

# ヒト培養表皮におけるアスコルビン酸の経皮吸収および紫外線 UVB による細胞障害に対する予防、回復効果の検討

東京都健康長寿医療センター研究所

近藤 嘉高

Several studies have reported the effects of vitamin C (L-ascorbic acid, AA) on ultraviolet B (UVB)-induced cell damage using cultured keratinocytes. However, the epidermis consists of multiple cell layers, and the effect of AA on UVB-induced damage to the human epidermis remains unclear. Therefore, we investigated the effect of AA on UVB-induced skin damage using reconstituted human epidermis. The reconstituted human epidermal surface was treated with 100 and 500 mM AA and cultured for 3 h before (pre-AA treatment) or after (post-AA treatment) 120 mJ/cm<sup>2</sup> UVB irradiation. Pre- and post-AA treatments of the epidermal surface suppressed UVB-induced cell death, apoptosis, DNA damage, reactive oxygen species (ROS) production, and the inflammatory response by downregulating tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) expression and release. Moreover, the pre-AA treatment was more effective at preventing UVB-induced skin damage than the post-AA treatment. In summary, pre- and post-AA treatments of the epidermis prevent UVB-induced damage.

## 1. 緒言

皮膚は、表皮、真皮、皮下脂肪という構造をとる。表皮の角質層は、保湿や異物の侵入を防ぐバリア機能を担う。地上に届く太陽光には、表皮から真皮上層までしか到達しない紫外線 UVB (280-320 nm) と、真皮深層まで到達する UVA (320-400 nm) が含まれる。私たちは、紫外線を浴びると日焼け、すなわち、皮膚が赤く炎症を起こす急性症状とメラニン色素の沈着が起こる。この時、表皮細胞で発生する種々の活性酸素種によって、細胞障害さらにはアポトーシスが起り、炎症が惹起される。また、表皮細胞の DNA は、紫外線により傷害されて、その蓄積は皮膚がんの原因となる。従って、第一の対策としては、日焼け止めを皮膚に塗り、サンスクリーンによって紫外線を遮断することが重要である。しかし、完全には紫外線を遮断できないことから、第二の対策として、細胞内で発生する活性酸素種を消去できる抗酸化物質を摂取することが肝要となる。

アスコルビン酸(ビタミンC)は、紫外線で生ずる一重項酸素をはじめ、種々の活性酸素種を消去できる水溶性の強力な抗酸化物質である。私たちヒトは、進化の過程でアスコルビン酸の合成能を欠損したため、食事など外からアスコルビン酸を摂取する必要がある。従って、紫外線対策としては、アスコルビン酸の経口摂取にくわえて、アスコルビン酸が含まれる日焼け止めを利用することも有効であろう。しかし、ヒトの皮膚に塗布したアスコルビン酸がど

のくらい表皮に吸収されるのか、吸収された表皮のアスコルビン酸は活性酸素種を消去して細胞障害やアポトーシス、炎症を抑制するのか、塗布するタイミングはいつが効果的なのかなど、科学的な知見が不足しているのが現状である。本研究では、ヒト正常皮膚細胞より再構築された3次元培養表皮を用いて、アスコルビン酸の経皮吸収およびUVBによる日焼けに対する予防、回復効果を明らかにする。

## 2. 方法

### 2.1. ヒト培養表皮へのアスコルビン酸の取り込み

初めに、皮膚に塗布したアスコルビン酸が経皮吸収されるかどうかを明らかにするため、ヒト正常皮膚細胞より再構築された3次元培養モデルの表皮を用いてアスコルビン酸の経皮吸収を調べた。培養カップ内のヒト培養表皮は、最下層の基底膜側にはアスコルビン酸を含まない培地を入れ、最上層の角層はバリア機能を持つため空気と接した状態で培養した。表皮上にアスコルビン酸ナトリウム溶液(0, 10, 100, 500, 1000 mM)を添加して、3時間後および6時間後に表皮を回収した。表皮中の総アスコルビン酸(アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸)は、高速液体クロマトグラフィーおよび電気化学検出器を用いた方法により高感度に定量した。

### 2.2. UVB照射によるヒト培養表皮の細胞障害評価

次に、ヒト培養表皮にUVB (50, 80, 120 mJ/cm<sup>2</sup>)を照射して、24時間後に細胞障害を評価した。細胞生存率は、MTTアッセイで測定した。表皮の厚さは、培養表皮の凍結切片をヘマトキシリン・エオシン染色した後、染色画像の表皮厚を測定した。表皮の層構造は、凍結切片を用いたシトルリン化タンパク質やfilaggrin, loricrin, keratin 10, keratin 14, collagen type IV, trichohyalinの免疫蛍光染色により評価した。アポトーシス頻度は、凍結切片をTUNEL染色した後、TUNEL陽性細胞数を定量した。



Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage

Yoshitaka Kondo

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

DNA 損傷は、DNA 二重鎖切斷の指標である  $\gamma$ -H2A.X の免疫蛍光染色により、陽性細胞率を定量した。

### 2.3. UVB 照射によるヒト培養表皮の細胞障害に対するアスコルビン酸の効果

ヒト培養表皮に UVB ( $120\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) を照射する前または後の 3 時間、アスコルビン酸ナトリウム溶液 (100, 500mM) を表皮表面に添加した。UVB 照射 24 時間後に、細胞生存率やアポトーシス頻度、DNA 損傷、酸化ストレスを評価した。酸化ストレスは、脂質過酸化の指標である 4-hydroxynonenal (4-HNE) の免疫蛍光染色により、活性酸素種は、スーパーオキシドアニオンを検出する dihydroethidium (DHE) 染色により評価した。また、UVB 照射 3 時間後に定量的 PCR 法により培養表皮の TNF- $\alpha$  遺伝子発現量を、照射 9 時間後に ELISA 法により培養上清の TNF- $\alpha$  タンパク質量を測定した。

## 3. 結果

アスコルビン酸を添加しないヒト培養表皮では、表皮中に総アスコルビン酸は全く検出されなかった。一方、アスコルビン酸を添加したヒト培養表皮では、総アスコルビン酸が検出され、添加濃度 (10, 100, 500, 1000 mM) が高い群ほど、総アスコルビン酸量は多かった。

次に、ヒト培養表皮に UVB ( $50, 80, 120\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) を照射して、24 時間後に細胞障害を評価した。照射量が多い培養表皮は、細胞生存率が低く、アポトーシス細胞や細胞の空胞化、DNA 損傷が多かった。しかし、表皮の厚さや層構造に明らかな差は認められなかった。一方、UVB 照射の前または後にアスコルビン酸を添加した培養表皮は、添加しない群に比べて細胞生存率が高く、アポトーシス頻度や細胞の空胞化、DNA 損傷、酸化ストレス、活性酸素種が少なかった。特に、アスコルビン酸を UVB 照射

前に添加した培養表皮は、照射後に添加した時に比べて、UVB による細胞障害がより抑制された。

## 4. 考察、総括

ヒト 3 次元培養表皮に添加したアスコルビン酸は、経皮吸収されることが明らかとなった。アスコルビン酸は、角層のバリアがあるものの、おそらく細胞間隙を通過して表皮中に入り、ナトリウム依存性ビタミン C トランスポーター (SVCT) により角化細胞に取り込まれると考えられる。3 次元培養表皮は、ヒトの表皮構造を再現したモデルであることから、ヒトの皮膚に塗布したアスコルビン酸も経皮吸収されることが示唆される。

これまでに、表皮の角化細胞を用いた単層培養の試験からは、抑制効果と増悪効果のいずれも報告されており、議論が続いていた。しかし、生体内により近いヒト 3 次元培養表皮を用いた本研究により、経皮吸収されたアスコルビン酸は、UVB による細胞障害を抑制することが明らかとなった。表皮中のアスコルビン酸は、UVB により産生される活性酸素種を消去することにより酸化ストレスを抑制して、DNA 損傷やアポトーシスなどの細胞障害を防いだと考えられる。さらに、アスコルビン酸塗布のタイミングについて、UVB 照射の前の方が後よりも効果的であることも明らかとなった (図)。この研究成果は、皮膚におけるアスコルビン酸の機能解明や紫外線対策に貢献することが期待される。

### (引用文献)

- 1) Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y, Saito N, Ohsawa H, Kurita K, Nagata K, Yoshida M, Ishigami A. Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Sci Rep.* 8 (1), 16199 (2018)

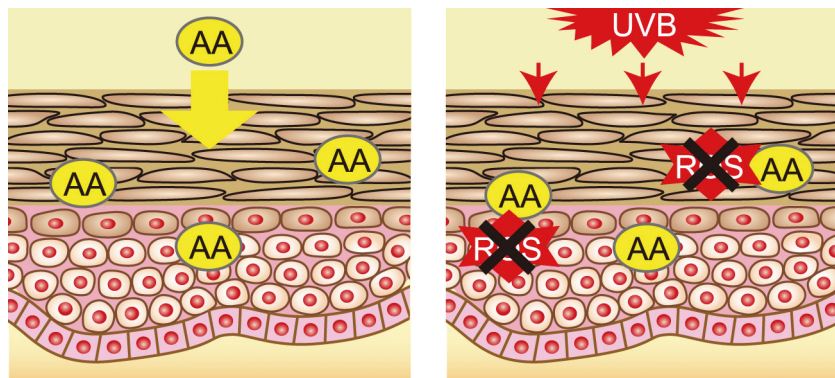


図 皮膚へのアスコルビン酸塗布は、紫外線照射による細胞障害を抑制  
UVB 照射の前または後にアスコルビン酸を表皮表面に添加すると、表皮にアスコルビン酸が取り込まれて、UVB 照射による細胞障害を抑制した。特に、UVB 照射前にアスコルビン酸を塗布した方が、後から塗布するよりも効果的であった。  
AA : アスコルビン酸、ROS : 活性酸素種、UVB : 紫外線