シワ形成メカニズムと予防

光老化によるシワの形成機序とその予防

芋川 玄爾*

The biological mechanism underlying UVB-induced wrinkling and its prevention

Genji IMOKAWA *

* *Kao Biological Science Laboratories*

A series of our studies demonstrated that wrinkling on the human face is initiated at the eye corner which is the most frequently sun-exposed area. The depth of the wrinkling was found to be paralleled by the diminished elastic property in the same area, indicating that a significant decrease in the skin elasticity is mainly responsible for the formation of wrinkling. In our studies using rat hind limb skins for elucidating the causative factors of the reduced elasticity, we found that wrinkle formation in the skin following long-term UVB irradiation was accompanied by decreases in skin elasticity and the concomitant curling of elastic fibers in the dermis which suggested that the tortuosity of dermal elastic fibers is an important determinant in reducing the skin elasticity. Since the damage in three dimensional elastic fiber structures seems to be attributable to the partial digestion by elastases, the degradative enzymes for elastic fibers, whose activities in the dermis were enhanced by repeated UVB irradiations, we determined whether the inhibition of elastase activity *in vivo* would prevent the damage of dermal elastic fibers and might eradicate wrinkle formation associated with the loss of skin elasticity. Because the major elastase in the skin under non-inflammatory conditions is skin fibroblast elastase, we used a specific inhibitor of that enzyme to assess its biological role in wrinkle formation. The hind limb skins of Sprague-Dawley rats or hairless mice were irradiated with UVB at a suberythemal dose 3 times a week for 6 weeks. During that period, 0.1-10.0 mM N-phenetylphosphonyl-leucyl-tryptophane (NPLT), an inhibitor of skin fibroblast elastase, was applied topically 5 times a week. NPLT application at concentrations of 0.1-1.0 mM eradicated wrinkle formation in a dose-dependent manner, with a peak for inhibition at 1.0 mM. This inhibition was accompanied by a continued low tortuosity of dermal elastic fibers and a maintenance of skin elasticity. These findings suggest that skin fibroblast elastase plays an essential role in the degeneration and /or tortuosity of elastic fibers induced by cumulative UVB

* 花王株式会社生物科学研究所

irradiation and that its inhibition would provide a desirable model for preventing sun-induced wrinkling. [*Skin Cancer (Japan)* 2003 ; 18 : 157-164]

Key words: Photoaging, Ultraviolet light B, Wrinkle, Elastic fiber, Elastase

はじめに

加齢に伴い、顔面にシワやたるみなどの形態変化が起きることはよく知られており、その主要な悪化要因に紫外線（UVA や UVB）による光老化の影響が報告され、この光老化は非露光部位で起こるような自然老化とは区別されている。シワの形成は病的変化ではないが、典型的な老徴の1つであり、その発生増悪には日光曝露が密接に係わり、今までの日光曝露の程度を示すマーカーとも考えることが出来るので、シワは皮膚における微弱な前癌症状と捉えることも出来るかもしれない。シワの発生にはコラーゲン、エラスチン、グリコサミノグリカンなど真皮マトリックス成分の様々な変化が関わっていることが従来報告されているが、そのメカニズムの直接的な証明としては不完全なものであった。すなわち完成したシワ組織でのコラーゲン、エラスチン、グリコサミノグリカンなどの量的質的变化を捉えてはいるが、その変化がなぜシワ形成につながるのかについては十分な説明がなされていないのが現状であった。我々は従来の代表的メカニズムとしての、シワのエラストーシス（変性エラスチンの蓄積）由来説とは異なり、皮膚の弾力性を司る主要な成分であるエラスチン線維が紫外線によるエラストーシス発現のはるか以前のシワ形成前および初期に変性し、その弾力性を消失することがシワの発生に重要な要因であることを見出し、またこの変性は、皮膚悪性腫瘍の発生にも関与することが報告¹⁾されている種々のプロテアーゼと類似して、真皮線維芽細胞が産生分泌するエラスチン分解酵素、エラスターゼの働きによること

を明らかとした。本報ではこのエラスチン/エラスターゼネットワークの紫外線誘導シワ形成メカニズムへの関与について、我々が行ってきた最近の研究を紹介する。

1. 皮膚の弾力性が低下した部位に一致してシワが形成される

10代から80代までの日本人女性約150名の顔面のシワは加齢とともに程度が増強し、特にシワの発生が最も早く認められる（平均35歳）部位は目尻で²⁾、ほぼ同時に行った皮膚弾力性の測定でも最も早く加齢に伴い弾力性の低下する部位は目尻であった³⁾。しかし顔面よりも紫外線が当たりにくい前腕皮膚では顔面よりも加齢による弾力性の低下は弱く⁴⁾、紫外線の当たりやすい部分では皮膚弾力性（はり）が低下しやすく、結果としてシワが発生しやすいということが推察される。さらにシワの三次元解析で測定した顔面目尻でのシワの深さ（シワの程度）は同部位の皮膚弾力性の低下と強い相関が認められ⁵⁾、皮膚の弾力性が低下した部位と一致してかつ一過性のシワ（笑いジワ）に沿ってシワが形成されることが明らかとなった。この一過性のシワが紫外線により固定される現象は、ヘアレスマウスを用いた紫外線誘導シワ形成実験においても次に述べるごとく証明した⁶⁾。すなわち、ヘアレスマウスの背中では紫外線を連続照射することによって正中線に対して横方向に（額の横ジワに類似した形状の）シワが形成される。しかしマウス皮膚を正中線に平行になるように一過性の人工的な溝（縦ジワ）を瞬間接着剤で作製し、その直後に紫外線を照射しこれを繰り返すとマウス背部皮膚に固定していた方

向と同じように縦シワが形成された。一方、紫外線照射を行わずに一時的に縦方向に固定したのみのマウスでは、固定していた方向にシワは形成されなかった。すなわちヒトの目尻には若い年齢であっても笑いシワのような一過性のシワが形成されるので、このマウスの実験結果をヒト顔面のシワに当てはめて考えると、皮膚にはりがある（皮膚弾力性が高い）ときにはシワは形成しにくい、紫外線を浴びることで皮膚の弾力性が低下して一過性のシワ（笑いシワ）が戻りにくくなり、シワが固定されると考えられる。

2. 皮膚の弾力性低下は真皮弾性線維の変性（湾曲化）による

皮膚が紫外線を浴びて皮膚弾力性が低下するときには、真皮内部ではどのような変化が起きているのかを調べるため、我々は紫外線を照射したときの真皮弾性線維三次元形態の観察を行った。ラットの後ろ足をメルコックス樹脂を用いて灌流固定し、蟻酸にてコラーゲン等を消化することで、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いたラット足底皮膚における真皮弾性線維三次元構造の観察が可能となる⁷⁾。すなわちこの方法では、ラットの腹部大動脈から樹脂を注入し、後ろ足の血管を固定し、自然に近い状態で弾性線維の観察することが可能である（従ってこの方法は背部皮膚には応用できず、足底皮膚に限定される）。自然な弾性線維は直線状にゴムが張っている状態の組織で、皮膚の弾力性の維持はこの直線的な弾性線維の性状に依存している。若齢ラットの弾性線維は高い直線性を保っているが、加齢に伴い湾曲化（直線性の低下）することが明らかになっている⁸⁾。ここで若齢のラット足底皮膚に1MED（最小紅斑量）以下の紫外線（UVB）を連続して照射すると、皮膚の弾力性低下と一致して真皮弾性線維の直線性が失われて湾曲化することが明らかになり（図1、2）⁹⁾、従って皮膚は紫外線を浴びるこ

とにより、まず弾性線維の三次元構造（直線性）が変化し、皮膚弾力性が低下する結果、シワが形成されるものと推察される。

3. 弾性線維分解酵素（エラスターゼ）阻害剤でシワが予防できる

このように、日常レベルの紫外線でも、連続して浴びることで光老化を起し、弾性線維が湾曲化し、結果として皮膚の弾力性が低下してシワが形成されることが明らかになってきた。そこでこの弾性線維の湾曲化はどのようなメカニズムで起こっているのか検討した。培養表皮細胞に紫外線を照射してその培養上清液を真皮線維芽細胞に添加すると、真皮線維芽細胞のマトリックスプロテインおよびそれらの分解酵素の中でコラーゲン合成およびエラスターゼ遺伝子発現が顕著に上昇することが認められた。一方コラーゲナーゼおよびエラスチン合成の遺伝子には殆ど変化が認められず、表皮細胞は紫外線照射により真皮線維芽細胞にコラーゲン合成およびエラスターゼ産生を促進する因子を分泌することが明らかになった。従って、この紫外線照射により表皮細胞分泌因子を介した真皮線維芽細胞の産生するエラスターゼ酵素が弾性線維の変性を誘導している可能性が示唆された。このエラスチン線維の変性もしくは消失がエラスターゼの活性・亢進により引き起こされ、コラーゲンが全く正常にもかかわらず、シワが形成される病気としては真皮中層 mid-dermal elastolysis が知られている。これらの事実に基づいて、実際の紫外線照射により真皮エラスターゼ活性が亢進し、弾性線維を分解・変性させ、その結果起こる皮膚弾力性低下によりシワが形成されるメカニズムを実証するために真皮線維芽細胞エラスターゼ阻害剤を新しくデザインし、シワ予防効果の有無を検証した。前述したラット足底およびヘアレスマウス背部皮膚に1MED以下のUVBを連続照射すると真皮中の弾性線維分解酵素エラスターゼ（線維芽細胞由

図1. ラット足底皮膚の真皮弾性線維走査型電子顕微鏡像
A: UVB を照射していない9週齢ラットの弾性線維
B: 3週齢から6週間 UVB を照射すると同時に80% EtOH を塗布したときの弾性線維
C: 3週齢から6週間 UVB を照射すると同時に1mM NPLT を塗布したときの弾性線維

図2. ラット足底皮膚へのUVBの連続照射による皮膚弾力性(キュートメーターによる測定)の減少と弾性線維直線性(走査型電子顕微鏡像からの測定)の低下

来エラスターゼ)の活性は予想通り有意に上昇した(図3)¹⁰⁾¹¹⁾。この線維芽細胞エラスターゼを特異的に阻害し(図4),易吸収性である化合物(N-phenetyl-phosphonyl-leucyl-triptphan; NPLT)を合成し,ラット足底皮膚やヘアレスマウス背部皮膚に1MED以下のUVB照射後に塗布し,これを6週間あるいは15週間続けることで,control(80%EtOH)と比較して濃度依存的に有意に真皮弾性線維の湾曲化が抑制さ

れ(図1),皮膚弾力性の低下を防ぎ,さらにシワの形成が予防されることが明らかになった(図5)¹⁰⁾¹¹⁾。ヒト顔面のシワに対しても,生薬から抽出した線維芽細胞由来エラスターゼ阻害エキスを配合クリームを1年間塗布することで,プラセボ塗布部位と比較して目尻および下眼瞼の皮膚弾力性の低下を抑制するとともにシワが有意に予防および改善されることが明らかとなっている。従って,紫外線照射により上昇す

図3. ヘアレスマウス背部皮膚への1MED以下のUVB累積照射による真皮中エラスターゼ活性の上昇

図4. NPLTの各種プロテアーゼに対する阻害性
NPLTはフィブробラスト由来エラスターゼを特異的に阻害する

図5. NPLTのUVB照射直後での塗付によるシワ形成の抑制
UVBサンスクリーン剤Parsol MCXのUVB照射後の塗付ではシワの抑制効果は認められない

る線維芽細胞由来エラスターゼ活性を阻害することで、弾性線維の変性（湾曲化）を防ぎ、皮膚弾力性が維持される結果、シワの予防が可能であることが明らかとなった。

4. まとめ

以上の我々の研究からシワの発生メカニズムが皮膚の弾力性の変化に基づいて起きており、この皮膚弾力性は真皮弾性線維の三次元構造と密接に関わっていることが初めて明らかとなった。さらに真皮弾性線維の三次元構造の変性に関与している因子としては紫外線刺激により真皮線維芽細胞より産生されるメタロプロテアー

ゼの一種であるエラスターゼが中心的な役割を果たしていることも明確となった。この一連のシワ発生メカニズム（図6）はエラスターゼ阻害剤の塗布により紫外線によるシワ形成が顕著に予防されたことから証明された。臨床レベルでもこの線維芽細胞エラスターゼ阻害剤はヒト顔面皮膚のシワ形成を予防/改善することも実証されている。すなわち現在シワ予防目的でも用いられているUVカット化粧料に加えて紫外線曝露後においてもシワの予防が可能であるケミカルも見出され、シワを代表とする光老化の予防システムが従来に比べてより充実している。

図 6. シワ発生メカニズムとその予防システム

文 献

- 1) Starcher B, O'Neal P, Granstein RD, Beissert S : Inhibition of neutrophil elastase suppresses the development of skin tumors in hairless mice. *J Invest Dermatol*, 107 : 159-163, 1996
- 2) Tsukahara K, Takema Y, Kazama H, Yorimoto Y, Fujimura T, Moriwaki S, Kitahara T, Kawai M, Imokawa G : A photographic scale for the assessment of human facial wrinkles. *J Cosmet Sci*, 51 : 127-139, 2000
- 3) Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M : The relationship between age-related changes in the physical properties and development of wrinkles in human facial skin. *J Soc Cosmet Chem*, 46 : 163-173, 1995
- 4) Takema Y, Sakaino Y, Imokawa G : Age-related changes in the mechanical properties and thickness of human facial skin. *Brit J Dermatol*, 131 : 641-648, 1994
- 5) Akazaki S, Nakagawa H, Kazama H, Osanai O, Kawai M, Takema Y, Imokawa G : Age-related changes in skin wrinkles assessed by a novel three-dimensional morphometric analysis. *Br J Dermatol*, 147 : 689-695, 2002
- 6) Takema Y, Fujimura T, Ohsu H, Imokawa G : Unusual wrinkle formation after temporary skin fixation followed by UVB irradiation in hairless mouse skin. *Exp Dermatol*, 5 : 145-149, 1996
- 7) Imayama S, Braverman IM : Scanning electron microscope study of elastic fibers of the loose connective tissue (superficial fascia) in the rat. *Anat*

Rec, 222 : 115-120, 1988

- 8) Imayama S, Braverman IM : A hypothetical explanation for the aging of skin. Chronologic alteration of the three-dimensional arrangement of collagen and elastic fibers in connective tissue. Am J Pathol, 134 : 1019-1025, 1989
- 9) Imokawa G, Takema Y, Yorimoto Y, Tsukahara K, Kawai M, Imayama S : Degree of ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent. J Invest Dermatol, 105 : 254-258, 1995
- 10) Tsukahara K, Takema Y, Moriwaki S, Tsuji N, Suzuki Y, Fujimura T, Imokawa G : Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. J Invest Dermatol, 117 : 671-677, 2001
- 11) Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G : The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation : implication through selective inhibition of elastase activity. Photochem Photobiol, 74 : 283-290, 2001