

(様式5)

# 学位論文要旨

平成 29年 7月 26日

学位申請者

水谷多恵子 印

## 学位論文題目

角層および表皮細胞における活性酸素とカルボニル化タンパク質の生成がもたらす酸化ストレスとヤブツバキ葉エキスによる抑制

## 学位論文の要旨

皮膚は、生体の最外層に位置し、生体物質の外部環境への漏出を抑制し、外因性物質の生体内への侵入を含む刺激から生体を保護するバリア機能を発揮している。一方で、皮膚は最外層に存在することから、絶えず環境由来の酸化ストレスに曝されている器官でもある。酸化ストレスとは、過剰な活性酸素 (Reactive oxygen species ; ROS) の生成により生体にもたらされる有害な作用を指す。皮膚においては、内因性のROS生成に加え、太陽光に含まれるUVの曝露により大量のROSが生成され、その最終反応生成物としてカルボニル化タンパク質 (Carbonylated proteins ; CPs) が存在することが知られている。

本研究は、皮膚において過剰なROSの生成を誘導する因子を明らかにすることを目的とし、皮膚に存在するCPsと、皮膚の洗浄を目的として使用される代表的なアニオン性界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム (Sodium lauryl sulfate ; SLS) に着目して研究を行い、これらが皮膚において過剰なROSを生成する事実と、これらのROS生成における詳細なメカニズムを明らかにした。さらにその対応策を提案することを目的として、ヤブツバキの葉に由来するエキスによるROS消去素材としての有用性について評価した。

本研究をおこなう上で、皮膚が受けた酸化ストレスを定量的に評価できるツールが必要となる。そこで、第1章においては、皮膚の酸化ストレスマーカーとして知られるCPsに着目し、角層に存在するCPsを相対定量的に評価する手段を開発した。角層のCPsを、fluorescein-5-t hiosemicarbazide (FTSC) を用いて特異的に蛍光標識することにより検出し、得られた蛍光顕微鏡画像を画像解析することにより、角層細胞内CPsの存在頻度 (CPsレベル) を算出した。角層の蛍光画像解析において妨げとなる、角層積層部が発する過剰な蛍光は、画像のRGB表色系のGの階調値分布をもとにした閾値を設定することによって、除外可能なことが確認された。また、本検討手法を用いることにより、標準偏差が顕著に低下したことから、CPsレベルの微小な差の検出感度が向上することも明らかとなった。本法は、角層試料の多重剥離の割合の影響を受けることなく、角層が受けた酸化ストレスレベルの評価を客観的に評価可能できる点において、有用な手法であると考えられた。先行研究では、角層におけるCPsの増加は、皮膚保湿機能および皮膚の光学的特性に影響を及ぼすことが明らかとされており、CPsレベルを低値に維持することの重要性が提案されている。このことから角層のCPsをパラメーターとした皮膚状態の解析においても、非常に有用な解析ツールとなりうる。

第2章では、ROSによって開始される脂質過酸化反応の最終生成物であるCPsが、太陽光曝露下において自らが光増感剤として機能することでROSを生成し、新たなCPsの生成を誘導する

事実を明らかとした。

CPsのモデルとして、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin ; BSA) をアクロレイン処理することにより調製したカルボニル化BSA (CP-BSA) を用い、その蛍光特性を精査したところ、520 nm付近をピークとする蛍光スペクトルを示し、その最大励起波長は430 nmであることが明らかとなった。この蛍光特性に従い、ヒト皮膚より採取した角層に、長波長UVAおよびブルーライト (400–470 nm) を照射することによるROSの生成を、6-(4-Methoxyphenyl)-2-methyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one hydrochloride (MCLA) を用いた化学発光法によって検出した。その結果、角層への長波長UVAおよびブルーライトの照射はROSの生成を誘導し、同測定系へのSODの添加によって発光の増加が抑制されたことから、生成されたROSはスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\cdot O_2^-$ ) であることが強く示唆された。また、アクロレインを用いて人工的にカルボニル化した角層に対して、長波長UVAおよびブルーライトを照射した場合に、MCLAの発光強度がアクロレイン処理濃度依存的に増加することを確認した。

さらに、スピントラップ剤である5-(2,2-Dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (CYPMPPO) を用いたESRスピントラップ法により、CPsから生成されるROSの同定を試みた。CP-BSAはCYPMPPOの共存下における、UVAおよびブルーライト領域の光を含むキセノンアークランプの照射下において、明瞭なESRシグナルを示した。さらに、同測定系におけるSODの添加効果を確認したところ、SODの添加によってESRシグナルは完全に消失した。この事実より、CP-BSAに対するキセノンアークランプの照射によって生成されたラジカルは、 $\cdot O_2^-$  であると考えられた。これらの結果をもとに、長波長UVAおよびブルーライトへの曝露によりCPsから生成されるROSは $\cdot O_2^-$  であると結論づけた。

これらの事実から長波長UVAからブルーライトの波長領域を作用スペクトルとし、光増感反応タイプIを介して $\cdot O_2^-$  を生成することが確認された。生成した $\cdot O_2^-$  は脂質過酸化反応を介して、新たなCPsの生成を誘導すると考えられる。

角層のCPsレベルは、角層水分量およびTEWLなどの皮膚保湿性パラメーターに対して負の相関を示すことから、皮膚の乾燥とSCCPsには関連性があることが示唆されている。これらの事実から、CPsを低頻度に保つことは、皮膚表面におけるROSの生成を介した酸化ストレスの抑制と、皮膚保湿性の維持との両面から非常に重要であると考えられた。同時に、CPsの生成機構を考慮すると、CPsを低頻度に保つためには、皮膚において生成されるROSを速やかに消去することが重要であることが推察され、皮膚の抗酸化機構を日常のスキンケアによって維持、もしくは補うことが有効であると考えられた。

第3章では、洗浄剤の使用が、皮膚においてROSを生成させる可能性に着目した。そこで、代表的なアニオン性界面活性剤であるSLSを対象とし、ROSの生成が誘導されるメカニズムについて詳細に検討をした。

表皮再構築モデルの角層表面にSLSを適用し、表皮生細胞層におけるROSの生成をMCLA化学発光法により確認した。このことから、SLSは角層を通過し、表皮角化細胞の生細胞層においてROSの生成を誘導する可能性が示唆された。さらにSLSはヒト表皮角化細胞株 (HaCaT) の細胞膜の流動性を増大させることで、細胞内への $Ca^{2+}$  の流入を増加させることが明らかとなった。細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の増加は、膜結合酵素複合体であるNADPHオキシダーゼ (Nox) やミトコンドリアにおけるROS生成を増加させることで、細胞内ROSレベルの増加が誘導されることが示唆された。同時に、HaCaT細胞へのSLSの処理は、細胞内への $Ca^{2+}$  の流入を介して、カルパインの活性化を誘導し、インターロイキン-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) の分泌を亢進することが明らかとなった。IL-1受容体関連キナーゼ1は、IL-1 $\alpha$  受容体およびそのリガンドであるIL-1 $\alpha$  との反応によって活性化され、Noxの活性化を誘導することから、ROSの生成はさらに刺激される可能性がある。

本研究により角層を通過したアニオン性界面活性剤が、表皮生細胞層においてROSの生成を誘導することが明らかとなった。アニオン性界面活性剤によるROS生成の誘導メカニズムは、皮膚に用いられる界面活性剤の評価における新しいアプローチ法としての応用が期待される。

第2章および第3章の結果から、皮膚においては様々な経路によりROSの生成が誘導されることが示唆され、皮膚において生成したROSは酸化ストレスによる皮膚傷害を誘導することが推

察された。そのため、ROSを消去する抗酸化物質の皮膚への適用が有効であると考察した。

そこで、第4章ではカテキンやエピカテキン、生物種固有の化合物であるオキカメリアシドやカメリアノシドをはじめとするポリフェノール類を、複数含有することが報告されているヤブツバキの葉のエキスに着目した。ヤブツバキは、季節を通して深緑色をした成葉を有する常緑広葉樹であり、春から夏にかけて黄緑色の若葉が出現する。本研究では、葉の熟度が異なる若葉と成葉それぞれのエキスを調製し、抗酸化作用の評価に用いた。UV曝露によって生体内に生じる活性酸素種のうち、広く細胞内に存在する過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) と、 $H_2O_2$ を前駆物質とするヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) に対する消去活性を確認した。その結果、ヤブツバキの若葉および成葉の抽出液には、 $H_2O_2$ および $\cdot OH$ を直接消去する作用が認められた。また、二種の葉のエキスの消去能を比較すると、どちらのROSに対しても、若葉に由来するエキス (CJGL) の方が高い消去能を示した。角層およびHaCaT細胞におけるROSの消去にもとづく、CJGLの抗酸化能を評価することにより、皮膚における酸化ストレスに対する緩和作用を評価した。

その結果、CJGLは剥離角層の表面への適用によりUV照射下において誘導されるCPsの増加を抑制することが確認された。さらに、CJGLを24時間処理したHaCaT細胞においては、定常状態におけるROSレベルの低下と、 $H_2O_2$ による細胞傷害の緩和作用が認められた。一方、CJGLを2時間処理したHaCaT細胞においては、 $H_2O_2$ による細胞傷害の緩和作用が認められなかったことから、細胞内において機能を発揮した抗酸化物質は、*in vitro*にてROSの補足および消去に関与した物質とは必ずしも共通ではない可能性が示唆された。つまり、CJGLは細胞内の抗酸化機構に関与することで、間接的な抗酸化作用を発揮した可能性が考えられた。

Keap1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で、Keap1からのNrf2の解離を誘導することが報告されている。解離したNrf2は核内移行し、ROS生成抑制系酵素の遺伝子発現を誘導することから、同様の機構によってCJGLが細胞の抗酸化機構を増強した可能性がある。CJGLによる、ROS生成抑制系酵素の遺伝子発現への関与に関する考察は、これらのタンパク質レベルにおける発現増加の確認が必須であり、今後の検討課題としたい。

本研究は、皮膚におけるROSの生成源を明らかにすることを目的とした。皮膚において生成されたCPsが、太陽光曝露下において光増感剤として機能しROSを生成する事実と、皮膚の洗浄剤として用いられるアニオン性界面活性剤であるSLSが、表皮生細胞層にまで侵入し、ROSを生成する事実と、その生成メカニズムの詳細を明らかにした。さらに、これらのROSに対して、抗酸化物質を含有するCJGLは、ROSを直接的に消去する作用、および細胞内抗酸化機構を介した作用の両面から、皮膚を保護する有用な素材となる可能性を示した。

本研究の結果は、皮膚において様々な因子がROSを生成するメカニズムの一端を明らかにした。このことは、過剰なROSによる酸化ストレスの除去がスキンケアの明確なターゲットとなることを示唆し、それらの対応策として、抗酸化物質を用いた日常的なスキンケアが重要であることを示した。