

1 細胞イメージングからひも解く、加齢に伴う角質細胞内の変化 Single-Cell Imaging of Age-Related Changes in Keratinocyte Cells

渡邊 紘介¹, 菊地 哲宏¹, 安富 諒¹, 豊田 耕司¹, 鈴田 和之¹, 伊藤 廉¹
Kosuke Watanabe¹, Tetsuhiro Kikuchi¹, Ryo Adomi¹, Koji Toyoda¹, Kazuyuki Suzuta¹, Len Ito¹

¹ 株式会社ミルボン
¹ 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、この細胞老化の要因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。本実験では、顕微 IR 法を用いることで、ヒト頭皮表皮層を構成する角化細胞の老化による細胞内酸化タンパク質の広がり of 1 細胞イメージングを試みた。その結果、角化細胞内においてタンパク質の酸化シグナルの一つであるカルボニル基のシグナルが偏った分布を持って増加することを確認した。

キーワード： 顕微 IR、角化細胞、タンパク質、1 細胞イメージング

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要因の一つに、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出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。

細胞酸化のメカニズム解明は、老化現象をひも解く重要な研究テーマであるが、これまでの研究における酸化の可視化は、細胞外のものに限られていた。その要因として、酸化を検出する蛍光試薬は存在するが、細胞内、特に生細胞内に入れることが難しいことが挙げられ、そのため細胞内の酸化の分布や酸化とタンパク質構造変化との関連性については、ほとんど観察出来ていない。一方で、赤外光を細胞に透過させる手法を用いれば、細胞内の情報を得ることが出来る。細胞内における酸化分布や、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。

実験手法：

測定試料：

市販されている一般株化正常ヒト表皮角化細胞（Normal Human Epidermal Keratinocytes : NHEK）

測定条件：

BL43IR の赤外分光光度計（Bruker Vertex70）と赤外顕微鏡（Bruker Hyperion2000）を使用する。試料を、赤外透過材料であるフッ化バリウム板にのせ、赤外顕微鏡 XY 試料ステージ上で透過測定する。マッピング測定には、XY 試料ステージをそれぞれの頭皮角質層・細胞試料に適切なステップ間隔、範囲を設定する。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する。MCT 検出器を用い、測定波数範囲は $6000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ とする。本実験では市販されているヒト由来の角化細胞を用いる。角化細胞の測定では、継代別の細胞をフッ化カルシウムに接着培養させ、乾燥を防ぐためグリセリンを含んだリン酸緩衝液で覆い、透過測定を行う。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 $6000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ の波長にて赤外吸収スペクトルを得る。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 128 とする。 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、1 細胞のカルボニル基イメージングを行った。

結果および考察：

市販されている初代培養ケラチノサイトを使用して、継代数別に 1 細胞イメージングを行った結果、継代数 3 回の若い細胞ではほとんどカルボニル基のシグナルが確認されなかったことと対照的に、継代数 7 回の老化様細胞では、カルボニル基のシグナルが増大していることが確認できた (Fig. 1)。また、特に継代数 7 回の老化様細胞内ではカルボニル基シグナルの分布に偏りが存在していることも確認できた。

この酸化現象の分布の偏りは、細胞内の金属分布の違いも影響している可能性が考えられる。我々は横断利用として 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。これら金属分布と細胞の酸化状態の分布を紐づけることが出来れば、細胞内における酸化現象メカニズムの一端を解明でき、それらに対応する製品開発に応用できると考えている。

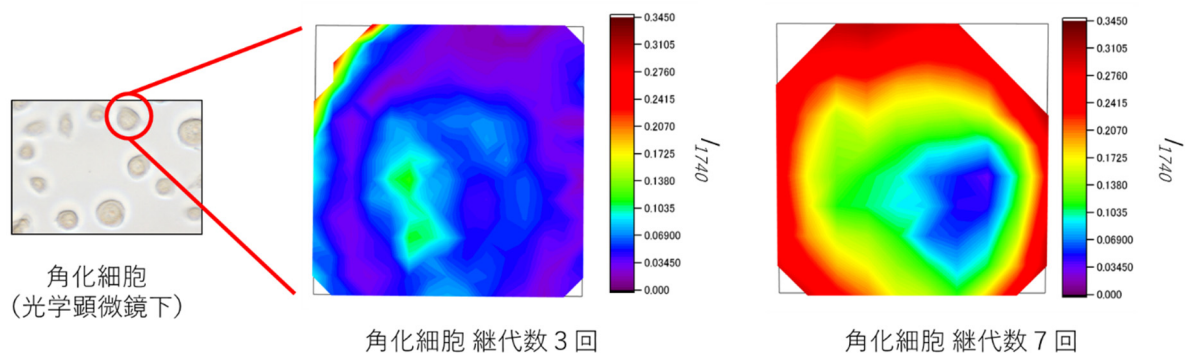


Fig. 1 角化細胞 1 細胞内部におけるカルボニル基シグナルのマッピング画像。

I_{1740} は、アミド I によって割り込まれたカルボニル基のシグナル強度を示している。

今後の課題：

今回、老化細胞内でカルボニル基シグナルが偏った分布を持っていることが 1 細胞イメージングによって確認された。これは細胞内の老化によるタンパク質酸化現象に、細胞内で分布偏差があることを示唆している。これらが細胞内金属分布と紐づくかについて、ビームラインの横断的利用により明らかにしようと試みているが、細胞の測定条件が異なるため単純比較が難しい等の障壁がある。今後は、測定条件を出来る限り近いものにするため、各々のビームライン担当者と共に測定条件開発も行いながら、細胞内酸化現象メカニズムの解明を行っていく。

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.*, *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)