

## 総説 (第19回徳島医学会賞受賞論文)

### UVA 誘導皮膚光老化における脂質過酸化物の役割と抗酸化物質摂取の影響

南 裕子<sup>1)</sup>, 川 畑 球 一<sup>1)</sup>, 横 山 可南子<sup>1)</sup>, 板 東 紀 子<sup>2)</sup>, 河 合 慶 親<sup>2)</sup>, 寺 尾 純 二<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>徳島大学大学院栄養生命科学教育部食品機能学分野,

<sup>2)</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部栄養設計学講座食品機能学分野

(平成19年10月22日受付)

(平成19年10月29日受理)

#### はじめに

皮膚は生体と外部環境とを隔てるとともに、さまざまな外部刺激に対する生体防御の最前線を担っている。この外部環境刺激の一つに紫外線があり、地表に到達する紫外線のおよそ95%は長波長紫外線 UVA が占めている<sup>1)</sup>。UVA は真皮まで到達し、一重項酸素などの活性酸素種 (ROS) の生成を介して組織を傷害し<sup>2)</sup>、皮膚光老化や皮膚がんの発症に寄与していると考えられている。このような ROS による酸化傷害が関与する皮膚光老化は加齢により生じる生理的老化とは区別される<sup>3,4)</sup>。皮膚光老化の特徴である表皮の肥厚、深く大きなシワの形成やたるみには、真皮弾性線維や膠原線維の分解・減少が関与する<sup>5)</sup>。この作用を担うのが Matrix Metalloproteinase (MMP) であるが、UVA 曝露による MMP 活性化の詳細なメカニズムについては不明な点が多い。

皮膚の光老化を予防することは QOL の向上から重要である。そこで、われわれは UVA 誘導皮膚光老化発症における脂質過酸化物の役割を検討するとともに、抗酸化物質摂取による光老化抑制作用を評価している。これまでにわれわれが行ってきた研究の概要とそこで得た知見を以下に述べたい。

#### 1. UVA 誘導皮膚光老化における MMP の役割

UVA による皮膚光老化のモデルとしてヘアレスマウスに8週間反復して UVA 曝露すると、深く大きなシワやたるみ、皮膚の肥厚などの光老化に特徴的な所見がみとめられた (図1)。これは主に真皮弾性線維および膠原線維の断裂によるものであり、真皮構成成分の分解に

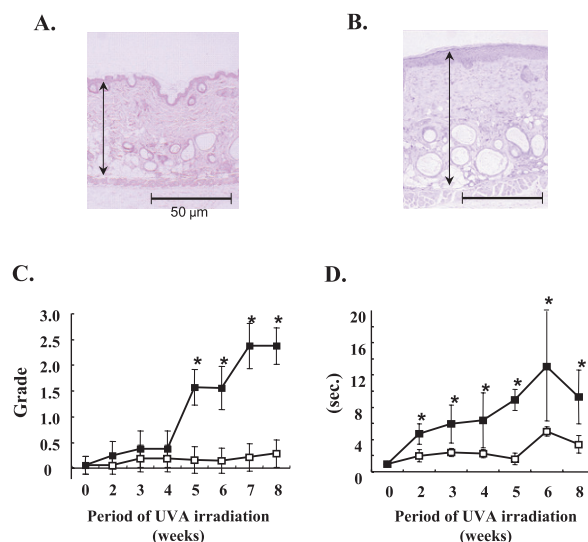


図1 8週間のUVA曝露に伴うヘアレスマウス皮膚の変化  
A: UVA非照射マウスの皮膚HE染色, B: UVA照射マウスの皮膚HE染色, C: シワ形成, D: たるみの強さ (N=10, \*p<0.05)

は MMP が関与すると考えられる。このうち gelatinase である MMP-2や MMP-9は基底膜を構成するIV型コラーゲンや真皮を構成するエラスチン, I型, III型コラーゲンを分解することが報告されている<sup>6-8)</sup>。この MMP-2や MMP-9が真皮コラーゲンや基底膜を分解し<sup>9)</sup>、皮膚構造が保持できなくなることで皮膚は大きく陥没し、深いシワの形成に至る。MMP-2や MMP-9は UV 照射や過酸化水素を含む ROS 曝露によりケラチノサイトや線維芽細胞から誘導され<sup>10,11)</sup>、その発現には JNK, ERK などの MAPK による制御が関与すると考えられる<sup>12)</sup>。実際に、ヘアレスマウスに長期間 UVA を曝露させるこ

とによって、MMP-2、MMP-9活性およびそれらの発現が有意に上昇したことから(図2)、光老化におけるシワ形成にはMMPの活性化が重要であることが確認された。

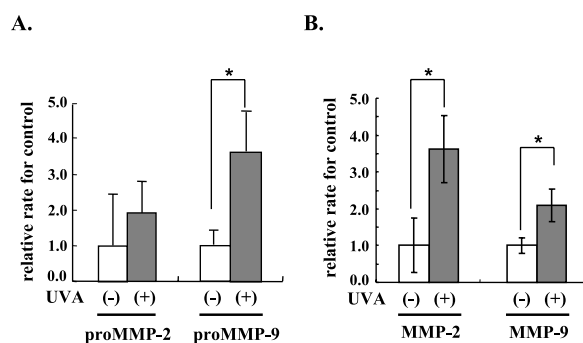


図2 UVA曝露による皮膚のMMP-9活性(A)とタンパク質発現(B)の変化 (N=5, \* $p<0.05$ )

## 2. MMP活性への脂質過酸化物の関与

皮膚へのUVA曝露により生じたROSはさまざまな生体成分を酸化するが、その一つに生体膜脂質があげられる。ROSによる生体膜の不飽和脂質過酸化反応は、生体膜構造の変化や膜機能の損失をもたらす。脂質過酸化物は多くの疾患の発症や進展に関連することが報告されている<sup>13-15</sup>。生体膜を構成する重要な脂質であるコレステロールがROSにより酸化されると、一次酸化反応生成物としてコレステロールヒドロペルオキシド(Chol-OOH)が生じる。Chol-OOHは他の脂肪酸やそのエステル型LOOHに比べてグルタチオンペルオキシダーゼによる還元解毒作用を受けにくい<sup>16,17</sup>。したがって、生体内で比較的長く存在して生体への作用が持続する可能性がある。ラット皮膚では生理的老化とともにChol-OOHが増加することが知られている<sup>18,19</sup>。一方、われわれはラット皮膚へのUVA照射により一重項酸素特異的なChol-OOHが生成することをみとめた<sup>20</sup>。細胞膜においてコレステロールはMMP発現に関与するMAPKシグナリングの起点となるラフトを構成することから<sup>21</sup>、細胞膜コレステロールが減少することによりMMP発現が誘導されることが示唆されている<sup>22</sup>。われわれは、マウス皮内に直接Chol-OOHを皮内投与することによりMMP活性が誘導されることを認めた。このChol-OOHによるMMPの誘導はリノール酸ヒドロペルオキシド、4-HNEや過酸化水素では起こらなかったことから、Chol-OOHが選択的にMMP発現を促進することが強く

示唆された。

## 3. 抗酸化物質摂取による光老化予防

抗酸化物質は酸化的な要因が関与する皮膚光老化を抑制できることが近年報告されている<sup>23,24</sup>。しかしこれは皮膚に直接塗布することによる効果であった。そこで、本研究では日常的な抗酸化物質摂取による皮膚光老化抑制作用を明らかにするため、一重項酸素の特異的消去剤であるβ-カロテンをマウスに摂取させながら8週間UVAを照射することによる皮膚への影響を検討した。その結果、β-カロテンを摂取することによりシワの形成やたるみ、肥厚などのUVA曝露による組織学的な変化が顕著に抑制された。また、UVA曝露に伴う皮膚中のChol-OOH蓄積が抑えられた。このChol-OOH蓄積の抑制は、とくに一重項酸素酸化反応に特異的な生成物であるChol-5α-OOHで顕著であったことから、摂取β-カロテンはUVA曝露により生じた一重項酸素を消去することにより、皮膚光老化の抑制に寄与することが明らかになった。さらに、皮膚の光老化に関与するROSとしての一重項酸素の重要性が確認された。

おわりに

本研究は、皮膚光老化におけるシワ・たるみの形成にChol-OOHが関与すること、さらに光老化における一重項酸素の役割を明らかにしたものである。また、食事からの抗酸化物質の日常的な摂取が皮膚光老化抑制に機能することが示唆された(図3)。今後はChol-OOHによ

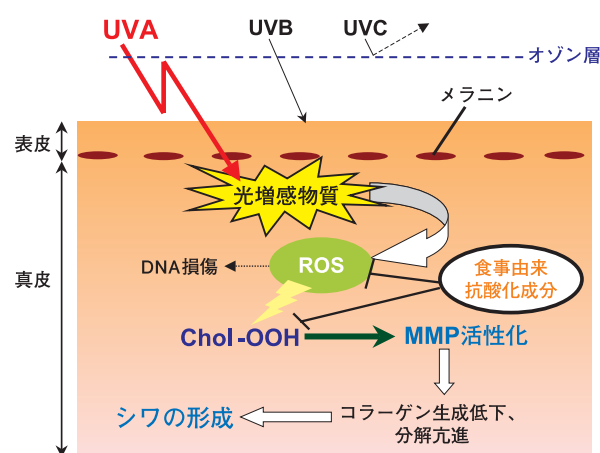


図3 UVA曝露によるChol-OOHの生成と皮膚光老化発症および食事性抗酸化物質による光老化抑制の関与の推定。

る MMP 活性化についての分子メカニズムを明らかにする必要があると思われる。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言をいただきました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野の諸先生方に心よりお礼申し上げます。また、皮膚組織染色およびその解析においてご指導、ご鞭撻いただきました同皮膚科学分野久保宜明先生、荒瀬誠治先生、同生体栄養学分野平坂勝也先生、二川健先生に厚くお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Svobodova, A., Walterova, D., Vostalova, J.: Ultra-violet light induced alteration to the skin. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub., 150 : 25-38, 2006
- 2) Yasui, H., Sakurai, H.: Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 269 : 131-136, 2000
- 3) El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., *et al.* : Intrinsic aging vs. photoaging : a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. Exp. Dermatol., 11 : 398-405, 2002
- 4) Yasui, H., Sakurai, H. : Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light. Exp. Dermatol., 12 : 655-661, 2003
- 5) Bissett, D. L., Hannon, D. P., Orr, T. V. : An animal model of solar-aged skin : histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. Photochem. Photobiol., 46 : 367-378, 1987
- 6) Murphy, G., Cockett, M. L., Ward, R. V., Docherty, A. J.: Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and-2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). Biochem. J., 277 : 277-279, 1991
- 7) Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., *et al.* : Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. J. Biol. Chem., 267 : 21712-21719, 1992
- 8) Senior, R. M., Griffin, G. L., Fliszar, C. J., Shapiro, S. D., *et al.* : Human 92-and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. J. Biol. Chem., 266 : 7870-7875, 1991
- 9) Inomata, S., Matsunaga, Y., Amano, S., Takada, K., *et al.* : Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. J. Invest. Dermatol., 120 : 128-134, 2003
- 10) Kawaguchi, Y., Tanaka, H., Okada, T., Konishi, H., *et al.* : The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. Arch. Dermatol. Res., 288 : 39-44, 1996
- 11) Brenneisen, P., Briviba, K., Wlaschek, M., Wenk, J., *et al.* : Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. Free. Radic. Biol. Med., 22 : 515-524, 1997
- 12) Zeigler, M. E., Chi, Y., Schmidt, T., Varani, J. : Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. J. Cell. Physiol., 180 : 271-284, 1999
- 13) Sultana, R., Perluigi, M., Butterfield, D. A. : Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease : insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. Antioxid. Redox. Signal., 8 : 2021-2037, 2006
- 14) Nicolson, G. L., Metabolic syndrome and mitochondrial function : molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. J. Cell. Biochem., 100 : 1352-1369, 2007
- 15) Zmijewski, J. W., Landar, A., Watanabe, N., Dickinson, D. A., *et al.* : Cell signalling by oxidized lipids and the

- role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem. Soc. Trans.*, **33** : 1385-1389, 2005
- 16) Thomas, J. P., Maiorino, M., Ursini, F., Girotti, A. W. : Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.*, **265** : 454-461, 1990
- 17) Thomas, J. P., Girotti, A. W. : Photooxidation of cell membranes in the presence of hematoporphyrin derivative : reactivity of phospholipid and cholesterol hydroperoxides with glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **962** : 297-307, 1988
- 18) Yamazaki, S., Ozawa, N., Hiratsuka, A., Watanabe, T. : Quantitative determination of cholesterol 5alpha-, 7alpha-, and 7beta-hydroperoxides in rat skin. *Free. Radic. Biol. Med.*, **27** : 110-118, 1999
- 19) Ozawa, N., Yamazaki, S., Chiba, K., Aoyama, H., *et al.* : Occurrence of cholesterol 7alpha- and 7beta-hydroperoxides in rat skin as aging markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178** : 242-247, 1991
- 20) Minami, Y., Yokoi, S., Setoyama, M., Bando, N., *et al.* : Combination of TLC Blotting and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Analysis of Peroxidized Cholesterol. *Lipids.*, **42** : 1055-1063, 2007
- 21) Chen, X., Resh, M. D. : Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. *J. Biol. Chem.*, **276** : 34617-34623, 2001
- 22) Kim, S., Kim, Y., Lee, Young, Cho, Kwang Hyun. : Cholesterol inhibits MMP-9 expression in human epidermal keratinocytes and HaCaT cells. *FEBS. Lett.*, **581** : 3869-3874, 2007
- 23) Reeve, V. E., Widyarini, S., Domanski, D., Chew, E., *et al.* : Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equol. *Photochem. Photobiol.*, **81** : 1548-1553, 2005
- 24) Hwang, I. K., Yoo, K. Y., Kim, D. W., Jeong, S. J., *et al.* : An extract of *Polygonum multiflorum* protects against free radical damage induced by ultraviolet B irradiation of the skin. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **39** : 1181-1188, 2006

## *Effect of peroxidized lipids on UVA-induced photoaging in mouse skin and its inhibition by dietary antioxidants*

*Yuko Minami<sup>1)</sup>, Kyuichi Kawabata<sup>1)</sup>, Kanako Yokoyama<sup>1)</sup>, Noriko Bando<sup>2)</sup>, Yoshichika Kawai<sup>2)</sup>, and Junji Terao<sup>2)</sup>*

<sup>1)</sup>*Department of Food Science, Graduate School of Nutrition and Biosciences, The University of Tokushima, Tokushima, Japan*

<sup>2)</sup>*Department of Food Science, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

Role of ultraviolet A (UVA) on oxidative damage has attracted much attention in relation to skin photoaging process. In this study, we investigated effect of cholesterol hydroperoxides (Chol-OOHs), stable products of reactive oxygen species (ROS)-induced lipid peroxidation, on matrix metalloproteinase (MMP) activation responsible for wrinkle formation in hairless mouse skin and then estimated the inhibition of UVA-induced MMP activation by dietary  $\beta$ -carotene. Hairless mice were exposed to UVA irradiation for 8 weeks. Chol-OOHs content in the skin was found to increase significantly by the exposure of UVA. In addition, the activity of MMP-9 and its protein expression were elevated with wrinkle formation. This activation was also induced by intracutaneous injection of Chol-OOHs. Interestingly, dietary  $\beta$ -carotene (500 mg/kg diet) and  $\alpha$ -tocopherol (100 mg/kg diet) suppressed the accumulation of Chol-OOH as well as MMP activation. These results suggest that Chol-OOHs formed by the exposure of UVA to skin contribute to the activation of MMPs resulting in skin photoaging. Dietary antioxidants may prevent skin photoaging through, at least partly, the suppression of MMP activation due to UVA-induced lipid peroxidation.

Key words : UVA, cholesterol peroxidative products, matrix metalloproteinase,  $\beta$ -carotene