

頭皮常在菌による組織酸化とエイジングの関係性に迫る The Relationship Between the Tissue Aging and Oxidation Caused by Bacteria Colonizing on the Scalp

菊地 哲宏, 安久都 卓哉, 菅原 達郎, 渡邊 紘介, 鈴田 和之, 伊藤 廉
Tetsuhiro Kikuchi, Takuya Akutsu, Tatsuro Sugawara, Kosuke Watanabe, Kazuyuki Suzuta, Len Ito

株式会社ミルボン
Milbon Co. Ltd.,

我が国の人口動態における少子高齢化の傾向は、美容業界においても重要な影響を与えており、特に団塊ジュニア世代である 40 代から 50 代に向けた製品開発が活発になっている。40 代以降においては、細胞老化による頭皮や毛髪の変化が顕著となり、この細胞老化の一つとして細胞内外タンパク質酸化が確認されている。本課題では、特定の頭皮常在菌と共培養した三次元培養皮膚モデルを顕微 IR 法にて測定することで、カルボニル基のシグナルが増加することを、確認することができた。更にカーブフィッティング解析にてタンパク質の二次構造情報を計算し、計算から得られた値を用いてタンパク質二次構造のイメージマッピング図を作成したところ、特定の頭皮常在菌と共培養した三次元培養皮膚モデルでは β -sheet の割合が相対的に増加する可能性が示唆された。

キーワード： 酸化、顕微 IR、タンパク質

背景と研究目的：

我が国の人口動態における少子高齢化の傾向は、美容業界においても重要な影響を与えている。経済活動を牽引してきた団塊世代の高齢化、及び団塊ジュニア世代が 40 代後半に突入したことを機に、アンチエイジングを謳う商品企画や開発競争が盛んになってきた。また、このような高齢化社会を迎える日本の化粧品メーカーがどのような研究を行い、商品開発を行っていくのか、世界各国が注目している。エイジングと頭皮或いは毛髪の変化を掴む研究[1-4]が進められているが、まだまだ研究の余地があり、研究進展が望まれている。

ヒト細胞の老化現象の一つに、酸化ストレスによる細胞酸化現象がある。細胞の酸化は、主に活性酸素群 (ROS) によって引き起こされることが知られている。活性酸素群に対して、細胞は活性酸素除去能を持つカタラーゼ等の酵素を有するが、年齢を重ねるにつれ、酵素の活性は次第に低下し、細胞の酸化現象が顕著になる。我々はこれまで、加齢に伴い、ヒトの頭皮角層細胞や毛髪で、細胞酸化現象の一つであるタンパク質のカルボニル化が増加することをとらえている[5]。このタンパク質のカルボニル化は表皮角層細胞のタンパク質二次構造の変化を誘発するとの報告もあり[6]、頭皮角層細胞や毛髪の構造に影響を与えることも考えられる。また、酸化ストレスの誘導によって、角層細胞同士を繋ぐタンパク質で構成されるタイトジャンクションの劣化を引き起こすことが近年報告されている[7]。タイトジャンクションが劣化すると皮膚バリア機能が低下し、細胞間の水分が抜けやすくなり乾燥性皮膚のような老化現象を示し[8]、それが炎症を引き起こすことで老化が加速すると考えられる。このように細胞酸化と細胞のタンパク質構造の関係は、老化現象に密接に関連していると示唆される。

細胞酸化及びタンパク質構造は、老化現象をひも解く重要な研究テーマであるが、酸化を検出する蛍光試薬を、細胞内に入れることが難しいことなどから、酸化の分布や酸化とタンパク質構造変化との関連性を、可視化する方法はいまだ発展途上である。一方、赤外光を細胞に透過させる手法を用いれば、細胞内の情報を試薬等を用いることなく直接的に得ることが出来る。実際、我々は継代により老化させた細胞を用いた一細胞イメージング技術により細胞内のカルボニル化タンパク質の細胞内分布をイメージングする方法を確立してきた (産業利用一般課題: 2018A1573, 2018B1610, 2019A1638)。

また、我々は特定の頭皮常在菌が細胞老化を促進することを生化学的にとらえており[9]、これまで BL43IR を活用した一細胞イメージングによって、前述の頭皮常在菌を細胞に暴露することで、細胞内でカルボニル化タンパク質が増加し、細胞酸化が加速することも見出している。またその頭皮常在菌

は細胞外での活性酸素種の産生を促進していることが報告されている[10]ことから、酸化ストレスや頭皮常在菌のような外的環境と細胞・組織中のタンパク質構造との関係は、老化現象に密接に関連している可能性が高い。

本課題では、細胞よりも生体組織に近い、三次元培養皮膚モデルにて、常在菌の暴露による酸化分布や、酸化に伴うタンパク質の構造変化との関連性を高分解能で解析できれば、酸化抑制のメカニズム解明に繋がり、老化現象を効果的に抑制できる商品開発に繋がると考え、研究を行った。

実験：

測定試料：

市販されている三次元培養皮膚モデル

測定条件：

BL43IR の赤外分光光度計 (Bruker Vertex70) と赤外顕微鏡 (Bruker Hyperion2000) を使用した。試料を赤外透過材料であるフッ化カルシウム板にのせ、赤外顕微鏡 XY 試料ステージ上で透過測定した。マッピング測定には、XY 試料ステージをそれぞれの試料に適切なステップ間隔、範囲を設定した。赤外光は、必要な空間分解に応じて、アパーチャーにて領域を制限して照射した。MCT 検出器を用い、測定波数範囲は $6000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ とした。本実験では市販されている三次元培養皮膚モデルを用いた。三次元培養皮膚モデルはメタノールにて固定を行った後、クリオスタットにて $5\text{ }\mu\text{m}$ の厚さで切片化し、フッ化カルシウム板に乗せて測定を行った。測定はマッピングステージを使用して $2.5\text{ }\mu\text{m} \times 2.5\text{ }\mu\text{m}$ 単位で行い、各測定点に対して $6000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ の波数にて赤外吸収スペクトルを得た。この時のアパーチャーサイズは $2.5\text{ }\mu\text{m} \times 2.5\text{ }\mu\text{m}$ とし、積算回数は 64 とした。 1740 cm^{-1} 付近に現れるカルボニル基を 1650 cm^{-1} 付近のアミド I のシグナルで割り込むことによって解析することで I_{1740} とし、三次元培養皮膚モデルを用いたカルボニル基イメージングを行った。またアミド I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) の赤外吸収スペクトルに対し、カーブフィッティング解析を行い、H. Yang らが報告している[11]ガウスピーク ($\alpha\text{-helix}$: 1653 cm^{-1} , $\beta\text{-sheet}$: 1628 cm^{-1}) 面積値から、タンパク質のフォールディング状態を算出した。

結果および考察：

測定の結果、特定の頭皮常在菌の培養上清を三次元培養皮膚に暴露し培養を行うことで、組織上部の角質層付近だけでなく組織内部でもカルボニル基由来のピークを確認し、イメージマッピング図として反映した (Fig. 1)。このことにより、頭皮常在菌により、単一細胞だけでなく、組織にも酸化が促進する可能性が示唆された。

またカーブフィッティング解析にてタンパク質の二次構造情報を計算し、計算から得られた値を用いてタンパク質二次構造のイメージマッピング図を作成したところ、頭皮常在菌の暴露によって $\beta\text{-sheet}$ の割合が相対的に増加する傾向がみられた (Fig. 2)。細胞老化によってタンパク質が二次構造変化を起こすとの報告[6]があるが、本検討により、顕微 IR 法によって組織の二次構造変化を捉えられる可能性が出てきた。

今後の課題：

今回、特定の頭皮常在菌によって培養した再構築皮膚でも単一細胞同様カルボニル基シグナルを確認することができた。細胞に関しては、すでに横断利用として BL24XU で行った蛍光 X 線測定 (産業利用一般課題: 2018A3264, 2018B3264) にて、継代により老化様を呈している細胞で、金属分布が乱れていることも見出している。組織の酸化現象と金属分布などの紐づけについて、現在鋭意検討中である。今後は、各々のビームライン担当者と共に測定方法・条件開発も行いながら、細胞や組織内酸化現象メカニズムの解明を行っていきたい。

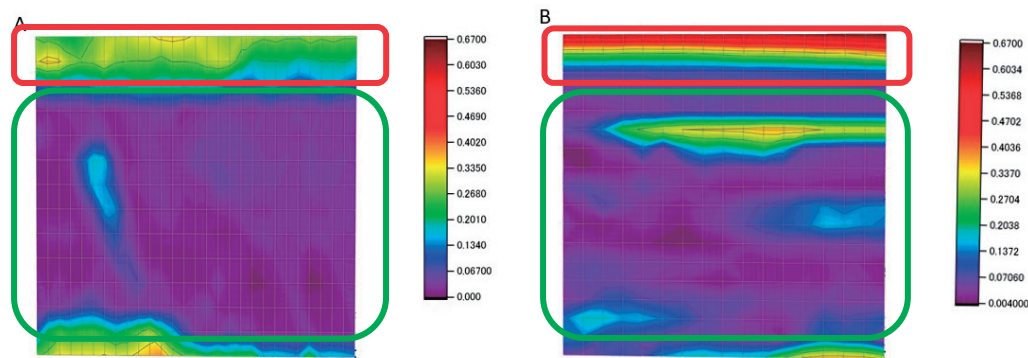


Fig. 1 顕微 FT-IR によるカルボニル化タンパク質のマッピングデータ

アミド I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) およびカルボニル ($1710\text{--}1775\text{ cm}^{-1}$) の赤外吸収スペクトルに対し、カーブフィッティング解析を行い、アミド I に対するカルボニル基の吸収強度をもちいてマッピングデータを作成。上部赤囲い部が角質層組織、下部緑囲いが表皮内部組織。特定の頭皮常在菌培養上清を添加した三次元培養皮膚モデル (B) では添加しなかった三次元培養皮膚モデル (A) と比べて酸化が促進していることが分かった。

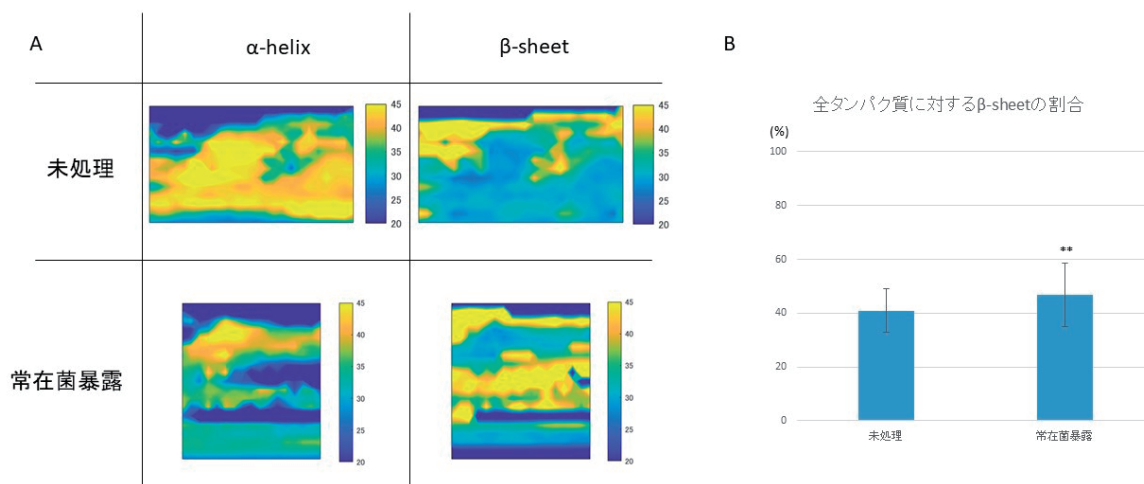


Fig. 2 常在菌を暴露した三次元培養皮膚モデルのタンパク質二次構造マッピングデータ

アミド I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) の赤外吸収スペクトルに対し、カーブフィッティング解析を行った。マッピングデータを作成したところ、常在菌で処理したものでは、 β -Sheet の割合が全体的に増加しており (A)、全タンパク質に対する β -sheet の割合も有意に上昇していることが分かった (B, **: $p < 0.01$)

参考文献：

- [1] Sakurai Y., et al., *JSID 37th Annual Meeting* (2012)
- [2] Nagase S., et al., *J. Cosmet. Sci.*, **60**, 637 (2009)
- [3] Masukawa Y., et al., *J. Cosmet. Sci.*, **56**, 1 (2005)
- [4] 西村桂一ら, *日本化粧品学会誌*, **13**, 134 (1989)
- [5] 櫻井勇希ら, 第 14 回抗加齢医学会総会 (2014)
- [6] Iwai I., et al., *Int J Cosmet Sci.*, **30**, 41–46 (2008)
- [7] C El-Chami., et al., *Sci Rep.*, **8**, 5167 (2018)
- [8] Tončić RJ., et al., *Clin Dermatol.*, **36**, 109–115 (2018)
- [9] Akutsu T., et al. The 14th ASCS Conference (2019)
- [10] Huycke MM., et al., *Mol Microbiol.*, **42**, 729–740 (2001)
- [11] H. Yang, et al., *Nat. Protoc.*, **10**, 382 (2015)