

## 紫外線誘導しわ形成に対する サンスクリーン製剤の迅速評価法の開発

A Trial of Quick Evaluation Method for Photo-protective  
Sunscreens against Ultraviolet-induced Wrinkle Formation

花田勝美<sup>\*</sup>, 玉井克人<sup>\*</sup>, 今 浮<sup>\*</sup>, 中野 創<sup>\*</sup>, 原田 研<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>弘前大学

光老化, とくにしわの抑制を目的としたサンスクリーン製剤の開発が行われているが, その評価には長期間を要する。そこで日光弾性線維症の発現を迅速に把握できる実験系が求められている。ここでは中波長紫外線 UVB が誘導するエラスチン・プロモーター活性を蛍光で観察する実験系の作成を試みた。その結果, UVB 誘導エラスチン・プロモーター活性の UVB 照射量依存性を蛍光で観察することができた。すなわち, 迅速かつ簡便にエラスチン成分の豊富な日光弾性線維症の発現を定量できる可能性が示唆された。ホリバグループのひとつであるジョバンイボン社(アメリカ)製の光ファイバー付き蛍光分光測定装置 SPEX Fluorolog-3 による注入細胞の蛍光の定量はサンスクリーン製剤の迅速評価に有用となることが示唆された。

For the purpose of prevention of photoaging causing deep wrinkle formation, a great number of sunscreens against broadband spectra of solar ultraviolet (UV) have been produced. However, *in vivo* evaluation of sunscreens for anti-photoaging requires a long period. In the present experiment, a new evaluation system has been tested. Mouse fibroblast (3T3) transferred human-elastin promoter linked to Green Fluorescent Protein (GFP) reporter gene was cultivated. After exposure to UVB, green fluorescence intensity of 3T3 was observed. In addition, after injection of the cells into the mouse skin, fluorescence intensity was measured using SPEX Fluorolog-3 model 322 spectrofluorometer fitted with an optical attachment (Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA). The cultured cells emitted green fluorescence in UVB-dose dependent manners. The fluorescence of injected cells was measurable from the surface of mouse skin. The result indicates the quantitative measurement of fluorescence intensity of cells injected to mouse skin might be useful for the quick and easy evaluation of solar elastosis formation and protective effect of sunscreens.

### 1

#### はじめに

しわの形成には「光老化」と「自然老化」の2つの機序が存在する。露出部である顔面では皮膚の肥厚と深く刻まれた「しわ」がみられ、「光老化」優位の像を示す。

光老化の結果としてみられる「しわ」の最も特徴的な組織学的変化は, 日光弾性線維症であり, 慢性紫外線曝露による皮膚の劣化の代表的所見となっている。日光弾性線維症では真皮上層に限局して弾性線維様成分の集塊像がみられるが, 正常の弾性線維の機能を果たさず「はり」のない皮膚となり, 結果として光老化によるしわ形成の要因となるものと考えられている。

弾性線維はエラスチンやフィブリリンにより構成され, 線維芽細胞により産生されるが, 近年, これら成分の発現におよぼす紫外線の影響に関して分子生物学的解明がなされている。

図1には紫外線によるしわの形成機序, 日光弾性線維症形成の分子生物学的メカニズムを示した。すなわち, 中波長紫外線(UVB)や長波長紫外線(UVA)は線維芽細胞に作用し, 種々の生物学的活性を引き起こしうる。

UVB 照射はエラスチン産生にあずかるエラスチン mRNA を誘導し, かつ, エラスチンプロモーターの活性を増加させることが知られている<sup>[1]</sup>。また, UVA 照射は真皮の基質の変性にあずかるコラゲナーゼやストロメライシ

ン-1のmRNA<sup>[2]</sup>を増加させることも知られており,コラーゲンの変性が代償性にエラスチン様成分の発現を増加させるものと考えられている。

これらの事実はしわの形成にはUVB, UVAの両紫外線が促進的にはたらくことを意味する。このため光老化の抑制を目的とした,サンスクリーン製剤の開発に努力が払われている。

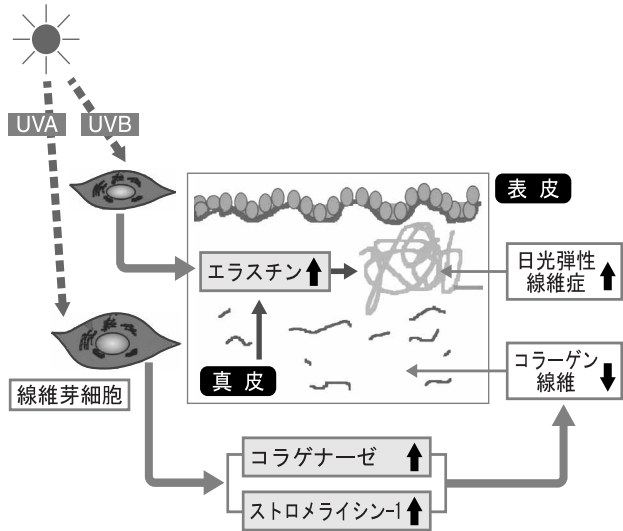


図1 紫外線による「しわ」の形成機序

さて, *in vivo* で光老化抑制に対するサンスクリーン製剤の評価を実行するためにはしわ形成の実験系が必要となる。実際に,ヘアレスマウスを用い,紫外線シミュレータによるしわ形成が試みられ,サンスクリーン製剤を塗布したマウスでは明らかなしわの抑制効果がみられるという。

いずれにしても,実験的なしわ形成には4~8カ月という長期間を要していて,このことがサンスクリーン製剤開発の障害となっている。

そこで日光弾性線維症の発現を迅速に把握できる実験系が求められ,これまで,ヒト・エラスチン・プロモーター遺伝子を組み込んだトランスジェニック・マウスが作成され,サンスクリーン製剤の紫外線防御能の検討に用いられている<sup>[3]</sup>。しかし,前述の系では,マウスの作製・維持,定量の煩わしさがあり,実用化を鈍らせている。

今回は,さらに迅速,簡便かつ感度の高い手技を探るべく,UVBが誘導するエラスチン・プロモーター活性を蛍光で観察することを試みた。

2

実験方法

(1) ヒト・エラスチン・プロモーターの蛍光たんぱく (GFP)発現ベクターへの組み込み

エラスチン・プロモーター/GFP発現ベクターの作製に先立ち,ヒト genomicDNA のエラスチン・プロモーター部位約 840bp を PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)法で増幅するため,primerを合成し,そのprimerを用い,ヒト genomicDNA を鋳型として PCR で増幅した。PCR 産物を組み込んだ GFP 発現ベクターを制限酵素で消化後,ゲル電気泳動を行った(図2)。

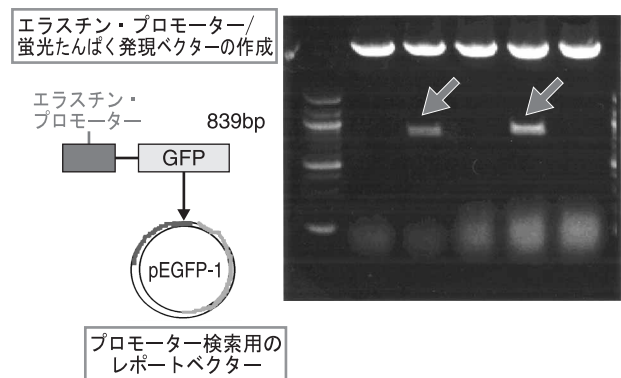


図2 エラスチン・プロモーター導入の確認

(2) プロモーター検索ベクターの3T3マウス線維芽細胞への導入

今回の導入細胞には3T3細胞 マウス線維芽細胞を用い,リポゾーム法(DOTAP法)を用いてGFP発現ベクターを導入した。

(3) 発現ベクター導入3T3細胞への紫外線照射

プロモーター検索ベクター導入3T3細胞に対して,導入24時間後に紫外線(UVB) 20mJ/cm<sup>2</sup>および40mJ/cm<sup>2</sup>を照射し,さらに24時間培養後蛍光顕微鏡にて3T3細胞の蛍光たんぱく発現の有無を観察した。次いで,UVB照射後,マウス皮下に照射3T3細胞を注入,ホリバグループのひとつであるジョバンイボン社(アメリカ製)の光ファイバー付き蛍光分光測定装置(SPEX Fluorolog-3)にて,マウスの外表より蛍光強度を定量化した。

3

結果

図2(右)にはエラスチン・プロモーター/GFP発現ベクターのゲル電気泳動の結果を示した。

840bp付近にバンドが観察され、実際にエラスチン・プロモーターが組み込まれていることが確認された。導入3T3細胞では、UVB 20mJ/cm<sup>2</sup>および40mJ/cm<sup>2</sup>照射により、3T3細胞は細胞質に産生GFPの強い蛍光を示し、その蛍光はUVBの照射量依存性に強度を増した(図3)。in vivoにおける蛍光はエラスチン・プロモーター/GFP発現ベクター導入細胞を注入した部位で有意に高かった(図4)。

4

考察

今回の実験では、3T3細胞を用いたin vitroの実験系の開発からin vivo評価への応用可能な点を明らかにした。今後は、エラスチン・プロモーター/GFP発現ベクターを導入したマウス線維芽細胞を注入後、実際に同部位にサンスクリーン製剤を塗布、外表からUVBを照射し、その後の蛍光強度を蛍光分光測定で定量化することで、サンスクリーンの製剤の効果をin vivoで観察する予定である。

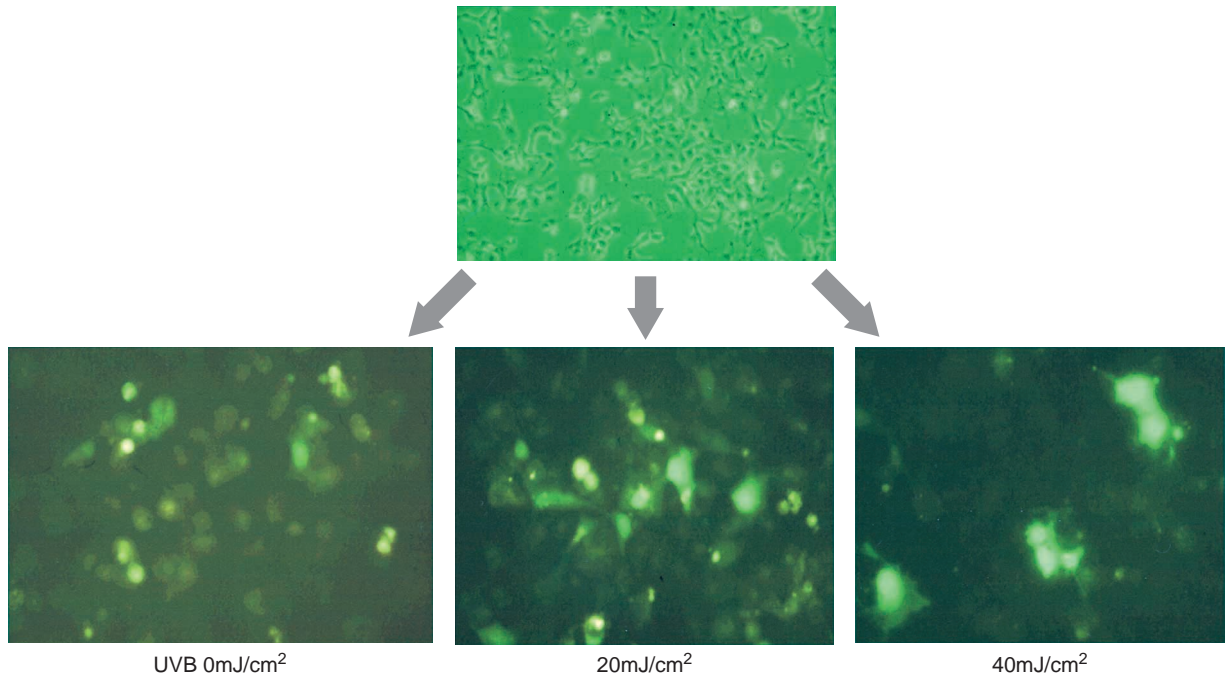


図3 UVB誘導蛍光蛋白(GFP)の発現

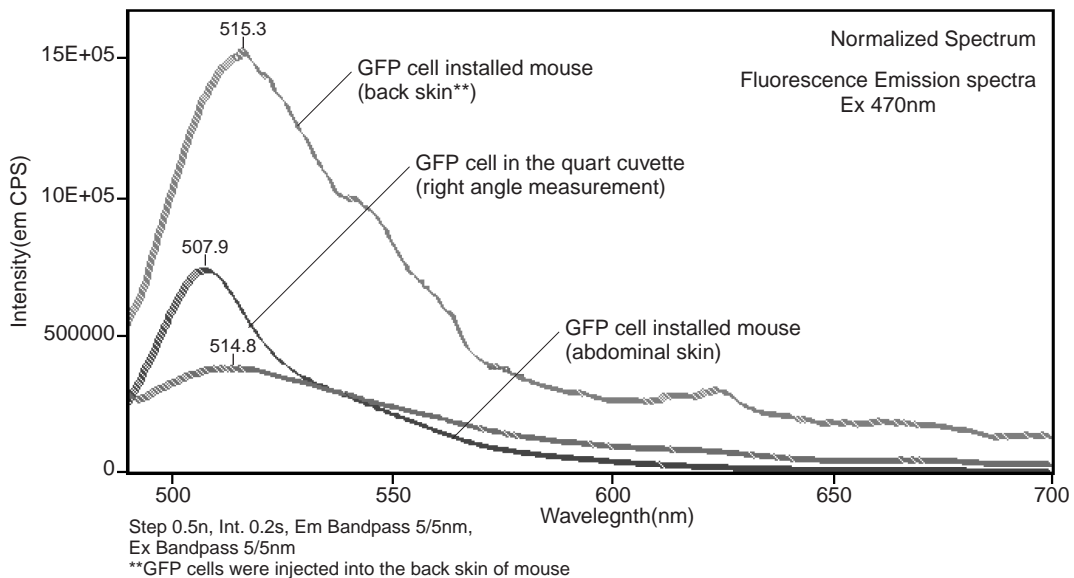


図4 UVBを照射3T3細胞の蛍光強度

## 5

## まとめ・結語

1. UVB 誘導エラスチン・プロモーター活性を照射量依存性の蛍光量で観察することができた。
2. 迅速かつ簡便に日光弾性線維症の発現を定量できる可能性が示唆された。すなわち, *in vivo* の実験系に応用することにより, 光老化防止を目的とするサンスクリーン製剤の開発に有用となることを明らかにした。
3. この評価法を実行するために, 皮下注入細胞の蛍光を光ファイバー付き蛍光分光測定装置 (SPEX Fluorolog-3) にて皮表から定量した結果, 明らかなる有意差を認め, 満足すべき成績が得られた。

## 参考文献

- [ 1 ] Bemstein EF, Qiu Y, Tanai K, Shepley KJ, Resnik KS, AJhang H, Tuan R, Mauviel A. Uitto J: "Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin", *J. Invest Dermatol*, 103: 182-186, 1994.
- [ 2 ] Sawamura D., Ohta T., Hanada K., Ishikawa H., Tamai A., Yazima H., Meng X., Nomura K. Hashimoto I., Mauviel A., Uitto J., "Involvement of the AP-1 site within the 5-flanking region of the stromelysin-I gene in induction of the gene expression by UVA irradiation", *Arch Dermatol Res*, 288(10):628-632, 1996.
- [ 3 ] Bernstein EF., Brown DB., Takeuchi T., Kong SK., Uitto J., "Evaluation of sunscreens with various sun protection factors in a new transgenic mouse model of cutaneous photoaging that measures elastin promoter activation", *J. Am. Acad. Dermatol*, 37(5 Pt 1):725-729. 1997.



花田 勝美

Katsumi HANADA, M. D.

弘前大学  
医学部 皮膚科教室  
教授  
医学博士

玉井克人

Katsuto TAMAI, M. D.

弘前大学  
医学部 皮膚科教室  
助教授  
医学博士

今 浮

Atsushi KON, M. D.

弘前大学  
医学部 皮膚科教室  
講師  
医学博士

中野 創

Hajime NAKANO, M. D.

弘前大学  
医学部 皮膚科教室  
講師  
医学博士

原田 研

Ken HARADA, M. D.

弘前大学  
医学部 皮膚科教室  
助手  
医学博士