

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780110

研究課題名（和文）大気環境刺激による皮膚脂質の酸化修飾とその制御のための食品応用

研究課題名（英文）Peroxidation of skin lipids: a role of nutraceutical foods as the inhibitor

研究代表者

仲川 清隆 (Nakagawa, Kiyotaka)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：80361145

研究成果の概要（和文）：表皮脂質（皮膚表面の脂質）は太陽光などの大気環境刺激の影響を受けやすいと考えられ、先に我々は、太陽光暴露によるヒト表皮脂質スクアレンの過酸化を認めた。本研究では、この知見を確認するとともに、スクアレンヒドロペルオキシドによる皮膚炎症惹起を見いだした。この炎症の予防には、米糠に特徴的に含まれるトコトリエノールの有効性を明らかにした。このように、大気環境刺激による皮膚脂質（スクアレン）の酸化修飾・炎症作用とその抑制のための食品（トコトリエノール）応用に資する知見を得た。

研究成果の概要（英文）：When skin is exposed to air environment including sunlight, peroxidation of the skin surface lipids can occur. Indeed, we have previously found that peroxidation of squalene occurs in human skin surface lipids. In this study, we confirmed the findings (skin squalene peroxidation), and found that squalene hydroperoxide induces skin inflammatory responses. As a preventive strategy, the inflammation could be reduced via the use of rice tocotrienol. Squalene hydroperoxide (a peroxidation product of skin surface lipids) would therefore be considered a potential therapeutic target for skin inflammatory disorders, and tocotrienol has potential use as a protective agent against skin diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：大気環境刺激、皮膚脂質、酸化修飾、スクアレン、皮膚炎症

## 1. 研究開始当初の背景

生体組織の中で最大の器官である皮膚は、太陽光（紫外線）などの大気環境刺激に常に曝されている。皮膚組織は、脂質（33%）、タンパク質（64%）、灰分（3%）からなり、脂質

の割合が高い。外界と直接に接する皮膚表面の脂質（表皮脂質）の組成は、スクアレン、トリアシルグリセロール、コレステロール、ワックスエステル、遊離脂肪酸で約95%を占める。したがって、これらの表皮脂質が、太

日光などの影響をもっとも受けやすいと考えられ、大気環境刺激による表皮脂質の酸化修飾とその影響（皮膚炎症や老化）に興味を持たれる。

先に我々は、太陽光暴露による表皮脂質スクアレン（分子内に特徴的な6個の二重結合を有する、図1）の酸化修飾を予期して、スクアレン酸化物（スクアレンヒドロペルオキシド）を高感度に定量できるLC-MS/MS法を確立した（K. Nakagawa, et al., J. Lipid Res., 48, 2779-2787, 2007）。実際に、ヒト表皮脂質を分析し、太陽光暴露前のスクアレンヒドロペルオキシドは微量（6種の異性体の合計 950  $\mu\text{g/g}$  skin lipids）であるが、わずか数時間の暴露によりスクアレンヒドロペルオキシド量が顕著に増大（2760  $\mu\text{g/g}$  skin lipids）することを見出し、ヒト皮膚のスクアレンは日光浴程度の極軽微な太陽光暴露でも容易に過酸化されることを証明した。皮膚に蓄積するスクアレンヒドロペルオキシドは、皮膚炎症や老化への関与が示唆される。

以上のことから、大気環境が皮膚脂質分子に影響することの定量的理解、そして、その機構を明確にしていくことが、新たな重要な課題であると考えられる。

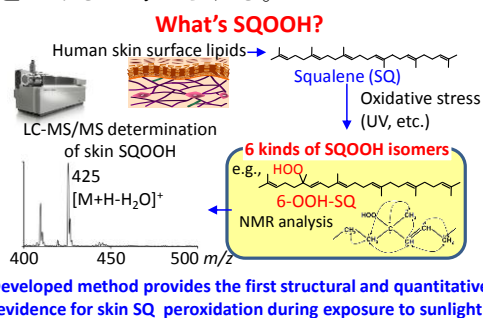


図1 表皮脂質スクアレン(SQ)からのスクアレンヒドロペルオキシド(SQOOH)の生成とLC-MS/MS分析

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、大気環境（太陽光や紫外線）が皮膚脂質に与える影響評価、および皮膚炎症・老化予防の観点から、下記の研究課題の解決を目的とする。

- ①大気環境の影響による表皮脂質の酸化修飾・構造変化の機構解明
- ②皮膚脂質の構造修飾が皮膚細胞機能に与える影響の評価
- ③皮膚炎症・老化の予防に向けた皮膚脂質の構造修飾を抑制できる食品成分の同定と効能評価

また、皮膚脂質の酸化物を定量的に解析することで、④ヒトが曝露されている大気環境の状態（例えば、紫外線濃度が高いなど）を知ることができるようになる可能性が考えられるため、この点も併せて検討する。

本研究では、大気環境の皮膚疾病への関与と食品成分による制御を、化学的かつ定量的根拠に基づいて理解できるようにする。こうした研究は過去にほとんど行われておらず、先駆的な知見が得られると期待される。

## 3. 研究の方法

### ①大気環境の影響による表皮脂質の酸化修飾・構造変化の機構解明

これまでに、日光浴程度の極軽微な太陽光暴露でヒト表皮にスクアレンヒドロペルオキシドが生じることを見いだしている（図1）。他の脂質酸化物が皮膚に蓄積する可能性を調べるために、各種の表皮脂質を種々の条件で紫外線等に暴露し、どのような生成物が生じるのかをLC-MS/MSで調べる。生成物が認められた場合、その生成機構を検討する。

### ②皮膚脂質の構造修飾が皮膚細胞機能に与える影響の評価

皮膚脂質の酸化物の生理作用を細胞実験で評価する。実験にはヒト表皮角化細胞（HaCaT）や3次元培養ヒト皮膚モデル（Vitroife-Skin）を用いる。遺伝子発現への影響をDNAチップとリアルタイムRT-PCRで調べる。タンパク質発現への影響をウエスタンブロットティングやELISAで検討する。スクアレンヒドロペルオキシドによる皮膚炎症の惹起や老化への関わりがとくに考えられるため、これらに関連する遺伝子やタンパク質の発現を重点的に調べる。

### ③皮膚炎症・老化の予防に向けた皮膚脂質の構造修飾を抑制できる食品成分の同定と効能評価

上記で皮膚脂質酸化物（スクアレンヒドロペルオキシド）の炎症・老化への関与を明らかにした後に、これらの予防を目的とした研究を行う。具体的には、スクアレンヒドロペルオキシドの皮膚炎症作用の抑制には、トコトリエノール（米糠に特徴的に含まれる不飽和ビタミンE）が有効であることを見出しつつあるため、細胞実験や動物実験を行い、この知見の確定を進める。

### ④大気環境変化指標としての皮膚脂質修飾物の分析の有効性検証

①大気環境の影響による表皮脂質の酸化修飾・構造変化の機構解明で得られる成績、加えて③の知見も参考に、皮膚脂質酸化物の解析が、ヒトが曝露されている大気環境の状態（例えば、紫外線濃度が高いなど）の把握につながるのかを検討する。

## 4. 研究成果

### ①大気環境の影響による表皮脂質の酸化修飾・構造変化の機構解明

表皮脂質を種々の条件で紫外線等に暴露し、どのような生成物が生じるのかをLC-MS/MSで調べた。その結果、ヒト表皮脂質の過酸化では、スクアレンヒドロペルオキシドの生成が重要であることをあらためて確認した。

## ②皮膚脂質の構造修飾が皮膚細胞機能に与える影響の評価

表皮脂質の酸化物、とくにスクアレンヒドロペルオキシドの生理作用を細胞実験で評価した。HaCaTを用いた実験では、スクアレンヒドロペルオキシドの処理により、一連の炎症関連遺伝子 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、COX-2、iNOS) の発現が増加し、とくにCOX-2の増加が特徴的であることがわかった (図2)。この炎症メカニズムは、スクアレンヒドロペルオキシドが活性酸素 (ROS) の産生増加を引き起こし、ROSがCOX-2の発現を亢進し、その結果としてPGE2などの増加を招き、皮膚炎症を引き起こすと考えられた。同様に、3次元培養ヒト皮膚モデル (Vitroife-Skin) を用いても、スクアレンヒドロペルオキシドによる皮膚炎症惹起作用を認めた。

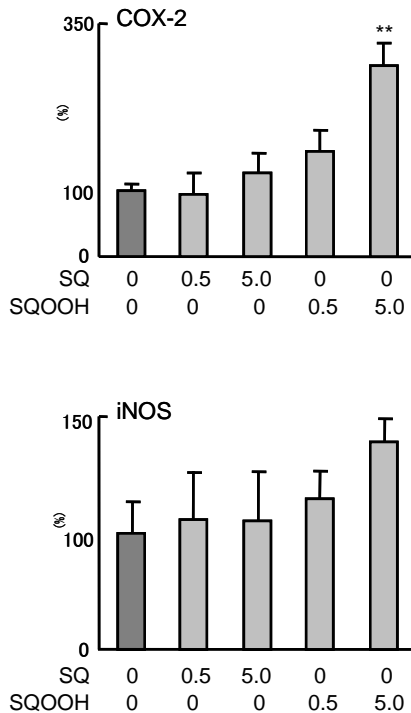


図2 スクアレンおよびスクアレンヒドロペルオキシド (0~5 $\mu$ M) がHaCaTのCOX-2とiNOS発現に与える影響。Mean $\pm$ SD (n=6)

次いで、スクアレンヒドロペルオキシドには6種の異性体があるため、異性体ごとの影響解析を、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いて行った。その結果、異性体の違い (スクアレンの酸化修飾部位の違い) により、3次元

培養ヒト皮膚モデルに対する細胞毒性や炎症性サイトカイン産生能が異なることを明らかにした (図3)。

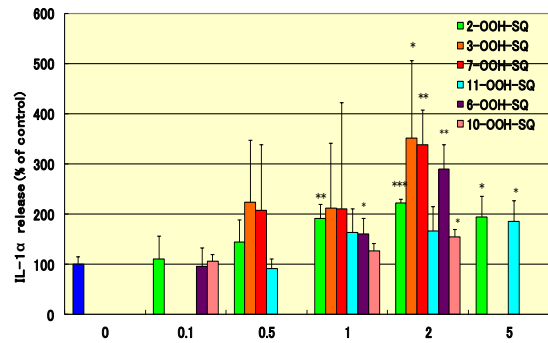


図3 6種のスクアレンヒドロペルオキシド異性体 (2-OOH-SQ, 6-OOH-SQ, 3-OOH-SQ, 7-OOH-SQ, 10-OOH-SQ, 11-OOH-SQ) が3次元培養ヒト皮膚モデルのIL-1 $\alpha$ 放出に与える影響。Mean $\pm$ SD (n=3)。強度の順は2-OOH-SQ, 6-OOH-SQ > 3-OOH-SQ, 7-OOH-SQ > 10-OOH-SQ, 11-OOH-SQであった。スクアレンヒドロペルオキシドの生成しやすさは、脂質ラジカルの安定性およびその周囲のかさ高さから、2-OOH-SQ, 6-OOH-SQ > 10-OOH-SQ > 3-OOH-SQ > 7-OOH-SQ > 11-OOH-SQと考えられ、スクアレンヒドロペルオキシドの生成しやすさとIL-1 $\alpha$ 産生能との間に相関性がある可能性が示唆された。

## ③皮膚炎症・老化の予防に向けた皮膚脂質の構造修飾を抑制できる食品成分の同定と効能評価

スクアレンヒドロペルオキシドの皮膚炎症作用を抑制できる成分としてトコトリエノールの有効性を、HaCaT細胞を用いた細胞実験で確認した。さらに、動物実験 (UV照射モデル) でトコトリエノール摂取の有効性を明らかにした (図4)。

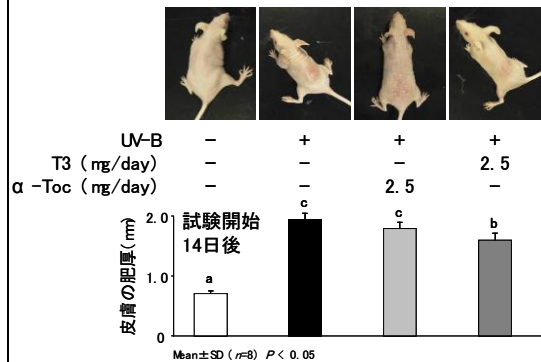


図4 UV-B照射によるヘアレスマウス皮膚の肥厚とT3摂取の影響

## ④大気環境変化指標としての皮膚脂質修飾物の分析の有効性検証

①の知見から考えて、表皮スクアレンヒド

ロペルオキシドのモニターリングは、大気環境状態（とくに紫外線の変化）の推定につながる可能性が考えられた。

以上のように、本研究では、震災の影響で計画していた研究の一部が実施できなかったものの、概ね順調に研究は推移し、「大気環境刺激による皮膚脂質の酸化修飾とその制御のための食品応用」に関する一連の知見が得られたと言える。今後は、科学研究費補助金あるいは他省庁の研究費を得て、とくに③皮膚炎症・老化の予防に向けた皮膚脂質の構造修飾を抑制できる食品成分の同定と効能評価についての研究を深化・発展させていきたいと考えている。

最後に、3次元培養ヒト皮膚モデルの実験は、国立医薬品食品衛生研究所 内野正先生の多大なるご協力を得て実施しました。この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

#### 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)

1. K. Nakagawa, A. Shibata, T. Maruko, P. Sookwong, T. Tsuzuki, K. Nakayama, H. Nishida, T. Miyazawa,  $\gamma$ -Tocotrienol reduces squalene hydroperoxide-induced inflammatory responses in HaCat keratinocytes, *Lipids*, 査読有, 45, 833-841 (2010)

[学会発表] (計6件)

1. 内野正, 仲川清隆, 五十嵐良明, 西村哲治, 宮澤陽夫, スクアレンの酸化修飾部位の違いによる3次元培養ヒト皮膚細胞への影響, 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会第19回年会, 2011年12月17日, 仙台
2. 仲川清隆, 食品・栄養学研究に資する分析法の開発と展開, 21世紀の機能性食品研究—基礎と応用—, 2011年7月21日, 帯広
3. 丸子徹, 仲川清隆, 柴田央, 内野正, 宮澤陽夫, 皮表脂質へのスクアレンヒドロペルオキシドの蓄積とその炎症作用, 第44回日本栄養・食糧学会東北支部大会, 2010年11月6日, 仙台
4. 仲川清隆, 生活環境下の太陽光暴露でヒト皮膚に生じるスクアレン過酸化物質による皮膚炎症惹起の分子機構, 日本油化学会第49回年会, 2010年9月15日, 函館
5. 仲川清隆, 宮澤陽夫, 太陽光暴露によるヒト皮表スクアレンヒドロペルオキシドの生成, 夏季油脂・コレステロール

- 研究会, 2010年7月24日, 箱根
6. 内野正, 仲川清隆, 五十嵐良明, 西村哲治, 宮澤陽夫, 皮膚の酸化修飾物がヒト皮膚細胞に及ぼす影響, 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010年6月16-18日, 沖縄

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
無し

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲川 清隆 (Nakagawa, Kiyotaka)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 80361145

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: