

東京工科大学

博士學位論文

内的因子と外環境因子により生成される

細胞内活性酸素種 (ROS) の

除去に基づく植物エキスに関する研究

-オリーブ果実圧搾残渣より抽出したエキスと、
Ocimum basilicum エキスによる細胞内 ROS 除去作用-

令和 3 年 3 月 19 日

吉川 まどか

目次

序論	1
1. 皮膚の機能と構造	1
1.1. 表皮	1
1.2. 真皮	2
2. 皮膚における ROS (reactive oxygen species) の生成と消去	3
2.1. ROS とは	3
2.2. 生体内における ROS の生成	4
2.3. ROS のフィットプリント 脂質過酸化反応最終生成物 CP	5
2.4. ROS 生成刺激因子	5
2.4.1. UV	5
2.4.2. 大気汚染物質	5
2.4.3. 界面活性剤などの化学物質	6
2.5. 生体内の ROS 消去機構	6
3. ROS が惹起する皮膚障害	8
3.1. ROS および酸化ストレスが表皮バリア機能に及ぼす影響	8
3.1.1. 角層形成への ROS の影響	8
3.1.2. 細胞間脂質の低下と ROS の関係性	8
3.1.3. TJ 機能の低下と ROS の関係性	9
3.2. 色素沈着と ROS の関係	10
3.3. ECM 変性と ROS の関係	11
3.3.1. コラーゲン線維の合成と分解	11
3.3.2. オキシタラン線維の分解	11
4. オリーブエキスおよび <i>Ocimum basilicum</i> エキスの抗酸化作用および皮膚に及ぼす作用	12
4.1. オリーブ果実に含まれているヒドロキシチロソール	12
4.2. <i>Ocimum basilicum</i> エキスに含まれているロズマリン酸	15
5. 本研究の目的	16
6. 本研究の概要	17
第 1 章 オリーブ果実圧搾残渣より抽出したエキスの表皮細胞における抗酸化作用	18
1.1. 緒言	18
1.2. 実験方法	19

1.2.1	試薬	19
1.2.2	細胞培養	19
1.2.3	オリーブ果実圧搾残渣エキスの調製	20
1.2.4	YE、ME の化学的 ROS 消去作用	20
1.2.5	過酸化水素添加による HaCaT 細胞内の ROS 消去能の測定	21
1.2.6	YE による Nrf2 の核内移行	21
1.2.7	Nrf2 シグナルの下流に存在する γ -GCS mRNA の発現量	21
1.2.8	YE による細胞内の総 GSH 量	22
1.2.9	Nrf2 ノックダウン細胞の調製	22
1.2.10	HaCaT 細胞における cortisol による ROS の増大に対する YE の効果	22
1.2.11	統計解析	23
1.3.	結果	23
1.3.1.	YE、ME の前処理を行った HaCaT 細胞の ROS 消去能	23
1.3.2.	YE、ME の化学的 ROS 消去作用	24
1.3.3.	YE の ROS 消去能亢進メカニズムの解析	24
1.3.4.	cortisol による HaCaT 細胞内の ROS, CP に対する YE の抑制効果	26
1.4.	考察	27
第 2 章 真皮線維芽細胞において複数回の UVA 照射によるコラーゲン線維量の低下に 対する <i>Ocimum basilicum</i> エキスの改善効果		30
2.1.	緒言	30
2.2.	実験方法	30
2.2.1.	試薬	30
2.2.2.	細胞培養	31
2.2.3.	光源	31
2.2.4.	コラーゲン線維量の減少した細胞の作製	31
2.2.5.	UVA 照射による NHDF 内 ROS に対する OC、ロズマリン酸の効果	32
2.2.6.	<i>Ocimum basilicum</i> エキス (OC) の調製	32
2.2.7.	OC 内のロズマリン酸の確認	33
2.2.8.	OC とロズマリン酸の化学的 ROS 消去能	33
2.2.9.	複数回 UVA 照射と試料処理	34
2.2.10.	UVA 単回および複数回照射による NHDF 内の CP の生成に対する OC とロズマ リン酸の効果	34
2.2.11.	type I collagen、MMP-1 mRNA 発現量	34
2.2.12.	MMP-1 タンパク発現量	35
2.2.13.	type I collagen タンパク発現量	35
2.2.14.	type I collagen 線維量低下に対する OC とロズマリン酸の作用	36

2.2.15. 統計解析	36
2.3. 結果	36
2.3.1. 複数回 UVA 照射による type I collagen 線維量	36
2.3.2. OC 内のロズマリン酸の含量率.....	37
2.3.3. 単回 UVA 照射による細胞内 ROS に対する OC とロズマリン酸の効果	38
2.3.4. UVA 単回および複数回照射による NHDF 内の ROS および CP の生成に対する OC とロズマリン酸の効果	38
2.3.5. OC とロズマリン酸の化学的 ROS 除去能	40
2.3.6. コラーゲン合成、分解、コラーゲン線維量に対する OC とロズマリン酸の作用	41
2.4. 考察	43
第 3 章 総括	46
参考文献	49
謝辞	62

略語一覽

略語	正式名称
•O ₂ ⁻	superoxide anion radical
•OH	hydroxyl radical
¹ O ₂	singlet oxygen
4-HNE	4-hydroxynonenal
AD	atopic dermatitis
AGEs	advanced glycation end-products
AhR	aryl hydrocarbon receptor
AKR	aldo-keto reductase
AP-1	activator protein 1
ARE	antioxidant response element
BSA	Bovine serum albumin
CCN-1/CYR61	cysteine-rich protein-61
CE	cornified cell envelope
COX	cyclooxygenase
COX2	cyclooxygenase-2
CP	carbonylated proteins
CYP1A1	cytochrome P450-1A1
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide
DSG-1	desmoglein-1
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
DTPA	diethylenetriamine-N,N,N',N''-pentaacetic Acid
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor-like
EGF-R	epidermal growth factor receptor
EMILIN-1	elastin microfibril interfacer 1
ERK	extracellular signal-regulated kinase1/2
ET-1	endothelin-1
FTSC	fluorescein-5-thiosemicarbazide
GAG	glycosaminoglycan
γ-GCS	γ-glutamyl cysteine synthetase

略語	正式名称
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GR _e	glucocorticoid receptor
GSH	glutathione
GST	glutathione S-transferase
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HO-1	heme oxygenase-1
HP	hematoporphyrin
HPLC	high performance liquid chromatography
HPX	hypoxanthine
IL-1 α	interleukin-1 α
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Keap-1	kelch-like ECH-associated protein 1
LCE	lipid cell envelope
LOO \bullet	lipid peroxy radicals
LOX	lysyl oxidase
LTBP-4	latent TGF- β binding protein
MAGPs	microfibril associated glycoproteins
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate
MFAP-4	microfibrillar-associated protein-4
MMP-1	matrix metalloproteinase-1
MS	melanosome
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NADPH	nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NEP	neutral Endopeptidase
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblast

略語	正式名称
NQO1	NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OC	<i>ocimum basilicum</i>
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbon
PGE2	prostaglandin E ₂
POMC	proopiomelanocortin
RA	rosmarinic acid
ROS	reactive oxygen species
RPTPs	receptor type protein tyrosine phosphatases
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
sicontrol	random sequence siRNA
SL	solar lentigos
SLS	sodium lauryl sulfate
SOD	superoxide dismutase
SOD 3	superoxide dismutase-3
SPRP	small proline-rich protein
SPT	serine palmitoyltransferase
SQSTM1	sequestosome-1
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
TEWL	transepidermal water loss
TJ	tight junction
TMPD	2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone hydrochloride
TNXR1	thioredoxin reductase
TRPA1	transient receptor potential subtype ankyrin 1
TYR	tyrosinase
UV	ultraviolet
UVA	ultraviolet A
UVB	ultraviolet B
xCT	cystine/glutamate anionic amino acid transporter
ZO	zonula occludens
α -MSH	α -melanocyte-stimulating hormone
β -NADPH	β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

序論

1. 皮膚の機能と構造

皮膚は、生体内部と外環境の境界に位置することにより、生体内内部を外部刺激や異物侵入から保護することにより、生体内の機能の恒常性を維持する重要な臓器である。故に、皮膚は外環境因子の影響を強く受け、その影響に対応しながら恒常性を維持する稀な臓器でもある。外環境因子の一つである太陽光が曝露された皮膚では急性反応が惹起され、慢性的に曝露された皮膚では機能変化に伴う構造の変化が生じる¹⁾。

一方、皮膚の外観は、相対する人々に多くの印象を与える。具体的には皮膚の色素斑、シワ、タルミのような色調の不均一性や形態変化は、その人の認知年齢に強い印象を与える。

本章では、本論文の主旨の理解を高めるため、このような生体防御およびヒトの認知印象に関わる皮膚がどのような構造であるかについて紹介する。

皮膚は、大きく表皮、真皮、皮下組織の三層により構成されている。まずは、表皮の機能およびその機能を具現化している構造を紹介する。

1.1. 表皮

表皮は、ケラチノサイト (keratinocyte) と呼ばれる細胞で構成され、一般的な組織に認められる細胞外マトリックスの存在は少ない。ケラチノサイトは分化に伴い、基底層、有棘層、顆粒層、角層の 4 層を形成する。基底層に存在するケラチノサイトのみ分裂能を有し、基底層で分裂したケラチノサイトは、分化過程を経て順次、皮膚表面に向かって上がってゆき有棘細胞、顆粒細胞、角層細胞となる。

細胞としての代謝を行っているのは顆粒細胞までであり、角層に入ると細胞は劇的な変化を遂げ死細胞となる。よって、このように計画された細胞死により、ケラチノサイトの分化過程はアポトーシスとも考えられている。

表皮の基本的な機能は、内成分の生体外への漏出、外来成分の生体内の侵入を防ぐバリアとしての機能である。

このバリア機能は、死細胞である角層細胞と角層細胞間に存在する脂質ラメラ層、顆粒層第二層に存在するタイトジャンクション (TJ; tight junction) により具現化されている。

皮膚最外層に存在する角層細胞は、脂質で構成される細胞膜がなくなり、細胞膜の代わりに角層細胞の内部から裏打ちタンパク構造が形成される。この裏打ちタンパク構造体をコーニファイドセルエンベロープ (CE; cornified cell envelope) と呼ぶ²⁾。CE は有棘細胞により合成されるインボルクリン、顆粒細胞にて合成されるロリクリン、フィラグリン、small proline-rich protein (SPRP) などがトランスグルタミナーゼ 1 (TGM-1; transglutaminase-1) により架橋されることで形成される²⁾。また、角層細胞の表面には ω -ヒドロキシセラミドの ω -ヒドロキシ基がインボルクリンのカルボキシル基とエステル結合した脂質辺縁層 (LCE; lipid cell envelope) が存在し角層細胞に疎水的な性質を付与している。このエステル結合形

成にも TGM-1 が関与している。さらに、CE は界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS; Sodium dodecyl sulfate) 水溶液中で煮沸処理しても溶解しないほどの強い構造を持つ³⁾。この強靱な構造を有する角層細胞が顆粒層以下の生細胞層を覆うことにより外部からの物理的、化学的な刺激に対して抵抗性を発揮することができる。

角層細胞間に存在する細胞間脂質ラメラ層は、セラミド、遊離脂肪酸、コレステロールおよびコレステロール硫酸で構成され脂質二重膜構造を形成した脂質膜が角層細胞間に層を作り存在している。このような構造は、角層細胞をレンガと見立て、細胞間脂質ラメラ層をセメントと見立てた、ブリックス-モルタル構造として説明されている。これら脂質は、合成された後に顆粒細胞内の層板顆粒内に前駆脂質として蓄えられ、層板顆粒が顆粒細胞の上部の細胞膜と融合することにより脂質は細胞外へ分泌される。細胞間脂質ラメラ層の形成には、前述の LCE が足場として働くことが報告されている。

TJ は顆粒層の第 2 層目の顆粒細胞の細胞膜垂直面に存在し、occludin や claudin、zonula occludens (ZO) タンパクなど複数の構造タンパクを隣り合う顆粒細胞が提供し接着因子としての構造を形成している。TJ は、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} のようなイオンおよび水のような低分子化合物の顆粒層以下への移動を制限している。 Ca^{2+} はケラチノサイトの分化誘導イオンであることから、表皮内での Ca^{2+} の濃度勾配を調節することにより表皮の分化を制御している⁴⁾。

1.2. 真皮

真皮は表層から、乳頭層、網状層に分かれており、膠原線維 (コラーゲン線維)、弾性線維、プロテオグリカンにより構成される細胞外マトリクス (ECM; extracellular matrix) 内に真皮線維芽細胞 (NHDF; Normal Human Dermal Fibroblast) が存在する組織である。NHDF は ECM 構成成分の母細胞として働き、これら構成成分の生合成を行う⁵⁾。

コラーゲン線維は真皮層の 70% を占め真皮の骨格線維としての役割をはたしている。真皮に存在するコラーゲンの中では type I コラーゲンが最も多く⁶⁾、type III コラーゲンと type V コラーゲンは真皮乳頭層に多く含まれ、比較的細い線維を形成する。コラーゲン線維の形成は、NHDF 内で合成されたコラーゲンペプチドのリジン残基とプロリン残基がプロリンヒドロキシラーゼ、プロリル-4-ヒドロキシラーゼによって水酸基が導入される⁷⁾ ことによりトリプルヘリックス構造をとり、プロコラーゲントリプルヘリックスとなり細胞外へ分泌される⁸⁾ ことから始まる。次いで、プロコラーゲンペプチダーゼによりプロコラーゲントリプルヘリックスの N 末端と、C 末端部分が切断され、トロポコラーゲントリプルヘリックスとなる⁹⁾。トロポコラーゲントリプルヘリックスは自己凝集し、コラーゲンマイクロフィブリルを形成する⁹⁾。コラーゲンマイクロフィブリルが、銅依存性酵素であるリジルオキシダーゼ (LOX; lysyl oxidase) によりリジン由来の架橋を形成する¹⁰⁾ ことによりコラーゲン線維が形成される。

弾性線維は、トロポエラスチンが自己凝集する過程を経て不溶化したエラスチン¹¹⁾がマイクロフィブリル上に沈着、架橋することにより線維が形成される。

弾性線維はオキシタラン線維、エラウニン線維、エラスチン線維に分けられ、弾性線維の主成分はマイクロフィブリルとエラスチンである¹²⁾。弾性線維の種類における違いはマイクロフィブリル上に沈着するエラスチンの量的な違いである。乳頭層を皮膚表面に対して水平に走るエラスチン線維から皮膚表面に向かってエラウニン線維、オキシタラン線維と伸びオキシタラン線維の末端は基底膜に結合していると考えられている。

マイクロフィブリルを構成しているタンパク質は主にシステインを多く含むグリコプロテインであるフィブリリン 1 (fibrillin-1) とフィブリリン 2 (fibrillin-2) であり、microfibrillar-associated protein-4 (MFAP-4) によって線維状に組織化される¹³⁾。その他のマイクロフィブリルタンパクである microfibril associated glycoproteins-1 (MAGPs)、も同様に、fibrillin-1 と fibrillin-2 と共局在する¹⁴⁾。さらに、fibrillin-1 と結合するタンパク質として、elastin microfibril interfacier 1 (EMILIN-1) がある¹⁵⁾。また、fibrillin はカルシウム結合コンセンサスである、上皮細胞成長因子様 (EGF; epidermal growth factor-like) モチーフを含んでいるため、マイクロフィブリルの線維化と整合性にはカルシウムが重要な役割を担っている¹⁶⁾。

トロポエラスチンの自己凝集は lysyl oxidase (LOX)、フィブリン-4 (fibulin-4) により触媒される^{14,17,18)}。自己凝集したトロポエラスチンは、カルシウム依存性でありエラスチン線維の表面に位置するフィブリン-5 (fibulin-5) と結合し¹⁹⁾、fibulin-5 は fibrillin-1 の C と N-末端と弱い親和性と latent TGF- β binding protein (LTBP-4) に存在するシステインドメインと結合する。fibulin-5 によって、エラスチンはマイクロフィブリル上へ球状に凝集することなく、直鎖状に沈着し²⁰⁾線維が形成される。

プロテオグリカンはコラーゲン線維とエラスチン線維の間を埋める成分であり、酸性ムコ多糖であるヒアルロン酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカン (GAG; glycosaminoglycan) とコアタンパクが結合した構造をとる。

真皮の機能としては、皮膚の力学的な強度と弾力性の保持である。皮膚の力学的な強度はコラーゲン線維により保持され^{5,21)}、弾力性は弾性線維により保持されている¹⁾。

2. 皮膚における ROS (reactive oxygen species) の生成と消去

細胞内および組織内において過剰に生成される活性酸素種 (ROS) により酸化ストレスは発生する。特に、皮膚は外環境との境界に位置することから内的要因のみならず外的刺激によっても ROS の生成は亢進される。そこで、ROS の種類と皮膚内での ROS 生成経路について述べる。

2.1. ROS とは

ROS は酸素分子 (O₂) の反応性が亢進された分子種であるが、本来、O₂ は空軌道を有しビラジカル構造を持つことから反応性に富んだ分子である。ROS は大きくラジカル性の分

子種と非ラジカル性の分子種に分けられる。ラジカル性の分子種には、 O_2 が一電子還元されたスーパーオキシドアニオンラジカル ($\bullet O_2^-$; superoxide anion radical)、さらに二電子還元されたヒドロキシラジカル ($\bullet OH$; hydroxyl radical)、これらの活性種が脂質分子のアリル位からラジカル引き抜く反応により生成されるラジカルと O_2 の反応により生成される脂質過酸化ラジカル ($LOO\bullet$; lipid peroxy radicals) などがある。一方、非ラジカル性の分子種には $\bullet O_2^-$ が一電子還元された過酸化水素 (H_2O_2) と一重項酸素 (1O_2 ; singlet oxygen) がある。 1O_2 は、 3O_2 の電子スピンの同一方向を向いているのに対して励起され電子スピンの逆スピンとなり、親電子性が高まることによりさらに酸化反応性が高くなった分子種である。

2.2. 生体内における ROS 生成

$\bullet O_2^-$ は nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシダーゼやキサンチンオキシダーゼの酵素反応とミトコンドリアによる呼吸鎖反応の副生成物、あるいは type I 光増感反応生成物として生成される²²⁻²⁴)。NADPH オキシダーゼは、NADPH から電子を受け取り、 O_2 を 1 電子還元することにより $\bullet O_2^-$ を生成する²³)。また、キサンチンオキシダーゼはキサンチンを尿酸に変換する酵素であり、変換過程において $\bullet O_2^-$ が生成される²⁴)。

ミトコンドリアの呼吸鎖反応では、呼吸鎖複合体 I、III において $\bullet O_2^-$ が副生成物として生成される²⁵)。呼吸鎖複合体 I では NADH、複合体 II ではコハク酸をそれぞれ酸化することで、ユビキノンを還元してユビキノールにする。複合体 III でユビキノールを酸化することでシトクロム c が還元され、複合体 IV でシトクロム c が酸化され、酸素分子に電子を伝達することにより水に還元される。この電子伝達の過程において、複合体 I や複合体 III において、 O_2 が一電子還元され、 $\bullet O_2^-$ が生成される。皮膚において type I 光増感反応を起こす増感剤としては、リボフラビンやトリプトファンのような低分子化合物があり、糖化反応最終生成物 (AGEs; advanced glycation end-products) やカルボニル化タンパク質 (CP; carbonylated proteins) も type I 光増感反応を起こす。

H_2O_2 は $\bullet O_2^-$ がスーパーオキシドジスムターゼ (SOD; superoxide dismutase) との不均化反応することにより生成され²²)、また、 $\bullet O_2^-$ の自発的な反応においても生成される。 H_2O_2 は Fe^{2+} 、 Cu^+ の存在下でフェントン反応し、 $\bullet OH$ を生成する^{26,27})。 $\bullet OH$ は紫外線 (UV; ultraviolet) による H_2O_2 の均等開裂反応においても生成する。 $\bullet OH$ はアラキドン酸代謝におけるシクロオキシゲナーゼ (COX; cyclooxygenase) および、リポキシゲナーゼが関与する経路においても生成される²⁸)。

白血球などでは、ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase) が H_2O_2 と細胞内塩素イオン (Cl^-) により次亜塩素酸 (HOCl) を生成し、HOCl が H_2O_2 と反応することにより 1O_2 は生成される。一方、皮膚では UVA (ultraviolet A) による type II 光増感反応により 1O_2 は生成される。光増感物質として、皮膚表面ではニキビ菌である *Propionibacterium acnes* が産生するコプロポルフィリン²⁹) があり、細胞内ではリボフラビンやフラビントンパクなどがあ

る。

2.3. ROS のフットプリント 脂質過酸化反応最終生成物 CP

CP は酸化タンパク質の一つであり、タンパク質が本来有していないアルデヒド基がアミノ酸側鎖に導入されたタンパク質の総称である。タンパク質のカルボニル化は、メチオニンやシステインの酸化と比較し、容易に誘導されず、リジン残基の酸化によるアリシン (allysine; 2-aminoadipic semialdehyde) や、アルギニン残基の酸化による γ -グルタミルセミアルデヒドなどのアミノ酸残基の直接的な酸化により生成される経路^{30,31)} と、ROS とスクваленや不飽和脂肪酸などとの反応により生成される過酸化脂質由来の活性アルデヒド化合物とアミノ酸の遊離アミノ基との反応により生成される経路がある³²⁾。脂質過酸化反応では、ROS がアリル位の電子引き抜き反応を引き起こすことにより開始され、脂質過酸化ラジカルを経由して開裂後にアルデヒド化合物が生成される。生成されるアルデヒド化合物にはアクロレインやクロトンアルデヒド、4-ヒドロキシノネナール (4-HNE; 4-hydroxynonenal) などがある。タンパク質のリジン残基、アルギニン残基のアミノ基とアルデヒド化合物が Schiff 塩基を形成し、CP が生成される。確認されている CP の特徴的なフラグメントにはピロール付加体、マイケル付加体、フォルミルデヒドロピペリジノ付加体がある³³⁻³⁵⁾。

2.4. ROS 生成刺激因子

2.4.1. UV

皮膚における ROS の生成刺激因子として UV がある。UV の刺激により、紅斑、色素沈着、皮膚の光老化が生じる。UVB (ultraviolet B) および UVA はケラチノサイト内の Ca^{2+} を増加させ NADPH オキシダーゼを活性化することにより $\cdot\text{O}_2^-$ の生成を増加させる^{36,37)}。UVA は、 $\cdot\text{O}_2^-$ に加えて、 $^1\text{O}_2$ を生成する。皮膚に存在するフラビンやポルフィリンなどの UVA 領域の光を吸収するクロモフォアの光増感反応を介して $^1\text{O}_2$ は生成される²⁹⁾。

また、CP は長波長 UVA からブルー領域の可視光線を吸収し type I 光増感反応を介して酸素分子へ電子移動を起こし $\cdot\text{O}_2^-$ を生成することが報告されている³⁸⁾、また、AGEs への UVA 照射も、CP と同様に type I 光増感反応を介して $\cdot\text{O}_2^-$ が生成されることが報告されている³⁹⁾。このように、皮膚に存在する酸化タンパクが UVA からブルー領域の可視光線のクロモファーとして作用し ROS の生成源となる。

2.4.2. 大気汚染物質

大気汚染物質に含まれる多環芳香族炭化水素 (PAHs; polycyclic aromatic hydrocarbon) はケラチノサイト内において、aryl hydrocarbon receptor (AhR) のリガンドとなり、PAHs の代

謝を行うため cytochrome P450-1A1 (CYP1A1) の発現を誘導する。CYP1A1 は PAHs の代謝過程において ROS を生成する^{40,41}。また、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin による心筋細胞における CYP1A1 の発現誘導はミトコンドリア活性の低下と細胞内における ROS の生成亢進を誘導することが報告されている⁴²。このように大気汚染物質に含まれる PAHs やダイオキシンも細胞内 ROS の生成亢進を引き起こす。

2.4.3. 界面活性剤などの化学物質

洗浄剤に配合されるアニオン性の界面活性剤 (SLS; sodium lauryl sulfate) も細胞内 ROS の生成亢進を誘導する。ヒトケラチノサイトにより構築されたヒト再構成表皮モデルへの角層表面からの SLS 処理は、処理 15 分後にモデル内の ROS の生成亢進を誘導する。この ROS 生成は、SLS による細胞膜の流動性が増加を介した細胞内 Ca^{2+} の濃度の増加が要因となり細胞内 ROS とミトコンドリア内の ROS が生成を促進することが報告されている⁴³。このように細胞膜の構造変化を惹起するような両親媒性化合物も細胞内 ROS の生成亢進を誘導する可能性が考えられる。

2.5. 生体内の ROS 消去機構

生体内、細胞内における ROS は、抗酸化物質である アスコルビン酸、トコフェロール、カロチノイド⁴⁴ や、生体内で合成される還元型グルタチオン (GSH; glutathione)、抗酸化酵素群により消去され、生体内のレドックスバランスが維持されている。

生体の抗酸化酵素として、SOD、カタラーゼ (catalase)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx; glutathione peroxidase)、ビリルビンの生成に関わる酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1; heme oxygenase-1) がある。SOD は、 $\cdot\text{O}_2^-$ を O_2 と H_2O_2 に不均化する酵素であり、主なものとして細胞質に存在する Cu/Zn-SOD とミトコンドリア内膜に存在する Mn-SOD の 2 種がある。カタラーゼはペルオキシゾームに存在すると考えられており、 H_2O_2 を O_2 と H_2O に変換する反応を触媒する酵素である。また、細胞質やミトコンドリアに存在する GPx は、GSH を基質として H_2O_2 を O_2 と H_2O に分解する⁴⁵。HO-1 により生成されるビリルビンは、抗酸化作用を有する⁴⁶ ことが報告されている。

これらの抗酸化酵素群の多くは Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)/Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1) シグナルにより調節されている^{47,48}。Nrf2 は Keap1 と複合体を形成し細胞質に存在している⁴⁹。しかし、細胞内のレドックスバランスが酸化型へ傾くことにより Keap-1 の酸化センサーであるシステイン残基が酸化される。この結果、Keap-1 の高次構造の変化に伴い Nrf2 がリリースされ、細胞質から核内へ移行し、遺伝子の上流に存在する ARE (antioxidant response element) に結合する。この結果、その下流にコードされている遺伝子群の発現が高まる。ARE 下流にコードされている抗酸化系酵素群は第二相薬物代謝酵素群とも呼ばれ、HO-1、NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1 (NQO1)、 γ -glutamyl

cysteine synthetase (γ -GCS)、glutathione S-transferase (GST)、glutathione reductase (GR)、thioredoxin reductase (TNXRD1)、ferritin、sequestosome-1 (SQSTM1)、aldo-keto reductase (AKR)、cystine/glutamate anionic amino acid transporter (xCT) などがある。これら、抗酸化酵素が消去できる ROS を Table 1 にまとめた。

Table 1 抗酸化酵素

antioxidative enzyme	Corresponding ROS
SOD	$\bullet\text{O}_2^-$
catalase	H_2O_2
GPx	H_2O_2
HO-1	$^1\text{O}_2, \bullet\text{O}_2^-, \bullet\text{OH}, \text{LOO}\bullet, \text{NO}$
NQO1	$\bullet\text{O}_2^-$
γ -GCS	H_2O_2
GST	LOOH
GR	H_2O_2
TNXRD1	H_2O_2
ferritin	$\bullet\text{OH}$

3. ROS が惹起する皮膚障害

皮膚を構成する細胞の恒常性の低下により、様々な皮膚障害が生じる。恒常性の低下による皮膚障害の要因は、内因性と外因性の刺激に大別され、内因性の刺激として、遺伝子疾患、加齢や精神的なストレス、外因性の刺激として、太陽光線、大気汚染、化学物質が挙げられる。これらの刺激の多くは、皮膚組織内において ROS 生成の増加に伴う酸化ストレスを誘導する。その結果、皮膚の恒常性維持が妨げられる。本項では、ROS および ROS の増加に伴い生じる酸化ストレスが皮膚の恒常性維持に与える影響について、表皮のバリア機能、色素斑の形成、ECM 構造の変化に注目して紹介する。

3.1. ROS および酸化ストレスが表皮バリア機能に及ぼす影響

皮膚のバリア機能は TEWL (transepidermal water loss) 値により評価される。コラーゲン誘発関節炎のモデルである DBA/1JmcSlc マウスの皮膚は高い TEWL 値を示し、バリア機能が低下している。このモデルマウスでは、血中の ROS が高いこと、NAC (N-acetyl-L-cysteine) の投与により、TEWL 値の改善が確認されたことから、バリア機能の低下に ROS が関与している可能性が強く示唆される⁵⁰⁾。また、ヒト疫学調査においても ROS の最終生成物である角層の CP と TEWL 値が正の相関を示すことが報告されている^{51,52)}。

このような事実から、皮膚バリア機能は ROS および酸化ストレスにより大きな影響を受けることが考えられる。

皮膚のバリア機能は、前述のように角層細胞、角層細胞間脂質のラメラ構造体、TJ によって発揮されることから皮膚のバリア機能に関わる各因子における ROS および酸化ストレスの影響について以下にまとめた。

3.1.1. 角層形成への ROS の影響

ストレスホルモンであるコルチゾールとケラチノサイトで生成される ROS との関係は未だ明らかとなっていないが、他臓器由来の細胞において、コルチゾールと同様のグルココルチコイドであるデキサメタゾンが ROS を増大させること⁵³⁾、コルチゾールはグルココルチコイド受容体 (GR; glucocorticoid receptor) を介して ROS を増大させる⁵⁴⁾ ことが報告されている。

連続的な可視光とラジオノイズ環境下で飼育することにより精神的ストレスを亢進させたヘアレスマウスは、ケラチノサイトの分化マーカーであるインボルクリン、ロリクリンの減少、脂肪酸、セラミドといった脂質の合成能低下を伴う TEWL の増加、表皮基底細胞数の減少と、コルネオデスモソームを構成するタンパク質であるデスモグレイン-1 (DSG-1; desmoglein-1) の発現量の低下によるコルネオデスモソームの密度の低下が観察されている^{55,56)}。この TEWL の高値には、角層細胞間の脆弱な接着性が寄与している可能性が示唆され、ROS が角層形成に影響を及ぼす可能性が考えられる。

3.1.2. 細胞間脂質の低下と ROS の関係性

細胞間脂質の主成分であるセラミドは、角層のバリア機能に重要な役割を担っている。バ

リア機能の低下が認められる疾患であるアトピー性皮膚炎 (AD; atopic dermatitis) の患者では、角層のセラミド 1、セラミド 3 量の低下が認められ、TEWL の有意な亢進も確認されている^{57,58)}。また、AD 患者の疾患部位の角層では ROS の最終生成物である CP の有意な増加も確認されていることから⁵⁹⁾、細胞間脂質合成に対する ROS の影響が示唆される。

セラミドは、セリンとパルミトイル CoA を出発物質として、スフィンゴシン合成酵素である SPT (serine palmitoyltransferase) の触媒により 3-ケトスフィンガニンが合成され、その後、ceramide synthase により脂肪酸が結合されセラミドが合成される⁶⁰⁾。このスフィンゴシン合成段階が、セラミド合成の律速段階となり *de novo* 合成される。表皮ケラチノサイトに H₂O₂ を曝露すると SPT 遺伝子の発現量の低下が認められる⁶¹⁾ ことから、H₂O₂ が細胞間脂質の合成を低下させる原因であることが示唆される。

3.1.3. TJ 機能の低下と ROS の関係性

UVB は皮膚およびケラチノサイト内の ROS 生成を増加させることが知られており、ROS の生成刺激因子の一つである。一般的に UVB の単回照射は TEWL の増加と皮膚表面の水分量を低下させることが知られている⁶²⁾。生体皮膚における TJ の機能は、マーカー Sulfo-NHS-LC-Biotin の皮膚内分布により確認することができる。TJ の機能が正常の場合、皮下注射した、あるいは真皮側から投与された Sulfo-NHS-LC-Biotin は occludin および ZO-1 が存在する顆粒層でその拡散は留められる。再生表皮モデルでは TJ の構造破壊を誘導するカプリン酸処理により Sulfo-NHS-LC-Biotin の角層への拡散が確認されている⁶³⁾。再生表皮モデルへの UVB 照射は、真皮側から投与された Sulfo-NHS-LC-Biotin の角層への拡散を誘導し、UVB による TJ 構造の破壊を示唆している。

一方、UVB 照射はケラチノサイトの TJ 構成タンパク質である occludin の発現量の低下を引き起こし、この低下は TEWL の回復に伴い回復することが確認されている^{64,65)}。

さらに、ラットのケラチノサイト (REK) を用いた研究では、UVB を照射された REK は TJ を構成するタンパク質である、claudin-1、claudin-4、occludin が細胞膜周辺ではなく細胞質に存在することが観察されている^{65,66)}。また、ケラチノサイトより構築した TJ が構築されている細胞シートへの UVB 照射は、TJ により生じる細胞シート表面と培養液間の電気抵抗値の低下、高分子デキストランの細胞シートの通過を引き起こす⁶⁶⁾。以上の事実から、ROS の生成刺激因子である UVB 照射は TJ 構造を破壊することが示唆される。

ROS である H₂O₂ による TJ 構造破壊についても報告されている。H₂O₂ を REK に暴露した場合も同様に、TJ 構成タンパク質が細胞質に局在すること、電気抵抗値の低下、デキストランの透過性の亢進が認められている⁶⁶⁾。UVB 照射による TJ 構造破壊は、UVB 照射前に GSH を投与することにより改善されることから UVB 照射による TJ 構造破壊に ROS の関与が示唆される⁶⁶⁾。

3.2. 色素沈着と ROS の関係

UVB 曝露は、急性的な皮膚反応として曝露から数時間後に炎症 (sunburn) を生じ、12 ~ 24 時間後をピークとして消退後、数日後に色素沈着 (suntan) が生じる。よって、UVB は ROS 生成刺激因子であり、且つ、色素沈着発生因子でもある。UVB 誘発色素沈着のメカニズムは、これまでの多くの研究により明らかにされている。

UVB に曝露されたケラチノサイトは IL-1 α (interleukin-1 α) などの炎症サイトカインやメラノサイト活性化因子を分泌する^{67,68}。IL-1 α は、ケラチノサイトへオートクリン的に作用し、endothelin-1 (ET-1) を合成し分泌する。ET-1 は、endothelin B receptor を介してメラノサイトの増殖、およびメラノソーム (MS; melanosome) 内でのメラニン合成を活性化させる^{69,70}。この、UVB による IL-1 α の分泌亢進は抗酸化物質であるビタミン C 前駆体を処理することにより抑制される⁷¹ ことから、細胞内 ROS の増加が IL-1 α の分泌亢進の要因であることが考えられる。また、ET-1 は UVB 照射によりメラノサイトにおいても合成され、その合成は SOD 3 (superoxide dismutase-3) の処理によって抑制され、結果としてメラニン合成も抑制される⁷⁰。

また、UVB 照射によりケラチノサイトから合成・分泌される prostaglandin E₂ (PGE₂) は、メラノサイトの樹状突起の伸長を亢進する。また、PGE₂ はメラノサイトの増殖も促進させ、色素沈着を促進させる⁷²。UVB 照射によりケラチノサイト内にて生成が増加した ROS はアラキドン酸の酸化酵素である cyclooxygenase-2 (COX2) の遺伝子発現を伴うタンパク合成を促進し、PGE₂ の合成・分泌を増加させる⁷³。

さらに、 α -Melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) は UVB 照射を行ったケラチノサイトから合成・分泌され、メラノサイトのメラノコルチン 1 受容体に結合することにより cyclic AMP シグナルを介してメラノサイトの増殖、チロシナーゼ (TYR; tyrosinase) や TYR 関連酵素の合成促進を引き起こす。また、ケラチノサイトへのオートクライン的な作用により MS の貪食を亢進する。その結果、 α -MSH は色素沈着を誘導する。 α -MSH はプロオピオメラノコルチン (POMC; proopiomelanocortin) が、段階的にプロセッシングされることにより生成される。UVB 照射によりケラチノサイト内において産生が促進される POMC による α -SMH の分泌は、抗酸化成分である NAC の前処理によって抑制される⁷⁴。

また、近年、太陽光線の慢性的な曝露により発生する老人性色素斑 (SL; solar lentigos) 部位では老化の形質を有する線維芽細胞が多く存在することが報告されている。線維芽細胞は stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) を分泌することにより、メラノサイトのメラニン合成に抑制的に作用しているが、老化の形質を有する線維芽細胞では SDF-1 の合成・分泌が低下することによりメラノサイトのメラニン合成に対する抑制力が低下することが SL の発生の要因であると報告されている⁷⁵。線維芽細胞の老化形質獲得には高酸化状態が寄与し、実験的には H₂O₂ の複数回曝露により老化形質が線維芽細胞に発現する⁷⁶。

以上の報告から、UVB により生じる色素沈着には多くのケースに ROS が関与し、SL のような色素斑の発生に対しても ROS が関与していることが示唆される。

3.3. ECM 変性と ROS の関係

加齢、あるいは光老化皮膚の形態的な皮膚の変化としてシワやタルミが挙げられる。光老化皮膚の発生には真皮乳頭層におけるコラーゲン線維の減少と弾性線維の細線維であるオキシタラン線維の消失が大きく寄与していると考えられている⁷⁷⁾。

そこで、太陽光および ROS がこれら線維の変化与える影響について、コラーゲン線維とオキシタラン線維について紹介する。

3.3.1. コラーゲン線維の合成と分解

真皮乳頭層における type I collagen 線維の減少のメカニズムは ROS がトリガーとなることが、これまでの研究により以下のように明らかにされている。

ROS は epidermal growth factor receptor (EGF-R) シグナルを活性化させる。具体的には、定常状態においても EGF-R は、リン酸化されるが、receptor type protein tyrosine phosphatases (RPTPs) により脱リン酸化され EGF-R シグナルの下流シグナルは不活化されている。ROS は、RPTPs のシステイン残基を酸化することにより、phosphatase 活性は不活化され、EGF-R シグナルの下流シグナルは活性化される。EGF-R シグナルの下流には mitogen-activated protein kinases (MAPKs) の一つである c-Jun N-terminal kinase (JNK) が存在し、JNK の活性化により c-Jun のリン酸化は促進する。一方、ROS は nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を活性化させ、IL-1 α 、interleukin-6 (IL-6) を介したシグナルにより extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK) を活性化し c-Fos をリン酸化する。c-Jun と c-Fos は複合体である activator protein 1 (AP-1) を形成し、その応答エレメントに結合することにより下流遺伝子の転写活性を高める⁷⁸⁾。

AP-1 のシグナルの下流には cysteine-rich protein-61 (CCN-1/CYR61) と matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) が存在している。皮膚への UV 照射は CCN-1/CYR61 発現量を増加させることが確認されている⁷⁹⁾。CCN-1/CYR61 はコラーゲンペプチド合成抑制因子であり、CCN-1/CYR61 の発現量の増加とともに type I collagen の発現量の減少が真皮線維芽細胞に UV を照射した場合に観察されている⁷⁹⁾。

一方、コラーゲン線維の分解は MMP-1 により開始される。AP-1 転写の下流には MMP-1 遺伝子もコードされており ROS により MMP-1 の発現が亢進する。具体的には、UVA 照射により生成される $^1\text{O}_2$ が、線維芽細胞内の IL-1 α の分泌を増加させ、オートクライン的に作用し IL-6 分泌を介して MMP-1 が増加することが報告されている⁸⁰⁾。

以上のことから、UV 照射により生じた ROS が AP-1 の核内移行を促進し、CCN-1 および MMP-1 の発現の増加を介して真皮乳頭層におけるコラーゲン線維の減少を引き起こしていることが、現状では皮膚の光老化の一因と認識されている。

3.3.2. オキシタラン線維の分解

光老化皮膚では基底膜から垂直に伸びる弾性線維の一つであるオキシタラン線維の消失が観察されている。オキシタラン線維の分解は neutral endopeptidase (NEP) である neprilysin と好中球エラスターゼにより行われる⁸¹⁾。NEP は膜結合型エラスチン分解作用

を有するプロテアーゼであり、UVB 照射によりケラチノサイトから分泌される IL-1 α 、granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) により線維芽細胞の NEP の産生が増加する⁸²⁾。また、線維芽細胞への UVA 照射も NEP の産生を亢進させる。ROS は、NF- κ B シグナルを活性化し IL-1 α および interleukin-8 (IL-8) の合成・分泌を増加させる。このことから、UVB 照射により細胞内に生成した ROS が IL-1 α を介して線維芽細胞の NEP の発現を亢進させ、さらに UVA 照射により生成した ROS が IL-8 を介して線維芽細胞の NEP の発現を亢進させる可能性が考えられる⁸²⁾。

4. オリーブエキスおよび *Ocimum basilicum* エキスの抗酸化作用および皮膚に及ぼす作用

本研究では、オリーブ果実圧搾残渣から調製されたオリーブ果実圧搾残渣エキスおよびロズマリン酸を含有している *Ocimum basilicum* エキス (OC) の細胞内 ROS 消去作用および光老化皮膚の予防改善効果について明らかにした。そこで、これらエキスの ROS 消去作用および皮膚に及ぼす作用に関する先行研究について紹介する。

4.1. オリーブ果実に含まれているヒドロキシチロソール

オリーブ果実にはポリフェノールであるヒドロキシチロソールが含まれており、廃棄されるオリーブ果実圧搾残渣から調製したエキスにも同様に含有されていることが報告されている⁸³⁾。

ヒドロキシチロソールの抗酸化に関する研究は多くあり、その一部を紹介する。

ヒドロキシチロソールは、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞において *t*-ブチルヒドロペルオキシドによる細胞内 ROS の増加を抑制すること、また、ヒト腸管細胞株である Human Caco-2 細胞においてヒドロキシチロソールが細胞内の ROS の増加を抑制することが報告されている^{84,85)}。さらに、ヒドロキシチロソールは、リポタンパク質を処理したマクロファージ J774 A.1 細胞の細胞内 GSH 量の減少を抑制すること⁸⁶⁾、メチル水銀を処理したヒト腹部神経芽細胞腫である IMR-32 細胞の GR、GST の mRNA の発現低下を抑制すること⁸⁷⁾、ラット副腎髄質褐色細胞腫である PC12 細胞の HO-1、NQO1 の mRNA 発現を高め、細胞内 GSH 量を増加させること⁸⁸⁾ が報告されている。また、ヒドロキシチロソールは UVB 照射ヒト皮膚不死化角化細胞株である HaCaT 細胞内に過剰に生成される ROS を低減させること⁸⁹⁾、UVB による細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている⁹⁰⁾。さらに、ヒドロキシチロソールは UVA 照射による HaCaT 細胞内の ROS の増加を抑制することが報告されている⁹¹⁾。このようにオリーブ果実に含まれているヒドロキシチロソールは、細胞内酸化ストレスを低減することが明らかとなっている。

ヒドロキシチロソールの抗酸化作用メカニズムについて以下のような報告が多数ある。ヒドロキシチロソールはマクロファージにおいて Nrf2 の核内移行を誘導すること⁹²⁾、HepG2 細胞においても Nrf2 の核内移行が促進され抗酸化酵素である GPx の活性が増加する⁹³⁾ ことが明らかとなっている。さらに、網膜色素上皮細胞である ARPE-19 細胞にお

いて、ヒドロキシチロソールは α 、 β 不飽和アルデヒドであるアクロレインによる Nrf2 の核内移行の低下を改善し、Nrf2 シグナルの下流にコードされている HO-1、NQO1 の低下を抑制することが報告されている⁹⁴⁾。

以上の先行研究を Table 2-1, 2-2 にまとめた。

Table 2-1 先行研究におけるヒドロキシチロソールの酸化作用

細胞	濃度	プロトコール	効果	ref
HepG2 cell	10 - 40 μM	ヒドロキシチロソールを 20 時間添加し、 <i>t</i> -ブチルヒド ロペルオキシド を 3 時間添加	GSH 量の低下を抑制した	84)
		ヒドロキシチロソールを 20 時間添加し、 <i>t</i> -ブチルヒド ロペルオキシド を 90 分添加	細胞内の ROS の増加を 抑制した	
Human Caco-2 細胞	5 - 40 μM	ヒドロキシチロソール (5-40 μM) を 4 時間添加	細胞内の ROS が低下した	85)
マクロファ ージ J774 A.1	3 μM	リポタンパク質とヒドロキシチロ ソールを 同時に添加 (24 時間)	リポタンパク質による細胞 内の H ₂ O ₂ と・O ₂ ⁻ の増加を抑制 した リポタンパク質添加に よる細胞内 GSH 量の 減少を抑制した	86)
IMR-32 神経芽細胞 腫	5 μM	ヒドロキシチロソールを 処理した後 メチル水銀を処理	GSH、SOD、GST の減少 を抑制した	87)
PC12 細 胞	10-50 μM	ヒドロキシチロソールを 24 時間添加	GSH 量が増加した GPx、GR、GST mRNA 増 加した	88)
HaCaT 細 胞	50 - 100 μM	UVB を 45 mJ/cm ² 照射し、 ヒドロキシチロソールを添加	細胞内の ROS の増加が 抑制された	89)
HaCaT 細 胞	20 μM	ヒドロキシチロソール 6 時間添加	アポトーシスを生じた細 胞数が減少した	90)
HaCaT 細 胞	200-1000 μM	ヒドロキシチロソール 50 μM を 6 時間添加	UVA 照射による 細胞内 ROS の増加が抑制 された	91)
マクロフ ァージ Raw264.7	10 μM	リポポリサッカライド (1 μg/ml) と ヒドロキシチロソールを同時に 18 時間添加	Nrf2 が核内移行した	92)

Table 2-2 先行研究におけるヒドロキシチロソールの抗酸化作用

細胞	濃度	プロトコール	効果	ref
HepG2	0.5 - 10 μM	ヒドロキシチロソール 6 時間、20 時間添加	核内の Nrf2 が増加 (6 時間) GPx の活性が増加 (20 時間)	93)
ARPE-19 細胞	100 μM	ヒドロキシチロソール 100 μM を 48 時間添加し アクロレインを 75 μM 24 時間添加	アクロレインにより低下 した Cu/Zn SOD, Mn SOD mRNA を ヒドロキシチロソールは 抑制した	94)
			アクロレインにより Nrf2 の核内移行が 低下したがヒドロキシチロ ソールにより Nrf2 の核内移 行の低下が抑制された	
			アクロレインによる γ-GCL, NQO1, HO-1 の 低下がヒドロキシチロソ ールにより抑制された	

4.2. *Ocimum basilicum* エキスに含まれているローズマリン酸

Ocimum basilicum エキス (OC) に含まれているローズマリン酸の抗酸化作用に関する先行研究を Table 3 にまとめた。先行研究において、ローズマリン酸はヒドロキシラジカルとスーパーオキシドアニオンラジカル消去能を示し、抗酸化物質として作用することが報告されている⁹⁵⁾。また、ローズマリン酸は UVB 照射 HaCaT 細胞内の ROS の増加を抑制すること⁹⁵⁾、や H₂O₂ 処理による細胞内 ROS の増加を抑制すること⁹⁶⁾、H₂O₂ 処理正常ヒト真皮線維芽細胞の細胞内 ROS の増加を抑制することが報告されている⁹⁷⁾。このことから、ローズマリン酸は細胞内の ROS を消去する作用を有することも明らかとなっている。さらに、ローズマリン酸は UVA 照射 HaCaT 細胞の細胞内 GSH 量の低下を抑制したことから⁹⁸⁾、細胞内抗酸化機構を刺激・亢進させる作用を有することが示唆されている。

また、Table 4 に示したようにマウスやラットを用いた *in vivo* 研究では、OC は腎臓の CP の増加を抑制する作用⁹⁹⁾ や精巣において抗アポトーシス作用¹⁰⁰⁾ を有することが報告されている。さらに、ヒト使用研究において OC を含有したクリーム塗布により、TEWL が低下すること、シワ幅が軽減されることが報告されている¹⁰¹⁾

Table 3 先行研究におけるロズマリン酸の抗酸化作用

細胞	濃度	プロトコール	効果	ref
HaCaT 細胞	2.5 μM	ロズマリン酸を 1 時間 前処理し、 UVB を 30 mJ/cm ² 照射	UVB 照射による細胞内の ROS の増加を 抑制した	95)
		ESR を用い、ロズマリン 酸のヒドロキシラジカルと スーパーオキシドアニオン ラジカル消去能を検討	ヒドロキシラジカル 消去能と スーパーオキシドアニオ ンラジカル消去能を有する	
HaCaT 細胞	13.8 - 138 μM	過酸化水素 100 μM とロ ズマリン酸を 混合し 24 時間添加	細胞内の ROS の増加を 抑制した	96)
NHDF	30 μM	過酸化水素 600 μM を添 加する 12 時間前にロズマリン酸 を添加	過酸化水素による細胞内 ROS の 増加を抑制した	97)
			HO-1 mRNA の発現量を 増加させた	
HaCaT 細胞	50 μM	UVA 20 J/cm ² を照射し た直後にロズマリン酸を添 加	UVA 照射による GSH 量の 低下を抑制した	98)

Table 4 先行研究における OC の作用

動物	投与量	プロトコール	効果	ref
CD 1 マウス	500 mg/kg/体重	免疫抑制剤投与した マウスに 2 週間 OC を摂取させた	腎臓の CP の増加が抑 制された	99)
アルビノ ラット	20 mg/kg /体重	カドミウムの摂取後、 OC を 5 日/週、 8 週間摂取させた	カドミウム誘発の精巢の アポトーシスが抑制された	100)

5. 本研究の目的

これまでの研究から皮膚組織において生成が亢進される ROS は、多くの皮膚トラブルの原因となることが明らかにされている。皮膚組織内で ROS の亢進は、主には太陽光線に含まれる紫外線曝露により生じる。また、外環境因子のみならず近年の高ストレス社会では、精神的なストレスも生体内の ROS の生成を誘導することが明らかにされている。

皮膚内部での ROS 生成亢進に伴う酸化ストレスは、角層細胞形成不全を伴う表皮バリア機能を低下させ、さらには皮膚老化の特徴である色素斑形成やシワ、タルミの発生をも誘導、加速することが明らかにされている。そこで、本研究は ROS により惹起される皮膚トラブルの原因を取り除くことにより人々の皮膚の健康維持に貢献することを目的として実施した。

6. 本研究の概要

第一章では、近年の健康志向により摂取が増加したオリーブ油の圧搾残渣の ROS 除去作用を確認し、その除去メカニズムを明らかにした。現状、オリーブ油は未熟な緑果より圧搾された油と成熟した黒果より圧搾された油がある。よって、その圧搾残渣には未熟果実由来のもの、成熟果実由来のものがある。本章では、まず、未熟果実圧搾残渣から抽出されたエキスと成熟果実圧搾残渣から抽出されたエキスの細胞内 ROS 除去能の違いを検討し、未熟果実圧搾残渣から抽出されたエキスにより高い ROS 除去効果を認めた。この未熟果実圧搾残渣から抽出されたエキスの ROS 除去メカニズムは、化学的な ROS 除去能のみではなく細胞内の ROS に対する防御システムを活性化し、細胞内抗酸化成分である GSH 合成を促進することがその本質であることを見出した。また、結果は産業廃棄物として処分されるオリーブ油圧搾残渣の有効な再利用法の提案につながった。

さらに未熟果実圧搾残渣から抽出されたエキスは精神的ストレスにより分泌されるコルチゾールによる細胞内 ROS の生成亢進を抑制することを見出した。よって、未熟果実圧搾残渣から抽出されたエキスは ROS により惹起、増強される皮膚トラブルを改善する可能性が示唆された。

第二章では、光老化皮膚の特徴である真皮乳頭層におけるコラーゲン線維の減少に注目した。私達の皮膚における光老化は、繰り返し太陽光線を浴びることにより発生する。また、太陽光線 UV の中で UVA は真皮まで侵入し、直接、線維芽細胞に影響を及ぼす。そこで、そのコラーゲン線維の減少を培養細胞系で再現するため、真皮線維芽細胞へ UVA の複数回照射を実施した。UVA 複数回照射は、真皮線維芽細胞のコラーゲン線維形成を低下させることが明らかとなった。そこで、UVA 複数回照射による線維芽細胞のコラーゲン線維形成の低下に対する改善策を探索し、ロズマリン酸を含む *Ocimum basilicum* エキスにコラーゲン線維形成の低下の改善効果を見出した。この事実は、ロズマリン酸を含む *Ocimum basilicum* エキスが光老化皮膚の特徴であるシワあるいはタルミの予防・改善に有効に働く可能性を示している。

本論文は、ROS により惹起、増強される皮膚トラブルに対する対策として、オリーブ油圧搾残渣抽出物とロズマリン酸を含む *Ocimum basilicum* エキスの効果を明らかにした。これらの素材を用いたスキンケアが人々の健やかな皮膚の維持につながるものとする。

第 1 章 オリーブ果実圧搾残渣より抽出したエキスの表皮細胞における抗酸化作用

1.1. 緒言

太陽光線のような外環境因子の刺激により皮膚の細胞内で生成される ROS は主に NADPH オキシダーゼの活性化により生成される $\cdot\text{O}_2^-$ である。 $\cdot\text{O}_2^-$ は、細胞内に存在する SOD による不均化反応や自発的な変換反応により ROS の中では比較的安定性が高い H_2O_2 へ還元され、 H_2O_2 による細胞内のタンパク質や脂質の酸化により代謝機能の低下が生じる。 H_2O_2 は Fe^{2+} や Cu^+ の存在下において、フェントン反応により反応性の高い $\cdot\text{OH}$ となる。 $\cdot\text{OH}$ は、脂質から電子引き抜きアルキルラジカルを生成し、そのアルキルラジカルが酸素分子と反応し脂質過酸化ラジカルを経てアルデヒド化合物を生成する。アルデヒド化合物は細胞内タンパク質のリジン残基、アルギニン残基と反応し CP を生成する。CP が細胞内機能を低下させることが報告されている^{102,103)} ことから、CP を生成するトリガーである細胞内の ROS を効率よく消去することは細胞の機能低下を抑制する上で有効な手段である。

ROS およびその最終生成物である CP により誘導される変化として、紫外線紅斑反応を惹起する PGE_2 の合成亢進¹⁰⁴⁾、その合成亢進によるメラノサイトの活性化¹⁰⁵⁾、痒みの亢進¹⁰⁶⁾、皮膚保湿機能の低下^{51,61)} といった皮膚トラブルが報告されている。

また、近年は、精神的ストレスと皮膚生理との関連性が研究されるようになり、高い心理的ストレスが TEWL の増加やバリア機能の低下、皮膚のかゆみといった皮膚トラブルを引き起こすことが報告されている^{55,56,107,108)}。精神的ストレスにより分泌が亢進されるコルチゾールは、ストレスホルモンとして知られているが、このような皮膚トラブルとコルチゾールの因果関係についての研究はさほど多くはない。序論にも紹介したように多くの皮膚トラブルは ROS により惹起されることから、コルチゾールにより細胞内 ROS 生成が亢進する可能性が考えられる。しかしながら、コルチゾールが細胞内の ROS 生成を亢進するか否かは HaCaT 細胞では明らかにされていない。そこで、本章では HaCaT 細胞内の ROS へのコルチゾールの影響を明らかにし、精神的なストレスによる皮膚トラブルにも ROS の消去が重要な手段となるかを検証した。

一方、ROS の低減効果を期待する成分として植物由来の *phytochemicals* の作用が盛んに研究されている。植物に含まれるポリフェノールは抗酸化作用があることから¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾、皮膚においても酸化ストレスの抑制素材としての効果が期待される。そこで、本章ではヒドロキシチロソールやオレウロペインといったポリフェノールを含有するオリーブ果実に着目した^{112,113)}。オリーブ果実はオイルを圧搾した後、圧搾残渣として廃棄されるが、その残渣から抽出したエキスにもヒドロキシチロソールが含有されていることが報告されている。

そこで、産業廃棄物の有効利用による社会貢献と皮膚の健康維持を目的としてオリーブ果実の圧搾残渣より抽出したエキスの HaCaT 細胞における抗酸化作用を評価した。オリーブ果実の成熟度は 8 段階に分類される¹¹⁴⁾。成熟度の低い果実(若い果実)と成熟度の高い果実から圧搾されたオリーブ果実が市場にある。また、オリーブ果実は成熟に伴い抗酸化効果が期待されるフェノール性化合物が徐々に減少することが報告されている^{115,116)}。そこで、本章ではオリーブ果実の成熟度の違いによる抗酸化作用を含めた検討を行った。

1.2. 実験方法

1.2.1. 試薬

試薬は以下の物を使用した。ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM)、Ca²⁺ および Mg²⁺ 含有ハックス緩衝液 (HBSS(+)) は日水製薬株式会社 (東京, 日本) より購入した。トリプシン (ブタ膵臓由来)、30% H₂O₂、L-ascorbic acid、DL- α tocopherol、Xanthine oxidase (XOD)、10% Formaldehyde neutral buffer solution、Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) はナカライテスク (京都, 日本) より購入した。Iron (II) perchlorate (Fe(ClO₄)₂)、4- Amino antipyrine、Hypoxanthine (HPX) は FUJIFILM 和光純薬 (大阪, 日本) より購入した。5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)、*tert*-Butyl Hydroperoxide (*t*-BuOOH)、Phenol、Diethylenetriamine-N,N,N',N'-pentaacetic Acid (DTPA)、Hydrocortisone は東京化成工業 (東京, 日本) より購入した。5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)、2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES) は同仁化学研究所 (熊本, 日本) より購入した。Peroxidase、RevaTra Ace qPCR Master Mix は東洋紡 (大阪, 日本) より購入した。Triton-X-100、Bovine serum albumin (BSA) は Sigma-Aldrich (Missouri, USA) より購入した。2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) は Merck (Darmstadt, Germany) より購入した。BCA protein assay kit、Dylight 488 conjugated Streptavidin、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent は Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA) より購入した。Rabbit anti-Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) polyclonal antibody、Biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody、Hoechst 33342、Fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC) は Invitrogen Corporation (California, USA) より購入した。 β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADPH)、Glutathione Reductase (GR) はオリエンタル酵母工業 (東京, 日本) より購入した。Nrf2-small interfering RNA、random sequence siRNA は Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA) より購入した。RNeasy Mini kit は Qiagen (Venlo, Netherlands) より購入した。

1.2.2. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT 細胞) (Boukamp, P., 1988) は 5% の FBS を含む DMEM を用いて、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。0.25% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含有する PBS(-) を用いて細胞を剥離し、細胞培養用 96 ウェルマイクロプレート (Iwaki, 静岡, 日本) に 3.5 × 10⁴ cells/well あるいは 1.0 × 10⁴ cells/well の密度で細胞を播種し実験を

行った。

1.2.3. オリーブ果実圧搾残渣エキスの調製

未成熟果実と成熟果実のオリーブ果実圧搾残渣は、株式会社蒼のダイヤ (香川, 日本) から提供された。オリーブ果実圧搾残渣は、EG-45 grinder (Kalita, 横浜, 日本) を用いて粉碎後、22.5 g を 450 mL の 50% エタノールに室温下、1 週間浸漬した。浸漬後、抽出液と搾りかすを濾別した。抽出液は、ロータリーエバポレーター (NAJ-160 rotary evaporator, 東京理科器械, 東京, 日本) を用いて 50% エタノールを留去、濃縮した後、乾固させた。真空ポンプを用いて、完全に溶媒を除去した後、得られた固形物を 50% エタノールに 100 mg/mL の濃度で溶解し冷凍保存した。未成熟果実、成熟果実から得られたこれらの抽出物をそれぞれ未成熟果実の搾りかすエキス (YE)、成熟果実の搾りかすエキス (ME) とし以下の実験に供した。

1.2.4. YE、ME の化学的 ROS 消去作用

YE、ME の化学的 ROS 消去作用を測定した。ROS 消去作用は各種 ROS を 50% 消去する濃度、IC₅₀ を用いて表した。対象とした ROS は H₂O₂、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、LOO \cdot である。H₂O₂ 消去能は、H₂O₂ とエキスをインキュベートした後の残存 H₂O₂ 量を求めることにより測定した。5 mM H₂O₂ と YE あるいは ME あるいは陽性コントロール試料として用いた L-アスコルビン酸を各濃度 37°C で 30 分間反応させた。反応液を、0.8 mM 4-Amino antipyrine、4 mM Phenol と 725 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Peroxidase 共存下で反応させ、4-amino antipyrine と Phenol の酸化縮合体であるキノンイミンの生成を 550 nm の吸光度を用いて測定した。サンプル無添加試料の 550 nm の吸光度に対する、各試料、各濃度の吸光度の比率から IC₅₀ を算出した。

$\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、LOO \cdot の消去能は ESR スピントラップ法を用いて測定した。ESR スペクトロメーターは、RFR-30 spectrometer (Radical Research, 東京, 日本) を用いた。各ラジカルの強さは外部の基準として使用した Mn²⁺ のシグナル強度に対する比、シグナル/Mn²⁺ の比で算出した。各ラジカルの消去能は、IC₅₀ にて算出した。

$\cdot\text{O}_2^-$ 消去能は、1.14 mM DTPA と試料共存下、0.19 U/mL XOD、0.45 mM HPX にて生成させた $\cdot\text{O}_2^-$ を 90 mM DMPO を用いてスピントラップし、ラジカル強度、および Mn²⁺ のシグナル強度を測定した。陽性コントロール試料として L-アスコルビン酸を用いた。

$\cdot\text{OH}$ 消去能は、試料共存下、0.16 mM H₂O₂、0.04 mM Fe (ClO₄)₂ にて生成した $\cdot\text{OH}$ を 90 mM DMPO を用いてスピントラップし、ラジカル強度、および Mn²⁺ のシグナル強度を測定した。陽性コントロール試料として L-アスコルビン酸を用いた。

LOO 消去能は、1.18 mM DTPA と試料共存下、1.9 mM *t*-BuOOH、0.12 mM Fe (ClO₄)₂ にて生成させた BuOO \cdot を 90 mM DMPO を用いてスピントラップし、ラジカル強度、および Mn²⁺ のシグナル強度を測定した。陽性コントロール試料として DL- α トコフェロールを用いた。

ESR シグナルは以下の条件で測定した

Output power: 4.0 mW

Scanning field: 336.5 ± 7.5 mT

Modulation frequency: 0.25 mT

Response time: 0.03 s

1.2.5. 過酸化水素添加による HaCaT 細胞内の ROS 消去能の測定

細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートに 3.5×10^4 cells/well の細胞密度で HaCaT 細胞を播種し 24 時間培養した。その後、HaCaT 細胞を YE あるいは ME を含有した 5% FBS 含有 DMEM を用いて 24 時間培養した。細胞を PBS(-) を用い 2 回洗浄した後、HBSS(+) に溶解した 20 μ M の H₂DCFDA を細胞と 30 分間インキュベートし H₂DCFDA を細胞内へ取り込ませた。洗浄後、HBSS(+) にて調製した 500 μ M の H₂O₂ と細胞を 15 分間インキュベートした。PBS(-) で細胞を 2 回洗浄し、細胞内に残存した H₂O₂ 量を細胞内の蛍光強度 (F.I.) (励起波長; 485 nm、蛍光波長; 530 nm) として測定した。さらに、0.5% Triton-X-100 含有 PBS(-) を用いて細胞を溶解し、溶解液のタンパク量を BCA assay kit を用いて測定した。細胞内に残存する H₂O₂ 量の値を F.I./ μ g protein 値として算出した。YE および ME の外来 H₂O₂ の消去能を、無処理 HaCaT 細胞の F.I./ μ g protein を 1.0 として、それぞれの F.I./ μ g protein を規格化した値を用いて表した。

1.2.6. YE による Nrf2 の核内移行

細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートに 1.0×10^4 cells/well の細胞密度で HaCaT 細胞を播種し 24 時間培養した。500 μ g/mL の YE を含有した 5% FBS 含有 DMEM を用いて HaCaT 細胞を 5 時間培養した後、4% パラホルムアルデヒドを室温下、10 分間処理し、細胞の固定を行った。その後、1% BSA にて室温下、1 時間ブロッキングを行い、Rabbit anti-Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) polyclonal antibody (2 μ g/mL) を 4°C にて一晩反応させた。0.05% PBST にて洗浄後、細胞を Biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (0.5 ng/mL) と室温下にて、2 時間反応させた。0.05% PBST にて洗浄後、DyLight 488 conjugated streptavidin (1 ng/mL) を室温下にて、1 時間暗室で反応させた。さらに、4 μ M Hoechst 33342 を用いて核を染色し、BZ-X810 fluorescence microscope (Keyence, 大阪, 日本) にて蛍光画像の撮影を行い Nrf2 の核内移行の観察を実施した。

1.2.7. Nrf2 シグナルの下流に存在する γ -GCS mRNA の発現量

細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートに 3.5×10^4 cells/well の細胞密度で HaCaT 細胞を播種し 24 時間培養した。500 μ g/mL の YE を含有した 5% FBS 含有 DMEM を用いて HaCaT 細胞を 6 時間培養した。総 RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて cDNA の合成を行い SYBR Green Gene

Expression Assay を使用し γ -GCS mRNA 発現量を Eco Real-Time PCR System を用いて測定した。 γ -GCS、house keeping として使用した GAPDH のプライマーの情報は以下の通りである。

γ -GCS forward, 5'-TTGCAGGAAGGCATTGATCA-3', γ -GCS reverse, 5'-GCATCATCCAGGTGTATTTTCTCTT-3', GAPDH forward, 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', GAPDH reverse, 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'。

結果は $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて GAPDH で補正した。

1.2.8. YE による細胞内の総 GSH 量

細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートに 3.5×10^4 cells/well の細胞密度で HaCaT 細胞を播種し 24 時間培養した。500 μ g/mL YE を含有した 5% FBS 含有 DMEM を用いて HaCaT 細胞を 24 時間培養した。細胞内の GSH 量はグルタチオンリダクターゼリサイクリング法を用いて定量を行った。100 μ L の 0.5% Triton-X 含有 PBS(-) を添加し細胞を溶解した。25 μ L の細胞溶解液と 125 μ L の 0.1 M リン酸緩衝液 (PB 緩衝液) (pH 7.6)、25 μ L の 2 mM NADPH 含有 5% NaHCO₃ を混合し、さらに 25 μ L の GR 含有 PB 緩衝液を添加し 37 $^{\circ}$ C にて 10 分間インキュベートした。その後、この混合液に 25 μ L の 10 mM DTNB 含有 PB 緩衝液を加え、37 $^{\circ}$ C にて 30 分間インキュベートした。混合液を 450 nm の吸光度にて測定した。総 GSH は、既知濃度の酸化型グルタチオンを用いて作製した検量線より求めた。

さらに、細胞溶解液のタンパク質量を BCA assay kit を用いて定量した。細胞内総 GSH 量は、単位タンパク質あたりの総 GSH 量 (GSH (pmol)/ μ g protein) として表した。

1.2.9. Nrf2 ノックダウン細胞の調製

HaCaT 細胞を 1.0×10^4 cells/well の密度で細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートに播種し 24 時間培養した後、Nrf2-small interfering RNA (siNrf2) またはコントロールとして random sequence siRNA (sicontrol) を 100 nM に Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent を用いて調製し 48 時間添加した。

1.2.10. HaCaT 細胞における cortisol による ROS に対する YE の効果

細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートに 3.5×10^4 cells/well の細胞密度で HaCaT 細胞を播種し 24 時間培養した。500 μ g/mL の YE を含有した 5% FBS 含有 DMEM を用いて HaCaT 細胞を 24 時間培養した。細胞を PBS(-) を用い 2 回洗浄した後、HBSS(+) に溶解した 20 μ M の H₂DCFDA を細胞と 30 分間インキュベートし H₂DCFDA を細胞内へ取り込ませた。さらに、100 μ M cortisol を含有した 5% FBS 含有 DMEM を用いて HaCaT 細胞を 24 時間培養した。PBS (-) で細胞を 2 回洗浄し、細胞内 ROS 量を細胞内の蛍光強度 (F.I.) (励起波長; 485 nm、蛍光波長; 530 nm) として測定した。さらに、0.5% Triton-X-100 含

有 PBS(-) を用いて細胞を溶解し、溶解液のタンパク量を BCA assay kit を用いて測定した。細胞内に残存する ROS の値を F.I./ μg protein 値として算出した。無処理 HaCaT 細胞の F.I./ μg protein を 1.0 として、それぞれの F.I./ μg protein を規格化した値を用いて表した。

1.2.11. 統計解析

測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、Student の *t* 検定によって有意差検定を行った。*p* 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

1.3. 結果

1.3.1. YE、ME の前処理を行った HaCaT 細胞の ROS 消去能

YE と ME の前処理を行った HaCaT 細胞の ROS 消去能を検討することを目的として、HaCaT 細胞へ YE と ME を 24 時間添加した後、 H_2O_2 を 15 分間曝露し、細胞内の H_2O_2 量を測定した。YE、ME 添加により濃度依存的な細胞内の H_2O_2 の減少が認められた (Fig. 1-1)。さらに、その作用を ME と比較したところ、YE により強い細胞内の H_2O_2 量の減少作用が確認された。

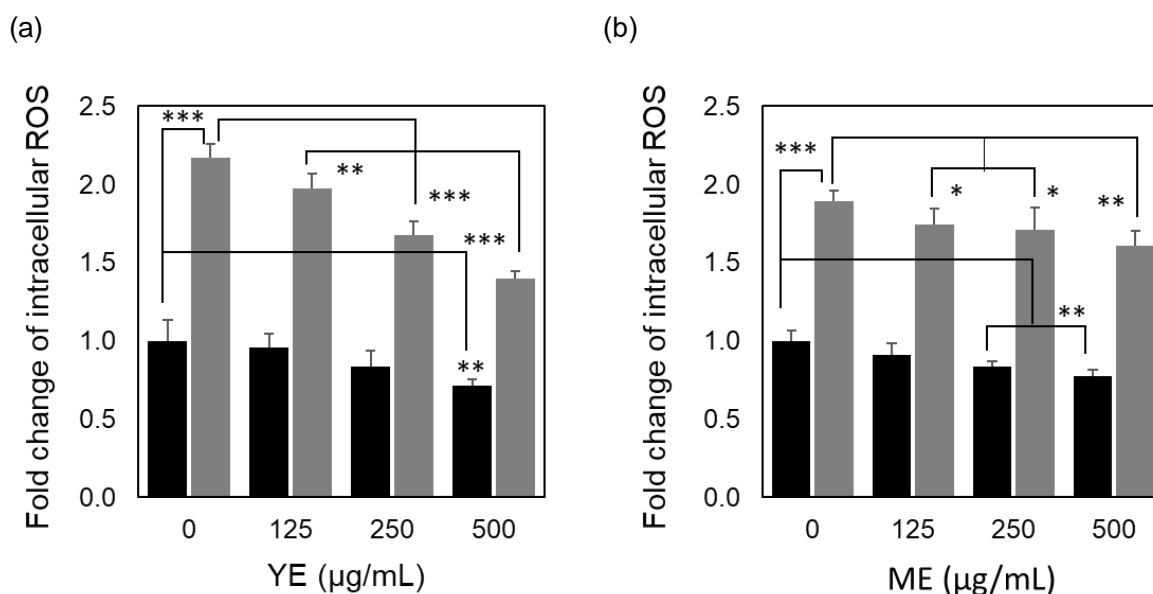


Fig. 1-1 Biological scavenging of the YE and the ME against extracellular exposure to H_2O_2 .

HaCaT keratinocytes were cultured in the presence or absence of YE (a) or the ME (b) for 24 hours. After loading with $20 \mu\text{M}$ H_2DCDFA for 30 min, keratinocytes were exposed to $500 \mu\text{M}$ H_2O_2 for 15 min. The fluorescence intensity (F.I.) (Ex; 485 nm, Em; 530 nm) derived from H_2DCDFA oxidized by the remaining H_2O_2 was then measured. Intracellular ROS levels are expressed as means \pm standard deviations of fold changes against F.I./ μg protein of keratinocytes cultured without the sample and H_2O_2 ($n = 5$). Significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1.3.2. YE、ME の化学的 ROS 消去作用

YE、ME の化学的 ROS 消去作用として、 H_2O_2 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{LOO}\cdot$ の消去能を選択し測定した。結果を Table 1-1 にまとめた。 $\text{LOO}\cdot$ を除く、 H_2O_2 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ について、陽性コントロール試料の IC_{50} 値と比較し YE、ME とともに IC_{50} 値が高値を示した。さらに、YE と比較し ME は H_2O_2 への IC_{50} 値が有意に高値を示した。 H_2O_2 消去能は ME と比較し YE の方が高いことが明らかとなった (Table 1-1)。

以上の結果から、YE、ME とともに化学的な ROS 消去能は一般的な抗酸化剤である *L*-アスコルビン酸、あるいは *DL*- α トコフェロールと比較して高くはないことが確認された (Table 1-1)。

Table 1-1 Scavenging capabilities of YE and ME against ROS in the chemical aspect.

		IC_{50}															
		$\cdot\text{O}_2^-$				H_2O_2				$\cdot\text{OH}$				$\text{LOO}\cdot$			
		Mean	± S.D.	p^1	p^2	Mean	± S.D.	p^1	p^2	Mean	± S.D.	p^1	p^2	Mean	± S.D.	p^1	p^2
YE ($\mu\text{g/mL}$)		182.1	± 31.1	***		3878.0	± 157.5	***		411.9	± 24.9	***		14.3	± 0.9		N.S.
ME ($\mu\text{g/mL}$)		196.0	± 35.9	***	N.S.	8609.2	± 432.1	***	***	471.5	± 29.6	***	N.S.	14.9	± 1.2	N.S.	N.S.
<i>L</i> -ascorbic acid	($\mu\text{g/mL}$)	27.6	± 1.6			400.0	± 7.0			9.6	± 0.2						
	(μM)	156.8	± 9.1			2272.7	± 39.8			54.5	± 1.1						
<i>DL</i> - α tocopherol	($\mu\text{g/mL}$)													13.2	± 2.2		
	(μM)													30.2	± 5.1		

Positive control: *L*-ascorbic acid was used for $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 and $\cdot\text{OH}$, *DL*- α -tocopherol was used for $\text{LOO}\cdot$. Significance p^1 ; between positive control and YE or ME, p^2 ; between YE and ME, *** $p < 0.001$, N.S. not significance. IC_{50} are expressed as means \pm standard deviations ($\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, $\text{LOO}\cdot$; $n = 3$, H_2O_2 ; $n = 4$).

1.3.3. YE の ROS 消去能亢進メカニズムの解析

1.3.1 および 1.3.2 の結果を総合的に考察した場合、1.3.1 で得られた生物学的な ROS 消去能は化学的な ROS 消去能に依存しているよりも抗酸化機構の亢進に依存していることが考察された。

一般的には、細胞内に存在する ROS に対する防御作用は Nrf2/Keap1 シグナルに由来することが知られている。そこで、YE の ROS 消去能の亢進の作用機序に、Nrf2/Keap1 経路が関与している可能性を検討することを目的として、YE による Nrf2 の核内移行について検討した。YE 共存下で 5 時間培養した HaCaT 細胞は、YE 未処理 control 細胞と比較して Nrf2 が核内移行している細胞が多く認められた (Fig.1-2 (a))。このことから、YE により Nrf2 の経路が活性化されていることが考えられた。そこで、Nrf2 経路の下流である γ -GCS mRNA の発現およびその最終生成物である GSH を測定した。その結果、YE 未処理 control 細胞の γ -GCS mRNA 発現量と比較し YE 共存下で培養した HaCaT 細胞に有意に高い γ -GCS mRNA 量が確認された (Fig. 1-2 (b))。さらに、YE 未処理 control 細胞の細胞

内 GSH に比較して YE 共存下で培養した HaCaT 細胞は高い細胞内 GSH 量を示した (Fig. 1-2 (d))。

また、siNrf2 を用い Nrf2 のノックダウンを行った (Fig. 1-2 (c))。Nrf2 のノックダウンを行った HaCaT 細胞では YE による総 GSH 量の増加の消失が確認された (Fig. 1-2 (d))。

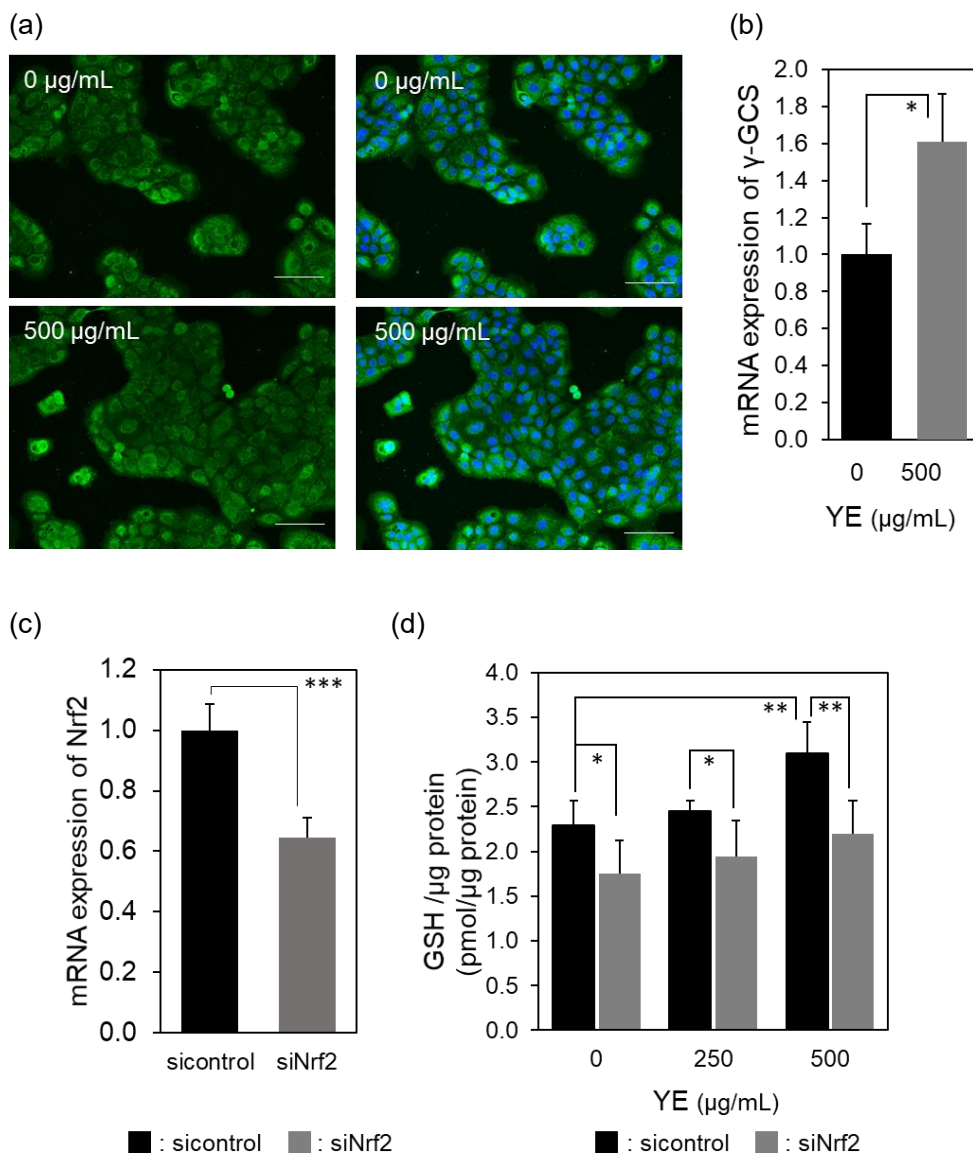


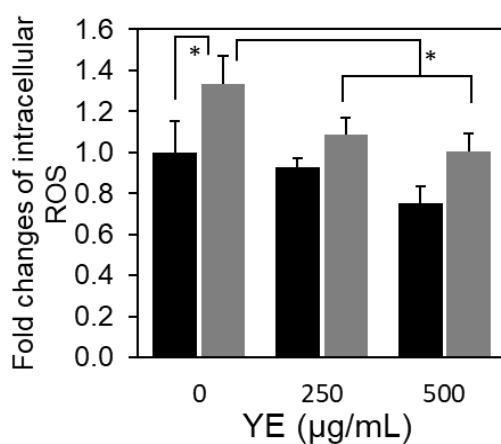
Fig. 1-2 Activation of Nrf2 signaling by the YE.

(a) Representative images of Nrf2 translocation into nuclei. HaCaT keratinocytes were cultured with or without the YE for 5 hours. Scale bars: 100 μm. (b) mRNA expression levels of γ -GCS in HaCaT keratinocytes cultured with or without the YE for 6 hours quantified by real time-PCR. mRNA expression levels are expressed as means \pm standard deviations (n = 3). Significance; * p < 0.05. (c) The Nrf2 mRNA knockdown efficiency. HaCaT keratinocytes were cultured with 100 nM a random sequence siRNA (sicontrol) using Lipofectamine or 100 nM siNrf2. The expression of Nrf2 mRNA in sicontrol or siNrf2 quantified by real time-PCR. mRNA expression levels are expressed as means \pm standard deviations (n = 3). (d) GSH levels of HaCaT keratinocytes treated with or without the knock-down by Nrf2 siRNA. HaCaT keratinocytes were cultured with the siNrf2 or sicontrol. GSH levels are expressed as means \pm standard deviations (n = 6) of pmol GSH normalized to protein levels. Significance; * p < 0.05, ** p < 0.01.

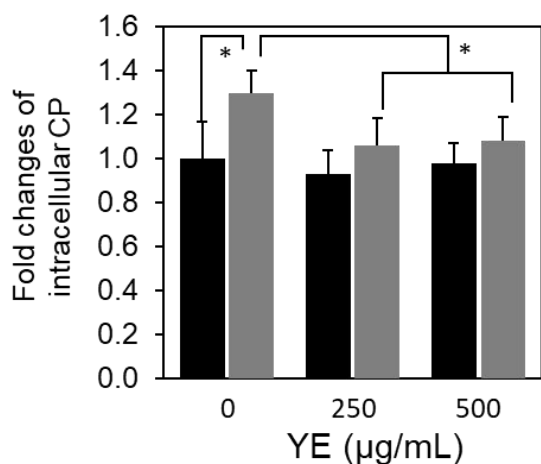
1.3.4. cortisol による HaCaT 細胞内の ROS, CP に対する YE の抑制効果

精神的ストレスにより増加するコルチゾール共存下で 24 時間培養した HaCaT 細胞は有意な細胞内 ROS 量の増加を認めた (Fig. 1-3 (a))。また、24 時間 YE を前処理した HaCaT 細胞は、コルチゾールによる細胞内 ROS の増加を有意に抑制した (Fig. 1-3 (a))。さらに、細胞内 ROS の最終生成物である CP の生成も有意に抑制した (Fig. 1-3 (b), (c))。

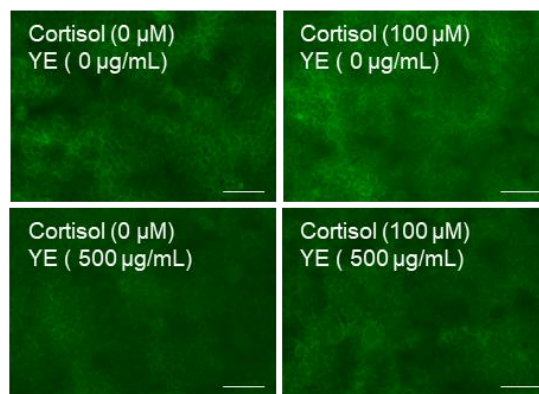
(a)



(b)



(c)



■ : Cortisol (0 µM) ■ : Cortisol (100 µM)

Fig. 1-3 Reduction capability of the YE against intracellular ROS and CP elevated by cortisol.

(a) Intracellular ROS levels are expressed as means \pm standard deviations of fold changes against F.I./ μ g protein of cells cultured without the YE and cortisol (n = 5). (b) Intracellular CP were quantified by the analysis of images fluorescence labeling with FTSC. Expressed as means \pm standard deviations of fold changes against the green fluorescence derived from CP in keratinocytes cultured without the YE and cortisol (n = 5). (c) Representative images of cells. Scale bars: 100 μ m. Significance; * p < 0.05.

1.4. 考察

本章ではオリーブ未成熟果実と成熟果実のオリーブ果実圧搾残渣抽出物の中で未成熟果実抽出物 (YE) が、成熟果実抽出物 (ME) と比較して細胞内酸化状態亢進に対し高い抑制効果を有することを明らかにした。YE および ME の化学的な ROS 除去能を評価したところ、ROS 除去能は一般的な抗酸化剤に比較して弱く、細胞内酸化状態亢進に対する抑制効果は YE および ME の化学的な ROS 除去能に由来することに加え細胞内抗酸化メカニズムの亢進に由来するものであることが示唆された。

一般的に、細胞内抗酸化防御システムは Nrf2 (nuclear factor E2-related factor-2)/Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) シグナルの活性化により亢進される⁴⁸⁾。通常、Nrf2 は Keap1 と複合体を形成し細胞質に存在する。Keap1 のシステイン残基は酸化センサーであり、細胞内酸化状態が高まることにより SH 基が SS 結合へ酸化され¹¹⁷⁾ Keap1 と Nrf2 が解離する。乖離した Nrf2 は核内移行し、その応答エレメントに結合することにより、応答エレメントの下流にコードされている抗酸化系遺伝子群である γ -GCS、HO-1、NQO1 の転写活性が高まる⁴⁸⁾。このような機序で、抗酸化系酵素および抗酸化系物質の合成が促進されることにより細胞内高酸化状態は改善される (Fig. 1-4)。

細胞内酸化状態亢進に対する YE の高い抑制効果は、Nrf2/Keap1 シグナルの活性化に基づく可能性を考え、Nrf2 の細胞内の局在を確認したところ、YE の添加により Nrf2 が核内移行した細胞が高い頻度で確認された。

GSH は細胞内抗酸化剤の一つであり、その作用は GPx の基質として H₂O₂ の消去に作用するのみならず、システイン残基由来の SH 基がプロトドナーとして ROS に対する還元作用を発揮することにより ROS を消去する¹¹⁸⁾。GSH は γ -GCS とグルタチオン合成酵素 (glutathione synthase) による 2 段階反応で合成されるが¹¹⁸⁾、 γ -GCS が合成の律速酵素^{45,119)} であり、且つ、Nrf2/Keap1 シグナルの下流にコードされている¹¹⁹⁾。

YE の添加は、 γ -GCS mRNA 発現の亢進と細胞内総 GSH の増加を示し、さらに Nrf2 のノックダウンを行った HaCaT 細胞ではその効果は消失した。

以上の結果をまとめると、細胞内で抗酸化物質として作用する機構に加え、GSH 合成を行う γ -GCS の遺伝子発現を促進させる Nrf2/Keap1 シグナルを介して細胞内抗酸化防御システムを亢進させる作用により、YE は細胞内の ROS を消去することが示唆された。

現時点では YE が Nrf2 を活性化させる本質についての知見はない。先行研究では、ヒドロキシチロソールが Nrf2 の経路を活性化、また Nrf2 経路の下流にある抗酸化酵素の発現量を増加させることが報告されている¹²⁰⁻¹²²⁾。また、80% エタノールにて抽出したオリーブ果実圧搾残渣エキスにも同様にヒドロキシチロソール、ルテオリン、ルチンといったポリフェノールが含有されている⁸³⁾ ことが報告されている。Keap-1 のレドックスセンサーである SH 基が酸化されることにより Nrf2 が Keap-1 と解離し、核内移行後、ARE へ結合し下流の抗酸化系酵素および抗酸化系物質の遺伝子発現が亢進する。ヒドロキシチロソールはカテコール構造を有していることから、むしろ還元的に働き Nrf2 の活性化を引き起こすこと

は考えにくい。しかしながら、ヒドロキシチロソールは実際に Nrf2 の活性化を起こすことから、その作用機序は以下のように説明されている。ヒドロキシチロソールのカテコール構造は酸化され *o*-キノンになることにより求電子性を示し Nrf2 と Keap-1 を解離させる。YE にも同様のポリフェノールが含まれ、これらポリフェノールが Nrf2 の経路を活性化した可能性が考えられる。また、YE の添加により Nrf2 の核内移行が増加した機序として、プロテアソーム系による Nrf2 の分解が YE の添加により抑制されたことが考えられるが、さらなる検討が必要である。

さらに本章では精神的ストレスにより分泌が亢進されるコルチゾールが HaCaT 細胞の細胞内 ROS の生成を亢進することが見出された。このメカニズムは以下のように考察される。

コルチゾールは Nrf2 依存性の細胞内抗酸化防御システムを低下させるとの報告がある¹²³⁾。また、肝臓の細胞である H4IIE 細胞において、コルチゾールの添加により細胞内 H₂O₂ が増加した¹²³⁾との報告もある。これらの事実は、HaCaT 細胞においても同様に、コルチゾールが細胞内 H₂O₂ 量を増加させることを支持している。このメカニズムについて、既報文献から考察すると HaCaT 細胞においても Nrf2 依存性の細胞内抗酸化防御システムをコルチゾールが低下させることにより、定常状態で生成される $\cdot\text{O}_2^-$ 由来の H₂O₂ が消去されず、細胞内 H₂O₂ が残存している可能性が考えられる。

さらに、YE はコルチゾールの刺激による HaCaT 細胞内の ROS 生成亢進を抑制し、ROS の最終生成物である CP の細胞内蓄積に対する緩和効果も示すことが明らかとなった。

ROS により惹起される皮膚トラブルには以下のようなものが報告されている。紫外線照射後には NADPH オキシダーゼの活性化により生成された $\cdot\text{O}_2^-$ から変換された H₂O₂ が増加し、PGE₂ の合成を亢進し紫外線紅斑反応が惹起される¹²⁴⁻¹²⁶⁾。また、H₂O₂ から生じる $\cdot\text{OH}$ は脂質過酸化ラジカルを生成し、尋常性座瘡により生じる炎症を助長する¹²⁷⁾。さらに、ROS の最終生成物である CP は尋常性乾癬やアトピー性皮膚炎患者の角層内で増加しており^{59,128)}、角層の水分量と負の相関がある⁵¹⁾ことから皮膚保湿機能を低下させる。また、H₂O₂ は transient receptor potential subtype ankyrin 1 (TRPA1) の活性化を介した皮膚の痒みをマウス皮膚において誘導する¹⁰⁶⁾ことが報告されている。

YE の添加は HaCaT 細胞内の ROS と CP 量を減少させたことから、YE は上記の皮膚トラブルを緩和する効果が期待できる。

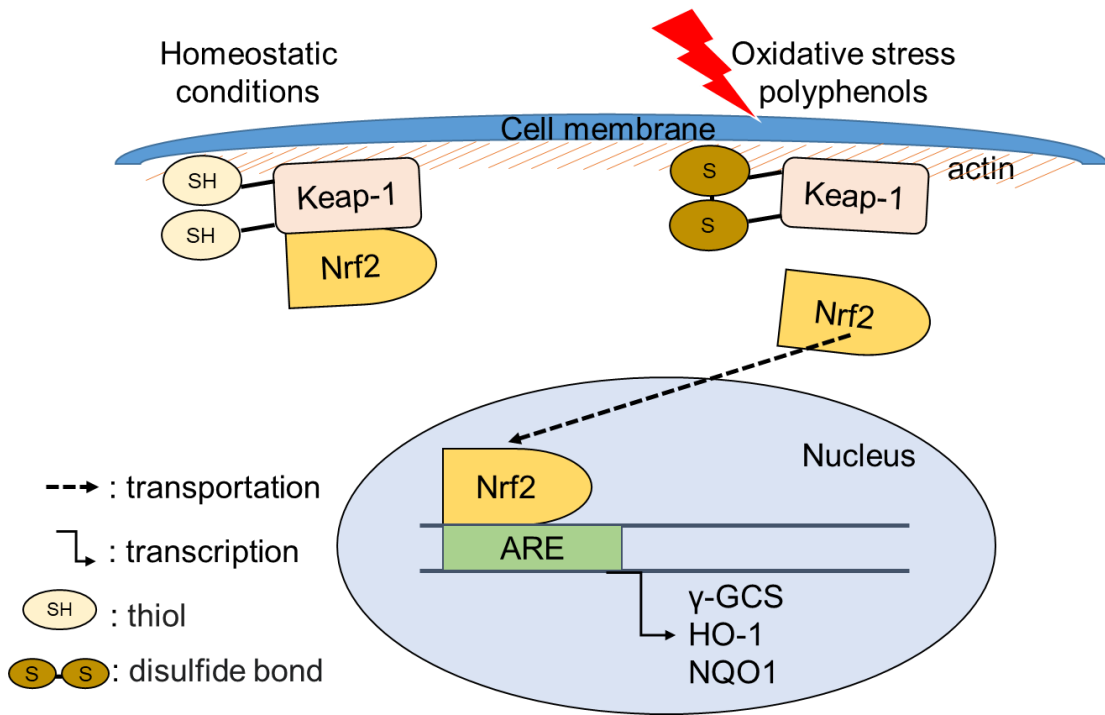


Fig. 1-4 Nrf2-Keap1 signaling under oxidative stress or treatment of polyphenols.

第 2 章 真皮線維芽細胞において複数回の UVA 照射によるコラーゲン線維量の低下に対する *Ocimum basilicum* エキスの改善効果

2.1. 緒言

光老化皮膚の特徴は、真皮乳頭層におけるコラーゲン線維の減少¹²⁹⁾である。したがって、コラーゲン線維の減少の抑制、および再生促進は皮膚の光老化の予防、改善につながる。光老化皮膚は慢性的な太陽光線曝露により形成される。また、太陽光線の中で、UVA は真皮層まで到達し、線維芽細胞へ直接作用することが知られている。UVA を照射した NHDF ではコラーゲン分解酵素である MMP-1 の発現量の増加¹³⁰⁾と type I collagen の発現量の低下が確認されている¹³¹⁻¹³³⁾。また、UV によるコラーゲンの合成の低下と、分解酵素の増加は正常ヒト真皮線維芽細胞 (NHDF) 内の ROS の増加に起因することが報告されている¹³⁴⁾。そこで、慢性的な太陽光線曝露状況を *in vitro* において再現することを考えた。

NHDF への UVA の複数回は、NHDF のコラーゲン線維形成およびコラーゲン線維分解に関して光老化皮膚で観察される結果を誘導する可能性が期待された。そこで、UVA 複数回照射 NHDF のコラーゲン関連タンパクおよびその遺伝子変化、コラーゲン線維形成を検討した。その結果、UVA 複数回照射した NHDF ではコラーゲン分解酵素である MMP-1 の発現量の増加と type I collagen の発現量の低下を伴うコラーゲン線維形成の低下が確認された。

一方、UV によるコラーゲンの合成の低下と、MMP-1 の増加は NHDF 内の ROS の増加に起因することが報告されている¹³⁴⁾ ことから、ROS の低減効果を有する植物エキスが NHDF におけるコラーゲン線維量の減少を抑制すると考えられる。

ROS の低減効果が期待される植物由来成分としてロズマリン酸が報告されている¹³⁵⁾。ロズマリン酸は HaCaT 細胞において UVB 照射、H₂O₂ による ROS の生成を抑制する^{95,96)} ことから、ロズマリン酸を含むバジルの一種 *Ocimum basilicum* エキス (OC) についても UVA を照射した NHDF 内 ROS の生成量の増加を抑制し、コラーゲン線維量の減少を抑制する効果が期待される。

そこで、本章では、細胞内の酸化ストレスに注目してロズマリン酸を含有する OC のコラーゲン線維形成能低下に対する改善効果について検証し、報告する。

2.2. 実験方法

2.2.1. 試薬

試薬は以下のものを使用した。ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM), Ca²⁺ および Mg²⁺ 含有ハックス緩衝液 (HBSS (+)) は日水製薬株式会社 (東京, 日本) より購入した。

トリプシン (ブタ膵臓由来)、30% H₂O₂、L-ascorbic acid、DL- α tocopherol、Xanthine oxidase (XOD)、Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) はナカライテスク株式会社 (京都, 日本) より購入した。Iron (II) perchlorate (Fe(ClO₄)₂)、Hypoxanthine (HPX) は FUJIFILM 和光純薬 (大阪, 日本) より購入した。2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidone hydrochloride (TMPD)、tert-Butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) は東京化成工業 (東京, 日本) より購入した。2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate (MES) は同仁化学研究所 (熊本, 日本) より購入した。Peroxidase、RevaTra Ace qPCR Master Mix は東洋紡 (大阪, 日本) より購入した。Triton-X-100、Bovine serum albumin (BSA) は Sigma-Aldrich (Missouri, USA) より購入した。H₂DCFDA は Merck (Darmstadt, Germany) より購入した。BCA protein assay kit は Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA) より購入した。Biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody、Hoechst 33342、Fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC) は Invitrogen Corporation (California, USA) より購入した。RNeasy Mini kit は Qiagen (Venlo, Netherlands) より購入した。Hematoporphyrin (HP) は MP Biomedicals (California, USA) より購入した。Anti-MMP-1 antibody (goat polyclonal) は Gene Tex (California, USA) より購入した。Anti-collagen type I antibody conjugated to biotin (rabbit polyclonal) は Rockland Scientific (Victoria, Canada) より購入した。Anti-goat IgG antibody conjugated to HRP、Streptavidin conjugated to HRP は R&D Systems (Minnesota, USA) より購入した。Ez WestBlue は ATTO (東京, 日本) より購入した。Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ fragment (Alexa Fluor 594 conjugate) は Cell Signaling (Massachusetts, USA) より購入した。

2.2.2. 細胞培養

正常ヒト真皮線維芽細胞 (NHDF) は 5% FBS を含む DMEM を用いて、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。0.25% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含有する PBS (-) を用いて細胞を剥離し、培養細胞用 96 ウェルマイクロプレート (Iwaki, 静岡, 日本) に 2.0×10^4 cells/well の密度で播種し実験を行った。

2.2.3. 光源

UVA の照射は、ピークの波長が 352 nm である UVA 光源 (FL20/BLB fluorescent lamp; Toshiba, 東京, 日本) を用いて行った。照射強度は、紫外線照射計 (UVP UVX Radiometer; fisher scientific; California, USA) を用い測定した。

2.2.4. コラーゲン線維量の減少した細胞の作製

細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートに 2×10^4 cells/well の細胞密度で NHDF を播種し 24 時間培養した。洗浄後、培養液を HBSS(+) に置き換え、NHDF へ 10 J/cm^2 の UVA を照射した。この操作を 1 日 1 回、3 日間連続で実施し複数回の UVA 照射を行った。最終照射の 2 週間後に type I コラーゲンの免疫組織染色を行った。各ウェルに 4% ホ

ルムアルデヒドを添加し 15 分間静置し細胞および形成された線維の固定を行った。PBS(-)にて洗浄後、1% BSA を用い、1 時間室温でブロッキングを行った。PBS (-) にて洗浄を行い、Anti-type I collagen antibody (1:500) を添加し 4 °C、一晚反応させた。0.05% PBST にて洗浄を行った後、Anti-rabbit IgG (H+L) antibody-conjugated to Alexa Fluor 594 (1:1000) を 2 時間室温にて反応させた。PBS(-) にて洗浄後、2 μ M Hoechst 33342 を添加し、37 °C にて 5 分間インキュベートし核染色を行った。Fluoid Cell imaging Station を用いて画像を撮影した。また、コラーゲン線維量を定量するために、corneocytometry software (CIEL, 東京, 日本) を用い定量を行った。具体的には、取得画像内のコラーゲン線維の部分の面積率を算出することによって、コラーゲン線維量の指標とした。

2.2.5. UVA 照射による NHDF 内 ROS に対する OC、ローズマリン酸の効果

細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートに 2×10^4 cells/well の細胞密度で NHDF を播種し 24 時間培養した。細胞を PBS(-) を用い、2 回洗浄した後、HBSS(+) に溶解した 20 μ M の H₂DCFDA を細胞と 30 分間インキュベートし、H₂DCFDA を細胞内へ取り込ませた。洗浄後、培養液を HBSS(+) に置き換え、NHDF へ 10 J/cm² の UVA を照射した。その後、NHDF と HBSS(+) にて調製した OC あるいはローズマリン酸と 6 時間インキュベートした。HBSS(+) にて細胞を洗浄後、細胞内に生成された ROS を細胞内の蛍光強度 (F.I.) (励起波長; 485 nm、蛍光波長; 530 nm) として測定した。さらに、0.5% Triton-X-100 含有 PBS(-) を用いて細胞を溶解し、溶解液のタンパク量を BCA assay kit を用いて測定した。細胞内に残存する ROS 量の値を F.I./ μ g protein 値として算出した。細胞内 ROS 量は、UVA 無照射、OC あるいはローズマリン酸無処理 NHDF の F.I./ μ g protein を 1.0 として、それぞれの F.I./ μ g protein を規格化した値を用いて表した。

2.2.6. *Ocimum basilicum* エキス (OC) の調製

Ocimum basilicum エキスは ABResearch srl Via dell' Impresa (Brendola (VI), Italy) から提供された。また、ローズマリン酸 (FUJIFILM 和光純薬, 大阪, 日本) をポジティブコントロールとして使用し、5% FBS を含む DMEM を用いてそれぞれの濃度に希釈し、細胞培養の実験を行った。

2.2.7. OC 内のロズマリン酸の確認

OC 内のロズマリン酸の含有量を high performance liquid chromatography (HPLC) (NANOSPACE SI-2, 資生堂, 東京, 日本) を用いて測定した。OC、ロズマリン酸を精製水に溶解し、それぞれの濃度に調製し HPLC を実施した。

HPLC の測定条件を以下に記した。

カラム: CAPCELL PAK C18 MG II 5 μm 250 mm x 2.0mm (Osaka Soda, 大阪, 日本)

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

流速: 0.4 mL/分

注入量: 2 μL

検出波長: 330 nm

移動相: $\text{CH}_3\text{CN} : 10 \text{ mM } \text{KH}_2\text{PO}_4 = 25 : 75$

2.2.8. OC とロズマリン酸の化学的 ROS 消去能

OC、ロズマリン酸の ROS 消去能を測定した。ROS 消去作用は各種 ROS を 50% 消去する濃度である IC_{50} を用いて表した。対象とした ROS は、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 、 $\text{LOO}\cdot$ 、 $^1\text{O}_2$ である。 H_2O_2 消去能は、 H_2O_2 とエキスをインキュベートした後の残存 H_2O_2 量を求めることにより測定した。5 mM H_2O_2 と OC あるいはロズマリン酸あるいは陽性コントロール試料として用いた *L*-アスコルビン酸を各濃度 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間反応させた。反応液を、0.8 mM 4-Amino antipyrine、4 mM Phenol と 725 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Peroxidase 共存下で反応させ、4- amino antipyrine と Phenol の酸化縮合体であるキノンイミンの生成を 550 nm の吸光度を用いて測定した。サンプル無添加試料の 550 nm の吸光度に対する、各試料、各濃度の吸光度の比率から IC_{50} を算出した。 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{LOO}\cdot$ 、 $^1\text{O}_2$ 消去能は ESR スピントラップ法を用いて測定した。ESR スペクトロメーターは、RFR-30 spectrometer (Radical Research, 東京, 日本) を用いた。各ラジカルの強さは外部の基準として使用した Mn^{2+} のシグナル強度に対する比、シグナル/ Mn^{2+} の比で算出した。各ラジカルの消去能は、 IC_{50} にて算出した。

$^1\text{O}_2$ 消去能は、UVA 照射下で 25mM の TMPD、0.1 mM の HP、0.1M Tris/HCl (pH. 8.5) で溶解した試料共存下、UVA を照射し $^1\text{O}_2$ を生成させ $^1\text{O}_2$ を TMPD を用いてスピントラップし、ラジカル強度、および Mn^{2+} のシグナル強度を測定し、 IC_{50} 値を算出した。陽性コントロール試料としてアジ化ナトリウムを用いた。

$\cdot\text{O}_2^-$ 消去能は、1.14 mM DTPA と試料共存下、0.19 U/mL XOD、0.70 mM HPX、7 μM の DTPA にて生成させた $\cdot\text{O}_2^-$ を 90 mM DMPO を用いてスピントラップし、ラジカル強度、および Mn^{2+} のシグナル強度を測定した。陽性コントロール試料として *L*-アスコルビン酸を用いた。

$\cdot\text{OH}$ 消去能は、試料共存下、0.16 mM H_2O_2 、0.04 mM $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ にて生成した $\cdot\text{OH}$ を 90 mM DMPO を用いてスピントラップし、ラジカル強度、および Mn^{2+} のシグナル強度を測定した。陽性コントロール試料として *L*-アスコルビン酸を用いた。

LOO[•] 消去能は、1.18 mM DTPA と試料共存下、1.9 mM *t*-BuOOH、0.48 mM Fe (ClO₄)₂ にて生成させた BuOO[•] を 90 mM DMPO を用いてスピントラップし、ラジカル強度、および Mn²⁺ のシグナル強度を測定した。陽性コントロール試料として DL- α トコフェロールを用いた。

ESR シグナルは以下の条件で測定した。

Output power: 4.0 mW

Scanning field: 336.5 \pm 7.5 mT

Modulation frequency: 0.25 mT

Response time: 0.03 s

2.2.9. 複数回 UVA 照射と試料処理

細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートに 2 \times 10⁴ cells/well の細胞密度で NHDF を播種し 24 時間培養した。洗浄後、培養液を HBSS(+) に置き換え、NHDF \rightarrow 10 J/cm² の UVA を照射した。照射終了後、NHDF を 250 μ g/mL の OC あるいは 62.5 μ g/mL (174 μ M) のロズマリン酸を含有した 5% FBS 含有 DMEM を用いて 24 時間培養した。複数回照射は、この操作を 3 日間連続で実施した。

2.2.10. UVA 単回および複数回照射による NHDF 内の CP の生成に対する OC とロズマリン酸の効果

最終照射の 24 時間後に、NHDF を冷メタノールにて固定し、20 μ M FTSC 含有 0.1 M MES Na buffer (pH. 5.5) を添加し室温下、1 時間暗所にて反応させ CP を蛍光ラベルした。その後、NHDF を PBS(-) にて 2 回洗浄した後、HBSS(+) を用いて調製した 2 μ M Hoechst 33342 を添加し、37 $^{\circ}$ C にて 5 分間インキュベートし核染色を行った。NHDF を PBS(-) で洗浄後、蛍光マイクロプレートリーダー (SpectraMax Gemini EM Microplate Reader; Molecular Devices, CA, USA) にて CP 由来の FTSC の蛍光強度 (励起波長; 465 nm、蛍光波長; 535 nm) と核由来の Hoechst 33342 の蛍光強度 (励起波長; 350 nm、蛍光波長; 461 nm) を測定した。細胞内 CP 値は、FTSC/Hoechst の蛍光強度比とし、UVA 無照射、OC あるいはロズマリン酸無処理 NHDF の CP 値を 1.0 とし各処理細胞の CP 値を規格化した値で表した。さらに、NHDF 内の CP は Fluid Cell imaging station (Life Technology, CA, USA) を用いて蛍光画像を撮影した。

2.2.11. type I collagen、MMP-1 mRNA 発現量

最後の UVA 照射の 24 時間後、PBS(-) にて細胞を 2 回洗浄後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて cDNA の合成を行い SYBR Green Gene Expression Assay を使用し COL1A1 mRNA、MMP-1 mRNA 発現量を Eco Real Time PCR system を用いて測定した。COL1A1 mRNA、MMP-1 mRNA、house keeping として使用した GAPDH のプライマーの情

報は以下の通りである。

COL1A1 forward, 5'-CCCGGGTTTCAGAGACAACCTTC-3', COL1A1 reverse, 5'-TCCACA TGCTTTATTCCAGCAATC-3', MMP-1 forward, 5'-AAGGTGGACCAACAATTTTCAGA-3', MMP-1 reverse, 5'-TGAAGGTGTAGCTAGGGTACATCAA-3', GAPDH forward, 5'-GCACCGTAAGGCTGAGAAC-3', GAPDH reverse, 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。

結果は $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて GAPDH で補正した。

2.2.12. MMP-1 タンパク発現量

最終 UVA 照射の 24 時間後、5% の FBS を含む DMEM に培地を置換し、さらに 24 時間培養を行った。上清を回収し、1000 RPM の回転数にて、4°C、5 分間遠心分離し、細胞培養上清を回収した。上清 10 μ L と Sample buffer solution (FUJIFILM 和光純薬, 東京, 日本) 10 μ L を混合し、ドライブロックバス EB-303 (アズワン, 大阪, 日本) を用いて 95 °C、5 分間煮沸したサンプルを 10% SDS-PAGE に 10 μ L アプライし、電気泳動を行った。電気泳動終了後、PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories, California, USA) に転写を行った。メンブレンを 0.05% PBST にて 5 分間洗浄した後、1% BSA を用い、1 時間、室温にてブロッキングを行った。0.05% PBST にて 5 分間、3 回洗浄後、Anti-MMP-1 antibody (goat polyclonal) (1:1000) をメンブレンに浸漬し、一晩、4 °C にて反応させた。0.05% PBST にて洗浄後、Anti-goat IgG antibody conjugated to HRP (1:1000) を 2 時間、室温にてメンブレンに浸漬した。0.05 % PBST を用いてメンブレンを洗浄し、Ez WestBlue にて MMP-1 のバンドを検出した。さらに、Image J software を用いて解析し、UVA 無照射、OC あるいはロズマリン酸無処理細胞の上清中に含まれる MMP-1 の発現量を 1.0 として、発現量を算出した。

2.2.13. type I collagen タンパク発現量

最終 UVA 照射の 24 時間後、5% の FBS を含む DMEM に培地を置換し 24 時間培養を行い、培養上清を回収した。回収した上清を ELISA プレート (H-plate, Sumitomo Bakelite, 東京, 日本) に 4 °C にて一晩、吸着させた。PBS (-) を用いプレートを洗浄後、1% BSA にてブロッキングを 1 時間、室温環境下で実施した。0.05% PBST にてプレートを洗浄後、Anti-collagen I antibody conjugated biotin (1:5000) を 4 °C、一晩反応させた。0.05% PBST にて 2 回洗浄後、Streptavidin-HRP (1:500) を室温、暗所にて 1 時間反応させた。その後、0.05% PBST (-) にて 2 回洗浄し、0.5 mg/mL ABTS 含有 0.1 M Phosphate citrate buffer (pH.4.0) と、適量の 30% H₂O₂ を混合した溶液を 20 分間反応させ、405 nm の吸光度を測定し type I collagen の量を定量した。さらに、0.5% Triton-X-100 含有 PBS (-) を用いて細胞を溶解し、タンパク質量測定した。タンパク質量定量は、細胞溶解液と BCA assay kit を混合した後、増加した 550 nm の吸光度を測定し、同時に作成した検量線からタンパク質量算出した。type I collagen タンパク量を pg type I collagen/ μ g protein として算出した。

2.2.14. type I collagen 線維量低下に対する OC とロズマリン酸の作用

複数回の UVA を照射し、OC、ロズマリン酸を 24 時間添加した NHDF は、新鮮な 5% FBS を含む DMEM に培地を用いてさらに 2 週間培養を行った。各ウェルを洗浄後、4% ホルムアルデヒドを用い室温にて 15 分間静置し細胞および形成された線維の固定を行った。PBS(-) にて洗浄後、1% BSA を用い、1 時間室温でブロッキングを行った。さらに、0.05% PBST を用い洗浄後、0.3 % BSA 含有 PBS(-) にて調製した Anti-type I collagen antibody (1:500) を添加し 4℃、一晚インキュベートした。PBS(-) にて洗浄後、0.3% BSA 含有 PBS(-) にて調製した Anti-rabbit IgG (H+L) antibody-conjugated to Alexa Fluor 594 (1:1000) を遮光下、2 時間室温にてインキュベートした。0.05% PBST にて洗浄後、2 μM Hoechst 33342 を添加し、37℃ にて 5 分間インキュベートし核染色を行った。PBS(-) にて洗浄後、Fluor Cell imaging Station を用いて画像を撮影した。また、コラーゲン線維量は、専用ソフトウェアである corneocytometry software (CIEL, 東京, 日本) を用い定量を行った。具体的には、取得画像内のコラーゲン線維の部分の面積率を算出することによって、コラーゲン線維量の指標とした。

2.2.15. 統計解析

測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、Student の *t* 検定によって有意差検定を行った。*p* 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

2.3. 結果

2.3.1. 複数回 UVA 照射による type I collagen 線維量

NHDF において、複数回の UVA 照射により type I collagen 線維量が未照射と比較し有意に減少した (Fig.2-1)。このことから、NHDF に対して複数回の UVA 照射を実施することによってコラーゲン線維量の減少に着目し、OC とロズマリン酸の作用を検証することが可能となった。

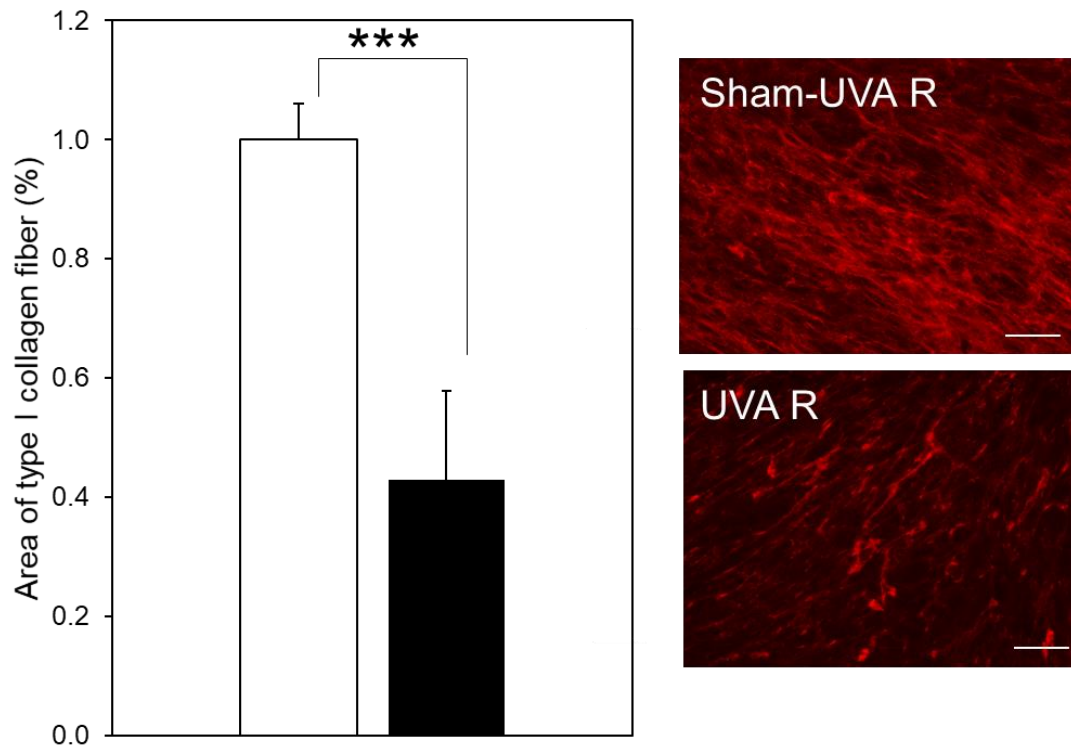


Fig. 2-1 An effect of repetitive UVA irradiation on type I collagen fiber formation.

NHDF were irradiated single or repetitive UVA. NHDF were further cultured for 2 weeks after the final irradiation. After fixation with 4% formaldehyde, collagen fibers were immunostained with anti-type I collagen antibody and anti-rabbit IgG (H+L) antibody-conjugated Alexa Fluor 594. (a) Areas of type I collagen fibers were digitalized with comecyometry. (n = 4). Areas of type I collagen fibers are expressed as means \pm standard deviations. UVA irradiation is abbreviated as UVA R. □; Sham-UVA R, ■; UVA R. Significance; *** p < 0.001. (b) Images of collagen fibers. Scale bars: 100 μ m.

2.3.2. OC 内のロズマリン酸の含量率

本研究で使用した OC 内におけるロズマリン酸の含有率を測定することを目的とし、HPLC を実施した。ロズマリン酸と OC のクロマトグラムを Fig.2-2 に示した。クロマトグラムの保持時間から OC に認められたピークがロズマリン酸であることを同定した。OC 中のロズマリン酸の存在量は、面積比から 38.01 w/w% であった。

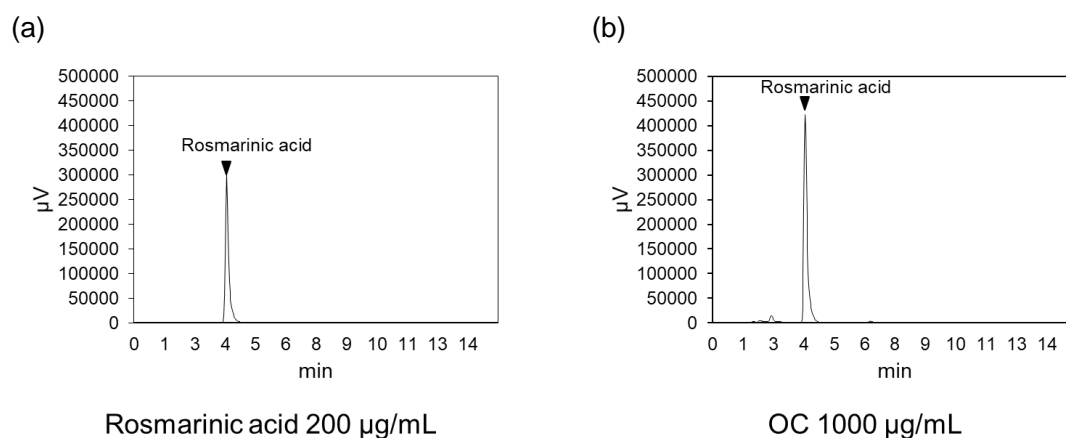


Fig. 2-2 HPLC analysis of Rosmarinic acid in OC.

The analysis of Rosmarinic acid was carried out by HPLC. OC and Rosmarinic acid were dissolved with deionized water. CAPCELL PAK C18 MG II 5 µm 250 mm x 2.0mm was obtained from Osaka Soda (Osaka, Japan) was used in the HPLC analysis as a column. ABS at 330 nm was used for the detection. Elution was carried out at a flow rate of 0.4 mL/min at 40 °C. Eluent was CH₃CN : 10 mM KH₂PO₄ = 25 : 75 and injection volume at 2 µL. (a) Rosmarinic acid 200 µg/mL, (b) OC 1000 µg/mL.

2.3.3. 単回 UVA 照射による細胞内 ROS に対する OC とロズマリン酸の効果

OC およびロズマリン酸は、UVA 単回照射により増加した NHDF 内 ROS を濃度依存的に抑制した (Fig. 2-3 (a))。

2.3.4. UVA 単回および複数回照射による NHDF 内の ROS および CP の生成に対する OC とロズマリン酸の効果

NHDF へ 10 J/cm² の UVA を単回照射し OC、ロズマリン酸を 24 時間添加した後、細胞内の ROS 量、CP の生成量を測定した結果、OC およびロズマリン酸は単回 UVA 照射により増加した細胞内 ROS 量と CP の生成量の増加を抑制した。さらに、複数回 UVA 照射による細胞内 CP の生成量の増加についても OC およびロズマリン酸は有意に抑制した (Fig. 2-3 (b), (c), Fig. 2-4)。

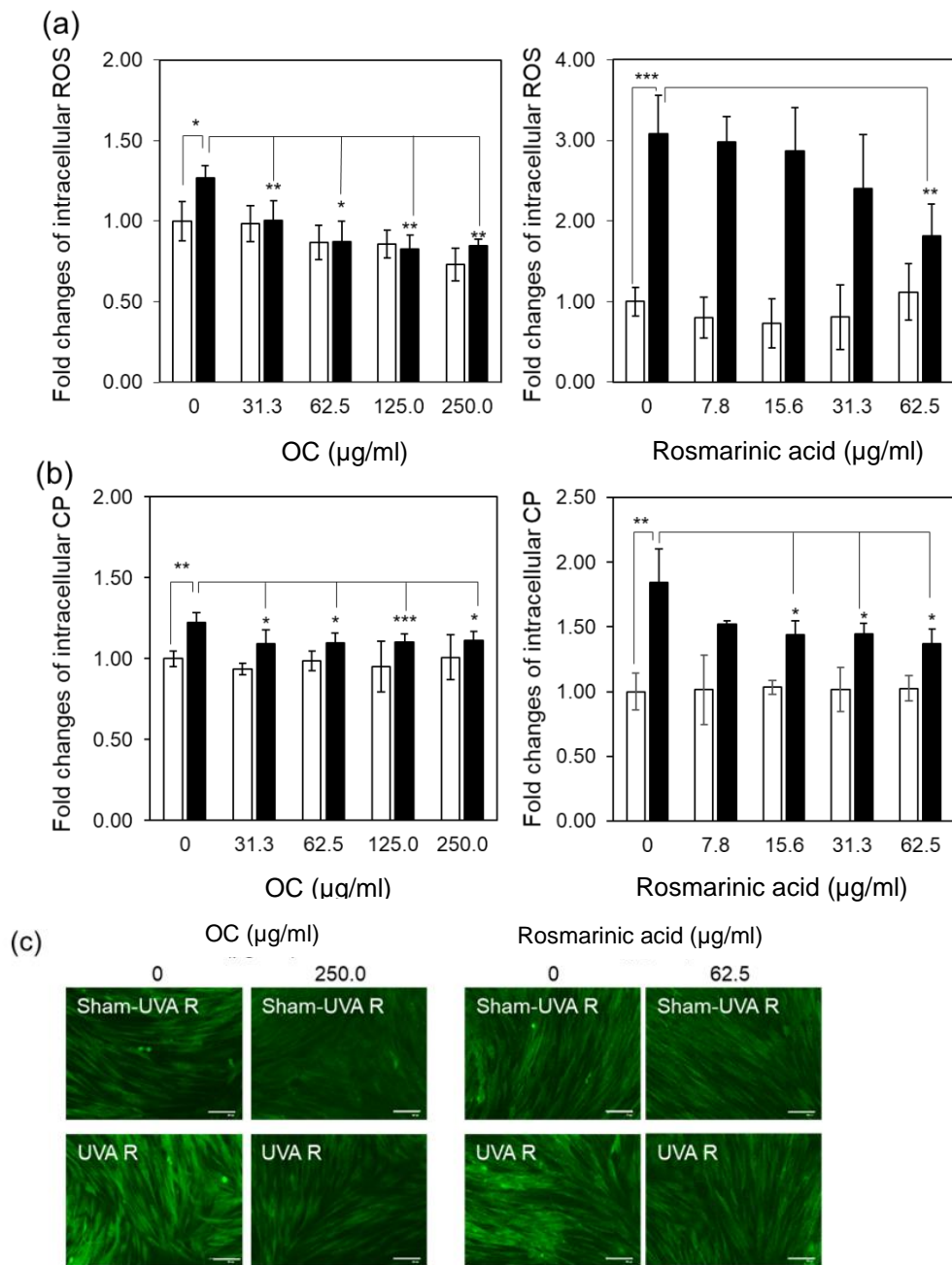


Fig. 2-3 Suppressive effects of OC and Rosmarinic acid on intracellular levels of ROS and CP elevated by a single UVA irradiation.

(a) After loading with H_2DCFDA , NHDF were irradiated with UVA at a dose of 10 J/cm^2 and were then cultured in the presence or absence of OC or Rosmarinic acid for 6 hours. Intracellular ROS levels were determined by measuring fluorescence intensity (F.I.), and were calculated by dividing F.I. by the protein content of cells ($\text{F.I./}\mu\text{g protein}$). Intracellular ROS levels are expressed as fold changes normalized with intracellular ROS levels of untreated Sham-UVA irradiated NHDF. Data are expressed as means \pm standard deviations (OC; $n = 3$, Rosmarinic acid; $n = 4$). UVA irradiation is abbreviated as UVA R. \square ; Sham-UVA R, \blacksquare ; UVA R. (b) After UVA irradiation, cells were cultured for 24 hours in the presence or absence of OC or RA. Intracellular CP levels were quantified by measuring F.I. after fluorescence labeling with FTSC, and were calculated as value of the F.I. divided by the F.I. of nuclei stained with Hoechst 33342. Intracellular CP levels are expressed as fold changes normalized with intracellular CP of untreated Sham-UVA irradiated NHDF. Data are expressed as means \pm standard deviations ($n = 4$). \square ; Sham-UVA R, \blacksquare ; UVA R. (c) Representative images of intracellular CP. Scale bars: $100 \mu\text{m}$. significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

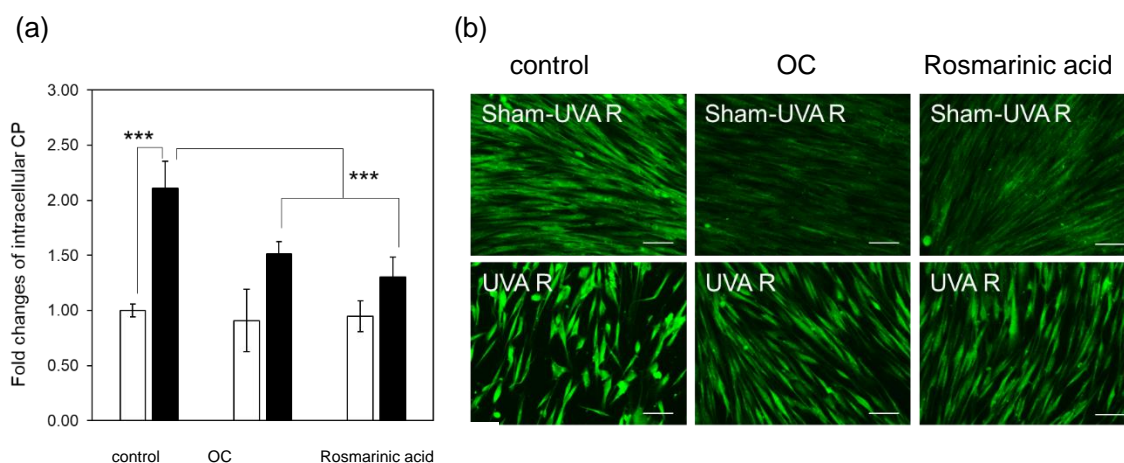


Fig. 2-4 Suppressive effects of OC and Rosmarinic acid against intracellular CP in NHDF exposed to repetitive UVA irradiation.

NHDF were irradiated with UVA at a dose of 10 J/cm² once a day for 3 successive days. NHDF were cultured in the presence or absence of OC (250 µg/mL) or Rosmarinic acid (62.5 µg/mL) after each UVA irradiation, and were further cultured for 24 hours after the final irradiation. After fixation with cold methanol, intracellular CP and nuclei were detected by fluorescence labeling with FTSC and Hoechst 33342, respectively. (a) Intracellular CP levels were quantified by measuring F.I. after fluorescence labeling with FTSC, calculated as the value of F.I. divided by the F.I. of nuclei stained with Hoechst 33342. Intracellular CP levels are expressed as fold changes normalized with intracellular CP of untreated Sham-UVA irradiated NHDF. UVA irradiation is abbreviated as UVA R. Data are expressed as means ± standard deviations (n = 5). □; Sham-UVA R, ■; UVA R. (b) Representative images of intracellular CP. UVA irradiation is abbreviated as UVA R. Scale bars: 100 µm. significance; *** p < 0.001.

2.3.5. OC とロズマリン酸の化学的 ROS 消去作用

OC、ロズマリン酸の $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{LOO}\cdot$ 、 $^1\text{O}_2$ に対する化学的消去作用を Table 2-1 にまとめた。 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 について陽性コントロール試料 L-アスコルビン酸の IC₅₀ 値と比較して、OC、ロズマリン酸ともに IC₅₀ 値が高値を示した。また $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 において OC の IC₅₀ 値はロズマリン酸と比較し有意に高値を示した。 $^1\text{O}_2$ については、ロズマリン酸は陽性コントロール試料アジ化ナトリウムの IC₅₀ 値と同程度の IC₅₀ 値を示したが、OC の IC₅₀ 値はアジ化ナトリウムより高値を示した。一方、 $\text{LOO}\cdot$ に対しては陽性コントロール試料 DL- α トコフェロールの IC₅₀ 値と比較し、OC、ロズマリン酸ともに低い IC₅₀ 値を示した。

以上の結果から、OC、ロズマリン酸ともに化学的な ROS 消去能は、 $\text{LOO}\cdot$ に対する消去能は高く、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 、 $^1\text{O}_2$ の消去能は高くはないことが明らかとなった。

Table 2-1 Chemical scavenging profiles of OC and RA against various ROS.

		IC ₅₀									
		•O ₂ ⁻		H ₂ O ₂		•OH		LOO•		¹ O ₂	
		Mean ± S.D.	p ¹ p ²	Mean ± S.D.	p ¹ p ²	Mean ± S.D.	p ¹ p ²	Mean ± S.D.	p ¹ p ²	Mean ± S.D.	p ¹ p ²
OC	(μg/mL)	873.6 ± 92.7	*** *	2234.4 ± 60.4	*** **	285.5 ± 8.1	*** **	213.0 ± 16.0	*** **	273.1 ± 15.0	** **
Rosmarinic acid	(μg/mL)	650.5 ± 83.7	***	822.2 ± 94.1	**	245.4 ± 4.6	***	110.5 ± 7.5	***	181.3 ± 14.9	N.D.
	(μM)	1805.4 ± 232.4	***	3355.2 ± 322.7	**	681.1 ± 12.8	***	306.7 ± 20.9	***	503.2 ± 41.4	N.D.
L-ascorbic acid	(μg/mL)	79.6 ± 49.0		249.4 ± 3.8		69.8 ± 0.8					
	(μM)	452.1 ± 277.9		1416.3 ± 21.4		396.2 ± 4.5					
DL-α tocopherol	(μg/mL)							803.6 ± 40.5			
	(μM)							1865.8 ± 93.9			
Sodium azide	(μg/mL)									179.4 ± 11.7	
	(μM)									2759.9 ± 179.7	

Positive control: L-ascorbic acid was used for •O₂⁻, H₂O₂ and •OH, DL-α-tocopherol was used for LOO• and Sodium azide (NaN₃) was used for ¹O₂ (n = 3). Significance p¹; against positive control and p²; against Rosmarinic acid. * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001. N.D., not significance.

2.3.6. コラーゲン合成、分解、コラーゲン線維量に対する OC とロズマリン酸の作用

複数回の UVA 照射によるコラーゲンタンパク合成および MMP-1 合成・分泌に対する OC、およびロズマリン酸の作用を検討した。その結果、OC、およびロズマリン酸ともに、複数回 UVA 照射による type I collagen タンパク質の発現低下を有意に回復した (Fig. 2-5 (b))。さらに、OC、およびロズマリン酸は複数回 UVA 照射による MMP-1 mRNA および培養液へ分泌された MMP-1 タンパク質の増加を有意に抑制した (Fig. 2-6)。また、複数回 UVA 照射による type I collagen の線維形成量の減少を OC およびロズマリン酸は抑制した (Fig. 2-7 (a), (b))。

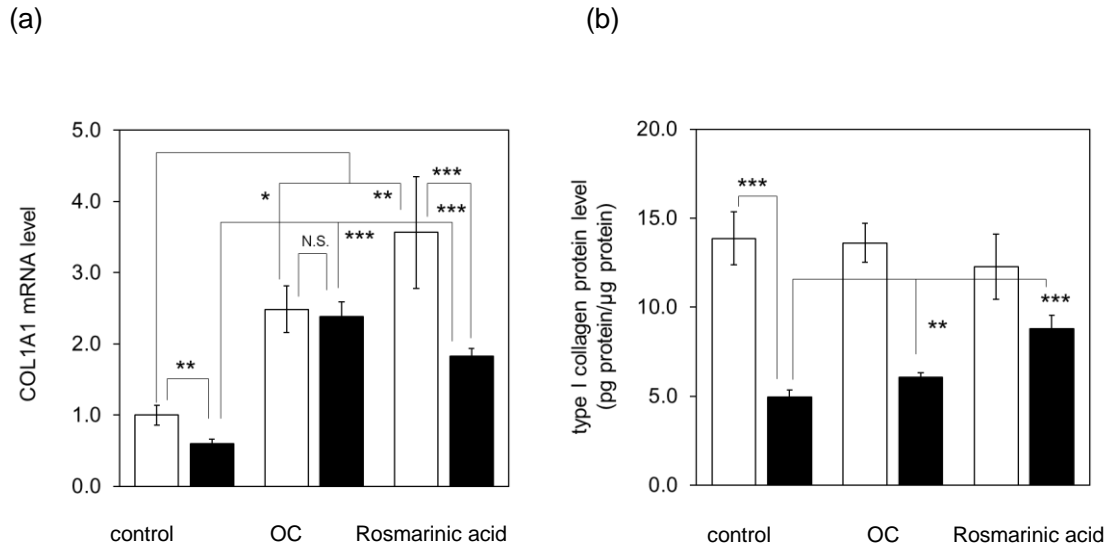


Fig. 2-5 Restorative effects of OC and Rosmarinic acid on type I collagen altered by repetitive UVA irradiation.

NHDF were irradiated with UVA at a dose of 10 J/cm² once a day for 3 successive days. NHDF were cultured in the presence or absence of OC (250 μg/mL) or Rosmarinic acid (62.5 μg/mL) after each UVA irradiation, and were further cultured for 24 hours (mRNA) or 48 hours (protein) after the final irradiation. (a) mRNA expression levels of type I collagen induced by UVA irradiation are expressed as means ± standard deviations. (n = 4). UVA irradiation is abbreviated as UVA R. □; Sham-UVA R, ■; UVA R. (b) Protein levels of type I collagen were quantified with ELISA, and are expressed as means ± standard deviations (n = 4). □; Sham-UVA R, ■; UVA R. Significance; * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

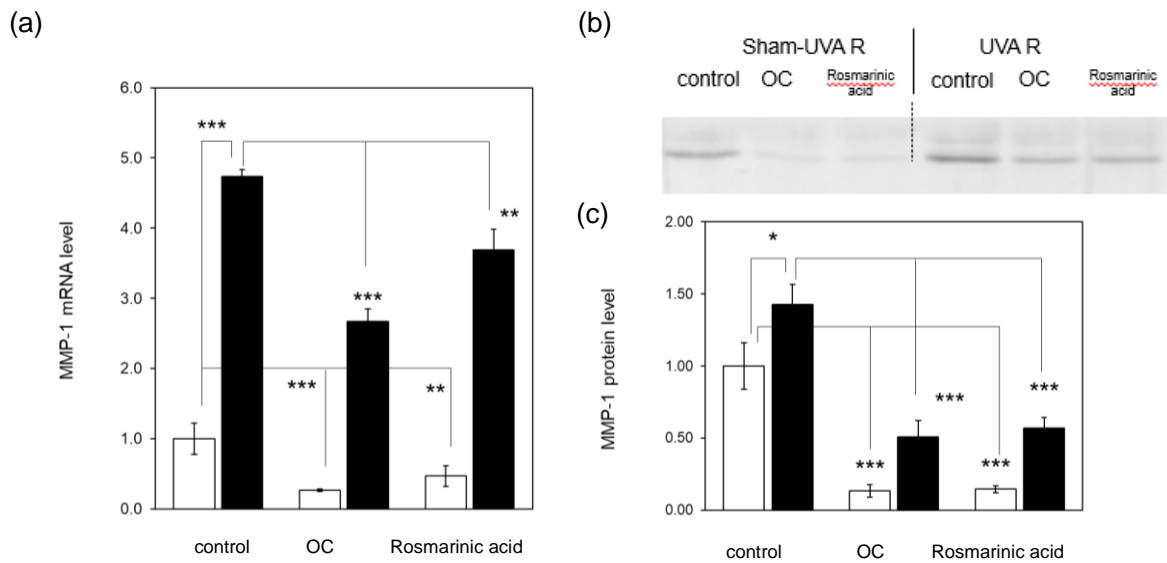


Fig. 2-6 Restorative effects of OC and Rosmarinic acid on MMP-1 altered by repetitive UVA irradiation.

NHDF were irradiated with UVA at a dose of 10 J/cm² once a day for 3 successive days. NHDF were cultured in the presence or absence of OC (250 μg/mL) or Rosmarinic acid (62.5 μg/mL) after each UVA irradiation, and were further cultured for 24 hours (mRNA) or 48 hours (protein) after the final irradiation. (a) mRNA expression levels of MMP-1 induced by UVA irradiation in NHDF. mRNA expression levels are expressed as means ± standard deviations. (n = 3). UVA irradiation is abbreviated as UVA R. □; Sham-UVA R, ■; UVA R. (b) Representative images of western blotting of MMP-1 proteins secreted from NHDF irradiated with UVA. (c) MMP-1 levels were digitalized from images of western blotting with Image J, and are expressed as means ± standard deviations. (n = 3). □; Sham-UVA R, ■; UVA R. Significance; * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

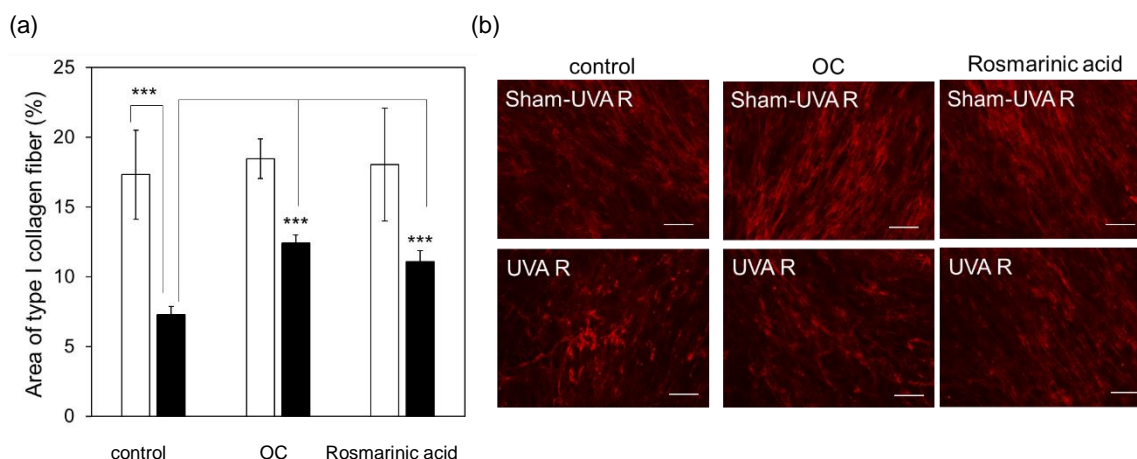


Fig. 2-7 Effects of OC and Rosmarinic acid on type I collagen fiber formation by repetitive UVA irradiation.

NHDF were irradiated with UVA at a dose of 10 J/cm² once a day for 3 successive days. NHDF were cultured in the presence or absence of OC (250 µg/mL) or Rosmarinic acid (62.5 µg/mL) after each UVA irradiation and then were further cultured for 2 weeks. After fixation with 4% formaldehyde, collagen fibers were immunostained with Anti-type I collagen antibody and Anti-rabbit IgG (H+L) antibody-conjugated Alexa Fluor 594. (a) Representative images of collagen fibers, (b) Areas of type I collagen fibers were digitalized with comecytometry. (n = 3). Scale bars: 100 µm. Areas of type I collagen fibers are expressed as means ± standard deviations. UVA irradiation is abbreviated as UVA R. □; Sham-UVA R, ■; UVA R. Significance; *** p < 0.001.

2.4. 考察

本章では、光老化の特徴であるコラーゲン線維量の減少に対する *Ocimum basilicum* エキス (OC) の効果を検証することを目的とした。まず、皮膚が光老化する過程と同じ過程を培養 NHDF に適用しコラーゲン再生および分解おける遺伝子、タンパク発現を明らかとし、その最終産物であるコラーゲン線維形成能の変化を明らかにした。光老化皮膚の真皮に存在する線維芽細胞は、慢性的に UVA に曝露されている。UVA の 3 回照射は未照射と比較してコラーゲン線維の再生能の低下と分解を示す形質を発現し、MMP-1 mRNA、タンパク発現量の増加 (Fig. 2-6)と、type I collagen の発現量の低下を示した (Fig. 2-5 (b))。複数回の UVA 照射による MMP-1 mRNA の発現の増加は、二日のインターバルで 3 回の UVA 照射を行っている先行研究の結果¹³⁶⁾と一致を示した。さらに、UVA の複数回照射は光老化皮膚の真皮に蓄積が確認される CP の線維芽細胞の細胞内増加を誘導した (Fig. 2-4)。この事実は、UVA 照射により細胞内にて過剰生成された ROS に起因すると考えられる。事実、UVA 単回照射により細胞内 ROS の生成増加が確認されている (Fig. 2-3)。

この現象は、光老化皮膚に見られる状況を再現していることが確認された (Fig. 2-1)。このことから、UVA を複数回照射することによりコラーゲン線維量の減少に着目し、OC の効果を検証することが可能となった。

さらに、本章では OC と *Ocimum basilicum* エキスに含まれるロズマリン酸が、単回 UVA 照射により NHDF 内で生成される ROS、およびその最終生成物である CP の生成を抑制することが明らかとなった。また、その抑制作用は複数回 UVA 照射した NHDF 内の CP の増加に対しても確認された。この結果は、OC およびロズマリン酸が以下に示した作用に

より UVA 照射により増加する細胞内 ROS を減少させた可能性が考えられる。一つは、OC およびロズマリン酸の化学的な ROS 消去作用であり、他方は細胞の生理的な作用を介した細胞内抗酸化防御システムの亢進による作用¹¹⁷⁾ である。

そこで、OC およびロズマリン酸の細胞内 ROS の制御作用およびその最終生成物である CP の生成抑制作用を明らかにすることを目的として、OC およびロズマリン酸の化学的な ROS 消去能を評価した。OC およびロズマリン酸ともに $\cdot\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 に対する化学的消去能はポジティブコントロールと比較して低いあるいは同等にも関わらず、複数回 UVA 照射による細胞内 CP の生成を抑制したことから、OC およびロズマリン酸には化学的な抗酸化作用に加え細胞内抗酸化防御システムを亢進させる作用を有する可能性が示唆される (Table 2-1、Fig. 2-3)。

一方、 $\text{LOO}\cdot$ の消去能は OC およびロズマリン酸ともに陽性コントロールである *DL*- α -トコフェロールの消去能と比較して、高いことが確認された。この結果は、ロズマリン酸には $\text{LOO}\cdot$ に対する消去能があると報告している先行研究¹³⁵⁾ と一致した。

CP は、脂質過酸化物から生成されるアルデヒド化合物により合成される³²⁾。したがって、OC およびロズマリン酸による単回および複数回 UVA 照射による細胞内 CP 増加の抑制は、OC およびロズマリン酸の化学的な $\text{LOO}\cdot$ 消去能に由来している可能性が考えられる。

OC およびロズマリン酸の UVA 照射による細胞内 ROS の上昇抑制は細胞内抗酸化防御システムの亢進作用^{95,98)}、CP の生成量の増加抑制は細胞内抗酸化防御システムの亢進作用と化学的な $\text{LOO}\cdot$ の消去により発現されている可能性が考えられた。

しかしながら、本研究における OC およびロズマリン酸の細胞内抗酸化防御システムの亢進作用についてはさらに詳細な検討が必要である。

線維芽細胞内 ROS とコラーゲン分解タンパク発現、type I collagen タンパク発現については、序論で紹介したように多くの先行研究により、そのプロセスが明らかとなっている。コラーゲン合成の制御タンパクである CCN1/Cyr61 とコラーゲン分解酵素である MMP-1 は、転写因子 AP-1 の下流にコードされている¹³⁷⁾。AP-1 は c-Jun と c-Fos のヘテロダイマーであり¹³⁸⁾、c-Jun と c-Fos の細胞内 ROS により合成の促進が以下の経路で進行する。細胞膜に存在する EGF 受容体を ROS が活性化させ¹³⁹⁾、その下流に位置する JNK の活性化により c-Jun は合成される¹⁴⁰⁾。一方、c-Fos は ROS により活性化した NF- κ B/IL-1/IL-6 シグナル¹⁴¹⁾ を介した ERK1/2 の活性化により合成される¹⁴²⁾。また、MMP-1 の合成は ROS のみではなく ROS により生成される脂質過酸化物によっても合成が促進される¹⁴³⁻¹⁴⁵⁾。

このように細胞内 ROS はコラーゲン合成の抑制、コラーゲン分解の促進といったコラーゲン合成と分解のバランスを崩すことにより真皮乳頭層におけるコラーゲン線維の減少を誘導する。そのため、UVA 照射による NHDF 内の ROS の上昇を抑制する OC およびロズマリン酸には光老化皮膚で見られる真皮乳頭層におけるコラーゲン線維の減少を予防、改善する作用が期待される。

そこで、OC およびロズマリン酸のコラーゲン分解と合成のバランスの崩れ、コラーゲン線維量に対する防御・改善作用を評価した。

UVA 複数回照射による type I collagen タンパク質発現の低下と MMP-1 mRNA および MMP-1 タンパク質の増加に対して、OC およびロズマリン酸ともに有意な改善効果を示した。さらに、UVA 複数回照射により生じた NHDF の type I collagen 線維量の減少を OC およびロズマリン酸ともに抑制した (Fig.2-7)。

以上の結果をまとめると、OC およびロズマリン酸は複数回 UVA 照射した線維芽細胞のコラーゲン代謝バランスの崩れを改善し、皮膚の光老化の進行の予防および改善効果を有する可能性が示唆された。

OC 内のロズマリン酸の含量から考えると、この作用の本質は OC に含まれるロズマリン酸以外の成分が寄与している可能性は低いと考えられるが、さらなる検証が必要である。

第 3 章 総括

皮膚組織において生成が亢進される ROS による酸化ストレスの増大は、角層細胞の形成不全を伴う表皮バリア機能の低下、皮膚老化の特徴である色素斑形成やシワ、タルミの発生の誘導や尋常性座瘡による皮膚炎症の悪化といった多くの皮膚トラブルを惹起する要因である。

本研究は、皮膚トラブルの原因となる皮膚の組織内で生成される ROS を取り除く素材を探索することで人々の皮膚の健康維持に貢献することを目的として実施した。

第 1 章では、健康志向により消費が増加したオリーブオイルを精製する際に生じるオリーブ果実の圧搾残渣に着目し、産業廃棄物の利用法と皮膚組織内で生成される ROS を取り除く素材としての検討を行った。オリーブ果実には、抗酸化作用のあるヒドロキシチロソールが含有されており、オリーブ果実圧搾残渣エキスにも同様にヒドロキシチロソールが含有されている。また、現在、オリーブ果実には成熟度の低い果実と成熟度の高い果実から圧搾されたオリーブ果実が上市されており、その 2 種類の残渣が産業廃棄物として破棄されている。そこで、本研究では未成熟果実と成熟果実それぞれの圧搾残渣エキスを調製し、抗酸化作用の評価を生物学的および化学的 ROS 消去作用を用いて実施した。

生物学的 ROS 消去作用評価を行った結果、未成熟果実圧搾残渣エキス (YE)、成熟果実圧搾残渣エキス (ME) とともに細胞内の ROS 消去能を有し、その作用は YE が強いことが明らかとなった。YE、ME の化学的な ROS 消去能を評価したところ、ROS 消去能は一般的な抗酸化物質と比較し低く、細胞内の ROS 消去作用は化学的な ROS 消去能のみではなく細胞内抗酸化機構の亢進に由来している可能性が考えられた。そこで、抗酸化作用の高かった YE に着目し、YE の抗酸化機構への影響を検討した。その結果、YE は Nrf2 の核内移行を促進し、 γ -GCS の転写を促進し、細胞内の GSH 量を増加させることが明らかとなった。

Nrf2 の核内移行は Nrf2/Keap-1 シグナルの亢進により生じる。Keap-1 のレドックスセンサーであるシステイン残基の SH 基は、キノンなどのポリフェノール酸化物と反応することにより Keap-1 と Nrf2 が乖離し Nrf2 の核内移行が誘導されることが報告されている。また、先行研究においてオリーブ果実圧搾残渣には Nrf2/Keap-1 シグナルを活性化させるポリフェノールであるヒドロキシチロソールが含有されていることが報告されている。以上のことから、本研究で用いた YE にも同様の成分が含まれ、それらにより抗酸化機構である Nrf2/Keap-1 シグナルが亢進した可能性が考えられるが、YE に含まれる成分に関して詳細な検討が必須であり、今後の課題としたい。

さらに本章では生体内の他の細胞種において ROS の生成を促進するコルチゾールが HaCaT 細胞においても同様に ROS およびその最終生成物 CP の生成を増加させるか否

かについて検討した。その結果、コルチゾールの添加により HaCaT 細胞の細胞内 ROS、CP の生成が亢進し、YE はこれらの生成の増加を抑制することが明らかとなった。コルチゾールより生体内で増加した ROS は Nrf2/Keap-1 シグナルを低下させること、さらに細胞内の H₂O₂ を増加させることが報告されている。以上のことから、本研究においても同様のメカニズムでコルチゾールの曝露により表皮細胞内で ROS の生成が亢進したことが考えられる。コルチゾールは精神的なストレスにより分泌が亢進することから、YE には精神的なストレスによる皮膚トラブルの原因となりうる ROS の生成に対する消去効果を有することが明らかとなった。

ROS、CP が誘発する表皮の皮膚トラブルとして、紫外線紅斑、乾燥、痒みが挙げられ、YE はそれらを緩和する効果が期待でき、さらに廃棄物を減らすことで皮膚の健康維持を目的とした素材となるだけでなく環境に配慮した素材となることが期待できる。

第 2 章ではシワ、タルミといった光老化皮膚の特徴である真皮乳頭層のコラーゲン線維量の減少を改善する素材を評価することを目的とし研究を実施した。光老化は繰り返し太陽光を浴びることにより進行する。太陽光の中でも、UVA はコラーゲン線維の存在する真皮層まで到達し光老化の進行に、より直接的に関与していることが考えられる。そこで、UVA の複数回照射を正常ヒト真皮線維芽細胞 (NHDF) に行い、コラーゲン線維形成への影響を確認した。その結果、複数回照射は未照射と比較し、type I collagen 線維量の減少が認められた。このことから、本研究で用いた複数回の UVA 照射は光老化皮膚で認められるコラーゲン線維形成の低下を明確に再現できることが明らかとなった。

また、複数回 UVA 照射により COL1A1 mRNA、type I collagen タンパク質発現量が未照射と比較し低下し、MMP-1 mRNA、MMP-1 タンパク質発現量が未照射と比較し増加していることが確認された。UVA 照射による type I collagen の発現量の低下は ROS の増加により生じる AP-1 の核内移行による TGF- β -Smad シグナルの抑制因子である Smad7 の増加とコラーゲン合成フィードバックタンパク CCN1/Cyr61 の増加に由来する。一方、UVA 照射による MMP-1 の発現量の増加は ROS の増加による AP-1 の核内移行による MMP-1 の転写促進が原因であるとされる。以上のことから、本章において、コラーゲンの恒常性とコラーゲン線維形成量の低下は UVA 照射による ROS の生成により引き起こされた可能性が考えられる。

そこで、コラーゲン線維量の減少に対する改善策の探索を目的に、抗酸化物質であるローズマリン酸を含有する *Ocimum basilicum* エキス (OC) に着目し、UVA 照射による細胞内 ROS 消去能の評価を行った。その結果、単回の UVA 照射による NHDF 内の ROS の生成の増加を OC、ローズマリン酸ともに抑制することが確認された。さらに、UVA の単回と複数回照射により生じた ROS の最終生成物である CP の生成増加に対しても、OC、ローズマリン酸は抑制する効果が認められ、OC およびローズマリン酸の化学的な ROS 消去作用あるいは細胞内の抗酸化機構の亢進作用を有することが考えられる。そこで、OC および ロズ

マリン酸の化学的な ROS 消去能を確認した結果、OC およびロズマリン酸ともに $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 に対する化学的消去能は陽性コントロールである L-アスコルビン酸と比較し低く、 $^1\text{O}_2$ 消去能はポジティブコントロールであるアジ化ナトリウムと同等あるいは低いことが明らかとなった。一方で、 $\text{LOO}\cdot$ の消去能は OC、ロズマリン酸ともに脂溶性抗酸化剤である DL- α -トコフェロールよりも高い消去能を有することが確認された。CP は脂質化酸化反応において生成されるアルデヒド化合物によるタンパク質のアミノ基修飾によって合成されることから、OC およびロズマリン酸の UVA 照射による細胞内の ROS の上昇抑制は化学的な ROS 消去作用に加え、細胞内抗酸化機構の亢進、CP の増加の抑制は細胞内抗酸化機構の亢進と、化学的な $\text{LOO}\cdot$ の消去能に由来している可能性が示唆された。先行研究では、HaCaT 細胞において UVB の照射による ROS の生成をロズマリン酸が Nrf2/Keap-1 シグナルを介して消去したと報告されており、本研究においても Nrf2/Keap-1 シグナルの関与を検討することが必須であり、今後の課題としたい。

OC、ロズマリン酸に細胞内 ROS 消去作用が認められたことから、ROS によるコラーゲン恒常性とコラーゲン線維形成量の低下を予防・改善する効果が期待される。そこで複数回の UVA 照射におけるコラーゲンの恒常性とコラーゲン線維形成量に対する OC、ロズマリン酸の作用を評価した。その結果、複数回 UVA 照射による type I collagen タンパク質発現の低下と MMP-1 mRNA および MMP-1 タンパク質の分泌の増加に対して、OC およびロズマリン酸ともに有意な改善効果を示した。さらに、複数回 UVA 照射により生じた NHDF の type I collagen の線維量の減少を OC およびロズマリン酸は抑制する作用を認めた。以上のことから、OC およびロズマリン酸は複数回の UVA 照射を実施した NHDF のコラーゲン合成と分解のバランスの崩れを回復し、コラーゲン線維形成の低下の予防・改善を行い、皮膚の光老化の進行の予防・改善効果を有する可能性が示唆された。

本研究の結果は、未成熟オリーブ果実圧搾残渣抽出物が主に Nrf2 シグナルを介して細胞内 ROS 消去機能を発揮すること、ロズマリン酸を含む *Ocimum basilicum* エキスが UVA 照射により増加する細胞内 ROS の低減、および CP の低減と UVA による線維芽細胞のコラーゲン線維形成能の低下を抑制することを見出した。本研究より見出された素材は、ROS により惹起、増強される皮膚トラブルである、紫外線による紅斑反応、表皮バリア機能の低下、乾燥、痒み、皮膚老化に対して有用な効果を発揮する可能性が示唆された。

本研究の成果は、これらの素材を用いたスキンケアが皮膚トラブルを予防・改善し、健やかな皮膚の維持につながり、人々の QOL を高めることに貢献するものと考えられる。

参考文献

1. Langton, A. K.;Graham, H. K.;Griffiths, C. E. M.Watson, R. E. B. Ageing significantly impacts the biomechanical function and structural composition of skin. *Experimental dermatology* **28**, 981-984 (2019)
2. Candi, E.;Schmidt, R.Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 328-340 (2005)
3. Ruhrberg, C.;Hajibagheri, M. A.;Simon, M.;Dooley, T. P.Watt, F. M. Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. *The Journal of cell biology* **134**, 715-729 (1996)
4. Kurasawa, M.;Maeda, T.;Oba, A.;Yamamoto, T.Sasaki, H. Tight junction regulates epidermal calcium ion gradient and differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* **406**, 506-511 (2011)
5. Shin, J. W.;Kwon, S. H.;Choi, J. Y.;Na, J. I.;Huh, C. H.;Choi, H. R.Park, K. C. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *International journal of molecular sciences* **20**(2019)
6. Garrone, R.;Lethias, C.Le Guellec, D. Distribution of minor collagens during skin development. *Microscopy research and technique* **38**, 407-412 (1997)
7. Canty, E. G.Kadler, K. E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of cell science* **118**, 1341-1353 (2005)
8. Bornstein, P. The structure and assembly of procollagen - a review. *Journal of supramolecular structure* **2**, 108-120 (1974)
9. Shoulders, M. D.Raines, R. T. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry* **78**, 929-958 (2009)
10. Maki, J. M.;Sormunen, R.;Lippo, S.;Kaarteenaho-Wiik, R.;Soininen, R.Myllyharju, J. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *The American journal of pathology* **167**, 927-936 (2005)
11. Vindin, H.;Mithieux, S. M.Weiss, A. S. Elastin architecture. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **84**, 4-16 (2019)
12. Rosenbloom, J.;Abrams, W. R.Mecham, R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**, 1208-1218 (1993)
13. Kasamatsu, S.;Hachiya, A.;Fujimura, T.;Sriwiriyanont, P.;Haketa, K.;Visscher, M. O.;Kitzmilller, W. J.;Bello, A.;Kitahara, T.;Kobinger, G. P.Takema, Y. Essential role of microfibrillar-associated protein 4 in human cutaneous homeostasis and in its photoprotection. *Scientific reports* **1**, 164

- (2011)
14. Wagenseil, J. E.;Mecham, R. P. New insights into elastic fiber assembly. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* **81**, 229-240 (2007)
 15. Schiavinato, A.;Keene, D. R.;Wohl, A. P.;Corallo, D.;Colombatti, A.;Wagener, R.;Paulsson, M.;Bonaldo, P.;Sengle, G. Targeting of EMILIN-1 and EMILIN-2 to Fibrillin Microfibrils Facilitates their Incorporation into the Extracellular Matrix. *The Journal of investigative dermatology* **136**, 1150-1160 (2016)
 16. Kielty, C. M.;Shuttleworth, C. A. The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils. *FEBS letters* **336**, 323-326 (1993)
 17. Kagan, H. M.;Vaccaro, C. A.;Bronson, R. E.;Tang, S. S.;Brody, J. S. Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue. *The Journal of cell biology* **103**, 1121-1128 (1986)
 18. Vrhovski, B.;Weiss, A. S. Biochemistry of tropoelastin. *European journal of biochemistry* **258**, 1-18 (1998)
 19. Yanagisawa, H.;Davis, E. C.;Starcher, B. C.;Ouchi, T.;Yanagisawa, M.;Richardson, J. A.;Olson, E. N. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* **415**, 168-171 (2002)
 20. Noda, K.;Dabovic, B.;Takagi, K.;Inoue, T.;Horiguchi, M.;Hirai, M.;Fujikawa, Y.;Akama, T. O.;Kusumoto, K.;Zilberberg, L.;Sakai, L. Y.;Koli, K.;Naitoh, M.;von Melchner, H.;Suzuki, S.;Rifkin, D. B.;Nakamura, T. Latent TGF- β binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 2852-2857 (2013)
 21. Nishimori, Y.;Edwards, C.;Pearse, A.;Matsumoto, K.;Kawai, M.;Marks, R. Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles. *The Journal of investigative dermatology* **117**, 1458-1463 (2001)
 22. Masaki, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *Journal of dermatological science* **58**, 85-90 (2010)
 23. Babior, B. M.;Lambeth, J. D.;Nauseef, W. The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics* **397**, 342-344 (2002)
 24. Granger, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *The American journal of physiology* **255**, H1269-1275 (1988)
 25. Zorov, D. B.;Juhaszova, M.;Sollott, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews* **94**, 909-950 (2014)
 26. Fischbacher, A.;von Sonntag, C.;Schmidt, T. C. Hydroxyl radical yields in the Fenton process under various pH, ligand concentrations and hydrogen peroxide/Fe(II) ratios. *Chemosphere* **182**,

- 738-744 (2017)
27. Jomova, K.;Lawson, M.;Drostinova, L.;Lauro, P.;Poprac, P.;Brezova, V.;Michalik, M.;Lukes, V.Valko, M. Protective role of quercetin against copper(II)-induced oxidative stress: A spectroscopic, theoretical and DNA damage study. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **110**, 340-350 (2017)
 28. Coyle, J. T.Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science (New York, N.Y.)* **262**, 689-695 (1993)
 29. Arakane, K.;Ryu, A.;Hayashi, C.;Masunaga, T.;Shinmoto, K.;Mashiko, S.;Nagano, T.Hirobe, M. Singlet oxygen (1 delta g) generation from coproporphyrin in Propionibacterium acnes on irradiation. *Biochemical and biophysical research communications* **223**, 578-582 (1996)
 30. Sell, D. R.;Strauch, C. M.;Shen, W.Monnier, V. M. 2-amino adipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. *The Biochemical journal* **404**, 269-277 (2007)
 31. Climent, I.Levine, R. L. Oxidation of the active site of glutamine synthetase: conversion of arginine-344 to gamma-glutamyl semialdehyde. *Archives of biochemistry and biophysics* **289**, 371-375 (1991)
 32. Grimsrud, P. A.;Xie, H.;Griffin, T. J.Bernlohr, D. A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *The Journal of biological chemistry* **283**, 21837-21841 (2008)
 33. Uchida, K. Formation of Acrolein and Its Conjugated with Proteins during Lipid Peroxidation. *日本油化学会誌* **47**, 1207-1215, 1277 (1998)
 34. Uchida, K.;Kanematsu, M.;Morimitsu, Y.;Osawa, T.;Noguchi, N.Niki, E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* **273**, 16058-16066 (1998)
 35. LoPachin, R. M.;Gavin, T.;Petersen, D. R.Barber, D. S. Molecular mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal and acrolein toxicity: nucleophilic targets and adduct formation. *Chemical research in toxicology* **22**, 1499-1508 (2009)
 36. Valencia, A.Kochevar, I. E. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **128**, 214-222 (2008)
 37. Glady, A.;Tanaka, M.;Moriaga, C. S.;Yasui, M.Hara-Chikuma, M. Involvement of NADPH oxidase 1 in UVB-induced cell signaling and cytotoxicity in human keratinocytes. *Biochemistry and biophysics reports* **14**, 7-15 (2018)
 38. Mizutani, T.;Sumida, H.;Sagawa, Y.;Okano, Y.Masaki, H. Carbonylated proteins exposed to UVA and to blue light generate reactive oxygen species through a type I photosensitizing reaction. *Journal of dermatological science* **84**, 314-321 (2016)

39. Masaki, H.;Okano, Y.Sakurai, H. Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. *Biochimica et biophysica acta* **1428**, 45-56 (1999)
40. Nebert, D. W.;Roe, A. L.;Dieter, M. Z.;Solis, W. A.;Yang, Y.Dalton, T. P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochemical pharmacology* **59**, 65-85 (2000)
41. Yokota, M.;Yahagi, S.Masaki, H. Ethyl 2,4-dicarboethoxy pantothenate, a derivative of pantothenic acid, prevents cellular damage initiated by environmental pollutants through Nrf2 activation. *Journal of dermatological science* **92**, 162-171 (2018)
42. Zhou, B.;Wang, X.;Li, F.;Wang, Y.;Yang, L.;Zhen, X.Tan, W. Mitochondrial activity and oxidative stress functions are influenced by the activation of AhR-induced CYP1A1 overexpression in cardiomyocytes. *Molecular medicine reports* **16**, 174-180 (2017)
43. Mizutani, T.;Mori, R.;Hirayama, M.;Sagawa, Y.;Shimizu, K.;Okano, Y.Masaki, H. Sodium Lauryl Sulfate Stimulates the Generation of Reactive Oxygen Species through Interactions with Cell Membranes. *Journal of oleo science* **65**, 993-1001 (2016)
44. Shindo, Y.;Witt, E.;Han, D.;Epstein, W.Packer, L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *The Journal of investigative dermatology* **102**, 122-124 (1994)
45. Chen, H. H.Kuo, M. T. Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Metal-based drugs* **2010**(2010)
46. Yamaguchi, T.Sugimoto, A. [Diversity and anti-oxidative effects of bilirubin]. *Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society* **75**, 224-233 (2003)
47. Niture, S. K.;Khatri, R.Jaiswal, A. K. Regulation of Nrf2-an update. *Free radical biology & medicine* **66**, 36-44 (2014)
48. Bellezza, I.;Giambanco, I.;Minelli, A.Donato, R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* **1865**, 721-733 (2018)
49. Kobayashi, A.;Kang, M. I.;Okawa, H.;Ohtsuji, M.;Zenke, Y.;Chiba, T.;Igarashi, K.Yamamoto, M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology* **24**, 7130-7139 (2004)
50. Goto, K.;Hiramoto, K.;Kawakita, M.;Yamaoka, M.Ooi, K. The Influence of Reactive Oxygen Species and Glucocorticoids on Dry Skin in a Mouse Model of Arthritis. *Skin pharmacology and physiology* **31**, 188-197 (2018)
51. Fujita, H.;Hirao, T.Takahashi, M. A simple and non-invasive visualization for assessment of carbonylated protein in the stratum corneum. *Skin Res Technol* **13**, 84-90 (2007)
52. Masaki, H.;Yamashita, Y.;Kyotani, D.;Honda, T.;Takano, K.;Tamura, T.;Mizutani, T.Okano, Y. Correlations between skin hydration parameters and corneocyte-derived parameters to

- characterize skin conditions. *Journal of cosmetic dermatology* **18**, 308-314 (2019)
53. Oshima, Y.;Kuroda, Y.;Kunishige, M.;Matsumoto, T.Mitsui, T. Oxidative stress-associated mitochondrial dysfunction in corticosteroid-treated muscle cells. *Muscle & nerve* **30**, 49-54 (2004)
 54. Espinoza, M. B.;Aedo, J. E.;Zuloaga, R.;Valenzuela, C.;Molina, A.Valdés, J. A. Cortisol Induces Reactive Oxygen Species Through a Membrane Glucocorticoid Receptor in Rainbow Trout Myotubes. *Journal of cellular biochemistry* **118**, 718-725 (2017)
 55. Choi, E. H.;Brown, B. E.;Crumrine, D.;Chang, S.;Man, M. Q.;Elias, P. M.Feingold, K. R. Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity. *The Journal of investigative dermatology* **124**, 587-595 (2005)
 56. Choi, E. H.;Demerjian, M.;Crumrine, D.;Brown, B. E.;Mauro, T.;Elias, P. M.Feingold, K. R. Glucocorticoid blockade reverses psychological stress-induced abnormalities in epidermal structure and function. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **291**, R1657-1662 (2006)
 57. Di Nardo, A.;Wertz, P.;Giannetti, A.Seidenari, S. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta dermato-venereologica* **78**, 27-30 (1998)
 58. Imokawa, G.;Abe, A.;Jin, K.;Higaki, Y.;Kawashima, M.Hidano, A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *The Journal of investigative dermatology* **96**, 523-526 (1991)
 59. Niwa, Y.;Sumi, H.;Kawahira, K.;Terashima, T.;Nakamura, T.Akamatsu, H. Protein oxidative damage in the stratum corneum: Evidence for a link between environmental oxidants and the changing prevalence and nature of atopic dermatitis in Japan. *The British journal of dermatology* **149**, 248-254 (2003)
 60. Rabionet, M.;Gorgas, K.Sandhoff, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et biophysica acta* **1841**, 422-434 (2014)
 61. Katsuyama, Y.;Taira, N.;Tsuboi, T.;Yoshioka, M.;Masaki, H.Muraoka, O. 3-O-Laurylglyceril ascorbate reinforces skin barrier function through not only the reduction of oxidative stress but also the activation of ceramide synthesis. *International journal of cosmetic science* **39**, 49-55 (2017)
 62. Yanagihara, S.;Kobayashi, H.;Tamiya, H.;Tsuruta, D.;Okano, Y.;Takahashi, K.;Masaki, H.;Yamada, T.;Hasegawa, S.;Akamatsu, H.Ishii, M. Protective effect of hochuekkito, a Kampo prescription, against ultraviolet B irradiation-induced skin damage in hairless mice. *J Dermatol* **40**, 201-206 (2013)
 63. Kurasawa, M.;Kuroda, S.;Kida, N.;Murata, M.;Oba, A.;Yamamoto, T.Sasaki, H. Regulation of tight junction permeability by sodium caprate in human keratinocytes and reconstructed epidermis. *Biochemical and biophysical research communications* **381**, 171-175 (2009)
 64. Yamamoto, T.;Kurasawa, M.;Hattori, T.;Maeda, T.;Nakano, H.Sasaki, H. Relationship between

- expression of tight junction-related molecules and perturbed epidermal barrier function in UVB-irradiated hairless mice. *Archives of dermatological research* **300**, 61-68 (2008)
65. Yuki, T.;Hachiya, A.;Kusaka, A.;Sriwiriyanont, P.;Visscher, M. O.;Morita, K.;Muto, M.;Miyachi, Y.;Sugiyama, Y.Inoue, S. Characterization of tight junctions and their disruption by UVB in human epidermis and cultured keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **131**, 744-752 (2011)
 66. El-Chami, C.;Haslam, I. S.;Steward, M. C.O'Neill, C. A. Organic osmolytes preserve the function of the developing tight junction in ultraviolet B-irradiated rat epidermal keratinocytes. *Scientific reports* **8**, 5167 (2018)
 67. Imokawa, G.;Yada, Y.Miyagishi, M. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *The Journal of biological chemistry* **267**, 24675-24680 (1992)
 68. Corsini, E.;Bruccoleri, A.;Marinovich, M.Galli, C. L. In vitro mechanism(s) of ultraviolet-induced tumor necrosis factor-alpha release in a human keratinocyte cell line. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **11**, 112-118 (1995)
 69. Imokawa, G.;Miyagishi, M.Yada, Y. Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *The Journal of investigative dermatology* **105**, 32-37 (1995)
 70. Kim, H. Y.;Sah, S. K.;Choi, S. S.Kim, T. Y. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life sciences* **210**, 201-208 (2018)
 71. Ochiai, Y.;Kaburagi, S.;Obayashi, K.;Ujiiie, N.;Hashimoto, S.;Okano, Y.;Masaki, H.;Ichihashi, M.Sakurai, H. A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP), prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. *Journal of dermatological science* **44**, 37-44 (2006)
 72. Tomita, Y.;Iwamoto, M.;Masuda, T.Tagami, H. Stimulatory effect of prostaglandin E2 on the configuration of normal human melanocytes in vitro. *The Journal of investigative dermatology* **89**, 299-301 (1987)
 73. Chen, W.;Tang, Q.;Gonzales, M. S.Bowden, G. T. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* **20**, 3921-3926 (2001)
 74. Chakraborty, A. K.;Funasaka, Y.;Slominski, A.;Ermak, G.;Hwang, J.;Pawelek, J. M.Ichihashi, M. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochimica et biophysica acta* **1313**, 130-138 (1996)
 75. Yoon, J. E.;Kim, Y.;Kwon, S.;Kim, M.;Kim, Y. H.;Kim, J. H.;Park, T. J.Kang, H. Y. Senescent fibroblasts drive ageing pigmentation: A potential therapeutic target for senile lentigo.

- Theranostics* **8**, 4620-4632 (2018)
76. Jung, T.;Höhn, A.;Catalgol, B.Grune, T. Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics* **483**, 127-135 (2009)
 77. Rijken, F.Bruijnzeel, P. L. The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings* **14**, 67-72 (2009)
 78. Fisher, G. J.;Wang, Z. Q.;Datta, S. C.;Varani, J.;Kang, S.Voorhees, J. J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *The New England journal of medicine* **337**, 1419-1428 (1997)
 79. Quan, T.;Qin, Z.;Xu, Y.;He, T.;Kang, S.;Voorhees, J. J.Fisher, G. J. Ultraviolet irradiation induces CYR61/CCN1, a mediator of collagen homeostasis, through activation of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology* **130**, 1697-1706 (2010)
 80. Wlaschek, M.;Wenk, J.;Brenneisen, P.;Briviba, K.;Schwarz, A.;Sies, H.Scharffetter-Kochanek, K. Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro. *FEBS letters* **413**, 239-242 (1997)
 81. Morisaki, N.;Moriwaki, S.;Sugiyama-Nakagiri, Y.;Haketa, K.;Takema, Y.Imokawa, G. Neprilysin is identical to skin fibroblast elastase: its role in skin aging and UV responses. *The Journal of biological chemistry* **285**, 39819-39827 (2010)
 82. Nakajima, H.;Ezaki, Y.;Nagai, T.;Yoshioka, R.Imokawa, G. Epithelial-mesenchymal interaction during UVB-induced up-regulation of neutral endopeptidase. *The Biochemical journal* **443**, 297-305 (2012)
 83. Tamasi, G.;Baratto, M. C.;Bonechi, C.;Byelyakova, A.;Pardini, A.;Donati, A.;Leone, G.;Consumi, M.;Lamponi, S.;Magnani, A.Rossi, C. Chemical characterization and antioxidant properties of products and by-products from *Olea europaea* L. *Food science & nutrition* **7**, 2907-2920 (2019)
 84. Goya, L.;Mateos, R.Bravo, L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *European journal of nutrition* **46**, 70-78 (2007)
 85. Rodríguez-Ramiro, I.;Martín, M.;Ramos, S.;Bravo, L.Goya, L. Olive oil hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *Toxicology* **288**, 43-48 (2011)
 86. Di Benedetto, R.;Vari, R.;Scazzocchio, B.;Filesi, C.;Santangelo, C.;Giovannini, C.;Matarrese, P.;D'Archivio, M.Masella, R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* **17**, 535-545 (2007)
 87. Mohan, V.;Das, S.Rao, S. B. Hydroxytyrosol, a dietary phenolic compound forestalls the toxic effects of methylmercury-induced toxicity in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Environmental*

- toxicology* **31**, 1264-1275 (2016)
88. Peng, S.;Zhang, B.;Yao, J.;Duan, D.Fang, J. Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells. *Food & function* **6**, 2091-2100 (2015)
 89. Guo, W.;An, Y.;Jiang, L.;Geng, C.Zhong, L. The protective effects of hydroxytyrosol against UVB-induced DNA damage in HaCaT cells. *Phytother Res* **24**, 352-359 (2010)
 90. Salucci, S.;Burattini, S.;Curzi, D.;Buontempo, F.;Martelli, A. M.;Zappia, G.;Falcieri, E.Battistelli, M. Antioxidants in the prevention of UVB-induced keratinocyte apoptosis. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **141**, 1-9 (2014)
 91. Zwane, R. E.;Parker, A.;Kudanga, T.;Davids, L. M.Burton, S. G. Novel, biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**, 11509-11517 (2012)
 92. Bigagli, E.;Cinci, L.;Paccosi, S.;Parenti, A.;D'Ambrosio, M.Luceri, C. Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *International immunopharmacology* **43**, 147-155 (2017)
 93. Martín, M. A.;Ramos, S.;Granado-Serrano, A. B.;Rodríguez-Ramiro, I.;Trujillo, M.;Bravo, L.Goya, L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxicant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Molecular nutrition & food research* **54**, 956-966 (2010)
 94. Zhu, L.;Liu, Z.;Feng, Z.;Hao, J.;Shen, W.;Li, X.;Sun, L.;Sharman, E.;Wang, Y.;Wertz, K.;Weber, P.;Shi, X.Liu, J. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *The Journal of nutritional biochemistry* **21**, 1089-1098 (2010)
 95. Fernando, P. M.;Piao, M. J.;Kang, K. A.;Ryu, Y. S.;Hewage, S. R.;Chae, S. W.Hyun, J. W. Rosmarinic Acid Attenuates Cell Damage against UVB Radiation-Induced Oxidative Stress via Enhancing Antioxidant Effects in Human HaCaT Cells. *Biomolecules & therapeutics* **24**, 75-84 (2016)
 96. Ramanauskienė, K.;Stelmakiene, A.Majienė, D. Assessment of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Hydrogels: Quality and Bioactivity in Skin Cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2015**, 635975 (2015)
 97. Hahn, H. J.;Kim, K. B.;An, I. S.;Ahn, K. J.Han, H. J. Protective effects of rosmarinic acid against hydrogen peroxide-induced cellular senescence and the inflammatory response in normal human dermal fibroblasts. *Molecular medicine reports* **16**, 9763-9769 (2017)
 98. Psotova, J.;Svobodova, A.;Kolarova, H.Walterova, D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **84**, 167-174 (2006)

99. Oyouni, A. A. A.;Saggu, S.;Tousson, E.Rehman, H. Immunosuppressant drug tacrolimus induced mitochondrial nephrotoxicity, modified PCNA and Bcl-2 expression attenuated by Ocimum basilicum L. in CD1 mice. *Toxicology reports* **5**, 687-694 (2018)
100. Sakr, S. A.Nooh, H. Z. Effect of Ocimum basilicum extract on cadmium-induced testicular histomorphometric and immunohistochemical alterations in albino rats. *Anatomy & cell biology* **46**, 122-130 (2013)
101. Rasul, A.Akhtar, N. Formulation and in vivo evaluation for anti-aging effects of an emulsion containing basil extract using non- invasive biophysical techniques. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* **19**, 344-350 (2011)
102. Iwai, I.Hirao, T. Protein carbonyls damage the water-holding capacity of the stratum corneum. *Skin pharmacology and physiology* **21**, 269-273 (2008)
103. Iwai, I.;Ikuta, K.;Murayama, K.Hirao, T. Change in optical properties of stratum corneum induced by protein carbonylation in vitro. *International journal of cosmetic science* **30**, 41-46 (2008)
104. Salvemini, D.;Misko, T. P.;Masferrer, J. L.;Seibert, K.;Currie, M. G.Needleman, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7240-7244 (1993)
105. Scott, G.;Fricke, A.;Fender, A.;McClelland, L.Jacobs, S. Prostaglandin E2 regulates melanocyte dendrite formation through activation of PKCzeta. *Experimental cell research* **313**, 3840-3850 (2007)
106. Liu, T.Ji, R. R. Oxidative stress induces itch via activation of transient receptor potential subtype ankyrin 1 in mice. *Neuroscience bulletin* **28**, 145-154 (2012)
107. Fukuda, S.;Baba, S.Akasaka, T. Psychological stress has the potential to cause a decline in the epidermal permeability barrier function of the horny layer. *International journal of cosmetic science* **37**, 63-69 (2015)
108. Bin Saif, G. A.;Alotaibi, H. M.;Alzolibani, A. A.;Almodihesh, N. A.;Albraidi, H. F.;Alotaibi, N. M.Yosipovitch, G. Association of psychological stress with skin symptoms among medical students. *Saudi medical journal* **39**, 59-66 (2018)
109. Romeo, L.;Intrieri, M.;D'Agata, V.;Mangano, N. G.;Oriani, G.;Ontario, M. L.Scapagnini, G. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, induces heme oxygenase in rat neurons and acts as an effective neuroprotective agent against oxidative stress. *Journal of the American College of Nutrition* **28 Suppl**, 492s-499s (2009)
110. Izumi, Y.;Matsumura, A.;Wakita, S.;Akagi, K.;Fukuda, H.;Kume, T.;Irie, K.;Takada-Takatori, Y.;Sugimoto, H.;Hashimoto, T.Akaike, A. Isolation, identification, and biological evaluation of Nrf2-ARE activator from the leaves of green perilla (*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridis*). *Free radical biology & medicine* **53**, 669-679 (2012)
111. Umeno, A.;Takashima, M.;Murotomi, K.;Nakajima, Y.;Koike, T.;Matsuo, T.Yoshida, Y. Radical-

- scavenging Activity and Antioxidative Effects of Olive Leaf Components Oleuropein and Hydroxytyrosol in Comparison with Homovanillic Alcohol. *Journal of oleo science* **64**, 793-800 (2015)
112. Avola, R.;Graziano, A. C. E.;Pannuzzo, G.;Bonina, F.Cardile, V. Hydroxytyrosol from olive fruits prevents blue-light-induced damage in human keratinocytes and fibroblasts. *Journal of cellular physiology* **234**, 9065-9076 (2019)
113. Ricciutelli, M.;Marconi, S.;Boarelli, M. C.;Caprioli, G.;Sagratini, G.;Ballini, R.Fiorini, D. Olive oil polyphenols: A quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim. *Journal of chromatography. A* **1481**, 53-63 (2017)
114. Mínguez-Mosquera, I.Gallardo-Guerrero, L. Disappearance of chlorophylls and carotenoids during the ripening of the olive. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **69**, 1-6 (1995)
115. Conde, C.;Delrot, S.Gerós, H. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of plant physiology* **165**, 1545-1562 (2008)
116. Abdallah, M.;Marzocco, S.;Adesso, S.;Zarrouk, M.Guerfel, M. Olive oil polyphenols extracts inhibit inflammatory markers in J774A.1 murine macrophages and scavenge free radicals. *Acta histochemica* **120**, 1-10 (2018)
117. Dinkova-Kostova, A. T.;Holtzclaw, W. D.;Cole, R. N.;Itoh, K.;Wakabayashi, N.;Kato, Y.;Yamamoto, M.Talalay, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11908-11913 (2002)
118. Townsend, D. M.;Tew, K. D.Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **57**, 145-155 (2003)
119. Chen, J. Y.;Wang, F. B.;Xu, H.;Xu, L. F.;Chen, D.;Liu, W. H.;Mu, X.Wen, Y. Q. High glucose promotes prostate cancer cells apoptosis via Nrf2/ARE signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences* **23**, 192-200 (2019)
120. Illesca, P.;Valenzuela, R.;Espinosa, A.;Echeverría, F.;Soto-Alarcon, S.;Ortiz, M.Videla, L. A. Hydroxytyrosol supplementation ameliorates the metabolic disturbances in white adipose tissue from mice fed a high-fat diet through recovery of transcription factors Nrf2, SREBP-1c, PPAR- γ and NF- κ B. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **109**, 2472-2481 (2019)
121. Sun, W.;Wang, X.;Hou, C.;Yang, L.;Li, H.;Guo, J.;Huo, C.;Wang, M.;Miao, Y.;Liu, J.Kang, Y. Oleuropein improves mitochondrial function to attenuate oxidative stress by activating the Nrf2 pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. *Neuropharmacology* **113**, 556-566 (2017)

122. Serreli, G.;Deiana, M. Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Modulation of Cellular Pathways Related to Oxidant Species and Inflammation in Aging. *Cells* **9**(2020)
123. Kratschmar, D. V.;Calabrese, D.;Walsh, J.;Lister, A.;Birk, J.;Appenzeller-Herzog, C.;Moulin, P.;Goldring, C. E.Odermatt, A. Suppression of the Nrf2-dependent antioxidant response by glucocorticoids and 11beta-HSD1-mediated glucocorticoid activation in hepatic cells. *PLoS one* **7**, e36774 (2012)
124. Rhodes, L. E.;Belgi, G.;Parslew, R.;McLoughlin, L.;Clough, G. F.Friedmann, P. S. Ultraviolet-B-induced erythema is mediated by nitric oxide and prostaglandin E2 in combination. *The Journal of investigative dermatology* **117**, 880-885 (2001)
125. Black, A. K.;Greaves, M. W.;Hensby, C. N.Plummer, N. A. Increased prostaglandins E2 and F2alpha in human skin at 6 and 24 h after ultraviolet B irradiation (290- 320 nm). *British journal of clinical pharmacology* **5**, 431-436 (1978)
126. Rhodes, L. E.;Gledhill, K.;Masoodi, M.;Haylett, A. K.;Brownrigg, M.;Thody, A. J.;Tobin, D. J.Nicolaou, A. The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 3947-3956 (2009)
127. Ottaviani, M.;Alesta, T.;Flori, E.;Mastrofrancesco, A.;Zouboulis, C. C.Picardo, M. Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: a possible role in acne vulgaris. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 2430-2437 (2006)
128. Iwai, I.;Shimadzu, K.;Kobayashi, Y.;Hirao, T.Etou, T. Increased carbonyl protein level in the stratum corneum of inflammatory skin disorders: A non-invasive approach. *J Dermatol* **37**, 693-698 (2010)
129. Zheng, P.Kligman, L. H. UVA-induced ultrastructural changes in hairless mouse skin: a comparison to UVB-induced damage. *The Journal of investigative dermatology* **100**, 194-199 (1993)
130. Liu, X.;Zhang, R.;Shi, H.;Li, X.;Li, Y.;Taha, A.Xu, C. Protective effect of curcumin against ultraviolet A irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts. *Molecular medicine reports* **17**, 7227-7237 (2018)
131. Varani, J.;Spearman, D.;Perone, P.;Fligiel, S. E.;Datta, S. C.;Wang, Z. Q.;Shao, Y.;Kang, S.;Fisher, G. J.Voorhees, J. J. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *The American journal of pathology* **158**, 931-942 (2001)
132. Hseu, Y. C.;Korivi, M.;Lin, F. Y.;Li, M. L.;Lin, R. W.;Wu, J. J.Yang, H. L. Trans-cinnamic acid attenuates UVA-induced photoaging through inhibition of AP-1 activation and induction of Nrf2-mediated antioxidant genes in human skin fibroblasts. *Journal of dermatological science* **90**, 123-134 (2018)

133. Peng, Y.;Song, X.;Zheng, Y.;Wang, X.Lai, W. Circular RNA profiling reveals that circCOL3A1-859267 regulate type I collagen expression in photoaged human dermal fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* **486**, 277-284 (2017)
134. Fisher, G. J.Voorhees, J. J. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings* **3**, 61-68 (1998)
135. Zuo, A. R.;Dong, H. H.;Yu, Y. Y.;Shu, Q. L.;Zheng, L. X.;Yu, X. Y.Cao, S. W. The antityrosinase and antioxidant activities of flavonoids dominated by the number and location of phenolic hydroxyl groups. *Chinese medicine* **13**, 51 (2018)
136. Nakyai, W.;Tissot, M.;Humbert, P.;Grandmottet, F.;Viyoch, J.Viennet, C. Effects of Repeated UVA Irradiation on Human Skin Fibroblasts Embedded in 3D Tense Collagen Matrix. *Photochemistry and photobiology* **94**, 715-724 (2018)
137. Yan, C. Regulation of MatrixMetalloproteinase GeneExpression. *Journal of cellular physiology* **211**, 19-26 (2006)
138. Karin, M.Hunter, T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current biology : CB* **5**, 747-757 (1995)
139. Huang, S.;Zhang, A.;Ding, G.Chen, R. Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation. *American journal of physiology. Renal physiology* **296**, F1323-1333 (2009)
140. Kajanne, R.;Miettinen, P.;Mehlem, A.;Leivonen, S. K.;Birrner, M.;Foschi, M.;Kähäri, V. M.Leppä, S. EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. *Journal of cellular physiology* **212**, 489-497 (2007)
141. Karthikeyan, R.;Kanimozhi, G.;Prasad, N. R.;Agilan, B.;Ganesan, M.Srithar, G. Alpha pinene modulates UVA-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in human skin epidermal keratinocytes. *Life sciences* **212**, 150-158 (2018)
142. Higashi, N.;Kunimoto, H.;Kaneko, S.;Sasaki, T.;Ishii, M.;Kojima, H.Nakajima, K. Cytoplasmic c-Fos induced by the YXXQ-derived STAT3 signal requires the co-operative MEK/ERK signal for its nuclear translocation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **9**, 233-242 (2004)
143. Polte, T.Tyrrell, R. M. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Free radical biology & medicine* **36**, 1566-1574 (2004)
144. Hiraoka, K.;Sasaguri, Y.;Komiya, S.;Zenmyo, M.;Inoue, A.Morimatsu, M. Effects of lipid peroxide on production of matrix metalloproteinase 1 (tissue collagenase) and 3 (stromelysin) and tissue inhibitor metalloproteinase 1 by human rheumatoid synovial fibroblasts. *Experimental and molecular pathology* **59**, 169-176 (1993)

145. Ohuchida, M.;Sasaguri, Y.;Morimatsu, M.;Nagase, H.Yagi, K. Effect of linoleic acid hydroperoxide on production of matrix metalloproteinases by human skin fibroblasts. *Biochemistry international* **25**, 447-452 (1991)

謝辞

本研究の実施において、終始ご丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました、東京工科大学応用生物学部 正木 仁 教授に心から、多大なる感謝を申し上げます。

また、細胞培養を始めるにあたり指導をしていただきました、株式会社 CIEL 山脇 裕美子 様、実験方法や原理についての指導をしていただきました、株式会社 CIEL 水谷 多恵子 博士、実験を組み立てるにあたり必要な考え方や知識をご教授いただいた、株式会社 CIEL 岡野 由利 博士に深く御礼を申し上げます。

実験をする上で、さらに研究生生活において、様々な面で支えて下さり、励ましてくださった東京工科大学光老化研究室の 戸田 菜月 様 に感謝を致します。

最後に、4年間の大学院生活を不自由なく過ごせるようにサポートしてくれた両親に感謝します。