

老人性乾皮症のセルフメディケーションに向けた
マグネシウム吸収促進食品の探索

岐阜薬科大学 生化学研究室 副学長 教授

いかり あきら
五十里 彰

老人性乾皮症のセルフメディケーションに向けた マグネシウム吸収促進食品の探索

主任研究者 岐阜薬科大学 生命薬学大講座 生化学研究室 教授 五十里 彰

分担研究者 岐阜薬科大学 生化学研究室 講師 吉野 雄太

【要旨】

目的：加齢に伴う皮膚バリア機能低下には、ヒアルロン酸やセラミドなどの保湿因子の減少が関与する。マグネシウムは皮膚機能改善作用が報告されているが、その分子機構は不明である。本研究では、マグネシウムチャネルである NIPAL4 に着目し、その機能と食品由来成分による制御を検討した。

方法：ヒトケラチノサイト由来 HaCaT 細胞および三次元培養表皮モデルを使用した。老化促進剤 tenovin-1 (Ten) 処理により老化様状態を誘導した。NIPAL4 ノックダウンおよび Mg^{2+} 除去条件下での影響を解析し、レポーターアッセイにより NIPAL4 転写活性化成分を探索した。

結果：Ten 処理により NIPAL4 発現および $[Mg^{2+}]_i$ が低下し、ヒアルロン酸合成酵素 (HAS2、HAS3) およびセラミド合成酵素 (GCS、SMS、GBA) の発現が低下した。NIPAL4 ノックダウンおよび Mg^{2+} 除去により同様の結果が得られた。食品ライブラリーから NIPAL4 転写活性化作用を有する化合物としてオリエンチンを同定した。オリエンチンとそのアグリコンであるルテオリンは、Ten による NIPAL4 発現低下および $[Mg^{2+}]_i$ 低下を回復させ、ヒアルロン酸とスフィンゴミエリンの産生酵素の発現低下を改善した。一方、p53 のアセチル化には影響を与えなかった。三次元皮膚モデルにおいても、これらの化合物はヒアルロン酸およびスフィンゴミエリン濃度を増加させ、低下したバリア機能を改善した。

考察：NIPAL4 を介した Mg^{2+} 恒常性は保湿因子産生と皮膚バリア維持に重要であり、オリエンチンおよびルテオリンは p53 非依存的にこの経路を改善することが示唆された。これらは老人性乾皮症予防に有用な機能性食品素材となる可能性がある。

1、調査研究目的

日本を含めた先進諸国では高齢者人口が増加し、乾燥や痒みを伴う老人性乾皮症の患者数が増加している。乾皮症の根本的治療薬は存在せず、保湿剤などの対象療法になる。乾皮症の重症化により皮膚炎や感染症のリスクが向上するため、セルフメディケーションに向けた新たな機

能性食品や薬剤の開発が必要である。細胞老化によって保湿因子(脂質セラミドやヒアルロン酸)の産生量や皮脂の分泌量が減少し、角質層バリア機能が低下する。そのため、老化による保湿因子の産生低下を改善する化合物は、老人性乾皮症の予防・治療効果が期待できる。

マグネシウムは伝承的にデトックス、疲労回復、美肌効果を有するといわれ、エプソムソルト、死海の海水、ヴィシーミネラル 89 などの商品が化粧品や入浴剤として利用される。また、マグネシウム補充は皮膚の創傷治癒の促進作用やアトピー性皮膚炎の改善作用が報告されている。しかし、肌の保湿やアンチエイジングにおけるマグネシウムの作用機序は大部分が不明である。皮膚表皮細胞では、NIPAL4 マグネシウムチャンネルを介してマグネシウムが細胞内へ取り込まれる。遺伝性魚鱗癬の皮膚疾患において NIPAL4 の遺伝子変異が同定され、マグネシウム濃度低下とセラミド代謝異常の関係が解明された^{1, 2)}。最近申請者は、NIPAL4 発現の低下によりヒアルロン酸合成遺伝子の発現およびヒアルロン酸産生量が低下することを解明した³⁾。さらに、マグネシウムはポリアミン産生を亢進して紫外線曝露による細胞障害を軽減すること⁴⁾、細胞遊走因子の発現増加を介して創傷治癒を促進すること⁵⁾を報告した。老化に伴い NIPAL4 の発現量が減少し、ヒアルロン酸濃度およびセラミド濃度が低下することを発見したが、NIPAL4 の発現低下を改善する化合物は未開発である。そこで本研究では、老人性乾皮症のセルフメディケーションに向け、NIPAL4 の発現増加作用をもつ食品素材を探索し、ヒアルロン酸やセラミド産生に対する効果を検討した。

2. 調査研究手法

2.1. 細胞培養

実験には、ヒト表皮ケラチノサイト由来 HaCaT 細胞および三次元培養表皮 EPI-MODEL (J-TEC 社) を使用した。HaCaT 細胞は 5% ウシ胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle Medium を用いて、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養した。0.5% trypsin-EDTA 溶液を用いて 3 ~ 4 日ごとに継代し、実験に用いた。

2.2. トランスフェクションとレポーターアッセイ

HaCaT 細胞を 96 ウェルプレートに培養後、HilyMax (Dojindo Laboratory 社) を用いて NIPAL4 のレポーターベクターをトランスフェクションした。

2.3. 細胞内遊離マグネシウム濃度 ([Mg²⁺]_i) の測定

HaCaT 細胞にマグネシウム蛍光プローブの KMG-20/AM を負荷し、蛍光プレートリーダーを用いて [Mg²⁺]_i を測定した。

2.4. RNA 抽出とリアルタイム PCR

TRI reagent (コスモバイオ社) を用いて細胞から RNA を抽出した。ReverTra Ace (東

洋紡社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調製した。定量的リアルタイム PCR 法では、Real time PCR Eco (アズワン社) を用いて mRNA 量を解析した。

2.5. SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロット法

Lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecylsulfate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) を用いてタンパク質を可溶化し、遠心操作により核画分を分離した。7.5 ~ 15% SDS- ポリアクリルアミドゲルにタンパク質サンプルをアプライし、30 mA で約 80 分間電気泳動した。ゲルを PVDF 膜に転写後、2% スキムミルクで 30 分間処理し、ブロッキングを行った。各種一次抗体 (1,000 倍希釈) を 4°C で一晩処理した。PVDF 膜の洗浄後、二次抗体を室温にて 60 分間反応させた。EzWestLumi plus (アトー社) を用いて各タンパク質のバンドを検出した。

2.6. 細胞間透過性の評価

VapoMeter (Keystone Scientific 社) を用いて、経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定した。また、Volt-ohmmeter (Millipore 社) を用いて、上皮膜間電気抵抗値 (TER) を測定した。

2.7. ヒアルロン酸濃度とスフィンゴミエリン濃度の測定

培地を回収後、ヒアルロン酸測定キット (PG リサーチ社) とスフィンゴミエリンアッセイキット (Cayman 社) を用いて、ヒアルロン酸とスフィンゴミエリンの濃度を測定した。

3. 調査研究成果

3.1. ヒアルロン酸とセラミドの産生に関わる酵素発現に対する NIPAL4 発現の影響

HaCaT 細胞に老化促進剤である tenovin-1 (Ten) を処理したところ、NIPAL4 の発現量が減少し、 $[Mg^{2+}]_i$ が低下した。そこで、siRNA を用いて NIPAL4 発現をノックダウンし、 $[Mg^{2+}]_i$ に対する影響を検討した。その結果、NIPAL4 ノックダウンにより有意に $[Mg^{2+}]_i$ が低下した。次に、ヒアルロン酸とセラミドの産生に関わる酵素発現に対する NIPAL4 発現の影響を検討した。ケラチノサイトにおいて、ヒアルロン酸は HAS2 と HAS3 によって産生される。NIPAL4 ノックダウンにより、HAS2 と HAS3 の発現量が有意に減少した。また、セラミド産生に関わる GCS、SMS、GBA の発現量が減少した。培地からマグネシウムを除去することにより、同様の結果が得られた。

3.2. NIPAL4 の転写活性化作用をもつ機能性食品の探索

NIPAL4 のレポーターベクターを導入した細胞において、Ten 処理によりレポーター活性が有意に低下した (Fig. 1)。約 240 種類からなる食品化合物ライブラリーを用いて、

NIPAL4 の転写活性化作用をもつ機能性食品を探索したところ、数種類の化合物に活性化作用が確認された。本研究では、オリエンチンに着目して研究を進めることにした。なお、オリエンチンはアサイー、ソバ、キビ等の食品に含まれることが報告されている。

3.3. NIPAL4 発現と $[Mg^{2+}]_i$ に対するオリエンチンの効果

オリエンチンはルテオリンの配糖体であるため、ルテオリンも一緒に評価することにした。HaCaT 細胞に Ten を処理したところ、NIPAL4 の mRNA 量とタンパク質発現量が有意に減少し、これらの効果はオリエンチンやルテオリンの共処理により改善した (Fig. 2)。また、Ten 処理による $[Mg^{2+}]_i$ の低下も、オリエンチンやルテオリンの共処理により改善した。以上の結果から、老化刺激による NIPAL4 発現の低下に対し、オリエンチンとルテオリンは改善効果をもつことが明らかになった。

3.4. p53 の活性化に対するオリエンチンの効果

p53 は細胞老化を誘導することで老化促進に関与することが知られている⁶⁾。p53 はアセチル化修飾を受けることにより活性化し、標的遺伝子の転写を促進することで細胞周期停止、アポトーシス、細胞老化を誘導する⁷⁾。HaCaT 細胞に Ten を処理したところ、アセチル化 p53 量が増加した (Fig. 3)。しかし、この効果はオリエンチンやルテオリンの共処理により改善しなかった。そのため、オリエンチンとルテオリンは、p53 とは異なる経路を介して NIPAL4 の転写活性を増大させると示唆された。

3.5. ヒアルロン酸とセラミドの産生酵素の発現に対するオリエンチンの効果

Ten 処理による HAS2 と HAS3 の mRNA 量の低下は、オリエンチンやルテオリンの共処理により改善した (Fig. 4)。同様に、GCS、SMS、GBA 発現の低下も、オリエンチンやルテオリンの共処理により改善した。

3.6. 皮膚三次元モデルにおけるオリエンチンの機能評価

三次元培養表皮 EPI-MODEL に Ten を処理したところ、TEWL が増加し、TER が低下した (Fig. 5)。これらの結果から、Ten は皮膚のバリア機能を減弱させることが示唆された。Ten 処理によるバリア機能の低下は、オリエンチンやルテオリンの共処理により改善した。さらに、Ten 処理によるヒアルロン酸とスフィンゴミエリン (セラミド前駆体) の濃度低下も、オリエンチンやルテオリンの共処理により改善した。

4. 考察

本研究では、皮膚バリア機能の維持に重要な因子である NIPAL4 マグネシウムチャンネルに着

目し、その発現低下がヒアルロン酸およびセラミド産生に与える影響、さらに食品由来成分による制御機構について検討した。老化促進剤である Ten の処理により NIPAL4 の発現低下と $[Mg^{2+}]_i$ の減少が認められたことから、NIPAL4 が $[Mg^{2+}]_i$ 恒常性の維持に関与することが示唆された。実際に、siRNA による NIPAL4 ノックダウンにより $[Mg^{2+}]_i$ 低下が再現されたことから、NIPAL4 は $[Mg^{2+}]_i$ 恒常性の維持に不可欠である可能性が高い。さらに、 Mg^{2+} 除去条件下でもヒアルロン酸およびセラミド産生関連酵素 (HAS2、HAS3、GCS、SMS、GBA) の発現低下が観察されたことから、 $[Mg^{2+}]_i$ はこれら代謝経路の転写制御に重要な役割を担うと考えられる。ヒアルロン酸およびセラミドはともに皮膚の保湿およびバリア機能の維持に必須であり、これらの産生低下は加齢に伴う皮膚機能低下と密接に関連している。本研究の結果は、NIPAL4 発現低下を起点とした $[Mg^{2+}]_i$ 恒常性の破綻が、ヒアルロン酸およびセラミド産生の低下を介して皮膚バリア機能の低下を引き起こす新たな分子機構を示唆するものである。

食品化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、NIPAL4 の転写活性を増強する化合物としてオリエンチンを同定した。オリエンチンおよびそのアグリコンであるルテオリンは、Ten による NIPAL4 発現低下および $[Mg^{2+}]_i$ 低下を回復させたことから、これらの化合物は NIPAL4 の転写制御を介して $[Mg^{2+}]_i$ 恒常性の改善作用を有すると考えられる。一方で、Ten により誘導される p53 のアセチル化は、オリエンチンおよびルテオリンによって改善されなかった。このことは、これらの化合物が p53 経路を直接抑制するのではなく、p53 とは独立した転写制御機構を介して NIPAL4 発現を制御していることを示唆する。

オリエンチンおよびルテオリンは、ヒアルロン酸およびセラミド産生関連酵素の発現低下を回復させるとともに、三次元皮膚モデルにおいて低下したバリア機能 (TEWL 上昇および TER 低下) を改善した。これらの結果から、加齢による皮膚バリア機能の低下に対し、NIPAL4 は新たな予防標的となることが示唆される。

5. まとめ

本研究において、NIPAL4 の発現を増加させる食品由来成分として、ルテオリンとその配糖体であるオリエンチンを見出した。老化促進剤を処理した HaCaT 細胞および三次元皮膚モデルにおいて、これらの化合物はヒアルロン酸やスフィンゴミエリンの産生を増加させ、皮膚バリア機能を増強した。以上の結果より、これらの成分は老人性乾皮症の予防を目的とした機能性食品素材としての応用が期待される。

6. 調査研究発表

なし

7. 引用文献

- 1) Honda, Y., Kitamura, T., Naganuma, T., Abe, T., Ohno, Y., Sassa, T., Kihara, A., Decreased Skin Barrier Lipid Acylceramide and Differentiation-Dependent Gene Expression in Ichthyosis Gene Nipal4-Knockout Mice, *J Invest Dermatol*, 138, 741-749 (2018).
- 2) Murase, Y., Takeichi, T., Kawamoto, A., Tanahashi, K., Okuno, Y., Takama, H., Shimizu, E., Ishikawa, J., Ogi, T., Akiyama, M., Reduced stratum corneum acylceramides in autosomal recessive congenital ichthyosis with a NIPAL4 mutation, *J Dermatol Sci*, 97, 50-56 (2020).
- 3) Marunaka, K., Shu, S., Kobayashi, M., Goto, M., Katsuta, Y., Yoshino, Y., Ikari, A., Elevation of hyaluronan synthase by magnesium supplementation mediated through the activation of GSK3 and CREB in human keratinocyte-derived HaCaT cells, *Int J Mol Sci*, 23, (2021).
- 4) Shu, S., Kobayashi, M., Marunaka, K., Yoshino, Y., Goto, M., Katsuta, Y., Ikari, A., Magnesium Supplementation Attenuates Ultraviolet-B-Induced Damage Mediated through Elevation of Polyamine Production in Human HaCaT Keratinocytes, *Cells*, 11, (2022).
- 5) Yoshino, Y., Teruya, T., Miyamoto, C., Hirose, M., Endo, S., Ikari, A., Unraveling the Mechanisms Involved in the Beneficial Effects of Magnesium Treatment on Skin Wound Healing, *Int J Mol Sci*, 25, 4994 (2024).
- 6) Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., Melino, G., Senescence and aging: the critical roles of p53, *Oncogene*, 32, 5129-5143 (2013).
- 7) Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., Gu, W., Acetylation is indispensable for p53 activation, *Cell*, 133, 612-626 (2008).

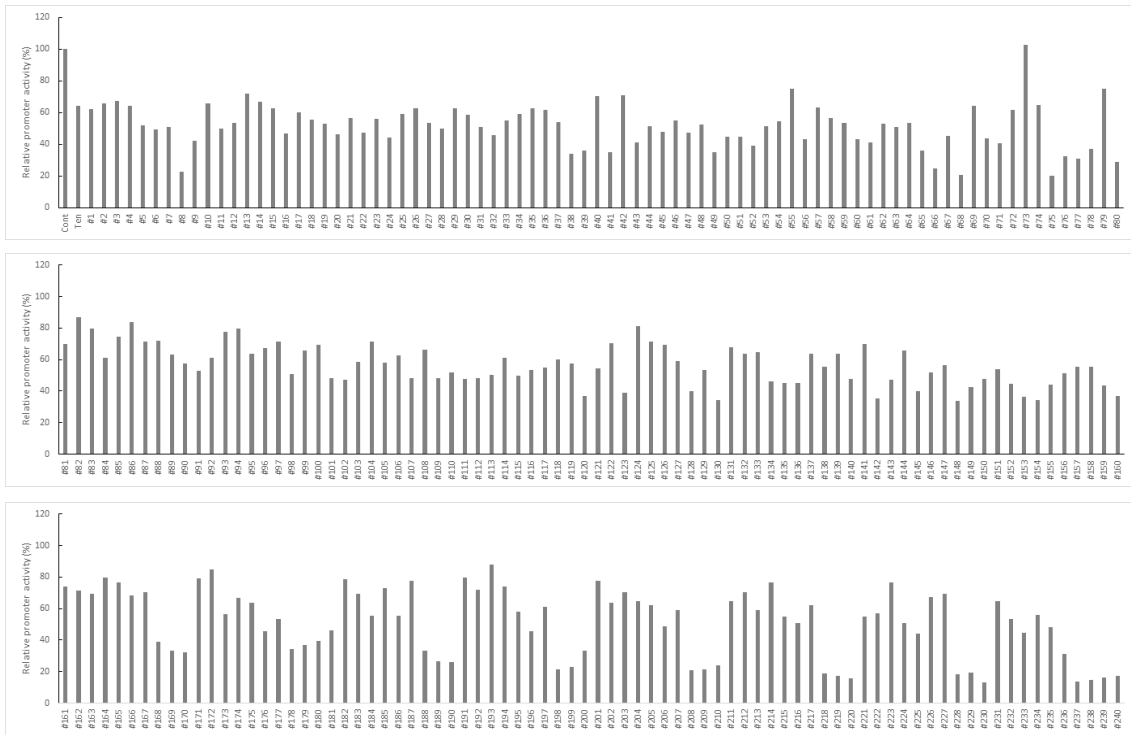


Fig. 1. Effects of food compounds on NIPAL4 promoter activity

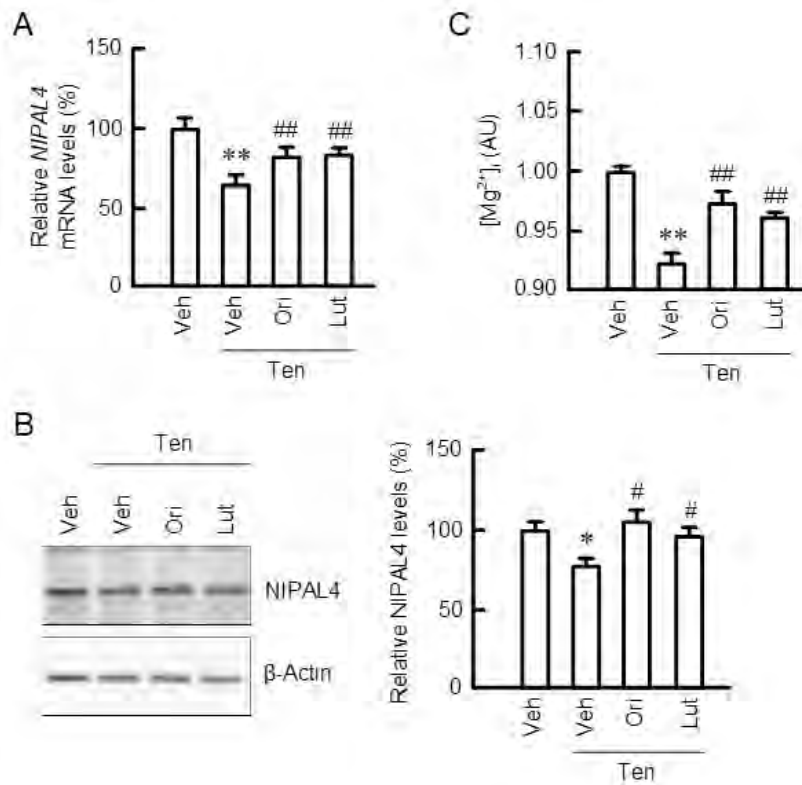


Fig. 2. Effects of orientin and luteolin on NIPAL4 expression and [Mg²⁺]_i

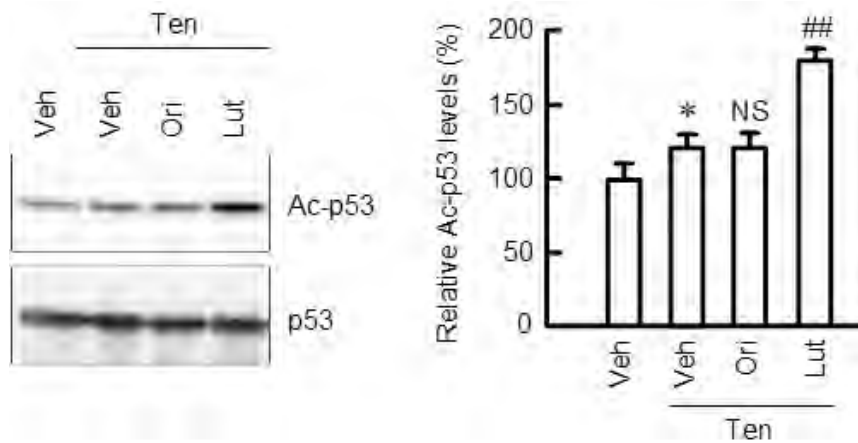


Fig. 3. Effects of orientin and luteolin on acetylation of p53

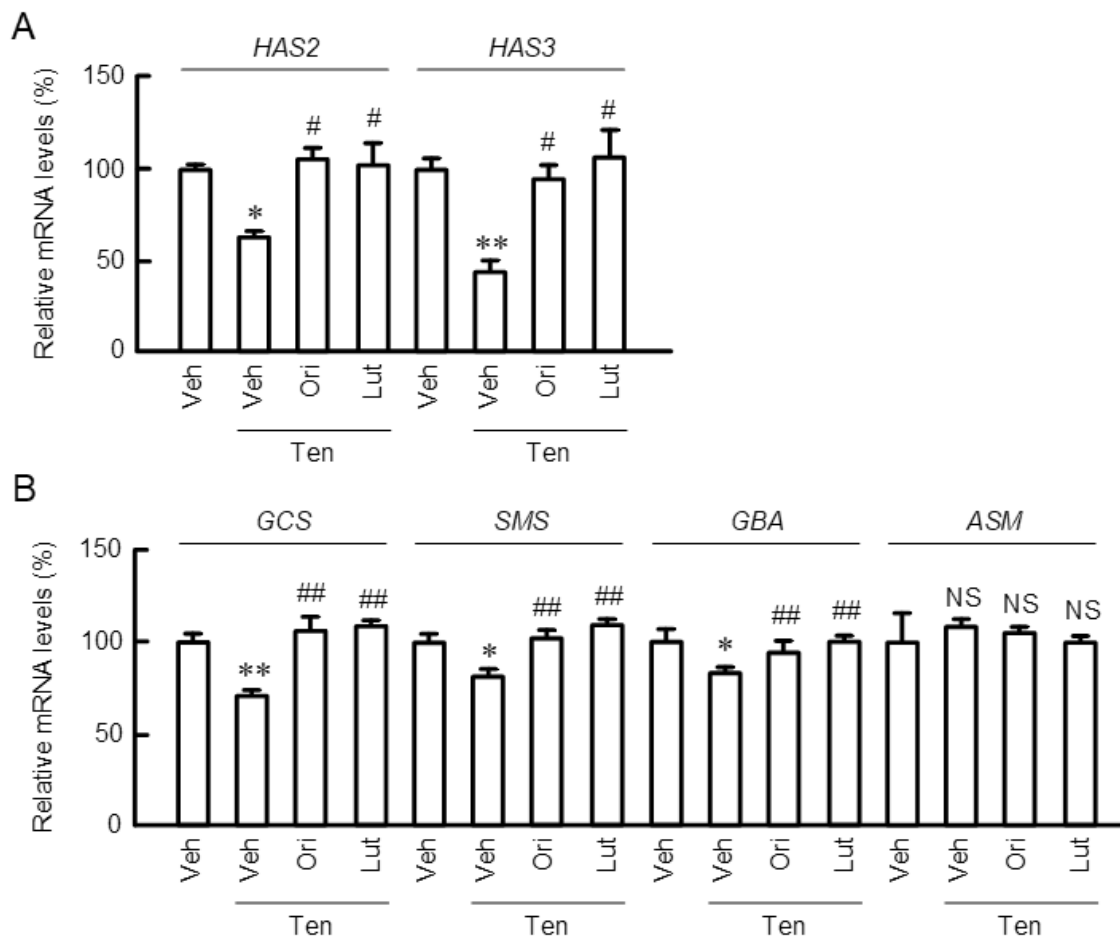


Fig. 4. Effects of orientin and luteolin on the expression of enzymes involved in hyaluronic acid and ceramide production

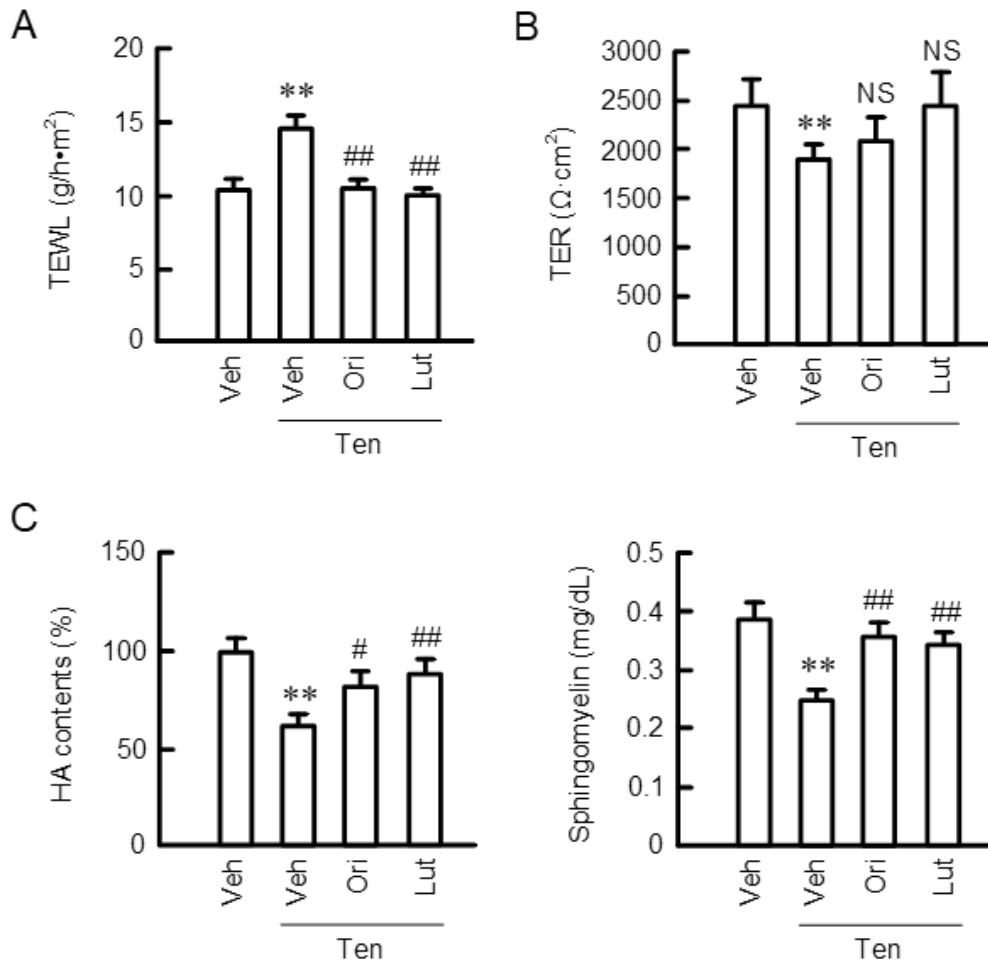


Fig. 5. Effects of orientin and luteolin on barrier function in a 3D skin model