

紫外線照射による皮膚悪化の卵殻膜摂食 および塗布による効果の分子レベル解析

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。真皮には、I型、III型などのコラーゲンが存在し、皮膚の形、はりに関わりとともに、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。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であるといわれている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 *de novo* 合成は、Serine palmitoyltransferase (SPT) が律速酵素として関わっている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言われている。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³⁾。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食させ、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週間摂食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、あるいは塗布による動物実験では、細胞増殖能、セラミド合成酵素 SPT mRNA 量増加作用があった⁴⁾。

現在、徐々に地表での紫外線量が増加しており、欧米では皮膚がんなどに対する危機感が増えている。紫外線は皮膚コラーゲン、ヒアルロン酸、セラミド、エラスチンの代謝に影響を与え、皮膚機能を悪化させる。今までに明らかにした卵殻膜ペプチド摂食の効果を利用して、本研究では、卵殻膜ペプチド摂食による紫外線照射した皮膚への効果を分子レベルで解析することを目的とした。なお、紫外線(UV)は、週3回4週間0.1~3J/cm²照射する予備実験を行い、皮膚でのCxcl1、S100A8などの炎症マーカーのRNA量を測定し、照射量3J/cm²に決定した。

■ 方 法

(1)動物実験

8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、AIN-93摂食群(コントロール、C群)、AIN-93摂食+UV3J/cm²週3回照射群(UVC群)、卵殻膜ペプチド3%含有AIN-93摂食群(3%群)、卵殻膜ペプチド3%含有AIN-93摂食群+UV3J/cm²週3回照射群(UV3%群)、卵殻膜ペプチド5%含有AIN-93摂食群(5%群)、卵殻膜ペプチド5%含有AIN-93摂食+UV3J/cm²週3回照射群(UV5%群)の6群に分けて4週間飼育した。食餌は、AIN-93を午後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±2°C、湿度は50±10%に保った。1群は5匹とした。卵殻膜ペプチドはキューピー株式会社より供与していただいた。3%および5%の卵殻膜含有の場合、ショ糖を減らして添加した。紫外線はラット背部に照射した。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2022065)行った。皮膚採取は、三種混合麻酔薬投与後に背部から行った。

(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ELISA、III型トロポコラーゲン量はウエスタンブロッティング法

を用い、バンドの数値化は 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) で処理し、糖質を抽出後、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

角質層セラミドなどの皮脂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 にて数値化した。

(5)mRNA 量の測定

皮膚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

4 週間の動物実験において、各群間での摂食量、体重には有意な差は認められなかった(データ示さず)。紫外線照射による炎症を確認すべく、皮膚 RNA を用いて炎症マーカーである Chemokine(C-X-C motif)ligand 1(Cxcl1)、S100 タンパク質 A8(S100A8)の mRNA 量を測定したところ、有意ではなかったが、C 群と比して CUV 群で増加傾向だった(図 1)。よって、本実験系で卵殻膜ペプチド摂食による紫外線照射への影響を検討できると判断した。Cxcl1 mRNA は、3%群で有意に増加した。S100A8 mRNA 量も 3%群で高かった。

I 型トロポコラーゲン量は 3, 5%群で増加することはなかった。また UV 照射することによるトロポコラーゲン量減少傾向は 5%群で抑制傾向だった。I 型トロポコラーゲンに関与する Colla1 mRNA 量は各群で大きな差は認められなかった(図 2)。III型トロポコラーゲンは、どの群でも差は認められなかった。一方その遺伝子 Col3a1 の mRNA 量は UVC, 3, 5%群で増加傾向だった(図 3)。

ヒアルロン酸量は、UVC 群と比して UV5%群で減少傾向だった(図 4)。真皮での合成に重要な HAS2 は 5%群で増加傾向だった。UV3%および UV5%群は、3%、5%群と比してそれぞれ減少傾向だった(図 5)。表皮での合成に重要な HAS3 は 3%、5%群で増加傾向だったが、UV3%、UV5%群は、3%、5%と比して、それぞれ減少傾向だった(図 5)。

セラミド量は、どの群でも差は認めれなかった(図 6)。セラミドの *de novo* 合成律速酵素である SPT の mRNA 量は、3%群で有意に減少した(図 6)。水分蒸散量は、どの群でも変化がなかった(データ示さず)。

■ 考 察

これまでに卵殻膜ペプチドの摂食により、コラーゲン量、ヒアルロン酸量を増加させ、塗布により、セラミド合成を促進させることを明らかにしてきた。そこで、今回は、ラットに紫外線を照射し、炎症を惹起した皮膚への卵殻膜ペプチド摂食による効果を検討した。ラットに慢性的に紫外線を照射する研究が今までにほとんどなく、照射量の決定の予備実験を行ったところ、3J/cm²、週 3 回の照射で炎症が惹起されることを確認した(図 1)。このモデルを用いて、4 週間、3 あるいは 5%濃度で卵殻膜ペプチドを摂食させ、コラーゲン量、ヒアルロン酸量、セラミド量およびこれら分子に関わる mRNA 量を測定した。その結果、紫外線によって上昇する炎症マーカーの mRNA 量は 3%摂食群有意に高く、5%摂食群でも高かった。その原因は不明である。今後の検討課題としたい。

紫外線照射により、コラーゲン量、ヒアルロン酸量、セラミド量に顕著な変化はなかった。また、紫外線照射したラットに卵殻膜ペプチドを摂食させても大きな変化はなく(図 2~6)、卵殻膜ペプチド摂食は紫外線照射により炎症を惹起した皮膚には影響を与えることはないと判断した。しかし、卵殻膜ペプチドは、真皮に多く存在するヒアルロン酸合成酵素 2 の mRNA 量を増加させる効果があった。ヒアルロン酸は年齢とともに顕著に減少する分子であることから、卵殻膜ペプチドの摂食は、紫外線による光加齢よりも、加齢に有効である可能性が高いと考えられた。

■ 要 約

現在、徐々に地表での紫外線量が増加しており、欧米では皮膚がんなどに対する危機感が増えている。紫外線は、皮膚内分子である、ハリ、繊維芽細胞の足場となるコラーゲン、皮膚内の水分を保持

し、免疫系を維持するヒアルロン酸、体内の水分を維持し外的環境から身を守るセラミド、弾力性、粘弾性に重要なエラスチンの代謝に影響を与え、シワの形成促進だけでなく、皮膚機能を悪化させる。一方、卵殻膜ペプチド摂取は、ヒアルロン酸量、コラーゲン量を増加させ、また塗布はセラミド合成を促進することがわかっている。そこで、本研究では、慢性的に紫外線照射したラットに卵殻膜ペプチドを摂取させ、紫外線照射した皮膚への効果を分子レベルで解析することを目的とした。紫外線照射によって、炎症マーカー mRNA 量の増加傾向が認められた。3あるいは5%卵殻膜ペプチドを摂取させたところ、炎症マーカーが増加することが認められた。紫外線照射した皮膚への卵殻膜ペプチド摂取の効果はなかった。しかし、5%卵殻膜ペプチド摂取はヒアルロン酸合成酵素2の mRNA 量を増加させたことから、卵殻膜ペプチド摂取は紫外線照射による光加齢よりも通常の加齢に有効である可能性があった。

■ 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, セラミド研究の新展開 - 基礎から応用へ -, 食品科学新聞社, p22-31(2019)
- 3) 大石祐一、卵殻膜ペプチド摂取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)
- 4) 大石祐一、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の解析、2019 年度研究報告概要集、一般財団法人旗影会, p72-82(2019)

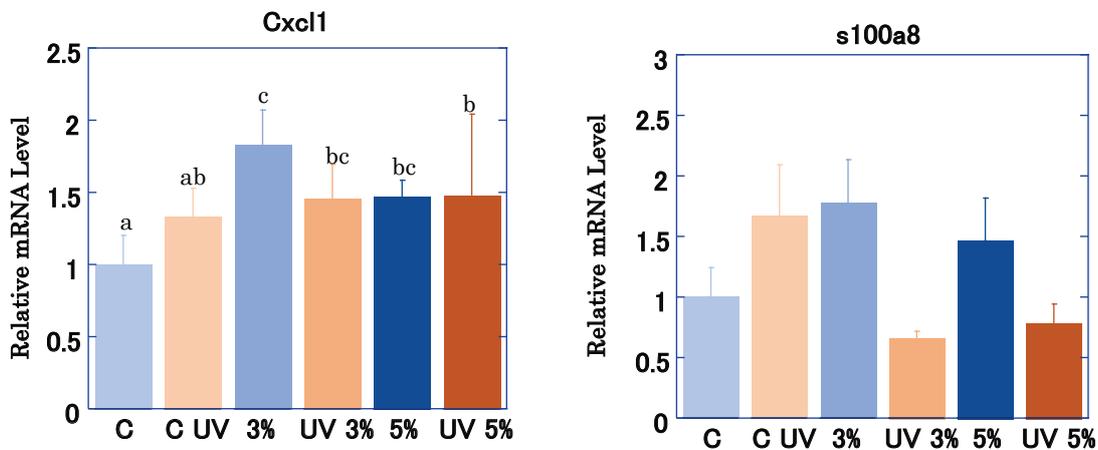


図1 皮膚炎症マーカーCxcl1およびS100A9のmRNA量

C;コントロール(AIN-93食), UVC;週3回紫外線3 J/cm²照射、AIN93食、3%; 3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV3%; 週3回紫外線3 J/cm²照射、3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、5%; 5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV5%; 週3回紫外線3 J/cm²照射、5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食
 グラフ中で異なる文字がついている群間には $p < 0.05$ で有意差があることを示す。

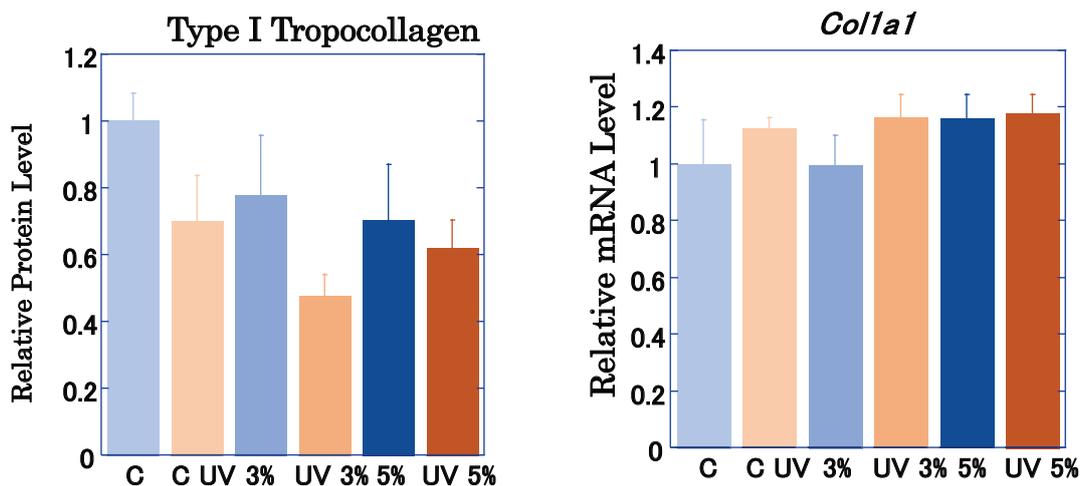


図2 皮膚I型トロポコラーゲン量およびCol1a1 mRNA量

C;コントロール(AIN-93食), UVC;週3回紫外線3 J/cm²照射、AIN93食、3%; 3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV3%; 週3回紫外線3 J/cm²照射、3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、5%; 5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV5%; 週3回紫外線3 J/cm²照射、5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食

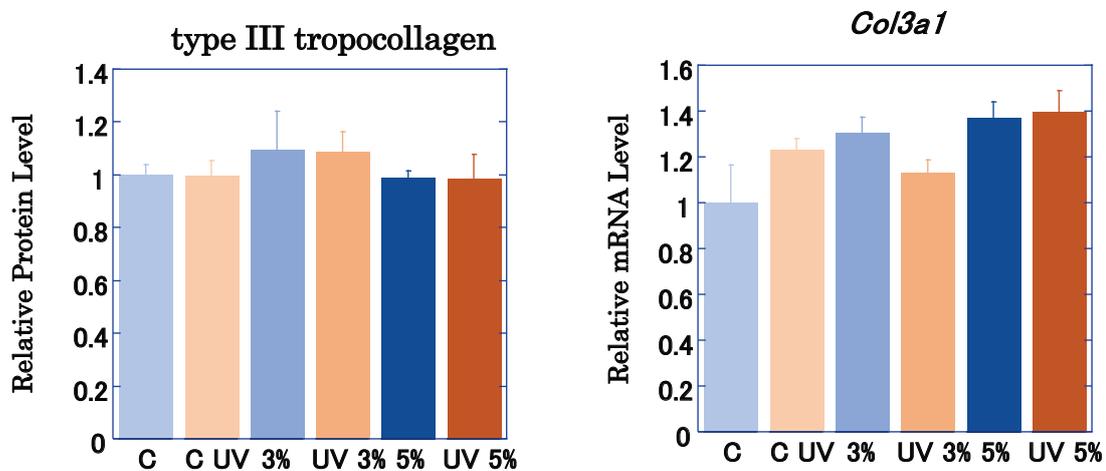


図3 皮膚Ⅲ型トロポコラーゲン量およびCol1a1mRNA量

C;コントロール(AIN-93食) , UVC;週3回紫外線3J/cm²照射、AIN93食、3% ; 3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV3% ; 週3回紫外線3J/cm²照射、3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、5% ; 5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV5% ; 週3回紫外線3J/cm²照射、5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食

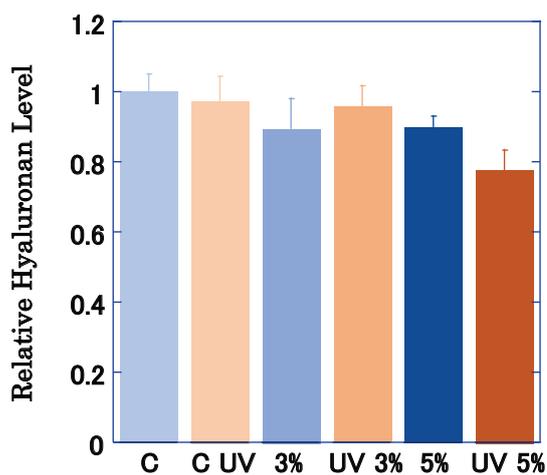


図4 皮膚ヒアルロン酸量

C;コントロール(AIN-93食) , UVC;週3回紫外線3J/cm²照射、AIN93食、3% ; 3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV3% ; 週3回紫外線3J/cm²照射、3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、5% ; 5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV5% ; 週3回紫外線3J/cm²照射、5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食

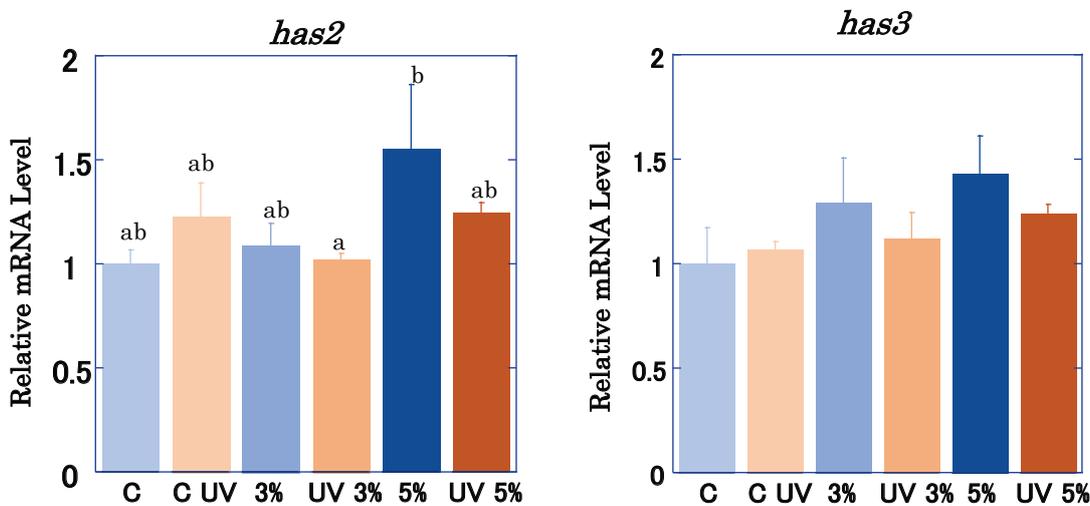


図5 皮膚ヒアルロン合成酵素has2およびhas3のmRNA量

C;コントロール(AIN-93食), UVC;週3回紫外線3J/cm²照射、AIN93食、3%; 3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV3%; 週3回紫外線3J/cm²照射、3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、5%; 5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV5%; 週3回紫外線3J/cm²照射、5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食
 グラフ中で異なる文字がついている群間には $p < 0.05$ で有意差があることを示す。

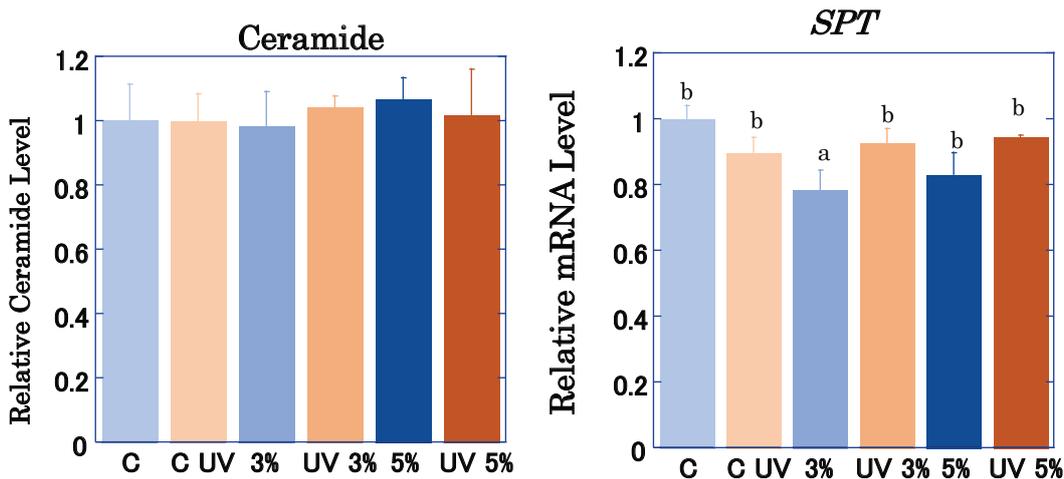


図6 皮膚セラミド量およびSPTmRNA量

C;コントロール(AIN-93食), UVC;週3回紫外線3J/cm²照射、AIN93食、3%; 3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV3%; 週3回紫外線3J/cm²照射、3%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、5%; 5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食、UV5%; 週3回紫外線3J/cm²照射、5%卵殻膜ペプチド含有AIN-93食
 グラフ中で異なる文字がついている群間には $p < 0.05$ で有意差があることを示す。