

皮膚の老化に伴うテロメア短縮化とフリーラジカル障害に対する、細胞内アスコルビン酸のエンリッチング化による防御効果

広島県立大学 生物資源学部生物資源開発学科

横 尾 誠 一、長 尾 則 男、三 羽 信 比 古

Genuine degrees of cellular senescence of human skin are not necessarily in accordance with calendar ages, and were shown in the present study to be potentially evaluated by measurement of length of telomeric DNA for a trace amount of human skin trash prepared with the ordered instrument rasp. Telomeric DNA was shortened in a manner dependent on calendar ages (0-72 years old, n=28) of donors as shown by Southern blot using epidermal DNA isolated from human skin. Prevention of age-dependent telomere shortening was achieved by pro-vitamin C, ascorbate-2-O-phosphate (Asc2P), but not by ascorbic acid(Asc) itself administered to human skin epidermal keratinocytes NHEK-F, which also acquired an elongated life span by 5.1 population doubling levels when administered with Asc2P but not Asc. UV-B induced cell mortality in human skin epidermal cells HaCaT was prevented by Asc2P but not Asc. Thus, Asc2P but not Asc is shown to protect human skin keratinocytes against telomere shortening, cellular senescence and UV-B injury.

1 緒 言

年齢を経るに伴って皮膚に各種の「老化症状」を生じるが、この根本的な原因の一つとして、皮膚を構成する細胞の「分裂速度」の低下が重要である¹⁻³⁾。この細胞老化や細胞寿命を規定する要因として、細胞分裂に伴う「テロメア(46本の染色体の両端を保護するDNA繰り返し構造)の短縮化」が極めて本質的であるとして、近年急速に着眼され始めた。テロメアが短くなると、染色体が不安定となり、細胞寿命が尽きることが知られている⁴⁾。

一方、アスコルビン酸(ビタミンC)は、36億年もの生物進化の過程で淘汰選抜されてきた優れた抗酸化性の体内分子であるが、それにも関わらず、従来の研究では、外来的に動物に投与しても劇的な生物学的効果は少なかった。このため我々は、アスコルビン酸に酸化抵抗性を付与した誘導体を用いて、各種の動物細胞の細胞内アスコルビン酸濃度を、細胞外濃度よりも67～120倍もの「高濃度化」(エンリッチング効果)することを可能にした¹⁻⁹⁾が、未修飾のアスコルビン酸では9～21倍に過ぎなかった。我々はこの酸化抵抗型アスコルビン酸誘導体によって、従来は見られなかった顕著なフリーラジカル制御効果の幾つかを下記の通り見出した⁴⁻⁹⁾：

- ①ウシ血管内皮細胞の過酸化脂質障害の防御、
- ②ラット肝臓・心臓の虚血障害の防御、
- ③ヒト皮膚角化細胞のUV障害の防御、

- ④マウスでの皮膚癌転移の阻害効果。

この技術蓄積を活かして本研究では、次の点を解析する：

- ①ヒト皮膚表皮の角化細胞を用い、老化に伴うテロメア短縮化を解析し、皮膚老化の新規の指標になりうるかを明らかにする、
- ②老化に伴うテロメア短縮化を細胞内アスコルビン酸エンリッチングによって人為的に防御できるかを調べる、
- ③この作用機序として細胞内フリーラジカルの消長と皮膚老化との相関性を明確にする

2 実 験

2.1 皮膚老化の新規の指標としての、テロメア長とテロメラーゼ活性の定量

- ①テロメア長は、(TTAGGG)_nをDNAプローブとして用いて、Southern blotを行ない、TRF(telomere restriction fragment)として求める。我々は既にヒト臍帯静脈の血管内皮HUVE細胞でテロメア長を求めた⁴⁾。
- ②テロメラーゼは、癌細胞と生殖細胞では強い活性であるため、僅か10～100細胞でも検出できるが、正常な体細胞では従来10⁵～10⁶細胞でも検出できないことが多く、殆ど活性がないと見なされてきた。我々は、Shay博士によるTRAP法を改良して10⁴個の正常細胞でも測定できる高感度な測定系を確立済みである⁴⁾。
- ③これらの方法により、ヒト皮膚表皮の角化細胞で加齢(継代培養)に伴ってテロメアが短縮化し、テロメラーゼ活性が消失することを示せると予想する。

2.2 皮膚老化モデルとしての、ヒト皮膚表皮の角化細胞NHEK-Fの継代培養^{2, 4)}

- ①この正常細胞(2倍体の染色体)は、細胞分裂する積算回数(population doubling level)が27～29に達すると、それ以上は分裂できなくなり「分裂寿命」となる(Hayflick's



Preventive effects of enrichment of intracellular ascorbate on age-dependent telomeric DNA shortening and free radical injury in the skin

Seiichi YOKOO, Norio NAGAO, Nobuhiko MIWA

Laboratory of Gene Control Technology, Department of BioTechnology, Hiroshima Prefectural University School of BioSciences

limit)。この1ラウンドに3～4か月を必要とする。

- ②各継代培養ごとに一部の細胞を冷凍保存し、後日一括して解凍し、テロメア長とテロメラーゼ（テロメア伸長酵素）活性を測定する。
- ③各継代培養ごとに、細胞の継代直前密度（飽和細胞密度の75%）と細胞サイズ分布をコールター・カウンターとチャネライザーで定量する。

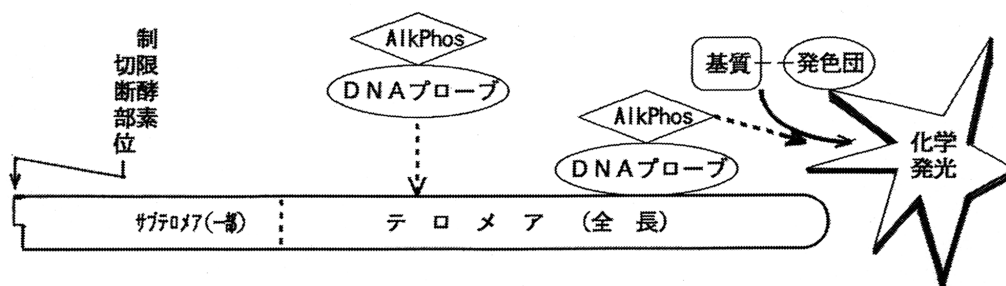


図1 AlkPhos 標識プローブ／化学発光法によるテロメア計測の原理

制限酵素（HinfI）はサブテロメア部分の特定の塩基配列の部分で切断するが、テロメア部分では切断しないので、取得されたDNA断片（TRF：terminal restriction fragment）はテロメア全長を含む。(1) TRFの中のテロメア部分を認識するDNAプローブである（TTAGGG）₄（分子、約7900）に酵素AlkPhos（分子、約80000）を架橋剤FAで結合させて、AlkPhosで標識したDNAプローブを作製する。(2)この場合に、DNAプローブによるテロメア認識力も、AlkPhosの酵素活性も、いずれをも低下させないような結合反応条件が求められる。(3)架橋剤の添加が多過ぎると、特に酵素の側の多数の部分で分子内架橋を引き起こすので不適切である。(4)と同時に、酵素とDNAプローブとは結合反応での混合比や添加濃度によっては、1：1（mol/mol）から逸脱した結合比となってしまう、テロメア検出に不適切となる。(5)発色団を含むリン酸エステル基質が酵素によって加水分解されてテロメア部分で化学発光を生じる。

2.3 細胞内アスコル

ビン酸エンリッチング（高濃度化）による皮膚老化の人為的防御^{4, 5, 6)}

- ①各種の酸化抵抗型アスコルビン酸誘導体を細胞に投与し続けて、細胞内フリーラジカルを消去した場合、テロメア短縮化を防御して、細胞寿命を延長するかを調べる。
- ②この逆に、細胞死を起こさない程度のH₂O₂や紫外線B波を弱いストレスとして負荷し続けた場合、テロメア短縮化が促進して、細胞寿命を縮めるかも、併せて調べる。

3 結果

3.1 テロメア計測技術の高感度化

従来のテロメア測定法はテロメアを識別する（TTAGGG）₄ DNAプローブの5'末端を³²P標識してサザンブロットで検出していた。著者らは300bp未満のDNAには不向きとされてきたAlkPhos/FA標識を24bpのプローブでも高率化でき、これに適したECLで強い化学発光を生じさせ従来の15～100倍ほど高感度に初めて非放射能（Non-RI）法での検出を可能とした（図1）²⁾。DNA20ng（従来の検出限界は300～2000ng）を用いてAlkPhos/FA-ECL サザンブロットで定量できた（図2）。

テロメア測定工程としては

- ①皮膚擦過屑を回収
- ②界面活性剤による細胞膜の溶解、RNAと蛋白の除去でDNAを抽出
- ③DNAをサブテロメア部分で制限酵素（HinfI）で切る
- ④DNA断片の混合液をアガロースゲル電気泳動で分離
- ⑤DNA断片を別の膜に転写
- ⑥AlkPhos結合させた（TTAGGG）₄ DNAプローブがテロメア含有DNA断片だけと結合

DNA (ng)	100	60	40	20	10
Cell Nr. (10 ³)	71	43	29	14	7.1

Long DNA fr
↑
TRF
↓
Short DNA fr

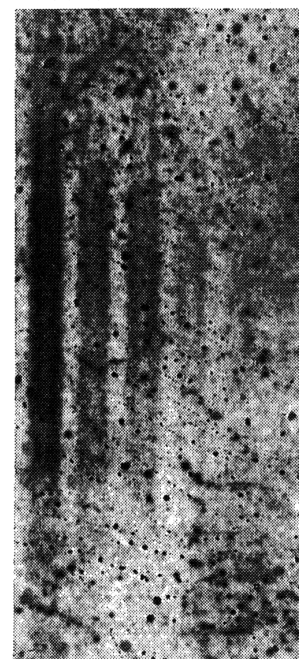


図2 AlkPhos 標識プローブ／化学発光法によるテロメア計測の感度

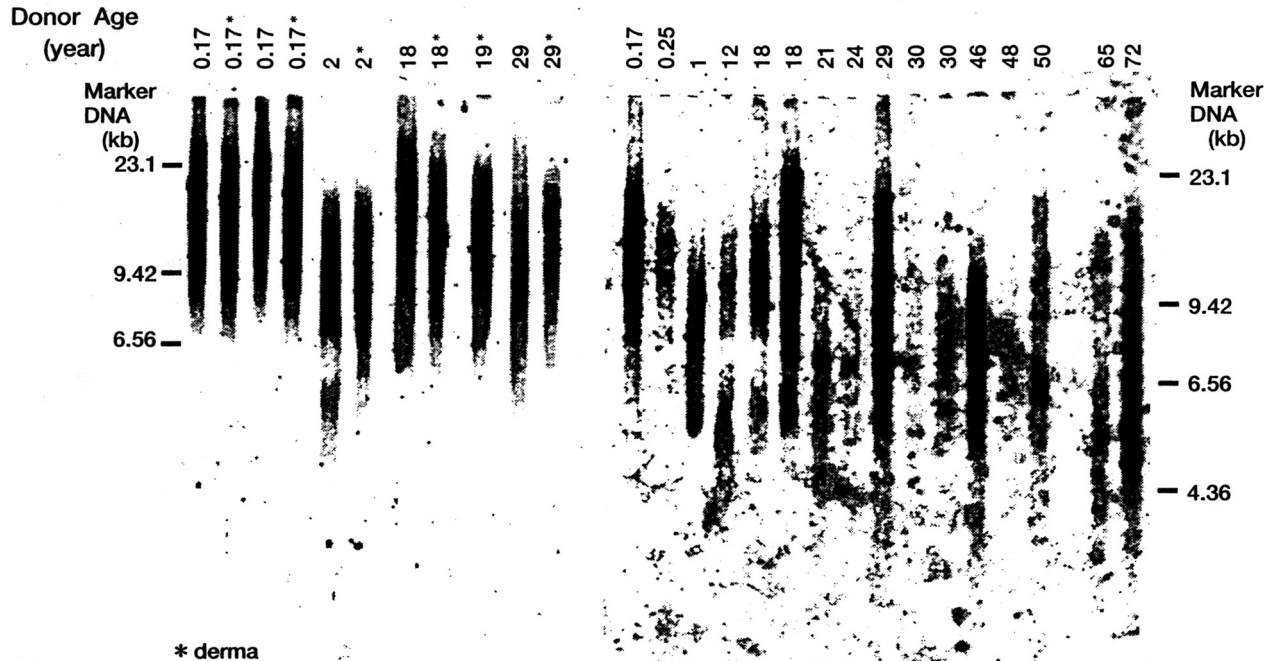
左から順に各々約71000、43000、29000、14000、7100個のヒト皮膚表皮細胞からの抽出に相当する100、60、40、20、10ngのDNAを制限酵素HinfIで切断してテロメアを化学発光法で検出した。20ngDNA（14000細胞）で検出できることが示された。従来の放射能標識法は100万細胞が必要だった。

- ⑦酵素作用で化学発光を生じる反応物を与えるとテロメア部分だけが化学発光し、これをX線フィルムで感光。

3.2 ヒト皮膚表皮のテロメアの年齢依存性

Cooke のグループはヒト皮膚片が年齢に伴ってテロメア短縮化を受けると報じたが、表皮・真皮の他に皮下組織も含みその含有率も不揃いだった。著者らは各年令のヒト皮膚片から表皮側を単離して DNA 抽出した結果、TRF (テロメア全長含有 DNA 断片) は 0 才の 11.6kb から次第に

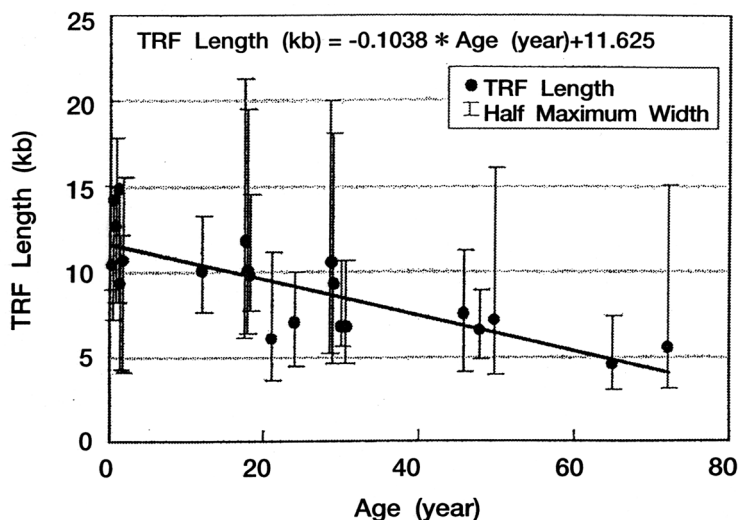
短縮化し 72 才まではほぼ直線的に短縮化していることを AlkPhos 標識プローブ法で見出した (図 3、4)。ヒト皮膚表皮がテロメア短縮化を伴って老化していることを初めて示し、日本人の基準となる皮膚表皮テロメアの年齢依存性の 1 次方程式も算出した。



Chemiluminescence-utilizing quantification for telomeric DNA obtained from the human epidermis of diverse ages using an alkaline phosphatase-labelled (TTAGGG)_n DNA probe.

図 3 ヒト皮膚表皮のテロメア長の年齢依存的な短縮

サザンブロットでの TRF (テロメア全長含有 DNA 断片) の電気泳動パターンにおいてスミア (ホウキ星状の感光部分) の「位置」が上であるほどテロメアが長いことを示す。したがって、若年→中年→老年……と老化するに伴ってテロメアの位置が下になってきているが、これはテロメア短縮化を意味する。テロメアは 0 才の 11.6kb から次第に短縮化し 70 才まではほぼ直線的に短縮化していることを AlkPhos 標識プローブ法で見出した



Dependency of telomeric DNA length of the epidermis on ages of skin donors as assessed by Southern blot and expressed as TRF length.

図 4 ヒト皮膚表皮のテロメア年齢における診断システムの検基準線の作成

サザンブロットをデンストメトリによってピーク位置と半値幅を求めてグラフ化した。年齢に伴ってテロメアが直線的に短縮化するが、10 才ほど年を取るとテロメアは約 1kb ずつ短くなることを示す。日光への露出部と非露出部との皮膚で短縮化率に違いがあるかは未確定だが、少なくとも圧倒的な差異があることはなかった。

3.3 ヒト皮膚表皮の角化細胞 NHEK-F のテロメア短縮化

ヒト表皮角化細胞 NHEK-F は細胞分裂回数を経るに伴ってテロメアが短縮化していた。我々は既にヒト静脈血管内皮細胞が細胞分裂回数を経るに伴ってテロメア短縮化が見られることを見出した⁴⁾が、これと同様な結果だった。ところがプロビタミン C の Asc2P を継続的に投与しておくと、テロメア短縮化が抑制され、細胞寿命も増大した。

NHEK-F は 9.0 回まで細胞分裂して分裂停止した。プロビタミン C の ascorbic acid-2-O-phosphate-Mg_{1.5} (Asc2P) を添加しておくと、13.7 回まで細胞分裂できるようになり細胞寿命が延長されたが、Asc (未修飾ビタミン C) 添加では 8.9 回の分裂に止まった (図 5)。これは通常 1 mm² にしか細胞増殖しない皮膚細胞が Asc2P による細胞寿命延長で、24mm² の皮膚面積にまで達する生涯細胞供給能をもたらすことを意味する (図 6)。Asc2P 添加は細胞増殖速度の点でも対照の 2.6 倍に増大させ、皮膚の細胞供給速度も供給細胞数も向上させると示唆された (図 7)。テロメア長 (TRF) は分裂停止前の対照細胞が 6.8kb、Asc は 6.3kb であるのに比し、7.3kb と維持することが示された (図 8)。

3.4 皮膚の近い将来の老化度を予測する先行指標

皮膚テロメア診断は「肌の今の外見は良いが、今後は急変するのか、維持されるか」を明確にする。このため化粧

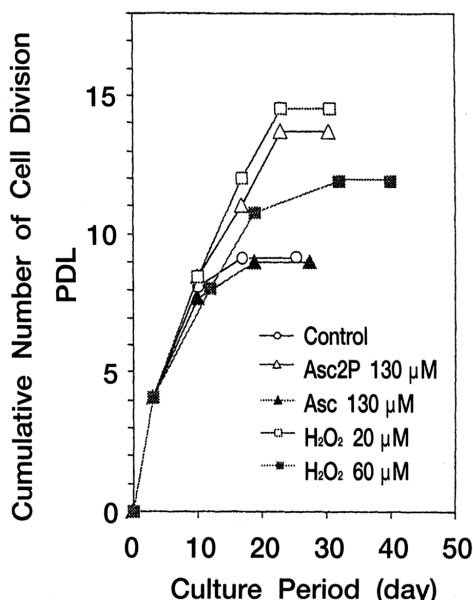


図5 正常ヒト皮膚表皮由来の角化細胞 NHEK-F の細胞分裂寿命

この角化細胞は 8.9 回まで細胞分裂してその後に分裂停止した。プロビタミン C の ascorbic acid-2-O-phosphate-Mg_{1.5} (Asc2P) を添加しておくと、13.7 回まで分裂できるようになり細胞寿命が延長されたが、Asc (未修飾ビタミン C) 添加では 8.9 回の分裂までに止まった。

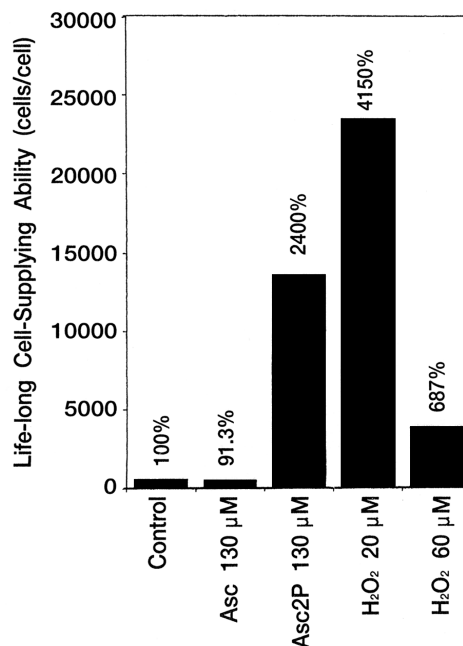


図6 正常ヒト皮膚表皮由来の角化細胞 NHEK-F の生涯細胞供給力 (Life-long Cell Supplying Ability)

ヒト新生児の皮膚 1mm² の表皮細胞 NHEK-F は、細胞寿命が尽きるまで 477mm² 相当 (「切手」サイズ) の算積分にまで増殖する。しかし、Asc2P 投与によるテロメア維持を介して、54% 多くの回数分、細胞分裂するので算積 13300mm² (一万円札サイズ) にまで増殖し、生涯での細胞供給総数を 27.9 倍に増大したことになる。

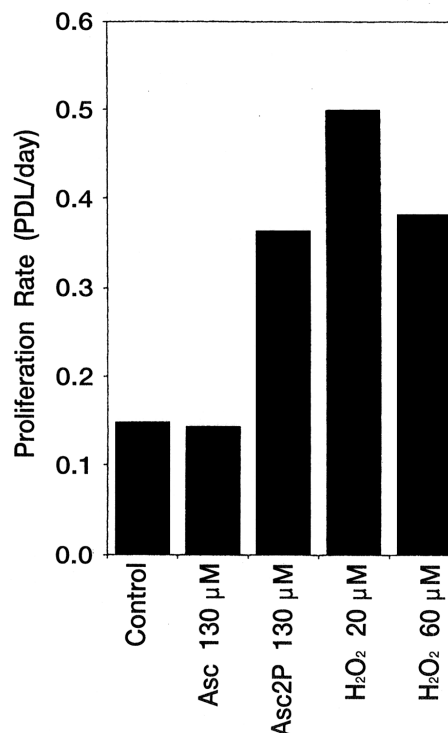


図7 正常ヒト皮膚表皮由来の角化細胞 NHEK-F の細胞増殖速度

Asc2P 投与は無投与の 2.6 倍の細胞増殖速度に増大させ、皮膚の細胞供給速度も供給細胞数も向上させるので、老化防御に働くと考えられる。

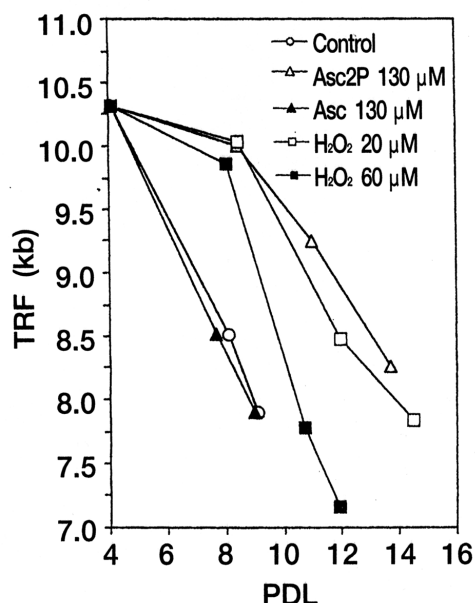


図8 正常ヒト皮膚表皮由来の角化細胞 NHEK-F の細胞分裂に伴うテロメア短縮化

この角化細胞は細胞分裂に伴ってテロメアが下限 (TRF6.8 kb) まで短縮化する。一方、Asc2P 投与による細胞寿命延長の場合はテロメア短縮化が緩慢で済んだ。しかし、寿命延長の場合もテロメア下限に近づくと同様に寿命が尽きる。この事実はテロメア短縮化速度が寿命の長短を決めると共に、一定値のテロメア下限までの短縮化が寿命の長短に関わらず寿命限界をもたらすことが示された。無投与細胞が分裂停止する直前の時点で比較すると、無投与細胞のテロメア長 (TRF) は 6.8kb、Asc 投与では 6.3kb であるのに比し、Asc2P 投与では 7.3kb と維持されている。

品消費者は今の肌の手入れ法や使用化粧品が適正かどうかを知る客観的な判断材料となる。「細胞の増殖速度」は死んだ皮膚細胞を補充する迅速性に関わるが、細胞増殖速度は暦年齢に画一的に規定されるのではなくテロメアの長短によって規定されていることを著者らは示した^{2, 4)}。

- ①テロメア短縮化の急激な進行中で細胞増殖が維持されていてもその直後に細胞増殖が遅延し始めることになる。
- ②一方、テロメアが維持されていると相当期間に及んで未だ盛んな細胞増殖を維持できることを意味する。よって、見掛けの細胞増殖や外見だけでは「肌の曲がり角」に近いかがまだかは判別できず、テロメア計測でだけ判別できることになる。

4 考察

従来は肌年齢を科学的に実証する客観的な方法が殆どなかった。皮膚では真皮よりも表皮の方が紫外線B波・皮脂・微生物の影響を受けて老化が進行するので、表皮角化細胞のテロメア長を測定することが皮膚老化度の評価に有意義となる。テロメア長は測定時直前の生理状態や気候条件に左右されない真の皮膚老化度 (肌年齢) を客観的に算定できる。肌年齢を診断する意義は、

- ①今まで肌の受けた環境要因や肌ケアの良悪を判定する
- ②外見の肌状態からは判らない近い将来に起こる皮膚変化を予測する

にある。
テロメア計測の従来技術は、多量の細胞 (100 万個以上) が必要なため、人体から外科手術で 5mm² 程度の組織を摘出する必要があった。しかし、人体の皮膚などから微量の皮膚擦過屑を苦痛なく採取することは従来は困難だった。著者らは顔の皮膚のテロメア長を計測して DNA レベルでの肌年齢が判る診断システムを確立した。

- ①針の形状・材質、植込み密度・角度、植針面に各種の工夫を凝らしたラスプ (極細径ステンレス極短針を高密度に植えたディスプレイ) で頬の皮膚を無痛、無出血、無痕跡に擦る。テープストリッピングは局所的に皮膚を損傷し、DNA が粘着剤に包埋され後工程に支障を来す。
- ②皮膚擦過屑の付いたラスプ部分を切り離して搬送する。
- ③ 48-72 時間後に DNA 肌年齢が分かる。

テロメアとテロメラーゼの実体と生物学的意義の解析は近年、急展開した。老化に伴ってテロメア長が 12 ~ 15kb から 5 ~ 8 kb に短縮化する (Nature 1990) が、これはヒト肺の繊維芽細胞についてであり、本研究の皮膚の角化細胞ではわかっていない。血管内皮細胞では我々が初めて見出した (Life sci., 1998; Fragr. J. 1997)。癌のテロメア長は細胞によって極端に長い (>15kb)、短い (< 5 kb) が多いが、その周辺の正常組織は一定範囲内 (6 ~ 13kb) だった (Int.J. Oncol. 1995)。テロメラーゼは癌と生殖組織で高活性で、正常成人の体細胞は活性がないと見なされていたが、PCR を用いた TRAP 法で測定が高感度となった (Methods Cell Sci.'95)。テロメア長は DNA 複製の度に 50 ~ 150bp ずつ短縮する (EMBO J. '92) が、高酸素圧/フリーラジカルによる DNA 障害でもテロメア短縮化が起こる (Exptl. Cell Res. 1995)。この逆に、テロメア短縮化への抑制効果は、我々による細胞内アスコルビン酸の高濃度化だけが有効例であり^{2, 4)}、他に報告例はない。

我々は、ヒト臍帯静脈の血管内皮 HUVE 細胞を継代培養すると、細胞分裂の積算回数 (PDL) が 27 で分裂が停止したが、細胞に酸化抵抗型 ビタミン C の L-アスコルビン酸-2-O-リン酸 (Asc2P) を 50 ~ 130 μM 継続投与すると、PDL 42 まで延命し、テロメア短縮化も減速させた。継代開始で 12kb あったテロメア長は 7 kb にまで短縮化すると、細胞分裂が停止することは違いないが、テロメア短縮化の減速が細胞寿命の延長に直結するを初めて示した。

我々は HUVE 細胞がテロメラーゼ活性を微弱ながらもつことを、PCR を用いた TRAP 法で見出し、かつ、細胞の加齢に伴ってテロメラーゼ活性が次第に消失するが、延命効果のある Asc2P を投与した HUVE 細胞ではテロメラーゼ活性が長期間に及んで保持できることも示した。

細胞外のアスコルビン酸 (Asc) は細胞内に取込まれて、細胞外濃度の 8 ～ 22 倍に濃縮蓄積される程度であるが、Asc2P は細胞内取込みに伴って脱リン酸化され Asc の形で 67 ～ 120 倍という高濃度に細胞内に濃縮蓄積されることを、各種 (血管内皮・線維芽・表皮角化・悪性黒色腫) 細胞で我々は見出した^{4-6, 8, 9)}。ヒト・マウス皮膚表皮の角化細胞への紫外線 B 波の照射による細胞死は、Asc は抑えないが、Asc2P 投与で抑制されることを我々は WST-1 法 (ミトコンドリア脱酸素酵素活性) と Ethidium homodimer / 蛍光プレートリーダー法 (細胞膜障害) で見出した (Cell. Mol. Biol. Res. '95)。今回ヒト皮膚表皮の角化細胞でも同様な細胞防護効果を見出したことになる。この時、Asc2P は脱リン酸化されて細胞内 Asc を高濃度化し、紫外線による DNA 鎖上のシクロブタン型ピリミジン 2 量体の形成 (Anti-CPD-Ab を用いた Slot blot)、ヌクレオソーム間 DNA 2 本鎖切断 (共焦点レーザー顕微鏡を用いた TUNEL 法、アガロース電気泳動)、癌抑制遺伝子 p53 発現 (野生型と変異型 p53 を識別した免疫染色、ウェスタン・プロット) のいずれもを抑えた。紫外線を照射された皮膚の角化細胞の内部にはフリーラジカルが多量生じることは、蛍光色素 CDCF H / 共焦点レーザー顕微鏡法、スピントラップ剤 DMPO / 電子スピン共鳴 (ESR) 法で定量したが、今後 Asc2P による防護効果におけるフリーラジカル消長をより詳細に解析する予定である。

(参考文献)

- 1) 三羽信比古・編「バイオ抗酸化剤プロビタミン C ～皮膚傷害・ガン・老化の防御と実用化研究～」フレグランスジャーナル社 (1999)
- 2) 横尾誠一ら: *Fragrance J.* 27 (7) :69-74 (1999) ; 日本香粧品科学会第 24 回学術大会 ,p.67 (1999)
- 3) 三羽信比古:「ビタミン C の知られざる働き」、*Sci & Technol Series* 第 33 巻、丸善 (1992)
- 4) Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E & Miwa N: *Life Sci.* 63 : 935-948 (1998)
- 5) Fujiwara M, Nagao N & Miwa N: *Free Radical Res.* 27 : 97-104 (1997)
- 6) Kanatate T, Nagao N & Miwa N: *Cell.Mol.Biol.Res.*, 41 : 561-567 (1995) ; *Biomed.Gerontol.* 19 : 78-81 (1995)
- 7) Saitoh Y, Nagao N & Miwa N: *Mol. Cell.Biochem.*, 173 : 43-50 (1997)
- 8) Kageyama K, Nagao N & Miwa N: *Anticancer Res.* 19 (5) : 4321-4326 (1999) ; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122 : 41-44 (1996) ; *Cancer Biochem. Biophys.* 14 : 273-280 (1995)
- 9) Liu J-W, Nagao N & Miwa N: *Anticancer Res.* 20 (1) 113-118 (2000) ; *Oncol Res.* in press (2000)