

2020年3月

関西大学審査学位論文

外的因子が毛髪構成要素に及ぼす影響

関西大学
理工学研究科
総合理工学専攻
生命・医薬
18D6010 堀部 一平

外的因子が毛髪構成要素に及ぼす影響

毛髪は外見を印象付ける主要な要素の一つであり、美容対象として重要な位置づけがされている。高齢化が進む我が国では、健康寿命の延伸と外見的にも若々しくありたいとの希望が相まって、毛髪美容への関心が高まっている。特に、壮年期後半以上の年齢の女性に、いつまでも若々しく、思い通りのヘアスタイルを作りたいと願っている人が多い。その人たちの毛髪の悩みのなかで、「白髪」「髪がパサつく」「くせ毛・髪もうねり」の3つが上位に挙げられていることから、これらの予防・改善に結び付く毛髪美容法に強い関心があると推測される。そこで、私は、毛髪美容法開発の観点から、様々な外的因子が毛髪構成要素に及ぼす影響について調べた。

まず、「白髪」は、通常毛球部のメラノサイトで産生されるメラニン色素が、エイジングや酸化ストレスなどの影響により産生されないことがその発生の一因であると考えられる。そこで、マウス B16 メラノーマ細胞を用いて様々な物質のメラニン産生促進効果を調べたところ、特定の構造をもつフラボノイド類に高い効果を見出した（第二章）。

次に、「髪がパサつく」のは、紫外線などの外的因子によって毛髪内の脂質やタンパク質にダメージが生じ、手触りの悪化に繋がると考えられる。そこで、紫外線によって毛髪がどのような影響を受けるのかを調べたところ、毛髪内部の脂肪酸が酸化され、最終的に短鎖のアルデヒドとなって外部に排出されており、紫外線により毛髪内部の脂肪酸が変化し、その他のタンパク質などに影響を与えている可能性があることを見出した（第三章）。

最後に、後天的な「くせ毛・髪もうねり」は、エイジングや外的因子などが影響していると考えられる。そこで、毛髪形成に重要である外毛根鞘細胞とタンパク質の品質管理を担う小胞体に注目し、小胞体ストレス応答の破綻がコラーゲン産生に影響を及ぼし、「うねり」が発生するのではないかという仮説のもと研究を行った。その結果、外毛根鞘細胞で小胞体ストレスが発生することで、細胞内の IV 型コラーゲンの量が増加することを見出した（第四章）。

以下に、第一章の序論に続く各章の概略を述べる。

第二章 フラボノイドの抗白髪効果に関する研究

白髪の発生要因の一つは、メラノサイトで産生されるメラニン色素が何らかの原因で産生されなくなるためと考えられる。そこで、マウス B16 メラノーマ細胞を用いて、各種

フラボノイドによる、メラニン産生促進効果について検討を行った。その結果、フラボノイド骨格の B 環の 4' 位にメトキシ基を持つジオスマチン、アカセチンおよびケンフェライドにより、コントロールと比較して 3~7 倍量のメラニン産生促進およびチロシナーゼ活性の増加を示すことが判った。それらの効果は、対応する 4' 位が OH-タイプのフラボノイドと比較して顕著に高く、4' 位にメトキシ基を持つ構造と、メラニン産生促進効果との間に構造活性相関があることを示していた。また、B16 メラノーマ細胞のメラニン合成に関する因子のタンパク質発現を調べたところ、アカセチンにより活性型の ERK およびチロシナーゼが経時的に増加することが判った。すなわち、メラニン産生促進効果は、ERK 経路の活性化およびそれに伴うチロシナーゼ発現量の増加に起因することを見出した。

第三章 紫外線が毛髪の脂質に与える影響に関する研究

毛髪に存在するオレイン酸やリノール酸などの不飽和脂肪酸は、酸化されることで過酸化脂質を生成し、最終的にアルデヒドを生じる。それらの過酸化脂質やアルデヒド類は、タンパク質を変性させ生体に悪影響を及ぼすと考えられる。そこで、毛髪に紫外線を照射した際に生じるアルデヒド類を検出する方法を検討した。毛髪に含まれる脂肪酸を GC-MS で分析したところ、パルミトレイン酸 (C16:1, n-7) やオレイン酸 (C18:1, n-9) など不飽和脂肪酸を多く含んでいた。さらに、密閉容器中で毛髪に紫外線を照射し、発生した気体を 1,3-シクロヘキサジオン (CHD) 溶液に直接トラップし、得られたアルデヒド-CHD 誘導体を LC-MS で分析した。その結果、ホルムアルデヒドやアセトアルデヒドといった短鎖アルデヒドが多く検出された。すなわち、紫外線を照射することで毛髪内部の脂肪酸の過酸化反応が起こっていると推察され、過酸化反応で生じるラジカル種やアルデヒドが毛髪に対してダメージを与える可能性が示唆された。

第四章 毛髪のうねりに関する研究

毛髪の「うねり」は、先天的な要因以外に、加齢や外的ストレスなど後天的な要因によって発生する場合も考えられる。そこで、毛髪を形成する上で重要である外毛根鞘細胞に注目し、小胞体ストレスと基底膜成分である IV 型コラーゲンの産生の関係性について検討を行った。その結果、小胞体ストレスを惹起するツニカマイシンにより小胞体ストレスマーカーである GRP78 の発現が増加し、細胞内の IV 型コラーゲン量も増加することが判った。今後、酸化ストレスが外毛根鞘細胞のコラーゲン産生に与える影響およびマウスを用いた形態学的変化についても検討を進めることで、外毛根鞘細胞のコラーゲン産生とうねり発生の関係性を明らかにしていく予定である。

以上

目次

第一章 序論	
第一節 毛髪の発生と構造	1
第二節 毛髪に関する消費者の悩みとその研究知見	2
第二章 フラボノイドの抗白髪効果に関する研究	
第一節 緒言	6
第二節 B16F10 メラノーマ細胞に対する各種フラボノイド類のメラニン産生促進効果	7
第三節 フラボノイドがチロシナーゼ活性に与える影響	11
第四節 ERK-CREB 経路を介したメラニン産生促進効果の作用機序の同定	12
第五節 小括	14
第三章 紫外線が毛髪の脂質に与える影響に関する研究	
第一節 緒言	15
第二節 毛髪に含まれる脂肪酸の分析	16
第三節 紫外線照射によって毛髪から発生するアルデヒド類の同定および定量	18
第四節 小括	22
第四章 毛髪のうねりに関する研究	
第一節 緒言	24
第二節 外毛根鞘細胞の培養方法の検討	26
第三節 ツニカマイシン処理による小胞体ストレス発生の確認	27
第四節 小胞体ストレスがコラーゲン産生に与える影響	31
第五節 小括	35
総括	36
実験の部	37
引用文献	45
謝辞	48

第一章 序論

第一節 毛髪 of 発生と構造

胎児期に組織や器官が作られる過程は、一般には発生と呼ばれるが、毛髪の場合、他の臓器や器官と違った特徴がある。それは、大人になってもこのような発生現象が繰り返し見られることである。我々のように複雑な構造を持つ多細胞生物の成体では、粘膜細胞や血球、皮膚の表皮細胞など一部の細胞を除き大部分の細胞が増殖を止めてしまう。一部の細胞は、常に新しく作られ再生産し続けている。毛髪も常に伸長し、生え代わっており、その度に毛髪 of 元になる細胞すなわち毛母細胞は、毛周期と呼ばれるサイクルに沿って増殖・衰退を繰り返している。毛周期は、「成長期」→「退行期」→「休止期」→「成長期」というサイクルを数年単位で繰り返し、再生を続けていく¹⁾。それぞれ、成長期は約 4~6 年、退行期は約 2 週間、休止期は 3~4 か月であり、毛髪全体の約 85% が成長期、約 15% が休止期であると言われている。毛周期を繰り返す毛包全体の構造は、より表皮に近く毛周期を通じて変化しない固定部と、毛包の中ほどに存在する毛隆起より内部にあり、一過性でその構造が変化する変動部に分けられる。このことは毛髪 of 形態形成を考える上でとても重要である。すなわち、他の臓器では発生は一生に一度きりしか起こらないのに対し、毛髪では何度も発生過程を繰り返していると考えることができる。

毛包は年輪状の多層構造をとっているが、頭皮より外側に見えているいわゆる毛と呼ばれるのは毛小皮 (キューティクル)、毛皮質 (コルテックス)、毛髄質 (メデュラ) からなる毛幹部である。毛幹 of 外側には 3 層からなる内毛根鞘と、外毛根鞘があり、そのさらに外側は、基底膜と類似した硝子膜をはさんで結合組織性毛包で覆われている。毛髪 of 成長は、毛球の部分に陥入した結合組織由来の毛乳頭が重要な働きをしており、その周りの上皮由来の毛母細胞が分裂して毛幹および内毛根鞘各層の前駆細胞を産生する¹⁾。また、毛髪 of 成長には毛幹部以外にもその周りを覆う毛包が重要であり、そのなかでも最外層となる外毛根鞘は、中ほどにある立毛筋付着部にバルジ領域と呼ばれるやや隆起した部位を持ち、ここに毛包幹細胞や色素幹細胞が保存されている点からも注目されている²⁾³⁾。

第二節 毛髪に関する消費者の悩みとその研究知見

女性にとって毛髪は非常に重要であり、自分自身の見た目をいつまでも若々しく保ち、思い通りのヘアスタイルを作りたいと願っている。そのため、20～60代の女性を対象に行った、「髪と頭皮」に関する意識調査の結果にあるように、年代ごとの傾向は異なるが、毛髪や頭皮に関する様々な悩みが挙げられている⁴⁾。トータルでの結果では、最も多く挙げられた悩みとして「白髪」があり、次に「髪がぱさつく」、「くせ毛・髪がうねる」といった回答が多くなっており、それぞれ46.2%、44.8%、41.0%の回答率であった。年代別に見ると、20代、30代の若年層では、「髪がぱさつく」、「くせ毛・髪がうねる」が上位に挙げられ、40代以降では、「白髪」がその上位に挙げられている。

年代による違いはあるが、「白髪」「髪がパサつく」「くせ毛・髪のうねり」といったことが上位に挙げられており、これらの事項に対して女性から高い関心を持たれていることがうかがえる。

(1) 白髪について

「白髪」は、通常毛球部のメラノサイトで産生されるメラニン色素が、エイジングや酸化ストレスなどの影響により産生されないことがその発生の一因であると考えられる。メラニン色素は、皮膚や毛髪に存在する生体色素のひとつであり、紫外線から皮膚やDNAを守る機能や有害な活性酸素種を除去する機能を持っている⁵⁾。一般に皮膚の色はメラニン色素の量によって決定されるが、異常なメラニン生成や老化などによって生じるシミやくすみは女性にとって大きな悩みであり、「美白」への関心や期待が高く、さまざまなアプローチによる美白剤の開発が行われている。また、その一方で、メラニン色素が失われることで生じる「白髪」が40代以降の女性の大きな悩みとして挙げられる。「白髪」の発生要因としては、毛母に存在するメラノサイトの減少や維持不全、メラニン合成能の低下などが考えられ、それらに関する研究も盛んに行われている。

毛髪には白髪、ブロンド、赤毛、黒髪など様々な色がみられるが、それらは全てメラニン色素の種類と濃度、形状によって決められている。動植物の持つ色素にはメラニンの他にヘモグロビンやクロロフィル、カロチノイド、フラボノイドなどが知られているが、これらの色素は分子量が小さく、類似した分子ファミリーを含めて構造が決定されている。それに対しメラニンはチロシンから生じたさまざまなインドール化合物が3次元的に結合したポリマーであり、その中にチロシナーゼなどの酵素タンパク質やその他の構造タンパク質を巻き込んだ巨大分子のメラニンタンパク質複合体として存在する。メラニンには大きく分けて、黒色から茶褐色で不溶性のユーメラニン (eumelanin) と、黄色から赤褐色でアルカリ可溶性のフェオメラニン (pheomelanin) の2種類がある⁶⁾。

毛髪メラニン色素は毛包メラノサイトで作られ、樹状突起を介して周囲の毛母細胞に受け渡される。白髪になるということは、毛髪にメラニンが供給されないことであり、以下のような原因が考えられる。

- ①メラノサイトが存在しない場合
- ②メラノサイトは存在するがチロシナーゼ遺伝子が働かない場合
- ③メラノサイトから毛母細胞へのメラニンの移行がうまく行われない場合
- ④色素幹細胞の保存不良と幹細胞からのメラノサイトの分配が正常に行われない場合

成長期が開始されると、バルジ領域に存在する色素幹細胞が分化・増殖して新たなメラノサイトが供給される。白髪の多くは、この新しいメラノサイトが正常に供給されないことが原因と考えられる。白髪のメラノサイトに関しては、白髪成長期毛では黒髪成長期毛よりも明らかに毛髪 1 本あたりに存在するメラノサイトの数が少ないが、その割合についてはいくつかの報告がある。霜垣の報告⁷⁾によると、解析した 5 割近くの白髪では毛球部および外毛根鞘の両部位にメラノサイトが検出され、少しでもメラノサイトが検出されたものは約 8 割であった。一方、山田の報告⁸⁾では、メラノサイトがわずかにでも存在する白髪の割合は約 2 割としており、より最近の報告では白髪の毛球部を観察すると 80% 以上はメラノサイトを持たず、メラノサイトを有する白髪は数 % に過ぎないとしている⁹⁾。いずれにせよ、白髪にはメラノサイトが存在するタイプがあり、このタイプの白髪発生はメラノサイト自身のメラニン合成能の低下や、数の減少などが考えられる。

例えば、白髪では、活性酸素種や過酸化水素などの酸化ストレスにより、メラノサイトのアポトーシスが増加することや¹⁰⁾、チロシナーゼの活性部位が酸化されることで活性が低下する¹¹⁾といった報告がある。また近年、メラノサイト幹細胞 (MSC) の存在が明らかとなり³⁾、様々な分化過程に関与する Notch シグナル経路が MSC の維持に重要であるという報告や¹²⁾¹³⁾、毛包幹細胞が MSC の維持に必須であるという報告もなされている¹⁴⁾。

(2) 毛髪の脂質について

毛髪の脂質は、キューティクルやコルテックスに存在する細胞膜複合体 (CMC) や、細胞膜の 2 重層もしくはラメラ層に蓄積した内部脂質などとして存在している。CMC は、2 層の β -layer とその両 β -layer に挟まれた δ -layer からなり、 β -layer が脂質 2 分子膜であると言われている¹⁵⁾。また、毛髪表面には 18-メチルエイコサン酸 (18-MEA) が結合していると言われている¹⁶⁾。

毛髪内部に存在する脂質は、化学物質の拡散、水分保持、細胞接着、力学的強度、といった様々な物理化学的特性の保持に寄与している。一方で、18-MEA は毛髪表面の摩擦抵抗

を減らし滑らかな手触りを与え、毛髪表面を疎水的に保つ役割を担っている。パーマやブリーチ処理を行うことで、タンパク質や脂質の流出などが起こり、毛髪の手触りが悪くなり、強度や保水性などが低下すると考えられる。その様な現象を調べるために、毛髪のタンパク質に関してはアミノ酸分析などが行われている。一方で、毛髪の脂質に関しては、毛髪の表面脂質と内部脂質に分類し、それぞれを溶媒抽出することで、薄層クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどを用いた分析が行われている。

西村らは¹⁷⁾、毛髪脂質を内部脂質 (internal lipids) と外部脂質 (external lipids) に分けて抽出し毛髪脂質の年齢による変化と毛髪水分量との関係を調べた。抽出した毛髪脂質を、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いて分析した結果、内部脂質総量は、幼児よりも成人で高い値を示し、内部脂質のコレステロール量は 10 歳前後を境にその後大きく減少した。また、コレステロール量と毛髪の含水率の間には正の相関関係が見られた。

また、Edo は¹⁸⁾、ヒト毛髪の内部脂質における太陽光の影響について、その基礎的な知見を得た。化学的処理を受けていない未処理の黒髪とブロンド髪 25 cm を用い、表面脂質および内部脂質を抽出し分析を行った結果、分離した内部脂質の定量により黒髪とブロンド髪における光に対する著しい反応の違いを検出する事ができた。ブロンド髪では、UV-A や UV-B の照射よりも可視光を照射した方がコレステロールや脂肪酸といった内部脂質の減少が大きかった。黒髪では、内部脂質量の減少が少なかったため、光による脂質の減少はユーメラニンによって抑制されていることが示唆された。

(3) くせ毛について

「くせ毛・髪のうねり」は、ツヤの低下やまとまりの悪さに繋がると考えられ、「くせ毛・髪のうねり」の解消 (改善) は、多くの女性にとって強い関心事であると推察される³⁾。

「くせ毛・髪のうねり」は、個人間や人種の違いにより様々な形態を示すが¹⁹⁾、その先天的な要因として、毛根の形に強く影響を受ける。すなわち、毛根で髪の毛が作られる時からすでに形が決まっており、直毛の毛根がまっすぐなのに対し、くせ毛の毛根は曲がっているために、ねじれたり、湾曲したりした毛髪が作られると言われている²⁰⁾。

毛髪内部の構造としては、特に羊毛でその内部の構造と形状についてよく調べられており、オルトコルテックス細胞とパラコルテックス細胞という 2 種類のコルテックス細胞が、それぞれ羊毛のくせの外側と内側に存在することで縮れ毛となっている²¹⁾。羊毛と同様に、ヒトの毛髪でも 2 種類のコルテックス細胞の分布が毛髪形状に影響しているという報告がある²²⁾²³⁾。また、毛髪の発生段階での違いについては、構成されるタンパク質の発現の違いについて、くせ毛の毛包で一部のケラチン蛋白質 (hHa8) の mRNA がくせの内側に多く発現しているといった報告や²⁴⁾、Insulin like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)

と呼ばれる細胞増殖因子 IGF の関連タンパク質がくせの外側に過剰に発現し、基底膜の IV 型コラーゲンが外毛根鞘に浸潤している現象が見られるという報告もある²⁵⁾。その他にも、連珠毛と呼ばれる毛髪の形状が数珠のような形を形成する先天性な毛髪疾患では、細胞間接着分子をコードしている desmoglein 4 遺伝子の変異で発症し、毛髪の形成過程における細胞内の小胞体ストレスがその発症に関わっているということが示唆されている²⁶⁾。

第二章 フラボノイドの抗白髪効果に関する研究

第一節 緒言

フラボノイドは、野菜や果物などの植物に広く存在するポリフェノール類の総称であり、抗酸化作用や抗炎症作用、抗がん作用といった多くの有効性や²⁷⁾²⁸⁾、その毒性の低さから健康補助食品や化粧品などに利用されている。フラボノイドの化粧品への利用として、メラニン生成の制御に関する報告がいくつかなされている。その一例として、プロシアニジンには、メラニン合成に関与する酵素であるチロシナーゼを阻害する効果が報告されており²⁹⁾、美白化粧品としての利用が考えられている。一方、ノビレチンやナリンゲニンは、B16F10メラノーマ細胞の細胞外シグナル制御キナーゼ（ERK）の活性化³⁰⁾やチロシナーゼ発現の増加³¹⁾によりメラニン合成を促進させるという報告がある。また、ケルセチンのように、メラニン合成の抑制³²⁾と促進³³⁾³⁴⁾の両方の効果が報告されているものもある。

メラニン色素は、皮膚や毛髪に存在する生体色素のひとつであり、紫外線から皮膚やDNAを守る機能や有害な活性酸素種を除去する機能を持っている³⁵⁾。一般に皮膚の色はメラニン色素の量によって決定されているが、異常なメラニン生成や老化などによって生じるシミやくすみは女性にとって大きな悩みであり、「美白」への関心や期待が非常に高く、さまざまなアプローチによる美白剤の開発が行われている。また、それとは逆に毛髪ではメラニンが失われることで生じる「白髪」が悩みのひとつとして挙げられる。毛母に存在するメラノサイトの増殖維持不全、メラニン合成能の低下などが白髪の主な原因として考えられ、それらに関する研究も盛んに行われている。

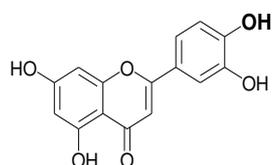
そこで本章では、天然成分であるフラボノイドの機能に着目し、B16F10メラノーマ細胞のメラニン合成に与える影響とその構造活性相関および作用機構に関する報告を行う。

第二節 B16F10 メラノーマ細胞に対する各種フラボノイド類のメラニン産生促進効果

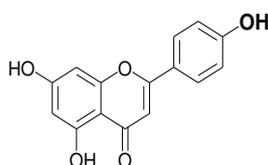
(1) フラボノイドのメラニンがメラニン合成に与える影響

今回試験に供したフラボノイドの構造を Figure 1. に示した。これらのフラボノイドを用いて、B16F10 メラノーマ細胞のメラニン合成に与える影響について調べたところ、顕微鏡下および細胞ペレットの目視判定により、4' 位にメトキシ基を持つフラボノイドであるジオスメチン、アカセチンおよびケンフェライドで処理することで顕著にメラニン色素の量が多くなっていることが観察された (Figure 2.)。

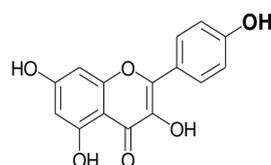
4'-OH-type



Luteolin

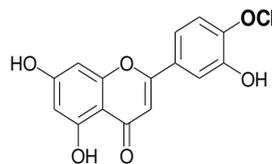


Apigenin

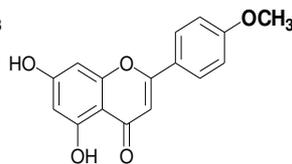


Kaempferol

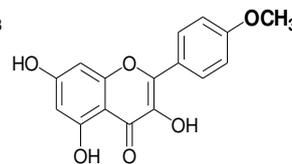
4'-O-Methyl-type



Diosmetin



Acacetin



Kaempferide

Figure 1. Structure of Flavonoids

Diosmetin, acacetin and kaempferide were selected as 4'-O-methyl-type flavonoids. Luteolin, apigenin and kaempferol are their corresponding 4'-OH-type, respectively.

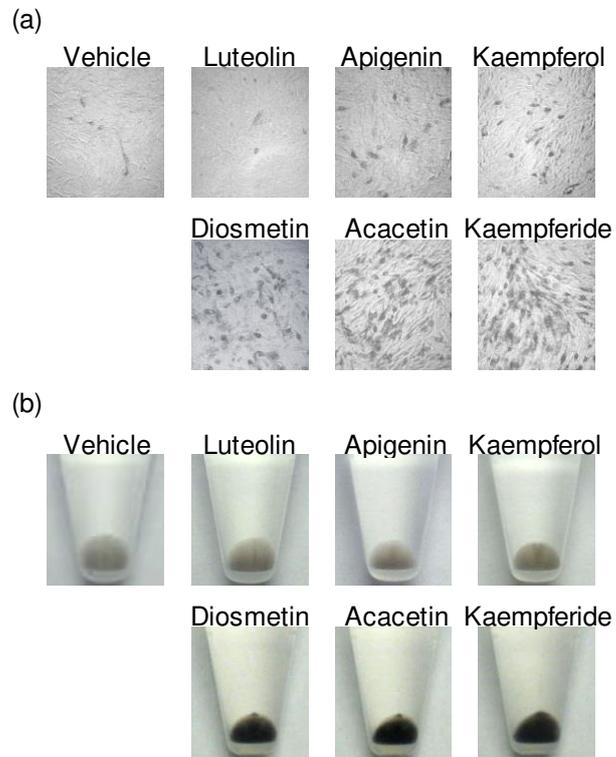


Figure 2. Induction of Melanogenesis by Flavonoids in B16F10 Melanoma Cells

(a) B16F10 melanoma cells were treated with 0.1%(v/v) DMSO (vehicle) or with flavonoids (10 μ M) for 96 h with a medium change after 48 h. (b) Appearance of the recovered cell pellets in test tubes.

(2) メラニン産生促進効果およびフラボノイド構造活性相関

さらに、回収したそれらの細胞について細胞数の測定およびメラニン合成量の定量を行った結果、各フラボノイドが細胞増殖に与える影響はほとんどないということが判った。

一方、メラニン合成量について比較すると、ジオスメチン、アカセチンおよびケンフェライドで処理した細胞では、メラニン合成量がコントロールである DMSO 添加細胞の 3~7 倍量となっており、4' 位が水酸基である OH-タイプのフラボノイド（ルテオリン、アピゲニン、ケンフェロール）と比較して顕著にメラニン合成量が増加していた（Figure 3.）。すなわち、メラニン産生促進効果とフラボノイドの 4' 位がメチル化された構造との間に、構造活性相関があることが示唆された。

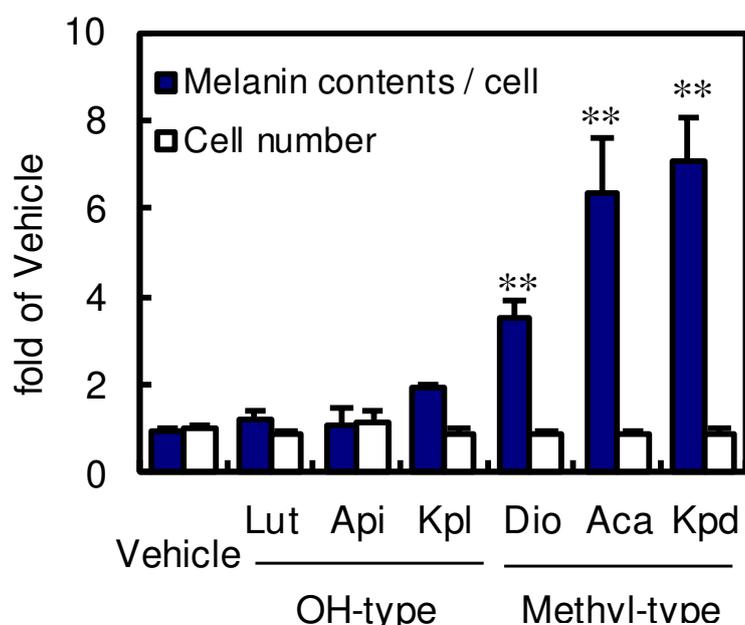


Figure 3. Induction of Melanogenesis by Flavonoids in B16F10 Melanoma Cells

Melanin contents and cell number were measured. After normalization of the melanin contents to the cell number in each sample, the melanin level and cell number were expressed as fold of vehicle cells (DMSO-treated cells). Each column represents the mean \pm S.D. (n = 3). ** p < 0.01 Compared with vehicle.

(3) メラニン産生促進効果におけるメチル化フラボノイドの濃度依存性

メチル化フラボノイドによるメラニン産生促進効果が、濃度依存的にどのような変化を示すのかを調べるため、各種濃度のフラボノイドを用い、実験を行った。

その結果、ジオスメチンとケンフェライドは、15 μM までは濃度依存的な効果を示したが、20 μM では逆にその効果が減少する傾向にあった。一方、アカセチンは1~20 μM まで濃度依存的にメラニン合成量が増加し、その効果はコントロールと比較して非常に顕著であった。その効果は他の2種よりも高く、さらに濃度を上げることで効果が高まる可能性も考えられた (Figure 4.)。

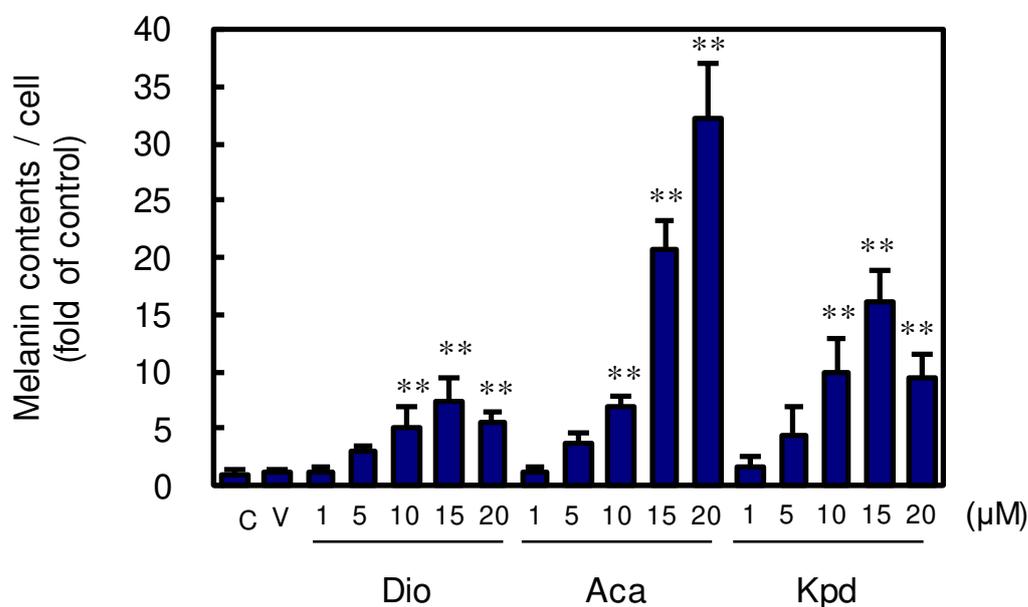


Figure 4. Concentration Dependence of the Effects of 4'-O-Methyl-type Flavonoids on Melanin Contents in B16F10 Melanoma Cells

B16F10 melanoma cells were treated without (Control; C) or with 0.1% (v/v) DMSO (Vehicle; V), or with the flavonoids, diosmetin (Dio), acacetin (Aca) and kaempferide (Kpd), at the indicated concentrations for 96 h, and the melanin contents and cell number were measured. After normalization of the melanin contents to the cell number in each sample, the melanin level was expressed as fold of control. Each column represents the mean \pm S.D. (n = 3). ** p < 0.01 compared with control.

第三節 フラボノイドがチロシナーゼ活性に与える影響

メラニン合成の律速酵素であるチロシナーゼ (TYR) の酵素活性に与える影響を調べるため、各フラボノイド処理を行った細胞から得られた細胞抽出液を用いて、タンパク質あたりのチロシナーゼ活性を測定した。

その結果、B16F10 メラノーマ細胞のメラニン合成量に比例してチロシナーゼ活性も高いということが判った (Figure 5.)。従って、細胞内のチロシナーゼ発現量が増加することでメラニン合成が促進されているものと推測された。ただし、ケンフェライドは、ジオスマチンやアカセチンと比較してメラニン合成量に対するチロシナーゼ活性の割合が低かったため、メラニン合成関連酵素である Tyrosinase-related protein 1 (TRP1) や TRP2 の発現増加といった、チロシナーゼ発現の活性化以外の効果を持っている可能性も考えられる。

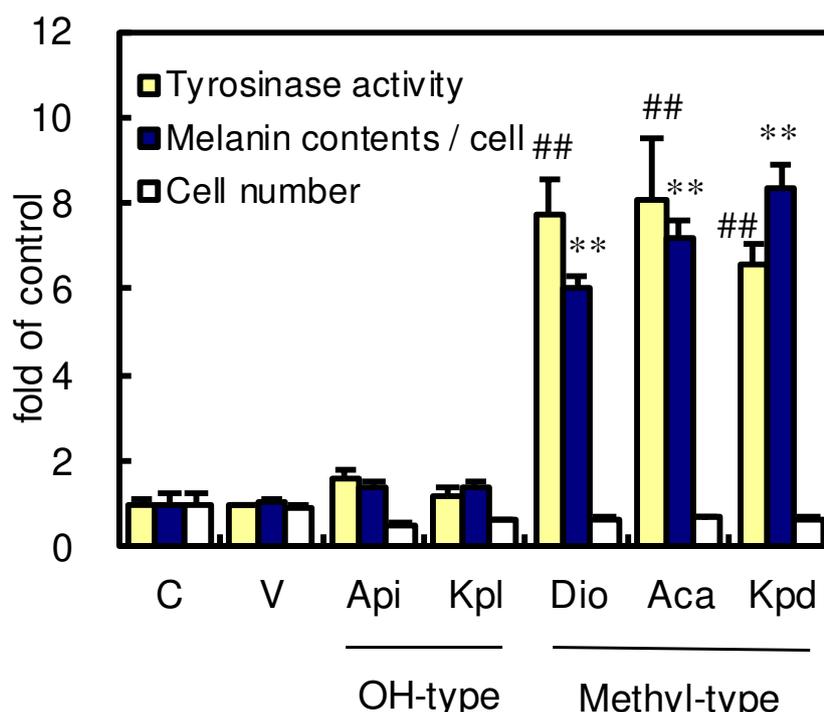


Figure 5. Effects of Flavonoids on Tyrosinase Activity

B16F10 melanoma cells were treated with flavonoids (10 μ M) or with 0.1% (v/v) DMSO (Vehicle; V), or without (Control; C) for 72 h. Each column represents the mean \pm S.D. (n = 3). ** and ## p < 0.01 compared with control.

第四節 ERK-CREB 経路を介したメラニン産生促進効果の作用機序の同定

Methyl-タイプのフラボノイドによるメラニン産生促進効果の作用機序を明らかにするため、アカセチンを処理した B16F10 メラノーマ細胞を用いて、ウェスタンブロット分析によりメラニン合成制御に関連するタンパク質を検出した。

メラニン合成に関連するタンパク質として、ATP から合成された cAMP によって活性化された PKA を介して活性化される転写因子の一つである、cAMP response element binding protein (CREB) と、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼの一種である細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) およびチロシナーゼをターゲットにタンパク質発現の変化を観察した

その結果、アカセチンを投与してから 60 分後までリン酸化 ERK1/2 のタンパク質量が時間依存的に増加し、それと同調して 30 分~120 分後の範囲でリン酸化 CREB のタンパク質量が増加することが判った (Figure 6. a)。さらに、アカセチンを投与してから 72 時間後にチロシナーゼタンパク質の発現量が増加することが判った (Figure 6. b,c)。

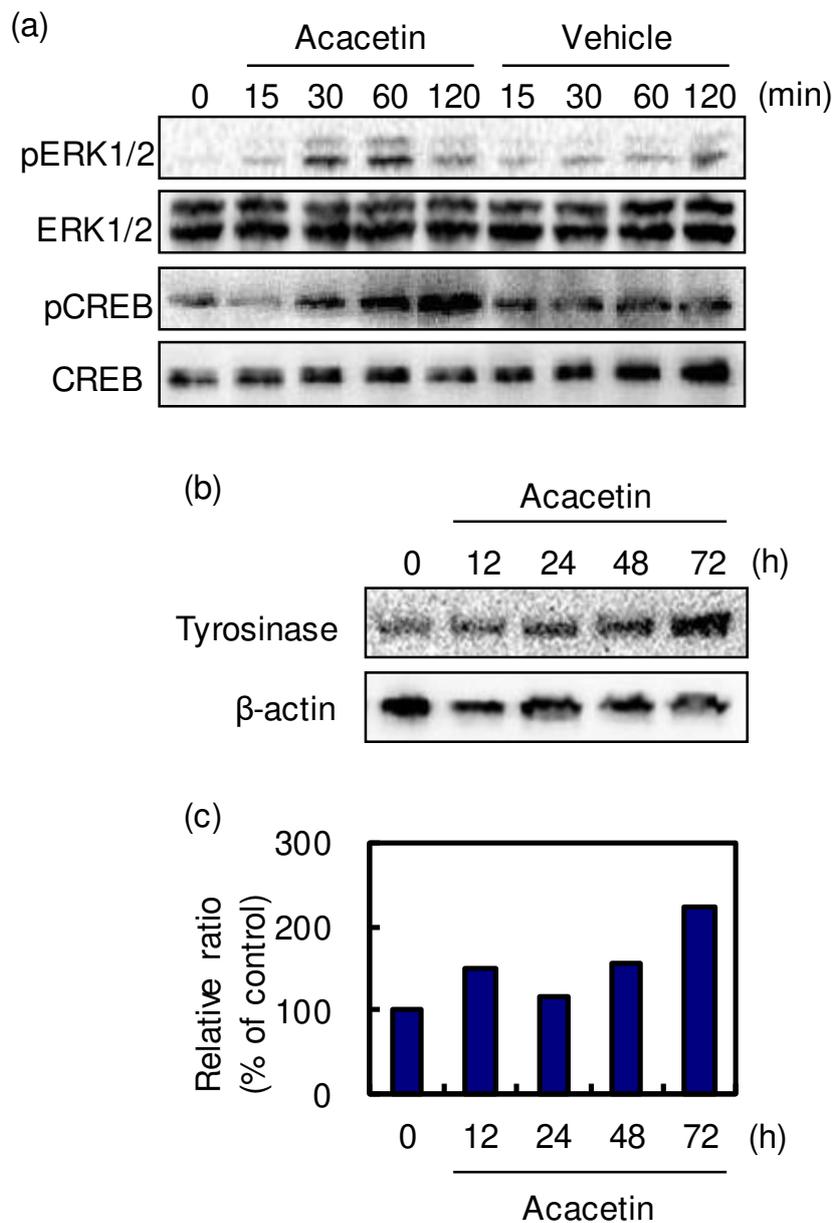


Figure 6. Effect of Acacetin on the Expression of Melanogenic Proteins in B16F10 Melanoma Cells

B16F10 melanoma cells were treated with 10 μ M acacetin or with 0.1% (v/v) DMSO (Vehicle) for the indicated times. (a, b) Representative images obtained by western blot analysis using specific antibodies for each protein. (c) Quantitative analysis of the expression levels of tyrosinase. The intensity of each band shown in panel b was quantitated by densitometry and normalized against β -actin. Each column represents the mean (n = 2).

第五節 小括

今回、フラボノイドが持つ機能と構造に着目し、抗白髪剤の開発を目的にメラニン産生を促進させるような物質の探索を行った。その結果、4'位にメトキシ基を持たないルテオリン、アピゲニン、ケンフェロールは、B16F10 メラノーマ細胞のメラニン合成に与える効果はほとんど見られなかった。一方、それぞれの 4' 位の OH 基をメチル化した構造をもつフラボノイドであるジオスメチン、アカセチン、ケンフェライドは、B16F10 メラノーマ細胞に対する顕著なメラニン産生促進効果を示した。この事は、B 環の 4' 位にメトキシ基を持つフラボノイドの構造と、B16F10 メラノーマ細胞のメラニン産生を促進させる効果との間に高い相関性があることを示していると考えられる。

チロシナーゼは、チロシンから DOPA および DOPA から DOPA quinone への反応を触媒する酵素であり、メラニン合成経路における律速酵素である³⁶⁾。本検討におけるフラボノイドのメラニン産生促進効果を評価するため、フラボノイド処理を行った細胞のチロシナーゼ活性を測定したところ、メラニン産生量に比例してチロシナーゼ活性が高まっていることが判った。小眼球症関連転写因子 (MITF) はメラノサイトの分化、増殖、生存に関連する因子であり³⁷⁾、チロシナーゼおよびチロシナーゼ関連タンパク質 1 と 2 の遺伝子発現を制御している³⁶⁾³⁸⁾³⁹⁾。MITF の発現は、さまざまな細胞外の刺激により活性化されるタンパク質キナーゼ経路を介して活性化される CREB によって引き起こされている。例えば、cAMP により活性化される PKA は CREB をリン酸化する代表的なキナーゼである⁴⁰⁾。その他にも、ERK によって活性化される p90RSK や⁴¹⁾、別の MAPK である p38MAPK によって活性化される MAPKAPK2(MAPK activated protein kinase-2) が⁴²⁾、CREB を活性化することが報告されている。また、PI3K(Phosphatidylinositol 3 kinase) によって活性化される Akt も CREB をリン酸化することが報告されている⁴³⁾。

アカセチンが B16F10 メラノーマ細胞のメラニン合成に関する因子に与える影響について調べた結果、投与時間に依存して活性型 ERK1/2 の増加が認められた。それと同調して CREB のリン酸化が進んでおり、チロシナーゼタンパク質の発現量も増加していることが判った。従って、アカセチンの投与により ERK のリン酸化が進み、MAPK カスケードが活性化されることで、CREB のリン酸化およびそれに伴ったチロシナーゼ発現量の増加が起り、B16F10 メラノーマ細胞のメラニン合成が誘導されているものと考えられる。

本検討の結果より、B 環の 4' 位にメトキシ基を持つ 3 種のフラボノイドは、B16F10 メラノーマ細胞のメラニン合成を促進させることが判り、その構造と活性に高い相関が見られた。

第三章 紫外線が毛髪の脂質に与える影響に関する研究

第一節 緒言

毛髪の損傷は、ヘアカラーやパーマ、紫外線といった外部刺激から生じる、物理的・化学的な影響によって毛髪内部へと及ぶことが分かっている。特に紫外線については、日々の生活の中で浴びる頻度が高く、ヘアサイクルの点からも数年に渡りその影響が蓄積されるため、毛髪の損傷に繋がるものと考えられる。実際、紫外線の影響により、毛髪内部の遊離脂肪酸が減少することや¹⁸⁾、毛髪アミノ酸の光化学的な分解で生じたフリーラジカルが毛髪のケラチンタンパク質に対して悪影響を及ぼすことが知られている⁴⁴⁾。一方で、外部刺激により毛髪に含まれる脂質や頭皮の皮脂が変化し、それらが媒介することで間接的に毛髪に損傷を与える可能性も考えられるが、それらがどのような影響を及ぼすかについては、まだ十分に報告されていない。

一般的に、脂質は酸素と結合して過酸化脂質を生成する特徴がある。毛髪脂質であるオレイン酸やリノール酸は紫外線によって酸化され過酸化脂質となり、さらに酸化され一連の化学反応を経て酸化最終産物としてアルデヒド類を生成することが知られている⁴⁵⁾⁴⁶⁾。毛髪は物理的、化学的な影響から頭部を守る役割を持ち、常にその影響に曝されている。紫外線照射が毛髪に与える影響について、特に毛髪の脂肪酸に対する過酸化反応やアルデヒドなど不快な臭いの元となる成分の発生についての報告はなされていない。そこで、今回、毛髪脂質が酸化され過酸化脂質やアルデヒドを生じることで毛髪タンパク質に悪影響を及ぼし、髪のパサつきにつながる可能性があるのではないかとすることを調査する目的で、毛髪に紫外線を照射した際に生じる揮発成分を同定・定量する方法について検討を行った。

第二節 毛髪に含まれる脂肪酸の分析

(1) 毛髪由来脂肪酸の分析

まず、毛髪に含まれる脂肪酸の組成を確認するため、毛髪から得られた脂肪酸を GC-MS 分析した。その結果を Table 1. に示した。

今回、20 種類の脂肪酸が検出されその内 14 種類の脂肪酸を同定することができた。その結果、飽和脂肪酸とともに不飽和脂肪酸が多く含まれていることが判り、その割合は 66.1% であった。最も多く含まれていた不飽和脂肪酸はパルミトレイン酸 (C16:1,n-7) であり 25.2% の割合で含まれていた。次いでオレイン酸 (C18:1,n-9) が 18.7%、エイコセン酸 (C20:1,n-9) が 11.0% の割合で含まれていた。毛髪由来の脂肪酸についてはすでに報告されており、今回の結果と同様であった。

不飽和脂肪酸は紫外線などの影響によりアルデヒドを形成することが知られており、以前の検討でオレイン酸やリノール酸に紫外線を照射することでアルデヒドが形成されることを確認している。そこで、実際に紫外線によって毛髪の不飽和脂肪酸からアルデヒドが発生するかどうかを、揮発性のアルデヒドを検出することで確認することとした。

Table 1. Retention time and detection rate of detected fatty acids

Fatty acid	Untreated hair		
	Retention time (min)	Ratio to internal standard	Detection rate (%)
1. Lauric acid (C12: 0)	11.03	0.85	1.2
2. Tridecanoic acid (internal standard substance)	14.41	1.00	-
3. Unidentified	16.38	-	-
4. Myristic acid (C14: 0)	18.30	5.11	7.3
5. Myristoleic acid (C14: 1)	19.18	1.72	2.4
6. Pentadecanoic acid (C15: 0)	22.35	2.82	4.0
7. Pentadecenoic acid (C15: 1)	23.18	1.36	1.9
8. Unidentified	25.33	-	-
9. Palmitic acid (C16: 0)	26.71	11.41	16.2
10. Palmitoleic acid (C16: 1, n-7)	27.56	17.72	25.2
11. Unidentified	27.95	-	-
12. Heptadecenoic acid (C17: 1)	31.51	2.37	3.4
13. Unidentified	33.53	-	-
14. Stearic acid (C18: 0)	35.02	3.67	5.2
15. Oleic acid (C18: 1, n-9)	35.67	13.14	18.7
16. Linoleic acid (C18: 2, n-6)	36.57	1.11	1.6
17. Eicosenoic acid (C20: 1, n-9)	43.54	7.74	11.0
18. Eicosadienoic acid (C20: 2)	45.59	1.39	2.0
19. Unidentified	58.28	-	-
20. Unidentified	66.66	-	-

***Bold: unsaturated Fatty Acid**

第三節 紫外線照射によって毛髪から発生するアルデヒド類の同定および定量

アルデヒド類の検出方法として、1,3-シクロヘキサンジオン (CHD) を用いた HPLC による検出方法が知られている。今回、Matsuoka らの報告⁴⁷⁾に従って実験を行った (Table 2.)。

この方法では短鎖から長鎖まで幅広い脂肪族アルデヒドの検出が可能であり、アルデヒドと CHD が反応することで形成されるデカヒドロアクリジン-1,8-ジオン (DHA) 誘導体を検出することで毛髪から発生したアルデヒド類の同定および定量を行った。

Table 2. Composition of CHD solution used for test

	Reaction concentration
CHD	5.0 mg/mL (44.6 μ mol/mL)
Ammonium acetate	100 mg/mL (1.30 mmol/mL)
Acetic acid	50 μ L/mL (0.874 mmol/mL)
Water	

(1) 短鎖アルデヒド類の捕捉装置

毛髪そのものから発生する気体成分については、密閉容器中で毛髪に熱処理（50℃）を行い、発生した気体を捕集し分析する方法などがある⁴⁸⁾。今回の検出対象である短鎖アルデヒド類は、沸点が低く発生した段階で気化し捕捉することが困難であることが予想された。そこで、密閉容器中で毛髪に紫外線を照射し、発生した気体をより安定な化合物に誘導体化することで捕捉する方法を検討した。

密閉容器中で毛髪に紫外線を照射し、送風ポンプで風を送ることで発生した気体を 1,3-シクロヘキサジオン（CHD）溶液に直接トラップした。CHD 溶液への気体の滞留時間をできるだけ長くし、塩を加えた氷水でトラップ部分をよく冷やすことで効率よく気体を回収した（Figure 7.）。

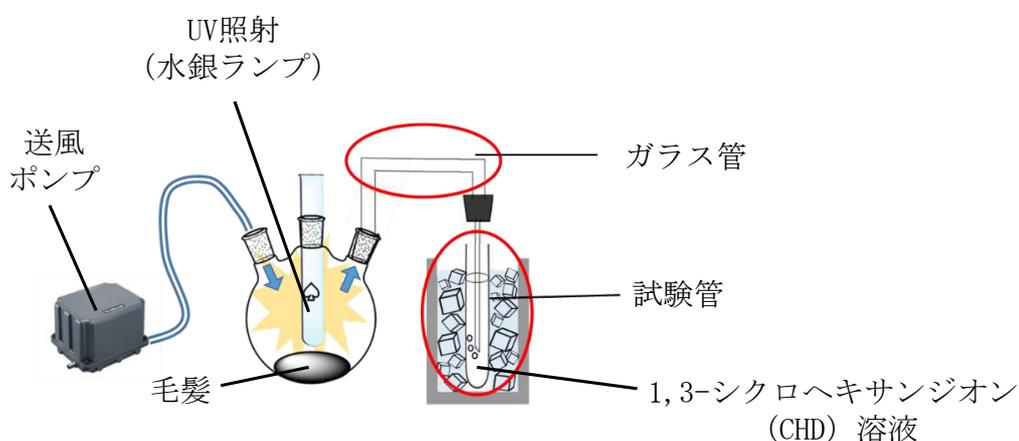


Figure 7. Schematic of a device that traps aldehydes generated from hair by ultraviolet irradiation

The gas generated by irradiating the hair with ultraviolet rays in a sealed container and sending air with a blower pump was directly trapped in the 1,3-cyclohexanedione (CHD) solution.

(2) 紫外線照射によって毛髪から発生するアルデヒド類の同定および定量

一定量の毛髪試料を用い、紫外線を照射した際に発生するアルデヒド類を上記の捕捉装置によって捕捉し、同定および定量を行った。その際、送風ポンプを用いて発生した気体を CHD 溶液 に直接トラップし反応させた。得られたアルデヒド-CHD 誘導体を LC-MS により検出した。代表的な UV 検出クロマトグラムを Figure 8. に示した。

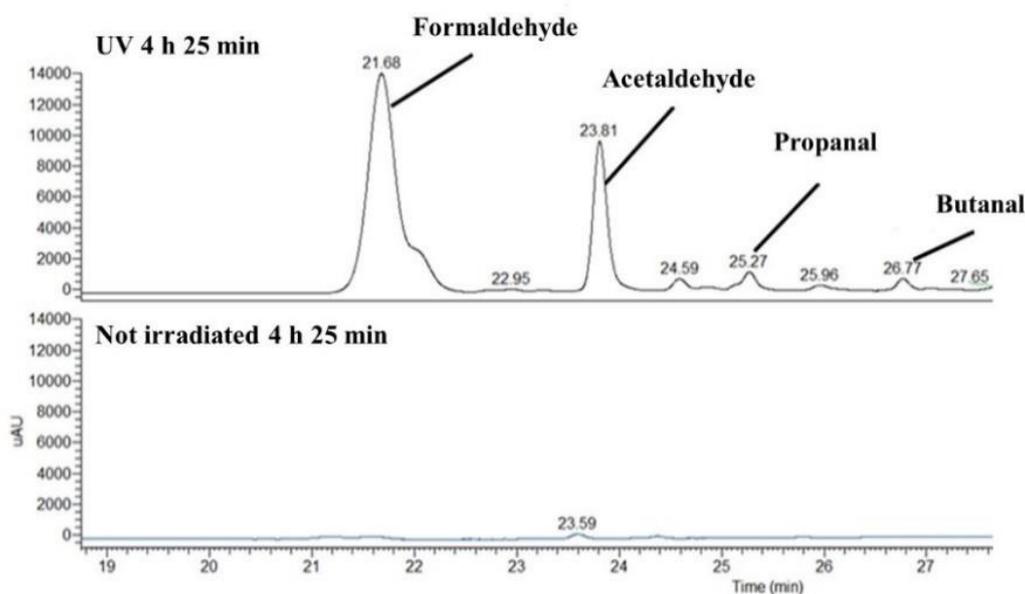


Figure 8. Typical UV detection chromatogram by LC-MS measurement (upper: with UV irradiated, lower: Not irradiated)

LC-MS の UV ピークから、標品と比較を行うことで同定を行い、検量線から各種アルデヒド濃度を算出し、実際に紫外線照射によって毛髪 3 g から発生したアルデヒド量に換算した (Table 3.)。試験は 4 回実施し、コントロールは、紫外線照射のみを行わず、それ以外は同様の条件とした。

Table 3. Detection of aldehyde generated 3 g of hair (UV irradiated 4h 25min)

	Amount of aldehyde formed (μg)								
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
1	67.06	10.80	2.63	0.94	0.44	0.24	0.05	0.03	0.08
2	65.74	15.57	4.34	1.52	0.60	0.36	0.07	0.05	0.24
3	182.96	8.65	4.90	2.12	0.28	0.29	0.03	0.02	0.05
4	84.43	4.06	1.28	0.53	0.15	0.11	0.01	0.01	0.01
Average	100.05	9.77	3.29	1.28	0.37	0.25	0.04	0.03	0.09
SD(S)	55.93	4.78	1.65	0.69	0.20	0.10	0.03	0.02	0.10

Aldehydes detected when UV irradiation was performed for 4 hours and 25 minutes on 3 g of hair. The test was performed four times. C1: formaldehyde, C2: acetaldehyde, C3: propanal, C4: butanal, C5: pentanal, C6: hexanal C7: heptanal, C8: octanal, C9: nonanal

その結果、紫外線照射により、主にホルムアルデヒド(C1)、アセトアルデヒド(C2)、プロパナル(C3)、ブタナル(C4)が発生し、蒸散していることが確認された。特に今回の実験ではホルムアルデヒド(C1)が最も多く検出された。人の毛髪は、長さにもよるが平均約 100 g 程度であると言われている。毛髪 100 g から UV 照射によって生成されると予測されるアルデヒド量を先ほどの結果から算出した (Table 4.)。

Table 4. Amount of aldehyde generated from 100 g of hair (estimated value)

Carbon number	Name	Amount(μg)
C1	Formaldehyde	3334.9
C2	Acetaldehyde	325.7
C3	Propanal	109.6
C4	Butanal	42.6
C5	Pentanal	12.3
C6	Hexanal	8.4
C7	Heptanal	1.4
C8	Octanal	0.9
C9	Nonanal	3.1

その結果、約 1 か月相当の紫外線の影響により、毛髪から約 3.3 mg 相当のホルムアルデヒドが蒸散している計算になることが判った。

第四節 小括

脂質は酸化により過酸化脂質を生成し、それが分解されると最終産物としてアルデヒド類を生成する。実際、毛髪にも存在する脂肪酸であるオレイン酸 (18:1, n-9) やリノール酸 (18:2, n-6) に紫外線を照射すると、アセトアルデヒド (C2) をはじめプロパナール (C3) やヘキサナール (C6) といった様々なアルデヒド類を生成することを確認している。今回、毛髪に紫外線を照射すると短鎖アルデヒド類が発生することが判ったが、これは主に毛髪に含まれる脂質、特に不飽和脂肪酸が過酸化反応を起こした結果に由来すると考える。今回用いた毛髪には、パルミトリン酸やオレイン酸などの不飽和脂肪酸が多く含まれていた。一般的には、脂肪酸からのアルデヒドの生成は、二重結合の位置で開裂が起き、n-9 系のオレイン酸からは C9 が、n-6 系のリノール酸からは C6 が、n-3 系の α -リノレン酸からは C3 が、n-7 系のパルミトリン酸からは C7 が生成されることが報告されている。今回使用した毛髪には、パルミトリン酸やオレイン酸が多く含まれているという結果から、C7 や C9 が多く生成されると予想されるが、より短鎖のアルデヒド類であるホルムアルデヒド (C1) やアセトアルデヒド (C2) が多く検出される結果となった。この理由として、短鎖のアルデヒド類ほど揮発性が高い特性を持つため、今回の手法では検出されやすかったのではないかと考える。また、その他の可能性として、脂質の過酸化によって生成された長鎖アルデヒドがノリッシュ反応 II 型によって、短鎖アルデヒドに分解する経路が考えられる。ノリッシュ反応 II 型では、アルデヒドは光照射によって Figure 9. に示すように分解し、アセトアルデヒドが生成されることが知られている⁴⁹⁾。この時同時に発生した末端オレフィンが不飽和脂肪酸と同様に、紫外線により過酸化されることでホルムアルデヒドが生成されるため最も多く検出されたのではないかと考える。

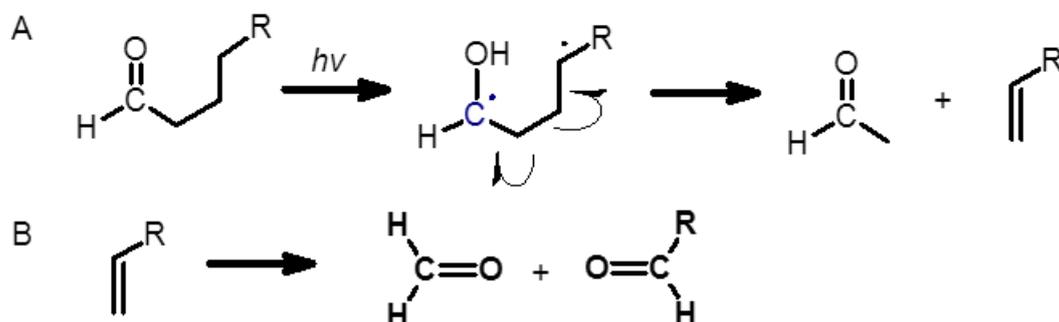


Figure 9. Expected short chain aldehyde formation reaction.

A: Norrish Type 2 reaction, B: Oxidative cleavage of terminal olefins

以上のことより、今回毛髪に紫外線を照射することで短鎖アルデヒド類が検出され、間接的に脂肪酸の過酸化反応が起こっていることが推測された。従って、過酸化反応で生じたラジカル種やアルデヒドが毛髪に対してダメージを与え「髪がパサつく」原因の一つとなる可能性が考えられる。また、揮発性や臭い閾値の点から影響は少ないかもしれないが、頭皮だけではなく毛髪からも、不快な臭いの元が発生していることが判った。

第四章 毛髪のおねりに関する研究

第一節 緒言

毛髪のおねりは、先天的な要因以外に、加齢や外的ストレスなど後天的な要因によって発生する場合も考えられ、実際、加齢によって毛髪のおねりが発生するといった報告がある⁵⁰⁾。しかし、毛髪の発生段階で生じる加齢変化についての報告はほとんど見られない。そこで今回、加齢変化にともなって生じる毛髪のおねりについて、毛髪を形作る上で重要であると考えられる外毛根鞘細胞に注目し、その細胞におけるタンパク質合成と小胞体ストレスが加齢と共にどのように変化するのかの検討を行い、「おねり」との関連についての知見を得ることを目的に実験を行った。

小胞体では、異常なタンパク質が生じると小胞体ストレス応答（Unfolded Protein Response：UPR）と呼ばれる防御機構が働き、タンパク質合成の調節、シャペロン分子によるリフォールディング、タンパク質の分解、などにより異常なタンパク質が蓄積しないよう制御されている⁵¹⁾（Figure 10.）。

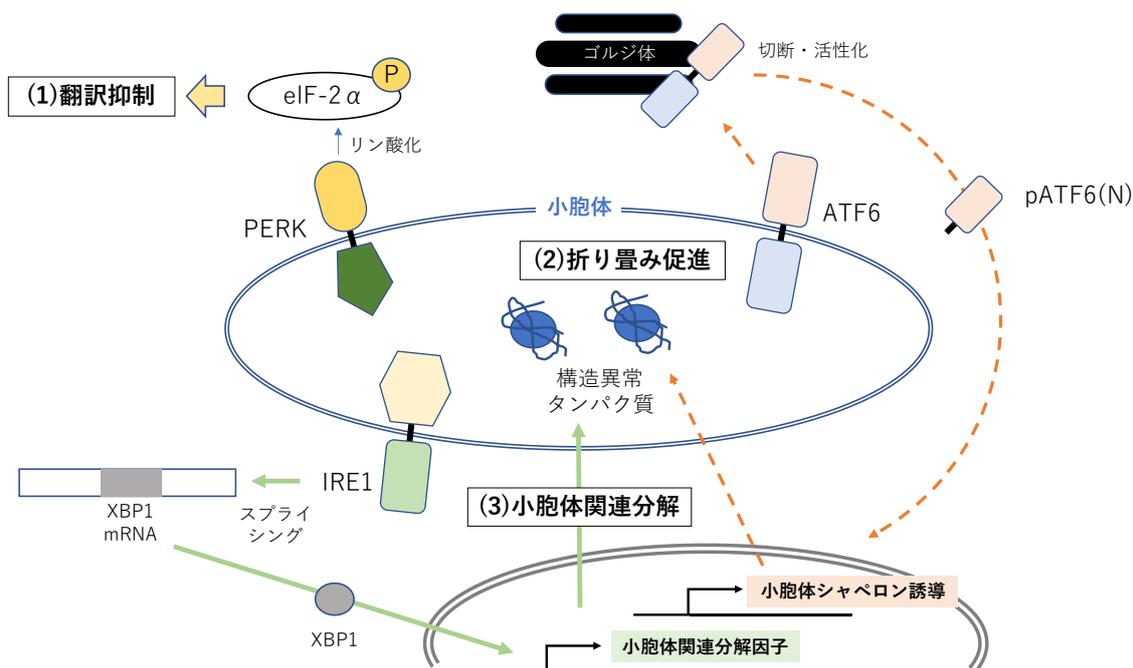


Figure 10. 小胞体ストレス応答

近年、これら一連の UPR が神経疾患や糖尿病などさまざまな疾患の原因になっているという報告がある⁵²⁾。特に、森らは⁵³⁾、メダカの初期発生 of 脊索形成において、小胞体ストレス応答が上手く働かなくなると歪んだ鞘細胞が形成されると報告しており、巨大分子であるコラーゲンの細胞外への分泌には小胞体ストレス応答を介した一連のタンパク質分泌に関わる因子の発現増加が重要であるとしている。脊索は、脊索細胞が増殖・分化して形成されるが、コラーゲンなどの細胞外マトリックスが大量に合成され細胞外に分泌されることで、きれいな鞘として伸張することができる。以上のように、小胞体ストレス応答が細胞分化にも深く関連していると考えられる。

毛髪は第一章で述べたように、「成長期」、「退行期」、「休止期」と呼ばれる一連の過程を経て 4 年～6 年周期で新たに生え変わっており、これを毛周期と呼んでいる。この際、毛包の毛隆起（バルジ領域）より下方の部分（一過性部）は、退行期と共に減縮し、新たな成長期とともに再形成される。新たな毛髪の元となる毛包幹細胞は外毛根鞘のバルジ領域に存在するが、加齢によるダメージが蓄積することで一過性部の毛包形成に関わる外毛根鞘細胞のタンパク質合成に異常が生じ、後天的な毛髪の「うねり」の発生要因の一つとなるのではないかと考えられる。

一方で、毛包の最外層は外毛根鞘細胞で覆われているが、さらにその外側には真皮系の組織である結合性組織毛包と呼ばれる部分が存在する。外毛根鞘細胞と結合性組織毛包の境界には、皮膚の表皮と真皮の間にある基底膜にあたる硝子膜が存在している。皮膚の基底膜は、IV 型コラーゲンや VII 型コラーゲン、ラミニンといった細胞外マトリックス成分が主成分であり、加齢や紫外線の影響によりそれらの分解活性が高まり、その構造が破壊される。その結果、皮膚のしわ・たるみなど表皮や真皮にまで影響を及ぼし、見た目の変化を生じると考えられている⁵⁴⁾⁵⁵⁾。

以上のことより、毛髪において外毛根鞘細胞と結合性組織毛包の境界に存在する硝子膜が毛包の形態形成に重要であると推察し、メダカの軸索形成の異常のように、外毛根鞘細胞からのコラーゲン分泌が加齢などの影響で正常に行われなくなり、毛包の形態がいびつになることや、強度が弱まることで毛髪のうねりが発生するのではないかという仮説のもと検証を行った。

第二節 外毛根鞘細胞の培養方法の検討

毛包の外層に存在し、毛髪の土台作りとして重要である外毛根鞘細胞を得るため、抜去毛から培養する方法を検討した。

(1) 分散培養 (dispersed cell culture) の検討

ヒト毛髪から外毛根鞘細胞を得るため、荒瀬らの方法⁵⁶⁾と笹原らの方法⁵⁷⁾を参考に抜去毛からの初代培養を試みた。ヒト毛髪を1本ずつ引き抜き、トリプシン溶液で細胞を分散させたものを回収し、ケラチノサイト培養培地 KBM NHEK-XF (KOHJIN BIO, Saitama, Japan) にて培養を行った。

その結果、細胞の接着と増殖が見られたが、一部サンプルにおいて頭皮由来の常在菌によるコンタミネーションが見られたため、方法の改良を検討した。

(2) 分散培養 (dispersed cell culture) の再検討

皮膚などの生体試料からの初代培養では、常在菌などによる汚染を防ぐため、70% エタノールなどによる消毒操作を行うのが一般的である⁵⁸⁾。そこで、以下のような方法で抜去毛包を得ることとした。

【毛髪抜去方法】

1. 適当量の毛髪が得られるように区画を分け、その他の毛髪をブロッキングする。
2. 抜去しようとする毛髪（およそ 20~30 本）を予め頭皮から 5 mm ほどの部分でカットする。
3. アルコールをしみ込ませた脱脂綿でしっかりと頭皮および毛髪を消毒する。
4. 毛抜きで1本ずつ毛髪を抜去する。

抜去後の毛包を用いて、(1)と同様の方法で分散培養を行ったところ、コンタミネーションもなく、順調に培養を行えたことから、本方法にて抜去毛包からの外毛根鞘細胞の培養が行えることが分かった。

第三節 ツニカマイシン処理による小胞体ストレス発生の確認

(1) 小胞体ストレス誘導の薬剤およびマーカータンパク質について

小胞体ストレスを誘導する薬剤と小胞体ストレスのマーカータンパク質はいくつか知られており、以下にその一例を示した。

<小胞体ストレス誘導剤>

- ・ Thapsigargin (タプシガルギン) :
小胞体内にカルシウムを取込む役割を担う小胞体カルシウム ATPアーゼを阻害
- ・ Cyclopiazonic Acid (シクロピアゾン酸) :
小胞体内にカルシウムを取込む役割を担う小胞体カルシウム ATPアーゼを阻害
- ・ Tunicamycin (ツニカマイシン) :
小胞体内糖鎖修飾阻害剤
- ・ (+) -Brefeldin A (ブレフェルディン A) :
小胞体-ゴルジ体間輸送阻害剤

<小胞体ストレスのマーカータンパク質>

- ・ CHOP/GADD153/DDIT3
構造、調節領域で高度に保存された遺伝子、小胞体ストレスによって顕著に誘導されるタンパク質で、ミスフォールドタンパク質や折りたたまれていないタンパク質に応答して活性化される。
- ・ GRP78/HSPA5
免疫グロブリン重鎖結合タンパク質とも呼ばれる HSP70ファミリーのメンバーであり、小胞体でのタンパク質会合と折りたたみに関与する。
- ・ ATF6 抗体
転写因子の一つで、小胞体ストレス応答タンパク質の発現を活性化させる。

今回、一般的によく使用されている⁵⁹⁾ツニカマイシンを小胞体ストレスの誘導剤として、GRP78を小胞体ストレスのマーカータンパク質として以降の検討で用いることとした。

(2) ツニカマイシンによる細胞毒性の確認

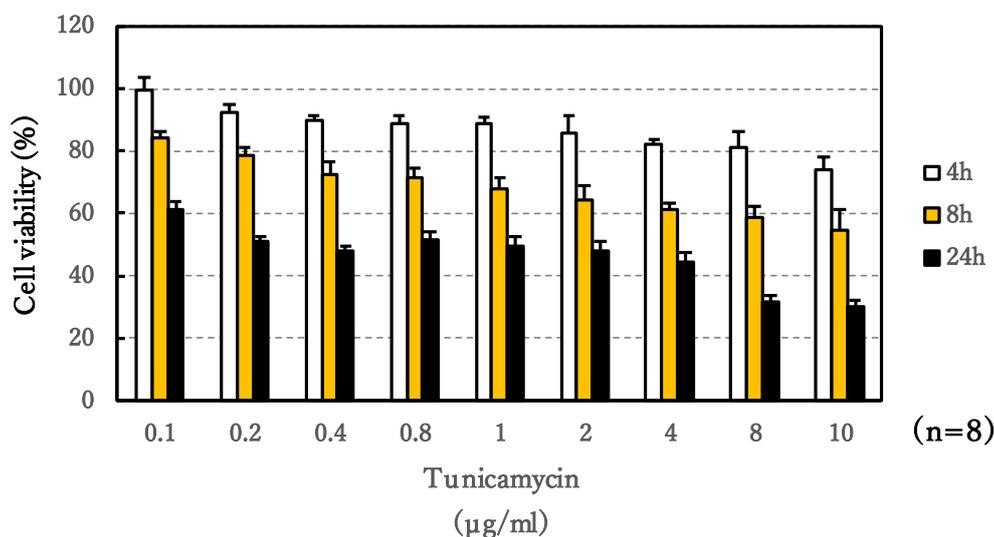
小胞体ストレスを誘導する薬剤としてツニカマイシン (Sigma-Aldrich) を用い、実際に外毛根鞘細胞で小胞体ストレスが生じるのかどうかを確認するため、まず薬剤による細胞生存率への影響について確認を行った。

外毛根鞘細胞に、ツニカマイシンを 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で 9 濃度に設定し、時間経過ごとの細胞生存率を WST-1 アッセイ (DOJINDO, Kumamoto, Japan) により確認した。

Table 5. Effects of tunicamycin on cell viability of outer root sheath cells (%)

		4hs		8hs		24hs	
		average	SD(S)	average	SD(S)	average	SD(S)
Tunicamycin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.1	99.3	4.3	84.4	2.0	61.2	2.3
	0.2	92.6	2.5	78.6	2.6	51.2	1.1
	0.4	90.0	1.2	72.5	3.9	48.1	1.6
	0.8	88.8	2.4	71.5	2.8	51.6	2.4
	1	89.0	1.9	67.9	3.4	49.7	2.7
	2	86.0	5.1	64.2	4.6	47.9	2.9
	4	82.2	1.7	61.3	2.2	44.6	2.6
	8	81.2	4.8	58.7	3.6	31.6	1.8
	10	74.1	3.9	54.7	6.3	30.2	2.2

(n=8)



(n=8)

Figure 11. Effects of tunicamycin on cell viability of outer root sheath cells

Outer root sheath cells (ORSC) were treated with each tunicamycin at the indicated concentrations for 4h, 8h and 24h, and cell number were measured. Each column represents the mean \pm S.D. (n = 8).

それぞれ、コントロール（溶媒：DMSO）を 100 としたときの相対値で細胞生存率を比較した結果を Table 5. および Figure 11. に示した。

その結果、濃度および処理時間依存的に細胞生存率が低下した。今回の結果では、0.1～0.2 µg/mL の段階でやや影響の変化が見られたが、0.2～2 µg/mL の範囲ではそれほど大きな影響はなく、どちらかといえば 2 µg/mL 以上の濃度で影響が大きくなる傾向にあった。

以上の結果から、比較的高濃度で極端な細胞毒性が見られない 1 µg/mL の濃度で今後の処理を行うこととした。

(3) 小胞体ストレスの確認

ツニカマイシンを用いて実際に外毛根鞘細胞で小胞体ストレスが生じるのかどうかについて確認するため、小胞体ストレスマーカーの一つである GRP78 の発現量の変化をウェスタンブロッティングにより確認した。

GRP78 は、シャペロンタンパク質の一種であり、発現誘導されることで異常構造タンパク質の発生を抑え、小胞体ストレスを緩和するため、小胞体ストレスの分子マーカーとして広く用いられている。

外毛根鞘細胞にツニカマイシンを各時間にて処理し、それぞれ細胞抽出液を採取しウェスタンブロッティングにより GRP78 の発現量を確認したところ、ツニカマイシン処理を行うことで GRP78 の発現量が増加することが分かった (Figure 12.)。すなわち、外毛根鞘細胞においてもツニカマイシン処理により小胞体ストレスを生じることが確認できた。

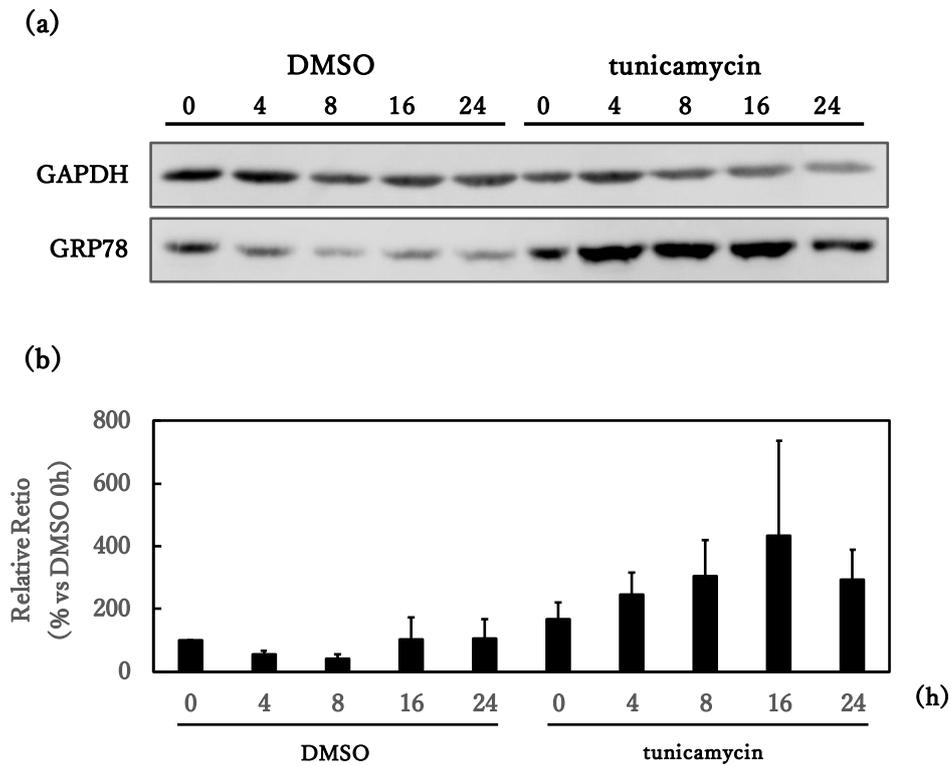


Figure 12. Confirmation of GRP78 expression in outer root sheath cells treated with tunicamycin by Western blotting

Outer root sheath cells (ORSC) were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tunicamycin or with 0.1% (v/v) DMSO (Vehicle) for the indicated times. (a) Representative images obtained by western blot analysis using specific antibodies for each protein. (b) Quantitative analysis of the expression levels of GRP78. The intensity of each band shown in panel a was quantitated by densitometry and normalized against GAPDH. Each column represents the mean ($n = 3$).

第四節 小胞体ストレスがコラーゲン産生に与える影響

毛包の形態維持に必要であると考えられる基底膜成分の中でも、特に IV 型コラーゲンにターゲットを絞り、外毛根鞘細胞での産生が小胞体ストレスの発生によりどう変化するのかを確認した。

(1) サンドイッチ ELISA 法による IV 型コラーゲンの検出方法の確立

サンドイッチ ELISA 法を確立するため、最適な一次抗体および二次抗体の濃度を確認するため、以下の条件で IV 型コラーゲンの検出を試みた。

- ・ 一次抗体

Human Collagen IV α 1 Antibody (R&D systems, #577238)

⇒ 0.2、0.5、1、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5 濃度

- ・ 二次抗体

Anti-Collagen TypeIV, Rabbit-Poly (Novusbio, NB120-6586)

⇒ 400、200、100、50 ng/mL 4 濃度

- ・ 検出サンプル

Native Human Collagen IV protein (Abcam, ab7536)

⇒ 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$

以下の Table 6. に各抗体濃度における IV 型コラーゲンの定量結果を示した。

Table 6. Detection of type IV collagen by ELISA

		primaly antibody ($\mu\text{g}/\text{mL}$)									
		0.2		0.5		1		2		4	
secondary antibody (ng/mL)	50	0.052	0.010	0.058	0.009	0.060	0.010	0.058	0.011	0.063	0.016
	100	0.099	0.026	0.125	0.020	0.131	0.019	0.118	0.019	0.120	0.023
	200	0.198	0.054	0.259	0.058	0.258	0.063	0.251	0.060	0.254	0.057
	400	0.350	0.094	0.421	0.092	0.420	0.100	0.431	0.101	0.426	0.107
		2.5	0.625	2.5	0.625	2.5	0.625	2.5	0.625	2.5	0.625
Type IV Collagen Protein ($\mu\text{g}/\text{mL}$)											

average (n=2)

また、Figure 13. に二次抗体が 400 ng/mL における各一次抗体濃度の検量線を示した。

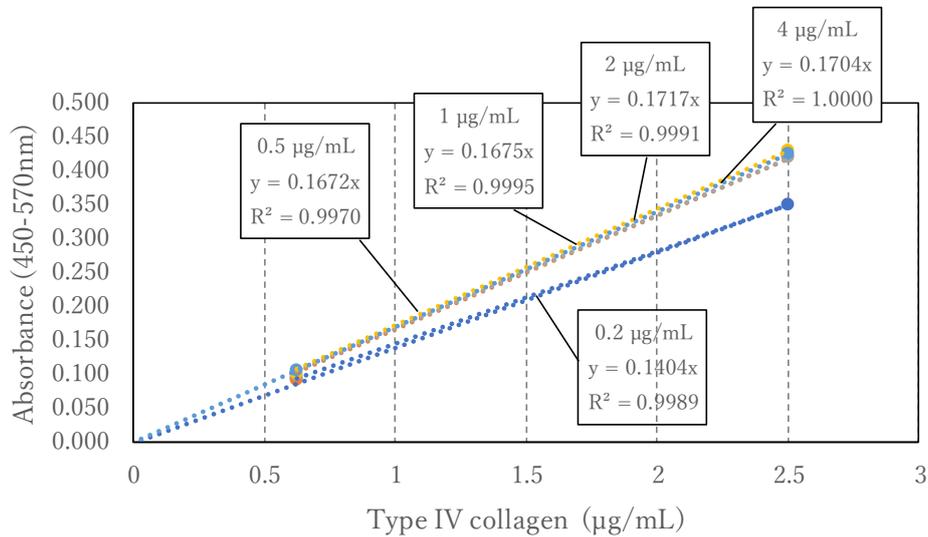


Figure 13. Calibration curve of each primary antibody concentration at 400 ng/mL of secondary anti-collagen antibody.

以上の結果より、サンドイッチ ELISA 法による IV 型コラーゲンの検出を試みたところ、標準品のサンプルを検出することができた。今回のコラーゲン量の範囲でいくと、一次抗体の濃度は 0.5 µg/mL 以上で全て同様の傾向を示したため、0.5 µg/mL で必要十分であると考えられる。一方、二次抗体については濃度依存的に検出量が増えており、400 ng/mL で必要十分であると考えられた。したがって、今後は一次抗体が 0.5 µg/mL、二次抗体が 400 ng/mL の条件で検討を進めていくこととした。

(2) 小胞体ストレスによる外毛根鞘細胞の IV 型コラーゲン産生に与える影響

ツニカマイシンを用いて小胞体ストレスを誘導した際に、外毛根鞘細胞の IV 型コラーゲンの発現がどう変化するかを確認するため、処理時間を 0~48 時間まで設定し、確認した。

また今回より、ツニカマイシンの濃度を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、より小胞体ストレスの影響が表れやすい条件で試験を行った。

細胞抽出液中の IV 型コラーゲン量を Figure 14. に示した。コラーゲン量は全タンパク質あたりの相対量で示した。

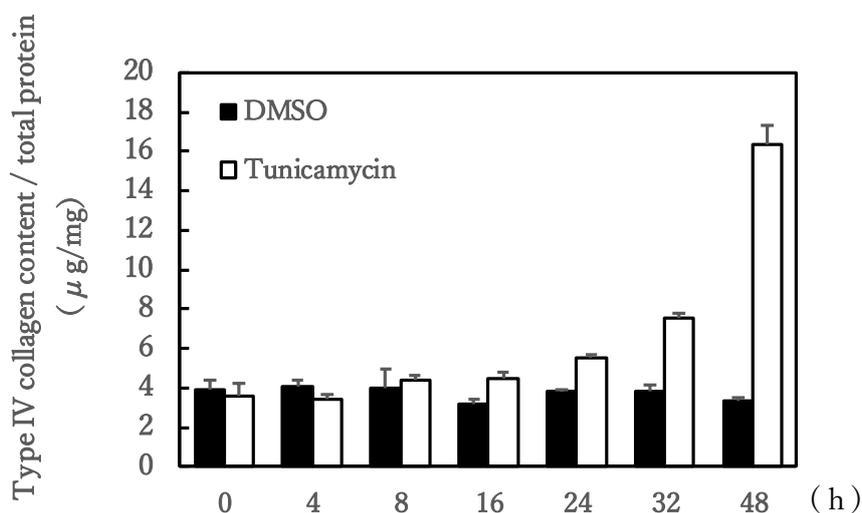


Figure 14 Effect of endoplasmic reticulum stress on type IV collagen production of outer root sheath cells

Outer root sheath cells were treated with tunicamycin (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or with 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ DMSO (Vehicle) for the indicated times. The amount of type IV collagen per total protein was measured by ELISA. Each column represents the mean \pm S.D. (n = 3).

今回、検討を行った 48 時間まで、DMSO によって IV 型コラーゲンの量に変化は見られなかった。一方、ツニカマイシン処理によって、時間経過ごとに細胞内の IV 型コラーゲン量は増加し、48 時間後では特に顕著であった (Figure 14.)。すなわち、ツニカマイシン処理により小胞体ストレスが掛かることで細胞内の IV 型コラーゲンの量が増えることが

判った。

また、処理 24 時間でツニカマイシン濃度を変化させた時の IV 型コラーゲンの発現に対する影響を確認するため、各種濃度のツニカマイシンを外毛根鞘細胞に処理した。

その結果、細胞抽出液および培養上清中の IV 型コラーゲン量を定量したところ、細胞内の IV 型コラーゲンは濃度依存的に上昇したが、培養上清中の IV 型コラーゲン量はツニカマイシン処理により低下した (Figure 15.)。

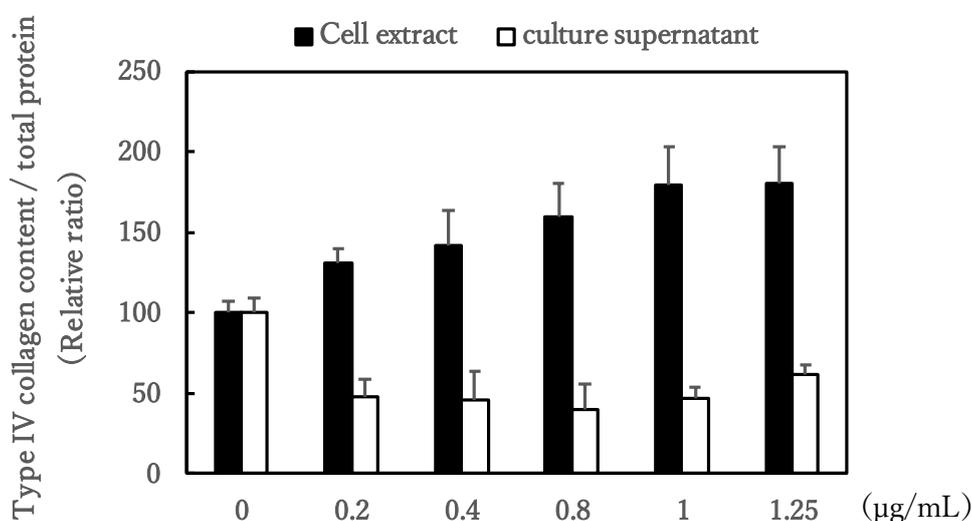


Figure 15. Intracellular and extracellular type IV collagen content of outer root sheath cells treated with tunicamycin

Outer root sheath cells were treated with only vehicle (0.5 µL/mL DMSO) or with tunicamycin at the indicated concentrations for 24h. The amount of type IV collagen per total protein was measured by ELISA. Each column represents the mean \pm S.D. (n = 3).

以上の結果より、ツニカマイシン処理による小胞体ストレスの影響により、細胞内の IV 型コラーゲンの量が増加したが、その一方で、細胞外の IV 型コラーゲンのタンパク質量は減少したことから、単純に IV 型コラーゲンのタンパク質発現が増加したのではなく、小胞体ストレスの影響によりタンパク質の細胞外への分泌が阻害されている可能性が示唆された。

今後、遺伝子発現による検証を行い、細胞内の IV 型コラーゲンの発現がタンパク質発現量の増加によるものなのかどうかについて検証を行っていきたい。

第五節 小括

毛髪の「うねり」は、先天的な要因以外に、加齢や外的ストレスなど後天的な要因によって発生する場合も考えられる。そこで、毛髪を形成する上で重要である外毛根鞘細胞に注目し、小胞体ストレスと基底膜成分である IV 型コラーゲンの産生との関係性について検討を行った。その結果、小胞体ストレスを惹起するツニカマイシンにより小胞体ストレスマーカーである GRP78 の発現が増加し、細胞内の IV 型コラーゲン量も増加することが判った。今後、酸化ストレスが外毛根鞘細胞のコラーゲン産生に与える影響およびマウスを用いた形態学的変化についても検討を進めることで、外毛根鞘細胞のコラーゲン産生とうねり発生の関係性を明らかにしていく予定である。

総括

今回、女性の毛髪や頭皮に関するさまざまな悩みの中でも特に関心の高い、「白髪」「髪がパサつく」「くせ毛・髪のうねり」の 3 つに対して、エイジングや外的因子によって毛髪に生じる変化とそれらの予防に関する研究を行った。

・第二章では、マウス B16F10 メラノーマ細胞を用いて、各種フラボノイドによる、メラニン産生促進効果について検討を行った。その結果、フラボノイド骨格の B 環の 4' 位にメトキシ基を持つジオスメチン、アカセチンおよびケンフェライドによりメラニン産生の促進およびチロシナーゼ活性の増加を示すことが判った。それらの効果は、対応する 4' 位が OH-タイプのフラボノイドと比較して顕著に高く、4' 位にメトキシ基を持つ構造と、メラニン産生促進効果との間に構造活性相関があることが判った。また、メラニン合成に関する因子のタンパク質発現を調べたところ、アカセチンによるメラニン産生促進効果は、ERK および CREB の活性化によるチロシナーゼ発現の増加によることが判った。

・第三章では、毛髪に紫外線を照射した際に生じるアルデヒド類を検出する方法を検討した。密閉容器中で毛髪に紫外線を照射し、発生した気体を 1,3-シクロヘキサジオン (CHD) 溶液に直接トラップし LC-MS を用いて分析したところ、ホルムアルデヒドやアセトアルデヒドといった短鎖アルデヒドが多く検出された。すなわち、紫外線を照射することで毛髪内部の脂肪酸の過酸化反応が起こっていると推察され、過酸化反応で生じるラジカル種やアルデヒドが毛髪に対してダメージを与える可能性があることが判った。

・第四章では、毛髪を形成する上で重要である外毛根鞘細胞に注目し、小胞体ストレスと基底膜成分である IV 型コラーゲンの産生の関係性について検討を行った。その結果、小胞体ストレスを惹起するツニカマイシンにより小胞体ストレスマーカーである GRP78 の発現が増加し、細胞内の IV 型コラーゲン量も増加することが判った。

今回、白髪に対しては、4' 位にメトキシ基を持つフラボノイドの効果により、メラニン産生を促進する薬剤への応用が期待できる。一方で、髪のパサつきやうねりに関してはその現象や効果的な解決方法については見いだせておらず、今後の課題であると考え。特に、毛髪のうねりに関しては、今後、酸化ストレスが外毛根鞘細胞のコラーゲン産生に与える影響およびマウスを用いた形態学的変化についても検討を進めることで、外毛根鞘細胞のコラーゲン産生とうねり発生の関係性を明らかにしていくとともに、加齢に伴ううねりを改善できる薬剤の開発に役立てていただければ考える。

実験の部

第二章に関する実験

2.1. フラボノイド

今回試験に供したフラボノイドを Figure 1. に示した。全て Extrasynthese 社(Genay Cedex, France) より入手した。フラボノイドはその構造から、4' 位に水酸基を持つ OH-タイプとして、ルテオリン (Luteolin)、アピゲニン (Apigenin) およびケンフェロール (Kaempferol) を用いた。また、それぞれの 4' 位にメトキシ基を持つ 4'-*O*-Methyl-タイプとして、ジオスメチン (Diosmetin)、アカセチン (Acacetin) およびケンフェライド (Kaempferide) を用いた。各フラボノイドは、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し試験に供した。

2.2. B16F10 メラノーマ細胞の培養

細胞はマウス由来の B16F10 メラノーマ細胞 (JCRB0202: JCRB cell bank, Japan) を用いた。培養液には、10 % のウシ胎児血清 (FBS) およびペニシリン (20 u/mL) とストレプトマイシン (20 µg/mL) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM-high glucose ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用い、37°C、5 % CO₂ 条件下にて培養した。

2.3. メラニン合成促進作用の評価

B16F10 メラノーマ細胞を、12 ウェルマイクロプレートにウェルあたり 1.0×10^4 個となるように播種し、72 時間前培養を行った。その後、フラボノイドを所定濃度となるように添加した培地およびコントロールとして DMSO を添加した培地でさらに 96 時間培養を行った。なお、培地は 48 時間ごとに新しいものと交換した。培養終了後、顕微鏡による細胞のメラニン合成の観察を行い、回収した細胞を PBS(-) で洗浄した後、細胞ペレットの色を基準にメラニン合成促進作用を評価した。0.25 % トリプシン/EDTA 溶液で細胞をプレートから除去した後、PBS Buffer による洗浄および遠心分離 (5,000 rpm、2 分) による回収を 2 回行った。細胞数の計測は、Burker-Turk chamber を用いて行った。

さらに、回収した細胞を 200 µL の 1N 水酸化ナトリウム水溶液に懸濁後、37°Cで一晩静置してメラニンを可溶化させ、415 nm の吸光度を測定することでメラニン合成量を定量した。メラニン量は、濃度既知の合成メラニン (Sigma-Aldrich) を用いて得られた検量線より算出した。

2.4. チロシナーゼ活性の測定

B16F10 メラノーマ細胞を、35mm dish に 2.0×10^4 個となるように播種し、72 時間前培養を行った。その後、フラボノイドを所定濃度となるように添加した培地およびコントロールとして DMSO を添加した培地でさらに 72 時間培養を行った。培養終了後、細胞を回収し PBS(-) で洗浄した後、細胞溶解液 (0.1M リン酸バッファー (pH 6.8)、1 % Triton X-100、1mM PMSF、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アプロチニン、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ロイペプチン) に懸濁し超音波処理により細胞を破碎することで細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液のタンパク質量をブラッドフォード法 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) により測定し、各サンプル 100 μL 中のタンパク質濃度が 50 μg となるように調製した。次に、細胞溶解液 100 μL に 1mM L-DOPA 溶液を 10 μL 加え、37°C で 120 分間反応させ、415 nm における吸光度変化をもとにタンパク質あたりのチロシナーゼ活性を測定した。

2.5. ウェスタンブロット分析

B16F10 メラノーマ細胞を、60mm dish に 1×10^6 個となるように播種し、血清を含まない DMEM 培地を用いて 24 時間培養した。その後、10 μM のアカセチンを添加した培地およびコントロールとして DMSO を添加した培地を用いて、所定の時間で培養を行った。その後、各培養時間で細胞を回収し、PBS(-) で洗浄した後、細胞溶解液 (0.1 M NaCl, 20 mM sodium pyrophosphate, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 % glycerol, 1 % NP-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM PMSF および Phosphatase Inhibitor Cocktail (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)) に懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートし細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液のタンパク質量を BCA 法 (Thermo Fisher Scientific, USA) により測定し、各サンプル 5 μg をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。細胞抽出液を、100°C、5 分間処理し、13 % ゲル濃度の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によりタンパク質を分離し、polyvinylidene fluoride 膜上に (Millipore, Bedford, MA, USA) 転写した。その後、転写膜をスキムミルクでブロッキングし、TBST バッファーに溶解した一次抗体を 4°C で一晩処理した。それぞれの一次抗体は、チロシナーゼウサギポリクローナル抗体は Aviva Systems Biology 社製 (San Diego, CA, USA) を、 β -アクチン、ERK、リン酸化 ERK ウサギポリクローナル抗体は Sigma-Aldrich 社製を、CREB、リン酸化 CREB マウスポリクローナル抗体は Cell Signaling Technology 社製 (MA, USA) を用いた。転写膜を洗浄した後、HRP 標識済みの二次抗体を室温で 1 時間反応させ、Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いてタンパク質を検出した

2.6. 統計分析

実験データは、Dunnett の多重比較テストを使用して統計的有意性について評価した。データは、それぞれコントロールもしくは溶媒単体のグループと比較を行った。データの値は、平均値と標準偏差値 (SD) であらわした。

第三章に関する実験

3.1. 使用試薬

1,3-シクロヘキサジオンおよびバレルアルデヒド (C5)、ヘプタナール (C7)、オクタナール (C8) については東京化成工業社製 (Tokyo, Japan) を、水酸化カリウムおよび三フッ化ホウ素メタノール、酢酸アンモニウム、酢酸、プロピオンアルデヒド (C3)、ブチルアルデヒド (C4)、ヘキサナール (C6)、ノナナール (C9)については、和光純薬社製 (Osaka, Japan) を、ホルムアルデヒド (C1) およびアセトアルデヒド (C2) については Sigma-Aldrich 社製を、トリデカン酸およびメタノール、クロロホルム、ヘキサン、アセトニトリルは Nacalai Tesque 社製を用いた。脂肪酸メチルエステルの標準品は、Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich) を用いた

3.2. 毛髪試料

性別、年齢および化学的処理の有無を問わず簡易的に多くの毛髪を得るため、美容室からカット施術後の毛髪を採集し試験に供した。得られた毛髪を 1% SDS 溶液中で 5 分間スターラーにより攪拌し洗浄を行った後、水道水でよくすすぎ乾燥させた。

3.3. 毛髪脂質の抽出

毛髪試料 0.45 g を 1M KOH 90%メタノール溶液に浸漬し、60°C のオイルバス中で 2 時間、加水分解処理を行った。その後、水 5 mL、6M HCl 2.5mL、クロロホルム 20mL を加え 30 分間スターラーで攪拌した。次に、分液ロートに移し 100 回程度攪拌し、有機溶媒層を分取した。この有機溶媒層を毛髪由来脂質とし、エバポレーターで濃縮後、GC-MS 分析を行った。

3.4. 毛髪脂質の GC-MS 分析

GC-MS 測定には、GC-2010, PARVUM 2, AOC20i (SHIMADZU, Kyoto, Japan) を用いた。得られた毛髪脂質にヘキサンを加え溶解し、NaOH メタノール溶液 0.75 mL、内部標準試料 (トリデカン酸) 0.1 mL を加え、9 分間ヒートブロック (100°C) で加熱した。さらに、三フッ化ホウ素メタノール溶液 1 mL を加え、7 分間ヒートブロック (100°C) で加熱し、脂肪酸メチルエステル誘導体を得た。その後、以下の条件で GC-MS 分析を行った。

【GC-MS 分析条件】

カラム：Omegawax 250 30 m×0.25 mm I.D. ×0.25 μm film

カラムオープン温度：120°C、カラム流量：1.00 mL/min

気化室温度：250°C、圧力：80.8 kPa、全流量：14.0 mL/min

3.5. 紫外線照射

毛髪への紫外線照射については、照明装置 (UM-103B-B, Eiko Electric Industrial, Tokyo, Japan) および高圧水銀ランプ (UM-102, UV 波長 : 300~450 nm, USHIO, Tokyo, Japan) を搭載した UV 照射装置 (ULO-6DQ, USHIO, Tokyo, Japan) を用いた。紫外線照射部の下方 1 cm となるように毛髪試料をセットし、紫外線照射を行った。この時の UV-A (320~400 nm) および UV-B (280~320 nm) の紫外線強度は、それぞれ 3.49mW/cm² および 4.45 mW/cm² となった。紫外線の照射時間は、UV-B 照射量が 706.8 kJ/m² となる 4 時間 25 分に設定した。紫外線量は、茨城県つくば市の 1994 年から 2008 年までの 7 月の日積算 UV-B 量の平均値 (23.56 kJ/m²) から算出した (気象庁)。

3.6. アルデヒド検出装置

密閉容器中で毛髪に紫外線を照射し、送風ポンプで風を送ることで発生した気体を 1,3-シクロヘキサジオン (CHD) 溶液に直接トラップした。

3.7. CHD 誘導体化によるアルデヒド類の検出

紫外線照射部の下方 1 cm に毛髪試料を約 3 g 静置し、4 時間 25 分間紫外線を照射した。その際、送風ポンプを用いて発生した気体を直接 CHD 溶液 (2 mL) にトラップし、反応させた。得られたアルデヒド-CHD 誘導体を LC-MS により検出した。

3.8. LC-MS 測定

LC-MS 測定には、Q Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。紫外線照射によって発生したアルデヒド類を直接 CHD 溶液と反応させ、DHA 誘導体を得た。得られた DHA 誘導体を、シリンジ (SS-01T, Terumo, Tokyo, Japan) とフィルター (GLCTD-PTFE 1345, Shimadzu) を用いて濾過した。その後、以下の条件で LC-MS 測定を行った。DHA 誘導体の UV 吸収スペクトルの極大吸収波長を 366 nm とし、HPLC により測定を行った。

【LC-MS 分析条件】

Solvent A : 水+0.1 % ギ酸、Solvent B : アセトニトリル+0.1 % ギ酸

グラジエント (B.Conc %) : 0.00~12.00 min 5 % 12.00~25.00 min 5→65 %
25.00~30.00 min 65 % 30.00~40.00 min 95 %
40.00~50.00 min 5 %

検出 : 366 nm、オープン温度 : 40 °C、流速 : 0.2 mL/min、注入量 : 2 µL

カラム : X Terra MS C8 Column, 125 Å, 5 µm, 2.1×150 mm, 1/pkg

3.9. 紫外線照射によって毛髪から生成されるアルデヒド類の検出

密閉容器中で毛髪試料 3 g に一定時間（4 時間 25 分）紫外線を照射し、発生した気体を送風ポンプで送り出し、CHD 溶液にトラップした。紫外線照射終了後、生成された DHA 誘導体を LC-MS 測定し、得られた UV ピークをマニュアルインテグレーションによって Area 値 (MA) を導き出した。各アルデヒド-CHD 標品の MA 値と濃度 (μM) の関係から、検量線を作成し、毛髪から発生したアルデヒド類の定量を行った。コントロールは、紫外線照射のみを行わず、それ以外は同様の条件とした。

第四章に関する実験

4.1. 使用試薬

外毛根鞘細胞の培養にはケラチノサイト培養培地 KBM NHEK-XF (KOHJIN BIO, Saitama, Japan) を、小胞体ストレスの誘導剤としてツニカマイシン (Sigma-Aldrich) を用いた。

4.2 皮膚常在菌の除去

抜去毛包を得る際に皮膚常在菌による汚染を防ぐため、70% エタノールを用いた消毒操作を行った。まず、適当量 (20~30 本) の毛髪が得られるように髪留めを用いて区画を分け、余分な毛髪をブロッキングした。その後、頭皮から約 5 mm の部分で毛髪をカットし、アルコールをしみ込ませた脱脂綿でしっかりと頭皮および毛髪を消毒した。

4.3. 抜去毛包からの外毛根鞘細胞の分散培養

上記 4.2. で処理した後、毛髪を毛抜きで 1 本ずつ引き抜き、透明な外毛根鞘が付着している毛包のみを選択し、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (Nacalai Tesque) (各終濃度: 20 u/mL、20 µg/mL) を含む Eagle's MEM 培地 (Sigma-Aldrich) に回収した。その後、回収した毛包をまとめて PBS(-) で洗浄し、0.25 % トリプシン/EDTA 溶液を加え、37°C、15 分間反応させ、パスツールピペットでピペッティングすることで細胞を分散させた。血清を含む Eagle's MEM 培地でトリプシンの反応を停止させ、900 rpm、3 分間遠心分離を行い、細胞を回収した。その後、ケラチノサイト培養培地 KBM NHEK-XF に懸濁し、35mm dish に 1×10^4 個/cm² となるよう播種した。

4.4 ウェスタンブロット分析

外毛根鞘細胞を、35mm dish に 1×10^5 個となるように播種し、KBM NHEK-XF 培地を用いて 48 時間培養した。その後、各種濃度のツニカマイシンを添加した培地およびコントロールとして DMSO を添加した培地を用いて、所定の時間で培養を行った。細胞を回収した後、PBS(-) で洗浄し、細胞溶解液 (RIPA buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P40, 0.5 % デオキシコール酸 Na, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA (pH 7.2), 0.06 mg/mL aprotinin, 0.01 mg/mL leupeptin, 1 mM PMSF) を添加し、氷上で 15 分間インキュベートした。その後、セルスクレーパーで細胞を掻き取りマイクロチューブに回収し、超音波発生装置にて細胞を破碎し (15sec×2)、遠心分離 (12,000rpm、4°C、10 分) し、得られた上清を細胞抽出液とした。得られた細胞抽出液のタンパク質量を BCA 法 (Thermo Fisher Scientific) により測定した。細胞抽出液を、100°C、5 分間処理し、10 % ゲル濃度の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によりタンパク質を分離し、polyvinylidene fluoride 膜 (Bio-Rad, Hercules, California, USA) 上に転写した。その

後、転写膜をスキムミルクでブロッキングし、TBST バッファーに溶解した一次抗体を 4°C で一晩処理した。それぞれの一次抗体は、GRP78 ラットモノクローナル抗体は SantaCruz 社製 (Dallas, Texas, USA) を、GAPDH ラビットポリクローナル抗体は Cell Signaling Technology 社製をそれぞれ用いた。転写膜を洗浄した後、HRP を標識した二次抗体を室温で 1 時間反応させ、Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いてタンパク質を検出した

4.5. ELISA 分析

96 ウェルマイクロプレートに 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) で希釈した 0.5 µg/mL の濃度のヒト IV 型コラーゲンマウスモノクローナル抗体 (R&D Systems, Minneapolis, USA) を 100 µl/well 注入した後、プレートをシーリングし 4°C で一晩インキュベートし、抗体をプレート表面に固相化した。その後、PBST バッファーでプレートの洗浄を行い (300 µL/well×4 回)、5 % スキムミルク (Nacalai Tesque) を 100 µL/well 注入し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを同様に洗浄し、各種濃度のサンプルおよびスタンダードとして Native Human Collagen IV protein (Abcam, Cambridge, United Kingdom) を 100 µL/well 注入し、2 時間インキュベートした。プレートを同様に洗浄し、400 ng/mL の二次抗体 (ヒト IV 型コラーゲンラビットポリクローナル抗体, Novusbio, Colorado, USA) を 100 µL/well 注入し、1 時間インキュベートした。次に、HRP 標識済みのラビット IgG 抗体を用いて IV 型コラーゲンを検出した。HRP の基質には、TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン, Nacalai Tesque) を用い、0.2 M クエン酸バッファー (pH 4.0)、0.5 mM TMB、0.005 % 過酸化水素となるよう混合し基質溶液を得た。

引用文献

- 1 あたらしい皮膚科学 第2版 清水 宏著 中山書店出版
- 2 西村栄美, 実験医学, Vol.35、No.8 (5月号) (2017)
- 3 Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jakson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S. *Nature*, 416, 854-860 (2002)
- 4 働く女性の「髪と頭皮」に関する意識調査 長瀬産業株式会社、株式会社ナガセ ビューティーケア 働く女性の意識調査レポート 2011年1月
- 5 Rózanowska M, Sarna T, Land EJ, Truscott TG, *Free Radic Biol Med* 26: 518-525 (1999)
- 6 Jody P Ebanks, R Randall Wickett, Raymond E Boissy. *Int J Mol Sci*, 10(9),4066-4087 (2009)
- 7 霜垣 久夫、日本化粧品科学会誌 Vol.26 No.1 17-21 (2002)
- 8 山田 立郎、皮膚と美容 Vol.34 No.3 21-28 (2002)
- 9 相馬 勤、岩渕 徳郎、皮膚と美容 Vol.41 No.2 28-33 (2009)
- 10 Arck PC, Overall R, Spatz K, Liezman C, Handjiski B, Klapp BF, Birch-Machin MA, Peters EM. *FASEB J*. 20: 1567-1569 (2006)
- 11 Wood JM, Decker H, Hartmann H, Chavan B, Spencer JD, Hasse S, Thornton MJ, Shalhaf M, Paus R, Schallreuter KU. *FASEB J*. 23: 2065-2075 (2009)
- 12 Moriyama M, Osawa M, Mak SS, Ohtsuka T, Yamamoto N, Han H, Delmas V, Kageyama R, Beermann F, et al. *J. Cell Biol.* 173: 333-339 (2006)
- 13 Schouwey K, Delmas V, Larue L, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, Radtke F, Beermann F, *Dev. Dyn.* 236: 282-289 (2007)
- 14 Nishimura EK, Suzuki M, Igras V, Du J, Loning S, Miyachi Y, Roes J, Beermann F, Fisher DE, *Cell Stem Cell* 6: 130-140 (2010)
- 15 松崎 貴、新井 幸三、上甲 恭平、細川 稔、中村 浩一、最新の毛髪科学、フレグランスジャーナル社 (2003)
- 16 S.naito, M.ooshika, N.yorimoto, Y.kuroda, in : *Proceeding of The 9th International Wool Textile Research Conference*, p367 (1995)
- 17 西村 桂一、西野 美奈子、稲岡 靖規、北田 好男、福島 信、化粧品会誌 Vol.13, No.3 134-139(1989)
- 18 Edo Hoting, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 47 201-211(1996)
- 19 De la Mettrie R, Saint-Léger D, Loussouarn G, Garcel A, Porter C, Langaney A, *Hum. Biol.* 79(3):265-281 (2007)
- 20 Lindelöf B, Forslind B, Hedblad MA, Kaveus U, *Arch Dermatol.* 124(9):1359-1363 (1988)
- 21 Horio M, Kondo T, *Text Res J*, 23 373-386 (1953)

- 22 Bryson WG, Harland DP, Caldwell JP, Vernon JA, Walls RJ, Woods JL, Nagase S, Itou T, Koike K. *J Struct Biol.*, Apr;166(1):46-58 (2009)
- 23 長瀬 忍, *Fragrance J*, 2: 38-43 (2010)
- 24 Thibaut S, Barbarat P, Leroy F, Bernard BA. *Int J Dermatol.*, Oct;46 Suppl 1:7-10 (2007)
- 25 Sriwiriyanont P, Hachiya A, Pickens WL, Moriwaki S, Kitahara T, Visscher MO, Kitzmiller WJ, Bello A, Takema Y, Kobinger GP. *J Invest Dermatol.* 131(2):320-328 (2011)
- 26 Kato M, Shimizu A, Yokoyama Y, Kaira K, Shimomura Y, Ishida-Yamamoto A, Kamei K, Tokunaga F, Ishikawa O., *J Invest Dermatol.*, May;135(5):1253-1260 (2015)
- 27 Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, *J. Nat. Prod.* 61: 71-76 (1998)
- 28 Lu J, Papp LV, Fang J, Rodriguez-Nieto S, Zhivotovsky B, Holmgren A, *Cancer Res.* 66: 4410-4418 (2006)
- 29 Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, Kobori M, Kanda T, Shinmoto H, Tsushida T, *J. Agric. Food Chem.* 53: 6105–6111 (2005)
- 30 Yoon HS, Lee SR, Ko HC, Choi SY, Park JG, Kim JK, Kim SJ, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 1781–1784 (2007)
- 31 Ohguchi K, Akao Y, Nozawa Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 1499-1501 (2006)
- 32 Fujii T, Saito M, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1989–1993 (2009)
- 33 Nagata H, Takekoshi S, Takeyama R, Homma T, Osamura YR, *Pigment Cell Res.* 17: 66-73 (2004)
- 34 Takeyama R, Takekoshi S, Nagata H, Osamura YR, Kawana S, *J. Mol. Histol.* 35: 157-165 (2004)
- 35 Arck PC, Overall R, Spatz K, Liezman C, Handjiski B, Klapp BF, Birch-Machin MA, Peters EM. *FASEB J.* 20: 1567-1569 (2006)
- 36 del Marmol V, Beermann F., *FEBS Lett.* 381: 165-168 (1996)
- 37 Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H., *Cell.* 74: 395-404 (1993)
- 38 Bentley NJ, Eisen T, Goding CR., *Mol Cell Biol.* 14: 7996-8006 (1994)
- 39 Bertolotto C, Buscà R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP, Ballotti R., *Mol Cell Biol.* 18: 694-702 (1998)
- 40 Gonzalez GA, Montminy MR., *Cell.* 59: 675-680 (1989)
- 41 Xing J, Ginty DD, Greenberg ME., *Science.* 273: 959-63 (1996)
- 42 Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ., *EMBO J.* 15: 4629-4642 (1996)
- 43 Du K, Montminy M., *J Biol Chem.* 273: 32377-32379 (1998)
- 44 ROBBINS CR, *Chemical and Physical Behavior of Human Hair* (Springer, New York,

- 2002)
- 45 Arnold N. Onyango, J. Chemistry and Physics of Lipids., 165, 777-786 (2012)
 - 46 Yu Wang, Ping Cui, J. Agric. Food Chem., 63, 6293-6296 (2015)
 - 47 M. Matsuoka, N. Imado, T. Maki, K. Banno, T. Sato, J. Chromatographia, 43, 501-506 (1996)
 - 48 Noel. Goetz, GENEVIEVE KABA, DANIEL GOOD, GEORGES HUSSLER, PIERRE BORE., J. Soc. Cosmet. Chem., 39 1-13 (1988)
 - 49 R. G. W. NORRISH, C. H. BAMFORD Nature, 140, 195-196 (1937)
 - 50 伊藤隆司, 梶浦嘉夫, 長瀬 忍, 放射光, March Vol.21, No.2 (2008)
 - 51 木俣行雄, 蛋白質 核酸 酵素, Vol.3 No.1 (2008)
 - 52 Yoshida H, FEBS J., 274(3):630-658 (2007)
 - 53 Ishikawa T, Toyama T, Nakamura Y, Tamada K, Shimizu H, Ninagawa S, Okada T, Kamei Y, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Aoyama E, Takigawa M, Harada A, Mori K. J Cell Biol., 216(6):1761-1774 (2017)
 - 54 入山 俊介, 海塩 健一, 常長 誠, 安達 栄治郎, 天野 , 日本化粧品技術者会誌 48 卷 1 号 p. 35-40 (2014)
 - 55 天野 聡, 日本化粧品技術者会誌 35 卷 1 号 p. 1-7 (2001)
 - 56 荒瀬 誠治, 内田 尚之, 順天堂医学, 37 卷 4 号 p. 542-549 (1992)
 - 57 笹原 祐介 喜多野 征夫 家本 敦子 吉川 良恵 中野 芳朗 森永 伴法 竹内 勝之 川真 田 伸 村上 能庸 玉置(橋本) 知子, 兵庫医科大学医学会雑誌, vol.32, no.1, pp.95-104 (2007)
 - 58 井家益和, 畠賢一郎, Organ Biology 22, (1) 57-65 (2015)
 - 59 Sasaya H, Utsumi T, Shimoke K, Nakayama H, Matsumura Y, Fukunaga K, Ikeuchi T., J Biochem. 144(2):251-7 (2008)

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました関西大学化学生命工学部 生命・生物工学科 長岡康夫教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました関西大学化学生命工学部生命・生物工学科 住吉孝明准教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、細胞培養の基礎をはじめ多大なる示唆、ご助言をいただきました岐阜大学工学部 化学・生命工学科 竹森洋教授に心から感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、小胞体ストレスに関する多大なる示唆、ご助言をいただきました関西大学化学生命工学部 生命・生物工学科 下家浩二教授に心から感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、細胞培養や機器測定による評価にご協力いただいた関西大学化学生命工学部 生命・生物工学科 医薬品工学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

本研究テーマに巡り会う機会をいただき、筆者が社会人博士課程に挑戦することを快諾し、協力してくださった中野製薬株式会社 マーケティング本部の皆様にも御礼申し上げます。

最後に、筆者のわがまを許し、日々支えてくれた妻に深く感謝いたします。

2019年11月