

東京工科大学
博士學位論文

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

平成 29 年 9 月

水谷多恵子

目次

序論.....	1
第1章 角層カルボニル化タンパク質の新規画像評価手法の検討.....	9
1-1. 諸言.....	9
1-2. 実験方法.....	10
1-2-1. 試薬.....	10
1-2-2. 光源.....	10
1-2-3. 蛍光標識したカルボニル化タンパク質 (CPs) の調製と蛍光標準の作製.....	10
1-2-4. 角層の採取とスライドガラスへの転写.....	11
1-2-5. 角層 CPs の蛍光標識.....	11
1-2-6. in vitro における角層への UV 照射.....	11
1-2-7. 画像ヒストグラムに基づく閾値画像処理.....	11
1-2-8. 統計解析.....	12
1-3. 結果.....	12
1-3-1. 画像階調値 G による CPs の評価.....	12
1-3-2. 階調閾値処理の有無による同一角層試料の CP レベルの比較.....	14
1-3-3. UV 照射によって増加する角層 CPs の検出.....	14
1-4. 考察.....	15
第2章 太陽光照射下にて CPs が ROS を生成するメカニズム.....	18
2-1. 諸言.....	18
2-2. 実験方法.....	19
2-2-1. 試薬.....	19
2-2-2. 光源.....	19

2-2-3. 試料の調製.....	19
2-2-3-1. 豚皮由来角層シートの調製.....	19
2-2-3-2. テープストリップ法によるヒト角層の採取.....	20
2-2-3-3. ケラチンフィルムの調製.....	20
2-2-3-4. タンパク質のカルボニル化.....	20
2-2-4. 画像解析による CP レベルと自家蛍光レベルの算出.....	21
2-2-5. ROS の検出.....	22
2-2-5-1. ESR スピントラップ法による ROS の検出.....	22
2-2-5-2. MCLA 化学発光の測定.....	22
2-2-6. 統計解析.....	23
2-3. 結果.....	24
2-3-1. UV 照射により角層において生成される ROS と CPs.....	24
2-3-2. 角層およびケラチンフィルムの CP レベルと自家蛍光の関連性.....	25
2-3-3. CPs の蛍光スペクトル.....	27
2-3-4. MCLA 化学発光法を用いた ROS 検出と同定.....	28
2-3-5. ESR スピントラップ法を用いた ROS の検出と同定.....	30
2-4. 考察.....	32
第 3 章 ラウリル硫酸ナトリウムが ROS の生成を誘導するメカニズム.....	35
3-1. 緒言.....	35
3-2. 実験方法.....	35
3-2-1. 試薬.....	35
3-2-2. 細胞培養.....	36
3-2-3. RHE モデルにおける ROS の測定.....	36
3-2-4. 細胞内 ROS レベルの測定.....	37
3-2-5. ミトコンドリア ROS の測定.....	37

3-2-6. 生体膜流動性の評価.....	37
3-2-7. 細胞内カルシウムイオンレベルの測定	38
3-2-8. カルパインの活性測定.....	38
3-2-9. IL-1 α 分泌量の定量	39
3-2-10. 統計解析	39
3-3. 結果.....	40
3-3-1. ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)を適用した RHE モデルにおける ROS レベルの増加.....	40
3-3-2. SLS 曝露が誘導する細胞内 ROS レベルの増加.....	41
3-3-3. ミトコンドリア ROS の測定.....	42
3-3-4. 細胞内 Ca ²⁺ 濃度の増加と ROS の生成	43
3-3-5. SLS と細胞膜の相互作用	44
3-3-6. SLS 処理した HaCaT 細胞からの IL-1 α の分泌亢進.....	44
3-3-7. ROS の生成における IL-1 α の関与	45
3-3-8. SLS 処理した HaCaT におけるカルパイン活性の増加	46
3-4. 考察.....	46
第 4 章 皮膚における酸化ストレス抑制素材としてのヤブツバキ葉エキスの有用性	49
4-1. 緒言.....	49
4-2. 実験方法.....	50
4-2-1. 試薬	50
4-2-2. 光源	50
4-2-3. 細胞培養	50
4-2-4. ツバキ葉エキスの調製.....	50
4-2-5. 過酸化水素消去活性の測定.....	51
4-2-6. ヒドロキシルラジカル消去活性の測定.....	51
4-2-7. 細胞内 ROS レベルの評価.....	52

4-2-8. 角層表面における CPs 増加に対する抑制作用.....	52
4-2-9. 細胞生存率の評価.....	53
4-2-10. 過酸化水素により誘導される細胞傷害の抑制作用	53
4-2-11. 統計解析.....	53
4-3. 結果.....	53
4-3-1. <i>in vitro</i> ROS 消去活性	53
4-3-2. 角層表面における CPs 増加に対する抑制作用.....	55
4-3-3. 細胞内 ROS レベルの抑制作用.....	56
4-3-4. 過酸化水素により誘導される細胞毒性の抑制作用	56
4-4. 考察.....	57
第 5 章 総括	60
参考文献.....	65
謝辞.....	79

略語一覽

·O₂⁻: superoxide anion radical

·OH: hydroxyl radical

¹O₂: singlet oxygen

AGEs: advanced glycation end products

BSA: bovine serum albumin

CJGL: extract from green leaves of *Camellia japonica*

CJML: extract from matured leaves of *Camellia japonica*

CP-BSA: carbonylated BSA

CPs: carbonylated proteins

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

ESR: electron spin resonance

EtOH: ethanol

FTSC: fluorescein-5-thiosemicarbazide

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione

H₂DCFDA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

HaCaT: immortalized human keratinocytes

HBSS: hanks buffered saline solution

IL-1RA: interleukin-1 receptor antagonist

IL-1 α : interleukin-1 α

MCLA: 6-(4-Methoxyphenyl)-2-methyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one hydrochloride

MES: 2-morpholinoethanesulfonic acid

NBD-H: 4-hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole hydrazine

NGF: nerve growth factor

NMF: natural moisturizing factor

Nox: NADPH oxidase

Nrf2: nuclear factor E2-related factor-2

RHE: reconstructed human epidermal equivalents

ROS: reactive oxygen species

SC: stratum corneum

SLS: sodium lauryl sulfate

TBIP: threshold-based image processing

TEWL: transepidermal water loss

1,3-BG: 1,3-butylene glycol

4-AP: 4-aminoantipyrine

5-DSA: 5-doxyyl stearic acid

序 論

皮膚の構造

皮膚は生体と外部環境との境界に位置し、水をはじめとする生体物質の漏出を調節し、様々な外因性の刺激から生体を保護する機能（バリア機能）を発揮することで、生体の恒常性維持に關与する重要な器官である。皮膚は、最外層より角層、顆粒層、有棘層、基底層からなる表皮、さらに基底膜を境界として、真皮、皮下組織からなる層状の構造をしている。このうち皮膚がバリア機能を発揮する上で、最も重要な役割を果たしているのは角層である。また、人が審美的な観点で皮膚の美しさを判断するのも、皮膚組織のうち唯一目に触れることのできる皮膚表面の角層である。

表皮は、基底膜上の基底細胞の分裂によって生じた娘細胞が分化（角化）することにより形成され、この分化の過程において表皮細胞は保湿やバリア機能の發揮に必要な様々な遺伝子を発現、合成し、最終的には自らが死細胞である角層細胞となることで、堅牢な角層を形成する。角層では、角層細胞、セラミドやコレステロール、および遊離脂肪酸からなる角層細胞間脂質のラメラ構造体や、天然保湿因子（natural moisturizing factor; NMF）が角層の水分保持に重要な役割を果たしている^{1,2)}。皮膚を健全に保つ上で、角層が適切な水分量を保持していることは、機能的にも美容的にも非常に重要であることが、これまでの数多くの研究から示されている³⁻⁶⁾。角層における水分量の低下は、皮膚の乾燥を誘導し、多くの皮膚トラブルの要因となると考えられている。

皮膚における活性酸素種の生成

活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）は生理活性物質であると同時に、過剰に生成されることにより酸化ストレスと呼ばれる生体に有害な作用をもたらすことが知られている^{7,8)}。酸素分子（ O_2 ）は 2 つの不対電子（biradical）を有するため、他の分子から電子を奪う性質がある。ROS は、この O_2 が電子を奪う性質により生成される反応性に富む化学種である⁹⁾。ROS は、ラジカルと非ラジカルに分類でき、前者にはスーパーオキシドアニオンラジカル（superoxide anion radical; $\cdot O_2^-$ ）、ヒドロキシルラジカル（hydroxyl radical; $\cdot OH$ ）、アルコキシラジカル（alkoxy radical; $LO\cdot$ ）、ペルオキシラジカル（peroxy radical; $LOO\cdot$ ）、ペルヒドロキシルラジカル（perhydroxyl radical; $HOO\cdot$ ）、一酸化窒素（ $NO\cdot$ ）、二酸化

窒素($\text{NO}_2\cdot$)などが含まれ、後者には、一重項酸素($^1\text{O}_2$)、オゾン(O_3)、過酸化水素(H_2O_2)、脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)などが含まれる。

ROS は生体内において、主には様々な酵素反応の生成物として、恒常的に生成されている。ミトコンドリアが呼吸鎖反応の電子伝達系において ATP を合成する過程で、呼吸鎖複合体 III および I によって $\cdot\text{O}_2^-$ が生成されることは良く知られている^{10,11)}。また、キサンチンオキシダーゼ¹²⁾や NADPH オキシダーゼ(Nox)¹³⁾の酵素反応によっても $\cdot\text{O}_2^-$ が生成され、アラキドン酸代謝におけるシクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase; COX)およびリポキシゲナーゼが関与する経路においては、 $\cdot\text{OH}$ が生成される¹⁴⁾。

皮膚で生成される ROS には、このような生体代謝過程において生成される ROS と、太陽光線のような外環境因子による代謝過程の刺激や生体成分の光増感反応を介して生成される ROS とがある。地表に到達する太陽紫外線(UV)は、生体への反応性が異なる UVA (320–400 nm)と UVB (280–320 nm)に分類される。UVA と UVB は、異なる機構により、異なる種類の ROS を生成する¹⁵⁾。UVB および UVA は Nox を活性化することにより表皮細胞内において $\cdot\text{O}_2^-$ の生成を増加させる¹⁶⁻¹⁸⁾。細胞内において生成された $\cdot\text{O}_2^-$ は、細胞内にて自発的な変換あるいはスーパーオキシドディスムターゼ(superoxide dismutase; SOD)による酵素反応により H_2O_2 に変換される¹⁹⁾。UVA は、 $\cdot\text{O}_2^-$ に加えて $^1\text{O}_2$ の生成を誘導する。皮膚には、フラビンやポルフィリンなどの UVA 領域の光を吸収するクロモフォアを有した数多くの物質が存在し²⁰⁾、UVA はこれらのクロモフォアの光増感反応を介して $^1\text{O}_2$ を生成する。また生体内の糖質とタンパク質とのメイラード反応の進行により生成した最終糖化産物(advanced glycation end products; AGEs)への UVA の曝露は、光増感反応を介して $\cdot\text{O}_2^-$ を生成することも報告されている²¹⁾。

皮膚の表面に存在する皮脂膜は、皮膚の保湿機能を助ける一方で、スクワレンをはじめとする不飽和脂質を含むことから、ROS による酸化反応の第一ターゲットとなる^{22,23)}。このことから、皮膚表面における光増感反応による ROS の生成は、皮脂由来の脂質ペルオキシドの生成という面において非常に重要である。具体的な例として、皮膚常在菌である *Propionibacterium acnes* (アクネ菌)が代謝産物として生成するコプロポルフィリンは、皮脂とともに皮膚表面上に移行し、UVA 曝露下における光増感反応によって $^1\text{O}_2$ を生成し、スクワレンを酸化してスクワレンモノヒドロペルオキシドを生成することが知られている²⁴⁾。

皮膚の抗酸化機構

過剰な ROS は、DNA 鎖の切断や塩基修飾、カルボニル化などの酸化修飾による酵素の不活性化、脂質や糖の酸化を引き起こすことにより、皮膚老化や皮膚癌の発症原因となりうる²⁵⁾。そのため、過剰に生成された ROS に対し、生体は様々な仕組みで防御機構(抗酸化機構)を備えている。生体の抗酸化機構は、ROS を消去する抗酸化酵素群と ROS を捕捉・消去する抗酸化物質群により構成されており、これらを総称して抗酸化因子という²⁶⁾。

生体の抗酸化酵素には、SOD やカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase; GPx)、ヘムオキシゲナーゼ-1 (heme oxygenase-1; HO-1) などがある。SOD は、 $\cdot\text{O}_2^-$ を O_2 と H_2O_2 に不均化 (dismutation) する酵素であり、主なものとして細胞質に存在する Cu/Zn SOD とミトコンドリア内膜に存在する Mn SOD の 2 種がある^{27,28)}。 H_2O_2 は、生細胞ではペルオキシソームに存在するカタラーゼ²⁹⁾や、細胞質やミトコンドリアに存在する GPx の還元型グルタチオン (GSH) 存在下における反応により、 O_2 と H_2O に分解される。抗酸化酵素は、真皮よりも表皮において単位組織あたりの活性が高いことが知られており、なかでも特に SOD とカタラーゼの活性が高いことから、これらは皮膚における主要な抗酸化酵素と考えられている³⁰⁾。

また、皮膚には、生体成分である尿酸、および GSH が非酵素系の抗酸化物質として存在し、これらの単位組織あたりの濃度も、真皮に比較して表皮において高いことが知られている^{31,32)}。そのほかに、経口摂取あるいは経皮投与により生体に作用する抗酸化物質として、ビタミン C、ビタミン E、カロチノイドがある。一般に、これらの抗酸化物質は、脂溶性の抗酸化物質 (ビタミン E、カロチノイドなど) が細胞膜などの脂質ドメインにおいて、水溶性の抗酸化物質 (ビタミン C、尿酸、GSH など) は細胞質や細胞外液において作用する。

さらに、表皮内においても抗酸化因子の濃度勾配が存在し、表皮細胞の分化の進行に伴い外側に向かって、抗酸化因子の濃度が高くなることが知られている^{33,34)}。これらの抗酸化因子の濃度勾配は、酸化ストレス応答性の転写因子である nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) の、表皮内における活性化の確率の違いを反映していると理解されている^{35,36)}。皮膚は、表層において外的因子の影響を受けやすく、酸化ストレスに曝される確率は高くなる。よって、Nrf2 活性化の割合は表層側ほど高くなること

が考えられる。定常状態において、Nrf2 は Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と会合した状態で細胞質に局在しているが、酸化ストレス下においては、Keap1 のレドックスセンサーであるシステイン残基が酸化されることにより、Keap1 が Nrf2 から解離することで活性化され、核内に移行する³⁷⁾。核内に移行した Nrf2 は、複数の抗酸化タンパク質の遺伝子のプロモーター領域に存在する抗オキシダント反応配列 (antioxidant response element; ARE, 5'-A/GTGAC/GNNGCA/G-3') に結合することで、カタラーゼや SOD、GPx、HO-1、GSH の合成における律速酵素である γ -glutamylcysteine synthetase (γ GCS) などの様々な抗酸化因子の発現を亢進させる³⁷⁾。

また死細胞である角層細胞によって構成される角層には、特徴的な抗酸化因子による抗酸化機構が存在している。角層細胞の辺縁部には、コーニファイドエンベロープ (cornified cell envelope; CE) と呼ばれる強靱な裏打ちタンパク質の膜が形成されており、皮膚のバリア機能に参与している。CE には、ロリクリンや 14 kDa に満たない小型のタンパク質である small proline-rich proteins (SPRRs) など、システイン残基やヒスチジン残基を多く含むタンパク質が大量に存在しており、これらが抗酸化物質として機能することで ROS に対するバリアとしても機能している³⁸⁻⁴⁰⁾。システイン残基の SH 基は、プロトンを放出し自身が酸化されることにより ROS を消去する。SPRRs は表皮の創傷治癒部位において、急激に発現が増加することから、創傷治癒過程に発生する酸化ストレスに対する抗酸化物質としての機能を発揮することも示唆されている⁴¹⁾。

生体におけるカルボニル化タンパク質の生成

生体のタンパク質が酸化ストレスのターゲットとなり、加齢や疾病に参与することは良く知られている⁴²⁾。多くの場合、タンパク質の酸化は、アミノ酸側鎖の構造変化に由来する高次構造の変化をもたらすことから、そのタンパク質が本来有する機能の消失または低下を誘導すると考えられる。タンパク質において最も酸化を受けやすいアミノ酸残基はメチオニンとシステインであり、酸化によってメチオニンはメチオニンスルホキンドを形成し、システインはジスルフィド結合の形成と、酸素の付加反応を競合的に生じさせる⁴⁴⁾。

カルボニル化タンパク質 (carbonylated proteins; CPs) は、タンパク質が本来有していないアルデヒド基がアミノ酸側鎖に導入されたタンパク質の総称である。タンパク質のカルボニル化は、メチオニンやシ

ステインの酸化に比べて容易には誘導されないことから、CPs は、より高いレベルの酸化ストレスによって誘導される酸化タンパク質であると考えられる⁴⁴⁾。タンパク質のカルボニル化は、リジン残基の酸化によるアリシン(allysine; 2-aminoadipic semialdehyde)や、アルギニン残基の酸化による γ -グルタミルセミアルデヒドなどのアミノ酸残基の直接的な酸化により生成される経路と^{45,46)}、ROS とスクアレンや不飽和脂肪酸などとの反応により生成される過酸化脂質由来の活性アルデヒド化合物と、アミノ酸の遊離アミノ基との反応により生成される経路がある⁴⁷⁻⁴⁹⁾。後者においては、アクロレインやクロトンアルデヒド、および4-ヒドロキシノネナールに代表される活性アルデヒド化合物がタンパク質のリジン、アルギニン、プロリン、システインなどの求核性残基に付加し、CPs を生成する⁴⁴⁾。また、これらの求核性残基は各種酵素の活性部位に多く存在することからも、カルボニル化によって生体内の酵素活性の低下や消失が引き起こされることが推察される。

ROS およびカルボニル化タンパク質が皮膚機能に及ぼす影響

過剰な ROS の生成が皮膚状態に及ぼす影響には、ROS によって直接誘導される反応によるものと、CPs などの ROS によって生成される物質が引き起こす、二次的な反応によるものがある⁵⁰⁾。

炎症や色素斑の形成、および真皮マトリクスの変性は、ROS により誘導される皮膚障害であり⁵¹⁾、ROS がこれらを誘導するメカニズムは、次のように明らかにされている。皮膚に紅斑反応を引き起こす炎症のメディエーターである prostaglandin E2 (PGE₂) は、ROS による COX-2 の発現亢進によって産生が誘導される^{52,53)}。また、色素斑の形成を誘導するメラニンの産生は、ROS による α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) の産生亢進と、PGE₂ によって刺激される^{54,55)}。さらに、表皮細胞内で産生される一酸化窒素(NO \cdot)も、メラノサイト内のチロシナーゼやチロシナーゼ関連タンパク質 1 の発現を亢進することが明らかとされており⁵⁶⁾、ROS が種々の経路において色素斑の形成の誘導に関与していることが示唆される。真皮においては、ROS がマトリックスメタロプロテアーゼ-1 (Matrix metalloproteinase-1; MMP-1) の発現亢進を誘導することにより、細胞外マトリクスの主要な構成成分である I 型コラーゲンの分解を促進することが知られている。コラーゲン線維の分解は、MMP-1 による三重螺旋構造の切断により開始され、コラーゲン線維の減少は、シワの形成を誘導すると考えられている⁵⁷⁾。具体的には、ROS がインターロイキン-1 α (interleukin-1 α ; IL-1 α) の分泌亢進を誘導し、IL-1 α は IL-

6 の産生を誘導することで、MMP-1 の mRNA およびタンパク質の合成を誘導する⁵⁸⁾。さらに、ROS は protein tyrosine phosphatase (PTP) の活性中心にある SH 基を酸化し、PTP を不活性化することにより epidermal growth factor-receptor (EGF-R) の活性化状態を維持する。その結果、c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化により増加する activated protein-1 (AP-1) によって、MMP-1 の転写活性が亢進する⁵⁹⁾。

一方、ROS によって誘導される CPs の生成は、初期反応として脂質過酸化反応が重要な役割を果たし⁶⁰⁾、皮膚内部および皮膚表面において、以下のようなプロセスにより、進行すると考察される。皮膚では、太陽光線曝露により表皮細胞内において ROS が生成され、さらに角層においては、コプロポルフィリンの光増感反応によって ROS が生成される。これらの ROS が、細胞膜構成リン脂質や皮脂を酸化し過酸化脂質を生成する。その結果、これらの過酸化脂質に由来する活性アルデヒド化合物とのタンパク質との反応により CPs が生成される。事実として、CPs は高齢者の露光部の表皮および真皮に高頻度で観察されるほか⁶¹⁾、若年者においても露光部の角層では高頻度で観察されている^{62,63)}。上記の生成プロセスを考慮すると角層に存在する CPs は、表皮生細胞層において生成された CPs と、皮膚表面において生成された CPs の両者を反映した脂質過酸化最終生成物であることが示唆される。

このように生成した CPs が、皮膚状態に及ぼす影響を示唆するいくつかの疫学的研究報告がある。一般に、特にアジア人の皮膚色は、老化に伴って黄黒くシフトすることが知られている⁶¹⁾。この皮膚色の変化は、皮膚に蓄積した CPs および AGEs の光学特性を反映したものと考えられている^{63,64)}。さらに、角層における CPs の増加は、角層の光透過性を低下させることが、ヒトおよび豚皮由来の角層を人工的にカルボニル化させた実験によって示されている⁶⁵⁾。角層の光透過性は、皮膚の透明感の官能評価と相関があるとされており⁶⁶⁾、CPs の増加による角層の透明性の低下と皮膚色の黄黒いシフトは、美容的な観点においては好ましくない変化をもたらすものと考えられる。

また角層の CPs は、水分量および TEWL などの皮膚保湿性パラメーター⁶²⁾、およびキュートメーターを用いた皮膚の伸展性の評価において、負の相関を示すことが報告されている⁶⁷⁾。さらに、冬季に誘発された乾燥皮膚における CPs は、夏季における CPs に比べて、高い頻度で認められることや⁶⁷⁾、角層表面を人工的に低湿度環境に曝露した再構築ヒト表皮モデルの表皮全層における CPs の増加、および人工的にカルボニル化させた角層およびケラチンゲルの水分保持力の低下から、CPs の皮膚乾燥状態との関連性が示されている^{68,69)}。これらの事実より、角層における CPs の増加が皮膚の乾燥を促

進する可能性、さらには、皮膚の乾燥が ROS 生成を伴う酸化ストレスを誘導し、角層の CPs の生成を促進する可能性が示唆される。また、皮膚表面水分量の低下およびバリア機能の低下している荒れ肌から採取した角層では、インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト(interleukin-1 receptor antagonist; IL-1RA)に対する IL-1 α の比率⁷⁰⁾と、角層の CPs の存在頻度(CP レベル)⁶²⁾が増加していることが報告されている。この事実から、荒れ肌と、酸化ストレスの関与が示唆され、酸化ストレスが荒れ肌惹起要因の 1 つとして作用する可能性が推察される。

さらに、真皮にも目を向けると、光老化皮膚においては、表皮における Cu/Zn SOD および Mn SOD、カタラーゼの抗酸化酵素の顕著な減少とともに、真皮上層において CPs の蓄積が認められることが報告されている^{71,72)}。このことから、光老化皮膚に特徴的な皮膚形態の変化に、真皮における CPs の蓄積が関与していることも推察される。

本研究の目的

本研究は、皮膚において過剰な ROS の生成を誘導する新たな因子を明らかにし、過剰に生成した ROS によって惹起される細胞障害に対する天然素材の緩和作用を明らかにすることを目的とした。

生体における ROS の最終生成物であり、皮膚においても高頻度で認められる CPs と、皮膚の洗浄において使用されるラウリル硫酸ナトリウム(Sodium lauryl sulfate; SLS)による ROS の生成に着目して研究をおこなった。さらに、ROS を消去する素材として、ヤブツバキの葉に由来するエキスの有用性について評価した。

はじめに、本研究をおこなう上で必要となる、角層に存在する CPs を客観的に評価するツールを開発した。これまで、蛍光標識によって可視化した角層内 CPs の画像解析により、角層細胞内の CP レベルを評価する手法が一般的に用いられていたが、この従来法においては角層が積層した部分に由来する蛍光輝度が、客観的な CPs の評価を妨げる問題があった。本研究では、角層の積層状態に影響を受けずに CPs を数値化する手法を開発した(第 1 章)⁷³⁾。第 2 章では、太陽光の曝露下において、CPs が光増感剤として機能することにより、ROS の生成源となる事実を明らかとした⁷⁴⁾。第 3 章では、SLS の表皮生細胞層への侵入が、表皮細胞の ROS 生成を誘導することを明らかとし、その生成における詳細なメカニズムを検証した⁷⁵⁾。これらのことから、皮膚において生成する ROS を消去し、皮膚を酸

化ストレスから保護することは非常に重要であると考え、第4章では、その手段として種々のポリフェノール類を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皮膚への適用に着目し、角層および表皮細胞における酸化ストレスに対する緩和作用を評価した⁷⁶⁾。その結果、ヤブツバキの葉のエキスは、化学的および生理学的な抗酸化作用を有することを明らかとした。

本論文は、角層の CPs や SLS による ROS 生成のメカニズムの解明を介して、皮膚が日常生活において様々な ROS 生成源に曝される事実を明らかにし、さらに ROS から皮膚を保護する目的として抗酸化物質を用いたスキンケアの重要性について明らかにした。

第 1 章 角層カルボニル化タンパク質の新規画像評価手法の検討

1-1. 諸言

CPs は、アミノ酸残基の直接酸化および脂質過酸化反応を介して生成される酸化タンパク質であり、酸化ストレスを反映するバイオマーカーとして知られている。皮膚においては、CPs は特に太陽光曝露部位の角層、表皮、真皮に広く分布している。最近の報告では、角層中に含まれる CPs が皮膚の光学的特性を変化させることにより、皮膚色を黄ぐすませ、透明感を低下させることや、角層の水分保持機能を低下させるなど、生理的および美容的な面において悪影響を及ぼすことが明らかとなっている^{61,62,77}。つまり角層の CPs は、皮膚の酸化ストレスマーカーとしての役割だけではなく、皮膚の機能性に広範囲に影響を与える重要な因子であると理解される。そのため、角層の CPs が皮膚機能に及ぼす影響を検討する上で、角層における CP レベルを、適切かつ客観的に決定する測定方法が必要と考えられる。

角層の CP レベルを評価する手法の一つに、剥離した角層の CPs を蛍光標識し、蛍光強度によって数値化する方法がある⁷⁸。しかしながら、剥離した角層にはドナーの皮膚状態に依存した多重剥離状態や、角層辺縁部位での細胞同士の重なりなど、角層が積層した部分が散見される (Fig. 1-1)。そのため、これらに由来する過度な蛍光が、角層細胞が本来有する CPs の数値化において評価の妨げとなるという問題があった。そこで本章では、角層の積層部分に由来する蛍光を、画像処理を用いることにより画像上から除去することで、角層の CP レベルを、より客観的に、かつ高い精度で解析する手法を検討した。

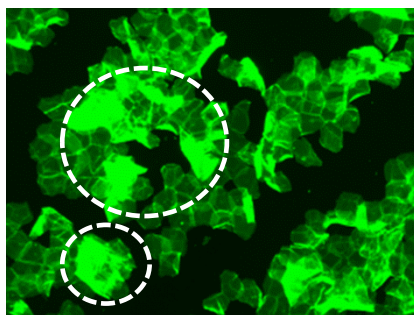


Fig. 1-1 A representative image of fluorescence labelled carbonylated proteins in the stratum corneum. Green fluorescent indicates CPs labelled with fluorescein-5-thiosemicarbazide. White dashed circles indicate multilayered stratum corneum.

1-2. 実験方法

1-2-1. 試薬

試薬は以下のものを使用した。

アクロレイン(モノマー); 東京化成工業株式会社(東京), Sephadex G50; GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES); キシレン; 和光純薬工業株式会社(大阪), ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA); Fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), スクアレン; ナカライテスク株式会社(京都), BCA protein assay kit; Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA), ポリフッ化ビニリデン (Polyvinylidene difluoride; PVDF) 膜; アトー株式会社(東京).

1-2-2. 光源

- ・ 紫外線照射光源 (Broadband UVB lamp TL20W/I2); Philips (Amsterdam, Netherlands)

1-2-3. 蛍光標識した CPs の調製と蛍光標準の作製

精製水を用いて調製した 50 mg/mL BSA に、1 M アクロレイン水溶液を加え、37°C にて 2 時間インキュベートすることによりカルボニル化 BSA (CP-BSA) を調製した。ゲルろ過クロマトグラフィー法によって未反応のアクロレインを除去することを目的として、反応溶液の遠心分離 (15,000 rpm, 5 分間) 後に得られた上清を、Sephadex G50 を充填したカラム (カラム体積; 2.5 mL) に供し、精製水を用いて溶出した。500 μ L ずつ分画し、このうち CP-BSA を含む画分にカルボニル基反応性の蛍光標識剤である 20 μ M FTSC を加え、室温、遮光下にて 2 時間反応させた。未反応の FTSC は前述のゲルろ過クロマトグラフィー法によって除去した。100 μ L 単位で回収したフラクションのタンパク質濃度を定法にしたがって BCA protein assay kit を用いて定量した後、FTSC によって標識された CP-BSA を精製水によって適宜希釈したものを、2 μ L ずつ PVDF 膜上にブロットすることで蛍光標準を作製した。これを、CCD カメラを装備した蛍光顕微鏡 (FLoid Cell Imaging Station; Life Technologies Corp., (Grand Island, NY, USA)) を用いて観察し、蛍光画像を撮影した。

1-2-4. 角層の採取とスライドガラスへの転写

ヒト角層の採取は、東京工科大学倫理審査委員会にて承認された後に実施した。角層は粘着テープ(セロテープ; ニチバン株式会社(東京))を用いたテープストリッピング法によって採取した。角層を採取したテープを直径 6 mm の円形に成形した後、スライドガラスの表面に圧着し、これをキシレンに一晩浸漬させることで粘着剤を溶解して基材のセロハンを除去し、角層をスライドガラス表面に転写させた。

1-2-5. 角層 CPs の蛍光標識

角層の CPs の可視化は、Fujita らの方法⁶²⁾を一部改変した次の方法でおこなった。角層を転写したスライドガラスを、0.1 M MES-Na buffer (pH 5.5)を用いて調製した 20 μ M FTSC に浸漬し、室温にて 1 時間インキュベートした。精製水を用いて十分に洗浄後、蛍光顕微鏡を用いて観察し、蛍光画像を取得した。

1-2-6. *in vitro* における角層への UV 照射

21 歳女性の上腕内側部の同一部位において、テープストリップを 3 回繰り返して採取し、3 枚目のテープの角層をスライドガラスに転写した。転写した角層の表面にスクアレンを 3 μ L 重層した後、Broadband UVB ランプ(放射波長: 290–320 nm)によって UV を 0–3,700 mJ/cm² 照射した。37 °C の湿潤下で 24 時間インキュベートした後、キシレンに浸漬してスクアレンを除去し、生成した CPs を 1-2-5 項に示した方法で蛍光標識し、可視化した。

1-2-7. 画像ヒストグラムに基づく閾値画像処理

画像ヒストグラムは蛍光画像より算出した。画像ヒストグラムをもとに、RGB (Red, Green, Blue) 表色系の G の階調閾値の選択と、再出力した画像の観察を繰り返すことで、単層の角層部分を抽出する適切な画素値を決定した。本研究において、一連の画像処理を閾値画像処理(threshold-based image processing; TBIP)とした。TBIP によって抽出した画像よりピクセルあたりの平均階調値を算出し、角層の CP レベルとして用いた。

1-2-8. 統計解析

測定値は平均値 ± 標準偏差で表し、Student の *t* 検定によって有意差検定をおこなった。*p* 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

1-3. 結果

1-3-1. 画像階調値 G による CPs の評価

蛍光標識した CPs を画像解析により数値化する目的で、アクロレインによってカルボニル化させた CP-BSA 量と画像パラメーターである RGB 表色系の階調値 G との直線性について確認した。CP-BSA を、アルデヒド基およびケトン基に対する特異的反応性蛍光プローブである FTSC によって標識した後、PVDF 膜上にブロットし、CCD カメラを備えた蛍光顕微鏡によって画像を撮影した。各濃度に調製した CP-BSA の蛍光画像から平均階調値を算出した結果、階調値 35 から 160 の範囲において、平均階調値と CP-BSA のタンパク質量に直線性が認められた (Fig. 1-2)。

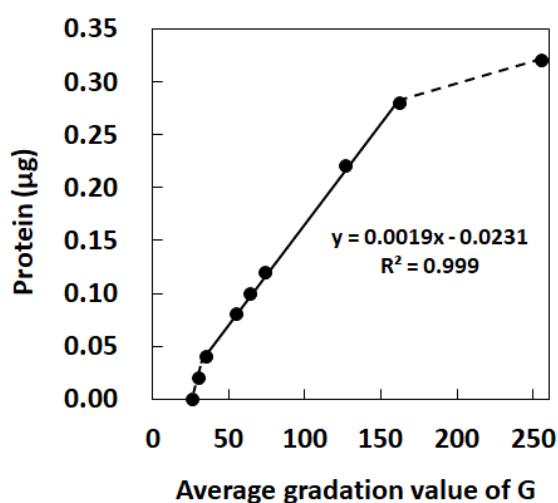


Fig. 1-2 Relationship between the fluorescence intensity and the gradation value obtained from fluorescence images. Gradation values of fluorescence images from dot-blotted FTSC-labelled carbonylated BSA were plotted against the amount of protein. The fluorescence intensity gave a linear relationship with pixel values ranging from 35 to 160 of the gradation value of G (solid line).

このことから FTSC に由来する蛍光強度は、画像の G の平均階調値で評価可能であると判断し、CPs の数値化において客観的評価の妨げとなる角層積層部分を、階調値分布に基づいて除外するアルゴリズムを検討した。

画像から画像ヒストグラムを出力し、G の階調値分布を取得した (Fig. 1-3a)。TBIP によって、細胞が存在しない領域 (バックグラウンド) と、角層積層部を除く階調閾値をそれぞれ設定し、画像を再出力することにより (Fig. 1-3b)、バックグラウンドと角層の積層部を除いた画像 (Fig. 1-3b-B) が抽出された。そこで、抽出された画像の G の平均階調値を用いて角層の CP レベルを評価することの妥当性および有用性を、以降の試験において評価した。

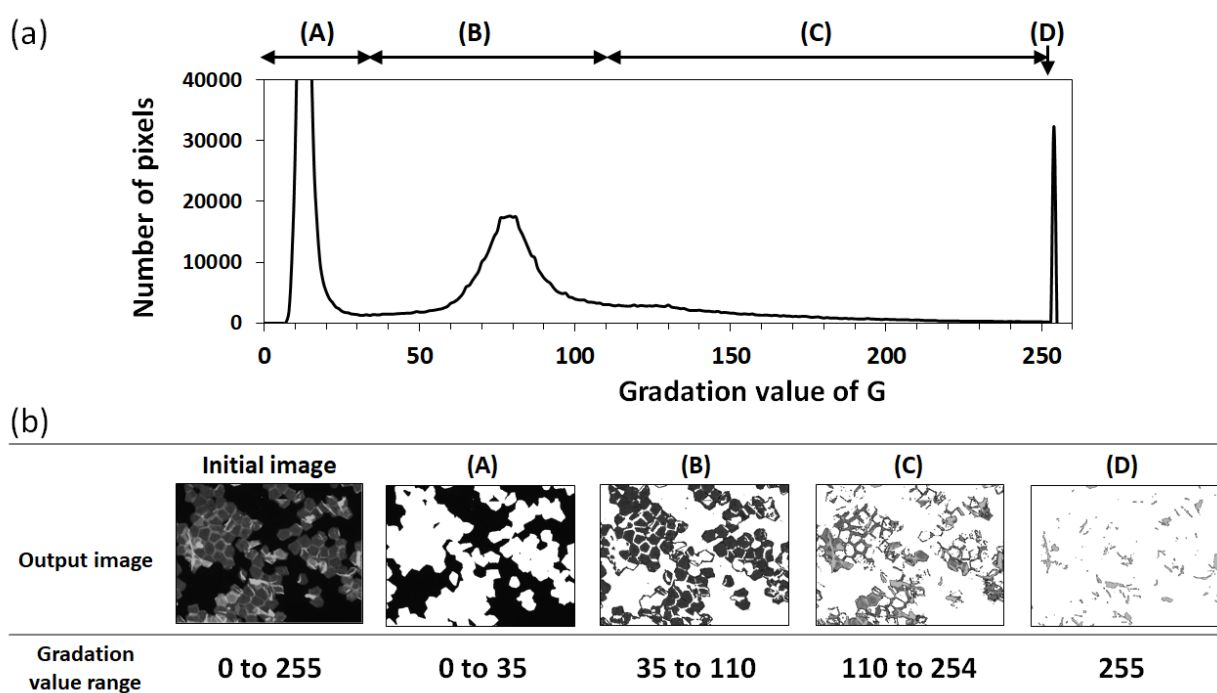
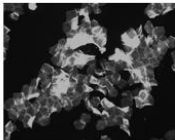
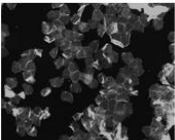
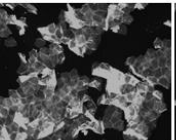
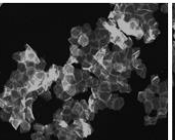
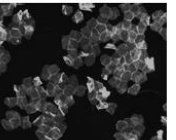


Fig. 1-3 Identification of fluorescence origins using a profile of the image histogram. A representative profile of the image histogram of the gradation value of G (a). Thresholded images by appropriate values of the gradation value of G (b). The profile was divided into four fragments, A to D. The background area (A) and the monolayer stratum corneum (SC) (B) were specifically divided. The multiplex area (C) and the overlapping SC and debris (D) emitted strong fluorescence, and the pixel values were out of the linear range.

1-3-2. 階調閾値処理の有無による同一角層試料の CP レベルの比較

角層タンパク質のカルボニル化の程度を評価する目的において、TBIP により角層積層部分を除去して算出した CP レベルを用いることの妥当性を評価した。直径 6 mm のテープで採取した角層の CPs を FTSC によって蛍光標識したのち、蛍光画像をランダムに 5 か所撮影し、TBIP によって角層積層部分を除去した場合と、閾値処理を行わずに算出した場合の CP レベルをそれぞれ算出した。閾値処理をおこなわずに算出した CP レベル (Fig. 1-4a) と比較し、閾値処理をおこなった CP レベル (Fig. 1-4b) は低値となり、標準偏差が顕著に低減することが確認された。

(a)

Initial Fluorescent image						
CP level	127.3	110.24	135.0	117.9	101.7	118.5 ± 13.2

(b)

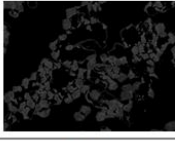
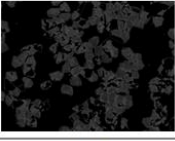
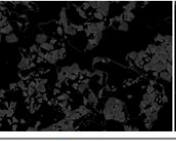
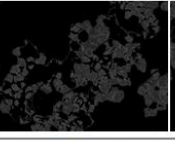
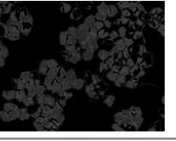
Output image with TBIP method						
CP level	72.7	71.5	76.6	74.8	73.9	73.9 ± 1.9

Fig. 1-4 Comparison of CP levels with and without the threshold-based image processing (TBIP) method. Five fluorescent images were captured from a FTSC-labelled SC sample that was 6 mm in diameter. The initial images containing multiplex desquamation areas and saturated pixels (a). Each output image of the SC monolayer with the TBIP method (b).

1-3-3. UV 照射によって増加する角層 CPs の検出

TBIP の有無による、角層の CP レベルの微小な差の検出感度を比較することを目的とし、UV 照射により誘導した脂質過酸化反応を介した角層の CPs の増加を、それぞれの CP レベルによって評価した。スライドガラスに転写した角層試料の表面にスクアレンを滴下後、UV を照射したときの CP レベルは、TBIP の有無にかかわらず、UV 照射強度依存的な増加傾向を示した (Fig. 1-5)。UV 未照射角層の CP レベルに対して統計的に有意な差を示す最小の UV 照射強度は、TBIP をおこなうことにより低下したことから、TBIP により角層の CP レベルの微小な差の検出感度が向上したことが示唆された。

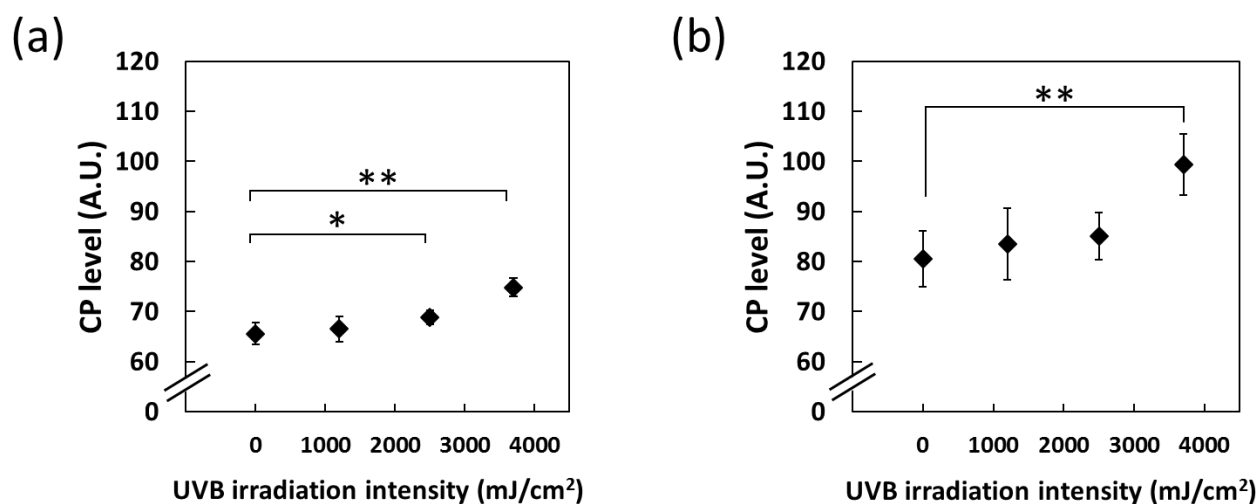


Fig. 1-5 Measurement of UVB-induced CP levels. CP levels obtained by the TBIP method (a) and by the simple image analysis method (b). Data are expressed as means \pm standard deviation ($n = 6$), Significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. sham irradiation control).

1-4. 考察

テープストリッピング法によって採取した角層試料は、皮膚状態を反映する数々のパラメーターを半侵襲的に評価可能にするという点において、有用な生体試料である。いくつかのバイオマーカーを、検出および定量するために、蛍光標識された角層の画像を用いた画像解析法が利用されている^{79,80}。しかし、テープストリッピング法によって採取した角層を蛍光標識すると、角層が積層する部分から非常に強い蛍光が発せられるため、蛍光画像から算出される平均蛍光強度の定量的な扱いを困難にしている問題があった。

一般に、同一被験者の同一部位より得られた角層の酸化ストレスレベルは同様であると考えられる。しかしながら、FTSCによって蛍光標識された角層試料を直径 6 mm の範囲においてランダムに 5 か所撮影した蛍光画像を比較すると、画像に含まれる多重剥離部分の比率に応じて、CPs の存在率は全く異なる印象を与えた。実際に、これらの 5 枚の画像を用い、多重剥離部分を含めて算出した細胞面積あたりの平均輝度は、標準偏差が高い結果となった (Fig. 1-4a)。つまり、角層の積層部分を除去することなく、単純な画像解析によって算出された角層の CP レベルを、角層試料の酸化レベルを反映するパラメーターとして採用することは、精度の観点から考えて不適切であると示唆された。これらの事実より、解析における角層の積層部分の影響を排除することによる、単層の角層細胞内の CPs を計測する技術

開発の重要性が示唆されたことから、単層の角層領域を画像上で抽出し、単層の角層に由来した CP レベルを算出する新たな手法を検討した。

はじめに、FTSC による蛍光標識によって得られた角層のデジタル蛍光画像を用いて、RGB 表色系の G の階調値により CP レベルを算出する手法の妥当性を評価した。8 ビットのデジタル画像においては、RGB の光の 3 色は、それぞれ暗から明まで 256 段階のグラデーションで表現され、この時の 256 段階の値を階調値と呼ぶ。デジタル画像は、CCD カメラによって受光された光の強度に基づき、ピクセル毎に階調値が指定されることにより作図される。そこで、画像の G の階調値と FTSC の蛍光強度との直線性を確認した (Fig. 1-2)。その結果、8 ビットの画像における階調値が、35 から 160 の範囲に両者の直線関係が認められ、この範囲内においては階調値 G を用いた角層 CPs の相対定量的な議論が可能と考えられた。対照的に、階調値が 35 未満または 160 以上の階調値では直線関係は認められず、少なくとも同じパラメーターを適用した定量的な議論は不可能であることが示唆された。

そこで、画像上において単層の角層細胞を抽出するための、適切な G の階調値を決定するために、蛍光画像の画像値のヒストグラム分布を用い、閾値の選択によって出力される画像を精査した。その結果、FTSC によって標識した角層画像のヒストグラム分布は A から D の 4 つの領域に分割可能であることを見出した (Fig. 1-3a)。領域 A は角層細胞が存在しない背景の画像に相当し、領域 B は単層の角層の画像を抽出した。領域 C は積層した角層の画像に相当し、D は多重に重なり合った角層の画像に相当していた (Fig. 1-3b)。領域 C は、角層の辺縁部に観察される太く帯状に染色される個所と、わずかに存在する強く蛍光を発する角層細胞の画像から構成されていた。角層辺縁部に認められる帯状の領域は、表皮角化細胞分化の立体モデル⁷¹⁾における、隣接した角層細胞の垂直面部同士が接触し重なっている部分と考えられた。4 つの領域のうち、背景に対応する領域 A は階調値 35 未満であり、領域 C および D のテーリング部分は階調値 160 を超える範囲にあった。角層が積層している領域は、G の階調値と FTSC の蛍光強度との直線性が認められる範囲外であったため、この点においても、画像から単層の角層領域を抽出せずに、適切な CP レベルを求めることは困難であることが示唆された。単層の角層領域を選択するための閾値や、FTSC の蛍光強度と階調値との間に直線性が認められる G の階調値の範囲は、蛍光画像を撮影する装置に依存して変化する。しかしながら、それらの値の変化にかかわらず、TBIP によって相対定量的な議論が可能な画像上の領域を選択することは、適切な角層の

CPレベルの算出に不可欠な操作であると言える。

次に、角層の酸化ストレスレベルの評価における、TBIP を用いた CP レベルの算出の妥当性および有用性を検証した。前述の 5 枚の画像を対象とし、角層の積層部分を考慮せずに、単純な画像解析によって算出された角層の CP レベルは、 118.5 ± 13.2 であった (Fig. 1-4a)。一方、TBIP を用いて算出した 5 枚の画像の CP レベルは 73.9 ± 1.9 となり、CP レベルおよび標準偏差の値は低値となった (Fig. 1-4b)。これらの結果を比較することにより、TBIP は標準偏差を減少させ、角層の CP レベルの測定の精度を向上させるのに有用であることが示唆された。また、標準偏差が低下したことから、同時に TBIP が角層の CP レベルの微小な変化に対する検出感度を改善することが期待された。UV 照射による酸化ストレスは、CPs 生成のイニシエーターの一つとなり得る。実際に、*in vitro* にて非常に強い UV を曝露することにより角層の CP レベルが上昇することが報告されている⁶²⁾。そこで、UVB に曝露した角層の CP レベルの増加を、TBIP を用いて解析した。スライドグラスに転写した角層の表面にスクアレンを塗布し、UVB を曝露した。その結果、 $2,500 \text{ mJ/cm}^2$ の照射強度において未照射に対する角層の CP レベルの有意な上昇が認められた (Fig. 1-5a)。対照的に、角層の積層部分を考慮しない単純な画像解析法によって算出された CP レベルは、同じ照射強度においては未照射の角層に対する有意差が認められず、 $3,700 \text{ mJ/cm}^2$ の照射強度において有意差が認められた (Fig. 1-5b)。これらの結果は、TBIP が単純な画像解析法よりも角層の CP レベルの微小な変化に対する検出感度が高いことを示唆している。

以上の結果より、TBIP は、単層の角層から発せられる蛍光を抽出することにより、角層の CP レベルを適切に決定できる手法であると考えられた。最近の研究では、皮膚保湿機能および皮膚の光学的特定の観点から、角層において CP レベルを低値に維持することの重要性が提案されている^{67-69,79)}。そのため、角層における CPs の生成を抑制する薬剤のスクリーニング研究や、角層の CPs をパラメーターとした皮膚状態の疫学的な研究において、TBIP を用いた本法は非常に有用な研究ツールになると期待される。

第2章 太陽光照射下にて CPs が ROS を生成するメカニズム

2-1. 諸言

角層は皮膚の最外層に位置し、太陽光への曝露をはじめとした外環境に曝される器官である。皮膚への UV 照射は、角層における H_2O_2 の生成を誘導する可能性が示されており⁸⁰⁾、角層には UV の曝露下において ROS を生成する機構が存在することが示唆される。これまでの報告において、最終糖化反応生成物である AGEs が光増感剤として UVA を吸収することにより、 $\cdot\text{O}_2^-$ が生成されることが報告されている²⁰⁾。角層においても AGEs の存在は認められることから⁸¹⁾、AGEs が H_2O_2 生成の供給源の一つとして機能する可能性が考えられる。しかしながら、AGEs の生成速度と角層のターンオーバー速度とのバランスを考慮すると、角層中の AGEs が UV 曝露による ROS 生成の主要な因子であるとは考えにくい。

一方、角層は CPs が生成されやすい環境を有している。事実として、角層では深部よりも表層において、CPs が多く存在する。角層表面にはスクアレンやトリグリセリド、遊離脂肪酸、コレステロールおよびコレステロール誘導体からなる皮脂が存在している。さらに角層表面では、UVA の曝露によって尋常性ざ瘡の原因菌である *Propionibacterium acnes* が産生するコプロポルフィリンの光増感反応を介して、 $^1\text{O}_2$ が生成されることが知られている⁸³⁾。皮脂は、分子構造中に不飽和結合を有するものを含むため、皮膚表面で生成された $^1\text{O}_2$ により容易に酸化される。実際に、太陽光線へ曝露された皮膚では皮脂中のスクワレンが酸化されたスクワレンペルオキシドの存在が報告されている^{83,84)}。このように、角層は ROS の生成と脂質過酸化反応を介して CPs が生成されるのに適した環境にあることが理解される。さらに、CPs は黄褐色を呈するなどの AGEs と類似の光学的特性を有する⁸⁵⁾。CPs は AGEs に比較してユビキタスに角層に存在することからも、CPs が角層における ROS 生成の生成源となりうる可能性が示唆される。

そこで本章では、CPs が光増感剤として機能し、太陽光曝露下において ROS を生成する可能性について検証することを目的として研究を実施した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 試薬

試薬は以下のものを使用した。

アクロレイン(モノマー); Ethylene glycol diglycidyl ether (EGDG); Methyl cypridina luciferin analog (MCLA); 4-hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole hydrazine (NBD-H); 東京化成工業株式会社(東京), Sodium dodecyl sulphate (SDS); MES; キシレン; 和光純薬工業株式会社(大阪), BSA; FTSC; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), BCA protein assay reagent kit; Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, USA), 尿素; 2-メルカプトエタノール; トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris); Tri-fluoroacetic acid (TFA); アジ化ナトリウム (NaN_3); SOD; ナカライテスク株式会社(京都), 5-(2,2-Dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide (CYPMPO); ラジカルリサーチ研究所(東京), 羊毛由来ケラチン; 株式会社成和化成(大阪).

2-2-2. 光源

紫外線の照射は、以下に示す 2 種類の光源を使用し、照射強度は紫外線照度計 (UVX radiometer sensor; UVP(Upland, CA, USA)) を用いて 310 nm における照射強度を測定した。

- ・ ソーラーシミュレーター (DRC SOLAR UV SIMULATOR 3P-100); 株式会社ワイ・イー・ブイ(大阪)
- ・ キセノンアークランプ (Supercure-203S UV LIGHTSOURCE); 株式会社 三永電機製作所(大阪)

短波長可視光(400–470 nm, ブルーライト)の照射は、白色 LED 光源に 470 nm の長波長カットフィルター(55HA; 朝日分光株式会社(東京))を装着することで波長分離したものを使用した。ブルーライトの照射強度は パワーメーター (PowerMax-USB PM2 Power Sensor); Coherent inc. (Santa Clara, CA, USA)) を用いて測定し、435 nm におけるエネルギー量に換算して示した。

2-2-3. 試料の調製

2-2-3-1. 豚皮由来角層シートの調製

食肉処理場にて、屠殺直後の食用豚の新鮮な豚皮を入手した。豚皮は約 100 cm² に成形した後、皮下脂肪層を金属製ヤスリ(AK-STDH; 株式会社 TJM デザイン(東京))で除去し、角層表面を傷つけない

いように小型のハサミで毛を切断した。試験に使用するまでの間、 -80°C にて凍結保管した。角層シートは、加熱分離法 (heat separation)⁸⁶⁾によって調製した。

2-2-3-2. テープストリップ法によるヒト角層の採取

ヒト角層の採取は、東京工科大学倫理審査委員会にて承認された後に実施した。角層は粘着テープを用いたテープストリップ法によって採取し、粘着テープを直径 6 mm の円形に成形して使用した。試験には、セロテープおよび角質チェッカー (有限会社アサヒバイオメッド (東京)) の 2 種類の粘着テープを使用した。セロテープを用いて採取した角層は、第 1 章 1-2-4 項に示した方法でスライドガラスに転写し、蛍光顕微鏡観察に使用した。角質チェッカーを用いて採取した角層は転写をせず、2-2-5-2 項に示す ROS 反応性化学発光プローブである MCLA を用いた試験に使用した。

2-2-3-3. ケラチンフィルムの調製

ケラチンフィルムは Tanabe らの方法⁸⁷⁾を一部改変して調製した。可溶化ケラチンを調製することを目的とし、蓋つきのガラス容器にて、羊毛由来ケラチン 9 g を 8 M 尿素、0.26 M SDS および 1.66 M 2-メルカプトエタノールを含有する水溶液 100 mL に浸漬した。これを振とう恒温槽 (パーソナル-11・SDN; タイテック株式会社 (埼玉)) を用いて、 50°C にて 16 時間振とうした後、溶液を回収して遠心分離し (3,000 rpm、10 分間) 上清を得た。上清をナイロンメッシュによってろ過し、得られたろ液をセルロース製の透析チューブ (UC36-32-100, molecular cutoff of 12–16 kDa, diameter 28 mm; エーディア株式会社 (東京)) に充填し、3 L の精製水を透析外液として、 4°C にて 3 日間透析後、透析内液を回収し、可溶化ケラチン溶液を得た。3 日間の透析の期間中、透析外液は毎日交換した。機械的強度のあるケラチンフィルムを調製することを目的とし、架橋剤として 2 mg/mL EGDG をタンパク質濃度 20 mg/mL の可溶化ケラチン溶液に加え、よく混合した。これを底面が平滑なポリプロピレン製のディッシュに注いだものを、 50°C にて一晩反応および乾燥させることで、透明なケラチンフィルムを調製した。

2-2-3-4. タンパク質のカルボニル化

CPs はアクロレインとタンパク質との反応によって生成させた。豚皮のアクロレイン処理は次に示す方

法でおこなった。毛と皮下脂肪層を除去した豚皮を、厚さ 5 mm の 2 枚のプラスチック板の間に挟み、クリップによってきつく留めた。角層側のプラスチック板には予め直径 2.5 cm の穴を複数開けておき、豚皮の角層表面を底面とするこれらの穴に 0–10 mM アクロレイン水溶液を加え、37°C にて 15 時間インキュベートすることによって豚皮をカルボニル化させた。その後、アクロレイン水溶液を除去し、精製水を用いて十分に洗浄し、プラスチック板を外して、試験に供した。

ケラチンフィルムは、1 M アクロレイン水溶液中にて 37°C、24 時間インキュベートすることによってカルボニル化させた。カルボニル化したケラチンフィルムは精製水を用いて十分に洗浄した後、試験に供した。

BSA は、450 mg の BSA および 150 mM アクロレインを含む水溶液 3 mL を 37°C にて 48 時間インキュベートすることによりカルボニル化した後、未反応のアクロレインを次の条件において透析し、除去した。反応液をセルロース製の透析チューブ (molecular cutoff of 3.5 kDa, diameter 12 mm; Fisher Scientific USA (Pittsburgh, PA, USA)) に充填し、精製水 1.5 L を透析外液として、4°C にて 2 日間透析をした。透析開始 24 時間後に、外液を 1 回交換した。透析内液を遠心式限外ろ過フィルターユニット (Centricut; molecular cutoff 10 kDa, 倉敷紡績株式会社 (大阪)) を用いて適宜濃縮したものを CP-BSA 溶液とし、試験に供した。

2-2-4. CP レベルと自家蛍光レベルの算出

角層およびケラチンフィルムの自家蛍光は、蛍光顕微鏡を用いて青色 LED 光 (390 ± 20 nm) 照射下にて観察した。角層の CPs は、FTSC を使用した第 1 章 1-2-5 項に示した方法で蛍光標識した。角層の自家蛍光レベルおよび CP レベルは、蛍光画像ピクセルあたりの平均階調値として算出した。

ケラチンフィルムの CPs は、FTSC で標識後マイクロプレートリーダーによって蛍光強度を測定することにより数値化した。ケラチンフィルムを直径 6 mm に成形した後、96 穴マイクロプレートのウェルの底面に設置し、0.1 M MES-Na buffer (pH 5.5) を用いて調製した 20 μ M FTSC を 100 μ L 加え、20 分間反応させた後、精製水で十分に洗浄した。FTSC の蛍光強度 (励起波長: 465 nm, 蛍光波長: 535 nm) をマイクロプレートリーダーによって測定し、ケラチンフィルムの CP レベルとした。

CP-BSA の CP レベルは、アルデヒド基反応性蛍光プローブである NBD-H を用いて数値化した。25

μM NBD-H を含む 0.05% TFA を、アクロレイン処理した BSA に加え、室温にて 30 分間反応後、マイクロプレートリーダー (Spark 10M; TECAN (Männedorf, Switzerland)) によって蛍光強度 (励起波長: 465 nm, 蛍光波長: 535 nm) を測定し、BSA の CP レベルを算出した。

2-2-5. ROS の検出

2-2-5-1. ESR スピントラップ法による ROS の検出

ESR スペクトルは、ESR 測定装置 (RFR-30 spectrometer; 株式会社 JEOL (東京)) を用い、室温において、キセノンアークランプによる UV および可視光の照射下にて測定した。90 mg/mL に調製した CP-BSA もしくは BSA 20 μL と 400 mM に調製した CYPMPO 10 μL を混合した後、ガラス製のキャピラリーに充填して ESR 測定装置に設置した。SOD は 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したものを 10 μL 添加した。キセノンアークランプの照射下 (600 mJ/cm^2) にて、CP-BSA および BSA より生成する CYPMPO アダクトの ESR スペクトルを記録した。設定条件は以下の通りとした (Table 2-1)。

Table 2-1 Measuring conditions for ESR study.

Items	Value
modulation frequency	9.4 GHz
modulation amplitude width	0.01 mT
scanning field	336.0 ± 5 mT
receiver gain	1000
output power	16 mW

2-2-5-2. MCLA 化学発光の測定

$^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{O}_2$ と反応することにより化学発光を示す MCLA を用い、ヒト角層およびケラチンフィルムから生成される ROS を化学発光によって測定した。角質チェッカーを用いて採取した角層を、直径 6 mm の円形に成形した後、角層が付着している面が上向きとなるように白色マイクロプレートのウェルの底面に設置した。同様に、ケラチンフィルムについても直径 6 mm に成形し、白色マイクロプレートのウェルの底面に設置した。角層表面およびケラチンフィルムに、種々の光源によって光を照射した直後に、

0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) を用いて 10 μ M に調製した MCLA 溶液を 100 μ L 加え、発生した化学発光の強度を、マイクロプレートルミノメーター (Luminoskan Ascent; Thermo Fisher Scientific Inc., (Waltham, MA, USA)) を用いて直ちに測定した。

2-2-6. 統計解析

測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、Student の t 検定によって有意差検定をおこなった。 p 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

2-3. 結果

2-3-1. UV 照射により角層において生成される ROS と CPs

テープストリップ法によって採取した角層を用い、UV への曝露により角層から ROS が生成される可能性を検討した。剥離角層に UV を照射後、生成された ROS を MCLA の化学発光によって検出したところ、UV 未照射の角層に対して有意な化学発光の増加が認められた (Fig. 2-1a)。このことから、角層において UV 照射により ROS が生成することが確認された。次に ROS の生成により誘導される CPs の生成を検証したところ、UV を照射した角層の CP レベルは照射強度依存的に増加した (Fig. 2-1b)。これらのことから、角層への UV の照射によって誘導された ROS が、角層タンパク質をカルボニル化した可能性が示唆された。

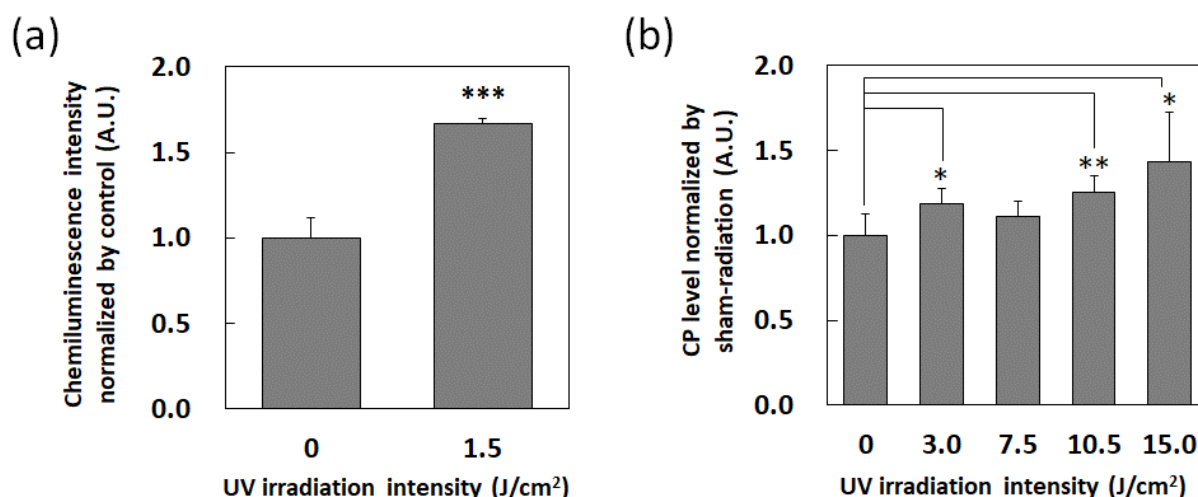


Fig. 2-1 Effect of UV exposure on the SC *in vitro*. (a) MCLA chemiluminescence intensity of the SC increased after UV irradiation at 1.5 J/cm². The SCs were tape-stripped from the upper inner arm of human skin with a KAKUSHITSU checker, and then were cut into 6 mm diameter pieces for the assay. The die-cut SC sheet was placed on the bottom of a white colored microplate for UV irradiation with a solar simulator. ROS generation was detected as chemiluminescence intensity with a microplate luminometer immediately after adding 100 μ L of 10 μ M MCLA. (b) UV exposure increased the CP level in the SC. SC tape-stripped from the upper inner arm was exposed to UV using a solar simulator. CP levels were digitalized by image analysis of fluorescent images obtained from the fluorescence labelling technique using fluorescein-5-thiosemicarbazide. Data are expressed as means \pm standard deviation of 5 independent examinations. Significance, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs. sham irradiation control).

2-3-2. 角層およびケラチンフィルムの CP レベルと自家蛍光の関連性

2-3-1 項の検討において ROS が生成したことから、この ROS 生成における光増感反応の関与の可能性が考えられた。一般に光増感反応による ROS の生成は、クロモフォアが光エネルギーを吸収して励起され、一重項状態となったのち、基底状態(三重項状態)に戻るときに、酸素分子に対してエネルギー移動あるいは電子移動をおこなうことにより生じる。また、一般にクロモフォアが一重項状態から基底状態に戻るとき蛍光を生じる場合がある。このことから、UV を照射した角層における ROS 生成のメカニズムを考察することを目的とし、角層の自家蛍光に着目した。その結果、角層の自家蛍光強度と角層の CP レベルは正の相関を示すことを見出した (Pearson's correlation coefficient, $r = 0.591$, Significance, $p < 0.001$, Fig. 2-2)。

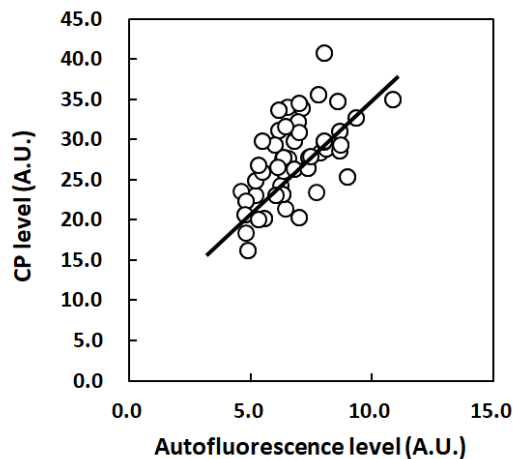


Fig. 2-2 Positive correlation of the CP level with autofluorescence level of the SC. SCs were collected by tape-stripping from the cheek or the upper inner arm of volunteers ($n = 5$). The autofluorescence level and CP level were determined after UV exposure (0, 3, 7.5, 10.5, 15 J/cm²). Data points do not consider the collection site or the irradiation energy. Data are expressed as means of 5 independent examinations. Pearson's correlation coefficient, $r = 0.591$, $p < 0.001$.

さらに、豚皮由来の角層シート、およびケラチンフィルムを試料とし、アクロレインを用いて人工的にカルボニル化を誘導した結果、どちらの試料においてもアクロレイン処理によって CP レベルの有意な増加とともに、自家蛍光レベルの有意な増加が認められた (Table 2-2)。

Table 2-2 Relationship between artificial protein carbonylation and autofluorescence.

Specimen	Acrolein (mM)	CP level normalized by control (A.U.)	Autofluorescence level normalized by control (A.U.)
SC from porcine skin	0	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.09
	1	1.74 ± 0.13 ***	1.26 ± 0.09 **
	10	2.09 ± 0.15 ***	1.59 ± 0.02 ***
Keratin film	0	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.14
	1000	6.74 ± 1.48 ***	1.54 ± 0.39 ***

CP levels were determined by the fluorescence labelling technique using fluorescein-5-thiosemicarbazide. Both the CP level and the autofluorescence level of the SCs increased after acrolein treatment. Data are expressed as means ± standard deviation of 5 independent examinations. Significance, ** p<0.01, *** p<0.001 (vs. non-acrolein treated control).

2-3-3. CPs の蛍光スペクトル

CPs の光学特性を明らかにすることを目的として、アクロレインを用いて人工的にカルボニル化した豚皮由来角層シートと、CP-BSA の蛍光および励起スペクトルを測定した (Fig. 2-3)。無処理の BSA および無処理の角層シートは、375 nm を弱いピークとする励起スペクトルと 510 nm を弱いピークとする蛍光スペクトルを示した (Fig. 2-3a, b)。一方、CP-BSA とカルボニル化した角層シートは、どちらも劇的に蛍光強度が増加し、430 nm を明瞭なピークとする励起スペクトルと、520 nm を明瞭なピークとする蛍光スペクトルを示した (Fig. 2-3c, d)。アクロレイン処理によって、蛍光強度が顕著に増加したことに加え、励起スペクトルのピークが 375 nm から 430 nm に長波長側へのシフトが確認された。これらの結果から、アクロレイン処理によるカルボニル化によって蛍光性のフラグメントが生成したことが示唆された。

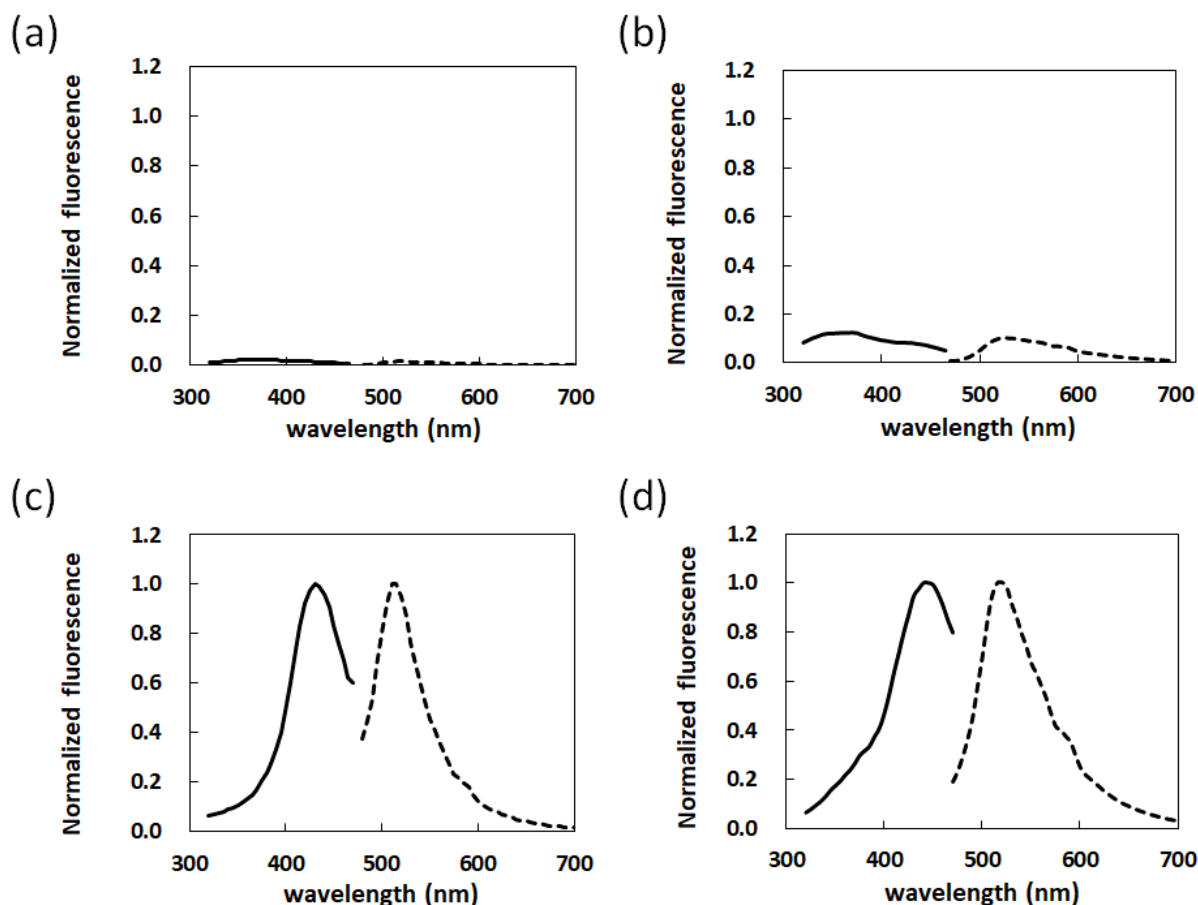


Fig. 2-3 Fluorescence spectrum of carbonylated-BSA (CP-BSA) and carbonylated-SC sheets. Fluorescence spectra were measured by an excitation-emission matrix spectroscopy at an excitation wavelength of 320–470 nm (solid line) and an emission wavelength of 480–700 nm (dashed line). (a) BSA, (b) non-treated SC sheet, (c) CP-BSA and (d) carbonylated SC sheet.

2-3-4. MCLA 化学発光法を用いた ROS 検出と同定

CP-BSA の励起スペクトルに基づき、角層の CPs への長波長 UVA およびブルーライトの照射による ROS の生成を検証した。アクロレイン処理によって人工的にカルボニル化した豚皮由来の角層シートに、長波長 UVA およびブルーライトを照射後、ROS の生成を MCLA の化学発光によって検出した。その結果、長波長 UVA 照射およびブルーライト照射のどちらにおいても、角層の CP レベル依存的に MCLA の発光強度が増加することが明らかになった (Table 2-3)。また、試料としてケラチンフィルムを用いた場合においても、長波長 UVA およびブルーライトの照射によって MCLA の化学発光は増加し、その強度はカルボニル化したケラチンフィルムを用いることにより、さらに増加することが確認された。

MCLA は $\cdot\text{O}_2^-$ および $^1\text{O}_2$ との反応により化学発光を生じることから、アクロレイン処理をしていない通常のヒト由来角層から生成される ROS の同定を目的として、SOD およびアジ化ナトリウム (NaN_3) の添加が、MCLA の化学発光強度に与える影響を評価した。その結果、長波長 UVA およびブルーライトへの曝露によって角層より生成される ROS に由来する MCLA の化学発光は、反応系への SOD (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の添加によって有意に低下した。一方、 NaN_3 の添加によっては有意な変化は認められなかった。この結果より、長波長 UVA もしくはブルーライトへの曝露によって角層より生成される ROS は $\cdot\text{O}_2^-$ である可能性が示唆された。

Table 2-3 Effects of acrolein treatment on ROS generation after UV / blue light radiation *in vitro*.

Samples	Acrolein (mM)	CP level (A.U.)	Sham-radiation	UV			Blue light radiation		
			C.I. mean \pm SD	C.I. mean \pm SD	Significance vs. acrolein non-treated	Significance vs. sham-radiation	C.I. mean \pm SD	Significance vs. acrolein non-treated	Significance vs. sham-radiation
Porcine SC	0	1.00 \pm 0.13	1.00 \pm 0.08	1.22 \pm 0.03		#	1.27 \pm 0.03		†††
	1	1.74 \pm 0.13	1.11 \pm 0.10	1.36 \pm 0.01	**	#	1.33 \pm 0.03	*	††
	10	2.09 \pm 0.15	1.10 \pm 0.11	1.49 \pm 0.05	**	##	1.38 \pm 0.06	*	††
Keratin film	0	1.00 \pm 0.24	1.00 \pm 0.04	1.17 \pm 0.08		#	1.19 \pm 0.06		†††
	1000	6.74 \pm 1.48	1.01 \pm 0.06	1.29 \pm 0.07	*	###	1.32 \pm 0.10	*	†††
Human SC	0	–	1.00 \pm 0.06	1.13 \pm 0.05		###	1.31 \pm 0.05		†††
	+ SOD (10 μ g/mL)	–	0.86 \pm 0.06	1.02 \pm 0.06	*	##	0.94 \pm 0.03	***	†
	+ NaN ₃ (500 μ M)	–	1.03 \pm 0.09	1.17 \pm 0.06		##	1.35 \pm 0.02		†††

ROS generation after irradiation was evaluated using the MCLA chemiluminescence method. UV (1.5 J/cm²) and blue light radiation (12 J/cm²) were carried out using a solar simulator and white light-emitting diodes (LEDs) with a 470 nm short pass filter respectively. MCLA chemiluminescence intensities (C.I.) were normalized by the intensity of the sham irradiation control of the non-acrolein treated subject. CP levels were determined using the fluorescence labelling technique with fluorescein-5-thiosemicarbazide. Data are expressed as means \pm standard deviation of 5 independent examinations. *: significant difference compared to non-acrolein treated control. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. #: significant difference between sham irradiation control and UV irradiation. # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001. †: significant difference between sham irradiation control and blue light irradiation. † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001.

2-3-5. ESR スピントラップ法を用いた ROS の検出と同定

長波長 UVA およびブルーライトの波長領域を含むキセノンアークランプの照射下において、CPs より生成される ROS を ESR スピントラップ法により同定した。未照射の BSA および CP-BSA と、キセノンアークランプ照射下における BSA は明瞭なシグナルを示さなかった (Fig. 2-4a-c)。一方、CP-BSA は、スピントラップ剤の共存下において、キセノンアークランプの照射下にて明瞭な ESR スペクトルを示した (Fig. 2-4d)。このスペクトルパターンは、CYPMPO の $\cdot\text{O}_2^-$ アダクトにおける ESR スペクトルパターンと類似していた⁸⁸⁾。そこで、UV および可視光を照射した CP-BSA に由来する ESR シグナルパターンにおける、 $\cdot\text{O}_2^-$ の寄与を明らかにする目的で同測定系に SOD を添加したところ、ESR シグナルは完全に消失した (Fig. 2-4e)。これらの結果より、UV および可視光の照射下において CP-BSA より与えられる ESR スペクトルは、 $\cdot\text{O}_2^-$ の生成に由来するスペクトルであると考えられた。

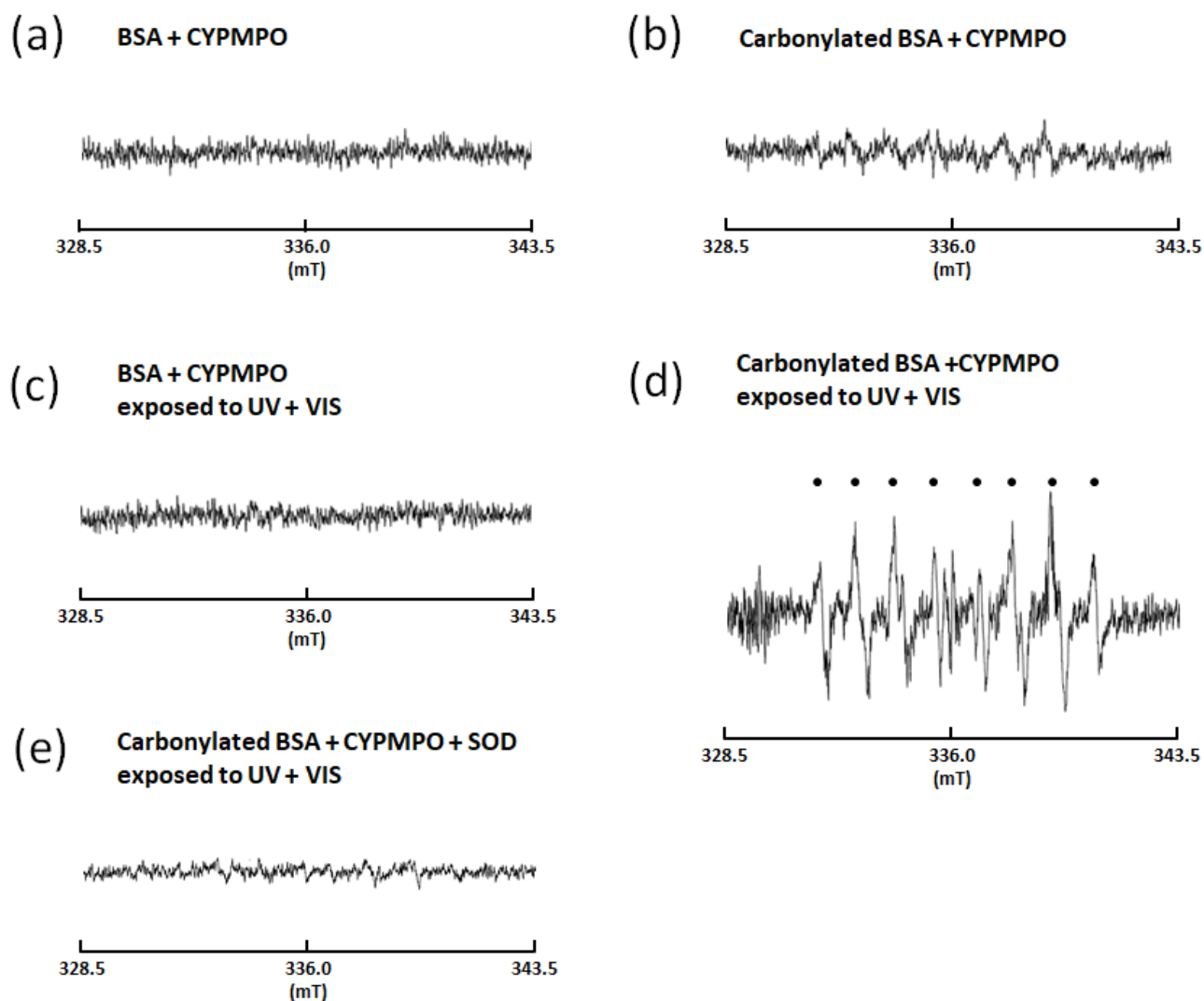


Fig. 2-4 ESR spectra of CYPMPO adducts obtained from acrolein-treated BSA during UVA and visible light irradiation. ESR spectra were obtained using the RFR-30 Radical Analyzer system after exposure to UVA and visible light with a xenon arc lamp at room temperature. A solution composed of the sample and 400 mM CYPMPO solution was transferred into an ESR quartz cell, which was placed in the ESR. (a) BSA (90 mg/mL); (b) CP-BSA (90 mg/mL); (c) BSA (90 mg/mL) exposed to UVA and visible light (600 mJ/cm²); (d) CP-BSA (90 mg/mL) exposed to UVA and visible light (600 mJ/cm²); (e) CP-BSA (90 mg/mL) and SOD (200 μg/mL) exposed to UVA and visible light (600 mJ/cm²). CP-BSA exposed to UVA and visible light exhibited an ESR spectrum similar to an octet signal that was identified as a CYPMPO-super oxide anion radical adduct.

2-4. 考察

CPs は、タンパク質のアミノ酸残基の直接酸化、もしくは脂質過酸化反応により生成されるアクロレイン、4-ヒドロキシノネナール、マロンジアルデヒドなどの活性アルデヒド化合物とタンパク質との反応によって、タンパク質にアルデヒド基が導入されることにより生成される^{47,48)}。その生成機構から、CPs は脂質過酸化最終生成物 (Advanced lipid peroxidation end products; ALEs) とも言われる⁸⁹⁾。紫外線曝露をはじめとする外因性の酸化ストレスへの曝露にかかわらず、細胞内においては、ミトコンドリアによる呼吸鎖反応の副産物として $\cdot\text{O}_2^-$ が恒常的に生成されており、その結果、細胞内においても CPs は恒常的に生成され得ることが示唆される。そして、表皮においては、表皮生細胞で生成した CPs は終末分化の過程で角層に移行することが考えられる。実際に、非露光部位の角層においても、CPs は検出される。

一方、ヒトの皮膚には、フラビンやポルフィリン、AGEs など、UVA 領域の光を吸収するクロモフォアを有した数多くの物質が存在している^{20,21)}。これらのクロモフォアは、太陽光曝露下における ROS 生成に関与し、皮膚内および皮膚表面における CPs の生成に寄与すると考えられる。これらの事実から、CPs は角層に常に存在し、CPs が太陽光の曝露による ROS の生成に関与している可能性が示唆される。

本章では、長波長 UVA およびブルーライトを曝露した角層から生成される ROS の生成メカニズムについて検討し、CPs の光増感反応を中心とした ROS の生成機構を明らかにした。ソーラーシミュレーターを用いた角層への UV の曝露は、スライドガラスに転写した角層においても、CPs の増加をもたらした (Fig. 2-1b)。これらの事実から、CPs 生成のイニシエーターとなる ROS の生成源が角層中に存在し、その生成源の存在量の違いが、太陽光曝露後に生成する角層内 CP レベルの個人差を生じさせる可能性が考えられた。太陽光曝露によって誘導される ROS 生成のメカニズムとして、最も可能性の高い反応として、光増感反応が挙げられる。光増感剤の特性として、光エネルギーを吸収することにより一重項状態に励起し、基底状態に戻るときにそのエネルギーが放出され、蛍光が観察される場合がある。そのためスライドガラス上に転写した角層に、光増感剤が存在する場合には、光照射下において角層から自家蛍光が検出されると考えた。そこで、角層の CPs が光増感剤として機能する可能性を検証するために、青色光 (370–410 nm) 照射下における角層の自家蛍光強度と、角層の CP レベルとの相関を調べた結果、両者には正の相関があることが明らかとなった (Fig. 2-2)。角層に存在するカルボニルタンパク質は、付加した活性アルデヒド化合物の構造に基づき、様々な種類が報告されている⁹⁰⁾。特にタンパク質へのアクロレイ

ンの付加により生じた CPs が角層に高頻度に存在することが明らかとなっていることから、本研究においてはアクロレインとタンパク質との反応により、人工的にカルボニルタンパク質を生成させたものを試料として用いた。アクロレインを用いてカルボニル化させた豚皮由来の角層シートおよびケラチンフィルムを用い、自家蛍光レベルがアクロレイン処理濃度に依存して増加することを確認した (Table 2-2)。そこで、アクロレイン処理によりカルボニル化した角層シート、および BSA をアクロレイン処理することにより調製した CP-BSA を対象とし、CPs の光学特性を検討したところ、どちらの試料においても、最大励起波長 430 nm および最大蛍光波長 520 nm を明瞭なピークとする励起/蛍光スペクトルを示すことが明らかとなった (Fig. 2-3c, d)。CPs の生成に伴う励起スペクトルの長波長シフト (Fig. 2-3b, d) は、タンパク質のアミノ酸残基とアクロレインとの反応により生じると考えられ、CPs フラグメントとして同定されているピロロール付加物⁹¹⁾ およびジヒドロピリジン付加物⁹²⁾ が CPs 内の蛍光性フラグメントとして生成した可能性がある。

そこで、CPs の励起スペクトルに基づき、長波長 UVA およびブルーライトの照射下にて、CPs による ROS の生成の検出と ROS の同定を試みた。まず、ROS を高感度に検出可能な MCLA 化学発光法を用いて、長波長 UVA およびブルーライトを照射したヒト由来の剥離角層から ROS が生成されることを確認した。さらに、豚皮由来の角層シートおよびケラチンフィルムのアクロレイン処理によるカルボニル化は、長波長 UVA およびブルーライト照射後の、MCLA の化学発光強度を増加させることが明らかとなった (Table 2-3)。MCLA は、 $^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{O}_2^-$ と反応することにより化学発光を生じることが知られている。長波長 UVA およびブルーライト照射下において、角層から生成された ROS を同定するために、MCLA の化学発光測定系における、SOD および NaN_3 の添加の効果を確認した。その結果、SOD は MCLA の化学発光強度の増加を完全に抑制し、 NaN_3 は MCLA 化学発光強度に影響を与えなかった (Table 2-3)。

次に、アクロレイン処理によって調製した CP-BSA を対象とし、長波長 UVA およびブルーライト領域の波長を含む光源であるキセノンアークランプの照射下における ROS の生成を、ESR スピントラップ法を用いて検出した (Fig. 2-4d)。その結果、スピントラップ剤として用いた CYPMPO が示したシグナルは、CYPMPO の $\cdot\text{O}_2^-$ アダクトにおける ESR スペクトルパターンと類似しており⁸⁸⁾、このシグナルは SOD の添加により完全に消失することが確認された。

これらの結果を総合すると、長波長 UVA およびブルーライトへの曝露により角層から生成された ROS は、 $\cdot\text{O}_2^-$ であると結論付けた。

光増感反応による ROS の生成には、基底状態にある三重項酸素への電子移動(タイプ I 反応)による $\cdot\text{O}_2^-$ の生成と、同じく三重項酸素へのエネルギー移動(タイプ II 反応)による $^1\text{O}_2$ の生成の 2 種類の反応がある^{93,94)}。本研究の結果は、CPs が光増感反応のタイプ I を介し $\cdot\text{O}_2^-$ を生成することを示唆している (Fig. 2-5)。以上の結果より、CPs は光増感剤として機能し、タイプ I 反応により ROS を生成し、その作用スペクトルは長波長 UVA およびブルーライトであると結論付けた。

本研究の結果は、角層中の CPs が、太陽光曝露下で ROS の生成を介して新しいタンパク質のカルボニル化を進行させるという、負のループの存在を示唆する。ループの繰り返りは、角層の CP レベルを上昇させると考えられる。角層の CPs は皮膚の水分保持に強く関与していることが報告されていることから^{68,69,95)}、角層における CPs の蓄積は、乾燥肌の形成を誘導する可能性がある。

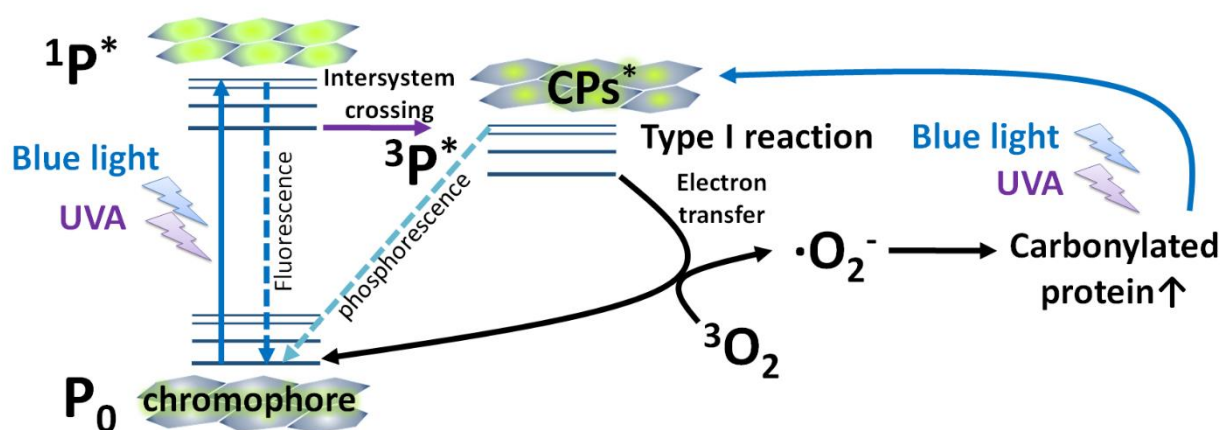


Fig. 2-5 A hypothetical scheme of ROS generation from UV- and blue light-exposed SC. ROS is generated through a photosensitizing reaction of chromophore in SC and light radiation. Photosensitization (Type I reaction) occurs and ultimately generates $\cdot\text{O}_2^-$. P_0 : ground state of photosensitizer, $1P^*$: excited singlet state of photosensitizer, $3P^*$: excited metastable triplet state of photosensitizer, CPs^* : excited carbonylated protein.

第3章 ラウリル硫酸ナトリウムが ROS の生成を誘導するメカニズム

3-1. 緒言

化粧品は、皮膚の保湿や清浄などを目的として日常的に皮膚に直接使用されるものであることから、使用による皮膚障害などのリスクを限りなく低く保つことが求められる。一般に、日本の消費者は清潔志向が高く、ハンドソープやボディソープ、洗顔料などの洗浄剤を頻繁に使用している。多くの洗浄剤はアニオン性の界面活性剤を主成分とするため、使用頻度の面から、日本人は皮膚に対するアニオン性の界面活性剤の影響を受けやすいと考えられる。

代表的なアニオン性の界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム (Sodium lauryl sulfate; SLS) は、*in vivo* において TEWL の増加を誘導することや⁹⁶⁾、刺激性を生じること⁹⁷⁾、NMF の供給源となるプロフィラグリン、角層剥離関連酵素であるカリクレイン 5 および 7 の発現低下を誘導することで、表皮分化に変調をもたらすことが報告されている⁹⁸⁾。また、共焦点ラマン顕微鏡を用いた観察により、SLS は皮膚内に浸透し、表皮生細胞層に到達することが報告されており⁹⁹⁾、SLS は表皮細胞に対して直接的な作用をもたらす可能性が示唆される。一方、SLS を使用した洗浄は、抗酸化剤を含む外用剤の適用を組み合わせ使用をすることにより、SLS による皮膚の刺激性および炎症が低減したという報告があり、SLS が皮膚に及ぼす作用と酸化ストレスとの関連性も示唆される¹⁰⁰⁾。

そこで本章では、SLS により誘導される皮膚障害の要因として、SLS の表皮細胞への直接的な相互作用を考え、細胞内 ROS レベルに注目して検討をおこなった。

3-2. 実験方法

3-2-1. 試薬

試薬は以下のものを使用した。ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium; DMEM); ハンクス平衡塩液 (Ca²⁺および Mg²⁺含有 Hanks' balanced salt solution; HBSS(+)); 日水製薬株式会社 (東京), トリプシン (ブタ膵臓由来); Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt Dihydrate (EDTA); SLS; レシチン (大豆由来); コレステロール; ナカライテスク株式会社 (京都), ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS); Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), BCA protein assay kit; Pierce

Chemical Co. (Rockford, IL, USA) , 1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid acetoxymethyl ester (BAPTA-AM) ; 5-doxyyl stearic acid (5-DSA) ; Fura 2-AM; 2',7' - dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) ; Sigma (St Louis, MO, USA) , Suc-LLVY-7-aminomethylcoumarin (Suc-LLVY-AMC) ; Boston Biochem (Boston, MA, USA) , IL-1 α ELISA Quantikine kit;R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), MitoSox; Molecular Probes (Eugene, OR, USA), MCLA; 東京化成工業株式会社(東京), ヒト表皮再構築モデル (reconstructed human epidermal equivalent; RHE モデル); Episkin (Lyon, France), Sodium lauryl ether sulfate; sodium polyoxyethylene (5) lauryl ether carboxylate; sodium polyoxyethylene (11) lauryl ether carboxylate; sodium lauryl phosphate; lauryl ether phosphate; sodium lauroyl methyl alanine; sodium lauroyl methyl taurine; sodium laurate; potassium cocoate; potassium myristate; 日光ケミカルズ株式会社(東京).

3-2-2. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT 細胞)¹⁰⁾は 5% の FBS を含む DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。0.25%トリプシンおよび 0.02% EDTA を含有する PBS (-)を用いて細胞を剥離し、96 穴培養細胞用マイクロプレート(旭硝子株式会社(東京))に 3.5×10⁴ cells/ウェルの密度で再播種して各実験に供した。

3-2-3. RHE モデルにおける ROS の測定

PBS (-)を用いて種々の濃度に調製した SLS 150 μ L を、RHE モデルの角層表面に滴下し 15 分間処理をした。モデルを PBS (-)によって洗浄し、15 分後および 19 時間後にモデル内で生成される ROS を、MCLA の化学発光によって検出した。モデルを PBS (-)によって洗浄し、50% EtOH を含有する PBS (-)を用いて調製した 100 μ M MCLA 100 μ L を RHE モデルの角層表面に滴下したときの、化学発光を超高感度化学発光画像化装置 (NightOWL; Berthold Technologies (Bad Wildbad, Germany))によって角層側から撮影した。

3-2-4. 細胞内 ROS レベルの測定

マイクロプレートに播種した HaCaT 細胞を 24 時間培養後、HBSS (+) を用いて調製した ROS 反応性蛍光プローブの 20 μM H₂DCFDA によって 30 分間処理し、細胞内に取り込ませた。HBSS (+) にて細胞を洗浄後、5% FBS を含有する DMEM を用いて調製した 0–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SLS を添加し、24 時間培養を継続したのち、0.1% Triton X-100 を含有する PBS (-) によって細胞を溶解し、マイクロプレートリーダーによって蛍光強度を測定した (励起波長: 485 nm, 蛍光波長: 530 nm)。その後、定法にしたがって BCA protein assay kit にてタンパク質量を測定し、蛍光強度をタンパク質量で除して、細胞内 ROS レベルを算出した。結果は、無処理群の値に対する相対値として示した。

3-2-5. ミトコンドリア ROS の測定

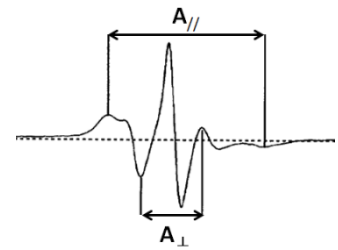
マイクロプレートに播種した HaCaT 細胞を 24 時間培養後、HBSS (+) を用いて調製した $\cdot\text{O}_2^-$ の特異的検出蛍光プローブである 5 μM MitoSOX によって 30 分間処理し、細胞内に取り込ませた。HBSS (+) にて細胞を洗浄後、HBSS (+) を用いて調製した 50 μM SLS を添加し、0–7 時間培養を継続したのち、PBS (-) によって細胞を洗浄後、0.1% Triton X-100 を含有する PBS (-) によって細胞を溶解し、マイクロプレートリーダーによって蛍光強度を測定した (励起波長: 510 nm, 蛍光波長: 580 nm)。その後、BCA protein assay kit にてタンパク質量を測定し、蛍光強度をタンパク質量で除して、ミトコンドリア ROS レベルを算出した。結果は、無処理群の値に対する相対値として示した。

3-2-6. 生体膜流動性の評価

リポソーム膜および HaCaT 細胞の細胞膜流動性の変動は、ESR スピンラベル剤である 5-DSA を用いた ESR スピンラベル法によって評価した¹⁰²⁾。リポソームは、Bangham 法¹⁰³⁾により調製し、定法にしたがいレシチンとコレステロール比を 2:1 として調製した¹⁰⁴⁾。リポソームおよび HaCaT 細胞 (1.0×10^6 cells) をそれぞれ 1 mM 5-DSA または 10 mM 5-DSA 共存下でインキュベートすることにより、生体膜内にスピンラベル剤を取り込ませた。生体膜の流動性における SLS の作用は、ESR スペクトルをもとに次式(式 1)によって算出される秩序パラメーター (S) を用いて評価した。

$$S = (A_{//} - A_{\perp}) / [A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})] \quad (\text{式 1})$$

(A_{xx} : 0.63 mT A_{yy} : 0.58 mT A_{zz} : 3.36 mT)



ESR スペクトルは、ESR 測定装置を用い、37°C において次の設定条件下で測定した (Table 3-1)。

Table 3-1 Measuring conditions for ESR study.

Items	Value
modulation frequency	100 kHz
modulation amplitude width	0.1 mT
scanning field	338.1 ± 5 mT
receiver gain	200
response time	0.03
sweep time	8 min
output power	4 mW

3-2-7. 細胞内カルシウムイオンレベルの測定

細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) レベルは、細胞浸透性を有する Ca^{2+} 反応プローブである Fura-2 AM¹⁰⁵⁾ を用いて評価した。マイクロプレートに播種した HaCaT 細胞を 24 時間培養後、HBSS (+) を用いて調製した 10 μM Fura-2 AM を 30 分間処理することで細胞内に導入した。細胞を洗浄後、HBSS (+) を用いて調製した 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SLS を細胞に曝露し、Fura-2 に由来する蛍光をマイクロプレートリーダーによって測定した (励起波長: 340 nm、蛍光波長: 510 nm)。その後、BCA protein assay kit を用いてタンパク質量を定量し、蛍光強度をタンパク質量で除することで、細胞内 Ca^{2+} レベルを算出した。細胞内 Ca^{2+} レベルは、無処理群の値に対する相対値として示した。

3-2-8. カルパインの活性測定

カルパインの活性は、酵素反応特異的な合成基質 (Suc-LLVY-AMC)¹⁰⁶⁾ を用いて評価した。マイクロプレートに播種した HaCaT 細胞を 24 時間培養後、5% FBS を含有する DMEM を用いて調製した 50

$\mu\text{g/mL}$ SLS によって 1 から 24 時間培養した。HBSS (+) によって細胞を洗浄後、 $10 \mu\text{M}$ Suc-LLVY-AMC を含有する HBSS (+) を用いて 1 時間処理することで細胞内に基質を浸透させた。PBS (-) によって細胞を洗浄後、0.1% Triton X-100 を含有する PBS (-) を用いて細胞を溶解後し、AMC に由来する蛍光をマイクロプレートリーダーによって測定した(励起波長: 380 nm, 蛍光波長: 460 nm)。AMC 標品を用いて作成した検量線に蛍光値を内挿することにより、カルパインの酵素反応によって生成した AMC 量を定量した。その後、BCA protein assay kit を用いてタンパク質量を定量し、単位時間あたりに生成した AMC 量をタンパク質量で除した値を算出し、カルパインの酵素活性 (AMC pmol/ μg protein/h) とした。

3-2-9. IL-1 α 分泌量の定量

マイクロプレートに播種した HaCaT 細胞を 24 時間培養後、5%FBS を含有する DMEM を用いて調製した $50 \mu\text{g/mL}$ SLS を用いて、3、6 および 24 時間処理した。培地中に分泌された IL-1 α を IL-1 α ELISA Quantikine kit を用いて定量した。BCA protein assay kit を用いてタンパク質量を定量し、IL-1 α の定量値をタンパク質量で除することで、タンパク質量あたりの IL-1 α 量を算出した。

3-2-10. 統計解析

測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、Student の t 検定によって有意差検定をおこなった。 p 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

3-3. 結果

3-3-1. SLSを適用した RHE モデルにおける ROS レベルの増加

皮膚に適用した SLS が表皮生細胞層に到達し、細胞内 ROS の過剰な生成を誘導するかを確認する目的で、RHE モデルの角層表面に SLS を適用した。ROS の生成は、MCLA を用いて検出した¹⁰⁷⁾。SLS を適用した RHE モデルでは、わずか 15 分後に強い化学発光が確認され、RHE モデル内における顕著な ROS 生成の亢進が認められた。さらに、19 時間経過後においても過剰な ROS 生成が確認された (Fig. 3-1)。

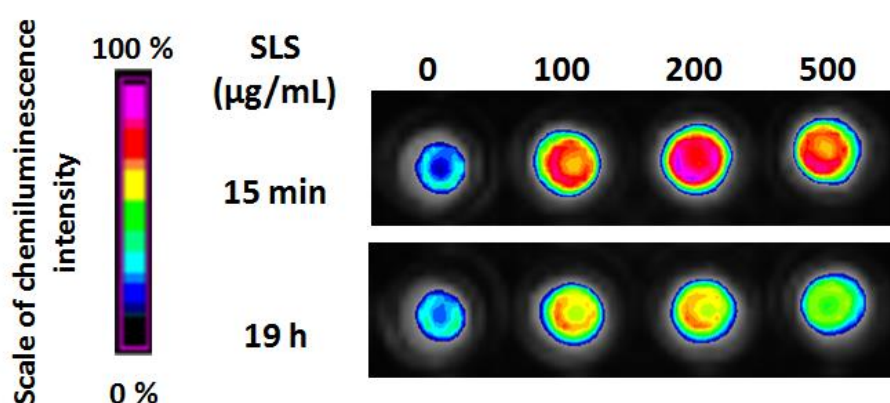


Fig. 3-1 Chemiluminescence images of SLS-treated RHE models. SLS in PBS (150 µL) at various concentrations was placed on the surface of RHE models for 15 min. After washing with PBS, 100 µM MCLA prepared with 50% EtOH in PBS (100 µL) were placed on the surface of the RHEs. Chemiluminescence images were taken with a NightOWL at 15 min and at 19 h.

3-3-2. SLS の曝露が誘導する細胞内 ROS レベルの増加

表皮細胞に対する SLS の直接作用による ROS 生成の誘導を確認する目的で、SLS の処理による細胞内 ROS レベルの変化を評価した。

HaCaT 細胞に SLS を 24 時間処理し、 H_2O_2 をはじめとする種々の ROS と反応することにより蛍光を発する細胞浸透性蛍光プローブ (H_2DCFDA) によって、細胞内 ROS レベルを測定した。SLS 25 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度において、細胞内の ROS レベルは有意に増加し、50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度においては無処理に対して 4.03 ± 0.28 倍に増加した (Fig. 3-2)。

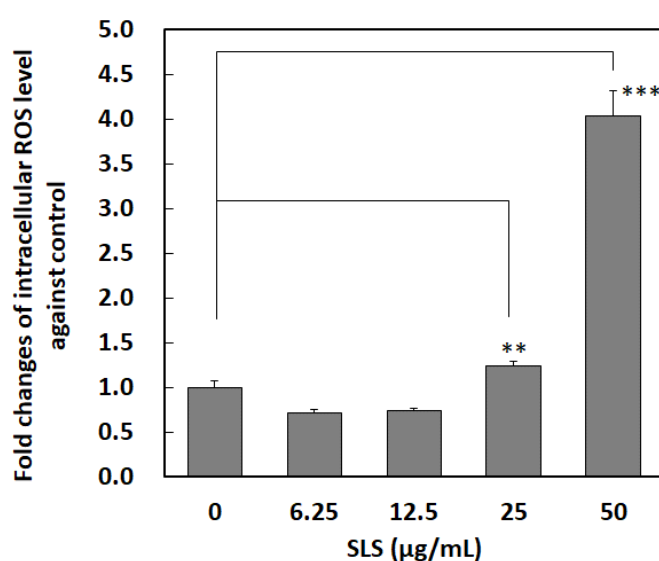


Fig. 3-2 Intracellular ROS levels in SLS-treated HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes loaded with 20 μM H_2DCFDA were cultured in DMEM containing various concentrations of SLS and 5% FBS for 24 h. The fluorescence (Ex; 485 nm, Em; 530 nm) of cell lysates with 0.1% Triton X-100 in PBS was measured. Intracellular ROS levels are calculated as fluorescence intensity (F.I.) per μg protein. Protein concentrations were determined with a BCA protein assay kit. Data are expressed as averages and standard deviations of a fold change against the value of control cells ($n = 5$). Significance ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3-3-3. ミトコンドリア ROS の測定

次に、ミトコンドリアが生成する ROS に着目し、ミトコンドリア移行性を有する $\cdot\text{O}_2^-$ の特異的検出蛍光プローブ (MitoSOX) によって、SLS 処理後のミトコンドリア由来の ROS レベルを経時的に測定した。SLS 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を処理した HaCaT 細胞における ROS レベルは、1 時間後には無処理に対して 10.1 ± 0.6 倍に増加した (Fig. 3-3)。

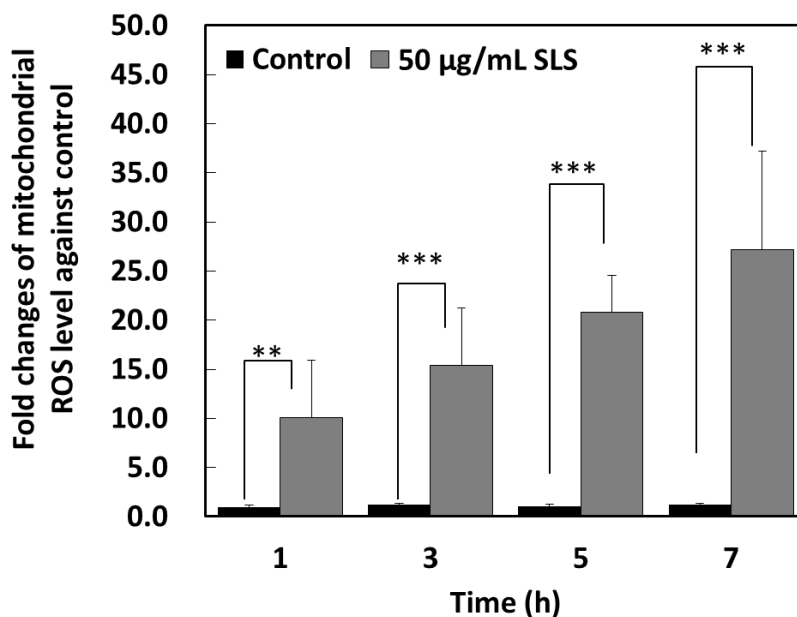


Fig. 3-3 Mitochondrial ROS levels in SLS-treated HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes loaded with 5 μM MitoSOX were incubated with HBSS(+) containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SLS for several periods. The fluorescence (Ex; 510 nm, Em; 580 nm) of cell lysates with 0.1% Triton X-100 in PBS was measured. Mitochondrial ROS levels are calculated as fluorescence intensity (F.I.) per μg protein. Protein concentrations were determined with a BCA protein assay kit. Data are expressed as averages and standard deviations of fold changes against the value of control cells ($n = 5$). Significance ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3-3-4. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加と ROS の生成

細胞内における ROS 生成は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加によって刺激されることから¹⁰⁸⁾、SLS を処理した HaCaT 細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度の動態を、細胞膜透過性を有する Ca^{2+} 反応性蛍光プローブ (Fura-2 AM) によって評価した。HaCaT 細胞に 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の SLS を処理した 3 時間後には、 Ca^{2+} 濃度を反映する Fura-2 の蛍光強度は無処理に対して 3.2 ± 2.0 倍に上昇した (Fig. 3-4a)。さらに、SLS を処理した HaCaT 細胞において誘導される ROS レベルの増加における Ca^{2+} の関与を、 Ca^{2+} に特異的な細胞膜透過性キレート剤 (BAPTA-AM)¹⁰⁹⁾を用いて検証した。HaCaT 細胞を BAPTA-AM の共存および非共存下において SLS を処理し、24 時間後の細胞内 ROS レベルを H_2DCFDA の蛍光によって測定した結果、BAPTA-AM の共存下では 6 時間および 24 時間後の時点において、細胞内 ROS の増加は有意に抑制されることが明らかとなった (Fig. 3-4b)。

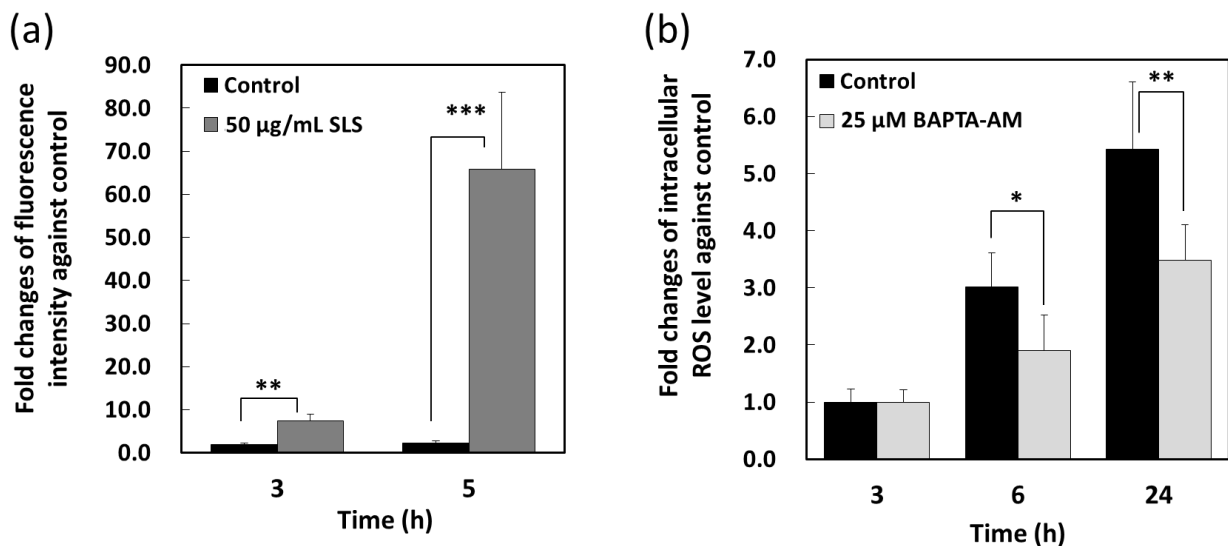


Fig. 3-4 Ca^{2+} influx of SLS-treated HaCaT keratinocytes and effects of a Ca^{2+} chelator, BAPTA-AM, on SLS-induced ROS generation. (a) HaCaT keratinocytes were loaded with 10 μM Fura-2 AM and were exposed to SLS in HBSS(+) at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The fluorescence (Ex; 340 nm, Em; 510 nm) was measured with a fluorescence micro-plate reader. Intracellular Ca^{2+} is calculated as fluorescence intensity (F.I.) per μg protein and is expressed as fold change of the value of control cells. Protein concentrations were determined with a BCA protein assay kit. (b) HaCaT keratinocytes were loaded with 20 μM H_2DCFDA and then were cultured with various concentrations of SLS with or without 25 μM BAPTA-AM for 24 h. The fluorescence (Ex; 485 nm, Em; 530 nm) of cell lysates with 0.1% Triton X-100 in PBS(-) was measured. Intracellular ROS levels are calculated as fluorescence intensity (F.I.) per μg protein. Protein concentrations were determined with a BCA protein assay kit. Data are expressed as averages and standard deviations of fold changes against the value of control cells (n = 5). Significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3-3-5. SLS と細胞膜の相互作用

定常状態において、細胞質ゾルの Ca^{2+} 濃度は、細胞膜上および小胞体膜上に存在する Ca^{2+} チャンネルの働きにより極めて低く調節されていることが知られている¹¹⁰⁾。SLS が誘導する細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加のメカニズムを明らかにすることを目的とし、SLS を処理した HaCaT 細胞、およびモデル系として SLS を処理したリポソーム膜の流動性を、スピンラベル剤 (5-DSA) を用いた ESR スピントラップ法によって測定した。本研究では、膜の流動性は ESR スペクトルより算出した秩序パラメーター (S) によって評価した (3-2-6 項 式 1)。SLS を処理したリポソーム膜および HaCaT 細胞の細胞膜の秩序パラメーターは、未処理に比較して低値を示したことから (Table 3-2)、SLS が生体膜に直接作用することにより、膜の流動性が増加することが示唆された。

Table 3-2 Membrane fluidities of SLS treated-Liposome and HaCaT keratinocytes.

	SLS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	(S) Mean \pm SD
Liposome	0	1.248 \pm 0.007
	25	1.219 \pm 0.005 ***
	50	1.215 \pm 0.008 ***
	100	1.190 \pm 0.006 ***
HaCaT kertinocyte	0	0.782 \pm 0.006
	50	0.735 \pm 0.005 **

The alterations in membrane fluidity were estimated using an ESR spin-labeling method with 5-DSA. Concentrations of 5-DSA on spin labeling were 1 mM for liposomes and 10 mM for HaCaT keratinocytes. After incubation with 5-DSA for 30 min at 37°C, liposomes and HaCaT keratinocytes were treated with various concentrations of SLS. Membrane fluidity was evaluated by order parameter (S) calculated from the ESR spectra. Significance ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3-3-6. SLS を処理した HaCaT 細胞からの IL-1 α の分泌亢進

SLS による細胞内 ROS レベルの増加と IL-1 α の分泌亢進との関連性を明らかにすることを目的として、HaCaT 細胞への SLS の曝露による IL-1 α の分泌応答を検証した。IL-1 α の分泌は、SLS 処理 24 時間後において顕著な増加を示したが、3 時間および 6 時間後においては、有意な分泌亢進は認められなかった (Fig. 3-5a)。

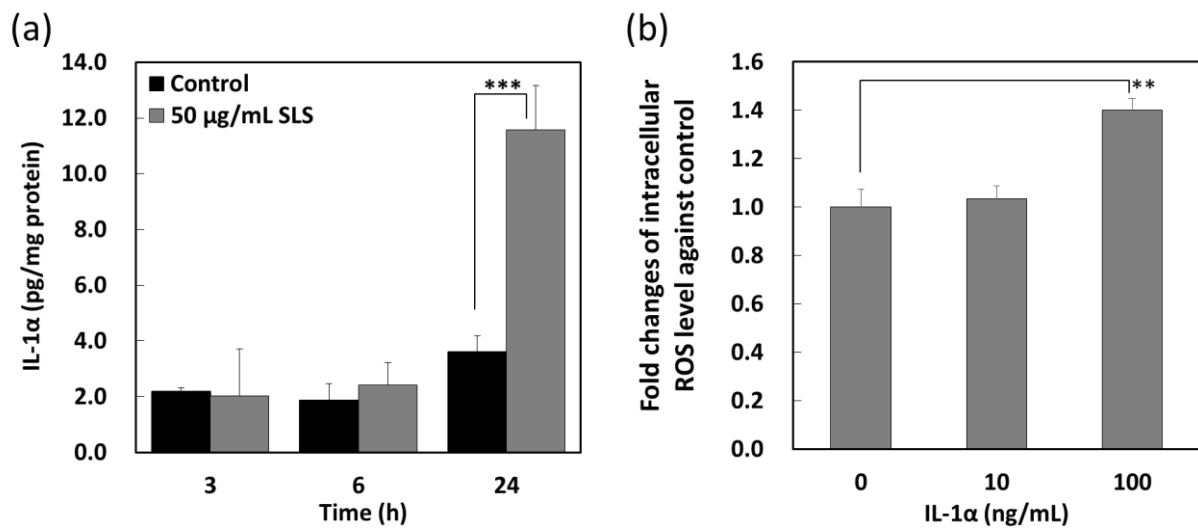


Fig. 3-5 IL-1 α secretion of SLS-treated HaCaT keratinocytes and ROS generation of IL-1 α -treated HaCaT keratinocytes. (a) HaCaT keratinocytes were cultured in the presence of SLS at a concentration of 50 μ g/mL for various periods. IL-1 α secreted into medium was quantified using an IL-1 α ELISA Quantikine kit. Protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit. Data are expressed as quantitative value (pg) per μ g protein. (b) HaCaT keratinocytes loaded with 20 μ M H₂DCFDA were cultured in the presence of IL-1 α at 10 and 100 ng/mL for 24 h. The fluorescence (Ex; 485 nm, Em; 530 nm) of cell lysates with 0.1% Triton X-100 in PBS was measured. Intracellular ROS levels are calculated as fluorescence intensity (F.I.) per μ g protein. Protein concentrations were determined with a BCA protein assay kit. Data are expressed as averages and standard deviations of a fold change against the value of control cells (n = 5). Significance ** p<0.01, *** p<0.001.

3-3-7. ROS の生成における IL-1 α の関与

細胞内 ROS レベルの増加における IL-1 α の役割を明らかにすることを目的として、HaCaT 細胞を IL-1 α 共存下で培養した時の細胞内 ROS レベルを、H₂DCFDA を用いて測定した。100 ng/mL の IL-1 α の処理により細胞内の ROS レベルは、無処理の細胞に比較して有意に増加した (Fig. 3-5b)。

3-3-8. SLS を処理した HaCaT 細胞におけるカルパイン活性の増加

細胞内において IL-1 α は前駆体である pro-IL-1 α の構造で存在しており、細胞外への分泌にはカルシウムイオン依存性のペプチダーゼであるカルパインによるプロセッシングを必要とする¹¹⁾。そこで、SLS 処理後の HaCaT 細胞内のカルパイン活性を、合成基質 (Suc-LLVY-AMC) を用いて測定したところ、SLS の処理濃度依存的にカルパイン活性が増加することが確認された (Table 3-3)。

Table 3-3 Calpain activity of SLS treated HaCaT keratinocytes

Time (h)	AMC (pmol/ μ g protein/h)	
	control	SLS
1	ND	ND
3	ND	0.20 \pm 0.19
5	ND	1.40 \pm 0.67
7	ND	2.27 \pm 1.21
9	ND	3.65 \pm 1.04
24	0.70 \pm 0.37	21.62 \pm 4.45 ***

HaCaT keratinocytes were exposed to SLS at 50 μ g/mL for several hours. Then, cells were treated with 10 μ M Suc-LLVY-AMC for 1 h. After lysing cells with 0.1% Triton X-100, the fluorescence intensity of each lysate was measured (Ex; 380 nm, Em; 460 nm). Protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit to allow calculation of the data as intensity per unit protein. Calpain activity is expressed as AMC (pmol/ μ g protein/h). ND: not detected, Significance *** p<0.001 (vs. control).

3-4. 考察

本研究の結果、RHE モデルへの SLS の適用は、RHE モデル内において ROS レベルを増加させることが明らかとなった。ROS レベルの増加は、SLS の適用 15 分後に確認され、19 時間経過後においても確認された。SLS の処理は、HaCaT 細胞においても、細胞内の ROS レベルおよびミトコンドリア ROS の生成を増加させたことから、角層を通過して生細胞層に到達した SLS は、細胞に直接作用して ROS の生成を誘導することが示唆された。

SLS と生体膜との相互作用を、ESR スピンラベル法によって評価した結果、SLS は細胞膜およびリポソーム膜の膜流動性を増加させることが確認された。一方で、HaCaT 細胞への SLS の処理は、細胞内 Ca²⁺濃度の増加を誘導した。一般に、細胞内の Ca²⁺濃度は、小胞内に Ca²⁺を貯蔵する小胞体からの Ca²⁺の

放出¹¹¹⁾、および細胞膜上に存在する Ca^{2+} チャネルによって制御されている。細胞膜上に存在する Ca^{2+} チャネルには、電位依存性 Ca^{2+} チャネル(voltage-gated calcium channel; VDCC)、およびシグナル誘導性 Ca^{2+} チャネルである TRP チャネル(transient receptor potential channel)とストア作動性 Ca^{2+} チャネル(store-operated calcium channel; SOC チャネル)があり、いずれも表皮細胞における発現が報告されている¹¹²⁻¹¹⁵⁾。VDCC は、膜電位の脱分極によって開口し、細胞内へ Ca^{2+} を選択的に透過させるチャネル分子で、特異的チャネルブロッカーの皮膚表面への塗布により、皮膚バリアの回復速度が増加したことが報告されている¹¹²⁾。TRP チャネルは、様々な物理化学的な刺激によって活性化される、非特異的なカチオンチャネルであり、主に Ca^{2+} を透過することが知られている¹¹⁶⁾。SOC チャネルは、小胞体 Ca^{2+} ストアの Ca^{2+} 枯渇によって活性化されるチャネルである。小胞体膜に発現する Ca^{2+} センサータンパク質である stromal interaction molecule (STIM)と細胞膜に発現する Orai チャネルタンパク質とのカップリングにより開口し、細胞外から細胞質ゾルおよび小胞体への Ca^{2+} 流入経路となる^{117,118)}。これらの Ca^{2+} チャネルへの SLS の影響も考えられたが、本研究では SLS の界面活性剤としての作用に注目し、細胞膜への影響について検証した。その結果、表皮細胞への SLS の処理が誘導した細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、SLS との相互作用により流動性が増加した細胞膜を経由した非特異的な Ca^{2+} の流入に基づく可能性が示唆された。

また、 Ca^{2+} 特異的キレート剤である BAPTA は、SLS への曝露にともなう HaCaT 細胞内の ROS 生成を抑制した。ROS は、細胞内で主にミトコンドリアの呼吸鎖反応の過程で生成されるほか¹¹⁾、Nox の酵素反応によっても生成される¹³⁾。表皮細胞においては、Nox の触媒サブユニットである膜タンパク質の gp91^{phox} (Nox2) およびそのホモログである Nox1 の発現が認められる^{108,119)}。Nox1 および Nox2 自身には直接的な Ca^{2+} 依存性はないが¹²⁰⁾、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、protein kinase C (PKC) の活性化を介した、Rac のリン酸化によって¹²¹⁾、Rac の活性化と膜移行を誘導する^{122,123)}。リン酸化された Rac の膜移行により、Nox1 および Nox2 の活性化が高められることが明らかにされている¹⁹⁾。

このように、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、ミトコンドリアおよび Nox の活性を高めることにより ROS 生成を亢進させる^{108,124)}ことから、SLS による細胞内 ROS レベルの増加は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を介して誘導されたと考えられた。つまり、細胞内における Ca^{2+} 濃度の増加が、SLS によって誘導される ROS 生成のイニシエーターであることが示唆された。

一方、細胞内カルパインの活性は、細胞への SLS 処理 3 時間以降に経時的に増加し、SLS 処理 24 時間後の時点においては、無処理の細胞に比較して有意な IL-1 α の分泌亢進が認められた。IL-1 α は、定常状態においては前駆体である pro-IL-1 α として細胞内に貯蔵され、pro-IL-1 α は、Ca²⁺により活性化されるカルパインによるプロセッシングを受けた後に、細胞から分泌される¹¹⁾。さらに、IL-1 受容体関連キナーゼ 1 (IRAK-1) は、IL-1 α 受容体およびそのリガンドである IL-1 α との反応によって活性化され、膜結合酵素複合体である Nox の活性化を誘導する¹²⁵⁾。つまり、SLS により分泌が亢進される IL-1 α もまた、細胞内 ROS レベルの増加を誘導することから、ROS 生成は、IL-1 α によってさらに刺激される可能性がある。

これらの結果を経時的に整理すると、表皮細胞において SLS が誘導する ROS 生成は、以下に示す順序で進行することが示唆される。まず、表皮細胞の細胞膜と SLS との相互作用により、細胞内への Ca²⁺ の流入が増加する。細胞内 Ca²⁺濃度の増加は、ミトコンドリアにおける ROS 生成の亢進、および Nox の活性化を引き起こす。さらに、細胞内における Ca²⁺の増加は、カルパインの活性化を介して IL-1 α の分泌を刺激し、IL-1 α は IRAK-1 の活性化を介して Nox の活性化を誘導し、ROS 生成をさらに増加させる。以上のような時間系列において、表皮細胞へ直接作用した SLS は ROS 生成を亢進させることが考えられた。

本研究の結果は、洗浄剤に配合される SLS のようなアニオン性界面活性剤が、角層を通過し、表皮細胞の細胞膜へ直接作用することにより細胞膜の膜流動性を高め、細胞内への非特異的な Ca²⁺の流入を引き起こすこと、その結果、細胞内 ROS の過剰な生成を誘導する可能性を示唆した。以上のことから、洗浄剤の使用により誘導される皮膚障害においても、酸化ストレスが重要な役割を果たす可能性を明らかにした。

第4章 皮膚における酸化ストレス抑制素材としての

ヤブツバキ葉エキスの有用性

4-1. 緒言

本研究では、皮膚における ROS の生成源となる新たな因子として、皮膚に存在する CPs が、太陽光曝露下で光増感剤として機能し ROS を産生すること(第2章)、また、皮膚の洗浄剤として用いられる代表的なアニオン性界面活性剤である SLS が、表皮生細胞内の Ca^{2+} 濃度を増加させることにより細胞内 ROS の生成を誘導すること(第3章)を明らかとした。これらのことから、皮膚においては様々な経路により ROS の生成が誘導されることが確認され、生成した ROS は酸化ストレスによる皮膚障害を誘導することが推察された。生体は抗酸化機構を備えることで、内因性および外因性の酸化ストレスから生体を保護している。しかしながら、生体の抗酸化物質であるカタラーゼや GSH は、加齢や紫外線曝露などによって減少することが知られている^{120,127)}。そのため、生体の抗酸化機構を向上すること、もしくは別の抗酸化物質によって、低下した生体の抗酸化機構を補うことは、皮膚を酸化ストレスから保護する目的において非常に重要である。特に、過剰な ROS 生成の場となる角層および表皮細胞における抗酸化作用の発揮は、酸化ストレスが誘導する皮膚障害を抑制する目的において重要であり、スキンケア素材に期待される機能性の一つであると考えられる。

これまでに、植物に含まれる抗酸化物質については多くの研究がなされている。油糧種子、穀類やナッツ、植物葉や樹皮、ハーブ類などの多様な植物素材にはポリフェノール類やイオウ化合物に分類される抗酸化成分が含まれる¹²⁸⁾。さらに、植物抽出物には ROS を直接消去する機能に加え、前述の Keap1/Nrf2/ARE システムの活性化を介した、内因性の抗酸化タンパク質発現の誘導作用が期待される³⁷⁾。実際に、いくつかの植物由来ポリフェノールによる Keap1/Nrf2/ARE を介した SOD の発現誘導が報告されている¹²⁹⁻¹³²⁾。これらの事実より、植物に由来する抽出物は ROS を捕捉・消去する抗酸化物質を含有することと、抗酸化酵素や抗酸化性成分の遺伝子発現を誘導することの両面の機能を有する可能性が期待される。

そこで本章では、カテキン類をはじめとする複数のポリフェノール類を含有することが報告されているヤブツバキ (*Camellia japonica*) の葉の抽出物に着目し、角層および表皮細胞における酸化ストレスに対す

る緩和作用に着目して、酸化ストレスにより誘導される皮膚障害に対する抑制素材としての可能性を検討した。

4-2. 実験方法

4-2-1. 試薬

試薬は以下のものを使用した。DMEM; HBSS (+); 日水製薬株式会社(東京), トリプシン(ブタ膵臓由来); EDTA; ナカライテスク株式会社(京都), FBS; Biological Industries (Migdal HaEmek, Israel), 過酸化水素水(30%); 4-aminoantipyrine (4-AP); フェノール; $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Tris; MES; キシレン; 和光純薬工業株式会社(大阪), Horseradish peroxidase (HRP); 東洋紡株式会社(大阪), FTSC; Neutral red; 1,3-ブチレングリコール(1,3-BG); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), BCA protein assay kit; Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA), H_2DCFDA ; Calbiochem (Madison, WI, USA), 5,5-Dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO); 東京化成工業株式会社(東京)。

4-2-2. 光源

紫外線の照射は、紫外線照射光源 (Broadband UVB lamp TL20W/I2); Philips (Amsterdam, Netherlands) を用いておこなった。紫外線照度計を用い 310 nm における照射強度を測定した。

4-2-3. 細胞培養

第3章 3-2-2 項に記載した方法に準じて培養した HaCaT 細胞を各試験に供した。

4-2-4. ツバキ葉エキスの調製

2011年5月に伊豆大島(東京)にて採取した若葉と成葉の2種類のヤブツバキの葉を用いた。本研究においては、同年の春に伸長した新鞘から出現し、新鞘先端から数えて5枚から6枚の黄緑色の葉をヤブツバキの若葉と定義し、それ以外の濃い深緑色の葉を成葉と定義した。新鮮なヤブツバキの葉を90°Cにて3時間乾燥させた後、細断し、乾燥重量に対して20倍重量の50% 1,3-BG水溶液に浸漬し、50°Cにて5時間抽出した。この抽出液を濾過して得られた濾液を冷蔵下にて1週間静置し、生じた沈殿物を

濾別した濾液を 1,3-BG 抽出物とした。固形物の含有量は 110 °C における蒸発残分をもとに算出し、12.9 mg/mL の固形分を含有する若葉の 1,3-BG 抽出物を CJGL (extract from green leaves of *Camellia japonica*) とし、4.1 mg/mL の固形分を含有する成葉の 1,3-BG 抽出物を CJML (extract from matured leaves of *Camellia japonica*) として、それぞれ試験に供した。

4-2-5. 過酸化水素消去活性の測定

4-2-4 項の方法で調製したエキスを、PBS (-) を用いて 5 mM に調製した H₂O₂ と混合し、37 °C にて 30 分間インキュベートしたものを試料として供した。残存する H₂O₂ 量は、ペルオキシダーゼと反応させることにより、4-AP とフェノールの酸化縮合により生成されるキノンイミンの呈色を測定することによって定量した。試料 25 μL と 3.2 mM 4-AP 25 μL、16 mM フェノール 25 μL、1.8 units/mL の HRP 25 μL を混合し、37 °C で 10 分間インキュベートの後、マイクロプレートリーダーで吸光度 (測定波長: 490 nm) を測定した。4-AP、フェノール、HRP は 50 mM Tris-HCl (pH8.0) で溶解した。

H₂O₂ の消去活性は、エキスの濃度に対する消去率のプロットにおける直線回帰式より、50% 消去率に必要な固形分濃度 (SC₅₀) の算出により評価した。

4-2-6. ヒドロキシルラジカル消去活性の測定

エキスによる・OH 消去能の評価は、ESR スピントラップ法を用いて評価した。・OH は H₂O₂ と二価鉄とのフェントン反応により生成させた。反応液 (150 μL) は、種々の濃度に調製したエキス 100 μL、それぞれの終濃度が 0.26 mM H₂O₂、0.3 mM Fe(ClO₄)₂·6H₂O、1.7% DMPO となるように調製した水溶液を、ガラス製のキャピラリーに充填して測定に供した。溶液を混和後、正確に 45 秒後のスペクトル測定をした。ESR スペクトルは、ESR 測定装置を用い、室温において次の設定条件下で測定した (Table 4-1)。

Table 4-1 Measuring conditions for ESR study.

Items	Value
modulation frequency	9.4 GHz
modulation amplitude width	0.1 mT
scanning field	337 ± 5 mT
receiver gain	200
output power	4 mW

外部標準として酸化マンガンの 3 番目のシグナル($S.I_{Mn^{2+}}$)を用い、対照として精製水を用いた際のシグナル($S.I_{ref}$)強度と、エキスをを用いた際のシグナル($S.I_{extract}$)から $\cdot OH$ 消去率(%)を次式より算出した(式 2)。

$$\cdot OH \text{ 消去率}(\%) = [1 - (S.I_{extract}/S.I_{Mn^{2+}})/(S.I_{ref}/S.I_{Mn^{2+}})] \times 100 \quad (\text{式 2})$$

SC₅₀ 値は $\cdot OH$ の 50% 消去に必要なエキスの固形分濃度として算出した。

4-2-7. 細胞内 ROS レベルの測定

マイクロプレートに播種した HaCaT 細胞を 24 時間培養後、5%FBS 含有 DMEM を用いて調製したエキスの固形分 0–125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含有する培地に置き換え、24 時間培養を継続した。HBSS(+)で細胞を洗浄した後に、10 μM H₂DCFDA を含む HBSS(+)に置き換え、37°C、5%CO₂ 下の遮光下で 30 分間処理し、細胞内に取り込ませた。HBSS(+)にて細胞を洗浄後、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した(励起波長: 485 nm, 蛍光波長: 530 nm)。その後、0.1% Triton X-100 を含有する PBS(-)を加えて細胞を溶解し、定法にしたがって BCA protein assay kit によりタンパク質量を測定した。蛍光強度をタンパク質量で除して、細胞内 ROS レベルを算出した。結果は、無処理群の値に対する相対値として示した。

4-2-8. 角層表面における CPs 増加に対する抑制作用

セロテープによって採取した角層を 7.5 mm 角に成形し、第 1 章 1-2-4 項に示した方法でスライドグラ

スに転写した後、50% 1,3-BG を用いて固形物が 0–0.1 質量%となるように調製したエキスを角層表面に 3 μ L 重層後、UVB を 2800 mJ/cm² 照射した。角層の CPs は、第 1 章 1-2-5 項に示した FTSC を使用した方法で蛍光標識し、CP レベルは蛍光画像ピクセルあたりの平均階調値として算出した。

4-2-9. 細胞生存率の測定

細胞生存率は、細胞浸透性色素である Neutral red (NR) を用いて評価した。培地を HBSS (+) で洗浄後、16.5 μ g/mL の NR を含む 5%FBS 含有 DMEM に置き換え、37°C、5%CO₂ 下で 2 時間培養をした。培地を HBSS (+) で洗浄後、細胞内に取り込まれた NR を溶出液 (30%メタノール含有 1 M 塩酸水溶液) で抽出し、この溶液の吸光度 (測定波長: 550 nm, 参照波長: 650 nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。細胞生存率はエキスを含有しない 5%FBS 含有 DMEM で培養した細胞の生存率に対する相対値として算出した。

4-2-10. 過酸化水素により誘導される細胞傷害の抑制作用

マイクロプレートに播種した HaCaT 細胞を 24 時間培養後、5%FBS 含有 DMEM を用いて調製した CJGL (固形分 125 μ g/mL) を含有する培地に置き換え、2 時間もしくは 24 時間培養を継続した。培地を HBSS (+) で洗浄後、0–5.0 mM の H₂O₂ を含む HBSS (+) 溶液に置き換えて 2 時間培養した。HBSS (+) で H₂O₂ を洗浄除去し、エキスを含まない 5%FBS 含有 DMEM に置き換えて 24 時間培養した後、4-2-9 項に記載の方法によって細胞生存率を評価した。細胞生存率は、5%FBS 含有 DMEM で培養し、H₂O₂ およびエキス無処理細胞の生存率に対する相対値として算出した。

4-2-11. 統計解析

測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、Student の *t* 検定によって有意差検定をおこなった。*p* 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

4-3. 結果

4-3-1. *in vitro* ROS 消去活性

CJGL と CJML の ROS 消去活性を比較することを目的として、H₂O₂ および \cdot OH の消去活性を測定し

た (Table 4-2)。H₂O₂ および・OH のどちらに対しても、CJGL は CJML に比較して高い消去活性を示した。このことから、CJGL は高い抗酸化作用を有する有用な素材であると考え、以降の試験では CJGL を試験試料として選択した。

Table 4-2 Radical scavenging activities of CJML and CJGL.

ROS	SC ₅₀ (mg/mL)	
	CJML	CJGL
H ₂ O ₂	3.489 ± 0.623	0.878 ± 0.152**
・OH	0.163 ± 0.008	0.079 ± 0.007**

Scavenging against H₂O₂ was determined to quantify the remaining H₂O₂ after incubation with an extract and H₂O₂ using HRP in the presence of 4-aminoantipyrine and phenol. Scavenging abilities against ・OH were evaluated by using an ESR spin trapping method. The scavenging abilities were expressed as the concentration of 50% scavenging (SC₅₀). The data are expressed as mean ± standard deviation of 4 independent examinations. Significance ** p<0.01 (CJML vs. CJGL).

4-3-2. 角層表面における CPs 増加に対する抑制作用

紫外線の曝露により誘導される CPs の増加に対する、CJGL の抑制作用を、剥離角層を材料として評価した。*in vitro* にて CJGL を角層表面に塗布し、UV を照射することによってカルボニル化を誘導した。CJGL 無塗布の角層では、UV 照射によって CP レベルが有意に増加した(Fig. 4-1)。一方、CJGL を塗布した角層では CJGL の濃度依存的に CP レベルは有意に低下した。

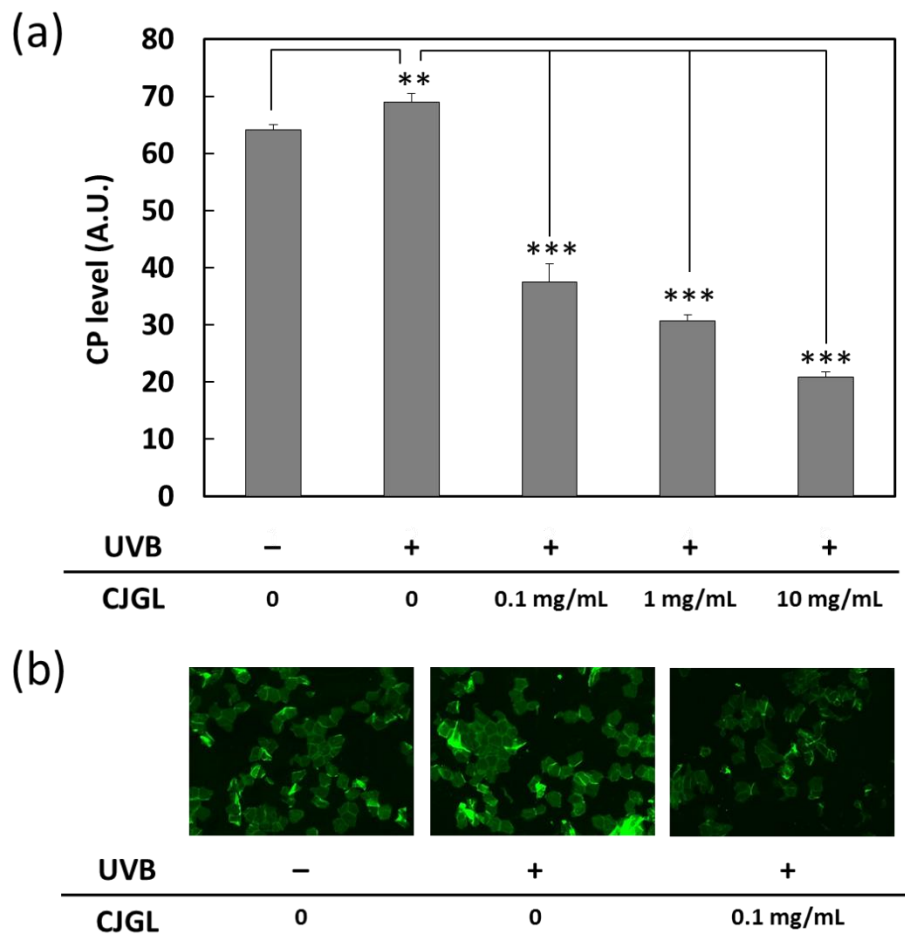


Fig. 4-1 Inhibition of stratum corneum (SC) carbonylation by the extract from green leaves of *C. japonica* (CJGL). A SC was transferred on to a glass slide, treated with 3 μ L CJGL (0–10 mg/mL in 50% 1,3-BG), and exposed to UVB at an energy density of 2,800 mJ/cm^2 . The CP level of the SC was determined by the fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC) method. (a) The data are expressed as the mean \pm standard deviation of 5 independent examinations. Significance ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (b) Representative photographs of SC carbonylation.

4-3-3. 細胞内 ROS レベルの抑制作用

CJGL による定常状態の細胞内 ROS レベルの抑制作用を評価した。CJGL を 24 時間処理した HaCaT 細胞の細胞内 ROS は、無処理の細胞に対し、CJGL の濃度依存的に有意な減少を示した (Fig. 4-2)。

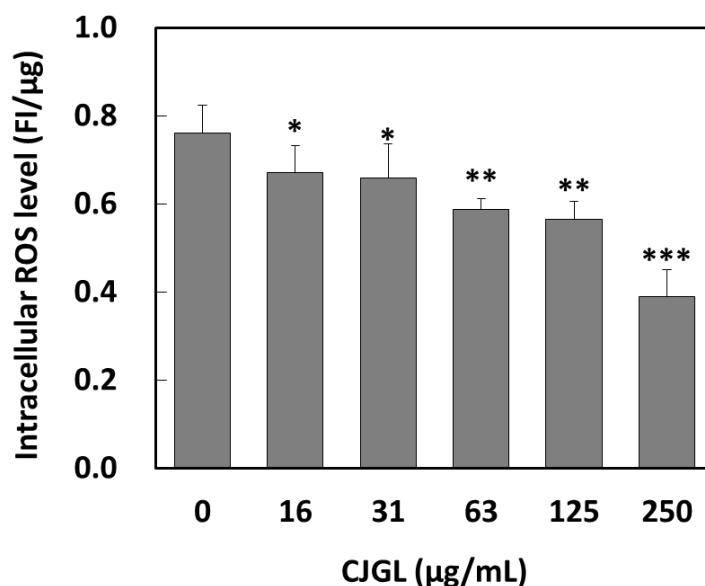


Fig. 4-2 Suppression of intracellular ROS by CJGL. HaCaT keratinocytes that were cultured with CJGL for 24 h were incubated with 10 μM H₂DCFDA for 30 min. The fluorescence intensity was then measured. The data are expressed as the mean ± standard deviation of 5 independent examinations. Significance * p<0.05, ** p<0.01, *** p < 0.001.

4-3-4. 過酸化水素により誘導される細胞毒性の抑制作用

CJGL による酸化ストレス耐性の向上作用を評価することを目的として、予め CJGL を 2 時間もしくは 24 時間処理した HaCaT 細胞に、酸化ストレス源として H₂O₂ を曝露し、曝露 24 時間後の細胞生存率を評価した。どちらの処理時間においても、H₂O₂ の濃度依存的に細胞生存率は減少したが、H₂O₂ 曝露前の CJGL の処理時間を 24 時間とした場合には、H₂O₂ 1.3 mM 以上の濃度において、CJGL 無処理細胞と比較して顕著な細胞毒性の緩和が認められた (p < 0.001, Fig. 4-3b)。一方 CJGL の曝露時間を 2 時間とした場合には、同様の作用は認められなかった (Fig. 4-3a)。

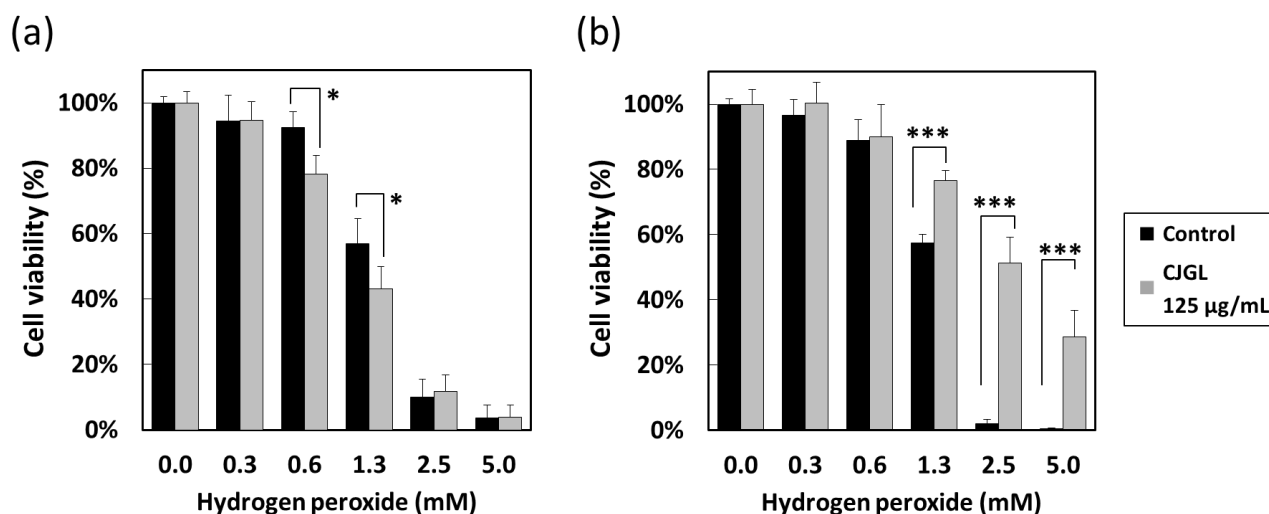


Fig. 4-3 Protective effect of CJGL against H₂O₂ exposure. HaCaT keratinocytes that were cultured with CJGL for 2 h (a) or 24 h (b) were exposed to 0–5 mM H₂O₂ for 2 h. After exposure, the cells again incubated in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum (FBS) for 24 h. Cell viability was measured by using the neutral red method. The data are expressed as the mean ± standard deviation of 5 independent examinations. Significance * p<0.05, *** p<0.001.

4-4. 考察

Camellia japonica (和名 ヤブツバキ)は、その種子油が化粧油の原料として 1 世紀以上に渡り使用され、日本人にはなじみの深い植物である。ヤブツバキは日本原産の植物で、濃い深緑色の成葉を、季節を通して有する常緑広葉樹に分類され、葉にはよく発達したクチクラ層 (cuticle layer) を有する代表的な植物であることが知られている。ヤブツバキの花茎は若い枝 (green shoot) の頂部に現れ、春から夏にかけて伸長し、5から6枚の鮮やかな黄緑色の若葉がこの新鞘から出現する。ヤブツバキの若葉の採取は、種子の収量の低下に影響を及ぼすことから、若葉を対象とした研究例はほとんど見当たらない。分類上、ヤブツバキと同じ *Camellia* 属に分類される *Camellia sinensis* (和名 チャノキ) の葉を煎じたものは、緑茶や紅茶、烏龍茶など、世界中で飲料に使用されている。対照的に、ヤブツバキの葉は、沖縄や韓国など限られた地域において飲用されている。またヤブツバキの葉の抽出物に関する経口摂取の安全性は既に報告がある¹³³⁾。これまでに、ヤブツバキの葉に含まれる生理活性物質として、(-)-エピカテキンおよび(+)-カテキン¹³⁴⁾、抗アレルギーおよび抗炎症作用を示すオキカメアシド (3,4-dioxoloellagic acid 4'-O-β-D-glucopyranoside)¹³⁵⁾、quercetin-3-β-D-glucoside やオイゲノール¹³⁶⁾、Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) 消去活性を有する抗酸化物質として、カメリアノシド (quercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-O-α-L-

rhamnopylanosyl-(1→6)-O-β-D-glucopylanoside)、ルチンやヒペロシドおよびイソクエルシトリン¹³⁷⁾についての報告がある。また、最近の報告では、ヤブツバキ葉の抽出物が、ヒト真皮線維芽細胞において MMP-1 の mRNA 発現を低下させ¹³⁸⁾、コラーゲンタイプ I α1 鎖 (COL1A1) mRNA の発現増加を誘導することにより¹³⁹⁾、コラーゲン産生量を増加させる抗老化作用を有することが明らかとされた。

ヤブツバキ葉の含有成分として、前述した様々なポリフェノール類が同定されていることから¹³³⁻¹³⁸⁾、CJGL および CJML が、抗酸化作用を有することが強く期待された。そこで本研究では、皮膚において生成される ROS を消去する素材としての、ヤブツバキ葉のエキスの有用性を、角層および表皮細胞における酸化ストレスの緩和作用によって評価した。はじめに、UV 曝露によって生体内に生じる ROS のうち、広く細胞内に存在する H₂O₂ と、H₂O₂ を前駆物質とする・OH に対する消去活性を確認した。その結果、ヤブツバキ葉のエキスには、H₂O₂ および・OH を直接的に消去する作用が認められた。CJGL と CJML の消去能を比較した結果、どちらの ROS に対しても、CJGL の方が高い消去能を示したことから、本研究では、ヤブツバキの若葉に由来する CJGL を選択し、以降の検討を実施した。

CJGL による H₂O₂ および・OH に対する高い消去活性が認められたことから、角層への UV 照射が誘導する CP レベルの増加に対する CJGL の抑制効果を検討したところ、CJGL を塗布した角層試料においては、CP レベルの増加が抑制された (Fig. 4-1)。このことは、CJGL が角層の UV 照射により生成する ROS の消去を介して、CPs の増加を抑制した可能性を示唆している。

CJGL 共存下で培養した HaCaT 細胞の細胞内 ROS レベルは、CJGL 濃度依存的に有意に低下していた (Fig. 4-2)。さらに、CJGL の共存下で予め 24 時間培養した HaCaT 細胞においては、H₂O₂ への曝露によって誘導される細胞生存率の低下が、有意に緩和された (Fig. 4-3b)。一方、CJGL 共存下での培養時間を 2 時間とした場合には、上記の緩和作用は認められなかった (Fig. 4-3a)。これらの結果から、H₂O₂ の曝露が誘導する細胞傷害に対する緩和作用は、CJGL が含有する抗酸化成分の細胞内拡散による直接的なものではなく、Keap1/Nrf2/ARE システムの活性化を介した細胞内抗酸化システム関連タンパク質の産生亢進に基づく間接的な抗酸化作用による可能性が示唆された。

一般に、ポリフェノールは自身が酸化されることにより生体物質の酸化を防ぐことが出来るが、このとき、ポリフェノールはラジカル種を経て酸化物となる。キノンのようなポリフェノール酸化物は、Keap1 のレドックスセンサーであるシステイン残基の SH 基と反応することで、Keap1 からの Nrf2 の解離を誘導し Nrf2 が

活性化することが報告されており¹⁴⁰⁾、CJGL に含まれるポリフェノール類による同様のメカニズムが Keap1/Nrf2/ARE システムの活性化を介して、抗酸化物質の発現増加をもたらした可能性が考えられる。

最近の研究では、表皮細胞における酸化ストレスがセラミド合成の律速酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (Serine palmitoyltransferase; SPT) の mRNA 発現の低下を介し、表皮バリア機能を低下させる可能性が示唆されている^{141,142)}。また、光老化皮膚において特徴的な線維芽細胞における MMP-1 の発現増加が、UVB 照射により酸化ストレスを誘導した表皮細胞の培養上清を処理することにより再現されることも明らかとなった¹⁴³⁾。本研究においても、SLS による荒れ肌の誘導に表皮細胞への酸化ストレスの誘導が関与していること、また酸化ストレスの産物である CPs が、皮膚表面における ROS の生成要因の一つとなることを示した。これらの事実より、角層および表皮細胞における酸化ストレスの誘導を抑制することは、皮膚機能を維持する上で重要であると考えられ、この点において CJGL は有用なスキンケア素材になり得ると結論付けた。

第5章 総括

本研究は、皮膚において過剰な ROS の生成を誘導する新たな因子を明らかにすることを目的とし、生体における ROS の最終生成物であり皮膚においても存在が認められる CPs と、皮膚の洗浄において使用される代表的なアニオン性界面活性剤である SLS が、皮膚において過剰な ROS を生成する事実と、これらの ROS 生成における詳細なメカニズムを明らかにした。さらに、ROS を消去する素材として、ヤブツバキの葉に由来するエキスの有用性について評価した。

本研究をおこなう上で、皮膚が受けた酸化ストレスを定量的に評価できるツールが必要となった。そこで、第1章においては、皮膚の酸化ストレスマーカーとして知られる CPs に着目し、角層に存在する CPs を相対定量的に評価する手段を開発した。角層の CPs を、FTSC を用いて特異的に蛍光標識することにより検出し、得られた蛍光顕微鏡画像を画像解析することにより、角層細胞内 CPs の存在頻度 (CP レベル) を算出した。角層の蛍光画像解析において妨げとなる、角層積層部が発する過剰な蛍光は、画像の RGB 表色系の G の階調値分布をもとにした閾値を設定することによって、除外可能なことが確認された。また、本検討手法を用いることにより、標準偏差が顕著に低下したことから、CP レベルの微小な差の検出感度が向上することも明らかとなった。本法は、角層試料の多重剥離の割合の影響を受けることなく、角層が受けた酸化ストレスレベルの評価を客観的に評価可能できる点において、有用な手法であると考えられた。先行研究では、角層における CPs の増加は皮膚保湿機能および皮膚の光学的特性に影響を及ぼすことが明らかとされており、CP レベルを低値に維持することの重要性が提案されている。このことから角層の CPs をパラメーターとした皮膚状態の解析においても、非常に有用な解析ツールとなりうる。

第2章では、ROS によって開始される脂質過酸化反応の最終生成物である 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 を生成し、新たな CPs の生成を誘導する事実を明らかにした。CPs のモデルとして、BSA をアクロレイン処理することにより調製した CP-BSA を用い、その光学特性を検証したところ、520 nm 付近をピークとする蛍光スペクトルを示し、その最大励起波長は 430 nm であることが明らかとなった。この励起/蛍光特性にしたがい、ヒト皮膚より採取した角層に、長波長 UVA およびブルーライトを照射することによる ROS の生成を、MCLA を用いた化学発光法によって検出した。

その結果、角層への長波長 UVA およびブルーライトの照射は ROS の生成を誘導し、同測定系への SOD の添加によって発光の増加が抑制されたことから、生成された ROS は $\cdot\text{O}_2^-$ であることが強く示唆された。また、アクロレインを用いて人工的にカルボニル化した角層に対して、長波長 UVA およびブルーライトを照射した場合に、MCLA の発光強度がアクロレインの処理濃度依存的に増加することを確認した。

さらに、スピントラップ剤である CYPMPO を用いた ESR スピントラップ法により、CPs から生成される ROS の同定を試みた。CP-BSA は CYPMPO の共存下における、UVA およびブルーライト領域の光を含むキセノンアークランプの照射下において、明瞭な ESR シグナルを示した。さらに、同測定系における SOD の添加効果を確認したところ、SOD の添加によって ESR シグナルは完全に消失した。この事実より、CP-BSA に対するキセノンアークランプの照射によって生成されたラジカルは、 $\cdot\text{O}_2^-$ であると考えられた。これらの結果をもとに、長波長 UVA およびブルーライトへの曝露により CPs から生成される ROS は $\cdot\text{O}_2^-$ であると結論付けた。

これらの事実から、CPs は長波長 UVA からブルーライトの波長領域を作用スペクトルとし、光増感反応タイプ I を介して $\cdot\text{O}_2^-$ を生成することが確認された。生成した $\cdot\text{O}_2^-$ は脂質過酸化反応を介して、新たな CPs の生成を誘導すると考えられる。

第 3 章では、洗浄剤の使用が、皮膚において ROS を生成させる可能性に着目した。そこで、代表的なアニオン性界面活性剤である SLS を対象とし、ROS の生成が誘導されるメカニズムについて詳細に検討した。表皮再構築モデルの角層表面に SLS を適用し、表皮生細胞層における ROS の生成を MCLA 化学発光法により確認した。このことから、SLS は角層を通過し、表皮細胞の生細胞層において ROS の生成を誘導する可能性が示唆された。さらに SLS は HaCaT 細胞の細胞膜の流動性を増大させることにより、非特異的に細胞内への Ca^{2+} の流入を増加させることが示唆された。細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、膜結合酵素複合体である Nox やミトコンドリアにおける ROS 生成を増加させることで、細胞内 ROS レベルの増加を誘導することが示唆された。同時に、HaCaT 細胞への SLS の処理は、細胞内への Ca^{2+} の流入を介して、カルパインの活性化を誘導し、IL-1 α の分泌を亢進することが明らかとなった。IRAK-1 は、IL-1 α 受容体およびそのリガンドである IL-1 α との反応によって活性化され、Nox の活性化を誘導することから、IL-1 α の分泌亢進により ROS の生成はさらに刺激される可能性がある。

本研究の結果は、角層を通過したアニオン性界面活性剤が、表皮生細胞層において ROS の生成を誘導することを明らかとした。アニオン性界面活性剤による ROS 生成の誘導メカニズムは、皮膚に用いられる界面活性剤の評価における新しいアプローチ手法としての応用が期待される。

第 2 章および第 3 章の結果から、皮膚においては様々な経路により ROS の生成が誘導されることが示唆され、皮膚において生成した ROS は、酸化ストレスによる皮膚障害を誘導することが推察された。そのため、ROS を消去する抗酸化物質の皮膚への適用が有効であると考察した。そこで、第 4 章では(+)-カテキンや(-)-エピカテキン、生物種固有の化合物であるオキカメリアシドやカメリアノシドをはじめとする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に着目した。ヤブツバキは、季節を通して深緑色をした成葉を有する常緑広葉樹であり、春から夏にかけて黄緑色の若葉が出現する。本研究では、葉の熟度が異なる若葉と成葉それぞれのエキスを調製し、抗酸化作用の評価に用いた。UV 曝露によって生体内に生じる活性酸素種のうち、広く細胞内に存在する H_2O_2 と、 H_2O_2 を前駆物質とする $\cdot\text{OH}$ に対する消去活性を確認した。その結果、ヤブツバキの若葉および成葉の抽出液には、 H_2O_2 および $\cdot\text{OH}$ を直接消去する作用が認められた。また、これら二種のヤブツバキ葉エキスの消去能を比較すると、どちらの ROS に対しても、若葉に由来するエキス(CJGL)の方が高い消去能を示した。角層および HaCaT 細胞における ROS の消去に基づく、CJGL の抗酸化能を評価することにより、皮膚における酸化ストレスに対する緩和作用を評価した。その結果、CJGL は剥離角層の表面への適用により 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 細胞においては、定常状態における ROS レベルの低下と、 H_2O_2 による細胞傷害の緩和作用が認められた。一方、CJGL を 2 時間処理した HaCaT 細胞においては、 H_2O_2 による細胞傷害の緩和作用が認められなかったことから、細胞内において機能を発揮した抗酸化物質は、*in vitro* にて ROS の補足および消去に関与した物質とは必ずしも共通ではない可能性が示唆された。つまり、CJGL は細胞内の抗酸化機構に関与することで、間接的な抗酸化作用を発揮した可能性が考えられた。

Keap1 のレドックスセンサーであるシステイン残基の SH 基は、キノンなどのポリフェノール酸化物と反応することで、Keap1 からの Nrf2 の解離を誘導することが報告されている。解離した Nrf2 は核内移行し、ROS 生成抑制系酵素の遺伝子発現を誘導することから、同様の機構によって CJGL が細胞の抗酸化機

構を増強した可能性がある。CJGL による、ROS 生成抑制系酵素の遺伝子発現への関与に関する考察は、これらのタンパク質レベルにおける発現増加の確認が必須であり、今後の検討課題としたい。

本研究は、皮膚における新たな ROS の生成源として、皮膚において生成された CPs が、太陽光曝露下において光増感剤として機能し ROS を生成する事実と、皮膚の洗浄剤として用いられるアニオン性界面活性剤である SLS が、表皮生細胞層にまで侵入し、ROS を生成する事実を明らかとし、その生成メカニズムを解明した。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の活性化をもたらす作用の両面から、皮膚を保護する有用な素材となる可能性を示した。

表皮における ROS 生成は、表皮細胞内のタンパク質のカルボニル化、その後の分化に伴う CPs の角層への蓄積を誘導する。角層の CP レベルは、角層水分量および TEWL などの皮膚保湿性パラメータに対して負の相関を示すことから、皮膚の乾燥と角層の CPs には関連性があることが示唆されている。これらの事実から、表皮において過剰生成される ROS を消去し CPs を低濃度に保つことは、皮膚表面における CPs の光増感作用を介した ROS の生成抑制と、皮膚保湿性の維持との両面から非常に重要であると考えられた。

本研究の結果は、皮膚において様々な因子が ROS を生成するメカニズムの一端を明らかにした。特に ROS の最終生成物である CPs が新たな ROS 生成源になることを見出した。このことは、過剰な ROS による酸化ストレスの除去がスキンケアの明確なターゲットとなることを示唆し、それらの対応策として、抗酸化物質を用いた日常的なスキンケアが重要であることを示した (Fig. 5-1)。

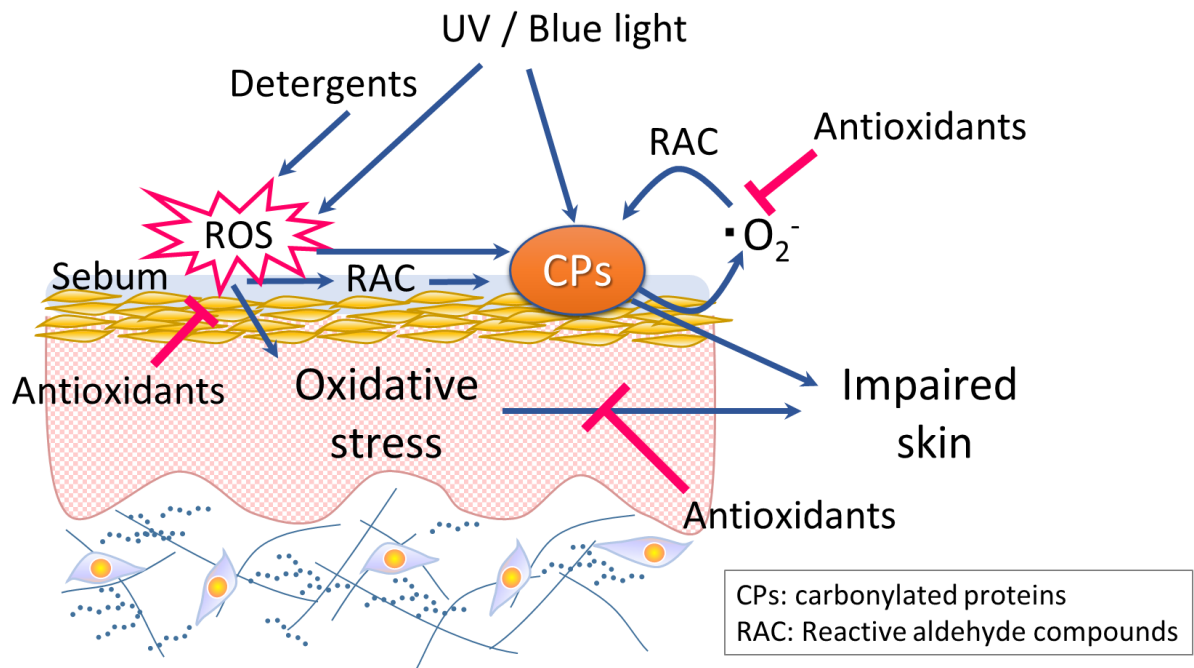


Fig. 5-1 Proposed scheme of antioxidant defense in the ROS-induced impaired skin.

参考文献

1. Rawlings, A. V., Harding, C. R. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* 17 s1, 43–48 (2004)
2. Elias, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 80, 44s–49s (1983)
3. Tagami, H., Kanamaru, Y., Inoue, K., Suehisa, S., Inoue, F., Iwatsuki, K., Yoshikuni, K., Yamada, M. Water sorption-desorption test of the skin in vivo for functional assessment of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 78(5), 425–428 (1982)
4. Horii, I., Nakayama, Y., Obata, M., Tagami, H. Stratum corneum hydration and amino acid content in xerotic skin. *Br. J. Dermatol.* 121(5), 587–592 (1989)
5. Wilhelm, K. P., Cua, A. B., Maibach, H. I. Skin aging: effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Arch. Dermatol.* 127(12), 1806–1809 (1991)
6. Sato, J., Yanai, M., Hirao, T., Denda, M. Water content and thickness of the stratum corneum contribute to skin surface morphology. *Arch. Dermatol. Res.* 292(8), 412–417 (2000)
7. Trouba, K. J., Hamadeh, H. K., Amin, R. P., Germolec, D. R. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid. Redox Signal.* 4(4), 665–673 (2002)
8. Kamata, H., Hirata, H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 11(1), 1–14 (1999)
9. Fujita, T. Formation and Removal of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxides and Free Radicals and Their Biological Effects. *Yakugaku Zasshi.* 122(3), 203–218 (2002)
10. Lenaz, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB life.* 52, 159–164 (2001)
11. Richter, C., Gogvadze, V., Laffranchi, R., Schlapbach, R., Schweizer, M., Suter, M., Walter, P., Yaffee, M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1271, 67–74 (1995)

12. Parks, D. A., Granger, D. N. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.* 548, 87 (1986)
13. Gamaley, I. A., Klyubin, I. V. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int. Rev. Cytol.* 188, 203–255 (1999)
14. Coyle, J. T., Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689–696 (1993)
15. Masaki, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J. Dermatol. Sci.* 58(2), 85–90 (2010)
16. Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T., Sakurai, H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 18(1), 162–166 (1995)
17. Jurkiewicz, B. A., Buettnerf, G. R. EPR Detection of Free Radicals in UV-Irradiated Skin: Mouse Versus Human. *Photochem. Photobiol.* 64(6), 918–922 (1996)
18. Takahashi, M. A., Asada, K. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 226(2), 558–566 (1983)
19. Valencia, A., Kochevar, I. E. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 128(1), 214–222 (2008)
20. Wondrak, G. T., Jacobson, M. K., Jacobson, E. L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 215–237 (2006)
21. Masaki, H., Okano, Y., Sakurai, H. Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1428, 45–56 (1999)
22. Sheu, H. M., Chao, S. C., Wong, T. W., Lee, Y. Y., Tsai, J. C. Human skin surface lipid film: an ultrastructural study and interaction with corneocytes and intercellular lipid lamellae of the stratum corneum. *Br. J. Dermatol.* 140(3), 385–391 (1999)
23. Pappas, A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol.* 1(2), 72–76 (2009)

24. Ryu, A., Arakane, K., Koide, C., Arai, H., Nagano, T. Squalene as a target molecule in skin hyperpigmentation caused by singlet oxygen. *Biol. Pharm. Bull.* 32(9), 1504–1509 (2009).
25. Totter, J. R. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77(4), 1763–1767 (1980)
26. 川内康弘. 皮膚の酸化ストレス. *東京医科大学雑誌* 73(3), 244-251 (2015)
27. McCord, J. M., Irwin, F. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radic. Biol. Med.* 5, 363–369 (1988)
28. Fridovich, I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272(30), 18515–18517 (1997)
29. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61(2), 192–208 (2004)
30. Polefka, T. G., Meyer, T. A., Agin, P. P., Bianchini, R. J. Cutaneous oxidative stress. *J. Cosmet. Dermatol.* 11(1), 55–64 (2012)
31. Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W., Packer, L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 102(1), 122–124 (1994)
32. Sasaki, H., Itoh, T., Akamatsu, H., Okamoto, H., Horio, T. Effects of calcium concentration on the SOD activity and UVB-induced cytotoxicity in cultured human keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol. Photomed.* 21(1), 9–14 (2005)
33. Vessey, D. A., Lee, K. H., Boyer, T. D. Differentiation-induced enhancement of the ability of cultured human keratinocytes to suppress oxidative stress. *J. Invest. Dermatol.* 104(3), 355–358 (1995)
34. Piao, M. S., Choi, J. Y., Lee, D. H., Yun, S. J., Lee, J. B., Lee, S. C. Differentiation-dependent expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 via NF-E2 related factor-2 activation in human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 62(3), 147–153 (2011)
35. Piao, M. S., Park, J. J., Choi, J. Y., Lee, D. H., Yun, S. J., Lee, J. B., Lee, S. C. Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation. *Arch. Dermatol. Res.* 304(5), 387–395 (2012)

36. Zhang D. D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug. Metab. Rev.*, 38, 769–789 (2006).
37. Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–13295 (2009)
38. Thiele, J. J., Schroeter, C., Hsieh, S. N., Podda, M., Packer, L. The antioxidant network of the stratum corneum. *Oxidants and antioxidants in cutaneous biology*. vol. 29. Karger Publishers, 26–42 (2001)
39. Thiele, J. J. Oxidative targets in the stratum corneum. *Skin Pharmacol. Physiol.* 14, s1, 87–91 (2001)
40. Vermeij, W. P., Alia, A., Backendorf, C. ROS quenching potential of the epidermal cornified cell envelope. *J. Invest. Dermatol.* 131(7), 1435–1441 (2011)
41. Vermeij, W. P., Claude B. Skin cornification proteins provide global link between ROS detoxification and cell migration during wound healing. *PLoS one* 5(8), e11957 (2010)
42. Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220–1224 (1992)
43. Berlett, B. S., Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316 (1997)
44. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends. Mol. Med.* 9(4), 169–176 (2003)
45. Sell, D. R., Strauch, C. M., Shen, W., Monnier, V. M. 2-Amino adipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochem. J.* 404(2), 269–277 (2007)
46. Climent, I., Levine, R. L. Oxidation of the active site of glutamine synthetase: conversion of arginine-344 to gamma-glutamyl semialdehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 371–375 (1991)
47. Grimsrud, P. A., Xie, H., Griffin, T. J., Bernlohr, D. A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J. Biol. Chem.* 283(32), 21837–21841 (2008)
48. Adams, S., Green, P., Claxton, R., Simcox, S., Williams, M. V., Walsh, K., Leeuwenburgh, C. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front. Biosci.* 6, A17–A24 (2001)

49. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica. Chimica. Acta.* 329(1), 23–38 (2003)
50. Parola, M., Bellomo, G., Robino, G., Barrera, G., Dianzani, M. U. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid. Redox. Signal.* 1(3), 255–284 (1999)
51. 正木仁. Zn²⁺と化粧品－紫外線による色素沈着及びシワ抑制効果を中心に－. *薬学雑誌*. 132, 261–269 (2012)
52. Warren, J. B. Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light. *FASEB J.* 8(2), 247–251 (1994)
53. Rhodes, L. E., Gledhill, K., Masoodi, M., Haylett, A. K., Brownrigg, M., Thody, A. J., Tobin, D. J., Nicolaou, A. The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases. *FASEB J.* 23(11), 3947–3956 (2009)
54. Bologna, J., Murray, M., Pawelek, J. UVB-induced melanogen melanogenesis may be mediated through the MSH-receptor system. *J. Invest. Dermatol.* 92, 651–656 (1989)
55. Tomita, Y., Iwamoto, M., Masuda, T., Tagami, H. Stimulatory effect of prostaglandin E2 on the configuration of normal human melanocytes in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 89, 299–301 (1987)
56. Sasaki, M., Horikoshi, T., Uchiwa, H., Miyachi, Y. Up-regulation of Tyrosinase Gene by Nitric Oxide in Human Melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 13(4), 248–252 (2000)
57. Yaar, M., Gilchrist, B.A. Photoaging: mechanism, prevention and therapy. *Br. J. Dermatol.* 157, 874–887 (2007)
58. Hanson, K. M., Simon, J. D. Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(18), 10576–10578 (1998)
59. Denu, J. M., Tanner, K. G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*, 37(16), 5633–5642 (1998)
60. Sell, D. R., Strauch, C. M., Shen, W., Monnier V. M. 2-Amino adipic acid is a marker of protein

- carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochem. J.* 404(2), 269–277 (2007)
61. De Rigal, J., Des Mazis, I., Diridollou, S., Querleux, B., Yang, G., Leroy, F., Barbosa, V. H. The effect of age on skin color and color heterogeneity in four ethnic groups. *Skin Res. Technol.* 16(2), 168–178 (2010)
62. Fujita, H., Hirao T., Takahashi M. A simple and noninvasive visualization for assessment of carbonylated protein in the stratum corneum. *Skin Res. Technol.* 13, 84–90 (2007)
63. Ogura, Y., Kuwahara, T., Akiyama, M., Tajima, S., Hattori, K., Okamoto, K., Okawa, S., Yamada, Y., Tagami, H., Takahashi, M., Hirao, T. Dermal carbonyl modification is related to the yellowish color change of photo-aged Japanese facial skin. *J. Dermatol. Sci.* 64(1), 45–52 (2011)
64. Ohshima, H., Oyobikawa, M., Tada, A., Maeda, T., Takiwaki, H., Itoh, M., Kanto, H. Melanin and facial skin fluorescence as markers of yellowish discoloration with aging. *Skin Res. Technol.* 15(4), 496–502 (2009)
65. Iwai, I., Ikuta, K., Murayama, K., Hirao, T. Change in optical properties of stratum corneum induced by protein carbonylation in vitro. *Int. J. Cosmet. Sci.* 30, 41–46 (2008)
66. 岩井一郎, 桑原智祐, 平尾哲二. 角層タンパク質のカルボニル化による肌透明感の低下. *日本化粧品技術者会誌* 42(1) 16–21 (2008)
67. Kobayashi, Y., Iwai, I., Akutsu, N., Hirao, T. Increased carbonyl protein levels in the stratum corneum of the face during winter. *Int. J. Cosmet. Sci.* 30, 35–40 (2008)
68. Yokota, M., Shimizu, K., Kyotani, D., Yahagi, S., Hashimoto, S., Masaki H. The possible involvement of skin dryness on alterations of the dermal matrix. *Exp. Dermatol.* 23, s1, 27–31 (2014)
69. Iwai, I., Hirao, T. Protein carbonyls damage the water-holding capacity of the stratum corneum. *Skin Pharmacol. Physiol.* 21, 269–273 (2008)
70. Kikuchi, K., Kobayashi, H., Hirao, T., Ito, A., Takahashi, H., Tagami, H. Improvement of mild inflammatory changes of the facial skin induced by winter environment with daily applications of a moisturizing cream. A half-side test of biophysical skin parameters, cytokine expression pattern and

- the formation of cornified envelope. *Dermatology*. 207, 269–275 (2003)
71. Tanaka, N., Tajima, S., Ishibashi, A., Uchida, K., Shigematsu, T. Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin. *Arch. Dermatol. Res.* 293, 363–367 (2001)
 72. Sander, C. S., Chang, H., Salzmann, S., Müller, C. S., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., Thiele, J. J. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 118(4), 618–625 (2002)
 73. Mizutani, T., Mizutani, T., Imamura, C., Okano, Y., Masaki, H. Novel sensitive method on evaluation of carbonylated protein in the stratum corneum, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.* 41(2), 1–5 (2017)
 74. Mizutani, T., Sumida, H., Sagawa, Y., Okano, Y., Masaki, H. Carbonylated proteins exposed to UVA and to blue light generate reactive oxygen species through a type I photosensitizing reaction. *J. Dermatol. Sci.* 84(3), 314–321 (2016)
 75. Mizutani, T., Mori, R., Hirayama, M., Sagawa, Y., Shimizu, K., Okano, Y., Masaki, H. Sodium Lauryl Sulfate Stimulates the Generation of Reactive Oxygen Species through Interactions with Cell Membranes. *J. Oleo Sci.* 65(12), 993–1001 (2016)
 76. Mizutani, T., Masaki, H. Anti-photoaging capability of antioxidant extract from *Camellia japonica* leaf. *Exp. Dermatol.* 23, s1 23–26 (2014)
 77. Iwai, I., Kuwahara, T., Hirao, T. Decrease in the skin transparency induced by protein carbonylation in the stratum corneum. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.* 42, 16–21 (2008)
 78. Mudiyanselage, S. E., Elsner, P., Thiele, J. J., Hamburger, M. Ultraviolet A induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 120, 915–922 (2003)
 79. Hirao, T., Denda, M., Takahashi, M. Identification of immature cornified envelopes in the barrier impaired epidermis by characterization of their hydrophobicity and antigenicities of the components. *Exp. Dermatol.* 10, 35–44 (2001)
 80. Ou-Yang, H., Stamatatos, G., Saliou, C., Kollias, N. A chemiluminescence study of UVA-induced

- oxidative stress in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 122(4), 1020–1029 (2004)
81. Kawabata, K., Yoshikawa, H., Saruwatari, K., Akazawa, Y., Inoue, T., Kuze, T., Sayo, T. Uchida, N., Sugiyama, Y. The presence of N ϵ -(Carboxymethyl) lysine in the human epidermis. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1814, 1246–1252 (2011)
82. Arakane, K., Ryu, A., Hayashi, C., Masunaga, T., Shinmoto, K., Mashiko, S., Nagano, T., Hirobe, M. Singlet Oxygen ($^1\Delta_g$) Generation from Coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* Irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223(3), 578–582 (1996)
83. Ohsawa, K., Watanabe, T., Matsukawa, R., Yoshimura, Y., Imaeda, K. The possible role of squalene and its peroxide of the sebum in the occurrence of sunburn and protection from the damage caused by UV irradiation. *J. Toxicol. Sci.* 9(2), 151–159 (1984)
84. Mudiyansele, S. E., Elsner, P., Thiele, J. J., Hamburger, M. Ultraviolet A induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 120, 915–922 (2003)
85. Beisswenger, P. J., Howell, S., Mackenzie, T., Corstjens, H., Muizzuddin, N., Matsui, M. S. Two fluorescent wavelengths, 440ex/520em nm and 370ex/440em nm, reflect advanced glycation and oxidation end products in human skin without diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 14(3), 285–292 (2012)
86. Kligman, A. M., Christophers, E. Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Arch. Dermatol.* 88, 702–705 (1963)
87. Tanabe, T., Okitsu, N., Yamauchi, K. Fabrication and characterization of chemically crosslinked keratin films. *Mater. Sci. Eng., C.* 24(3), 441–446 (2004)
88. Oowada, S., Endo, N., Kameya, H., Shimmei, M., Kotake, Y. Multiple free-radical scavenging capacity in serum. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 51(2), 117–121 (2012)
89. Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., Salvayre, R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 153(1), 6–20 (2008)

90. Hirao, T., Takahashi, M. Carbonylation of cornified envelopes in the stratum corneum. *FEBS Lett.* 579, 6870–6874 (2005).
91. Itakura, K., Osawa, T., Uchida, K. Structure of a fluorescent compound formed from 4-hydroxy-2-nonenal and N α -hippuryllysine: a model for fluorophores derived from protein modifications by lipid peroxidation. *J. Org. Chem.* 63(1), 185–187 (1998)
92. Yamada, S., Kumazawa, S., Ishii, T., Nakayama, T., Itakura, K., Shibata, N., Kobayashi, M., Sakai, K., Osawa, T., Uchida, K. Immunochemical detection of a lipofuscin-like fluorophore derived from malondialdehyde and lysine. *J. Lipid Res.* 42(8), 1187–1196 (2001)
93. Zhiyi, Z., Nenghui, W., Qian, W., Meifan, L. EPR studies of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and free radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, $\text{HB}\cdot$) generated during photosensitization of hypocrellin B. *Free Radic. Biol. Med. A.* 14(1), 1–9 (1993)
94. Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2(1), 1–23 (2005)
95. Iwai, I., Shimadzu, K., Kobayashi, Y., Hirao, T., Etou, T. Increased carbonyl protein level in the stratum corneum of inflammatory skin disorders: A non-invasive approach. *J. Dermatol.* 37(8), 693–698 (2010)
96. Coquette, A., Berna, N., Vandenbosch, A., Rosdy, M., De Wever, B., Poumay, Y. Analysis of interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicol. In Vitro.* 17, 311–321 (2003)
97. Nardo, A. D., Sugino, K., Wertz, P., Ademola, J., Maibach, H. I. Sodium lauryl sulfate (SLS) induced irritant contact dermatitis: a correlation study between ceramides and in vivo parameters of irritation. *Contact Dermatitis* 35, 86–91 (1996)
98. Törmä, H., Lindberg, M., Berne, B. Skin barrier disruption by sodium lauryl sulfate-exposure alters the expressions of involucrin, transglutaminase 1, profilaggrin, and kallikreins during the repair phase

- in human skin *In Vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1212–1219 (2008)
99. Mao, G., Flach, C. R., Mendelsohn, R., Walters, R. M. Imaging the distribution of sodium dodecyl sulfate in skin by confocal Raman and infrared microspectroscopy. *Pharm. Res.* 29, 2189–2201 (2012)
100. Schempp, C. M., Meinke, M. C., Lademann, J., Ferrari, Y., Brecht, T., Gehring, W. Topical antioxidants protect the skin from chemical-induced irritation in the repetitive washing test: a placebo-controlled, double-blind study. *Contact Dermatitis* 67(4), 234–237 (2012)
101. Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761–771 (1988)
102. Hubbell, W. L., McConnell, H. M. Molecular motion in spin labeled phospholipids and membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 314–326 (1971)
103. Kitagawa, S., Kametani, F., Tsuchiya, K., Sakurai, H. ESR analysis with long-chain alkyl spin labels in bovine blood platelets. Relationship between the increase in membrane fluidity by alcohols and phenolic compounds and their inhibitory effects on aggregation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1027, 123–129 (1990)
104. Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238–252 (1965)
105. Dolak, J. A., Waller, R. L., Glende, E. A. Jr., Recknagel, R. O. Liver cell calcium homeostasis in carbon tetrachloride liver cell injury: new data with fura2. *J. Biochem. Toxicol.* 3, 329–342 (1988)
106. Guttman, R. P., Sokol, S., Baker, D. L., Simpkins, K. L., Dong, Y., Lynch, D. R. Proteolysis of the N-methyl-d-aspartate receptor by calpain in situ. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 1023–1030 (2002)
107. Kambayashi Y., Ogino K. Reestimation of Cypridina luciferin analogs (MCLA) as a chemiluminescence probe to detect active oxygen species-cautionary note for use of MCLA. *J. Toxicol. Sci.* 3, 139–148 (2003)
108. Valencia, A., Kochevar, I. E. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced

- reactive oxygen species in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 128, 214–222 (2008)
109. Dormer, R. L. Introduction of calcium chelators into isolated rat pancreatic acini inhibits amylase release in response to carbamylcholine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119(3), 876–883 (1984)
110. Clemens, R. A., Lowell, C. A. Store-operated calcium signaling in neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 98, 497–502 (2015)
111. Sultana, T., Wahab-Wahlgren, A., Assmus, M., Parvinen, M., Weber, G., Söder, O. Expression and regulation of the prointerleukin-1 α processing enzymes calpain I and II in the rat testis. *Int. J. Androl.* 26, 37–45 (2003)
112. Denda, M., Fujiwara, S., Hibino, T. Expression of voltage-gated calcium channel subunit α 1C in epidermal keratinocytes and effects of agonist and antagonists of the channel on skin barrier homeostasis. *Exp. Dermatol.* 15(6), 455–460 (2006)
113. Peier, A. M., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Moqrich, A., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Story G. M., Colley, S., Hogenesch, J. B., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296, 2046–2049 (2002)
114. Jans, R., Mottram, L., Johnson, D. L., Brown, A. M., Sikkink, S., Ross, K., Reynolds, N. J. Lysophosphatidic acid promotes cell migration through STIM1-and Orai1-mediated Ca^{2+} _i mobilization and NFAT2 activation. *J. Invest. Dermatol.* 133.3, 793–802 (2013)
115. Numaga-Tomita, T., Putney, J. W. Role of STIM1-and Orai1-mediated Ca^{2+} entry in Ca^{2+} -induced epidermal keratinocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 126.2, 605–612 (2013)
116. Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517 (2003)
117. Shen, W. W., Frieden, M., Demaurex, N. Remodelling of the endoplasmic reticulum during store-operated calcium entry. *Biol. Cell* 103(8), 365–380 (2011)
118. Bogeski, I., Kilch, T., Niemeyer, B. A. ROS and SOCE: recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai. *J. Physiol.* 590(17), 4193–4200 (2012)
119. Chamulitrat, W., Stremmel, W., Kawahara, T., Rokutan, K., Fujii, H., Wingler, K., Schmidt, H. H. H. W., Schmidt, R. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91 phox homologs in

- human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 122(4), 1000–1009 (2004)
120. Lambeth, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4(3), 181 (2004)
121. Mehta, D., Konstantoulaki, M., Ahmed, G. U., Malik, A. B. Sphingosine 1-phosphate-induced mobilization of intracellular Ca^{2+} mediates Rac activation and adherens junction assembly in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 17320–17328 (2005)
122. Price, L. S., Langeslag, M., ten Klooster, J. P., Hordijk, P. L., Jalink, K., Collard, J. G. Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J. Biol. Chem.* 278, 39413–39421 (2003)
123. Ueyama, T., Geiszt, M., Leto, T. L. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2160–2174 (2006)
124. Santo-Domingo, J., Wiederkehr, A., De Marchi, U. Modulation of the matrix redox signaling by mitochondrial Ca^{2+} . *World J. Biol. Chem.* 6, 310–323 (2015)
125. Maitra, U., Singh, N., Gan, L., Ringwood, L., Li, L. IRAK-1 contributes to lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species generation in macrophages by inducing NOX-1 transcription and Rac1 activation and suppressing the expression of antioxidative enzymes. *J. Biol. Chem.* 284, 35403–35411 (2009)
126. Bova, L. M., Sweeney, M. H., Jamie, J. F., Truscott, R. J. Major changes in human ocular UV protection with age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 200–205 (2001)
127. Shindo, Y., Witt, E., Packer, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J. Invest. Dermatol.* 100, 260–265 (1993)
128. 大澤俊彦. 酸化ストレス制御を中心とする食品機能因子の化学と作用機構に関する研究. *日本農芸化学会誌* 76, 804–813 (2002)
129. Na, H. K., Young-Joon, S. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem. Toxicol.* 46.4, 1271–1278 (2008)
130. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related

- enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16(10), 577–586 (2005)
131. Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kensler, T. W. The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18.12, 1779–1791 (2005)
132. Kobayashi, M., Yamamoto, M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid. Redox. Signal.* 7.3-4, 385–394 (2005)
133. Kuba, M., Tsuha, K., Hirose-Yasumoto, M., Yasumoto, T. Safety Evaluation of Tsubaki (*Camellia japonica*) Leaves Extract. *J. Jpn. Soc. Food Sci.* 55, 379–382 (2008)
134. Nagata, T., Sakai, S. Differences in caffeine, flavanols and amino acids contents in leaves of cultivated species of *Camellia*. *Japan. J. Breed.* 34, 459–467 (1984)
135. Onodera, K., Tsuha, K., Yasumoto-Hirose, M., Tsuha, K., Hanashiro, K., Naoki, H., Yasumoto, T. Okicamelliaside, an extraordinarily potent anti-degranulation glucoside isolated from leaves of *Camellia japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 2532–2534 (2010)
136. Lee, J. H., Kim, J. W., Ko, N. Y., Mun, S. H., Kim, D. K., Kim, J. D., Kim, H. S., Lee, K. R., Kim, Y. K., Radinger, M., Choi, W. S. *Camellia japonica* suppresses immunoglobulin E-mediated allergic response by the inhibition of Syk kinase activation in mast cells. *Clin. Exp. Allergy* 38, 794–804 (2008)
137. Onodera, K., Hanashiro, K., Yasumoto, T. Camellianoside, a novel antioxidant glycoside from the leaves of *Camellia japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1995–1998 (2006)
138. Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., Yang, H. C., Park, S. H., Ko, K. I., Lee, S. H., Kim, K. H., Lee, N. H., Kim, J. M., Son, K. H., Son, K. H. Inhibitory effects of natural plants of Jeju Island on elastase and MMP-1 expression. *J. Cosmet. Sci.* 58, 19–33 (2007)
139. Hayashi, S., Isakari, K., Yoshizaki, N. Anti-aging Activity of *Camellia japonica* Leaf Extracts. *10th Asian Societies of Cosmetic Scientists Conference* 108–109 (2011)
140. Erlank, H., Elmann, A., Kohen, R., Kanner, J. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. *Free Radic. Biol. Med.* 51(12), 2319–2327 (2011)
141. Katsuyama, Y., Taira, N., Tsuboi, T., Yoshioka, M., Masaki, H., Muraoka, O. 3-O-Laurylglycerol

- ascorbate reinforces skin barrier function through not only the reduction of oxidative stress but also the activation of ceramide synthesis. *Int. J. Cosmet. Sci.* 39, 49–55 (2017)
142. Farrell, A. M., Uchida, Y., Nagiec, M. M., Harris, I. R., Dickson, R. C., Elias, P. M., Holleran, W. M. UVB irradiation up-regulates serine palmitoyltransferase in cultured human keratinocytes. *J. Lipid Res.* 10, 2031–2038 (1998)
143. Shimizu, K., Yahagi S., Izutsu, Y., Obayashi, K., Yamashita, Y., Okano, Y., Masaki, H. A Proposal on a New Anti-Aging Anti-Wrinkling Story: Blocking Epidermal-Dermal Crosstalk by Stengthening the Intracellular Reactive Oxygen Species Scavenging Capability. *IFSCC Magazine* 1, 3–9 (2010)

謝 辞

本研究の実施において、終始ご丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました東京工科大学応用生物学部 正木仁教授に心から感謝を申し上げます。また学位取得の機会を与えて下さり、ご指導と励ましの言葉を下さった株式会社 CIEL 岡野由利博士に深く御礼申し上げます。

各章の実験に携わって下さった東京工科大学光老化研究室の卒業研究生である森亮太様、平山美咲様、角田聖様、また、株式会社コスモステクニカルセンター 清水健司様に感謝いたします。

東京工科大学における研究の機会を与えて下さいました株式会社 CIEL 池尾誠彦様、株式会社大島 椿本舗 豊田由起子様にご御礼申し上げます。

実験を実施する上で様々な面で支えて下さった東京工科大学光老化研究室の卒業研究生と社会人研究生の皆様に感謝いたします。

最後に、画像解析プログラムの作成に加え、研究生活を理解し支えてくれた夫に感謝します。