博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

及 び

審査の結果の要旨

第 17 集

令和２年度
（2020 年度）

実 践 女 子 大 学

は　し　が　き

本篇は、学位規則（昭和２８年４月１日文部省令第９号）第８条による公表を目的として、平成２８年３月２０日本学において学位を授与した者の、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を収録したものである。

学位記番号に付した甲は、学位規則第４条第１項（いわゆる課程博士）によるものであることを示す。

目　　次

課程の修了によるもの（課程博士）

甲第10号　博士(食物栄養学)　青　木　敦　子　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

食品の機能性成分が老化に与える影響
Resveratrol および Epigallocatechin Gallate が紫外線照射
ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン・エラスチン産生に及ぼす影響

課程の修了によるもの

（課程博士）

氏名（本籍）	青木（あおき）　敦子（あつこ）（宮城県）
学位の種類	博士（食物栄養学）
学位記番号	甲第 10 号
学位所授与年月日	令和 3 年 3 月 2 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項　該当
論　文　題　目	食品の機能性成分が老化に与える影響 Resveratrol および Epigallocatechin Gallate が紫外線照射ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン・エラスチン産生に及ぼす影響
論文審査委員	主査　教授　松　島　照　彦 副査　教授　山　﨑　　壮 副査　教授　中　村　彰　男

博 士 論 文 要 旨

題目

食品の機能性成分が老化に与える影響

Resveratrol および Epigallocatechin Gallate が紫外線照射
ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン・エラスチン産生に及ぼす影響の解析

【目的】食品の機能性成分が皮膚老化に与える影響を解析することを目的とし、老化の細胞障害モデルとして、ヒト皮膚線維芽細胞に紫外線を照射し、コラーゲン、エラスチン産生を観察した。全コラーゲンの 9 割を占める *Collagen I* やコラーゲン代謝を調整し、真皮のコラーゲン合成に関する老化制御を行う老化関連遺伝子の *Sirtuin VI* を測定対象とし、遺伝子レベルで検討した。また AGEs の 1 種で、糖化コラーゲン中の酸化によってコラーゲンに特異的に生成され、蓄積されるカルボキシメチルアルギニン（CMA）や無秩序な架橋性 AGEs の形成により加齢に伴う皮膚コラーゲンへ蓄積の指標となるペントシジン、長期的な酸化ストレスによる皮膚コラーゲンへの蓄積の指標となるカルボキシメチルリジン（CML）を測定し、検討した。

【方法】培養ヒト皮膚線維芽細胞 305M に紫外線 A 波（UVA）350nm，強度 832.5μW/cm^{2}で照射後、αMEM 培地にレスベラトロール(Res) 、エピガロカテキンガレート(EGCG）を 50、100、150μM の終濃度で 3 日置きに添加し、 5% CO_2、37℃で培養した。コラーゲン分泌量は、Sircol assay kit を使用し、PEG 沈殿を行なった後、シリウスレッド溶液で染色し、酸洗浄、アルカリ抽出を行なった。エラスチン分泌量は、α-エラスチンへ変換後、Fastin Elastin assay kit を使用し、 TPPS 色素結合、濃縮、溶出を行った。細胞膜連結型のコラーゲン蓄積量は、 Bouin's 液で固定し、シリウスレッド溶液で染色し、酸洗浄、アルカリ抽出を行なった。それぞれ吸光度 550nm で比色定量を行なった。

UVA 照射および機能性成分添加による細胞の傷害性および生細胞数は Cell Counting Kit-8 を用いて測定し、培地中へのコラーゲン分泌量、エラスチン分泌量、細胞膜連結型コラーゲン量の測定結果については、対照（無添加）群との比較においては対照群に対する生細胞数により補正を行なった。

遺伝子転写活性の測定では、total RNA に逆転写酵素を加えて cDNA を作成し、リアルタイム PCR で遺伝子発現を観察した。

コラーゲン中の CMA 糖化反応測定は、collagen AGEs Assay kit を使用して、コラーゲン固定化プレートにアミノグアニジン、Res 、EGCG 、クルクミン、ロズマリン酸、ショウガオールを添加し、37℃ で 7 日間静置し、糖化反応を行った。ブロッ

キングバッファー、一次抗体、二次抗体、発色液、停止液を添加し、吸光度 450nm で比色定量を行なった。

ウエスタンブロッティングによる測定では、SDS で処理したサンプルを添加して細胞培養培地およびコラーゲン溶液（ウシ、ラット、標準)）を 4-15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF メンブレンに転写した。1% BSA/Tween-PBS または 5%スキムミルク/Tween-PBS でブロッキング処理後、一次抗体（500 倍希釈抗ペントシジン抗体、抗コラーゲン抗体、抗 CML 抗体)、および HRP 標識二次抗体と反応させ、化学発光検出試薬をマウント後、Odyssey Fc を用いて測定した。

【結果】添加なし、Res EGCG の添加において、培地中に分泌されたコラーゲン分泌量は、UVA 照射後に減少がみられた。Res の添加後 3 日目の 150 μ mol/L 以外で有意な増加がみられ、低濃度になるに従って増加の傾向がみられた。 EGCG の添加では、UVA 照射なしでは、添加後 9 日目に 50 μ mol/L で有意な減少がみられ 150 μ mol/L で有意な増加がみられた。添加後 3 日目の 50、150 μ mol/L と UVA 照射後の添加後 9 日目に有意な増加がみられた。

Res および EGCG の添加において、UVA 照射後にコラーゲン蓄積量の減少がみられた。 Res の添加では、 UVA 照射なしの細胞では、有意な増加がみられ、 UVA 照射後の細胞では、 50 μmol/L の添加において、有意な増加がみられた。 EGCG の添加では、UVA 照射なしの細胞で、有意な増加がみられた。

Res および EGCG の添加では、9 日目に培地中への分泌量の減少がみられた。Res の添加では、 UVA 照射の有無にかかわらず 添加後 9 日目に有意な増加がみられ、 UVA 照射後の 添加後 3 日目に有意な減少がみられた。 EGCG の添加において、添加後 9 日目においても有意な増加がみられた。

UVA 照射なしの *Collagen I* 、 *Collagenase* 遺伝子発現では、 Res の 100 、150 μ mol/L 、EGCG の 150 μ mol/L の添加において、*Collagen I* 遺伝子の転写の亢進が顕著にみられた。 UVA 照射後においては、EGCG の 50 μ mol/L の添加を除いて *Collagenase* 遺伝子発現の亢進がより顕著にみられた。 *Elastin* 遺伝子発現では、 UVA 照射なしの Res の 100 、150 μ mol/L 、 EGCG の 150 μ mol/L の添加において、顕著な亢進がみられた。UVA 照射後においては、EGCG の 150 μ mol/L の添加以外では、顕著な発現はみられなかった。 Res および EGCG の添加により老化関連遺伝子の *SirtuinVI* 遺伝子発現の亢進がみられ、高濃度の添加において顕著であった。

添加なしと比較すると、Res、クルクミン、ロズマリン酸、ショウガオールの添加により、CMA 産生の抑制がみられた。全ての機能性成分の添加において、添加濃度が高くなるに従って、CMA 産生の減少がみられた。

Res、EGCG の添加において、対照（添加なし）と比べると全ての添加濃度においてペントシジン、CML 蓄積量が減少しており、抑制がみられた。また、添加濃度が高くなるに

従って、減少がみられた。

【考察】

培地中へのコラーゲン、およびにエラスチン分泌量、線維芽細胞膜連結型のコラーゲン蓄積量は、 UVA 照射により減少しており、紫外線の影響を強く受けることが確認された。

Res の添加による *Collagenase* の発現の変化を *Collagen I* と比較すると 、UVA (-) では亢進が顕著であったが UVA 照射後においては、*Collagenase* の発現の亢進が顕著であった。 UVA 照射後は、傷害されたコラーゲン分子を除去するために、分解が活発化していることが示唆された。培地中のコラーゲン分泌量の増加が抑制されているのは傷害初期においてさらに分解が亢進している可能性があると考えられる。

線維芽細胞膜結合型コラーゲン蓄積量は、UVA (-) の細胞では、分泌を上回る合成が行われ、照射後の細胞では、合成が亢進したのと同程度に細胞外への分泌も亢進したために、結合して残る量に変化が無かったのではないかと考えられる。

遺伝子発現において UVA 照射後の EGCG を除いた *Collagen I* 、*Collagenase* 、UVA 照射(-) の *Elastin* および *SirtuinVI* では、Res と EGCG の添加が高濃度になるほど亢進がみられた。

UVA(-)において EGCG の添加により、*Collagen I* の遺伝子発現の亢進および、*Collagenase* の遺伝子発現の亢進は、高濃度になるに従って顕著になっており、合成およびに分解が活発化している可能性が示唆された。

エラスチンにおいては、培地中への分泌、遺伝子発現共に同じ傾向にあり、高濃度において顕著に増加、亢進がみられた。照射後の細胞において EGCG 添加による遺伝子発現の亢進は顕著ではないにもかかわらず、培地中のエラスチン量は照射をしない細胞と同程度に増加している。エラスチンと同様に *SirtuinVI* においても UVA (-) では、高濃度において顕著に亢進する傾向がみられた。Res , EGCG は *SirtuinVI* の遺伝子発現を亢進しており、Res, EGCG によるコラーゲン分泌の増加は、 *Collagen I* 遺伝子の発現亢進とともに、*SirtuinVI* の発現亢進を介している可能性も考えられる。

クルクミン、ロズマリン酸、ショウガオールなど糖化抑制作用など報告されており、今回、Res による CMA 生成阻害活性がこれらと同程度であることから、Res の添加においても、抑制及び生成阻害活性の効果が期待できるのではないかと推測される。またウエスタンブロッティングによるペントシジン、CML の測定結果から、EGCG および Res の添加において、AGEs 産生抑制および老化架橋形成抑制の可能性があるのではないかと示唆された。またコラーゲンの測定では、Res, EGCG ともに添加濃度が高くなるにしたって増加しており、Res 及び EGCG の添加により、糖化抑制を通じて、コラーゲンの分泌量が増えることも示唆される。

令和 2 年度　食物栄養学専攻　博士後期課程（博士）論文

審査結果の要旨

氏　名　青木敦子

論文名　食品の機能性成分が老化に与える影響

Resveratrol および Epigallocatechin Gallate が紫外線照射ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン・エラスチン産生に及ぼす影響の解析.

老化現象の中で皮膚の老化は体表からの視認も可能であり、加齢による変化のほか、紫外線 A 波によりコラーゲン、エラスチンの線維が切断され、また活性酸素種を産生し、タンパク質のカルボニル化を促進して過剰架橋を形成させることにより、その弾力性、強靭性が失われることが知られている。近年、食品の機能性成分について皮膚のしわに対する効果が経皮吸収的に認められたものはあるが、、紫外線による傷害に対する影響や細胞生物学的、生化学的な作用メカニズムを解析した報告は極めて少ない。

青木敦子氏は紫外線照射をしたヒト皮膚線維芽細胞を老化モデルとし、これに種々の食品の機能性成分を添加し、細胞外マトリクスタンパク質の代謝回転とそれらの遺伝子発現、および老化関連遺伝子の発現を観察し、またグルコースを添加して孵置することにより糖化に与える影響を観察している。青木敦子氏は、この研究を通じ、紫外線 A 波の照射により、コラーゲン・エラスチン分泌量及び細胞膜連結型コラーゲン蓄積量は照射時間に依存して減少が見られたが、resveratrol、epigallocatechin gallate の添加により collagen、elastin の分泌量に増加傾向が見られること、また *Collagen I* 遺伝子の発現が増加すること、また糖化産物であるペントシジンの生成が減少することを明らかにした。

これまで報告された研究は組織学的解析が主体であるが、青木敦子氏の研究は、食品に含まれる機能性成分が、紫外線による皮膚の老化を抑制することをタンパク質レベルと遺伝子発現レベルの解析を主体として解析して明らかにしたこれまで例がない研究であり、皮膚科学、抗老化研究における臨床栄養学的意義は大きい。また、本研究は *in vitro* 系として基礎を築いたものであり、経皮、経口投与により有効な低分子化合物開発のシーズとなりうる研究である。

以上の観点から、本研究は博士後期課程（博士）論文として合格であり、学位の授与に値すると判定した。

博士学位論文　内容の要旨及び審査の結果の要旨　第 17 集　令和 3 年度

2021 年　4 月　1 日

編集・発行　　実 践 女 子 大 学 大 学 院
東京都日野市大坂上４－１－１
〒191-8510　Tel 042(585)8817

機関リポジトリにより公表