

氏名	尾崎 理恵
学位の種類	修士 (生活科学)
学位記番号	生修第209号
学位授与年月日	平成27年 3月14日
学位授与の要件	学位規準第15条第1項
学位論文題目	論文題目 ヒト表皮細胞におけるウイスキーコンジェナーの heme oxygenase-1 発現誘導作用
審査委員	主査 間瀬 民生 教授 副査 江崎 秀男 教授 副査 大口 健司 准教授

【背景・目的】

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) は、大気中の酸素よりも活性化された酸素の総称である。通常、生体内において微量の ROS が産生されているが、処理しきれない過剰な ROS は、酸化ストレスとして生体構成成分を攻撃し、脂質や糖の酸化、タンパク質の変性、DNA の変異といった酸化ダメージを引き起こす。その結果、種々の疾病や老化を誘発すると考えられている。特に皮膚は、外界と接しているため、他の臓器に比べ ROS の影響を受けやすい。しわ、しみ、たるみといった皮膚特有の老化現象や、太陽光暴露時に起こる皮膚炎症(サンバーン) は、皮膚細胞内で発生した過剰な ROS がイニシエーターとなっている。そのため、美容上の観点からも、ROS への対応策が重要となる。これまで、ROS による酸化障害に対する防御方法として、抗酸化作用を有するビタミンやファイトケミカルの積極的な摂取が有効と考えられてきた。しかしながら、*in vitro* 系で抗酸化作用を示す物質が、必ずしも生体内で抗酸化作用を発揮するとは限らない。また、抗酸化効果を維持するため、これらの成分を大量に摂取し続けることは現実的に困難である。近年、新しいアンチエイジング法として、細胞が備え持つ適応機能に着目した手法が注目されている。すなわち、細胞防御遺伝子の発現を何らかの方法で誘導し、細胞の ROS 防御能を高め、酸化ストレスに対する抵抗性を強化する方法である。生体内には、様々な酸化ストレス防御因子が存在するが、その中で中心的な役割を担っているのがヘムオキシゲナーゼ 1 (heme oxygenase-1 ; HO-1) である。HO-1 はヘム分解の律速酵素で、反応産物のビリベルジン、ビリルビン、一酸化炭素には強い抗酸化力がある。細胞が ROS にさらされると、その防御機構として細胞内に HO-1 発現が誘導されるが、近年、ファイトケミカル等によっても HO-1 の発現が増強されることがわかってきた。そのため、HO-1 発現を増大さ

せる素材にはアンチエイジング効果が期待できる。そこで本研究では、新しい抗皮膚老化素材を見出すことを目的として、ウイスキーの凍結乾燥物であるウイスキーコンジェナー (WhC) の HO-1 発現誘導作用とその分子メカニズムについて、ヒト表皮角化細胞株を用いて解析した。

【方法】

1. 被験試料

市販のウイスキー (サントリー山崎 18 年) から、アルコールおよび水分を除去し、得られた残渣を凍結乾燥して WhC とした。WhC に含まれる既知化合物類は、化学合成品を用いた。なお、WhC および WhC 含有化合物は、サントリーホールディングス株式会社より供与された。

2. 細胞培養と被験試料の添加

本実験は、ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT 細胞) を用いた。細胞は 10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。被験試料の添加には、24 穴マルチウェルプレートに播種した細胞を用い、細胞密度がサブコンフルエントに達した後、所定濃度の被験試料を培養液中に添加した。

3. 細胞内タンパク質の発現量解析

細胞から調製した可溶化液中のタンパク質を、SDS-PAGE 法により分離した。次いで、ゲル上のタンパク質を、PVDF 膜に電気的に転写した後、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により、目的タンパク質を検出した。

4. 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定には、WST-1 アッセイ法を用いた。細胞培養液中に、Premix WST-1 試薬を添加し、30 分間培養後、マイクロプレートリーダーを用いて波長 450nm の吸光度を測定した。細胞生存率はコントロール群の吸光度を 100% として、コントロールに対する割合で算出した。

5. RNA 干渉法による標的遺伝子のノックダウン

標的遺伝子のノックダウンは、siRNA を用いた RNA 干渉法 (RNA interference : RNAi) により行った。24 穴マルチウェルプレートに細胞を播種し、細胞密度が約 60%に達した時点で、Nrf2 遺伝子に対する siRNA をリポフェクション法により細胞へ導入した。

【結果・考察】

まず始めに、HaCaT 細胞を用いて、WhC による HO-1 タンパク質の発現誘導作用を検討した。無刺激の細胞 (Cont) では細胞内に HO-1 が発現していないが、WhC を添加することによって HO-1 タンパク質発現が顕著に誘導された。一方、ニューポットと呼ばれているオーク樽貯蔵前のウイスキー原酒のコンジェナーを添加した場合には、HO-1 タンパク質の発現がみとめられなかった。すなわち、WhC による HO-1 タンパク質の発現誘導作用には、オーク樽中での熟成過程が深く関与していることが推測された。

次に、WhC に含まれる 12 種類の既知化合物について、HO-1 タンパク質の発現誘導作用を検証した。その結果、ウイスキー特有の熟成香形成に関与する sinapylaldehyde (SiA) と coniferylaldehyde (CoA) に HO-1 タンパク質に対する発現誘導作用がみとめられた。両成分の HO-1 タンパク質発現誘導作用は、混合物である WhC よりも強く、その作用は SiA の方がより強いことが示された。これらの結果から、以後は SiA を中心に実験を行った。

SiA は、HaCaT 細胞内の HO-1 タンパク質を増大させることから、SiA を処理した細胞は酸化ストレスに対して抵抗性を示すことが期待される。そこで、H₂O₂ を用いた酸化ストレス負荷に対する細胞生存率の評価を行った。その結果、SiA を予め前処理した細胞では、H₂O₂ 添加により惹起される細胞毒性が軽減された。すなわち、SiA によって発現が誘導された HO-1 タンパク質によって、酸化ストレスに対する適応性が充進することが示された。

次に、SiA による HO-1 タンパク質の発現誘導作用について分子メカニズム解析を行った。近年、NF-E2-related factor 2 (Nrf2) と呼ばれる転写因子が、ROS や親電子性物質などの反応性物質によって活性化され、第 2 相酵素 (抗酸化や異物代謝に関わる酵素) を中心とした生体防御因子の遺伝子発現を増大させることがわかってきた。そこで、SiA の作用における Nrf2 の関与を調べるために、siRNA を用いた RNA 干渉法によって細胞内の Nrf2 をノックダウンした。コントロール細胞では、SiA を添加

することによって、HO-1 タンパク質が強く誘導されることを確認した。一方、Nrf2 に対する siRNA をトランスフェクションし、細胞内の Nrf2 をノックダウンした細胞に SiA を添加した場合は、HO-1 タンパク質の発現誘導がほぼ完全に抑制された。すなわち、SiA による HO-1 タンパク質の発現誘導作用は、Nrf2 を介している可能性が強く示唆された。また、Nrf2 は活性化すると核内へ移行することが知られている。そこで、SiA を処理した細胞より、核タンパク質抽出液を抽出し、核移行した Nrf2 量を解析した。すると、SiA 未添加の細胞では、核分画に Nrf2 がみとめられないのに対し、SiA を添加した細胞では、Nrf2 の核移行がみとめられた。さらに、Nrf2 の総タンパク質発現量について、SiA 添加後の経時変化を調べたところ、HO-1 発現の増大に先行して、Nrf2 の発現量が増加していることがわかった。Nrf2 量の増大は、Nrf2 の核内移行を誘導することが知られていることから、SiA による Nrf2 の発現増加メカニズムが今後の検討課題である。

近年、ブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファンや、唐辛子に含まれるカプサイシンが、プロオキシダントとして細胞内で ROS を産生させることで、Nrf2 を活性化し、HO-1 タンパク質の発現を誘導することが報告されている。そこで、Nrf2 を介した SiA の HO-1 タンパク質発現誘導に ROS が関与しているか否かを、ROS 消去剤として知られる N-acetylcysteine (NAC) を用いて検証した。その結果、NAC 未処理の細胞と比較して、NAC を前処理した細胞では、SiA による HO-1 タンパク質の発現誘導作用が抑制された。すなわち、SiA は細胞内で ROS を産生するプロオキシダントとして作用している可能性が示唆された。

HO-1 に代表される ROS に対する抗酸化システムは、Nrf2 を介した生体防御機構の制御下にある。すなわち、Nrf2 を活性化させることは、酸化ストレスに対する抵抗性を高めると考えられる。少量のストレスが細胞の防御機構を誘導することによって、重篤なストレスに対し耐性となる現象をホルミシスと呼ぶが、SiA は細胞内で微量の ROS を産生することにより、酸化ストレス応答としてのホルミシス効果を誘導する可能性が示唆された。WhC 含有成分である SiA は、表皮細胞の抗酸化システムを高める新しい皮膚アンチエイジング素材として期待される。今後、SiA を効率よく抽出させる方法等を検討し、機能性化粧品や健康食品の開発へと繋げたい。

[テキストを入力]

[テキストを入力]