

【研究区分：先端的研究】

研究テーマ：アッケシソウ抽出物による美肌効果とその分子機構研究	
研究代表者：生物資源科学部生命環境学科（生命科学コース）教授 達家雅明	連絡先：tatsuka@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
【研究概要】 アッケシソウ (<i>Salicornia europaea</i> , <i>Salicornia herbacea</i> に同じ) は、環境省絶滅危惧指定の耐塩性植物である。古代より鹹草として薬用に供されていたが、近年、その生理活性資源としての有用性が注目されている。中でも、肌ホメオスタシスへの改善効果が期待される。本研究では、3次元皮膚培養モデル (a multilayered, highly differentiated <i>in vitro</i> skin model) を用いて、アッケシソウ抽出液の生理効果を解析した。その結果、太陽光紫外線 (UVB) による皮膚上皮基底層幹細胞の分裂軸の乱れに対して改善作用のあることがわかった。	

【研究内容・成果】

(研究背景) RhoGDI (Rho GDP-dissociation inhibitor) は、真核生物の細胞骨格や細胞運動を制御する細胞内シグナル経路上に存在するシグナルスイッチ分子 (Rho ファミリー G タンパク質) のレオスタット (可変抵抗器) として機能する^{文献1}。ヒトで3種類存在する RhoGDI の内、RhoGDI β (RhoGDI2, LyGDI, D4GDI としても知られる) にだけ、その分子内に3型カスパーゼによる切断サイトがある^{文献1}。紫外線などのゲノムストレスにより3型カスパーゼが活性化した細胞では、N末側が欠失した変様 RhoGDI β (Δ N-RhoGDI β) が発現する^{文献1}。

我々のこれまでのヒト上皮がん HeLa 細胞を用いた研究によって、 Δ N-RhoGDI β は、ゲノムストレス後に生存し再増殖した細胞で持続的に発現しており、補償的に増殖した細胞の分裂軸の乱れ (正常な細胞分裂軸制御からの逸脱) とかかわっていることがわかっている^{文献2}。すなわち、 Δ N-RhoGDI β 発現は、ゲノムストレスによる分裂軸の乱れの原因となっており、 Δ N-RhoGDI β 発現抑制により、この乱れは抑制させることが出来ると考えられる^{文献2}。実際、short hairpin RNA (shRNA) の実験では、RhoGDI β ノックダウンが、紫外線によって引き起こされた分裂軸の乱れを抑制する^{文献3}。このことから、RhoGDI β の発現を抑制させる効果のある生理活性物質の探索は、紫外線照射時の Δ N-RhoGDI β 発現抑制因子の発見へと繋がり、結果的に、紫外線で誘発される分裂軸の乱れを防ぐ因子の開発に繋がる^{文献3}。

このようなコンセプトを基盤として、我々は、「HeLa 細胞による RhoGDI β 発現変動活性検出系」を開発し (右図)、ヒト皮膚に塗布することを目的とした添加天然物素材のライブラリを入手後、その 105 種類を 1 次スクリーニングした。その結果、13 種類の RhoGDI β 発現変動活性を有する素材を選別し (2 次スクリーニング)、その最有力候補として、アッケシソウ抽出液を見つけるに至った (3 次スクリーニング)。

アッケシソウは、古く「神農本草経」や「大和本草」に鹹草として掲載される薬草であり、また、近年においては、その抽出液の美肌効果が期待されている。一方において、本草は、その昔は機内域を含む瀬戸内一円に生育していたと思われるが、近年では絶滅が危惧されている。

本研究では、RhoGDI β 発現抑制活性を持つ天然素材として発見されたアッケシソウ抽出液の美肌効果の作用機作について科学的に解明する目的から、RhoGDI β 発現抑制によって期待される紫外線照射時の分裂軸の変動を抑える効果について、3次元皮膚培養モデル (a multilayered, highly differentiated *in vitro* skin model) により解析を行った。

(材料と方法) アッケシソウ抽出液：北海道北海道厚岸郡厚岸町厚岸湾生育のアッケシソウを用いた。常温にて、アッケシソウの乾燥重量に対して 20 倍量の 3-methoxy-3-methyl-1-butanol (30%) で抽出を行った。

RhoGDI β 発現抑制素材スクリーニング方法

目的：細胞分裂軸を乱す Δ N-RhoGDI β の産生を抑制するため、その前駆体であるRhoGDI β の産生(発現)を抑制する素材を見出す。

方法：RhoGDI β の遺伝子発現を抑制する素材を見出すため、素材処理した細胞(HeLa)のRNAを回収し、RhoGDI β の発現を Real Time PCR で確認する。

プロトコール

- ① 12WellのプレートにHeLa細胞を 5×10^4 ずつ播き、24時間培養
- ② 素材を加えた培地に 換し、さらに24時間培養
- ③ 培地を取り除き、細胞からRNAを抽出 (Trizol, TaKaRa)
- ④ RNAを用いてReal Time PCRを実施 (One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit, TaKaRa)
- ⑤ β -actinを内部標準とし、RhoGDI β の発現量を確認



【研究区分：先端的研究】

紫外線照射：UVB 照射装置デルマレイ-200 (311 nm ナローバンド) を用いた。

3次元皮膚培養モデル解析：市販5社の培養系を試した結果、培養における増殖能、皮膚ケラチン細胞への分化度、そして、その分化形態、また、製品間のバラツキの少なさという点で最も優れていた EPI-200 (米国 MatTek 社製) を用いた。通常分化状態の培養系に対して、非照射、あるいは、100 と 200 mJ/cm² の紫外線照射後 2 日毎に培地交換を行った。アッケシソウ処理群には、0.03%、0.1%、0.3% のアッケシソウ抽出液含有培地を用いた。培養 10 日目に固定パラフィン包埋後、縦方向の連続切片を作成し、hematoxylin-eosin 染色を行った (下図左)。分裂角度は、1 回の実験で 25 個以上の分裂細胞を計測し、3 回の実験で合計 80 個の分裂細胞を計測した。

(結果) 紫外線照射により、基底膜と並行に分裂する対称分裂と基底膜に直行する非対称分裂の割合が減った (下図中央 A B C)。これに対して、いずれの濃度のアッケシソウ抽出液処理群においても、対称分裂と非対称分裂の割合の減少は緩和された (下図中央 D E F G H I J K L)。また、統計学的なバラツキの有意差検定もこの結果を支持した。

(考察) 皮膚上皮におけるケラチン細胞層の構築の乱れが紫外線で起こり、その結果、皮膚の肌理の乱れや保湿力の喪失、角化の度合いの低下などが生じることは、よく知られている^{文献3}。また、近年の上皮組織構築過程の研究から、基底膜上の幹細胞分裂が基底膜に対して並行に分裂する対称分裂 (幹細胞性分裂) と基底膜に直行する非対称分裂 (分化性分裂) によって制御されていることも広く知られるようになった^{文献3}。しかしながら、実際に、紫外線によって、基底膜上の幹細胞分裂軸の乱れが生じることを証明した研究結果を見ない。今回、我々は、3次元皮膚培養モデルを用いた解析から、紫外線照射後の細胞分裂では、対称分裂と非対称分裂の精度が下がることを示した。また、この低下をアッケシソウ抽出液により改善した (下図右)。

アッケシソウ抽出液には、抗酸化活性や抗炎症活性、細胞分化に対する影響などの種々の生理活性が報告されているが、今回の研究結果は、アッケシソウ抽出液中には、これまで報告の無い幹細胞の分裂軸制御に影響を与える因子が存在することを示す。アッケシソウ抽出液は、HeLa 細胞の RhoGDIβ 発現を抑制する効果を指標としてスクリーニングされた天然物素材であり、次年度継続研究対象とならなかったものの、今後の課題として、1) どういった含有因子が RhoGDIβ 発現を抑制するのか、2) その因子が分裂軸制御にかかわる因子なのか、3) すなわち、その因子の RhoGDIβ 発現抑制活性が皮膚の紫外線による乱れを回復させることに繋がるのか、などについて明らかにして行きたい。特に、アッケシソウは耐塩性植物であり、植物細胞における耐塩機構シグナルに Rho ファミリー G タンパク質が深く関わっていることが知られており、そういった意味でも、アッケシソウ抽出液中の RhoGDIβ 発現抑制因子の解析は興味深い。

文献 1) 達家雅明, 他. RhoGDIβ を分子標的とした応用生命科学の可能性. 生命環境学雑誌. 2016 March;8(1):1-12.

文献 2) Fujiwara M., et al. Radiation-Induced RhoGDIβ cleavage leads to perturbation of cell polarity: a possible link to cancer spreading. J Cell Physiol. 2016 Nov;231(11):2493-2505.

文献 3) Doi N., et al. RhoGDIβ affects HeLa cell spindle orientation following UVC irradiation. J Cell Physiol. 2019 Sep;234(9):15134-15146.

