

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380072

研究課題名(和文)経口摂取した機能性食品成分による皮膚細胞活性化の分子基盤解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of skin cell activation by orally administered functional food substances

研究代表者

清水 誠 (Shimizu, Makoto)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30114507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：マグネシウム欠乏飼料やUV照射がマウスの皮膚に誘導する遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイ解析によって見出し、セラミドやコラーゲンのような細胞間マトリックス(ECM)成分の経口投与がそれらの変動を緩和するなど皮膚の遺伝子発現に影響を及ぼすことを明らかにした。また、マウスの初代細胞あるいはヒトの株化細胞を用いて構築した繊維芽細胞・角化細胞の共培養系で、セラミドの代謝物やコラーゲンペプチドがin vivoと同様の遺伝子変化を誘導する例を見出した。経口摂取したこれらの成分は消化や代謝を受けた後、皮膚組織に到達し、繊維芽細胞を介して角化細胞機能に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gene expression changes induced in damaged mice skin by Mg-deficient diet or UV irradiation were elucidated by DNA microarray and PCR analyses. Oral administration of ECM components, such as ceramide and collagen, was found to attenuate the gene expression changes. In vitro experiments using a fibroblast-keratinocyte co-culture system constructed with mouse primary skin cells or human skin cell lines showed that metabolites of ceramide as well as collagen peptides induced similar effects on gene expression of skin cells. These results suggest that ECM components are digested and/or metabolized after oral administration, reach the skin tissue, and then affect keratinocyte functions via modulating fibroblast-keratinocyte interactions.

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：皮膚 セラミド コラーゲン 遺伝子発現 繊維芽細胞 角化細胞 共培養

1. 研究開始当初の背景

過去 20 年以上にわたって、様々な疾病の予防や体調改善に役立つ機能性食品成分の探索とその作用機構が研究されてきた結果、科学的エビデンスを基盤に開発される機能性食品である「特定保健用食品」の開発が進み、許可された品目数も 2010 年時点で 950 を超えるに至った。一方、未だに特定保健用食品としての許可を得ることが出来ない機能性食品の中にも、社会からの期待が大きく、また実効性の期待されるものもいくつも登場しつつあった。その一つに皮膚の改善効果（保湿性・バリア機能向上効果等）を謳った食品群がある。

皮膚の状態を改善することを標榜した健康食品としては、コラーゲン、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックス成分 (ECM) を機能性素材として用いたものが以前から開発されてきたが、近年になってセラミド関連の素材にも大きな関心が寄せられるようになっていた。また、これらの成分を含む食品を摂取することにより明らかに皮膚改善効果が実感される場合があるという市場調査の結果、あるいは動物やヒトでの改善効果を示唆するような各種実験データなど、経口摂取した食品成分が皮膚に良い影響を及ぼすことを示す研究成果も少なからず報告されるようになっていた。しかしこのような ECM 成分が、経口的に摂取された時に実際に皮膚改善効果を示すかどうかについては疑問を持つ研究者も多かった。その最大の理由は、一般に腸管吸収性が低いと考えられるこれらの成分が、経口摂取のような方法で皮膚の状態を改善することを納得させる説明あるいは作用メカニズムが示されていないこと、特に ECM 成分あるいはその分解物や代謝物が皮膚組織に到達してどのように細胞機能を調節するかに関する分子レベルの知見がなかったことであると思われる。

2. 研究の目的

本研究は「仮に ECM 成分の経口摂取が本当に皮膚の状態を改善するとしたら、どのような作用メカニズムが考え得るのか」という視点に立って、「ECM 成分の腸管での吸収→腸管上皮や肝臓での代謝→皮膚細胞への作用」の 3 つのステップを考慮した作業仮説を構築し、それを分子・細胞・動物レベルで実証することを目的とした。具体的には ECM 関連成分として主にセラミドとコラーゲンに着目し、それらの代謝物や分解物を含めた関連成分が皮膚由来の繊維芽細胞や角化細胞等の機能に及ぼす影響をマウスやヒトの細胞を用いた *in vitro* 実験系、マウスを用いた *in vivo* 実験系の両方によって明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ECM 成分の腸管上皮細胞層透過性の検討

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 を Trans-well insert 中の透過性膜上に単層培養し、本上皮細胞層を用いて、セラミドとその代謝物であるスフィンゴシン (SPH) やスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P)、あるいはコラーゲンとその分解ペプチド (CP) の腸管上皮細胞層透過性の測定を試みた。

(2) ヘアレスマウスを用いた ECM 成分の経口投与実験

マウスに Mg 欠乏食を与える実験系
ヘアレスマウス (Hos,HR-1、3 週令) を 1 週間予備飼育した後に、皮膚にダメージを与える AD 食 (Mg 欠乏食) を与えて 4 週間飼育し、その後、セラミド (グルコシルセラミド) を添加した通常食を与えて、皮膚ダメージの回復に及ぼすセラミドの影響を観察した。

マウスに UV 照射を行う実験系
6 週令のヘアレスマウスに通常食あるいは通常食 + コラーゲンペプチド食を投与した状態で、4 週間にわたって毎日一定時間 UV を照射し、UV による皮膚のダメージに対するコラーゲン投与の影響を観察した。なお、UV 照射をしないコントロール群に及ぼすコラーゲンペプチド投与 (6 週間) の影響も同時に調べた。

(3) 皮膚細胞を用いた *in vitro* 実験系 (共培養系) による解析

マウスから分離した角化細胞と繊維芽細胞を用いた培養系
生後 2-3 日の Balb/c マウス (HR-1 と同系のマウス) の皮膚組織を摘出し、そこから繊維芽細胞と角化細胞を分離した。繊維芽細胞は透過性膜を装着した培養インサートの中にコラーゲンゲルに包埋した形で培養した。一方、角化細胞はゲルの表面に撒き、培養液を満たしたウェル中にインサートを置いた状態でゲル表面を空気に曝露して 5 日間培養した。その後、インサートの下側の培養液に ECM 成分を添加して一定時間培養し、角化細胞や繊維芽細胞における遺伝子発現変化を調べた。

ヒト角化細胞株 HaCaT 細胞とヒト初代繊維芽細胞を用いた培養系

同様にヒト初代繊維芽細胞 (クラボウ) をコラーゲンゲル中に分散させ、ゲルの表面に HaCaT 細胞を撒いて時間を変えて培養し、角化細胞層を形成させた。各種マーカー分子の発現を見ることによって培養時間を決定し、その条件下で繊維芽細胞の下部培養液中に加えた ECM 成分が角化細胞層の遺伝子発現変化に及ぼす影響を観察した。

(4) 皮膚細胞における遺伝子発現の ECM 成分投与による変化の観察

培養後の角化細胞あるいは繊維芽細胞から RNA を回収し、cDNA を作製して DNA マイクロアレイ解析に供した。発現量に変化が

見られた遺伝子については Real time-RT-PCR 法によって遺伝子変動の確認を行った。また皮膚の主要なタンパク質の中で、抗体が入手可能なもの、発現量が多いものについては Western blotting 解析を試みた。得られた遺伝子変化データについてはいくつかの情報科学的手法で解析を行った。

4. 研究成果

(1) ECM 成分の腸管透過性

腸管上皮細胞 Caco-2 の単層培養系を用いて、セラミドやコラーゲンの腸管上皮細胞層透過性を測定したが、本実験系ではこれらの透過性が高いという結果は得られず、透過した分解物や代謝物もほとんど検出できなかった。そこで、主に文献から想定されるセラミドやスフィンゴ脂質の代謝物、あるいはコラーゲンの分解ペプチドに着目し、それらが体内に移行したと仮定して、繊維芽細胞や角化細胞における遺伝子発現に及ぼす影響を検討することにした。また平行してマウスを用いた in vivo 実験を実施し、これら ECM 成分が皮膚に及ぼす効果を調べ、ECM 関連物質によって発現変動する皮膚細胞中の遺伝子としてどのようなものがあるか探索した。その結果、標的遺伝子としては、繊維芽細胞(真皮)ではコラーゲン繊維関連、脂質代謝関連、ナトリウム排出関連の遺伝子が、角化細胞(表皮)では毛包・皮脂腺関連、角質層関連、神経細胞関連遺伝子などが ECM 摂取の影響を受けることが示唆されたので、以後はこれらの遺伝子を中心に検討を進めた。

(2) 皮膚 in vitro 実験系の構築

幼若マウスから分離した初代繊維芽細胞と角化細胞を3次元で共培養することで、機能的な表皮細胞モデル・真皮細胞モデルが作成できることを確認することができた。さらにヒトの角化細胞株を用いても同様の共培養系が作成できることを見出し、さらに皮膚細胞の分化を誘導するのに適した培養条件設定にも成功した。そこでこれらの培養細胞実験系とマウスを用いた in vivo 実験系を組み合わせ、セラミド(代謝物)およびコラーゲン(ペプチド)が標的遺伝子の発現に及ぼす影響を詳細に検討することにした。

(3) マウス投与試験による ECM 成分の皮膚遺伝子発現調節作用

Mg 欠乏食(AD 食)を用いた実験系でのセラミドの効果

ヘアレスマウスに皮膚ダメージを与える Mg 欠乏食(AD 食)を投与した時、およびここにセラミドなどスフィンゴシン関連物質を含む試験食を加えた時に皮膚組織の遺伝子にそれぞれどのような変動が起こるかを、DNA マイクロアレイや RT-PCR によって検討した。角質細胞の細胞膜を裏打ちしているコーニファイドエンベロープに関する遺伝子、細胞外マトリクスに関する遺伝子、毛に関す

る遺伝子などが AD 食によって増加する傾向が観察された。また脂質代謝に関する遺伝子群に減少傾向がみられた。グルコシルセラミドの投与は、AD 食を摂取したマウスの皮膚組織において発現上昇した6遺伝子、発現低下した4遺伝子の変化を抑制した。また、これらの遺伝子変化が表皮(角化細胞)における変化なのか、真皮(繊維芽細胞)における変化なのかを明らかにした。さらに、AD 食を与えていない通常食マウスに対するグルコシルセラミドの投与が表皮あるいは真皮のいくつかの遺伝子を変動させることを見出し、グルコシルセラミドの経口摂取は皮膚組織における遺伝子発現に影響を及ぼすことを明らかにした。

UV 照射マウスを用いた実験系でのコラーゲンの効果

マウスの皮膚に UV を照射して皮膚の炎症・傷害を誘導した時に、コラーゲンの経口投与が皮膚細胞の遺伝子発現変化にどのような影響を及ぼすかについて検討を行い、UV 照射で発現低下した 11 遺伝子に対するコラーゲンの緩和作用、発現上昇した 7 遺伝子に対するコラーゲンの緩和作用などを見いだした。変化した遺伝子には低酸素、脂質代謝、コレステロール生合成に関わるものなどがあり、コラーゲンの摂取は皮膚損傷の機能回復に貢献していることが推測された。

(4) 共培養系を用いた in vitro 実験系での ECM 成分の影響解析

ECM 関連成分による皮膚組織の遺伝子発現変化を解析するために角化細胞と繊維芽細胞の共培養系を構築し、in vivo 実験と in vitro 実験の相関性を検討した。

セラミドが皮膚細胞に及ぼす影響の解析
マウスから分離して培養した繊維芽細胞あるいは角化細胞にミルクセラミド(MPL)、あるいはその代謝物であるスフィンゴシン(SPH)、スフィンゴシン1リン酸(S1P)を加えて培養し、in vivo 実験で変動が観察された遺伝子の in vitro での発現状態を観察したところ、その変化は細胞レベルでも生体中と類似の傾向を示した。また MPL と SPH で遺伝子発現変化のパターンが類似していたことから、MPL の活性は、含まれるスフィンゴリンミエリン及びその代謝物である SPH などに起因するものであることが示唆された。

一方、ヒト株化細胞を用いた共培養系によってセラミド関連物質が皮膚細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した結果、繊維芽細胞においては SPH24 時間処理群で elastin や elastase の発現量が増加し、角化細胞においては S1P 処理群でスフィンゴミエリン代謝酵素、S1P 受容体、タイトジャンクション関連遺伝子などの発現量に変化が見られた。なお、セラミド関連物質による皮膚細胞の遺伝子発現変化誘導には繊維芽細胞と角化細胞の相互作用が必要であることを示すデータが得られている。これらの結果から、ヒト株化

細胞を用いた角化細胞 繊維芽細胞の共培養系も、皮膚における細胞間相互作用や食品由来因子の作用を解析する上で有用であることが確認できた。

コラーゲンが皮膚細胞に及ぼす影響の解析マウスの共培養系を用いて、コラーゲンペプチドが皮膚細胞での遺伝子発現に及ぼす影響を見た結果、コラーゲンペプチドが角化細胞層の形成や基質の構成に関わるいくつかの遺伝子の発現を変化させることが見出された。例えば、角化細胞ではケラチン関連遺伝子や細胞骨格関連遺伝子が顕著に変化したほか、皮膚の損傷に関連する遺伝子が変動した。また、その影響の多くが角化細胞と繊維芽細胞の共培養系でのみ観察されることが見出され、コラーゲンペプチドの作用においても両細胞の相互作用が必須であることが示された。

なお、ヒト細胞を用いた共培養系での実験は現在進行中であるが、今のところコラーゲンペプチド添加による角化細胞、繊維芽細胞での遺伝子発現変動が同様に見られている。

以上述べたように、本研究は *in vivo*, *in vitro* の両実験系を用いて、ECM 成分の皮膚細胞への影響を主として遺伝子発現レベルで解析したものである。本研究の結果、セラミドやコラーゲンの経口摂取により、その代謝物や分解物が皮膚組織に到達した場合、それらは皮膚細胞の機能を司る各種遺伝子の発現を調節し得ること、またその調節には繊維芽細胞と角化細胞の相互作用が関わることを示唆された。*In vivo* 実験系において、栄養素欠如や UV 刺激によりダメージを受けた皮膚組織の各種遺伝子発現が ECM 成分の経口摂取で変動したことを考えると、「ECM 成分 消化物・代謝物 血中 皮膚組織（真皮）での繊維芽細胞の刺激 皮膚組織（表皮）での角化細胞の刺激 皮膚のバリア機能・代謝機能などの改善」といったプロセスが進行し、ECM 成分は皮膚の改善に何らかの役割を果たし得るものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takatori, R., Lan Phuong, L.V., Iwamoto, T., Satsu, H., Totsuka, M., Shimizu, M. Effects of oral administration of glucosylceramide on gene expression changes in hairless mouse skin: Comparison between whole skin, epidermis, and dermis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77, 1882-1887 (2013)

〔学会発表〕(計 3 件)

赤木 裕、レ ヴ ラン フォン、薩 秀夫、戸塚 護、千田和広、清水 誠、共培養系においてセラミドが皮膚細胞に及ぼす影響。日本農芸化学会2014年度大会、2014年03月27日～30日（川崎）

Phuong, L.V., Takatori, R., Iwamoto, T., Sato, K., Totsuka, M., Satsu, H., Chida, K., Shimizu, M. Organotypic coculture of mouse skin cells as a model for studying the effects of collagen peptide. 日本農芸化学会2013年度大会、2013年03月24日～27日（仙台）
Phuong, L.V., Takatori, R., Iwamoto, T., Sato, K., Totsuka, M., Satsu, H., Chida, K., Shimizu, M. Effects of prolyl-hydroxyproline, a collagen peptide, on gene expression of mouse skin cells in coculture. International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012) 2012年11月27日～30日（Nagoya）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 誠 (SHIMIZU Makoto)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：30114507

(2) 研究分担者

戸塚 護 (TOTSUKA Mamoru)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：70227601

(3) 研究分担者

薩 秀夫 (SATSU Hideo)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：80323484