

コラーゲン産生に対して食品の機能性成分が与える影響 ～紫外線照射線維芽細胞を細胞傷害モデルとした 細胞生物学的解析～

青木敦子*・秋田修**・松岡康浩***・富重慶子*・松島照彦*

生活科学研究科 臨床栄養学研究室* 食品加工学研究室** 食品産業学研究室***

Effect of Food Ingredients on Collagen Production:
Cell Biological Analysis Using UV-Irradiated Skin Fibroblasts as a Model for Cell damage

Atsuko AOKI*, Osamu AKITA**, Yasuhiro MATSUOKA***, Keiko TOMISHIGE*, Teruhiko
MATSUSHIMA*

*, **, *** Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University

Using ultraviolet-irradiated mouse fibroblasts as a model for cell damage, we analyzed collagen synthesis and secretion into the culture medium and changes in gene expression of proteins involved in collagen synthesis and metabolism. Various food ingredients and nutritional elements were added to the culture medium and their effects were analyzed. Secretion and accumulation of collagen was decreased depending on the duration of ultraviolet-irradiation. The addition of collagen peptides increased the secretion of collagen into the medium. Following the addition of resveratrol, the main functional polyphenol of red wine, membrane-bound collagen was decreased, collagen secretion into the medium was increased, and gene expression of collagen-I, collagen-II, and collagenase was increased. We, therefore, suggest that collagen metabolism may be activated by resveratrol.

Keywords : skin (皮膚), fibroblast (線維芽細胞), ultraviolet (紫外線), collagen (コラーゲン), gene expression (遺伝子発現)

1. 【諸言】

線維芽細胞は皮膚の構造や機能に主要な役割を担っており、真皮の結合組織の主要なタンパク質であるコラーゲンおよびエラスチンを生成し、皮膚の「弾力」や「はり」を維持している。紫外線の影響を受けると線維芽細胞の合成、分泌の能力が低下することにより、コラーゲンやエラスチン量が減少するとともに、その構造が変化して、強靱性および弾力性が失われ、「シワ」や「たるみ」などが引き起こされる事が知られている¹⁾²⁾³⁾。

本研究では、細胞傷害モデルとして、マウス線維芽細胞 3T3-L1 に対し、皮膚の真皮にまで到達する紫外線 A 波 (UVA) を照射し、コラーゲンの分泌や遺伝子転写発現などに及ぼす影響を観察した。さらに食品の機能性成分の摂取により紫外線傷害が予防、抑制されたとする報告があることから⁴⁾、エピカテキン⁵⁾⁶⁾、レスベラトロール⁷⁾、アスタキサンチン⁸⁾などの機能性成分、およびコラーゲンの消化産物であるジペプチド、トリペプチ

ド⁹⁾を培地中に加えて、その影響を観察することを目的として実験を行った。

2. 実験方法

1) 培養条件

細胞は ATCC より提供を受けた 3T3-L1 (マウス胚由来線維芽細胞) を用いた。培地は Low - glucose 組成 (1 g/L) のダルベッコ変法イーグル培地「日水」^① (日水製薬株式会社) 10 g、NaHCO₃ 14 g/L 水溶液 100mL、Pen Strep 5 mL (Gibco, 10,000 units/mL penicillin + 10,000 μg/mL Streptomycin)、FBS 100 mL (Gibco, 仔牛胎児血清) にミリ Q 水を加えて 1 L として用いた。細胞を 12 穴プレートに 75 cells/mm² の密度で播種し、5 % CO₂、37 °C で培養した。培地は機能性成分添加前と機能性成分添加後 3 日ごとに液替えをして回収し、回収した培地はマイクロチューブに入れて冷蔵保存した。培養は 9 日間継続し、培地を回収した後、細胞の染色および total

RNA の抽出を行った。

2) UVA 照射

細胞を 12 穴プレートに播種して継代した後 2 日目に、クリーンベンチ送風下で、アズワン株式会社のハンディ UVA ランプ (365 nm : 50 mm の距離において 1407 μ W/cm²) を用い、プレートの 65 mm 上方から、30 分間、60 分間および 120 分間照射を行った。65 mm の距離では紫外線強度は 832 μ W/cm² となるが、通常の太陽光による紫外線強度が 500 ~ 1000 μ W/cm² なのでそれと同等になるように照射を行うこととした。

3) 機能的成分の添加

エピカテキン、レスベラトロール、アスタキサンチン、トリペプチド (Gly-Hyp-Pro) は DMSO (ジメチルスルホキシド) に溶解し、ジペプチド (Pro-Hyp) はミリ Q 水に溶解し、それぞれ 200 mM の溶液を作成した。成分の溶液は、UV 照射 24 時間後に、液替えを行った新しい培地に最終濃度 200 μ M になるように添加した。

4) 培養液中コラーゲンの定量

培地に PEG 3000-4000 を添付のプロトコールに従って加えて 0 ~ 4°C で 1 晩静置した後、12,000 xg 4°C で 10 分間遠心分離した。沈殿に Sircol Dye Reagent を加えてコラーゲンと色素結合させ、Acid Salt Wash Regent (20 mL) を脱イオン水 (80 mL) で希釈した溶液で酸洗浄をし、アルカリ抽出した。Biorad 社の microplate reader 3550 を用いて、吸光度 550 nm で培地中コラーゲン量を比色定量した。

5) 細胞膜連結型等のコラーゲン定量

機能的成分添加後 9 日目の細胞を PBS で洗浄後、Bouin's 液 (24 % ホルマリン、71 % 飽和ピクリン酸、5 % 氷酢酸) で 60 分間固定して、15 分間流水で洗浄後、乾燥させ、シリウスレッド溶液 (Sirius Red を飽和ピクリン酸水溶液に 0.1 % の濃度で溶解) を加え、マイクロプレート振盪機で 60 分振盪し、0.01 N 塩酸で酸洗浄後、0.1 N 水酸化ナトリウムでアルカリ抽出を行い、マイクロプレート振盪機で 30 分間振盪した。Biorad 社の microplate reader 3550 を用いて、吸光度 550 nm において比色により測定し、相対値をもって表した。

6) 遺伝子発現の測定

6-1. Total RNA の抽出

機能的成分添加後 9 日目の細胞を PBS で洗浄し、QIA-Shredder kit、および RNeasy Plus Mini kit (Quiagen 社) を用い、添付のプロトコールに従い total RNA を抽

出した。RLT (350 μ L) を加えた後、ポリスマンで細胞を剥離し、QIA-Shredder column に移し、9,000 xg で 2 分間遠心分離し、gDNA eliminator spin column に移し 9,000 xg で 30 秒間遠心分離を行った。70%エタノールを 350 μ L 添加し、RNeasy spin column に 700 μ L 移し、9,000 xg で 15 秒間遠心分離し、RW 1 を 700 μ L 添加し、9,000 xg で 15 秒間遠心分離し、RPE を 500 μ L 添加し、9,000 xg で 15 秒間遠心分離し、RPE を 500 μ L 添加し、9,000 xg で 2 分間遠心分離し、RNase free Water を 50 μ L 添加し 9,000 xg で 1 分間遠心分離することによりカラムから溶出させ、-20°C で使用するまで凍結保存した。

6-2. cDNA の合成

High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems 社) を用い、添付のプロトコールに従って行った。

2 × RT Buffer 10 μ L、Total RNA 9 μ L に逆転写酵素 M-MLV (20 × Enzyme Mix) 1 μ L を加え、37°C で 60 分間反応させて cDNA を合成し 95°C で 5 分間加熱することにより反応を停止させた。産生物は 4°C で保存した。

6-3. Real-time PCR による測定

cDNA を Primer-probe (Applied Biosystems 社) を含む Taq Man Array Plates に分注し、AMI PRISM 7000 を用い、real-time PCR により、ノーマライザー遺伝子として β -アクチンを使用し、遺伝子発現を相対定量 ($\Delta\Delta$ ct 法) で測定した。Primer-probe セットは ABI 社により至適化されたものを用い、遺伝子ごとに以下のとおりである。

collagen-I (Gene ID 12842, Ref Seq NM 007742.3, TaqManAssay ID Mm 00801666 g 1)、*collagen-II* (12843, NM 007743.2, Mm 00483888 m 1)、*collagenase (MMP)* (83995, NM 032006.3, Mm 00473485 m 1)。

7) 統計処理

得られたデータは SPSS statics 24 バージョンを用いて一元配置分散分析を行った。各群の比較には危険率 5% で多重比較法の Tukey 検定を用いて統計処理を行った。グラフのエラーバーは平均値 ± 標準誤差で表した

3. 実験結果

1) 線維芽細胞からのコラーゲン分泌の検討

機能的成分添加なし条件で紫外線照射の影響を比較した。照射により、線維芽細胞からのコラーゲン分泌量は、3 日目、6 日目では照射時間が長くなるに従って減少した。また 30 分間および 60 分間照射した細胞では培養日数が増えるに従って、コラーゲンの分泌量の増加がみられ回復が見られた。しかし、照射 120 分においては、明らかな回復は認められなかった (図 1)。

照射後 3 日目においては、レスベラトロールの添加では、添加なしと比較すると全体的に増加がみられ、照射なしで ($p < 0.01$) の有意差がみられた。トリペプチド以外の機能性成分の添加では、照射時間が長くなるに従って分泌量が減少する傾向がみられたが、トリペプチドの添加においては、照射 30 分では多少減少が見られたが、照射 60 分、120 分では ($p < 0.01$) の有意差がみられ、照射時間が長くなるに従って著しい増加がみられた (図 2)。

照射後 9 日目においては、添加なしに比べて、トリペプチドの添加では、照射 120 分で ($p < 0.05$) の有意差がみられた。エピカテキン、アスタキサンチンの照射なしでは、添加なしに比べて、培地中へのコラーゲンの分泌量は増加の傾向がみられたが有意差はみられなかった (図 3)。

2) 線維膜連結型等におけるコラーゲン蓄積の検討

機能性成分を添加しない場合、照射の有無にかかわらず、また照射時間にかかわらず、細胞内コラーゲン量には大きな変化がみられなかった。エピカテキンの添加では、添加なしに比べて、照射なし ($p < 0.01$) において増加がみられたが、照射後においては添加なしとの差がみられなかった。レスベラトロールの添加においては、照射の有無にかかわらず、コラーゲン量の著しい抑制がみられた ($p < 0.01$)。アスタキサンチンの添加においても照射の有無にかかわらず、減少がみられた (p

< 0.01)。ジペプチドの添加では、照射なし ($p < 0.01$)、照射 30 分 ($p < 0.05$)、照射 60 分 ($p < 0.01$) において有意差がみられた。トリペプチドの添加では、照射の有無にかかわらず変化がみられなかった (図 4)。

3) コラーゲンおよび関連遺伝子の転写活性の測定

ノーマライザー遺伝子として、 β -アクチンを使用して、相対定量 ($\Delta \Delta ct$ 値) によって算出した値では、添加なしを 1 として比較した場合、*collagen I* について照射なしでは、レスベラトロール、エピカテキンの添加により遺伝子発現の著しい増加がみられた。照射 60 分では、エピカテキン、トリペプチドによる増加がみられた (図 5)。

collagen-II について照射なしでは、レスベラトロールの添加により遺伝子発現が著しく増加しており、次いで、エピカテキンによる増加がみられた。照射 60 分では、エピカテキン、トリペプチドにより増加がみられた (図 6)。

collagenase について照射なしでは、レスベラトロールにより遺伝子発現が著しく増加しており、次いでエピカテキンの増加がみられた。照射 60 分では、トリペプチド、レスベラトロールの増加がみられた (図 7)。

collagen I、*collagen II*、コラーゲン分解酵素である *collagenase* のいずれにおいても、レスベラトロールの添加により、照射なしの場合、遺伝子発現が著しく増加していると考えられる。またエピカテキンにおいても、レ

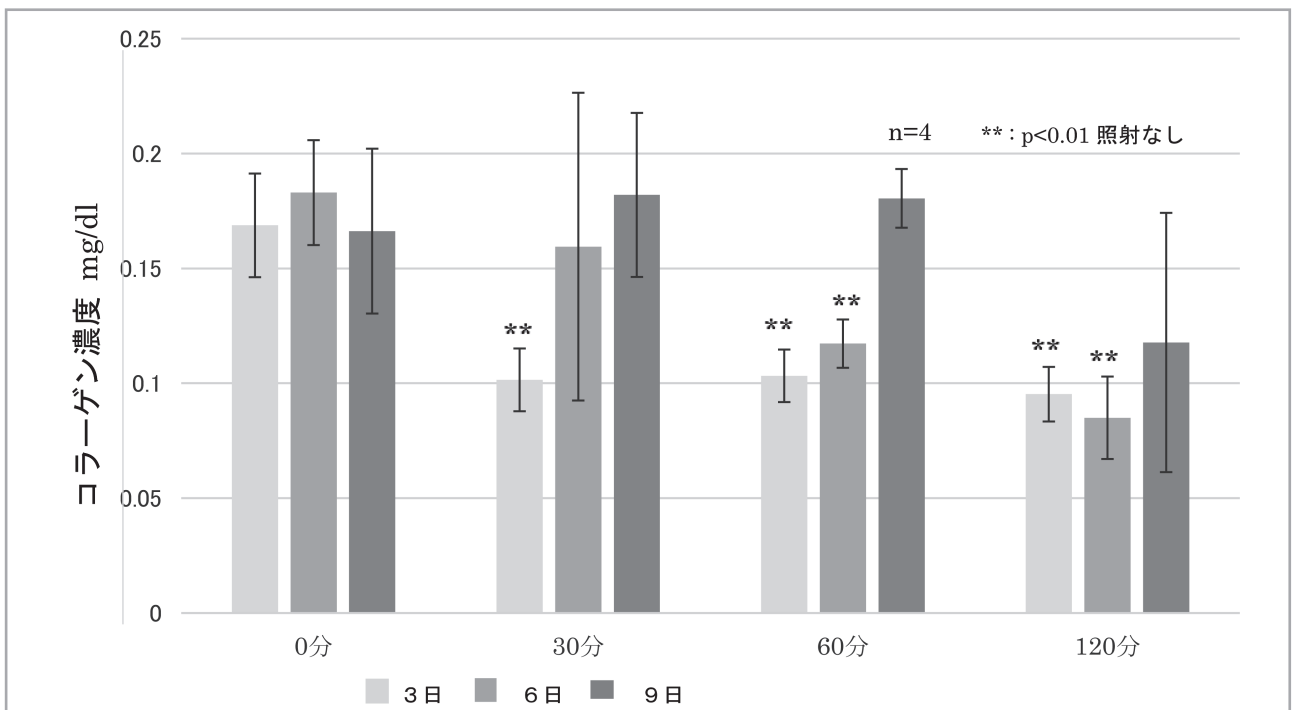


図 1. UV 照射が線維芽細胞からのコラーゲン分泌に対して及ぼす影響 機能性成分添加後 3 日 6 日 9 日 線維芽細胞から培養液中へ分泌されたコラーゲンの濃度を測定し、照射なしと照射後の比較検討

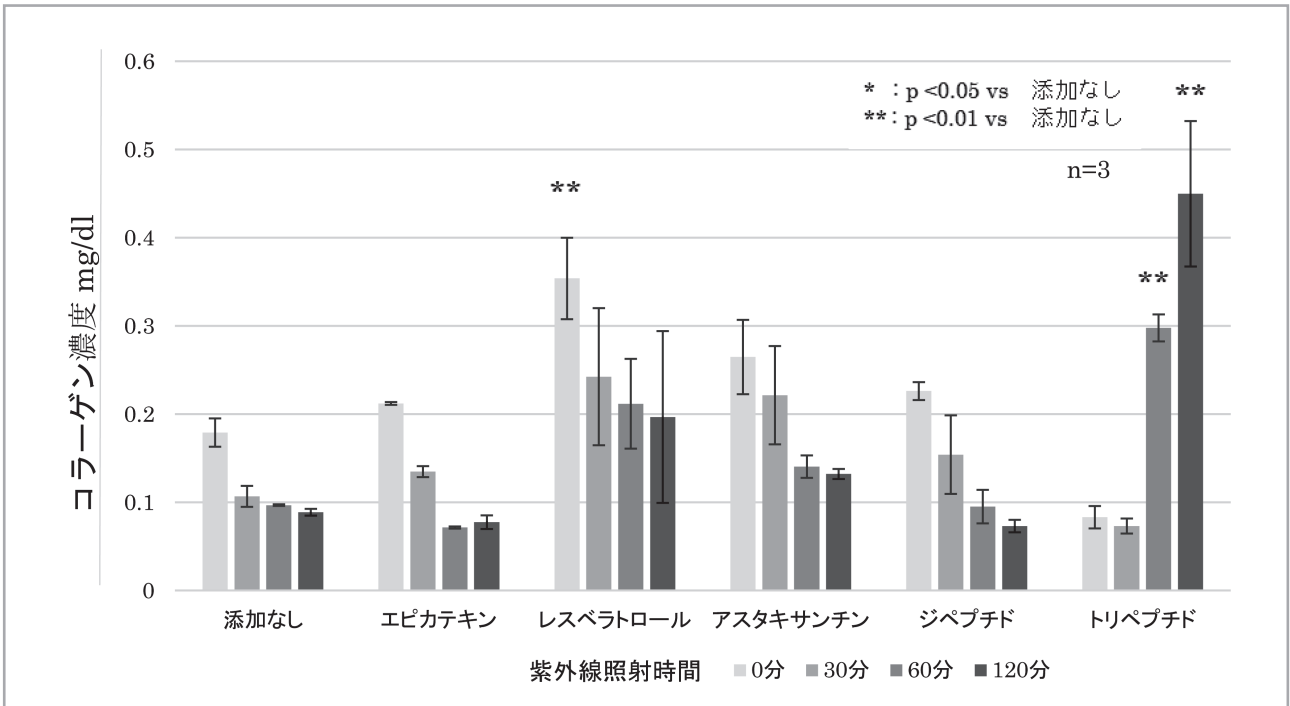


図2. 添加なしと機能性成分を添加した線維芽細胞からのコラーゲン分泌量の推移 (機能性成分添加後 3 日目) ■ 0分 ■ 30分 ■ 60分 ■ 120分
 添加なしと機能性成分を添加した線維芽細胞からのコラーゲン分泌量の推移を比較検討

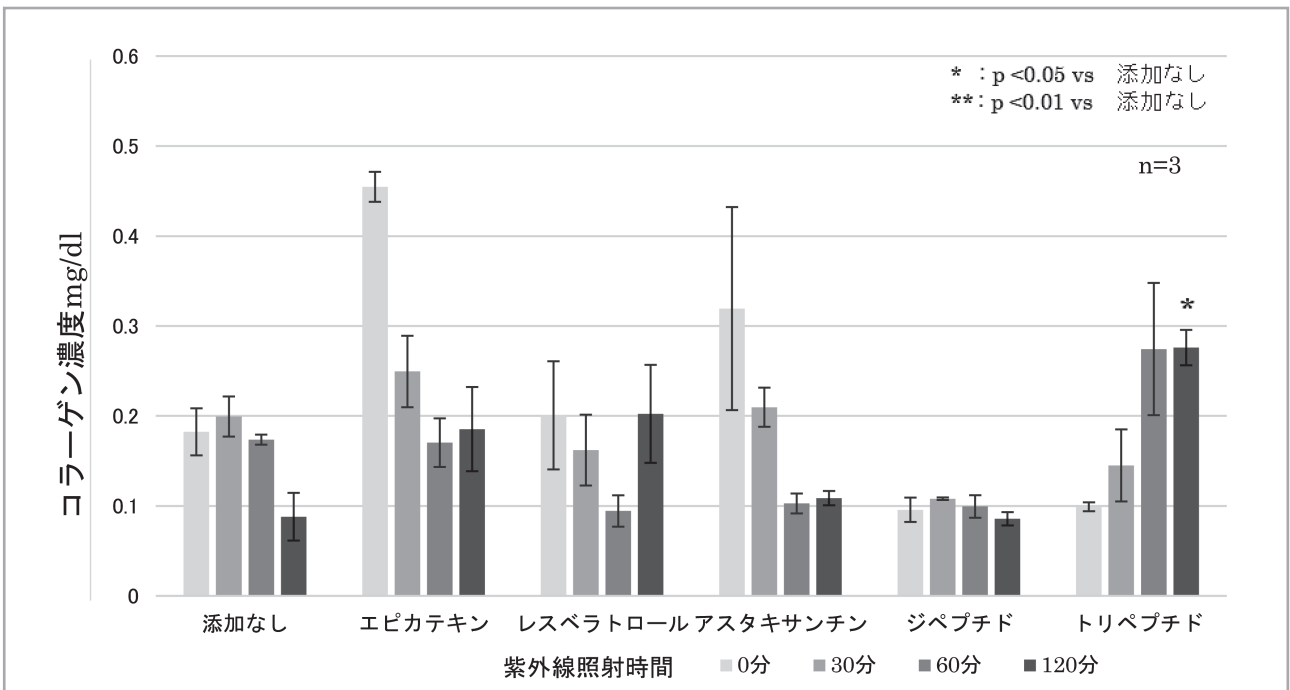


図3. 添加なしと機能性成分を添加した線維芽細胞からのコラーゲン分泌量の推移 (機能性成分添加後 9 日目) ■ 0分 ■ 30分 ■ 60分 ■ 120分
 添加なしと機能性成分を添加した線維芽細胞からのコラーゲン分泌量の推移を比較検討

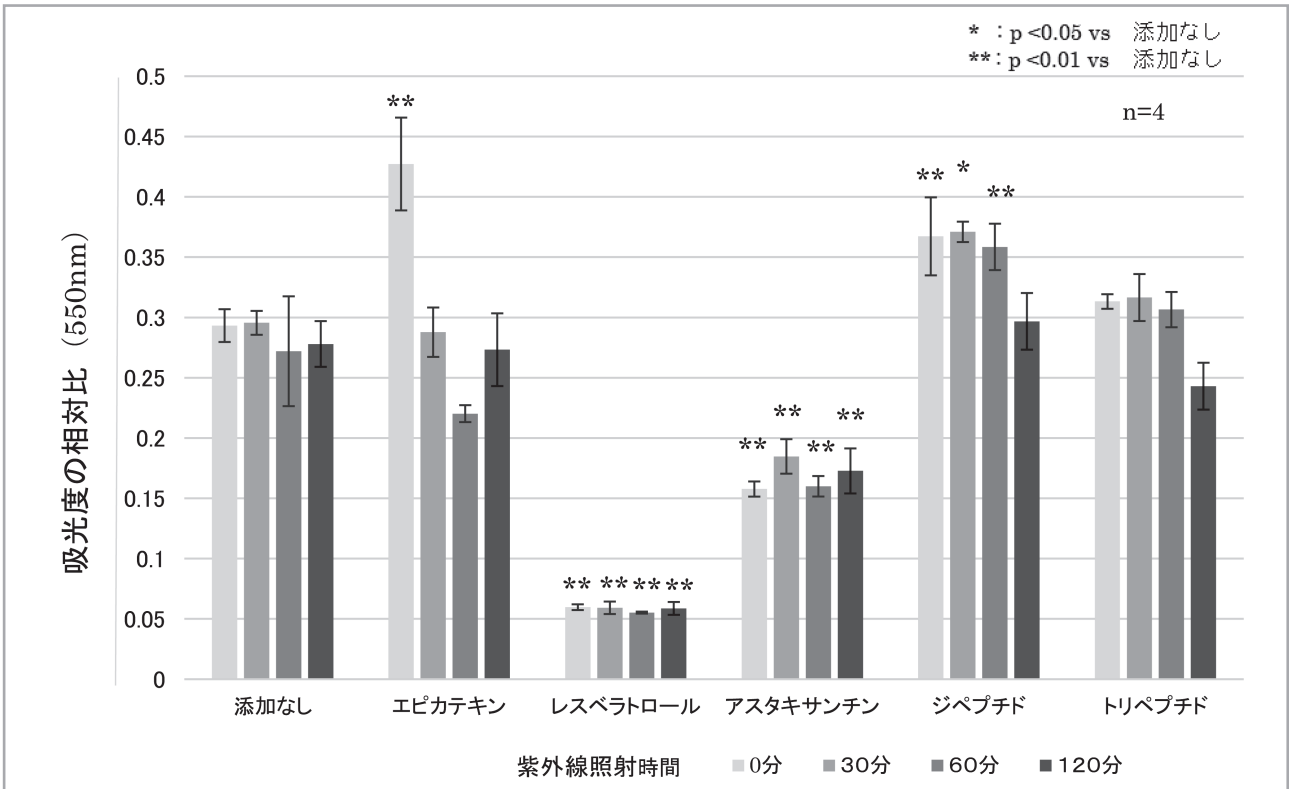


図 4. 機能性成分添加なしと機能性成分を添加した線維芽細胞膜連結型のコラーゲンの定量
 ■ 0分 ■ 30分 ■ 60分 ■ 120分
 添加なしと機能性成分を添加した線維芽細胞膜連結型のコラーゲンの定量を比較検討

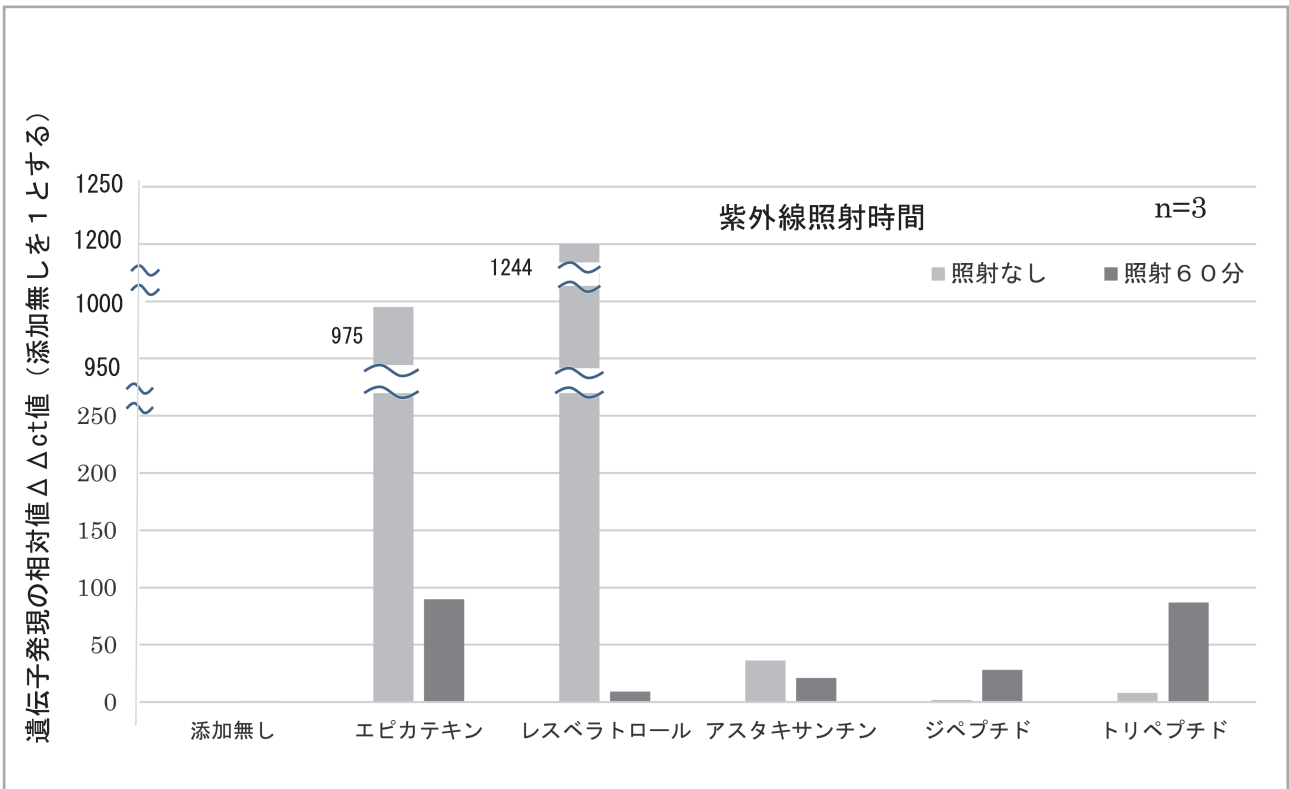


図 5. collagen I 遺伝子の発現 (機能性成分添加後 9 日目の細胞) 機能性成分添加なしを 1 として比較検討
 ■ 照射なし ■ 照射 60 分

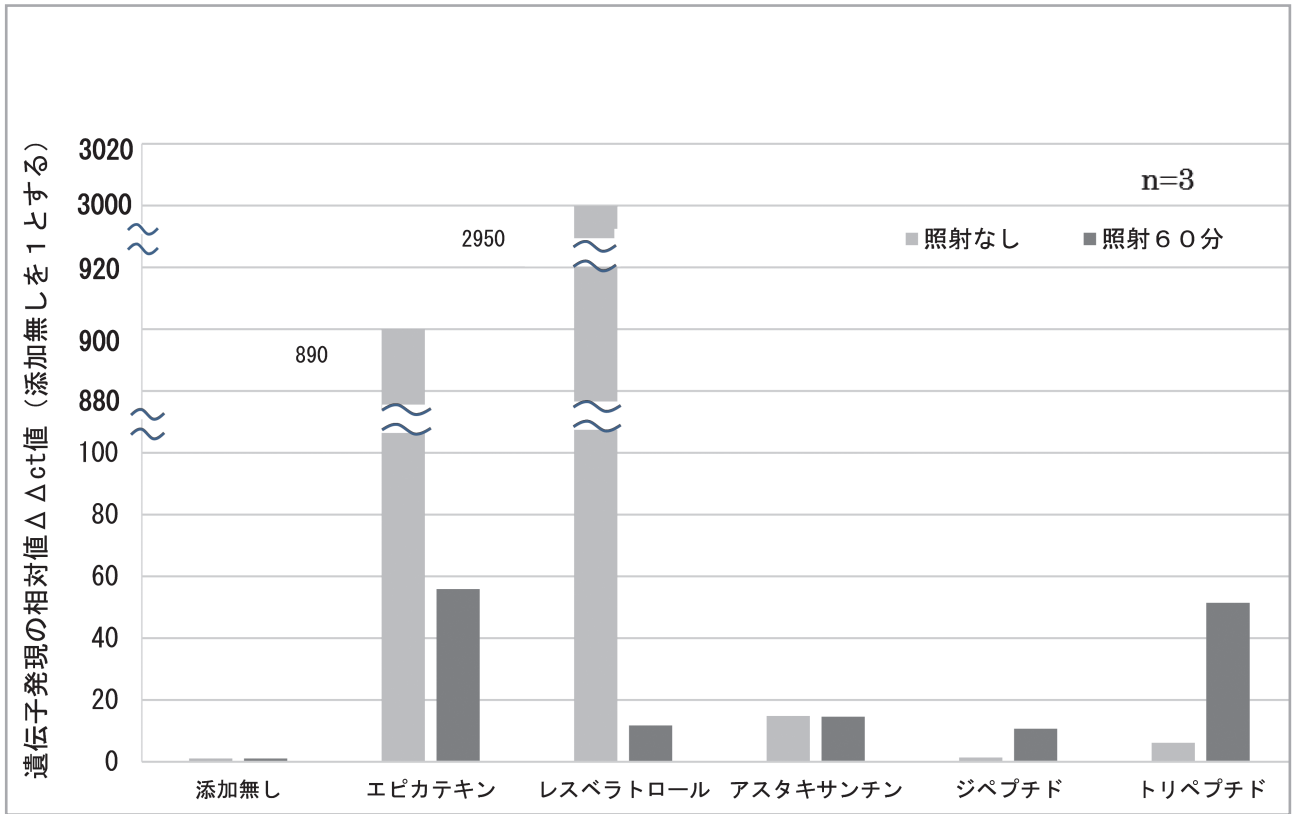


図6. Collagen II 遺伝子の発現 (機能性成分添加後 9 日目の細胞) 機能性成分添加なしを 1 として比較検討
 ■照射なし ■照射 60 分

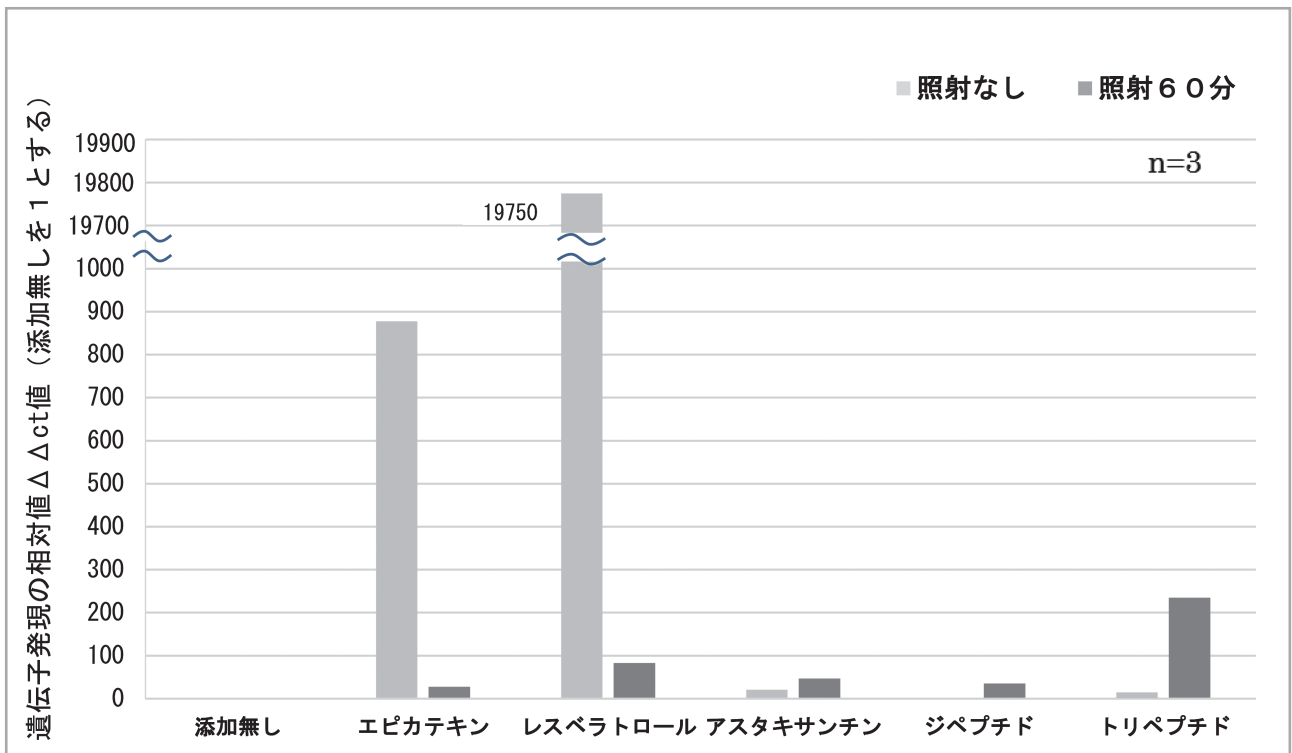


図7. Collagenase 遺伝子の発現 (機能性成分添加後 9 日目の細胞) 機能性成分添加なしを 1 として比較検討
 ■照射なし ■照射 60 分

スベラトロールに比べればその程度は弱いですが、添加なしに比べて遺伝子発現が増加していることが観察された。

4. 考察

今回の結果では、機能性成分を添加していない線維芽細胞から培地内へのコラーゲン分泌を見ると、照射時間が長くなるに従って、コラーゲン分泌量の減少の傾向がみられており、他の研究などでも報告されているように¹⁰⁾、UV 照射の影響を強く受けることが確認された。また、短い照射 (30 分、60 分) では、培養日数が増えるに従ってコラーゲンの分泌量が増加の傾向にあるが、長時間 (120 分) では分泌量の増加がないことから、傷害が強くなると回復がみられなくなると推測される。レスベラトロールに関する研究では、レスベラトロールの collagenase との関係性を述べた報告が多くみられる。照射なしでレスベラトロールを添加すると collagenase の働きを抑制するという研究結果¹¹⁾¹²⁾や、炎症性及び老化のバイオマーカーを有意に抑制する働きがあるという研究結果⁷⁾がある。また、UV を照射した実験で、レスベラトロールは collagenase 遺伝子の発現を減少させ、UV 照射後のコラーゲンの分解を防止する可能性があるという研究結果の報告などがある¹³⁾。本研究の結果とは多少違った結果の報告がなされているようだが、本研究では、培養液中へのコラーゲンの分泌量は照射後の培養日数が少ない方がレスベラトロール添加の影響を受けやすく、一方、線維芽細胞内コラーゲンは著しい抑制がみられたことから、細胞から活発に産生しているのではないかと推測される。遺伝子の発現については、照射なしにおいて collagen I、collagen II の遺伝子発現にも、レスベラトロールによる増加がみられることから、産生の増加があるものの、それを上回る分泌が行われているのではないかと推測される。また、collagenase の遺伝子発現の増加もみられるので、代謝回転が活発になっている可能性も示唆された。

トリペプチド¹⁴⁾の添加では、ヒト皮膚線維芽細胞においてヒアルロン酸の合成を促進するという報告があるが¹⁵⁾、今回の研究では、コラーゲンにも分泌増加がみられ、UV 照射の時間が長くなるに従い、さらにコラーゲン分泌が増加しているため、トリペプチドには結合組織の合成に種々の影響を与える可能性があるのではないかと考えられる。

カテキン類に関しては、紫外線誘発 DNA 損傷を修復する能力を亢進させるとの研究発表¹⁶⁾や、紫外線から保護する働きがあるという研究¹⁷⁾、そして酸化ストレスによる線維芽細胞の細胞死を抑制する作用があるという研究発表がある¹⁸⁾が、今回の研究では、むしろ紫外線照射なしにおいてエピカテキンによりコラーゲン分泌、

collagen 遺伝子の発現の増加がみられ、紫外線照射に対する修復とは関係がない、コラーゲンの合成や分解に対する直接の反応に効果があるかもしれないと考えられる。

今回用いたいくつかの機能性成分について、紫外線照射細胞傷害モデルにおいてある程度の効果が認められたが、サンプル数が少なく、MTT による細胞傷害の検討も行っていないので、確定的な見解とすることはできない。今後、実験系の検討を重ねての詳細な解析が必要と考える。

謝辞

本研究はタケダリサーチサポート TKDS 2017063018 と学内研究助成 2018 No.5 のご支援を賜り、深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 市橋 正光：皮膚光老化・光老化の概要、Functional Food, 2 (4) : 345-352 (2009)
- 2) 錦織 千佳子：紫外線と光防御、美容皮膚科学 (日本美容皮膚科学会、南山堂) : 31-39 (2009)
- 3) Chen B, Li R, Yan N, Chen G, Qian W, Jiang HL, Ji C, Bi ZG: Abstragaloside IV controls collagen reduction in photoaging skin by improving transforming growth factor- β /Smad signaling suppression and inhibiting matrix metalloproteinase-1, Mol Med Rep, 5: 3344-3348 (2015)
- 4) 金 辰也、内藤裕二、吉川敏一：紫外線障害に対する機能性食品因子の影響、Functional Food, 2 (4): 374-382 (2009)
- 5) Gupata R, Dixon KM, Deo SS, Holliday CJ, Slater M, Halliday GM, Reeve VE, Mason RS.: Photoprotection by 1.25 di-hydroxyvitamin D3 is associated with an increase in p 53 and a decrease in nitric oxide products, J Invest Dermatol, 127: 707-715 (2006)
- 6) Heinrich U, Moore CE, De Spirt S, Tronnier H, Stahl W: Green tea polyphenols provide photoprotection, increase micro-circulation and modulate skin properties of women, J Nutr, 141 (6): 1202-1208 (2011)
- 7) Edwin D Lephart, John M Sommerfelt, Merritt, B Andrus: Resveratrol influences on gene expression in human skin, Journal of Function Foods, 10: 342-377 (2014)
- 8) Nakajima H, Fukazawa K, Wakabayashi Y, Wakamatsu K, Senda K, Imokawa G: Abrogating effect of a xanthophyll carotenoid astaxanthin on the stem cell factor induced stimulation of human epidermal pigmentation, Arch Dermal Res, 304 (10) : 803-816 (2012)
- 9) 酒井康夫：皮膚浸透性コラーゲン・トリペプチドの機

- 能性と有用性、日本写真会誌、67 (4) : 397-401 (2004)
- 10) Nakyai W , Tissot M, Humbert P, Grandmottet F , Viyoch J, Viennet C: Effects of Repeated UVA Irradiation on Human Skin Fibroblasts Embedded in 3D Tense Collagen Matrix , *Photochem Photobiol* , 94 (4) : 715-724 (2018)
 - 11) Giardina S , Michelotti A , Zavattini G , Finzi S , Ghisalberti C , Marzatico F: Efficacy study in vitro: assessment of the properties of resveratrol and resveratrol + N-acetyl-cysteine on proliferation and inhibition of collagen activity, *Minerva Ginecol*, 62 (3) : 195-201 (2010)
 - 12) Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, deCabo R, Sinclair DA : Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* , 444 (7117) : 337-342 (2006)
 - 13) Lee JS, Park KY , Min HG, Lee SJ, Kim JJ, Choi JS, Kim WS, Cha HJ: Negative regulation of stress-induced matrix metalloproteinase-9 by Sirt1 in skin tissue, *Experimental dermatology*, 19 (12) : 1060-1066 (2010)
 - 14) Ohara H, Matsumoto H , Ito K, Sato K e: Comparison of quantity and structures of hydroxyproline , containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolystates from different sources , *Agricultural and Food Chemistry*, 55 : 1532-1535 (2007)
 - 15) Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, Akiyama M, Fujimoto N, Kobayashi T, Tajima S: Collagen derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts, *Journal of Dermatology*, 37: 330-338 (2010)
 - 16) Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A: Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan , *Nature* ,425: 191-196 (2003)
 - 17) 山田 秀和 : 皮膚老化の評価、*Functional Food*, 2 (4) : 367-373 (2009)
 - 18) 金澤成行 : ポリフェノールの皮膚における抗老化作用の検討、三島海雲記念財団研究報告書 : 1-5 (2012)