

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14800

研究課題名（和文）質量分析による皮膚脂質の酸化修飾メカニズムの解明と食品機能成分による制御法の構築

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of oxidative modification of skin lipids using LC-MS/MS and the development of control method by food functional ingredients

研究代表者

伊藤 隼哉（Ito, Junya）

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：50781647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：皮膚脂質の酸化が皮膚状態・疾患に与える影響の解明や食品機能成分による予防・改善方法の構築を目指し、(1)皮膚脂質の酸化ターゲットの同定と酸化メカニズムの評価、(2)皮膚脂質の酸化修飾が皮膚に与える生理的・物理的影響の解明、(3)皮膚の老化や機能低下を予防する食品機能性成分の探索と評価、これらに取り組んだ。(1)を通して皮膚脂質の酸化メカニズムの詳細を明らかにした。さらに、(2)および(3)では、皮膚脂質の酸化修飾がフェロトーシスに関連することを明らかにし、その予防に資する食品機能性成分の手がかりを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚は生体組織で最大の臓器であり、私たちが外部環境から守る生理的・物理的シールドとして常に機能を発揮している。「皮膚の酸化」は、皮膚の異常・老化（シミ、シワ、たるみ等）や乾癬、アトピー性皮膚炎、皮膚がんといった皮膚疾患に大きな影響を与え、QOLを著しく低下させることから、皮膚酸化の全容解明は、学术界・社会から強く要請されている。こうした現状の中で、本研究の成果は、皮膚の酸化が皮膚状態に与える影響の真の理解につながり、健全な皮膚状態の維持を実現できることから、社会的意義と波及性は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：With the aim of elucidating the effects of skin lipid oxidation on skin conditions and diseases and developing preventive and remedial methods using food functional ingredients, we aimed to (1) identify targets of skin lipid oxidation and evaluate their oxidation mechanisms, (2) clarify the physiological and physical effects of skin lipid oxidation modification, and (3) explore food functional ingredients for preventing skin aging and functional decline. We successfully achieved (1) by clarifying the oxidation mechanism of dermal lipids. In (2) and (3), we found that oxidative modification of skin lipids is related to ferroptosis and discovered potential food functional ingredients to prevent it.

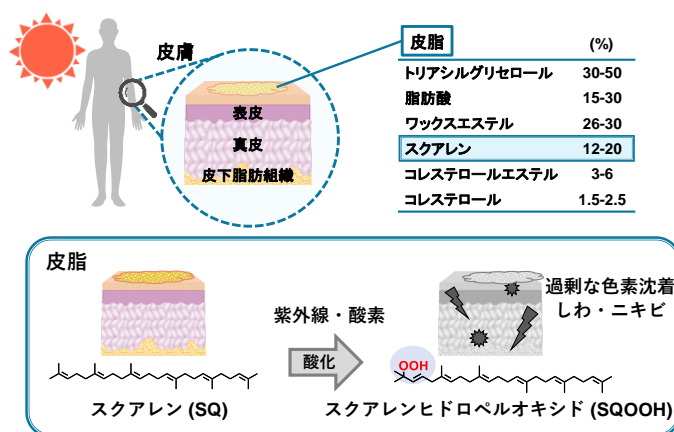
研究分野：食品科学

キーワード：皮膚脂質 酸化修飾 LC-MS/MS フェロトーシス

1. 研究開始当初の背景

皮膚は生体組織で最大の臓器であり、私たちが外部環境から守る生理的・物理的シールドとして常に機能を発揮している。「皮膚の酸化」は、皮膚の異常・老化（シミ、シワ、たるみ等）や乾癬、アトピー性皮膚炎、皮膚がんといった皮膚疾患に大きな影響を与え、QOLを著しく低下させることから、皮膚酸化の全容解明は、学术界・社会から強く要請されている。特に、皮脂を含む表皮は、外部環境からの種々の刺激（紫外線や化学物質、アレルギー抗原、細菌・ウイルス、等）に対するバリア機能を示すことから、酸化による影響が注目されている。例えば、皮脂に含まれるスクアレンは、太陽光などによる酸化ストレスを受け、酸化修飾されることで、シワやニキビといった皮膚の諸症状を引き起こすと考えられているが（図1）、その詳細は明らかでない。

また、『皮膚の酸化』⇔『日焼け』⇔『紫外線』⇔『活性酸素』というイメージは、容易に想像され、社会的にも浸透しているが、皮膚の酸化をもたらす真のメカニズム、例えば活性酸素種の実態は明らかでない。他方、応募者らはこれまでに、世界に先駆け、脂質をターゲットとし酸化メカニズムを特定できる方法の開発に取り組んできた。本技術は脂質の酸化修飾物を酸化マーカーと捉えることにより、その生成メカニズムを評価する手法であり、本技術を皮膚に応用することで、「皮膚の酸化」の真の理解につながると着想した。



2. 研究の目的

従来の皮膚における酸化の研究では、皮膚脂質の酸化修飾物（例えば、スクアレンヒドロペルオキシドやカルボニルトンパク）に関しては、専ら、生理活性物質として捉えられ、酸化修飾物そのものが皮膚へ与える生理的影響に関して評価がなされてきた。本研究では、皮膚が酸化ストレスを受けることで生じる皮膚脂質の酸化修飾を、酸化メカニズムの評価マーカーと生理的・物理的機能として多角的に捉えて解析することであり、解析結果をもとに、有効な食品機能性成分の活用を目指すことである。具体的には、(1)皮膚脂質の酸化ターゲットの同定と酸化メカニズムの評価、(2)皮膚脂質の酸化修飾が皮膚に与える生理的・物理的影響の解明、(3)皮膚の老化や機能低下を予防する食品機能性成分の探索と評価、これらに取り組む。以上より、皮膚の酸化が皮膚状態に与える影響の真の理解につながり、健全な皮膚状態の維持を実現できることから、社会的意義と波及性は極めて大きい。

3. 研究の方法

(1) 皮膚脂質の酸化ターゲットの同定と酸化メカニズムの評価

紫外線により皮膚の脂質やタンパク質が酸化修飾され、皮膚の老化に繋がることは明らかであるが、実際に紫外線からどのような酸化（例えば、活性酸素種）が生じているかについては不明な点が多い。そこで、皮脂に含まれる脂質に着目し、それらの酸化修飾物を解析することで酸化ターゲットと酸化メカニズムの評価を行った。具体的には、皮脂の主要成分であるスクアレンと比較的多く存在する遊離脂肪酸（不飽和脂肪酸としてリノール酸に着目）の脂質ヒドロペルオキシドを異性体レベルで解析した。さらに、光の波長の違いがスクアレンの酸化に与える影響を評価した。

(2) 皮膚脂質の酸化修飾が皮膚に与える生理的・物理的影響の解明

培養細胞にスクアレンヒドロペルオキシドを処理し、細胞生存率に与える影響を評価した。さらに、このメカニズムを評価するために、脂質酸化が関連するフェルトーシスに着目し、スクアレンヒドロペルオキシドがフェルトーシスに与える影響を評価した。

(3) 皮膚の老化や機能低下を予防する食品機能性成分の探索と評価

フェルトーシスに関連する抗酸化関連の阻害剤を用いて、スクアレンヒドロペルオキシドが誘導する細胞死のさらなるメカニズム評価を行った。さらに、本結果をもとに、スクアレンヒドロペルオキシドによる細胞死の抑制に有用な食品機能成分を推定した。

4. 研究成果

(1) 皮膚脂質の酸化ターゲットの同定と酸化メカニズムの評価

脂質の LC-MS/MS 分析の結果、これまでの我々の研究で明らかにしてきた結果と同様に、スクアレンヒドロペルオキシドが明瞭に検出された。さらに、リノール酸ヒドロペルオキシドも検出されたことからヒト皮脂においてスクアレンのみならずリノール酸をはじめとする脂肪酸も酸化のターゲットになる可能性を明らかにした。次に、スクアレンヒドロペルオキシドとリノール酸ヒドロペルオキシドの異性体解析を通して、それぞれの酸化メカニズムを解析したところ、スクアレンは一重項酸素酸化されている一方で、リノール酸の酸化にはラジカル酸化が関与していることが明らかとなった。すなわち、スクアレンと脂肪酸は皮脂において異なるメカニズムで酸化していることが示唆され、さらに、*in vitro* 試験により、スクアレンヒドロペルオキシドがリノール酸の酸化に関与している可能性も示唆された (図 2)。そこで、波長の違いがスクアレンヒドロペルオキシドの生成に与える影響を検証した。その結果、光波長 380-450 nm 付近 (ブルーライト領域) の照射によりスクアレンヒドロペルオキシドの大きな増加が観察され、この波長領域はポルフィリンの吸収波長とおおよそ一致した。これらの結果は、皮脂のポルフィリンから一重項酸素酸が生じ、この一重項酸素酸によりスクアレンが酸化され皮脂の光酸化が進む可能性を示唆した。

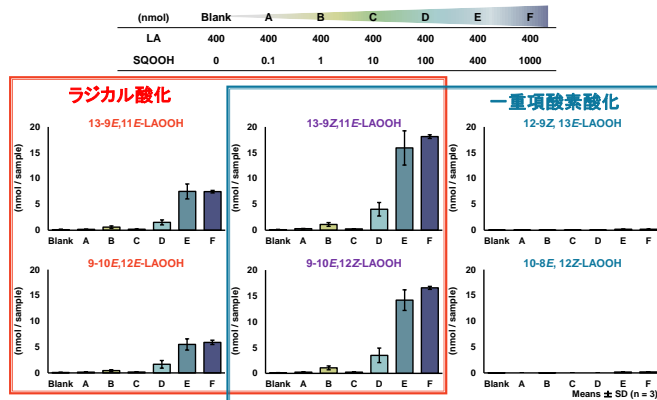


図 2. スクアレンヒドロペルオキシド (SQOOH) の添加量依存的にリノール酸ヒドロペルオキシドが増加

(2) 皮膚脂質の酸化修飾が皮膚に与える生理的・物理的影響の解明

スクアレンヒドロペルオキシドを様々な濃度 (3, 10, 30 μM) で培養細胞に処理したところ、10, 30 μM の処理で細胞生存率が減少した。すなわち、スクアレンヒドロペルオキシドが細胞死を誘導していることが示唆された。そこで、近年、脂質酸化依存的細胞死として知られるフェロトーシスに着目した。フェロトーシスでは主にリン脂質ヒドロペルオキシドが注目されているため、リン脂質ヒドロペルオキシドも同様に処理したところ、スクアレンヒドロペルオキシドによる細胞死の誘導はリン脂質ヒドロペルオキシドと同等以上であった (図 3)。スクアレンヒドロペルオキシドがフェロトーシスに与える影響はほとんど明らかでなかったが、本研究により、スクアレンヒドロペルオキシドが細胞膜を構成するリン脂質の酸化修飾を誘導し、膜構造を変化させて細胞死を誘導させることが示唆された。そこで(3)にてこの作用機序のさらなる検証と、予防法の手がかりを得ることとした。

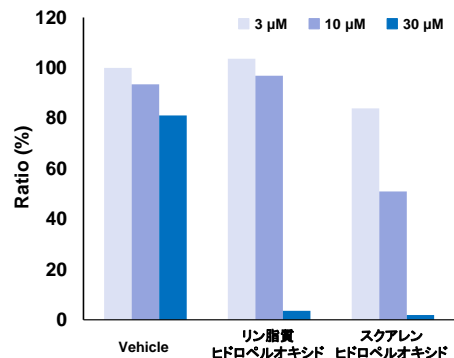


図 3. スクアレンヒドロペルオキシドが細胞死を誘導

(3) 皮膚の老化や機能低下を予防する食品機能性成分の探索と評価

脂質の主要脂質であるスクアレンの酸化修飾物であるスクアレンヒドロペルオキシドがフェロトーシスを誘導することが示唆された。そのため、この細胞死を抑制できる食品機能性成分が重要であると考えられた。そこで、フェロトーシス誘導剤である RSL3 (リン脂質ヒドロペルオキシド還元酵素阻害剤)、もしくは抗酸化成分としてフェロトーシスを抑制することが知られている ferrostatin-1 を処理し、スクアレンヒドロペルオキシドがフェロトーシスを誘導する可能性を更に検証するとともに、抑制に寄与する抗酸化成分の評価を行った。その結果、スクアレンヒドロペルオキシドによる細胞死は ferrostatin-1 でレスキューされ、本細胞死がフェロトーシスである可能性がさらに示唆された (図 4)。Ferrostatin-1 の作用機序は、ラジカルトラップであるため、スクアレンヒドロペルオキシドによるフェロトーシスの誘導には、ラジカル酸化の抑制が有用であることが示唆された。実際に、ラジカル酸化の抑制に有用な食品機能性成分であるトコフェロールによっても細胞死が抑制されることを確認しつつ

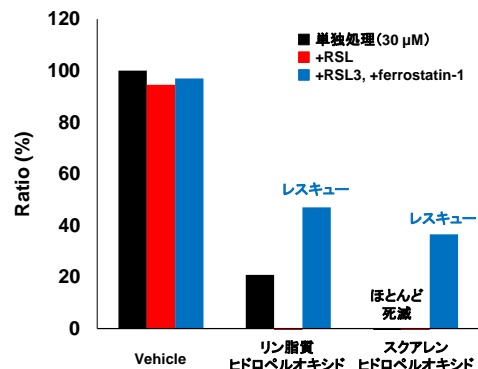


図 4. フェロトーシス抑制剤の処理により細胞死が抑制

ある。我々は以前に、ラジカル酸化を抑制できる成分のスクリーニングを実施しており、ラジカル酸化の抑制に有用な食品機能性成分も見出していることから、最終的には、フェロトキシスを抑制し、ひいては皮膚の老化や機能低下の予防に資する食品機能性成分が見出されると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikawa Ayano, Ito Junya, Shimizu Naoki, Kato Shunji, Kobayashi Eri, Ohnari Hiroki, Sakata Osamu, Naru Eiji, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 1500
2. 論文標題 Linoleic acid and squalene are oxidized by discrete oxidation mechanisms in human sebum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 112 ~ 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nyas.14615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤隼哉, 石川絢野, 清水直紀, 加藤俊治, 小林エリ, 大成宏樹, 坂田修, 成英次, 仲川清隆
2. 発表標題 ヒト皮脂における脂肪酸ヒドロペルオキシドの解析と酸化メカニズムの評価
3. 学会等名 日本脂質栄養学会第30回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤隼哉, 石川絢野, 清水直紀, 加藤俊治, 小林エリ, 大成宏樹, 坂田修, 成英次, 仲川清隆
2. 発表標題 ヒト皮脂の脂質酸化メカニズムの評価：リノール酸に着目して
3. 学会等名 第46回日本化粧品学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤隼哉, 石川絢野, 清水直紀, 小林エリ, 小林豊明, 平昌宏, 仲川清隆
2. 発表標題 皮脂酸化の制御に向けた酸化メカニズムの評価：酸化に影響を与える波長に着目して
3. 学会等名 第65回日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------