

【課題番号：SHP2503】

## リベシン B の光老化に対する軽減効果の検証と分子機構の解明

七島直樹\*

青森県立保健大学 健康科学部 栄養学科

Key Words ①線維芽細胞 ②皮膚 ③光老化 ④細胞外マトリックス ⑤リベシン B

### I. はじめに

皮膚は弾力やハリを形成するのに役立っているコラーゲン、エラスチンなどのタンパク質の他に、水分を保持するヒアルロン酸などの細胞外マトリックスが豊富な組織である。真皮に存在する線維芽細胞はこれらの細胞外マトリックスを産生しているため、皮膚の美容や抗老化に重要な細胞である。皮膚の老化には、自然老化と光老化の2種類がある。光老化は、紫外線にさらされることで生じ、自然老化の進行を加速する。皮膚老化の8割は光老化が原因であることから、抗老化のためには皮膚を紫外線から守ることが重要である。紫外線は波長の長い順にUV-A、UV-B、UV-Cに分類され、UV-Aは真皮まで届き、体内のさまざまな分子に吸収され、その結果生じる活性酸素を介して線維芽細胞などの膜脂質やタンパク質、DNAなどに酸化損傷を与える。そのため、活性酸素を消去する抗酸化力を有する成分の摂取は光老化を軽減することが知られている。

リベシンは、カシスの葉から検出された高度な対称性を有するポリフェノールであり、抗酸化力を有することが知られている。また、植物にはエストロゲン活性を有する分子が含まれており、植物性（フィト）エストロゲンと総称される。申請者はこれまでにリベシンのサブタイプであるリベシンBには、フィトエストロゲン活性があることを見出している。このように、リベシンBは抗酸化力とフィトエストロゲン活性の両方を併せ持つ機能性分子であり、光老化のみならずエストロゲンの影響を受けやすい皮膚の抗老化に貢献できる分子であることが期待される。

### II. 目的

光老化モデル線維芽細胞を用い、リベシンBの光老化に対する軽減効果を検証し、さらに分子機構を明らかにすることを目的とした。

### III. 研究方法

#### 1. 細胞増殖試験

HSF に、リベシン B を 0、1、10、100、1000nM になるように添加した。72 時間後 Cell Counting Kit-8 を添加し、細胞増殖を評価した。

#### 2. UVA による細胞増殖の影響

---

\*連絡先：〒030-8505 青森市浜館間瀬 58-1 E-mail: n\_nanashima@ms.auhw.ac.jp

HSF に、リベシン B を 0、1、5、25nM になるように添加した。24 時間培養後、4J の UVA を照射し、24 時間後 Cell Counting Kit-8 を添加し、細胞増殖を評価した。

3. 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) の測定

HSF に、リベシン B を 0、1、5、20  $\mu$ g/ml になるように添加した。24 時間培養後、4J の UVA を照射した。続いて、最終濃度 1 $\mu$ M となるように DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) を添加し、インキュベーター内 (37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 存在下) で 30 分間インキュベートした。HBSS を用いて細胞を 2 回洗浄後に HBSS を 50  $\mu$ L 加え、蛍光プレートリーダーで蛍光検出 (480 nm/530 nm) した。

4. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)法による遺伝子発現の解析

HSF に、リベシン B を 0、1、10、100、1000nM になるように添加した。24 時間培養後、RNA を抽出してから、cDNA を作製した。各種遺伝子のプライマーを用いて RT-qPCR を行った。

#### IV. 結果・考察

1. 細胞増殖試験

HSF に 1nM から 10 $\mu$ M のリベシン B を添加したところ、コントロール (0nM) に比べいずれの濃度においても有意な細胞の増殖が認められた。しかし、リベシン B の添加量を増やしても増殖できる細胞数には限界があり、10 $\mu$ M では減少した。この結果より、リベシン B は HSF の細胞増殖を促す効果を有していることが示唆された。

2. UVA による細胞増殖の影響

UVA 未照射群での細胞増殖率を 100%とした時に比べ照射群では 90%に減少した。しかし、リベシン B を添加した群では未照射群と同程度までに回復した。この結果より、リベシン B は UVA からのダメージから HSF を保護し、細胞減少の抑制に寄与していることが示唆された。

3. ROS の測定

HSF に 4J の UVA を照射すると、ROS の発生が約 60%増加した。しかし、1nM、5nM、25nM リベシン B で 24 時間処理した HSF はそれぞれ約 50%、40%、30%の発生率の増加にとどまった。つまり、リベシン B は ROS の発生率を抑制したことが示唆された。

4. 皮膚美容関連遺伝子の発現解析

リアルタイム PCR の結果、皮膚に最も多く存在するコラーゲンである I 型コラーゲン (*COL1A1*) の発現量は増加傾向だった。ヒアルロン酸合成酵素である *HAS2* は有意な増加傾向が認められた。マトリックスメタロプロテアーゼの一つで、コラーゲンの分解に関わっている *MMP1* は減少傾向だった。リベシン B は HSF において皮膚美容に関する遺伝子をポジティブに変動させていることが示唆された。以上の結果から、リベシン B はヒト皮膚線維芽細胞に対して皮膚美容に重要なコラーゲンやヒアルロン酸の産生を促すことが示唆された。しかし、UVA を照射後のリベシン B の効果についてはまだ十分なデータが得られておらず今後実験を重ねてく必要がある。

## VI. 文献

1) Tatsunori Sasaki, Wei Li, Shinnosuke Zaike, Yoshihisa Asada, Qin Li, Fenghua M, Qingbo Zhang, Kazuo Koike, Antioxidant lignoids from leaves of *Ribes nigrum*., *Phytochemistry*, 95, 333-40, 2013.

## VII. 発表

1. 七島直樹, カシスが有する様々な保健機能, *FFI ジャーナル*, 230, 235-241, 2025.
2. Nanashima N, Norikura T, Nakano M, Hata C, Horie K. Silencing of *ERR $\alpha$*  gene represses cell proliferation and induces apoptosis in human skin fibroblasts. *Mol Med Rep*, 31, 6, 2025.
3. Nanashima N, Maeda H, Nakajima A, Nishizuka M, Narumi T, Ichita J, Itoku K. Apple Pomace Extract Induces Cell Proliferation and Increases Type I Collagen and Hyaluronan Production in Human Skin Fibroblasts In Vitro. *Plant Foods Hum Nutr*, 79, 693-699, 2024.
4. Nanashima N, Horie K, Oey I. Blackcurrant extract promotes differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts. *Biomed Rep*, 21, 121, 2024.
5. Nanashima N, Horie K, Maeda H, Kato Y. Detecting Phytoestrogens and Mammalian Estrogens in Blackcurrants (*Ribes nigrum*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 34, 1196-1199, 2024.