

氏名・(本籍)	ヨシモト サトシ 吉本 聖 (山口県)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	甲第工50号
学位授与の日付	令和2年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)
学位論文題目	リボフラビンを起点としたアミノ酸やビタミン間の UVA光増感で産生される過酸化水素により促進される 真皮線維芽細胞の光老化に関する研究
論文審査委員	主査 教授 安藤 秀哉 副査 教授 滝澤 昇 教授 竹崎 誠 教授 片岡 健 教授 中村 元直 教授 西方 敬人 (甲南大学フロンティア サイエンス学部)

論文内容の要旨

申請者氏名 吉本 聖

論文題目

リボフラビンを起点としたアミノ酸やビタミン間のUVA光増感で産生される過酸化水素により促進される真皮線維芽細胞の光老化に関する研究

皮膚の老化を予防する、つまり、見た目を若々しく保つことはQOLの向上に大きな寄与を果たすことから、世界的に研究が盛んな領域の一つである。本研究は、皮膚老化の中でも、長期的なUVA暴露により引き起こされる真皮線維芽細胞の光老化機序について、今までに一般に十分に理解されていなかった、“細胞障害の主要因となる活性酸素種”と、その“産生機序”を、種々のアミノ酸やビタミンの共存下で生じるUVA光増感反応を解析することで、詳細に明らかにしたものである。

さらに、本研究中で得られた“in vitroで光老化線維芽細胞を誘導する方法”と“光増感剤と栄養成分の組み合わせでおこす異なる機序の光増感反応”の応用により、光老化と色素沈着、および光老化の予防について新しい知見を得ることができた。以下に本研究で得られた成果の一部を示す。

1) UVA暴露で引き起こされる細胞障害が種々のアミノ酸とビタミンが共存する環境下で増悪され、その細胞障害の主要因となる活性酸素種が H_2O_2 であること

UVA暴露で発生する H_2O_2 は種々のアミノ酸とビタミン混合溶液(DMEM)で多量に発生したが、DMEM中のアミノ酸のみ、または、ビタミンのみの溶液条件ではほとんど産生されなかった。加えて、DMEM中のUVA暴露で誘発された線維芽細胞の細胞死は、高い H_2O_2 消去能をもつカタラーゼやGSHの添加で完全に抑制された。以上より、UVA暴露によりDMEM中に発生した H_2O_2 が細胞障害の主要因であることが示唆された。

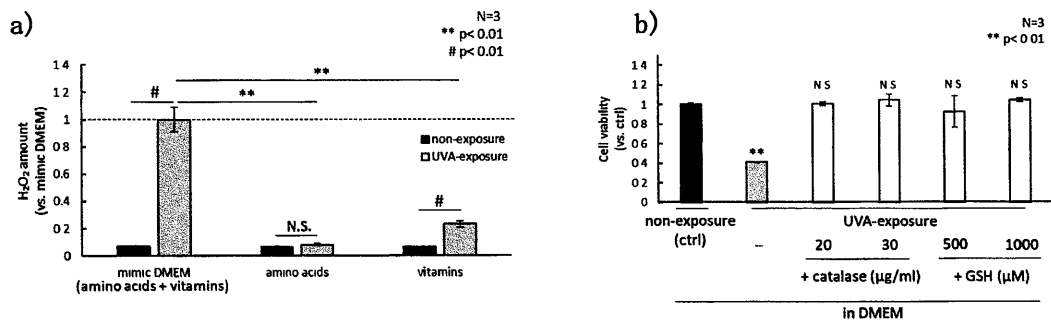


図1. a) 各成分へのUVA暴露で発生した H_2O_2 量

b) DMEM中でのUVA暴露後にカタラーゼ/GSHを添加した線維芽細胞の細胞生存率

2) 種々のアミノ酸とビタミンの中でも UVA 暴露による H₂O₂ 産生の初期反応を担う成分がビタミン B₂ として知られるリボフラビンであること

UVA 照射されたアミノ酸とビタミン混合溶液で多量に発生した H₂O₂ は、UVA クロモフォアとしての性質ももつリボフラビン(ビタミン B₂)を除いた条件で、有意に低下した (図 2 a)。

そこで、リボフラビンとの共存下における UVA 暴露で H₂O₂ を多量に産生する成分を探したところ、トリプトファンやチロシン、葉酸が H₂O₂ 産生に関与していた (図 2 b)。

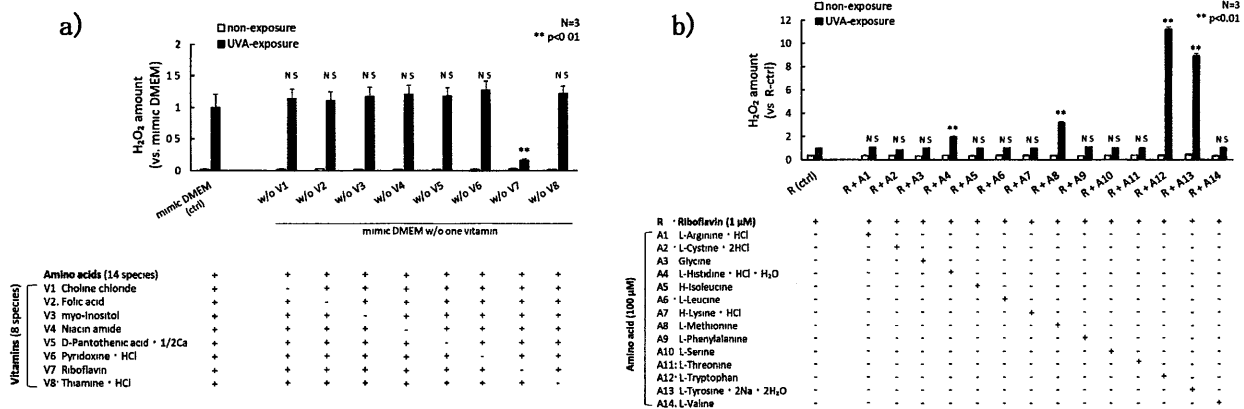


図 2. a) DMEM から一種のビタミンを除いた溶液に UVA を暴露した際に産生された H₂O₂ 量
b) UVA 暴露時にリボフラビンと協調的に H₂O₂ を産生するアミノ酸の探索

3) リボフラビンと共存することで UVA 暴露中の H₂O₂ 産生を増加させる成分が、トリプトファン、チロシン、葉酸などであり、リボフラビンと葉酸間の光増感反応が type 1 (もしくは minor type 2) 反応であること、リボフラビンとトリプトファン間の光増感反応が major type 2 反応であり、異なる機序で H₂O₂ を産生すること

NaN₃ により、リボフラビンとトリプトファン間の光増感反応が抑制されたが、リボフラビンと葉酸間の光増感反応は抑制されなかった (図 3)。これらの結果は、リボフラビンと対になる成分により、H₂O₂ を産生する機序が異なることを示している (図 4)。

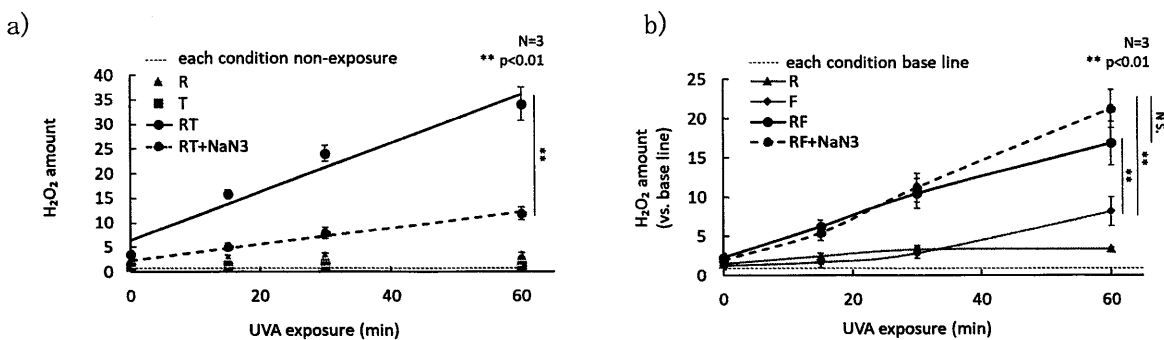


図 3. a) 一重項酸素消去剤である NaN₃ 存在下におけるリボフラビンと b) 葉酸, c) トリプトファン間の光増感反応で産生される H₂O₂ の経時的な評価

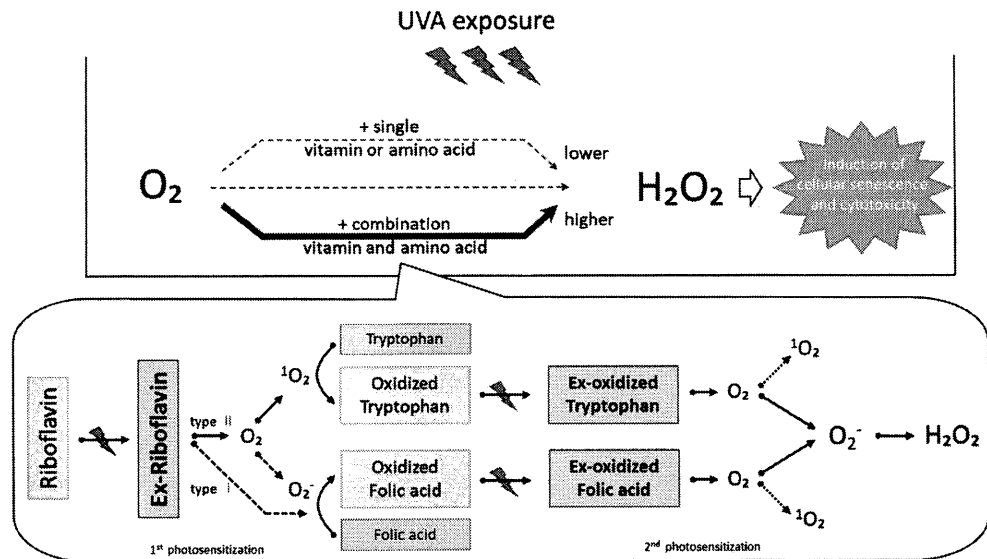


図4. 本研究で明らかとなった種々の栄養成分が存在する環境でおこる光増感反応のメカニズム
微量のリボフラビンから始まる光増感反応が、環境中に多く存在するアミノ酸やビタミンにより、大きな光増感反応をおこすことでH₂O₂が多量に産生される

4) リボフラビン共存下のUVA光増感反応を抑制する濃度のシステインは、リボフラビンと種々の栄養成分共存下のUVA暴露で誘発される細胞障害を完全に阻害すること

機序の異なる光増感反応に対する抗酸化素材の作用を評価した。光増感反応には多種の活性酸素種が関与するため、抗酸化機能の異なる抗酸化素材で評価したところ、興味深いことに、光増感反応による細胞毒性は1mM-アスコルビン酸処理により増悪したが、1mM-システインの処理では完全に抑制された(図5)。また、1mM-アスコルビン酸はトリプトファンや葉酸と同様にリボフラビンと協調的に光増感したが、1mM-システインはリボフラビンとの協調的な光増感によるH₂O₂産生を抑制した。システインは高いH₂O₂消去能をもつことから、H₂O₂消去能が高く、かつ、リボフラビン共存下で光増感をおこさない素材であれば、UVAによる皮膚の光老化を抑制できる可能性が示唆された。

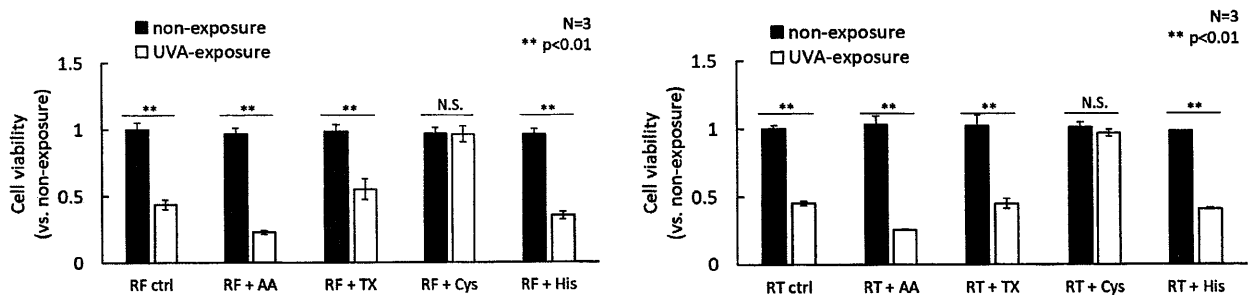


図5. 2種のUVA光増感反応に対する抗酸化素材の作用評価
(R:リボフラビン, T:トリプトファン, F:葉酸,
AA:アスコルビン酸, TX:トロロックス, Cys:システイン, His:ヒスチジン)

発 表 論 文 :

1. 学術論文 (査読有)

[1] S. Yoshimoto, N. Kohara, N. Sato, H. Ando, M. Ichihashi, Riboflavin plays a pivotal role in UVA-induced toxicity of fibroblasts as a key molecule in the production of H₂O₂ by UVA radiation in collaboration with amino acids and vitamins. International journal of molecular science. in press. (2020)

[2] S. Yoshimoto, Y. Ohagi, M. Yoshida, H. Yanagi, S. Hibino, M. Ichihashi, H. Ando, Placental Extracts Regulate Melanin Synthesis in Normal Human Melanocytes with Alterations of Mitochondrial Respiration, Experimental Dermatology, 1:50-54, (2019).

[3] S. Yoshimoto, M. Yoshida, H. Ando, M. Ichihashi, Establishment of photo-aging in vitro by repetitive UVA irradiation: Induction of characteristic markers of senescence and its prevention by PAPANAL with potent catalase activity, Photochemistry and Photobiology, 94:438-444, (2018).

[4] M. Ichihashi, H. Yanagi, S. Yoshimoto, H. Ando, M. Kunisada, C. Nishigori. Olive oil and skin anti-aging. Glycative Stress Research. 5:86-94, (2018).

[5] 市橋正光, 吉本聖, 安藤秀哉, 皮膚のアンチエイジング, オレオサイエンス 18:121-129, 2018

[6] H. Ando, Y. Ohagi, M. Yoshida, S. Yoshimoto, Y. Higashi, M. Yagi, K. Monji, M. Yagi, T. Uchiumi, D. Kang, M. Ichihashi, Melanin pigment interrupts the fluorescence staining of mitochondria in melanocytes, Journal of Dermatology Science, 84(3):349-351, (2016).

2. 商業雑誌 (査読無)

[1] 吉本聖, 吉田萌生, 安藤秀哉, 真皮におけるシミ形成要因と美白化粧品開発への応用, COSMETIC STAGE, 11:1-3, (2017)

3. 著書

[1] 吉本聖, 平松歩, 安藤秀哉, 薬用美白化粧品のこれまでとこれから—培養皮膚細胞を用いた評価手法の変遷と新規美白コンセプトの展望について—, FRAGRANCE JOURNAL, 2月号 p10-15, (2020).

[2] 吉本聖, 「最新・化粧品開発のための美容理論、処方/製剤、機能評価の実際」第11章 真皮線維芽細胞がもつ色素細胞のメラニン生成抑制作用について, 技術教育出版社, p104-113, (2018).

審査結果の要旨

本研究は、太陽光線に含まれる紫外線が皮膚の老化現象を助長する作用メカニズムに関するものであり、特に女性にとっては興味深い研究テーマである。これまでに世界中の大学研究者や化粧品会社をはじめとする企業の研究者が数多くの学術論文を発表してきた研究分野である。今回、論文提出者である吉本聖は、先行研究により報告されている紫外線誘導老化促進作用の評価手法の問題点を抽出し、従来の実験手法では捉えられなかった現象を明らかにすることに成功した。また、改良もしくは新規の手法を用いた実験を実施したことにより多くの新知見を得て、未知の作用メカニズムを解明することもできた。さらに、老化予防効果があるとされて日常から多くの消費者が使用している各種の抗酸化剤には、紫外線によって生じる活性酸素の消去能に対する特異性があり、それぞれに適した使用方法があり得ることを示した。このことは、消費者が老化予防化粧品を使用する際に太陽紫外線を避けるべきであるなど、適切な使用方法を提示することが可能となる、有用かつQOLの向上に貢献する研究成果であると言える。

学位論文は、序論、総括、引用文献を含む7章から構成されている。また、本研究では皮膚老化を評価する実験手法の問題点を改善することにも注力したことから、“実験操作”の章を独立させた。第2章では、これまでの研究報告と対比しながら、紫外線誘導老化促進作用の原因因子とそれを生じる組み合わせを明らかにした。これまでは個々のクロモフォア（紫外線のエネルギーを吸収して活性酸素を発生する物質）に関する知見が主であったが、本研究では意外にも複数のクロモフォアが共存すると相乗的な活性酸素発生作用が認められることを発見した。第3章では、紫外線誘導老化に深く関わる真皮の線維芽細胞と、代表的な皮膚の老化現象である“しみ”の関係を解析した。紫外線により線維芽細胞の老化が促進され、しみの原因となるメラニン色素の生成量が増加することを示した。第4章では、抗酸化剤であっても場合によっては皮膚の老化を促進する方向へはたらくこともあることを示した。代表的な抗酸化剤であるアスコルビン酸（ビタミンC）は、真皮に存在するリボフラビン（ビタミンB2）と共存して紫外線が照射されると、顕著な過酸化水素が発生することを見出した。しかしながら、同じく代表的な抗酸化剤であるL-システインは、リボフラビンと共存しても過酸化水素を発生しないことを示し、野外で活動する際にはシステイン系の抗酸化剤を用いるべきであることが示唆される研究結果を得ることができた。以上のように、本研究の成果はコスメティックサイエンスの研究分野に資する有益な内容を含んでおり、化粧品会社が老化予防などの機能性化粧品を研究開発する際に必要な新規コンセプト構築にも役立つ。

上述の研究成果は5編の査読付き論文として学術論文誌に掲載され、10件の国内および海外の学会で発表された。これらのことを総合的に審査した結果、本論文は博士学位論文として合格であると判断し、論文提出者である吉本聖は博士（工学）の学位を授与するのにふさわしいことを認める。