

博士学位論文審査結果要旨

平成 29年 8月 30日

研究科、専攻名 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻

学位申請者氏名 水谷 多恵子

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

審査結果の要旨

平成29年8月22日に東京工科大学において学位申請者 水谷多恵子さんの学位審査公開発表会が開催され、以下の要旨に示す博士論文に関する発表と関連する質疑応答が行われた。

本研究は、日常の生活行動が皮膚表面および表皮内部において活性酸素の生成を誘導し、日常のスキンケアにおける抗酸化ケアの重要性を示唆し、生活者のQOLを高めるための極めてオリジナリティーの高い基礎的かつ実学的な研究である。

研究の背景において、皮膚は生体の最外層に位置し、生体物質の外部環境への拡散を調節し、外因性物質の刺激から生体を保護するバリア機能を発揮する器官である。その結果、皮膚は絶えず外環境により惹起されるストレスに曝されている器官でもある。外環境により惹起されるストレスには酸化ストレスがあるが、酸化ストレスとは、過剰な活性酸素 (Reactive oxygen species ; ROS) の産生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産生に加え、太陽光に含まれるUVの曝露により大量の外因性のROSが産生され、その反応産物としてカルボニル化タンパク質 (Carbonylated proteins ; CPs) が生成することが知られている。

申請者は、本研究において皮膚においてROSの産生を誘導する環境由来因子を生活行動に着目して明らかにすることを目的として研究を行った。生活行動に由来する因子として、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) に着目して申請者は研究を行い、これらが皮膚においてROSを産生する事実と、ROSを産生す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。

申請者は、本研究を実施するにあたり、角層における酸化ストレス最終生成物であるCPsを定量的に評価できるツールが必要であると考え、画像解析手法を用いて角層細胞に存在するCPsの客観的な定量アルゴリズムの構築を行った。角層細胞内に存在するCPsは、皮膚表面よりテープストリップ法にて剥離した角層を、fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC) を用いて特異的に蛍光標識することにより検出し、得られた蛍光画像の画像解析によってCPsの存在頻度 (CPsレベル) を算出する手法が一般的に用いられている。この既存法は、角層の剥離状態が常に均一な状態ではなく角層積層部分が強い蛍光輝度を発することにより客観的なCPsの定量の妨げとなっていることが指摘されている。そこで、申請者は客観的評価の妨げとなる角層積層部分を画像のRGB表色系のGの階調値分布をもとにした閾値の設定による画像の抽出 (閾値処理) によって、除外するアルゴリズムを開発し、角層内部に存在するCPsの定量を可能にした。

第2章では、申請者は、ROSによって誘導される酸化ストレスの産物である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を産生し、新たなCPsの生成を誘導する事実を明らかとした。具体的には、UVおよびブルーライト（400–470 nm）を照射したヒト皮膚より採取した角層から生成するROSをMCLA（6-(4-Methoxyphenyl)-2-methyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one hydrochloride）を用いた化学発光法及び5-(2,2-Dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxideをスピントラップ剤として用いたESRスピントラップ法により検出した。さらに、アクロレインを用いて人工的にカルボニル化した角層へのUVおよびブルーライトを照射は、アクロレイン処理濃度依存的にMCLAの化学発光強度を増加させることを確認している。これら測定系へのSODの添加によって発光の増加が抑制されたことから、生成したROSはスーパーオキシドアニオンラジカルであることを示した。

次に、申請者は皮膚を清潔に保つために使用される洗浄剤の主成分であるアニオン性界面活性剤が、皮膚においてROSを産生させる可能性に着目し検証を行った。具体的には、申請者は代表的なアニオン性界面活性剤であるSLSを表皮再構築モデルの角層表面に適用し、MCLAの化学発光方法を用いて表皮生細胞層におけるROSの生成を確認した。この事実は、皮膚に適用されたSLSは角層を通過し、表皮角化細胞の生細胞層においてROSの産生を誘導する可能性が示唆され、界面活性剤の皮膚トラブルの一因を明らかにする興味ある知見である。

さらに、SLSをヒト表皮角化細胞株（HaCaT）に処理し、ROSの産生が誘導されること、さらにその作用メカニズムについて詳細に検討をした。SLSによる細胞内ROSの生成は、細胞膜の流動性を増大させることで、細胞内へのCa²⁺の流入を増加させることがトリガーとなっていることを明らかとした。細胞内Ca²⁺濃度の増加は、ミトコンドリアにおけるROS産生の増加が誘導し、同時に、細胞内へのCa²⁺の流入はカルパインの活性化を介してインターロイキン-1α（IL-1α）の分泌を増加させた。分泌されたIL-1αによるIL-1受容体関連キナーゼ1（IRAK-1）の活性化も、ROSの生成に関与すると考えられた。

第2章および第3章の結果に基づいて、申請者は、第4章では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の抗酸化作用に着目し検討を行った。ヤブツバキの若葉および成葉の抽出液に、H₂O₂および・OHを直接消去する作用を認めたが、その作用は若葉に由来するエキス（CJGL）の方が高い作用を確認している。CJGLは剥離角層への適用により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においては、定常状態におけるROSレベルの低下と、H₂O₂による細胞傷害の緩和作用が認められている。

本研究をまとめると以下ようになる。生活行動に由来する外環境因子に注目してROSの生成源を明らかにすることを目的として検討を行い、角層において存在するCPsが、太陽光曝露下において光増感剤として機能しROSを生成すること、洗浄剤の主成分であるSLSが、表皮生細胞層においてROSを産生することを明らかとした。また、SLSによるROS生成の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補う作用の両面から、皮膚を保護する有用な素材となる可能性を示した。

本論文はこれまでのスキンケアにおいて重要視されてこなかった抗酸化ケアの重要性を明確に示唆する実学的かつ基礎的な研究であり、先行研究にはないオリジナリティーの高い研究成果を示している。学位審査公開発表会における発表および質疑に対する応答についても妥当なものであり、本審査委員会は、本論文の著者に対して博士（工学）の学位を授与するための十分な学識と能力を有しているものと認める。

審査委員 主査

東京工科大学 教授 正木 仁 