

ヒト皮膚線維芽細胞および軟骨細胞におけるリンゴ搾汁残渣の機能性解析 ～細胞外マトリックス成分の産生に着目して～

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軟骨細胞 ④細胞外マトリックス ⑤リンゴ搾汁残渣

I. はじめに

リンゴ搾汁残渣は、リンゴ果汁の製造工場において、搾汁工程の際に大量に排出される。リンゴ搾汁残渣には、全果リンゴに含まれる有用成分が残存しているにもかかわらず、腐敗が早く保存が難しいことから、大気汚染や環境公害などの問題につながっており、経費をかけて廃棄物として処理されている。また、リンゴ搾汁残渣からエタノール抽出した抽出物（APE）にはグリコシルセラミドやウルソール酸などの有用成分が残存していることが明らかになっている¹⁾。

細胞外マトリックスは、細胞外の空間を充填する物質の総称であり、物理的な支持体の役割（皮膚、軟骨や骨）、細胞-基質接着における足場の役割を担っている。皮膚や軟骨は細胞外マトリックスが豊富な組織であり、皮膚線維芽細胞は主にI型コラーゲンやヒアルロン酸を産生し、軟骨細胞は主にII型コラーゲンや様々なプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス成分を産生している。皮膚線維芽細胞における細胞外マトリックス成分の産生は皮膚の美容や抗老化に関連しており、加齢によって線維芽細胞の増殖が減少し、細胞外マトリックス成分の産生が減少することが知られている。また、加齢および変形性膝関節症では軟骨細胞から産生される細胞外マトリックスの分解が亢進され、膝の痛みにつながる事が知られている。

II. 目的

本研究では、ヒト皮膚線維芽細胞と軟骨細胞における APE の保健機能を解明するために①ヒト皮膚線維芽細胞 (HSF)における I 型コラーゲンとヒアルロン酸の産生の評価、②ヒト軟骨細胞 (OUMS-27)における II 型コラーゲンとプロテオグリカンの産生を評価することを目的とした。

III. 研究方法

1. 細胞増殖試験

HSF および OUMS-27 へ、APE を 0、1、5、20 μ g/ml になるように添加した。72 時間培養後、Cell Counting Kit-8 を添加し、細胞増殖を評価した。

2. 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) による I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、ヒアルロン酸およびプロテオグリカンの産生量の定量

HSF および OUMS-27 へ、APE を添加し、72 時間培養した。培養後、上清を回収し HSF では II 型コラーゲンとヒアルロン酸の産生量を、OUMS-27 では II 型コラーゲンを ELISA 法で定量した。プロテオグリカンはアルシアンブルーで OUMS-27 を染色後、6M グアニジン塩酸塩で溶出後に分光光度計で測定した。

3. 次世代シーケンサーによる RNA-シーケンス (RNA-seq) 解析

HSF へ、APE を添加し、24 時間培養後、RNA を抽出してから、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析で皮膚美容関連遺伝子の発現を網羅的に解析した。

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

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

HSF および OUMS-27 へ、APE を添加し、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. 結果および考察

APE を HSF へ添加すると 10 および 20 μ g/ml の濃度において HSF の細胞数は増加した。一方で、OUMS-27 の増殖は認められなかった。HSF が増殖したメカニズムは解明されなかったが、OUMS-27 とともに、少なくとも 0-20 μ g/ml の APE には細胞毒性はないことが示唆された。

HSF が培地中に産生された I 型コラーゲンは 5 μ g/ml と 20 μ g/ml の APE の添加によって増加した。ヒアルロン酸は、APE を加えた全ての濃度において増加した。また、OUMS-27 においても II 型コラーゲンとプロテオグリカンの産生は増加した。

皮膚美容関連遺伝子の発現を網羅的に解析するために RNA-seq 解析を行った結果、I 型コラーゲン遺伝子である、*COL1A1* や *COL1A2*、III 型コラーゲン遺伝子である *COL3A1* が 1.3~1.5 倍に増加していた。また、コラーゲンの分解に関与する酵素群 MMP について、20 μ g/ml の APE を添加した HSF においては、*MMP1* のみ 1.6 倍に増加していたものの、ほとんど変化がないものが大半だった。一方で、ヒアルロン酸合成酵素である *HAS1*、*HAS2*、*HAS3* は増加していた。特に *HAS1* が、APE 5 μ g/ml を添加した HSF で 8.8 倍、20 μ g/ml 添加 HSF で 11.4 倍と顕著に増加していた。そこで、これらの結果を RT-qPCR 法で詳細に確認したところ、APE の添加によって、HSF では *COL1A1*、*HAS1*、*HAS2*、*HAS3* の発現が亢進し、ヒアルロン酸分解酵素である *HYAL1* は低下した。OUMS-27 では *COL2A1*、プロテオグリカン合成酵素遺伝子の *ACAN* の発現は亢進し、*MMP3*、*MMP13*、プロテオグリカン分解酵素遺伝子である *ADAMTS5* の発現は低下した。これらの結果より、HSF や OUMS-27 では APE が皮膚美容関連遺伝子の発現に寄与していることが示唆された。しかしながら、どのようなシグナリングが活性化してこのような変化が起きているかは今後検討する必要がある。

以上より、APE の添加によって HSF および OUMS-27 において細胞外マトリックスの産生は遺伝子の発現の変動に伴って増加していることが示唆された。

VI. 文献

- 1) Watanabe A, Shimada M, Maeda H, Narumi T, Ichita J, Itoku K, Nakajima A. Apple Pomace Extract Improves MK-801-Induced Memory Impairment in Mice. *Nutrients*. 2024;16(2). doi: 10.3390/nu16020194.

VII. 発表

- 1) 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.
- 2) 七島直樹. リンゴ搾汁残渣抽出物は細胞外マトリックスの産生を増加させる -ヒト皮膚線維芽細胞および軟骨細胞をターゲットとして-, 青い森の食材研究会令和6年度セミナー、2024年12月、青森市.