

卵殻膜ペプチド摂食による皮膚機能改善効果の分子レベルでの解析

東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科・教授 大石 祐一

■ 緒言

皮膚は、昼一昼ほどもある大きな組織である。体内の水分蒸散を防ぎ、さらに外界から体内を守る役割がある。それを担うのがコラーゲン、ヒアルロン酸、セラミドなどの分子である。皮膚は、真皮と表皮からなる(図1)。真皮には、I型とIII型コラーゲンなどのコラーゲンが存在し、皮膚の形、はりに関わるとともに、細胞外マトリックスの合成、分解などを行っている線維芽細胞の足場となっている。I型コラーゲンは皮膚に最も多いコラーゲンであり、皮膚コラーゲンの約80%を占める。また、III型コラーゲンは皮膚コラーゲンの約10%を占め、創傷治癒過程における重要な因子といわれている。

ヒアルロン酸は、D-グルクロン酸とD-N-アセチルグルコサミンとの交互の繰り返しで10000以上になることもある、保水性の非常に高い、巨大な分子であり、皮膚に存在する細胞への栄養の補給、老廃物の排出、免疫細胞の移動に関わる多糖である。その量は年齢とともに減少し、40歳代では乳児の半分になるといわれている。このヒアルロン酸を合成する酵素(hyaluronan synthases, HAS)は、3種類存在し、真皮では主にHAS2、表皮では主にHAS3が合成を担っている¹⁾。

セラミドは、表皮に存在し、表皮上層部の角質層細胞間脂質の約60%を占め、外部からの刺激に対するバリア機能や体内水分の蒸散防止に関与する分子である。セラミド合成は、Serine palmitoyltransferase(SPT)が律速酵素として関わっている。セラミドは細胞内でSPTなどの酵素により生合成された後、一旦グルコシルセラミドまたはスフィンゴミエリンとして蓄積され、角質最下層において細胞外へ分泌される。その後、角質細胞間で酵素により、再びセラミドに変換される²⁾。

卵殻膜は、タンパク質を多く含み、そのアミノ酸組成では、シスチンとグルタミン酸が多い。創傷治癒にはIII型コラーゲンが重要といわれているが、卵殻膜は、III型コラーゲン産生促進効果を有し、古代から創傷治癒に有効であるといわれている。

最近、酵素処理による卵殻膜ペプチドが開発され、卵殻膜と同様にシステインに富み、水にも可溶である。抗酸化作用、チロシナーゼ阻害活性、コラーゲンの分解に関わるマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMPs)の産生促進効果があるといわれている。この効果は、皮膚の美白あるいは美肌に関わるが、細胞、試験管レベルの研究である。そこで、今回は、ヘアレスラットを用いて、卵殻膜ペプチドを摂食させ、皮膚への効果を分子レベルで検討することにした。

■ 方法

(1)動物実験

4週齢雄性ヘアレスラット(HWY/Slc)をAIN-76にて、1週間馴化飼育後、表1の5群に分けて4週間飼育した。食餌は、午後4時から翌午前10時までで供与し、水は自由摂取とした。また、午前8時から午後8時を昼とし、午後8時から午前8時までを夜とする12時間の明暗サイクルで飼育した。室温は $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $50 \pm 10\%$ に保った。1群は6匹とした。動物実験においては、東京農業大学動物実験委員会の承認を得て(ライセンス番号120001)行った。皮膚採取は、ソムノペンチル麻酔後に行った。

(2)トロポコラーゲン量の測定

合成間もないと考えられるトロポコラーゲンは、冷生理食塩水内でホモゲナイズした皮膚から抽出した。

I型トロポコラーゲン量は、市販のELISAキットを用いて測定した。III型トロポコラーゲン量の測定は、ウエスタンブロッティング法を用いた。数値化はAmersham Imager 600(GE社製)を用いた。

(3)ヒアルロン酸量の測定

皮膚をアクチナーゼEで処理後、市販のヒアルロン酸結合タンパク質を利用したELISAキットを用いて測定した。

(4)セラミド量の測定

角質層セラミドを瞬間接着剤を用いて皮膚から回収後、皮脂をTLCで展開した。展開後、硫酸銅・

リン酸溶液にて発色させ、Amersham Imager 600にて数値化、比較した。

(5)mRNA量の測定

皮膚切片を液体窒素下で破碎後、市販のキットを用いて totalRNA 抽出、cDNA 化した。mRNA 量は real time PCR 法で測定した。なお、 β -actin を内部標準として、それぞれの mRNA 量を算定、比較した。

(6)有意差検定

有意差検定は、Student-Newman-Keuls test で行った。

■ 結果

(1)体重、摂食量、皮膚水分蒸散量、水分量および粘弾性

体重、摂食量は有意な差が認められなかった(図 2)。

皮膚水分蒸散量は、2 週間目では卵殻膜摂食 3%以上で亢進した。4 週間目では、全ての群でコントロール群(0%)よりも多かった(図 3)。一方、皮膚内水分量は、2 週間目では、全ての群でコントロール群よりも多かった。4 週間目では、3%以外は、多かった。

皮膚粘弾性において、R2 は皮膚を針等で押した後に戻る力、R7 は皮膚を針等で押した後の戻る瞬発性を見たものである。どちらも同様の結果だったが、卵殻膜 3%摂食群において減少傾向があった(図 4)。

(2)トロポコラーゲン量

I 型トロポコラーゲン量は卵殻膜 3%摂食まで濃度依存的に増加し(図 5)、5%以上ではコントロール群と同等だった。その mRNA 量は、各群とも変化無かった(図 6)。

創傷治癒に参与する III 型トロポコラーゲン量(図 7)は、1%~10%までコントロール群よりも増加傾向があった。しかし、濃度依存性がなかった。その mRNA 量(図 8)は、3%まではコントロール群と変化無く、5%以上は徐々に減少傾向だった。

(3)ヒアルロン酸

ヒアルロン酸量(図 9)は、卵殻膜 5%摂食まで濃度依存的に増加し、10%では、減少傾向があったが、コントロール群よりは多かった。真皮に多い、ヒアルロン酸合成酵素 Has2 の mRNA 量(図 10)は、5%までは変化無かった。10%では減少した。表皮に多い、ヒアルロン酸合成酵素 Has3 の mRNA 量は、卵殻膜 3、5%摂食によって、コントロールよりも有意に減少した(図 11)。

(4)セラミド量

皮膚セラミド量を測定した。その結果、卵殻膜ペプチド摂食により、セラミド量は 3%以上で有意に減少した(図 12)。

■ 考察

卵殻膜ペプチドは、摂食した際の皮膚への影響について、不明であったので検討した。

4 週間、卵殻膜ペプチド摂食させた際の皮膚を構成する分子への影響は、3%摂食での I 型コラーゲンの増加、全濃度における III 型コラーゲン量の増加、5%でのヒアルロン酸増加が認められた。しかし、セラミドに関しては、5%以上で減少した。この原因を探るべく、I 型および III 型コラーゲンの mRNA 量を測定したが、卵殻膜ペプチド摂食による増加はなかった。本結果から、卵殻膜ペプチド摂食は合成系に影響を与えない可能性が考えられた。コラーゲンは、3 本螺旋のタンパク質であるが、mRNA からペプチドが生成され、その後 3 本になる。よって、mRNA 量と 3 本螺旋であるコラーゲン量が一致するとは限らない。事実、加齢することにより、3 本螺旋になる効率が下がるといわれている³⁾。卵殻膜ペプチドはこの 3 本螺旋形成に有効なのかもしれない。また、TIMPs といわれる MMP 阻害物質増加などに卵殻膜ペプチドは影響を与え、I、III 型コラーゲンの分解抑制を促進しその量を増加させる可能性もある。

ヒアルロン酸に関わる合成酵素に関しては、真皮では 10%で減少、表皮では 3%で減少した。真皮、表皮のヒアルロン酸合成酵素の合成に相反する効果のある TGF β 1⁴⁾の影響は考えにくく、卵殻膜ペプチドは他のサイトカインに影響を与え、ヒアルロン酸合成に関わるのかもしれない。ヒアルロン酸の保水能力を考慮すると、皮膚内水分量増加原因(図 3)の一部はヒアルロン酸量の増加に関わっていると考えられた。

角質層のセラミド量は 5%以上の摂食で減少した。この結果と水分蒸散量亢進の結果が一致した(図 2)。

皮膚粘弾性は、ヒアルロン酸やコラーゲン量の影響が考えられるが、分子レベルと粘弾性の間に

は明白な相関はなかった。コラーゲンは半減期の非常に長いタンパク質であるので、粘弾性に影響を与えるには、より長期の卵殻膜ペプチド摂取期間が必要なかもしれない。

我々は、卵殻膜ペプチドを表皮細胞へ添加し、表皮細胞の増殖率、セラミド合成酵素の mRNA 量を測定した(未発表データ)。卵殻膜ペプチドは、表皮細胞を増殖させ、さらにセラミド合成酵素 mRNA 量を増加させた。このことは、1 個 1 個の表皮細胞のセラミド合成が促進され、さらに表皮細胞も増えるので、卵殻膜ペプチドの皮膚への塗布は水分蒸散量を抑制する可能性が考えられた。

今回、皮膚内分子への効果はあったが、粘弾性には影響がなかった。今後は、摂取期間を長くするあるいは、皮膚機能が減少した加齢ラットなどによる研究を行うことで、さらなる効果が明らかになると考えられた。

■ 要 約

卵殻膜ペプチド摂取による皮膚への影響を検討した。卵殻膜ペプチドは、コラーゲン量やヒアルロン酸量を増加させ、皮膚内水分量を増加させる効果があると考えられた。さらに、表皮細胞を用いた実験では、細胞増殖能、セラミド合成酵素 mRNA 量を増加させたことから、卵殻膜ペプチドの摂取と皮膚への塗布の両方を行うことが水分蒸散量抑制かつ皮膚内水分量増加による皮膚機能の増強をさせ、老化抑制につながる可能性が考えられた。

■ 文 献

- 1) P. H. Weigel, et. al., Hyaluronan synthases., J. Biol. Chem., 272, 13997-14000(1997)
- 2) セラミド研究会編, セラミド - 基礎と応用 - ここまできたセラミド研究最前線, 食品科学新聞社, p64-65(2011)
- 3) 小出 輝、林 利彦編、細胞外マトリックス, 愛智出版, p53-93(2000)
- 4) Sayo, T, Inoue, S., et.al., Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 118, 43-48(2002)

表1 ラット摂食群とその略称名

群	略 称
AIN-76 (コントロール)	C
AIN-76+1%卵殻膜ペプチド	1%
AIN-76+3%卵殻膜ペプチド	3%
AIN-76+5%卵殻膜ペプチド	5%
AIN-76+10%卵殻膜ペプチド	10%

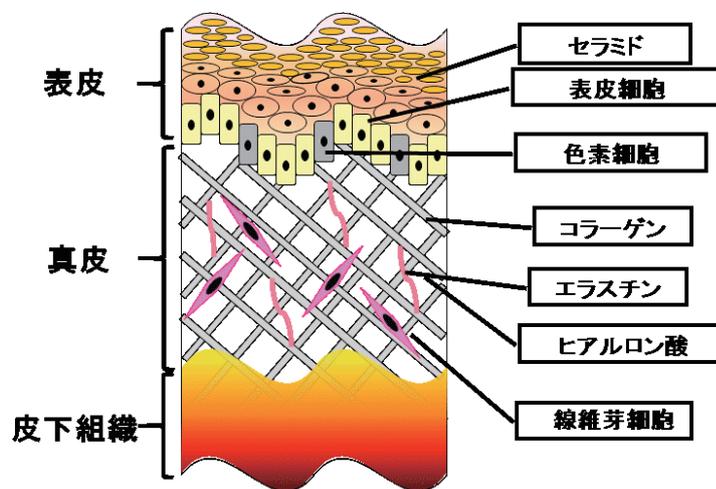


図1 皮膚の構造

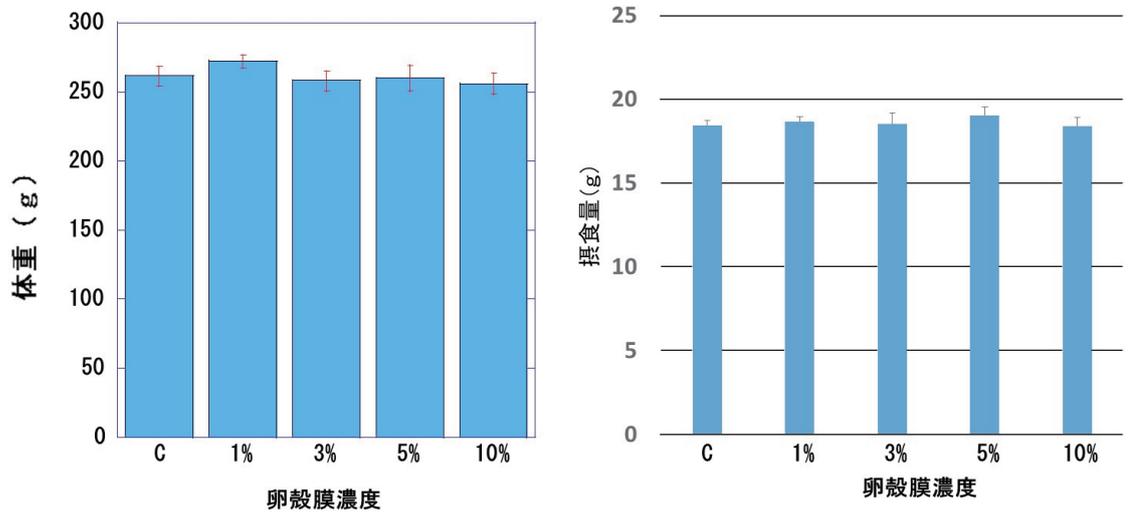


図2 卵殻膜摂食に体重および摂食量への影響

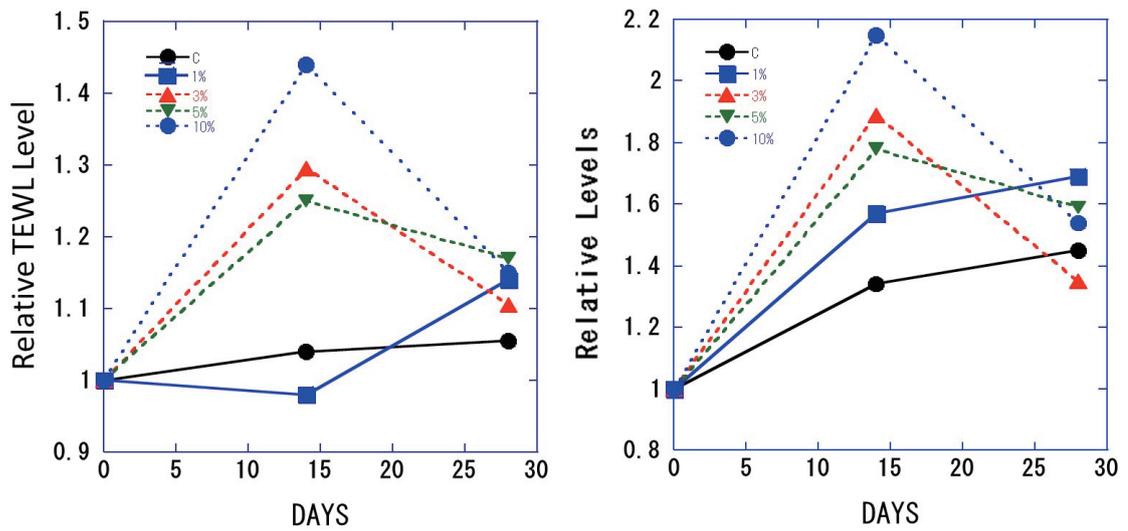


図3 卵殻膜摂食による皮膚水分蒸散量(左)、皮膚内水分量(右)への影響

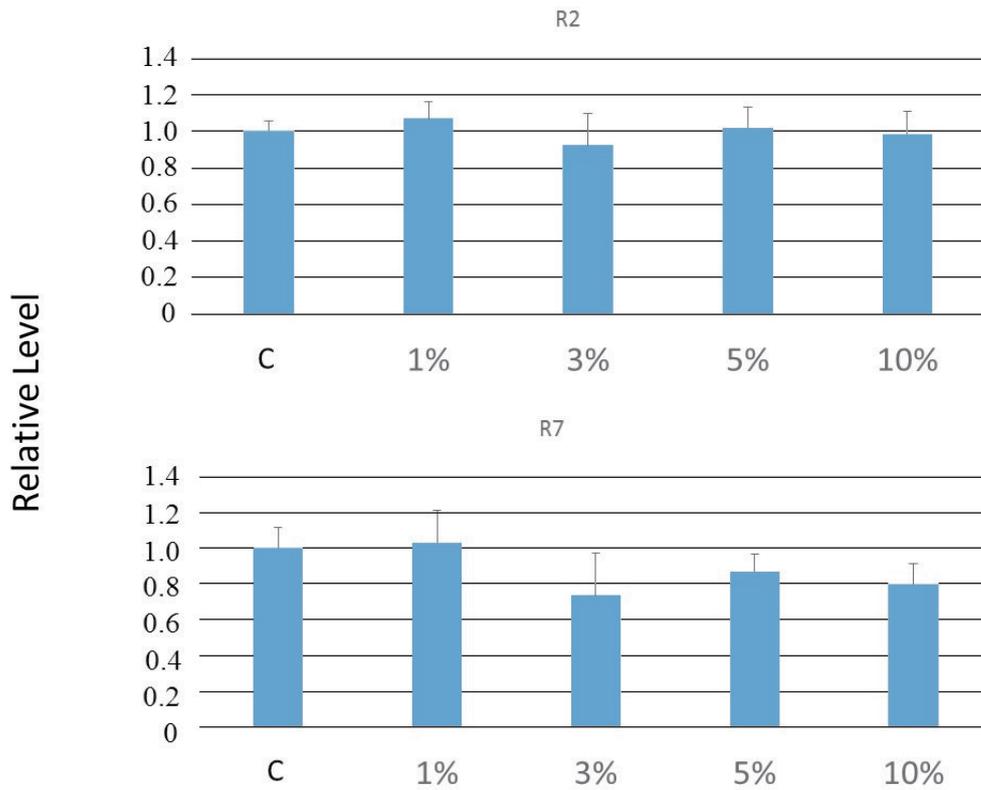


図4 卵殻膜摂食による皮膚粘弾性への影響 means ± SE

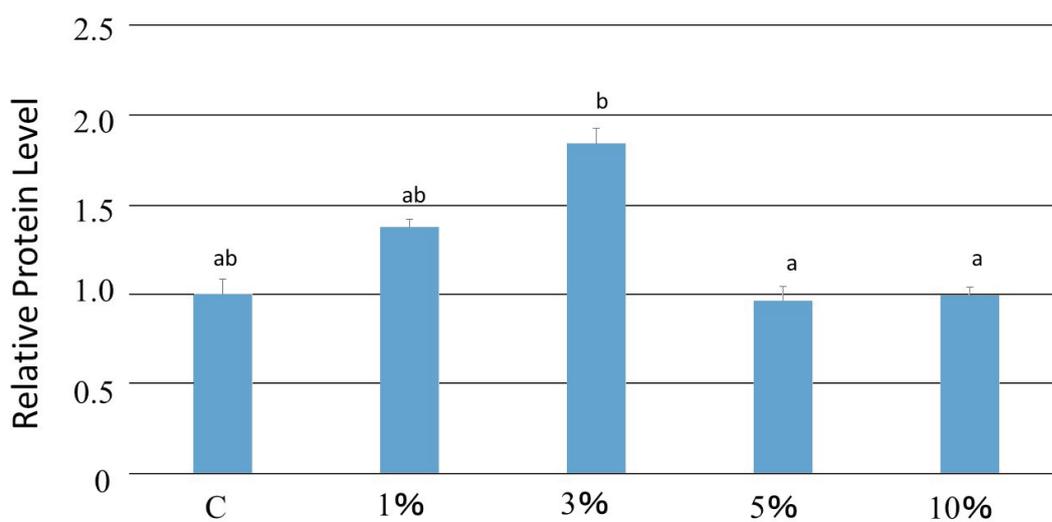


図5 卵殻膜摂食によるI型コラーゲン量への影響 means ± SE
 図中の異なる文字は、 $p < 0.01$ で有意差があることを示す。

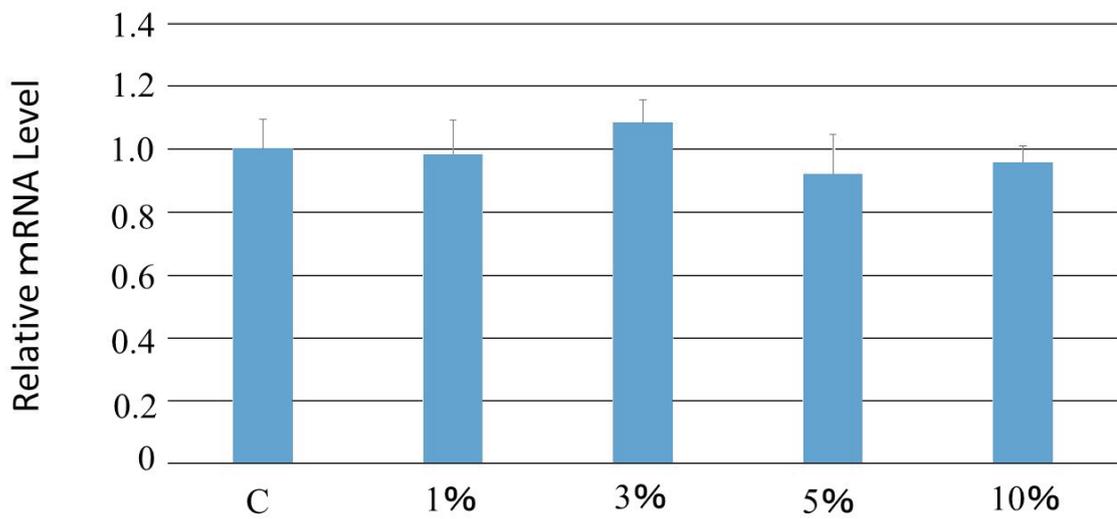


図6 卵殻膜摂食によるI型コラーゲン mRNA 量への影響 means ± SE

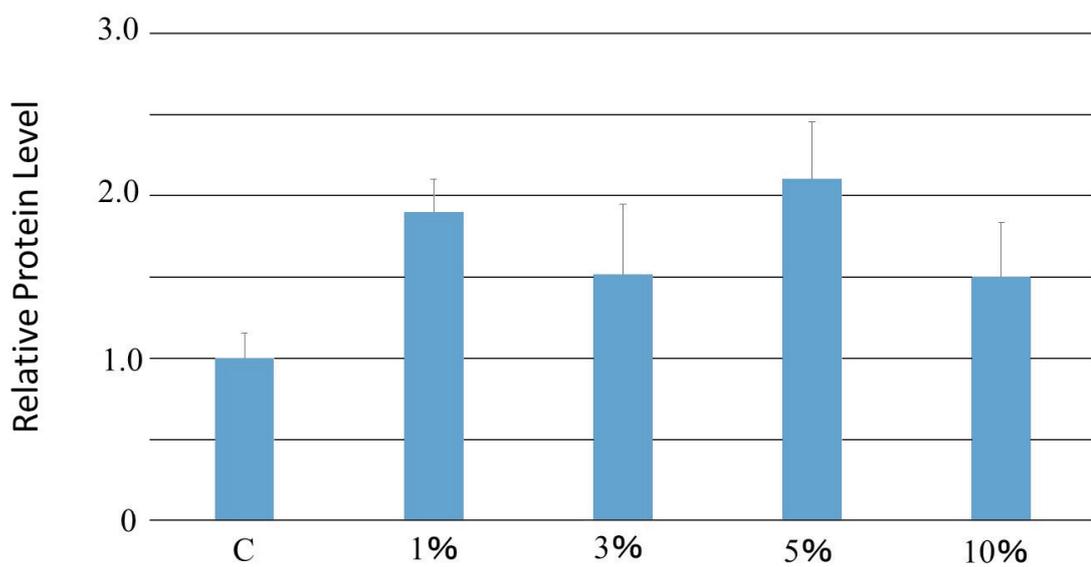


図7 卵殻膜摂食によるIII型コラーゲン量への影響 means ± SE

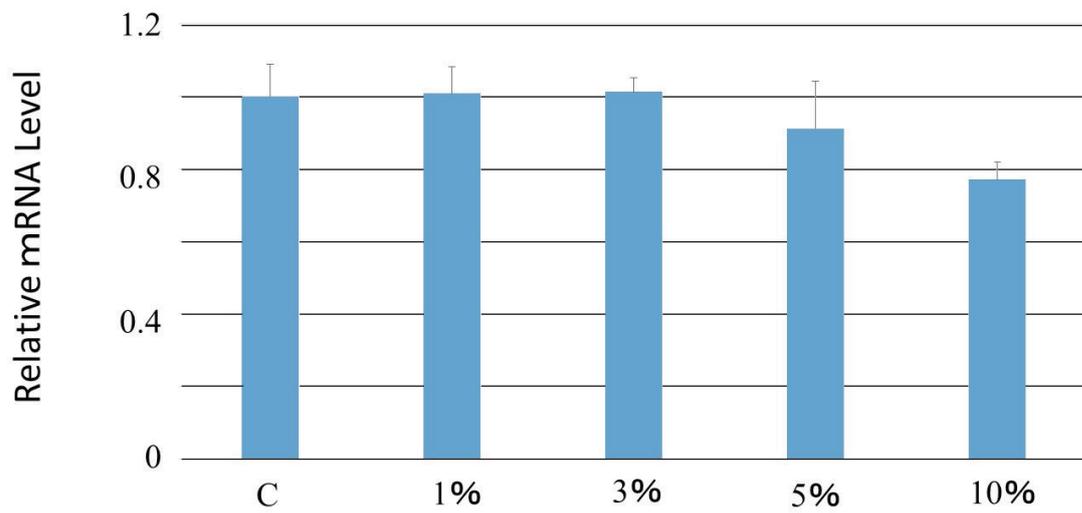


図8 卵殻膜摂食によるIII型コラーゲン mRNA 量への影響 means ± SE

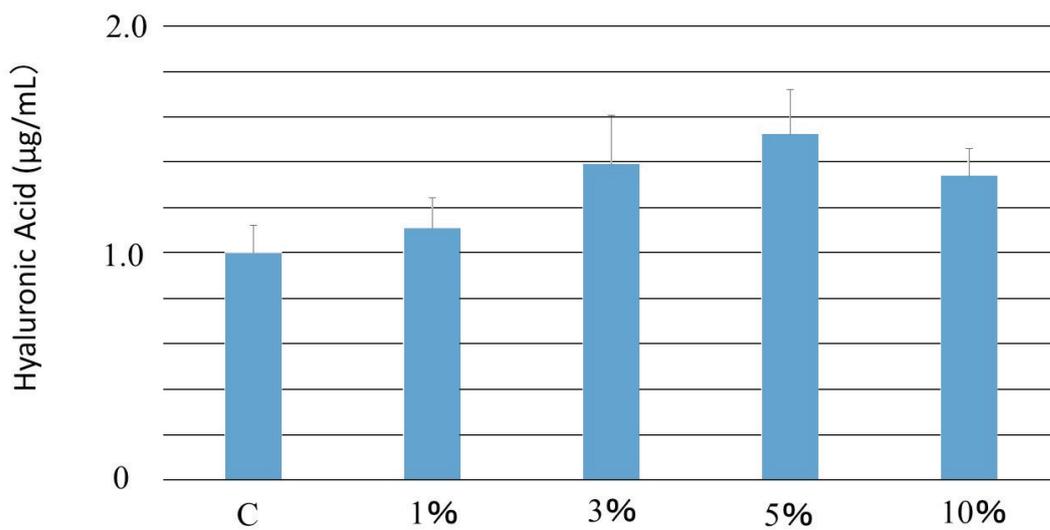


図9 卵殻膜摂食による皮膚ヒアルロン酸量への影響 means ± SE

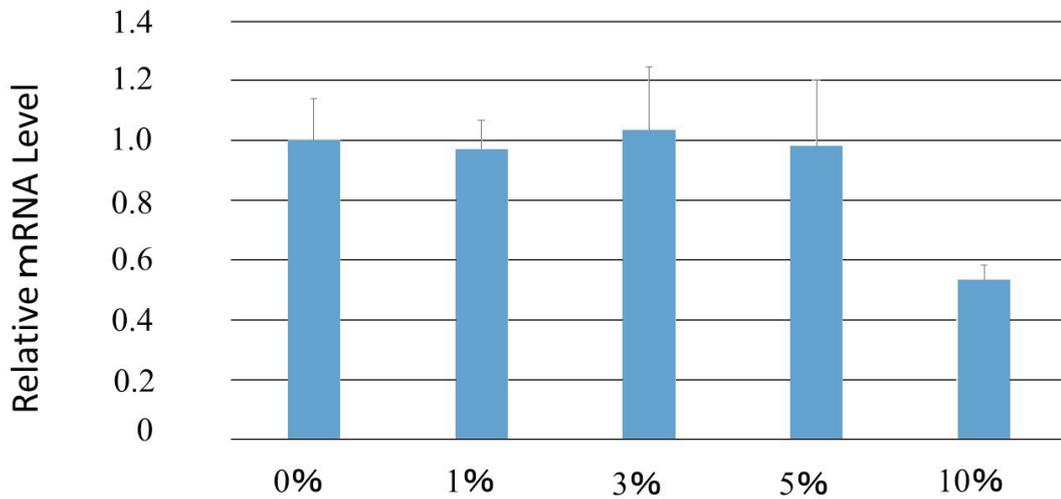


図 10 卵殻膜摂食によるヒアルロン酸合成酵素 2mRNA 量への影響 means ± SE

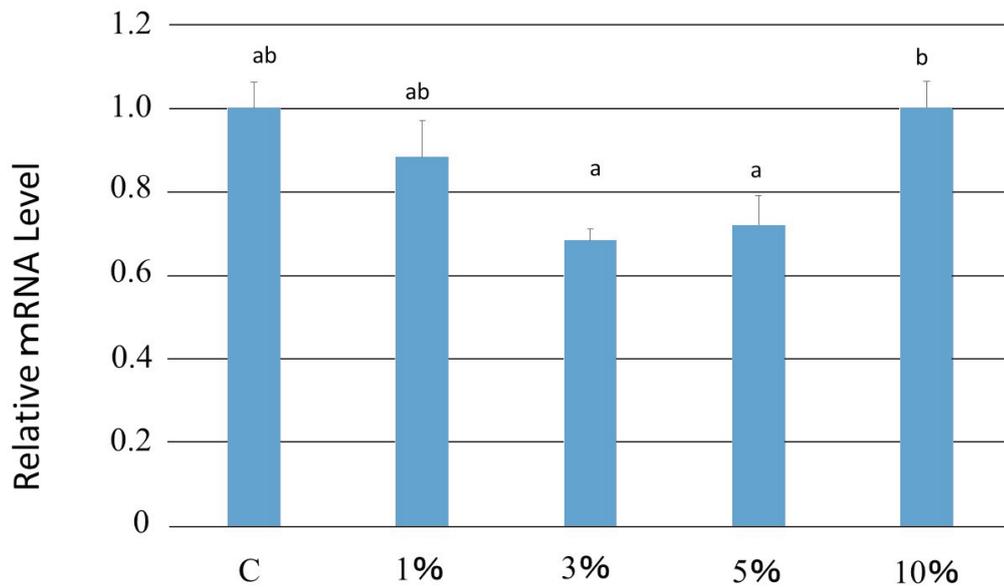


図 11 卵殻膜摂食によるヒアルロン酸合成酵素 3mRNA 量への影響 means ± SE
 図中の異なる文字は、 $p < 0.01$ で有意差があることを示す。

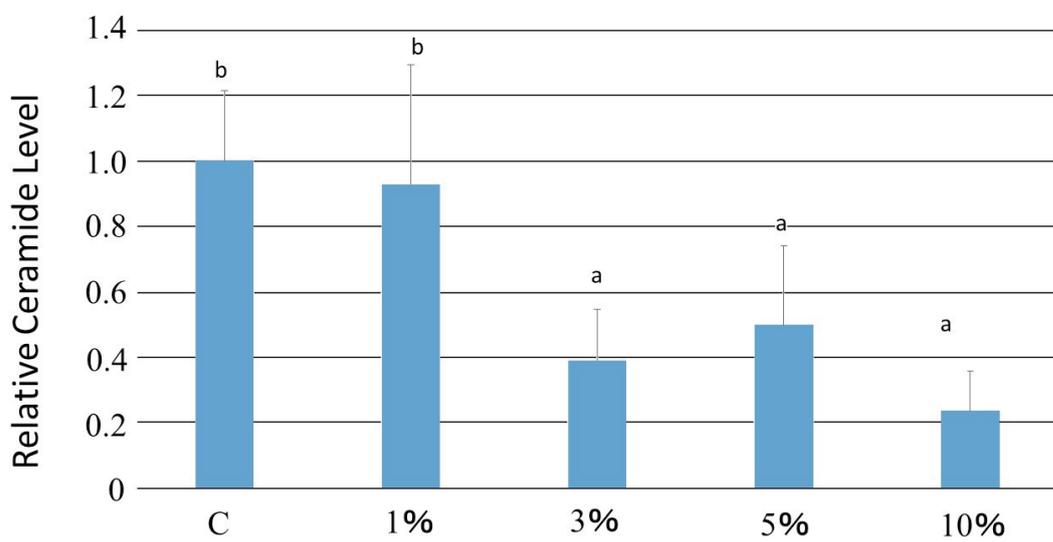


図12 卵殻膜摂食による表皮セラミド量への影響 means ± SE
 図中の異なる文字は、 $p < 0.01$ で有意差があることを示す。