

環境ストレスと皮膚

Enviromental Stress and Skin

○ 伊達 朗 (P&G ジャパン・神戸テクニカルセンター)

Akira DATE, P&G Japan Kobe Technical Center

Key Words: Aging Skin, Anti-Oxidation Enzyme, Catalase, Stratum Corneum, Tape Stripping, Noninvasive

1. はじめに

歳をとれば、シミ・シワ・たるみといった『年齢のサイン』が現われ、多くの女性はこれらに対して特に敏感となってきた。近年、美しく歳を重ねると言う思考と相まってアンチ・エイジング（抗加齢）に対するニーズが拡大する傾向にある。皮膚の老化は、大きく、内因性老化と外因性老化に分けられ、内因性老化は、主として遺伝的にプログラムされた老化であり、外因性老化は、紫外線障害、環境汚染、激しい天候、喫煙等の外的要因が加わったものである。生体は、環境ストレス（活性酸素、発ガン物質、環境汚染物質）に曝されているが、その環境応答に関する様々な生体防御遺伝子の働きによって、その恒常性を維持している。皮膚では、活性酸素種(Reactive Oxygen Species ; ROS)が、紫外線による皮膚障害、光老化、色素沈着のプロセスにおいて重要な役割を担っており、その詳細なメカニズムが研究されている。ROSは、生体細胞内におけるエネルギー代謝過程で生じるものであり、スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシシラジカル ($\cdot OH$) 及び一重項酸素 (1O_2) の4種類がある。

カタラーゼは、ROSの一つである過酸化水素(H_2O_2)の分解を触媒する酵素であり、過酸化水素を水と酸素に分解することで、生体内の過酸化水素濃度を低く維持し、細胞や組織への酸化障害を回避する働きがあるため、抗酸化酵素とも呼ばれる。皮膚は、その面積や代謝量から考えると「最大の臓器」とも言えるが、カタラーゼは表皮細胞、メラノサイト、線維芽細胞等あらゆる皮膚細胞に存在し、自然光に含まれる紫外線等の光ストレスによって生じた活性酸素傷害を防御している¹⁻⁵⁾。Bangらは、高齢および若年群において、アレルギー性接触皮膚炎男性患者の皮膚（全層）中のカタラーゼ量が、健康皮膚と比較して低いことを報告している⁶⁾。カタラーゼは、皮膚の最外層である角質層にも存在し、皮膚の深度とともに濃度勾配的に増加する一方で、紫外線A波暴露により低下し、また加齢により回復が低下することが報告されている⁷⁾。これらの臨床学的知見から、光ストレスによる皮膚内部状態の変化が、皮膚表層の抗酸化酵素の活性の変化で観察できる可能性が示唆される。

我々は、皮膚の光ストレスの評価に用いるバイオマーカーとして、活性酸素種の消去分解酵素であるカタラーゼ活性に注目し、非侵襲、簡便、即時測定可能な皮膚酵素測定用センサの開発を進めている。今回、年齢の異なる紫外線暴露及び非暴露皮膚において、GeneChipアレイを用いた抗酸化機能に関するゲノム解析の結果と、最近開発した角質カタラーゼ活性を用いた光ストレス評価法の有効性について報告する。

2. 加齢皮膚の抗酸化機能に関するゲノム解析

生体は外的なストレス（活性酸素、発ガン物質、環境汚染物質）に曝されているが、その環境応答に関する様々な生体防御遺伝子の働きによって、その恒常性を維持している。皮膚では、活性酸素種が紫外線による皮膚障害、光老化、色素沈着のプロセスにおいて重要な役割を担っており、その詳細なメカニズムが研究されている。抗酸化応答配列(ARE)は、転写因子 NRF2 の下、第二相酵素群及び抗酸化タンパク質群を誘導する転写制御配列であり、その関連遺伝子の誘導は、酸化障害から皮膚を防御する上で、重要な役割を果たしていると考えられている。

今回、年齢の異なる紫外線暴露及び非暴露皮膚において抗酸化機能に関するゲノム解析を実施し、年齢・紫外線暴露の影響を検討した。本試験の被検者は、米国オハイオ州シンシナティ在住で、長期紫外線暴露による光ダメージ及び光老化症状があることを自己申告した18-20歳の健康女性10名及び60代(60-67歳)の健康女性10名の合計20名である。本試験のプロトコルは、米国P & G社及びシンシナティ大学の両倫理委員会の承認を受けた。被検者には、皮膚科医が検査の趣旨を口頭と書面の双方で十分に説明し、十分なインフォームドコンセントが得られた後に実施した。皮膚サンプルの採取には、直径4mmの専用パンチを用い、非露光部位である臀部及び露光部位である上腕外側部の皮膚を採取した後、RNAの抽出、精製を行った。ターゲットとなるcRNAを合成し、HG-U133A microarrays (アフィメトリックス社、USA)を用いて、加齢皮膚の抗酸化機能に関するゲノム解析を実施した。抗酸化機能に関する代表的な転写遺伝子であり、ARE関連遺伝子であるNRF-2が、年齢、紫外線の影響で、その遺伝子発現が有意に低下していた (Fig.1)。

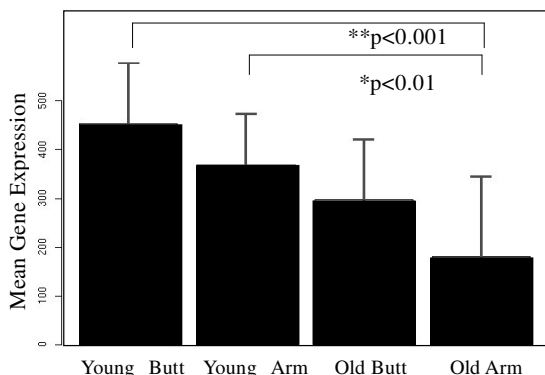


Fig. 1: Clinical Genomic Study: NRF2 gene expression

The genomics study shows that there are NRF-2 gene expression among acute/chronic photo damages and chronological aging. NRF2 regulates genes with ARE (antioxidant response elements). NRF-2 gene expression was decreased by photo damage in both young and old subjects. This key transcription factor that regulate protective mechanisms were down-regulated with aging.

また、過酸化水素 (H₂O₂)の合成に関与するSOD3, AOX1が、年齢、紫外線の影響でその遺伝子発現が有意に増加していた(p<0.05)。一方、過酸化水素 (H₂O₂)の消去に関与するGPX2の遺伝子発現が、年齢の影響で有意に低下していた(p<0.05)。過酸化水素 (H₂O₂)を制御する酵素群は、光ストレス評価の重要なバイオマーカーになると考えられる。

3. 角質カタラーゼ活性を用いた光ストレス評価法

3-1. 対象と方法

(1) 検査プロトコル

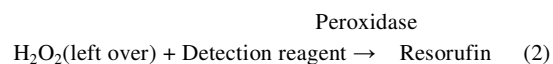
被検者は、秋田県在住で色白であることを自己申告した健康女性 61 名 (27.03 ± 13.58 歳, mean ± SD) である。本検査のプロトコルは、岩手大学倫理委員会の承認を受けた。被検者には、検査の趣旨を口頭と書面の双方で十分に説明し、十分なインフォームドコンセントが得られた後に実施した。

角質の採取には、直径 22 mm の円形状アクリル樹脂性粘着テープである角質採取テープ (D-Squame Standard Sample Disc, D100, CuDerm Co., USA) を用い、頬と上腕内側の角質を採取した。角質採取テープを 30 秒間貼付してから剥離する操作を、同一ヶ所で 2 枚連続して行った。本分析には、2 枚目の角質採取テープのみを用いた。

角質採取テープに付着したタンパクの抽出を行うために、角質採取テープを 1.5 ml のエッペンチューブに入れ、Triton X-100 を 0.1% 含有する 4 mM の酢酸緩衝液 (pH5) を 750 μl 加えた。超音波洗浄器 (2210DTH, Branson Ultrasonics Co., USA) を用いて、37 °C で 30 分間超音波処理を行い、得られたサンプルを -30 °C で保存した。解凍時は、測定の前日にサンプルを 4°C の冷蔵庫に入れることでゆっくりと解凍した。解凍後は、遠心エバポレータ (CE1, 日立工機) を用いて、37 °C で 4 時間処理し、5 倍濃縮後に体積調整を行うことで、150 μl の角質サンプル溶液を得た。

(2) 角質カタラーゼ活性の分析

角質カタラーゼ活性の分析には、カタラーゼ定量キット (Fluorecent Catalase Detection Kit, FLOCAT100-3, Cell Technology Inc., USA) を用いた。次式のように、サンプルに規定量の過酸化水素を添加し、カタラーゼによる酵素反応を行った後に、残留した過酸化水素の定量を行うことでカタラーゼ活性を分析する。



黒色の蛍光測定用 96 ウェルプレートに、角質サンプル溶液を 50 μl, 40 μM 過酸化水素 50 μl を添加し、25 °C でおだやかに振盪しながら 60 分間インキュベーションを行

った。その後、調整した反応混合液を 100 μl 添加し、25 °C で 15 分間インキュベーションを行った。そして、蛍光マイクロプレートリーダー (ARVO MX, Perkin Elmer Inc., USA) を用いて、励起波長 550 nm, 励起波長 550 nm, 測定波長 615 nm におけるレゾルフィン (蛍光基質, C₁₂H₇NO₃) の蛍光強度 RFU (relative fluorescence units) を測定した。最後に、RFU とブランクの蛍光強度の差分 ΔRFU を求め、検量線よりカタラーゼ活性を算出した。ブランクは、未貼付の角質採取テープから抽出されたサンプルの活性とした。

カタラーゼ活性は、角質採取テープの面積をもとに、次式により単位面積当たりの活性に換算した。

$$1 \text{ U/ml} \times 150 \mu\text{l} / 3.8 \text{ cm}^2 = 39.5 \text{ mU/cm}^2 \quad (3)$$

角質採取テープによる採取量の影響を考慮するために、角質サンプルの TP を分析した。TP の分析には、Lowry 法⁽¹⁾ による総タンパク定量キット (DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いた。Lowry 法は、界面活性剤の影響が少なく、感度が高いため、低濃度のサンプル分析に適した方法である。角質サンプル溶液 20 μl と蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、測定波長 755 nm における吸光度を測定し、検量線から TP を算出した。カタラーゼ活性と同様に、単位面積当たりの量 (μg/cm²) で示した。なお、測定感度限界 20 μg/ml 以下のデータを除外した。

(3) 皮膚色彩差の測定

ヒト角質層に含まれるカタラーゼ活性 (角質カタラーゼ活性, CAT 活性) と露光部位である頬の皮膚色の相関を考察するために、色彩色差計 (CR-300, コニカミノルタセンシング) を用いて皮膚色を測定し、CIE-L*a*b*系に準じて皮膚の色彩差を表現した。測定回数は 3 回とし、皮膚色 L*値; 明度, a*値; 赤み, b*値; 黄みの各平均値を算出した。

(4) 統計処理

群間の比較には、t 検定および相関係数を用いた。特に断りのない場合、データは mean ± SD で示した。

3-2. 結果

(1) 部位間の比較

角質カタラーゼ活性は、1.18 – 223 U/cm² の範囲に分布した。各測定部位における平均値は、頬が 96.7 ± 54.1 U/cm², 上腕内側が 99.5 ± 50.5 U/cm² であり、部位間に有意差は観察されなかった。TP は、頬が 3.55 ± 1.18 μg/cm², 上腕内側が 3.16 ± 1.58 μg/cm² となり、部位間に有意差は観察されなかった。

そこで、角質タンパクの採取量のバラツキが酵素活性に与える影響を考慮するために、角質カタラーゼ活性を TP で除算した単位 TP 当たりの角質カタラーゼ活性 (角質カタラーゼ活性/TP 比, U/mg) を求めた。角質カタラーゼ活性/TP 比は、0.51 – 96.99 U/mg の範囲に分布した。各部位における角質カタラーゼ活性/TP 比は、頬が 31.04 ± 17.02 U/mg, 上腕内側が 38.92 ± 21.83 U/mg となり、非露光部位である上腕内側の方が露光部位である頬よりも有意に高い値を示した (Fig.2)。

Fig.3 には、角質カタラーゼ活性/TP 比を年代別で示した。20-39 歳のグループ (n = 25) の角質カタラーゼ活性/TP 比は、頬が 29.84 ± 15.21 U/mg, 上腕内側が 40.23 ± 19.13 U/mg であり、非露光部位である上腕内側の方が露光部位である

頬よりも有意に高い値を示した。一方、19歳以下 ($n = 20$) および40歳以上のグループ ($n = 9$) では、20 - 39歳のグループと同様の傾向を示すものの、色白の程度による個人差、サンプル数に起因する要因が大きく、有意差は観察されなかった。

なお、頬および上腕内側の角質カタラーゼ活性/TP比は、年齢との間に有意な相関はなかった。

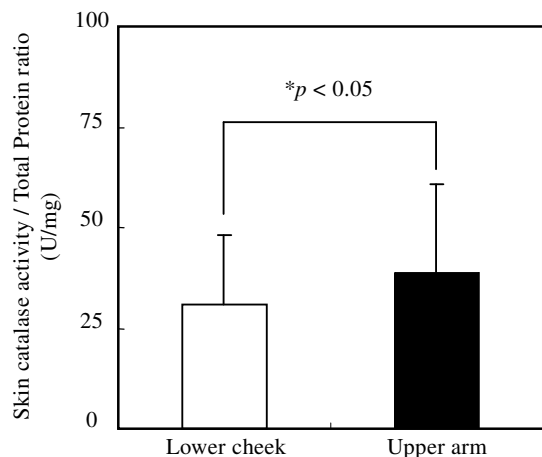


Fig.2. Comparison of skin catalase activity/TP ratio between the lower cheek and the upper arm.

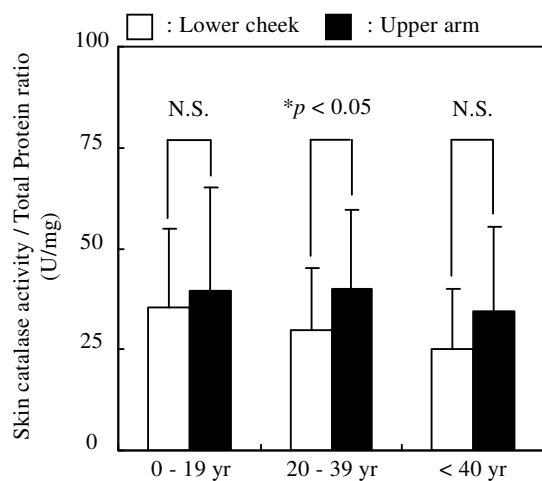


Fig.3. Comparison of skin catalase activity /TP ratio between the lower cheek and the upper arm in three different age groups.

(2) 皮膚色彩差との相関

頬のL*値(明度)は、61.07 - 70.09の範囲に分布し、平均値は、 65.72 ± 2.07 であった。頬のa*値(赤み)は、9.14 - 18.66の範囲に分布し、平均値は 12.14 ± 2.14 であった。頬のb*値(黄み)は、7.47 - 18.96の範囲に分布し、平均値は 12.86 ± 2.33 であった。これらの皮膚色彩差と角質カタラーゼ活性/TP比の間には、統計的な相関性が観察されなかった。

そこで、日本女性の皮膚色として、やや色白肌として位置付けられるL*値60以上65未満の群 ($n = 17$) と、色白肌として位置付けられるL*値65以上の群 ($n = 37$) の2群に分けて、角質カタラーゼ活性/TP比と皮膚の色彩差と

の相関性について検討を行った。

その結果、やや色白肌群(L*値60以上65未満)では、角質カタラーゼ活性/TP比とL*値の間に有意な相関は観察されなかったが、a*値との間に正の相関($r = 0.54, p < 0.05$)、b*値との間に負の相関($r = -0.44, p < 0.05$)が認められた。これに対して、色白肌群(L*値65以上)では、L*値、a*値、b*値のいずれのパラメーターとも、角質カタラーゼ活性/TP比との間に有意な相関は観察されなかった。Fig.4には、角質カタラーゼ活性/TP比を、L*値をもとに色白の程度で群分けした結果を示した。

やや色白肌群の角質カタラーゼ活性/TP比は、頬が 29.28 ± 14.12 U/mg、上腕内側が 44.55 ± 22.29 U/mgとなり、非露光部位である上腕内側の方が露光部位である頬よりも有意に高い値を示した。一方、色白肌群の角質カタラーゼ活性/TP比は、頬が 31.84 ± 18.32 U/mg、上腕内側が 36.34 ± 21.43 U/mgとなり、有意差は観察されなかった。

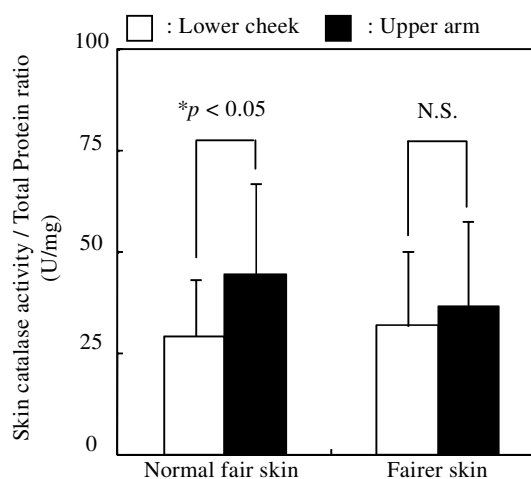


Fig.4. Comparison of skin catalase activity/TP ratio between the lower cheek and the upper arm in different skin fairness tone groups.

3-3. 考察

カタラーゼ活性と光ストレスの関連については、非露光部位である上腕内側の角質カタラーゼ活性/TP比が露光部位である頬よりも有意に高い値を示し、紫外線暴露によってカタラーゼ活性が低下することがわかった。Yamadaらの研究⁸⁾においても、紫外線暴露による角質カタラーゼ活性の低下が確認されており、角質カタラーゼ活性が、紫外線暴露による光ストレスの影響を反映したバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

年齢との関連性については、非露光部位における角質カタラーゼ活性/TP比と年齢との間に有意な相関は観測されず、Giacomoniらの報告⁹⁾と一致する結果となった。一方、露光部位においても同様に相関は観察されなかったが、この結果は、露光部位である前腕外側部の角質カタラーゼ活性が年齢とともに減少するというCorstjensらの報告¹⁰⁾とは異なるものとなった。Corstjensらが米国女性107名を対象とし、色白の程度で群分けしていないのに対して、本研究では、日本の北部に位置する秋田県在住の美白女性を被検者とする中で、色白かつ紫外線暴露の比較的少ない皮膚サンプルを分析対象としたことがその主な理由として考

えられる。また、40歳以上のグループにおいて、上腕内側と頬の角質カタラーゼ活性/TP比に有意な差が見られなかった理由としては、色白の程度での群分け、美白意識が高い色白肌群の存在、及び実験数に起因する要因が多いことが考えられる。

皮膚の色彩差との関連性については、L*値65以上の色白肌群における角質カタラーゼ活性/TP比と、L*値、a*値、b*値の間にそれぞれ相関は見られなかった。質問紙を用いて色白肌群の皮膚状態を確認したところ、被検者の多くが非露光部位、露光部位ともにめだつた肌トラブルはなく、紫外線暴露や炎症による皮膚ストレスがない、透明感の高い、きめのある肌であることがわかった。

一方、L*値60以上65未満のやや色白肌群においては、角質カタラーゼ活性/TP比とL*値の間に有意な相関は見られなかったものの、a*値との間に正の相関、b*値との間に負の相関が観察された。さらに、色白肌群(L*値65以上)では、露光部位と非露光部位の角質カタラーゼ活性/TP比に有意な差が観察されなかったのに対して、やや色白肌群(L*値60以上65未満)では、非露光部位の方が露光部位よりも有意に高い値を示した。色白の程度での群分けでは、平均年齢に大差がないことから、年齢よりもL*値の重要性が示唆された。また、質問紙を用いてやや色白肌群の皮膚状態を確認したところ、露光部位にきめの粗さやくすみといった肌トラブルを持つ被検者の割合が高いことから、日焼けによって色相が赤から黄よりになったと考えられる。このように、ある一定以上の紫外線暴露を受けた被検者の場合には、角質カタラーゼ活性/TP比により皮膚ストレス状態を評価できる可能性が示唆された。

以上、皮膚の光ストレスの程度の評価に用いるバイオマーカーとして、過酸化水素(H₂O₂)を制御する酵素である角質カタラーゼ活性に着目し、露光部位である頬と非露光部位である上腕内側の角質サンプルから、角質カタラーゼ活性と総タンパクを定量した。本研究によって、1)紫外線暴露によるカタラーゼ活性の低下と、2)やや色白肌群(L*値60以上65未満)での光ストレスによる角質カタラーゼ活性の低下が示された。これらより、角質カタラーゼ活性が、紫外線暴露による光ストレスの影響を反映したバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Shindo Y, Witt E, Packer L, Antioxidant defence mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 1993; 100(3): 260-265.
- 2) Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L, Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of skin, *J Invest Dermatol* 1994; 102(1): 122-124.
- 3) Okano Y et al., Catalase activity and carbonylated protein of stratum corneum in atopic dermatitis, *Proc. of the Annual Meeting of the JSID* 2009; 62.
- 4) Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L, The antioxidant network of the stratum corneum, *Curr Probl Dermatol* 2001; 29: 26-42.
- 5) Sander CS et al., Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo, *J Invest Dermatol* 2002; 118(4): 618-25.

- 6) Bang HD, Shin MH, Chung JH, Cho KH, Kim KH, Eun HC, Changes of cutaneous antioxidant enzyme activity in allergic contact dermatitis in young and old individuals, *Exog Dermatol* 2002; 1: 296-301.
- 7) Hellemans L, Corstjens H, Neven A, Declercq L, Maes D, Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery, *J Invest Dermatol* 2003; 120(3): 434-439.
- 8) Yamada S, Development of a sensitive method to measure catalase activity in the stratum corneum: The possibility of catalase activity in the stratum corneum as a parameter of UV-induced skin damage, *Fragrance Journa*, 2007; 35(1): 49-51.
- 9) Giacomoni PU, Declercq L, Hellemans L, Maes D, Aging of human skin: review of a mechanism model and first experimental data, *IUBMB Life* 2000; 49(4): 259-263.
- 10) Corstjens H, Declercq L, Hellemans L, Sente I, Maes D, Prevention of oxidative damage that contributes to the loss of bioenergetic capacity In ageing skin, *Exp Gerontol* 2007; 42(9): 924-929.