

平成30年 5月25日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14926

研究課題名(和文)食品カロテノイドの経口摂取による皮膚保護効果

研究課題名(英文)Protective effect of dietary carotenoid on the skin

研究代表者

菅原 達也 (SUGAWARA, Tatsuya)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70378818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：緑藻由来シフォナキサンチンが皮膚に与える影響を調べるために、光老化モデルマウスを用いた検討を行った。シフォナキサンチン摂取は、UV照射による経皮水分蒸散量の上昇およびシワの形成を有意に抑制した。このとき、表皮と真皮からシフォナキサンチンおよびその代謝物が検出された。皮膚の遺伝子発現解析から、シフォナキサンチン摂取は、表皮においてUV照射による天然保湿因子の減少を抑制し、真皮においてUV照射によるマトリックスメタロプロテアーゼ発現の上昇を抑制することが示唆された。以上の結果から、摂取されたシフォナキサンチンは、皮膚に到達し、光老化を効率的に抑制することが確認された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effect of dietary siphonaxanthin derived from green algae on skin photoaging in UVA-irradiated hairless mice. After chronic UVA exposure, a significant increase in trans-epidermal water loss and wrinkle formation in the dorsal skin caused by UVA was observed, and dietary siphonaxanthin significantly suppressed these photoaging features. Siphonaxanthin and its metabolites were found in the skin of siphonaxanthin-fed mice. It was suggested that dietary siphonaxanthin could affect the decrease of natural moisturizing factors in the epidermis and the increase of matrix metalloprotease in the dermis by UVA irradiation because of the changes of mRNA expressions in the skin. Our results indicate that dietary siphonaxanthin accumulates in the skin and appears to prevent the photoaging.

研究分野：農学

キーワード：食品機能 光老化 シフォナキサンチン

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えている我が国において、生活習慣病予防や健康寿命を長く保つことが求められてきている。そのために、機能性を有する食品成分の探索とそのメカニズムの解明が精力的に進められてきている。さらに健康であることに加えて、外面的な美しさや若さを維持する、いわゆるアンチエイジングが注目されており、高齢者の自信や行動力を維持し、QOLを向上するためにも重要な課題となってきている。

皮膚の老化は、加齢によって進む自然老化だけでなく、環境要因にも強く影響を受け、とくに紫外線によって引き起こされる光老化現象も重要である。その主な症状としては、深いシワ、タルミ、表皮肥厚化、グルコサミノグリカンの増加、コラーゲンの減少などが挙げられ、皮膚組織における活性酸素種の生成が原因の一つである。紫外線暴露による活性酸素や炎症の惹起は、表皮層において皮膚バリアの破たんによる保水性の低下、真皮層では細胞外マトリックスの分解によるシワの形成を引き起こす (Am J Med 98: 99S-103S, 1995) (図1)。したがって、抗酸化成分は、その予防と改善に有効と考えられる。実際に、研究代表者はこれまでにフコキサンチンやアスタキサンチンといった抗酸化成分であるカロテノイドが皮膚の光老化抑制に有効であることを見出している (Biosci Biotechnol Biochem 75: 757, 2011; PLoS One 12: e0171178, 2017)。

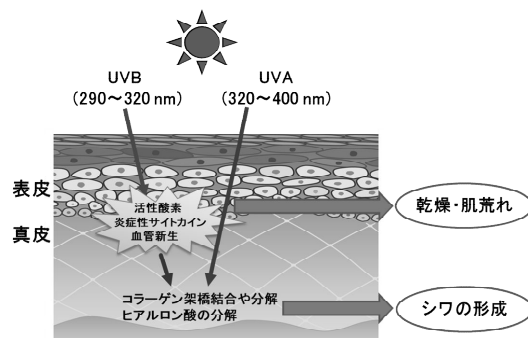


図1 皮膚の光老化

また、血管新生が光老化現象に深く関わることも報告されている。皮膚では通常 TSP-1 (Thrombospondin-1) の作用により血管新生は抑制されているが、紫外線によって TSP-1 生合成が抑制され、血管新生を促進する VEGF (Vascular endothelial growth factor) の産生が亢進する。これが皮膚のダメージを引き起こし、シワ発生に結びつくことが示唆されている。(J Invest Dermatol 118: 800-5, 2002; J Invest Dermatol 122: 201-8, 2004)。

研究代表者は、緑藻由来カロテノイドであるシフォナキサンチンに強力な血管新生抑制作用を見出している (Phytomedicine 17: 1140-4, 2010; Mol Cell Biochem 380:

1-9, 2013; Mar Drugs 12: 3660-8, 2014)。緑藻類は他の海藻に比べて流通は多くないが、アオサやアオノリ、クビレスタ(海ブドウ)などが食されている。比較的深いところに生息出来る深所性緑藻(クビレスタやミルなど)には、C19位に水酸基を有するシフォナキサンチンが特異的に含まれる(図2)。シフォナキサンチン含有量の高いミル(海松)は、日本では飛鳥時代よりも前から食用とされているが、現在は三重県の英虞湾近辺などで自生したものがわずかに採取されているのみで、ほとんど流通されていない。カロテノイドは一般的に抗酸化性を示すことから、古くから食経験のある天然抗酸化成分であり、強力な血管新生抑制作用を有するシフォナキサンチンが効率的に皮膚保護作用を示すことが期待できる。

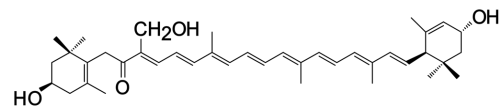


図2 シフォナキサンチンの化学構造

2. 研究の目的

紫外線防御物質や抗酸化物質の皮膚への外用によって、光老化を効率的に防御できる。しかしながら、皮膚は本来、外界から体内を守るバリアとして物質の通過を防ぐ器官であることから、塗布した物質が真皮層にまで到達できる可能性は低く、真皮層にまで到達できる UVA によって引き起こされる細胞外マトリックスの分解などを効率的に防御することは困難であると予想される。その解決方法として、食品成分として経口摂取することで、体内から真皮層へ到達させることができれば、皮膚光老化をより効率的に防御できるものと考えられる。

これらを踏まえて本研究では、とくに強力な血管新生抑制作用が見出されている緑藻由来シフォナキサンチンを用いて、以下を明らかにすること目的とした。

- (1) ナガミルなどの緑藻からシフォナキサンチン抽出物を作成し、光老化モデルマウスを用いて経口摂取による効果を検証する。
- (2) 体内動態、とくに皮膚への移行を確認する。
- (3) 動物実験試料や培養細胞を用いた検証から、その作用メカニズムの解明を目指す

3. 研究の方法

(1) 試料の調製

シフォナキサンチンは市販されていないため、海藻原料より抽出精製して評価に用いた (Biochem Biophys Acta 1810: 497-503, 2011; J Nutr 145: 490-498, 2015)。英虞湾で採取されたナガミル (*Codium cylindricum*) を凍結乾燥し、ミルミキサーを用いて粉碎した。約 10 倍容のアセトンを加え、スターラ

ーで撈拌しながら 4 にて一晚放置し、脂質を抽出した。溶媒留去した後、ヘキサン/アセトン (90:10, v/v) に再溶解したものをナガミル粗抽出液とした。

粗抽出液の溶媒を留去し、ヘキサンに再溶解して、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。ヘキサン/アセトン混液を用いた段階溶出により、橙色を呈する画分を回収した。さらに TLC に供してシフォナキサンチン画分をかきとり、シフォナキサンチン濃縮画分を得た。この画分を動物実験に用いた。

また、ナガミル粗抽出液を LiChroprep RP-18 (内径 10 mm×長さ 240 mm) カラムを用いた HPLC に供し、移動相としてメタノール/水 (90:10, v/v, 0.1%酢酸アンモニウム含有) を 3 mL/min で送液した。保持時間 20 分付近の橙色のフラクションを分取した。このシフォナキサンチン粗精製画分をさらに TSKgel ODS-80Ts (内径 4.6 mm×長さ 250 mm) カラムを用いた HPLC に供し、アセトニトリル/メタノール/水 (75:15:10, v/v/v, 0.1%酢酸アンモニウム含有) を 1 mL/min で送液した。保持時間 9 分付近のピークを分取し、得られたシフォナキサンチンを培養細胞の実験に用いた。

(2) 光老化モデルマウスを用いた評価

実験にはヘアレスマウス (Hos:HR-1) 雌 6 週齢を用いた。飼育条件は室温 24 ± 2 、12 時間の明暗周期で、精製飼料 AIN-93G と蒸留水を自由摂取させた。予備飼育 11 日間後、ノーマル群、コントロール群、0.001%シフォナキサンチン添加群 (SPX 群) の 3 群に分けた (n=6)。コントロール群と SPX 群には週 5 回、UV 照射を行った。UVA ランプ (BLACKLIGHT BLUE F15T8BLB 352 nm, SANKYO DENKI) 6 本を用い、マウス背部から約 20 cm の距離から照射量 $20 \text{ J/cm}^2/\text{day}$ となるように照射した。ノーマル群とコントロール群には基本組成の AIN-93G を摂餌させ、SPX 群にはシフォナキサンチン含有精製大豆油を配合した AIN-93G (0.001%シフォナキサンチン含有) を摂餌させた。10 週間の飼育中に、経時的にイソフルラン吸引麻酔下で、背部皮膚の経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定し、シワ解析用レプリカを採取した。

試験期間終了後、一晚絶食させたマウスをイソフルラン吸引麻酔下で、下大静脈より採血し、臓器を採取した。また、背部皮膚を採取し、一部を用いて組織切片を作成した。皮膚については、真皮と表皮に分離し、遺伝子発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法により評価した。血漿、真皮および表皮のシフォナキサンチン蓄積量について HPLC を用いて定量を行った。

また、UVA 照射を行わず、シフォナキサンチンを摂取させる動物実験も行った。AIN-93G を基本食として、シフォナキサンチンを 0.001%および 0.0001%添加した試験群を 4 週間飼育し、試験期間中、前述と同様に

TEWL と角層水分量の評価を行った。

(3) 培養細胞を用いた評価

正常ヒト新生児包皮皮膚線維芽細胞を 37、5% CO_2 の環境下で培養した。コンフルエントになる前にトリプシン処理によって継代し、維持した。実験には継代数 3~6 の細胞を用いた。24 ウェルプレートにそれぞれ播種し、24 時間後、シフォナキサンチン含有試験培地に交換し、さらに 24 時間培養した。シフォナキサンチン処理後、培地をアスピレーターで除去し、HBSS で洗浄した後、照射量が 10 J/cm^2 となるように UVA 照射を行い、遺伝子発現と蛋白質分泌量を評価した。

4. 研究成果

(1) シフォナキサンチン濃縮画分の調製

ナガミル粉碎物 56 g からシフォナキサンチン 5.4 mg が得られた。シフォナキサンチン濃縮画分の純度は 69.4%であった (図 3)。TLC 分析により、シフォナキサンチンの他に、ネオキサンチンとモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) に由来するスポットが認められた。この画分を用いて動物実験を行った。

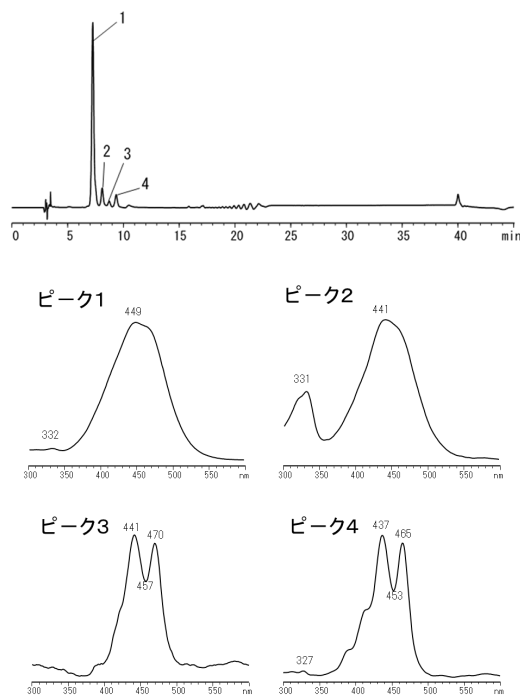


図3 シフォナキサンチン濃縮画分の HPLC クロマトグラムと各ピークの UV-VIS スペクトル

(2) 光老化モデルマウスを用いた評価

飼育期間中の体重増加量については、群間に有意な差は認められなかった。また、いずれの臓器においても群間に有意な差は認められなかった。

8 および 10 週目において、UVA 照射によって TEWL が有意に増加し、シフォナキサンチン摂取によって有意に抑制された。また 10

週目において、UVA 照射によって角層水分量が有意に減少し、シフォナキサンチン摂取によって有意に増加した。皮膚粘弾性は、UVA 照射による影響は認められず、群間の有意な変化も認められなかった。背部皮膚レプリカ解析によって、シワ最大幅は 8 週目のみで、シワ最大深度は 4 週および 8 週目で、シワ面積率、シワ体積率、シワ平均深度、シワ個数は 8 週目以降で、それぞれ UVA 照射によって有意に増加し、シフォナキサンチンの摂取によって、10 週目のシワ面積率とシワ個数以外で、有意な抑制もしくは抑制傾向が認められた。

背部皮膚の HE 染色標本を用いて表皮厚を測定したところ、UVA 照射により、表皮の肥厚化が誘導され、シフォナキサンチン摂取によって有意に抑制された。

HPLC 解析により、真皮からシフォナキサンチンとその代謝物に由来するピークが検出され、LC-MS 解析の結果から、ジデヒドロ代謝物とデヒドロ代謝物と推定された。一方、表皮では、個体では検出できなかったため、群全体をプールして解析したところ、真皮と同様の 3 つのピークが検出された。以上の結果から、経口摂取されたシフォナキサンチンは、皮膚にまで到達していることが確認された。したがって、真皮と表皮に到達したシフォナキサンチンやその代謝物は、皮膚で直接効果を示すことによって光老化を抑制できることが示唆された。

遺伝子の発現変動を調べたところ、表皮では、Spink5、Flg2、Flg の発現が UVA 照射で有意に上昇し、シフォナキサンチン摂取によって有意に低下または低下傾向を示した。また、Sts、Aqp3、Casp14、Klk7 の発現は UVA 照射によって有意に低下または低下傾向を示し、シフォナキサンチン摂取によって有意な上昇または上昇傾向を示した。皮膚の保湿に必須な因子である天然保湿因子 (NMF) は、角質層でカスパーゼ 14 (CASP14) やブレオマイシン分解酵素 (BH) によってフィラグリンが分解されることで産生される。また、セリンプロテアーゼインヒビターである LEKTI-1 は、CASP14 の働きを阻害することが知られている。したがって、UVA 照射により LEKTI-1 の発現が増加し、CASP14 の発現が減少したことによって NMF の産生量が減少し、TEWL の増加につながったものと考えられた。シフォナキサンチン摂取によってこれらが回復したことから、NMF の産生が促進され、TEWL の増加が抑制されたと考えられた。

一方、真皮では Mmp13 と Plg の発現が UVA 照射によって有意に上昇し、シフォナキサンチン摂取によって有意に低下または低下傾向を示した。マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、細胞外マトリックスを分解する酵素であり、炎症性刺激により誘導される。UVA 照射によって表皮角化細胞で分泌される炎症性サイトカインなどのさまざまな伝達物質は、真皮層に移行して線維芽細胞におけ

る MMP の発現を増加させることが知られている。また、プラスミノゲン (PLG) は、プラスミンの前駆体であり、さまざまな細胞外マトリックスを分解し、MMP を直接活性化することが知られている。したがって、UVA 照射によって MMP-13 の発現が増加したことでコラーゲンの分解が促進され、シワの形成につながり、それがシフォナキサンチン摂取によって抑制されたものと考えられた。さらに MMP-13 の発現上昇には、UVA 照射による PLG の発現上昇に伴う MMPs の活性化が関わっていると考えられた。

これまでの検討から、0.01% アスタキサンチン含有食の摂取による光老化抑制作用が見出されている (PLoS One 12: e0171178, 2017)。本研究性から、さらに低濃度のシフォナキサンチン含有食の摂取によっても光老化抑制作用が認められ、シフォナキサンチンの食品成分としての効率的な利用が期待された。

一方、UVA を照射せずにシフォナキサンチン添加食で飼育した場合、体重増加量については、群間に有意な差は認められず、飼育期間中の TEWL と角層水分量ともに有意な変化は認められなかった。しかしながら、0.001% 添加食群では、無添加のコントロール群に比べて、TEWL が低下する傾向を示した。

(3) 培養細胞を用いた評価

UVA 照射により真皮線維芽細胞の MMP-1 mRNA 発現は、非照射と比べて約 1.5 倍と有意に増加した。0.1 μM シフォナキサンチン処理によって、その増加は有意に抑制された。培地中 pro MMP-1 分泌量も、UVA 照射により有意に増加した。0.01 および 0.1 μM シフォナキサンチン処理によって pro MMP-1 分泌は抑制され、非照射と比較して有意差は認められなかった。

以上の結果からも、シフォナキサンチンは UVA によって惹起される MMP 発現上昇を抑制することが示された。

(4) 総括

本研究から得られたシフォナキサンチンによる皮膚光老化抑制作用の推定されるメカニズムを図 4 に示した。

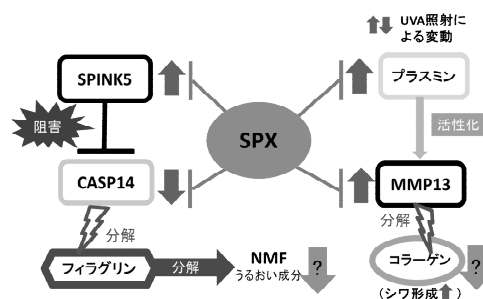


図 4 光老化抑制作用の推定メカニズム

本研究は、食品機能成分として経口摂取す

ることで、皮膚の保護作用を示そうとする点が特色である。これまでの皮膚への効果が期待される食品成分として、コラーゲンやヒアルロン酸などの細胞外マトリックスを構成する高分子が注目されてきた。これらについて、効果を示す報告はなされているものの、その作用機序は依然として不明である。コラーゲンやヒアルロン酸のような高分子化合物がそのままあるいは分解物として吸収されて、真皮層で利用されるとは考えにくい。一方、本研究では、比較的低分子で体内蓄積性も高いシフォナキサンチンに注目した。本研究成果によって、経口摂取されたシフォナキサンチンが皮膚へ到達し、機能を発揮することが示されたことから、今後の食品機能学研究における萌芽的な意義も極めて高いといえる。本研究成果を応用できれば、未活用海藻に含まれるカロテノイドの有効活用によって、国民のQOL向上にも貢献することができる。

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 1 件)

菅原 達也、真鍋 祐樹、藻類由来カロテノイドの生理作用、機能性食品と薬理栄養、査読無、11 巻、2017、80 - 85

〔学会発表〕(計 3 件)

橋本 夏希、中山 千華、真鍋 祐樹、菅原 達也、UVA 照射ヘアレスマウスの皮膚光老化に与えるシフォナキサンチン経口摂取の影響、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年

菅原 達也、脂質成分の皮膚機能保全作用、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年

橋本 夏希、中山 千華、真鍋 祐樹、菅原 達也、緑藻シフォナキサンチンによる皮膚光老化抑制効果、第 31 回カロテノイド研究談話会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

とくになし

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅原 達也 (SUGAWARA, Tatsuya)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：70378818

(2)研究分担者

真鍋 祐樹 (MANABE, Yuki)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：20730104

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし