

# 酸化ストレスの生体分子イメージングから迫る 対紫外線スキンケア分子の新規探索と機能評価

群馬大学大学院医学系研究科教育研究支援センター岩脇研究室

岩脇 隆夫

Oxidative stress has recently gotten a great deal of attention, because it is reported to be responsible for a variety of diseases and health concern and to be associated with fatigue and aging. Although oxidative stress is subject to occur everywhere of the body, skin cells are more exposed with oxidative stress by ultraviolet radiation, especially UV-A. The UV-related oxidative stress causes the protein degradation and accelerates the aging process in the skin cells. Thus, well-controlled oxidative stress needs for anti-aging of the skin cells. We have previously developed the gene constructs and model mice for visualizing oxidative stress in vivo. Here we also introduced the gene constructs into human-derived skin cells, and established experimental tools to easily measure oxidative stress in vitro. By using these tools, we discovered and evaluated the function of crocetin for anti-aging of the skin cells. Crocetin, is a carotenoid found in fruits of gardenia and saffron. We confirmed that crocetin mitigated oxidative stress and damage of the skin cells exposed to UV-A irradiation. These results indicate that crocetin might be potentially useful for protection against skin damage induced by UV-A.

## 1. 緒言

ストレスというと多くの人は心的なものを連想するが、生物の構成単位である細胞も外的および内的環境から様々なストレスに曝されている。それゆえに細胞はそれらストレスに対して順応できる分子メカニズムを発達させてきた。細胞レベルで感じとられるストレスの一種に「酸化ストレス」というものがあり、これは主に細胞内に発生する活性酸素が原因で生じるストレスである。この酸化ストレスは様々な疾患や健康問題の原因であることや、また疲労や老化とも密接に関連することが報告されるようになって、近年大きな注目を浴びている。さらには研究の世界だけでなく、美容の世界でも「酸化ストレス」は関心を集めていて、女性雑誌などでは酸化ストレスを解消する「抗酸化力」や「アンチエイジング」という言葉とともに特集が組まれるほどになっている。体のいたる所で酸化ストレスは発生する可能性を含んでいるのであるが、肌細胞ではとりわけ紫外線（特にUV-A波）が原因で酸化ストレスが生じやすい。この酸化ストレスは肌細胞内のタンパク質の酸化を引き起こし、肌の老化を進めてしまう。ゆえに肌細胞の老化を食い止めるには、酸化ストレスを上手くコントロールできることが重要である。そこで本研究では肌細胞で有用な抗酸化物質の新規探索および機能評価を行う。

私たちはこれまで主に小胞体ストレスや酸化ストレスなど



Screening and functional evaluation of molecules for anti-UV skin-care by using in vivo imaging of oxidative stress

Takao Iwawaki

Iwawaki Laboratory, Education and Research Support Center Graduate School of Medicine, Gunma University

の細胞ストレスについて研究を行ってきており、最近では酸化ストレス可視化モデルマウスの開発に成功している<sup>1)</sup>。このマウスは酸化ストレス応答反応で重要な働きを担うNrf2の機能を巧妙に利用している。具体的には酸化ストレスレポーター遺伝子はNrf2の分解に関わるドメインとルシフェラーゼやGFP遺伝子の融合体が抗酸化応答エレメントで活性化されるように構成されている。このような遺伝子を持つマウスでは酸化ストレスに曝されると転写レベルでその酸化ストレスレポーター遺伝子が活性化される。さらに、その翻訳産物（酸化ストレスレポータータンパク質）は内在性Keap1の分解抑制から免れ、安定化することで光ようになるのである（図1）。

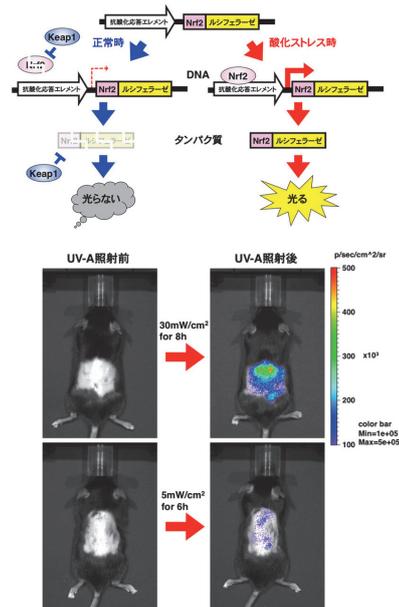


図1 上パネルはマウスに導入された遺伝子コンストラクトとその産物の酸化ストレス応答を模式的に表している。下のパネルはモデルマウスがUV-A紫外線照射された際のイメージング結果を示している。

## 2. 方法

株化肌細胞および試験管内再構成皮膚に先述の酸化ストレスレポーターを導入し、それらを用いて低分子化合物ライブラリーの中から紫外線誘導性酸化ストレスを軽減するものを探し出すこと、そしてその効果を評価することを目指した。具体的に使用した細胞は HEK001 細胞 (ATCC#CRL-2404) と NHEK-Ad 細胞 (Lonza#00192627) である。遺伝子導入方法としては一般的なリン酸カルシウム法、Effectene 法 (Qiagen#301425)、および Amaxa 法を順次試した。安定的な遺伝子導入株を選択する際の薬剤にはネオマイシン (シグマ #G8168) またはハイグロマイシン (InvivoGen#ant-hm-1) を使用した。ゆえにレポーター遺伝子はネオマイシン耐性遺伝子またはハイグロマイシン耐性遺伝子と共導入された。各遺伝子およびタンパク質の発現レベルはそれぞれ ABI 社の TaqMan プロブを用いたリアルタイム PCR 法および一般的に行われるウエスタンブロット解析または ELISA 解析により調べられた。レポーター (ルシフェラーゼ) 活性の測定には Dual luc assay キット (プロメガ #E1910) とルミノメーター (ベルトールド #LB9507) を用いた。レポーター (ルシフェラーゼ) 活性のライブイメージングには IVIS (Xenogen) を用いた。また活性酸素種の発生量を評価するために CM-H2DCFDA (Life Technologies#C6827) を用いた。

## 3. 結果

肌細胞を用いた研究は今回が初めてであったので、各 HEK001 細胞および NHEK-Ad 細胞の特徴をつかむところから実験をスタートさせた。HEK001 細胞を ATCC の推奨する条件で培養したところ、正常な増殖 (10 継代以上) を確認できた。NHEK-Ad 細胞も Lonza の推奨する条件で培養したところ、正常な増殖を確認できた。ただし、7 継代ぐらいで増殖が停止した。レポーター遺伝子の導入は低継代数で行うべきと考えた。安定的な遺伝子導入ではネオマイシン耐性遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして用いることを考えたため、各細胞のネオマイシンおよびハイグロマイシンに対する感受性を確認することとした。その結果、1 週間の培養で完全に細胞を死滅させる濃度は、ネオマイシンが 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ハイグロマイシンが 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。酸化ストレス可視化用レポーター遺伝子の安定導入細胞株が得られた後、その品質確認を酸化ストレス誘導剤処理により行う予定であるため、各細胞の酸化ストレス誘導剤処理に対する反応性を確認しておく必要がある。そこで 3 種類の代表的な酸化ストレス誘導剤である亜ヒ酸ナトリウム (メルク #1.06277.1000)、ジエチルマレイン酸 (シグマ #D97703)、および過酸化水素 (ナカライ #18411-25) を様々な濃度で培地に加えて培養

し、細胞の生存性を確認した。また、HO-1 遺伝子の発現応答性も確認した。10  $\mu\text{M}$  の亜ヒ酸ナトリウムを 8 時間処理したとき、HO-1 mRNA 発現レベルは非ストレス条件下の 70 ~ 120 倍に上昇する (図 2)。一方、100  $\mu\text{M}$  のジエチルマレイン酸を 8 時間処理する場合や 200  $\mu\text{M}$  の過酸化水素を 8 時間処理する場合でも HO-1 mRNA 発現レベルは非ストレス条件より上昇するが、亜ヒ酸ナトリウムに比べて、その程度は小さかった。したがって、安定導入細胞株の品質確認には 10  $\mu\text{M}$  亜ヒ酸ナトリウムの 8 時間を採用する。ちなみに HO-1 遺伝子は酸化ストレスにより活性化される Nrf2 を介して転写誘導されることが知られている。酸化ストレス可視化用レポーター遺伝子の安定導入細胞株を得るための遺伝子導入方法について GFP 発現プラスミドを用いて検討を行った。始めに最も安価に行うことができるリン酸カルシウム法を HEK001 細胞に試してみたが、GFP 陽性は全細胞あたり 1% 程度でしかなかった。続いて Effectene 法を試してみたが、GFP 陽性は全細胞あたり 2 ~ 3% 程度でしかなかった。そこで Amaxa 法を試してみたところ、GFP 陽性は全細胞あたり 60 ~ 70% であった。酸化ストレス可視化用レポーター遺伝子の安定導入細胞株を作成するにあたっては Amaxa 法を採用した。

HEK001 細胞へ酸化ストレス可視化用レポータープラスミドと内部標準用レポータープラスミドとネオマイシン耐性遺伝子発現プラスミドを 2 : 2 : 1 の割合 (質量比) で共導入した。15 日後、細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR 法で導入遺伝子が保持されていることを確認した。また亜ヒ酸ナトリウムで酸化ストレス処理を行い、その 8 時間後にライブイメージング解析を行い、細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、酸化ストレス可視化用レポーターの活性は亜ヒ酸ナトリウム処理した方がしなか

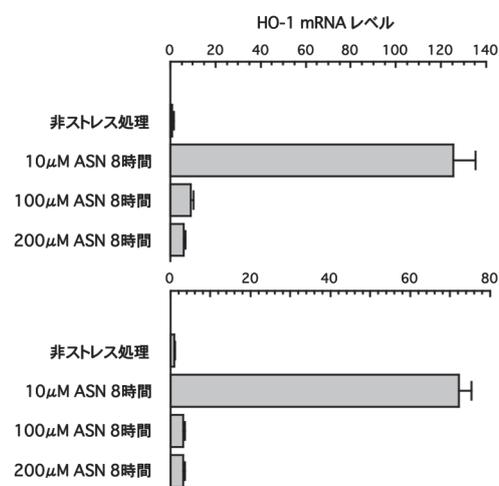


図2 各種濃度の亜ヒ酸ナトリウム (ASN) により処理された細胞における HO-1 遺伝子発現レベルを示す。上のヒストグラムは HEK001 細胞、下のヒストグラムは NHEK-Ad 細胞から得られたデータである。

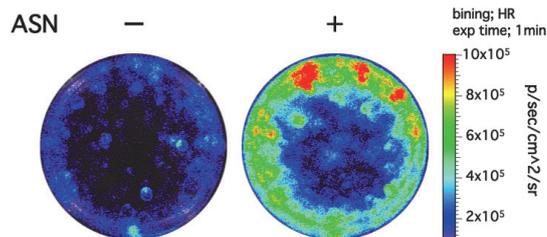


図3 酸化ストレスレポーター遺伝子を安定導入された HEK001 細胞におけるレポーター (ルシフェラーゼ) 活性のライブイメージング像を示す。亜硝酸ナトリウム (ASN) 処理により期待通り高レポーター活性が得られていることがわかる。

った方より 3.5 倍高かった (図 3)。一方、NHEK-Ad 細胞へもレポーター遺伝子を安定導入しようと試みたが、遺伝子導入後、細胞が十分な数に達する前に増殖が停止するため、これを諦めた。

2 種類の肌細胞のうち NHEK-Ad 細胞へのレポーター遺伝子安定導入はできなかったが、HEK001 細胞へは計画通り実行できた。ただ、この細胞の増殖速度が極めて遅かったため、また色々な条件検討が必要だったため、薬剤スクリーニングにずいぶん時間を取られたが漸く完了した。しかし結果はテストした低分子化合物ライブラリーの中には酸化ストレスを軽減するものが見出せなかった。一方で、本研究提案にはなかったが、国内で行っていた共同研究からクロセチンに紫外線誘導性酸化ストレスを軽減する効果<sup>2)</sup>が見出されたので本研究で樹立されたレポーター遺伝子安定導入細胞を用いて同効果の評価を行った。クロセチンはクチナシの実やサフランなどに含まれている黄色の天然色素で、カロテノイドカルボン酸の一つである。カロテノイドのうちβカロテンやリコピンには優れた抗酸化効果がよく知られているが、クロセチンはそれらメジャーなカロテノイドとは異なり両親媒性低分子化合物であり、体内へ取り込まれやすい性質を持つ。また抗酸化効果についても多くの報告があり、疲労回復や抗老化を謳った市販サプリメントなどに含まれて (特に目の) 健康を気にする人々からは注目を浴びている。しかしながら肌細胞におけるクロセチンの紫外線誘導性酸化ストレス軽減効果は不明であり、その効果は今回の研究で以下の通り示された。酸化ストレスレポーター遺伝子安定導入 HEK001 細胞へ UV-A 紫外線 (365nm 5mW/cm<sup>2</sup>) を 40 分間照射したところ、レポーター活性は非照射コントロール細胞に比べて 4.5 倍高かった (図 4)。また同様の実験を酸化ストレスレポーター遺伝子一過的導入 HEK001 細胞と NHEK-Ad 細胞で行ったところ、レポーター活性は UV-A 紫外線によって 4~4.5 倍上昇した (図 4)。さらにレポーター遺伝子を導入していない HEK001 細胞と NHEK-Ad 細胞で同様の実験を行い、酸

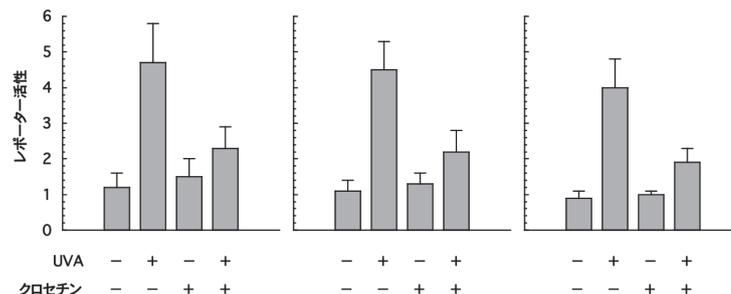


図4 UV-A 紫外線照射およびクロセチン添加の影響を酸化ストレスレポーター遺伝子により評価している。各ヒストグラムで用いられた細胞は、(左) 酸化ストレスレポーター遺伝子を安定導入された HEK001 細胞、(中) 酸化ストレスレポーター遺伝子を一過的に導入された HEK001 細胞、および(右) 酸化ストレスレポーター遺伝子を一過的に導入された NHEK-Ad 細胞。

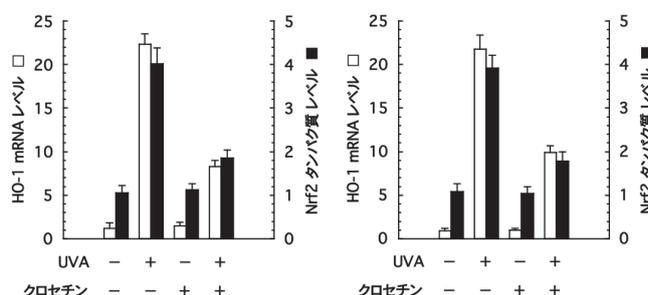


図5 UV-A 紫外線照射およびクロセチン添加の影響を HO-1 mRNA レベルと Nrf2 タンパク質レベルにより評価している。各ヒストグラムで用いられた細胞は、(左) HEK001 細胞と (右) NHEK-Ad 細胞。

化ストレス応答性分子である HO-1 mRNA および Nrf2 タンパク質の発現レベルを UV-A 紫外線照射と非照射間で比較したところ、UV-A 紫外線は両分子の発現レベルを顕著に高めた (図 5)。しかしながら UV-A 紫外線照射の 1 時間前にクロセチン (最終濃度 1 μM) を培地中へ加えると、上記のレポーターの活性上昇および酸化ストレス応答性分子の発現レベル上昇は幾分低く抑えられた (図 4 と 5)。次に活性酸素種の発生量についても UV-A 紫外線照射と非照射間およびクロセチン添加と非添加間で比較したところ、UV-A 紫外線は活性酸素種の発生量を顕著に高めるが、それはクロセチン添加によって部分的に軽減される結果が得られた (図 6)。

#### 4. 考 察

私たちは今日までにイメージング技術を用いて簡便に酸化ストレスの評価ができる実験系を構築しており、それをヒトに由来するケラチノサイトへ導入することで肌細胞に特化した酸化ストレス評価を可能にした。これは抗酸化機能を有した低分子化合物のハイスループットな解析に適しており、有用な実験ツールとなることが期待される。実際、本研究では、以前より抗酸化機能性面で注目されていたクロセチンについてケラチノサイトでの UV-A 紫外線誘導性

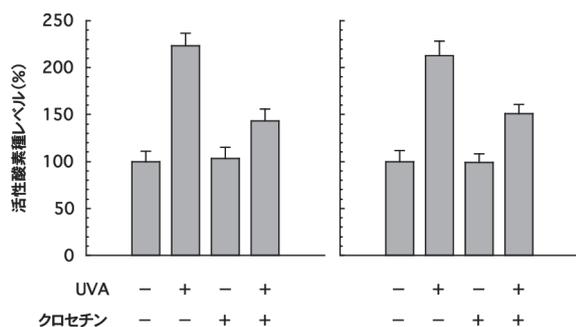


図6 UV-A 紫外線照射およびクロセチン添加の影響を活性酸素種の産生レベルにより評価している。各ヒストグラムで用いられた細胞は、(左) HEK001 細胞と(右) NHEK-Ad 細胞。

酸化ストレスに対する抗酸化性能を明らかにした。UV-A 紫外線照射に先立ってクロセチン処理を行うと、細胞内で発生する活性酸素種の量は抑えられ、これに伴って酸化ストレスにより活性化される応答分子の発現量も低下した。

このクロセチンによる抗酸化効果は他の細胞種では知られていたが、今回ヒトの肌細胞においても同効果を初めて確認できた。先にも述べた通り、クロセチンは既にサプリメントとして多くの方が口にしており、その安全性は高いと考えることができる。ゆえに本研究は今後のスキンケア商品開発において有意義な成果となるはずである。

#### (引用文献)

- 1) Oikawa D, Akai R, Tokuda M, Iwawaki T: A transgenic mouse model for monitoring oxidative stress, *Sci. Rep.*, vol. 2, no. 229, 2012.
- 2) Ohba T, Ishisaka M, Tsujii S, Tsuruma K, Shimazawa M, Kubo K, Umigai N, Iwawaki T, Hara H: Crocetin protects ultraviolet A-induced oxidative stress and cell death in skin in vitro and in vivo, *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 789, 244-253, 2016.