活性酸素の培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン代謝に及ぼす影響

田中 浩, 岡田富雄

日本メナード化粧品株式会社 生化学研究所†

**Effect of Reactive Oxygen Species on Collagen Metabolism
in Cultured Human Dermal fibroblasts**

Hiroshi Tanaka and Tomio Okada

Biochemical Research Institute, NIPPON MENARD COSMETIC Co., LTD.

The excessive loss of collagen is well known in photoaging skin. Collagen is synthesized by dermal fibroblasts and enzymatically digested by collagenase. Therefore, the quantitative alteration of collagen depends on the balance of synthesis and digestion. Skin is always exposed to oxygen stress and is suggested to be frequently generated the reactive oxygen species (ROS). We investigated the effect of ROS induced by xanthine-xanthine oxidase system on collagen production and collagenase activity in cultured human dermal fibroblasts. Collagen synthesis which was assessed by measuring ^3H -proline incorporation into extracellular collagen, was decreased by ROS exposure. Collagenase activity was measured by using DNP-peptide as a synthetic substrate of collagen and increased by ROS exposure. These changes supported the biological alteration of collagen observed in photoaging skin. Extracts of Chouji and Gennosyouko which have superoxide-scavenging activity, prevented the ROS-induced changes significantly. These results suggest that ROS may be one of the factors which cause the decrease of collagen observed in photoaging skin.

1. 緒 言

日光露出部である、いわゆる光加齢皮膚では組織学的にコラーゲン線維の著明な減少が知られている¹⁾。真皮のコラーゲン線維は線維芽細胞により生成され、線維芽細胞が産生するコラーゲナーゼの作用により酵素分解を受ける。これら生成と分解のバランスによりコラーゲン線維は量的に維持されていると考えられる。したがって、光加齢皮膚におけるコラーゲン線維減少の原因にはその生成の減少と分解の促進のいずれか、あるいは両方

の作用が考えられる。

一方、皮膚は絶えず酸素ストレスに曝されており、活性酸素の発生し易い臓器といえる。また、露光部では紫外線によって活性酸素が発生し、過酸化脂質レベルが高くなることが知られており²⁾、³⁾、近年、光加齢皮膚にみられるコラーゲン線維の著明な減少の原因として活性酸素の影響が考えられている。

そこで今回、培養ヒト皮膚線維芽細胞を用い、コラーゲン生成およびコラーゲナーゼ活性に及ぼす活性酸素の影響について検討した。また、合わせて活性酸素消去作用を有する生薬の効果についても検討した。

† 〒503 岐阜県大垣市浅草 4-66 ; 4-66 Asakusa,
Ogaki, Gifu, 503 Japan

2. 実 験

2.1 細胞培養

実験には正常ヒト皮膚線維芽細胞（理化学研究所・細胞開発銀行 NB1RGB）を10% FCS を含む Eagle's minimum essential medium (MEM) にて 5% CO₂, 37°C 条件下で培養し、継代数 6～8 の細胞を用いた。

2.2 活性酸素および消去剤

活性酸素は xanthine-xanthine oxidase 系により発生させた。すなわち、培養液中に最終濃度 xanthine 100μg/ml, xanthine oxidase (XOD) 10 または 100μU/ml になるようにそれぞれ添加して発生させた。また、活性酸素による培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン生成およびコラゲナーゼ活性の変化に及ぼす活性酸素消去剤の影響を検討する目的でラジカルスカベンジャーである superoxide dismutase (SOD, 100U/ml), catalase (50U/ml), 抗酸化剤である α-tocopherol (20μg/ml) および superoxide anion (O₂⁻) 消去作用を有することが報告されているチヨウジ, ゲンノショウコ, シャクヤク抽出物 (100μg/ml) を用いた⁴⁾。なお、今回の実験に用いた xanthine, XOD および各消去剤は細胞数に影響を及ぼさない濃度で用いた。

2.3 コラーゲン生成量の測定

定常期のコンフルエントな状態のヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン生成量の測定は Webster らの方法⁵⁾ に従い、生成されるコラーゲン中への ³H-proline の取り込みを指標として行った。すなわち、ヒト皮膚線維芽細胞を 96well プレートに各 well あたり 2.5×10⁴ 個ずつ播種し、10% FCS を含む MEM 0.2ml にて 4 日間培養した。この間に細胞はコンフルエントな状態となった。次に試料を溶解した FCS 無添加の MEM (50μg/ml L-ascorbic acid, 50μg/ml β-amino-propionitrile, 92.5 KBq/ml ³H-proline 含有) 0.2 ml に交換し、24時間培養した。その後、1mg/ml ペプシン溶液を各 well に 0.1ml 加え、³H-proline ラベルされたコラーゲンを抽出し、酸性および中性下において塩析により精製した。

最終的な沈澱物を 0.5M 酢酸に溶解後、液体シンチレーションカウンター (Beckman LS5801) にてコラーゲンに取り込まれた ³H 活性を測定した。

2.4 コラゲナーゼ活性の測定

定常期のコンフルエントな状態のヒト皮膚線維芽細胞におけるコラゲナーゼ活性の測定は合成基質法⁶⁾ により行った。すなわち、ヒト皮膚線維芽細胞を 60mm シャーレに 1×10⁵ 個ずつ播種し、10% FCS を含む MEM 4ml にて 8 日間培養した。なお、培養液は 4 日毎に交換し、この間に細胞はコンフルエントな状態となった。次に培養液を除去し、試料を溶解した FCS 無添加の MEM 4ml にて 24 時間培養した。その後、細胞を剥離し、超音波破碎したものを酵素試料液とした。

コラゲナーゼ合成基質 (5×10⁻⁴M DNP-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-D-Arg, 0.15M NaCl, 5mM CaCl₂ を含む 50mM トリス緩衝液 (pH 7.5) に溶解) 0.1ml に酵素試料液 0.1ml を加え、遮光下、37°C で 1 時間反応させた。1N HCl 0.5ml を加え反応を停止後、ethyl acetate-n-butanol (3:1) 1ml とともに激しく振盪し、分解産物を有機溶媒層に抽出した。遠心後、有機溶媒層の吸光度 (365nm) を測定した。

2.5 タンパク生成量の測定

活性酸素による細胞障害性を知る目的で、培養上清中に生成されるタンパク量を測定した。培養上清中のタンパク量は Bradford の色素結合法⁷⁾ (BIO-RAD Protein Assay Kit) を用いて定量した。

3. 結 果

3.1 活性酸素のコラーゲン生成に及ぼす影響

活性酸素の培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン生成に及ぼす影響を検討した結果を Fig.-1 に示した。

100μg/ml xanthine と 10 および 100μ U/ml XOD により発生した活性酸素はコラーゲン生成量を有意に抑制した。

一方、100μg/ml xanthine および 100μU/ml

Fig.-1 Effect of reactive oxygen species on collagen production in cultured human dermal fibroblasts.

X : 100µg/ml xanthine
 XOD : 100µU/ml xanthine oxidase
 ROS10 : 100µg/ml xanthine+10µU/ml xanthine oxidase
 ROS100 : 100µg/ml xanthine+100µU/ml xanthine oxidase
 Each value represents the mean±S.D. (n=5).
 **: p<0.01, *: p<0.05, significantly different from control (Student's *t*-test).

XOD はそれぞれ単独ではコラーゲン生成に影響を及ぼさなかった。

また、活性酸素のタンパク生成に及ぼす影響を検討した結果を **Fig.-2** に示した。

トータルのタンパク生成量は活性酸素により減少することではなく、100µg/ml xanthine と 100µU/ml XOD により発生した活性酸素では有意な増加がみられた。

3.2 活性酸素のコラゲナーゼ活性に及ぼす影響

活性酸素の培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラゲナーゼ活性に及ぼす影響を検討した結果を **Fig.-3** に示した。

100µg/ml xanthine と 100µU/ml XOD により発生した活性酸素はコラゲナーゼ活性を有意に促進した。

一方、100µg/ml xanthine および 100µU/ml XOD はそれぞれ単独ではコラゲナーゼ活性に影響を及ぼさなかった。

3.3 活性酸素によるコラーゲン生成の変化に対する活性酸素消去剤の影響

Fig.-2 Effect of reactive oxygen species on protein production in cultured human dermal fibroblasts.

X : 100µg/ml xanthine
 XOD : 100µU/ml xanthine oxidase
 ROS10 : 100µg/ml xanthine+10µU/ml xanthine oxidase
 ROS100 : 100µg/ml xanthine+100µU/ml xanthine oxidase
 Each value represents the mean±S.D. (n=3).
 *: p<0.05, significantly different from control (Student's *t*-test).

Fig.-3 Effect of reactive oxygen species on collagenase activity in cultured human dermal fibroblasts.

X : 100µg/ml xanthine
 XOD : 100µU/ml xanthine oxidase
 ROS10 : 100µg/ml xanthine+10µU/ml xanthine oxidase
 ROS100 : 100µg/ml xanthine+100µU/ml xanthine oxidase
 Each value represents the mean±S.D. (n=3).
 *: p<0.05, significantly different from control (Student's *t*-test).

ラジカルスカベンジャーである SOD と cata-

lase および抗酸化剤である α -tocopherol の活性酸素によるコラーゲン生成の減少に及ぼす影響を検討した結果を Fig.-4 に示した。

catalase および α -tocopherol は活性酸素によるコラーゲン生成の減少を抑制し、その場合のコラーゲン生成量はコントロールとほとんど差がなかった。一方、SOD は活性酸素によるコラーゲン生成の変化に影響を及ぼさなかった。

また、 O_2^- 消去作用を有することが報告されている⁴⁾ チョウジ、ゲンノショウコおよびシャクヤク抽出物の活性酸素によるコラーゲン生成の減少に及ぼす影響について検討した結果を Fig.-5 に示した。

チョウジ、ゲンノショウコおよびシャクヤク抽出物は活性酸素によるコラーゲン生成の減少を有意に抑制した。

3.4 活性酸素によるコラーゲナーゼ活性の変化に対する活性酸素消去剤の影響

活性酸素によるコラーゲナーゼ活性の上昇に及ぼす SOD, catalase および α -tocopherol の影響を検討した結果を Fig.-6 に示した。

Fig.-4 Effect of scavengers on ROS-induced change of collagen production in cultured human dermal fibroblasts.

ROS : 100 μ g/ml xanthine + 100 μ U/ml xanthine oxidase
SOD : 100U/ml superoxide dismutase
CAT : 50U/ml catalase
VE : 20 μ g/ml α -tocopherol
Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=5).

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$, significantly different from control (Student's *t*-test).

catalase および α -tocopherol は活性酸素によるコラーゲナーゼ活性の上昇を抑制したが、SOD

Fig.-5 Effect of crude drug extracts on ROS-induced change of collagen production in cultured human dermal fibroblasts.

ROS : 100 μ g/ml xanthine + 100 μ U/ml xanthine oxidase

Ch : Chouji

Ge : Gennosyouko

Sh : Shakuyaku, 100 μ g/ml

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=5).

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$, significantly different from ROS (Student's *t*-test).

Fig.-6 Effect of scavengers on ROS-induced change of collagenase activity in cultured human dermal fibroblasts.

ROS : 100 μ g/ml xanthine + 100 μ U/ml xanthine oxidase
SOD : 100U/ml superoxide dismutase
CAT : 50U/ml catalase
VE : 20 μ g/ml α -tocopherol
Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$, significantly different from control (Student's *t*-test).

Fig. 7 Effect of crude drug extracts on ROS-induced change of collagenase activity in cultured human dermal fibroblasts.

ROS : 100 μ g/ml xanthine+100 μ U/ml xanthine oxidase
 Ch : Chouji
 Ge : Gennosyouko
 Sh : Shakuyaku, 100 μ g/ml
 Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).
 **: p<0.01, significantly different from ROS (Student's t-test).

は影響を及ぼさなかった。

また、活性酸素によるコラーゲナーゼ活性の上昇に及ぼすチョウジ、ゲンノショウコおよびシャクヤク抽出物の影響について検討した結果を**Fig. 7**に示した。

チョウジおよびゲンノショウコ抽出物は活性酸素によるコラーゲナーゼ活性の上昇を有意に抑制したが、シャクヤク抽出物については抑制傾向はみられたが有意な差ではなかった。

4. 考 察

日光露光部にみられる光加齢皮膚においては、コラーゲン線維が著明に減少していることが知られている¹⁾。この原因として我々は真皮において発生する活性酸素の線維芽細胞に対する傷害性を考え、活性酸素の真皮コラーゲン代謝に及ぼす影響について検討した。その結果、xanthine-XOD系により発生した活性酸素は培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン生成を抑制し、コラーゲナーゼ活性を促進した。これらの結果から、真皮において発生した活性酸素は線維芽細胞に作用し、

コラーゲン生成を減少させ、さらに分解を促進して、結果的にコラーゲン量が減少するのではないかと考えられた。この変化は光加齢皮膚の真皮細胞外マトリックスにみられる変化¹⁾と一致するものであった。但し、今回の合成基質を用いたコラーゲナーゼ活性測定法は、その基質特異性に問題があり⁸⁾、コラーゲン分解に関わるコラーゲナーゼ、ゼラチナーゼ等の線維芽細胞が産生するマトリックスメタロプロテアーゼの総活性を測定しているおそれがある。したがって、コラーゲン分解に関しては今後、他の方法と合わせてコラーゲナーゼおよびゼラチナーゼ等個々の活性の変化を調べて行く必要があると考える。

また、活性酸素によりタンパク生成量の有意な増加がみられたが、培養系において紫外線によってストレスタンパクが生成されることが知られていることから⁹⁾、活性酸素の刺激に応答して線維芽細胞がストレスタンパク様の物質を生成した可能性が考えられた。

今回みられたコラーゲン生成およびコラーゲナーゼ活性の変化が活性酸素の影響によるものであれば、活性酸素消去物質はこれらの変化を抑制すると考えられる。そこで活性酸素消去物質としてラジカルスカベンジャーであるSOD, catalase, 抗酸化剤である α -tocopherolおよび O_2^- 消去作用を有することが報告されている生薬抽出物⁴⁾のうちその活性が強いチョウジおよびゲンノショウコと中程度のシャクヤクを選び、活性酸素によるコラーゲン生成およびコラーゲナーゼ活性の変化に対する影響を検討した。その結果、catalaseおよび α -tocopherolは活性酸素によるコラーゲン生成およびコラーゲナーゼ活性の変化をほぼ完全に抑制したが、SODはこれらの変化に影響を及ぼさなかった。Xanthine-XOD系では、 O_2^- と過酸化水素が発生し、 O_2^- はSODにより過酸化水素に変換される。過酸化水素はcatalase, glutathione peroxidase等の作用により水と酸素に分解され、無毒化されるが、一方では非常に傷害性の強いhydroxy radical ($\cdot OH$)に変化することが知られている¹⁰⁾。今回の結果では、SODが活性酸素による変化に影響を及ぼさなかった。これ

は、今回用いた培養系では生体系とは異なり過酸化水素を無毒化する *catalase* や *glutathione peroxidase* 等が不十分であったために *SOD* が O_2^- から過酸化水素への変換を促進しても、それを十分に無毒化できず、傷害性の強い $\cdot OH$ に変化したためではないかと考える。また活性酸素消去物質の影響を検討した結果から、今回みられたコラーゲン生成およびコラゲナーゼ活性の変化は過酸化水素あるいはそれから発生した $\cdot OH$ により引き起こされたのではないかと考えられた。

チョウジ、ゲンノショウコおよびシャクヤク抽出物は活性酸素によるコラーゲン生成の減少を有意に抑制した。活性酸素によるコラゲナーゼ活性の変化に対してはチョウジおよびゲンノショウコは有意な抑制効果を示したが、シャクヤクは有意な効果を示さなかった。伊藤らは各種生薬抽出物の O_2^- 消去作用について検討し、チョウジおよびゲンノショウコ抽出物はその作用が強いこと、またシャクヤク抽出物は中程度であることを報告しており⁴⁾、今回のコラゲナーゼ活性の結果と一致した。また、生薬抽出物の O_2^- 消去の反応機構は *SOD* による O_2^- の不均化反応とは異なるものであると考えられた。

今回の結果は、あくまで *in vitro* の実験からの推論であり、必ずしも *in vivo* を反映するものではないかも知れない。しかし、少なくとも今回の結果は光加齢皮膚にみられるコラーゲンの変化と一致するものであり、皮膚の光加齢変化の原因に活性酸素の関与を裏付けるものであると考え

る。今後、*in vivo* への移行を検討して行きたい。

5. 総 括

今回の結果から、真皮において発生する活性酸素が光加齢皮膚にみられるコラーゲン線維の著明な減少の原因のひとつである可能性が示唆された。また、チョウジおよびゲンノショウコ抽出物が光加齢皮膚にみられるコラーゲン線維の減少を抑制する可能性が示唆され、化粧品への応用が期待される。

参 考 文 献

- 1) L.M. Kligman and A.M. Kligman, *Photodermatol.*, **3**, 215 (1986)
- 2) A.L. Noris, *J. Invest. Dermatol.*, **39**, 445 (1962)
- 3) H. Meffert et al., *Experimentia*, **32**, 1397 (1976)
- 4) 伊藤三明ら, 香粧会誌, **14**, 196 (1990)
- 5) D.F. Webster and W. Harvey, *Anal. Biochem.*, **96**, 220 (1979)
- 6) Y. Masui et al., *Biochem. Med.*, **17**, 215 (1980)
- 7) M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
- 8) 鶴 大典, 船津 勝, “蛋白質分解酵素 I” p. 139 (1993) 学会出版センター
- 9) T. Muramatsu et al., *J. Invest. Dermatol.*, **98**, 786 (1992)
- 10) 大柳善彦, “SOD と活性酸素調節剤 その薬理作用と臨床応用” p.3 (1989) 日本医学館
(1994年2月18日受理)