

化粧品の機能性を評価するための 生体外皮膚モデルの構築および高機能素材の探索（第2報）

食品工業部

岩元彬 柘植圭介

化粧品及びその素材の美容効果を調べるため、これまでに皮膚ダメージを定量的に評価できる生体外皮膚モデルの検討を行ってきた。その結果、3次元培養表皮にUVBを照射し、経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定することで被験試料の保湿・バリア機能への影響を評価可能な試験系を構築した。しかしながら、このTEWLの変化が保湿・バリア機能を構成する生体因子の変動によるものかは明らかになっていなかった。そこで、本報では代表的な機能性成分である Ascorbyl glucoside (AG) の生体因子及びTEWLへの影響を評価することにより、試験系の適正性を検討した。3次元培養表皮のmRNA発現の変化を調べた結果、UVB照射により、セラミド合成関連酵素とタイトジャンクション形成因子の遺伝子発現が低下したのに対し、AGを添加したものでは発現量の低下が抑制されることを確認した。また、SPT1及びCerS3, SMS1, Claudin1発現量はTEWLとの相関性が極めて高く、本試験系はこれらの生体因子の変動をTEWLに反映している可能性が示された。今後、本研究で見出した条件で被験試料の作用を解析することにより、皮膚の保湿・バリア機能への影響を定量的に評価可能になることが期待される。

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、動物実験を行わずに3次元培養表皮等を用いる代替法による試験が世界中で強く求められている¹⁾が、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皮膚モデルの構築が望まれている。

表皮は皮膚の最外層として外界と接し、体内の水分の蒸散や異物等から人体を防御する機能を有している。この表皮を構成する細胞の95%は角化細胞であり、成熟に伴い上層に移行していき、図1に示すように深部から基底層、有棘層、顆粒層、角層を構成している。皮膚の保湿やバリア機能には角層の形成脂質であるセラミドや顆粒層のタイトジャンクションが重要な役割を果たしていることがよく知られ、これらの生体因子の発現が皮膚の保湿性やバリア機

能に影響を与えることが多くの研究で示されている²⁻⁵⁾。

そこで筆者らは、皮膚老化の最大環境要因である近紫外線（波長200-400 nm）の中でも、特に強い皮膚傷害を引き起こすUVB（波長280-320 nmの近紫外線）を3次元培養表皮に照射することにより保湿機能やバリア機能が低下した状態を作り出し、被験試料の皮膚機能への影響を定量的に評価可能な生体外皮膚モデルの構築を行ってきた。その結果、UVBの照射強度に依存して経皮水分蒸散量（Transepidermal water loss; TEWL）が上昇し皮膚バリア性が低下すること、またUVBの照射によるTEWLの上昇が代表的な抗酸化剤である Ascorbyl glucoside (AG)により抑制されることを報告してきた²⁾。

しかしながら、これらのTEWLの変化が皮膚の保湿やバリア機能の指標とされる生体因子の変動によるものかは明らかになっていなかった。

そこで、本報ではAGのセラミド合成関連因子やタイトジャンクション関連因子への影響を調べることにより、試験系の適正性を評価した。

2. 実験方法

2.1 被験試料の3次元培養表皮への影響評価

3 次元培養表皮は、ヒト表皮角化細胞を用いて作製された LabCyte EPI-MODEL24 (J-TEC) を使用した。LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験は経済協力開発機構 (OECD) テストガイドライン 439 に収載されており、その LabCyte EPI-MODEL24 は皮膚刺激性の評価に適した培養表皮モデルとされている。

まず、LabCyte EPI-MODEL24 の培養カップを 500 μL のアッセイ培地を分注したアッセイプレートに移し、 CO_2 インキュベーター内で培養した。18 時間培養後、培養カップをアッセイ培地または Ascorbyl glucoside (AG, SIGMA) を含むアッセイ培地を分注したアッセイプレートに移し、 CO_2 インキュベーター内で培養した。6 時間培養後、これに UVB (280-320 nm, ランプ: Toshiba SH1002MA, フィルター: Asahi spectra SH0325) を $125 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ の強度で照射した後に、新しく 500 μL のアッセイ培地または AG を含むアッセイ培地を分注したアッセイプレートに培養カップを移し、インキュベーター内で培養した。48 時間培養後、TEWL の測定及び培養表皮の mRNA 発現量を RT-qPCR 法により評価した。

2.2 RT-qPCR 法による遺伝子発現の検出

培養表皮の mRNA 発現量の変化を調べるため、培養表皮をバイオマッシャー II を用いて破碎後、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。評価に使用した遺伝子は claudin1, claudin4, ceramide synthase 3 (CerS3), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -glucocerebrosidase (GBA), glucosylceramide synthase (GCS), sphingomyelin synthase 1 (SMS1), serine palmitoyltransferase 1 (SPT1), 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 GAPDH を内部標準として比較 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。

2.3 3 次元培養表皮モデルの経皮水分蒸散量測定

LabCyte EPI-MODEL24 を 32°C に保った HIENAI MAT (コスモ・バイオ) 上で 5 分間フタを空けて静置した。その後、Tewitro TW24 (Courage+Khazaka) をセットし、これが入る $W340 \times H320 \times D275 \text{ mm}$ の箱を覆いかぶせ、600 秒間経皮水分蒸散量を測定した。解析には測定値が安定する 581~600 秒の 20 秒

間の経皮水分蒸散量を使用した。なお、これらの操作は、テーブルコーチ (興研) を用いた無菌環境下で行った。

2.4 統計解析

得られたデータの優位性は、GraphPad PRISM version 9.0 (GraphPad Software Inc.) を用い、one-way ANOVA で解析した。また、相関性解析は Pearson の相関係数の検定を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 セラミド合成関連因子への影響

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を防ぐバリア機能を有している。皮膚中の代表的な保湿因子としてはセラミドや天然保湿因子がよく知られている。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

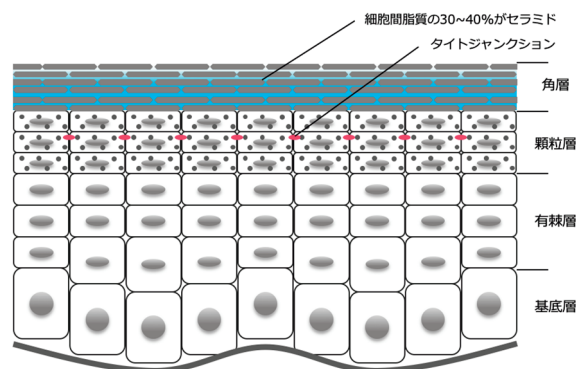


図1 表皮の構造

表1 プライマーリスト

プライマー	配列 (5'-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'-AACGCAATTCAGC AACAGT-3'
GAPDH sense	5'-CTTCGCTCTCTGCTCCTCTG-3'
antisense	5'-CGCCCAATACGACCAATCCG-3'
GBA sense	5'-TGGCATTGCTGTACATTGG -3'
antisense	5'-CGTTCCTCTGACTGGCAACC -3'
GCS sense	5'-ATGTGTCTGCTGCTGGCATG -3'
antisense	5'-CCAGGCGA CTGCATAATCAAG -3'
SMS1 sense	5'-CAACATTGGCGTAGACAT-3'
antisense	5'-TAGGAGGTACTCGTTCTGTG -3'
SPT1 sense	5'-GCGCGCTACTTGGAGAAAGA -3'
antisense	5'-TGTTCCACCGTGACCAAC-3'

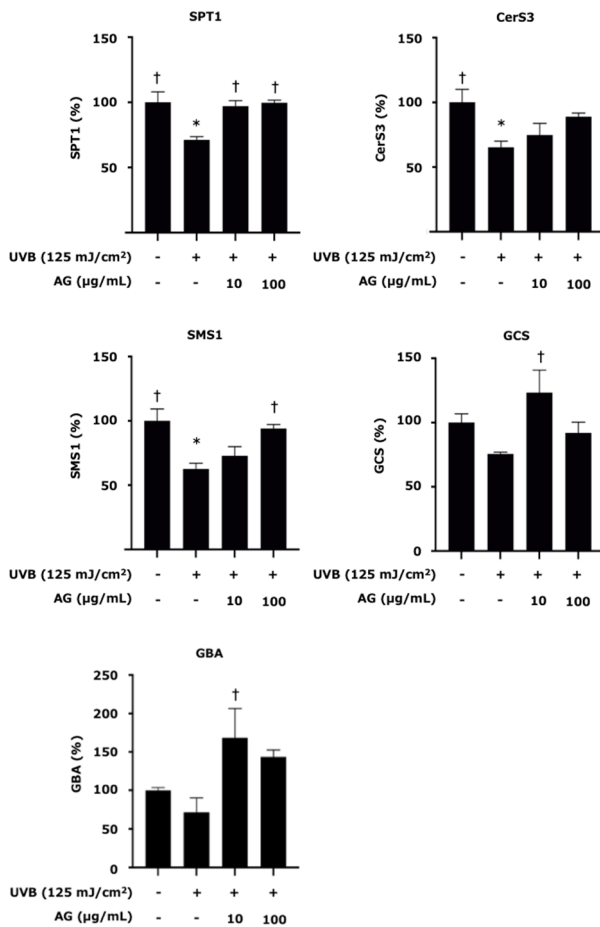


図2 セラミド合成関連酵素の遺伝子発現量
測定値は3連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。
* $p < 0.05$ vs 0 mJ/cm², † $p < 0.05$ vs 125 mJ/cm²を示す。

であることが報告されている^{3,4)}。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⁵⁾。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。

そこで、セラミドの合成関連酵素の遺伝子発現量を評価したところ、UVBを照射しアッセイ培地のみで培養した培養表皮と比べ、AGを含む培地で培養した培養表皮では、SPT1、SMS1、GBA、GCSの発現量が有意に増加した(図2)。表皮のセラミドの合成には、SPTやCerS3、GCS、GBA、SMSなどの酵素が関与している。まず、SPTがセラミド合成の第一段階であるセリンとパルミトイル-CoAの縮合を触媒し、CerS3が脂肪酸のN-アシル化によりセラミドの基本構造(セラミド前駆体)を形成する。ここから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GCSとGBA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SMSとAcid sphingomyelinase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、AG添加培地での培養により、SPT1及びGCS、GBA、SMS1発現量が増加し、CerS3についてはUVB照射による発現量の低下が抑制されたことから、二つの経路の両方で角層セラミド合成が活性化されたことが示唆された。また、Vitamin Cによりセラミド合成が活性化されることについてはいくつかの研究で報告されており⁶⁻⁸⁾、本試験系は被験試料の機能をTEWL以外にもセラミド合成量に反映している可能性が示された。

3.2 タイトジャンクションへの影響

外部環境や生化学的なダメージにより角層機能が低下すると、外界からのアレルゲンや病原体の侵入に対し炎症が生じ、この炎症がさらに皮膚にダメージを与え、保湿・バリア機能を低下させる。その結果、皮膚の滑らかさ、柔らかさが失われ、皮膚の肥厚化や乾燥が起こる³⁾。したがって、皮膚のバリア機能を一定に保つことは肌の恒常性維持に繋がる。また、紫外線がヘアレスマウスの経皮水分蒸散量の上昇及び炎症反応を誘発することが報告されており、ヒトにおいても同様の反応が起きていることが示唆されている⁹⁻¹¹⁾。皮膚のバリア機能の一部は、表皮の顆粒層表面に存在する角化細胞の表面タンパク質が結合したタイトジャンクションにより成り立っている。このタイトジャンクションに関連する生体因子としては、ClaudinやOccludinなどのタンパク質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

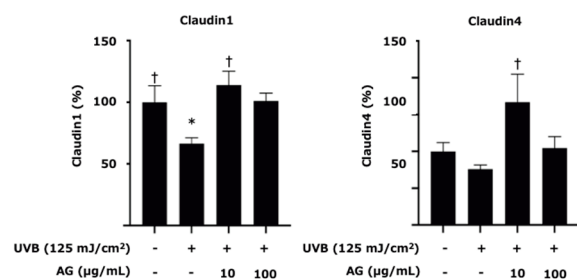


図3 タイトジャンクション形成因子の
遺伝子発現量

測定値は3連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。
* $p < 0.05$ vs 0 mJ/cm², † $p < 0.05$ vs 125 mJ/cm²を示す。

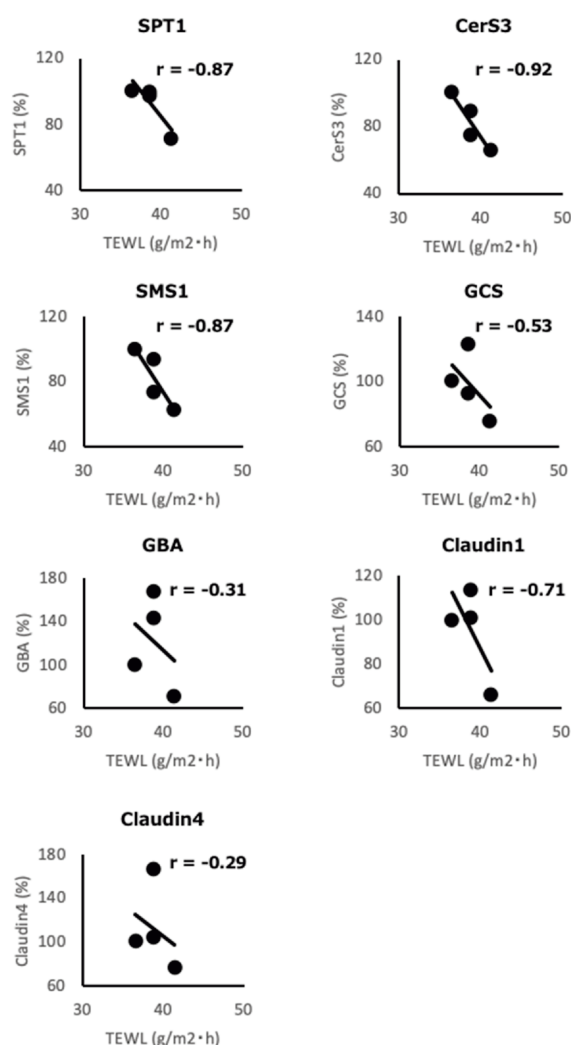


図4 遺伝子発現量とTEWLの相関性解析

成に重要な因子であることが明らかになっている^{3,4)}。

そこで、Claudin1の遺伝子発現を調べたところ、UVB照射により発現量が低下したのに対し、AG添加培地で培養したものは、発現量の低下が抑制された(図3)。また、この傾向はClaudin4でも同様に確認された。そのため、本試験系は被験試料の機能を少なくともClaudin1及びClaudin4といったタイトジャンクションを形成する生体因子に反映できることが示唆された。既報において、本試験系はUVB照射による皮膚バリア機能の低下をTEWLを指標にすることにより定量的に測定でき、AGの添加によりTEWLの低下が抑制されることを確認したことから、皮膚の保湿・バリア機能をTEWLに反映できる可能性を報告した²⁾。本報では、AGの添加により

様々なセラミド合成関連酵素やタイトジャンクション関連因子の発現が向上することを明らかにした。そこで、TEWLの増減に生体因子の変動が影響を与えているか評価するため、TEWLと生体因子発現量の相関性解析を行った。その結果、図4に示すように特にTEWLとSPT1及びCerS3、SMS1、Claudin1との相関性は高く、それぞれの係数は-0.87、-0.97、-0.87、-0.71であった。したがって、本試験系は生体因子の変動がTEWLに反映されており、実際のヒト皮膚における反応を再現した、優れた試験モデルである可能性が示された。

4. おわりに

本報では、3次元培養表皮を用いた試験系が保湿・バリア機能に關与する生体因子の発現量がTEWLに反映されているかを検討した。

紫外線を照射し通常培地で培養皮膚と比べ、AGを添加した培地で培養したものでは、セラミド合成関連因子及びタイトジャンクション形成因子の遺伝子発現が高いことが明らかとなった。また、これらの因子とTEWLとの関係性を調べたところ、多数の因子に極めて高い負の相関があることが明らかになり、本試験系は生体因子の変動をTEWLに反映する可能性が示された。

これらの知見は、化粧品及びその素材の機能を生体外で評価する皮膚モデルの構築に大いに役立つものであった。

なお、研究を実施するにあたって使用した紫外線照射装置及び培養細胞用経皮水分蒸散量センサー(Tewitro TW24)は、電源立地地域対策交付金で導入した。

参考文献

- 1) 岩崎泰夫, 化粧品の将来と課題, 化学と生物, 46(5), 346-351(2008)
- 2) 岩元彬, 柘植圭介, 化粧品の機能性を評価するための生体外皮膚モデルの構築および高機能素材の探索(第1報), 令和元年佐賀県工業技術センター, 33-36(2019)
- 3) 久保亮治, 皮膚バリアとランゲルハンス細胞の動態, 日本臨床免疫学会会誌, 34(2), 76-84(2011)
- 4) 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)

- 5) 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)
- 6) Uchida Y, Behne M, Quiec D, Elias PM, Holleran WM. Vitamin C stimulates sphingolipid production and markers of barrier formation in submerged human keratinocyte cultures, *J Invest Dermatol*, 117(5), 1307-13(2001)
- 7) Boyce ST, Supp AP, Swope VB, Warden GD. Vitamin C regulates keratinocyte viability, epidermal barrier, and basement membrane in vitro, and reduces wound contraction after grafting of cultured skin substitutes, *J Invest Dermatol*, 118(4), 565-72(2002)
- 8) Kim KP, Shin KO, Park K, Yun HJ, Mann S, Lee YM, Cho Y. Vitamin C Stimulates Epidermal Ceramide Production by Regulating Its Metabolic Enzymes, *Biomol Ther*, 23(6), 525-30(2015)
- 9) Kang MC, Yumnam S, Kim SY, Oral Intake of Collagen Peptide Attenuates Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Dehydration In Vivo by Regulating Hyaluronic Acid Synthesis, *Int J Mol Sci*, 19(11), 3551(2018)
- 10) Son DJ, Jung JC, Choi YM, Ryu HY, Lee S, Davis BA, Wheat Extract Oil (WEO) Attenuates UVB-Induced Photoaging via Collagen Synthesis in Human Keratinocytes and Hairless Mice, *Nutrients*, 12(2), 300 (2020)
- 11) Choi SI, Jung TD, Cho BY, Choi SY, Sim WS, Han X, Lee SJ, Kim YC, Lee OH, Choi SI, Jung TD, Cho BY, Choi SH, Sim WS, Han X, Lee SJ, Kim YC, Lee OH, Anti-photoaging effect of fermented agricultural by-products on ultraviolet B-irradiated hairless mouse skin, *Int J Mol Med*, 44(2), 559-56(2019)