

卵殻膜ペプチドの皮膚塗布による 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、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 が存在するといわれている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、平成 29 年度は、ヘアレスラットを用いて、卵殻膜ペプチドを摂取させ、皮膚への効果を分子レベルで検討した。その結果、1~5% 添加したエサ 4 週間摂取で皮膚コラーゲン量、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った³⁾。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 量増加作用があった。そこで、今回は、表皮細胞で認められた効果を in vivo で確認すべく、卵殻膜ペプチドを塗布することで表皮機能を増強できるか検討した。

■ 方 法

(1) 動物実験

9 週齢雄性ヘアレスラット(HWY/Slc)を AIN-93 にて、1 週間馴化飼育後、無塗布群、0、1、3、10、30mg/mL 卵殻膜ペプチド含有 50% アルコール塗布群の 6 群に分けて 4 週間飼育した。塗布は毎日、午前 10 時にそれぞれの水溶液を 200 μ L 背中全体に塗布した。食餌は、AIN-93 を午後 4 時から翌午前 10 時まで供与し、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 $^{\circ}$ 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 190001)行った。皮膚採取は、三種混合による麻酔後に行った。なお、28 日目には、麻酔後、皮膚内水分量、水分蒸散量、皮膚粘弾性を測定した。

(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、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(終濃度 1mg/mL)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 で有意差検定を行った。

■ 結 果

(1) 体重および摂食量(図 2)

6 群に大きな差は認められなかった。摂食量においても大きな差はなかった。

(2) 皮膚内水分量(図 3)

6 群に大きな差は認められなかった。

(3) 水分蒸散量(図 4)

無塗布群に比し、0mg/mL 卵殻膜ペプチド群で減少傾向が認められ、1 ~ 30mg/mL 塗布群で 3mg/mL まで徐々に増加し、30mg/mL では 0mg/mL に比して有意に増加した。

(4) 皮膚粘弾性(図 5)

皮膚粘弾性は無塗布群に比し、0mg/mL 卵殻膜ペプチド群で減少傾向を示し、濃度依存的に増加し、30mg/mL 群では 0mg/mL 群と比して有意に増加した。

(5) トロポコラーゲン量(図 6 ~ 9)

I 型トロポコラーゲン量は無塗布群と 0mg/mL 卵殻膜ペプチド群に差はなく、1 ~ 30mg/mL で 0mg/mL と比して増加傾向が認められた(図 6)。その mRNA 量は 1mg/mL で最も高い値を示した。3 ~ 30mg/mL では 0mg/mL 群と変わらなかった(図 7)。

III 型トロポコラーゲン量は、無塗布群で最も高い値を示し、3 ~ 30mg/mL 群では無塗布群よりも有意に低い値となった(図 8)。mRNA 量は 1mg/mL 群で最も高い値を示し、I 型トロポコラーゲン mRNA 量と同傾向だった(図 9)。

(6) ヒアルロン酸量(図 10 ~ 11)

全群で大きな差は認められなかった(図 10)。その遺伝子 rhas2mRNA 量は 0mg/mL で最も高い値を示し、30mg/mL 群は 0mg/mL と比して有意に低い値だった。rhas3mRNA 量は全群で大きな差は認められなかった(図 11)。

(7) セラミド量(図 12 ~ 13)

0mg/mL 卵殻膜ペプチド塗布群は無塗布群と比して、減少傾向を示した。1 ~ 30mg/mL 各群は 0mg/mL と比して有意に増加した(図 12)。しかし、その遺伝子の mRNA 量は全群で大きな差は認められなかった(図 13)。

■ 考 察

平成 29 年度には、卵殻膜ペプチドを摂食させることにより、コラーゲン量、ヒアルロン酸量を増加させる効果があった。摂食では、表皮のセラミド量を増加させることはなかったが、表皮角化細胞レベルでは細胞増殖、セラミド合成酵素 mRNA 量を増加させる効果があったことから、今回は、in vivo レベルで卵殻膜ペプチド水溶液(50%エタノール含有)を塗布することによる皮膚への効果を確認することにした。摂食で効果のあったトロポコラーゲン量は I 型において、1mg/mL 塗布により増加傾向があったが摂食による効果より低かった(図 6)³⁾。III 型トロポコラーゲン量には塗布による効果は認められなかった(図 8)。ヒアルロン酸量も塗布による効果はなかった(図 10)。皮膚粘弾性はこれら分子による影響が大きいと考えられるが、摂食よりも塗布の方が、粘弾性が上昇するという結果だった³⁾。本結果は、エラスチンという粘弾性に大きく関わるもう一つの分子による影響かもしれない。今後はエラスチンに関する測定を行っていきたいと考えている。

表皮に存在するセラミドは皮膚からの水分蒸散を防ぐ効果がある。今回、3mg/mL 以上の卵殻膜ペ

プチド塗布により水分蒸散量が増加するという結果となった(図 4)。これは、皮膚が荒れていることを意味する。一方、セラミドは 1mg/mL 以上で 0mg/mL と比して有意に増加した(図 12)。このことは 1mg/mL 以下の濃度でもセラミドを増加させる効果があり、その濃度で水分蒸散量が減るのかもしれない。また、皮膚内水分量が上昇したために水分蒸散量も上昇したのかもしれない。今後はより低濃度の塗布の検討をしたいと考えている。セラミドは SPT という酵素が律速酵素といわれており、今回、その酵素の mRNA 量を測定した。その結果、各群の SPTmRNA 量に大きな差はなかった(図 13)。セラミド量が増加したこととこのことから、各細胞における SPT 活性が高くなったのではなく、表皮角化細胞数が増加した、あるいはセラミド合成の他の酵素が変化したことが考えられた。

以上のことから、卵殻膜ペプチドの塗布は、摂食と異なり、表皮のセラミド量を増加させる効果があることが分かった。よって、平成 29 年度結果と今回の結果から、卵殻膜ペプチドの摂食かつ塗布を行うことは、コラーゲン、ヒアルロン酸、セラミド量を増加させ、皮膚機能を増強させる可能性がある。また、1mg/mL の塗布は濃すぎた可能性もあった。よって、今後は、1～5%程度含む卵殻膜ペプチドの摂食かつ 1mg/mL 以下での塗布により、皮膚機能改善効果があるか検討したいと考えている。

■ 要 約

摂食により皮膚コラーゲン量、ヒアルロン酸量を増加させる卵殻膜ペプチドを塗布することにより、表皮セラミド量への影響を検討した。その結果、1～30mg/mL の卵殻膜ペプチド水溶液(50%エタノール)200 μ L、4 週間塗布により、セラミド量を有意に増加させた。しかし、水分蒸散量は 3～30mg/mL で増加傾向があった。このことは卵殻膜ペプチド 1mg/mL 以下での塗布が適している可能性を示唆していた。また、これらの濃度で皮膚の粘弾性が上昇した。前回と今回の結果から、卵殻膜ペプチドの摂食かつ塗布は、コラーゲン、ヒアルロン酸、セラミド量を増加させるといった皮膚機能改善効果を有する可能性があった。

■ 文 献

- 1) P. H. Weigel, et. al., Hyalronan 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) 大石祐一、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、平成 29 年度研究報告概要集、一般財団法人旗影会, p97-106(2017)

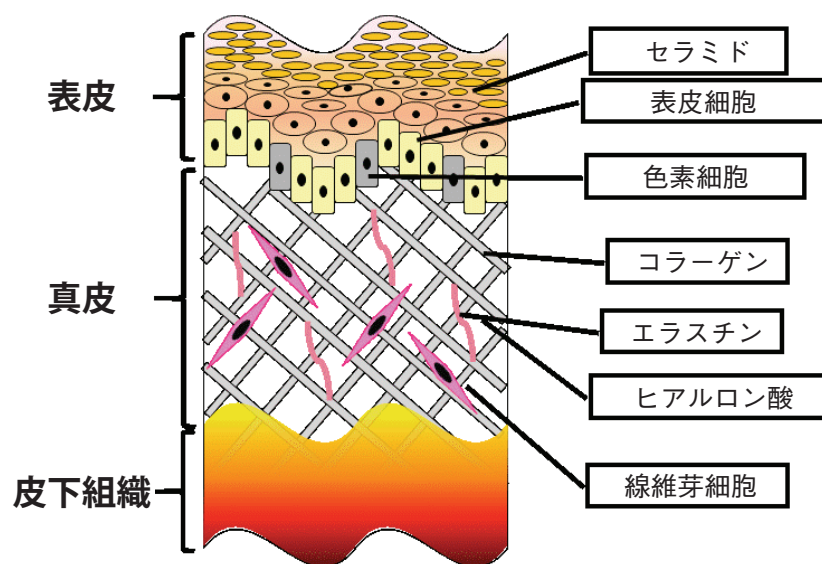


図1 皮膚の構造

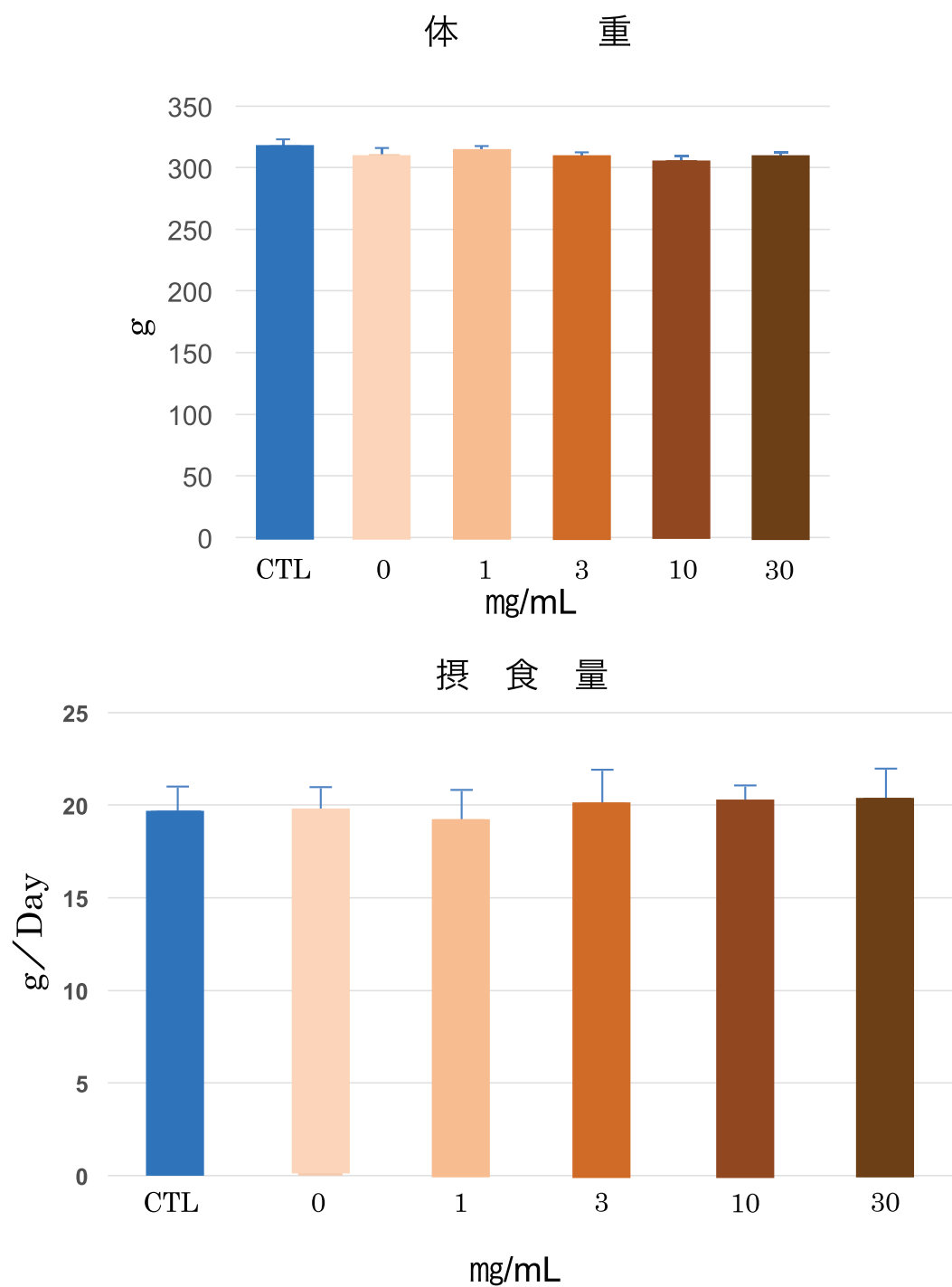


図2 卵殻膜ペプチド塗布による体重、摂食量への影響

CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液（50％エタノール）塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群

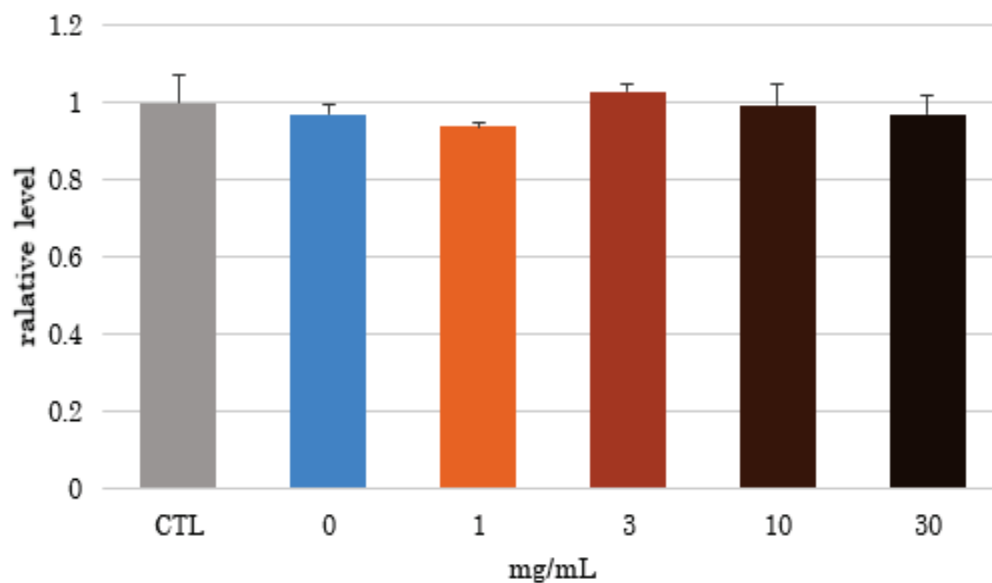


図3 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚内水分量への影響

CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液(50％エタノール)塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群

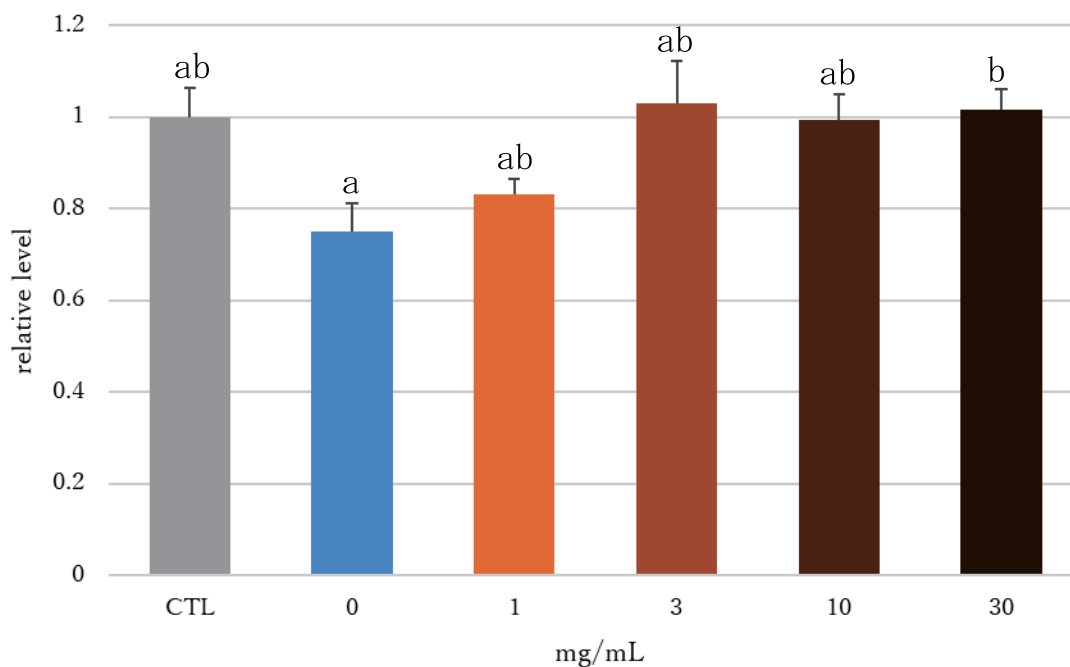


図4 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚内水分蒸散量への影響

CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液(50％エタノール)塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群

図中のアルファベットが異なる場合は $p < 0.05$ で有意差あり。

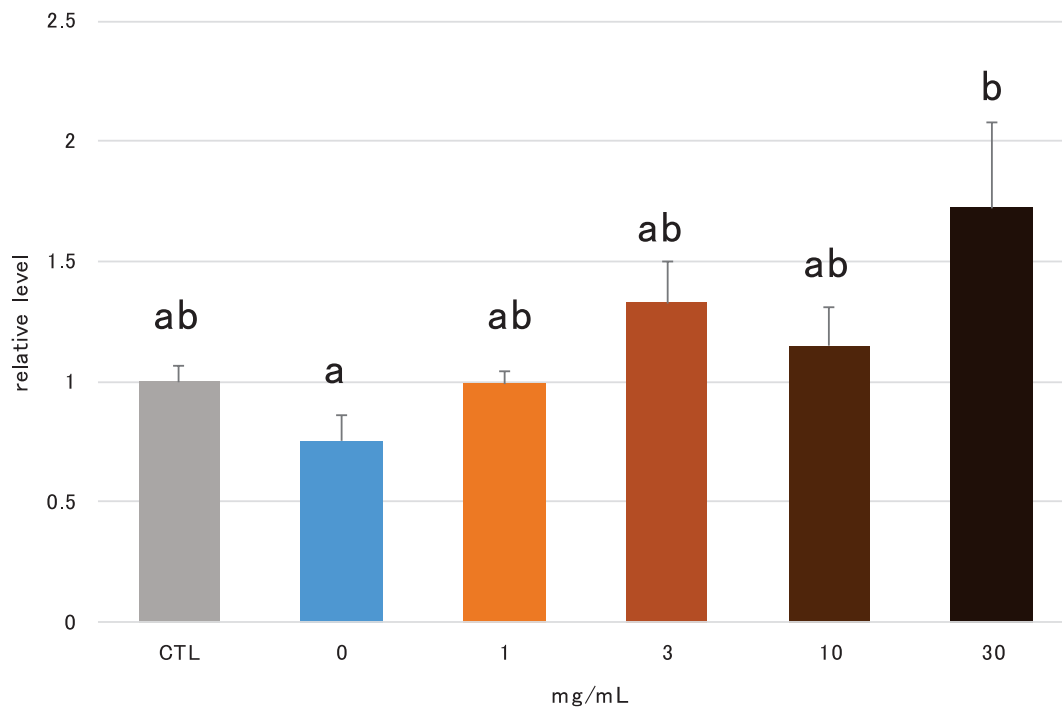


図5 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚粘弾性への影響

CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液(50％エタノール)塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群

図中のアルファベットが異なる場合は $p < 0.05$ で有意差あり。

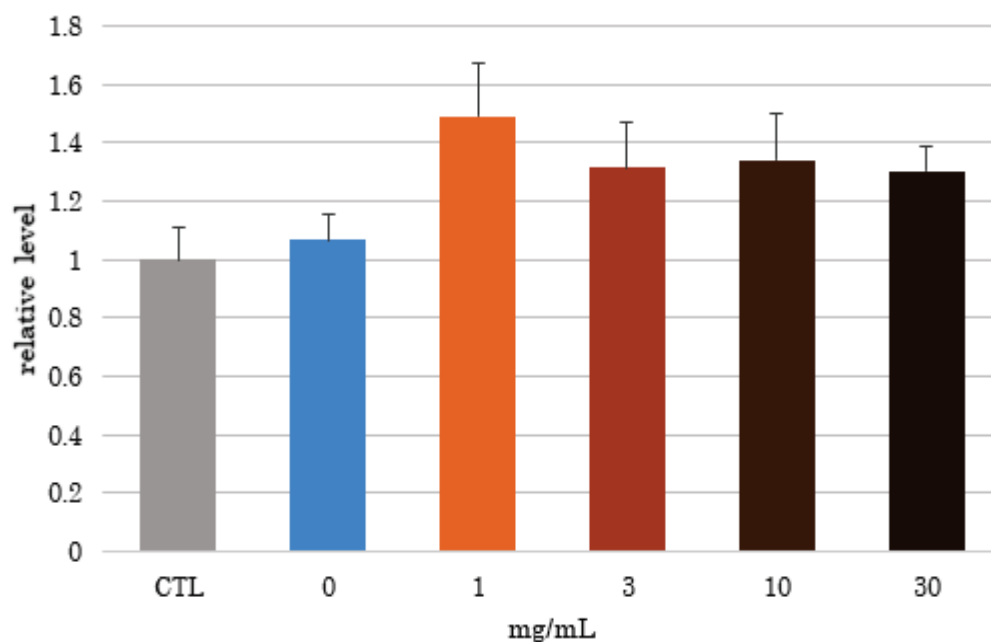


図6 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚Ⅰ型トロポコラーゲン量への影響

CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液(50％エタノール)塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群

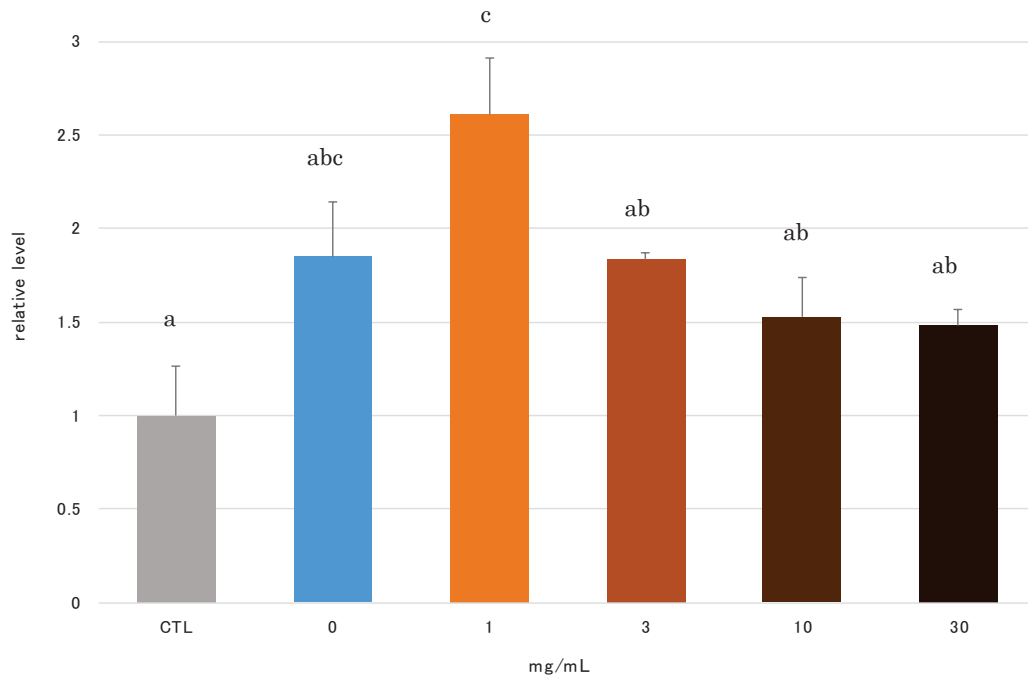


図7 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚Ⅰ型トロポコラーゲン mRNA(*col1a1*)量への影響
 C CTL; コントロール、0;50%エタノール塗布群、1;1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液(50%エタノール)塗布群、3;3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10;10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30;30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群
 図中のアルファベットが異なる場合は $p<0.05$ で有意差あり。

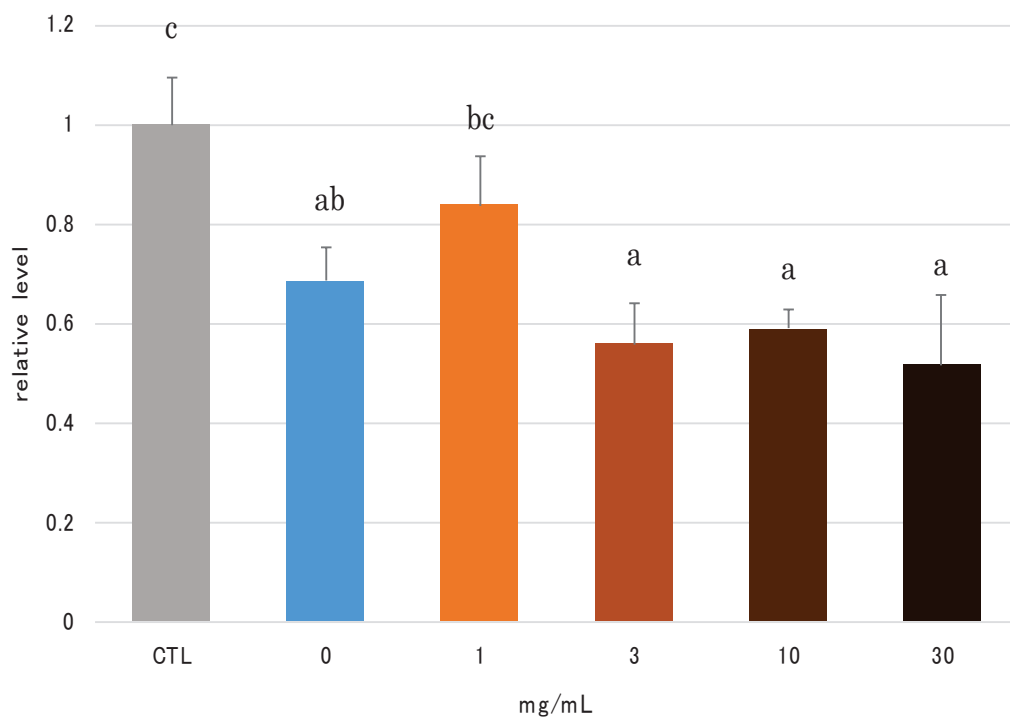


図8 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚Ⅲ型トロポコラーゲン量への影響
 CTL; コントロール、0;50%エタノール塗布群、1;1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液(50%エタノール)塗布群、3;3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10;10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30;30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群
 図中のアルファベットが異なる場合は $p<0.05$ で有意差あり。

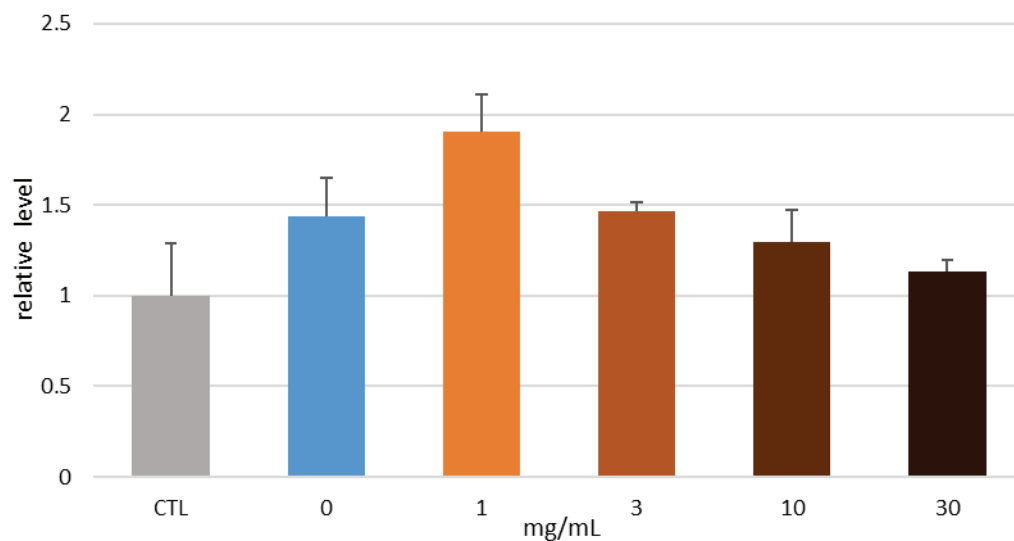


図9 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚Ⅲ型トロポコラーゲン mRNA(*col3a1*)量への影響
CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液(50％エタノール)塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群

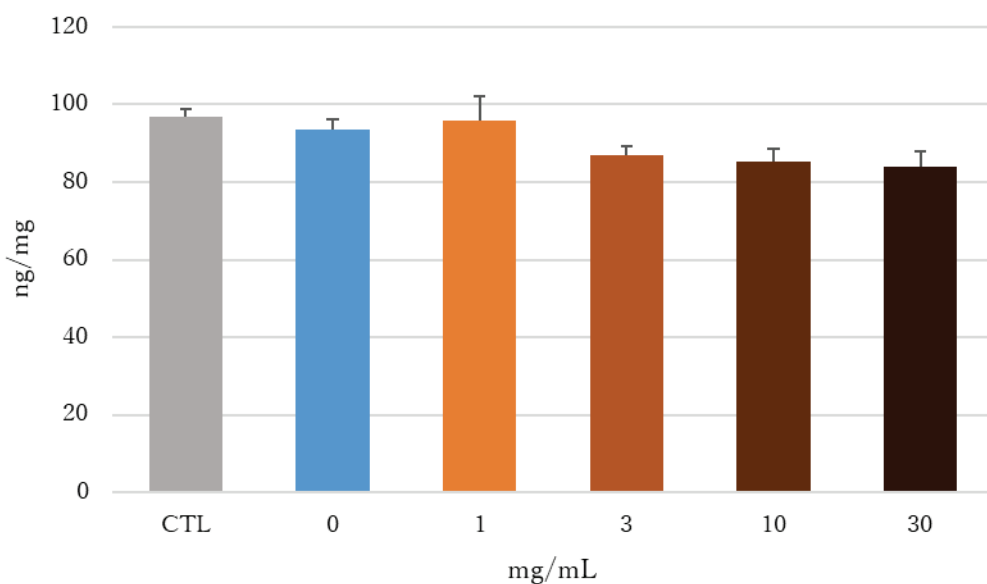


図10 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚ヒアルロン酸量への影響
CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液(50％エタノール)塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群

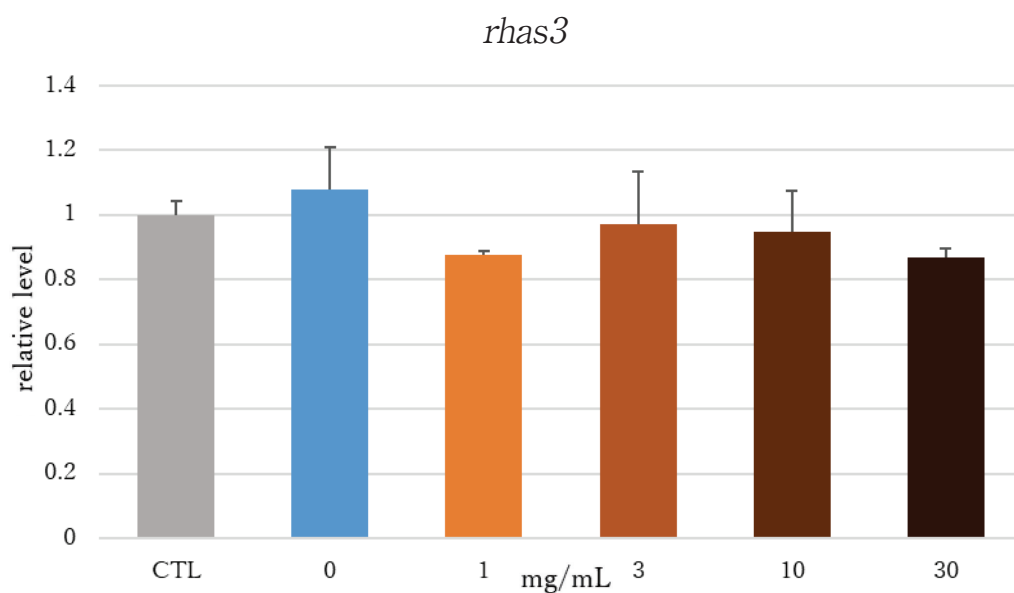
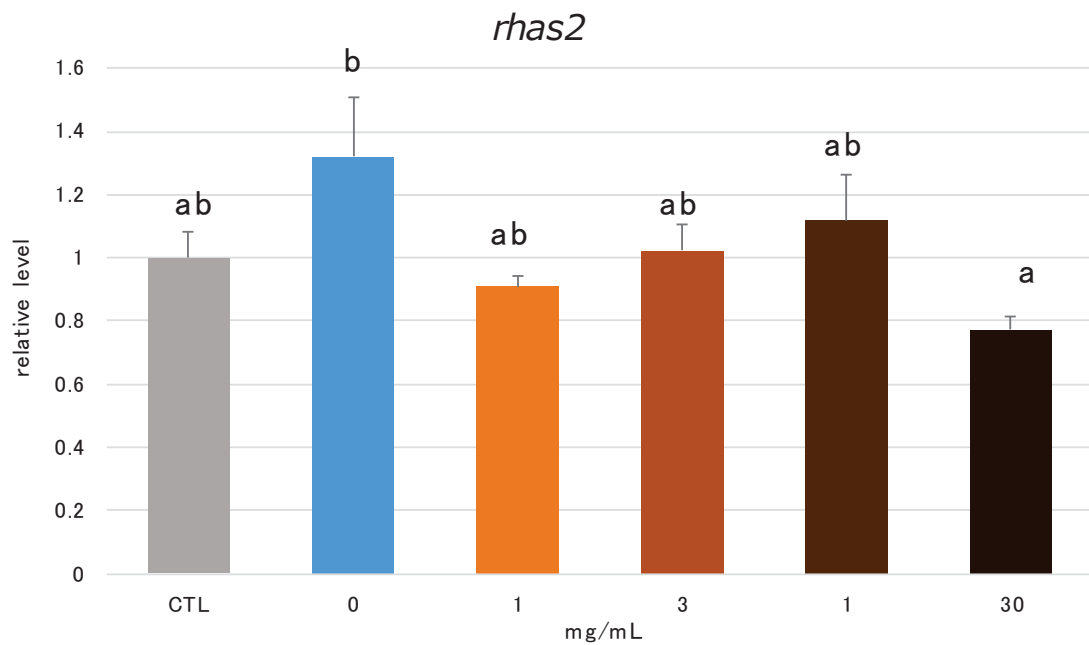


図 11 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚ヒアルロン酸量への影響

CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液（50％エタノール）塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群 *rhas2* は主に真皮に存在するヒアルロン酸合成酵素、*rhas3* は主に表皮に存在するヒアルロン酸合成酵素。

図中のアルファベットが異なる場合は $p < 0.05$ で有意差あり。

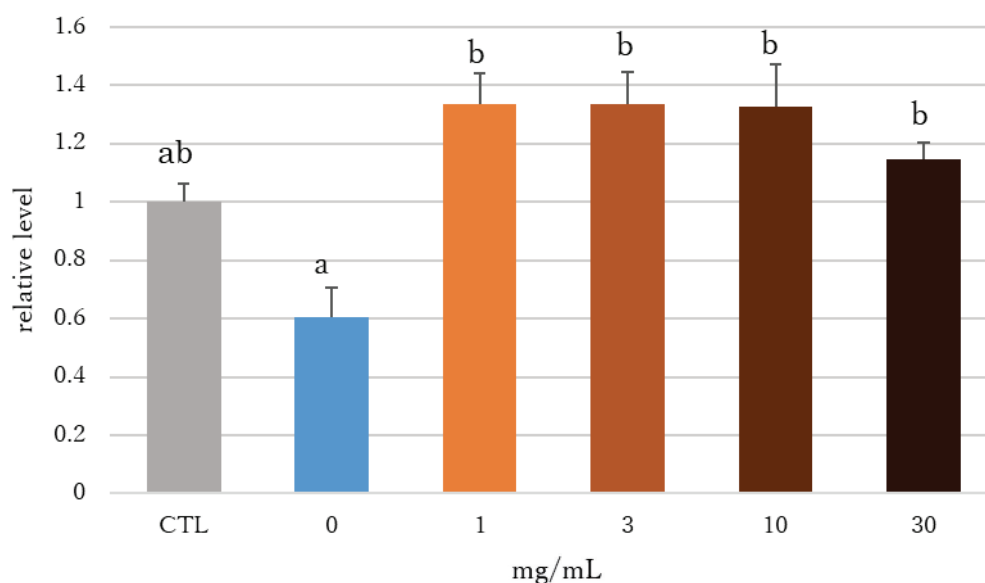


図 12 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚セラミド量への影響

CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液 (50％エタノール) 塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群

図中のアルファベットが異なる場合は $p < 0.05$ で有意差あり。

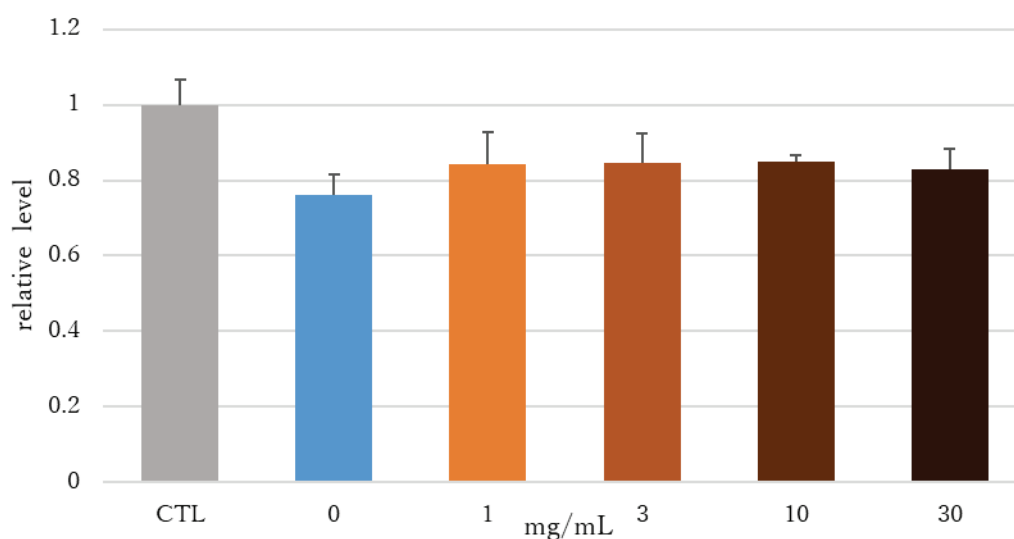


図 13 卵殻膜ペプチド塗布による皮膚セラミド律速酵素 SPTmRNA 量への影響

CTL；コントロール、0；50％エタノール塗布群、1；1mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液 (50％エタノール) 塗布群、3；3mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、10；10mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群、30；30mg/mL 卵殻膜ペプチド水溶液塗布群