

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究B

研究期間：2011～2012

課題番号：23700827

研究課題名（和文） 組織酸素分圧上昇が皮膚老化抑制に及ぼす効果

研究課題名（英文） Effects of increased tissue oxygen tension on dermal aging

研究代表者

川田 茂雄 (KAWADA SHIGEO)

東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員

研究者番号：20376601

研究成果の概要（和文）：本申請課題では、皮膚の組織酸素分圧を増加させ、皮膚の老化を抑制できるかについて検討した。実験動物のマウスの背中に紫外線を照射し、その後、マウスを高酸素環境に暴露すると、紫外線による皮膚の老化を抑制できることが分かった。皮膚に紫外線があたると、皮膚の血管増殖が起こり、これが皮膚の老化を促進すると考えられている。高酸素暴露では、この血管増殖を抑制することが分かった。このことから、組織酸素分圧の増加は条件によっては抗加齢効果があることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate whether increased dermal oxygen tension attenuates ultraviolet (UV)-B-induced dermal angiogenesis and wrinkle formation.

In experiment 1, the backs of the mice were exposed to UVB three times per week for a 5-wk. To increase dermal oxygen tension, the mice were exposed to hyperoxia (90% oxygen) for 2 h immediately after each UVB irradiation. This experiment cleared that such acute UVB exposure results in wrinkle formation associated with increased cutaneous angiogenesis. However, hyperoxic exposure immediately after UVB exposure attenuates these phenomena.

In experiment 2, we investigated the effects of hyperoxia on dermal aging induced by higher doses and longer periods of UVB irradiation. The backs of the mice were exposed to UVB three times per week for a 10-wk. Hyperoxic conditions could suppress increases in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  levels, a key molecule for angiogenesis. However, UVB-induced wrinkle formation and angiogenesis were not attenuated. Activities of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9, which are key molecules in wrinkle formation, increased with higher-dose and longer-term UVB irradiation regardless of exposure to hyperoxic conditions. In experiment 1, MMP-2 and MMP-9 activities did not increase.

These results suggest that suppression of increases in HIF-1 $\alpha$  levels alone is insufficient to suppress wrinkle formation caused by higher doses and longer periods of UVB irradiation. Moreover, MMP-2 and MMP-9 might not play a critical role in either wrinkle formation or angiogenesis during the early stage of acute UVB-induced wrinkle formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3300000	990000	4290000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学，応用健康科学

キーワード：生理学，老化，ストレス，シグナル伝達，生体機能利用

## 1. 研究開始当初の背景

生体内の組織酸素分圧は狭い範囲に厳密に制御されており、その逸脱は細胞に対して刺激となる。その刺激が過剰であれば細胞死に、ある程度の適度な刺激であれば細胞の働きの活性化に繋がる。例えば、細胞内酸素分圧が 4 mmHg 以下の状態が長時間続けば細胞死が起こるが、短時間であれば低酸素応答因子(hypoxic-inducible factor-1 等)の活性化により血管増殖や造血作用の惹起により身体は環境に適応する。

これまでの健康・スポーツ科学では低酸素分圧環境が生体に与える効果の研究が多数なされてきたが、逆に高酸素分圧環境の研究はほとんどなされてこなかった。その理由の1つに、「ヘモグロビン・酸素解離曲線」から、高気圧あるいは高酸素環境の意義が十分に理解されていなかったという面もある。つまり、常圧常酸素状態では肺胞内酸素分圧は約 100mmHg であり、その状態で血中ヘモグロビンはほぼ 100%酸素と結合しており、高酸素を吸入しても高気圧環境に暴露されてもヘモグロビンに結合する酸素量は増加しない。しかし、実際は、「気体の液体への溶解量は温度一定ならば、その気体の分圧に比例する」という Henry の法則からも分かる通り、高気圧、あるいは高酸素、さらにはその両方の組み合わせの環境下では、血液に直接物理的に溶解できる酸素量(溶解型酸素)を増加させることが可能である。例えば、高濃度酸素を吸入すれば溶存型酸素の量も増加し、理論的には 2.5 絶対気圧の環境で 100% 酸素を吸入すれば、動脈血酸素濃度は約 4.5ml/dl となり、健康人の安静時の必要酸素量は確保できるので、赤血球がなくても生存できることになる。実際に Boerema らは、豚を用いて血液から赤血球を除去しても、3 絶対気圧 100% 酸素環境の下では生存が可能であることを示している。

高気圧高酸素環境は医療現場では様々な疾患治療に応用されており医療保険が適用される疾患も数多くある。しかし、抗加齢、健康・スポーツに関わる分野では、ほとんどその効果は研究されておらず、また関連する疾患においても医療保険は適用されていない。

## 2. 研究の目的

我々は約 760 mmHg という大気圧環境の下で生活している(例外として高地居住者もいる)。ヒトが呼吸をする際にはこの圧力が重要となり、生体内に取り込まれる酸素の量(組織酸素分圧)は大気圧と大気圧中の酸素分圧でほぼ決まる。近年、高気圧高酸素環境にヒトを暴露させると、ヒトの運動パフォーマンスや精神ストレスの感受性に様々な影

響が生じることが示されている。本研究では、これまでの研究を更に推し進めて 1) 組織酸素分圧増加の抗加齢への効果、2) 効果の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、組織酸素分圧の増加が組織に対して、「抗加齢効果」を引き起す分子メカニズムを 1) 組織学的解析、2) 生化学的解析により解明する。本研究で対象とする組織は皮膚である。皮膚の老化は細胞自体の老化である、「生理学的老化」と、紫外線暴露による、「光老化」によって起こる。皮膚の老化に対しては、「光老化」のほうが影響は大きいと考えられている。

実験動物として雄性マウス(C57BL/6j)を用いた。皮膚を老化させるために、マウスの背部に紫外線(UVB)照射を行った。紫外線照射は週に 3 回とし、照射強度は第 1 週が 36 mJ/cm<sup>2</sup> とし、週ごとに 54, 72, 108, 144 mJ/cm<sup>2</sup> と強めていった。初年度は皮膚老化初期について検討するため実験期間は 5 週間とした。UVB 照射直後にマウスを 90%酸素の箱に入れ、高酸素暴露を 2 時間行った。医療分野では、高気圧酸素療法を行う場合、2 絶対気圧、100%酸素を 1 回あたり 1~2 時間暴露することを基本としている。しかし、この条件には必ずしも分子メカニズム的根拠があるわけではなく、元々、減圧症の治療に用いられた条件を他の疾患にも応用している。本研究では、生体への酸化障害の危険性も考慮して、より低い酸素暴露条件で行った。実験群は、UVB 照射も高酸素暴露も行わない通常飼育群(8 匹)、UVB 照射を行う群(8 匹)、UVB 照射と高酸素暴露を行う群(8 匹)の 3 群とした。実験期間終了後に皮膚表面にシリコンを塗り、皮膚の型を取り、それをスキャナーでパソコンに取り込んだ後、皮膚のシワの程度を先行研究の方法にならない評価した。その後、皮膚を採取し、血管増殖の程度は血管内皮細胞特異的マーカーである CD31 タンパクを免疫組織染色で検出し評価した。血管増殖に関与する因子については、血管増殖で中心的な役割を担う hypoxic-inducible transcriptional factor (HIF)-1 と vascular endothelial growth factor (VEGF) の細胞内での挙動を確認した。HIF-1 はタンパク、mRNA レベルでの発現量を解析し、VEGF はタンパクレベルでの発現量をそれぞれ解析した。

また、最終年度では、シワ形成の後期での影響を検討するために、UVB 照射期間と照射強度を増加させて検討した。実験期間は 10 週間とし、測定項目、マウスの実験群は初年度と同様のものを採用した。UVB の照射強度は第 1 週が 36 mJ/cm<sup>2</sup> とし、週ごとに 54, 72, 108, 144, 162, 180, 198 と増加させていき、

第9週と第10週は216 mJ/cm<sup>2</sup>とした。

紫外線にはUVB以外にもUVAとUVCが含まれているが、UVCはオゾン層でほぼ全て吸収され地表には届かないこと、またUVAは地表まで到達するものの、皮膚への影響はUVBのほうが大きいと、本研究ではUVBを用いた。

#### 4. 研究成果

高酸素暴露の組織酸素分圧に対する効果：本研究ではマウスを90%酸素の箱の中に置いたが、そのような環境下で、皮膚の酸素分圧が上昇するかどうかを皮膚の真皮に酸素電極を挿入することにより確認した。その結果、90%酸素に暴露すると通常時で約18mmHgの酸素分圧が2時間後には約160mmHgまで上昇することを確認した。

シワ形成初期に対して高酸素暴露が及ぼす効果：5週間のUVB照射により、皮膚にはシワが形成された。しかしながら、高酸素を暴露した群ではシワ形成の程度が抑制されていることが分かった。また、UVB照射では、皮膚直下の血管が増殖することが知られている。本研究でもUVB照射により皮膚直下の血管増殖が生じることを確認した。また、血管増殖に関与する因子であるHIF-1 $\alpha$ やvascular endothelial growth factor (VEGF)の増加も確認した。しかしながら、高酸素を暴露し皮膚組織酸素分圧を増加させると、これらの因子の増加が抑制されることが分かった。このことから、組織酸素分圧の増加には、皮膚に対して抗加齢効果があると言える。

初年度の実験において、高酸素暴露には皮膚に対して一定の抗老化作用があることが分かったが、大量の酸素は生体への酸化障害を引き起こす懸念もある。そこで、DNAの酸化障害の指標である尿中8-OHdG濃度を測定したところ、高酸素暴露によって上昇は認められなかった。このことから、本研究で用いた程度の高酸素暴露ではDNAの酸化障害は引き起こされないと考えられる。

皮膚にUVB照射を行うと、皮膚の最外層の表皮の肥厚が認められる。本研究でもUVB照射群と高酸素暴露群で表皮の肥厚が認められたが、その程度は高酸素暴露のほうが小さかった。表皮はタンパク質の塊であるため、表皮が肥厚すると皮膚の外観は瑞々しさを失う。これが、見た目の老化に関わっているが、UVB照射によって表皮が肥厚することは細胞がUVBによる障害を防ぐための防御反応であるとも考えられる。高酸素暴露ではこの表皮の肥厚を抑制するため、皮膚の瑞々しさは保てるが、UVBに対する防御反応が妨げられる可能性も否定できない。今後は、UVB照射による細胞障害の程度も検討する必要があると考えられる。

最終年度では、より長期で高強度のUVB照射にも高酸素暴露が効果的かどうかを検討

した。その結果、長期のUVB照射によるシワ形成を高酸素暴露によって抑制することは出来なかった。長期のUVB照射でも皮膚血管増殖が生じたが、高酸素暴露群でも同様に皮膚血管増殖が認められた。両群で血管増殖の程度に差は認められなかった。長期のUVB照射による皮膚シワ形成や血管増殖に対して高酸素暴露が効果を及ぼさなかった原因として、短期と長期のUVB照射時のコラーゲン分解酵素(MMP-2とMMP-9)に対する影響が異なることが影響していると考えている。つまり、短期のUVB照射ではMMP-2とMMP-9の活性は増加しないが、より長期の照射ではこれらの酵素活性が上昇することが分かった。MMP-2とMMP-9は、皮膚の構成成分であるコラーゲンを分解することによって直接的に皮膚にダメージを与える作用があると考えられる。実際に、長期のUVB照射では皮膚水分量が減少するという結果が得られた。また、血管増殖時に血管周囲の基底膜を分解することによって血管増殖を起こしやすくする役割が知られている。このことから、皮膚の老化を考える際にはMMP-2とMMP-9の活性の程度を考慮する必要がある。本研究では長期のUVB照射では、組織酸素分圧の上昇によりUVB照射によって増加するHIF-1 $\alpha$ の増加は抑制できたものの、MMP-2とMMP-9の活性上昇は抑制できなかった。このことは、MMP-2とMMP-9活性が上昇した状況下では、たとえHIF-1 $\alpha$ のみを抑制できたとしても皮膚老化を抑制できないことを示している。

短期のUVB照射実験でも長期の照射実験でも高酸素暴露によりHIF-1 $\alpha$ のタンパクレベルでの増加は抑制できた。これは、HIF-1 $\alpha$ が酸素分圧によって細胞内での安定性に影響されることが考えられる。HIF-1 $\alpha$ は通常酸素分圧環境下ではプロリン残基にヒドロキシ化修飾を受け、ヒドロキシ残基依存的にユビキチン化され、ユビキチン化されることにより細胞内タンパク質分解器官であるプロテアソームで分解されやすいからである。逆に、低酸素分圧環境下ではユビキチン化されにくく、その安定性が高まることも知られている。HIF-1 $\alpha$ はHIF-1 $\beta$ とヘテロ2量体を形成しHIF-1として働く。HIF-1はVEGFを介して血管新生を促すことが知られている。本研究では、UVB照射によりHIF-1 $\alpha$ のmRNAレベルでは高酸素暴露の有無に関わらず増加が認められたが、高酸素暴露によりタンパクレベルでは増加しないことが分かった。このことから、本研究で用いた高酸素暴露はHIF-1 $\alpha$ のユビキチン化を促進するのかもしれない。この点については今後の更なる解析が必要である。

本研究では、組織の酸素分圧の上昇が、ある条件下では抗老化作用があることを示すことができた。本研究では気圧は変化させず

に酸素濃度だけを変化させたが、気圧を高めることにより、さらに細胞内酸素分圧を高めることが可能である。生体に酸化障害が生じない程度までさらに生体内酸素分圧を高めた場合、抗老化作用が増強されるのかを検討することが今後の課題である。また、皮膚は生体を感染から防御したり、体内水分の蒸発防止といった物理的機能だけでなく、全身の免疫機能にも関与していることが知られている。本研究では、皮膚の外見の抗老化という側面のみに着目したが、今後は、加齢による皮膚機能の低下に対しても組織酸素分圧の増加が効果を示すかという点にも着目して研究を進めることが重要であると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Suppression of UVB-induced HIF-1  $\alpha$  up-regulation by hyperoxia dose not prevent wrinkle formation associated with increased MMPs activity in mouse skin. Shigeo KAWADA and Naokata ISHII. Biomedical Research 32(6): 363-372, 2011.  
URL:[https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/32/6/32\\_6\\_363/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/32/6/32_6_363/_article)  
(査読あり)
- 2) Mechanisms underlying ultraviolet radiation-induced dermal aging. Shigeo KAWADA, Satoshi NAKADA, Yuhei MAKANAE. The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine 2(2): 225-228, 2013. URL:  
<http://www.jspfsm.umin.ne.jp/journal/index.htm>  
(査読あり)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川田 茂雄 (KAWADA SHIGEO)

東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員

研究者番号：20376601