

# ヒト生体環境に着目した新規皮膚細胞培養系の構築と応用（第3報）

食品コスメ部  
岩元彬 柘植圭介

ヒト表皮中の酸素濃度である0.5~5%での表皮細胞の機能を調べるため、マルチガスインキュベーターを用いて酸素濃度1%、3%、5%の培養環境を作り出し、ヒト3次元培養表皮のミトコンドリア活性及びmRNA発現を評価した。48時間培養した3次元培養表皮のミトコンドリアの代謝活性をMTTアッセイにより調べたところ、酸素濃度1%、3%では低下したことから、これらの濃度では生細胞率もしくは細胞の代謝活性が低下したことが示された。また、セラミド合成酵素のmRNA発現解析の結果、CerS3は酸素濃度1%、SMS1は1%及び3%で発現量が低下したことから、低酸素条件下ではスフィンゴミエリンを介したセラミド合成が抑制されることが示唆された。一方、タイトジャンクションに關与するClaudin1は酸素濃度1%、Claudin4とOccludinは1%と3%でmRNA発現量が増加したことから、低酸素条件下ではタイトジャンクション形成タンパク質が増強される可能性が示された。これらの結果は、一般的な酸素濃度21%と低酸素条件では、表皮細胞の機能が変化することを示すものであり、よりヒトへの外挿性の高い結果を得るためには、低酸素条件下で研究を行う必要があることを示唆するものであった。

## 1. はじめに

佐賀県では、地域創生の取り組みとして、「美と健康に関するコスメティック産業を集積させ、コスメに関連する自然由来原料の供給地となることを目指すコスメティック構想」を推進しており、当センターでも県内素材の美容効果の検証を行ってきた。その結果、レンコンポリフェノールが炎症性サイトカインやコラーゲン産生を抑制することや<sup>1,2)</sup>、キヌアゴコラーゲン産生増強効果や分解阻害効果を有すること<sup>3)</sup>、褐藻綱ノコギリモクが抗炎症成分Sargahydroquinic acidやSargaquinic acidを含むこと等を見出してきた<sup>4)</sup>。

このような化粧品の開発では、倫理上の配慮から、実験動物を使用せず、培養細胞等を用いた動物実験代替法の活用が世界中で重視されている。しかしながら、現状は安全性の評価に留まり、機能評価への応用に至ったケースは少ない。そのため、化粧品の機能評価・開発にはヒト皮膚の反応を忠実に再現した生体外皮膚モデルの構築が望まれる。

一方、近年の報告でヒト表皮内の酸素濃度は生理的範囲から低酸素状態の0.5~5%であることが明らかになってきた<sup>5)</sup>。一般に表皮由来細胞を用いた試験は大気中と同程度の酸素濃度で行われているが、生体に近い評価のためには低酸素条件下での試験が必要であることが示唆されている。実際に、Tashiroらはアレルギー性炎症や痒みの原因となるTSLP発

現低酸素条件下では抑制されることを示し、約21%の酸素条件と1%の低酸素条件下では表皮細胞の反応量が変わることを報告している<sup>6)</sup>。

そこで、本研究ではヒト表皮由来角化細胞により形成された3次元表皮を用いて低酸素条件がセラミド合成関連酵素やタイトジャンクション形成因子の遺伝子発現に与える影響を評価した。

## 2. 実験方法

### 2.1 低酸素条件下における3次元培養表皮の培養

3次元培養表皮は、LabCyte EPI-MODEL24 (J-TEC) を使用した。まず、LabCyte EPI-MODEL24の培養カップを500  $\mu$ Lのアッセイ培地を分注した24 well培養プレートに移し、CO<sub>2</sub>インキュベーター(Thermo)で培養した。18時間培養後、培養カップを1.0 mLのアッセイ培地を分注した24 well培養プレートに移し、マルチガスインキュベーター (PHCbi) で酸素濃度1%、3%、5%でそれぞれ培養した。また、同様に酸素濃度を制御していないCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養したものをコントロールとした。48時間培養後、培養表皮の生細胞率をMTTアッセイ、mRNA発現量をRT-qPCRにより解析した。

### 2.2 MTTアッセイ

24 well培養プレートにアッセイ培地で0.5 mg/mLに調製した3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Dojindo) を500  $\mu$ L ず

つ分注し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で加温した。これに培養カップを移し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した。4 時間反応後、培養カップから培養表皮を回収し、0.04 mol/L の塩酸 (Fujifilm) を含むイソプロピルアルコール (Fujifilm) に浸漬させ、室温遮光条件下で一晩色素を抽出した。その後、抽出液を96 ウェルマイクロプレートに移し、570-650 nm の吸光度を測定することにより、ミトコンドリアの代謝活性を評価した。

### 2.3 RT-qPCR 法による mRNA 発現の評価

3次元培養表皮の mRNA 発現量の変化を調べるため、TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Thermo) を用いて総 RNA を抽出し、PrimeScript<sup>™</sup> RT Master Mix (Takara) により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、TB Green<sup>®</sup> Premix EX Taq<sup>™</sup> (Takara) を用いてリアルタイム PCR を行うことにより、遺伝子発現量を比較した。使用したプライマーは表 1 に示した。PCR 反応は 95°C 30 秒を 1 サイクル、95°C 5 秒、60°C 30 秒を 40 サイクルの条件で行った。増幅産物は 60°C から 90°C まで 0.5°C 毎に Melt curve 解析を行い、シングルピークであることを確認した。得られたデータは、BIO-RAD CFX Manager version 3.1 を用いて比較 CT 法により解析した。

表 1 プライマー配列

プライマー	配列 (5'-3')
aSMase sense	5'-TGGCTCTATGAAGCGATGG-3'
antisense	5'-AGCCGATGTAGGTAGTTGC-3'
Claudin1 sense	5'-GAAGTGATGAAGTGCTTGG-3'
antisense	5'-GGGTCATAGGGTCATAGAAT-3'
Claudin4 sense	5'-TATGGATGAAGTGCCTGGTG-3'
antisense	5'-GATGATGVTGATGATGACGAG-3'
CerS3 sense	5'-CCAGGCTGAAGAAATCCAG-3'
antisense	5'-AACGCAATCCAGC AACAGT-3'
GAPDH sense	5'-CTTCGCTCTCTGCTCCTCCTG-3'
antisense	5'-CGCCAATACGACCAAATCCG-3'
GCS sense	5'-CTTCGCTCTCTGCTCCTCCTG-3'
antisense	5'-CGCCAATACGACCAAATCCG-3'
SMS1 sense	5'-CAACATTGGCGTAGACAT-3'
antisense	5'-TAGGAGGTAAGTTCGTTG-3'
SPT1 sense	5'-GCGCGCTACTTGGAGAAAGA-3'
antisense	5'-TGTTCCACCGTGACCAAC-3'
Occludin sense	5'-CTGGATCAGGGAATATCCAC-3'
antisense	5'-TCAGCAGCAGCCATGTAC-3'
ZO-1 sense	5'-GATGGTGCTACAAGTGATG-3'
antisense	5'-TCCGTGCTATACATTGAGT-3'

### 2.4 統計解析

得られたデータは、GraphPad PRISM 10 (GraphPad Software Inc.) を用い、*student's t test* で解析した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 培養ガス環境が培養表皮のミトコンドリア代謝活性に与える影響

マルチガスインキュベーターを用いて酸素濃度 1%、3%、5% で培養した培養表皮のミトコンドリア代謝活性を MTT アッセイにより測定した。図 1 に示すように、酸素濃度 21% で培養した培養表皮と 5% で培養したものでは生細胞率に変化は認められなかった。一方、酸素濃度 1% と 3% で培養した培養表皮では、21% の酸素濃度で培養したものと比べ、有意に生細胞率が低下した。MTT アッセイは、細胞のミトコンドリアに存在する還元酵素活性を指標として生細胞率を測定する方法である。そのため、酸素濃度 1% 及び 3% で培養した培養表皮では、生細胞が減少した、もしくは細胞の代謝活性が低下したことが示唆された。

### 3.2 培養ガス環境が培養表皮のセラミド合成関連酵素の mRNA 発現に与える影響

皮膚の保湿にはセラミドや天然保湿因子が重要な役割を果たしている。特にセラミドは角層脂質重量の 30~40% を占め、皮膚の保湿やバリア機能に重要な細胞間脂質であることが報告されている<sup>7,8)</sup>。また、角層中のセラミドレベルが低下するとバリア機能が低下することが報告されている<sup>9)</sup>。そのため、セラミドの摂取や合成の誘導は皮膚の保湿に重要であると考えられており、その関連性について研究が活発に行われている。

図 2 に角層セラミドの合成経路を示す。表皮のセラミドの合成には、様々な酵素が関与しており、まず基底層から顆粒層にかけてセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (serine palmitoyltransferase (SPT) がセラミド合成の第一段階であるセリンとパルミト

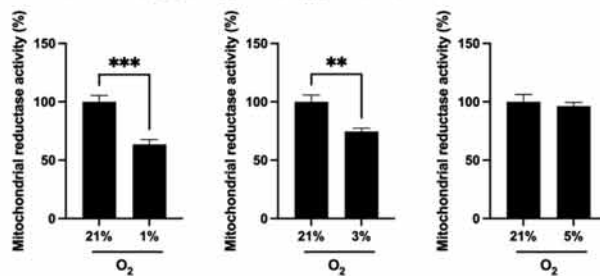


図 1 培養表皮のミトコンドリア活性

測定値は 3 匹の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 vs 酸素濃度 21% を示す。

イル-CoA の縮合を触媒し、セラミドシンセターゼ (ceramide synthase (CerS)) が脂肪酸の N-アシル化によりセラミド (セラミド前駆体) を形成する<sup>10)</sup>。ここから角質層セラミドを合成する経路は二つあり、一つはセラミド前駆体からグルコシルセラミドシンセターゼ (GCS) と  $\beta$  グルコセレブロシダーゼ (BGCase) の働きによりグルコシルセラミドを合成、分解を経由してセラミドができる経路、もう一つはスフィンゴミエリンシンセターゼ (sphingomyelin synthase (SMS)) とスフィンゴミエリナーゼ (acid sphingomyelinase (SMase)) によりスフィンゴミエリンを介する経路である。

本研究では、培養ガス環境がセラミドに与える影響を調べるため、セラミド合成に関与する酵素の mRNA 発現を評価した。その結果を図 3 に示した。SPT-1 及び SMase, BGCase は酸素濃度 1%, 3%, 5% の間で発現量に変化はなかった。CerS3 は、酸素濃度 1%では 21%と比べ発現量が低下したが、3%及び 5%では変化はなかった。SMS1 は、酸素濃度 1%及び 3%で発現量が低下したが、5%では変化しなかった。GCS は酸素濃度 1%で発現量が増加したが、3%と 5%では変化しなかった。

これらの結果から、低酸素条件下では培養表皮の CerS3 や SMS1 といったセラミド合成関連酵素の mRNA 発現が低下したことから、スフィンゴミエリンを介した角層セラミド経路は抑制されている可能性が示唆された。このことから、最終的な角層セラミドの合成が抑制される可能性が示された。

### 3.3 培養ガス環境がタイトジャンクション関連因子の mRNA 発現に与える影響

皮膚は、外界と生体を隔てる最大の臓器であり、外部からの刺激や異物の侵入、体内の水分等の漏出

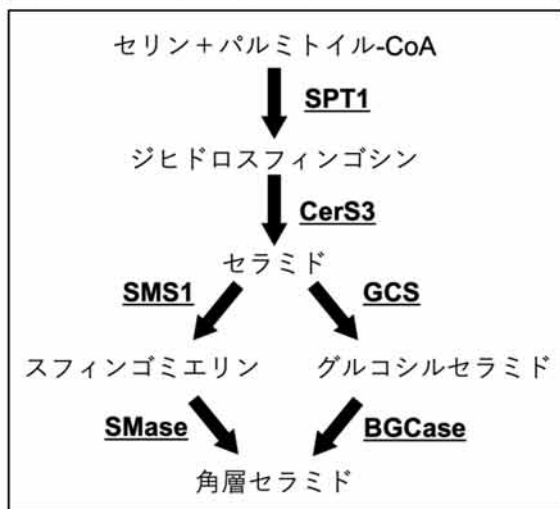


図 2 角層セラミド合成経路

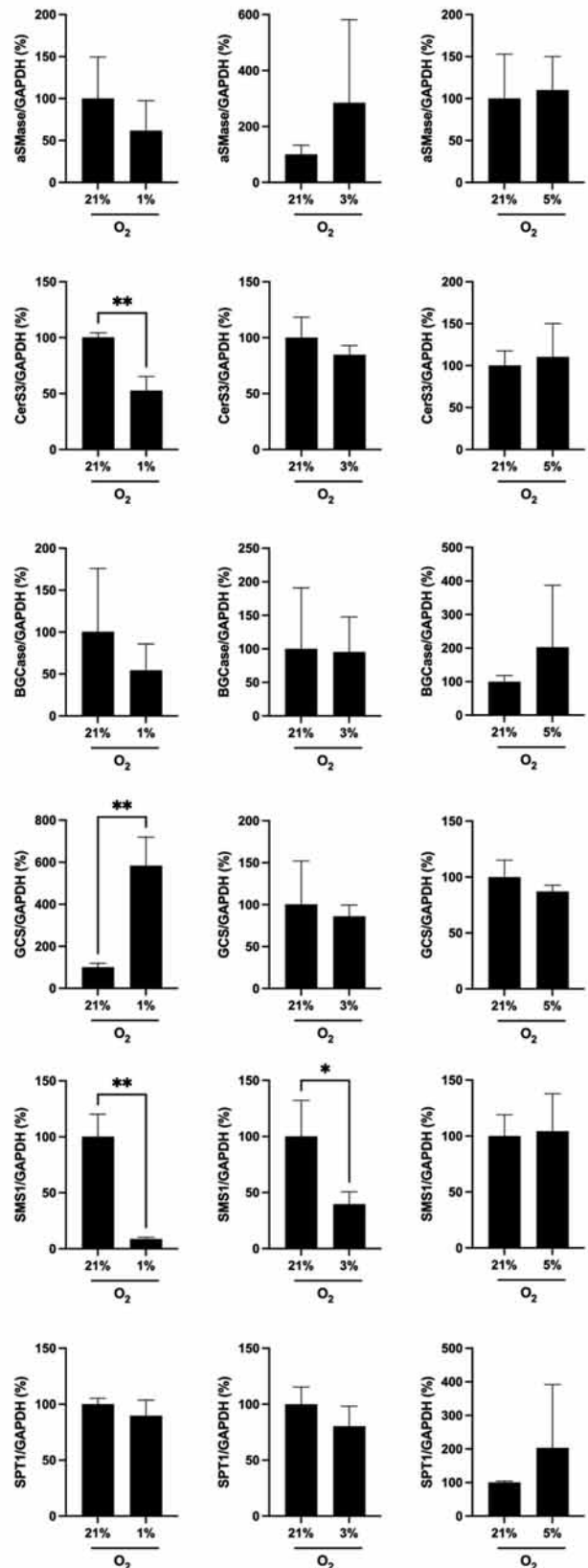


図 3 培養ガス環境がセラミド合成関連酵素の mRNA 発現に与える影響

測定値は 3 匹の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs 酸素濃度 21%を示す。

を防ぐバリア機能を有している。皮膚のバリア機能の維持には、表皮の顆粒層表面に存在する脂肪表面タンパク質が結合したタイトジャンクションが重要である。このタイトジャンクションを形成する因子としてはクローディン (claudin) やオクルディン (occludin), ゴニュラオクルディン (zonula occludins-1 (ZO-1)) などが知られており、特に Claudin については、ノックアウトマウスの真皮に注射した色素が角層まで浸透することや経費水分蒸散が亢進され体重を維持できないことなどが報告されており、バリア機能の形成に重要な因子であることが明らかになっている<sup>7,8)</sup>。

培養ガス環境がタイトジャンクションに与える影響を調べるため、タイトジャンクション形成タンパ

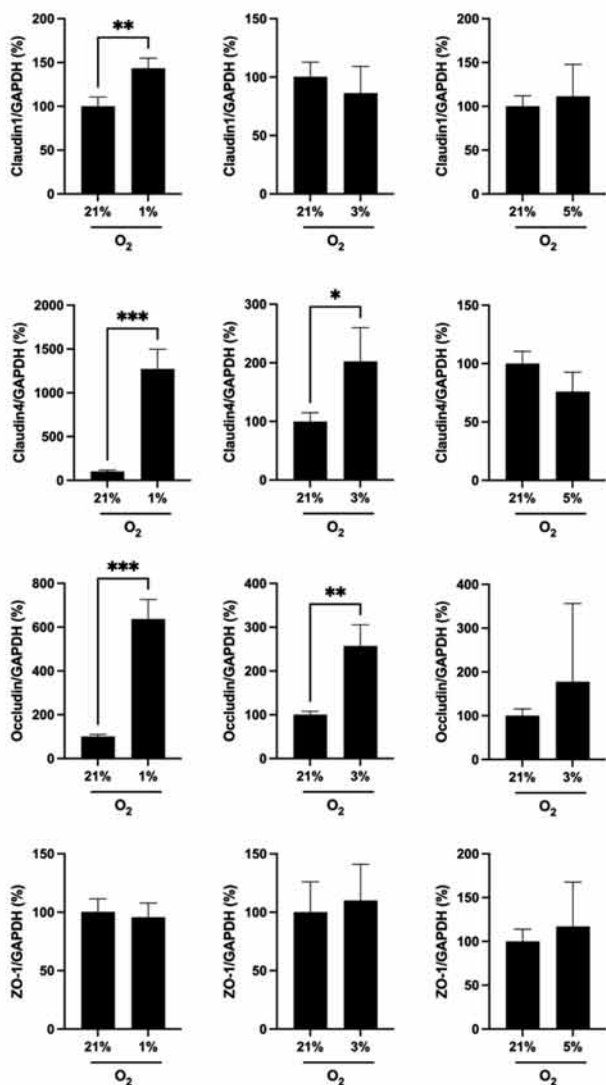


図4 培養ガス環境がタイトジャンクション関連因子の mRNA 発現に与える影響

測定値は 3 匹の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs 酸素濃度 21%を示す。

ク質の mRNA 発現を評価した。その結果、図 4 に示すように、酸素濃度 21%と比べ Claudin 1 は 1%で発現量が増加し、Claudin 4 及び Occludin は酸素濃度 1%と 3%で発現量が増加した。ZO-1 は、酸素濃度 1%, 3%, 5%の間で発現量に変化はなかった。これらの結果から、低酸素条件下では培養表皮の Claudin 1 や Claudin 4, Occludin の mRNA 発現量が増加したことから、タイトジャンクション形成タンパク質が増強される可能性が示された。

本報では、低酸素条件下におけるヒト培養表皮のセラミド合成酵素及びタイトジャンクション形成因子の mRNA 発現を調べ、一般的な *in vitro* 皮膚モデルとして用いられてきた酸素濃度 21%の評価とヒト表皮のガス環境に近い低酸素条件下での評価では、mRNA 発現量が異なることを明らかにした。これらの結果は、酸素濃度 21%での研究データがヒト皮膚に外挿できない可能性を示すものであった。これまでに低酸素条件下における皮膚細胞の研究については、Tashiro らが角化細胞の TNF- $\alpha$ 誘導性 TSLP 発現が抑制されることを報告しているが<sup>6)</sup>、セラミド及びタイトジャンクションに着目した研究の報告はない。本研究で明らかにしたセラミドやタイトジャンクション関連遺伝子の発現変化による保湿機能やバリア機能の変動を明らかにするためには、更なる研究が必要である。

#### 4. おわりに

本研究では、ヒト表皮の酸素濃度でのヒト培養表皮の機能変化を調べた。その結果、低酸素条件下ではセラミド合成関連遺伝子の発現が減少したことから、保湿機能を担うセラミド合成が抑制されることが示唆された。一方で、肌バリア機能を担うタイトジャンクション関連因子の遺伝子発現を調べたところ、低酸素条件下ではタイトジャンクションを形成する主要なタンパク質である Claudin 1 や Claudin 4, Occludin の発現が増加したことから、タイトジャンクション形成タンパク質が増強されることが示唆された。

今後は、本研究で再現した低酸素条件下で、植物エキスなどの化粧品原料の機能を評価することにより、よりヒト表皮に近い美容試験が実施できることが期待される。

#### 参考文献

- 1) 山内良子, 岩元彬, 吉村裕美, 柘植圭介, 炎症性サイトカイン産生抑制用の組成物, 2020; 特許

第 6667773 号

- 2) Iwamoto A, Yamauchi R, Oogai S, et al. Lotus root extract inhibits skin damage through suppression of collagenase production in vitro. *Cytotechnology*. 2022;74(2):309-317.
- 3) 岩元彬, 柘植圭介, 鶴田裕美, 三田かおり, コラゲナーゼ活性阻害用組成物及びコラーゲン産生促進用の組成物, 2022;特開 2022-139538
- 4) 柘植圭介, 岩元彬, 鶴田裕美, 山内良子, 藻類の産業利用に関する可能性研究 (第 2 報), 2018;平成 30 年佐賀県工業技術センター:19-31.
- 5) Evans SM, Schrlau AE, Chalian AA, Zhang P, Koch CJ. Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *J Invest Dermatol*, 126(12), 2596-606(2006)
- 6) Tashiro N, Segawa R, Tobita R, Asakawa S, Mizuno N, Hiratsuki M, Hirasawa N, Hypoxia inhibits TNF- $\alpha$ -induced TSLP expression in keratinocytes. *PLoS One*, 14(11), e0224705(2019)
- 7) 久保亮治, 皮膚バリアとランゲルハンス細胞の動態, 日本臨床免疫学会誌, 34(2),76-84(2011)
- 8) 下豊留芳枝, 辻村久, 石川准子, 藤村努, 北原隆, 日本人女性の角層セラミドプロファイルの部位差解析, 日本化粧品学会誌, 38(1), 3-8(2014)
- 9) Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A, Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: An etiologic factor in atopic dry skin?. *J Invest Dermatol*, 96(4), 523-526(1991)
- 10) Takeda S, Shimoda H, Takarada T, Imokawa G, Strawberry seed extract and its major component, tiliroside, promote ceramide synthesis in stratum corneum of human epidermal equivalents. *PLoS One*, 13(10), e0205061(2018)