

ビタミン C の摂取によるヒアルロン酸合成を介した 皮膚恒常性の維持

東京農工大学農学部附属硬蛋白質利用研究施設・准教授 宮田 真路

■ 目的

真皮の線維芽細胞は、皮膚に柔軟性と強度を与えるヒアルロン酸、コラーゲン、エラスチンなどの細胞外マトリックス分子を多量に分泌する。我々はこれまでに、ビタミン C (VitC) が副腎において糖質コルチコイドの分泌を抑える働きがあることを見出している。糖質コルチコイドは皮膚においてヒアルロン酸合成酵素の発現を強力に抑制することが報告されている。そこで、ヒアルロン酸合成を介して皮膚恒常性に貢献する食品成分として VitC に着目した。ヒアルロン酸の機能はその鎖長によって大きく変化するため、ヒアルロン酸の量だけでなく分子サイズを解析する必要がある。本研究では、微量の組織試料からヒアルロン酸の分子量を測定する技術を確認し、VitC が皮膚ヒアルロン酸に及ぼす影響を解明することを目指した。

■ 方法

1. 実験動物

ODS ラットを 6 週齢の時点で二群に分け 14 日間飼育した。対照群の実験食にはアスコルビン酸が 0.3g/kg 含まれており、VitC 欠乏群の実験食にはアスコルビン酸が含まれていない。

2. 血中コルチコステロンおよび副腎皮質刺激ホルモンの定量

対照群、VitC 欠乏群の血清を用い、競合 ELISA 法によって定量した。

3. 遺伝子発現の解析

対照群、VitC 欠乏群の皮膚から単離した RNA から cDNA を得たのち定量 PCR 法により転写産物の定量を行った。

4. ヒアルロン酸の生化学的解析

試料中のヒアルロン酸濃度を競合的 ELISA 様で測定した。試料にビオチン化ヒアルロン酸結合タンパク質とストレプトアビジン結合磁気ビーズを加え反応させた後に、ビーズを回収した。試料をアガロースゲル電気泳動で分離し、Stains-All で染色することで分子量を計測した。

■ 結果および考察

2 週間の VitC 欠乏の後、皮膚を含むすべての組織で VitC のレベルが有意に減少した。副腎では高濃度の VitC が欠乏時に急速に低下することから、視床下部-下垂体-副腎系が影響を受けるか検討した。その結果、VitC の欠乏は下垂体からの ACTH 分泌を変化させることなく、副腎における糖質コルチコイド合成を増加させることが分かった。

次に、皮膚におけるヒアルロン酸合成酵素 (Has) の遺伝子発現を調べた。皮膚においては、*Has2* が主に発現しており、*Has1* および *Has3* の発現レベルは非常に低かった。しかしながら、VitC 欠乏群では対照群に比較して *Has2* の発現量にわずかに低下するものの、個体差が大きく統計学的な有意差は見られなかった。

競合的 ELISA 法により各組織に含まれるヒアルロン酸を定量した結果、皮膚には他の臓器に比べて高濃度のヒアルロン酸が含まれることが分かった。次に、組織に含まれるヒアルロン酸の分子量を簡便に測定する方法の開発を行った。その結果、検出限界が 100 ng で、複数の試料に含まれるヒアルロン酸のサイズを同時に比較できる測定系が確立できた。この方法を用い、皮膚には 1000kDa 以上の高分子ヒアルロン酸を多く含むことが分かった。一方で、脳は他の組織と比較すると低分子ヒアルロン酸を多く含むことが示された。今回の研究では正常動物のヒアルロン酸解析に成功したものの、VitC 欠乏が及ぼす影響を明らかにするには至らなかった。

■ 結語

2 週間の VitC 欠乏により血中の糖質コルチコイド濃度が増加したにも関わらず、*Has2* の発現低下が見られなかった。本研究では、ヒアルロン酸の分子量を解析する手法の開発にも取り組んだ。我々の方法は、すべての手順が、1 日から 2 日で完了し、1 つのゲルで複数の試料のヒアルロン酸のサイズを同時に比較できる。本研究で確立したヒアルロン酸の分析手法は、複数の生物学的サンプルからのヒアルロン酸のサイズ分布を迅速に分析するために有益だと考えられる。