

加齢に伴う皮膚脂質の変化に対するリピドーム解析

京都府立医科大学 消化器内科

守田 麻由子

Human skin is exposed to some environmental stress. Because phospholipid (PL) and cholesterol esters (CE) are major component of cellular membrane, it is expected that the lipid change is a cause of the morphological change of the human skin. To analyze the morphological change and the lipid change of the skin according to aging would be important. In this study, to investigate the correlation of histology change and lipid change of skin, we analyzed lipid class, fatty acid composition using HaCaT cells.

The major component of lipid extracted from HaCaT cells was PL. The relative amount of CE was also high. The total relative amount of saturated fatty acid and unsaturated fatty acid was the almost same, but it of poly unsaturated fatty acid was low. Elaidic acid and/or oleic acid (18:1 ; carbon numbers : degree of unsaturation) would be the key component of skin lipid. The major molecular species of phosphatidyl choline (PC) were 32:1PC, 34:1PC, 34:2PC and 36:2PC. These molecules contained more than one unsaturated fatty acid acyl chain. We will examine the structural analysis for triacylglycerol (TG) molecular species and PC molecular species and these oxidation products of skin tissue.

1 緒言

皮膚は異物との接触や、紫外線、乾燥など、常にストレスを受けている組織である。皮膚脂質に関して脂質過酸化物質による皮膚炎の発症、コレステロール酸化物の発がん性などが報告されている¹⁾。脂質過酸化物質は加齢による量的変動を示し²⁾、リン脂質やコレステロールは生体膜の構成成分であることから、脂質変化が皮膚の形態変化の一因であることが予想される。皮膚では加齢に伴って表皮、真皮、脂肪層が薄くなり、弾力を損失するなど形態が変化する。皮膚脂質を網羅的に解析し、脂質変動の全体像のプロファイリングから加齢に伴う皮膚の形態変化および脂質変動を解析することが重要であると考えられる。

本研究では質量分析法を用いて皮膚のリピドーム解析を行い、皮膚が受けるストレスに起因する皮膚の組織学的な変化と脂質変動の相関関係を明らかにすることを目的とし、皮膚細胞を用いてリピドーム解析へ向けた予備検討を行った。

2 実験

2-1 脂質抽出

クロロホルム-メタノール混合溶液を用い、細胞から脂質を抽出した。



Lipidomic analysis of skin lipid changing by aging

Mayuko Morita

Molecular Gastroenterology and Hepatology,
Kyoto Prefectural University of Medicine

2-2 脂質クラス分析

脂質クラス分析はTLC-FID法に従った^{3,4)}。活性化させたクロマロッド (Chromarods S III, 三菱化学メディエンス) に脂質サンプルを1μLスポットし、溶媒中で展開した。脂質種の検出はイアトロスキャン (Iatroscan MK-6 三菱化学メディエンス) を用いた。各脂質クラス同定は、標準物質との保持時間の比較により行った。

【TLC条件】

・展開溶媒

ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸=80：20：1 (v/v/v)

【検出器条件】

・水素流量 160mL/min、空気流量1500mL/min

・スキャンスピード 30sec/scan

2-3 脂肪酸組成分析

脂肪酸組成分析はGC-MSを用いて行った。抽出した脂質を三フッ化ホウ素・メタノール法⁵⁾に従ってメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィー・質量分析計 (GC-17A-HP5000 (Shimadzu)) に供した。脂肪酸メチルエステルの同定は標準試薬 (Supelco 37 Component FAME Mix, SUPELCO) の保持時間との比較およびライブラリサーチによって行った。

【GC-MS条件】

・カラム DB-23 (Agilent Technologies)

・カラム温度 170℃ 1分間→4℃ /minで230℃まで昇温
→230℃で5分間保持

・キャリアガス ヘリウム (流速1mL/min)

・スプリット比 40：1

・気化室温度 270℃

・インターフェイス部温度 290℃

2-4 質量分析

質量分析法を用いて、脂質カラムの代わりにユニオンを接続した、フローインジェクションを行った。

【測定条件】

- ・イオン化法 エレクトロスプレーイオン化法
- ・質量分析計 esquire HCT plus (BRUKER DALTONICS)
- ・溶媒 メタノール：水=90：10 (pH=7.0, 1% ギ酸)
- ・流速 20 μ L/min
- ・測定モード Positive mode、Negative mode

3 結果

3-1 脂質クラス分析

HaCaT細胞から抽出した脂質の脂質クラスをTable 1に示した。HaCaT細胞抽出脂質ではリン脂質の割合が高く、次いでステロール類、TGの割合が高かった。

3-2 脂肪酸組成分析

HaCaT細胞抽出脂質の脂肪酸組成をTable 2に示した。主な脂肪酸は16:0 (ステアリン酸)、18:0 (パルミチン酸)、18:1 (エライジン酸、オレイン酸)であった。エライジン酸の割合はオレイン酸と同等であった。HaCaT細胞抽出脂質は、飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸の割合がほぼ同じであり、高度不飽和脂肪酸の割合は低い(図1)。

3-3 脂質の網羅的解析

HaCaT細胞抽出脂質では、Table 1に示したようにリン

Table 1 HaCaT細胞抽出脂質の脂質クラス

	①	②	③	Ave.
CE	11.20	12.15	16.19	13.17 \pm 2.65
TG	8.52	5.73	10.34	8.20 \pm 2.32
FFA	6.40	3.83	6.02	5.42 \pm 1.39
Ch1+DG	6.21	5.85	7.49	6.52 \pm 0.86
PL	67.67	72.44	57.94	66.1 \pm 7.38

Table 3 HaCaT細胞抽出脂質の主な PC、TG 分子種 (Positive mode)

PC [M+H] ⁺	m/z	Intensity	TG [M+NH ₄]	m/z	Intensity
30 : 1PC	706.5	951998	46 : 0TG	796.5	313125
32 : 1PC	732.5	4201270	48 : 0TG	824.6	316770
32 : 2PC	730.5	939616	48 : 1TG	822.6	385241
34 : 0PC	762.5	1093622	48 : 2TG	820.5	327803
34 : 1PC	760.5	7121840	50 : 1TG	850.6	524523
34 : 2PC	758.5	4265662	50 : 2TG	848.6	665469
34 : 3PC	756.5	517890	52 : 1TG	878.6	283877
36 : 1PC	788.5	1346654	52 : 2TG	876.6	939291
36 : 2PC	786.5	4647872	52 : 3TG	874.6	656301
36 : 4PC	782.5	529874	54 : 2TG	904.6	287452
38 : 2PC	814.5	967667			
38 : 3PC	812.5	545545			
38 : 4PC	810.5	541770			

4 考察

脂質の割合が高かったが、リン脂質の中でも細胞膜の構成成分であるPCが主要成分であった。Positive modeで検出された主なPC分子種、TG分子種を図2A、Table 3に示した。飽和脂肪酸だけで構成されたPC、TG分子種のIntensityは弱く、多くが分子内に1個以上の不飽和脂肪酸を含むPC、TG分子種であった。Negative modeで検出された主なPC分子種をTable 4に示した。遊離脂肪酸(～m/z400)はほとんど検出されず、検出された主な脂質はPCであった(図2B、Table 4)。

HaCaT細胞を用いて皮膚脂質の解析を行った。細胞抽出脂質の主な脂質成分はリン脂質であり、質量分析計による分析により、リン脂質の中でも特にPCを多く含んでい

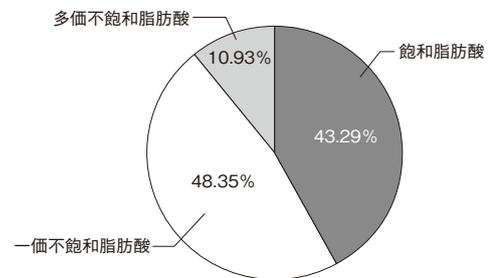


図1 HaCaT抽出脂質の脂肪酸組成

Table 2 HaCaT細胞抽出脂質の脂肪酸組成

	①	②	③	Ave.
C14 : 0	4.28	3.15	3.04	13.49 \pm 0.69
C16 : 0	32.47	26.82	26.11	28.47 \pm 3.49
C16 : 1	2.97	3.14	2.87	2.99 \pm 0.14
C16 : 1	9.25	9.49	10.03	9.59 \pm 0.40
C18 : 0	11.30	11.94	10.77	11.34 \pm 0.59
C18 : 1	19.50	19.19	18.62	19.10 \pm 0.45
C18 : 1	14.91	16.25	18.83	16.66 \pm 1.99
C18 : 2	2.14	4.12	2.48	2.91 \pm 1.06
C18 : 2	3.13	2.97	3.69	3.26 \pm 0.38
C20 : 4	3.85	6.03	4.39	4.75 \pm 1.13

Table 4 HaCaT細胞抽出脂質の主な PC 分子種 (Negative mode)

PC [M+HOO] ⁺	m/z	Intensity
30 : 1PC	750.5	18760
32 : 0PC	778.5	33925
32 : 1PC	776.5	58922
32 : 2PC	774.5	13071
34 : 0PC	806.4	15502
34 : 1PC	804.5	103839
34 : 2PC	802.5	54970
36 : 1PC	832.4	17334
36 : 2PC	830.5	66767
38 : 2PC	858.5	19594

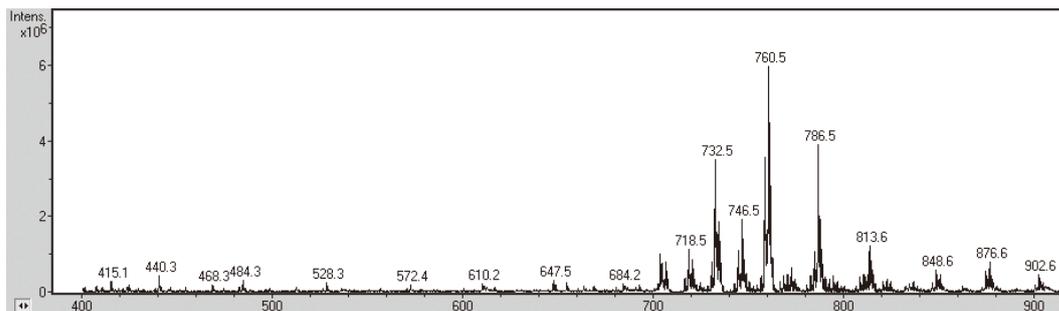


図 2A フローインジェクションによる測定結果 (Positive mode)

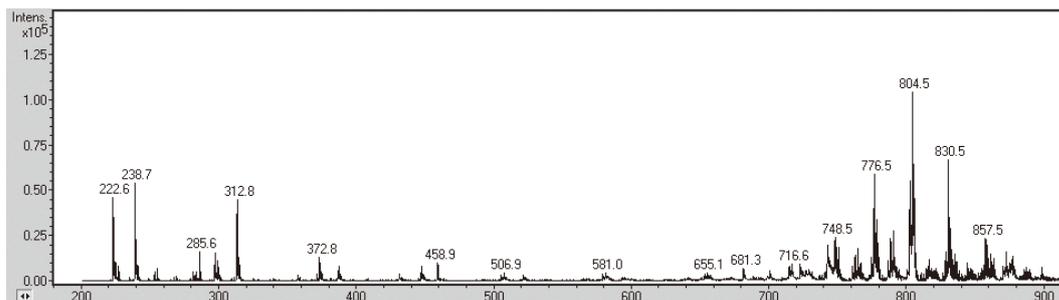


図 2B フローインジェクションによる測定結果 (Negative mode)

ることが示された。脂肪酸組成の特徴として、飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸の割合がほぼ同じであること、エライジン酸の割合が高いことが挙げられる。フローインジェクションによる網羅的測定において、ポジティブモード、ネガティブモードともにPCが顕著に検出され、それらは分子内に1個以上の不飽和脂肪酸をアシル基にもつPC分子種であった。

細胞膜の主要構成成分であるPCの組成変化は、加齢に伴う皮膚組織の形態変化の指標になると考えられる。特に一価不飽和脂肪酸を含むPC分子種やTG分子種、これらに由来する化合物や酸化生成物が加齢に伴う皮膚脂質の指標になると考えられる。

(参考文献)

1) Black HS, DR Douglas: Formation of carcinogen of natural origin in the etiology of ultraviolet light-induced carcinogenesis, *Cancer Res*, 33, 2094-2096, 1973.
 2) 金子孝夫, 田原正一, 松尾光秀: 老化に伴う皮膚脂質の

過酸化物質の加齢変化

3) N.C.Shantha: Thin-layer chromatography-flame ionization detection Iatroscan system. *J. Chromatography*, 624, 21-35, 1992.
 4) Laurent Striby, Raymond Lafont, Madeleine Goutx: Improvement in the Iatroscan thin-layer chromatographic-flame ionization detection analysis of marine lipids. Separation and quantitation of monoacylglycerols and diacylglycerols in standards and natural samples. *J. Chromatogr. A*, 849, 371-380, 1999.
 5) Shirai N, Suzuki H, Tokairin S, Ehara H, Wada S: Dietary and seasonal effects on the dorsal meat lipid composition of Japanese (*Silurus asotus*) and Thai catfish (*Clarias macrocephalus* and hybrid *Clarias macrocephalus* and *Clarias galipinus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 32, 609-619, 2002.