

令和2年度（2020）博士論文

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

実践女子大学大学院

生活科学研究科 食物栄養学専攻

青木 敦子

目次

第 1 章 略語

第 2 章 要旨

第 3 章 序論

3-1. 皮膚の構造と老化

3-2. コラーゲン

3-3. エラスチン

3-4. 架橋

3-5. 糖化

3-6. サーチュイン

3-7. テロメア

3-8. Resveratrol

3-9. Epigallocatechin gallate

第 4 章 実験方法

第 5 章 実験結果

第 6 章 考察

第 7 章 参考文献

謝辞

第 1 章 略語

| | |
|---------|---|
| AGEs | : Advanced Glycation end Products |
| CD 36 | : Cluster of Differentiation 36 |
| CMA | : Carboxy Methyl Arginine |
| CML | : N ^ε -(Carboxy Methyl) Lysine |
| CR | : Caloric Restriction |
| αMEM | : Alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium |
| ECM | : ExtraCellular Matrix |
| EGCG | : Epigallo Catechin Gallate |
| ERC | : ExtraChromosomal rDNA circle |
| FAD | : Flavin Adenine Dinucleotide |
| FBS | : Fetal Bovine Serum |
| FGF | : Fibroblast Growth Factor |
| FOXO | : Forkhead Box Protein |
| GDH | : Glutamate Dehydrogenase |
| GO | : Glyoxal |
| HAT | : Histone Acetyltransferase |
| HDAC | : Histone Deacetylase |
| Hyl | : Hydroxy Lysine |
| Hyp | : HydroxyProline |
| IL-1/-6 | : InterLeukin-1/-6 |
| LOX-1 | : Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 |
| LTBP-4 | : Latent TGF-β Binding Protein 4 |
| LTQ | : Lysine Tyrosyl Quinone |
| MFAP-4 | : Micro Fibril-Lar-Associated Protein 4 |
| MGO | : Methyl Glyoxal |
| MMP | : Matrix Metallo Proteinase |
| NAD | : Nicotinamide Adenine Dinucleotide |
| NAMPT | : Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase |
| NFκB | : Nuclear Factor-kappa B |
| NMN | : Nicotinamide Mono Nucleotide |

| | |
|---------------|--|
| NMNAT | : Nicotinamide Mononucleotide Adenylyl Transferase |
| Pen Strep | : Penicillin Streptomycin |
| PEPCK 1 | : Phosphoenol Pyruvate Carboxy Kinase 1 |
| PBS | : Phosphate Bufferd Saline |
| RAGE | : Receptor AGEs |
| Res | : Resveratrol |
| SR | : Scavenger Receptor |
| TGF- β | : Transforming Growth Factor- β |
| TIMP | : Tissue Inhibitor or MetalloProtease |
| TNF- α | : Tumor Necrosis Factor- α |
| UV | : Ultra Violet |
| 3-DG | : 3-Deoxy Glucosone |
| 8OHdG | : 8-oxo-2'-deoxogunosine |

第 2 章 要旨

【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て、紫外線照射ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン、エラスチン産生を観察し、作用機序を遺伝子レベルで検討した。

【方法】

培養ヒト皮膚線維芽細胞 305M に紫外線 A 波 (UVA) を照射後、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) を加えて培養し、コラーゲン、エラスチン分泌、細胞膜連結型のコラーゲン蓄積を測定し、関連する遺伝子の発現を観察した。また、コラーゲン中の CMA 糖化反応やウエスタンブロッティングによるペントシジン生成、CML 生成、コラーゲン生成に及ぼす影響、及びに Res, EGCG 添加による抗酸化能の測定を行った。

【結果】

UVA 照射後の細胞において、Res および EGCG の添加は、培地中へのコラーゲン、エラスチン分泌量を増加させた。Res 添加によるコラーゲン分泌は濃度依存的な減少であった。また、*Collagen I* 遺伝子、*Collagenase* 遺伝子の発現の亢進がみられた。UVA を照射しない細胞では、Res の添加により *Collagen I* 遺伝子、*Elastin* 遺伝子、*Sirtuin VI* 遺伝子発現の亢進がみられた。コラーゲン中の CMA 糖化反応の測定では、Res の添加では全ての濃度において抑制がみられたが、EGCG の添加では、1.0 mmol/L 以上の濃度添加により、コントロールと比較して抑制がみられた。ウエスタンブロッティングにおいては、ペントシジン、CML 生成では、添加濃度が高くなるに従って減少がみられたが、コラーゲン生成では、添加濃度が高くなるに従って増加がみられた。

抗酸化能の測定においては、添加濃度が高くなるに従って増加がみられた。

【考察】

Res 及び EGCG の添加により、培地中へのコラーゲン・エラスチン分泌量は、照射の有無にかかわらず、対照の (添加なし) と比較して、増加の傾向がみられた。遺伝子発現においては、*collagen I*、*collagenase* 遺伝子発現は亢進しており、皮膚基質の代謝回転が亢進し、皮膚基質の合成・分解双方が活発に行われる事によって、紫外線による傷害からの修復の促進し、光老化を抑制できるのではないかと推測される。

また、コラーゲンの糖化の指標となる CMA の抑制、ペントシジン、CML 生成の抑制及びに酸化抑制効果がみられた事から、Res 及び EGCG の添加により、皮膚老化抑制に影響を与える可能性が示唆された。

第 3 章 序論

老化は、普遍性、進行性、有害性、内在性という 4 つの特徴があるとされている。高齢化社会において老化による種々の現象は社会的な問題になっているが、成熟期以後に起こる各臓器の形態および生体機能の低下は、加齢とともに進行し、避けられない自然現象である¹⁾。その原因は、おもに内因性であると考えられているが、老化や寿命は生活習慣などの環境要因にも大きく影響を受け、その中でも外因性老化を引き起こす原因の 1 つに、慢性的な紫外線曝露により誘発される遺伝子変異や活性酸素種を生じる光老化があり、自然老化の進行を加速させ、皮膚に大きな影響を及ぼし²⁾³⁾、老化に関連した遺伝子に与える要因も報告されている⁴⁾。

皮膚は、生体内部と外環境の境界に位置し、常に爆されている臓器であり、様々な環境因子に対応し、恒常性を維持している。

加齢に伴い、皮膚の外観的な特徴には、皮膚に発現される老化現象の形態変化として、しわ、しみ、たるみなどがある。しわ、たるみの原因には、真皮構成成分の変化が、しみの原因には、表皮構成成分の変化が大きく影響していると言われている。成熟期を過ぎると、表皮では、角化細胞の活動が弱まり、ターンオーバーが遅くなり、表皮のバリア機能が低下し、乾燥、硬化して菲薄化し、皮膚の強度が低下すると言われている。

真皮の結合組織の主要なタンパク質である膠原線維(コラーゲン)および弾力線維(エラスチン)は、線維芽細胞によって生成され、皮膚の恒常性を維持しているが、紫外線 A 波 (以下 UVA) の影響を受けると線維芽細胞の合成、分泌の能力が低下し、コラーゲンやエラスチン量に変化し、分解酵素によって、切断、伸長など真皮のマトリックス構造に変性がおこり⁵⁾、強靱性および弾力性が失われ、皮膚の老化に影響することが知られている²⁾³⁾⁶⁾⁷⁾。紫外線は基本的に表皮と真皮の内因性老化を加速する。

これまで、機能性成分が線維芽細胞のコラーゲン合成に与える影響⁸⁾や 紫外線曝露による皮膚疾患に対する保護効果⁹⁾や線維芽細胞に機能性成分を添加時の UVA 照射後のコラーゲン合成への影響¹⁰⁾、細胞傷害が予防、抑制されたとする報告がある⁵⁾¹¹⁾が、いずれも知見は極めて少なく、ヒト皮膚線維芽細胞の UVA 紫外線照射下における機能性成分があたえる影響について、コラーゲン・エラスチンなどを細胞の基質タンパク質の合成、分泌、蓄積機能に与える影響や遺伝子発現、および老化遺伝子に与える影響を合わせての研究は少ないことから、検討を行い、分析する事を計画した。

芳香環 1 個に 2 個以上のフェノール性水酸基を有する化合物をポリフェノール (polyphenol) といい、分子内に複数のフェノール性ヒドロキシ基 (ベンゼン環、ナフ

タレン環などの芳香環に結合したヒドロキシ基)をもつ植物成分の総称であり、ほとんどの植物に含有され、その種類は 300 種類以上と言われている。光合成によってできる植物の色素や苦み成分であり、植物細胞の生成、活性化などを助ける働きを持つとされており、強い抗酸化作用があり、様々な分野において可能性があるのではないかと近年注目されている成分である。

我々は、先にマウス胚線維芽細胞を用いて培養し、網羅的にポリフェノールである機能性成分を添加して実験を行った結果、中でも特にレスベラトロール (Res) やカテキンの添加による著しい効果をみる事ができた。培地中へのコラーゲン分泌量においては、Res の添加により照射なしで増加がみられ、カテキン添加では、照射後に増加がみられた。また *Collagen I・II*、*Collagenase*、*Elastin* の遺伝子発現の亢進がみられ、さらに老化関連遺伝子についても検討を進め、*Igf3* や *Cdkn2a* 遺伝子などの著しい亢進を確認した。これらのことから、Res およびカテキンの添加により、分解双方の代謝回転が活発に行われており、一部遺伝子発現レベルでの機序も解析しえた研究結果を報告した¹²⁾。それを受けて、本研究では、より老化現象を反映できる老化の細胞障害モデルとして紫外線を照射したヒト成人の皮膚線維芽細胞株を用いる¹³⁾こととし、*in vitro* 培養系のヒト皮膚線維芽細胞 305M に皮膚の真皮に到達しうる UVA を照射して実験を行った。さらに、食品の機能性成分である エピガロカテキンガレート (EGCG)、Res を培地中に加えて、その効果を検討した。

皮膚の老化と深くかかわるコラーゲンおよびエラスチンの分泌量とそれらの遺伝子発現への影響を観察することで UVA 照射や機能性成分等の添加による老化への影響を検討した。

遺伝子としては、全コラーゲンの 9 割を占める *Collagen I* を測定した。また *Sirtuin* として知られる酵素ファミリーの中で、出芽酵母の *Sir 2* および哺乳類の *SIRT 1* はレスベラトロールにより活性化されるとする数多くの報告がある¹⁴⁾。一方、*Sirtuin VI* は真皮のコラーゲン代謝を調整し¹⁵⁾、全身の老化や皮膚のコラーゲンに関係していることが知られている。また、テロメア維持と細胞老化の制御、DNA 修復、および代謝制御など酵母 *Sir 2* (*SIRT 1*) と類似した機能を保持しており、転写制御にも関与していることが明らかになっている¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。*Sir 2* と Res との関連性に関する多くの研究報告がある中、*Sirtuin VI* との関連性を記した報告はされていない。そこで本研究では、老化関連遺伝子である *Sirtuin VI* を測定対象とした。

アミノ基とカルボニル基の間で非酵素的に結合する糖化反応 (メイラード反応) によ

って糖修飾および酸化を受けることによって生じる生体化学反応生成物である AGEs (advanced glycation endproducts: 最終糖化反応生成物) は、体内の細胞や分子に影響を与え、加齢の一因であり、加齢性疾患の原因であると考えられている。

CMA (カルボキシルメチルアルギニン) は GO (グリオキサール) を中間体としてアルギニン残基から生成する非蛍光性・非架橋性 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、生体コラーゲンに AGEs が蓄積すると、コラーゲンの変性に伴って、線維芽細胞にも悪影響を及ぼし、皮膚老化の要因にもなると言われている。

そこで、コラーゲンを GO で糖化させ、生成された CMA に糖化反応を阻害するアミノグアニジンと EGCG、Res を加えて測定し、検討した。

また、コラーゲンやエラスチンなどのタンパク質は、半減期が長いいため糖化の影響を受けやすく、組織形成過程にリシンやヒドロキシリシン残基を介した線維架橋を形成する一方、ペントシジンなどの架橋性 AGEs の生成蓄積は、無秩序なタンパク質架橋の形成により、タンパク質を変化させ、皮膚コラーゲン中に存在し、加齢と共に増加し、はり、弾力の低下など物理的な要因を引き起こすと言われており、ペントシジンは加齢に伴う皮膚コラーゲンへの蓄積などの指標となると言われている。

また CML (カルボキシメチルリシン) は、生体内で形成される AGEs の中で最も多く存在することが報告されており、皮膚蓄積性 AGEs の代表である。加齢に伴う皮膚コラーゲンへの蓄積など、長期的な酸化ストレス蓄積の指標となり、CML は、コラーゲンのリシン残基を修飾し、コラーゲンの架橋形成を傷害すると考えられている。

そのことから、添加後 9 日目 Day 13 の回収した培地を使って、ウエスタンブロットティングにより機能性成分を添加したコラーゲンとコラーゲン中に蓄積したペントシジン、CML を測定し、検討した。

研究において、関連する機能の機序、生理作用、作用メカニズムなどを知ることにより、理解を深め、研究の意義を見出すために、まずは研究報告の前にまとめたことを記載することとした。

3-1. 皮膚の構造と老化

【皮膚の構造】

ヒトの体全体を覆う皮膚は、生体内部と外環境の境界に位置し、常に環境因子に曝露されており、身体の中で最も広い面積を有しており、成人では、面積が 1.6 m²、重量は体重の約 8% であり、複雑な仕組みを持ち、体を健康に保つ上で重要な働きをしている人体で最大の臓器である。皮膚がおかれた環境から、外の環境に由来する様々な刺激に対応し、物理的な隔壁バリアとして働く事により恒常性を維持している。また、感染に対する免疫機能を有し、外界と直接触れるため、水分の喪失や透過を防ぐ一方、体温を調節し、微生物や物理化学的な刺激から生体を守るなど感覚器としての役割を果たすなど生命を維持するための必要不可欠な様々な機能を持っている。

皮膚は外側から順に「表皮(epidermis)」「真皮(dermis)」「皮下組織(subcutis)」の3層から構成されている。さらに表皮は下層から「基底層」「有棘層」「顆粒層」「角質層」と4層構造に分けられ、真皮は、基底膜直下から深層に向けて、乳頭層、乳頭下層、網状層に分かれており、網状層の方がより線維成分が密な結合組織である。

ひとつの臓器や器官、細胞が唯一の機能を果たすことはなく、様々な局面や条件下で、他の器官等と相互に作用しあい、多彩な機能を果たしている。

皮膚には、1 cm² あたり 100 の汗腺、100 の毛包、20 の皮脂線、毛髪(毛)、爪、などの特別な構造と働きをもち、これらは皮膚付属器と一括して呼ばれており、表皮が形を変えたものである¹⁹⁾。

表皮と真皮の境は、波形になっており、そのため表皮が真皮に向かって突起状に入りこんでいる部分があり、表皮突起と呼ばれている。しかし、この波形も年を取るにつれて表皮と真皮の境は平らになって目立たなくなっていく。これは皮膚が横に引っ張られたとき、それをのばして、皮膚の伸展に応じることができるようにするためである。

皮下組織は、脂肪を貯蔵することで組織容積を拡大し、その結果、内臓諸臓器と外界との空間的な距離を確保する組織であると言える。

皮膚の構造

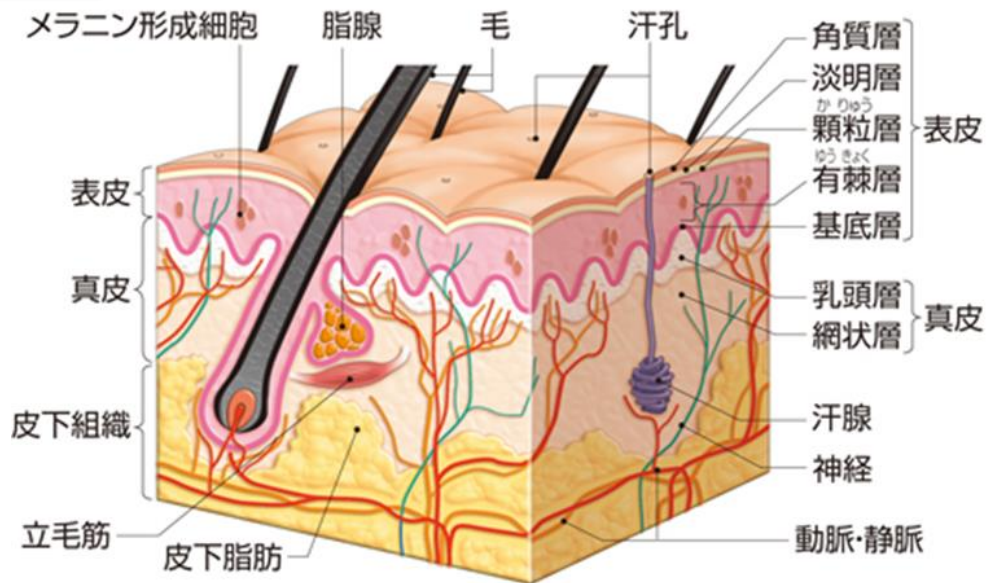


図 1. 皮膚の構造

ilusip.blogspot.com

《表皮》

表皮は、密な角層（無核の死んだ細胞層）を形成して、内側の生きた細胞群を外界から隔離するための境界面を形成する組織であり、表皮を構成する細胞は約 95% がケラチノサイト（角化細胞）であり、外界からの保護や創閉鎖に関与している。残りの約 5% はメラニンを生成し、ケラチノサイトへ移送するメラノサイト（色素細胞）、皮膚の免疫に関与するランゲルハンス細胞、知覚反応に関与するメルケル細胞である。最下層の基底層には、基底細胞（角化細胞の仲間）と色素細胞とメルケル細胞が存在する。

この角化細胞は表皮の最下層で分裂し、成熟するに伴い、上方の層へ移行していく。基底層で表皮の角化細胞が新しくつくられ、基底層でつくられた角化細胞は、次につくられる新しい細胞に押し上げられるように皮膚の表面に向かって移動していき、次々に形を変えて、基底層→有棘層→顆粒層→角質層の細胞に変わっていき、最後に角質層の表面から角片として剥がれ落ちる。

角質層は角化細胞により形成され、皮膚の最外層として外界と直に接し、水分の蒸発や異物の侵入、紫外線などの外的環境から、人体を防御する重要な機能を有している。

最下層の基底層で分裂した表皮角化細胞は、分化を誘導する多種の遺伝子の働きにより、外方に向かうと遺伝子発現を変え、最外層での重要なバリア機能を発揮するための準備を進める。

表皮バリア機能の 1 つは水分保持であり、顆粒層で大量に生成されるフィラグリントンパク質が角層に移行する際に分解され、アミノ酸となり、尿素などととともに角層細

胞内の水分保持に働く。さらに角層細胞間には水を通さないリン脂質セラミド、コレステロール、脂肪酸により構成される脂質が存在する。これらの構造から表皮は、内から外への水分の喪失を防ぐと同時に外環境から体内への水溶性物質の侵入、分子サイズが大きい物質の侵入防止の機構を備えている。表皮ではさらに、角化細胞から生成、分泌されるヒアルロン酸も水分保持に働いている。

皮膚色とは、表面での反射光と組織内で修飾をうけて出てきた光との総和で、皮膚色に関わる主要因は表皮にあり、角質細胞層の表面形状・厚さ・含水量・細胞間接着の状態、表皮構成細胞が含む食事由来の色素（カロテンなど）、および表皮組織中に含まれるメラニン色素の種類と量が皮膚色を決定すると言われている。

《真皮》

真皮は、表皮と突出するように接触している真皮乳頭層とその下層の網状層に分けられる。毛包や汗腺が入り込み、真皮層内には血管や神経が密なネットワークを形成している。

表皮を養う（乳頭層）とともに、張力と弾力を発揮し、内側の諸臓器（いわゆる内臓と骨格群）を至適な容積、容姿に封入するための（網状層）組織であり、表皮の10倍以上の厚さを持ち、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックスから構成されている。線維芽細胞は、それらの生理活性物質や細胞間物質を産生しており、真皮層のホメオスタシスの維持に働いている²⁰⁾。

線維芽細胞は、結合組織内で、線維状に配向しており、損傷組織内で良く増殖すると言われている。

真皮の変化が生じるメカニズムとして、太陽紫外線A波（UVA）により、コラーゲンやエラスチンを分解する酵素が活発につくられること、また別のメカニズムとして、非酵素的にグルコースまたはアマドリ生成物とタンパク質（エラスチンやコラーゲン）の結合が生じ、真皮結合組織の光線性弾力線維変性が生じるとの考え方もある。

後者には紫外線の直接作用や紫外線や炎症により間接的に発生する活性酸素が関与していると考えられる。UVAは皮膚の真皮に到達し、真皮に存在する光増感物質と反応して一重項酸素（ 1O_2 ）をはじめ各種の活性酸素（Ros）を発生して酸化ストレスを惹起すると考えられている。

細胞外マトリックス成分の減少および変性がシワ形成に関与するという報告がなされている²¹⁾。

真皮のコラーゲンは、乾燥重量の70%以上を占め、結合組織の主要成分である。また弾性線維は、乾燥重量の2~3%で、線維中央に分布する無構造なエラスチンと周囲の線維（マイクロフィブリル）から構成される。

《線維芽細胞》

間葉系細胞で、間葉から分化し、真皮において中心的役割を果たしている。膠原線維を形成するコラーゲンの前駆体、弾性線維を構成する前駆体やムコ多糖などの基質成分を合成し、細胞外に分泌する。その一方ではタンパク質分解酵素により結合組織の分解も行い、合成および分解の制御も行う。

光顕的には紡錘形の両端が細長く伸長した細胞で、電顕的にはよく発達した粗面小胞体、ゴジル装置が見られる。発達した粗面小胞体の中に無構造物質をみることがあり、これは各種線維やムコ多糖類の前駆体と考えられる。膠原線維を産生し真皮が成熟すると、線維細胞はその活動を停止し、線維細胞 (fibrocyte) となる。このとき細胞核は濃縮して小型となり、胞体も乏しい。これらの活性の調節には、副腎皮質ホルモンや甲状腺ホルモンなどが影響する。

創傷治癒過程では、細胞室にアクチン線維が増加して平滑筋細胞に似た筋線維芽細胞に変化し、肉芽組織などの組織の収縮に関与する。

膠原線維はコラーゲン線維が会合してできた線維であり、組織に硬さを与えている。線維芽細胞は α 鎖の三重螺旋構造のプロコラーゲンを分泌し、間もなくペプチダーゼが作用して両端が切り離され、トロポコラーゲンとなる。トロポコラーゲンは会合して直径 100 nm 程度のコラーゲン原線維を形成し、さらにコラーゲン原線維は会合してコラーゲン線維となる。会合の過程においてコラーゲン分子同士は共有結合を形成し、強度を高めている。

膠原線維はコラーゲン線維が会合してできた線維であり、組織に硬さを与えている。線維芽細胞は α 鎖の 3 重螺旋構造のプロコラーゲンを分泌し、間もなくペプチダーゼが作用して両端が切り離され、トロポコラーゲンとなる。トロポコラーゲンは会合して直径 100nm 程度のコラーゲン原線維を形成し、さらにコラーゲン原線維は会合してコラーゲン線維となる。会合の過程においてコラーゲン分子同士は共有結合を形成し、強度を高めている。

《細胞外マトリックス：ECM：Extracellular matrix》

胞外マトリックスとは、生体内で細胞を取り巻いている物質の総称であり、真皮にも豊富に存在する。成分としては、コラーゲン・エラスチンなどの線維成分と高分子タンパク質であるプロテオグリカン（ムコ多糖）などの非線維成分、およびこれらと細胞との接着を調節するフィブロネクチン・ラミニン・ビトロネクチンなどの接着分子からなる。

細胞外マトリックスの成分は、大きく分けると 3 種類あり、線維などの構造体の主体のタンパク質とグルコサミノグリカンとよばれる多糖、それに糖タンパク質である。細胞外マトリックスの中の構造体としては、コラーゲン線維、基底膜、弾性線維の 3 種類があり、その主体は前の 2 つのコラーゲンであり、弾性線維の主体はエラスチンである。グリコサミノグリカンには、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸などがある。ヒアルロン酸以外のグリコサミノグリカンは、タンパク質と共有結合で結合して存在し、それをプロテオグリカンという。

巨大な糖鎖であるグリコサミノグリカンやこれがタンパク質に結合したプロテオグリカンは、多量の水を引き付ける性質を持ち、水を多く含むゲル状の状態が存在し、真皮を柔軟な状態に維持し、外圧に対して抵抗する機能を果たしている。フィブロネクチンは、細胞の移動・分化・増殖を制御し、組織発生や創傷治癒に関与する。

正常状態での細胞外マトリックスの合成と分解はバランスが保たれており、マトリックスを分解する酵素である MMP (matrix metalloprotease) は組織の制御因子として重要である。

細胞成長因子は低濃度で細胞走化性を発揮し、高濃度で増殖を促進する働きがある。創傷治癒においては、低濃度で上皮細胞や線維芽細胞を遊走させ、高濃度で細胞分裂と細胞外マトリックスを産生させるという合理的な機能を持っている。

シンデカンは細胞の表面にあって、コラーゲンや細胞増殖因子の 1 つの FGF (線維芽細胞増殖因子=Fibroblast Growth Factor) と結合する性質を持っている。細胞がコラーゲンに接着するのにかかわっており、また FGF が細胞増殖活性を発揮するのにもかかわっていると考えられている。

デコリンは、別の細胞増殖因子 TGF- β (トランスフォーミング増殖因子 β =Transforming Growth Factor- β) は細胞増殖因子と言う名が付いているが、多くの細胞の増殖を抑制する因子と現在では考えられている。また細胞外マトリックスの産生を促進する作用を持っている。デコリンと結合した TGF- β は活性を失う。デコリンは

TGF- β の貯蔵装置になっていると考えられている。デコリンはコラーゲン線維とも結合する。

すなわち、プロテオグリカンは細胞、コラーゲンをはじめとする他の細胞外マトリックス成分、細胞増殖因子などと相互作用をし、いろいろな生物学的機能を発揮している。

《インテグリン》

細胞の表面には、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンなどと結合する受容体(レセプター)がある。これがインテグリンと呼ばれるタンパク質である。

インテグリンは、 α 鎖、 β 鎖の 2 本からできており、たくさんの種類がある。 α 鎖も β 鎖も細胞膜を貫通して存在していて、細胞の外側で細胞外マトリックス成分と結合する。一方細胞の内部では、インテグリンは細胞骨格(細胞を内側から支える構造体)と結合している。細胞外マトリックスと細胞骨格は、細胞膜を挟んで、インテグリンによって連携されている。細胞外マトリックスとインテグリンが結合すると、その情報は細胞の内部に伝えられる。シグナル伝達機構が活性化され、色々なタンパク質のリン酸化や活性化、移動、集積がつぎつぎと起こる。シグナルは最終的には細胞核の中に伝達され、特定の遺伝子が活性化されて、細胞の増殖や分化を引き起こす。また細胞骨格に伝達されて、細胞の形態の変化を生み出す。

【皮膚の老化】

老化には、生理的要因による内因性老化 (intrinsic aging) である自然老化に加え、環境要因によって加速される外因性老化 (extrinsic aging) がある²²⁾。内因性老化は、生理的老化ともいい、遺伝子的要因を背景に生じる、皮膚の加齢に伴う老化であり、形態的变化、機能的老化として表れる。経時的構造変化である内因性老化の皮膚に発現される老化現象として、しわ・しみ・たるみがある。皮膚 (外表) は、個体にとっては最終抹消の臓器であり、外的刺激に対するバリア機能を果たしている。

機能を要約すれば、表皮は、密な角層 (無核の死んだ細胞層) を形成して、内側の生きた細胞群を外界から隔離するための境界面を形成する組織である。真皮は表皮を養う (乳頭層) とともに張力と弾力を発揮して、内側の諸臓器 (いわゆる内臓と筋肉群) を至適な容姿に封入するための (網状層) 組織であり、皮膚の強度や柔軟性、ハリを保っている。真皮乳頭には血管の末端 (毛細管系蹄) が侵入しており、表皮へ栄養を供給している。皮下は、脂肪として貯留することで、組織容積を拡大し、その結果、内部諸臓器と外界との空間的な距離を確保する組織である²³⁾²⁴⁾

成熟期を過ぎると、表皮では角化細胞の活動が弱まり、ターンオーバーが遅くなる²⁵⁾ これにより、古い角質細胞が長く停滞する事になり、角層が脆くなる。そしてひよひのバリア機能は低下し、乾燥、硬化して、更には菲薄化する。真皮では、線維芽細胞の衰えにより、膠原線維の減少や弾性線維の損傷が目立つようになり、皮膚の柔軟性や強度が低下する。真皮マトリックス成分中のコラーゲンは、老化した皮膚において減少する事が報告されている²⁶⁾。また、真皮乳頭は老化により扁平化する。これにより表皮・真皮接合面は縮小するので、表皮への栄養供給が減少し、更なる表皮の老化を招くと考えられる²⁷⁾。

紫外線は基本的に表皮と真皮の内因性老化を加速する。また紫外線により乳頭層の弾性線維が変性し、それが真皮上層に沈着する²⁵⁾。これは弾力線維症と呼ばれ、光老化とともに変性した弾性線維「の沈着層が肥厚し、表皮の委縮をも招く²⁸⁾。成熟期を過ぎた皮膚は内因性老化により菲薄化するが、顔などの光老化する皮膚は肥厚する²⁷⁾²⁹⁾。

しみには、肝斑、老人性色素斑、炎症後性色素沈着などがり、基本的に表皮の基底細胞に含まれるメラニン色素量の増加が主体である。

肝斑は、両側の下眼瞼外側から頬骨領域に分布する。20歳代以降にみられる褐色調の小斑状色素沈着のことであり、妊娠性肝斑とも呼ばれている。

真皮には、一定以上伸長せず、張力を保つための膠原線維 (コラーゲン)、収縮力を発揮する弾性繊維 (エラスチン)、ヒアルロン酸などのムコ多糖類により多量の豊富な水分を保有する細胞間基質の中に規則的に立体配列されている。老化とともに各要素が不均等になると真皮は緊張と収縮能を失い、しわ、たるみを生じる。

【光老化】

外因性老化とは、皮膚老化に関する要因として、紫外線、可視光線、赤外線を含む太陽光線、温度環境、大気汚染、喫煙、食事、環境、睡眠、心理的ストレス、化粧品などの環境要因による皮膚障害のダメージが蓄積して生じる老化である。中でも特に紫外線の慢性的な曝露によって加速され、非露光部位で起こるような自然老化とは区別され“光老化”と呼称されている。皮膚の老化は、光老化が 80% と言われている。

活性酸素種 (ROS) は、酸化ストレスのイニシエーターであり、細胞内のミトコンドリア内在呼吸連鎖反応の過程で産生され、紫外線が皮膚内外での ROS 産生に大きく関与しており、紫外線によって産生される ROS の種類は、波長に依存して異なり、紫外線 UVB は、NADPH oxidase と呼吸連鎖反応を活性化することにより、 $\cdot\text{O}_2^-$ (スーパーオキシドアニオンラジカル) を細胞内で産生する³⁰⁾³¹⁾³²⁾。紫外線 UVA は、細胞内の NADPH oxidase の活性化と AGEs の光増感反応により、 $\cdot\text{O}_2^-$ を産生し³⁰⁾³³⁾³⁴⁾、さらに riboflavin 系や porphyrin 系のような chromophore を介した光増感反応により $^1\text{O}_2$ (一重項酸素) を産生する。

紫外線による細胞傷害の中に細胞内 DNA の損傷がある。DNA は 260nm 付近に吸収極大を持つ化学物質であり、紫外線 UVB を吸収することにより光化学反応を起こし、シクロブタン型ピリミジン 2 量体を生成することが知られている³⁵⁾。また紫外線 UVA により産生される ROS により 8-oxo-2'-deoxogunosine(8OHdG) を生成する³⁰⁾³⁶⁾。

紫外線は、免疫抑制に働く側面があるが、光老化皮膚ではマクロファージや好中球、リンパ球 T 細胞等の炎症性細胞の浸潤、肥満細胞の増加、毛細血管拡張等の所見が認められ、慢性皮膚炎症の様相を呈する。したがって光老化は、日光曝露による炎症と組織リモデリングの繰り返しに起因するマトリクス変性の過程とも捉えられる³⁷⁾。

太陽光線に含まれる紫外線のうち、UVB が表皮層で吸収されるのに対して、UVA は真皮の深層まで到達することから、真皮結合組織の変性には主として UVA が働いていると考えられる。

光老化による皮膚組織の変化は、真皮の細胞外マトリックス (ECM) 、特にその大半を占める I 型コラーゲンの変性に起因するところが大きいと言われており³⁸⁾、コラーゲン線維の減少³⁹⁾やエラスチンの増加⁴⁰⁾など真皮結合組織の変性が生じる。

【太陽光線】

地上に届く太陽光線には、短波長側から真空紫外線 C 波 (100~290 nm)、紫外線 B 波 (UVB :290~320 nm)、紫外線 A 波 (UVA :320~400 nm)、可視光線 (400~780 nm)、赤外線 (780 nm~1 mm) が含まれる。真空紫外線は、地球大気圏中の酸素やオゾンに吸収され地上には届かない。UVC は、遠紫外線と言い、UVB、UVA は近紫外線と総称される。赤外線は IR-A (780~1,400 nm)、IR-B (1,400~3,000 nm)、IR-C (3,000~1 mm) の 3 つに分かれ、それぞれが、近赤外、中赤外、遠赤外に相応し、地上に到達する赤外線のほとんどが近赤外線であり、生体に影響する赤外線は近赤外線領域である。

波長が短いほど生体への障害性が強い。これは細胞 DNA の吸収スペクトルが 240 nm ~ 300 nm の波長であり、DNA がこれらの波長の電磁波を吸収し変性すると細胞は障害を受けるからである。

皮膚へ照射された光は、角質のケラチンで反射され、表皮顆粒層のケラトヒアリン顆粒、メラニンで吸収、散乱され、ごく一部が真皮へ到達する。

300 nm 以下の波長のものは、オゾン層などで吸収されるため、障害性の強い UVC は地表に到達しないので、生物は生存することができる。

UVC は、強力な生物学的障害作用により、水、空気、物質表面の殺菌に利用され、実験室用クリーンベンチなどの殺菌灯として使用される。

地表に届く太陽光線は波長が短いほうから順に

| | |
|-------------------|----------------|
| 紫外線 (290~400nm) | 6%の比率で地上に届いている |
| 可視光線 (400~760nm) | 52% ; |
| 赤外線 (760nm~1.0mm) | 42% ; |

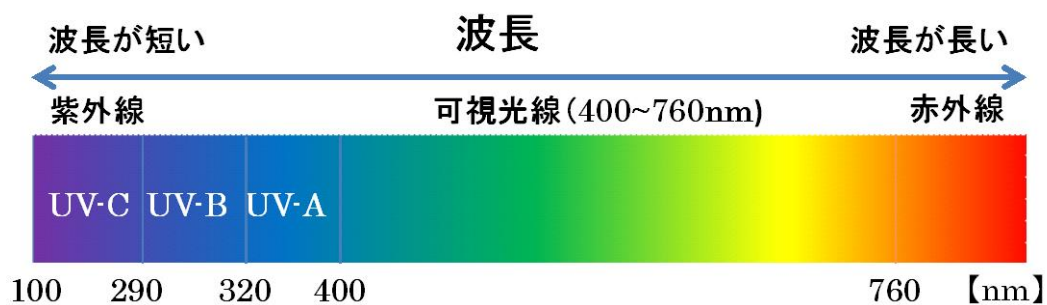


図 2. 太陽光線

《紫外線 A 波 (UVA)》

UVA は地球成層圏のオゾン層に全く吸収される事なく地表に届いており、太陽から届く紫外線の 9 割を占め、皮膚に蓄積的なダメージを与えており、皮膚老化の原因の 80% は、UVA 照射による光老化だと言われている。

波長が長い UVA は、皮膚の奥の真皮にまで侵入し、線維芽細胞やコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸などを損傷し、光老化を引き起こす原因になる。また血管、リンパ管などの他、皮膚免疫に関係ある抗系提示細胞の 1 つである肥満細胞、種々の細胞内色素団などを照射し、DNA、FAD (Flavin Adenine Dinucleotide)、リボフラビンなどフィビン系色素団に吸収され、活性酸素種 (ROS) の一重項酸素、スーパーオキサイドアニオン、過酸化水素、ヒドロオキシールラジカル等の極めて高い分子の生成を促し、細胞構成成分の過酸化による障害が起こる。UVA は、皮膚細胞 DNA には吸収されることがなく、UVB のように DNA が紫外線を直接吸収して、ピリミジン 2 量体などの光産物の生成は起こらないが、中でも細胞膜の主成分である、リン脂質などは過酸化により、細胞としての生理、生化学的、及び形態的な完全性への間接的な遺伝子 DNA 損傷を引き起こる。

UVA 照射による活性酸素の生成は、角化細胞膜の完全性を失わせ、細胞膜の半透性の変化はもとより、細胞膜の破壊、細胞内容物の細胞外への流出など様々な損傷を起こすなど、UVA 照射による活性酸素の生成、そしてそれによる過酸化が如何に生体にとって重大な障害を招くものかがうかがい知れる⁴¹⁾。

3-2. コラーゲン

コラーゲンは全ての多細胞生物に存在し、ヒトでは、生体内の細胞と細胞の間の細胞外基質（細胞外マトリックス：ECM）の主成分で、ECMを構成するタンパク質の中で最も多量に存在する。コラーゲンは、総タンパク質の約30%、中でも皮膚の乾燥重量の70%、骨では、ヒドロキシアパタイトと呼ばれるカルシウムとリン酸の化合物を除いた有機物の90%を占めていると言われており、皮膚の他、腱、軟骨、骨、血管壁、歯などにも多量に存在している。

多くのタンパク質が細胞中に存在して機能を果たし、生体中で球状を示し、水に溶けた状態で存在しているのに対して、コラーゲンの特徴は、細胞外で線維状あるいは膜状の構造体をしており、水に溶けない状態で存在している。

コラーゲンは主に間葉性細胞に属する線維芽細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞、象牙芽細胞、線維随伴細胞などによって合成される。また上皮細胞や平滑筋細胞にもコラーゲン合成能があると言われている。

タンパク質を構成成分で分類すると単純タンパク質、複合タンパク質、誘導タンパク質の3つに小分類できる。コラーゲンは単純タンパク質に属し、加熱変性したコラーゲンであるゼラチンは誘導タンパク質に分類される⁴²⁾。

細胞内で、DNA（アデニン、グアニン、シトシン、チミン）の4種の塩基のうち3種の組み合わせ塩基配列によってアミノ酸が決まり、それに従って、コラーゲンの元になるポリペプチド鎖（ α 鎖）が合成される。

線維芽細胞内粗面小胞体上の膜結合型のリポソームで合成された個々のポリペプチド鎖はプロ α 鎖と呼ばれ、長い大きな前駆体として合成され、小胞体の内腔に送られる。この前駆体には、生産されたばかりのポリペプチドを小胞体に導くアミノ末端シグナルペプチドがあり、N末端とC末端にプロペプチドと呼ばれるペプチドが付いている。

分子内には、コラーゲン特有のヘリックス構造領域と10残基程度のヘリックス構造をもたないN、C末端の領域（テロペプチド）がある。コラーゲンペプチドのアミノ酸配列の特徴は、3残基ごとにグリシンが存在し、Gly-X-Yの繰り返し構造であり、Gly残基の側鎖は、水素原子であり、最も小さいアミノ酸である。分子量が小さく、ねじれが容易なため、三重螺旋構造では、3本のポリペプチド鎖の中のGlyが螺旋の内部に位置しており、芯を形成している。Xの位置にプロリン、Yの位置にヒドロキシプロリンであることが多く、この2種類のアミノ酸が全残基の20~25%を占める。

コラーゲンは、タンパク質であるので、多数のアミノ酸が結合してできている。通常タンパク質を構成するアミノ酸は 20 種類だが、コラーゲンには特有のアミノ酸がいくつか含まれている。中でもヒドロキシプロリン (4-ヒドロキシプロリン) は、コラーゲンの全構成アミノ酸の約 10% を占め、コラーゲンの特徴と言える。ヒドロキシプロリンはプロリンにヒドロキシ基 (OH 基) が 1 個ついた構造をしており、コラーゲン合成の途中で、翻訳後修飾し、プロリンから変化してヒドロキシ化が起こる。プロリンのヒドロキシ化は三重螺旋の安定化に必要である。

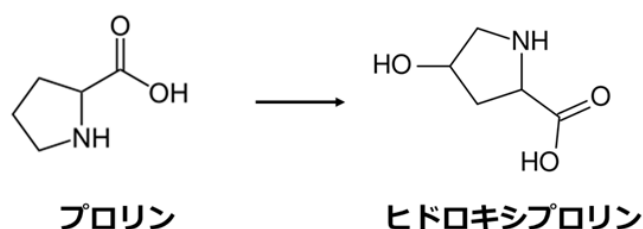


図 3. プロリンからヒドロキシプロリンへの変化

コラーゲン分子は、グリシン残基と他のアミノ酸残基 2 個 (Gly-X-Y) が繰り返す特異なアミノ酸配列を有する α 鎖からなり、2 本の $\alpha 1$ 鎖と 1 本の $\alpha 2$ 鎖が合成される。アミノ酸残基のプロリンとリシン残基がそれぞれの水酸化酵素 (プロリルヒドロキシラーゼ : prolyl hydroxylase) により翻訳後修飾により他のタンパク質にはほとんど含まれない水酸化されてヒドロキシプロリン (4Hyp)、ヒドロキシリシン (Hyl) に変換され、この両アミノ酸のヒドロキシ基がペプチド鎖間で水素結合を作るので、3 本鎖螺旋が安定化し、3 本鎖が螺旋構造 (α -ヘリックス) をとるようになる。

ヒドロキシリシンには、糖鎖が付いているものもあり、ガラクトースやグルコースがヒドロキシリシンに結合し、プロリンは、シス-トランス異性化を受ける。

プロペプチドどうしが会合して三量体を形成し、これらがジスルフィド結合によって、共有結合する。さらに Gly-X-Y アミノ酸の繰り返し配列中の特定の残基が共有結合修飾を受ける。

酵素が働くためにはビタミン C、 α -ケトグルタル酸が体内でコラーゲンが安定に維持されるために必須である。またこの反応に必要な O_2 の活性化には、 Fe^{2+} が不可欠であるが、プロリルヒドロキシラーゼに配位されている Fe^{2+} は酸化されやすく、その結果、酸素活性は失われる。ビタミン C が不活性化された酵素の Fe^{2+} を還元することによって、再び活性が取り戻され、特異的な抗酸化剤として機能している⁴³⁾。

3 本鎖が前駆体（プロコラーゲン）として生成され、合成されたペプチド鎖は、折りたたまれて、小胞に閉じ込められた形で細胞膜に運ばれ、融合することによってゴジル体の内部に入り、ゴジル体では、側面で会合して小さな束をつくり、できた束はその後ゴジル体を経由して細胞外に分泌される。

アミノ酸末端のプロペプチド（N-プロペプチド）の中には短い三重螺旋構造が存在するが、大部分は非螺旋構造で、カルボキシ末端のプロペプチド（C-プロペプチド）は全部非三重螺旋構造でほぼ球状をしている。その直後に組織の中に備わっている特異的なタンパク質分解酵素 procollagen peptidase（プロコラーゲン N-プロテイナーゼ、プロコラーゲン C-プロテイナーゼ）の働きで、三重螺旋構造（ヘリックス構造）を持っていない分子の末端プロペプチドが切断され、コラーゲン分子に変わる。

アミノ酸が存在末端側中の特定ヒドロキシリシンとリシンが酸化されて、ヒドロキシリシン残基、リシン残基がリシルオキシダーゼによって触媒された、ヒドロキシリシン、リシン由来のアルデヒドが別のポリペプチド鎖のアルデヒドとアルドール縮合及びシッフ塩基の形成などの有機化学反応を起こすことによって、側面同士を結び付け、分子間及び分子内に架橋が形成され、2本の α が結合して β 鎖が出来、コラーゲン線維特有の強い線維構造をつくる。コラーゲンの本質的な機能は弾力性と強靭性にあるが、それをささえるものとして安定性のある架橋結合が存在する。

細胞と細胞の隙間を埋めることで細胞の足場となり、細胞の分化や増殖、形態や器官の形成などを制御している。

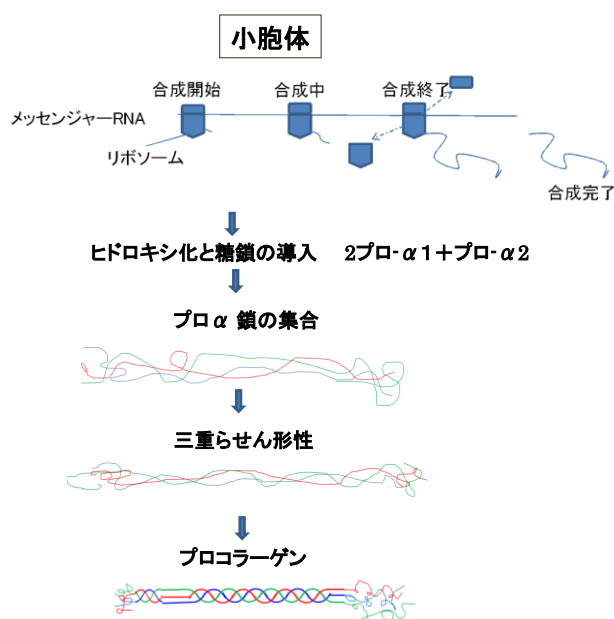


図 4a. 生体内コラーゲンの合成

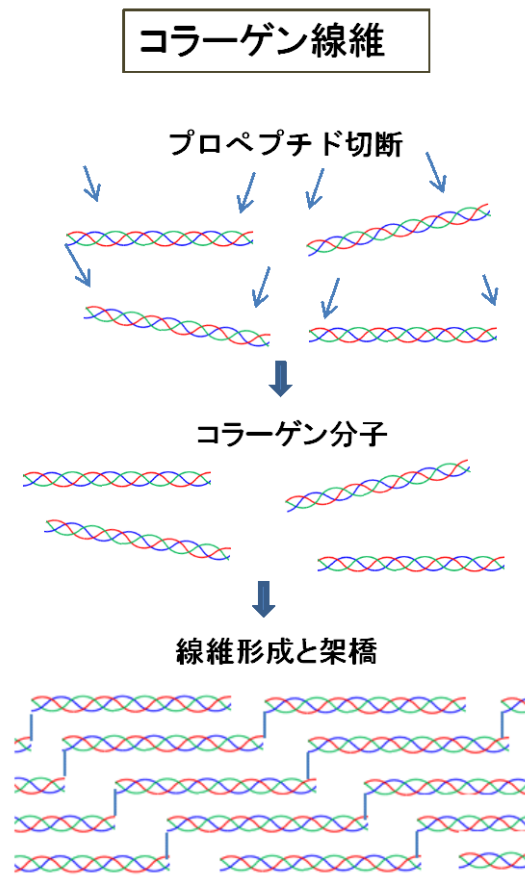


図 4b. 生体内コラーゲンの合成

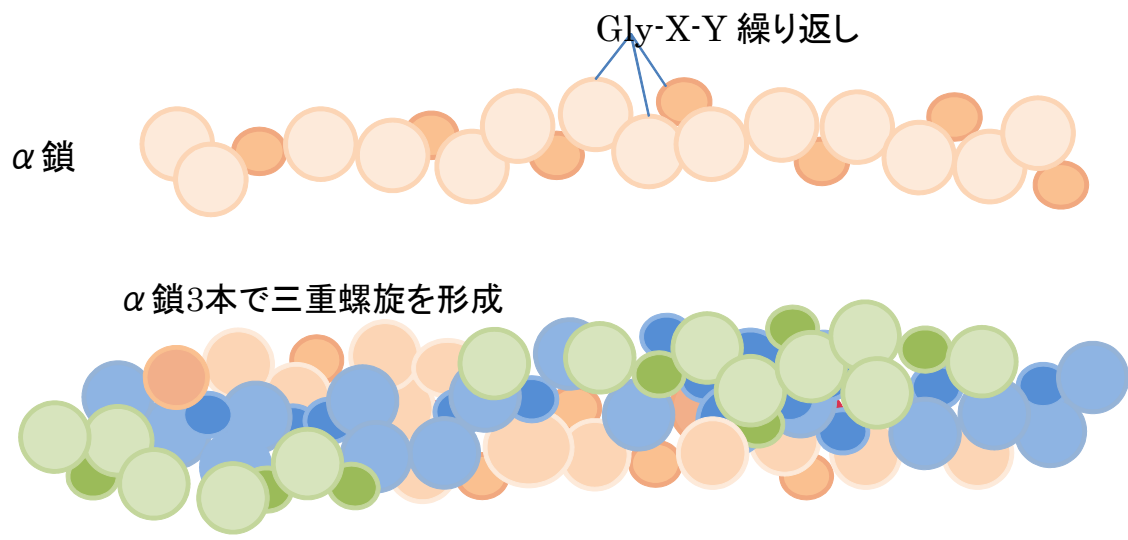


図 5 a. コラーゲンの構造

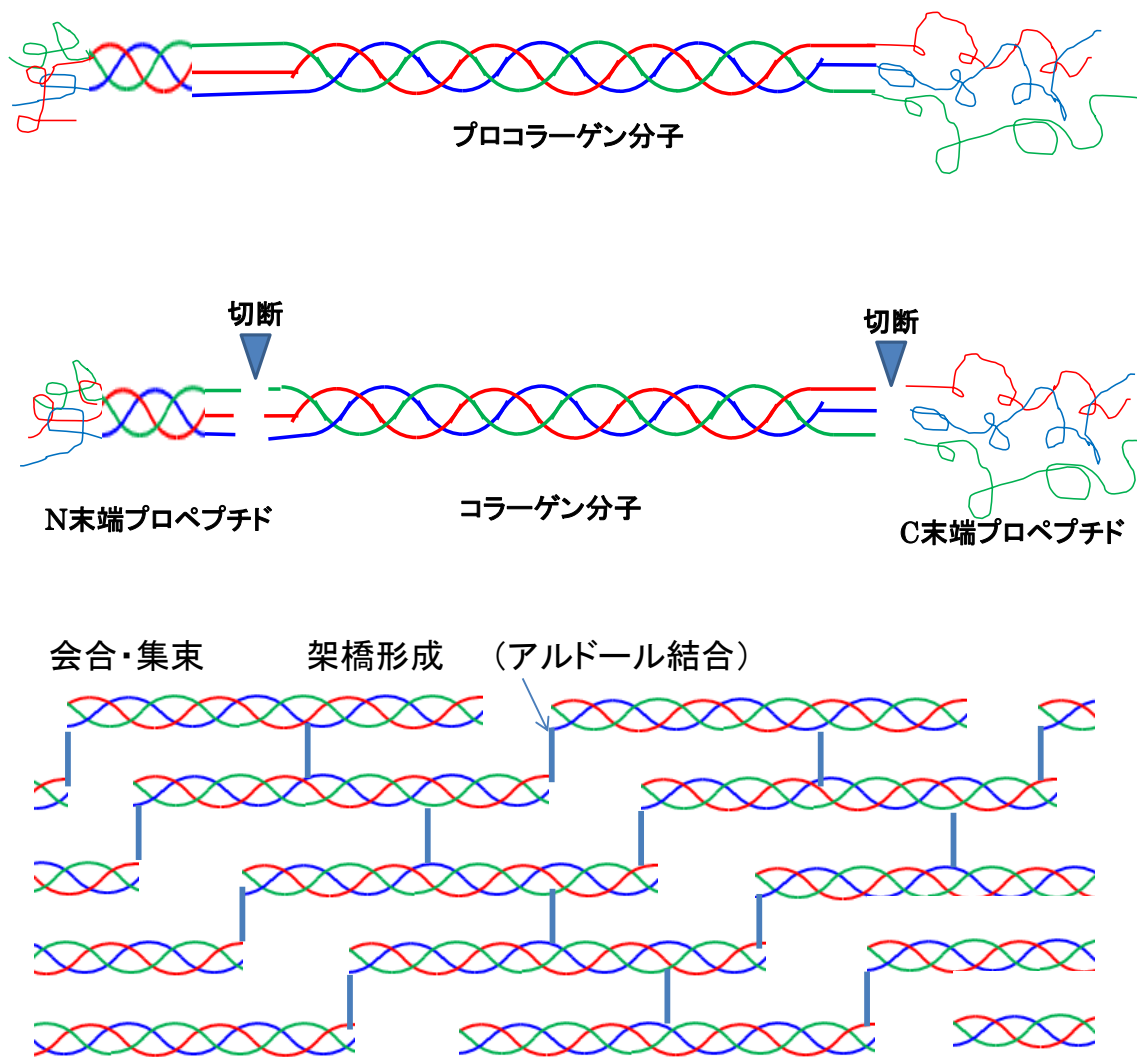


図 5 b. コラーゲンの構造

コラーゲンは、その物理化学的性質から構造や機能の異なる分子ファミリーに分けられ、遺伝子配列の解析結果から、分子構造やアミノ酸配列の異なる 29 の分子種の型があり、ほぼ発見順に番号が付けられている。

コラーゲンの構造は、I 型～XXIX 型が同定されているが、I 型のコラーゲンは、全コラーゲンの 9 割を占めるほど存在量が最も多い⁴⁴⁾。I 型のコラーゲンは、皮膚や骨、腱の主成分であるだけでなく、ほとんどの結合組織に分布し、多細胞動物の体の形態と強度を維持している。

| 型 | 主な分布 |
|--------|----------------------|
| I | 皮膚・骨・腱・靭帯・角膜など 種々の組織 |
| II | 軟骨・椎間板・脊索・目のガラス体液 |
| III | 皮膚・動脈壁 |
| IV | 基底膜 |
| V | 角膜 |
| VI | 種々の組織 |
| VII | 基底膜近傍 |
| VIII | 角膜デスメ膜・血管内皮細胞 |
| IX | 軟骨 |
| X | 軟骨 |
| XI | 軟骨 |
| XV | 腎臓など |
| XVII | ヘモデスモゾーム |
| XVIII | 肺・肝臓など |
| XXVI | 精巣・卵巣 |
| XXVIII | 神経シュワン細胞周辺基底膜 |

表 1. コラーゲンの分子種

I型のコラーゲンの場合、1個の分子量が約10万で、アミノ酸残基数1000程度の一続きのポリペプチド鎖(α鎖)が3本で三重螺旋構造を作り、分子量30万、コラーゲンヘリックス領域の長さが300nm、直径1.5~2nmの細長い棒状のタンパク質で、3本のポリペプチド鎖は、それぞれ左巻きの螺旋を巻きながら、3本のポリペプチド鎖が合わさって、右巻きの螺旋を作るコラーゲン分子の複合三重螺旋構造である。

コラーゲンの分子は、長軸方向に1分子の約1/4ずつ規則的に基礎杭的にずれながら自己集合し、67nm(1D)の周期を持つ線維束を形成しており、コラーゲン分子の長さは4.4Dである。

分子は非対称で方向性があり、全て同じ方向に並んでいる。

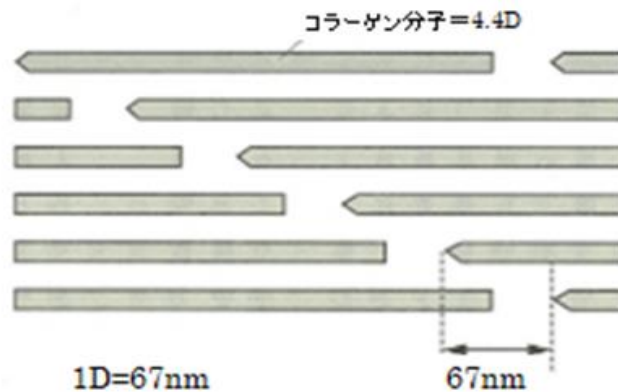


図 6. コラーゲン線維の模式図

生体内のコラーゲン線維は、他のタンパク質と比較して、非常に代謝の遅いタンパク質であるが、耐えず代謝回転をしており、分解量に相当する量が新たに生合成されていると考えられている。コラーゲンの三重螺旋構造は、多くのタンパク質分解酵素に対して抵抗性を示すため、簡単に分解されることはない。コラーゲン分解酵素であるコラゲナーゼ (MMP 1) は、哺乳類動物の組織や細胞にも存在し、体内では、通常非活性型として存在しているが、コラーゲン I 型の分子三重螺旋部分に作用して活性型に変化し、3 本の鎖を 1 箇所切断し、生じた断片は、熱に不安定になり、体温で変性する。三重螺旋構造が崩れたコラーゲン断片(ゼラチン化)は、多くのタンパク質分解酵素 (ペプシン、トリプシン、キモトリプシンなど) に対して感受性となり、分解されるようになる。

コラーゲン分子は、水に難溶で、これを熱水で抽出すると熱で変性し、三重螺旋構造が崩れて水溶性になる。可溶化したものがゼラチンで、このゼラチンを酵素などで加水分解したものがコラーゲンペプチドである。

MMP は、線維芽細胞や炎症細胞、癌細胞などで生成されるが、「引きがね」をひかないと生成されず、生成される因子には、サイトカイン、細胞増殖因子、発癌促進物質、癌遺伝子産物、起炎物質、糖化反応などがある。

糖化反応の進展は、AGEs の生成や架橋形成を伴うため、コラーゲンの物理的、化学的、生理的機能を不可逆的に変化させて機能を低下させる。また AGEs 化したコラーゲンは、分解されにくくなっていることもあり、組織内に蓄積するため、代謝サイクルを遅らせる。さらに酸化反応が起こりやすい生体内環境では、代謝分解に関わる生体内酵素による分解や酸化もコラーゲンを変性させる。

《MMP》

コラーゲン線維は、他のタンパク質に比べると速度は遅いが、合成される一方では分解され、たえず入れ替わり、代謝回転をしている。コラーゲンの特殊な三重螺旋構造を、普通のタンパク質分解酵素であるペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどは分解する事ができない。唯一コラーゲンを分解できる酵素であるコラゲナーゼは、コラーゲン I 型の分子の三重螺旋部分に作用して、3 本の鎖を一箇所切断する。

コラーゲンの三重螺旋構造は 40 °C ぐらいの温度で変性され、コラゲナーゼによって分子が切断されると、生じた断片の変性温度はもとの分子の変性温度よりも 5 °C 以上低く、体温で変性し、三重螺旋構造が崩れ、他のタンパク質分解酵素によってバラバラに分解されるようになる。コラゲナーゼは、II 型、III 型のコラーゲンも分解できるが、IV 型、V 型は分解できない。IV 型は IV 型コラゲナーゼとかゼラチナーゼと呼ばれ、III 型、IV 型を分解するのはストロメライシンという酵素である。

構造を調べてみると、アミノ酸配列がかなり似ていて、どの酵素も亜鉛要求性の酵素群で、活性中心に亜鉛を持っていて、さらにカルシウムが活性に必要である。同じファミリーに属する酵素で MMP (matrix metalloprotease) でコラゲナーゼを MMP-1、ゼラチナーゼを MMP-2、ストロメライシンを MMP-3 と呼ぶ。MMP の仲間は 23 種類ある。線維芽細胞から MMP-1、多核白血球から MMP-8 が産生され、I 型コラーゲンを分解する。MMP-2、MMP-9 は線維芽細胞の他ケラチノサイトでも産生され、V 型コラーゲン、エラスチンなどを分解し、MMP-3 はプロテオグリカンのコアタンパク、MMP-12 はエラスチンを分解する。

MMP は線維芽細胞、ケラチノサイト、マクロファージ、白血球のような組織の細胞や炎症細胞、癌細胞などで作られるのだが、「引き金」があって、引き金がないと生産されない。引き金を引く因子には、サイトカイン、細胞増殖因子、発癌促進物質、癌遺伝子産物、機縁物質などいろいろなものが知られている。ま MMP はまず活性のない大きな分子（プロ酵素）の形で生産され、細胞の外で余分な部分が切り取られて活性化される。活性化を行うのは別のタンパク質分解酵素である。さらに MMP と結合してその働きを止める阻害物質が存在している。血液の中には (α 2-マクログロブリンなど) が、組織の中にはある TIMP (tissue inhibitor or metalloprotease) がある。これらの酵素の活性は、TIMP によって厳密に制御されているが、炎症、癌浸潤などの病的状態では、平衡が崩れ、組織は絵画生じる。

コラーゲンは分解酵素で切断され活性化ペプチドになる

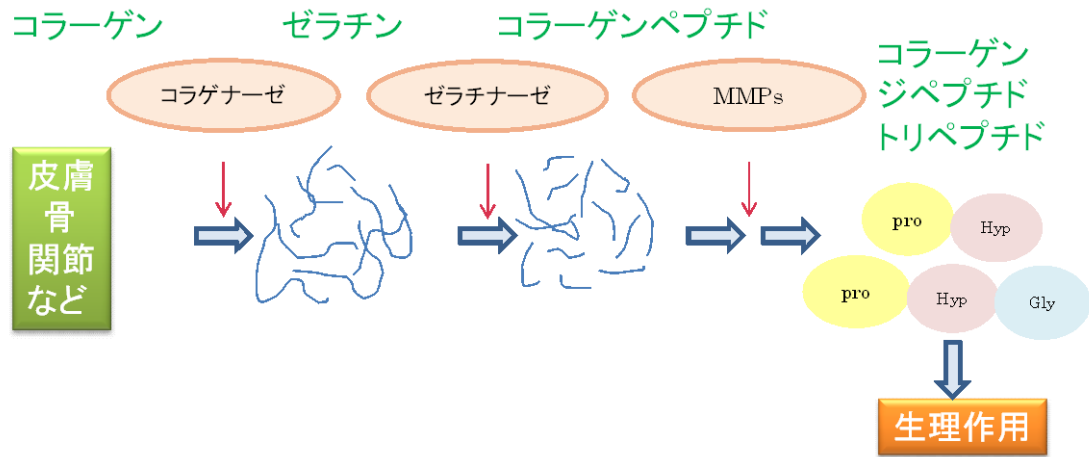


図 7. コラーゲンペプチドの生成過程

| 種類 | 名称 | 基質 |
|---------|------------|--|
| MMP-1 | コラゲナーゼ | I、II、III、X型コラーゲン |
| MMP-2 | ゼラチナーゼ A | ゼラチン、IV、V、VII、XI型コラーゲン ラミニン、フィブロネクチン、エラスチン |
| MMP-3 | ストロメライシンー1 | ゼラチン、III、IV、VII、IX型コラーゲン ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン |
| MMP-7 | マトリライシン | ゼラチン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、 エラスチン、プロテオグリカン |
| MMP-8 | 好中球コラゲナーゼ | I、II、III型コラーゲン |
| MMP-9 | ゼラチナーゼ B | ゼラチン、III、IV、V型コラーゲン エラスチン |
| MMP-10 | ストロメライシンー2 | ゼラチン、III、IV、V型コラーゲン フィブロネクチン |
| MMP-11 | ストロメライシンー3 | ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、 プロテオグリカン |
| MMP-12 | メタロエラスターゼ | エラスチン |
| MMP-13 | コラゲナーゼー3 | I型コラーゲン |
| MT1-MMP | 膜型 MMP | |

表 2. MMP ファミリー

3-3. エラスチン

エラスチン (Elastin) は、コラーゲン、ヒアルロン酸とともに皮膚の真皮にある線維芽細胞によってつくられる線維状のタンパク複合体で、コラーゲンの網目状の部分のスプリングのようなコイル状に巻きついて存在しており、体内では主に、コラーゲン同士を結びつけ、網目状に構成する働きをしている。コラーゲン線維は引っ張りには強いが全く伸び縮みしないが、エラスチンはゴムのような伸縮性があり、弾力性の性質を持ち合わせている。エラスチンは、コラーゲンの線維を支える役割を持つ線維であり、弾性線維とも呼ばれており、弾性線維の主要な構成成分で、脊椎動物の結合組織に広く分布する不溶性タンパク質である。また加熱しても可溶化せず、アルカリやプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素などに対して成功性がある。コラーゲンが真皮の線維成分の70%以上を占めているのに対し、エラスチンはわずか2~4%しか含まれていない。

構成されたものは、ゴムより強い弾力性、伸縮性があり、皮膚に弾力や柔軟性やハリを与える役割を担っている。0歳の赤ちゃんの時には、エラスチンの量が少なく、成長とともにエラスチンの量は増えていき、20歳代後半頃にピークをむかえ、その後、加齢とともに弾性線維は劣化・断裂し、皮膚のたるみの直接原因となる。また加齢以外にも、紫外線が真皮に炎症細胞を誘導し、炎症細胞から分泌されたエラスターゼが弾性線維を分解することが知られている。弾性線維のターンオーバーは極めて遅く、加齢した組織では弾性線維再生能はほぼないとされる⁴⁵⁾。

紫外線照射により真皮エラスターゼ活性が亢進し、弾性線維を分解、変性させ、その結果起こる皮膚弾力性低下によりシワが形成されると言われている⁴⁶⁾。

エラスチンは、皮膚の弾力を担う他に、細胞の増殖や接着にも大きく関わりを持つことが明らかになってきている。形成されるアミノ酸の80~90%は、ロイシン、アラニン、グリシン、プロリン、バリンの5種の疎水性アミノ酸によって占められており、グリシンが全体の1/3をしめている。またコラーゲン同様、プロリンとリシンが豊富にあり、プロリン含量は、全体の10%前後を占め、ヒドロキシプロリンも多少含まれているがほとんど含まれておらず、ヒドロキシリシンは含まれていない。

ヒトのエラスチン含有量は、項靭帯で78~80%、動脈で約50%、肺で約20%、真皮で約2~5%を占めている。真皮に含まれる微量のエラスチンは、伸縮性や弾性によって皮膚に弾力を与え、皮膚のハリを保つ働きをしている。

体内のエラスチン含有量は、成長とともに量が増え、20代後半がピークと言われており、年齢を重ねるに従って量が減少する。

コラーゲンと同様 40 代を過ぎると急激にその量は減少していき、肌のしわやたるみといった影響が表れてくる。また、紫外線やストレス、喫煙などが原因で発生する活性酸素によってもエラスチンは減少すると言われている。エラスチンが減少すると、皮膚の弾力が失われ、しわやたるみが生じ、血管の老化が早まり、動脈硬化や心筋梗塞、脳血栓などの重大な病気のリスクが高まると考えられている。エラスチンは、血小板凝集抑制作用をもち、線維芽細胞の増殖を促進する働きをもつことから、エラスチンに抗血栓作用、血流改善効果、皮膚保護作用をもつと考えられている⁴⁷⁾。

心臓近くの弾性型動脈にはエラスチンが多く含まれており、血管の弾力を維持しながら心臓から送り出される血液の流れを促す働きがある。

エラスチンは、生体内においてまず先駆体タンパク質・単量体のトロポエラスチン (Tropoelastin; 繰り返し配列の多い分子量 72 kDa) として血管や平滑筋細胞、線維芽細胞などで生合成される。次にトロポエラスチン分子は、マイクロフィブリ (Microfibril) と呼ばれる糖タンパク質の周囲や間隔に集合した後、分子間で適切に架橋されて弾性線維のコアタンパク質であるエラスチンとなる。エラスチンは、単独で線維を形成できず、トロポエラスチンがフィブリリン 1 (Fibrillin-1) によって形成されたマイクロフィブリル上に沈着して初めて弾性線維となる。フィブリリン-1 は、MFAP- 4 (Microfibril-lar-associated Protein 4) により産生が刺激され、さらに会合体形成を促進されることによりマイクロフィブリルを形成する⁴⁸⁾⁴⁹⁾。

正常なエラスチンの形成には、この第一段階であるトロポエラスチンの規則的な自己集合が重要で、この自己凝集を「コアセルベーション」と呼ぶ。マイクロフィブリル上には LTBP- 4 (Latent TGF- β binding protein 4) が存在し、トロポエラスチンは LOX とフィブリン(Fibulin)- 4 と会合体を形成し、この会合体にフィブリン- 5 が会合することによりコアセルベーションを示し、マイクロフィブリル上へ沈着する。生理的体温付近でコアセルベーションを起こし、冷やすとまた可溶化するという性質をもっている。自己凝縮により互いに近接したトロポエラスチンのリシン残基同士がリシルオキシダーゼ (LOX) 酵素によって架橋され、伸縮性を生み出す⁵⁰⁾。

LOX はリシン残基の側鎖 ϵ -アミノ基を酸化的に脱アミノ化のアルデヒド化する結合組織を構築及び修復する必要不可欠な銅イオン要求性酵素で⁵¹⁾、アルデヒド化したリシン残基は近隣のリシン残基側鎖とアルドール縮合及びシッフ塩基の形成などの化学反応によって分子間及び分子内に多様な架橋を形成する⁵²⁾。共有結合でできた、リシンの側鎖に由来している架橋がポロペプチド鎖間で形成される。この架橋産物がさら

に別のリシン残基側鎖と架橋を作り、合計 4 つの異なるエラスチン鎖に属するリシン残基が、互いに共有結合して、リシン残基を巻き込んだ架橋産物、デスマシンとイソデスマシンが最終的に形成され⁵³⁾、それによってエラスチン鎖同士が結合している。伸縮性のあるヘリックス構造と協調して、ゴムのように弾性に富んだ構造になっている。エラスチンのみに含まれる特有のアミノ酸、デスマシン、イソデスマシンは、エラスチン生合成の過程でエラスチン前駆体であるトロポエラスチン中のリシン残基より形成され、架橋形成に関与するアミノ酸で、コラーゲンなどの他のタンパク質には存在しないため、エラスチンの指標アミノ酸とされている⁵⁴⁾。デスマシンとイソデスマシンは、エラスチンが架橋されたときにのみ出来るので、組織の加水分解産物中のデスマシンやイソデスマシンは、含まれている弾性線維の量を表すのに用いられる。

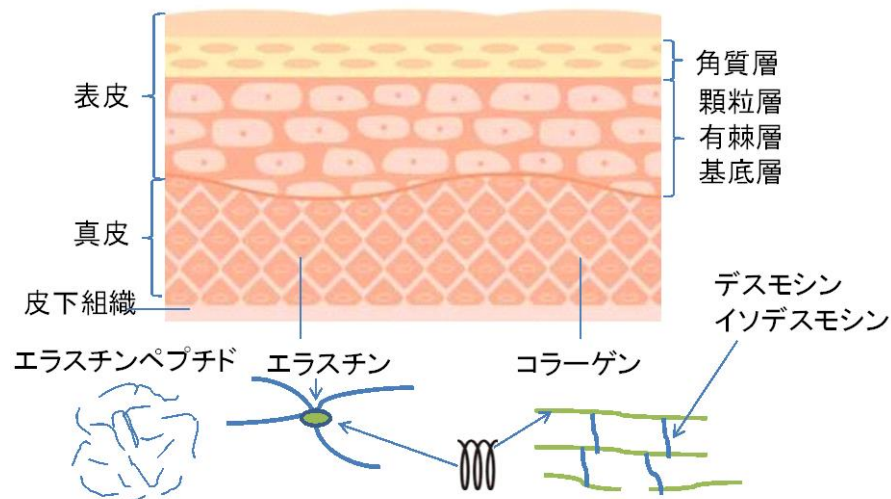


図 8 a. エラスチンの仕組み

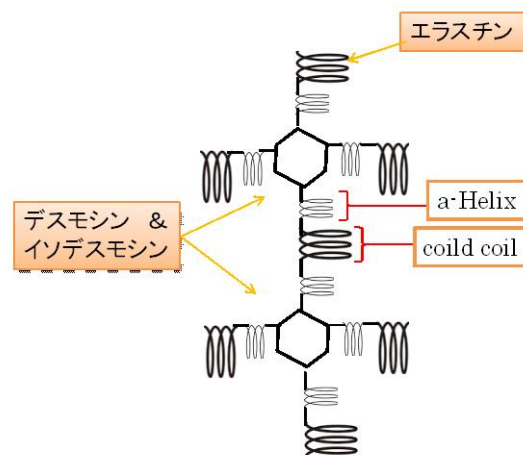


図 8 b. 架橋形成により形成されるエラスチンの仕組み

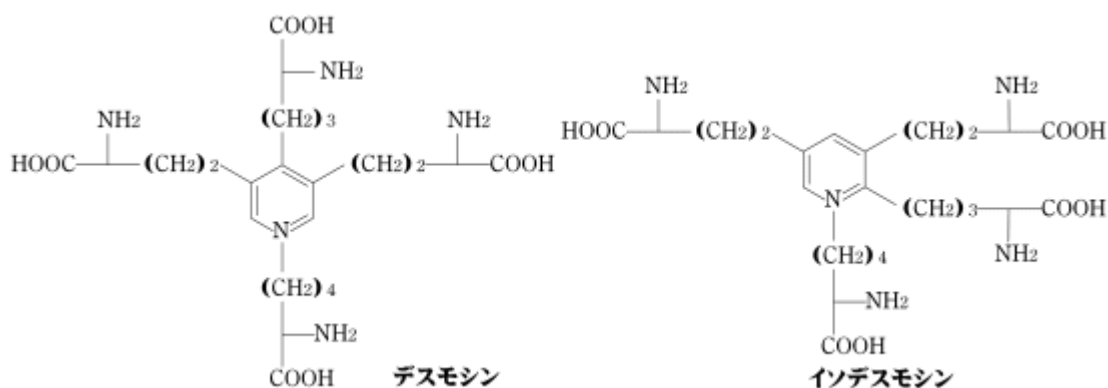


図 9. 組織の加水分解産物

LOX は、活性のないポリペプチドとして小胞体内に作られ、ゴルジ体内で銅イオンを受け取り、これを触媒として C 末端領域のリシン側鎖とチロシン側鎖の間に分子内架橋 LTQ (Lysine Tyrosyl Quinone) を形成する⁵⁵⁾。この LTQ が LOX のオキシダーゼ活性の活性中心となる。全長 LOX は分泌され N 末端プロペプチドが切断されて活性型 LOX となる⁴⁵⁾。

加齢や糖尿病などの疾患により血管壁や皮膚組織中のエラスチンにも糖化 (glycation) が起こり、血管や皮膚の硬化・老化の原因となることが報告されている。一般的に AGE で修飾されたタンパク質は各種タンパク質分解酵素に抵抗性になること、エラスチンのリシン残基は架橋形成に関わっていることにより、日光曝露のエラスチンは極めて不溶性になっている可能性が強く、このため代謝されずに沈着するものと考えられる⁵⁶⁾。

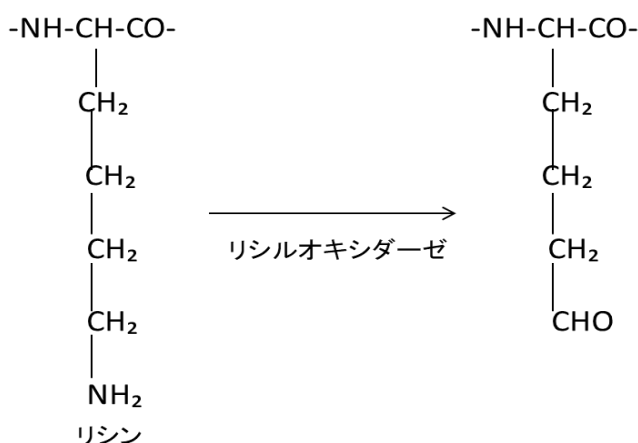
3-4. 架橋

コラーゲン線維が体の中で、役目を果たすためには、単に分子が会合して線維をつくるだけでは、不十分で、コラーゲン線維が強い弾力性を示すために、コラーゲン分子内・分子間にわたる架橋結合形成が必要である。架橋は、線維の結合をより強固にするとともに、網目状に張り巡らされた線維と線維の間に水分を蓄える役割を果たしており、このコラーゲンの性質により、皮膚の柔軟性、弾力性、保湿性が保たれている。

コラーゲンの架橋は、未熟架橋・成熟架橋・老化架橋と三段階に生成される。コラーゲン線維の引っ張り強度は、生後加齢と共に上昇し、成熟するとほぼ一定になる。

コラーゲン線維間の架橋は、胎児の結合組織は軟らかく、弱いため溶解されやすいが、加齢とともに減少してしまうため、二十歳くらいまでにこれらの架橋はほとんど消失してしまう。未熟架橋と呼ばれ、縮合する相手がアルデヒドとリシンに由来、又はヒドロキシリシン（コラーゲン特有のアミノ酸）に由来の違いによって、7種類の架橋成分が同定されている。

コラーゲン分子の N 末端と C 末端には、非ヘリックス部分が存在し、コラーゲンのポリペプチド鎖のアミノ N 末端テロペプチド（非ヘリックス部分）中の 9 位のリシン残基 ϵ -アミノ基が、酵素リシルオキシダーゼによって触媒され⁵⁷⁾、リシン由来のアルデヒド (α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒド・アリシン) になり、このアルデヒドが別のポリペプチド鎖の中のアルデヒドとアルドール縮合を起こす事によって、アルドール架橋が形成される⁵⁸⁾。



リシルオキシターゼ反応

図 10. リシンのリシルオキシターゼによる反応

同一分子中の 2 本の α 鎖(分子量 10 万)が結合による β 鎖 (分子量 20 万のコラーゲン分子、トロポコラーゲン) の生成による分子内架橋である。 α 鎖中に含まれる約 30 個のリシン残基のうち酸化を受けるのは非ヘリックスで酵素が近づきやすいアミノ末端にあるリシンのみである⁵⁹⁾。分子同士の結合形成である分子間架橋もまたリシン由来のアルデヒド(α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒド・アリシン)からできており、リシン由来のアルデヒドが、別の分子のリシン (またはヒドロキシリシン) の ϵ -アミノ基とシッフ塩基を形成することにより、分子間架橋が生成される⁶⁰⁾。

アルドール縮合型架橋やシッフ塩基型架橋を総合して還元性架橋といい、分子内結合としてアルドール結合が、分子間結合としては、不安定なものとしてアルジミン結合、安定な物としてアルドール結合の構造がある。

成熟機構の中間的反応であるアルドール縮合中の遊離アルデヒドが成熟架橋反応に利用され、分子内のアルドール縮合や分子間のアルジミン結合が減少し⁶¹⁾、リジノノルロイシン、オキシリジノノルロイシンおよび **post-histidine peak** が相対的に増加していくという研究報告もある⁶²⁾。

成熟に伴って、結合組織は化学的にも物理的にも強くなっていき、シッフ塩基が飽和化され、安定してくると、標識することができない安定した別の構造の非還元性架橋の分子間架橋に変化または転換が起こる。生成されたコラーゲン鎖は、時間と共に重合化していき、コラーゲンの成熟不溶化が進行する⁶⁰⁾。

皮膚のコラーゲンにはリシン由来のアルデヒドとヒドロキシリシンから生成したシッフ塩基架橋にヒスチジンが反応してできる、ヒスチジノヒドロキシリシノノルロイシンがある⁶³⁾。

コラーゲン分子は、1 分子の約 4 分の 1 にあたる 67 nm ごとに規則的にずれて会合し、線維を形成している。成熟に伴って、コラーゲンの C 末端非ヘリックス部分の特定アミノ酸 (群) 同士に結合、相互作用が起こり、立体構造が維持されている。相互作用する力は、イオン結合、水素結合、疎水的相互作用など非共有結合によって起こっている。

成熟架橋では、特定の場所に架橋が形成されるが、老化に伴いコラーゲン分子間には、ランダムに架橋が非酵素的に形成され、この老化架橋 (悪玉架橋) の生成が、架橋物を異物と判断して分解酵素 (コラゲナーゼ、エラスターゼなど) の分泌量が増え、正常なコラーゲンやエラスチンの分解も行われてしまう。

二十歳を過ぎた頃から加齢に伴い、コラーゲン中の AGEs (advanced glycation

endproducts: 最終糖化反応生成物) 蓄積の増加や分解性が低下する事がわかっている⁶⁴⁾。要因の 1 つとして、コラーゲンが他のタンパク質と比較して非常に代謝回転が遅いため、機能を長時間維持していくために変性防止対策が必要であるため、グルコースによって糖化反応が起こり、AGEs の生成、蓄積、および糖化架橋の形成が起こり、コラーゲンの物理的、化学的、生理的機能を不可逆的に変化させ、代謝回転が一層遅くなり、細胞の活動が低下することによりコラーゲンの代謝も低下し「線維が膨張しにくくなる」「皮膚にシワがよる」「血管が硬くなる」「関節が動きにくくなる」といった老化現象が引き起こってくる。

老化架橋は、単なる自然現象の加齢だけではなく、ストレスや紫外線の影響で加速され、UVA 照射によって発生した一重項酸素をコラーゲンに曝露するとコラーゲンの分子量化がみられ、老化架橋が形成されることが知られている。

またコラーゲンの老化架橋の促進要因の 1 つとして、タンパク質中のリシン残基のアミノ基あるいはアルギニン残基のグアニル基と糖のカルボニル基が非酵素的に Schiff 塩基、アマドリ生成物を経た後で形成するメイラード反応(糖化反応・グリケーション)生成物で、この化合物が転移を起こし、さらに脱水、酸化、縮合などいくつかの反応が連鎖的に起こって複雑な多糖類の生成物が出来、コラーゲン分子内にメイラード反応の後期生成物である AGEs が蓄積することにより老化架橋の形成が行われる。

糖化反応が起こりやすい生体内環境では、代謝分解に関わる生体内酵素自身も糖化して酵素活性を低下させる。同様に紫外線や活性酸素による分解や酸化もコラーゲンを変性させる。

糖酸化生成物(glycooxidation)とは、AGEs の一種で、蛋白質が非酵素的な糖修飾および酸化を受けることによって生じる生成物で、カルボキシメチルリシン: N^ε-(carboxymethyl) lysine: CML は、糖化修飾された蛋白質 Lys 残基がスーパーオキシドやヒドロキシラジカルにより酸化されることにより生じる糖酸化生成物で、生体中で形成される AGEs の中で最も多く存在することが報告されています。CML は加齢に伴うヒト皮膚コラーゲンへの蓄積など、長期的な酸化ストレス蓄積の指標となり、加齢とともに増加する⁶⁵⁾。

CML はコラーゲンのリシン残基を修飾し、コラーゲンの架橋形成を障害すると考えられており、エラスチンの架橋形成も障害される。CML の沈着には紫外線暴露が関与していると言われている。

CML はアマドリ化合物の酸化や脂質の過酸化で生じるため、活性酸素の存在下では AGEs の生成が促進される。

ペントシジンは、リシンとアルギニン残基をペントースが架橋した構造で、アミノ酸とリボース、キシロース、アラビノースなどにより生成する蛍光性・架橋性 AGEs で、

グルコース、フルクトースなどのヘキソースや 3DG からも低率であるが生成することが知られている。

ピラリンは 3DG とリシン残基の反応により生成する。クロスリンは 2つのリシン残基とグルコースが架橋した構造である。

AGEs の物理化学的な特徴としては、黄褐色で蛍光（主に EX:370nm、EM:440nm）を持ち、タンパク質間に架橋を形成することがある。ペントシジンも CML 同様、糖化反応と酸化反応が関与している糖酸化生成物（glycooxidation）である。皮膚コラーゲン中にも存在し、加齢と共に増加する。

生体内のコラーゲンを老化から守るには、合成能の活性化とともに糖化を抑え、代謝サイクルを適正に保つことが重要と考えられる。

3-5. 糖化

AGEs とは、Advanced Glycation End Products の略語であり、終末糖化産物、後期糖化産物等と訳される。特に非酵素的にタンパク質の糖化反応（メイラード反応=アミノカルボニル反応）によってよって生じる構造体の総称であり⁶⁶⁾、身体の様々な老化に関与する生体化学反応による生成物で、体外、体内の双方で生じる。

果糖やブドウ糖などグルコースの還元糖は、塩基性溶液中でアルデヒド基とケトン基を形成し⁶⁷⁾、アルデヒドとケトンはカルボニル基を持ち、カルボニル基は電気陰性度の高い酸素原子に電子が引き寄せられて分極し、炭素原子は求核攻撃を受けやすくなる。初期段階は、還元糖のカルボニル基(C=O)がタンパク質の N 末端アミノ基や ε-アミノ基(-NH₂)のリシンやアルギニンに非制御的に反応すると、機能性タンパクの機能障害が生じ、非酵素的に結合する過程で、シッフ塩基(C=N: アルジミン)を形成し、エナミノールを経てアマドリ転位が発生して、安定なアマドリ化合物 (C=N: アマドリ転位生成物、前期生成物、ケトアミン) を経由する。生体中のアマドリ化合物としては、HbA_{1c} やグリコアルブミンなどが代表的な物質である。

糖化反応は、アマドリ化合物生成までの反応を初期段階（前期反応）と呼びここまでは、可逆的な反応である。以降中期段階（中間体生成）、最終段階（後期反応）と呼ばれ、区別され、不可逆的な反応である⁶⁸⁾。

アマドリ転移化合物は、縮合、脱水、加水分解、架橋、炭素間の開裂により、3-デオキシグルコソン (3-DG=3-Deoxyglucosone)、グリオキサール(GO)、メチルグリオキサール(MGO=Methylglyoxal)やグリセルアルデヒド、グリコールアルデヒドなど分子内に 2 つのカルボニル基(C=O)を有する α-ジカルボニル化合物を生成する。特に 3-DG、MGO はグルコースの 10,000 倍の反応を有するため、糖化反応における生成は未反応のアミノ酸残基に作用して糖化反応を急速に進行させる。

その後、生体内では、α-ジカルボニル化合物、シッフ塩基、アマドリ化合物の分解、脂質過酸化反応由来のアルデヒド、糖の酸化や分解などにより、非酵素的に反応すると、組織内には AGEs が生成、蓄積する⁶⁹⁾⁷⁰⁾⁷¹⁾。

AGEs が生成する。AGEs は、あくまでも糖化反応による生成物の総称であり、一定の構造を示す化合物ではない。

AGEs は多様な化学物質で、蛍光を発するものと、蛍光を出さないもの、架橋の有無など、それぞれ特徴があり、現在判明しているだけでも、AGEs には百種類以上の化合物があり、それぞれが多様な化学的性質を有する。AGEs の例としては、N^ε-カル

ボキシメチルリシン (CML)、N^e-カルボキシエチルリシン(CEL)、N^e-カルボキシメチルアルギニン (CMA)、アルグピリミジン、ペントシジン、ピラリン、クロスリン、G A-ピリシン、グルコスパン、フロイルフラニルイミダゾールなど多数の化合物が特定されている。

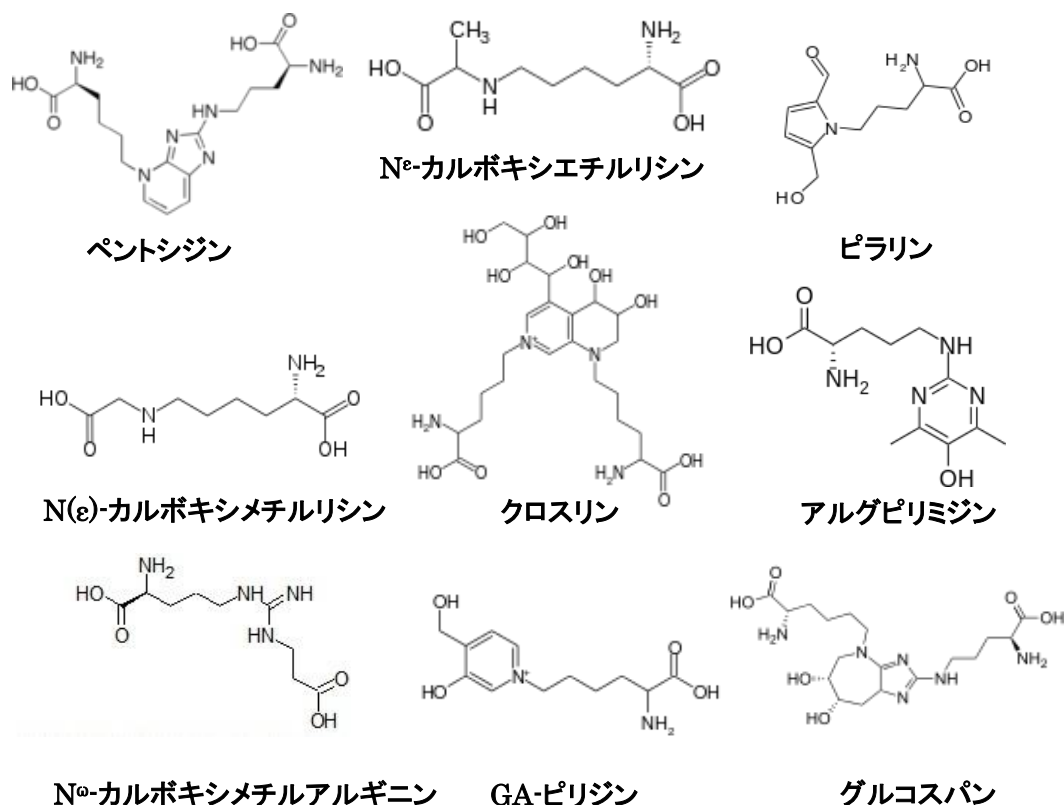


図 11. AGEs 化合物

AGEs は体内の細胞や分子のほぼ全てのタイプに影響を与え、加齢の一因でかつ加齢性慢性疾患の原因であると考えられ、最も病的関与が大きいと考えられている蓄積化合物の1つであり、AGEs の生体への影響は糖化ストレスと呼ばれる⁶⁹⁾⁷²⁾。糖化ストレスは酸化ストレスと並び重要な老化危険因子である。またヒトは、AGEs を分解する酵素を持たないため、一度出来ると蓄積されていく。

AGEs の物理化学的特徴として、AGEs 化したタンパク質である AGE 修飾タンパクをリガンドとして認識する AGE 受容体の存在が知られている。現在 AGE 受容体としては、ガレクチン 3 (galectin-3)、RAGE (receptor for AGEs)、スカベンジャー受容体(SR= scavenger receptor) クラス A(SR-A)、SR クラス B に属する CD36(cluster of differentiation 36)、SR-BI、lectin-like oxidized low density

lipoprotein receptor-1(LOX-1)、fasciclin、EGF-like,laminin-type EGF-like and link domain-containing scavenger receptor-1(FEEL-1)、FEEL-2 およびメガリンが知られている。多くは AGE の取り込み能と分解能を有するものであり、生体内から AGE を排除する役目を担っている可能性が考えられる。AGE 受容体の中で細胞内シグナリンによって細胞傷害を引き起こすことが明らかになっているのは RAGE のみである。RAGE タンパクは一回膜貫通型の I 型膜タンパクであり、イムノグロブリンスーパーファミリーに属し、細胞外領域に 3 つの免疫グロブリン様ドメインを持つ。最も N 末端にある免疫グロブリン可変領域様ドメイン部分の内部に AGE 結合部位が存在している⁷³⁾。

細胞は AGE 修飾タンパク質と AGE 受容体 RAGE の結合を引き金にして、サイトカインや成長因子の産生亢進など種々の細胞応答を引き起こし、種々の疾患発症・進展へと向かう事が考えられている。

皮膚中に蓄積した AGEs は、細胞表面に存在する RAGE と結合し、細胞内シグナル伝達により TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)、IL-1 (Interleukin-1)、IL-6 (Interleukin-6)などの炎症サイトカインの分泌を亢進する⁷⁴⁾⁷⁵⁾。

血中の AGEs の取り込みにはクッパー細胞や内皮細胞で発現する RAGE やスカベンジャーレセプターが関わっている事が示唆されている。AGEs の RAGE への結合は NF-kB の活性化などを引き起こす。糖尿病や加齢に際しては AGEs だけでなく RAGE の発現も上昇している。RAGE はグロブリンファミリーに属する膜貫通タンパク質であるが、他に分泌型の sRAGE、N 末端を欠く NtRAGE もある。RAGE は免疫細胞にも発現しており、その免疫機能の発揮にも重要な役割を持つ事が示されている。RAGE の抑制はほとんどの場合保護的な作用をもたらすが、免疫応答が損なわれるという報告もある。一方で、AGEs は受容体 RAGE に結合し、細胞内シグナルを介して遺伝子発現の活性化あるいは抑制に関与している。特に注目されるのは細胞内酸化ストレスの増強とそれに引き続き起きる NFkB(Nuclear Factor-kappa B)の活性化による炎症サイトカインの発現亢進である。

外因性の AGEs は食品の加熱(調理等)で生じる。食品の一部は体内で糖化反応を起こす。AGEs によるストレスを含む健康な体内での総合的な酸化反応ストレス・過酸化反応ストレスは、食事で摂取する外因性 AGEs やフルクトースやガラクトースといった反応性の強い糖の消費量に比例する。また糖化は、生体内においてヘモグロビンだけでなく、アルブミン、ケラチン、グロブリン、コラーゲンなど様々なタンパク質で起

こり、糖だけではなく、炎症や代謝で生じるカルボニル化合物の 3-DG、MGO、GO やグリセルアルデヒド、グリコールアルデヒドなどの中間体から AGE である CML、CEL やペントシジン、ピラリン、GA ピリシンなどが生成される。さらに AGE の酵素的な生成ルートも知られている。

20 歳を超えた頃から加齢に伴い、コラーゲン中の AGEs 蓄積の増加や分解性が低下します⁷⁶⁾⁷⁷⁾。コラーゲンが他のタンパク質と比較して、代謝回転が遅いため、生体内でグルコースによる糖化ストレスにより糖化反応が起こり、分子内に AGEs の蓄積や成熟架橋以外の線維間架橋である老化架橋（糖化架橋）の形成が関係していると言われている。糖化反応が起こりやすい生体内環境では、代謝分解に関わる生体内酵素自体も糖化して酵素活性を低下させる。

貪食細胞（マクロファージ）にが、AGE を処理する働きがあると言われているが、同時にコラーゲン線維の一部に損傷を与えてしまい、損なわれたコラーゲン線維を修復するために増殖を促す因子(TGF-β) を放出し、コラーゲン線維が過剰に作られ、逆に機能を失うことになると言われている。

マウス培養細胞を用いた実験では、コラーゲン線維の糖化が線維芽細胞の足場になる機能を低下させることが明らかになっている⁷⁸⁾。

タンパク質は通常リシン残基を有する。ヒトの場合、細胞核内のヒストンに最もリシンが多く存在し、リシン残基がスーパーオキシド(ONOO \cdot)やヒドロキシラジカル(\cdot OH) により酸化、非酵素的な糖修飾を受けることにより AGEs の一種である糖酸化生成物 (glycooxidation)が生じ糖化タンパク質 CML が生じる。

CML は、生体内で形成される AGEs の中で最も多く存在することが報告されており、皮膚蓄積性 AGEs の代表である。加齢に伴う皮膚コラーゲンへの蓄積など、長期的な酸化ストレス蓄積の指標となり、皮膚コラーゲンは 20~80 歳までに 33%が CML 化するとされている⁷⁴⁾⁷⁹⁾⁸⁰⁾。また CML は、コラーゲンのリシン残基を修飾し、コラーゲンの架橋形成を傷害すると考えられている。

後期反応マーカーの1つである CML はグリオキサール(GO)を中間体として生成する非蛍光性・非架橋性 AGEs で、糖尿病や酸化ストレス亢進時にも生成し、酸化ストレスがあると生じやすい。

非架橋性の AGEs である CML の蓄積したコラーゲンは RAGE を介した細胞内シグナル伝達により CML 化コラーゲンをヒト皮膚線維芽細胞に添加すると線維芽細胞にアポトーシスが誘導される⁶⁸⁾⁸¹⁾。また皮膚組織で糖化が進行するとタンパク質のリシン残基に

CML が生成する。コラーゲンの CML 化は、表皮に存在するケラチノサイトの遊走やコラーゲンへの接着能力を低下させる⁷³⁾⁸¹⁾⁸²⁾。

CML が蓄積したエラスチンは、好中球エラスターゼによって分解されにくく、凝集能の亢進、線維径の増加、弾性率や伸長率の低下を起こす。同様に AGEs が蓄積したタンパクは架橋形成が進むため、プロテアーゼによる分解を受けにくくなる。これらにより、皮膚ではターンオーバーが遅延する⁷⁴⁾。

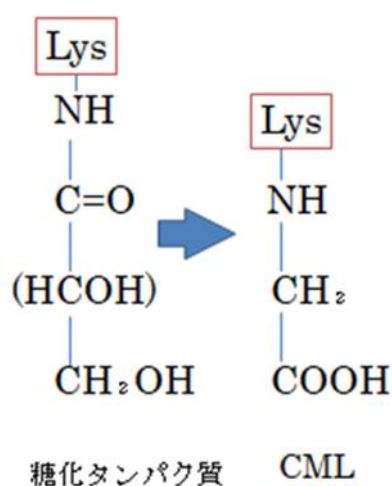


図 12. CML への変化

ペントシジンは分子量が 379 で、分子内にリシン残基、アルギニン残基およびイミダゾピリジニウム環(imidazopyridinium ring) を持ち⁸³⁾⁸⁴⁾、ペントースが架橋した構造で、アミノ酸とリボース、キシロース、アラビノースなどにより生成する。またグルコース、フルクトースなどのヘキソースや 3DG からも低率であるが生成することが知られている。

蛍光性は、励起波長 (ex) : 335 nm 、蛍光波長 (em) : 385 である。

ペントシジンは、皮膚コラーゲン中に存在し、加齢と共に増加する⁷²⁾⁸⁰⁾⁸⁵⁾。

一般的な AGEs でリボース、アルギニン、リシンから生成する架橋性、蛍光性 AGEs である。

ペントシジンなどの架橋性 AGEs の生成蓄積は、無秩序なタンパク架橋の形成による物理的障害の要因になる。タンパクを硬化させる。

ペントシジンのような架橋性 AGEs は、コラーゲン分子間を不規則に架橋します。その結果コラーゲンの性質が変化し、弾力性が低下します。

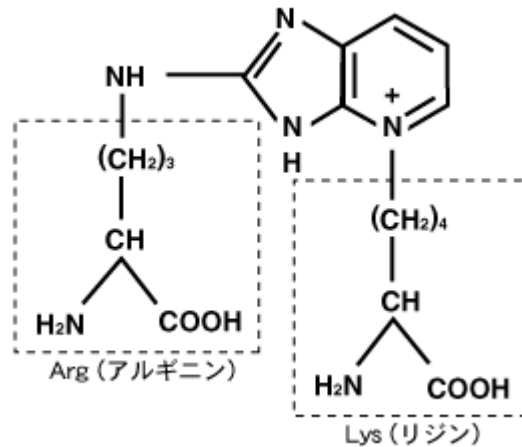


図 13. ペントシジン

CMA は、GO を中間体としてアルギニンから生成する AGEs で、コラーゲンなどの結合組織タンパク質に由来する糖化タンパク質に特異的に生成する。このため、CMA はコラーゲンの糖化マーカーとして有用であると考えられている⁸⁶⁾。AGEs のうちリシン残基が修飾される CML、アルギニン残基が修飾される CMA は、コラーゲンの正常な架橋形成を阻害し線維の安定性に影響を及ぼすと考えられている⁸⁷⁾⁸⁸⁾。生体コラーゲンに蓄積するとコラーゲンの変異に伴って線維芽細胞にも悪影響を及ぼし、皮膚の老化の要因になりうる。糖化は皮膚の老化・光老化のマーカーにもなりうる。

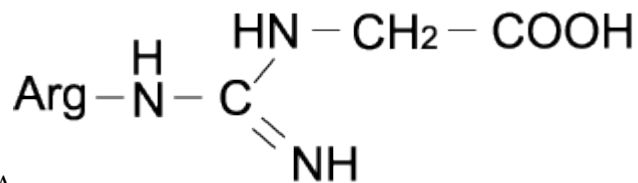


図 14. CMA

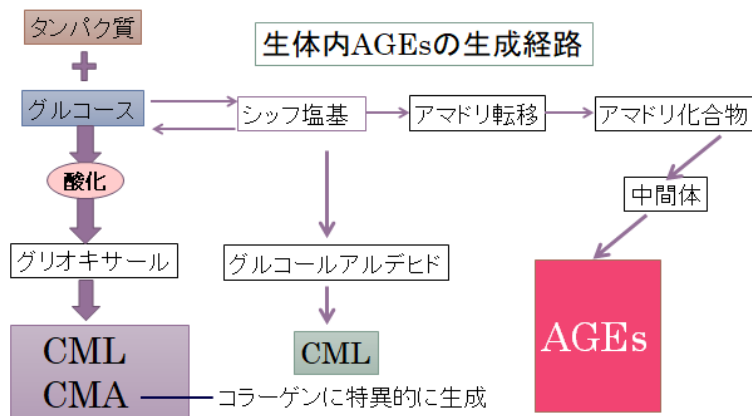


図 15. 生体内 AGEs の生成経路

3-6.サーチュイン

サーチュイン遺伝子 (Sir 2) は長寿遺伝子または抗老化遺伝子と呼ばれ、その活性化により生物の寿命が延びるとされる。サーチュイン (Sirtuin) は、サーチュイン遺伝子の活性化により合成されるタンパク質である。サーチュイン遺伝子 (Sir 2) は複合型遺伝子座 (HM loc)、テロメア及びリボソーム DNA (rDNA) 領域のクロマチンサイレンシング因子の 1 つとして出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の接続型を制御する遺伝子の 1 つとして同定された⁸⁹⁾。Sir 2 による寿命延長効果は、酵母だけではなく、線虫、ショウジョウバエなどの異なる生物でも相次いで報告され、長寿遺伝子と呼ばれるようになった⁹⁰⁾。

活性化には NAD⁺ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド=Nicotinamide adenine dinucleotide) を必要とし、核内ヒストンタンパク脱アセチル化酵素である⁹¹⁾。細胞質においても様々なタンパク質を脱アセチル化することで活性を制御している。遺伝子発現の調節は、ヒストンのアセチル化というタンパク質の修飾によって制御されており、遺伝子発現のスイッチが ON になる際は、ヒストンアセチル転移酵素 (HAT: histone acetyltransferase) によってヒストンがアセチル化され、遺伝子発現のスイッチが OFF になる際には、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC: histone deacetylase) によってヒストンが脱アセチル化される。サーチュインは、ヘテロクロマチン遺伝子発現が抑制されている領域に深く関わっている。

NAD は、補酵素の 1 つであり、生体反応の中で電子のやり取りに関わる、電子供与体の 1 つでもある。NAD は、哺乳類ではニコチンアミドを主要な基質として、2 段階の酵素反応を経て合成される。第一段階はでは、NAMPT (ニコチンアミドフォスホリボシルトランスフェラーゼ=nicotinamide phosphoribosyltransferase) 酵素が、ニコチナミドを NMN (ニコチナミドモノヌクレオチド Nicotinamidemononucleotide) に変換し、第二段階の酵素反応によって、NMN が NMNAT (ニコチナミドモノヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ=Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase) によって NAD に変換される。

サーチュインの活性を抑制する生体内に存在する重要な因子は NAD であり、サーチュインの反応基質として消費される。サーチュインが働き近傍に NAD がないと十分な活性を保つことができない。サーチュインの活性を上昇、維持させるためには、このサ

イクルを活性化させる働きがあるため、NMNを増やすことやNAMPT、NMNATの酵素活性を上げることによってサーチュイン活性が上昇すると考えられる⁹²⁾。

サーチュインが活性化される事によってその標的タンパク質が脱アセチル化され、活性が変化することで、遺伝子の発現などを制御していると考えられている。

カロリー制限やレスベラトロール⁹³⁾などのSIRT1アクチベーター（活性化化合物）、またはNAD合成の上昇によってSIRT1が活性化され、代謝の適応が起こり、その結果として、寿命延長、抗酸化作用が発揮されると考えられている⁹⁴⁾。

分裂寿命が近づいた出芽酵母では、rDNA領域における相同組換えにより切り出されて細胞にとって有害な環状DNA (extrachromosomal rDNA circle: ERC) が形成され、蓄積する事で老化が引き起こされる。ERCは分裂に際して母細胞にのみ引き渡される。サーチュインはこのERCの形成を抑制（サイレンシング）にかかわる分子として同定されている。

サーチュイン遺伝子には、リポソームRNA遺伝子間にある非コード転写プロモーター (E-pro) 転写を制御し、コピー数を維持し、一定に保つ作用があり、ゲノムの安定性へ通じ、寿命を延ばす。

哺乳類において、7種類のサーチュイン (SIRT 1-7) が存在する。細胞内の局在が異なることから、それぞれ異なる細胞機能を制御していると考えられる⁹⁵⁾。

<SIRT 1>

酵母 Sir 2 のオーソログ (orthologue) であり、高いDNA相同性を示し、最も類似している。Sir 2同様、非常に強い脱アセチル化酵素を持つ。細胞質と核内に局在。

ヒストン以外にもSIRT 1に基質として、がん抑制遺伝子 p53、ストレス応答やアポトーシス制御に関わるFOXO 3、炎症や免疫応答などに関わるNF-κB、筋分化の制御因子 MyoD、血管新生に関わる eNOS、核内受容体 PPARγ、コファクター 1 (PGC 1 α) などがある。生命現象に関わる重要なタンパク質を制御して細胞機能を調整している⁹⁶⁾。

SIRT 1は、カロリー制限の生理応答に重要な役割を果たすと考えられる⁹⁷⁾。主な機能としては、糖の産生・脂肪酸酸化・コレステロールの制御（肝臓）、脂肪酸動員・アディポカイン制御（白色脂肪）、インスリン分泌（膵B細胞）、神経保護（脳）、細胞分化の制御、ストレス抵抗性・細胞死の制御、カロリー制限の効果媒介などがある。

<SIRT 2>

主に細胞質に局在し、細胞周期依存的に核内にも局在。非常に強い脱アセチル化酵素を持つ。RIP 3 と相互作用し、その結合パートナーである RIP 1 を脱アセチル化することで複合体形成を促し、それによりネクローシスを促進させる。

SIRT 2 の基質として、 α -チューブリン、ヒストン H4 、 FOXO 1/3 (Forkhead box protein 1/3) 、 PEPCK 1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1)などが見出されている。主な機能としては、チューブリンの脱アセチル化、細胞周期の制御などがある。

<SIRT 3>

ミトコンドリアマトリクスに局在する可溶性のタンパク質で、ミトコンドリアの主要な NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素であると考えられる⁹⁸⁾。不活性型の前駆体タンパク質として細胞質で翻訳され、ミトコンドリアに移行した後に、N 末側の 100 アミノ酸残基が切断されることで活性化型となる。一部核内にも局在している⁹⁹⁾。SIRT 3 の発現は、肝臓において絶食により増加することから、カロリー制限に伴って起こる代謝性の変化をもたらす働きをもつ。主な機能としては、ミトコンドリアタンパク質脱アセチル化の他に酢酸代謝制御、脂肪酸酸化、ATP 産生などがある。

<SIRT 4>

ミトコンドリアマトリクスに局在。314 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端のシグナル配列によりミトコンドリアのマトリクスに輸送され、その際にシグナル配列が切断される。グルタミン脱水素酵素(GDH=Glutamate Dehydrogenase) を阻害して膵 B 細胞のインシュリン分泌の制御や脂肪酸酸化を調節していると考えられている。SIRT 4 は、栄養素の制御系とストレス経路の双方を制御する。他のサーチュインとは違い、これらの経路に対し制御的に働く。

SIRT 4 タンパク質は、全ての組織に幅広く発現しており、特に肝臓、腎臓、心臓、と脳では発現が高く、また筋肉、膵臓、脾臓といった組織では、発現が低いと言われている。主な機能としては、アミノ酸刺激によるインシュリン分泌（膵 B 細胞）、脂肪酸酸化（肝細胞および筋管細胞）などがある。

<SIRT 5>

ミトコンドリアマトリクスに局在。酵素活性は、 NAD^+ 依存的にリシンの脱スクシニル化と脱マロニル化する活性を持つ。アセチル基に比べてスクシニル基、マロニル基を効率よく加水分解することから、主要な脱スクシニル化酵素、マロニル化酵素であると考えられる¹⁰⁰⁾。主な機能としては、尿素回路の酵素である CPS1 を脱アセチル化し、尿サイクルの制御がある。

<SIRT 6>

核内、ヘテロクロマチン領域に局在。モノ ADP リボース転移酵素活性をもち、ヒストン H 3 の 9 番目 (H 3 K 9) や 56 番目 (H 3 K 56) のリシンを基質特異的に脱アセチル化する⁹⁰⁾¹⁰¹⁾¹⁰²⁾。またヒストン以外の非ヒストンタンパク質の基質も多く持ち、ミリスチル基などの長鎖脂肪酸を脱アシル化する活性を持つ⁹⁰⁾。

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) の存在かでも、H 3 K 9、H 3 K 56 のアセチル化が共に顕著に亢進する事から、SIRT 6 は、主要な脱アセチル化酵素として働いていると考えられる⁹⁵⁾。

ヒストンの脱アセチル化によるクロマチン・エピジェネティクス制御を介して、ゲノムの安定性、免疫、糖代謝、脂質代謝、心・血管疾患、神経疾患、癌、老化、寿命など非常にさまざまな生命現象や疾患にかかわることがわかっている⁹⁰⁾。

真皮のコラーゲン合成に関わる老化制御にも深く関わっていると言われている。

SIRT 6 が、テロメアに結合し、H 3 K 9 と H 3 K 56 を脱アセチル化することにより、テロメアを制御しているという研究報告がある。主な機能としては、塩基除去修復 (BER)、DNA 二本鎖損傷修復、テロメアクロマチン構造の制御、NF κ B シグナリンの制御、解糖系・トリグリセリド産生の制御 (肝臓) などがある。

<SIRT7>

核内、核小体によく局在。 NAD^+ 依存的にヒストン H 13 の 18 番目のリシンを特異的に脱アセチル化。主な機能としては、Pol I による転写の制御、ストレス応答と細胞死の制御 (心臓) などがある。

3-7. テロメア

真核生物では、真核細胞 DNA 末端に短い塩基配列の繰り返しからなるテロメアという領域がある。テロメアは染色体の末端に存在し、DNA 構造を保護しているリピート構造で、染色体構造を安定に維持している。細胞分裂のたびにリピート構造が短くなる（テロメア短縮）ことから細胞の老化を刻んでいる時計、すなわち体細胞の分裂回数を決める分裂時計であり、個体の老化時計でもあり、寿命時計としての役割も持っていると考えられている。有限に分裂寿命をもつヒトの体細胞の性質が、細胞自身のもつテロメア短縮という性質で決められており、細胞はテロメアにより分裂可能回数をはじめからプログラムされている。

細胞分裂のたびに少しずつ短くなるテロメアには、このテロメアの短縮を防ぐ酵素、テロメラーゼである。細胞分裂が活発な生殖細胞やガン細胞ではその酵素が活性化されている。テロメアの長さは若い細胞の方が細胞分裂を重ねた老化細胞よりも長いこと、テロメアの長さが限界まで短くなると細胞分裂を停止することから、細胞分裂の回数をカウントしている重要な因子であることが示唆されている。

老化現象のすべてにテロメア短縮が関係するわけではないが、テロメア短縮に伴う細胞機能の老化が局所的な器官の老化のみならず全身的な調整システムの老化進行にも関係すると考えられている。

テロメアの大部分は二本鎖 DNA だが、テロメアは直鎖状 DNA が安定に存在するために必要な領域で、哺乳類の場合なら 5'—(TTAGGG) n —3' という 6 塩基対の繰り返し配列からなり、各染色体末端に 1 万塩基対くらいの長さで存在し、数万塩基対もつながっている。反対側の鎖は 3'—(AATCCC)—5' の繰り返しである。3' 末端が一本鎖で、100 塩基程度オーバーハングしていて、この部分は G テイルと呼ばれている。テロメアにはテロメアの塩基配列を認識して結合するタンパク質が結合しており、最も末端部分では DNA のループ構造（t ループ）が形成され、末端の存在が隠されている物と考えられる。

ループには、TRF1 複合体と TRF2 複合体というたんぱく複合体が結合していることが示唆されている。ループの形成にはある長さのテロメア DNA の存在が必要であり、不足するとループを形成できず異常な、DNA 末端の存在として認識される。

DNA が複製されるとき、新生 DNA 鎖の 5' 端は鋳型に比べて短く、鋳型鎖 5' 端は、複製後に分解され、新生鎖、鋳型鎖とも複製ごとに 5' 末端が 50~150 塩基ず

つ短縮する。

活性酸素によって変異すると、テロメアが短縮しなくてもテロメアを保護しているテロメア結合タンパク質である **TRF2** の結合が低下する結果、細胞は老化し、増殖を停止する。逆に低酸素状態や活性酸素消去剤を与え続けて培養すると培養細胞の分裂寿命が延長すると言われている。

テロメアがなくなると、複数の DNA が末端同士でつながりあって細胞死を起こす。細胞が分裂できず、細胞ができない状態を細胞老化と呼んでいる。

テロメア短縮に伴う細胞機能の老化が、局所的な器官の老化のみならず、全身的な調節システムの老化進行にも関係すると考えられる。

3-8 . Resveratrol : レスベラトロール

スチルベノイド (スチルベノイド誘導体) ポリフェノールに属し、短鎖の共有二重結合と両端のベンゼン環がヒドロキシ基で置換された化学構造である。ポリフェノールは、芳香族炭化水素に結合した水酸基を多数分子内にもつ化合物の総称であり、その水酸基は酸化還元電位が低く、自ら酸化されることで抗酸化作用を示す。

Res は、植物が紫外線などの外的ストレスにさらされた時や感染などに対して生体を防御する物質が存在がし、生き続けるために生み出す防御成分「ファイトアレキシン」の 1 つとして機能しており、ブドウの茎や葉、果皮などに含まれており、系統名は 3,5,4'-トリヒドロキシ-trans-スチルベンである。Res は、植物の細菌感染や UV 照射により、植物中で合成が促進する。植物中では、スチルビンシンターゼという合成酵素により Res が合成され、その酵素は限られた植物にのみ存在し、その植物中に Res が存在する¹⁰³⁾¹⁰⁴⁾。

Res には、化学構造の違いによって「トランス型」と「シス型」の 2 種類存在し、その他にもグルコースなどの糖が結合した「配糖体」や「二量体」など様々な種類の Res がある。

トランス型は分子構造も安定しているが、シス型は紫外線や酸化によって影響を受けやすい分子構造を持っている。トランス型の Res も紫外線や酸化によってシス型に変化する事がある。

通常の栄養状態では眠っているが、飢餓状態に陥った時やカロリー摂取制限 (CR:Caloric Restriction) を 65 ~ 70% する事¹⁰⁵⁾で、長寿遺伝子と呼ばれるサーチュイン遺伝子 (Sir 2) が活性化し、酵母の寿命が延長する抗酸化作用が報告されている¹⁰⁶⁾。Sir 2 の哺乳類ホモログであるヒト SIRT 1 による p53 ペプチドの *in vivo* での脱アセチル化を定量する事により、低分子物質ライブラリーをスクリーニングし、Res をはじめとするポリフェノール化合物が SIRT 1 活性を亢進し、酵母の老化を抑制するサーチュイン遺伝子 (遺伝子) に直接作用し活性化し、酵母の寿命を延長させることがわかった¹⁰³⁾¹⁰⁷⁾。

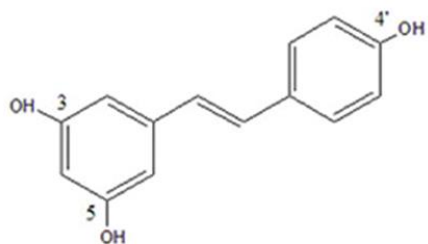
Res には、シクロオキシゲナーゼを抑制する抗炎症作用が見いだされ、血管拡張作用、抗血管新生作用、神経保護作用、抗癌作用、抗加齢作用など報告されている¹⁰⁸⁾。

Res は、紫外線による DNA 障害防止や血清中の抗酸化力増加、過酸化脂質 (活性酸素種により損傷を受けた脂質) の減少、紫外線により活性化する炎症関連転写因

子 NF- κ B の働き抑制などが報告されている¹⁰⁹⁾。

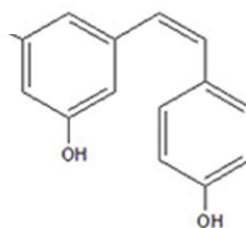
線維芽細胞において、SIRT 1 の発現がコラゲナーゼ (MMP 1) の発現を抑制する事から Res はコラゲナーゼの発現抑制をするという報告がある¹¹⁰⁾。

【トランスレスベラトロール】



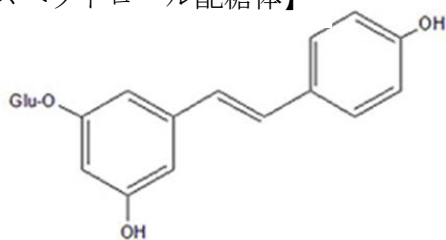
trans-Resveratrol

【シスレスベラトロール】



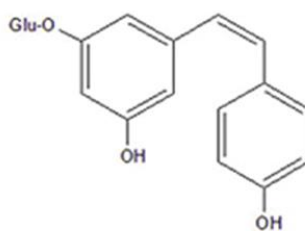
cis-Resveratrol

【レスベラトロール配糖体】



trans-Resveratrol-3-O-glucoside
(*trans*-Piceid)

【レスベラトロール二量体】



cis-Resveratrol-3-O-glucoside
(*cis*-Piceid)

図 16. レスベラトロールのトランス型・シス型 構造

3-9. EGCG

カテキン (catechin) は、フラボノイド (flavonoid) の 1 種で、狭義には、 $C_{15}H_{14}O_6$ で表される化合物であり、化学式分子量 290.27 である。化学構造的には 2 個のベンゼン環 (A および B 環) が、3 個の炭素で結ばれたもので、この 3 個の炭素は 1 個の酸素原子とともに 6 員環 (C 環) を形成している。フラボンやイソフラボンと異なり、C 環 2、3 位に二重結合はなく、3 位にヒドロキシ基をもつ、フラバノール (flavanol, flavanol - 3 - ol) 骨格を有し、多くの植物に含まれている化合物 (+) catechin である。ほかのフラボノイドと同様、A 環に 2 個のフェノール性ヒドロキシ基を持つが、このほか、B 環に 2 個あるいは 3 個のフェノール性ヒドロキシ基をもち、それぞれ、カテキン、ガロカテキンと称される。

カテキンは、フラボノイドの一種であることから、他のフラボノイド類と同様に A 環の 5 位と 7 位、B 環の 3' 位と 4' 位および C 環の 3 位には水酸基あるいは水酸基から変化したエーテル結合、エステル結合、配糖体結合を有する化合物が多く存在する。また C 環の 2 位と 3 位の炭素は不斉炭素であることから、立体異性体も存在する。

生合成的には、2 位の炭素の絶対配置は R タイプのものが合成される。しかし、2 位の炭素ベンジル位の炭素で、しかも酸素も結合していることから異性化しやすい環境にある。とくに B 環の 4' 位に水酸基を有する化合物の場合、異性化は簡単に起こる。現在までに知られているカテキンのほとんどが 4' 位に水酸基を有している。

2R, 3R タイプのカテキンはエピカテキン、2R, 3S タイプのカテキンはカテキンと呼ばれている¹¹¹⁾。

広義には、誘導体となる一連のフェノールを含み、この広義のカテキンは、茶の渋み成分であり、これらは酸化によって重合し、タンニンとなる。

茶カテキンの主要成分は、エピカテキン (epicatechin=EC) とそのヒドロキシ体のエピガロカテキン (epigallocatechin=EGC) 、およびそれらの没食子酸エステルであるエピカテキンガラート (epicatechin gallate=ECG) とエピガロカテキンガラート (epigallocatechin gallate=EGCG) の 4 つである。含有量の順は EGCG>EGC>ECG>EC である。

カテキン類のうち、体内産生ラジカルが原因となる酸化障害を EGCG が最も強く抑制し、次いで、ECG、EGC が強く、EC では、ほとんど効果がないという報告がある¹¹²⁾¹¹³⁾。これらの結果は、EGCG のガロイル基がカテキン類のフラバノール構造

の効果に密接に関わっていること、B 環のガロ構造がカテコール構造に比べて体内酸化抑制においては効果的に働いている事を示唆している¹¹³⁾。

EGCG は、他のカテキンと比較して、強い生理活性を示すとともに茶以外の植物には含まれない緑茶を特徴づける成分である¹¹⁴⁾¹¹⁵⁾。

2020 年から世界的な流行が始まった新型コロナウイルス感染症においては、緑茶を飲用する習慣のある地域とそうではない地域で感染率に有意な差がある事が判明しており、緑茶に含まれる EGCG がウイルス表面の突起と結合することにより感染力を弱める効果がある事が判明している¹¹⁶⁾。

EGCG を生体が感知する仕組みを緑茶カテキンセンシングと言いい、EGCG センサー分子として細胞膜タンパク質 67-kDa laminin receptor (67LR) が、EGCG の抗癌作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用といった機能性に関与することが報告されている¹¹⁷⁾。

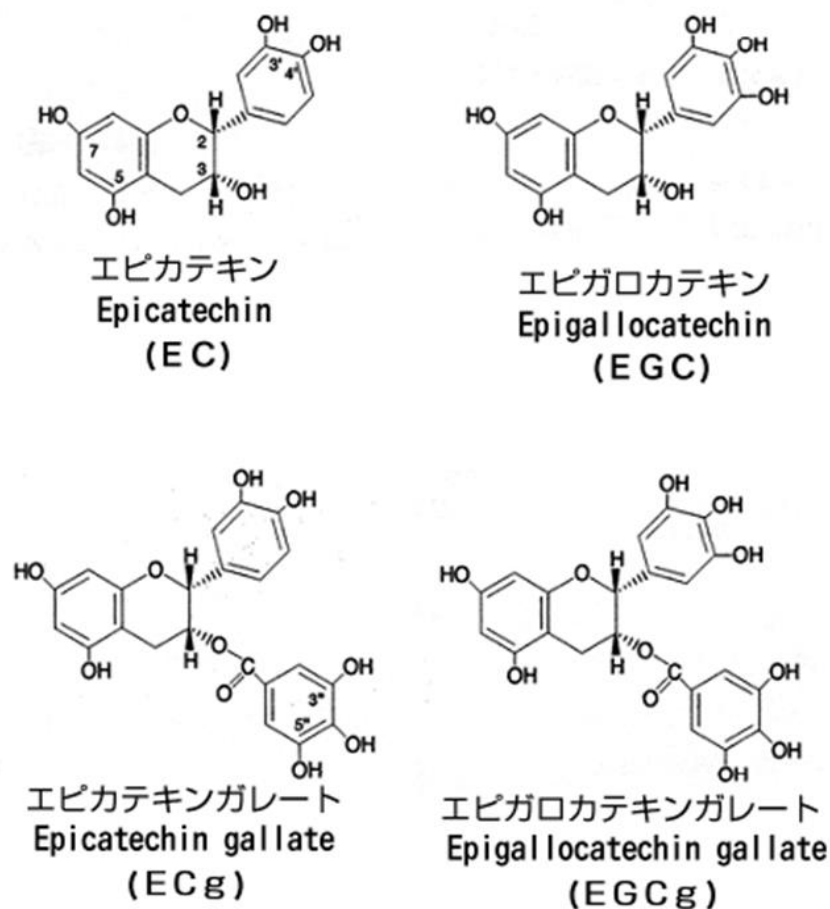


図 17. エピガロカテキン 緑茶に含まれる主なカテキン類化合物

第4章 実験方法

1) 培養条件

ヒト皮膚線維芽細胞は、理研バイオソースより入手した成人（26才）皮膚由来正常線維芽細胞（RCB0156:305M）を用いた。培地は Low-glucose 組成（1g/L）のフェノールレッド含有 α MEM 培地（Gibco、Ribonucleosides、L-Glutamine）400 mL、 NaHCO_3 （Sodium Hydrogen Carbonate）水溶液（14 g/L）50 mL、Pen-Strep（Penicillin-Streptomycin）2.5 mL（Gibco、10,000 units/mL penicillin, 10,000 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin）、FBS 50 mL（Gibco、仔牛胎盤血清）を加えてクリーンベンチ内で作製し、培養に用いた。細胞を 24 well プレートに 75 cells/mm^2 の密度で播種し、5% CO_2 、湿潤状態下 37°C のインキュベーター内で培養した。継代日を Day 0 として、Day 3 に UVA を照射し、24 時間後 Day 4 に培地を交換するとともに機能性成分の添加を行い、Day 7 および Day 13 に培地を回収し、培養中に分泌されたコラーゲン、エラスチンを測定試料とした。回収した培地はマイクロチューブに入れてそれぞれ冷蔵・冷凍保存した。Day 13 に培地を回収した後、細胞のシリウスレッド染色および total RNA の抽出を行った。

2) UVA 照射

細胞を 24 well プレートに播種して、培養 3 日目にクリーンベンチ内で、ハンディ UVA ランプ（365 nm、アズワン株式会社、50 mm の距離での照射強度 $1407 \mu\text{W/cm}^2$ ）を用い、120 分間照射を行った。本実験ではプレートの 65 mm 上方から照射して UVA 強度を $832 \mu\text{W/cm}^2$ とした。

3) 機能性成分の培地への添加

Res および EGCG を Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、それぞれ 200 mmol/L の溶液を作製し、細胞添加に用いた。機能性成分溶液は、UVA 照射 24 時間後 Day 4 に、培地交換を行った際と、その後の添加後培養 3 日目（Day 7）と 6 日目（Day 10）の培地交換の際に、最終濃度 50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ になるようにそれぞれ培地に添加した。9 日目（Day 13）に培養を終了した。

4) 培養液中コラーゲンの定量

定量には Sircol assay Kit (Biocolor 社) を用いた。回収した培地について、キットのプロトコールに従ってコラーゲン濃度を測定した。

マイクロチューブに 470 μl の DW、培地 30 μl 、Isolation & Concentration Reagent (PEG 3000 – 4000) を 100 μl 加えて 0 ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間静置し、PEG 沈殿させ、12,000 r.p.m、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間、遠心分離にかけ、上澄み 500 μl をマイクロピペットで取り除き、Sircol Dye Reagent を 500 μl 加えて色素結合させ、A Vortex mixer 5~6 で 30 分振動させ、12,000 r.p.m、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間、遠心分離にかけた。上澄みを捨て、Acid Salt Wash Reagent (20 ml+脱イオン水 80ml) を氷水に浸けながら、375 μl を加えて、

12,000 r.p.m、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間、遠心分離にかけ、酸洗浄後に、Alkali Reagent を 125 μl 加えてアルカリ抽出を行った。A Vortex mixer 5~6 で 5 分振動させ、96 well プレートに 100 μl ずつ注入し、マイクロプレートリーダーを用いて、波長 550 nm の吸光度でコラーゲン量を比色定量した。

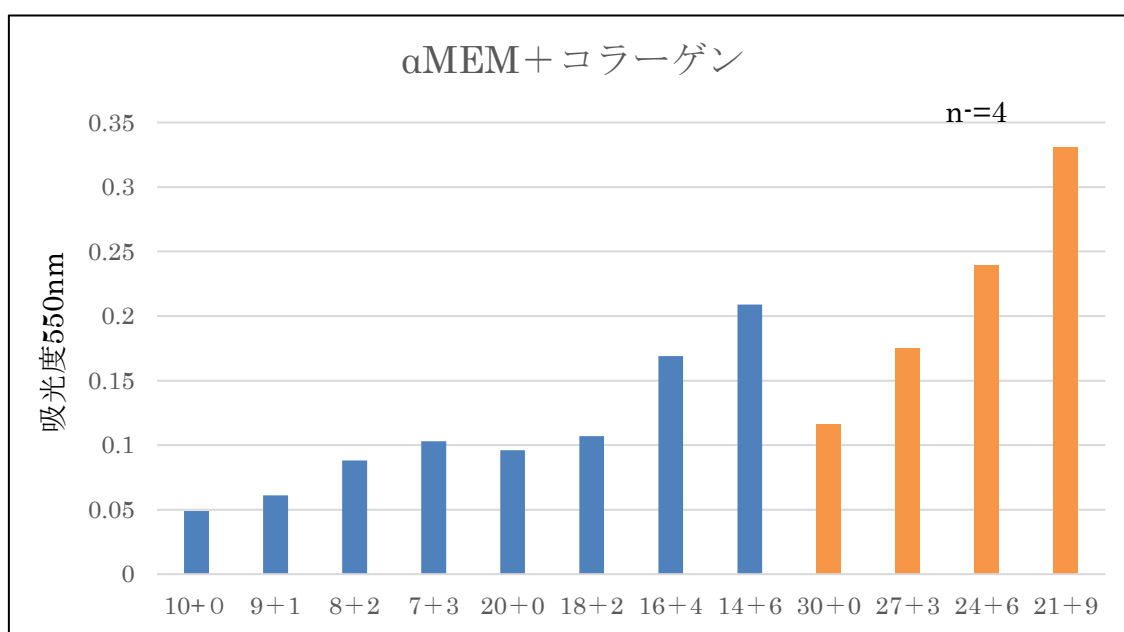
*培地中のコラーゲン量の定量において、細胞培地の使用する量を決定するにともない、トータル 10 μl 、20 μl 、30 μl の中で、 α MEM+コラーゲン標準液の割合を変えて、Isolation&Concentration Reagent を加えて PEG 沈殿させ、上澄みを取り除いた後、Sircol Dye Reagent を加えて遠心にかけ、上澄みを取り除き、Acid Salt Wash Reagent を加えて遠心にかけ、上澄みを取り除いた後に Alkali Reagent を加えて、Biorad 社の microplate reader3550 吸光度 550nm で測定しました。

その結果、30 μl の細胞培地を使って、Biocolor 社の Sircol collagen Assay キットを用いて、製造者のプロトコールに従って培養液中のコラーゲンの定量を行った。

(α MEM+コラーゲン標準液)

| | | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 10 μ l+0 μ l | 9 μ l+1 μ l | 8 μ l+2 μ l | 7 μ l+3 μ l |
| 0.049 | 0.061 | 0.088 | 0.103 |
| 20 μ l+0 μ l | 18 μ l+2 μ l | 16 μ l+4 μ l | 14 μ l+6 μ l |
| 0.096 | 0.107 | 0.169 | 0.209 |
| 30 μ l+0 μ l | 27 μ l+3 μ l | 24 μ l+6 μ l | 21 μ l+9 μ l |
| 0.116 | 0.175 | 0.239 | 0.331 |

表 3.



グラフ 1. α MEN 培地にコラーゲン標準液を加えて測定し、細胞培養を使用する量を決定

5) 細胞膜連結型のコラーゲンの定量

培地を除去した後、培養プレートに付着している細胞とそれに結合したコラーゲンをシリウスレッドで染色し、細胞膜連結型コラーゲンの蓄積量として定量した。機能性成分添加培地で培養 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 分間固定した。アスピレーターで吸引後、15 分間流水で洗浄後、クリーンベンチ内で乾燥させ、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 分振盪した。0.01 mol/L 塩酸で洗浄後、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶

液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。96 well プレートに 100 μl ずつ注入し、マイクロプレートリーダーを用いて、波長 550 nm における吸光度を比色により測定し、相対値をもって表した。Sirius Red はコラーゲン線維と定量的に結合するので、コラーゲンが溶出した色素液の吸光度と比例する範囲内で測定した。

6) 培養液中エラスチンの定量

エラスチンの定量は、Biocolor 社の Fastin Elastin Assay kit を用い、添付のプロトコールに従って行った。機能性成分添加後 3 日目 (Day 7)、6 日目 (Day 10)、9 日目 (Day 13) に回収したそれぞれの培地に 0.25 M シュウ酸を (培地 75 μl + シュウ酸 25 μl) マイクロチューブに入れ、100°C で 1 時間加熱し、 α -エラスチンへ変換した。

4°C で保存した Elastin Precipitating Reagent 100 μl 加えて A Vortex mixer 5~6 に 15 分かけ、12,000 r.p.m、4 °C で 10 分間遠心にかけた。上澄みを捨て、Dye Regent を 500 μl 加え、A Vortex mixer 5~6 を使用して攪拌を行った後、チューブ立てにたて、振盪機で 90 分振盪を行った。

12,000 r.p.m、4 °C で 10 分間遠心にかけた後、上澄みを捨て、Day Dissociation Reagent を 125 μl 加えて、A Vortex mixer 5~6 に 10 分間かけ、色素溶出後、96 well プレートに 100 μl ずつ注入し、マイクロプレートリーダーを用いて、波長 550 nm の吸光度でエラスチン量を比色定量した。

7) 遺伝子発現の測定

7-1. Total RNA の抽出

機能性成分添加後 9 日目 (Day 13) の細胞を PBS で洗浄し、RNeasy Plus Mini kit (Quiagen 社) を用いて、添付のプロトコールに従い total RNA を抽出した。

24 well プレートにそれぞれ RLT を 350 μl 入れ、ポリスマンを使用して細胞を剥がし、ピペットを使用して QIA-Shredder column に移し、9000 xg、4°C で 2 分間遠心後、中身をピペットを使用して、gDNA eliminator spin column に移し、9000 xg、4°C で 30 秒間遠心にかける。上のフィルター部分を取り除き 70% エタノールを 350

μl 加えてピペットを使用して混ぜ合わせる。 RNeasy spin column に 700 μl 移し、9000 xg. 4°Cで 15 秒間遠心にかけ、下の部分に溜まった液を捨て、 700 μl の RW1 を加え 9000 xg. 4°Cで 15 秒間遠心にかけ、 500 μl の RPE を加え 9000 xg. 4°Cで 15 秒間遠心にかけ、チューブを交換し、500 μl の RPE を加え 9000 xg. 4°Cで 2 分間遠心にかけ、チューブを交換し、50 μl の RNase free Water を加え 9000 xg. 4°Cで 1 分間遠心にかけ total RNA を抽出し、使用するまで-20 °Cで凍結保存した。

7-2. cDNA の合成

High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems 社) を使い、添付のプロトコールに従って行った。 Total RNA 9 μL に 10 μL の 2×RT Buffer 、1 μL の M-MLV 逆転写酵素溶液を加え、 37 °C で 60 分間反応させて cDNA を合成し 95 °C で 5 分間加熱により反応を停止させた。合成した cDNA は使用するまで 4 °C で保存した。

7-3. Real-time PCR を用いた遺伝子発現量の測定

cDNA を Applied Biosystems 社 (以下、ABI) の Primer-probe を含む Taq Man Array Plates に分注し、 ABI PRISM 7000 を用いて real-time PCR を行った。ノーマライザー遺伝子として *β-actin* 使用し、遺伝子発現量を相対定量 ($\Delta\Delta Ct$ 法)した。Primer-probe セットは ABI により至適化されたものを用いた。

β-actin (Gen ID 01060665 g1) 、 *Collagen I* (Gene ID 00164004 m1) 、 *MMP1* (00899658 m1) 、 *Elastin* (Gen ID 00355783 m1) 、 *SIRTVI* (Gene ID 00966002 m1)

8) 統計処理

得られたデータは t 検定および SPSS statics 24 バージョンを用いて一元配置分散分析を行った。それぞれの食品成分を添加したときのデータについて、添加なしを対照群とし、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。

9) 細胞傷害性および生細胞数の検討

UVA 照射および機能性成分 (Res および EGCG) の培地添加による細胞の傷害性および生細胞数の検討は、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて測定した。

対数増殖期にある細胞を 5000 cells/well となるように計数し、96 well マイクロプレートに 100 μl ずつ播種し、5% CO_2 、湿潤状態下 37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベーター内で培養した。継代日を Day 0 として、Day 3 に UVA 照射し、24 時間後 Day 4 に、培地交換を行った際とその後の添加後培養 3 日目 (Day 7) と 6 日目 (Day 10) の培地交換の際に、最終濃度 50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ になるように Res、EGCG をそれぞれ培地に添加し、9 日目 (Day 13) に培養を終了した。

照射日 (Day 0)、添加日 (Day 1)、添加後 3、6、9 日目 (Day 4、10、13) に CCK-8 溶液を各 well に 10 μl ずつ添加し、インキュベーター内で 2 時間静置し、マイクロプレートリーダーを用いて、波長 450 nm の吸光度で比色定量を行った。

細胞傷害率を算出し、培地中へのコラーゲン分泌量、エラスチン分泌量、細胞膜結合型コラーゲン量の測定結果については、対照 (添加なし) 群との比較においては対照群に対する生細胞数による補正を行った。

10) コラーゲン中の CMA 糖化反応測定

試薬は collagen AGEs Assay Kit (COSMO BIO CO.LTD) を用い、添付のプロトコールに従って行った。コラーゲン固定化 96well プレートにアミノグアニジン溶液 0、0.2、1、5 m mol/L と機能性成分 (Res、EGCG、クルクミン、ローズマリン酸、シヨウガオール) を各 0.04、0.2、1、5 m mol/L の濃度を 1 well あたり 50 μl 、GO 溶液を 50 μl 加え、プレートの表面にシールをし、湿潤状態下の 37 $^{\circ}\text{C}$ インキュベーターで 7 日間静置し、糖化反応を行った。

Well 内の溶液を除去後、洗浄バッファーで 3 回洗浄し、ブロッキングバッファーを 1 well あたり 200 μl 加え、室温で 1 時間静置し、ブロッキングバッファーを除去後、3 回洗浄し、一次抗体を 1 well あたり 100 μl 加え、室温で 1 時間静置した。一次抗体を除去後、3 回洗浄し、HRP 標準二次抗体を 1 well あたり 100 μl 加え、室温で 1 時間静置した。HRP 標準二次抗体を除去後、3 回洗浄し、発色液を 1 well あたり 100 μl 加え、室温で 30 分間静置した。発色確認後、1 well あたり 100 μl の

停止液を加えて発色を停止させ、マイクロプレートリーダーを用いて、波長 450 nm の吸光度で比色定量した。

11) ウェスタンブロッティングによる測定

サンプル処理液 50 μl にサンプル（培地、Res、EGCG 入り培地それぞれ 50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ 、コラーゲン（牛、ラット、標準））50 μl 、マーカー色素溶液 10 μl をそれぞれ加え、90°C で 10 分間加熱し、氷水で冷却し試料溶液を作成した。

電気泳動装置にパジェルを設置し、泳動バッファーを注入後、試料溶液を各 well に 15 μl 、マーカーを 5 μl 注入し、200 V の電圧を流した。

通電終了後、ゲルプレートを取り出し、陽極版の中央にセットした陽極用のスタックの上にのせ、その上に陰極用スタックをのせてスロットにセットし、メンブレンに転写した。

取り出したメンブレンを DW に浸け、Ponceau S 染色液に 1 分間浸し、DW、Tween-PBS で洗浄後、1% BSA/Tween-PBS 又は 5% スキムミルク/Tween-PBS ブロッキング溶液に 24 時間振盪させながら浸け、ブロッキング処理を行った。

Tween-PBS で洗浄後、一次抗体（500 倍希釈）（抗ペントシジン マウスモノクローナル抗体 Clone No. PEN-12 / 株式会社トランスジェニック）（抗 CML ヤギモノクローナル抗体 Ezetimibe No. 163222-33-1 / KEMPROTEC Limited）（抗コラーゲンラビットモノクローナル抗体 polyclonal 1070-1120/1464）をメンブレンの上にのせて 1 時間放置し、Tween-PBS で洗浄後、二次抗体（500 倍希釈、抗マウス IgG 抗体、抗ヤギ IgG、抗ラビット IgG）をメンブレンの上にのせて 1 時間放置した。Tween-PBS で洗浄後、メンブレンの上に化学発光検出試薬（Clarity & Clarity Max BIO RAD 社）をマウントし、5 分間静置後、Odyssey FC イメージングシステム（LI-COR）で測定した。

12) 機能性成分添加培地による抗酸化能の測定

・ Negative Control・・・1 well あたり発光試料（CL reagent）10 μl と酵素希釈溶液（Dilution buffer）80 μl の割合で混合液を作製

ブラックの 96 well にブランク溶液（ α MEM 培地）10 μl に混合液 90 μl 加えたものを Negative Control とし、試料（機能性成分添加なしと Res、EGCG を添加した照

射なし、照射 120 分の回収した培地) をそれぞれ 10 μ l 分注したものに、混合液 90 μ l を加えたものを Sample(N) とした。

・ Positive Control・・・1 well あたり発光試料 10 μ l と酵素溶液 (Enzyme solution) 80 μ l の割合で混合液を作製

96 well にブランク溶液 10 μ l に混合液 90 μ l 加えたものを Positive Control とし、試料をそれぞれ 10 μ l 分注したものに、混合液を 90 μ l 加えたものを Sample(P) とした。生物化学発光測定装置 AB-2350 Phelios (ATTO 株式会社)を使用して測定した。基質溶液にポンプをセットし、条件設定/計測で、ポンプの分注量を 200 μ l に設定し、プレートをセットし、測定を行った。

計測後、抗酸化能 = $1 - \frac{(\text{Sample(P)} - \text{Sample(N)})}{(\text{Positive Control} - \text{Negative Control})}$ の式を使用して、抗酸化能を算出した。

第5章 実験結果

1. UVA 照射および機能性成分が細胞の増殖と傷害に与える影響

照射日、添加日、添加後 3 日目 (Day 7)、6 日目 (Day 10)、9 日目 (Day 13) でそれぞれ細胞生存率を確認した。細胞は monolayer で増殖し、UVA (-)の細胞は、Day 4 において形態的には confluent になったが、生細胞数は Day 4 以降 Day 7 まで約 20% 程度の増加が見られ、以降定常になった。UVA 照射により生細胞数は対照 (無照射) の細胞に比べ Day 4 で約 80% であったが、その後 Day 10 まで増加して対照群と差がなくなった。Day 13 で confluent になった。(グラフ 2)

継代後 Day 4 で Res , EGCG を添加した。Res , EGCG の添加により、UVA を照射した細胞では対照 (無添加) の細胞と細胞数の差はなかったが、UVA を照射しない細胞では、生細胞数に差異がみられたので、以下、培地中へのコラーゲン分泌量、エラスチン分泌量、細胞膜結合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る補正を行った。(グラフ 2,3)

機能性成分添加が細胞生存数に及ぼす影響では、照射なしにおいて、Res ,EGCG ともに添加濃度が高くなるに従って、3 日目よりも 9 日目に細胞生存数に減少がみられた。照射 120 分においては、Res ,EGCG ともに 150 μ mol/L の添加において、多少の減少はみられたが、差異はみられなかった。(グラフ 3)

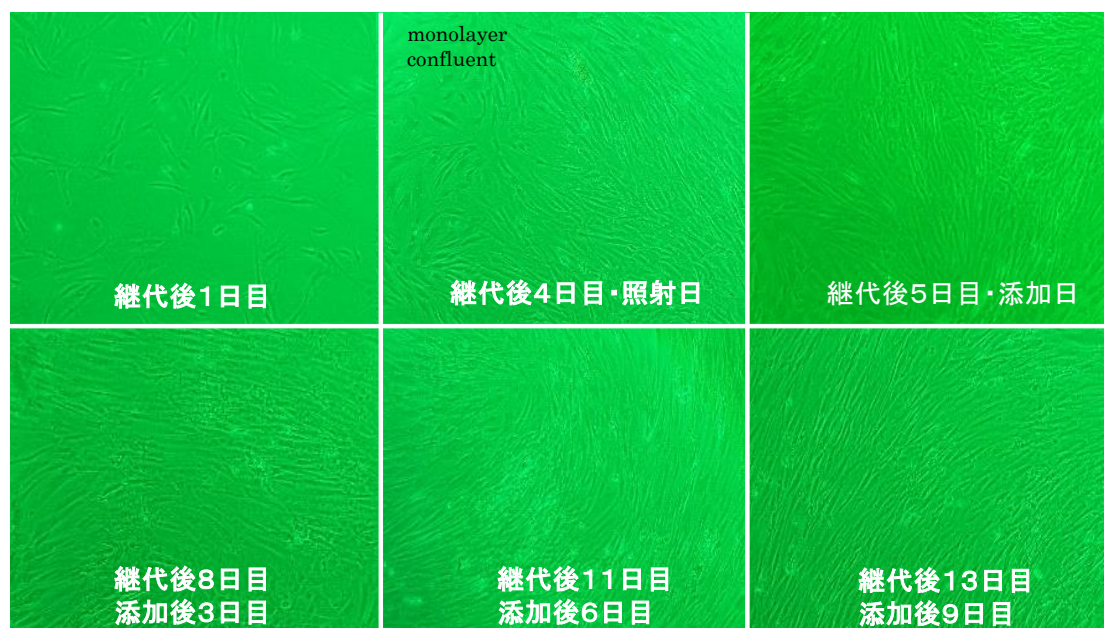
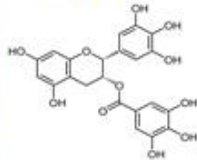


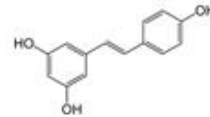
図 21 . 線維芽細胞を顕微鏡にて観察

今回、実験に用いた機能性成分とそれを含む食材

【エピガロカテキンガレート: **EGCG**】《お茶》

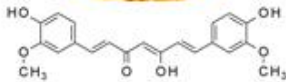


【レスベラトロール: **Res**】《ぶどう》

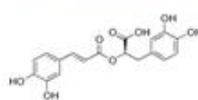


糖化測定に用いた機能性成分

【クルクミン】《カレー粉》



【ロスマリン酸】《ローズマリー》



【ショウガオール】《生姜》

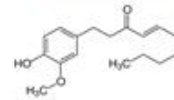
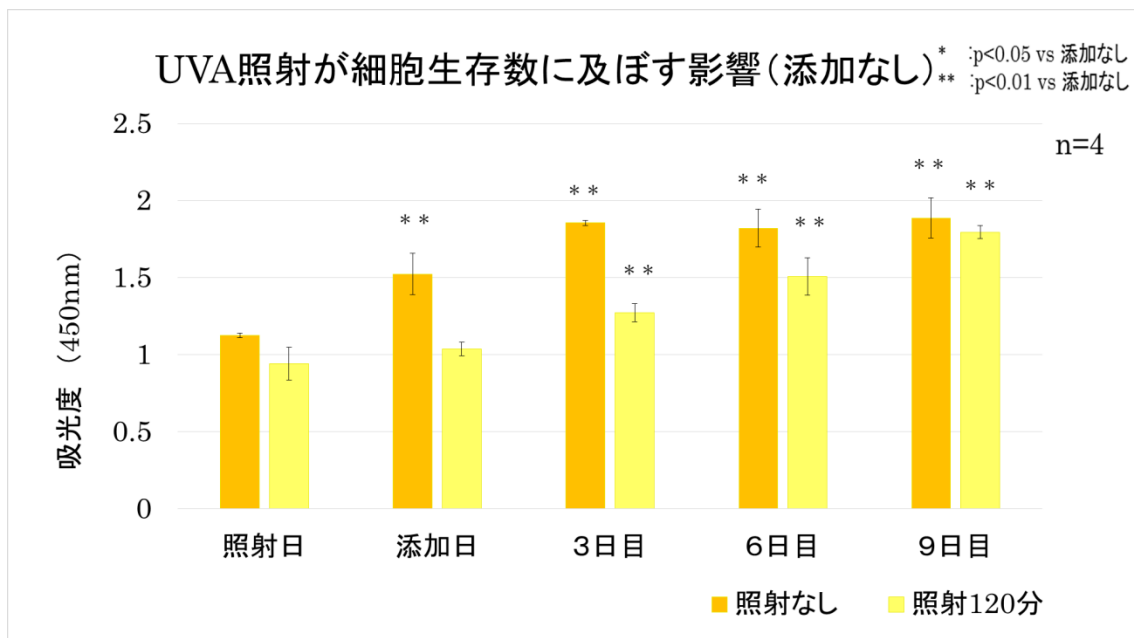


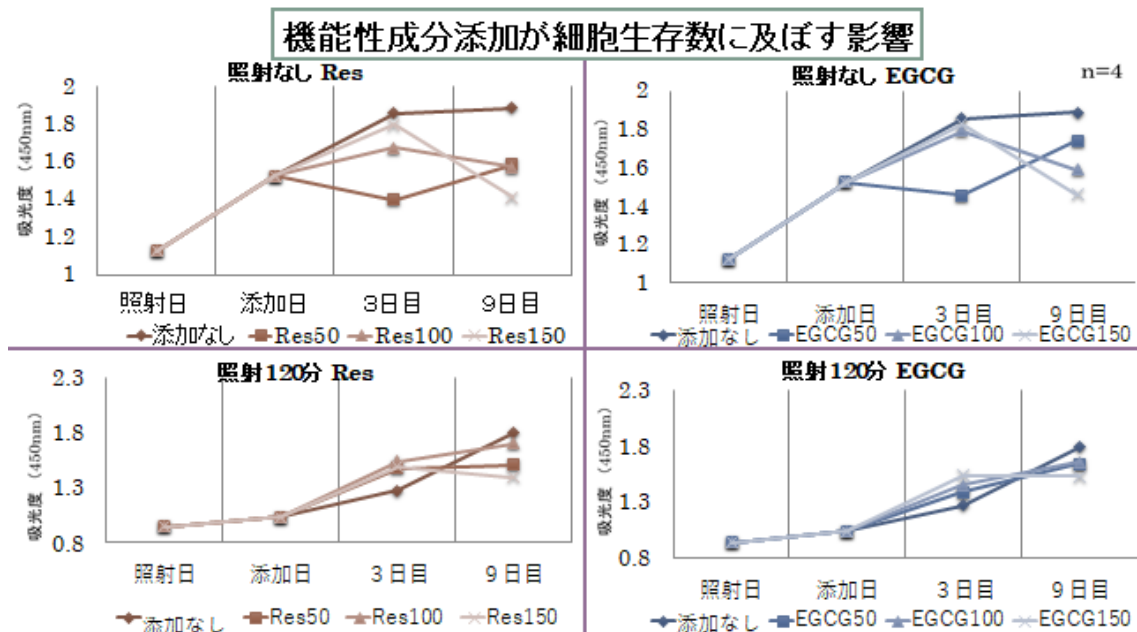
図 22. 実験に使用した機能性成分

糖化による CMA 生成に及ぼす影響を測定した方法に、糖化抑制効果が期待できると言われている、クルクミン、ロスマリン酸、ショウガオールも加えて測定を行った。



グラフ 2. UVA 照射 (機能性成分添加なし) が細胞生存数に及ぼす影響

■ 照射なし ■ 照射 120 分



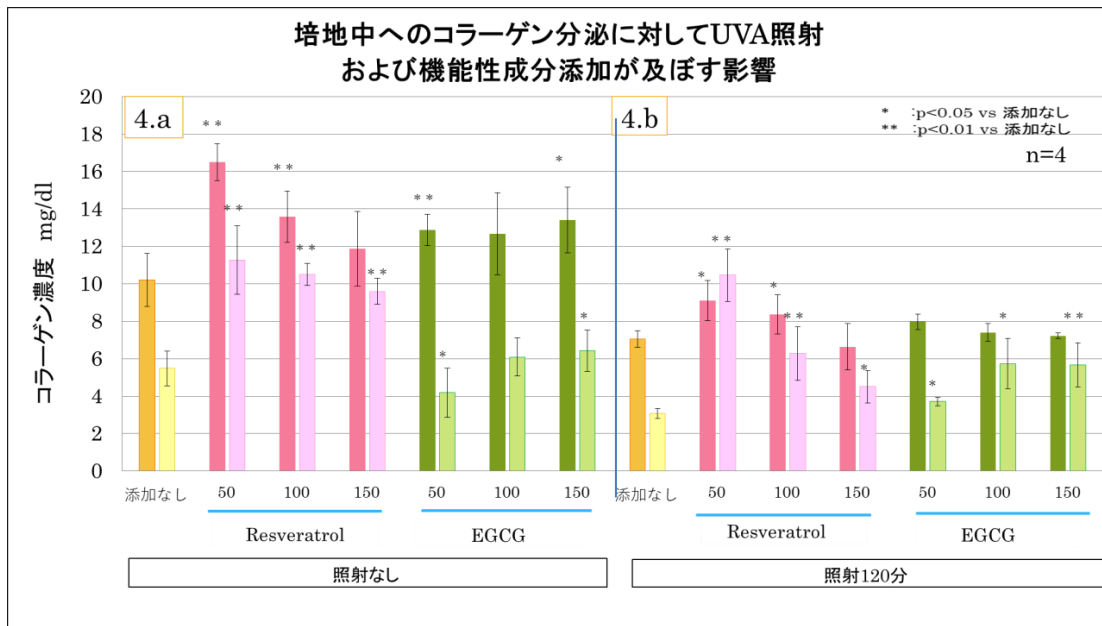
グラフ 3. 機能性成分添加による細胞生存数の比較検討

(Res UVA(-)/ 120 分)

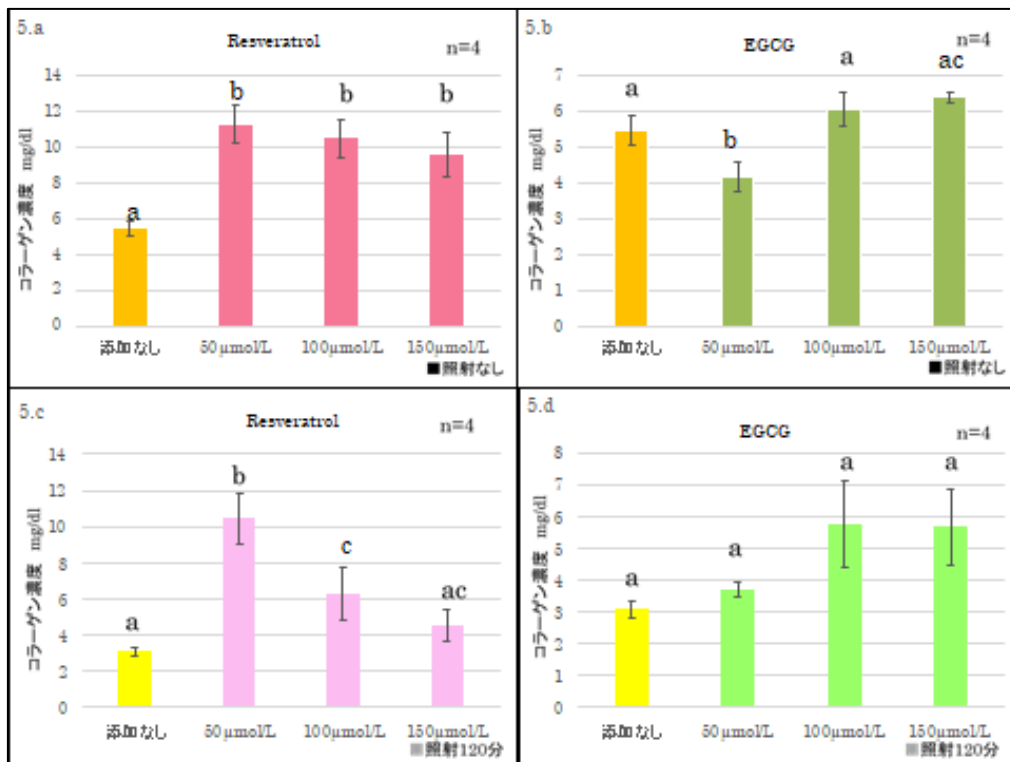
(EGCG UVA(-)/ 120 分)

2. UVA 照射、および機能性成分の添加がヒト皮膚線維芽細胞から培地中へのコラーゲン分泌量に及ぼす影響の検討

機能性成分添加なしの条件で、UVA 照射の影響と培養日数による影響を比較すると、ヒト皮膚線維芽細胞から培地中へのコラーゲン分泌量は、UVA 照射を行わなかった細胞（以下、UVA (-)）と比較すると照射後に減少がみられた。また UVA (-)において、3 日目より 9 日目の培地中へのコラーゲン分泌量の減少がみられた。（グラフ 4）



グラフ 4. 培地中へのコラーゲン分泌に対して UVA 照射および機能性成分添加が及ぼす影響 (添加後 ■ 3 日目 □ 9 日目) t 検定によるグラフ
 添加なしと機能性成分 Res および EGCG を添加したヒト皮膚線維芽細胞からのコラーゲン分泌量の推移と比較検討



グラフ 5. 培地中へのコラーゲン分泌に対して UVA 照射および機能性成分添加が及ぼす影響

9 日目 による比較検討

1) Res 添加が培地中へのコラーゲン分泌量に及ぼす影響

Res の添加後、培地中に分泌されたコラーゲン分泌量は、UVA (-)と比較するとUVA 照射後の分泌量に減少がみられた。

UVA (-)の細胞に Res を添加すると、Day 7 の 150 $\mu\text{mol/L}$ を除き、培地中へのコラーゲン分泌量に有意な増加がみられた ($p<0.01$)。照射後の細胞においても Day 7 の 150 $\mu\text{mol/L}$ を除き同様の変化がみられた (Day 13 の 50、100 $\mu\text{mol/L}$: $p<0.01$ 、それ以外 : $p<0.05$)。いずれの変化も低濃度 50 $\mu\text{mol/L}$ において顕著であった。

(グラフ 4 a.b)

9 日目の多重比較において、照射なしでは、添加なしと比較すると有意な増加がみられた。(グラフ 5 a)

照射 120 分においては、濃度依存的に有意な増加がみられた (グラフ 5 b)

2) EGCG 添加が培地中へコラーゲン分泌量に及ぼす影響

EGCG の添加後、培地中に分泌されたコラーゲン分泌量は、UVA (-)と比較するとUVA 照射後の分泌量に減少がみられた。EGCG の添加により、UVA (-)の細胞においては、Day 7 は 50、150 $\mu\text{mol/L}$ で有意な増加がみられ (50 $\mu\text{mol/L}$: $p<0.01$ 、150 $\mu\text{mol/L}$: $p<0.05$) たが、Day 13 では 50 $\mu\text{mol/L}$ で有意な減少 ($p<0.05$) がみられ、150 $\mu\text{mol/L}$ では有意な増加がみられた ($p<0.05$)。照射後の細胞に対する添加では Day 7 には有意な変化はみられなかったが、Day 13 において有意な増加がみられた (50, 100 $\mu\text{mol/L}$: $p<0.05$ 、150 $\mu\text{mol/L}$: $p<0.01$)。(グラフ 4 a.c)

9 日目の多重比較において、照射なしでは 50 $\mu\text{mol/L}$ の添加において有意な減少がみられ、150 $\mu\text{mol/L}$ の添加において有意な増加がみられたが、照射 120 分では、変化がみられなかった。(グラフ 5 b .d)

3. UVA 照射、および、Res、EGCG 添加が細胞膜連結型コラーゲン蓄積量に与える影響の検討

機能性成分添加後 9 日目 (Day 13) の細胞膜連結型コラーゲン蓄積量は、UVA (-)の細胞と比較すると UVA 照射後の細胞では、添加なしでは、変化がみられなかったが Res、EGCG の添加においてコラーゲン蓄積量に減少がみられた。

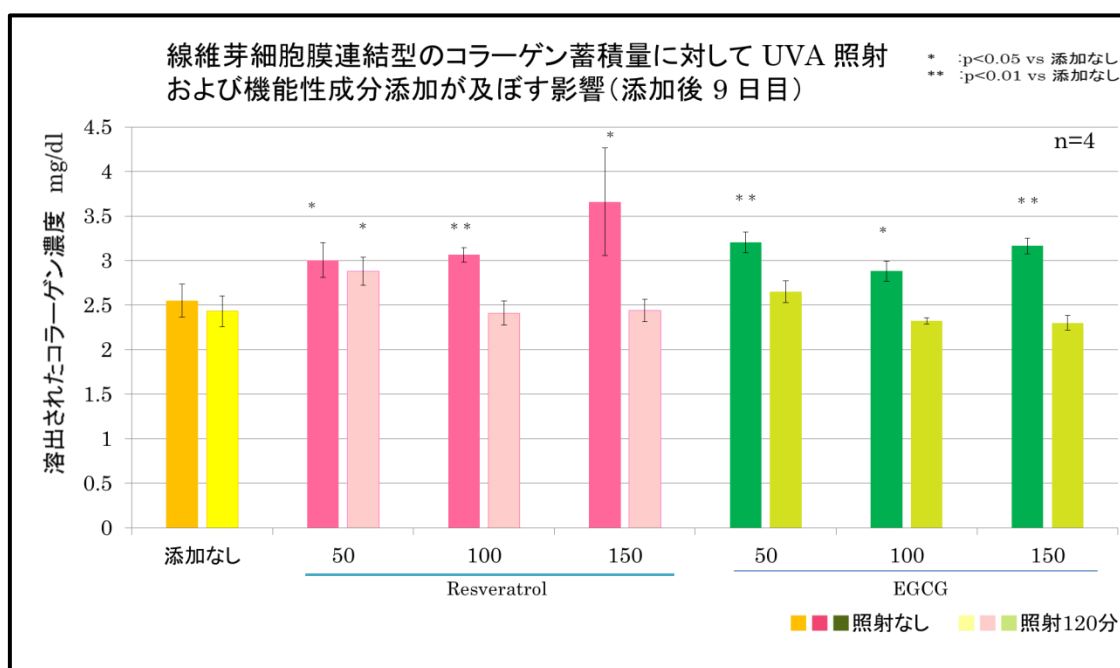
Res を添加すると、UVA (-)の細胞ではいずれの濃度においても添加なしと比較して、有意な増加がみられた (100 $\mu\text{mol/L}$: $p<0.01$ 、50、150 $\mu\text{mol/L}$: $p<0.05$)。

照射後の細胞に対しては、50 μmol/L の添加により有意な増加がみられたが (p<0.05)、より高濃度では有意な変化がみられなかった。

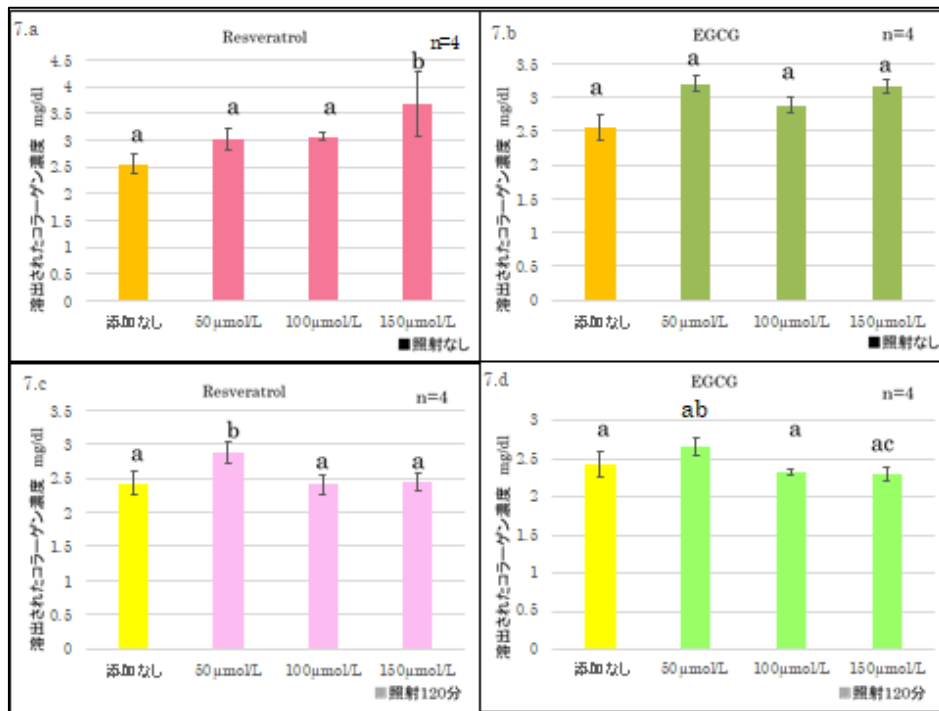
EGCG を添加するといずれの濃度においても、UVA (-)の細胞では添加なしと比較して、有意な増加がみられたが (100 μmol/L : p<0.05、それ以外 : p<0.051)、照射後の細胞では変化がみられなかった。(グラフ 6)

多重比較においては、Res の添加において照射なしでは、150 μmol/L の添加により有意な増加がみられ、照射 120 分では、50 μmol/L の添加により有意な増加がみられたが、他は変化がみられなかった。(グラフ 7.a.c)

EGCG の添加において照射なしでは変化がみられなかった。(グラフ 7.b) 照射 120 分では 50 μmol/L の添加により有意な増加がみられ、150 μmol/L の添加により有意な減少がみられた。(グラフ 7.d)

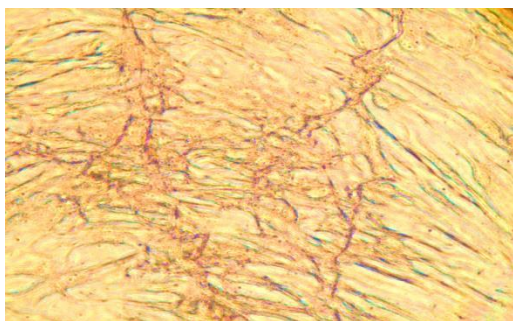


グラフ 6. 線維芽細胞膜連結型のコラーゲン蓄積に対して UVA 照射および機能性成分添加が及ぼす影響 t 検定によるグラフ UVA 照射時間 0 分 120 分 添加なしと機能性成分を添加したヒト皮膚線維芽細胞膜連結型コラーゲンの定量と比較検討



グラフ 7. 線維芽細胞膜連結型のコラーゲン蓄積に対して UVA 照射および機能性成分添加が及ぼす影響

『シリウスレッド染色によるコラーゲン細胞染色』



コラーゲンの蓄積が少ない



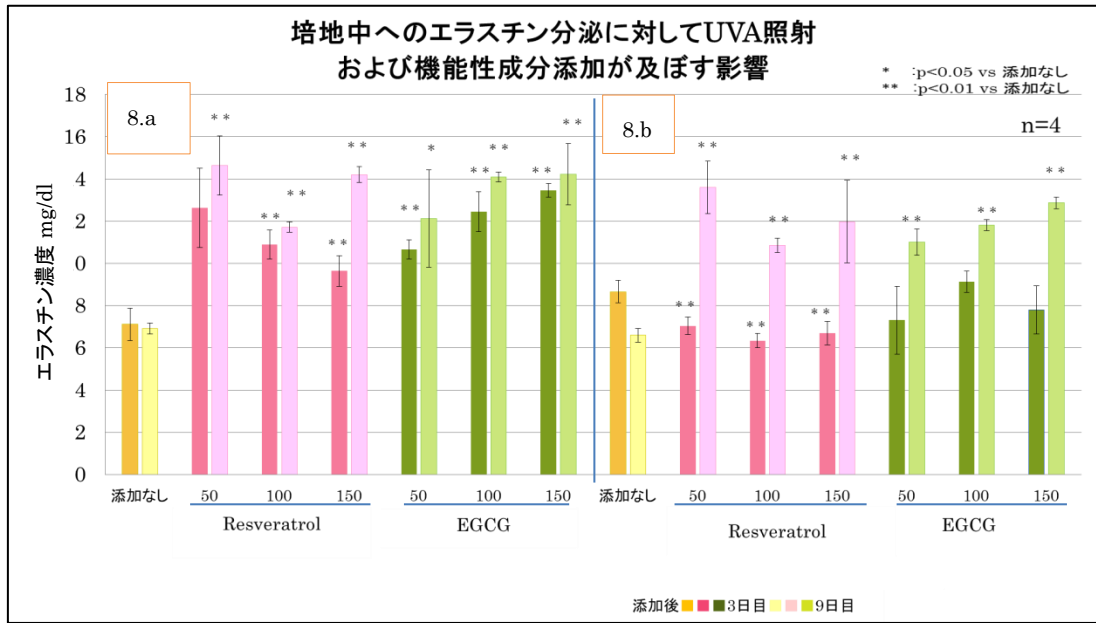
コラーゲンの蓄積が多い

図 23. 顕微鏡にてコラーゲン線維を観察

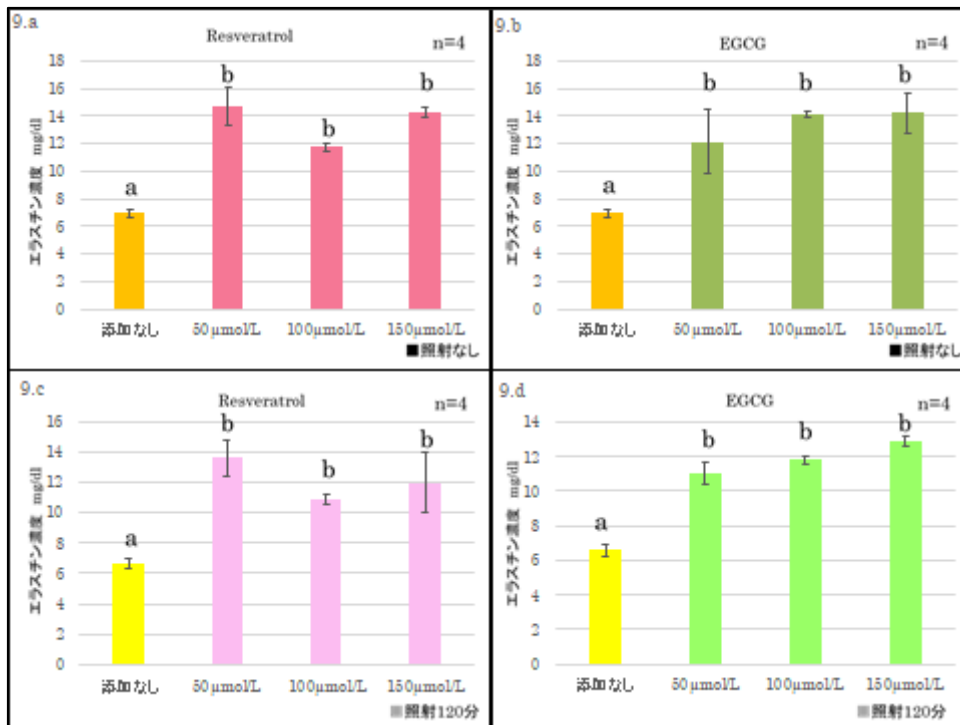
コラーゲン線維の蓄積が多いと右側のように赤く染色される。

4. ヒト皮膚線維芽細胞から培地中へのエラスチン分泌量に及ぼす影響の検討

機能性成分添加において、Day 7, 13 とともに、UVA (-) に比べて UVA 照射後に培地中へのエラスチン分泌量の減少がみられたが、添加なしでは、Day 7 において、照射後に増加がみられた。(グラフ 8)



グラフ 8. 培地中へのエラスチン分泌に対して UVA 照射および機能性成分添加が及ぼす影響
(添加後 ■ 3日目 ■ 9日目) t検定によるグラフ
添加なしと機能性成分を添加したヒト皮膚線維芽細胞からのエラスチン分泌量の推移
を比較検討



グラフ 9. 培地中へのエラスチン分泌に対して UVA 照射および機能性成分添加が及ぼす影響

1) Res 添加がエラスチン分泌量に与える影響

培地中へのエラスチン分泌量は、Res の添加は、UVA (-) の細胞に対してはいずれの濃度においても、また Day 7, 13 のいずれも有意な増加がみられた ($p < 0.01$)。照射後の細胞では、Day 7 においては有意な減少がみられ、Day 13 においては有意な増加がみられた ($p < 0.01$)。(グラフ 8)

多重比較においては、照射の有無にかかわらず、添加なしと比較して有意な増加はみられたが、濃度による変化はみられなかった。(グラフ 9 a .c)

2) EGCG 添加がエラスチン分泌に与える影響

培地中へのエラスチン分泌量は、EGCG の添加は UVA (-) の細胞においては濃度に関わらず Day 7, 13 のいずれも有意な増加がみられた(照射なしの Day 13 の $50 \mu\text{mol/L}$: $p < 0.05$ 、それ以外 : $p < 0.01$)。照射後の細胞においては、Day 7 では変化はみられなかったが、Day 13 では有意な増加がみられた ($p < 0.01$)。

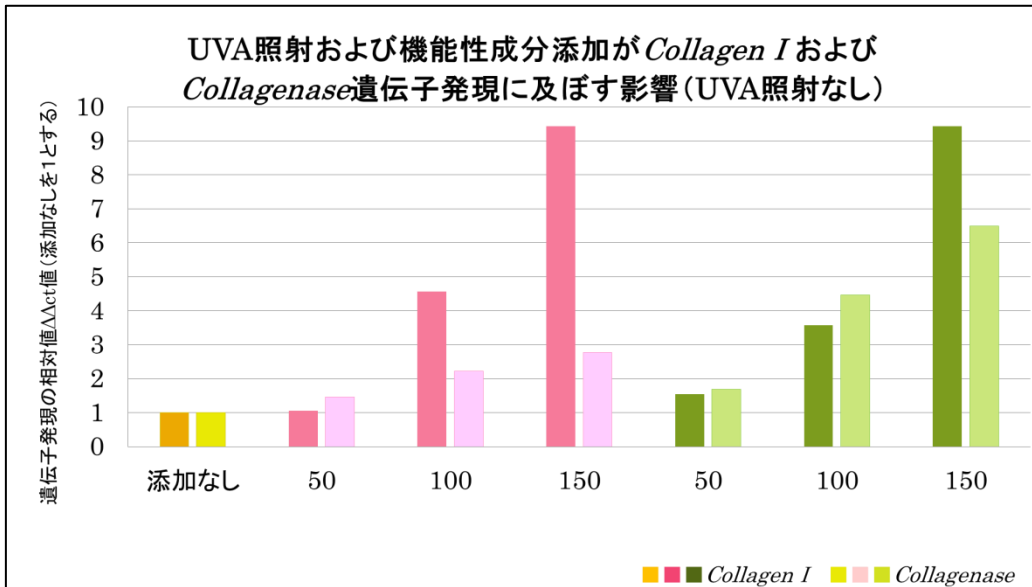
多重比較においては、添加なしと比較して、有意な増加はみられたが、濃度による変化はみられなかった。(グラフ 9 .b.d)

5. コラーゲンおよび老化関連遺伝子の遺伝子発現の測定

ノーマライザー遺伝子として *β -actin* を用い、相対定量 ($\Delta\Delta\text{ct}$ 値) によって算出した値について、添加なしを対照 1 として比較した。

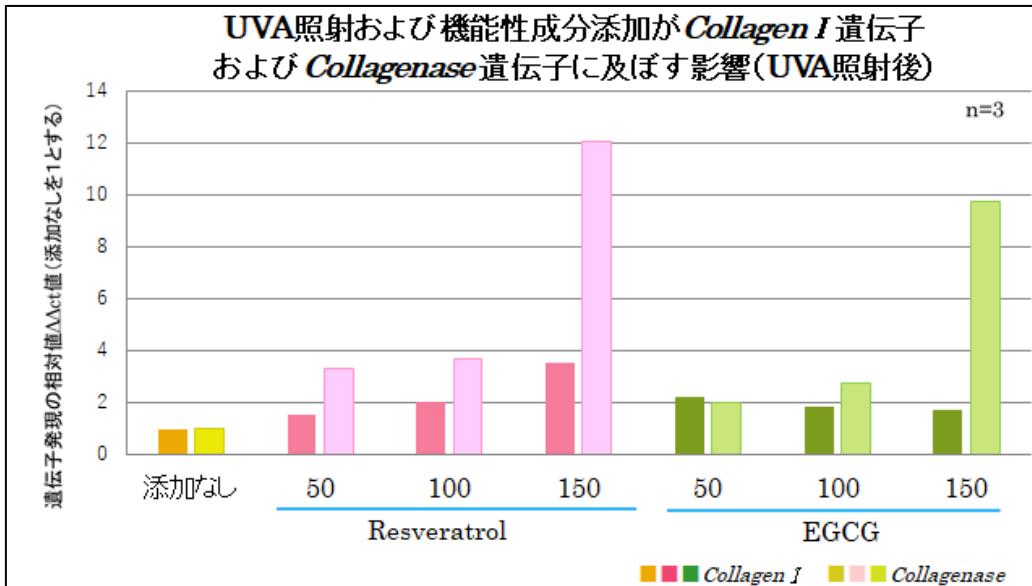
UVA (-) の *Collagen I* と *Collagen I* の分解酵素である *Collagenase (MMP1)* の遺伝子発現について、Res 100、150 $\mu\text{mol/L}$ 、EGCG 50 $\mu\text{mol/L}$ の添加において、*Collagen I* の転写の亢進が *Collagenase (MMP1)* の亢進より顕著にみられた(グラフ 10)。

一方 UVA 照射後の細胞においては、EGCG の 50 $\mu\text{mol/L}$ の添加を除いて、*Collagen I* の亢進に比べ *Collagenase (MMP1)* 発現遺伝子の亢進がみられた(グラフ 11)。



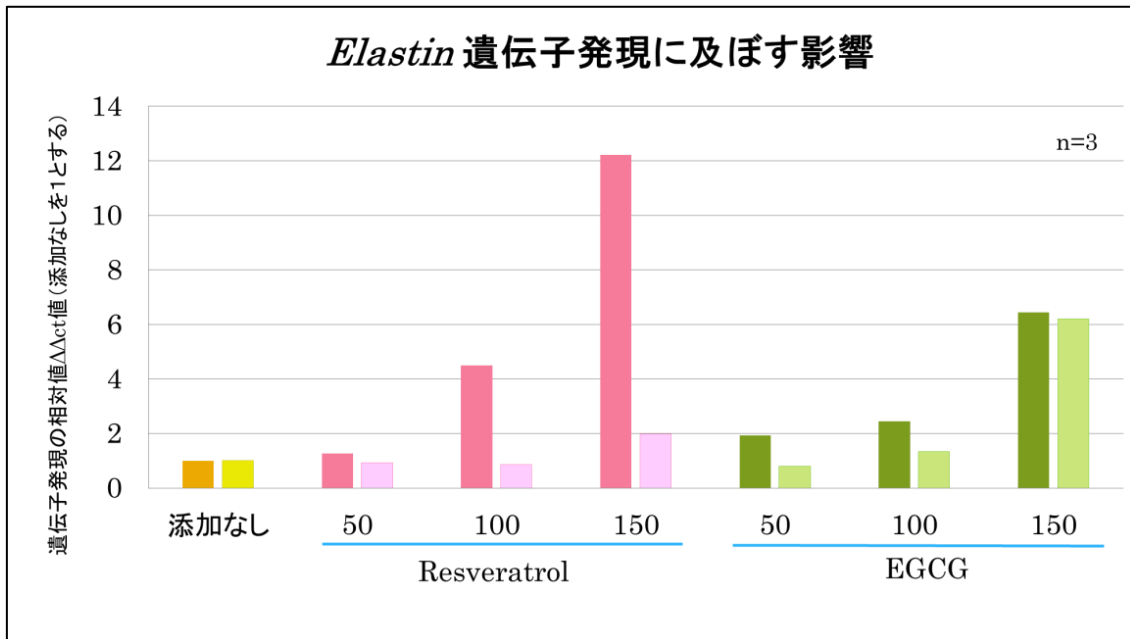
グラフ 10. UVA 照射および機能性成分添加が *Collagen I* 遺伝子および *Collagenase* 遺伝子発現に及ぼす影響 (UVA (-))

Collagen I、*Collagenase* の遺伝子発現において、添加なしを 1 とした遺伝子の相対値の比較検討 添加 9 日後



グラフ 11. UVA 照射および機能性成分添加が *Collagen I* 遺伝子 および *Collagenase* 遺伝子発現に及ぼす影響 (UVA 照射後)

Collagen I、*Collagenase* の遺伝子発現において、添加なしを 1 とした遺伝子の相対値の比較検討 添加 9 日後

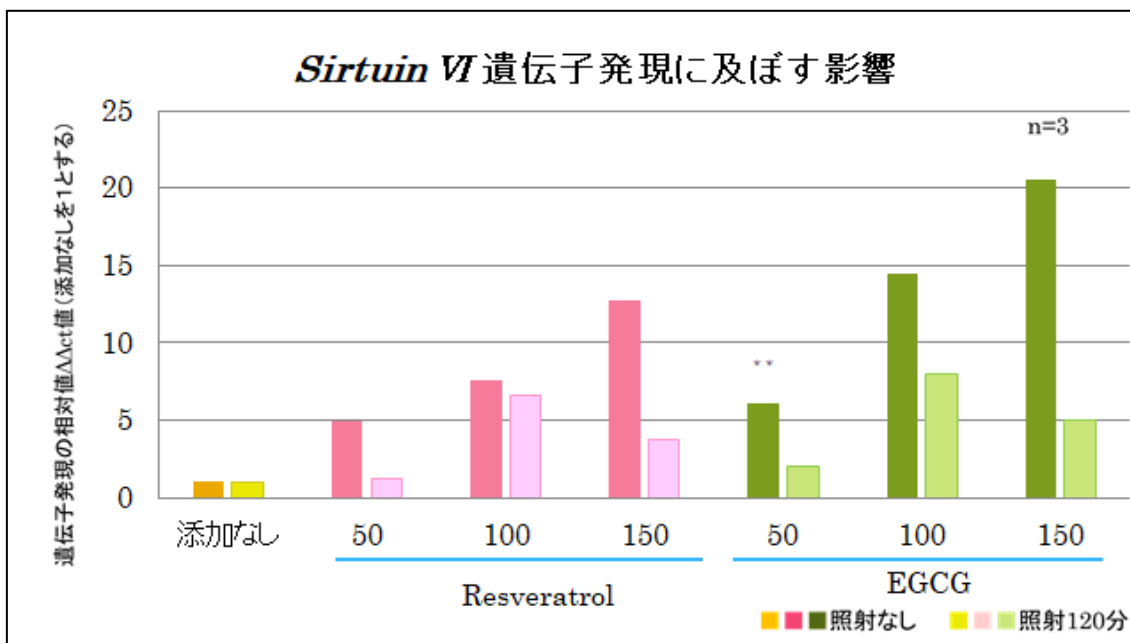


グラフ 12. *Elastin* 遺伝子発現に及ぼす影響

Elastin の遺伝子発現において、添加なしを 1 とした遺伝子の相対値の比較検討

添加 9 日後 UVA 照射時間 ■■■ 0 分 ■■■ 120 分

Elastin の遺伝子発現について、Res 100、150 μmol/L、EGCG 150 μmol/L の添加において、UVA (-)の細胞では顕著な発現の亢進がみられたが、UVA 照射後の細胞では、EGCG 150 μmol/L 以外の細胞では、顕著な発現はみられなかった(グラフ 12)。



グラフ 13. *Sirtuin VI* の遺伝子発現に及ぼす影響

Sirtuin VI の遺伝子発現において、添加なしを 1 とした遺伝子の相対値の比較検討

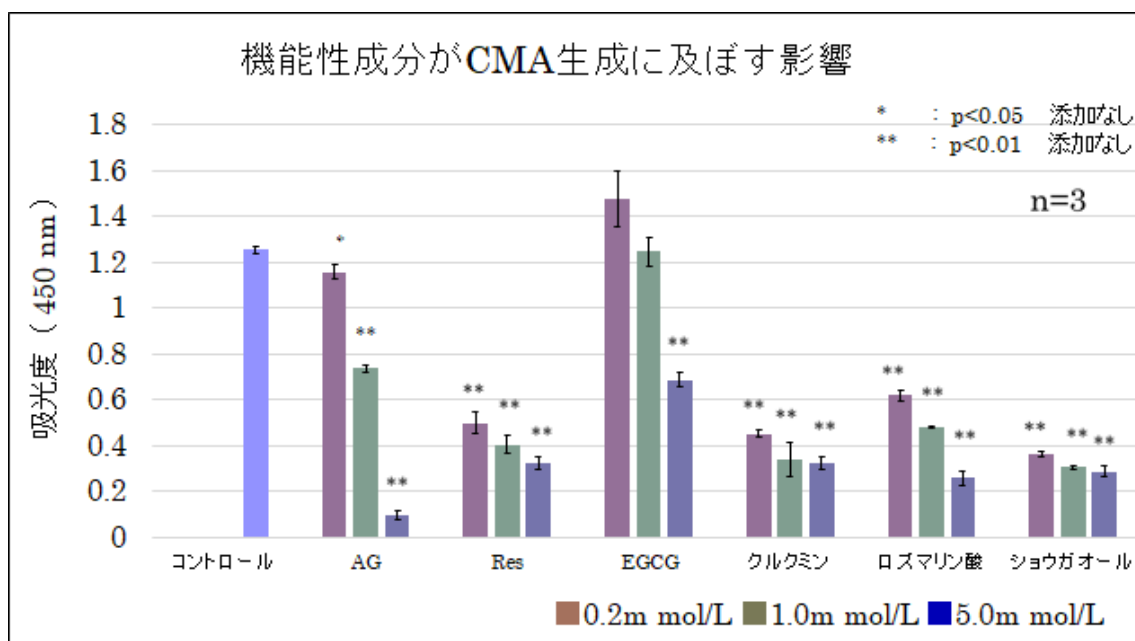
添加 9 日後 UVA 照射時間 0 分 120 分

老化関連遺伝子である *Sirtuin VI* の遺伝子発現は、UVA (-) の細胞において、Res および EGCG の添加により、いずれも著しい亢進がみられ、特に Res、EGCG の高濃度の添加において顕著であった。UVA 照射後の細胞においても UVA (-) の細胞ほど顕著ではないが、添加なしと比較し Res、EGCG の 50 μmol/L の添加を除いて、遺伝子発現の亢進がみられた。(グラフ 13)

6. コラーゲン中の CMA 糖化反応測定

糖化抑制効果があると報告されているクルクミン、ローズマリン酸、ショウガオールと同様に、Res の添加においても、コントロールと比較すると、全ての濃度で、CMA 産生の著しい抑制がみられた。添加濃度が高くなるに従って減少がみられた。

Res、クルクミン、ローズマリン酸、ショウガオールの全ての添加濃度及び、AG の 1.0 m mol/L、5.0 m mol/L、EGCG の 5.0 m mol/L の添加において、有意な減少 ($p < 0.01$)、AG の 0.2 m mol/L の添加において有意な減少 ($p < 0.05$) がみられた。また、EGCG においては、0.2 m mol/L では、コントロール以上に CMA 蓄積量 (吸光度) の増加がみられ、EGCG の 1 m mol/L がコントロールの 0 m mol/L (アミノグアニジン添加なし) とコントロールの濃度と同等程度であった。また、EGCG の 5.0 m mol/L の添加では、コントロールと比較して、減少がみられた。



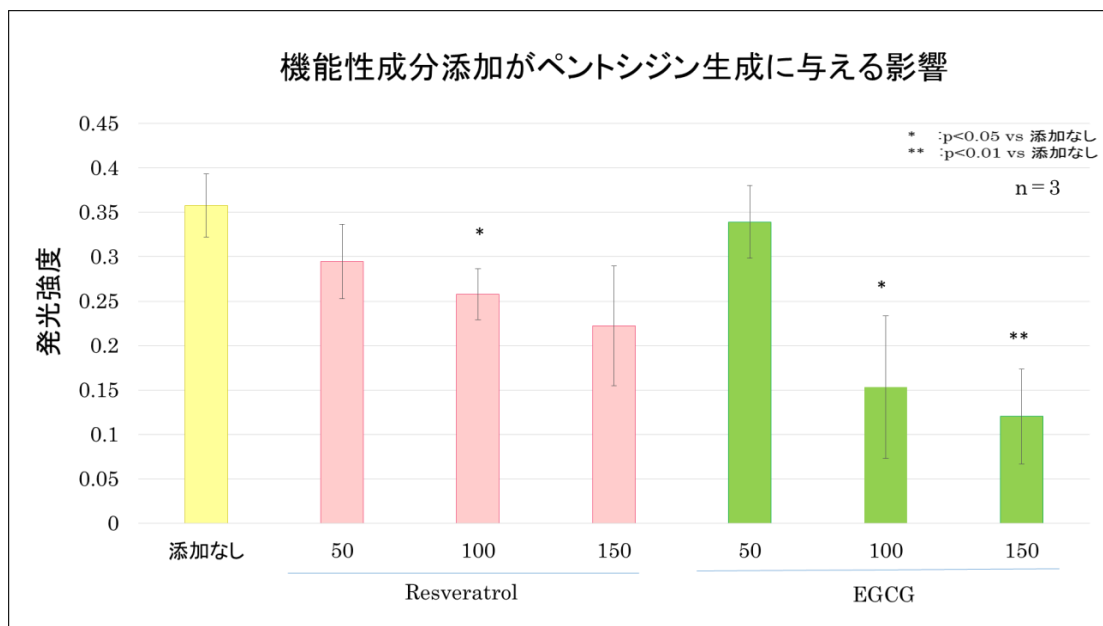
グラフ 14. 機能性成分 (Res、EGCG、クルクミン、ローズマリン酸、ショウガオール)

の添加が CMA 生成に及ぼす影響

無添加または等濃度のアミノグアニジンとの比較

■ 0 (コントロール) ■ 0.2 m mol/L ■ 1.0 m mol/L ■ 5.0 m mol/L

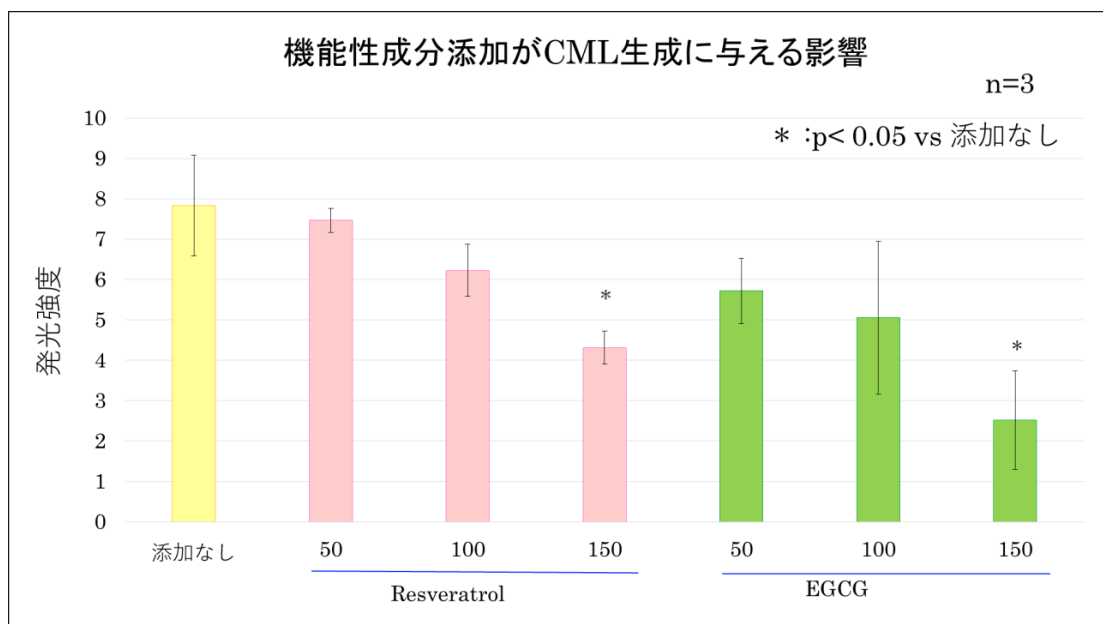
7. ウェスタンブロッティングによる測定



グラフ 15. 機能性成分添加がペントシジンの生成及び老化架橋形成に及ぼす影響

(添加なしと比較) ■ 添加なし ■ Resveratrol ■ EGCG

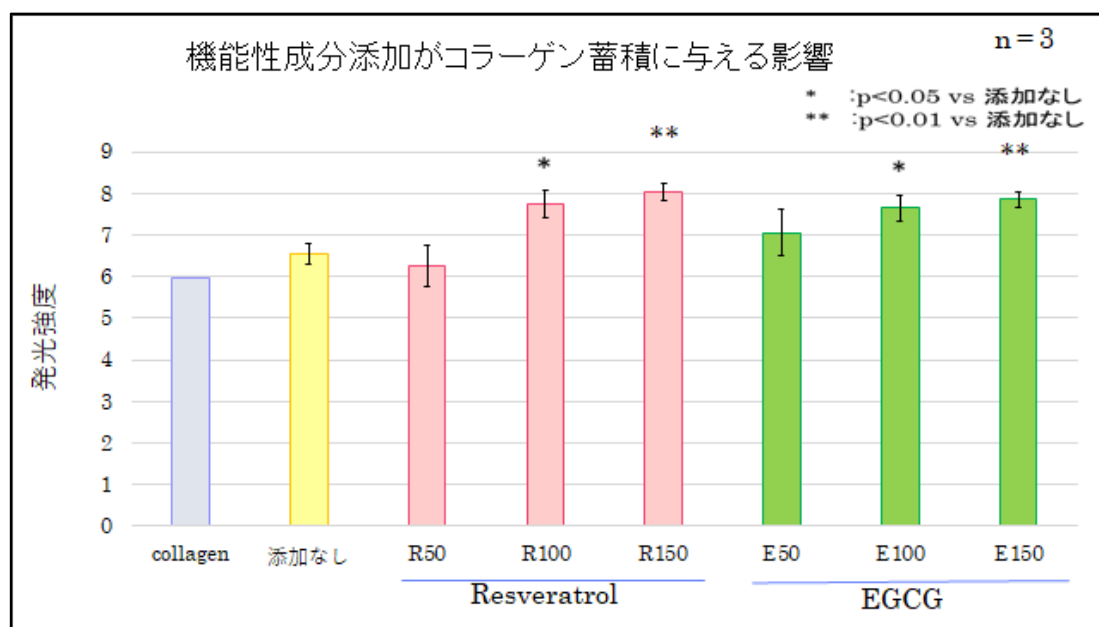
Res、EGCGともに、添加なしと比較すると、ペントシジン蓄積量の減少がみられた。特に Res、EGCG の 100 $\mu\text{mol/L}$ ($p<0.05$)、EGCG の 150 $\mu\text{mol/L}$ ($p<0.01$) の有意な減少がみられ、添加濃度が高くなるに従って減少がみられた。(グラフ 15)



グラフ 16. 機能性成分添加が CML の生成及び老化架橋形成に及ぼす影響

(添加なしと比較) ■ 添加なし ■ Resveratrol ■ EGCG

Res、EGCGともに、添加なしと比較すると、CML蓄積量の減少がみられた。特にRes、EGCGの150 μmol/L (p<0.05)の有意な減少がみられ、添加濃度が高くなるに従って減少がみられた。(グラフ 16)



グラフ 17. 機能性成分添加が添加なしと比較して、コラーゲン蓄積に及ぼす影響

■ 添加なし ■ Resveratrol ■ EGCG

Res、EGCGともに、コラーゲン標準液と比較するとコラーゲン蓄積量の増加がみられた。また添加なしと比較すると、Resの50 μmol/Lでは多少の減少がみられたが、それ以外の添加では蓄積量の増加がみられた。Res、EGCGの100 μmol/L (p<0.05)、EGCGの150 μmol/L (p<0.01)の有意な増加がみられ、添加濃度が高くなるに従って増加がみられた。(グラフ 16)

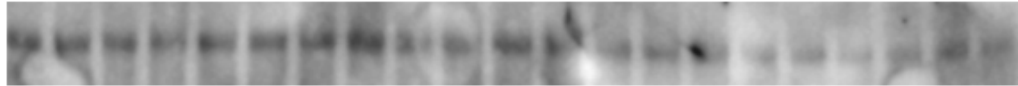
ウェスタン・ブロッティング
抗コラーゲン抗体



添加添加添加 R50 R50 R50 R100R100R100R150R150R150E50E50E50 E100E100E100E150E150E150 Mk
なしなしなし

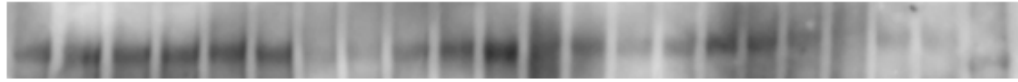
150kDa

抗ペントシジン抗体



添加添加添加 R50 R50 R50 E50 E50 E50 R100R100R100E100E100E100R150R150R150E150E150E150
なしなしなし

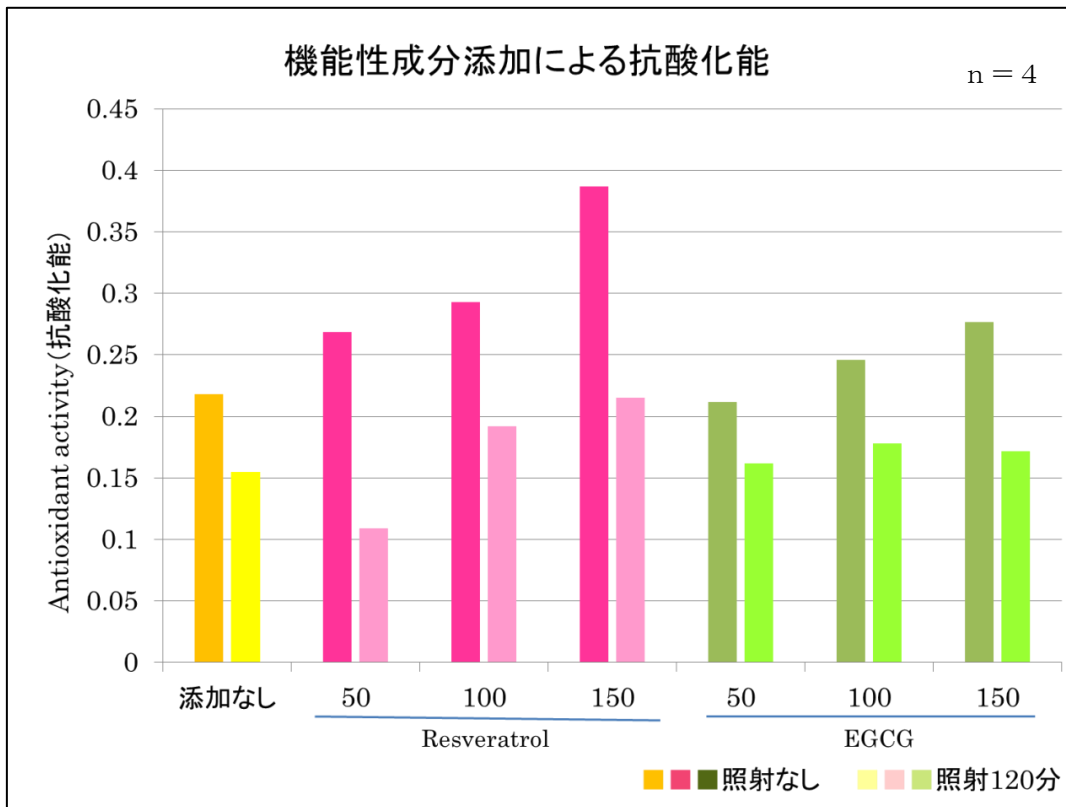
抗 CML 抗体



Mk R50 R50 R50R100R100R100 R150R150R150添加添加添加E50E50E50E100E100E100R150E150E150
なしなしなし

図 24. ウェスタンブロッティングによるコラーゲン・ペントシジン・CML 生成の観察
上段：抗コラーゲン抗体による検出. 中段：抗ペントシジン抗体による検出
下段：抗 CML 抗体による検出

分子量 15 万のコラーゲン分子の位置にペントシジン、CML を検出



グラフ 18. 機能性成分添加なしと比較して、抗酸化能による測定

抗酸化能の測定において、照射なしでは、添加なしと比較して、Res の全ての濃度の添加において、著しい抑制増加がみられ、添加濃度が高くなるに従って増加がみられ、添加なしと比較して酸化抑制がみられた。EGCG の添加においては、50 $\mu\text{mol/L}$ の添加では、添加なしと同等であったが、濃度が高くなるに従って抗酸化能の増加がみられた。

照射 120 分では、Res の添加では、50 $\mu\text{mol/L}$ の添加では、減少がみられたが、添加濃度が高くなるに従って増加がみられた。EGCG の添加では、多少の増加はみられたものの、変化はみられなかった。

第 7 章 考察

今回の結果では、培地中へのコラーゲン分泌量、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をみると、UVA 照射により減少しており、マウス胚線維芽細胞を用いて検討した我々の報告とも一致している¹²⁾。また他の研究などでも報告されているように、紫外線の影響を強く受けることが確認された¹¹⁸⁾。

Res¹¹⁹⁾ に関する研究では、Res の *Collagenase (MMP1)* との関係性を述べた報告が多くみられる。UVA (-)で Res を添加すると *Collagenase* の働きを抑制するという研究結果¹¹⁹⁾¹²⁰⁾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¹²¹⁾がある。また、UVA を照射した実験で、Res は MMP グループの *MMP-9* 遺伝子発現を減少させ、UVA 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¹²²⁾。

我々が先にマウス胚線維芽細胞を用いて行った研究では、200 μ mol/L の高濃度で Res を添加した結果、細胞膜連結のコラーゲン定量において、有意な減少がみられたことから、高濃度の添加による細胞傷害を受ける可能性があることを視野にいれ、200 μ mol/L の濃度以下の添加により比較検討を行った。200 μ mol/L 添加のマウスにおける培地中へのコラーゲン分泌量は、照射なしでは、添加後 3 日目と 9 日目を比較すると減少していたが、照射後においては、増加している結果になり、今回のヒト皮膚線維芽細胞の 50 μ mol/L の添加と同じような結果が得られた。

本研究では、Res の添加において、培地中へのコラーゲン分泌量は Res の濃度が低濃度になるに従って分泌量が増加していること、また、高濃度の添加では Day 13 に生細胞数の減少がみられることから、低濃度の添加が産生、分泌に関して有効なのではないかと推測される。

Res のサプリメントを 1 日 25mg 経口摂取した研究では、吸収率は少なくとも 70%であり、ピーク血漿レベルは 491 \pm 90 ng/mg(約 2 μ M)、血漿半減期は 9.2 \pm 0.6h であったという報告がされている¹²³⁾。我々の研究の濃度よりもかなり低濃度である。今後、このような事からさらに低濃度における検討を進めていく必要があると考えている。

本研究では、Res の添加による *Collagen I*、*Collagenase* 遺伝子発現を比較すると、UVA (-) では *Collagen I* 遺伝子発現の亢進が顕著であったが、UVA 照射後に

においては、*Collagenase* 遺伝子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。Day 7 の遺伝子は観察していないが、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。

培地中へのコラーゲン分泌量の 添加後 3 日目と 9 日目を比較すると、照射の有無にかかわらず、添加後 3 日目よりも 9 日目の分泌量の減少がみられ、Res の添加直後に活性化し、培養日数が長くなるに従って失われていくのではないかと推測される。またそれに反して、培地中へのエラスチン分泌量は、照射の有無にかかわらず、添加後 3 日目よりも 9 日目の分泌量の増加がみられることから、培養日数が長くなるに従ってエラスチン添加の影響を受け活発に分泌されるのではないかと推測される。

細胞内において膜結合型のリポソームで合成されるコラーゲンポリペプチド鎖は、小胞体の内腔に送り込まれ、ER 膜内腔に蓄積されて、プロコラーゲン（前駆体）として生成され、細胞外に分泌される¹²⁴⁾。生体内のコラーゲンは、細胞外で線維を形成することをもって最終段階とし、線維状として存在することを特徴としている¹²⁵⁾。本研究では、細胞内輸送と細胞外への分泌の両方の機能性成分添加による影響を測定することとした。

加齢とともにコラーゲンの代謝回転が遅くなり皮膚の強靭性、弾力性が失われていくことは知られている¹²⁶⁾。コラーゲンの代謝回転が活発に行われることによって、弾力の維持、老化の遅延が期待できるのではないかと考えられる。

本研究の線維芽細胞膜結合型コラーゲン蓄積量は、*Collagen I* の発現が亢進して合成されたコラーゲンのうち培地中に分泌されずに細胞膜などに結合して残っている部分と考えられる。分泌のプロセスを観察していないが、活発に合成が亢進し、細胞外への分泌が亢進したために、結合して残る量が少なかったのではないかと考えられる。

Res の添加による培地中へのコラーゲン分泌量は、照射の有無にかかわらず、添加濃度が高くなるに従って減少していた。それに反比例して、*Collagen I*、*Collagenase* 遺伝子発現では、照射の有無にかかわらず、添加濃度が高くなるに従って亢進がみられた。特に UVA 照射後の培地中への分泌量の減少は低濃度になるに従って著しいのに対し、UVA 照射後の遺伝子発現では、添加濃度が高くなるに従って、*collagenase* 遺伝子の発現が、*Collagen I* 遺伝子の発現の亢進以上に著しい結果であったことから、*Collagenase* 遺伝子により、*Collagen I* 遺伝子の分泌以上に代謝が促進し培地中への分泌量に影響を与えているのではないかと示唆される。

遺伝子発現において、UVA 照射の有無にかかわらず、*Elastin* および *Sirtuin VI* においても、Res の添加濃度が高くなるほど亢進がみられた。

カテキン類に関しては、紫外線誘発 DNA 損傷を修復¹²⁷⁾、保護¹²⁸⁾する能力を亢進

させるとの研究や、皮膚を紫外線による形態的損傷から保護する働きがあるという研究¹²⁹⁾¹³⁰⁾、また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がある¹³¹⁾。

本研究では、EGCG の添加により *Collagen I*、*Collagenase*、*Elastin*、*Sirtuin VI* の遺伝子発現は、UVA 照射の有無にかかわらず、高濃度になるに従って増加、亢進の傾向がみられた。高濃度の添加では照射により、*Collagen I*以上に *Collagenase* 遺伝子の著しい亢進がみられたことから、高濃度の添加では、コラーゲンは合成以上に分解が活発化している可能性が示唆された。

EGCG 添加による培地中へのコラーゲン分泌への影響は、照射無しの細胞においては添加 3 日目で見られた分泌の増加が、9 日目では添加濃度により違いが見られたのに対し、照射後の細胞においては 3 日目も 9 日目も分泌の増加が見られ、照射による傷害への修復への効果があることが考えられた。

EGCG の添加においては、培地中へのエラスチン分泌量は、照射の有無にかかわらず、添加後 3 日目よりも、添加後 9 日目に培地中への分泌量は有意な増加がみられることから、培養日数が長くなるに従って、代謝回転が活発になり添加の影響を受けて、分泌量が増加するのではないかと推測される。

Sirtuin は長寿遺伝子として知られているが、マウスにおいて *Sirtuin VI* の損失が真皮中のコラーゲン線維の減少につながり、コラーゲン合成に影響を与えることを示唆している報告がある¹⁵⁾。

Res, EGCG は *Sirtuin VI* 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、*Sirtuin VI* の発現亢進を介している可能性も考えられる。

今後、*Collagenase* および *Eastase* についてのタンパク質レベル（タンパク質量または酵素活性）での検討、また、他の長寿遺伝子についても検討を進める必要がある。さらに、コラーゲンの老化には糖化や酸化による老化架橋の形成も重要である。機能性成分添加が糖化産物の生成に与える影響などについても解析を行うことを予定している。

糖化において、クルクミン、ローズマリン酸、ショウガオールなど糖化抑制作用など報告されているが、今回 Res による CMA 生成阻害活性が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効果が期待できるのではないかと推測される。また EGCG は、7 日間の孵置により、それ自体の着色がみられることから、糖化の

抑制についての評価は困難であった。

ウエスタンブロッティングによるペントシジン、CML 蓄積量の測定結果から、EGCG の 50 μ mol/L の濃度の添加では、添加なしと比べて変化がみられなかったが、その他の 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ないかと示唆された。

抗酸化能の測定において、照射なしにおいて、特に Res の添加においては著しい増加がみられたことから、Res および EGCG において、抗酸化抑制の可能性が示唆された。

今後、*Collagenase* および *Elastase* についてのタンパク質レベル（タンパク質量または酵素活性）での検討、また、他の長寿遺伝子についても検討、解析を行うことを予定している。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、また本研究を進めるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました 実践女子大学 生活科学研究科 臨床栄養学研究室 松島 照彦教授、生活基礎化学研究室 山崎 壮教授、栄養生化学研究室 中村 彰男教授始め、学科の諸先生方には、心より深甚なる謝意を申し上げます。

また、特別研究生の富重 慶子さん、助手の阿部 祥子さんには、本研究を進める上でお力添えを賜り、深く御礼申し上げます。

またつらい時に心の支えとして寄り添い、優しさと安らぎ、そして多大なるご支援をしてくださいました、家族、友人、仕事先の皆様には心から感謝いたします。

【参考文献】

- 1) Bernard L Strehle: Time cells and aging. Academic Press, New York: 12-17, 1962
- 2) Masamitsu Ichihashi : Photoaging of the skin . Anti-Aging Medicine, 6 (6): 46-59, 2009
- 3) M.Yaar,B: Photoaging : mechanism , prevention and therapy . Bitish Journal of Dermatology. 157: 874-887, 2007
- 4) Nemoto S,et: Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway . Science. 306 (5704): 2105-2108, 2004
- 5) 池谷宗大、他 : ヒト皮膚線維芽細胞に対する長期 UVA 照射の作用—増殖および細胞外マトリックス形成に及ぼす影響— . J Soc. Cosmet. Chem.Jpn. 33 (3): 267-276, 1999
- 6) Chen B: Astragaloside 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
- 7) Nakayai W,et,al: Effects of Repeated UVA Irradiation on Human Skin Fibroblasts Embedded in 3D Tense Collagen Matrix.Photochem Photobiol . 94 (4): 715-724, 2018
- 8) Yuan Shao: Molecular basis of retinol anti-aging properties in naturally aged human skin in vivo. Int J Cosmet Sci. 39 (1): 56-65, 2017
- 9) Nichols JA: Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. Arch Dermatol Res. 302 (2): 71-83, 2010
- 10) Xiaoming Liu: Protective effect of curcumin against ultraviolet A irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts. Mol Med Rep. 17 (5): 7227-7237, 2018
- 11) 金辰也、他 : 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
- 12) 青木敦子、他 : 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.実践女子大学生生活科学部 紀要 、 56 : 23-30 , 2019
- 13) Bernerd F: UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces

- apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. *Cell Death Differ.* 5 (9): 792-802, 1998
- 14) Joseph A Baur, Kevin J Pearson, Nathan L Price, Hamish A Jamieson, Carles Lerin, Avash Kalra, Vinayakumar V Prabhu, Joanne S Allard, Guillermo Lopez-Lluch, Kaitlyn Lewis, Paul J Pistell, Suresh Poosala, Kevin G Becker, Olivier Boss, Dana Gwinn, Mingyi Wang, Sharan Ramaswamy, Kenneth W Fishbein, Richard G Spencer, Edward G Lakatta, David Le Couteur, Reuben J Shaw, Placido Navas, Pere Puigserver, Donald K Ingram, Rafael de Cabo, David A Sinclair: Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 444 (7117): 337-342. 2006
- 15) Yang Baohua: Effect of SIRT6 Silencing on Collagen Metabolism in Human Dermal Fibroblasts. *Cell Biol Int.* 36 (1): 105-108, 2012
- 16) Ronald A, McCord, Eriko Michishita, Tao Hong, Elisabeth Berber, Lisa D Boxer, Rika Kusumoto, Shenheng Guan, Xiaobing Shi, Or Gozani, Alma L, Burlingame, Vilhelm A Bohr, Katrin F Chua, SIRT6 stabilizes DNA-dependent Protein Kinase at chromatin for DNA double-strand break repair, *Aging.* 1 (1): 109-121, 2009
- 17) Tiara L A, Kawahara Eriko Michishita, Adam S Adler, Mara Damian, Elisabeth Berber, Meihong Lin, Ron A McCord, Kristine C L Ongaiqui, Lisa D Boxer, Howard Y Chang, Katrin F Chua, SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.* 136 (1): 62-74, 2009
- 18) Lei Zhong, Agustina D'Urso, Debra Toiber, Carlos Sebastian, Ryan E Henry, Douangson D Vadysirisack, Alexander Guimaraes, Brett Marinelli, Jakob D Wikstrom, Tomer Nir, Clary B Clish, Bhavapriya Vaitheesvaran, Othon Iliopoulos, Irwin Kurland, Yuval Dor, Ralph Weissleder, Orian S Shirihai, Leif W Ellisen, Joaquin M Espinosa, Raul Mostoslavsky. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha, *Cell*, 140(2) : 280-293, 2010
- 19) 井家 益和、畠 賢一郎、ヒト皮膚細胞の採取・培養法. *Organ Biology*, 22 (1): 57-65, 2015
- 20) 清水 宏、新しい皮膚科学 第2版、中山書店 : 13-17, 2011

- 21) Kligman A M, Early destructive effect of sunlight on human skin. J AMA.210: 2377-2380, 1969
- 22) Farage M A, Miller K W, Elsner P, Maibach H I. Intrinsic and extrinsic factors in skin aging . A review. Int. J. Cosmet. Sci, 30: 87-95 , 2008
- 23) Bannister LH (ed): *Gray's anatomy*, 38th ed, London, Churchill Livingstone Skin, In:, 376-418. 1995,
- 24) 皮膚の老化, 52-68
- 25) 今山修平 ; シワの基礎知識－発生機序と組織学－日本美容皮膚科学会誌、13 :138-145.2003
- 26) 酒井康夫.皮膚浸透性コラーゲン・トリペプチド (CTP) の機能えいと有用性、日本写真学会誌. 67 (4): 397-401,2004
- 27) 桑水流理、サウトン ジャリヤボーン、吉川暢宏 .力学的視点から見た肌の老化とシワの関係。生産研究 研究速報 59(2) :124-127.(2007)
- 28) Gniadecka M:Effect of Aging on Dermal Echogenicity . Skin Res .Technol.7:204-207 .2001
- 29) Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M, Imokawa G :Age-related Changes in the Elastic Properties and Thickness of Human Facial Skin .Br J Dermatol.131 :641-648.1994
- 30) 正木 仁、シワのサイエンス～成因から改善アプローチまで～抗老化のレビュー、日本化粧品学会誌、 37 (1) : 11-16 , 2013
- 31) Jurkiewicz B A, Buettner G R. EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: Mouse versus human. Photochem. Photobiol, 64: 918–922, 1996
- 32) Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation . Biochem. Biophys. Res. Commun., 206: 474–479 , 1995
- 33) Valencia A, Kochevar I E. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. J. Invest. Dermatol, 128: 214–222, 2008
- 34) Masaki H, Okano Y, Sakurai H. Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. Biochim. Biophys. Acta, 1428: 45–56,1999

- 35) Wolf P, Yarosh D B, Kripke M L.: Effects of sunscreens and a DNA excision repair enzyme on ultraviolet radiation-induced inflammation, immune suppression, and cyclobutane pyrimidine dimer formation in mice. *J. Invest. Dermatol*, 101: 523–527, 1993
- 36) Beehler B C, Przybyszewski J, Box H B, Kulesz-Martin M F, Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis*, 13: 2003–2007, 1992.
- 37) 佐用 哲也、しわのメカニズム. *ファルマシア*. 44 (5): 421-425, 2008
- 38) 池谷 宗大、松永 由紀子、西山 敏夫、福田 寶、高松 翼、ヒト皮膚線維芽細胞に対する長期 UVA 照射の作用～増殖および細胞外マトリックス形成に及ぼす影響～. *J.Soc.Cosmet. Chem.Jpn.* 33 (3): 267-276, 1999
- 39) J G SMITH Jr, E A DAVIDSON, W M SAMS Jr R D CLARK. Alterations in human dermal connective tissue with age and chronic sun damage *J Invest Dermatol* 39: 347-350, 1962
- 40) A M Kligman. Early destructive effect of sunlight on human skin. *JAMA*. 210 (13): 2377-2380, 1969
- 41) 野津 敬一、太陽紫外線 (UV-A , -B) の生物学的諸作用について .*J. Soc .Cosmet. Chem.Jpn.* 31 (1): 14-30, 1997
- 42) 和田正汎、長谷川忠男：コラーゲンとゼラチンの科学—食品に活かして楽しむ—。株式会社建帛社：3-9 (2011)
- 43) 入村達郎、岡山博人、清水孝雄：ストライヤー 基礎生化学 . 株式会社東京化学 同人 . 第1版：50-51 (2010)
- 44) Gorfon M K, Hahn R A. Collagens, *Cell Tissue Res*. 339 (1): 247-257, 2010
- 45) 中邨 智之：生体の伸縮性を生み出す仕組み—弾性線維形成の分子機構—、*日本化粧品学会誌*、43 (1)：14-17 . 2019
- 46) 芋川 玄爾：シワのメカニズムと予防：光老化によるシワの形成機序とその予防 . *Skin Cancer*. 18 (2): 157-164, 2003
- 47) Eri Shiratsuchi, Megumi Ura, Misako Nakaba, Iori Maeda, Kouji Okamoto : Elastin peptides prepared from piscine and mammalian elastic tissues inhibit collagen-induced platelet aggregation and stimulate migration and proliferation of human skin fibroblasts. *J Pept Sci* 16 (11):652-658, 2010
- 48) Kasamatsu S , Hachiya A , Fujimura T , Sriwiriyant P , Haketa K , Visscher

- M O , Kitzmuller W J ,
- 49) 正木 仁、環境因子が皮膚老化へ及ぼす影響 日本化粧品学会誌 、 43 (2) : 109-112 ,2019
 - 50) Rosenbloom J, Abrams W R, Mecham R. Extracellular matrix 4: The elastic fiber .FASEB J. 7 :1208-1218 , 1993
 - 51) Smith Mungo L, Kagan H M: Lysyl oxidase: Properties, regulation and multiple functions in biology. Matrix Biol. 16: 387-398, 1998
 - 52) Reiser K , McCormick R J , Rucker R B : Enzymatic and nonenzymatic cross - linking of collagen and elastin . FASEB J. 6: 2439-2449, 1992
 - 53) Lucero H A , Kagan H M : Lysyl oxidase : An oxidative enzyme and effector of cell function . Cell Mol Life Sci.63:2304-2316 (2006)
 - 54) I.E.GuidaM.CodiniC.A.PalmeriniC.FiniC.LucarelliA.Floridi . Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of desmosines in tissues. Journal of Chromatography A .507: 51-57.1990
 - 55) Wang S X ,Mure M ,Medzihradzsky K F ,Burlingame A L ,Brown D E ,Dooley D M ,Smith A J ,Kagan H M ,Klinman J P : A crosslinked cofactor in lysyl oxidase : Redox function for amino acid side chains . Science. 273: 1078-1084, 1996
 - 56) 多島 新吾 : Photocrosslinking と弾性線維 . Inflammation and Regeneration .29 (1) : 63-65 , 2009
 - 57) Han, S. and Tanzer, M. L , J.Biol .Chem 、 251 : 5779-5785
 - 58) 須山亨三 : 動物体結合組織タンパク質の架橋構造と機能 、 化学と生物 、 29 (2) : 90-98
 - 59) M.L.Tanzer : Science , 189 : 561 ,1973
 - 60) 松村勇一 : コラーゲン線維の形成と成熟、 Collagen Symposium , X : 47-60 ,1973
 - 61) 藤本大三郎 : 結合組織の加齢と架橋結合、 Connective Tissue 、 16(1) : 25-28 ,1984
 - 62) Franzblau, C, Kang, A. H., Faris , B.:ibid , 40 : 437 , 1970
 - 63) 藤本大三郎 、 永井裕 : コラーゲン代謝と疾患 、 株式会社講談社 : 69-85 , 1984
 - 64) Jeanmaire C : Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing.an in vivo and in vitro model study 、 Br.J.Dermatol 、 145 : 10-18 , 2001
 - 65) 広瀬 統 、 永瀬健一 、 伊藤三明 、 岡田富雄 : コラーゲンの架橋に及ぼす生薬エキスの効果 . J. Soc. Cosmet. Chem.Jpn .、 26 (4) : 289-294 , 1993

- 66) Goldin A , Beckman JA , Schmidt AM , Creager MA : Advanced glycation end products:spiking the development of diabetic vascular injury 114 (6) : 597-605 , 2006
- 67) Nagai R , Mori T , Ymamooto Y , Kaji Y , Yonei Y , Significance of advanced glycation end products in aging-relatd disease.Anci-Aging Medicine , 7 : 112-119 , 2010
- 68) 米井嘉一、八木雅之、糖化とアンチエイジング、総合健診、39 (5):596-600, 2012
- 69) 八木雅之、一色香那、高部雅子、石崎香、米井嘉一：高速液体クロマトグラフィ(HPLC)によるヒト血漿中ペントシジンの測定：Glycative Stress Reserch . 5 (2) : 119-128 , 2018
- 70) Yazaki K, Nagai R, Horiuchi S .: Creatine plays a direct role as a protein modifier in the formation of a novel advanced glycation end product . *J. Biochem.* 132 : 543-550 , 2002
- 71) Dyer DG , Blackledge JA , Thorpe SR.Formation of pentosidin during noenzymatic browning of proteins by glucose.*J Biol Chem* 266 : 11654-11660 , 1991
- 72) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K: Glycation stress and photo-aging in skin.*Anti-Aging Medicine.* 8 : 23-29 , 2011
- 73) 吉村和修、細谷龍男、山本博：AGE 特異的受容体(RAGE)、糖尿病 48 (6) : 411-414 , 2005
- 74) Maayuki Yagi, Yoshikazu Yonei: Glycative stress and anti-aging:7. Glycative stress and skin aging , *Glycativ Stress Reserch* , 5 (1) : 50-54 , 2018
- 75) Andrea IS , Loredana S , Ovidiu IG : .RAGE and TGF- β 1 , cross-talk regulate extracellular matrix turnover and cytokine synthesis in AGEs exposed fibroblast cells.*PLoS One* , 11 : e152376 ,2016
- 76) Verzijl N: Effect of collagen turnover on accumulation of advanced glycation end products, *J Biol. Chem* , 274 (50) : 39027-39031 ,2000
- 77) Jeanmaair C : Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing:an in vivo and in vitro model study , *Br , J.Dermatol* , 145 : 10-18 , 2001
- 78) 藤本大三郎：未来の生物化学シリーズ 32 コラーゲン、共立出版：110, 1994

- 79) Dunn JA, McCance DR, Thorp SR: Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen . *Biochemistry*. 30 : 105-1210 , 1991
- 80) D G Dyer , J A Dunn , S R Thorpe , K E Bailie , T J Lyons , D R McCance , J W Baynes , Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging . *J Clin Invest*. 91 (6) : 2463–2469 , 1993
- 81) Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM: Advanced glycation end products enhance expression of proapoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem*. 280 : 12087-12095 , 2005
- 82) Alikhani M , Maclellan CM , Raptis M : .Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS , MAP kinases , and the FOXO1 transcription factor.*Am J Physiol Cell Physiol* .292 : 850-856 , 2007
- 83) Masayuki Yagi, Kana Isshiki, Wakako Takabe, Kaori Ishizaki, Yoshihiko Yonei. : Measurement of pentosidine in human plasma by the high performance liquid chromatography , *Glycative Stress Reserch* .5 (2) : 119-128 , 2018
- 84) Spacek P, Adam M, Pentosidine in adteoarthritis: HPLC determination in body fluids and in tissues. *Rheumatol Int*. 26 : 923-927 ,2006
- 85) Sivan SS, Tsitron E, Wachtel Em: Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate fuman intervertebtal discs.*J Biochem* .399 : 29-3 , 2006
- 86) Katsumasa IJIMA, Michio MURATA, Hidenari TAKAHARA, Shinkichi IRIE , Daisaburou FUJIMOTO : Identification of Nε-carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagn . *Biochem J*. 347 : 23-27 , 2000
- 87) Hudson, D.M, Archer M, King K.B, Eyre D. R.: Glycation of Type I Collagen Selectively Targets the Same Helical Domain Lysine Sites as Lysyl Oxidase–mediated Cross-linking, *J. Biol. Chem*. 293 (40) : 15620–15627 , 2018
- 88) Bansode S, Bashtanova U, Li, R, Clark J, Müller K.H. Puzkarska A, Goldberga I, Chetwood H.H, Reid D.G, Colwell L.J, Skepper J.N, Shanahan C.M, Schitter G. Mesquida P, Duer M.J. Glycation Changes Molecular Organization and Charge Distribution in Type I Collagen Fibrils , *Sci. Rep.s* , 10

- (1) : 3397 ,2020
- 89) Klar A J S: Genetics, 93 : 37-50 , 1979
- 90) 來生 (道下) 江利子 : SIRT 6 と代謝・老化
- 91) Imai , S , Armstrong, C, Kaberlein, M, and Guarente, L: Transcription
Silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase,
Nature, 403 (6771): 795-800, 2000
- 92) 千葉 卓哉、老化学・病理学 人間科学のためのライフサイエンス入門、コロナ社 :
30-40 , 2016
- 93) Konrad T Howitz , Kevin J Bitterman , Haim Y Cohen Dudley W Lamming
Siva Lavu, Jason G Wood, Robert E Zipkin, Phuong Chung, Anne Kisielewski,
Li-Li Zhang, Brandy Scherer , David A Sinclair . Small molecule activators of
sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan
- 94) Baur, J, A, Pearson, K, J, Price, N, L, Jamieson, H, A, Lerin, C, Kalra, A,
Prabhu, V, V, Allard, J, S, Lopez-Lluch, G, Lewis, K, Postell, P, J, Poosala, S,
Becker, K, G, Boss, OGwinm, D, Wang, M, Ramaswamy, S, Fishbein, K, W,
Spencer, R, G, LakattaEZ, G, Le Couteur, DShaw, R, J, Navas, P, Puigserver,
P, Ingram, D, K de Cabo, R, and Sinclair, D, A: Resveratrol improves health and
survival of mice on a high-calorie diet , Nature , 444 (7117) : 337-342 , 2006
- 95) 道下 江利子 、サーチュインと老化 、基礎老化研究 、 37 (1) :1-6 , 2013
- 96) Imai S, Guarente L: Ten years of NAD-dependent SIR 2 family deacetylases:
implications for metabolic diseases. Trends Pharmacol Sci. 31 (5) :
212-220 ,2010
- 97) BOrdone L Cohen D, Robinson A: SIRT 1 transgenic mice show phenotypes
resembling calorie restriction Aging Cell. 6 (6):759-767 (2007)
- 98) Hirschey MD: SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible
enzyme deacetylation. Nature. 464(7285):121-125, 2010
- 99) Michishita E, Park J Y, Burneskis JM: Evolutionarily conserved and
nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. Mol
Biol Cell. 16 (10): 4623-4635 , 2005
- 100) Du J, Zhou Y, Su X: Sirt 5 is a NAD-dependent protein lysine
demalonylase and desuccinylase. Science. 334 (6057): 806-809 , 2011

- 101) Michishita E, MeCord RA, Boxer LD : Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H 3 lysine K 56 by human SIRT 6 .Cell Cycle . 8 (16): 2664-2666
- 102) McCor RA, Michishita E, Hong T, et al. SIRT 6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. Aging .1 (1) : 109-121 ,2009
- 103) 久保田俊介、石田晋 : レスベラトロールの可能性、 Functional Food 3 (2) : 155-160, 2009
- 104) 久保田俊介、坪田一男 : カロリスミミックリー、レスベラトロールのサイエンス. アンチ・エイジング医学—日本抗加齢医学会雑誌 5 (5) : 32-36 , 2009
- 105) MCay CM, Crowell MF, Maynard LA: The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size . Nutrition 5 : 155-172 , 1989
- 106) Guarente L, Kenyon C: Genetic pathways that rgulat ageing in model organisms. Nature. 408: 255-262, 2000
- 107) Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY : Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Mature . 425 : 191-196 , 2003
- 108) Baur JA. Sinclair DA: Therapeutic potential of resveratrol :the vivo evidence. Nat Rev Drug Discov 5: 493-506 , 2006
- 109) Nichols JA, Katiyar SK, Skin photoprotection by natural Polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. Arch. Dermatol, Res . 302: 71-83 , 2010
- 110) Ohguchi K , Itoh T , Akao Y , Inoue H , Nozawa Y , Ito M ., SIRT 1 modulates expression of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts . Br. J. Dermatol .13: 689-694, 2010
- 111) 宮瀬 敏男: 緑茶に含まれるカテキンの化学的特性—カテキンの種類および含有量 . Functional Food、 8 (1) : 4-9 , 2014
- 112) Igarashi K , Suzuki O , Hara Y : Compariosn of the protective effects of

- epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, and epicatechin on paraquat-induced oxidative stress in rats . *Food Sci Technol Res* 5:69-73 , 1999
- 113)五十嵐 善治：非栄養素ポリフェノールの探索研究と生理機能解析 .
 栄養・食糧学会誌 64 (3) : 127-135 , 2011
- 114)立花 宏文: 緑茶カテキン感知レセプターと抗がん作用、抗アレルギー作用との関わり. *Functional Food*, 8 (1) : 42-43 , 2014
- 115)立花 宏：食品ポリフェノールセンシングと生体調節. *実験医学*. 37 (4) :526-530 , 2019
- 116)Khan, Mohammad Faheem : Identification of Dietary Molecules as Therapeutic Agents to Combat COVID-19 Using Molecular Docking Studies. : 2020.
- 117)化学と生物 : 緑茶カテキンセンシング機構とその応用展開 カテキンパワーの引き出し方 . 54 (10) :698-699, 2016
- 118)正木仁:太陽光線に対する皮膚生理反応について.*J.Soc Cosmet.Chem.Jpn.*47 (3) : 197-201, 2013
- 119)Edwin D Lephart: Resveratrol influences on gene expression in human skin.*Journal of Function Foods*. 10 : 342-377, 2014
- 120)Giardina S,et al: 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
- 121)J W Wu: Resveratrol could reverse the expression of SIRT1 and MMP-1 in vitro. *Genet Mol Res* , 14 (4) : 12386-93 , 2015
- 122)Lee JS, : Negative regulation of stress-induced matrix metalloproteinase-9 by Sirt1 in skin tissue.*Experimental dermatology*. 19 (12) : 1060-1066 , 2010
- 123)和田侑子、他 : カテキンの秘めたるパワー.オレオサイエンス. 8 (9) : 371-378 , 2008
- 124)Thomas Walle,Faye Hsieh,Mark H DeLegge,John E Oatis Jr ,U Kristina Walle:High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. 32 (12):1377-1382 2004
- 125)Bruce Alberts,Alexander Johnson,Julian Lewis,Martin Raff,Keith Roberts,Peter Walter: MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL .19 :1184-1196 2010

- 126)手塚統夫,河合世津子, 徳田佳子: コラーゲンの合成とその調節.collagen Symposim x .:8-3-101
- 127)石橋康正:皮膚の老化とその対策.フレグランスジャーナル.1 : 19-24 1989
- 128)Morley N: The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage, Photodermol Photoimmunol Photmed. 21 (1) : 15-22 , 2005
- 129)J Kim: Protective Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- And UVB-induced Skin Damage. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 14 (1): 11-9, 2001
- 130)Heinrich U: Green tea polyphenols provide photoprotection, increase micro-circulation and modulate skin properties of women.J Nutr. 141 (6): 1202-1208 , 2011
- 131)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.三島海雲記念財研究報告書: 1-5, 2012