

平成 28 年度 研究経過報告書

研究者名

竹森久美子

研究課題名

紫外線照射による皮膚障害に対する魚類由来エラスチンペプチドの影響

研究目的・内容

本研究では、成熟ヘアレスマウスを用い加齢に加え紫外線照射による皮膚の劣化を促進させた光老化モデルマウスを作成し、その病態を明らかにすることを目的とした。さらに外因性エラスチン塗布による病態抑制効果を明らかにするため、魚類動脈球より高純度なエラスチンペプチドの精製を行い、紫外線照射による皮膚障害に対する魚類由来エラスチンペプチドの影響を検討した。

研究の経過

①エラスチンの精製：魚類動脈球からのエラスチン精製は、Pardridge (1963)らの化学的分解手法に基づき実施した。今回、近大マグとハマチ動脈球を材料として使用した。近大マグは養殖魚であり、精製エラスチンを電子顕微鏡で観察してみると、脂質残存量が非常に高く、ホモジナイザーによる破碎後の脱脂・脱水が困難であった。そこで、今回はハマチ動脈球から精製・可溶化した。可溶化したエラスチン溶液を用い、エラスチンに特有の熱コアセルベート能の有無により α エラスチンと β エラスチンを分離した。可溶化したエラスチン溶液は透明だが、温度を 60°C に上昇させると次第に混濁し、温度が低下すると再び透明になる(熱コアセルベーション)。析出したものを α -エラスチン、残りを β エラスチンとした。その状態を維持したまま遠心分離し、沈殿を α -エラスチン画分としてモデルマウスに対する塗布実験を行った。

②紫外線照射モデルマウスの作成とローション塗布実験：生後 18 週齢雄性ヘアレスマウス (Hos:HR-1) に 2 日に 1 回紫外線照射 (UVB $1.5\text{mW}/\text{cm}^2$) し、週単位で、照射線量・照射時間を増加させていき、紫外線照射による光老化モデルを作成した (UV 群)。照射直後に 1%エラスチンペプチド含有ローション (EL 群) およびプラセボローション (PL 群) を塗布した。18 週間後に皮膚を摘出し、組織学的観察 (HE 染色)、引張試験、増殖因子 (TGF, EGF) ならびに細胞周期関連因子 (p53, Ki67) の発現解析 (realtime PCR 法) を実施した。

③結果:Control 群と比較して UV 群の背部皮膚は粗造で硬く、紫外線障害が明瞭であった。一方、PL 群と EL 群では、これらの程度はいずれも軽微であった。また、表皮の厚みを光学顕微鏡下で計測したところ、UV 群： $101 \pm 15 \mu\text{m}$ 、PL 群： $90 \pm 19 \mu\text{m}$ 、EL 群： $67 \pm 14 \mu\text{m}$ となり、EL 群で最も薄く、表皮の肥厚が有意に抑制されていた。この皮膚片の引張試験を行ったところ、UV 群では伸展性の低下が著しかったが、EL 群は UV 群 PL 群に比べ高応力・高ひずみで破断しており、伸展性が良好であった。また、EL 群では増殖因子 EGF の発現が低値であったが、細胞増殖抑制因子である p53 の発現も低値であった。

Ki67はUV群に比べてPL群, EL群で低値傾向であり, 表皮の厚み計測の結果とある程度一致していた。これらの結果に意義については, 今後の課題である。

④まとめ: 以上の結果から, エラスチンペプチドは, 紫外線に対する表皮保護作用を有することが示唆された。今後は, 皮膚への浸透性の高い条件を確立するため, エラスチンペプチドの精製や投与量・投与方法を再検討するとともに, その機序を明らかにする予定である。

本研究と関連した今後の研究計画

①エラスチン精製条件の検討: 近大マグロは養殖魚であり, 脂質含量が高く, 今回エラスチンの精製度が非常に低下した。ホモジナイザーによる破碎後の脱脂・脱水が困難であったことから, 次年度は多検体体細胞破碎機(安井器械)を用いて動脈球を粉碎し, 溶媒の浸透性を高め, 効率化を図る(多検体体細胞破碎機本体は農学部の既存のものを使用できるため, 粉碎容器の購入のみで対応できる)。

②溶剤の検討: 今回, 浸透性を優先してローションを使用した, 皮膚表面への滞在時間を延長できるクリームも使用し, 両者の効果の比較を実施する。

③紫外線照射皮膚片の増殖因子および細胞周期関連因子発現解析の再検討: 紫外線照射モデルに対してエラスチンペプチドを塗布すると, 皮膚における細胞増殖因子と増殖抑制因子両方の発現が抑制された。その原因として背部に対する紫外線照射で, 線量・強度の均一化が困難で採取試験部位による差が大きいこと, 材料として表皮だけを完全に採取することは不可能で, 本実験では真皮を含む皮膚から抽出しているなど, 採取材料の問題が考えられる。皮膚切片の免疫染色を行い, その局在を明らかにしたうえで, 組織ホモジネートによるタンパク質発現解析を実施するなど, 発現解析の方法を改良する予定である。

成果の発表

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	平成 29 年 3 月 18 日

(平成 29 年 3 月 31 日現在)