

ポリフェノールの皮膚における抗老化作用の検討

金澤 成行

大阪大学大学院医学系研究科形成外科学 博士課程
(現 大阪大学大学院医学系研究科形成外科学 助教)

諸 言

活性酸素・フリーラジカルは生命を維持するために必要であるが、様々な物質に対して非特異的な化学反応をもたらすために、その有害性が近年指摘されている。細胞内の酵素で分解しきれない余分な活性酸素は癌や生活習慣病など様々な病気の原因であるといわれている。また、活性酸素の増加が、細胞を傷つけ癌を増加させるのみでなく、しみ、くすみなどの原因となるメラニンを増加させてしまうことが知られている。そして、活性酸素・フリーラジカルによる細胞のダメージは皮膚の老化にも悪影響をもたらしていると考えられている。

近年、コーヒーに含まれるポリフェノールの一つであるクロロゲン酸が強い抗酸化作用をもち、フリーラジカルの生成を阻害するという仕組みが明らかになった。また、ワイン、茶、リンゴ、ブルーベリーなどに多く含まれるカテキンも抗酸化作用をもち、活性酸素を抑えられている。そこで、抗酸化作用をもつクロロゲン酸やカテキンは皮膚の老化をある程度予防できる可能性があるのではないかと考えた。

皮膚の老化において、主要な役割を担っている細胞の一つに皮膚線維芽細胞がある。皮膚の弾力にとってコラーゲンやエラスチンなどのタンパクは重要であるが、それらを産生しているのが線維芽細胞である。つまり、線維芽細胞の活性化の減弱は皮膚の老化に直結するといえる。したがって、本研究により培養皮膚線維芽細胞を用いてクロロゲン酸やカテキンが線維芽細胞の生存にどのような影響を与えるかを、細胞生存に関連するタンパクに焦点をあてて、明らかにした。

実験方法

1. 細胞増殖試験

線維芽細胞 (NIH3T3) を用いて、96 ウェルプレートに濃度 1×10^5 /ml で培養し、クロロゲン酸 (0、1、10、

100 μ M)・カテキン (0、1、10、100 μ M) を添加し、24 時間後の細胞数を、吸光度 490nm として表されるホルマザン産物の量を測定することで比較した (CellTiter 96[®] R AQ One Solution cell proliferation assay; Promega)。なお、カテキンについては過酸化水素 (0.1mM) による酸化ストレス負荷をかけた後、実験を行った。

2. ウェスタンブロッティング法

線維芽細胞をクロロゲン酸 10 μ M 存在下で 30 分間培養した後、タンパクを抽出し Akt、CREB のタンパク活性の変化を調べた。さらに、Akt の上流である PI3-kinase を LY294002 (10 μ M) で阻害した後、先程と同様に CREB の活性化を調べた。

次に、過酸化水素 (0.1mM) による酸化ストレス条件下にカテキン 10 μ M で線維芽細胞を 30 分間刺激した後、JNK や p38-MAPK の蛋白活性化の状態を解析した。

3. タネル染色

DNA 鎖分解物の標識法 (TUNEL) に基づく単一細胞レベルでの、アポトーシスを免疫組織化学的に検出する In Situ 細胞死検出キット TMR red (Roche) を用いた。過酸化水素 (0.1mM) による酸化ストレスを与えた条件においてカテキン (10 μ M) を加え、24 時間後のタネル染色陽性細胞の数を測定した。評価はタネル染色陽性細胞数/すべての細胞数で行った。

結 果

1. クロロゲン酸、カテキンの線維芽細胞生存促進作用について

最初に、クロロゲン酸が線維芽細胞に与える影響を調べるために、クロロゲン酸を各濃度別 (0、1、10、100 μ M) に添加し、24 時間後の細胞数を解析した。図 1A

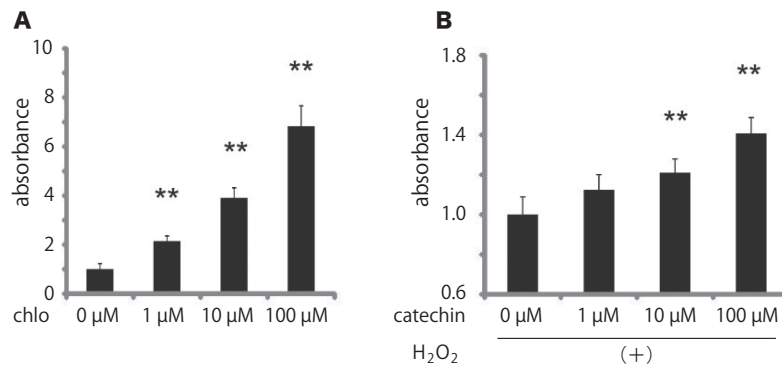


図1 クロロゲン酸・カテキンの線維芽細胞生存促進作用

(A) クロロゲン酸の各濃度 (0、1、10、100 μM) 添加 24 時間後の細胞数
 (B) 酸化ストレス下におけるカテキンの各濃度 (0、1、10、100 μM) 添加 24 時間後の細胞数 ** ; p<0.01

に示すとおり、クロロゲン酸 1、10、100 μM で有意に細胞増殖し、濃度依存性に線維芽細胞の生存を促進することがわかった。

次に、カテキンが酸化ストレス下の線維芽細胞に与える影響を調べるために、カテキンを各濃度別 (0、1、10、100 μM) に添加し、24 時間後の細胞数を解析した。図 1B に示すとおり、カテキンは濃度依存性に線維芽細胞の生存を促進 (細胞死を抑制) した。

2. クロロゲン酸はAkt、CREBを活性化する

種々の増殖因子によって細胞の生存が維持されるが、受容体の下流で活性化される複数の細胞内シグナル伝達機構のうちで、Ras/MAP キナーゼ経路や PI3 キナーゼ

/Akt 経路が生存シグナルに重要である。このうち、PI3 キナーゼ /Akt 経路、そして Akt のターゲット分子の一つである CREB に対してクロロゲン酸が与える影響についてウエスタンブロット法にてタンパクの活性を調べた。

図 2 に示すとおり、クロロゲン酸刺激により Akt、CREB ともにタンパクの活性化を認めた。

さらに、PI3 キナーゼ阻害剤 (LY294002) を用いて PI3 キナーゼ /Akt を阻害すると CREB の活性化の減弱を認め、クロロゲン酸による線維芽細胞生存促進作用が阻害された (図 3)。

以上から、クロロゲン酸は PI3 キナーゼ /Akt/CREB の経路を活性化することにより、線維芽細胞の生存を促進していることが示唆された。

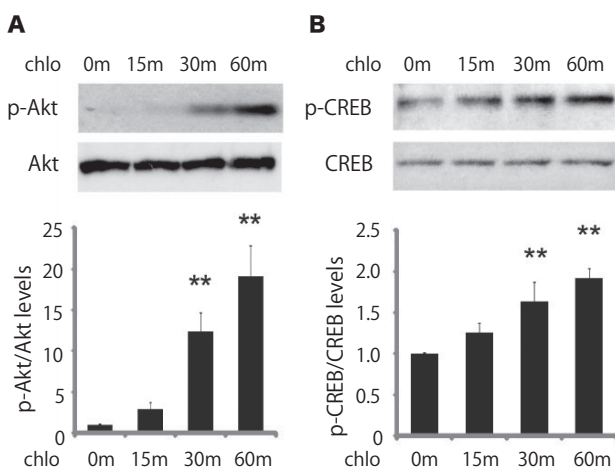


図2 クロロゲン酸刺激によるAkt、CREBの活性化の変化

(A) クロロゲン酸刺激後 0、15、30、60 分後の Akt の活性化を phospho-Akt/Akt で表している。
 (B) クロロゲン酸刺激後 0、15、30、60 分後の CREB の活性化を phospho-CREB/CREB で表している。
 ** ; p<0.01

3. カテキンはJNK、p38MAPKの活性化を抑制する

JNK および p38MAPK は、TNF-α や Fas による刺激や、熱ショック、UV 照射、高浸透圧といったさまざまな物理化学的ストレスで活性化し、細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。カテキンの酸化ストレス下における線維芽細胞に与える影響を調べるために、過酸化水素による酸化ストレス刺激、カテキン添加による JNK、p38MAPK の活性化の変化をウエスタンブロット法で調べた。

過酸化水素による酸化ストレスを与えると JNK、p38MAPK の活性化を認めたが、カテキン添加により、これらの活性化が抑制できた (図 4)。以上より、カテキンは酸化ストレスによる JNK、p38MAPK の活性化を抑制することがわかった。

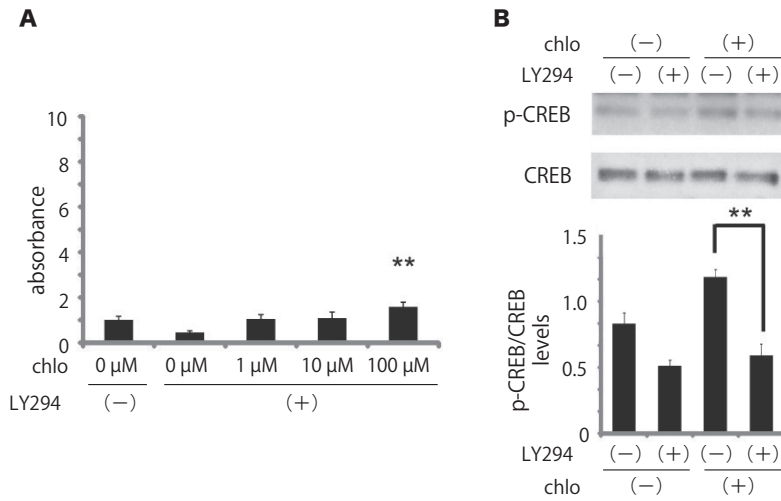


図3 Akt 阻害による細胞生存、CREB 活性化への影響

(A) Akt 阻害下でのクロロゲン酸刺激 24 時間後の細胞数
 (B) Akt 阻害下でのクロロゲン酸刺激による CREB の活性変化
 **: $p < 0.01$

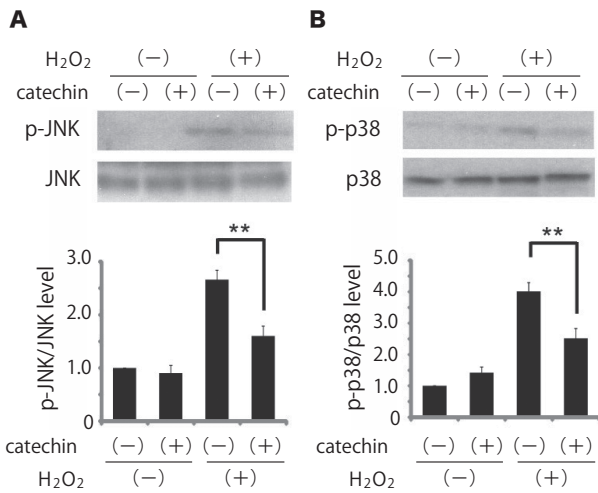


図4 酸化ストレス下におけるカテキン刺激による JNK、p38MAPK 活性の変化

(A) 酸化ストレス下でのカテキン刺激による JNK 活性の変化を phospho-JNK/JNK で表している。
 (B) 酸化ストレス下でのカテキン刺激による p38MAPK 活性の変化を phospho-p38MAPK/p38MAPK で表している。
 **: $p < 0.01$

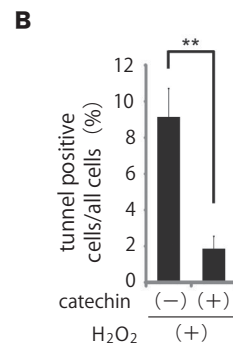
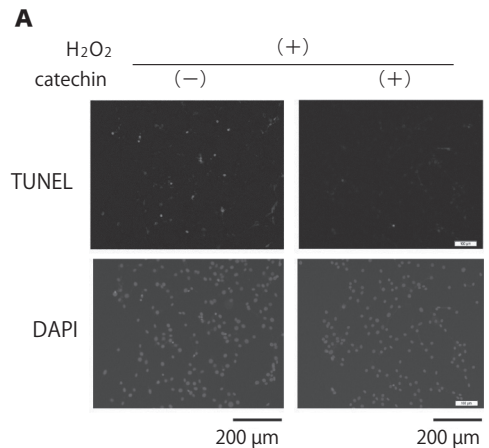


図5 酸化ストレス下におけるカテキン刺激による細胞死の抑制

(A) 酸化ストレス下でのカテキン添加 24 時間後のタネル染色陽性細胞の数を測定した。
 (B) タネル染色陽性細胞数/全ての細胞数で評価した。
 **: $p < 0.01$

4. カテキンは酸化ストレスによる細胞死を抑制する

過酸化水素による酸化ストレス刺激は細胞死を促進する。アポトーシスを起こした細胞を検出できるタネル染色により、カテキンが細胞死を本当に抑制するののかどうかを検証した。先程の結果同様、カテキン添加群にタネル染色陽性細胞数の減少を有意に認めた(図5)。この結果からもカテキンは酸化ストレス下における細胞死を抑制することが示唆された。

考 察

ポリフェノール (polyphenol) とは、分子内に複数のフェノール性ヒドロキシ基 (ベンゼン環、ナフタレン環などの芳香環に結合したヒドロキシ基) を持つ植物成分の総称である。ほとんどの植物に含有され、その種類は300種類以上といわれている。光合成によってできる植物の色素や苦味の成分であり、植物細胞の生成、活性化などを助ける働きを持つとされている。本研究はこれらのポリフェノールのうち、コーヒーに多く含まれているクロロゲン酸と、お茶に多く含まれているカテキンの皮膚線維芽細胞の生存に対する影響について調べたものである。

クロロゲン酸 (chlorogenic acid) は 5-カフェオイルキナ酸 (5-caffeoylquinic acid) と呼ばれ、caffeic acid のカルボキシル基がキナ酸 5 位のヒドロキシ基と脱水縮合した構造を持つ化合物である。コーヒー豆から初めて単離され、現在では多くの双子葉植物の種子や葉から見いだされている。クロロゲン酸の作用についてこれまで多くのことが様々な細胞を用いて報告されている。癌細胞増殖抑制作用¹⁾、解毒作用²⁾、抗炎症作用³⁾、抗酸化作用などである。しかし、これまでクロロゲン酸の線維芽細胞に対する作用は不明なところも多く、報告も少ない。したがって、本研究により、クロロゲン酸の線維芽細胞における作用を明らかにしようと考え、そしてクロロゲン酸による線維芽細胞生存促進作用を発見するに至った(図1)。

哺乳類細胞の生死は生存シグナルと細胞死シグナルのバランスによって決定される。そして、このバランスを決定するメカニズムに様々なキナーゼが関与していることが、近年明らかになりつつある。この生存促進にキナーゼによるシグナル伝達が重要な働きをしている。生存シグナルの代表的なキナーゼが Akt と ERK1/2 である^{4,5)}。本研究においても、クロロゲン酸の線維芽細胞生存促進作用に対して、Akt の関与が認められた(図2,3)。

Akt の細胞生存促進のメカニズムについても近年徐々に明らかになりつつある。アポトーシス誘導因子の中で Akt による制御が初めて明らかとなったのは Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) である。Bad は生存促進型の Bcl-2 ファミリーに属する Bcl-2 や Bcl-xL と結合してそれらを不活性化することで、アポトーシスを誘導する。Akt は Bad の Ser136 をリン酸化して不活性化することで生存を促進することが Datta らにより 1997 年に小脳顆粒細胞を用いて示された⁶⁾。また、Akt は CREB (cAMP-responsive element binding protein) の Ser133 をリン酸化して活性化することが知られている。CREB は生存促進型の Bcl-2 ファミリーである Bcl-2 や Mcl-1 などを転写活性化する。このように Akt は多様なターゲットを持ち、様々な段階でアポトーシスを抑制している。そして、本研究においても、クロロゲン酸の線維芽細胞生存促進作用に対して Akt、そして CREB の関与が認められた(図2,3)。

カテキン (catechin) は、狭義には化学式 C₁₅H₁₄O₆ で表される化合物であり、フラボノイドの 1 種である。広義にはその誘導体となる一連のポリフェノールも含み、この意味での使用例の方が多い。カテキンには実に多様な生理活性があることが報告されており、血圧上昇抑制作用、血中コレステロール調節作用、血糖値調節作用、抗酸化作用⁷⁾、老化抑制作用、抗癌、抗菌、抗アレルギー作用など多岐にわたる。しかし、線維芽細胞におけるカテキンの作用というのはあまりわかっていない。したがって、本研究は酸化ストレス下におけるカテキンの線維芽細胞に対する細胞死への影響を調べた。

MAP (mitogen-activated protein) キナーゼ経路は、細胞内での情報伝達を担っており、哺乳類においては 3 つの代表的な経路から構成されている。これらのうち、JNK (c-Jun N-terminal kinase) ならびに p38MAPK 経路はストレス応答キナーゼとも呼ばれ、紫外線、放射線、酸化ストレスや熱ショックといった様々なストレス刺激や炎症性サイトカインによって活性化され、アポトーシスの誘導をはじめとする多彩なストレス応答に関与している。

JNK は細胞死の制御に重要な役割を担っている Bcl-2 ファミリー分子の機能を調節していることが知られている。アポトーシス抑制にはたらく Bcl-2 は JNK によってリン酸化されてその抑制能が阻害される。一方、p38MAPK は Fas や Bax などのアポトーシスの誘導に関与しているといわれている。本研究では過酸化水素

による酸化ストレスで JNK、そして p38MAPK の活性化を認めた。さらには、カテキンにより、これらの活性化が阻害され、細胞死が抑制された (図 4,5)。つまり、カテキンは酸化ストレスによるアポトーシスを抑制できることが示唆された。

ポリフェノールは、野菜、果物、茶、コーヒー、ココアなど日常的に摂取している食品に含まれている成分で、生体に様々な生理的機能を果たしていると考えられるが、まだ未解明のところが多い。ヒト皮膚の健康におけるポリフェノールの役割を少しでも明らかにすることで、ヒトの健康維持・増進に貢献できることを願ってやまない。

要 約

本研究により、ポリフェノールの一つであるクロロゲン酸やカテキンが皮膚線維芽細胞の生存にどのような影響を与えるかを、細胞生存に関連するタンパクに焦点をあてることで明らかにした。クロロゲン酸には線維芽細胞の生存を促進する作用があり、生存促進の代表的なキナーゼである Akt、その標的分子である CREB の関与が認められた。また、カテキンは酸化ストレスによる線維

芽細胞の細胞死を抑制する作用があり、酸化ストレス刺激によりストレス応答キナーゼである JNK、p38MAPK の活性化を抑制することがわかった。ポリフェノールは、果物、茶、コーヒー、ココアなど日常的に摂取している食品に含まれており、これらを摂取することは、皮膚の健康維持に有益である可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様の御理解と御厚意に深く感謝するとともに厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) MT. Huang, et al.: *Cancer Res.*, 48, 5941-5946, 1988.
- 2) R. Feng, et al.: *J. Biol. Chem.*, 280, 27888-27895, 2005.
- 3) MT. Huang, et al.: *Cancer Res.*, 51, 813-819, 1991.
- 4) H. Dudek, et al.: *Science*, 275, 661-665, 1997.
- 5) Z. Xia, et al.: *Science*, 270, 1326-1331, 1995
- 6) SR. Datta, et al.: *Cell*, 91, 231-241, 1997.
- 7) ME. Cavet, et al.: *Mol Vis.*, 17, 533-542, 2011.