

海藻カロテノイドの皮膚における光老化抑制作用

京都大学大学院農学研究科

平 田 孝

Fucoanthin, a major carotenoid in brown algae, has various beneficial effects. In this study, we evaluated the effect of topical fucoanthin on UVB-induced skin photoaging of hairless mice. The dorsal skins were treated topically with a 0.001% fucoanthin solution 2 h before each UVB irradiation (5 times a week) for 10 weeks. The formation of wrinkles in UVB-irradiated skin treated with vehicle alone was significantly increased compared with the non-irradiated control. Treatment with fucoanthin tended to suppress the UVB-induced wrinkle formation but there was no significant difference between wrinkle formation in the control group and in the fucoanthin treatment group. However, topical treatment with fucoanthin significantly prevented UVB-induced epidermal hypertrophy, VEGF and MMP-13 expression in the epidermis and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the skin. These results indicate that topical treatment with fucoanthin prevents skin photoaging of UVB-irradiated hairless mice, possibly via its antioxidant and antiangiogenic effects.

1. 諸 言

老化現象として皮膚に現れる変化は、生命活動の結果生じる損傷の蓄積によって進行する内因性老化と、外的刺激を受け続けることによって進行する外因性老化の二種類に大別できる。外因性老化に関わる刺激としては、紫外線暴露、乾燥、熱、物理的刺激等が挙げられ、とくに紫外線による老化現象は光老化 (photoaging) と呼ばれている。高齢化や長寿化が進み、単に長生きするだけでなく、老化を抑制し健康的に生きることが重要と考えられるようになり、美容やアンチエイジングへの関心が高まっている。したがって、皮膚の老化に関わる光老化のメカニズムの解明やその抑制は、現代社会におけるQOL (Quality of Life) の向上に役立つと考えられる。

近年、光老化のメカニズムに血管新生が関与することが報告されている。血管新生とは、成熟個体において標的部位の血管内皮細胞がプロテアーゼを産生し、基底膜を消化して遊走・増殖した後、血管壁細胞ペリサイトが取り囲むことで既存の血管が拡張する現象である。紫外線照射によって引き起こされる VEGF (vascular endothelial growth factor, 血管新生促進因子) と TSP-1 (thrombospondin-1, 血管新生阻害因子) の発現バランスの変化が、皮膚の光老化を促すスイッチとなることが示唆されている^{1,2)}。また、血管内皮細胞の分泌するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) が真皮層を構成するコラーゲンを分解することでシワ形成

を直接的に引き起こすことも報告されている³⁾。さらに炎症と光老化の関わりとして、慢性的な紫外線照射によって誘導された好中球に由来する MMPs が、継続的に細胞外マトリックスを損傷した結果、シワ形成が引き起こされることも示されている^{4,5)}。したがって、血管新生抑制物質が光老化によるシワ形成を抑制できることが大いに期待される。

カロテノイドは生物全般に広く含まれる脂溶性色素で、赤から橙色を呈し、強い抗酸化作用を有する。近年、新しい健康機能が注目されており、その作用機序解明も進められている。フコキサンチンは、ワカメ、コンブ等の褐藻に特有の海洋由来カロテノイドであり、アレン構造、エポキシ基、ヒドロキシ基といった特徴的な構造を有する (図1)。我々のこれまでの取組みによって、フコキサンチンが強力な血管新生抑制作用を有することが明らかにされている⁶⁾。したがって、フコキサンチンの光老化抑制作用が期待される。そこで本研究では、光老化モデルマウスを用いてフコキサンチンの影響を検証するとともに、その作用機序を解明することを目的とした。

2. 実 験

2.1 フコキサンチンの抽出と精製

市販の乾燥ワカメをミルミキサーで粉碎後、約10倍容量のアセトンを加え、アルミホイルで遮光し4℃で一晩抽出した。ろ過後、エバポレーターで乾固し、残留物を少量のメタノールに溶かし、LiChroprep RP-18 (40–63μm、Merck) を用いたカラムクロマトグラフィーに供し、粗フコキサンチン画分を分取した。さらに ODS-80Ts TSK-gel (4.6×250mm、東ソー) を用いた HPLC に供し、フコキサンチンを精製した^{6,7)}。

2.2 動物実験

ヘアレスマウス (Hos : HR-1、6週齢、雌) を用いて、紫



Suppressive effects of the algal carotenoid fucoanthin on skin photoaging

Takashi Hirata

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

外線照射試験を行った。マウスの取り扱いは京都大学動物実験委員会の指針に従った。室温 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期12時間で、固形試料(MF)と水を自由摂食させた。2週間予備飼育した後、ノーマル群、コントロール群、フコキサンチン群の3群に分けた($n=6$)。ノーマル群はUVB照射も試料塗布もせずに飼育した。フコキサンチン群は週5回、0.001% (w/v) フコキサンチン溶液(プロピレングリコール/エタノール/水(3:2:5, v/v/v))、コントロール群は溶媒のみそれぞれを80 μl 背部に塗布し、2時間後にUVBを照射した。照射量は、第1週目で1日あたり30 mJ/cm^2 、第2、3、4週目はそれぞれ50、55、60 mJ/cm^2 、5週目以降は65 mJ/cm^2 と、段階的に照射強度を高めるようにした。塗布およびUVB照射処理期間は10週間とし、最後の照射から24時間後にイソフルランを用いた吸引麻酔下で皮膚の評価を行った。頸椎脱臼後、背部皮膚を採取した。

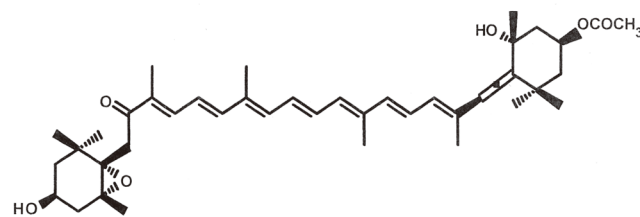


図1 フコキサンチンの化学構造

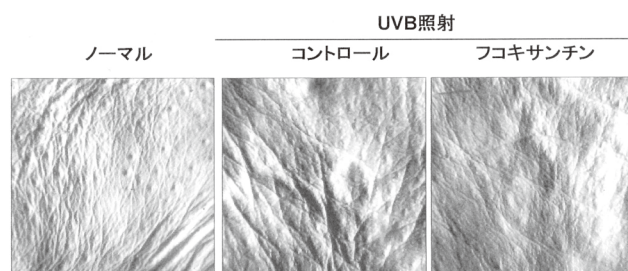


図2 UVB照射ヘアレスマウスの背部皮膚レプリカ

2.3 皮膚の評価

背部皮膚のレプリカ(ASA-01アサヒバイオメッド)を採取し、反射用レプリカ解析システム(ASA-03アサヒバイオメッド)を用いて解析した。

頸椎脱臼後、背部皮膚約 $20\times 20\text{mm}$ を採取し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン切片をHE染色した。光学顕微鏡で表皮厚を測定した。

採取した背部皮膚約50mgをホモジナイズし、TBARSを測定した⁸⁾。また、DispaseII (Roche)を用いて表皮層を単離し⁹⁾、セパゾール(ナカライテスク)を用いてトータルRNAを抽出後、リアルタイムRT-PCR法にて、VEGF、TSP-1、MMP-13、IL-6、TNF α のmRNA発現量を測定した。

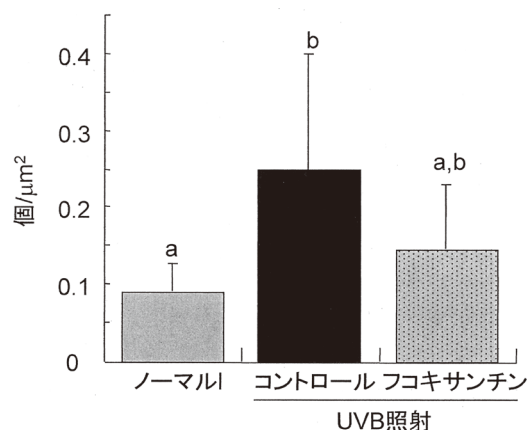


図3 レプリカ画像解析によるシワの定量
平均値 $\pm$ SD、異なる符号間で有意差あり($P<0.05$)

3. 結果

3.1 背部皮膚の形態変化の評価

UVB照射によって、ノーマル群と比較してコントロール群でシワが増加し、深いシワが特徴的に認められた。一方、フコキサンチン群はコントロール群と比較して深いシワは認められなかった(図2)。レプリカ画像を用いて、シワ平均個数について定量的に解析した結果、コントロール群で、ノーマル群に比べて有意な増加が認められた。一方、フコキサンチン群では有意ではないものの、コントロール群に比べて低値を示す傾向があり、ノーマル群とも有意な差は認められなかった(図3)。

3.2 組織学的分析

HE染色した背部皮膚切片を用いて、表皮層の肥厚化について調べた(図4)。コントロール群では表皮厚の肥厚化が認められたが、フコキサンチンはそれを抑制していることが認められた。肥厚化を定量的に評価した結果を図5

に示した。表皮厚はノーマル群に対してコントロール群で有意な増加が認められ、フコキサンチン群で有意に抑制された。

3.3 皮膚の過酸化

コントロール群でマロンジアルデヒド量がノーマル群に対して有意に増加した。一方、フコキサンチン群ではコントロール群に対して有意に減少し、ノーマル群と同レベルの値を示した(図6)。

3.4 表皮の遺伝子発現の変化

UVB照射によるMMP-13とVEGFの発現亢進は、フコキサンチン塗布によって有意に抑制された(図7)。TSP-1、TNF α 、IL-6の発現はいずれもすべての群間で有意な差は認められなかった。

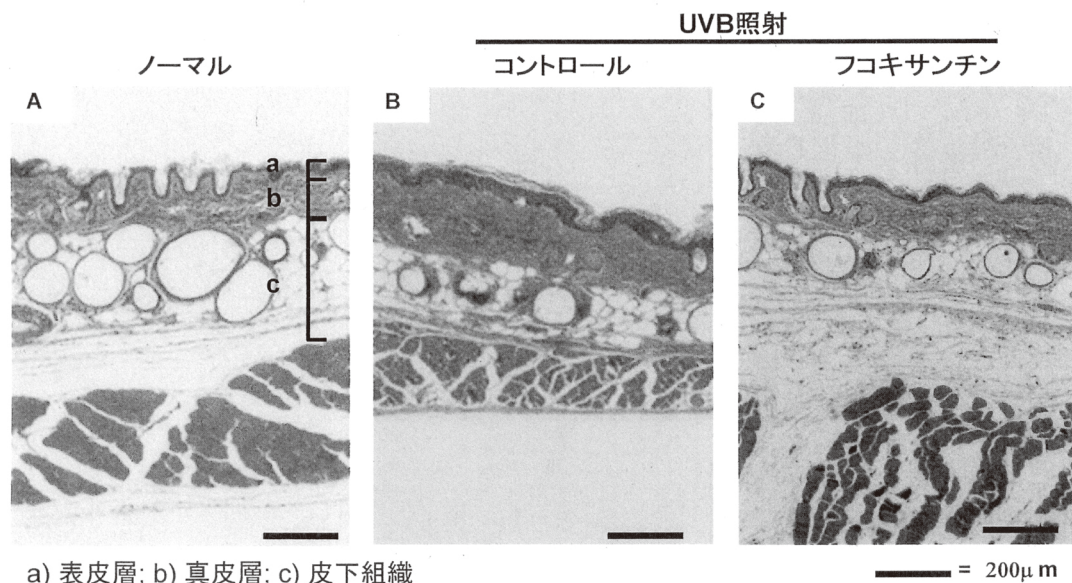


図4 背部皮膚の組織切片

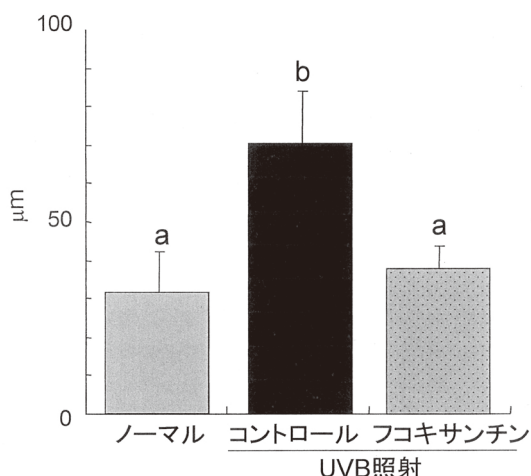


図5 UVB照射による背部表皮厚の変化に与えるフコキシサンチンの影響
 平均値 ±SD、異なる符号間で有意差あり (P<0.05)

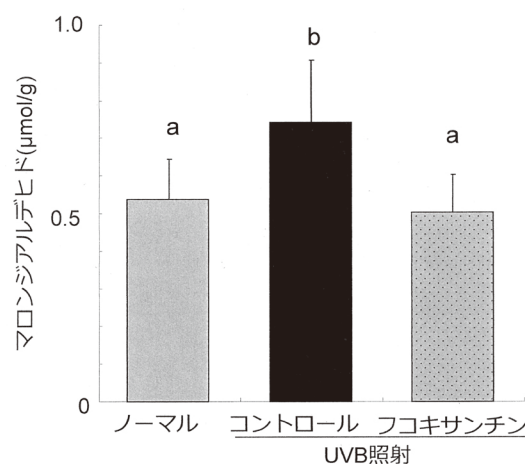


図6 UVB照射による皮膚の脂質酸化に与えるフコキシサンチンの影響
 平均値 ±SD、異なる符号間で有意差あり (P<0.05)

4. 考 察

本研究においてUVB照射による有意なシワ形成と表皮の肥厚化が認められ、0.001%フコキシサンチン溶液の塗布によってシワ形成の抑制傾向と有意な表皮肥厚化抑制作用が認められた。

表皮肥厚化は外因性老化である光老化と内因性老化とを区別する最も顕著な兆候の一つである。肥厚化は基底細胞層や真皮層を紫外線から守るための防御機構とみなすことが出来る。フコキシサンチンの有する生理活性が相乗的に機能してUVBによる皮膚の損傷を軽減したために、肥厚化が有意に抑制されたものと考えられた。

活性酸素種の産生によって、コレステロールやスクアレノ等の不飽和結合を有する脂質成分から過酸化脂質が生成

し、コラーゲンやエラスチンの損傷、DNAの傷害、抗酸化酵素の不活性化、細胞機能の劣化が引き起こされる。UVB照射によるTBARSの上昇が0.001%フコキシサンチン塗布により抑制されたことから、脂質過酸化反応を抑制することも光老化抑制作用の一因と考えられた。活性酸素を介してVEGFやMMPsの発現が調節されることも報告されており¹⁷⁻¹⁹⁾、活性酸素に応答したサイトカインを介してIL-1やIL-6、TNFαなどの産生が誘導されることも報告されている¹⁰⁾。したがって、活性酸素を介して変動する可能性のある遺伝子の発現解析も重要と考えられた。

UVB単回照射によって、VEGFとTSP-1の発現バランスの変化が連動することが明らかにされている²⁾。また、長期的UVB照射モデルにおいて、VEGF過剰発現マウスはUVB感受性が増加し、表皮肥厚化、シワ形成、炎症細

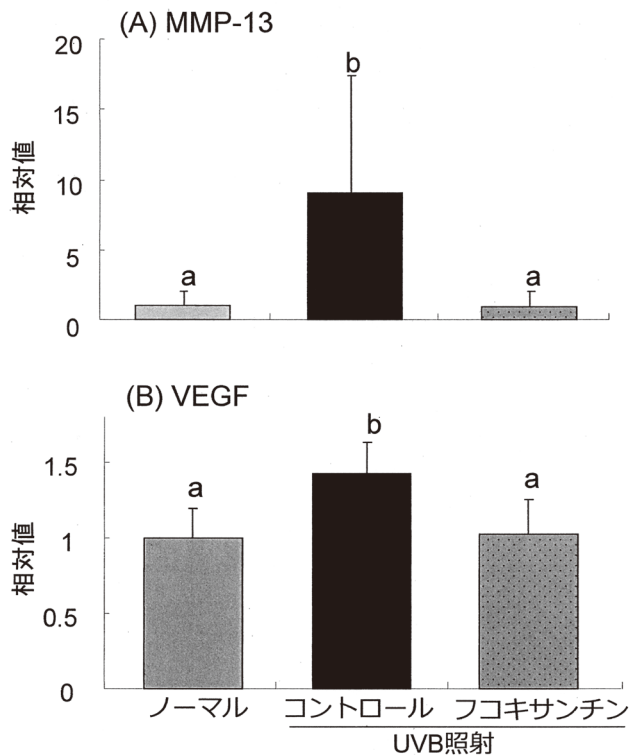


図7 UVB照射による皮膚の遺伝子発現に与えるフコキサンチンの影響
平均値 ±SD、異なる符号間で有意差あり (P<0.05)

胞の浸潤が惹起されることも報告されている¹⁾。したがってVEGFの発現亢進が光老化の惹起に強く関与するものと考えられる。一方、長期的にUVB照射したTSP-1過剰発現マウスにおいて細胞外マトリックスの損傷、シワの形成、表皮の肥厚化が抑制されており²⁰⁾、TSP-1もUVB照射による光老化の抑制に関わると考えられる。しかしながら、TSP-1はVEGFと異なり様々な働きを有するタンパク質でもあるために^{11, 12)}、本実験結果においてTSP-1の発現は変動しなかったものと推測された。

UVB照射によるMMP-13発現の促進も、0.001%フコキサンチン溶液の塗布によって有意に抑制された。MMP-13はマウスの主要なコラゲナーゼであり、ヒトにおけるMMP-1と同様の働きを担う。VEGFとMMPの発現は相互に強く関わっており¹³⁾、活性酸素を介したMMP制御メカニズムも報告されていることから¹⁴⁻¹⁶⁾、フコキサンチンの抗酸化作用とVEGF発現を介した血管新生抑制作用が相乗的に機能した結果、MMP-13発現が有意に抑制され、シワの形成が抑制されたものと考えられた。

(引用文献)

- 1) Hirakawa S, Fujii S, Kajiya K *et al.*: Vascular endothelial growth factor promotes sensitivity to ultraviolet B-induced cutaneous photodamage. *Blood*, 105, 2392-2399, 2005.
- 2) Yano K, Kajiya K, Ishiwata M *et al.*: Ultraviolet B-induced skin angiogenesis is associated with a switch in the balance of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression. *J. Invest. Dermatol.*, 122, 201-208, 2004.
- 3) Takema Y, Hattori M, Aizawa K: The relationship between quantitative changes in collagen and formation of wrinkles on hairless mouse skin after chronic UV irradiation. *J. Dermatol. Sci.*, 12, 56-63, 1996.
- 4) Bolognia JL: Aging skin. *Am. J. Med.*, 98, 99S-103S, 1995.
- 5) Cho HS, Lee MH, Lee J W *et al.*: Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomedicine*, 23, 155-162, 2007.
- 6) Sugawara T, Matsubara K, Akagi R *et al.*: Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9805-9810, 2006.
- 7) Sugawara T, Baskaran V, Tsuzuki W *et al.*: Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by Caco-2 human intestinal cells and mice. *J. Nutr.*, 132, 946-951, 2002.
- 8) Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52, 302-310, 1978.
- 9) Trost A, Bauer JW, Lanschützer C *et al.*: Rapid, high-quality and epidermal-specific isolation of RNA from human skin. *Exp. Dermatol.*, 16, 185-190, 2007.
- 10) Haddad JJ, Safieh-Garabedian B, Saadé NE *et al.*: Chemioxyexcitation (delta pO₂/ROS)-dependent release of IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha: evidence of cytokines as oxygen-sensitive mediators in the alveolar epithelium. *Cytokine*, 13, 138-147, 2001.
- 11) Nicosia RF, Tuszynski GP: Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro. *J. Cell Biol.*, 124, 183-193, 1994.
- 12) Donnini S, Morbidelli L, Taraboletti G *et al.*: ERK1-2 and p38 MAPK regulate MMP/TIMP balance and function in response to thrombospondin-1 fragments in the microvascular endothelium. *Life Sci.*, 74, 2975-2985, 2004.
- 13) Heissig B, Hattori K, Friedrich M *et al.*: Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases Current opinion in hematology. *Cur. Opin. Hematol.*, 10, 136-141, 2003.

- 14) Philips N, Keller T, Hendrix C *et al.*: Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. *Arch. Dermatolog. Res.*, 299, 373-379, 2007.
- 15) Wertz K, Seifert N, Hunziker PB *et al.*: Beta- carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen-dependent mechanism. *Free Radic. Biol. Med.*, 37, 654-670, 2004.
- 16) Karin W, Nicole S, Petra BH *et al.*: β -Carotene interference with UVA-induced gene expression by multiple pathways. *Pure Appl. Chem.*, 78, 1539-1550, 2006.
- 17) Mildner M, Weninger W, Trautinger F *et al.*: UVA and UVB radiation differentially regulate vascular endothelial growth factor expression in keratinocyte-derived cell lines and in human keratinocytes. *Photochem. Photobiol.*, 70, 674-679, 1999.
- 18) Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T *et al.*: The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.*, 288, 39-44, 1996.
- 19) Brenneisen P, Briviba K, Wlaschek M *et al.*: Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 515-524, 1997.
- 20) Yano K, Oura H, Detmar M: Targeted overexpression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in the epidermis of transgenic mice prevents ultraviolet-B-induced angiogenesis and cutaneous photo-damage. *J. Invest. Dermatol.*, 118, 800-805, 2002.