

メラニン過剰蓄積が引き起こすシミ特有の細胞老化機構とその薬剤ソリューション

井上 大悟*1 / ヌラニ アリフミー*1 / 柴田 貴子*1

1. はじめに

シミは、光老化の中でも人種や性別問わず老徴として特に認識される肌悩みの1つである。顔や手の甲など、日常的に日光にさらされる皮膚の部位に非対称の色素沈着病変として形成される。通常30代あたりから主にこめかみや頬にシミと実感できる色素沈着が現れ始め、40代から50代にかけて徐々にシミが濃くなったり、数が増えたり、広がったりといった様々な表現型に悪化していく¹⁾。現状の課題として、レーザー治療によるシミ除去後でもシミが再発することや、美白薬剤の有効性が各分子ターゲットに対する限定的なアプローチであることから、シミの根本的改善及び除去には、新たなアプローチからの研究開発が求められている。

シミにおける色素沈着のメカニズムは、メラノサイトの樹状突起発達を特徴としたメラニン生成亢進、基底ケラチノサイトの過剰なメラニン沈着という2種類の細胞の異常に集約できる²⁾。シミの過剰な色素沈着へいたる過程は、主に慢性的な紫外線暴露に起因するが、同様の紫外線暴露歴があると想定されるシミとその近傍の非シミ部位の運命を分かち決定因子は未だ不明なままである。以前の筆者らや他の研究から、表皮ケラチノサイトの分化に重要なEカドヘリンやNotch1の発現

低下が、ケラチノサイトの分化異常とその後の慢性炎症やメラノサイト刺激因子の恒常的な活性化を介してシミの悪化環境を規定することを示していた^{3) 4)}。したがって、外因性因子としての紫外線暴露に加えて、シミを悪化させるこれまでに明らかになっていない内因性因子を考慮する必要がある。しかしながら、美容施術あるいはご遺体の皮膚からシミを含む皮膚サンプルを入手することは非常に困難であり、上記課題に取り組む際の障壁となっている。この課題を解決するため、シミの非侵襲的計測が長い間求められてきた。例えば、光干渉断層撮影 (OCT) 血管トモグラフィーは、シミの真皮の異常な毛細血管構造を捉え、これが炎症性環境の形成に重要な役割を果たしている可能性があることが明らかとなった⁵⁾。さらに、蛍光寿命イメージング顕微鏡法 (FLIM) は、メラニン、NAD (P) H、特定のビタミンなどの内因性蛍光分子の蛍光寿命を測定することで、皮膚におけるメラニン分布を明らかにしてきた⁶⁾。このような先行研究を踏まえ、筆者らは蛍光寿命イメージングによってシミ特有の細胞内微小環境を捉え、かつそれを改善する有効成分の効果を検証できるのではないかと考えた。本研究において、①生きたシミの細胞レベルでの内在性プロセスを明らかにする非侵襲的測定アプローチを開発すること、②そこから導き出されたメカニズムをもとに実効

薬剤をスクリーニングしシミ改善につながる薬剤開発をすること、を目的とした。

2. シミにおける表皮の酸化リン酸化 (OXPHOS) 活性低下

筆者らはまず、“生きた”状態におけるシミ表皮細胞の代謝状態を調べるために酸化還元反応にかかわる電子伝達体NAD (P) Hを指標として、蛍光寿命トモグラフィ(MPTcompact/flex, JenLab)による測定をおこなった。資生堂倫理委員会の承認を得て実施した。被験者全員から書面によるインフォームドコンセントを得て、頬に顕著なシミ病変があると皮膚科医によって診断された30～69歳の18人の参加者(女性12人、男性6人)を測定した。NAD (P) Hは、タンパク質結合型NAD (P) Hとタンパク質非結合型NAD (P) Hの存在状態において2つ特徴的な蛍光寿命を持ち、前者はミトコンドリアのOXPHOSと、後者は細胞質における解糖系という2つのATP産生代謝経路の間接的な情報を取得することができる⁷⁾。解糖系が主に機能している基底ケラチノサイトとは対照的に、分化していくケラチノサイトでは、OXPHOSが細胞分化に必要なATP産生の供給源として機能する⁸⁾。すなわち、NAD (P) Hのタンパク質結合状態を調べることで、表皮細胞におけるATP産生代謝経路の代謝シフト状態を把握することができる。最近の報告により、NAD (P) Hの長寿命と短寿命の振幅の比率($A_{\text{bound NAD (P) H}}/A_{\text{free NAD (P) H}}$)

OXPHOSの活性化にともなって、 $A_{\text{bound NAD (P) H}}/A_{\text{free NAD (P) H}}$ 値が上昇した(図1A)。すなわち、培養ケラチノサイトのFLIM解析において、 $A_{\text{bound NAD (P) H}}/A_{\text{free NAD (P) H}}$ がOXPHOSの代謝シフト状態の指標として有効であることが示された。次に、同一被験者のシミ部位とシミ近傍部位(非シミ部位)で細胞内代謝状態をFLIM解析した(図1B)。基底層及び有棘層の遊離型NAD (P) Hの蛍光寿命減衰は、メラニン沈着した基底表皮細胞のメラニンの蛍光寿命減衰と分離が困難なため、まず、メラニンの寄与が少ない角層直下の顆粒層を評価した。遊離型NAD (P) Hの蛍光寿命は通常約0.2～1.2 nsで観察されるが、結合型NAD (P) Hの蛍光寿命は1～6.5 nsと長くなる¹⁰⁾。蛍光寿命自体は、pH、結合タンパク質、結合構造、さらにはNAD (P) Hプール全体などの細胞環境によって変動する⁹⁾。760 nm～780 nmの励起波長、最大出力10 mWの条件で、表皮顆粒層の細胞の細胞質の蛍光寿命をSPCImageソフトウェア(Becker&Hickl)を使用して解析した。蛍光寿命減衰曲線は、実験データに応じて、2指数あるいは3指数減衰モデルを適用しフィッティングをおこなった。各FLIM画像について、3～5個の細胞をランダムに選択し、核以外の細胞質をROI(Region of Interest)として設定し、FLIMの解析にもちいた。またフェーザプロットを解析することで、NAD (P) Hの蛍光寿命成分に含まれるメラニン等のバックグラウンド因子を区別し、

これ以降の閲覧を希望の場合は、本誌をご購読ください。