

学位論文概要

令和3年3月19日

学位申請者
吉川 まどか 印

学位論文題目

内的因子と外環境因子により生成される細胞内活性酸素種 (ROS) の
消去に基づく植物エキスに関する研究
-オリーブ果実圧搾残渣より抽出したエキスと、
Ocimum basilicum エキスによる細胞内 ROS 消去作用-

学位論文の概要

皮膚において生じる皮膚トラブルの原因因子として、皮膚組織内に過剰に生成される活性酸素種 (ROS; Reactive oxidative species) により生じる酸化ストレスが報告されている。また、皮膚は最外層に位置することから内的因子以外に外環境因子の影響を受ける臓器であることから、酸化ストレスは内的因子と外環境因子によって過剰に生成される ROS によって引き起こされる。このような酸化ストレスの原因となる過剰に生成された ROS を取り除くことは皮膚の健康維持および QOL の向上に貢献する手段となる。

本研究では、産業廃棄物であるオリーブ果実圧搾残渣に着目し、未成熟果実圧搾残渣エキスと成熟果実圧搾残渣エキスの2種類の抗酸化作用をヒト皮膚不死化細胞株 (HaCaT 細胞) において評価した。その結果、未成熟果実圧搾残渣エキス (YE) は細胞内の ROS 消去能を示したが、化学的な ROS 消去能は陽性試料と比較し同等あるいは低いことが確認された。そこで、YE において細胞内抗酸化防御システムである Nrf2 シグナルに着目し検討した結果、YE は Nrf2 の核内移行を促進し、 γ -GCS mRNA 発現、細胞内グルタチオン量を増加させた。以上のことから、YE は細胞内で抗酸化物質として作用したことに加え細胞内の抗酸化防御システムである Nrf2 シグナルを介し、細胞内の ROS を消去した可能性が示唆された。また、YE は精神的なストレスにより増加するコルチゾールによる HaCaT 細胞内の ROS とカルボニル化タンパク質 (CP) の増加を抑制したことから、精神的ストレスによる ROS に対する効果が期待できる。

さらに細胞内の ROS を増加させる刺激として、慢性的な太陽光線の曝露があり、その太陽光線曝露により進行する皮膚老化は生理的老化と区別して光老化と呼ばれている。光老化皮膚は真皮乳頭層のコラーゲン線維の低下を特徴としている。そこで、コラーゲン線維量の減少に対する素材の効果を確認するために、光老化進行状況を再現した UVA 複数回照射真皮線維芽細胞のコラーゲン関連タンパク質の発現とコラーゲン線維量を確認した。その結果、UVA 複数回照射は、線維芽細胞のコラーゲン分解酵素 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) の mRNA 発現増加と、type I collagen の mRNA 発現低下、さらに、コラーゲン線維形成量の減少を誘導することが確認された。また、UVA の単回照射が細胞内 ROS の増加を引き起こし、ROS の最終生成物である CP の細胞内蓄積を示したことから、UVA 照射による細胞内の ROS の増加がコラーゲン線維量の減少を引き起こしたことが考えられた。以上のことから、真皮線維芽細胞において、抗酸化物質が複数回の UVA 照射によるコラーゲン線維量の減少を緩和する可能性が考えられる。そこで、抗酸化物質であるローズマリン酸を含有する *Ocimum basilicum* エキス (OC) が真皮線維芽細胞においてコラーゲン線維量の減少に与える影響を検証した。その結果、OC とローズマリン酸はコラーゲン線維量の減少を抑制することが明らかとなった。OCとローズマリン酸は

単回 UVA 照射による ROS、CP、複数回の UVA 照射による CP の生成の増加を抑制したことから細胞内において ROS 除去を行っていることが確認された。さらに、OC、ロズマリン酸は複数回 UVA 照射により生じる type I collagen タンパク質の低下、MMP-1 タンパク質発現の増加を抑制した。以上のことから、OC およびロズマリン酸は複数回の UVA 照射を実施した線維芽細胞のコラーゲン代謝バランスの崩れの回復に寄与しコラーゲン線維形成量の減少を改善したことが考えられる。その作用は OC およびロズマリン酸の ROS 除去に基づいている可能性が示唆された。OC は、皮膚の光老化の進行の予防・改善効果を有する可能性が明らかとなった。

以上のことから、本研究で着目した素材を用いたスキンケアは皮膚トラブルを予防・改善する可能性があると考えられる。

学位論文要旨

令和 3 年 3 月 19 日

学位申請者
吉川 まどか 印

学位論文題目

内的因子と外環境因子により生成される細胞内活性酸素種 (ROS) の
消去に基づく植物エキスに関する研究
-オリーブ果実圧搾残渣より抽出したエキスと、
Ocimum basilicum エキスによる細胞内 ROS 消去作用-

学位論文の要旨

皮膚は、生体内内部を外的刺激や異物侵入から保護するバリア機能を有し、生体内の機能の恒常性を維持する重要な臓器である。また、皮膚は身体の最外層に位置することから外環境による影響を強く受けるため、皮膚障害を引き起こしやすく、また認知年齢に影響を与える臓器である。皮膚障害を誘導する原因因子として、皮膚組織内において過剰に生成される活性酸素種 (ROS; Reactive oxidative species) による酸化ストレスが挙げられる。そのため、皮膚障害の誘導、進行を促進する要因である ROS を取り除くことが皮膚の健康維持に貢献する手段となることが考えられる。皮膚組織内における過剰な ROS 生成には内的因子による刺激と外環境因子による刺激が関与している。

そこで、本研究は人々の皮膚トラブルを解決する手段として ROS を消去する素材を探索することを目的とし、オリーブ果実圧搾残渣エキスと *Ocimum basilicum* エキス (OC) に着目して研究を行い、これらのエキスによる ROS 消去素材としての有用性について評価し、人々の皮膚の健康維持に貢献することを目的とした。

外環境因子である UV 照射は、細胞内の Ca^{2+} 濃度の増加に伴う NADPH オキシダーゼの活性化により ROS である $\cdot\text{O}_2^-$ を生成するが、その寿命は短く比較的安定な H_2O_2 に変換されて細胞内に存在する。 H_2O_2 は Fe^{2+} あるいは Cu^+ の存在下、フェントン反応により反応性の最も高い $\cdot\text{OH}$ に変換される。 $\cdot\text{OH}$ は、脂質酸化反応を介して細胞内タンパク質を酸化しカルボニル化タンパク質 (CP) を生成することにより細胞機能を低下させる。よって、細胞機能の維持のためには細胞内の $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 といった ROS を消去すること、さらに ROS の最終生成物である CP の細胞内蓄積を抑制することが皮膚トラブルの解決手段として重要である。

第 1 章では、廃棄量が増加しているオリーブ果実の圧搾残渣に着目し、環境に配慮した素材としてオリーブ果実の圧搾残渣抽出エキスの ROS 消去材としての可能性を検証した。現在、オリーブ果実には成熟度の低い果実と成熟度の高い果実から圧搾されたオリーブ油が上市されており、その 2 種類の残渣が産業廃棄物として廃棄されている。

そこで、本研究では未成熟果実と成熟果実それぞれの圧搾残渣エキス (未成熟果実圧搾残渣エキス; YE、成熟果実圧搾残渣エキス; ME) を調製し、生物学的および化学的 ROS 消去作用を評価した。

その結果、YE、ME ともに細胞内の ROS 消去能を有し、その作用は YE の方が強いことが明らかとなった。YE、ME の化学的な ROS 消去能を評価したところ、ROS 消去能は一般的な抗酸化物質と比較し同等あるいは低く、細胞内の ROS 消去作用は化学的な ROS 消去能に加え、細胞内抗酸化機構の亢進に由来している可能性が考えられた。そこで、高い細胞内 ROS の減少を示した YE に着目し、YE の抗酸化防御システムへの影響を検討した。その結果、YE の添加により Nrf2 の核内移行の促進、 γ -GCS の転写の促進、細胞内のグルタチオン量が増加することが明らかとなった。

これらのことから、本研究において YE は細胞内抗酸化防御システムである Nrf2/Keap-1 シグナルの亢進を介し、細胞内の ROS を消去した可能性が考えられる。

また、生体内において、コルチゾールにより ROS が生成されることが報告されている。そこで、HaCaT 細胞においてもコルチゾールが ROS の生成、ROS の最終生成物 CP の細胞内蓄積を誘導するかを検討した。その結果、コルチゾールの添加による HaCaT 細胞内 ROS の生成、CP の細胞内蓄積が確認された。YE はこれらの ROS 生成の増加、CP の細胞内蓄積を抑制した。コルチゾールは Nrf2/Keap-1 シグナルを低下させること、さらに細胞内の H₂O₂ を増加させることが報告されている。以上のことから、本研究においても同様のメカニズムでコルチゾールの曝露により HaCaT 細胞内で ROS の生成が亢進したことが考えられる。コルチゾールは精神的なストレスにより分泌が亢進することから、YE は精神的なストレスによる皮膚トラブルの原因となりうる ROS の生成に対する消去効果を有することが明らかとなった。

第 1 章の結果から、ROS、CP が誘発する表皮の皮膚トラブルである紫外線紅斑、乾燥、痒みに対して、YE は緩和する効果を有することが期待でき、さらに廃棄物を減らすことで環境に配慮した素材となると考えられる。

慢性的な太陽光線の曝露は皮膚老化を加速し、その老化は生理的老化と区別して光老化と呼ばれている。光老化皮膚の特徴として真皮乳頭層のコラーゲン線維の低下が挙げられる。この光老化皮膚におけるコラーゲン線維量の減少メカニズムは、UV 曝露により過剰生成される ROS により開始されることが報告されている。第 2 章では、UV 曝露によるコラーゲン線維量の減少を抑制する素材の提案を目的として研究を行った。

まず、*in vitro* において慢性的な太陽光線の環境を再現し、その環境下でのコラーゲン線維形成の低下の再現について検討した。UV の中で UVA は、真皮層まで到達し線維芽細胞に直接影響を及ぼす。そこで、慢性的な太陽光線の環境を線維芽細胞への UVA 複数回照射とし、細胞内酸化状態、コラーゲン関連タンパク質の mRNA 発現、コラーゲン線維形成を確認した。

その結果、線維芽細胞への UVA 複数回照射により、コラーゲン分解酵素 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) の mRNA 発現の増加と、type I collagen の mRNA 発現の低下、type I collagen 線維形成量の減少が認められた。また、UVA の単回照射により線維芽細胞の細胞内 ROS の増加、CP の蓄積が確認された。以上のことから、UVA 照射による ROS の増加が線維芽細胞のコラーゲン関連タンパク質の mRNA 発現を変化させ、最終的にコラーゲン線維量の低下を引き起こしたことが考えられた。

そこで、細胞内酸化状態の低減作用が報告されているロズマリン酸を含有する *Ocimum basilicum* エキス (OC) の UVA 複数回照射による線維芽細胞内のコラーゲン線維形成能の低下改善作用について検証を行った。

OC とロズマリン酸に単回 UVA 照射による細胞内 ROS、単回と複数回 UVA 照射による CP の生成の増加を抑制することが明らかとなった。その一方で、 $\cdot\text{O}_2$ 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ に対する化学的消去能は低く、 $\text{LOO}\cdot$ の消去能のみ脂溶性抗酸化剤である DL- α -トコフェロールよりも高い消去能を有することが確認された。CP は脂質酸化反応において生成されるアルデヒド化合物によるタンパク質のアミノ基修飾によって合成されることから、OC およびロズマリン酸の UVA 照射による増加した細胞内 ROS の低減は、OC およびロズマリン酸の化学的な抗酸化作用に加え細胞内抗酸化防御システムの増強、CP の増加抑制は細胞内抗酸化防御システムの増強と、化学的な $\text{LOO}\cdot$ の消去能に由来している可能性が示唆された。

OC とロズマリン酸に細胞内 ROS 消去作用が認められたことから、ROS によるコラーゲン代謝のバランスの崩壊とコラーゲン線維形成量の減少を予防・改善する効果が期待された。そこで、コラーゲン線維量の減少が確立された複数回 UVA 照射におけるコラーゲンの代謝のバランスとコラーゲン線維形成量に対する OC、ロズマリン酸の作用を評価した。

その結果、複数回 UVA 照射による type I collagen タンパク質発現の低下と MMP-1 mRNA および MMP-1 タンパク質の分泌の増加に対して、OC およびロズマリン酸ともに有意な改善効果を示した。さらに、複数回 UVA 照射により生じた線維芽細胞の type I collagen の線維形成量の減少を OC およびロズマリン酸は改善する作用を示した。以上のことから、OC およびロズマリン酸は複数回の UVA 照射を実施した線維芽細胞のコラーゲン代謝バランスの崩れの回復と、コラーゲン線維形成量の減少の予防・改善を行い、皮膚の光老化の進行の予防・改善効果を有する可能性が示唆された。

本研究の結果は、未成熟オリーブ果実圧搾残渣抽出物が Nrf2 シグナルを介して細胞内 ROS 除去能を発揮し、内的刺激因子であり精神的ストレスにより増加するコルチゾールによる ROS 生成を抑制すること、ローズマリン酸を含む *Ocimum basilicum* エキスが UVA 照射により増加する細胞内 ROS および CP の増加と複数回の UVA 照射による線維芽細胞のコラーゲン線維形成能の低下を改善することを見出した。

本研究より見出された素材は、内的因子および外環境因子により過剰生成される ROS により惹起、増強される皮膚トラブルである紫外線による紅斑反応、表皮バリア機能の低下、乾燥、痒み、皮膚の光老化に対して有用な効果を発揮する可能性が示唆された。

本研究の成果は、これらの素材を用いたスキンケアが皮膚トラブルを予防・改善し、健やかな皮膚の維持につながり、人々の QOL を高めることに貢献するものとする。

S u m m a r y

Applicant for degree :

Madoka Yoshikawa

Title of thesis :

The study of plant extracts, which are based on reducing excessive reactive oxygen species generated by internal factor and environmental factor
-the effect of an extract of olive fruit residues after extracting olive oil and *Ocimum basilicum* extract on anti-oxidative stress-

It has been authorized that oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) which are generated excessively in the skin is one of causable factors on skin trouble. Internal and environmental stimuli exert as inducers of excessive ROS generation. Thus, to eliminate excessive ROS is an effective way to maintain the health in the skin.

In this study, we firstly examined the effects of the extracts of residues of olive fruits which are in the different mature stages after extracting oil on reducing intracellular ROS to maintain the skin health. The extract of young fruit residue (YE) showed the superior reducing of intracellular ROS than that of the extract of mature fruit residue. Despite of lower chemical scavenging against ROS, YE gave superior reduction of intracellular ROS through increasing intracellular glutathione by upregulation of γ -glutamyl cysteine synthase according to translocation of Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in nuclear. In addition, YE was reduced ROS in HaCaT keratinocytes elevated by cortisol which is a psychological stress hormone. Gathering the results, it was expected that YE prevent or improve the skin trouble initiated by psychological stress due to eliminating ROS.

On the other hand, it has been well known that ROS generated by UVA is responsible for collagen depletion at papillary dermis. Repetitive UVA irradiation to fibroblasts was reproduced the symptom of photoaged dermis such as reducing capability of collagen fiber formation. Then, the actions of *Ocimum basilicum* extract (OC) and rosmarinic acid which is a major component of OC on collagen metabolism related proteins, collagen and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), and collagen fiber formation altered by repetitive UVA irradiation were examined. Both of OC and Rosmarinic acid improved the unbalance of collagen synthesis and MMP-1 expression, and fiber formation of collagen. The results indicated the possibility that OC which contains Rosmarinic acid would prevent or improve collagen depletion at papillary dermis through elimination ROS generated by UVA.

Gathering the results, the study was successful to propose the plant extracts which have potential of maintaining the skin in healthy conditions. The skin care formulated these plant extracts will contribute human being to spend in higher quality of life.