

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

2020

岡山理科大学大学院
工学研究科
システム科学専攻

吉本 聖

目次

第1章 研究背景	1
第2章 種々のアミノ酸やビタミン存在下の UVA 暴露で誘発される線維芽細胞の光老化とその 主要因の解析	5
2-1. 序論	6
2-2. 結果	8
2-2-1. PBS または DMEM 中で UVA を反復暴露された線維芽細胞における老化指標 (SA- β -galactosidase 量) の比較	8
2-2-2. DMEM 中で UVA を反復暴露された線維芽細胞における種々の老化指標の比較	11
2-2-3. DMEM 中での UVA 暴露で生じた細胞障害の主要因の探索	15
2-2-4. UVA 暴露後の DMEM に生じた H ₂ O ₂ の定量	17
2-2-5. 130 μ M-H ₂ O ₂ の反復処理による細胞老化の誘導	18
2-2-6. UVA 暴露中に H ₂ O ₂ を産生する成分の特定-アミノ酸群とビタミン群の比較-	22
2-2-7. UVA 暴露中に H ₂ O ₂ を産生する成分の特定-リボフラビン-	24
2-2-8. UVA 暴露中に H ₂ O ₂ を産生する成分の特定-リボフラビンと協調する成分の探索-	27
2-2-9. 光増感メカニズムの解析	29
2-3. 考察	38
第3章 線維芽細胞と共培養した色素細胞のメラニン産生変化の検討	40
3-1. 序論	41
3-2. 結果	43
3-2-1. 線維芽細胞または UVA 暴露線維芽細胞と共培養した色素細胞の評価法	43
3-2-2. 線維芽細胞と共培養した色素細胞のメラニン量の比較	44
3-2-3. 線維芽細胞と共培養した色素細胞のチロシナーゼ量と SOD2 量の比較	45
3-3. 考察	46
第4章 UVA 光増感に対する抗酸化素材の作用の解析	48
4-1. 序論	49

4-2. 結果	50
4-2-1. UVA 暴露による H ₂ O ₂ 産生量が同等となる光増感条件の検討	50
4-2-2. UVA 光増感反応に対する各抗酸化素材の作用の評価	51
4-2-3. リポフラビンと抗酸化素材の間でおこる光増感反応の比較	54
4-3. 考察	57
第 5 章 総括	58
第 6 章 実験操作	61
6-1. 細胞培養	62
6-2. UVA 暴露条件	62
6-3. SA- β -galactosidase 染色	62
6-4. 細胞形態の評価	62
6-5. DHR123 による細胞内活性酸素種の評価	63
6-6. 細胞の色調の測定 (細胞酸化物の評価)	63
6-7. ウェスタンブロッティング	63
6-8. 細胞生存率の評価 (MTS 法)	64
6-9. H ₂ O ₂ の検出 (ADHP/HRP 法)	64
6-10. 線維芽細胞への H ₂ O ₂ 反復処理条件	64
6-11. mimic DMEM の作製	64
6-12. スーパーオキシドの検出 (MPEC 法)	65
6-13. 葉酸酸化物 (プテリン誘導体) の測定	65
6-14. トリプトファンとキヌレニン誘導体の測定	65
6-15. 色素細胞と線維芽細胞の共培養	65
6-16. メラニン定量	65
6-17. 統計分析	66
第 7 章 引用文献	67
謝辞	78

第 1 章

第1章 研究背景

これまでに多くの臨床研究や基礎研究により、慢性的な紫外線（UV）曝露は光老化や皮膚癌などの有害な皮膚損傷を誘発することが報告されている[1-4]。紫外線は、短波長のUVC（100～280 nm）、中波長のUVB（280～320 nm）、長波長のUVA（320～400 nm）に分類される[5]。UVAはさらにUVA2（320～340 nm）とUVA1（340～400 nm）に細分化される[6]。地表面に到達する紫外線のうち、約90～99%はUVA、約1～10%がUVBであることが知られている。また、UVCは大気中のオゾン層にほぼ完全に吸収されるため、地表面へ到達する線量は極僅かである。皮膚や目の細胞内外のDNA、RNA、一部のアミノ酸はUVB吸収能をもつため損傷を受けやすい。特に、細胞の核内に存在するDNAがUVBを吸収すると、CPD（シクロブタン型ピリミジン二量体）や6.4-PP（(6-4)型光産物）といった典型的なDNA損傷を誘発しヒトの皮膚に紅斑を生じさせる[7-11]。また、UVBは急性炎症に対する皮膚反応の主な原因であることが示されており、慢性的な日射によって誘発される光老化および皮膚癌の形成についても示されている[12]。対照的に、UVA線量は日焼けや紅斑などの急性的な皮膚反応はほとんど誘発しないが、光老化と呼ばれる慢性的な皮膚損傷の誘発に寄与する。UVAによる慢性皮膚損傷の機序は、フラビン類、ポルフィリン類、トリプトファン酸化物であるFICZ、メラニンなどの様々な光増感成分を介した光増感反応によって生成される活性酸素種（ROS）によって引き起こされることが報告されている[13-15]。UVAは、酸素分子を介さずに基質を直接酸化するtype 1反応と、酸素分子を介するtype 2反応に分類される。また、type 2反応は光増感成分からのエネルギー移動により一重項酸素を産生するmajor type 2反応と、電子移動によりスーパーオキシドを産生するminor type 2反応がある[16]。

慢性的な紫外線曝露で誘発される光老化の所見として、皮膚の粗造化、シワ、たるみ、不規則な色素沈着が観察される。皮膚の粗造化は角化細胞の増殖異常、深いシワやたるみは真皮を構成する弾性線維の変性、不規則な色素沈着は色素細胞のメラニン産生異常や増殖異常により誘発されることが知られている[17-20]。長波長であるUVAは真皮組織まで到達することから真皮組織の機能破綻に関与し、特に、真皮線維芽細胞がもつコラーゲンやエラスチン産生能の低下とコラゲナーゼに代表されるMMPs（マトリックスメタロプロ

テアーゼ)の発現増加で引き起こされる細胞外マトリックスの過剰な分解や変性で、皮膚の弾力性や強靭性が低下することがよく知られている[21-24]。また、真皮線維芽細胞の分泌因子は角化細胞の増殖・分化(FGFなど)や色素細胞のメラニン産生を調節する作用(Dkk1、NRG1など)をもつことが報告されてきた[25, 26]。特に、線維芽細胞がもつ色素細胞のメラニン産生を抑制する作用は、角化細胞などの他の皮膚細胞では報告されていないユニークな性質である。しかしながら、これらの線維芽細胞の機能も慢性的なUVA暴露により失われることが近年の研究により明らかとなってきた[27]。以上のことから、UVA暴露による真皮線維芽細胞の機能破綻を予防することは皮膚組織全体の機能維持に大きく貢献すると考えられる。

これまでに、UVA暴露による細胞障害を抑制する研究は数多く報告されており、UVA暴露により活性化するアポトーシスや抗酸化機能に関与するシグナル伝達経路、種々の遺伝子発現の変動などが明らかにされ、UVA暴露による細胞障害を予防する素材の提案もなされてきた[28]。しかし、十分な検討がなされていない領域も残されている。多くの研究で、UVA暴露による引き起こされた細胞障害は、UVA暴露により発生したROSによるものとされているが、発生したROSを特定したものや、その産生機序に関して議論されている報告は極少数である[29]。また実験条件として、UVAクロモフォアを含まないPBS中での高線量UVAの単回暴露により細胞障害を誘導する方法が主流であるが[30-40](Table 1)、これは細胞内のUVAクロモフォアによる光増感反応しか想定されていないと考えられる。しかし、真皮線維芽細胞は、表皮細胞や皮下脂肪細胞のように細胞同士が密に接している環境ではなく、組織液を含むコラーゲンなどの細胞外基質に囲まれた環境に存在している。つまり、線維芽細胞の細胞外環境下に存在するUVAクロモフォアを介した光増感反応も考慮に入れる必要があるのではないかと考えた。

以上より本研究では、UVA暴露により誘発される真皮線維芽細胞の光老化について理解を深めることを目的に、生体組織に近い環境として、UVAクロモフォアだけでなく種々のアミノ酸やビタミンが含有されるDMEM(Table 2)を選定し、UVA暴露中の光増感反応で発生するROSと線維芽細胞の光老化との関係を解析した。

Table 1. 先行研究における細胞への UVA 暴露条件

reference No.	UVA (J/cm ²)	number of exposure	buffer
30)	27.5	1	PBS
31)	20	1	PBS
32)	5~15	1	PBS
33)	10	3	PBS
34)	20	1	PBS
35)	20	1	PBS
36)	3	3	DMEM + 10% FBS
37)	8~16	1	MEMi
38)	1~2	1	PBS
39)	7~15	1	PBS
40)	10	3	PBS

Table 2. DMEM に含まれるアミノ酸とビタミン組成

amino acids (in DMEM)	(g/L)	vitamins (in DMEM)	(g/L)
A1 : L-Arginine · HCl	0.084	V1: Choline chloride	0.004
A2 : L-Cystine · 2HCl	0.0626	V2: Folic acid	0.004
A3 : Glycine	0.03	V3: myo-Inositol	0.0072
A4 : L-Histidine · HCl · H ₂ O	0.042	V4: Niacin amide	0.004
A5 : L-Isoleucine	0.105	V5: D-Pantothenic acid · 1/2Ca	0.004
A6 : L-Leucine	0.105	V6: Pyridoxine · HCl	0.00404
A7 : L-Lysine · HCl	0.146	V7: Riboflavin	0.0004
A8 : L-Methionine	0.03	V8: Thiamine · HCl	0.004
A9 : L-Phenylalanine	0.066		
A10: L-Serine	0.042		
A11: L-Threonine	0.095		
A12: L-Tryptophan	0.016		
A13: L-Tyrosine · 2Na · 2H ₂ O	0.12037		
A14: L-Valine	0.094		

第 2 章

第 2 章 種々のアミノ酸やビタミン存在下の UVA 暴露で誘発される線維芽細胞の 光老化とその主要因の解析

2-1 序論

真皮線維芽細胞はコラーゲンやエラスチンなど真皮マトリックスを構築し、皮膚の柔軟性や弾力性、強靭性に寄与する細胞である。加えて、分泌性因子による角化細胞の増殖や表皮形成、色素細胞のメラニン産生を調節する作用を有し、皮膚恒常性の維持に重要な役割を果たしている。このような線維芽細胞の作用は長期的な UVA の暴露により発生する ROS により低下すると考えられている。UVA による ROS の産生は生体に存在する UVA クロモフォアを介した光増感反応で生じる。UVA によるクロモフォアを介した光増感反応は、基質分子を直接酸化する type 1 反応と酸素分子の介在により ROS が発生する type 2 反応とに分類される。また、type 2 反応は、UVA を吸収したクロモフォアからのエネルギー移動による一重項酸素の発生を伴う major type 2 反応と、電子移動によるスーパーオキシド産生を伴う minor type 2 反応とに分類される。加えて、光増感反応により発生した一重項酸素やスーパーオキシドは、様々な環境因子により脂質ラジカルやヒドロキシラジカル、過酸化水素 (H_2O_2) の形成に寄与する。これらのことから、UVA 暴露により引き起こされる真皮線維芽細胞の老化メカニズムに対する理解を深めることは、UVA から真皮線維芽細胞を保護するために重要な課題となっている。UVA が引き起こす真皮光老化を研究する手法の中でも動物試験やヒト臨床試験のような *in vivo* における研究が最も重要であることは確かであるが、研究費用や実験操作の簡便さ、また、近年での化粧品業界における動物実験廃止の流れもあり、*in vitro* 研究の重要性も増している。そのため、生体環境により近い条件で *in vitro* 試験を行う必要がある。生体環境により近い条件として、再構成 3 次元皮膚組織を用いる手法が提案されているが、再構成 3 次元組織の作製や解析の習熟には時間や費用がかかるため簡便な評価方法とは言い難い。また、培養ディッシュに二次元的に播種した線維芽細胞に UVA を暴露する方法は非常に簡便な操作で実施できるため標準的に用いられているが、この方法の多くは UVA 暴露時に細胞培養液を PBS へと置換する。細胞培養液はフェノールレッドや血清が添加されているため、色素やタンパク質成分による UVA 吸収が試験結果の誤差となりやすいためである。しかし、PBS 中には光増感成分となる成分が含有されないため、UVA 暴露による ROS の産生はほとんどおこら

ない。そのため、細胞障害を誘導するためにはヒトが日常的に浴びる UVA 線量よりも高い強度の UVA 線量を必要とすることが多い。また、真皮組織はそのほとんどが type 1 コラーゲンに代表される細胞外マトリックスである。表皮組織や脂肪組織はその大部分が細胞自身で構成されるが、線維芽細胞は組織液が浸潤した細胞外マトリックス内にまばらに存在する。そのため、UVA 暴露による光増感反応は細胞内部だけでなく細胞外環境でもおこることが予想される。加えて、生体組織にはアミノ酸やビタミンなどの種々の栄養素が存在することから、UVA 暴露中の生体組織では、UVA クロモフォアによる ROS の産生だけでなく、抗酸化作用をもつ成分による ROS の除去も同時におきることが想定される。

そこで本章では、生体環境に近い条件でおこる光増感反応による ROS の産生と線維芽細胞の光老化について理解を深めることを目的に、UVA クロモフォアとしての作用をもつリボフラビン、葉酸、ピリドキシンや抗酸化作用をもつヒスチジンなど種々の栄養成分を含有する DMEM 中での UVA 暴露で誘導される線維芽細胞の老化機序を解析した。

2-2. 結果

2-2-1. PBS または DMEM 中で UVA を反復暴露された線維芽細胞における老化指標 (SA- β -galactosidase 量) の比較

初めに、栄養素を含有しない PBS もしくは、アミノ酸やビタミンなどの栄養素を含有する DMEM 中で UVA を反復的に暴露された線維芽細胞の細胞老化がどのように進行するか、老化した細胞で高い発現が認められる Senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -gal) 量を指標として比較した[41]。SA- β -gal 発現量の比較は、X-Gal を基質とした酵素反応により青色を呈色する染色法を用い、全細胞数の中から青色に呈色した細胞数を計測することで SA- β -gal 陽性細胞の割合を算出した。また、光老化は慢性的な紫外線暴露により誘発されることから、本実験における UVA 暴露は 1 日に 1 回、かつ 10 日間連続で行い、UVA 線量は昼間に外出した際に浴びる線量に近い 3.6 J/cm^2 とした[42]。細胞培養液を PBS または DMEM へ置換した線維芽細胞へ 1.0 mW/cm^2 -UVA を 1 時間照射し (3.6 J/cm^2)、UVA 暴露終了後に通常の細胞培養液へと置換し 24 時間インキュベートした。最後の UVA 暴露から 24 時間後の線維芽細胞を実験に使用した (Fig. 2-1)。各条件で 10 日間の UVA 暴露を受けた線維芽細胞について SA- β -gal 染色を実施した結果、UVA 未暴露の線維芽細胞と PBS 中で UVA 暴露を受けた線維芽細胞群では SA- β -gal 陽性細胞 (青色) がほとんど観察されなかったが、DMEM 中で UVA 暴露を受けた線維芽細胞群では約 60% が SA- β -gal 陽性細胞として観察された (Fig. 2-2)。この結果は、UVA 反復暴露による細胞老化が、栄養成分を含まない PBS 中よりも、アミノ酸やビタミンなどの種々の栄養成分を含む DMEM 中で促進されることを示している。つまり、細胞内で発生した ROS よりも細胞外環境で発生した ROS により細胞障害が強く誘発されることが示唆された。

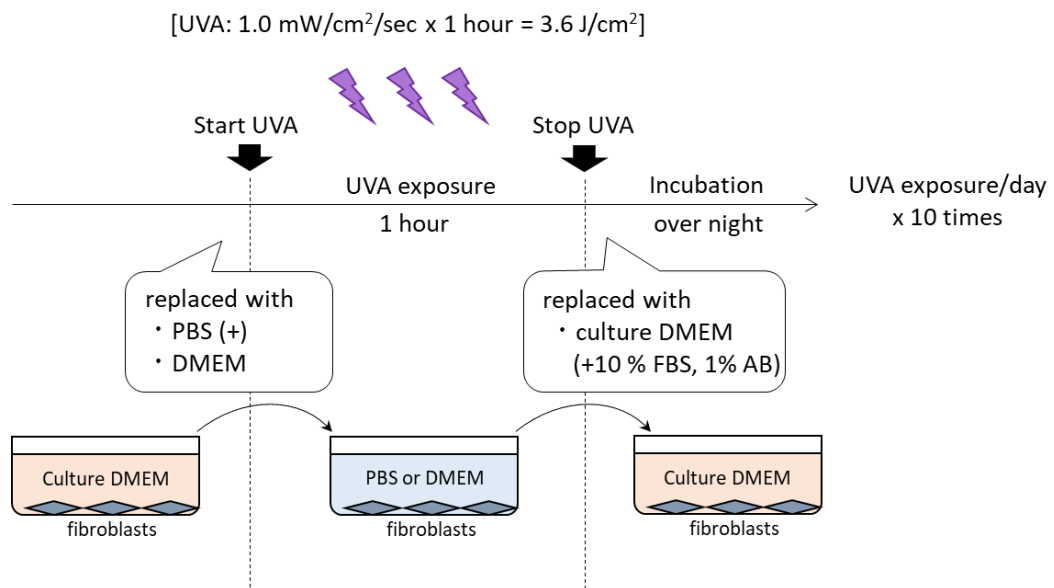


Figure 2-1. 線維芽細胞への UVA 暴露条件

50 x 10⁴ cell/100 mm dish の密度で播種した線維芽細胞へ 1.0 mW/cm²-UVA を 1 時間照射した (合計照射量: 3.6 J/cm²)。UVA 暴露前に PBS 洗浄で培養液を洗い流し、UVA 暴露は PBS (+) または血清とフェノールレッド不含の DMEM 中で行った。UVA 暴露終了後に通常の細胞培養液として用いるフェノールレッドと 10 %血清を含む DMEM へと交換し、24 時間インキュベートした (37 °C, 5 % CO₂)。各溶液量は、10 mL/100 mm dish である。1 日に 1 度ずつ線維芽細胞へ UVA を暴露し、10 日間連続で操作を続けた。10 度目の UVA 暴露から 24 時間後の細胞について各老化指標の評価を実施した。また、アルミホイルで覆い同様の操作を実施したものを UVA 未暴露の線維芽細胞とした。

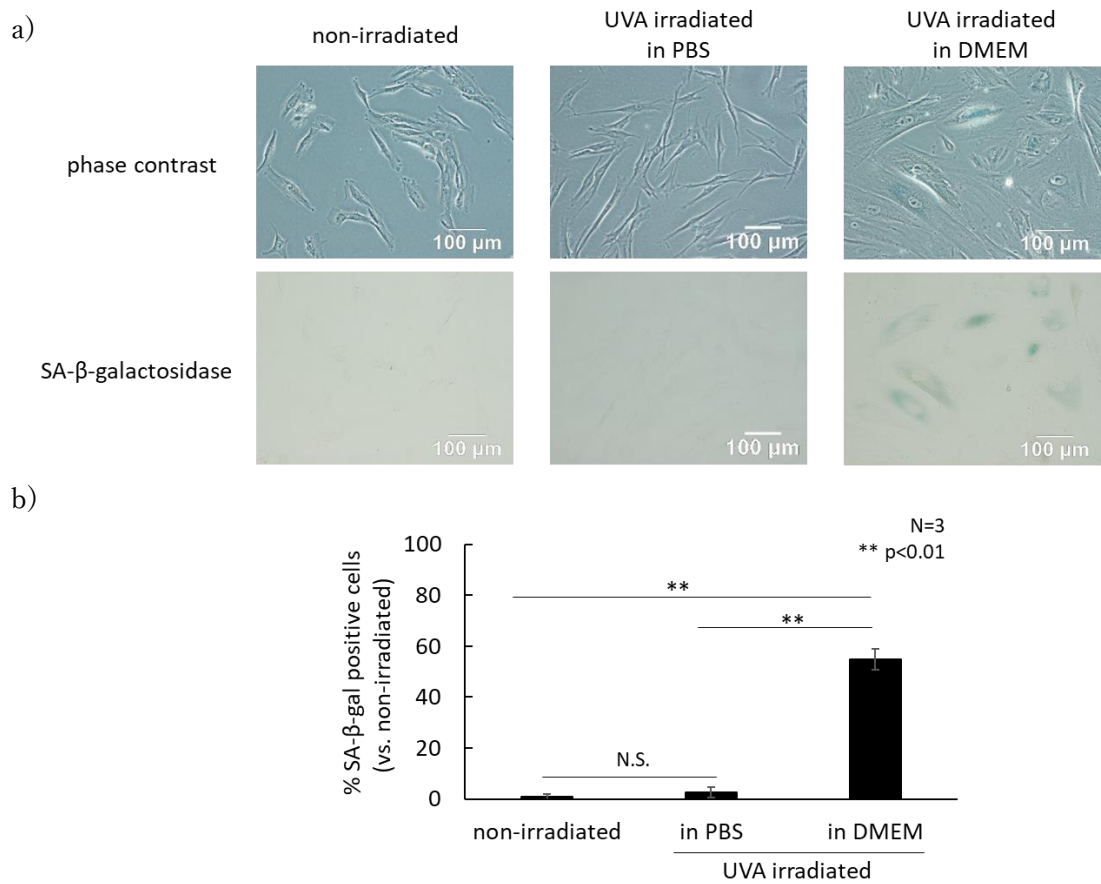


Figure 2-2. 各条件下で反復的な UVA 暴露を受けた線維芽細胞の SA-β-gal 量の比較

- a) 光学顕微鏡で観察した SA-β-gal 染色後の線維芽細胞の位相差像と明視野像、および、
 b) 全細胞に対する SA-β-gal 陽性細胞の割合をグラフとして表した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

2-2-2 DMEM 中で UVA を反復暴露された線維芽細胞の種々の老化指標の比較

DMEM 中で UVA を反復的に暴露された線維芽細胞は、PBS 中で UVA を反復暴露された線維芽細胞よりも SA- β -gal 陽性細胞が多く観察されたことから、細胞老化が早期に進行したと考えられた。そこで、現在までにヒトの老化線維芽細胞で観察されることが報告されている、細胞形態の変化、細胞内 ROS の増加、細胞過酸化物の増加、細胞の分裂停止に關与する p16 タンパク質量の増加といった指標が、DMEM 中で UVA 反復暴露を受けた線維芽細胞でも観察されるか評価した[43-46]。

細胞形態の比較

老化細胞は正常細胞と比較して細胞形態が扁平化する。光学顕微鏡で観察した細胞像から画像解析ソフトを用いて 1 細胞あたりの面積を求め、細胞形態を比較した。本実験では、1 細胞あたりの面積の増加を、細胞の扁平化として評価した。UVA 未暴露の線維芽細胞の細胞面積と比較して、DMEM 中で UVA 反復暴露を受けた線維芽細胞の細胞面積は約 7 倍に増加した(Fig. 2-3)。

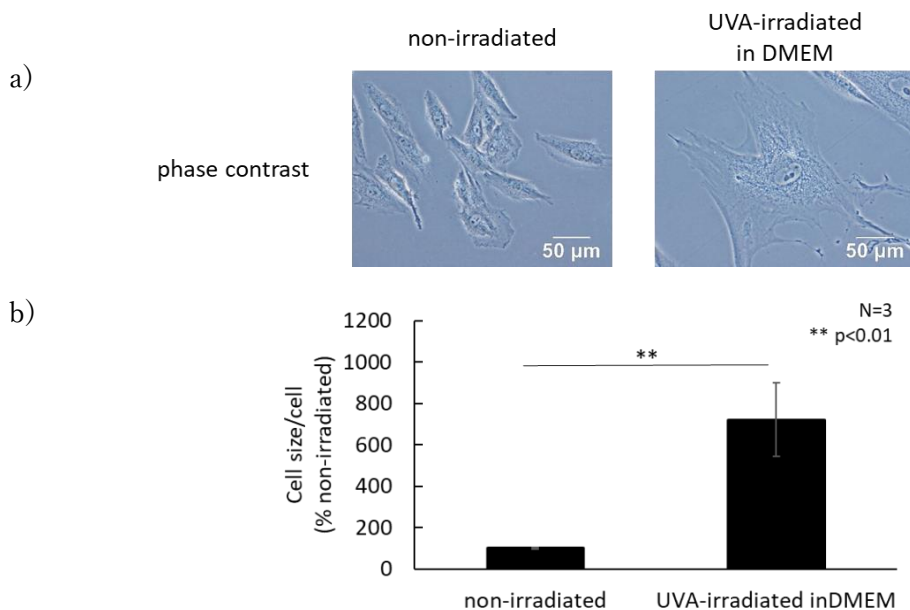


Figure. 2-3. DMEM 中で反復的な UVA 暴露を受けた線維芽細胞形態の比較

a) 光学顕微鏡で観察した線維芽細胞の位相差像、および、b) UVA 未暴露の 1 細胞あたりの面積を 100 とし、UVA 暴露後の 1 細胞あたりの細胞面積の相対値をグラフに表した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

細胞内 ROS 産生量の比較

老化細胞ではミトコンドリア機能障害や抗酸化システムの破綻が生じることで、細胞内 ROS 産生量が増加することが知られている[47]。そこで、細胞内の ROS により酸化されると緑色蛍光を発する Dihydrorhodamine123 (DHR123) を用いて細胞内 ROS 産生量を比較した。DHR123 染色後の細胞を蛍光顕微鏡により観察すると、UVA 未暴露の線維芽細胞ではほとんど蛍光が観察されなかったが、UVA 反復暴露後の細胞では細胞内に強い緑色蛍光が観察された。以上より、DMEM 中で UVA 反復暴露を受けた線維芽細胞は ROS の産生量が増加していることが示唆された(Fig. 2-4)。

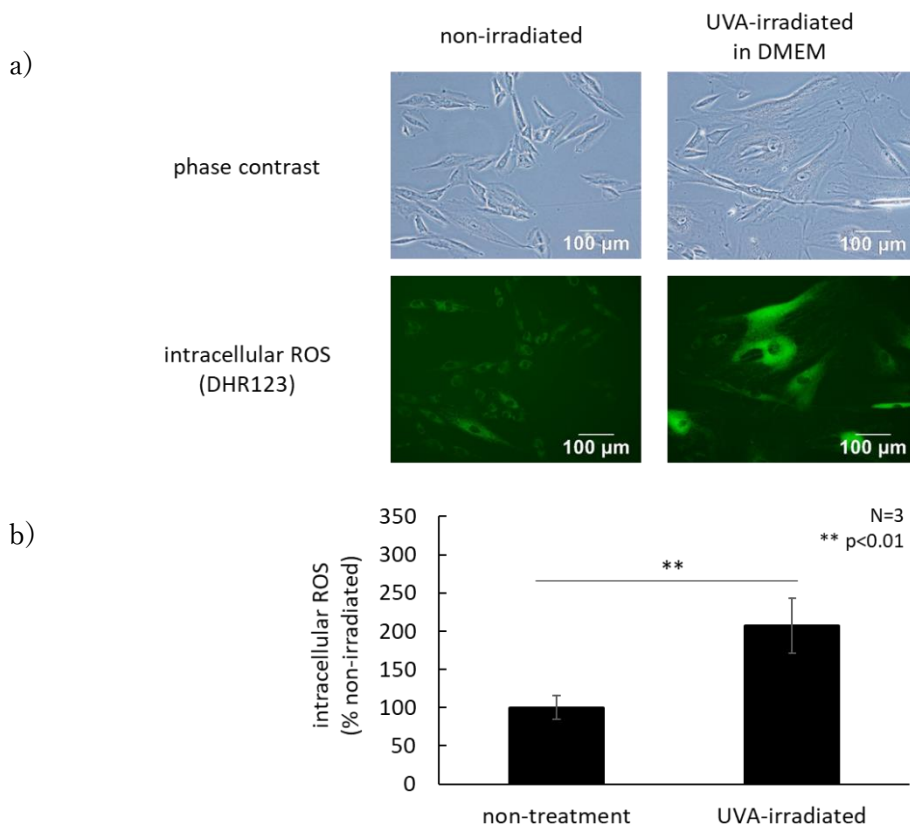


Figure 2-4. DMEM 中で反復的な UVA 暴露を受けた線維芽細胞の細胞内 ROS 量の比較

a) DHR123 染色後の線維芽細胞の位相差像と蛍光像 (ex 488 nm, em. 515 nm)、および、
b) グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。UVA 未暴露群の蛍光強度を 100 とし、UVA 暴露群の蛍光強度の相対値をグラフに表した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

細胞黄色化（細胞成分の過酸化）の比較

ROS は細胞成分を酸化することで脂質やタンパク質のカルボニル化や糖化を促進する。また、カルボニル化/糖化されたタンパク質や脂質は黄褐色に呈色することが報告されている。そこで、遠心分離により回収した UVA 未照射細胞と UVA 反復照射細胞の細胞ペレット像を比較したところ、UVA 反復暴露細胞の細胞ペレットでは黄色味が強く観察された。また、NP40 溶液により抽出した細胞成分の 450 nm における吸光度を測定した結果、UVA 反復暴露細胞から抽出した成分の吸光度は、UVA 未照射細胞と比較して有意に増加した(Fig. 2-5)。このことは、ROS の産生量増加のとともに、細胞成分がカルボニル化や糖化されたことを示唆している。

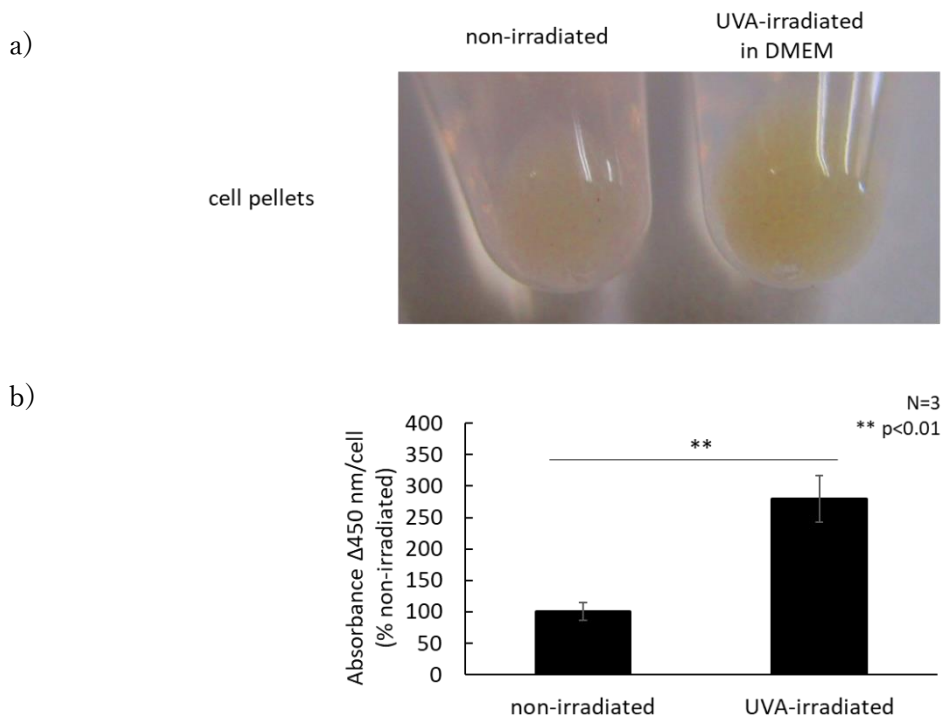


Figure 2-5. DMEM 中で反復的な UVA 暴露を受けた線維芽細胞の細胞黄色化の比較

a) 明視野における細胞ペレット像、および、b) UVA 未暴露群の細胞抽出物における 450 nm の吸光値を 100 とし、UVA 暴露群の吸光値の相対結果をグラフに表した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

p16 タンパク質量の比較

がん抑制遺伝子として知られる p16 タンパク質は細胞分裂周期を制御する作用をもち、分裂限界に達した細胞で p16 タンパク質の高発現が認められるとともに、ras 経路による過剰な MAPK シグナルが働いた場合に p16 発現が増加することで細胞分裂周期が停止することが知られている[48]。また、光老化した真皮組織中の線維芽細胞に p16 が高発現していることが報告されている。そこで、GAPDH を内部標準として p16 タンパク質の発現量をウェスタンブロッティングにより検出した。UVA 未暴露の線維芽細胞と比較して、DMEM 中で UVA 反復暴露を受けた線維芽細胞の p16 タンパク質量は増加していた(Fig. 2-6)。

これらの結果より、微量の UVA クロモフォアと種々の栄養成分を含む環境下で UVA 反復暴露を受けた線維芽細胞は早期に老化することが明らかとなった。

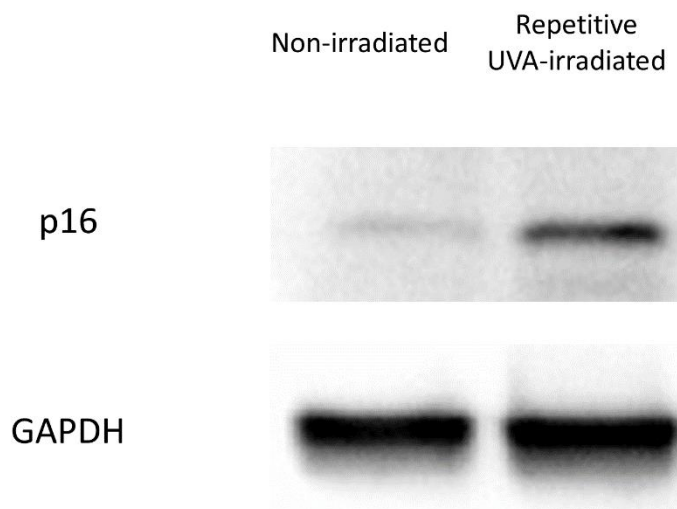


Figure 2-6. DMEM 中で反復的な UVA 暴露を受けた線維芽細胞の p16 発現量の比較
ウェスタンブロッティングで検出した p16 および GAPDH のバンド

2-2-3. DMEM 中での UVA 暴露で生じた細胞障害の主要因の探索

Hanks balanced salt solution (HBSS:グルコース・緩衝成分) または Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM:14 種のアミノ酸・8 種のビタミン・グルコース・緩衝成分) 中で UVA 暴露を受けた線維細胞の細胞生存率を比較した(Fig. 2-7a)。3.6 J/cm²-UVA 暴露後に新鮮な HBSS または DMEM へ交換すると、どちらも細胞生存率の低下は認められなかった。しかし、UVA 暴露終了後から培養液交換をせずに 3 時間インキュベーションを続けた条件での細胞生存率は、HBSS 中では低下しなかったが、DMEM 中の線維芽細胞では著しく低下した (Fig. 2-7b)。このことは、UVA 暴露中に発生した ROS の中でも、比較的に残存性の高い H₂O₂ であると予想された。そこで、高い H₂O₂ 消去作用をもつカタラーゼもしくは還元型グルタチオン (GSH) を DMEM 中で UVA 暴露を受けた線維芽細胞へ処理したところ、細胞生存率の低下が顕著に緩和された (Fig. 2-7c)。以上の結果より、DMEM 中の線維芽細胞への UVA 暴露で引き起こされた細胞障害の主要因が、種々の ROS の中でも、H₂O₂ であることが示唆された。

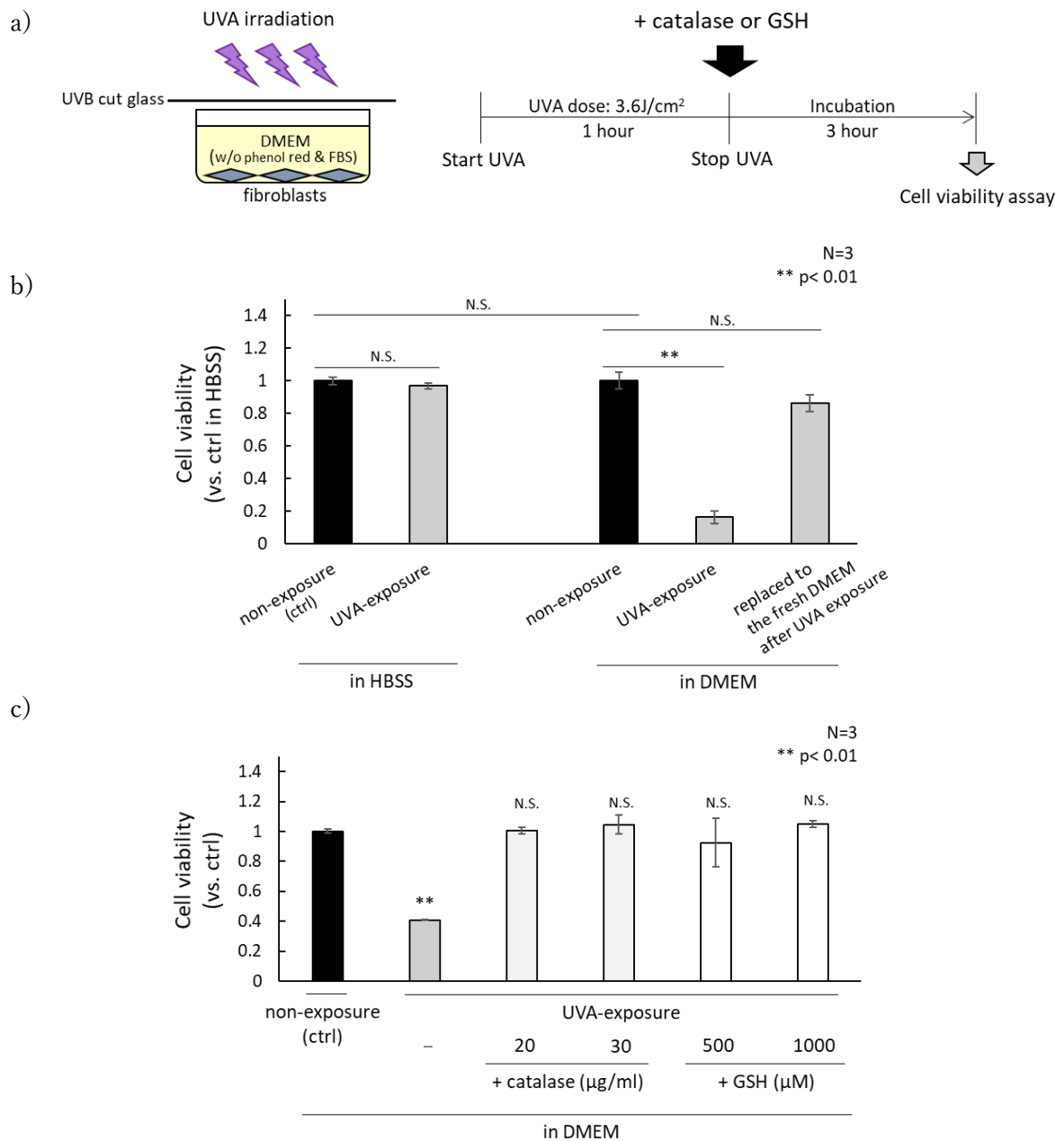


Figure 2-7. HBSS または DMEM 中で UVA 暴露を受けた線維芽細胞の細胞生存率の比較

a) 3.6 J/cm²-UVA を暴露後に 3 時間インキュベートした細胞の生存率を MTS 法により評価した。b) HBSS または DMEM 中で UVA 暴露を受けた線維芽細胞の細胞生存率と、c) DMEM 中での UVA 暴露に catalase もしくは GSH を添加した線維芽細胞の細胞生存率をグラフに表した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

2-2-4. UVA 暴露後の DMEM に生じた H₂O₂ の定量

前項の実験より、DMEM 中の線維芽細胞への UVA 暴露で誘導される細胞障害は H₂O₂ により引き起こされる可能性が示された。そのため、UVA 暴露を受けた DMEM に発生した濃度の H₂O₂ を反復的に処理することで、DMEM 中での UVA 暴露と同様に線維芽細胞の老化が誘導できると考えた。初めに、UVA 暴露後の DMEM 中に存在する H₂O₂ の濃度を ADHP/HRP 法を用いて測定したところ、3.6 J/cm²-UVA 暴露後の DMEM には約 130 μM の H₂O₂ が生じていたが、UVA 暴露前の DMEM と UVA 暴露を受けた PBS 中には H₂O₂ はほとんど生じていなかった (Fig.2-8)。

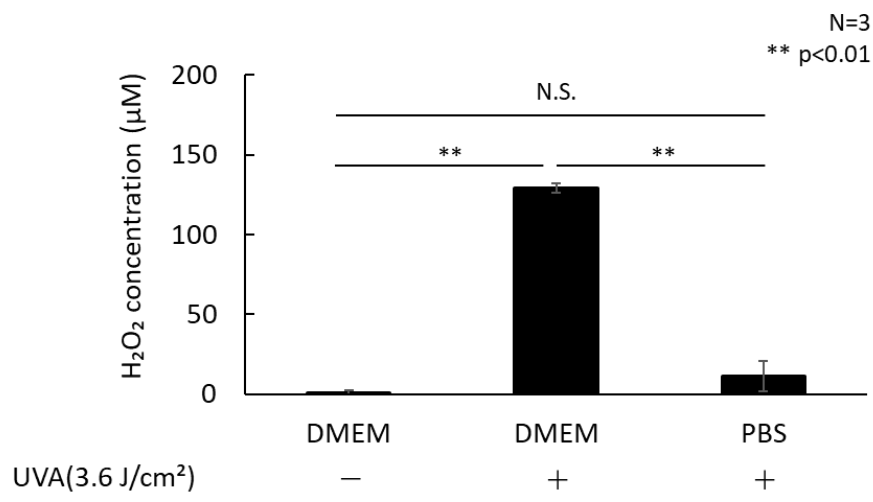


Figure 2-8. UVA に暴露された各溶媒中に発生した H₂O₂ 量の測定

血清とフェノールレッド不含 DMEM または HBSS に 3.6 J/cm²-UVA を照射した。アルミホイルで覆い、同様の操作を行ったものを UVA 未照射 DMEM とした。溶液量は 10 mL/100 mm dish である。UVA 暴露後の各溶媒を回収し、ADHP/HRP 法により溶媒中の H₂O₂ を測定した。同時に、H₂O₂ の検量線を作成し、各溶媒の測定値から H₂O₂ 濃度を算出した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

2-2-5. 130 μM - H_2O_2 の反復処理による細胞老化の誘導

続いて、測定された 130 μM の H_2O_2 を線維芽細胞へ反復処理することで細胞老化が誘導できるか検討を行った。UVA 反復暴露で線維芽細胞の老化を誘導した場合と条件を同等とするため、10% 血清を含む細胞培養用の DMEM から血清とフェノールレッドを含有しない DMEM に交換後に、130 μM の H_2O_2 を線維芽細胞へ処理し 1 時間インキュベートした。インキュベート後に細胞培養用の DMEM へ交換し、24 時間インキュベートした。この操作を 10 日間連続で行い、最後の H_2O_2 処理から 24 時間後の線維芽細胞を回収し、種々の細胞老化指標を測定した (Fig. 2-9)。その結果、130 μM の H_2O_2 を反復処理した線維芽細胞は、SA- β -gal 陽性細胞の増加、細胞形態の扁平化、細胞内 ROS の増加、p16 タンパク質量の増加が認められた (Fig. 2-10)。これらの結果より、DMEM 中での UVA 暴露で誘導される細胞老化の主要因が、UVA 暴露により DMEM 中に産生された H_2O_2 であることが示唆された (Fig. 2-11)。

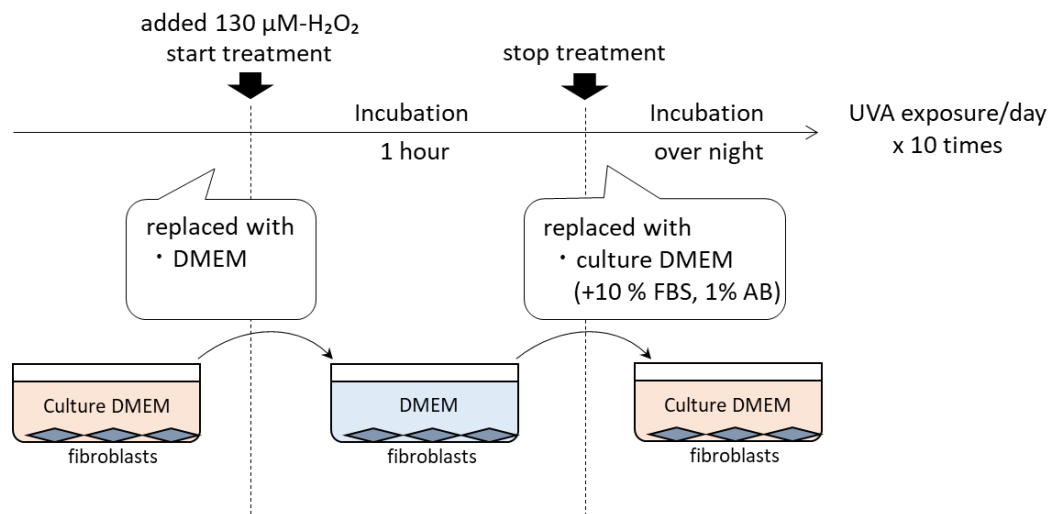
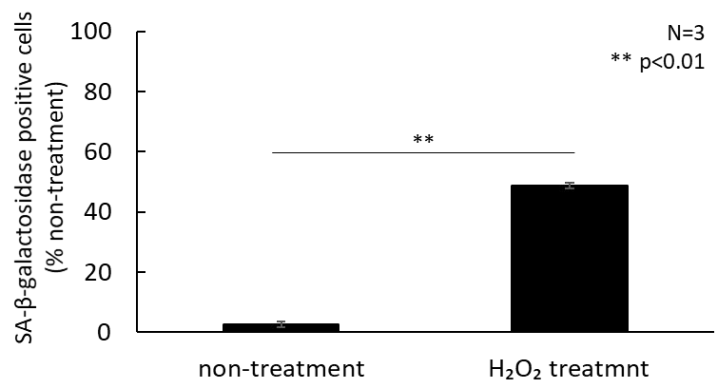
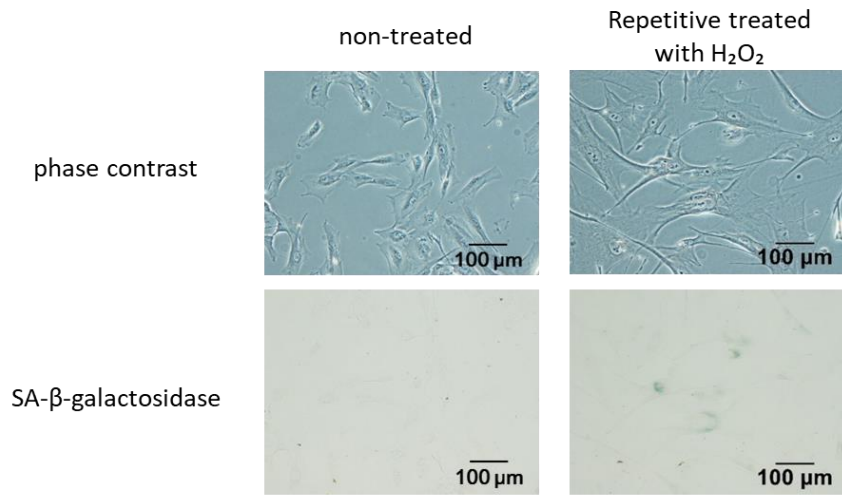


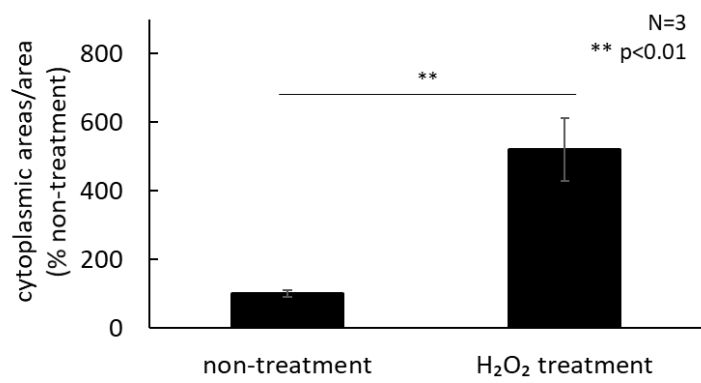
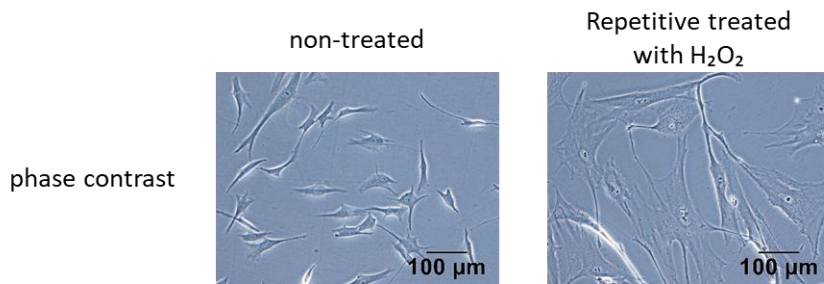
Figure 2-9. 線維芽細胞への 130 μM - H_2O_2 の処理条件

50×10^4 cell/100 mm dish の密度で播種した線維芽細胞へ 130 μM - H_2O_2 を 1 時間処理した。 H_2O_2 処理前に PBS 洗浄で培養液を洗い流し、 H_2O_2 処理は血清とフェノールレッド不含の DMEM 中で行った。 H_2O_2 処理終了後にフェノールレッドと 10% 血清を含む DMEM へと交換し、24 時間インキュベートした (37 °C, 5% CO_2)。各溶液量は、10 mL/100 mm dish である。1 日に 1 度の H_2O_2 処理を 10 日間連続で行った。10 度目の H_2O_2 処理から 24 時間後の細胞について各老化指標の評価を実施した。

a)



b)



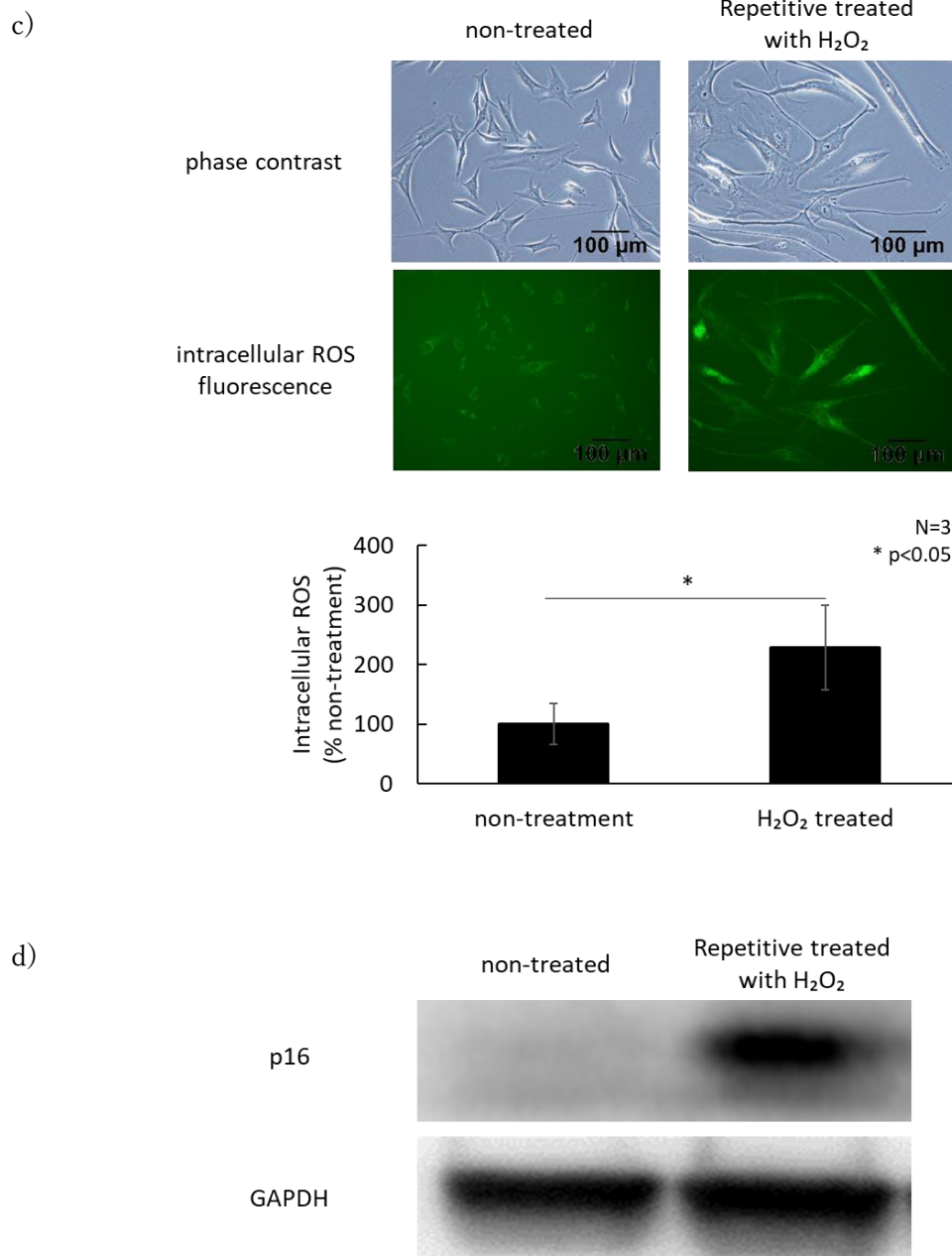


Figure 2-10. 130 μ M-H₂O₂を反復処理した線維芽細胞の老化指標の比較

(a) SA- β -galactosidase 陽性細胞の観察像と割合のグラフ, (b) 細胞形態の観察像と細胞面積のグラフ, (c) DHR123 蛍光染色による細胞内 ROS の観察像と蛍光強度のグラフ, (d) ウェスタンブロッティングによる p16 と GAPDH の検出、試験および解析は UVA 暴露実験と同様の手法を用いた。

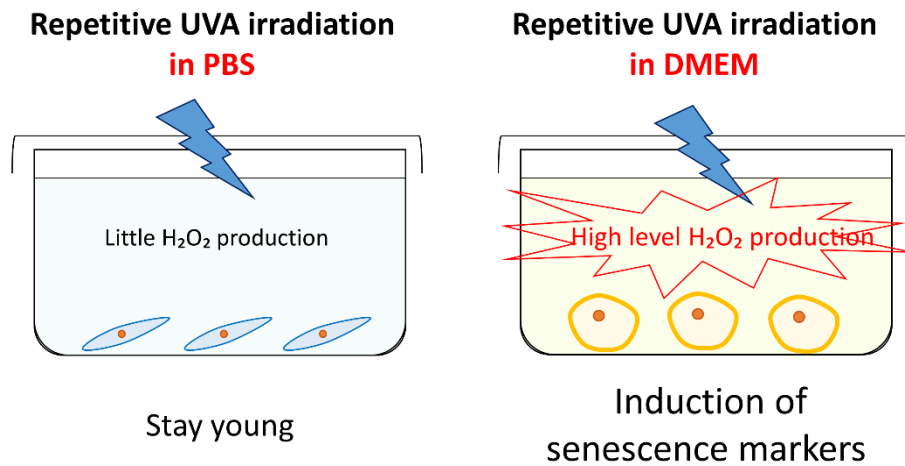


Figure 2-11. UVA 暴露により溶媒中に発生する H₂O₂ と線維芽細胞老化の関係

UVA クロモフォアを含まない PBS 中では H₂O₂ 産生が少なくほとんど細胞老化はおこらないが、UVA クロモフォアだけでなく種々のアミノ酸やビタミンを含む DMEM 中では多量の H₂O₂ が産生され細胞老化を誘発する。また、PBS 中での UVA 暴露で細胞老化が誘発されなかったことから、細胞内クロモフォアよりも細胞外クロモフォアから産生される ROS の影響が強いことが示唆される

2-2-6. UVA 暴露中に H₂O₂を産生する成分の特定-アミノ酸群とビタミン群の比較-

DMEM 中での UVA 暴露による線維芽細胞の酸化障害の主要因が、H₂O₂であったことから、DMEM 成分中より UVA 暴露により H₂O₂を産生する成分の特定を行った。文献調査により、DMEM 成分中の中で UVA クロモフォアとして作用する成分として、ビタミン群の中からリボフラビン、葉酸、ピリドキシンが候補に挙げられた[49-51]。アミノ酸群の中には UVA クロモフォアとして作用するものは候補に挙げられなかった。そこで、DMEM 組成を模倣して作成した 14 種のアミノ酸と 8 種のビタミンの混合溶液 (mimic DMEM) への UVA 暴露に発生した H₂O₂量を基準として、UVA クロモフォアを含有しない 14 種のアミノ酸混合溶液と、UVA クロモフォアを含有する 8 種のビタミン混合溶液へ UVA を照射した後の H₂O₂量を測定した。その結果、mimic DMEM の H₂O₂量は UVA 暴露後に大きく増加し、UVA クロモフォアを含有しないアミノ酸混合溶液は UVA 暴露後も H₂O₂量は増加しなかった。しかし、興味深いことに、UVA クロモフォアを含むビタミン混合溶液の H₂O₂量は増加したものの、mimic DMEM の H₂O₂量より有意に低い値であった(Fig. 2-12)。以上の結果より、UVA 暴露により DMEM 中に発生した H₂O₂は、リボフラビンなどの UVA クロモフォアのみで産生されたのではなく、UVA クロモフォアとアミノ酸との協調的な反応により産生されたと予想された。

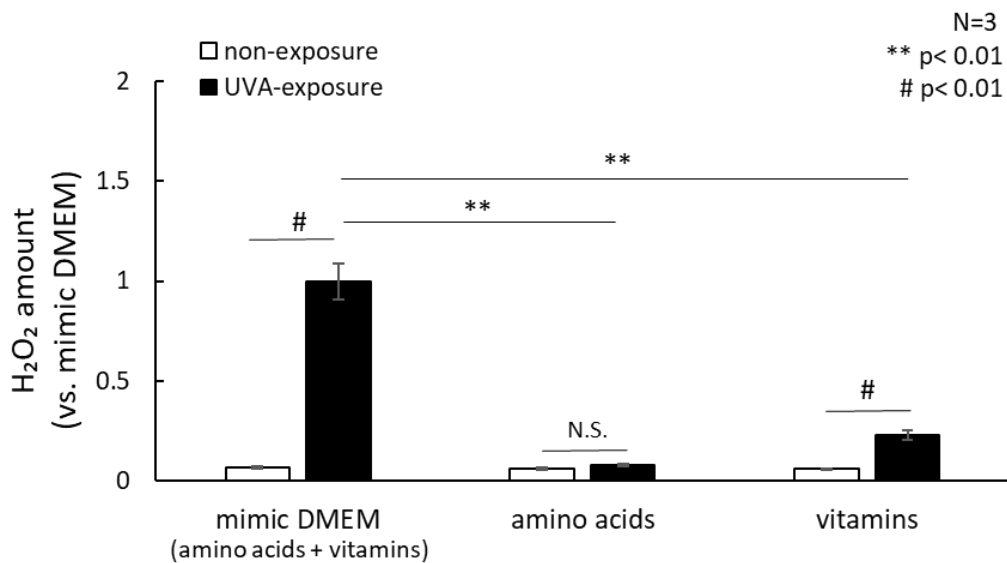
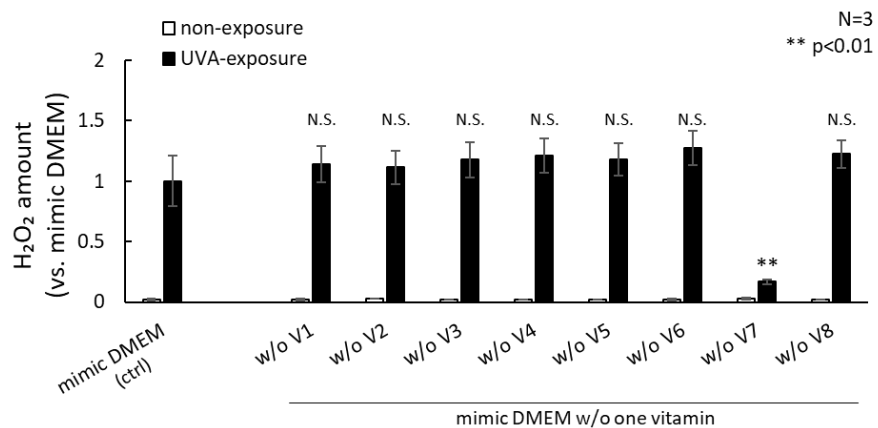


Figure 2-12. 各 DMEM 成分群への UVA 暴露で発生した H₂O₂量の比較

DMEM 組成に従って作成した 14 種のアミノ酸と 8 種のビタミンの全混合溶液(mimic DMEM)、と 14 種のアミノ酸混合溶液、8 種のビタミン混合溶液へ 3.6 J/cm²-UVA を照射し、産生された H₂O₂を ADHP/HRP 法で測定した。UVA 暴露後の mimic DMEM に生じた H₂O₂量を基準として各溶液中の H₂O₂量の相対値を算出した。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

2-2-7. UVA 暴露中に H₂O₂を産生する成分の特定-リボフラビン-

前項の結果より、特定の UVA クロモフォアとアミノ酸の共存条件で UVA 暴露後の H₂O₂産生量が増加することが予想されたことから、全成分混合溶液である mimic DMEM より一種の成分を除いた場合における UVA 暴露後の H₂O₂量を測定した。初めに、光増感反応に参与する UVA クロモフォアを特定するために、全成分から一種のビタミンを除く条件を比較した。UVA 暴露後の mimic DMEM に発生する H₂O₂量と比較して、有意に H₂O₂量が減少した条件は、全成分からリボフラビンを除いた場合のみであった(Fig. 2-13)。加えて、全成分よりリボフラビンを除いた場合におこる H₂O₂産生量の低下が、細胞生存率や細胞老化に影響を及ぼすか検討した。UVA 暴露後に 3 時間インキュベートした後の線維芽細胞の細胞生存率は、全成分を含む DMEM 中では有意に低下したが、全成分からリボフラビンのみ除いた DMEM では低下しなかった(Fig. 2-14a)。同様に、DMEM 中での UVA 反復暴露により誘導される細胞老化も、リボフラビンのみ除いた DMEM 中での UVA 暴露では細胞老化は誘導されなかった(Fig. 2-14b)。



		Amino acids (14 species)																
Vitamins (8 species)	V1: Choline chloride	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	V2: Folic acid	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	V3: myo-Inositol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	V4: Niacin amide	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	V5: D-Pantothenic acid · 1/2Ca	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	V6: Pyridoxine · HCl	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	V7: Riboflavin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	V8: Thiamine · HCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Figure 2-13. mimic DMEM よりビタミンを一種除いた溶液への UVA 暴露で発生した H₂O₂ 量の比較

mimic DMEM と mimic DMEM から一種のビタミンのみ除いた溶液へ 3.6 J/cm²-UVA を照射し、溶液中に産生された H₂O₂量を ADHP/HRP 法で測定した。UVA 暴露後の mimic DMEM に生じた H₂O₂量を基準として各溶液中の H₂O₂量の相対値を算出した。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

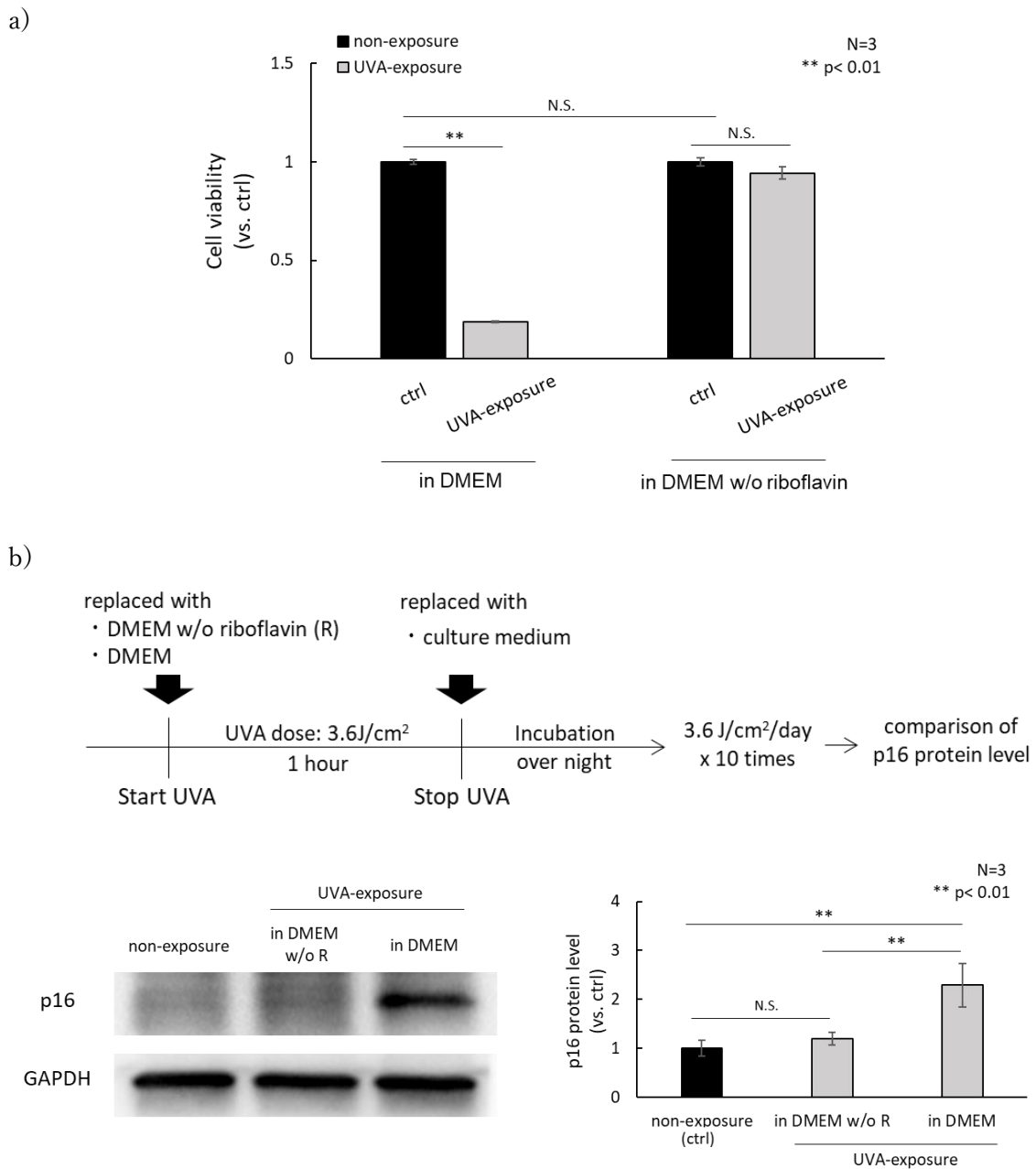
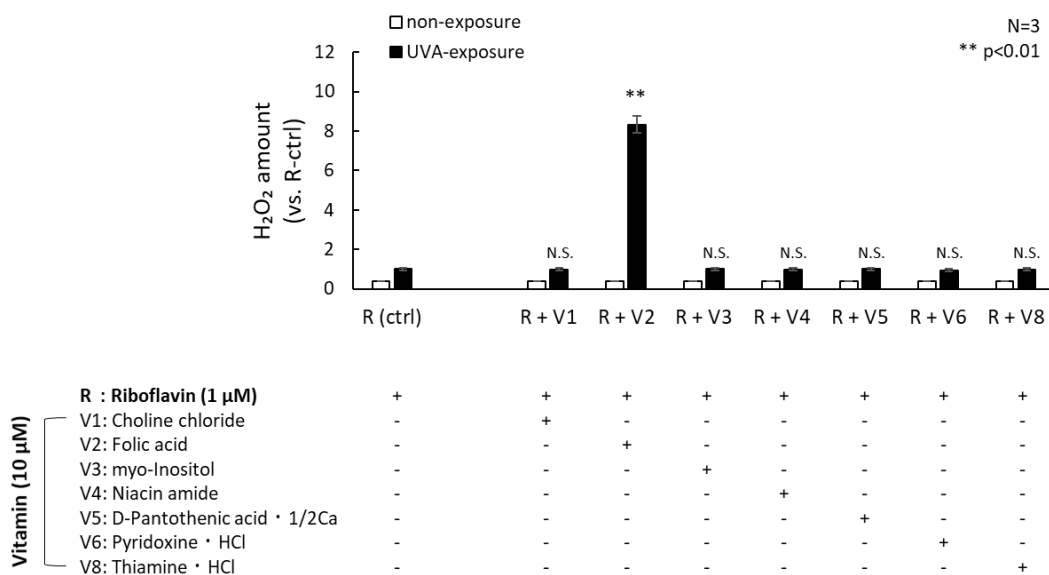


Figure 2-14. UVA 暴露条件下で DMEM 中のリポフラビンが線維芽細胞及ぼす影響の評価
 DMEM とリポフラビン不含 DMEM 中で UVA 暴露を受けた線維芽細胞を、a) UVA 暴露後から 3 時間後の細胞生存率、および、b) 10 日間の UVA 反復暴露を受けた細胞の p16 タンパク質量で比較評価した。a) は UVA 未暴露の細胞生存率を、b) は UVA 未暴露細胞の p16 検出値基準として各条件の相対値をグラフに表した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

2-2-8. UVA 暴露中に H₂O₂を産生する成分の特定-リボフラビンと協調する成分の探索-

前項において、UVA 暴露で DMEM に発生する H₂O₂がリボフラビンの存在により制御されていることが明らかとなった。しかし、リボフラビン単独では少量の H₂O₂しか産生されない。そのため、リボフラビン存在下の UVA 暴露により高い H₂O₂産生能を示す成分を探索したところ、ビタミンの中では葉酸が、アミノ酸の中ではトリプトファン、チロシン、メチオニン、ヒスチジンであることが明らかとなった(Fig 2-15)。特に、葉酸やトリプトファン、チロシンがリボフラビンと共存した場合に、UVA 暴露後の H₂O₂量は高い値を示した。

a)



b)

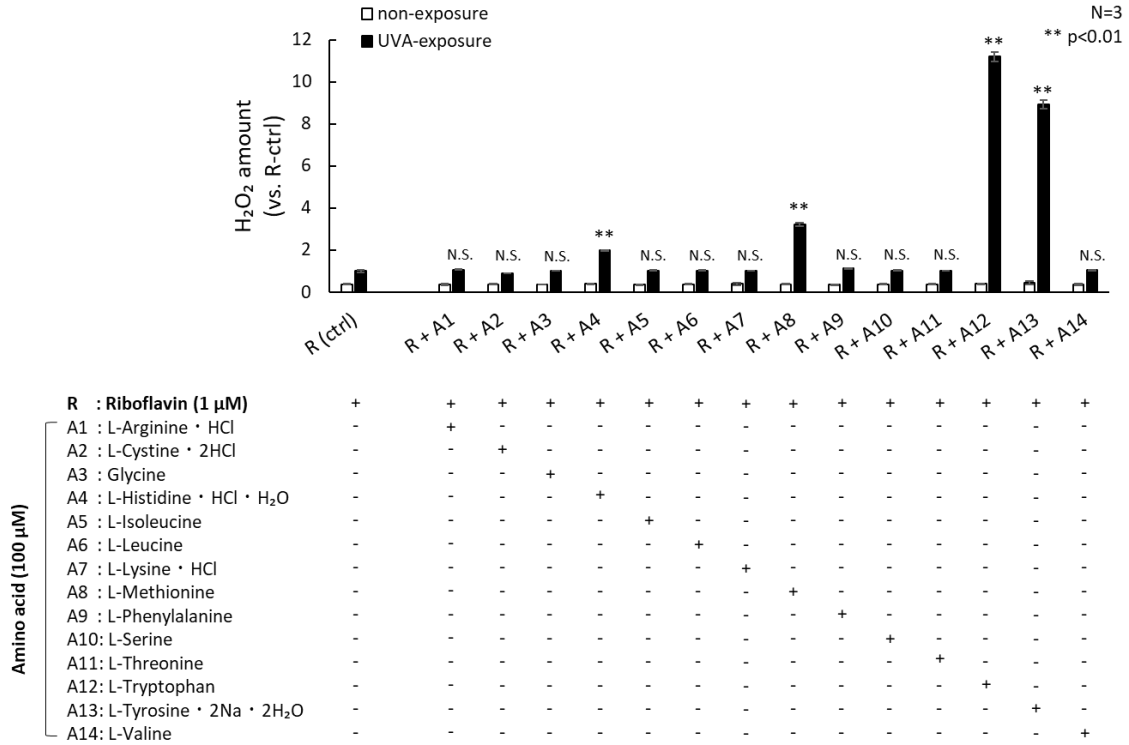


Figure 2-15. リボフラビンと各成分の混合溶液への UVA 暴露で発生した H₂O₂量の比較

a) 1 μM のリボフラビンと 10 μM のビタミンの混合溶液、b) 1 μM のリボフラビンと 100 μM のアミノ酸の混合溶液へ、3.6 J/cm²-UVA を暴露後に発生した H₂O₂量を ADHP/HRP 法で測定した。UVA を暴露した 1 μM のリボフラビン溶液中に発生した H₂O₂量を基準として、各溶液に発生した H₂O₂量の相対値を算出した。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

2-2-9. 光増感メカニズムの解析

最後に、リボフラビンと栄養成分の UVA 光増感で産生される H_2O_2 の産生機序について検討した。光増感反応における H_2O_2 産生の前段階として、スーパーオキシドや一重項酸素の発生が予想されたため、一重項酸素消去剤であるアジ化ナトリウム (NaN_3) の存在下/非存在下におけるスーパーオキシド産生能と H_2O_2 産生量を測定した。 H_2O_2 産生に一重項酸素が関与している場合には NaN_3 の存在下でスーパーオキシド産生能や H_2O_2 産生量が低下するが、一重項酸素の関与が低い場合にはスーパーオキシド産生能や H_2O_2 量は変化しない結果が得られる。そこで、リボフラビン共存下の UVA 暴露で H_2O_2 産生量が増加した葉酸、もしくは、トリプトファンについて比較を行ったところ、リボフラビンと葉酸間、または、リボフラビンとトリプトファン間では、異なる反応機序の光増感により H_2O_2 を産生するという興味深い結果を得た。

リボフラビンと葉酸間の光増感反応の解析

リボフラビンと葉酸共存下におけるスーパーオキシド産生能は UVA 暴露開始直後では低い値であったが、UVA 暴露時間に依存して増加した。このことは、UVA 暴露時間依存的に光増感成分が増加していることを示唆している。また、 NaN_3 を添加した条件下は、スーパーオキシド産生能に大きな変化は認められなかった (Fig. 2-16)。 H_2O_2 産生量はスーパーオキシド産生能と相関する結果であった (Fig. 2-17)。さらに、リボフラビン存在下での UVA 暴露における葉酸の自家蛍光の変化を比較した。葉酸が酸化されると UVA 波長領域で自家蛍光を示すプテリン誘導体に変化することに加え、プテリン誘導体は光増感成分として作用し ROS を産生することが報告されている [52]。UVA 未暴露の葉酸で測定された自家蛍光の値を基準として、リボフラビンや NaN_3 存在下での UVA 暴露後の葉酸の自家蛍光を算出した。葉酸単独への UVA 暴露でもプテリン誘導体特異的な自家蛍光は増加したが、リボフラビン存在下の UVA 暴露ではさらに高い自家蛍光を示した。スーパーオキシド産生能や H_2O_2 産生量と同様に、 NaN_3 を添加しても自家蛍光の増加が抑制されなかった (Fig. 2-18)。以上より、リボフラビン共存下での UVA 暴露で光増感作用をもつ葉酸酸化物が増加したことが、高い H_2O_2 産生量を示した要因であること、その反応は一重項酸素を介していないことが示唆された。

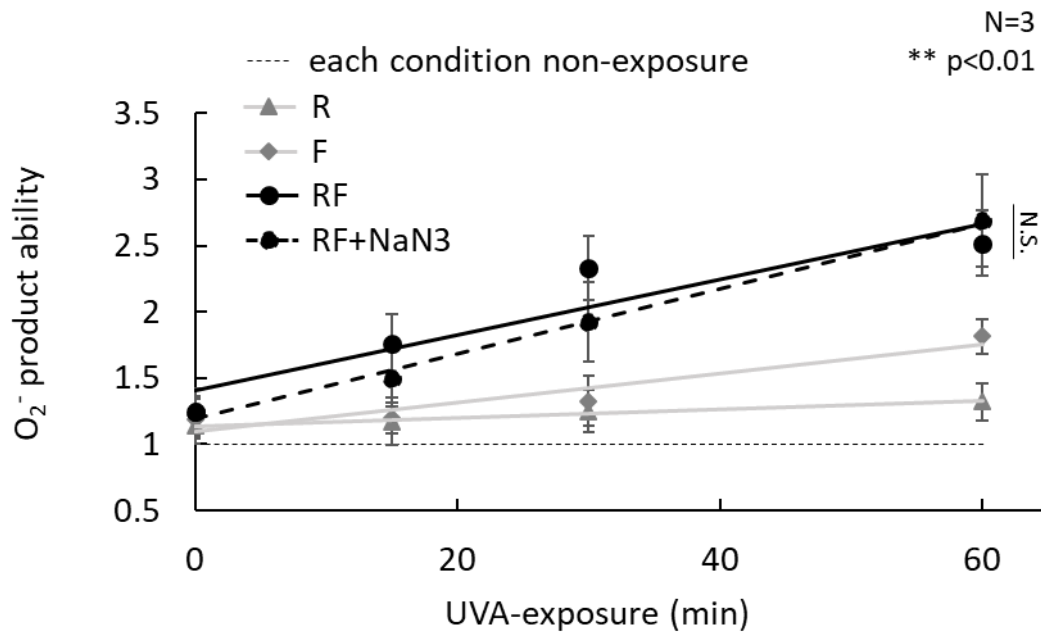


Figure 2-16. UVA 暴露中のリボフラビンと葉酸混合溶液におけるスーパーオキシド産生能の経時評価と

1 μM のリボフラビンと 10 μM の葉酸の単独または混合溶液へ 1.0 mW/cm^2 -UVA を暴露し、スーパーオキシド産生能の経時的な変化を測定した (0, 15, 30, 60 分)。同時に、混合溶液へ 1 mM の NaN_3 を添加した条件を評価した。スーパーオキシド産生能の測定には、スーパーオキシドに酸化されることで発光する MPEC 試薬を用いた。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。各溶液における UVA 未暴露条件のスーパーオキシド産生能を基準として、UVA 暴露された溶液のスーパーオキシド産生能の相対値を算出した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差であり、直線は近似曲線である。R:リボフラビン、F:葉酸、 NaN_3 :アジ化ナトリウム

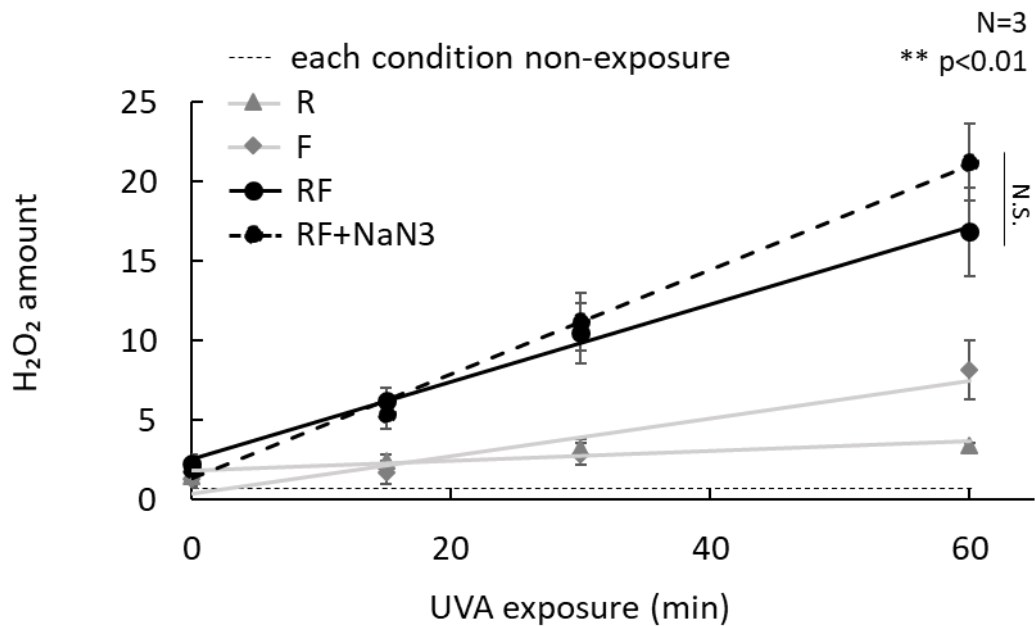


Figure 2-17. UVA 暴露中のリボフラビンと葉酸混合溶液における H₂O₂ 産生量の経時評価
 1 μM のリボフラビンと 10 μM の葉酸の単独または混合溶液へ 1.0 mW/cm²-UVA を暴露し、H₂O₂ 産生量の経時的な変化を測定した (0, 15, 30, 60 分)。同時に、混合溶液へ 1 mM の NaN₃ を添加した条件を評価した。H₂O₂ 産生量の測定は ADHP/HRP 法を用いた。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。各溶液における UVA 未暴露条件の H₂O₂ 産生量を基準として、UVA 暴露された溶液の H₂O₂ 産生量の相対値を算出した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差であり、直線は近似曲線である。R:リボフラビン、F:葉酸、NaN₃:アジ化ナトリウム

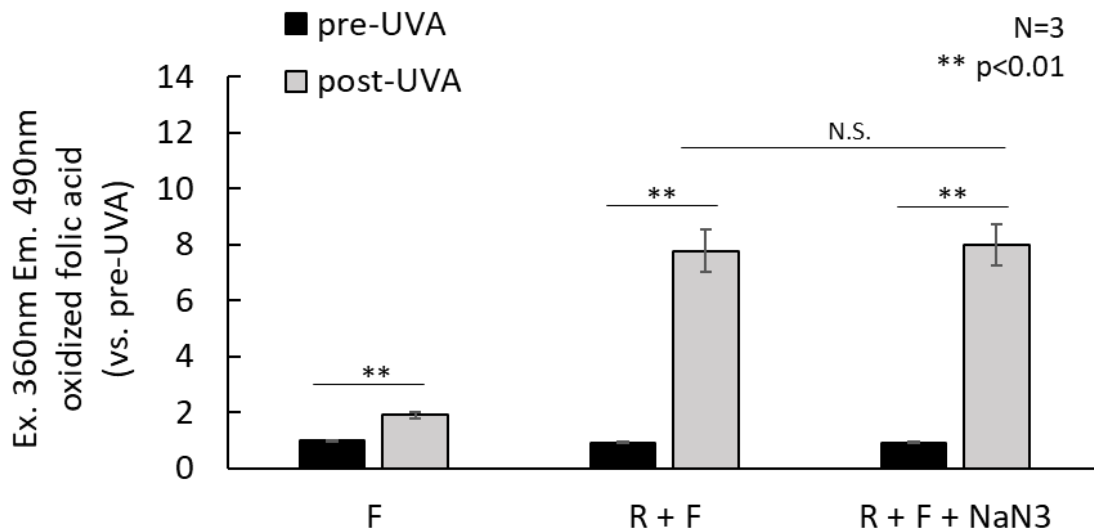


Figure 2-18. UVA 暴露前後のリボフラビンと葉酸溶液における自家蛍光の比較

1 μM のリボフラビンと 10 μM の葉酸混合溶液へ 3.6 J/cm^2 -UVA を暴露し、UVA 暴露の前後で葉酸酸化物特異的な自家蛍光を測定した (ex. 360 nm, em. 490 nm)。同時に、混合溶液へ 1 mM の NaN_3 を添加した条件を評価した。各溶液における UVA 暴露前の自家蛍光を基準として、UVA 暴露後の自家蛍光の相対値を算出した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。R:リボフラビン、F:葉酸、 NaN_3 :アジ化ナトリウム

リボフラビンとトリプトファン間の光増感反応の解析

リボフラビンとトリプトファン共存下におけるスーパーオキシド産生能や H_2O_2 産生量も、リボフラビンと葉酸間と同様に、UVA 暴露時間依存的に増加した。しかし興味深いことに、リボフラビンとトリプトファン間の UVA 光増感反応は一重項酸素消去剤である NaN_3 存在下で有意に抑制された (Fig. 2-19, 20)。また、トリプトファンの酸化物であるキヌレニンや FICZ も、葉酸酸化物であるプテリン誘導体と同じく UVA 光増感成分として作用することが報告されている [53, 54]。トリプトファン単独では UVA 暴露を受けてもトリプトファンの酸化分解やキヌレニンの増加は観察されないが、リボフラビン存在下の UVA 暴露では、トリプトファンの酸化分解が生じると同時に、キヌレニンが産生された。この光増感反応は、 NaN_3 添加により抑制されたことから、一重項酸素を介した反応であることが示唆された (Fig. 2-21)。

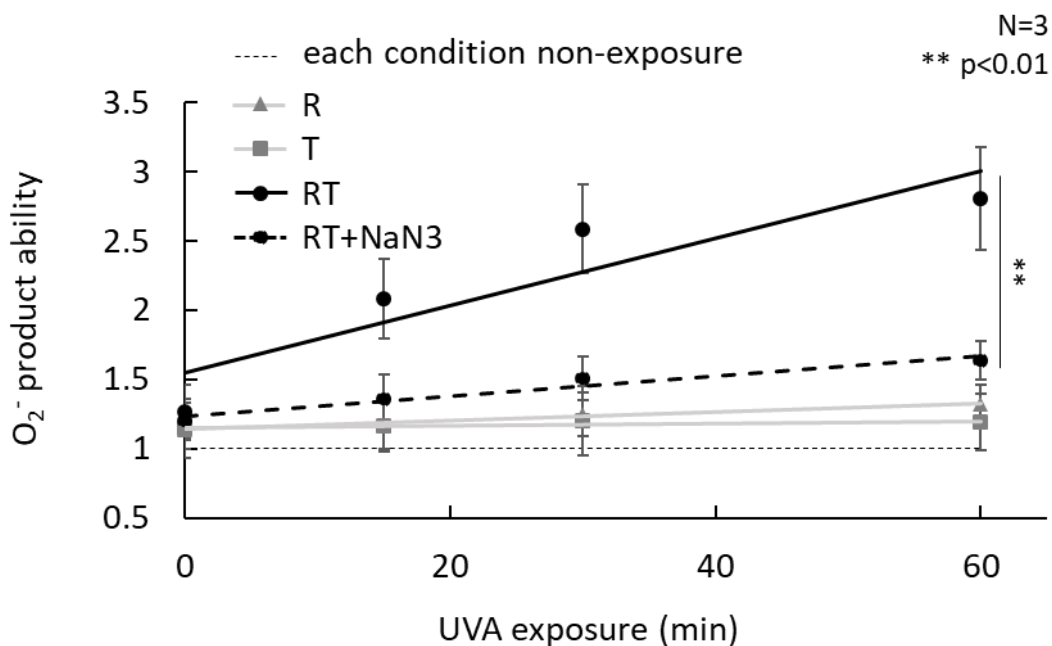


Figure 2-19. UVA 暴露中のリボフラビンとトリプトファン混合溶液におけるスーパーオキシド産生能の経時評価と

1 μM のリボフラビンと 100 μM のトリプトファンの単独または混合溶液へ 1.0 mW/cm^2 -UVA を暴露し、スーパーオキシド産生能の経時的な変化を測定した (0, 15, 30, 60 分)。同時に、混合溶液へ 1 mM の NaN_3 を添加した条件を評価した。スーパーオキシド産生能の測定には、スーパーオキシドに酸化されることで発光する MPEC 試薬を用いた。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。各溶液における UVA 未暴露条件のスーパーオキシド産生能を基準として、UVA 暴露された溶液のスーパーオキシド産生能の相対値を算出した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差であり、直線は近似曲線である。R:リボフラビン、T:トリプトファン、 NaN_3 :アジ化ナトリウム

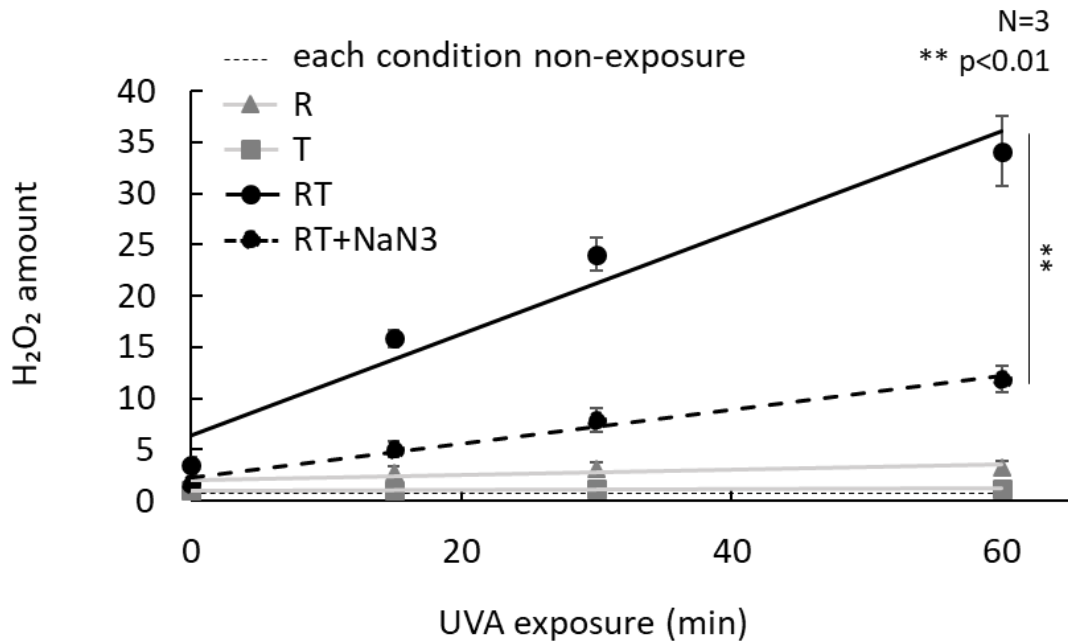


Figure 2-20. UVA 暴露中のリボフラビンとトリプトファン混合溶液における H₂O₂ 産生量の経時評価

1 μ M のリボフラビンと 100 μ M のトリプトファンの単独または混合溶液へ 1.0 mW/cm²-UVA を暴露し、H₂O₂ 産生量の経時的な変化を測定した (0, 15, 30, 60 分)。同時に、混合溶液へ 1 mM の NaN₃ を添加した条件を評価した。H₂O₂ 産生量の測定は ADHP/HRP 法を用いた。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。各溶液における UVA 未暴露条件の H₂O₂ 産生量を基準として、UVA 暴露された溶液の H₂O₂ 産生量の相対値を算出した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差であり、直線は近似曲線である。R:リボフラビン、T:トリプトファン、NaN₃:アジ化ナトリウム

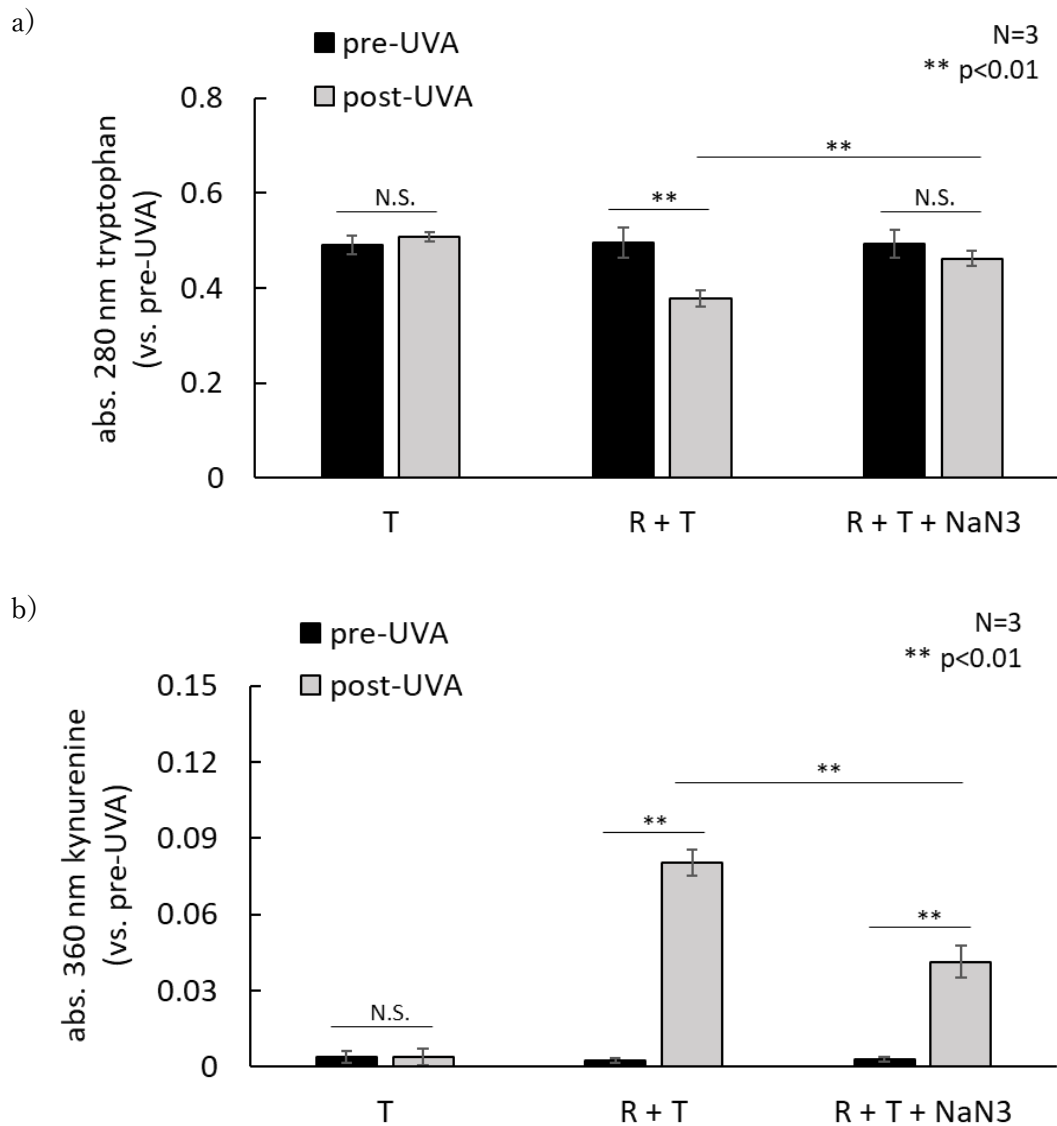


Figure 2-21. リポフラビン共存下の UVA 暴露によるトリプトファンの酸化分解とキヌレニン誘導体産生の評価

1 μM のリポフラビンと 100 μM のトリプトファンの単独または混合溶液へ 3.6 J/cm^2 -UVA を暴露し、UVA 暴露の前後でトリプトファンがもつ 280 nm の吸収波長とトリプトファン酸化物の一種であるキヌレニン誘導体がもつ 360 nm の吸収波長を測定した。同時に、混合溶液へ 1 mM の NaN_3 を添加した条件を評価した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。R:リポフラビン、T:トリプトファン、 NaN_3 :アジ化ナトリウム

これらの結果より、DMEMのような種々のアミノ酸やビタミンと光増感成分が混在する環境下でのUVA暴露で促進される線維芽細胞の酸化障害や光老化は、僅かなりボフラビンのUVA光増感を初期反応としてアミノ酸やビタミンの酸化が進行し、一部のアミノ酸やビタミンの酸化物がさらなる光増感を繰り返すことで増幅される H_2O_2 が主要因であることを明らかにした(Fig. 2-22)。

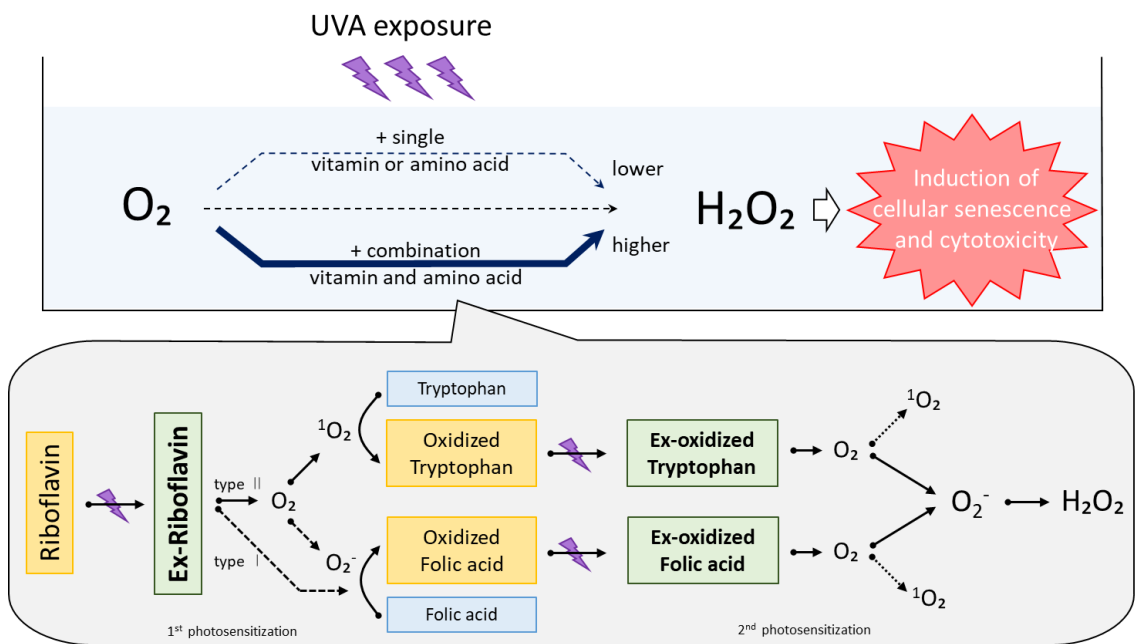


Figure 2-22. DMEM 中でおこる UVA 光増感による H_2O_2 産生機序の簡略図

2-3 考察

PBS の組成は、リン酸二水素カリウム、塩化カリウム、リン酸水素二ナトリウム、塩化ナトリウムであり、UVA クロモフォアとして作用する成分は含有されていない。対して、DMEM は微量ではあるが UVA クロモフォアとしての性質を示すリボフラビン、葉酸、ピリドキシンが含有される。線維芽細胞は 10% の血清を添加した DMEM で培養することから、PBS 洗浄後であっても、線維芽細胞内には種々の UVA クロモフォアや栄養成分が内在していると考えられる。その状態であっても、PBS 中での UVA 暴露は線維芽細胞の細胞老化を引き起こさなかった。対照的に、細胞外環境が DMEM で満たされた環境での UVA 反復暴露は線維芽細胞を早期に老化させた。このことは、線維芽細胞を老化させた活性酸素種が細胞外環境で産生されたことを強く示唆している。これらのことから、ヒト皮膚への UVA 暴露で生じる線維芽細胞の光老化は、細胞内の UVA クロモフォアを介して発生する ROS だけでなく、細胞外環境の UVA クロモフォアを介して発生する ROS により促進される可能性が示唆された。

本章では、UVA 暴露を受けた DMEM に発生する H_2O_2 が、リボフラビンとアミノ酸もしくはリボフラビンとビタミンとの協調的な光増感により劇的に増幅されることを見出した。また、その産生機序には、リボフラビンの光増感を初期反応として、1) 葉酸共存下では電子移動による光増感反応 (type 1 または minor-type 2) が、2) トリプトファン共存下ではエネルギー移動による光増感反応 (major-type 2) という異なる経路が存在することを示した。トリプトファンや葉酸は一方の経路に偏った反応であったが、どちらの経路でも反応する成分の存在も予想される。

リボフラビンと葉酸間の光増感で発生したと考えられるプテリン誘導体は、UVA 光増感によりスーパーオキシドや H_2O_2 などの ROS を産生することが報告されている。また、プテリン誘導体は白斑部位へ蓄積が観察されることから[55]、白斑部位特異的な H_2O_2 の蓄積が紫外線ストレスにより進行している可能性も示唆されている。しかし、なぜプテリン誘導体が白斑部位に蓄積されるかは明らかとなっていない。本研究の結果から考察すると、表皮のメラニン色素などにより吸収されていた UVA がリボフラビンなどの光増感剤に吸収されることで光増感反応が開始され、葉酸の酸化分解が促進される機序が予想され

る。このように、本研究で明らかとなった光増感機序を応用することで、紫外線が関与する皮膚疾患の解明や治療への応用が期待できる。

加えて、生体中のリボフラビン、葉酸、トリプトファンなどのアミノ酸の濃度について文献調査を行ったところ、皮膚組織中の濃度に関する報告を見つけることはできなかったが、血中または血清濃度に関する報告は存在した。血中や血清におけるリボフラビンは約 $0.2\ \mu\text{M}$ ~ $0.75\ \mu\text{M}$ 、葉酸は 0.02 ~ $0.1\ \mu\text{M}$ 、トリプトファンは約 $60\ \mu\text{M}$ であった[56-59]。DMEM には、リボフラビンが約 $1\ \mu\text{M}$ 、葉酸が約 $10\ \mu\text{M}$ 、トリプトファンが約 $80\ \mu\text{M}$ 含まれる。リボフラビンやトリプトファンは血中濃度より DMEM が少し高い値で含まれるが、大きく変わらない。しかし、葉酸は DMEM では血中の約 100~500 倍高く含有されている。これらのことから、ヒトの生体でおこる光増感反応は、白斑などの特殊な疾患を除き、光増感成分とアミノ酸間でおこる反応が優先される可能性が高いと考えられる。

また、DMEM にはヒスチジンの様に抗酸化作用を示す成分が含有されるにも関わらず、UVA 暴露による細胞老化が誘導されたことは興味深い。ヒスチジンは一重項酸素消去能をもつが、リボフラビン共存下の UVA 暴露では H_2O_2 産生を増加させた。このことは、種々の栄養成分中でおこる UVA 光増感反応が単純な抗酸化素材の添加では抑制されない可能性を示唆している。

本章では、UVA 暴露による線維芽細胞の光老化機序を詳細に明らかにした。また、これらの研究を行う中で、*in vitro* で簡易に光老化線維芽細胞を得る方法と、UVA 暴露により H_2O_2 を産生する成分の最小の組み合わせが明らかとなった。そこで、第3章では *in vitro* で再現した光老化線維芽細胞を用いて、線維芽細胞がもつ色素細胞のメラニン産生抑制作用について解析を行い、第4章では抗光老化素材の探索に有用な評価系の考案と、実際に種々の抗酸化素材を用いた評価を実施した。

第 3 章

第3章 線維芽細胞と共培養した色素細胞のメラニン産生変化の検討

3-1 序論

線維芽細胞は細胞増殖性因子（FGF、KGF、SCF など）を分泌しており、皮膚の恒常性の維持に大きな貢献をしていることは古くより知られてきた。近年ではさらに、色素細胞のメラニン生成を制御する働きを持つことに注目が集まっている。掌や蹠の色素形成が低い要因として線維芽細胞が分泌する Dkk1 が報告され[25]、対照的に、スキンタイプが高い人種の線維芽細胞では色素細胞のメラニン産生を活性化する NRG1 の分泌量が多いことが報告されている[26]。2014 年にはヒト皮膚から採取した線維芽細胞と色素細胞との実験から、線維芽細胞の光老化が色素沈着の形成に深く関与することが報告された[27]。しかし、その作用機序に関する報告は依然として少ない。これは、ヒト皮膚組織中で光老化した線維芽細胞の入手や、継続的な培養が困難であるためではないかと予想される。そこで、本研究により安定して得ることが可能となった、DMEM 中での UVA 反復暴露で得られた老化線維芽細胞を用いることで、線維芽細胞がもつ色素細胞メラニン産生抑制作用を解析が容易に可能となると考えた。

色素細胞は細胞内小器官のメラノソーム内でメラニン色素を合成する。メラノソームはその成熟段階に応じてステージ 1-4 に分類され、ステージ 1 ではエンソドーム様の多胞体と原繊維の形成が観察される。ステージ 2 では原繊維が重合した平面状の構造物が形成されると共に、メラノソームは楕円状となる。チロシナーゼなどのメラニン合成律速酵素はステージ 3 よりメラノソーム内に輸送され黒いメラニン色素が生じる。原繊維が観察されなくなるまでメラニン色素が合成されたメラノソームはステージ 4 として分類されている。さらに近年では、メラノソームとミトコンドリアの接触がメラノソームの成熟に関与することや、ミトコンドリアの形状がメラニン産生量と関連するという報告もなされている[60]。また過去に、メラニン産生抑制作用を示すプラセンタエキス、または、メラニン産生促進作用を示すプラセンタエキスを処理した色素細胞を解析することで、メラニン産生量の変化と、メラニン合成律速酵素であるチロシナーゼ量、ミトコンドリアの酸素消費量、および、ミトコンドリア内在性抗酸化酵素である SOD2 量の変化が相関関係を示すことを報告している[61]。先行研究の結果とも合わせて、色素細胞のメラニン産生がミトコ

ミトコンドリア機能を介して制御されると考えたことより、本研究では、正常線維芽細胞および DMEM 中での UVA 暴露で老化を誘導した線維芽細胞が色素細胞のメラニン産生にどのように影響するか評価することを目的とした。

3-2 結果

3-2-1 線維芽細胞または UVA 暴露線維芽細胞と共培養した色素細胞の評価法

線維芽細胞の分泌性因子が色素細胞のメラニン産生へ与える影響を評価するために、底面に 1 μm -pore を無数にもつ Hanging-trans well を用いて色素細胞と線維芽細胞を共培養した。Hanging-trans well は培養ディッシュからの取り外しが容易なため、共培養終了後に trans well を取り外すだけで色素細胞のみを評価することが可能である。色素細胞は培養ディッシュ上に、線維芽細胞は trans well 上に播種した (Fig. 3-1)。共培養開始から 2 日おきに培養液を交換し、合計 6 日間共培養を続けた。共培養終了後、正常線維芽細胞または DMEM 中での UVA 反復暴露で誘導した老化線維芽細胞と共培養した色素細胞を回収し、細胞内メラニン量とチロシナーゼ発現量および SOD2 発現量を比較した。

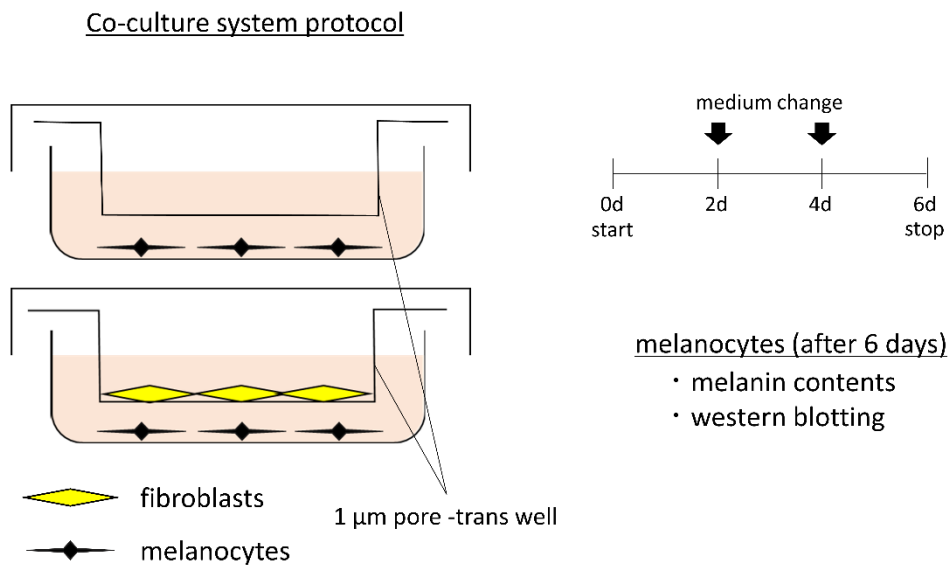


Figure 3-1. 線維芽細胞と色素細胞の共培養実験のプロトコル

3-2-2. 線維芽細胞と共培養した色素細胞のメラニン量の比較

単独培養の色素細胞内のメラニン量と比較して、UVA 未暴露の線維芽細胞と 6 日間共培養された色素細胞のメラニン量は有意に減少した。対照的に、DMEM 中の UVA 暴露で老化を誘導した線維芽細胞と 6 日間共培養された色素細胞のメラニン量には大きな変化は認められなかった (Fig. 3-2)。ヒト光老化皮膚より採取された線維芽細胞がメラニン産生抑制作用を失うことを報告している先行研究の結果と一致したことから、DMEM 中の UVA 暴露により得られた老化線維芽細胞は、光老化で生じる皮膚の色素異常症の研究へ応用できる可能性が示された。

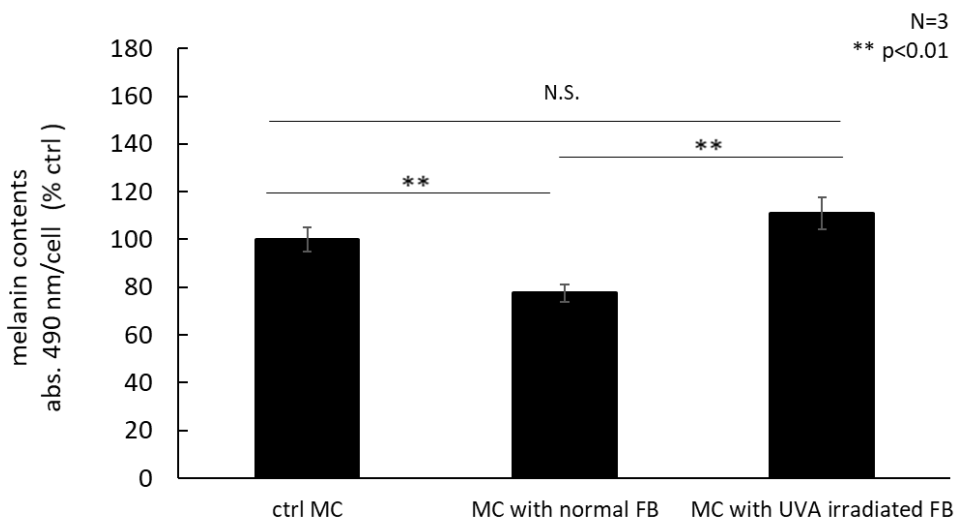


Figure 3-2. 線維芽細胞と共培養した色素細胞のメラニン量の比較

界面活性剤を用いて抽出した色素細胞内のメラニン色素を、10% DMSO/ NAOH 溶液中で加熱処理した。加熱処理後のメラニン抽出溶液を 490 nm の波長で吸光測定した。490 nm の吸光値を色素細胞数で割った値を細胞あたりのメラニン量とした。単培養の色素細胞のメラニン量を基準として、線維芽細胞と共培養した色素細胞のメラニン量の相対値を算出しグラフに表した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

3-3-3. 線維芽細胞と共培養した色素細胞のチロシナーゼ量と SOD2 量の比較

線維芽細胞と共培養した色素細胞のチロシナーゼ発現量と SOD2 発現量をウェスタンブロットティングにより評価した。単培養の色素細胞と比較して、UVA 未暴露の線維芽細胞との共培養によりメラニン産生量が低下した色素細胞では、チロシナーゼ発現量が減少し、SOD2 発現量は増加した。これは、過去に報告したメラニン産生を抑制するプラセンタエキスを処理した色素細胞の結果と同様であった。対して、DMEM 中での UVA 暴露により老化を誘導した線維芽細胞と共培養した色素細胞では、チロシナーゼ発現量と SOD2 発現量に大きな変化は観察されなかった(Fig. 3-3)。これらの結果より、正常な線維芽細胞は色素細胞のミトコンドリア機能を変化させることでメラニン産生を負に制御している可能性が示唆された。加えて、UVA 暴露により光老化した線維芽細胞ではその作用が失われることが明らかとなった。

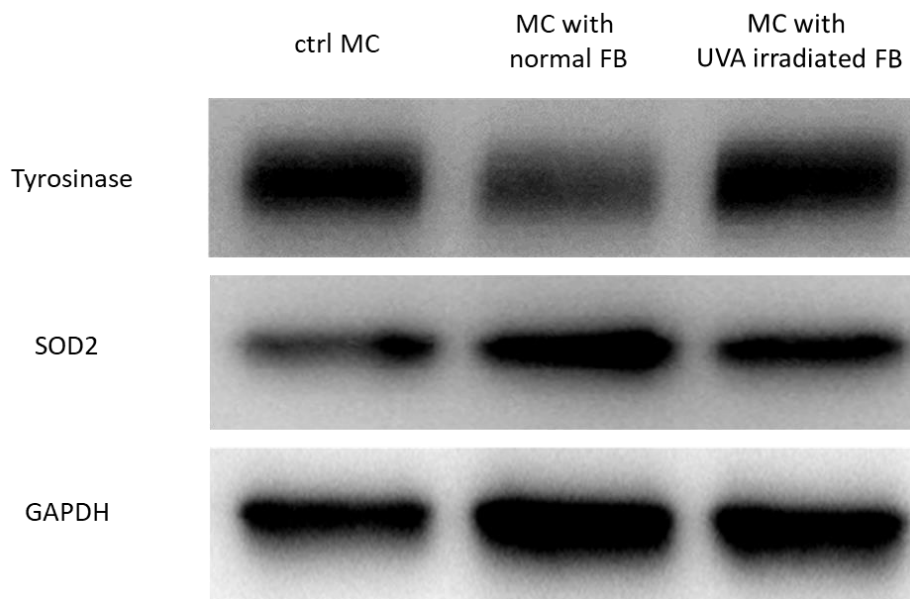


Figure 3-3. 線維芽細胞と共培養した色素細胞チロシナーゼ量と SOD2 量の比較

界面活性剤で抽出した色素細胞の総タンパク質をタンパク質定量により測定し、各抽出溶液のタンパク質量が等しくなるように調整した。調整後の抽出サンプルについてウェスタンブロットティング法を用いて評価した。

3-3 考察

日本では美白成分として認可されているプラセンタエキスは、インドでは白斑の治療薬として用いられるなど、メラニン産生促進作用と抑制作用の両作用を有している[62, 63]。我々は、プラセンタエキスがもつメラニン産生抑制作用と促進作用について研究を進める中で、全画分ではメラニン産生抑制作用が強くあらわれたプラセンタエキスであっても、その水溶性画分ではメラニン産生促進作用が強くあらわれることを過去に報告した。これは、動物の出産時に胎盤から採取されるプラセンタエキスが含む様々な生理活性因子の中には、メラニン産生抑制と促進作用をもつ因子がどちらも含有されているからだと考えられる。また、それぞれのプラセンタエキスを処理した色素細胞のメラニン産生量の変化と、酸素消費量や解糖能、ミトコンドリア内在性の抗酸化酵素である SOD2 発現量といったミトコンドリア機能とに相関関係を見出している。

真皮線維芽細胞もプラセンタエキスに似た作用を有している。現在までに、メラニン産生抑制作用を示す線維芽細胞由来の因子として Dkk1 や CXCL12 が、メラニン促進作用を示す線維芽細胞由来の因子として NRG1、KGF、TGF- β 、HGF、bFGF、CCN、SCF、NT-3、FAP- α 、BMP-4、Sema7a 等が、双方の性質を持つ因子として sFRP や WIF などが報告されている[64]。このように、線維芽細胞由来の種々の因子のバランスの変化により、メラニン産生を抑制もしくは促進していると考えられる。紫外線による光老化はこのバランスを変化させる環境因子の一つである。皮膚の光老化は、真皮および真皮線維芽細胞の深刻な変化に関連していることはよく知られている[65, 66]。また 2014 年には、紫外線による線維芽細胞の光老化が色素沈着を誘導することが立て続けに報告された。Salducci らは UVA を照射した線維芽細胞の培養上清が色素細胞の細胞数を増加させることを明らかにし、日光黒子部位の色素沈着には光老化した線維芽細胞由来の分泌物が関与していることを報告した[67]。また、Duval らはヒトの光老化部位から採取した線維芽細胞を用いた実験を行っている。再構築三次元皮膚モデルにおいて、線維芽細胞の有無が色素細胞のメラニン生成を変化させることを見出し、光老化をしていない線維芽細胞を含んだ三次元皮膚モデルにおいてメラニン生成度が抑制されることを証明した。同様の方法で光老化線維芽細胞を用いた三次元皮膚モデルを作製すると、メラニン生成が抑制されなかった。線維芽細胞と光老化線維芽細胞が分泌するメラニン生成に関与する因子の比較

では、ほとんどすべての因子で有意な差は観察されなかったものの、光老化線維芽細胞において、メラニン生成を促進することが知られている NRG1、HGF、SCF、BMP-4、bFGF などは増加傾向を示し、また、メラニン生成抑制作用をもつ Dkk1 は減少傾向であった。以上より、紫外線暴露による線維芽細胞の光老化は色素細胞のメラニン生成促進へ大きな影響を与えられていると考えられている。

そこで我々も、正常の線維芽細胞、もしくは、DMEM 中での UVA 反復暴露で老化を誘導した線維芽細胞と共培養した色素細胞のメラニン産生について評価し、先行研究と同様の結果を得たことから、実際の皮膚組織中でおこる光老化の機序を解析する *in vitro* 実験系として DMEM 中で真皮線維芽細胞へ UVA を反復暴露する方法が有用であると考えられた。また、この評価系による解析を進めた結果、真皮線維芽細胞がもつ色素細胞のメラニン産生抑制機序の一つの可能性として、線維芽細胞が色素細胞のミトコンドリア機能を調整することを見出した。線維芽細胞の色素細胞のメラニン産生抑制作用の解明には多くの課題が残されており、本研究により色素細胞のメラニン産生とミトコンドリア内在性抗酸化酵素である SOD2 発現量の関与を明らかにしたことは、今後の研究展開に大いに役立つと期待される。

第 4 章

第4章 UVA 光増感に対する抗酸化素材の作用の解析

4-1 序論

これまでの実験結果より、慢性的な UVA 暴露による真皮線維芽細胞の光老化を予防するためには、光増感成分と種々の栄養成分による協調的な光増感反応を抑制する必要があることが示唆された。光増感反応は種々の ROS により進行することから、光増感反応の抑制には抗酸化素材が有用だと考えられる。しかし、リボフラビンと葉酸間でおこるラジカル種による光増感反応や、リボフラビンとトリプトファン間でおこる非ラジカル種である一重項酸素による光増感反応、または、どちらの反応からも産生される H_2O_2 のように光増感反応に関わる活性酸素種が複数存在することから、どのような抗酸化素材が有効であるか予想することは困難である。また、一重項酸素消去剤である NaN_3 のように、リボフラビンとトリプトファン間でおこる光増感反応には効果があるが、リボフラビンと葉酸間の光増感反応には効果を示さない場合も考えられる。そこで本章では、それぞれ異なる抗酸化作用をもつ素材について、リボフラビンと葉酸間、もしくは、リボフラビンとトリプトファン間の光増感に対する作用について評価を行うことで、光増感を効果的に抑制する条件を検討した。抗酸化素材として、スーパーオキシドなどのラジカル種を消去する作用をもつアスコルビン酸や水溶性ビタミン E として知られるトコロックス、一重項酸素消去能をもつヒスチジン、 H_2O_2 消去能が高いシステインを選定した[68-70]。

4-2 結果

4-2-1 UVA 暴露による H₂O₂ 産生量が同等となる光増感条件の検討

リボフラビンと葉酸間、または、リボフラビンとトリプトファン間の UVA 光増感反応に対する抗酸化素材の作用の評価を容易にするために、それぞれの光増感反応で産生される最終的な H₂O₂ 量を同程度に揃えた。1 μM のリボフラビンに対して 30 μM の葉酸、または、100 μM のトリプトファンに 3.6 J/cm² の UVA を照射すると、最終的な H₂O₂ 量が同程度となった (Fig. 4-1)。

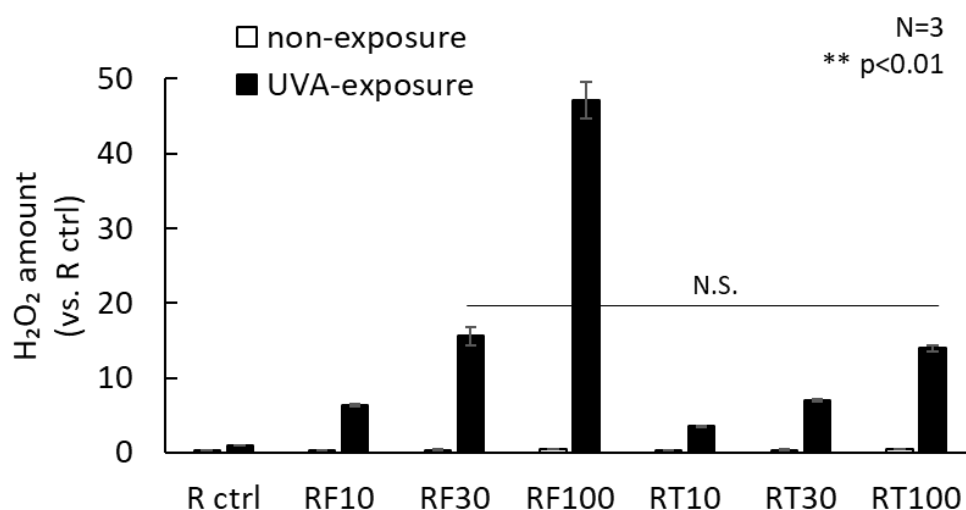


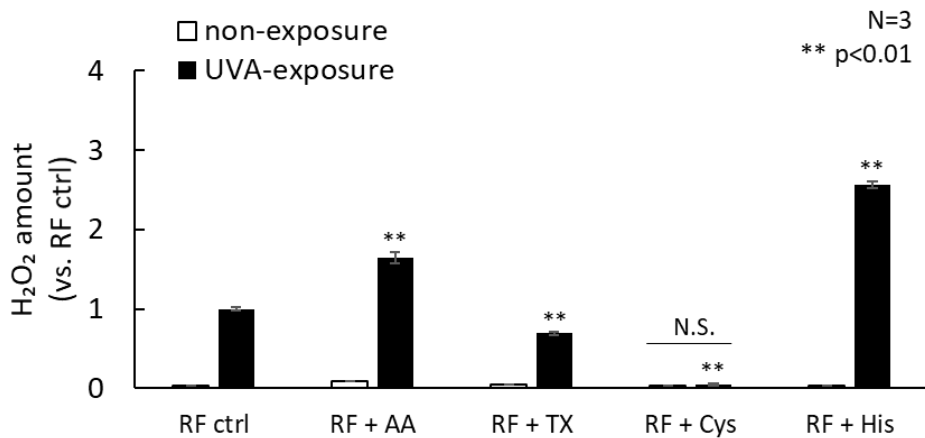
Figure 4-1. UVA 暴露されたリボフラビンと葉酸またはトリプトファンの混合溶液に発生した H₂O₂ 量の比較

1 μM のリボフラビンに対して 10, 30, 100 μM の葉酸の混合溶液、および、1 μM のリボフラビンに対して 10, 30, 100 μM のトリプトファン混合溶液を調整し、3.6 J/cm²-UVA を暴露した。UVA 暴露後に溶液中の H₂O₂ 量を ADHP/HRP 法で測定した。UVA を暴露した 1 μM のリボフラビン溶液中に発生した H₂O₂ 量を基準として、各溶液中に発生した H₂O₂ 量の相対値を算出した。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

4-2-2. UVA 光増感反応に対する各抗酸化素材の作用の評価

上記の条件を用いて、リボフラビンと葉酸間、および、リボフラビンとトリプトファン間の光増感反応に対するアスコルビン酸、トロロックス、システイン、ヒスチジンの作用を評価した。1 μM のリボフラビンと 30 μM の葉酸、1 mM の抗酸化素材を混合した溶液に 3.6 J/cm² の UVA を照射後、溶液中の H₂O₂ 量を測定した。リボフラビンと葉酸間の光増感反応で産生された H₂O₂ 量を基準として、それぞれの抗酸化素材を添加した場合の H₂O₂ 量の相対値を算出した。その結果、1 mM のアスコルビン酸、もしくは、1 mM のヒスチジンを添加した条件では UVA 暴露後の H₂O₂ 量が大幅に増加した。1 mM のトロロックス添加条件の H₂O₂ 量は有意に低下したが、UVA 未暴露の条件よりは高い値を示した。UVA 暴露後の H₂O₂ 産生量を最も低下させたのは 1 mM のシステインを添加した条件であり、UVA 未暴露条件と同程度の H₂O₂ 量であった (Fig. 4-2a)。次に、リボフラビンとトリプトファン間の光増感反応に対する抗酸化素材の作用を評価したところ、リボフラビンと葉酸間の光増感反応に対する抗酸化素材の反応とほぼ同様の結果となった。UVA を暴露した溶液中の H₂O₂ 量は、1 mM のアスコルビン酸を添加した条件が最も高く、1 mM のシステインを添加した条件が最も低い値を示した。1 mM のトロロックスを添加した条件では、僅かであるが有意に H₂O₂ 量を低下させた。興味深いことに、一重項酸素消去能をもつ NaN₃ (1 mM) で抑制されたリボフラビンとトリプトファンの光増感反応は、アジ化ナトリウムと同じく一重項酸素消去能をもつ 1 mM のヒスチジンを添加した条件では抑制されず、むしろ僅かに増加した (Fig. 4-2b)。加えて、それぞれの光増感条件において、線維芽細胞の細胞生存率へ及ぼす影響を比較した。リボフラビンと葉酸間、および、リボフラビンとトリプトファン間の UVA 光増感反応により低下した細胞生存率は、1 mM のシステインを添加した条件のみ緩和され、1 mM のアスコルビン酸を添加した条件ではさらに低下した (Fig. 4-3)。

a)



b)

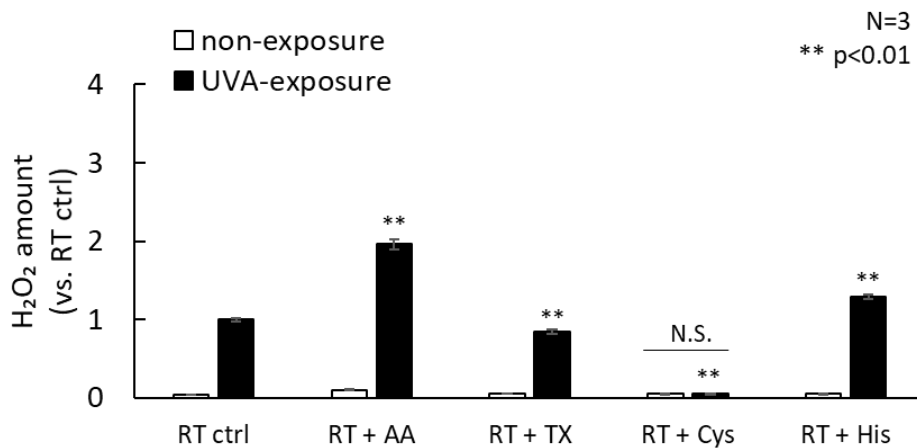


Figure 4-2. リポフラビンと葉酸間またはトリプトファン間の光増感反応での H_2O_2 産生に対する抗酸化素材の作用

a) $1 \mu M$ のリポフラビンと $30 \mu M$ の葉酸に $1 mM$ の抗酸化素材を添加した溶液、または、
 b) $1 \mu M$ のリポフラビンと $100 \mu M$ のトリプトファンに $1 mM$ の抗酸化素材を添加した溶液を調整し、 $3.6 J/cm^2$ -UVA を暴露した。UVA 暴露後に溶液中の H_2O_2 量を ADHP/HRP 法で測定した。UVA を暴露したリポフラビンと葉酸混合溶液(RF ctrl)、または、リポフラビンとトリプトファン混合溶液(RT ctrl)中に発生した H_2O_2 量を基準として、各抗酸化素材を添加した溶液中に発生した H_2O_2 量の相対値を算出した。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。

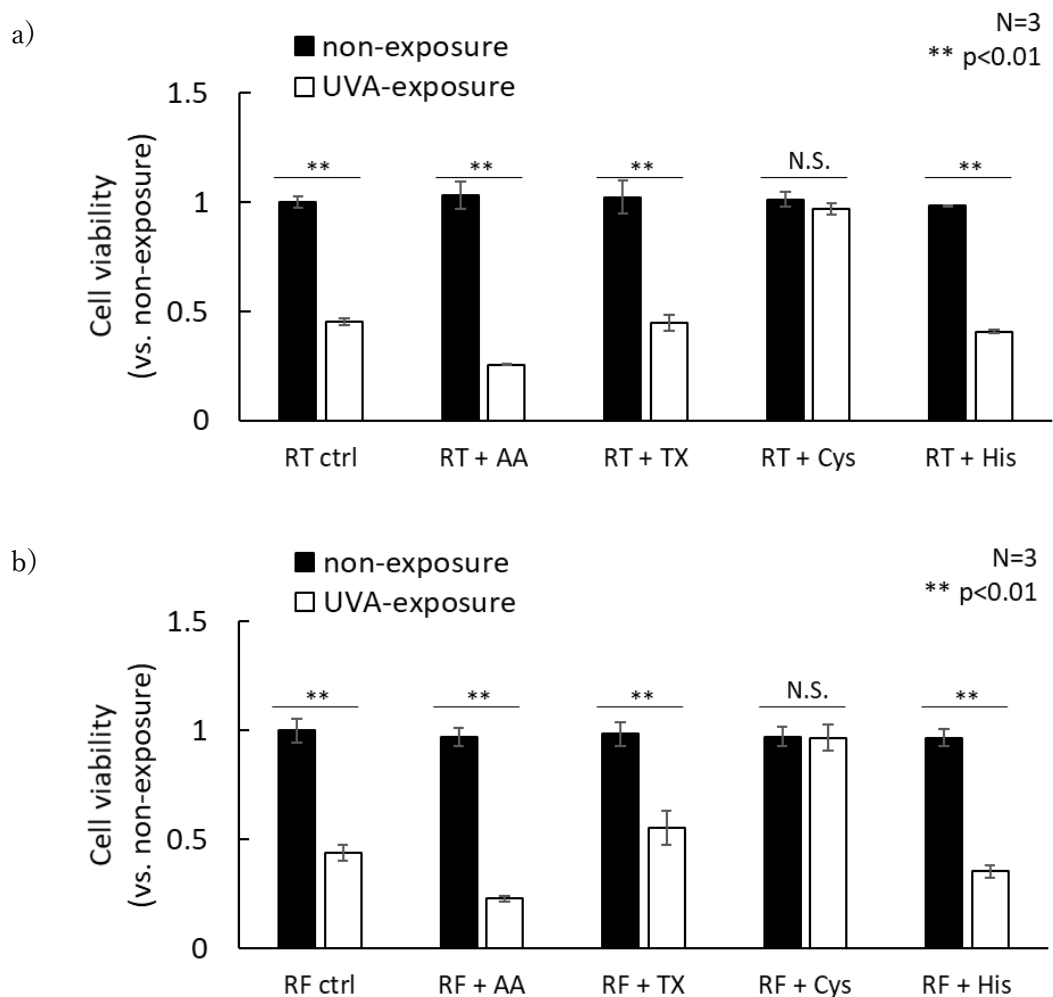


Figure 4-3. リポフラビンと葉酸間またはトリプトファン間の光増感反応での細胞障害に対する各抗酸化素材の作用

a) 1 μM のリポフラビンと 30 μM の葉酸に 1 mM の抗酸化素材を添加した溶液、または、
 b) 1 μM のリポフラビンと 100 μM のトリプトファンに 1 mM の抗酸化素材を添加した溶液中の線維芽細胞へ 3.6 J/cm^2 -UVA を暴露した。UVA 暴露後から 3 時間インキュベート後の細胞生存率を MTS 法により評価した。UVA 未暴露のリポフラビンと葉酸混合溶液中 (RF ctrl)、または、リポフラビンとトリプトファン混合溶液中 (RT ctrl) の細胞生存率を基準として各条件の細胞生存率をグラフに表した。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。AA: L-アスコルビン酸、TX: トロロックス、Cys: L-システイン、His: L-ヒスチジン

4-2-3. リボフラビンと抗酸化素材間でおこる光増感反応の比較

UVA 暴露で誘発される細胞障害が抗酸化素材の種類により変化した要因を調べる目的で、リボフラビンと抗酸化素材間でおこる UVA 光増感反応による H_2O_2 産生量を評価した。1 μM のリボフラビンとそれぞれ 1 mM の抗酸化素材を添加した溶液へ UVA を暴露し、溶液中の発生した H_2O_2 量を測定した。その結果、1 mM のアスコルビン酸、1 mM のトロロックス、1 mM のヒスチジンを添加した条件では、光増感反応による H_2O_2 産生が増加することが明らかとなった。1 mM のシステインを添加した条件では、UVA 未暴露の条件と同程度に低い値を示した (Fig. 4-4)。最後に、それぞれの抗酸化素材の H_2O_2 消去能を評価した。100 μM の H_2O_2 溶液に 1 mM の抗酸化素材を添加後、室温で 10 分インキュベートした。その結果、1 mM のシステイン添加条件では H_2O_2 を完全に消去した。1 mM のアスコルビン酸や 1 mM のトロロックスを添加した条件では約 50% の H_2O_2 を消去した。1 mM のヒスチジン添加条件では H_2O_2 は消去されなかった (Fig. 4-5)。以上のことから、強い H_2O_2 消去能をもち、かつ、リボフラビンとの光増感反応を抑制するシステインの様な抗酸化素材が、UVA 暴露による線維芽細胞の酸化障害を抑制する可能性が示唆された。また、リボフラビン存在下で光増感反応が増強するアスコルビン酸やヒスチジンのような抗酸化素材は、UVA 暴露による線維芽細胞の酸化障害をより強く引き起こす危険性も明らかとなった。

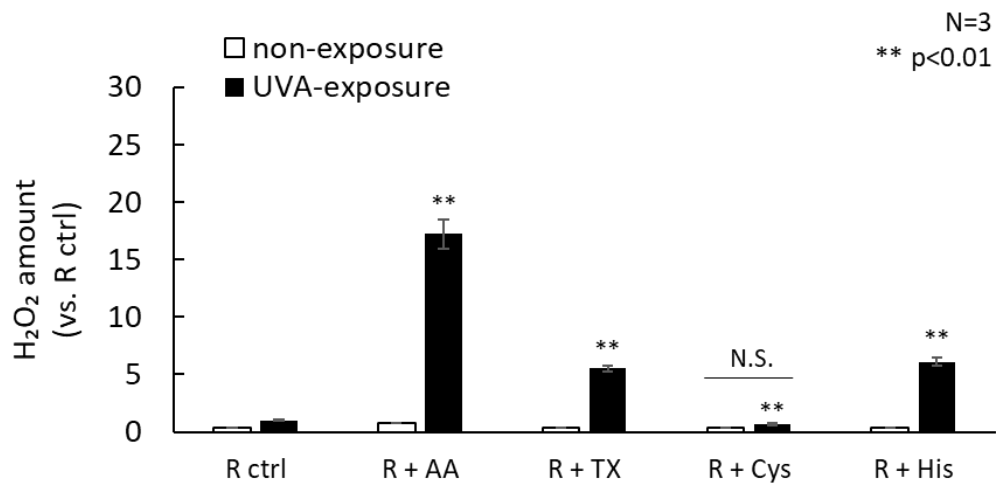


Figure 4-4. リボフラビンと抗酸化素材混合溶液への UVA 暴露で発生した H₂O₂量の比較
 1 μM のリボフラビンと 1 mM の抗酸化素材の混合溶液へ 3.6 J/cm²-UVA を照射した。UVA 暴露後に溶液中に発生した H₂O₂量を ADHP/HRP 法で測定した。UVA を暴露した 1 μM のリボフラビン溶液中に発生した H₂O₂量を基準として、各溶液に発生した H₂O₂量の相対値を算出した。アルミホイルで覆い同様の操作を実施した各溶液を UVA 未暴露の条件とした。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。AA: L-アスコルビン酸、TX: トロロックス、Cys: L-システイン、His: L-ヒスチジン

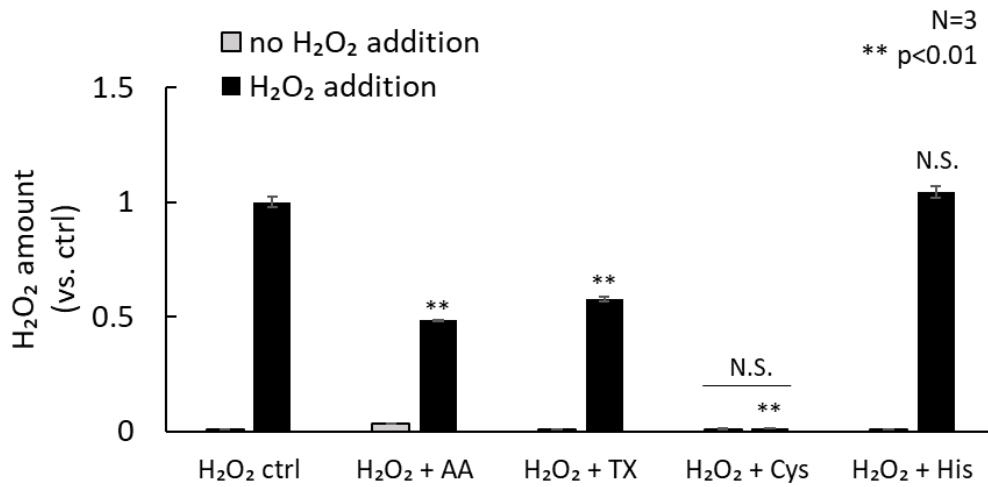


Figure 4-5. 各抗酸化素材における H₂O₂ 消去能の比較

HBSS または、HBSS で調整したそれぞれ 1 mM の抗酸化素材溶液に、最終濃度が 100 μ M となるよう H₂O₂ を添加した。H₂O₂ 添加から 10 分間室温でインキュベートし、10 分後の溶液中に残った H₂O₂ 量を ADHP/HRP 法で測定した。HBSS に H₂O₂ を添加した条件を基準として、各抗酸化素材溶液中の残った H₂O₂ 量の相対値を算出した。H₂O₂ を添加していない各条件の溶液の H₂O₂ 量も同時に測定した。グラフの値は、3 度の実験の平均値と標準偏差である。AA: L-アスコルビン酸、TX: トロロックス、Cys: L-システイン、His: L-ヒスチジン

4-3 考察

リボフラビン-葉酸間やリボフラビン-トリプトファン間の光増感に対する抗酸化素材の作用を評価した。その結果、一重項酸素やスーパーオキシド消去能が報告されているアスコルビン酸や、一重項酸素消去能が報告されているヒスチジンは、UVA 光増感反応による H_2O_2 産生量をより増加させる性質をもつことが明らかとなった。アスコルビン酸はプロオキシダントとして作用する側面をもつことや、一重項酸素と反応し H_2O_2 を産生することが報告されていることから、ROS への反応性の高さが光増感反応による H_2O_2 産生を増強したと考えられる。しかしながら、一重項酸素消去能をもつヒスチジンが光増感反応を促進したことは興味深い結果であった。ヒスチジンが光増感で酸化される研究報告はあるが、クロモフォアの共存下における UVA 暴露で H_2O_2 産生が増加するといった報告はない。これは、リボフラビンの光増感により酸化されたヒスチジン構造物が、トリプトファン酸化物のように、UVA クロモフォアとしての性質をもつ可能性を示している。これらの結果が示すように、通常では高い抗酸化能を示す素材であっても、クロモフォア共存下の UVA 暴露では期待される作用と反対の影響があらわれる可能性があることから、光増感反応に対する作用を丁寧に検証する必要がある。

本実験条件では、高い H_2O_2 消去能を示した 1 mM のシステインがリボフラビンと葉酸間、および、リボフラビンとトリプトファン間でおこる光増感反応に効果を示した。一重項酸素消去剤である NaN_3 は、リボフラビンとトリプトファン間の光増感反応を抑制したが、リボフラビンと葉酸間の光増感反応を抑制できなかったことから、両機序の光増感反応を抑制したシステインは、UVA 暴露で誘発される酸化障害や光老化の予防に役立つ可能性がある。光増感反応で発生した H_2O_2 を即時に消去したのか、初期反応であるリボフラビンの光増感を抑制したのか、システインの光増感抑制機序の解明は今後の検討課題としたい。

今後、リボフラビンなどの UVA クロモフォアと光増感反応をおこさず、ラジカル種や非ラジカル種の消去能が高い抗酸化素材を見出すことができれば、UVA による真皮線維芽細胞の光老化に対して効果的な予防が可能となると期待される。

第 5 章

第 5 章 総括

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を示す。

- 1) UVA 暴露で引き起こされる細胞老化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 ROS が H_2O_2 であること
- 2) 種々のアミノ酸とビタミンの中でも UVA 暴露による H_2O_2 産生の初期反応を担う成分がビタミン B_2 として知られるリボフラビンであること
- 3) リボフラビンと共存することで UVA 暴露中の H_2O_2 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 H_2O_2 を産生すること
- 4) 線維芽細胞と共培養した色素細胞ではチロシナーゼ (メラニン産生律速酵素) 量の低下との SOD2 量 (ミトコンドリア内在性抗酸化酵素) の増加がおこるが、光老化線維芽細胞では上記のような色素細胞の変化がおこらずメラニン産生が抑制されないこと
- 5) 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

本研究により、わずかな量の UVA クロモフォアであっても、周辺環境によっては UVA による酸化障害を強く誘導することが明らかとなった。加えて、一般的に用いられる抗酸化素材のアスコルビン酸は上記の反応を抑制せず、むしろ促進した。また、これらの光増感反応による細胞障害の主要因が H_2O_2 であることから、UVA 暴露による真皮線維芽細胞の光老化は、UVA クロモフォアと光増感せず、かつ、高い H_2O_2 消去能をもつ素材により予防できる可能性が示された。

リボフラビンなどの UVA クロモフォアとしても作用する成分や種々の栄養成分は、真皮だけではなく表皮にも豊富に存在する。しかし、真皮組織と表皮組織の構造の性質は異なることから、UVA による光増感反応機序も異なる可能性が考えられる。本研究は真皮組織でおこる光老化を想定したため、水溶液中の光増感反応に焦点をあてた研究を行ったが、細胞成分が密に詰まった表皮組織は、皮膚表面や角層、細胞間基質などの疎水性の環境も多いため、疎水性の環境中でおこる光増感反応について理解を深める必要がある。特に、皮膚表面は種々の抗酸化素材が配合される化粧品などの製剤を塗布する機会が多いことから、通常の生体環境ではおこらない皮膚障害が生じる可能性が高くなると考えられる。過去に問題となったソラレンによる光毒性も、紫外線との光増感反応が十分に理解されていなかったために生じたものである。水溶液中などの親水性の環境下に加え、疎水性の環境下でおこる光増感反応の解析が進めば、製剤の安全性をより確実に担保することが可能となるだろう。本研究の次の段階として、疎水性環境でおこる光増感反応の解析を今後検討したい。

また、UVA クロモフォアとして作用したリボフラビンや葉酸は、生命反応に必須の栄養素であるため生体中から除去することは望ましくない。リボフラビンが欠乏すると成長障害、脂漏性皮膚炎、口内炎などを引き起こし、葉酸の欠乏は成長障害や巨赤芽球性貧血を引き起こす。そのため、十分なリボフラビンや葉酸を摂取する必要があるが、紫外線を浴びすぎないように気をつけなければならない。今後、リボフラビンのような UVA クロモフォアの共存下での UVA 暴露でも、光増感反応を増強しない抗酸化素材の探索が進めば、皮膚の光老化を気にせずに、太陽の恵みを楽しむ日々を送ることができると期待される。

第 6 章

第6章 実験操作

6-1 細胞培養

正常ヒト真皮線維芽細胞 (Cascade Biologics、Portland、OR) は、10% FBS(Fetal bovine serum)および1% 抗生物質 (anti bioticsmicotics: SIGMA) を添加した DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium; Sigma Aldrich、St Louis、MO) で培養した。PDL 値が10以下の線維芽細胞を使用してそれぞれの実験を開始した。正常ヒト色素細胞 (Cascade Biologics) は、1% 抗生物質および growth factor cocktail を添加した Medium 254 (Gibco) で培養したものを使用した。

6-2 UVA 暴露条件

UVA 照射には UVA スペクトル (340~410 nm) を発する東芝蛍光ランプを使用した。100 mm 培養ディッシュに 50×10^4 の細胞密度播種で播種した線維芽細胞を PBS で2回洗浄し、各実験条件の緩衝液へと交換した。緩衝液の溶液量は、10 mL/100 mm dish、1 mL/24 well plate とした。UVA 照射中の温度上昇を防ぐため、UVA 照射装置の中にアイスボックスを設置し、1.0 mW/cm²-UVA を1時間照射した (線量 :3.6 J/cm²)。UVA 暴露後は PBS で2回洗浄し、細胞培養用の10% 血清を含む DMEM へと交換し24時間インキュベートした。この操作を合計10日間連続でおこなった (総線量 :36.0 J/cm²)。各細胞老化指標の測定 (SA- β -galactosidase、細胞形態、細胞内 ROS、細胞黄色化、p16 タンパク質量) は最後の UVA 照射から24時間後の細胞を使用した。UVA 照射時にアルミホイルで遮光し、同様の操作を行ったものを UVA 未暴露細胞とした。

6-3 SA- β -galactosidase 染色

SA- β -galactosidase 染色は、SA- β -galactosidase 染色 kit (BioVision) を使用し、付属の実験操作手順に従った。細胞を PBS で洗浄後、4%ホルムアルデヒドで10分間インキュベートすることで細胞を固定した。固定後の細胞を PBS で2回洗浄後に、SA- β -galactosidase 染色溶液に置換して24時間インキュベートした。青色に染色された細胞を SA- β -galactosidase 陽性細胞として計測し、全細胞数に対する存在比を測定した。1条件ごとに最低100以上の細胞を計測し測定値を算出した。

6-4 細胞形態の評価

細胞を顕微鏡で観察し細胞形態を撮影した。撮影画像から Cell Sens Dimension (Olympus) の解析ソフトにより細胞面積を測定した。1条件ごとに最低100以上の細胞を計測し、測定値を算出した。

6-5 DHR123 による細胞内活性酸素種の評価

PBS 洗浄後の細胞に、最終濃度が 10 μ M になるように DMEM で調整した Dihydrirhodamine123 (DHR123) を加え、1 時間インキュベートした(37 °C, 5% CO₂)。インキュベート後の細胞を PBS で 2 回洗浄した後に、観察用緩衝液の Medium106 (Gibco) へと置換した。細胞を蛍光顕微鏡で観察し、励起波長 488 nm、蛍光波長 515 nm の蛍光像を撮影した。撮影した蛍光像を Cell Sens Dimension (Olympus) の解析ソフトを使用して蛍光強度を測定した。1 条件ごとに最低 100 以上の細胞を計測し蛍光強度値を算出した。

6-6 細胞の色調の測定 (細胞酸化物の評価)

トリプシン処理により細胞を回収し、15,000 g で 3 分間の遠心分離により細胞ペレットを調整した。回収後の細胞ペレットを PBS で 2 回洗浄した。洗浄後の PBS を完全に取り除いた後に、1% Igepal 溶液 60 μ L を細胞ペレットへ添加し攪拌して溶解した。溶解後に 15,000 g で 3 分間遠心分離することで細胞デブリを沈降させた。遠心分離後の細胞上清を 96 well plate に移し、450nm の吸光度を測定した。

6-7 ウェスタンブロッティング

細胞サンプルを Lysis buffer (1% Igepal (Sigma)、0.01%SDS およびプロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Science) を含む 0.1 M Tris-HCl: pH 7.0) で溶解し、遠心分離 (15000 g、4°C、5 分間) 後の上清を細胞抽出物として使用した。細胞抽出物のタンパク質濃度は、BCA タンパク質 assay kit (Pierce) を使用して測定し、各細胞抽出液のタンパク質濃度を揃えた。細胞抽出物を Laemmli sumple buffer (Bio-Rad) と混合し、5%-メルカプトエタノールを加え、95°C で 5 分間煮沸することでウェスタンブロッティング用のサンプル溶液とした。5 μ g のタンパク質を含むサンプル溶液を、4 %~20 % Tris-glycine gel (Bio-Rad) を用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、PVDF メンブレン (Bio-Rad) へと転写した。転写後のメンブレンを 1 % カゼインブロッカー (Bio-Rad) で 1 時間ブロッキング後に、1 % カゼインブロッカー調整した一次抗体 (Anti-CDKN2A / p16INK4a 抗体、1 : 500; Abcam, Anti-SOD2 antibody、1:2000、anti- α PEP7、1:1000) を加え 24 時間インキュベートした。インキュベート後のメンブレンを 1%濃度で tween 20 を添加した TBS-T で 3 回 (各 5 分) 洗浄した後に、1% カゼインブロッカーで調整した 2 次抗体(HRP 結合抗ウサギまたは抗マウス抗体 (1 : 1000; Abcam))を加え 1 時間インキュベートした。インキュベート後のメンブレンを 1% tween 20-TBS で 3 回洗浄した後、ECL plus ウェスタンブロッティング検出システム (Bio-Rad) を用いて目的のバンドを検出した。タンパク質の分子量はタンパク質ラダー (Bio-Rad) と比較することで決定した。リブロットには、Re-Blot Plus Western Blot Recycling キット (Millipore) を使用して一度目の抗体を除去し、1%カゼインブロッカーを使用したブロッキングから再度同じ操作を行った。内部標準として GAPDH を一次抗体とし (抗 GAPDH 抗体、1 : 1000; Abcam) て使用した。目的バンドの検出は

ChemiDoc™ XRS + Image Lab™ ソフトウェアを使用した画像解析システムを使用し、目的バンドの光学密度を測定することにより、タンパク質量を比較した。

6-8 細胞生存率の評価 (MTS 法)

生細胞により MTS テトラゾリウムから還元されたホルマジン色素を検出することで、細胞生存率の指標として使用した。実験方法は CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent (Promega, Madison, Wisconsin) に準拠した。UVA 暴露後の細胞を 3 時間インキュベートし、DMEM(10% FBS, 1% AB) で調整した MTS 試薬と交換し、37°C インキュベータ内で 1 時間インキュベートした。インキュベート後の上清を 96 well plate へ移し、490nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

6-9 H₂O₂ の検出 (ADHP/HRP 法)

H₂O₂ と反応し蛍光を発する ADHP/HRP 法を使用した。OxiSelect™ Hydrogen Peroxide Assay Kit に準拠して測定を行った。UVA 暴露された測定サンプルを 96 well plate へ移し、ADHP/HRP 試薬を加え、遮光しながら室温で 30min 静置した。静置後の蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した(ex:415nm, em:610nm)。

6-10 線維芽細胞への H₂O₂ 反復処理条件

100 mm 培養ディッシュに 5×10^5 の細胞密度播種で播種した線維芽細胞を PBS で 2 回洗浄し、フェノールレッドと FBS 不含の DMEM へ置換した後に最終濃度 130 μ M になる様に H₂O₂ を添加した。1 時間インキュベート後に PBS で 2 回洗浄し、細胞培養用の DMEM へと交換後に 24 時間インキュベートした。この操作を合計 10 日間連続でおこなった。細胞老化指標の測定は H₂O₂ 最終処理から 24 時間後の細胞を用いた。細胞老化指標の測定 (SA- β -galactosidase、細胞形態、細胞内 ROS、p16 量) は H₂O₂ 最終処理から 24 時間後の細胞を用いた。

6-11 mimic DMEM の作製

DMEM に含まれる 14 種のアミノ酸と 8 種のビタミンを DMEM 組成と同濃度で HBSS に添加することで mimic DMEM を作製した。各成分の濃度は以下に表記した。

[Amino acids]: 0.084 g/L L-Arginine HCl (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI), Japan), 0.0626 g/L L-Cystine diHCl (TCI), 0.03 g/L Glycine (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation. (Wako), Japan) 0.042 g/L L-Histidine HCl monohydrate (TCI), 0.105 g/L L-Isoleucine (Wako), 0.105 g/L L-Leucine (TCI), 0.146 g/L L-Lysine monoHCl (TCI), 0.03 g/L Methionine (TCI), 0.066 g/L L-Phenylalanine (TCI), 0.042 g/L L-Serine (TCI), 0.095 g/L L-Threonine (TCI), 0.016 g/L L-Tryptophan (Sigma), 0.12037 g/L L-Tyrosine Disodium Salt Dihydrate (NACALAI TESQUE, INC., Japan), 0.094 g/L L-Valine (TCI).

[Vitamins]: 0.004 g/L Choline Cl (TCI), 0.004 g/L Folic acid (Wako), 0.0072 g/L myo-Inositol (TCI), 0.004 g/L Nicotinamide (TCI), 0.004 g/L Calcium D-pantothenate (TCI), 0.00404 g/L Pyridixine HCl (Wako), 0.0004 g/L Riboflavin (Wako), 0.004 g/L Thiamine HCl hydrate (TCI).

6-12 スーパーオキシダの検出 (MPEC 法)

スーパーオキシドと反応し発光する MPEC 試薬(ATTO)を用いた。MPEC 試薬付属の実験方法を改変して実施した。UVA 暴露された溶媒を 96 well plate へ移し、MPEC 試薬を加えた後に UVA を 2 分照射した。2 分後の MPEC 発光強度をプレートリーダーにて測定した。UVA 照射開始から 0, 15, 30, 60 分において測定し、経時的な UVA 産生能の変化を比較した。

6-13 葉酸酸化物 (プテリン誘導体) の測定

葉酸、葉酸とリボフラビンまたは葉酸とリボフラビンと NaN_3 のそれぞれの混合溶液に 3.6 J/cm^2 -UVA を暴露した。これらの混合溶液中に発生した葉酸酸化物由来の自家蛍光(ex:360 nm, em:490 nm)を UVA 暴露の前後にマイクロプレートリーダーで測定し、変化量を比較した。

6-14 トリプトファンとキヌレニン誘導体の測定

トリプトファンとキヌレニンは、先行研究を参考に、それぞれ 280 nm と 360 nm の吸光度を測定した。トリプトファン、トリプトファンとリボフラビンまたはトリプトファンとリボフラビンと NaN_3 の混合溶液に 3.6 J/cm^2 -UVA を 1 時間照射した。吸光度は UVA 暴露の前後に測定し、変化量を比較した。吸光度は GeneQuant 1300 (GE Healthcare Life Science, Japan) を使用して、光路長 10 mm の石英セルを用いて測定した。

6-15 色素細胞と線維芽細胞の共培養

共培養には、底面に $1 \mu\text{m-pore}$ をもつ Hanging trans well を用いた。trans well へ 50×10^4 の線維芽細胞を播種し、5% CO_2 インキュベータ内で 24 時間インキュベートした。同時に、6-well culture plate へ 50×10^4 の色素細胞を播種しインキュベートした。24 時間後に、線維芽細胞が播種された trans well を色素細胞が播種された 6 well culture plate にはめ込んだ。色素細胞様培養液と線維芽細胞用培養液を 1:1 の比率で混合したものを、共培養用の培養液とした。2 日おきに培養液を交換し、計 6 日間共培養を続けた。

6-16 メラニン定量

回収した色素細胞を界面活性剤により溶解し、 $15,000 \text{ g}$ で 3 分間遠心分離した。上清を取り除いた後に ethanol:ether 溶液(1:1)を添加し攪拌することで脂質成分を取り除いた。再度、

15,000 g で 3 分間遠心分離を行い、上清を取り除いた後に乾燥させた。乾燥後に 10 % 1N NaOH/DMSO 溶液を加え、85°C で 5 分間煮沸した。インキュベート後に、測定サンプルを 96 well plate へと移し、490 nm の吸光度を測定した。

6-17 統計分析

統計分析は、Dunnet II テストの一方方向分析を使用して、少なくとも 3 つの独立した実験で実行した。P 値が 0.05 未満である場合は統計的に有意であると評価した。

第 7 章

第7章 引用文献

- 1) Ahmed NU, Ueda M, Nikaido O, Osawa T, Ichihashi M. High levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine appear in normal human epidermis after a single dose of ultraviolet radiation. *Br J Dermatol.* 1999; 140:226-31.
- 2) Takeuchi H, Runger TM. Longwave UV light induces the aging-associated progerin. *J Invest Dermatol.* 2013; 133:1857-62.
- 3) Mahns A, Melchheier I, Suschek CV, Sies H, Klotz LO. Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide. *Free Radic Res.* 2003; 37: 391-7.
- 4) Imokawa G, Ishida K. Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging I: reduced skin elasticity, highly associated with enhanced dermal elastase activity, triggers wrinkling and sagging. *Int J Mol Sci.* 2015; 16:7753-75.
- 5) Mohania D, Chandel S, Kumar P, Verma V, Digvijay K, Tripathi D, Choudhury K, Mitten SK, Shah D. Skin defense-damage mechanism. *Ultraviolet radiations: Adv Exp Med Biol.* 2017; 996:71-87.
- 6) Edstrom DW, Porwit A, Ros AM. Effects on human skin of repetitive ultraviolet-A1 (UVA1) irradiation and visible light. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2001; 17:66-70.
- 7) Mullenders LHF. Solar UV damage to cellular DNA: From mechanisms to biological effects. *Photochem Photobiol Sci.* 2018; 17:1842-52.

- 8) Ghosh R, Amstad P, Cerutti P. UVB-induced DNA breaks interfere with transcriptional induction of c-fos. *Mol Cell Biol.* 1993; 13:6992-9.
- 9) El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Patnaik S, Zhao Q, Arafa el-S, Barakat B, Mir SN, Wani AA. Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. *Photochem Photobiol.* 2008; 84:307-16.
- 10) Babu V, Joshi PC. Tryptophan as an endogenous photosensitizer to elicit harmful effects of ultraviolet B. *Indian J Biochem Biophys.* 1992; 29:296-8.
- 11) Yamaguchi Y, Coelho SG, Zmudzka BZ, Takahashi K, Beer JZ, Hearing VJ, Miller SA. Cyclobutane pyrimidine dimer formation and p53 production in human skin after repeated UV irradiation. *Exp Dermatol.* 2008; 17:916-24.
- 12) Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994; 372:773-6.
- 13) Joshi PC. Comparison of the DNA-damaging property of photosensitised riboflavin via singlet oxygen (1O_2) and superoxide radical O_2^- . mechanisms. *Toxicol Lett.* 1985; 26:211-7.
- 14) Park SL, Justiniano R, Williams JD, Cabello CM, Qiao S, Wondrak GT. The tryptophan-derived endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is a nanomolar UVA photosensitizer in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2015; 135:1649-58.

- 15) Premi S, Wallisch S, Mano CM, Weiner AB, Bacchiocchi A, Wakamatsu K, Bechara EJ, Halaban R, Douki T, Brash DE. Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science*. 2015; 347: 842-7.
- 16) Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res*. 2001; 488:65-76.
- 17) Gilchrest, B. A., H. Y. Park, M. S. Eller, and M. Yaar. 1996. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem. Photobiol*. 1996; 63:1-10.
- 18) Chen, V. L., R. Fleischmajer, E. Schwartz, M. Palia, and R. Timpl. Immunohistochemistry of elastotic material in sun-damaged skin. *J. Invest. Dermatol*. 1986; 87:334-7.
- 19) Scwartz, E., F. A. Cruickshank, C. C. Christensen, J. S. Perlish, and M. Lebwohl. Collagen alterations in chronically sun-damaged human skin. *Photochem. Photobiol*. 1993; 58:841-4.
- 20) Oikarinen, A. Aging of the skin connective tissue: how to measure the biochemical and mechanical properties of aging dermis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 1994; 10:47-52
- 21) Furth, J. J. The steady-state levels of type I collagen mRNA are reduced in senescent fibroblasts. *J. Gerontol*. 1991; 46:122-4.
- 22) Martin, M., R. el Nabout, C. Lafuma, F. Crechet, and J. Remy. Fibronectin and collagen gene expression during in vitro ageing of pig skin fibroblasts. *Exp. Cell Res*. 1990; 191:8-13.

- 23) West, M. D., O. M. Pereira-Smith, and J. R. Smith. Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. *Exp. Cell Res.* 1989; 84:138-47.
- 24) Burke, E. M., W. E. Horton, J. D. Pearson, M. T. Crow, and G. R. Martin. Altered transcriptional regulation of human interstitial collagenase in cultured skin fibroblasts from older donors. *Exp. Gerontol.* 1994; 29:37-53
- 25) Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, Yasumoto K, Abdel-Malek ZA, Kubo T, Rouzaud F, Tanemura A, Yoshikawa K, Hearing VJ. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J Cell Biol.* 2004; 165:275-85
- 26) Choi J, Young JA, Callaway EM. Selective viral vector transduction of ErbB4 expressing cortical interneurons in vivo with a viral receptor-ligand bridge protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:16703-8.
- 27) Duval C, Cohen C, Chagnoleau C, Flouret V, Bourreau E, Bernerd F. Key regulatory role of dermal fibroblasts in pigmentation as demonstrated using a reconstructed skin model: impact of photo-aging. *PLoS One.* 2014; 9:e114182.
- 28) Dan LEI, Yingxue HUANG, Hongfu XIE, Yuxin YI, Juan LONG, Shangqing LIN, Chuchu HUANG, Dan JIAN, Ji LI. Fluorofenidone inhibits UV-A induced senescence in human dermal fibroblasts via the mammalian target of rapamycin-dependent SIRT1 pathway. *J Dermatol.* 2018; 45:791-8.
- 29) Dany Graindorge, Sylvain Martineau, Christelle Machon, Philippe Arnoux, Jérôme Guitton, Stefania Francesconi, Céline Frochot, Evelyne Sage, Pierre Marie Girard.

Singlet Oxygen-Mediated Oxidation during UVA Radiation Alters the Dynamic of Genomic DNA Replication. *PLoS One*. 2015; 10:e0140645.

30) Massimiliano Gasparrini, Tamara Y. Forbes-Hernandez, Sadia Afrin, Patricia Reboredo-Rodriguez, Danila Cianciosi, Bruno Mezzetti, José L. Quiles, Stefano Bompadre, Maurizio Battino, Francesca Giampieri. Strawberry-Based Cosmetic Formulations Protect Human Dermal Fibroblasts against UVA-Induced Damage. *Nutrients*. 2017; 9:E605.

31) Cheng-HuaHuang, Hsin-JuLi, Nan-LinWu, Chien-YuHsiao, Chun-NanLin, Hsun-Hsien Chang, Chi-FengHung. Photoprotective Effects of Cycloheterophyllin against UVA-Induced Damage and Oxidative Stress in Human Dermal Fibroblasts. *PLoS One*. 2016; 11:e0161767.

32) Xiaoming Liu, Ruizhi Zhang, Haixia Shi, Xiaobo Li, Yanhong Li, Ahmad Taha, Chunxing Xu. Protective effect of curcumin against ultraviolet A irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts. *Mol Med Rep*. 2018; 17:7227-37.

33) Lei D, Huang Y, Xie H, Yi Y, Long J, Lin S, Huang C, Jian D, Li J. Fluorofenidone inhibits UV-A induced senescence in human dermal fibroblasts via the mammalian target of rapamycin-dependent SIRT1 pathway. *J Dermatol*. 2018; 45:791-8.

34) Abidullah khan, Hongliang Bai, Maoguo Shu, Mingxia Chen, Amin Khan, Zhuanli Bai. Antioxidative and antiphotaging activities of neferine upon UV-A irradiation in human dermal fibroblasts. *Biosci Rep*. 2018; 6:BSR20181414.

35) Agnieszka Gęgotek, Sinemyiz Atalay, Pedro Domingues, Elżbieta Skrzydlewska. The Differences in the Proteome Profile of Cannabidiol-Treated Skin Fibroblasts following UVA or UVB Irradiation in 2D and 3D Cell Cultures. *Cells*. 2019; 8:E995.

- 36) You-Cheng Hseu, Chih-Ting Chang, Yugandhar Vudhya Gowrisankar, Xuan-Zao Chen, Hui-Chang Lin, Hung-Rong Yen, Hsin-Ling Yang. Zerumbone Exhibits Antiphotodamage and Dermatoprotective Properties in Ultraviolet A-Irradiated Human Skin Fibroblast Cells via the Activation of Nrf2/ARE Defensive Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 4098674.
- 37) Graindorge D, Martineau S, Machon C, Arnoux P, Guitton J, Francesconi S, Frochet C, Sage E, Girard PM. Singlet Oxygen-Mediated Oxidation during UVA Radiation Alters the Dynamic of Genomic DNA Replication. *PLoS One*. 2015; 10:e0140645.
- 38) Karran P, Brem R. Protein Oxidation and DNA Repair Inhibition by 6-Thioguanine and UVA Radiation. *DNA Repair (Amst)*. 2016; 44:178-85. #38
- 39) Hirota A, Kawachi Y, Itoh K, Nakamura Y, Xu X, Banno T, Takahashi T, Yamamoto M, Otsuka F. Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis. *J Invest Dermatol*. 2005; 124:825-32.
- 40) Yi Y, Xie H, Xiao X, Wang B, Du R, Liu Y, Li Z, Wang J, Sun L, Deng Z, Li J. Ultraviolet A irradiation induces senescence in human dermal fibroblasts by down-regulating DNMT1 via ZEB1. *Aging (Albany NY)*. 2018; 10:212-28.
- 41) Misaka T, Suzuki S, Miyata M, Kobayashi A, Shishido T, Ishigami A, Saitoh S, Hirose M, Kubota I, Takeishi Y. Deficiency of senescence marker protein 30 exacerbates angiotensin II-induced cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res*. 2013; 99: 461-70.
- 42) Ichihashi M, Ando H. The maximal cumulative solar UVB dose allowed to maintain healthy and young skin and prevent premature photoaging. *Exp Dermatol*. 2014; 23:43-6.

- 43) Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005; 120:483-95.
- 44) Ohshima, H., M. Oyobikawa, A. Tada, T. Maeda, H. Takiwaki, M. Itoh and H. Kanto. Melanin and facial skin fluorescence as markers of yellowish discoloration with aging. *Skin Res. Technol.* 2009; 15:496-502.
- 45) Ogura, Y., T. Kuwahara, M. Akiyama, S. Tajima, K. Hattori, K. Okamoto, S. Okawa, Y. Yamada, H. Tagami, M. Takahashi and T. Hirao. Dermal carbonyl modification is related to the yellowish color change of photo-aged Japanese facial skin. *J. Dermatol. Sci.* 2011; 64:45-52.
- 46) Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153:1194-1217.
- 47) Sahin, E., S. Colla, M. Liesa, J. Moslehi, F. L. Muller, M. Guo, M. Cooper, D. Kotton, A. J. Fabian, C. Walkey and R. S. Maser. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*. 2011; 470:359-65.
- 48) Rani S, Bhardwaj S, Srivastava N, Sharma VL, Parsad D, Kumar R. Senescence in the lesional fibroblasts of non-segmental vitiligo patients. *Arch Dermatol Res.* 2017; 309:123-32.
- 49) Sato K, Taguchi H, Maeda T, Minami H, Asada Y, Watanabe Y, Yoshikawa K. The primary cytotoxicity in ultraviolet-a-irradiated riboflavin solution is derived from hydrogen peroxide. *J Invest Dermatol.* 1995; 105: 608-12.

- 50) Dántola ML, Denofrio MP, Zurbano B, Gimenez CS, Ogilby PR, Lorente C, Thomas AH. Mechanism of photooxidation of folic acid sensitized by unconjugated pterins. *Photochem Photobiol Sci.* 2010; 9:1604-12.
- 51) Justiniano R, Williams JD, Perer J, Hua A, Lesson J, Park SL, Wondrak GT. The B6-vitamer Pyridoxal is a Sensitizer of UVA-induced Genotoxic Stress in Human Primary Keratinocytes and Reconstructed Epidermis. *Photochem Photobiol.* 2017; 93:990-8.
- 52) Juzeniene A, Thu Tam TT, Iani V, Moan J. The action spectrum for folic acid photodegradation in aqueous solutions. *J Photochem Photobiol B.* 2013; 126:11-6.
- 53) Brem R, Macpherson P, Guven M, Karran P. Oxidative stress induced by UVA photoactivation of the tryptophan UVB photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) inhibits nucleotide excision repair in human cells. *Sci Rep.* 2017; 7:4310.
- 54) Walrant P, Santus R. N-formyl-kynurenine, a tryptophan photooxidation product, as a photodynamic sensitizer. *Photochem Photobiol.* 1974; 19:411-7.
- 55) Rokos H, Beazley WD, Schallreuter KU. Oxidative stress in vitiligo: photo-oxidation of pterins produces H₂O₂ and pterin-6-carboxylic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 292:805-11.
- 56) Aili A, Hasim A, Kelimu A, Guo X, Mamtimin B, Abudula A, Upur H. Association of the plasma and tissue riboflavin levels with C20orf54 expression in cervical lesions and its relationship to HPV16 infection. *PLoS One.* 2014; 7:e103377.
- 57) EDWARD R. EICINER and ROBERT S. HALIMAN, Effect of Alcohol on Serum Folate Level, *J Clin Invest.* 1973; 3:584-91.

58) Ma Y, Peng D, Liu C, Huang C, Luo J. Serum high concentrations of homocysteine and low levels of folic acid and vitamin B12 are significantly correlated with the categories of coronary artery diseases. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017; 17:37.

59) 柴田 克己, 福渡 努. 成人男性における水溶性ビタミン摂取量と尿中および血中ビタミンレベルとの関係. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業) 日本人の食事摂取基準 (栄養所要量) の策定に関する基礎的研究.

60) Wu X, Hammer JA. Organelle interactions: melanosomes and mitochondria get cozy. *Curr Biol.* 2014; 24:R240-2.

61) Yoshimoto S, Ohagi Y, Yoshida M, Yanagi H, Hibino S, Ichihashi M, Ando H. Placental extracts regulate melanin synthesis in normal human melanocytes with alterations of mitochondrial respiration. *Exp Dermatol.* 2019; Suppl 1:50-4.

62) Mal'tsev VI, Kaliuzhnaia LD, Gubko LM. Experience in introducing the method of placental therapy in vitiligo in Ukraine. *Lik Sprava.* 1995; 123-5.

63) Pal P, Mallick S, Mandal SK, Das M, Dutta AK, Datta PK, Bera R, Bhadra R. A human placental extract: in vivo and in vitro assessments of its melanocyte growth and pigment-inducing activities. *Int J Dermatol.* 2002; 41:760-7.

64) Wang Y, Viennet C, Robin S, Berthon JY, He L, Humbert P. Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation. *J Dermatol Sci.* 2017; 88:159-66.

65) Durai PC, Thappa DM, Kumari R, Malathi M. Aging in elderly: chronological versus photoaging. *Indian J Dermatol.* 2012; 57:343-52.

66) Kawabata K, Kobayashi M, Kusaka-Kikushima A, Akasaka E, Mabuchi T, et al. A new objective histological scale for studying human photoaged skin. *Skin Res Technol.* 2014; 20:155-63.

67) Salducci M, André N, Guéré C, Martin M, Fitoussi R, Vié K, Cario-André M. Factors secreted by irradiated aged fibroblasts induce solar lentigo in pigmented reconstructed epidermis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:502-4.

68) Shimizu R, Yagi M, Kikuchi A. Suppression of riboflavin-sensitized singlet oxygen generation by l-ascorbic acid, 3-O-ethyl-l-ascorbic acid and Trolox. *J Photochem Photobiol B.* 2019; 191:116-22.

69) Ohtsu I, Wiriyanawudhiwong N, Morigasaki S, Nakatani T, Kadokura H, Takagi H. The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2010; 23:17479-87.

70) Hearse DJ, Kusama Y, Bernier M. Rapid electrophysiological changes leading to arrhythmias in the aerobic rat heart. Photosensitization studies with rose bengal-derived reactive oxygen intermediates. *Circ Res.* 1989; 65:146-53.

謝辞

本研究は、岡山理科大学大学院の在籍中に触れた皮膚研究中でも、特に興味を抱いていた長波長紫外線 A と真皮線維芽細胞の老化に関する研究成果をまとめたものです。本論文を執筆している中で、実に多くの方々に支えられていたことを改めて実感いたしました。この場を借りて、謝辞を述べさせていただきます。

初めに、主査を務めていただいた本学バイオ・応用化学科教授 安藤 秀哉 先生には、ゼミへの在籍から6年間もの間、実験指導に始まり、学会発表や論文作成など、研究者としての全てをご指導賜りました。また、様々なことへ挑戦するチャンスを与えていただき、研究だけでなく人生の師とも言えるほどお世話になりました。心より感謝を申し上げます。

副査を引き受けて頂きました、同科教授 滝澤 昇 先生、竹崎 誠 先生には学部時代より生化学やコロイド化学に関してご教授頂きました。深くお礼申し上げます。

同じく副査を引き受けて頂きました、本学臨床生命科学科 教授 片岡 健 先生、中村 元直 先生、甲南大学フロンティアサイエンス学部 西方 敬人 先生とは、大学院での出会いをきっかけに、学会や研究報告会、論文抄読会など様々な分野の研究へ触れる機会を設けて頂きました。深く感謝の意を表します。

神戸大学名誉教授 市橋 正光 先生には研究の楽しさを教えて頂きました。日々のディスカッションや斬新な研究テーマの提案など、研究へのモチベーションをどんどんと高めて頂きました。先生のお力添えが本研究を推し進める原動力となりました。心から感謝を申し上げます。

この場で具体的なお名前を挙げることができませんでしたが、本学を初め、多くの大学や企業の諸先生方、研究仲間にご支援を賜りました。また、ゼミの先輩、同輩、歴々の後輩、加えて多くの友人に研究生活を支えて頂きました。厚く御礼申し上げます。

最後に、研究者への道を経済的に、また精神的にも多大なる支援をしてくださった家族に、心よりの感謝を申し上げます。誠にありがとうございました。