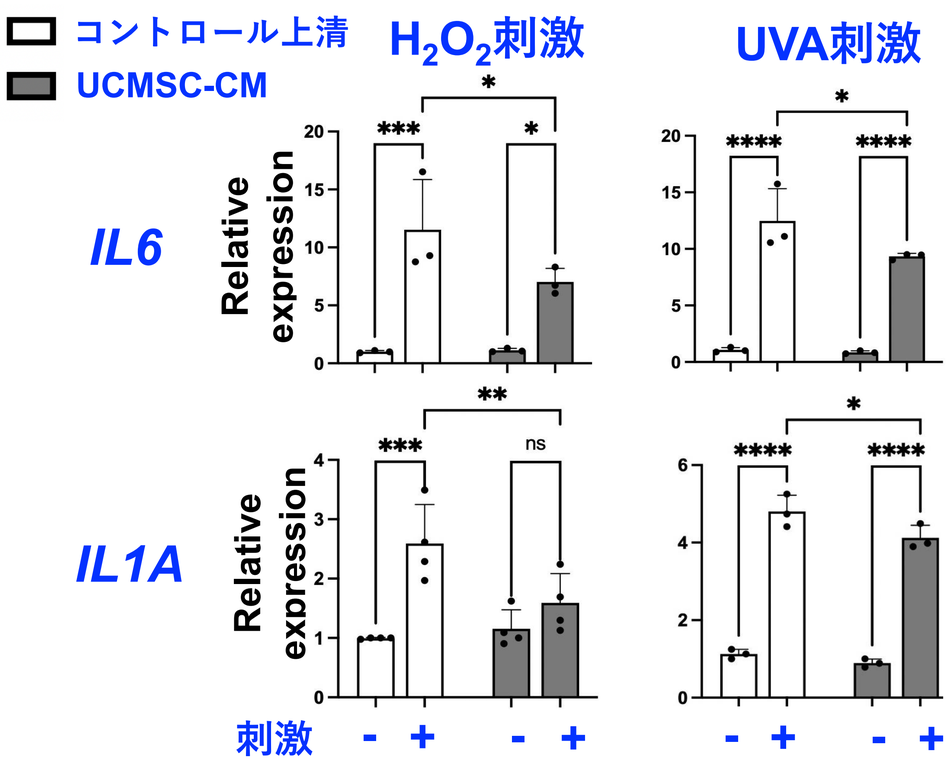
UCMSC-CMはNHEKsにおけるUVA/H_2O_2誘導性CDKN1A・CDKN2A発現上昇を抑制する



代表的な細胞周期停止マーカーであるCDKN1A（p21）、およびCDKN2A（p16）の相対遺伝子発現量を示す。NHEKsは、前述の方法に従ってH_2O_2またはUVAで刺激し、培養した。RNAは図中に示した各時点で回収し、qPCRを実施した。白色のバーは対照NHEKs、黒色のバーはUCMSC-CMを含むKBMで培養したNHEKsを示す。データは平均 ± SDで示した。　統計解析にはtwo-way ANOVAを用いた（*p < 0.05、***p < 0.001）。

Figure 2.

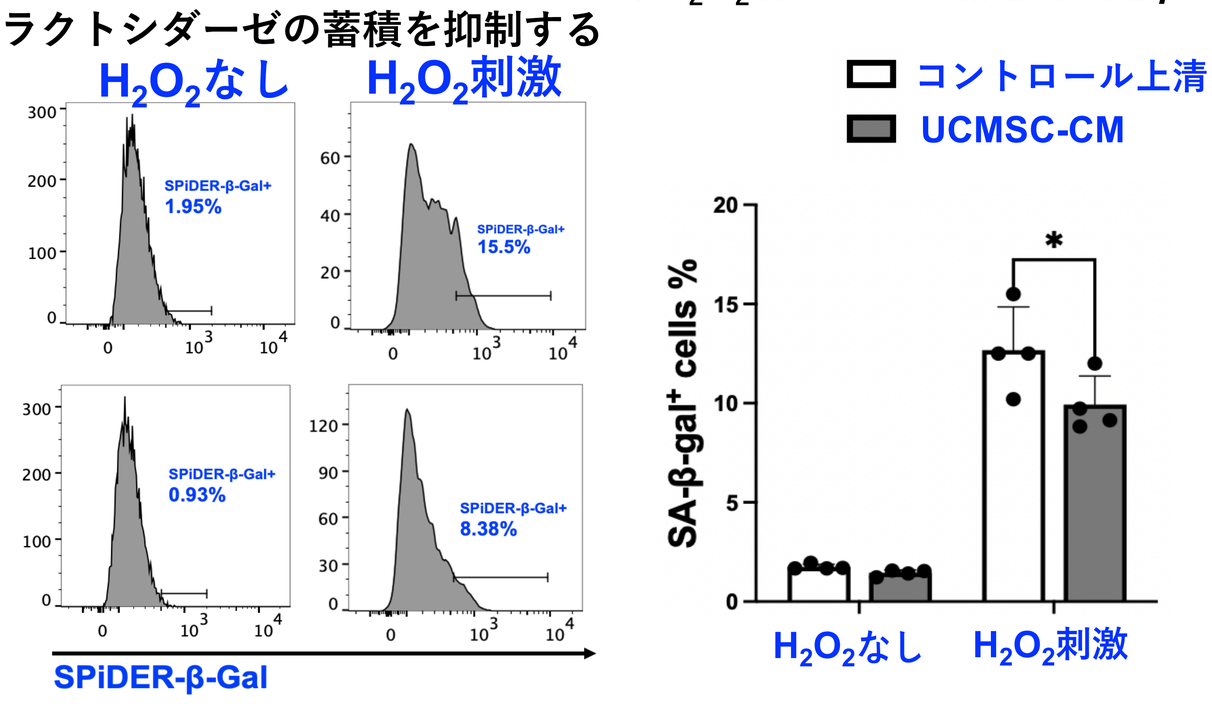
UCMSC-CMはNHEKsにおける UVA/H_2O_2 誘導性のSASP遺伝子（Il6、Il1a）発現を抑制する



代表的なSASPサイトカインであるIL6（IL-6）およびIL1A（IL-1α）の相対遺伝子発現量を示す。NHEKsは、前述の方法に従ってH_2O_2またはUVAで刺激し、培養した。刺激24時間後にRNAを回収し、qPCRを実施した。白色のバーはコントロールNHEKs、黒色のバーはUCMSC-CMを含むKBMで培養したNHEKsを示す。データは*ACTB*で正規化し、無刺激・コントロール培地群を基準（=1）としてΔΔCT値を算出した。データは平均 ± SDで示した。統計解析にはtwo-way ANOVAを用いた（*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、****p < 0.0001）

Figure 3.

UCMSC-CMはNHEKsにおける UVA/H_2O_2誘導性の細胞老化関連β-ガラクトシダーゼの蓄積を抑制する



左の図は、SPiDER-β-Gal検出キットを用いた老化関連βガラクトシダーゼの蓄積をフローサイトメトリーで検出したデータを示し、右の図はそれをまとめたグラフを表す。NHEKsを前述の方法に従ってH_2O_2で刺激し、刺激後96時間後に細胞を回収、SPiDER-β-Galで染色した。老化関連βガラクトシダーゼが蓄積すると蛍光を発するため、蛍光強度の高い細胞に蓄積していることを意味する。白色のバーはコントロールNHEKs、黒色のバーはUCMSC-CMを含むKBMで培養したNHEKsを示す。データは平均 ± SDで示した。統計解析にはtwo-way ANOVAを用いた（*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、****p < 0.0001）

結論

NHEKにUCMSC-CMを添加すると、H_2O_2またはUVAによって誘導される細胞周期停止マーカー（p21、p16）の発現が低下し、SASP関連サイトカイン（IL-6、IL-1α）も抑制された。詳細な分子機構は依然不明であるものの、これらの結果はUCMSC-CMがUV/ROS誘導性の細胞老化からケラチノサイトを保護する、あるいは老化した細胞を若返らせる機能を持つ可能性を示唆している。したがって、UCMSC-CMを含有する化粧品は、老化予防や若返り促進を含め、皮膚上皮細胞に対する抗老化効果を有することが期待される。今後は、UCMSC-CMの抗細胞老化作用の分子メカニズムを詳細に解明する必要がある。

BOX

†）老化細胞は老化関連分泌表現型（SASP）を獲得し、IL-6やIL-1αのような炎症性サイトカインを放出する。これらのSASP因子は細胞老化の維持や組織における慢性の軽度炎症にも寄与する。

††）p16（CDKN2A）およびp21（CDKN1A）は、細胞周期の進行、特にG1期での進行を阻害するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である。
これらは老化細胞で強く発現上昇し、細胞周期停止のマーカーとして広く用いられている。

全ての著者らに開示すべき利益相反はありません。