

# 学位論文概要

西暦 2021年 3月 19日

学位申請者

( 遠藤 香凜 ) 印

## 学位論文題目

皮膚の光老化進行における皮膚構成細胞の相互作用の機構解明とその解決策の提案

## 学位論文の要旨

本研究は、UVA を複数回照射することで光老化の表現型を発現した光老化モデル線維芽細胞を作成し、光老化皮膚の特徴であるシワ、シミの形成を中心に、皮膚に常在する細胞との相互作用を明らかにし、それに対する改善策を提案することを目的として行った。

真皮線維芽細胞は、複数回UVAを照射することにより老化細胞の形質発現が確認されたことから光老化線維芽細胞モデルとなりうる事が確認された。また、光老化線維芽細胞ではリソソームの機能低下によるオートファジー機能の低下が確認され、オートファジー機能の観点からも複数回UVA照射線維芽細胞が光老化線維芽細胞モデルとして適切であることが確認された。さらに、光老化線維芽細胞は、真皮コラーゲン線維および弾性線維形成不全を示した。これまで、色素斑は表皮細胞と色素細胞間の相互作用が中心となり形成されると考えられてきた。本研究において、光老化線維芽細胞も色素細胞を活性化することが確認された。表皮細胞は分化により、ターンオーバーされることからその作用は一過性であるが、線維芽細胞は真皮に存在し続けることからその影響は長期にわたることが考えられる。よって、光老化線維芽細胞との表皮細胞、色素細胞の相互作用が色素斑の滞留する一つの原因となっている可能性が示唆される。

既に肌荒れ防止主剤、美白主剤として良く知られ、汎用されてきたトラネキサム酸 (TA) には、光老化線維芽細胞の過剰なPGE<sub>2</sub>合成を抑制することにより真皮マトリックスの線維形成低下を改善し、光老化皮膚の進行を抑制するアンチエイジング剤としての可能性が見いだされた。さらに、TAは、慢性的なUVA照射による線維芽細胞の老化形質の発現抑制し、光老化線維芽細胞からPGE<sub>2</sub>の過剰合成を抑制することによる色素斑の顕在化、維持を改善する新しい作用を有している可能性が見いだされた。

UVB照射によるメラノソーム (MS) の表皮細胞への移送促進はROSにより合成が亢進される $\alpha$ -MSHが関与していることが確認された。西洋カボチャ種子エキス (RPS) は、Nrf2を介して細胞内の抗酸化システムを増強することにより、UVB及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるPOMCの遺伝子発現亢進を抑制し、表皮細胞の蛍光ビーズ (疑似MS) の貪食を抑制した。 $\alpha$ -トコフェロール脂肪酸エステル (VE-FA) は、UVB曝露後の表皮細胞の細胞内ROSの亢進を抑制し、PGE<sub>2</sub>分泌を抑制することにより色素細胞の活性化および表皮細胞のメラノソーム貪食を抑制し抗色素沈着剤として有効な作用を示す可能性が示された。

本研究の成果は、高齢化社会に向かう我が国の高齢者に若々しく健やかな皮膚の維持を提供するものとする。その結果、高齢者のADL (日常生活動作) およびQOL (生活の質) の維持・向上が、我が国の活性化につながることを期待する。

# 学 位 論 文 要 旨

西暦 2021 年 3月 19日

学位申請者

( 遠藤 香凜 ) 印

## 学位論文題目

皮膚の光老化進行における皮膚構成細胞の相互作用の機構解明とその解決策の提案

## 学位論文の要旨

皮膚老化は加齢による生理的老化と慢性的な太陽光曝露により進行する光老化に大別され、皮膚は体の最外層に位置することから皮膚老化は環境要因の影響を強く受ける光老化であると考えられる。深いシワは、光老化皮膚の特徴的な外観変化の一つであり、真皮マトリックスの構造変化に起因すると考えられている。組織化学的に光老化皮膚では、真皮細胞外マトリックス構成線維であるコラーゲン線維や弾性線維の乳頭層での減少、および消失が観察されている。さらに、光老化皮膚のもう一つの特徴的变化として老人性色素斑に代表されるシミの顕在化がある。老人性色素斑はUVへの曝露履歴に依存して顕在化することが報告されている。色素沈着は、UVに曝露された皮膚の表皮細胞や色素細胞から様々な色素細胞刺激因子が放出され、それら因子がパラクライン的及びオートクライン的に作用することによりメラニン合成の活発化とメラニンの表皮内での拡散により生じる。このように、UVによる一過性の色素沈着メカニズムについてはこれまで多くの研究により明らかにされてきた。しかしながら、限局性に出現する色素斑形成のメカニズムやその長期顕在化については未だ不明な点が多くある。近年、老人性色素斑の色素斑部位では基底膜の損傷や老化の形質を発現する線維芽細胞の存在が報告されている。この事実から、色素斑形成には、表皮細胞のみならず線維芽細胞も寄与することが強く示唆されている。一方、近年、加齢とオートファジー機能不全の関係が指摘されており、環境因子が皮膚におけるオートファジー機能に及ぼす影響を明らかにすることは皮膚老化のプロセスを理解するために重要である。

本研究では、光老化皮膚の特徴的な外観変化であるシワ、シミの形成に焦点を当て、光老化を促進する外的要因の一つである紫外線を曝露した培養細胞の表現型の変化、周辺細胞との相互作用を明らかにし、それらに対する予防、改善策を提案することを目的として実験を行った。

第1章ではUVAを連続曝露した真皮線維芽細胞の形質変化を明らかにすることを目的として実施した。UVA連続曝露した線維芽細胞では、細胞内ROSの上昇、抗酸化関連遺伝子の発現低下、コラーゲン、弾性線維形成関連遺伝子の変化が確認された。加えて、UVA連続照射が真皮線維芽細胞のオートファジー機能に及ぼす影響を確認したところ、UVA連続曝露した線維芽細胞ではオートファジー機能の低下が確認された。そしてこの機能低下は、分解酵素であるカテプシン活性の低下により引き起こされることを明らかにした。

第2章ではUVA連続照射による真皮マトリックス構造変化に対する改善策の提案としてトラネキサム酸のアンチエイジング作用の可能性を評価した。トラネキサム酸はプラスミン活性を阻害することでPGE<sub>2</sub>産生を抑制することが知られている美白主剤である。トラネキサム

酸はUVA連続曝露により減少するコラーゲン線維、弾性線維の形成を改善することが確認された。

第3章ではUVA連続曝露した線維芽細胞が色素斑形成に及ぼす作用を確認した。UVA連続曝露した線維芽細胞と共培養した色素細胞では、細胞増殖の亢進、樹状突起の伸長、チロシナーゼ遺伝子発現の亢進が確認された、そして三次元培養メラニンモデルとUVA連続曝露した線維芽細胞を共培養することでメラニン含有量の増加が認められた。

第4章では酸化ストレスが表皮細胞のメラノソーム貪食に及ぼす作用の確認を行った。UVBまたは過酸化水素曝露した表皮細胞の培養上清を用いて培養した表皮細胞ではメラノソーム貪食の亢進が認められた。また、UVB照射、過酸化水素曝露した表皮細胞ではPOMC遺伝子発現が上昇していることが確認された。西洋カボチャ種子エキスは、細胞内抗酸化システムであるNrf2の核内移行を促進することによる細胞内抗酸化系の活性化を誘導し、UVB、過酸化水素曝露した表皮細胞の細胞内ROSを低下させることで酸化ストレスにより亢進する表皮細胞のメラノソーム貪食を抑制することが明らかにされた。

第5章では表皮細胞を介した色素斑形成として、UVB照射を行った表皮細胞の培養上清を用いて色素細胞を培養し細胞増殖、樹状突起の伸長、さらに表皮細胞のメラノソーム貪食に対する $\alpha$ -トコフェロール脂肪酸エステルの効果を確認した。 $\alpha$ -トコフェロール脂肪酸エステルはUVB照射により亢進する表皮細胞の細胞内ROS、PGE<sub>2</sub>産生を抑制することで、色素細胞の活性化および表皮細胞のメラノソームの貪食を抑制する色素沈着抑制作用を有する可能性が確認された。

飛躍的な医療技術の発展に伴い平均寿命は今後も延長することが予想される社会において、年齢印象を直接反映する肌の健康的な維持は男女ともに若々しくいるための永遠のスキンケアテーマである。そのため、皮膚老化のメカニズムを解明し、そのメカニズムに沿ったスキンケアを実施することは、皮膚を健やかに若々しく保ち、高齢者の認知年齢を下げ、ADL（日常生活動作）やQOL（生活の質）の維持・向上に繋がると考えられる。

本研究は、慢性的な紫外線曝露により進行する光老化皮膚形成には皮膚に存在する表皮細胞、色素細胞、線維芽細胞間の相互作用が関与していること、既に多く使用されている化粧品原料がこれらの予防、改善に有効であることを見出した。真皮線維芽細胞では、複数回UVAを照射することにより老化細胞の形質発現が確認されたことから光老化線維芽細胞モデルとなりうることを確認された。また、光老化線維芽細胞ではリソソームの機能低下によるオートファジー機能の低下が確認され、オートファジー機能の観点からも複数回UVA照射線維芽細胞が光老化線維芽細胞モデルとして適切であることが確認された。

これまで、色素斑の形成は表皮細胞と色素細胞の関連がメインであると考えられてきた。本研究において、光老化線維芽細胞も色素細胞を活性化することが確認された。表皮細胞は分化により、ターンオーバーされることからその作用は一過性であるが、線維芽細胞は真皮に存在し続けることからその影響は長期にわたることが考えられる。よって、光老化線維芽細胞との表皮細胞、色素細胞の相互作用が色素斑の滞留する一つの原因となっている可能性が示唆される。

本学位論文研究では、光老化モデル線維芽細胞を作成することで、光により加速される皮膚老化の皮膚に存在する細胞間の相互作用の存在を明らかにし、さらに、その相互作用を妨げることで皮膚老化を予防、改善する素材の提案が行われた。

本学位論文研究の成果は、高齢化社会に向かう我が国の高齢者に若々しく健やかな皮膚の維持を提供するものとする。その結果、高齢者のADL（日常生活動作）およびQOL（生活の質）の維持・向上が、我が国の活性化につながることを期待する。

# S u m m a r y

Applicant for degree :2021/3/19

(ENDO KARIN)

Title of thesis :

Elucidation of the mechanism of skin constituent cell interaction in the progression of photoaging skin

The skin aging is strongly affected by environmental factors, and it is well recognized that ultraviolet (UV) radiation is an important environmental factor that promotes skin aging. In order to demonstrate the cell-phenotype and status of autophagy during environment-induced aging of the skin, we investigated the characterization of normal human dermal fibroblasts (NHDFs) treated with repetitive UVA irradiation as model fibroblasts in photoaged skin.

Firstly, senescence fibroblasts were established by successive UVA exposure. Fibroblasts exposed to UVA successively in four days showed expressions of senescence  $\beta$ -galactosidase, p16 and decrease of autophagic function.

In addition, senescence fibroblasts showed increased numbers of autophagosomes, which coincided with the accumulation of p62 and increased levels of LAMP-1 and lysosomes.

The dermis is mainly constructed by type I collagen fibers, which provide mechanical strength to the skin by building a frame-like structure, and by elastic fibers, which provide elasticity to respond to movements of the skin. The depletion of collagen fibers and the disappearance of oxytalan fibers, which are a type of elastic fiber, are characteristic changes in photoaged skin.

The senescence fibroblasts had higher secretion levels of Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>). In addition, fibroblasts repetitively irradiated with UVA or treated with PGE<sub>2</sub> produced disrupted collagen and fibrillin-1 fibers. Treatment with TA improved the formation of both types of fibers by repetitively UVA-irradiated fibroblasts by restoring the expression of fiber-related proteins at the mRNA and protein levels.

Thus, these results demonstrate that TA has potential as an anti-photoaging agent.

The conditioned media prepared by senescence fibroblasts were enhanced proliferation of keratinocytes and melanocytes. In addition, the conditioned media were developed dendrites of melanocytes and were increased tyrosinase protein. The experimental results showed well-consistency to the histological evidence. Gathering results, it was concluded the possibility that senescence fibroblasts play a crucial role as a occurring factor of solar lentigo.