

資 料

クロモジ枝抽出物によるヒト真皮線維芽細胞の紫外線損傷DNAに対する修復効果

牧野 正知^{*},^{**}・太田 ゆかり^{**}・勝部 拓矢^{*}

1. 目 的

我が国の総人口は、平成29年10月1日において1億2,671万人である。65歳以上の人口は3,515万人で、総人口に占める割合は27.7%となった¹⁾。高齢化率は、出生率の低下に伴う人口自然減少と医療技術・栄養状態の向上による寿命延長によって今後も上昇するものと予想されている。島根県産業技術センターでは、平成24年度から平成29年度にかけて高齢化社会対応の機能性素材開発プロジェクトを実施し、このような社会背景に対応するための研究開発を進めてきた。そのうち筆者らは皮膚老化に焦点を絞り機能性素材の開発を行った。

皮膚は、外界からの刺激に対しての感知・応答、境界の形成、熱交換、物質の透過排泄といった多機能を有する身体最大の器官である²⁾。また他の臓器組織と異なり外界に直接露出しているため、顔面や首などの老化現象は目につきやすくかつ個人差も強く現れる。そのため高齢者のみならず性別年代を超えて皮膚老化に対する関心は高い。その老化は他の臓器組織と同様に経時的で、老廃物の蓄積、機能性蛋白質の劣化、細胞内シグナル伝達の破綻などから組織障害や構造機能不全を惹起する退行性変化によると考えられている。またタバコの煙、環境ホルモンやホルムアルデヒドなどの化学物質や太陽紫外線に対する暴露のほか、乾燥、熱、寒冷など環境に依存するストレスによる外因老化も上乘せされる。特に皮膚の太陽紫外線への暴露はマトリックスメタロプロテアーゼやエラスターゼの発現を誘導し、それに引き続く膠原線維や弾性線維の分解・断裂によって美容上好ましくないシワやシミ、たるみなどの表現系変化をもたらす³⁻⁵⁾。

紫外線は波長によってUVA (315-400 nm)、UVB (280-315 nm)、UVC (100-280 nm) に分類される⁶⁾。この中で最もエネルギーが高く有害なUVCはオゾン層や大気中の酸素分子によって吸収されるため地表には届かず老化には寄与しない。UVBはUVAと比較して1,000倍程度エネルギーが強く⁷⁾、日光暴露に引き続き起こるサンタンやサンバーン、皮

膚の炎症、免疫抑制の原因となるほか、核DNAを直接的に酸化損傷しシクロブタンピリミジン二量体（以下CPDと略す）や6-4光産物を生成する⁷⁻⁹⁾。これらのDNA損傷は遺伝情報の欠失や改変になるため、生体はその修復機構であるヌクレオチド除去修復（以下NERと略す）によって恒常性を維持している¹⁰⁾。しかし加齢に伴い、NERの一つであるCPD除去修復機能は低下する^{11), 12)}。また先天的にNER機能の欠損あるいは低下した色素性乾皮症やコケイン症候群などの遺伝性疾患では、若くして老人様顔貌、シミそばかす、ドライスキンなどの加齢様症状が強く見られることから、DNA損傷あるいはその修復は皮膚老化に強く関係していると考えられている¹³⁾。従ってその修復を助けることで皮膚老化に対応できると考えられた。

本研究では島根県内で栽培されている植物や自生している植物、島根県産業技術センターで保有している微生物などを収集し、これらのうちCPD除去修復を促進するものを皮膚の培養細胞を用いた評価系により探索した。そしてそこから効果が見出されたクロモジ枝について詳細な検証を行ったので、その結果について報告する。

2. 試料および方法

2.1 収集した試料原料

島根県内で栽培されている植物、自生している植物あるいは島根県産業技術センターで分離した乳酸菌を試料原料として収集した。内訳は野菜（葉あるいは豆、44種類）、樹木（葉、枝、樹皮あるいは根、37種類）、山野草（葉、35種類）、果実（果実、果皮、種皮あるいは種子、22種類）、キノコ（子実体、13種類）、乳酸菌（破砕液、9種類）、ハーブ（葉、6種類）、花（花卉、2種類）である。

2.2 試料調製

試料原料は、凍結乾燥後、それぞれ熱水抽出とエタノール抽出に供した。前者は乾燥試料原料にその重量の20倍体積量の加熱した蒸留水を加え、湯浴上で20分間保持して抽出した。得られた抽出液は濾過・濃縮したのち凍結乾燥させ、これを熱水抽出物とした。後者は乾燥試料原料にその重量の20倍体積量の60% (v/v) 含水エタノールを加え、遮光し一晩攪拌して抽出した。得られた抽出液は濾過・濃縮したのち凍結乾燥させ、これをエタノール抽出物とした。熱水抽出物とエタノール抽出物を50 mgずつ採取し、それ

高齢化社会対応の機能性素材開発プロジェクトチーム
(*現：生物応用科, **現：生物機能応用技術開発プロジェクトチーム)

ぞれ1 mLの超純水と1 mLの60% (v/v) 含水エタノールで溶解したのち、遠心分離して得られた上清を熱水抽出物試料とエタノール抽出物試料として以後の実験に使用した。

2.3 残存CPD量測定によるCPD除去修復促進機能のスクリーニングと経時変化

10% (v/v) 牛胎児血清 (Gibco, Invitrogen Japan, Tokyo, Japan) 含有イーグル最小必須培地 (以下培地と略す, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) に正常ヒト真皮線維芽細胞 (以下NHDF細胞と略す, Lonza, Inc. Walkersville, MD, USA) を懸濁し, 96ウェルプレートに10,000細胞/ウェルで播種してCO₂インキュベータ (5% (v/v) CO₂, 37°C) 内で2日間培養した。

96ウェルプレートの各ウェルの培地を100 μLのリン酸緩衝生理食塩水 (以下PBSと略す) に置換したのち, UVBランプG15T8 (Sankyo Denki, Japan) を用いて発生させたUVBをプレートの上方30 cmから照射した。このとき一部のウェルはアルミシールを貼りUVBが照射されないようにして, 後述するELISA測定における陰性対照とした。UVB暴露量は, Radiometer Sensor UVX-31 (Analytik Jena US LLC, CA, USA) により測定した310 nmにおけるUVBの輝度と露光時間で調節した。本実験における総暴露量は, 細胞へのダメージとCPD発生量を予め検討して9 mJ/cm²とした。

UVB照射後, 試料を含む培地と試料を含まない培地とにそれぞれ置換して, 引き続きCO₂インキュベータ内で保持しNHDF細胞に作用させてCPD除去修復を図った。スクリーニングの際は試料を含む培地として, 熱水抽出物試料またはエタノール抽出物試料を培地でそれぞれ50倍希釈 (2.0% (v/v)) したものをを用いた。UVB照射後8時間経過した時点でウェル内のNHDF細胞をアセトン-メタノール液 (-20°C, 1:1容量) により10分間作用させ固定化した。CPD量は西永らの方法¹⁴⁾ に従い, 抗CPD抗体¹⁵⁾ を用いたELISA法により求めた (n=3)。各試料におけるCPD量は, 培地のみを作用させた8時間後のそれを100%とした相対値を計算して比較した。

経時的なCPD量の変化を検証する際は, UVB照射後0 (照射終了直後), 1, 4, 7時間の時点で細胞固定を行い, 上記と同様の方法で残存するCPD量を測定した (n=3)。なおこの場合, 1, 4, 7時間後のCPD量は, 0時間時のそれを100%とした相対値を計算して比較した。

2.4 クロモジ枝抽出試料濃度測定

スクリーニング試験だけでなく詳細を検討したクロモジ枝抽出物については試料濃度の測定を行った。2.2項で調製した熱水抽出物試料とエタノール抽出物試料をそれぞれ500 μLずつアルミ皿に採取し, それらを105°Cの乾燥器中で恒量となるまで乾燥させた。アルミ皿に残留した残渣の重量は精密電子天秤 (Excellence Plus XP, Mettler Toledo International Inc. Tokyo, Japan) で測定した (n=3)。試料

濃度は残留重量の平均値から重量%濃度 (w/v) として求めた。

2.5 細胞生存率測定による細胞毒性評価

培地に懸濁したNHDF細胞を96ウェルプレートに5,000細胞/ウェルとして播種した。CO₂インキュベータ (5% (v/v) CO₂, 37°C) で16時間培養した後, 2.3項と同様に培地をPBSに置換したのち総暴露量9 mJ/cm²となるようUVBを照射した。その後, 速やかに培地のみ, 溶媒対照としての超純水と60% (v/v) 含水エタノール, クロモジ枝の熱水抽出物試料またはエタノール抽出物試料を含む培地にそれぞれ置換した。作用時の試料濃度は2.3項と同様に50倍希釈を基準とし, さらに100, 200, 400倍希釈 (2倍希釈系列, 培地による希釈) とした。溶媒対照もまた試料と同様に希釈してNHDF細胞に作用させた。なお培地のみNHDF細胞に作用させたものを対照 (control) とした。

7時間後の細胞生存率は既報¹⁶⁾ と同様にハイコンテントイメージングの手法で求めた。すなわちHoechst 33342とヨウ化プロピジウム (それぞれDojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を用いて核を染色した。Hoechst 33342で染色された細胞核を全細胞数, またヨウ化プロピジウムで染色された細胞核を死細胞数とし, 撮影画像内のそれらの割合から細胞生存率を求めた (n=3)。

2.6 NHDF細胞相対増殖率の測定

培地に懸濁したNHDF細胞を96ウェルプレートに4,000細胞/ウェルとして播種した。CO₂インキュベータ (5% (v/v) CO₂, 37°C) で17時間培養した後, 熱水抽出物試料を200倍, 800倍, 3200倍となるよう培地で希釈したものに置換した。この際, 培地のみを作用させたものを対照 (control) とした。24時間CO₂インキュベータで培養したのち, テトラゾリウム塩 WST-1 と 1-Methoxy PMS (それぞれDojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を使用した比色法¹⁷⁾ により細胞増殖率を求めた。すなわち超純水に溶解した0.5 mLの2.0 mmol/Lの 1-Methoxy PMSと4.5 mLのWST-1溶液 (16.3 mgを4.5 mLの20 mmol/L HEPES (pH7.4) に溶解) を混合して反応液とし, このうち10 μLを各ウェルの培地に添加した。4時間後の450 nmの吸光度をプレートリーダー (EnSpire; PerkinElmer, Inc., Wellesley, MA, USA) で測定し (n=3), controlにおける吸光度を100%とした相対値を細胞増殖率として比較した。

2.7 統計解析

統計処理ならびにグラフの作成には統計解析言語R¹⁸⁾ を用いた。

3. 結果および考察

3.1 CPD除去修復促進試料のスクリーニング結果

熱水抽出物試料またはエタノール抽出物試料を作用させ, それぞれ8時間後に残存するCPD量の相対値 (相対CPD量) を求め, 試料原料ごとにプロットした (図1)。な

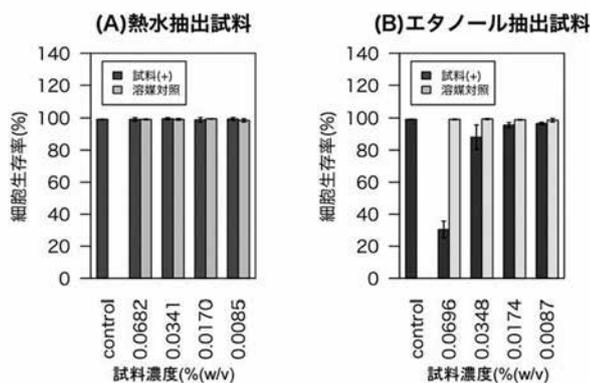


図3 細胞生存率

溶媒対照にはそれぞれ (A) 超純水と (B) 60% (v/v) 含水エタノールを用いた。培地のみを作用させたものをcontrolと表記した。

の促進は、試料作用後1時間で既に始まっており4時間程度で完了することが示唆された。

3.4 クロモジ枝抽出物の細胞毒性

クロモジ枝熱水抽出物試料とエタノール抽出物試料をそれぞれ0.0682% (w/v) と0.0696% (w/v) の濃度で作用させた場合、速やかなCPD量の減少が見られた。この作用が細胞毒性によるものでないか次に評価した。すなわちUVBを9mJ/cm²照射した細胞に、培地のみ (control)、溶媒対照のみ、クロモジ枝熱水抽出物試料またはエタノール抽出物試料をそれぞれ作用させた場合の細胞生存率を比較した (図3)。なお9mJ/cm²のUVBを照射したNHDF細胞に培地のみを作用させたcontrolにおける細胞生存率は99.2±0.1%で、このことは9mJ/cm²のUVB暴露量は細胞生存率に影響を与えないことを示唆している。

クロモジ枝熱水抽出物試料あるいは溶媒対照としての超純水を異なる濃度で作用させた場合の細胞生存率は、いずれの濃度においてもcontrolのそれと有意な差は見られなかった (図3A)。そのためこの濃度範囲におけるクロモジ枝熱水抽出物試料のUVB照射NHDF細胞に対する毒性は、見られないと考えられた。次にエタノール抽出物試料あるいは溶媒対照としての60% (v/v) 含水エタノールを異なる濃度で作用させたところ、前者では作用量に依存した毒性の誘発が見られたが、後者ではいずれの濃度においても毒性が見られなかった (図3B)。このことからエタノール抽出物試料の作用で見られる細胞毒性は、試料の溶解に使用した60% (v/v) 含水エタノールの影響ではなく、むしろ溶解している試料物によるものであると考えられた。

このように熱水抽出物試料が細胞生存率を低下させずにCPD除去修復効果を促進するのに対し、エタノール抽出物はCPD除去修復効果を促進すると同時に細胞生存率も低下させることから、CPD除去修復の促進と細胞ストレスは独立であること、またエタノール抽出物試料には熱水抽出

表1 細胞増殖率の比較

熱水抽出物濃度 (% w/v)			control
0.0170	0.0043	0.0011	
129 ± 2.63 ^a	117 ± 9.95 ^{ab}	110 ± 4.54 ^{bc}	100 ± 4.14 ^c

統計学的に有意であるものについては異なるアルファベットを付した。p<0.05, One-way ANOVA post hot test (Tukey HSD検定, n=3)

物試料と比較してより疎水性の高い成分が多く含まれるため、それらが細胞毒性に寄与するものの、CPD除去修復の促進に関与する成分も含まれていると考えられた。

3.5 クロモジ枝抽出物のNHDF細胞増殖効果の検証

クロモジ枝熱水抽出物あるいはエタノール抽出物による細胞毒性の評価には、細胞核蛍光染色画像による解析を用いた。その際、クロモジ枝熱水抽出物試料を作用させた場合、撮影視野における絶対細胞数が作用濃度によっては対照のそれと比べてやや増えている傾向が観察された。そこでクロモジ枝熱水抽出物試料を異なる濃度で24時間NHDF細胞に作用させ調べることにした。このときの細胞数はWST-1による比色定量法¹⁷⁾によって求め、試料を作用させなかった対照との吸光度の比較から細胞増殖率として求めた。熱水抽出物試料を0.0011% (w/v) の濃度で作用させたところ、controlと比較した細胞増殖率は110±4.54%と増加傾向を示し、0.0170%ならびに0.0043%の作用における細胞増殖率は有意に増加してそれぞれ129±2.63%と117±9.95%となった。また作用濃度依存的に増加していることも示唆された (表1)。

3.6 まとめ

我々は島根県内で栽培されている植物あるいは採取できる植物、また島根県産業技術センターで分離した微生物などを収集し、CPD除去修復を促進する一つの植物原料候補としてクロモジ枝を見出した。またその効果は培養細胞を用いた試験では作用1時間後からと速やかに発揮されることがわかった。

クロモジ (*Lindera*) 属に属する植物の抽出物には、セラミダーゼ活性を阻害することにより美肌、新陳代謝亢進、肌荒れ防止、皮膚老化防止、ニキビ改善、及び消炎作用、並びにメラニン産生抑制作用及び色素沈着抑制作用、繊維芽細胞賦活効果などが期待できると言われているが¹⁹⁾、CPDの除去修復を促進する作用については知られていない。従って今回の結果はクロモジ枝の皮膚に対する新たな効果を示唆するものである。またクロモジ枝熱水抽出物試料をNHDF細胞に作用させると増殖が促進されたことは、皮膚老化の観点から注目すべき効果の一つであるといえる。

皮膚は表層を形成する表皮、それを裏打ちする真皮、そして皮下組織および付属器によって構成されるが、そのうち真皮は細胞外マトリックスとその産生細胞から成り立つ。皮膚の形態を維持する上で特に重要である細胞外マトリックスは、皮膚の力学的な強度を保つ膠原線維、弾力性を与える弾性線維、水分を保持して膠原線維や弾性線維と結合して柔軟性を発揮するムコ多糖や糖タンパク質等の基質などを含んでおり、それらはNHDF細胞で産生・維持されている²⁾。しかし加齢に伴いNHDF細胞の増殖能は低下して²⁰⁾皮膚の機械的・機能的構造の崩壊に至ると考えられている²¹⁾。そのためここで見出したクロモジ枝熱水抽出物によるNHDF細胞の増殖促進効果が*in vivo*においても反映できれば、健康的な皮膚状態の維持に寄与すると期待される。

なおここでは示さなかったがクロモジ葉抽出物試料においてもNHDF細胞の増殖を促進する効果を確認しており、そのため増殖促進に関与する天然化合物は葉と枝に共通して存在することも考えられる。また先に提案されているクロモジ属植物の抽出物によるセラミダーゼ活性阻害は、細胞増殖に対し抑制的に関与すると考えられるが²²⁾、本研究で示したように細胞へ作用させる濃度によっては、セラミダーゼ阻害に引き続く増殖抑制効果よりも増殖効果の方が強く表れる可能性もある。

今回の検討ではクロモジ枝によるCPD除去修復促進がNERによるものかどうか明らかにするには至らなかった。またクロモジ枝に含まれるどのような成分がこれに関与しているかなど明らかにされなければならないことは多い。さらに*in vivo*においてもここで示した複数の効果が発揮されるかについての検証も必要である。なお我々はクロモジ以外の原料でも幾つか効果のあるものも見出しており、これらについても活用方法の検討を今後進めていく。

謝 辞

実験で使用した植物試料の一部のうち、山野草やキノコ類は島根県中山間地域研究センター・富川康之氏、野菜類は島根県農業技術センター・杉山万里氏に収集していただいた。葉草については島根県美郷町役場産業振興課から、またハーブ類については香木の森公園（島根県邑智郡邑南町）からご提供いただいた。また一部の植物については島根県立八雲立つ風土記の丘の風土記植物園にて採取させていただいた。クロモジについては（有）ユーエムディーからご提供頂いた。ここに記して関係各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 内閣府. 平成30年版高齢社会白書, 日経印刷, 2018, p.2-6.
- 2) 清水宏. あたらしい皮膚科学. 第2版, 中山書店, 2011, p.1-36.
- 3) Yaar, M.; Gilchrist, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology*. 2007, vol.157, p.874-887.
- 4) Gilchrist, B. A.; Krutmann, J. *Skin Aging*, Springer, 2006, p.1-53.

- 5) Gordon, J. R. S.; Brieve, J. C. Unilateral Dermatoheliosis. *New England Journal of Medicine*. 2012, vol.366, p.e25.
- 6) ISO 21348:2007. Definitions of Solar Irradiance Spectral Categories.
- 7) Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004, vol.195, p.298-308.
- 8) Setlow, R. B. Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science (New York, N.Y.)*. 1966, vol.153, p.379-386.
- 9) Rycyna, R. E.; Alderfer, J. L. UV irradiation of nucleic acids: formation, purification and solution conformational analysis of the '6-4 lesion' of dTpdT. *Nucleic acids research*. 1985, vol.13, p.5949-5963.
- 10) Reardon, J. T.; Sancar, A. Nucleotide Excision Repair. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2005, vol.79, p.183-235.
- 11) Takahashi, Y.; Moriwaki, S. I.; Sugiyama, Y.; Endo, Y.; Yamazaki, K.; Mori, T.; Takigawa, M.; Inoue, S. Decreased gene expression responsible for post-ultraviolet DNA repair synthesis in aging: A possible mechanism of age-related reduction in DNA repair capacity. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005, vol.124, p.435-442.
- 12) Goukassian, D.; Gad, F.; Yaar, M.; Eller, M. S.; Nehal, U. S.; Gilchrist, B. A. Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000, vol.14, p.1325-1334.
- 13) Cleaver, J. E.; Lam, E. T.; Revet, I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nature reviews. Genetics*. 2009, vol.10, p.756-768.
- 14) Nishinaga, M.; Kurata, R.; Onishi, K.; Kuriyama, K.; Wakasugi, M.; Matsunaga, T. Establishment of a microplate-formatted cell-based immunoassay for rapid analysis of nucleotide excision repair ability in human primary cells. *Photochemistry and photobiology*. 2012, vol.88, p.356-362.
- 15) Mori, T.; Nakane, M.; Hattori, T.; Matsunaga, T.; Ihara, M.; Nikaido, O. Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochemistry and photobiology*. 1991, vol.54, p.225-232.
- 16) Makino, M.; Katsube, T.; Ohta, Y.; Schmidt, W.; Yoshino, K. Preliminary study on antioxidant properties, phenolic contents, and effects of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut) seed shell extract on *in vitro* cyclobutane pyrimidine dimer repair. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 2017, vol.6, p.414-419.
- 17) Ishiyama, M.; Miyazono, Y.; Sasamoto, K.; Ohkura, Y.; Ueno, K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*. 1997, vol.44, p.1299-1305.
- 18) R Development Core Team, R.; R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R: A language and environment for statistical computing. 2017.
- 19) 国立大学法人富山大学; 株式会社伏見製薬所. セラミド調整剤. 特開2017-124984.
- 20) Gunin, G.; Kornilova, N. K.; Petrov, V. V.; Vasilyeva, O. V. Age changes in the number and proliferation of fibroblasts in the human skin. *Advances in Gerontology*. 2011, vol.1, p.299-303.

21) Quan, T.; Fisher, G. J. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015, vol.61, p.427-434.

22) Coant, N.; Sakamoto, W.; Mao, C.; Hannun, Y. A. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances in biological regulation*. 2017, vol.63, p.122-131.