

培養皮膚線維芽細胞の増殖に及ぼす加齢の影響と Glycyrrhizin の効果

村野 俊一*、林田視公子、齋藤 康、吉田 尚

千葉大学医学部第二内科

Effect of Glycyrrhizin on growth and aging of cultured human skin fibroblasts

Shunichi MURANO*, Mikiko HAYASHIDA, Yasushi SAITO, Sho YOSHIDA

The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University

(Received December 2, 1992. Accepted January 6, 1993.)

Abstract

Hayflick advocated that cultured human diploid fibroblasts underwent a finite number of population doublings (PD) and then died. After that human diploid fibroblasts are most popular material for cellular senescence research. In this study, we assessed usefulness of cell growth curve to estimate senescence of the cells. We found that cell growth was slower in cultured skin fibroblasts from old (84 year-old) donor than in those from young (16 year-old) donor. The cells from Werner syndrome, a genetic premature aging syndrome, showed the slower cell growth than that of the old subject even though the donor's age (44 year-old) was younger than that of the old subjects. We compared cell growth of cultured skin fibroblasts after 36PD to that of the same cells after 49PD, which is just before the finite life span, and found that *in vitro* cultivation also affected cell growth. These results suggested that cell growth curve could be an easy indicator to assess cellular aging. Glycyrrhizin was reported to accelerate healing of wound. In this study, we discussed the effect of the reagent on cell growth and found that it increased cell growth, dose-dependently. This result suggests a possibility that Glycyrrhizin could be a reagent to modify or regulate cellular senescence.

Key words human diploid fibroblasts, cellular senescence, Glycyrrhizin, cell growth curve.

結 言

Hayflick ら¹⁾ が培養 2 倍体ヒト線維芽細胞をモデルとしてもちいて細胞には分裂回数によって規定される寿命が存在することを見出して「細胞老化」の概念を提唱して以来、培養線維芽細胞は老化のメカニズムを研究するのに最も適した材料と考えられている。老年者から採取した皮膚より培養した線維芽細胞では若年者より調製した細胞に比べて少ない分裂回数でその増殖を止めてしまうことが知られている。また、老年者から調製した細胞や、培養して分裂（継代）回数とその分裂寿命に近づいた細胞、すなわち *in vitro* での老化が進んだ細胞では増殖の

速度が鈍ることや、増殖を停止した際の細胞密度が低下していることが観察されている。一方、和漢薬のなかでも甘草の抽出成分である Glycyrrhizin には創傷の治癒を早める効果のあることが知られており、線維芽細胞などの増殖を促進する効果のあることが予測される。そこで、今回我々は培養皮膚線維芽細胞をもちいて、細胞の増殖能を指標として Glycyrrhizin が細胞老化に影響を及ぼす可能性について検討した。

材料と方法

(1) 健康若年者、老年者および早老症候群 (Werner 症候群) 患者の培養皮膚線維芽細胞における細

*〒260 千葉市中央区亥鼻1-8-1
1-8-1, Inohana, Chuou-Ku, Chiba 260, Japan

胞増殖と DNA 合成の検討：16歳と84歳の健常者及び44歳のWerner症候群患者より採取した皮膚から培養線維芽細胞を調製した。培養液は10%子牛胎児血清を添加したDulbecco's modified Eagle培地を用いた。これらの細胞をトリプシン処理の後に一定数を35 mm²のpolystyrene製のCell Wells (Corning社)に播き、経時的に細胞をトリプシン処理して細胞数をCoulter counterを用いて計測し、細胞増殖曲線を描いた。同時に別のwellに2 μ Ciの³H] thymidineを添加し、37°Cで1時間インキュベーションした後細胞を分離して1.5 mlの0.1% Sodium dodecyl sulfateを加えて可溶化した後、50% Trichloroacetic acidにて沈殿する画分の放射活性を測定した。測定は継代後1, 3, 6, 9, 12日の時点で行なった。

(2) **培養線維芽細胞の増殖におよぼす継代の影響**：52歳の健常者より採取した皮膚からの培養線維芽細胞(継代36, 49代目)の細胞の増殖能を比較した。

(3) **培養線維芽細胞の増殖におよぼす Glycyrrhizin の影響**：65歳の健常者より採取した皮膚からの培養線維芽細胞(継代16代目)を用い、継代後2日目より培養液にGlycyrrhizinをそれぞれ25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml添加して1, 3, 8日目の時点で細胞数を測定した。

結 果

84歳と16歳の健常者の細胞の増殖曲線を比較することにより、細胞の提供者の加齢によりその培養線維芽細胞の増殖能の低下、すなわち細胞増殖の遅延と最終細胞密度の低下が観察された。これと同時に起こった³H-ThymidineのDNAへの取り込みでは高齢者よりの細胞で取り込みのピークの遅延及び低下が認められた。細胞老化が著しく促進されるWerner症候群の細胞では84歳の高齢者からの細胞に比較しても、細胞増殖の低下および³H-ThymidineのDNAへの取り込みのピークの遅延及び低下が認められた (Fig. 1)。

52歳の健常人より採取した細胞を36代と49代継代した細胞の増殖曲線を比較すると、継代を重ねた細胞で増殖能の低下が観察された (Fig. 2)。

Glycyrrhizinの細胞増殖への影響をみると、継代後2日目 (Glycyrrhizin添加後1日目)の時点ではGlycyrrhizin添加群と対照の間に細胞増殖の差異は認められなかったが、4日目 (Glycyrrhizin添加後3日目)の時点ではGlycyrrhizin添加群で対照に

比較して細胞数の増加する傾向が認められ、8日目の時点では有意な差が認められた (Fig. 3)。

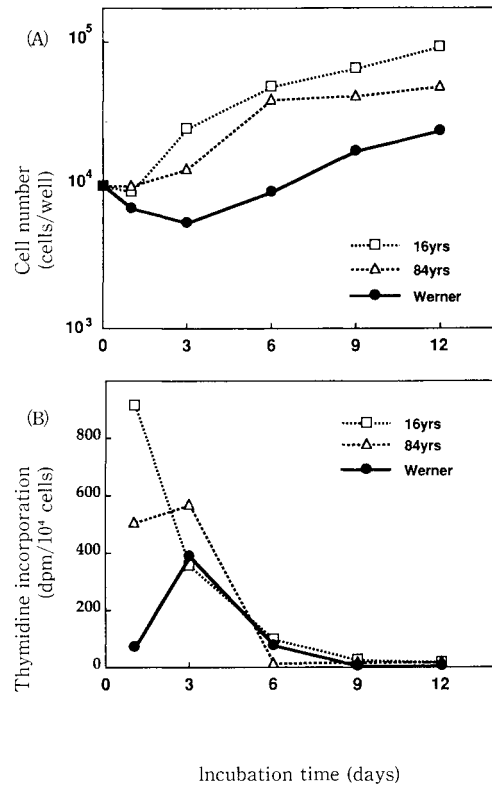


Fig. 1 (A) Cell growth curves of cultured skin fibroblasts from young (16 year-old) and old (84 year-old) donors.

(B) [³H] thymidine incorporation into DNA of the cultured skin fibroblasts.

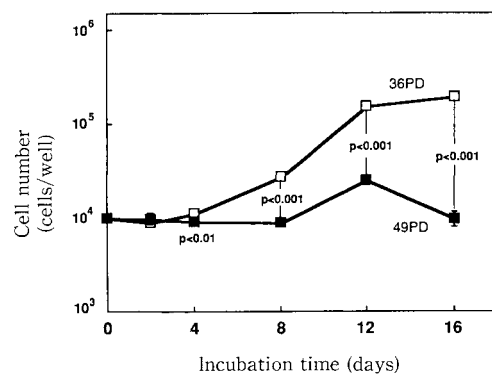


Fig. 2 Effect of serial cultivation on cell growth.

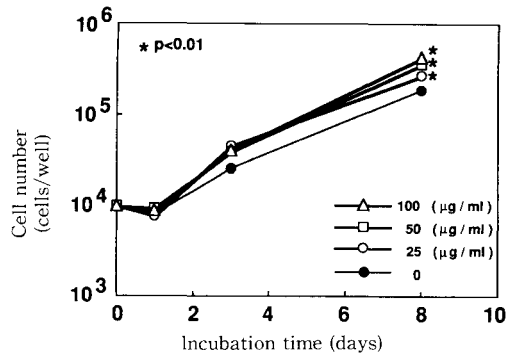


Fig. 3 Effect of Glycyrrhizin on growth of cultured skin fibroblasts.

考察及び結論

生体の老化はそれを構成する細胞の老化に起因していると考えられる。線維芽細胞などの老化は培養系に移した際の分裂能（何代継代を続けられるか）を指標として表されるが、これと相関する指標として細胞増殖能の測定があげられる。この細胞増殖能の測定は継代数の測定に比べて短期間に行なえる利点がある。今回細胞提供者の年齢、及び早老症候群である Werner 症候群の病態が細胞の増殖を低下させることを確認した。これらの細胞増殖の低下は同時におこなった³H-Thymidine の DNA への取り込み実験により DNA 合成の低下によるものであると考えられた。さらに、同一の細胞の増殖能が継代によりどのように変化するかについて検討したところ、継代数の進むにつれて著しい細胞増殖の低下が認められた (Fig. 2)。Glycyrrhizin については Cunitz²⁾ により創傷の治癒を促進する作用のあることが報告されている。そこで本剤の培養皮膚線維芽細胞の増殖に及ぼす効果について培養液に本剤を添加することにより検討したが、結果として Glycyrrhizin が濃度依存的に培養線維芽細胞の増殖能を増加させる作用のあることが見出された。熊谷ら³⁾ は

Glycyrrhizin がコーチゾンによる肉芽形成および線維芽細胞や HeLa 細胞の細胞増殖の抑制作用に拮抗してこれらをもとのレベルに戻す作用のあることを報告している。同じ報告で、Glycyrrhizin は単独では線維芽細胞の増殖を促進する作用はないとされている。しかし、その実験系では 60 時間のインキュベーションを用いており、今回われわれが観察した結果でも 3 日目 (72 時間) までの時点では Glycyrrhizin の添加により細胞増殖に有意な差があるとは言いがたく、同様の結果と考えられるが、インキュベーション時間を 7 日間とした時に有意差が観察された。したがって、本剤は細胞増殖を促進する効果を現すまでに数日間以上を要するものと考えられた。Glycyrrhizin が細胞の増殖能を増加させる機序については現在不明と言わざるをえないが、熊谷らは本剤がコーチゾンの作用を抑制したことから、これが本剤のもつステロイド類似の作用とはことなる直接作用であろうと考えている。³⁾ 今回の検討では *in vitro* の老化のまだあまり進んでいない 65 歳の健常者からの細胞を比較的継代数の少ない状態にでもちいたが、本剤がこの細胞にて増殖能を増加させたことは、老化による細胞機能の低下の始まりを抑制する意味から興味深い結果と考えられる。さらに細胞老化の進んだ細胞や、Werner 症候群の細胞にて低下した細胞増殖能に対して同様な効果を期待出来るか、また細胞老化について Hayflick が用いた指標である分裂寿命に関しては継代数の延長効果が見られるのかが今後検討されるべき課題であろう。

文 献

- 1) Hayflick, L. and Moorhead, P.S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621, 1961.
- 2) Cunitz, G.: Zur Wirkung von Succus Liquiritiae auf die Heilung experimenteller Hautwunden. *Arzneimittelforschung.* **18**, 434-5, 1968.
- 3) Kumagai, A. *et al.*: An inhibitory effect of Glycyrrhizin on the antigranulomatous action of cortisone. *Endocrinology* **74**, 145-148, 1964.