

紫外線曝露による皮膚老化モデルの構築

食品工業部

岩元彬

公益財団法人佐賀県地域産業支援センター

さがフード&コスメラボ 山内良子

化粧品及びその素材の美容機能を評価するため、皮膚老化の最大環境要因である紫外線をヒト皮膚細胞に照射することにより、肌のハリやシワの形成などの原因因子として知られる炎症性サイトカインや MMP-1, MMP-3 の発現を誘導できる条件を探索した。様々な照射強度で UV-A を照射したところ、HaCaT 及び NHDF では 5 J/cm² 以上で発現が増強される傾向が認められ、3 次元培養皮膚モデルでは 30 J/cm² 以上で増強が確認された。

1. はじめに

佐賀県では「さがフード&コスメラボ」や「唐津コスメティック構想」など、県内の農林水産資源を活用したコスメティック素材の開発支援の取り組みが活発に行われている。

近年の化粧品市場では、紫外線などの外的要因や加齢などの内的要因で起こる皮膚ダメージやトラブルの改善・解消効果を訴求した高機能化粧品が市場を急成長させている。このような化粧品の開発では、動物実験を行わない実験代替法の取り組みが世界中で強く求められているが、代替試験法の使用は安全性の評価に留まり、機能評価への応用には至っていない。このような背景から、高機能化粧品の開発にはヒト皮膚の反応を忠実に再現した生体外評価系の構築が望まれている。

そこで本研究では、皮膚老化の最大環境要因である紫外線をヒト皮膚細胞や 3 次元培養皮膚モデルに照射することにより炎症反応を誘導し、老化反応を定量的に評価可能な試験系の構築を試みた。

2. 実験方法

2.1 ヒト表皮角化細胞 HaCaT を用いた皮膚老化モデルの構築

ヒト表皮角化細胞株 HaCaT は、10%ウシ胎児血清 (FBS, West Bio) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Gibco) で継代培養した。

ヒト表皮角化細胞株 HaCaT の光老化反応を誘導する UV-A 照射条件を調べるため、10%FBS-DMEM で 30×10⁴ cells/mL に調製した HaCaT を 2mL ずつ 35 mm ディッシュに播種し、37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した。24 時間培養後、培養液を除去

し、リン酸生理食塩水 (PBS (-)) を 500 μL 添加した。これに UV-A (ランプ: Toshiba SH1002MA, フィルター: Asahi spectra SH0385+ LU0325) を 5-20 J/cm² の強度で照射した。UV-A 照射後、PBS (-) を除去し、DMEM を 1 mL 加え、インキュベーター内で培養した。6 時間もしくは 48 時間培養後、細胞を回収し、mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR (RT-qPCR) 法により評価した。

2.2 ヒト真皮線維芽細胞 NHDF を用いた皮膚老化モデルの構築

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF, LONZA) は、10%FBS-DMEM で継代培養した。

NHDF の光老化反応を誘導する UV-A 照射条件を調べるため、10%FBS-DMEM で 25×10⁴ cells/well に調製した NHDF を 35 mm ディッシュに 2 mL ずつ播種し、37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した。24 時間培養後、培養液を除去し、PBS (-) で 2 回洗浄した後に、500 μL の PBS (-) を添加し、これに UV-A を 5-30 J/cm² の照射強度で照射した。UV-A 照射後、PBS (-) を除去し、10%FBS-DMEM を 1 mL 加え、インキュベーター内で培養した。6 時間もしくは 48 時間培養後、細胞を回収し、mRNA の発現量を RT-qPCR 法により評価した。

2.3 3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚老化モデルの構築

3次元培養皮膚モデルは LabCyte EPI-MODEL24 (J-TEC) を使用した。まず、LabCyte EPI-MODEL24 を 500 μL のアッセイ培地 (J-TEC) を分注した 24 穴培養プレートに移し、37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した。18 時間培養後、これに UV-A を 20-60 J/cm² の強度で照射した後に、LabCyte EPI-

MODEL24 を 1.0 mL のアッセイ培地を分注した 24 穴培養プレートに移し、インキュベーター内で培養した。48 時間培養後、細胞の生存率を MTT アッセイ、mRNA 発現量を RT-qPCR 法により評価した。

2.4 RT-qPCR 法による遺伝子発現の検討

細胞の mRNA 発現量の変化を調べるため、TRIzol® Reagent (Thermo) を用いて総 RNA を抽出し、PrimeScript™ RT Master Mix (Takara) により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、TB Green® Premix EX Taq™ (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。PCR 反応は β -actin 及びグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH)、マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MMP-1)、MMP-3 は 95°C 5 分を 1 サイクル、95°C 5 秒、62.5°C 30 秒を 40 サイクル、インターロイキン-1 α (IL-1 α) 及び IL-6 は 95°C 5 分を 1 サイクル、95°C 5 秒、65°C 30 秒を 40 サイクルであり、使用したプライマーは表 1 に示した。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。これらの操作は製造プロトコールに従って行った。

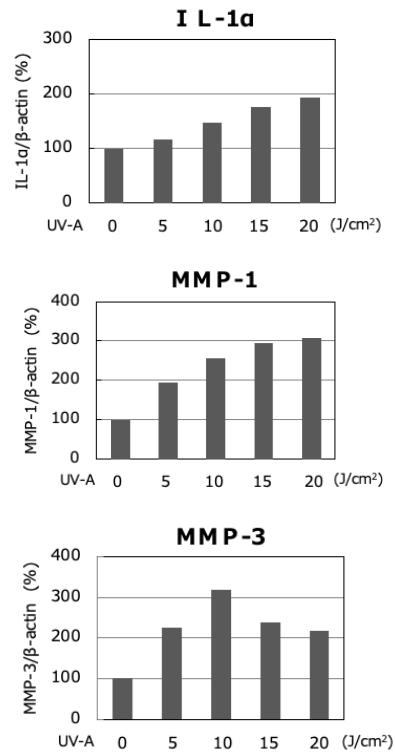
3. 結果及び考察

3.1 単層細胞シートを用いた皮膚老化モデルの構築

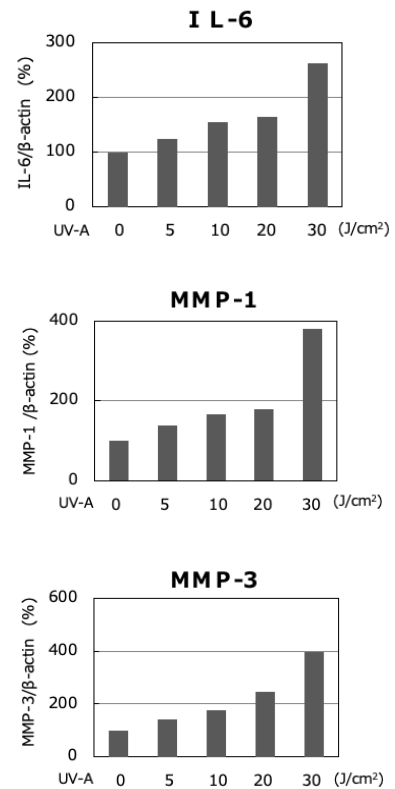
ヒト表皮角化細胞 HaCaT とヒト真皮線維芽細胞 NHDF の単層細胞シートを用いて、紫外線曝露による皮膚老化反応を誘導する条件を調べた。図 1 (a) に示すように HaCaT に 5 J/cm² 以上の UV-A を照射したところ、照射強度依存的に IL-1 α や MMP-1、MMP-3 の遺伝子発現量が増加した。また、同様に NHDF においても照射強度依存的に IL-6 や MMP-1、MMP-3 遺伝子発現量の増加が確認された(図 1 (b))。

表 1 プライマーリスト

プライマー	配列 (5'-3')
β -actin sense	5'-AACTGGAACGGTGAAGGTGAC -3'
antisense	5'-ATGGCAAGGGACTTCCTGTAAC-3
GAPDH sense	5'-CTTCGCTCTCTGCTCCTCTG-3'
antisense	5'-CGCCCAATACGACCAATCCG-3'
MMP-1 sense	5'-ACATGAGTCTTTGCCGAGG-3'
antisense	5'-AACCAAGGTTGACTTTATTCCAAACA-3'
MMP-3 sense	5'- TGAAGAGTCTTCCAATCCTACTGTTG-3'
antisense	5'-CTAGATATTTCTGAACAAGGTTTCATGCA-3'
IL-1 α sense	5'- GAAGAGACGGTTGAGTTTAAGCC-3'
antisense	5'- CAGGAAGCTAAAAGGTGCTGA-3'
IL-6 sense	5'- AGTTCCTGCAGAAAAAGGCAAAG-3'
antisense	5'- CATTTGCCGAAGAGCCCTCA-3'



(a) HaCaT の遺伝子発現量



(b) NHDF の遺伝子発現量

図 1 UV-A 照射の遺伝子発現への影響
測定値は 2 連の実験の平均値を示す。

3.2 3次元培養皮膚モデルを用いた皮膚老化モデルの構築

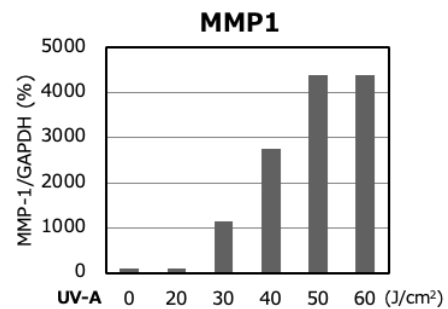
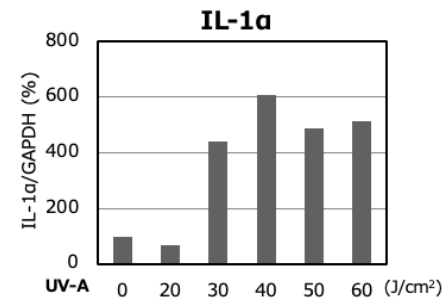
3次元皮膚培養モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いて、紫外線曝露によって皮膚老化反応を誘導する条件を検討した。図 2 (a) に示すように、30 J/cm²以上の強度で UV-A を照射した場合に、著しく IL-1 α 及び MMP-1 の遺伝子発現が増強された。また、生存率は 30 J/cm²の UV-A 照射で 90%程度の生存率であった (図 2 (b))。

地上に届く紫外線は、波長の長さで UV-A (320-400 nm)、UV-B (280-320 nm) に分けられ、UV-A がその大部分 (95%) を占めている。この UV-A は皮膚表皮及び真皮に作用し、光老化反応を誘起することが知られている。

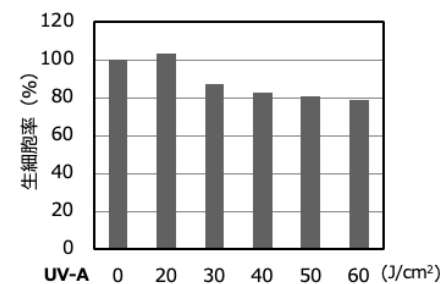
本研究では、HaCaT や NHDF で作製した単層細胞シートに UV-A を照射することにより、炎症反応の原因因子である IL-1 α や IL-6 といった炎症性サイトカイン、及びコラーゲンを分解する MMP-1 やプロテオグリカンを分解する MMP-3 の遺伝子発現量がどのように変化するか調べ¹⁾、HaCaT では UV-A 20 J/cm²の照射で IL-1 α が 1.9 倍、MMP-1 が 3.0 倍、MMP-3 が 2.1 倍、NHDF では 30 J/cm²の照射で IL-6 が 2.6 倍、MMP-1 が 3.8 倍、MMP-3 が 4.0 倍発現増強することを明らかにした。また同様に、LabCyte Epi-MODEL24 を用いた評価系では、30 J/cm²の UV-A 照射で IL-1 α 発現が 4.4 倍、MMP-1 発現が 11.3 倍発現増強されることを示した。今後、本研究で得られた知見をもとに県内農林水産資源の光老化反応への影響を評価することにより、高付加価値化及び未利用部分の有用活用に繋がることを期待される。

4. おわりに

本研究では、ヒト表皮角化細胞及びヒト真皮線維芽細胞、3次元培養皮膚モデルに紫外線を照射し、肌のハリ低下やシワの形成の原因因子である炎症性サイトカインや MMP-1、MMP-3 遺伝子発現を誘導できる条件を明らかにした。これらの知見は、県内農林水産資源の高付加価値化及び未利用部分の新産業活用のための美容機能評価に役立つものであった。



(a) 遺伝子発現量



(b) 生細胞率

図 2 UV-A 照射の LabCyte EPI-MODEL24 への影響
測定値は 2 連の実験の平均値を示す。

参考文献

- 1) Imokawa G, NaKajima H, Ishida K, Biological Mechanisms underlying the ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging II: Over-Expression of Neprilysin Plays an Essential Role, *Int J Mol Sci*, **16**(4),7776-7795 (2015)