

化粧品による光老化の抗酸化制御に関する 細胞生物学的及び生化学的研究

群馬大学医学部

宮地 良樹

Photoaging is a term that denotes the gross and microscopic cutaneous changes induced by chronic sun exposure, which is quite different from intrinsic chronological aging both qualitatively and quantitatively. Among the various insults brought by ultraviolet (UV) irradiation, reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxides are one of the most reasonable candidates for explaining actinic injuries in photoaging.

In the present study, using an experimental animal model of photoaging, we investigated the time dependent antioxidant enzyme changes as well as dermal glycosaminoglycan levels by disaccharide analysis. We have found that SOD activity was increased by repeated UVB irradiation, but catalase was not, indicating that the skin SOD and catalase activities are not coordinately regulated by a long-term UV irradiation and that the SOD activity, which has been reported to decrease after acute actinic injury, is induced by chronic photo-oxidative stress.

We have also demonstrated that the total amount of main disaccharide units increased by UV irradiation confirming the previous histochemical findings.

Another important progress made during the present investigation was the development of the three-dimensional culture system supplemented with L-ascorbic acid 2-phosphate using dermal fibroblasts from photoaged murine skin. This method should provide a promising technique to evaluate the capacity for regulating the photoaging process by cosmetics in the near future.

1 緒言

高齢化社会を迎えて、加齢による皮膚老徴に対する関心も高まり、また皮膚悪性腫瘍患者、とりわけ日光角化症、基底細胞上皮腫、有棘細胞癌などの患者数が明らかに増加している。これらの疾患に共通していることは、長期にわたる紫外線曝露による蓄積性の光線皮膚傷害が、高齢期に露光部皮膚病変としてあらわれる点である。すなわち、紫外線生物学の研究対象として克服されるべき課題と考えられる。日光露出部にみられる皮膚老徴は光老化として通常非露光部皮膚の老化とは、質的にも量的にも明確に区別される加齢現象で、整容的な観点からも、光発癌とともに莫大な

医療費が使われてる疾患である¹⁻³⁾。しかし、光老化は予防あるいは制御可能な老化現象であり、一般の人々の啓蒙が重要であるが、現在のところ被服やサンスクリーンなどによる物理化学的な光防御のみ可能である。この光老化の本質的な制御手段が開発されれば医療経済の面からみても福音と考えられる。

そこで、今回の研究では、ヘアレスマウスを用いた光老化モデルを作成し、得た試料を皮膚抗酸化能、皮膚ムコ多糖の側面から検討するとともに、次のステップとして光老化モデルマウス由来線維芽細胞の三次元培養系を確立・検証することで、将来、培養下での紫外線照射および各種酸素ストレスによる抗酸化能、過酸化脂質レベルの変動⁴⁾真皮ムコ多糖の組成および量的変化の二糖分析、コラーゲン架橋結合の解明をめざすことにした。さらにこれらの変化が化粧品として投与可能な抗酸化剤の外用というドラッグデリバリーによりどのように修飾され、それが究極的に光老化制御に貢献しうるか否かを明らかにしたいと考えている⁵⁻⁷⁾。

Cell biological and biochemical studies on anti-oxidative regulation of photoaging by cosmetics



Yoshiki Miyachi

Gunma University

2 実験

1) 光老化モデルマウスの作成⁹⁾

6週齢の雌性ヘアレスマウス (HOS: Hr-1) を購入し、週3回、マウス背面剃毛皮膚に、1回あたり UVB(290~320nm) を $40\text{mJ}/\text{cm}^2$ 、UVA(320~400nm) を $30\text{J}/\text{cm}^2$ ずつそれぞれ照射した。1群を12匹とし、最高36週間照射した。

2) 皮膚試料の準備

UVA、UVB照射群、非照射コントロール群の三群それぞれより12、24、36週後に4匹ずつのマウスから皮膚片を採取し、実験まで -80°C にて保存した。凍結試料は、フリーザーミルにて粉碎し所定の実験に供した。

3) ムコ多糖二糖分析⁹⁾

まず、粗ムコ多糖を精製のうえ、コンドロイチナーゼABC消化したのち、PMPラベルし、HPLCにて、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸を構成する $\Delta\text{Di-HA}$ (HA)、 $\Delta\text{Di-6S}$ (CS)、 $\Delta\text{Di-4S}$ (CS)、 $\Delta\text{Di-4S}$ (DS) を測定した。

4) 皮膚抗酸化能測定¹⁰⁾

SOD活性は、チトクローム法にて、カタラーゼ活性は、紫外外部吸収法によりそれぞれ測定した。

5) 線維芽細胞の三次元培養¹¹⁾

マウス線維芽細胞に先立ち、ヒト線維芽細胞を10%FCS添加DMEMに0.1mMのリン酸化アスコルビン酸 (Asc·2-p) を加えて、 CO_2 インキュベーターで培養した。細胞を収穫したのちムコ多糖分析に供した。

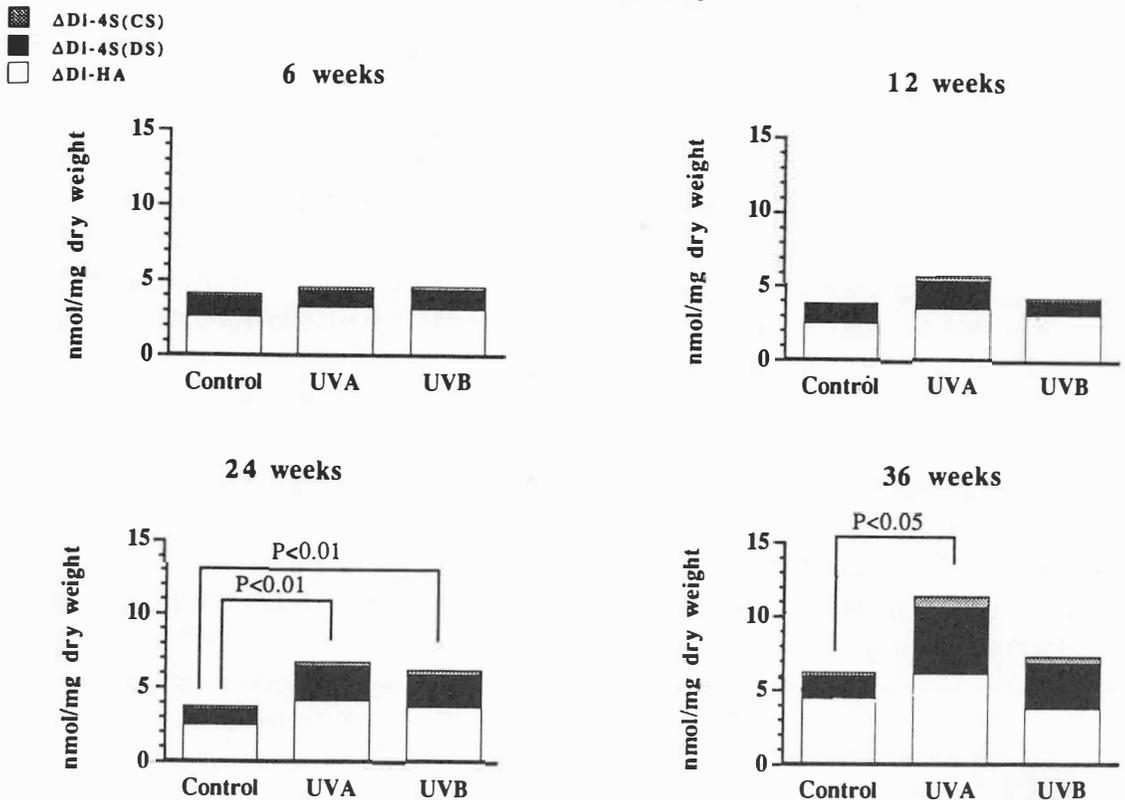


Fig. 1 The total amount of skin main disaccharide units in UVA-, UVB-irradiated and unirradiated control mice at 6th, 12th, 24th and 36th week.

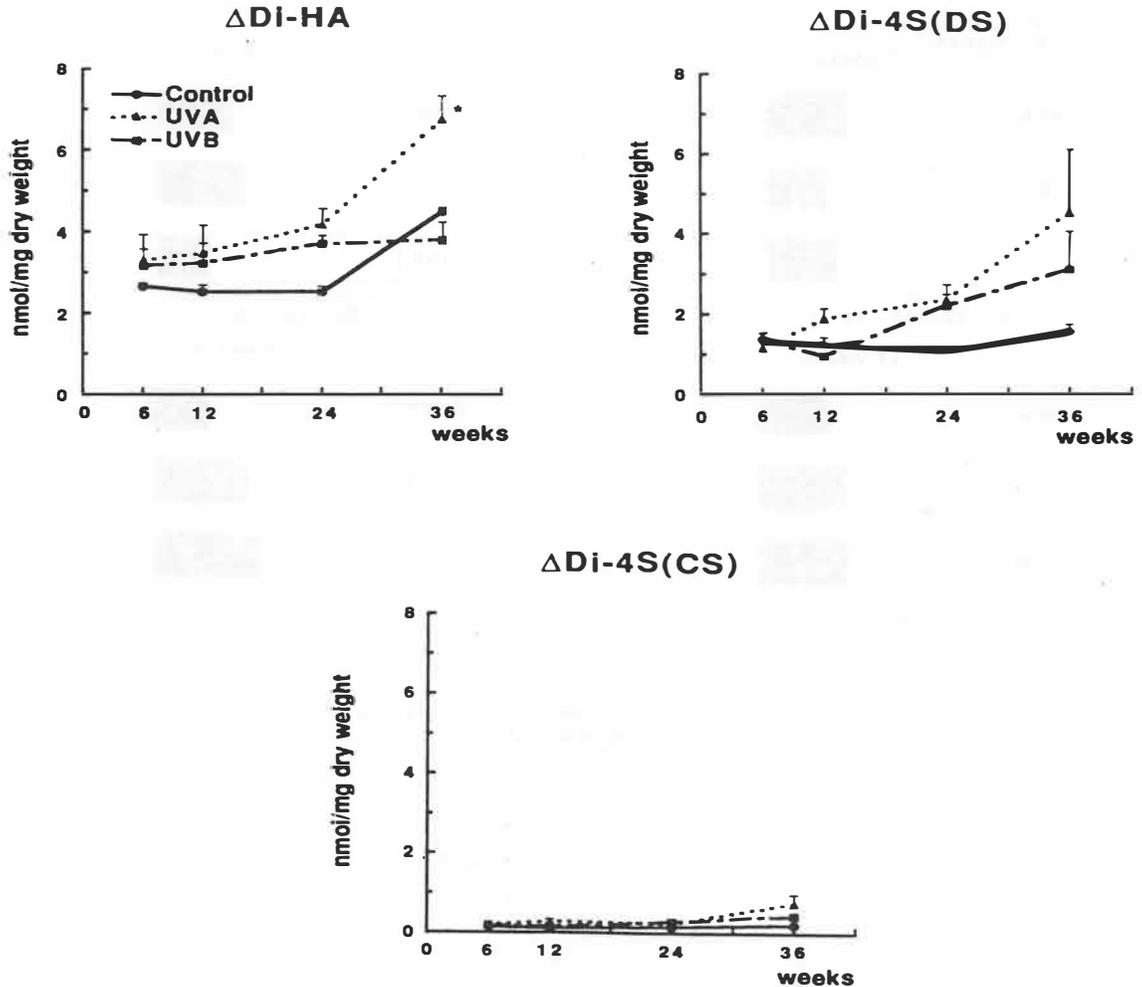


Fig. 2 The sequential changes of skin main disaccharide units, hyaluronic acid-derived Δ Di-HA (HA), dermatan sulfate derived Δ Di-4S (DS) and chondroitin-sulfate derived Δ Di-4S (CS), in UVA-, UVB-irradiated and unirradiated control mice.

3 結果

1) 光老化モデルマウスの皮膚ムコ多糖分析

コントロールヘアレスマウスでは、 Δ Di-HA (HA)と Δ Di-4S (DS)がほぼ全ムコ多糖の95%を占め、その全体量はFig. 1に示すように、照射12週からUVA照射群で増加しはじめ、24週では、

UVA、UVB照射群とも有意な増加を示した ($P < 0.01$)。二糖レベルの分析では、すべて増加傾向を示すものの、UVA照射36週の Δ Di-HA (HA)を除いて統計的な有意差はみられなかった (Fig. 2)。二糖組成をみると、照射36週でUVB、UVA、コントロール群の順に、 Δ Di-HA (HA)の減少、 Δ Di-4S (DS)の増加傾向が認められた (Fig. 3)。

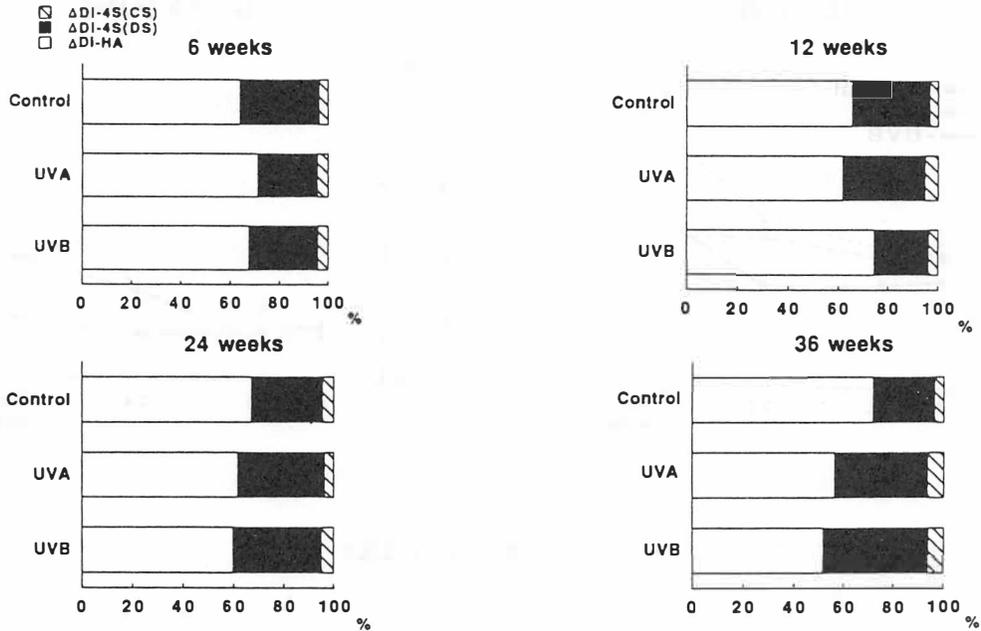


Fig. 3 The compositional change of skin main disaccharide units in UVA-, UVB-irradiated and unirradiated control mice at 6th, 12th, 24th and 36th week.

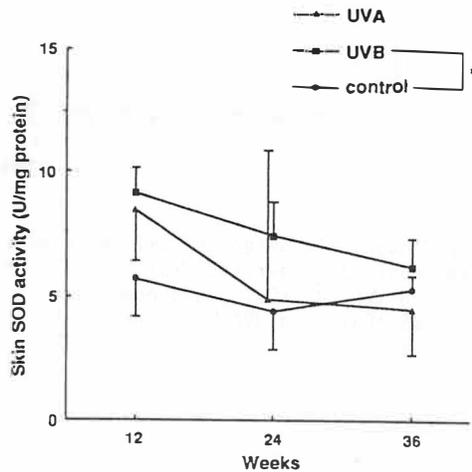


Fig. 4 The effect of UVA or UVB irradiation on SOD activity in hairless mice skin. Results are expressed as mean \pm SEM (n=4). *p < 0.05; analyzed by two factor ANOVA followed by Fisher's protected LSD test.

2) 皮膚抗酸化能の変化

UVB照射群では一様に有意な ($P < 0.05$) SOD活性の上昇がみられたが、UVA照射群では、12

週後に上昇したSOD活性は、24週までにほぼコントロールレベルに復した (Fig. 4)。カタラーゼ活性は、全経過を統計処理するとコントロール

群およびUVB照射群に比して、有意な低下がみられた (Fig. 5)。

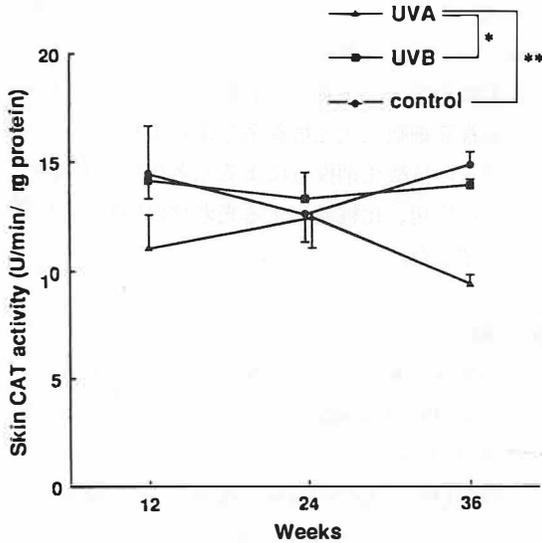


Fig. 5 The effect of UVA or UVB irradiation on Catalase activity in hairless mice skin. Results are expressed as mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$, ** $n < 0.01$; analyzed by two factor ANOVA followed by Fisher's protected LSD test.

3) 線維芽細胞の三次元培養

Asp·2-pを添加することにより、20日間の培養で、Fig. 6に示すように、線維芽細胞は重層し、

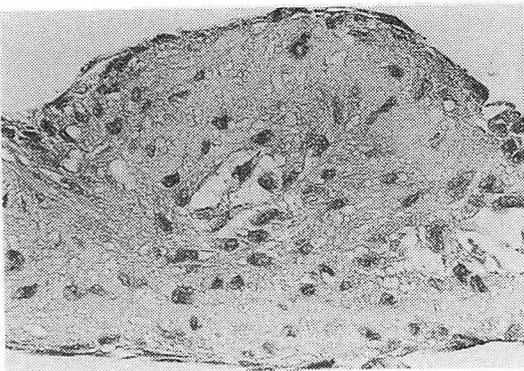


Fig. 6 Microscopic finding of the cell layer supplemented with L-ascorbic acid 2-phosphate. Multilayered fibroblasts supplemented with L-ascorbic acid 2-phosphate are surrounded by a dense extracellular matrix.

細胞外マトリックスも産生し、あたかも真皮の様相を呈するようになった。単層培養に比し、DNA量にして約5倍となり、ムコ多糖の二糖分析でもFig. 7に示すように、Asc·2-p添加群の方がより正常ヒト真皮のムコ多糖に類似するようになった。

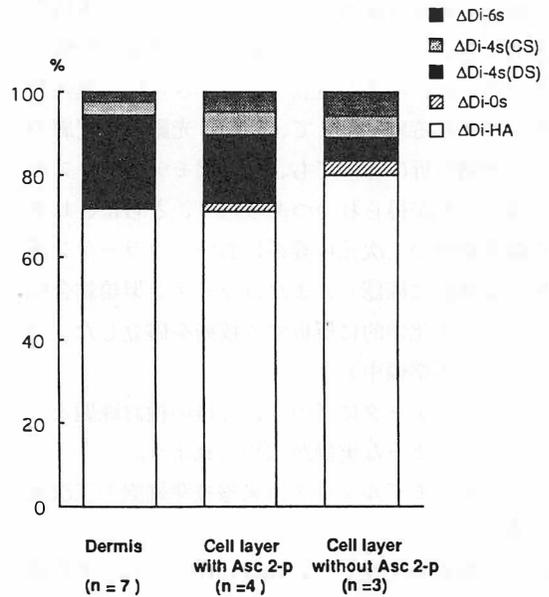


Fig. 7 The compositional change of main disaccharide units in the medium and the cell layer supplemented with or without L-ascorbic acid 2-phosphate. The cell layer supplemented with Asc 2-p became closer to that of the dermis mainly due to the increase of Δ Di-4S (DS)

4 考 案

今回の研究から判明したことを列挙すると以下のようなになる。

- 1) 光老化モデルマウスの皮膚変化は、ヒト光老化を反映したものであり、光老化研究に供することが可能であること。
- 2) 長期紫外線反復照射による皮膚抗酸化能の変化は、SODとカタラーゼとでは挙動が異なること、急性紫外線照射では減少するSOD活性も、慢性反復照射ではむしろ誘導されること、UVAとUVBと

5 総括

では、異なる変化を示すこと。

3) 真皮ムコ多糖の二糖分析では、従来の組織化学的变化をほぼ反映した変化を量的に把握できたこと、これらの変化はUVA、UVBにより差異があり、しかも照射回数に依存して変化していくこと¹²⁾。
4) Asc・2-pを添加したヒト線維芽細胞培養系では線維芽細胞は重層し、コラーゲンやムコ多糖を産生すること、ムコ多糖の組成は、真皮に類似していること、などの諸点である。さらに、現在判明しつつある事実として、ヒト日光露出部皮膚のムコ多糖分析においても、光老化モデルマウスと同様の所見が得られつつあり¹³⁾、さらに、ヒト線維芽細胞の三次元培養系においてコラーゲン産生を電顕的に確認し、またコラーゲン架橋結合についても生化学的に解析する技術を確立した(いずれも発表準備中)。

これらのデータに基づき、今後の検討課題としては以下のような実験が求められよう。

- 1) 光老化モデルマウス由来線維芽細胞の三次元培養の確立。
- 2) 同培養系を用いて、in vitroにおける紫外線照射を含む新たな酸素ストレスに対し、線維芽細胞の抗酸化能、過酸化脂質量がどのように変動するかを検証。
- 3) 同じく、コラーゲン架橋結合やムコ多糖組成がどのような挙動を示し、それが光老徴をどのように説明しうるかの検討。
- 4) 最終的に、cosmeticsとして外用可能な抗酸化物質(現在実用化している β -カロテンやビタミンEなどとの比較も含めて)をin vitro投与し、上記の変化をいかに制御しうるかの検索などである。

これらの検討により、長期紫外線照射による変化の一部でも抗酸化物質投与により制御可能であることが判明すれば化粧品に配合することにより、光防御よりもさらに積極的な抗光老化戦略手段としての有用性が明らかになり、臨床応用が可能となるものと期待される。

光老化モデルマウス皮膚を用いて、長期反復紫外線による皮膚抗酸化能、ムコ多糖組成、コラーゲン架橋形成などに対する影響を検討した。同時に、線維芽細胞三次元培養系を確立することにより、将来の抗酸化剤投与による光老化制御実験系としての応用、化粧品による光老化の抗酸化制御を展望した。

文 献

1. Yoshiki Miyachi, "Photoaging from an oxidative standpoint", *J. Dermatol. Sci.*, 9 79-86 (1995)
2. 宮地良樹, "老化の臨床-皮膚", 活性酸素・フリーラジカル, 5 181-186 (1994)
3. 宮地良樹, "紫外線防御, NMシンポジウム 光と皮膚" 日経メディカル 311 155-158 (1994)
4. 宮地良樹, "皮膚老化と過酸化脂質", *Geriatric Medicine.*, 32 1069-1072 (1994)
5. 宮地良樹, "活性酸素病態学(3)-皮膚科領域における抗酸化剤の臨床応用" 西日本皮膚科 56 503-513 (1994)
6. 宮地良樹, "皮膚抗酸化療法とフリーラジカル" *Mebio.*, 11 (4) 72-77 (1994)
7. 宮地良樹, "抗酸化剤による皮膚疾患の治療" 日皮会誌, 104 1608-1609 (1994)
8. 宮地良樹, "紫外線傷害モデル", 細胞工学別冊 活性酸素実験プロトコル, 谷口直之監修 秀潤社 283-287 (1994)
9. Tadayoshi Higuchi, Kazunori Ohnishi, Hiroaki Hayashi, Osamu Ishikawa, Yoshiki Miyachi "Changes in skin disaccharide components correlate with the severity of sclerotic skin in systemic sclerosis", *Acta. Dermatol. Venereol.*, 74 179-182 (1994)
10. Katsuyuki Okada, Yumiko Nonaka, Kazunori Ohnishi, Osamu Ishikawa, Yoshiki

- Miyachi, "Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin", *J. Dermatol. Sci.*, 8 183-186 (1994)
- 11 Osamu Ishikawa, Yoko Kojima, Yoshiki Miyachi, "Disaccharide analysis of dermal fibroblast derived glycosaminoglycans in the three dimensional culture", *J. Dermatol. Sci.*, 8 203-207 (1994)
- 12 Yumiko Takahashi, Katsuyuki Okada, Kazunori Ohnishi, Osamu Ishikawa, Yoshiki Miyachi, "Disaccharide analysis of the skin glycosaminoglycans in chronically ultraviolet-irradiated hairless mouse," *J. Dermatol. Sci.*, in press
- 13 Yumiko Takahashi, Katsuyuki Okada, Kazunori Ohnishi, Osamu Ishikawa, Yasushi Igarashi, Yoshiki Miyachi, "Disaccharide analysis of human skin glycosaminoglycans in sun-exposed and sun-protected skin of the aged people" *J. Dermatol. Sci.*, in press