

スピルリナの紫外線皮膚老化抑制効果に対する検討 およびそのメカニズムの解明

神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野

国定 充

Reactive oxygen species produced in response to UV radiation are important in skin tumor development. We have previously reported that deficiency of the *Ogg1* gene, encoding the repair enzyme for 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG), increases skin tumor incidence in mice upon repetitive UVB exposure and modulation of UVB-induced inflammatory response. *Spirulina platensis* (*S. platensis*) is used as a human food supplement because it contains abundant nutritional and antioxidant components. Therefore, we investigated the inhibitory effects of *S. platensis* on UVB-induced skin tumor development in *Ogg1* knockout-(KO) mice and the wild-type (WT) counterpart. Dietary *S. platensis* suppressed tumor induction and development in both genotypes compared to our previous data without *S. platensis*. Induction of erythema and ear swelling, one of the hallmarks of UVB-induced inflammatory responses, were suppressed in the skin of *Ogg1*-KO mice and albino hairless mice fed with dietary *S. platensis*. Compared with untreated mice, *S. platensis*-administered mice showed significantly reduced 8-oxoG formation in the skin after UVB exposure. Moreover, we found that *S. platensis* effectively down-regulated the signal proteins p38 MAPK, SAPK/JNK, and ERK after UVB exposure especially in *Ogg1*-KO mice. Our results suggest that *S. platensis* exerts anti-tumor effects against UVB irradiation in the skin through its anti-inflammatory and antioxidant effects. Now we are currently working on other factors, that is, aging related genes by *S. platensis*.

1. 緒言

紫外線による人体における影響は様々なものがあるが近年特に注目されているのはそれによる発癌およびしみ・しわなどの老化現象である。発癌について我々は今まで紫外線による直接的なDNA損傷が主な原因とされていたが、その他に紫外線によって皮膚に生じる活性酸素により間接的にDNA損傷が生じそれによって皮膚発癌を引き起こされることを報告してきた¹⁾。一方、中南米やアフリカなどで自生する *Spirulina platensis* (*S. platensis*) という珪藻類があるがそれはβカロチンなどを多く含み、元来抗酸化作用があるとされ、その肝庇護作用²⁾ や抗ウイルス作用³⁾、抗アレルギー作用⁴⁾などが報告されてきたが *S. platensis* が紫外線を受けた皮膚に対しての作用などは今まで研究がなされて来なかった。今回我々は *S. platensis* による紫外線の皮膚における影響、特に発癌に着目していかに短期、または中長期で影響を及ぼすか検討した。また我々は紫外線-活性酸素-DNA損傷による皮膚発癌において炎症因子が重要な役割があることも報告している⁵⁾ のでその作用点として炎症因子がいかに関与しているかも合わせて検証した。

2. 実験

2. 1. 経口 *S. platensis* 摂取による皮膚腫瘍形成の時期の検討

過去の我々の C57Bl マウス (野生型および活性酸素による DNA 障害の 8-oxoG を修復できない *Ogg1* ノックアウトマウス) の実験結果⁶⁾ を参照にして週 3 回、マウスの背中を剃毛後、2.5kJ/m² のブロードバンド UVB 光源 (TL 20W/12RS fluorescent lamps (Philips, Eindhoven, Holland)) を用いて照射を続けた。群においては 10% *S. platensis* が入った飼料と通常飼料、それぞれ野生型と *Ogg1* ノックアウトの群に分けて 45 週まで照射を継続し、どの群において皮膚腫瘍形成が早いかを比較・検討した。

2. 2. 経口 *S. platensis* 摂取による UVB 照射によるマウス皮膚における炎症反応の評価

マウス皮膚において UVB 照射後の DNA 損傷から紫外線発癌に至る経緯で重要な要素として炎症反応が挙げられる⁵⁾。 *S. platensis* 摂取 (4 週間投与) によってその炎症反応が抑制されているかを経時的に野生型および *Ogg1* ノックアウトマウス、さらにはアルビノヘアレスマウスにて、評価方法としてはマウス耳介の腫脹 (mm) を計測し、紅斑反応はスコア化して比較した。尚紫外線照射は単回で照射量は *Ogg1* マウスには 2.5 kJ/m²、アルビノヘアレスマウスには 1.5 kJ/m² とした。

2. 3. 経口 *S. platensis* 摂取による UVB 照射によるマウス皮膚における炎症反応関連遺伝子の検討

2. 2. と同様に 4 週間 *S. platensis* を投与しその後単回 UVB を照射後、皮膚より mRNA を抽出しそれを用いて



The study of effects on ultraviolet-induced skin aging by *Spirulina platensis*
Makoto Kunisada

Division of Dermatology, Department of Internal Related, Kobe University Graduate School of Medicine

アルタイム RT-PCR法で皮膚の炎症で重要とされる *Il1β* および *Cxcl1* の発現を野生型および *Ogg1* ノックアウトマウスにて 3, 6, 24 時間後にてそれぞれ比較検討を行った。さらに *Il1β* では抗体を用いた免疫染色にて 24 時間後での検討を行い、同様に TLR4 では免疫組織染色およびリアルタイム RT-PCR法で同様比較した。

2. 4. *S. platensis* の実効成分であるフィコシアノビルンにおけるシグナル蛋白の影響の検討

S. platensis の実効成分はフィコシアニンとされその活性型としてフィコシアノビルン (Phycocyanobilin: PCB) とされている。それが細胞内のシグナル蛋白に及ぼす影響を及ぼしているかを検討するためにウエスタンブロット法にて p38, JNK, ERK においてそれぞれリン酸化された蛋白も含めて、30 分後、2, 6, 24 時間後において検討した。検討したものは胎児マウス皮膚より単離した線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblasts: MEFs) について PCB を精製した粉末 (5 μg/mL) を MEFs に添加し、UVB 照射後に検討した。

3. 結果

3. 1. 経口 *S. platensis* 摂取による皮膚腫瘍形成の時期の検討

図 1 のごとく、*S. platensis* 摂取群では *Ogg1* 遺伝子型に関わらず 1 週から 6 週遅らせることができた。また *S. platensis* 摂取群では通常飼料を与えた群では照射後約 45 週で 100% 皮膚腫瘍を生じるのに対し、45 週時点でも全マウスの約 40% にしか腫瘍形成を認めなかった。

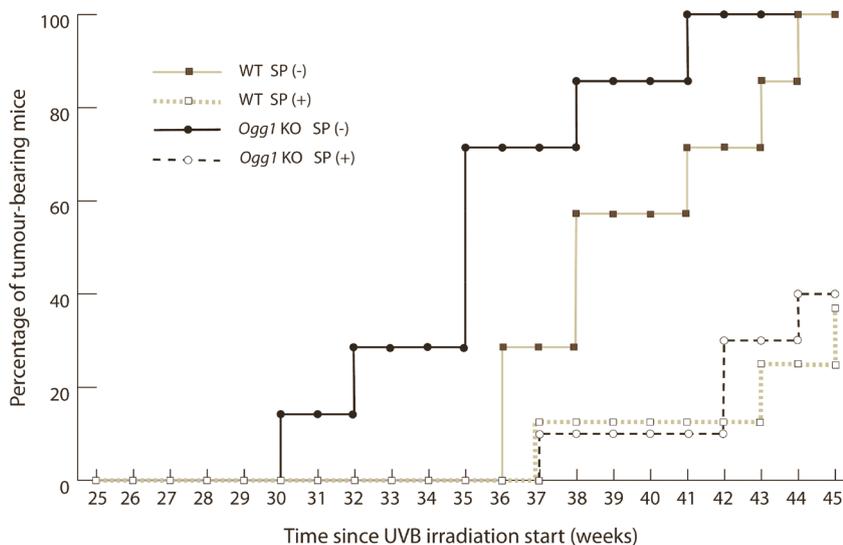


図1 *S. platensis* 添加において野生型および *Ogg1* ノックアウトマウス両方において腫瘍発生時期を遅らせることができた。

3. 2. 経口 *S. platensis* 摂取による UVB 照射によるマウス皮膚における炎症反応の評価

UVB 照射後の耳介腫脹の比較では *S. platensis* 摂取群が通常飼料摂取群と比較して野生型あるいは *Ogg1* ノックアウトマウスいずれにおいても抑制することが経時的に確認できた (図 2a)。またマウスのバックグラウンドを変えて同様現象が見られるかアルビノヘアレスマウスを用いた実験でも耳介腫脹は抑制されていた (図 2b)。ヘアレスマウスではさらに UVB 照射後の紅斑反応をも比較検討したが図 2c のごとく 72 時間後では紅斑反応の抑制が *S. platensis* 摂取群においても観察され鱗屑の減少も見られた (図 2c, d)。

3. 3. 経口 *S. platensis* 摂取による UVB 照射によるマウス皮膚における炎症反応関連遺伝子の検討

図 3 のごとく、UVB 照射後の *S. platensis* 摂取群においては通常飼料摂取群と比較して皮膚炎症関連遺伝子として知られる *Il1β*、*Cxcl1* いずれにおいても発現の抑制が見られた (図 3 a, b, c)。特に *Ogg1* ノックアウトマウスでの *Il1β* はすべての UVB 照射後のタイムポイントにおいてその傾向が統計学的有意差をもって示された (図 3 a)。また TLR4 においても免疫組織染色法やリアルタイム RT-PCR 法いずれにおいても UVB 照射後の発現抑制が *S. platensis* 摂取群において見られた (図 3 d, e)。

3. 4. *S. platensis* の実効成分であるフィコシアノビルンにおけるシグナル蛋白の影響の検討

ウエスタンブロット法にて、またマウス胎児よりの線維芽細胞 (MEFs) を用いて PCB 添加でいかにシグナル蛋白、

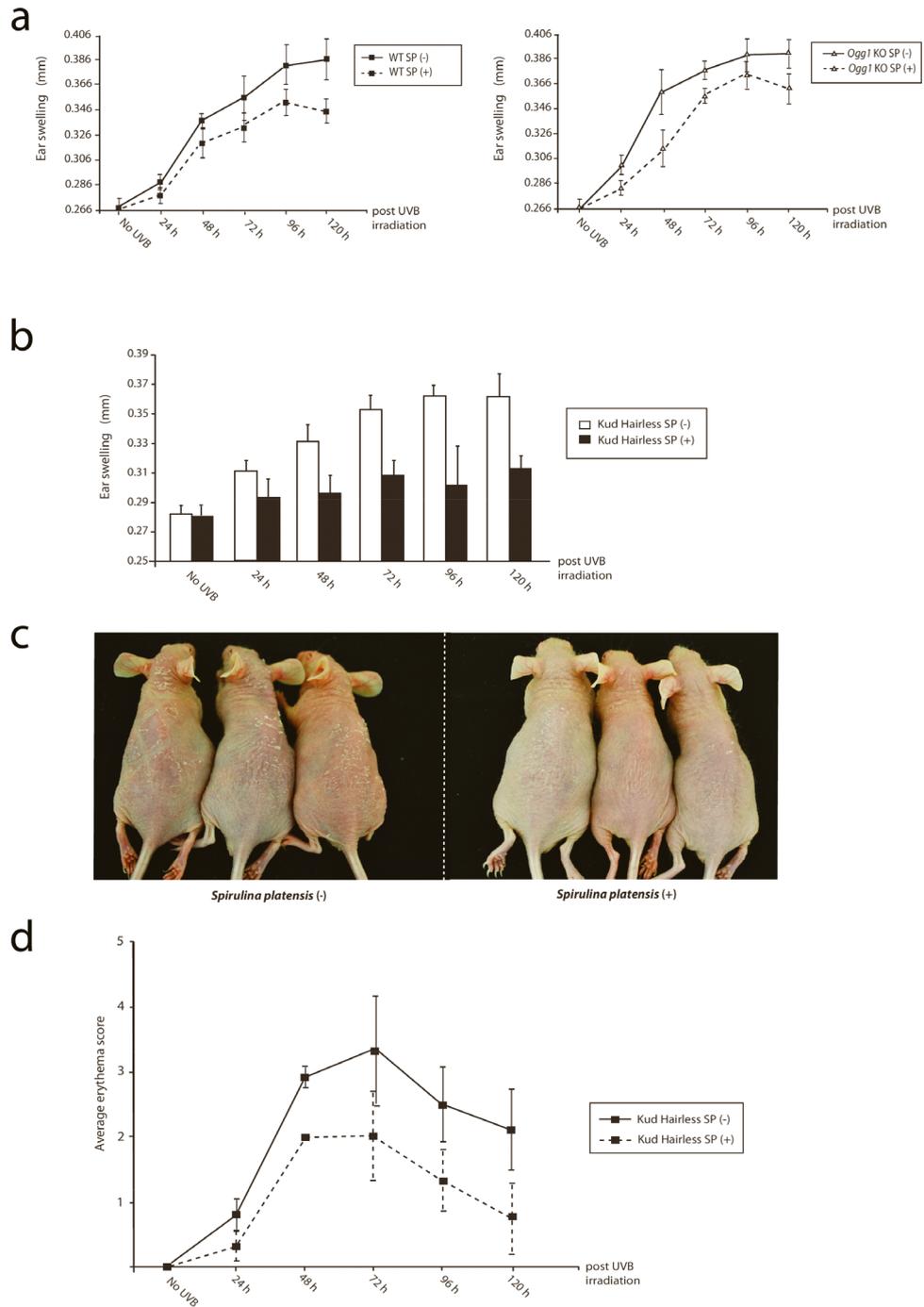


図2 *S. platensis* 群と通常飼料群での炎症反応の比較 a マウスの耳介腫脹の野生型および *Ogg1* ノックアウトマウスでの比較 b ヘアレスマウスでの耳介腫脹比較実験 c 紫外線照射後72時間後のヘアレスマウス背部の紅斑反応の比較 d cの紅斑反応比較をスコア化して比較したもの

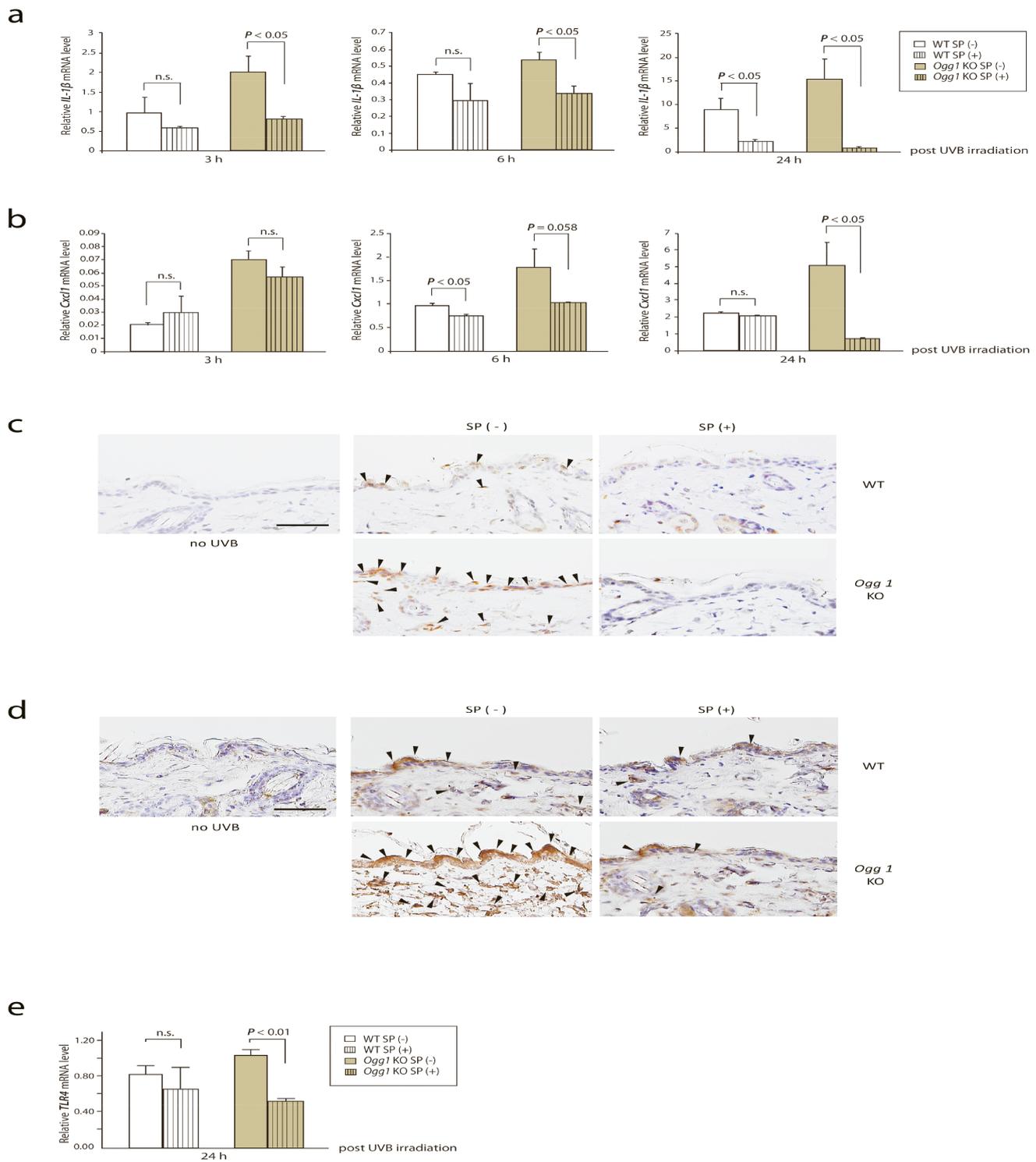


図3 *S. platensis* 摂取群と通常飼料群での炎症因子・遺伝子の比較
a $Il1\beta$ と b $Cxcl1$ の expression の比較、リアルタイム RT-PCR 法
c $Il1\beta$ の免疫組織染色
d TLR4 における免疫組織染色およびリアルタイム RT-PCR 法での検討 (e)

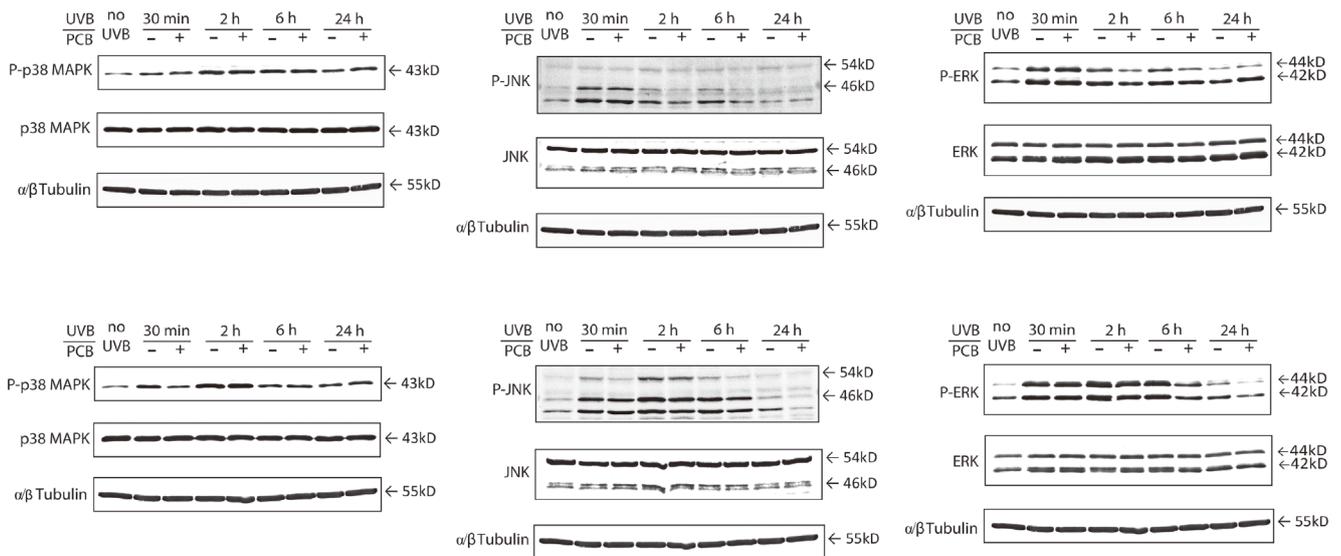


図4 ウェスタンブロット法によるシグナル蛋白のリン酸化 上段：野生型-MEFs、下段：*Ogg1* ノックアウトマウス-MEFs、それぞれ左より p38, JNK, ERK とそのリン酸化された蛋白を検討

ここでは紫外線応答に重要とされるもののリン酸化に注目し評価した。p38のリン酸化では特に*Ogg1*-MEFsについて照射後早い時間(30分後)において強い抑制が見られ、JNKのリン酸化でも同様に野生型-MEFsでは明らかではなかったものの、*Ogg1*-MEFsにて30分後において抑制が認められた。それとは対照的にERKのリン酸化では野生型-MEFs, *Ogg1*-MEFsとともに照射後遅い時間帯にてリン酸化抑制が認められた(図4)。

4. 考察

*S. platensis*においては我が国ではまだ馴染みが薄いが欧米各国ではサプリメントとして普及している。今回の我々の実験の結果からその作用点は紫外線により産生される活性酸素量を抑制していることが考えられるが、実際*S. platensis*は還元型のグルタチオンのレベルを上昇させることが報告されているので⁷⁾、今回の実験においては還元型グルタチオンの上昇は結果的に活性酸素で誘導されるDNA損傷である8-oxoGの産生を抑制していると考えられその効果により発癌作用を抑制していると考えられる。また*S. platensis*は今回の実験で皮膚における炎症反応も抑制することを示すことができた。我々は以前マウス皮膚に繰り返しUVB照射すると炎症部位より有意にペルオキシ亜硫酸(peroxynitrites)が上昇することを示した⁸⁾。ペルオキシ亜硫酸は好中球やマクロファージなど炎症部位より放出される一酸化窒素やスーパーオキシドによって産生されるので、以上を考え合わせると*S. platensis*の働きは抗炎症反応には特にPCBによりペルオキシ亜硫酸のスカベンジャーとして機能していると考えられる。

我々はまた*S. platensis*および紫外線が皮膚におよぼす関係の中でMAPKが多分に関与することを示した。Kimらはp38 MAPKがUVBで誘導される炎症反応を制御し、それらはおそらくCxcl1やIl6やシクロオキシゲナーゼ2などの誘導を介して行われている可能性を報告している⁹⁾。*S. platensis*が紫外線誘導の皮膚の炎症を抑える仕組みではこのp38MAPKの他にJNKも今回の実験では働いていることが示されているので今までの抗酸化作用のあるNアセチルシステインでJNKが抑制されている報告¹⁰⁾などと照らし合わせると*S. platensis*のシグナル蛋白に対する作用は多点に渡ると考えられる。

謝辞

本研究はコスメトロジー研究振興財団の助成を得て遂行されています。また*S. platensis*の原末やPCB原末飼料を提供して頂いたDICライフテック社にも合わせて深く感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Kunisada M, Sakumi K, Tominaga Y et al. (8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes *Ogg1* knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 65:6006-10 2005
- 2) Ismail MF, Ali DA, Fernando A et al. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina*. *Int J Biol Sci* 5:377-87 2009
- 3) Hayashi K, Hayashi T, Kojima I A natural sulfated polysaccharide calcium spirulan, isolated from *Spirulina*

- platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:1463-71 1996
- 4) Kim HM, Lee EH, Cho HH et al. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Spirulina*. *Biochem Pharmacol* 55:1071-6 1998
 - 5) Kunisada M, Yogianti F, Sakumi K et al. Increased expression of versican in the inflammatory response to UVB- and reactive oxygen species-induced skin tumorigenesis. *Am J Pathol* 179:3056-65 2011
 - 6) Kunisada M, Kumimoto H, Ishizaki K et al. Narrow-band UVB induces more carcinogenic skin tumors than broad-band UVB through the formation of cyclobutane pyrimidine dimer. *J Invest Dermatol* 127: 2865-71 2007
 - 7) Dasgupta T, Banejee S, Yadav PK et al. Chemomodulation of carcinogen metabolising enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. *Mol Cell Biochem* 226: 27-38 2001
 - 8) Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* 107:733-7 1996
 - 9) Kim AL, Labasi JM, Zhu Y et al. Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *J Invest Dermatol* 124:1318-25 2005
 - 10) Assefa Z, Garmyn M, Bouillon R et al. Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 108:886-91 1997