

神戸学院大学大学院薬学研究科学位論文

# Coenzyme Q<sub>10</sub>の培養ヒト線維芽細胞 コラーゲン産生増強作用と健康科学への応用

2022年1月

峯 幸稔

## 目 次

略語一覧.....	1
序論.....	3
本論	
第 1 章 CoQ <sub>10</sub> の培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いたコラーゲン産生増強作用	
第 1 節 緒言.....	5
第 2 節 実験方法.....	7
1-2-1. 細胞培養	
1-2-2. CoQ <sub>10</sub> 量の定量	
1-2-3. タンパク定量	
1-2-4. 細胞増殖率の測定	
1-2-5. リアルタイム PCR 法	
1-2-6. 免疫染色	
1-2-7. 統計学的処理	
第 3 節 実験結果.....	10
1-3-1. 細胞内 CoQ <sub>10</sub> 含量	
1-3-2. 細胞増殖促進効果	
1-3-3. I, IV, VII 型コラーゲン mRNA 発現量	
1-3-4. II, VIII 型 MMP mRNA 発現量	
1-3-5. HSP47、エラスチン mRNA 発現量	
1-3-6. I 型コラーゲンの免疫染色	
第 4 節 考察.....	15
第 2 章 CoQ <sub>10</sub> によるヒト線維芽 SIPS モデル細胞へのアンチエイジング効果	
第 1 節 緒言.....	17
第 2 節 実験方法.....	19
2-2-1. 細胞培養	
2-2-2. 細胞生存率	
2-2-3. 細胞内 ROS 産生量	
2-2-4. 老化細胞の検出	
2-2-5. リアルタイム PCR 法	
2-2-6. 免疫染色	
2-2-7. タンパク定量	

2-2-8. 統計学的処理	
第3節 実験結果.....	21
2-3-1. CoQ <sub>10</sub> による過酸化水素誘導性細胞死の抑制	
2-3-2. SIPS モデル細胞の SA-βgal 陽性染色	
2-3-3. SIPS モデル細胞でのコラーゲンおよび MMP 発現量	
2-3-4. SIPS モデル細胞での SASP 因子発現量	
2-3-5. SIPS モデル細胞での ROS 産生量	
第4節 考察.....	26
第3章 化学的に安定な還元型 CoQ <sub>10</sub> 含有新規ドリンク剤の開発	
第1節 緒言.....	28
第2節 実験方法.....	29
3-2-1. 細胞培養	
3-2-2. 酸化型および還元型 CoQ <sub>10</sub> 量の測定	
3-2-3. 統計学的処理	
第3節 実験結果.....	30
3-3-1. 還元型 CoQ <sub>10</sub> の安定性	
3-3-2. ビタミン C を用いた還元型 CoQ <sub>10</sub> の作製	
3-3-3. アスコルビン酸 Na を用いた還元型 CoQ <sub>10</sub> の作製	
3-3-4. ビタミン C を用いた異なる温度条件下での還元型 CoQ <sub>10</sub> の作製	
3-3-5. 各 PBS 構成成分中での還元型 CoQ <sub>10</sub> への変換速度	
3-3-6. 線維芽細胞内 CoQ <sub>10</sub> 含量	
3-3-7. Hep G2 細胞内 CoQ <sub>10</sub> 含量	
第4節 考察.....	38
総括.....	40
謝辞.....	41
引用文献.....	42
主論文.....	52
副論文.....	53

## 略語一覽

ATP	: adenosine-5'-triphosphate
BSA	: bovine serum albumin
CBB	: coomassie brilliant blue
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	: 5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
CoA	: coenzyme A
CoQ	: coenzyme Q
Ct	: threshold cycle
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR	: DNA damage response
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
ECD	: electrochemical detector
ECM	: extracellular matrix
FBS	: fetal bovine serum
HMG-CoA	: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: hydrogen peroxide
HPLC	: high performance liquid chromatography
HSP47	: heat shock protein 47
IL	: interleukin
MMP	: matrix metalloproteinase
NADH	: nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NGS	: normal goat serum
NMR	: nuclear magnetic resonance

NO	: nitric oxide
PBS	: phosphate buffered saline
PFA	: paraformaldehyde
QOL	: quality of life
RNA	: ribonucleic acid
RNase	: ribonuclease
ROS	: reactive oxygen species
SA- $\beta$ gal	: senescence-associated- $\beta$ galactosidase
SASP	: senescence-associated secretory phenotype
SD	: standard deviation
SE	: standard error
SIPS	: stress-induced premature senescence
UV	: ultraviolet

## 序論

Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) はユビキノンとも呼ばれる脂溶性のビタミン様物質であり、ヒトをはじめとする動植物で生合成される。Coenzymeとは酵素（エンザイム）を助ける成分のことであり、ユビキノンとは身体のすべての組織に存在する意味でラテン語の「ユビキタス（いたるところに存在する）」に由来している。また、CoQは2,3-Dimethoxy-5-methyl-6-polyprenyl-1,4-benzoquinone 構造をもつ化合物群の総称であり、この構造式は1958年にNMRを用いた解析により決定された<sup>1)</sup>。CoQは微生物・酵母から高等な動植物に至るまで自然界に幅広く存在するが、その構造中の6位のイソプレノイド側鎖の単位数（n）が生物間で異なり、これまでにCoQ<sub>1</sub>（n=1）からCoQ<sub>13</sub>（n=13）の同族体が見出されている。ヒトやウシではCoQ同族体としてCoQ<sub>10</sub>のみを持つが、ラットやマウスのように主同族体がCoQ<sub>9</sub>であり、他にもその数～十数%ほどの他同族体を持つ種もある<sup>2)</sup>。

ヒト生体中のCoQ<sub>10</sub>はミトコンドリア電子伝達系で、複合体I（NADH-CoQオキシドレダクターゼ）および複合体II（コハク酸-CoQレダクターゼ）からシトクロム系の複合体III（シトクロムcオキシドレダクターゼ、bc<sub>1</sub>複合体）への電子伝達に関与しており、シトクロムcとともに複合体間をつなぐ可動性の電子伝達因子とみなされている<sup>3)</sup>。電子伝達系でのATP生成過程では、ミトコンドリア内膜で還元基質からH<sup>+</sup>とe<sup>-</sup>が伝達されるとき、H<sup>+</sup>が内膜の外側にくみ出されることで内膜の内側と外側にプロトン濃度勾配が生じる。このプロトンの濃度勾配がATPaseを駆動するが、この際、CoQ<sub>10</sub>は単なる電子の伝達担体にとどまらずプロトンモータリクQサイクルを形成して積極的にプロトンをくみ出していることが提唱されている（Proton-motive Q cycle仮説）<sup>4)</sup>。一方、CoQは他の電子伝達体と比べて5～10倍量存在している。このことは、CoQが複合体IおよびIIとシトクロム系（複合体III→シトクロムc→複合体IV）をつなぐ電子プールとしての機能を担っているためであると考えられている<sup>5)</sup>。以上のことから、CoQはミトコンドリア電子伝達系の必須成分であり、エネルギー産生系で重要な役割を担っていることは周知の事実とされている。

CoQ<sub>10</sub>は生体中では酸化型と還元型の両者の形で存在している。さらに、血清や肝臓中ではとくにCoQ<sub>10</sub>の還元比率（還元型CoQ<sub>10</sub>/総（酸化型+還元型）CoQ<sub>10</sub>）が高いことが知られており<sup>6)</sup>、Mellorsらはその還元型CoQ<sub>10</sub>（CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>）が酸化型より強い抗酸化作用を発揮することを報告している<sup>7)</sup>。また、Takayanagiらはミトコンドリア電子伝達系でのCoQの酸化還元状態と抗酸化作用との関連性を明らかにし<sup>8)</sup>、Kaganらは細胞膜中の大部分のCoQはCoQH<sub>2</sub>として存在しており、内因性抗酸化剤として働くことなどを指摘している<sup>9)</sup>。そのうえ、生体内でCoQからCoQH<sub>2</sub>へと変換する酵素についての研究も盛んに行われており、NADPH依存性CoQ還元酵素<sup>10, 11)</sup>、リポアミド脱水素酵素<sup>12, 13)</sup>、チオレドキシン還元酵素<sup>14)</sup>、キノンオキシドレダクターゼ<sup>15, 16)</sup>などの酵素がこれまでに見出されている。しかしながら、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>はその抗酸化力の強さから、空気中では化学的に極めて不安定であり容易に酸化されてしまう。

生体内のCoQ<sub>10</sub>は食事由来の外因性と生合成由来の内因性CoQ<sub>10</sub>の両者によって賄われているとされている。このことは、完全静脈栄養施行患者での血清CoQ<sub>10</sub>値の挙動からも推察されている<sup>17)</sup>。内因性のCoQ<sub>10</sub>は2分子のacetyl CoAから3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)、メバロン酸を経由して合成されたイソプレノイド鎖と、フェニルアラニンやチロシンから合成されたキノン骨格がミトコンドリア内膜で縮合することにより生合成される<sup>18-20)</sup>。現在では、ミトコンドリアのみならず、CoQはミクロソーム（小胞体）やゴルジ体でも生合成されることが明らかにされている<sup>21-24)</sup>。なお、CoQの生合成過程は、コレステロール（ステロール）の生合成経路上のファルネシルピロリン酸まで共通であるため、スタチン系薬剤の服用時にはコレステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素が阻害されてしまう。したがって、コレステロール値の減少とともに生体内CoQ<sub>10</sub>量も低下してしまい、酸化ストレスに対する抵抗性が減衰してしまう<sup>25, 26)</sup>。わが国の様な超高齢社会では、生活習慣病の代表的な1つである脂質異常症患者も多く、生体内CoQ<sub>10</sub>量に影響を及ぼす可能性が容易に想像される。さらに、ヒトのCoQ<sub>10</sub>含量は加齢とともに減少することが知られている<sup>27)</sup>。そのため、CoQ<sub>10</sub>は老化や加齢性疾患との関りが強く示唆されており、その有効性が期待されているところである。

本研究では、老化関連疾患の予防や健康寿命延伸を目的として、CoQ<sub>10</sub>の皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響と、皮膚老化に対するCoQ<sub>10</sub>のアンチエイジング作用についての検討を行った。さらに、還元型CoQ<sub>10</sub>のドリンク剤への応用のための基礎的検討も行った。

## 本論

### 第1章 CoQ<sub>10</sub>の培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いたコラーゲン産生増強作用

#### 第1節 緒言

皮膚は表皮、真皮、皮下組織から成り立つ人体最大の組織であり、約 2m<sup>2</sup>の面積を有し、肝臓よりも重い組織である。表皮は皮膚の最も外側の層であり、角質層、淡明層、顆粒層、有棘層そして基底層から構成されており、常に身体の内側を真菌やウイルスの侵入から保護している。さらに、表皮では活発な細胞分裂と分化のために、ミトコンドリア電子伝達系を用いて常に ATP を合成している。一方、表皮と皮下組織の間にある真皮は、結合組織の役割を果たし、血管やリンパ管、毛のうなどの付属器が存在する。この真皮に存在する線維芽細胞はコラーゲン、エラスチン、フィブロネクチンの様な細胞外マトリックス (extracellular matrix : ECM) を産生することで皮膚の生理機能を維持している。中でも、ECM の代表的な分子であるコラーゲンやエラスチンは、結合組織の中で主な働きをする線維状タンパク質である。コラーゲン分子は 3 つの  $\alpha$  鎖からトリプルヘリックスを形成するため、固い骨格を生成し、様々なタイプや役割を持っている。例えば、I 型コラーゲンは横紋の線維を形成し、約 67 nm の軸周期をもつ皮膚に弾力を与える主な分子である<sup>28)</sup>。その他にも、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンや、基底膜と真皮を結合するアンカーフィブリルとしての役割を果たす VII 型コラーゲンなどがある。また、エラスチン線維は柔軟性に富むため、構造タンパク質に二次元性の伸展を与えている。このエラスチン線維はトロポエラスチンを基本とし、800 のアミノ酸残基を含んでいる構造を持っている。なお、コラーゲンは分子内にグリシンとアラニンを豊富に含んでいる。

matrix metalloproteinase (MMP) は ECM の異化酵素またはケモカインであり、炎症性酵素のグループに含まれている。特に、MMP はコラーゲンの分解酵素であることが知られており、MMP は加齢とともに発現量が上昇するため、高齢者でのコラーゲン分解の原因となることが示唆されている<sup>29,30)</sup>。

ミトコンドリア内膜の脂質二重膜に包埋されている CoQ<sub>10</sub> は、電子伝達系での ATP 産生作用と脂溶性抗酸化剤としてフリーラジカルの除去に寄与している<sup>31-34)</sup>。このような二つの重要な生理作用から、2001 年に厚生労働省は、「薬理学的有効性および適用に関して主張されていない限り CoQ<sub>10</sub> を食品添加物として使用すること」を認めており、CoQ<sub>10</sub> は老化による生活習慣病の予防に利用され始めた。そのため、現在でもわが国では CoQ<sub>10</sub> が数多くのサプリメントや健康食品、化粧品などに使用されている。なかでも、健康食品やスキンケア商品の販売が増加した原因の 1 つとしては、Hoppe らが 0.3% CoQ<sub>10</sub> 配合クリームを目じりに塗布したところ、しわの深さが改善したと報告したことによるものが大きい<sup>35)</sup>。その後、異なる研究者たちが CoQ<sub>10</sub> による皮膚への影響を報告している<sup>36-38)</sup>。しかしながら、最近では、体内への吸収性の高い水溶性 CoQ<sub>10</sub> を含有した製剤の使用やスキンケア商品等が販売



されるようになってきており、水溶化 CoQ<sub>10</sub> の皮膚への効果に関する検証はいまだ少ない。そのため、この章では水溶化 CoQ<sub>10</sub> の皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響について調査した。

## 第2節 実験方法

### 1-2-1. 細胞培養

新生児培養ヒト皮膚線維芽細胞（Lonza 社）は、2% Fetal Bovine Serum（FBS、GIBCO）、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM、ナカライテスク（株））中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 含有空気下（SCA-165DS, アステック社）培養した。PureSorb-Q™40（P40）である水溶化 CoQ<sub>10</sub> 粉末は CoQ<sub>10</sub> を 40% 含有（60%はプラセボ）しており、日清ファルマ株式会社より恵与された。また、この水溶化 CoQ<sub>10</sub> は線維芽細胞に 1 週間添加することでそれぞれの実験に供した。

### 1-2-2. CoQ<sub>10</sub> 量の定量

線維芽細胞中の CoQ<sub>10</sub> 含量は HPLC-ECD 法を用いて測定した<sup>39)</sup>。線維芽細胞は 0.25% トリプシン溶液（ナカライテスク（株））1.5 ml を用いて遊離させ、740 ×g、10 分間遠心した後、上澄みを除去し、Phosphate Buffered Saline（PBS）1 ml 中に回収した。この細胞懸濁液 0.5 ml を褐色スピッツ管に移し、99.5%エタノール 2 ml を加えて攪拌し、更に *n*-ヘキサン 5 ml を加え、よく攪拌した後、10 分間機械振とうした。その後、740 ×g、10 分間遠心分離し、上清の *n*-ヘキサン層をできる限り回収し、別の褐色スピッツ管に移した。上記の操作をもう一度行い、回収した *n*-ヘキサン層をエバポレーター（CVE-3100: 東京理化工機）で減圧乾燥後、直ちに 99.5%エタノール 100 µl を加えてよく攪拌した。この溶液に 0.25% 水素化ホウ素ナトリウム水溶液を加えて室温で 10 分間放置することで、酸化型 CoQ<sub>10</sub> をすべて還元型へと変換し、このうち 10 µl を下記の条件で HPLC に注入した。本法では HPLC による CoQ<sub>10</sub> の定量をピーク高さ法にて行い、CoQ<sub>10</sub> 含量は µmol/mg protein で示した。

#### 【HPLC 条件】

ポンプ	JASCO PU-980（日本分光）
電気化学検出器	NANOSPACE SI-2（資生堂）
カラム	Finepak SIL C18-5（日本分光）
移動相	99.5%エタノール：アセトニトリル：メタノール：70%過塩素酸 = 400：300：300：1（過塩素酸ナトリウム 7.023 g/L 含有）
電圧	+0.6 V
流速	1 ml/min
記録機	Chromatocorder 21（SIC システムインスツルメンツ株式会社）

### 1-2-3. タンパク定量

線維芽細胞のタンパク定量は Protein Quantification Kit-Rapid（同仁化学研究所）を用いた Bradford 法により行った<sup>40)</sup>。細胞はトリプシンを用いて、PBS 中に回収した。この細胞懸濁液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、4°C、10,000 ×g、5 分間遠心分離して上清を除去した。次に、NP40 lysis buffer（50 mM Tris-HCl（pH 8.0）、1 mM EDTA、0.1% NP40、250 mM NaCl、10% glycerol）を加え、細胞を溶解して得られた溶液 3 µl に Coomassie Brilliant Blue（CBB、同仁化学研究所）溶液 147 µl を加え、室温で 1 分間インキュベートした。その後、マイクロプレート分光光度計（PowerWave XS、BioTek）で 595 nm の吸光度を測定した。なお、細胞中のタンパク量は、Bovine Serum Albumin（BSA）（ナカライテスク（株））溶液を標準とした検量線をもとに算出した。

### 1-2-4. 細胞増殖率の測定

細胞増殖率は Cell Counting Kit WST-8（同仁化学研究所）を用いた MTT アッセイ法で測定した<sup>41)</sup>。24 well plate（Falcon）中で培養した細胞に WST-8 試薬を 40 µl ずつ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 含有空気下 2 時間インキュベートした。その後、1% SDS を 40 µl ずつ添加して発色反応を停止させた後、マイクロプレート分光光度計（PowerWave XS、BioTek）で 405 nm の吸光度を測定した。なお、細胞増殖率は未処理の細胞の 100%として示した。

### 1-2-5. リアルタイム PCR 法

線維芽細胞からの total RNA の調整は RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いて室温で行った。その際、プライマーは SIGMA-ALDRICH custom oligonucleotide synthesis service を使用して作成し、mRNA 発現量は TaqMan 法を用いて定量した。各プライマーの配列は COL1: Forward, 5'-GGGATTCCCTGGACCTAAAG-3' and reverse, 5'-GGAACACCTCGCTCTCCA-3'、COL4: forward, 5'-AGGAGAGAAGGGCGCTGT-3' and reverse, 5'-TCCAGGTAAGCGTCAACA-3'、COL7: Forward: 5'-GCTGGTGCTGCCTTTCTCT -3' and reverse, 5'- TCCA GGCCGAACCTCTGTC -3'、MMP2: forward, 5'-CCCCAAAACGGACAAAGAG-3' and reverse, 5'-TGTCCTTCAGCACAAACAGG-3'、MMP8: forward, 5'-TGACAGAGACCTCATTTTCCTATTTA-3' and reverse, 5'-CTGCGTCAATTGCTTGGA-3'、HSP47: forward, 5'-TCCCTCTGAGGCAGTTTCC-3' and reverse, 5'-GCTGCAGGTTTCTTCACCTC-3'であった。リアルタイム PCR による測定時、蒸留水 8.4 µl、Universal Probe（Roche）0.2 µl、10 µM sense primer 0.2 µl、10 µM antisense primer 0.2 µl、FastStart Universal Probe Master（Roche）10 µl、cDNA 溶液 1 µl をよく混合して Eco Real-Time PCR System（illumina）にセットした。その後、95°C、10 分間にて 1 サイクル行い、続いて 95°C、15 秒、60°C、1 分間からなる PCR 反応を 45 サイクル行った。この際、求められた Ct 値を基準とし、標準化のために 18sRNA を用いて mRNA 発現量を算出した。

#### 1-2-6. 免疫染色

35 mm Culture Dish (FALCON) 中で培養した線維芽細胞に 4% パラホルムアルデヒド (PFA、ナカライテスク (株)) を 1 ml 添加して、20 分間室温にて固定操作を行った。固定後、線維芽細胞を PBS で 3 回洗浄し、1 ml の 0.2% Triton X-100/10% NGS (normal goat serum) /PBS を用いて室温で 20 分間ブロッキングを行った。その後、300 倍に希釈した一次抗体 (Anti Type I Collagen (COSMO BIO)) を 4°C で一晩反応させた。反応後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 488 プローブ (life technologies) を室温、遮光条件下で 1 時間反応させた。最後に PBS で 3 回洗浄し、400 倍に希釈した DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 同仁化学研究所) /PBS により核染色を行い、落射蛍光装置を搭載した倒立型顕微鏡および U-MNIBA3 ミラーユニットを用いて蛍光観察した。

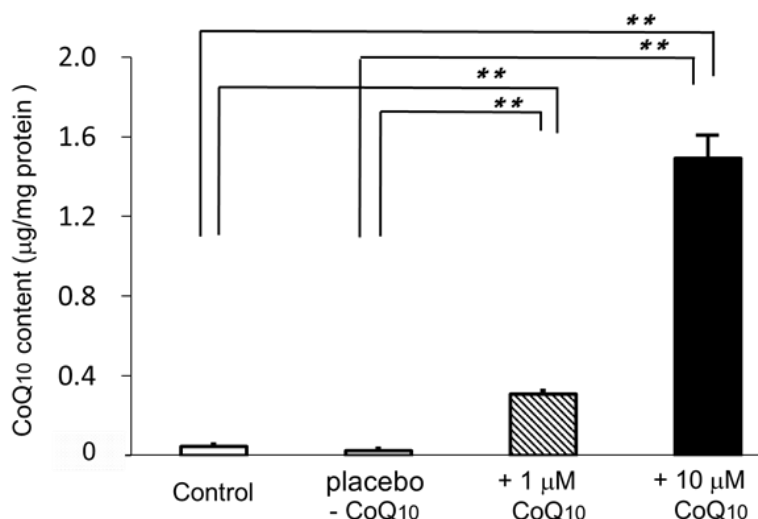
#### 1-2-7. 統計学的処理

統計学的処理は Unpaired student t-test により行い、測定結果は平均値 $\pm$ SD で示した。

### 第3節 実験結果

#### 1-3-1. 細胞内 CoQ<sub>10</sub> 含量

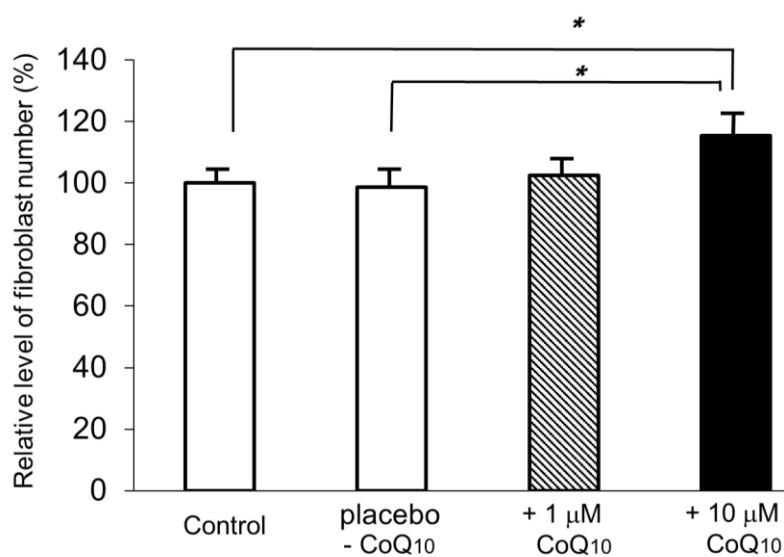
線維芽細胞の細胞内 CoQ<sub>10</sub> 含量は、Control 群：0.046 (μg/mg protein)、プラセボ (-CoQ<sub>10</sub>) 群：0.024 (μg/mg protein)、1 μM CoQ<sub>10</sub> 添加群：0.146 (μg/mg protein)、10 μM CoQ<sub>10</sub> 添加群：1.492 (μg/mg protein) であった (Fig. 1)。したがって、CoQ<sub>10</sub> は濃度依存的に細胞内へ取り込まれたことが確認された。



**Fig. 1** The fibroblasts were cultured in the presence of P40 for a one week, after, intracellular CoQ<sub>10</sub> levels are determined by HPLC-ECD methods. Results are means ± SD. n=4-7, \*\*P<0.01

#### 1-3-2. 細胞増殖促進効果

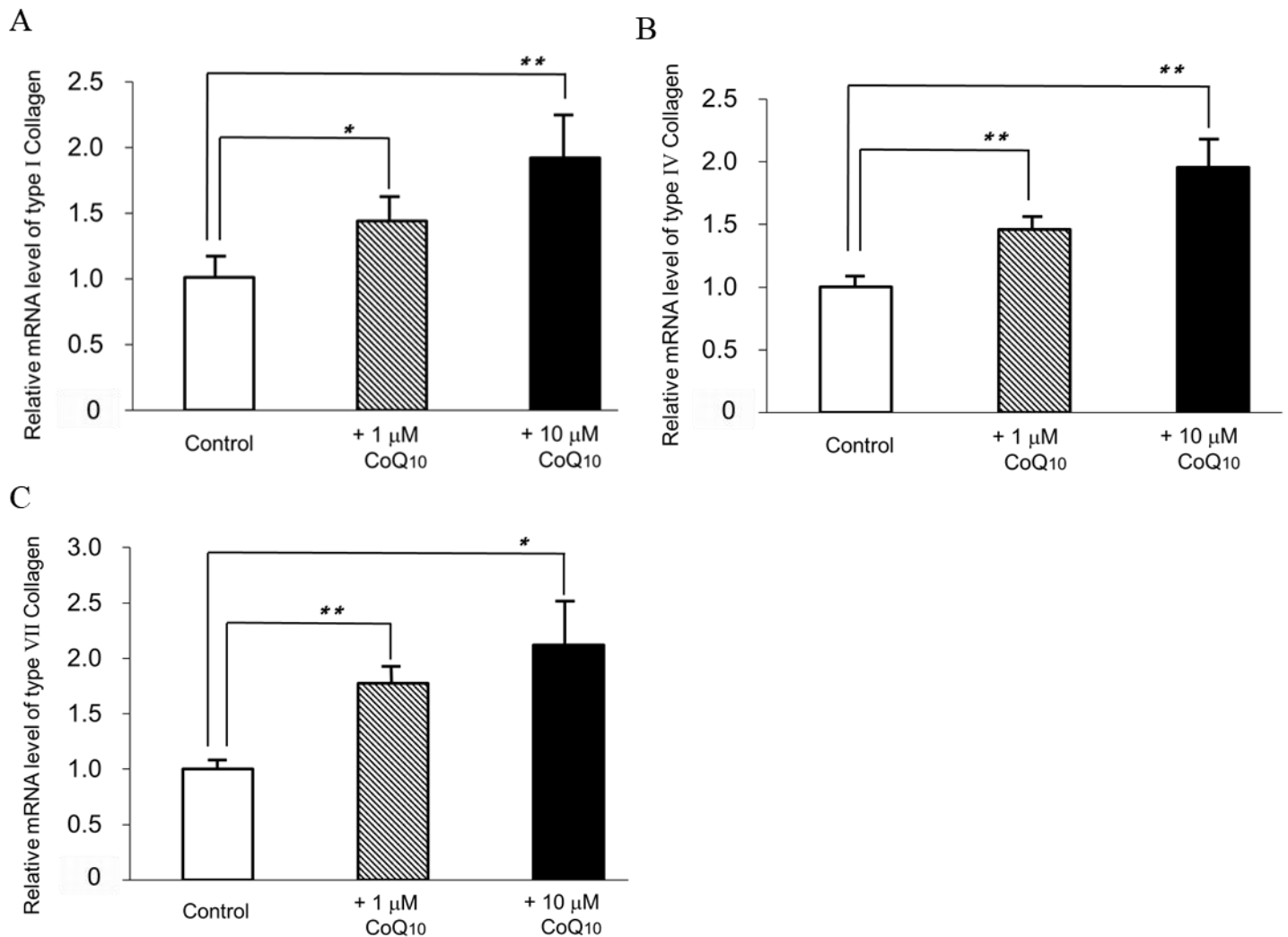
Control群の細胞増殖率を100%とした際、プラセボ (-CoQ<sub>10</sub>) 群：98.9%、1 μM CoQ<sub>10</sub> 添加群：102.5%、10 μM CoQ<sub>10</sub> 添加群：115.4%であった (Fig. 2)。したがって、10 μM CoQ<sub>10</sub> 添加群では細胞増殖率が有意に上昇したことが確認された。



**Fig. 2** Cell proliferation in fibroblasts were examined by MTT assay methods. The fibroblasts were treated with 10  $\mu$ M P40, which increased the number of fibroblasts. Results are means  $\pm$  SD.  $n=6$ , \* $P<0.05$

### 1-3-3. I, IV, VII 型コラーゲン mRNA 発現量

Control 群の mRNA 発現量との相対比率はそれぞれ、I 型コラーゲン ; 1  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> : 1.44、10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群 : 1.92、IV 型コラーゲン ; 1  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> : 1.46、10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群 : 1.95、VII 型コラーゲン ; 1  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> : 1.77、10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群 : 2.12 であり (Fig. 3 A, B, C) 、1, 10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群では、I, IV, VII 型コラーゲンの mRNA 量が有意に増加した。



**Fig. 3** Relative mRNA expression of type I, IV and VII collagens were determined by RT-PCR method and the target gene levels were normalized to the housekeeping gene 18sRNA.

(A) The mRNA level of type I collagen was increased by treatment of P40, and it also dose-dependently enhanced in fibroblasts. Results are means  $\pm$  SD. n=3-7, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

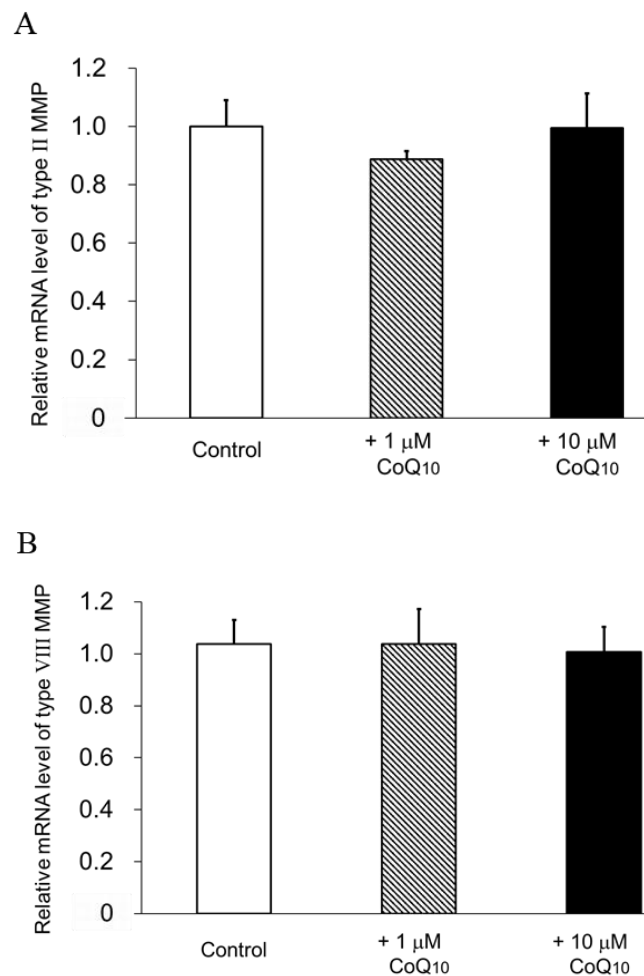
(B) A part of basement membrane is composed of type IV collagen, and it was increased to treatment of P40 in fibroblasts. Results are means  $\pm$  SD. n=4-5, \*\*P<0.01.

(C) Type VII collagen participate to connect basement membrane to dermis in skin. The fibroblasts were treated with more than 1  $\mu$ M P40 increased mRNA levels of type VII collagen.

Results are means  $\pm$  SD. n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

#### 1-3-4. II, VIII 型 MMP mRNA 発現量

Control 群の mRNA 発現量との相対比率はそれぞれ、II 型 MMP ; 1  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> : 0.91、10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群 : 1.02、VIII 型 MMP ; 1  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> : 1.03、10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群 : 1.00 であり (Fig. 4 A, B) 、1, 10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群では、II, VIII 型 MMP の mRNA 量に影響を与えなかった。

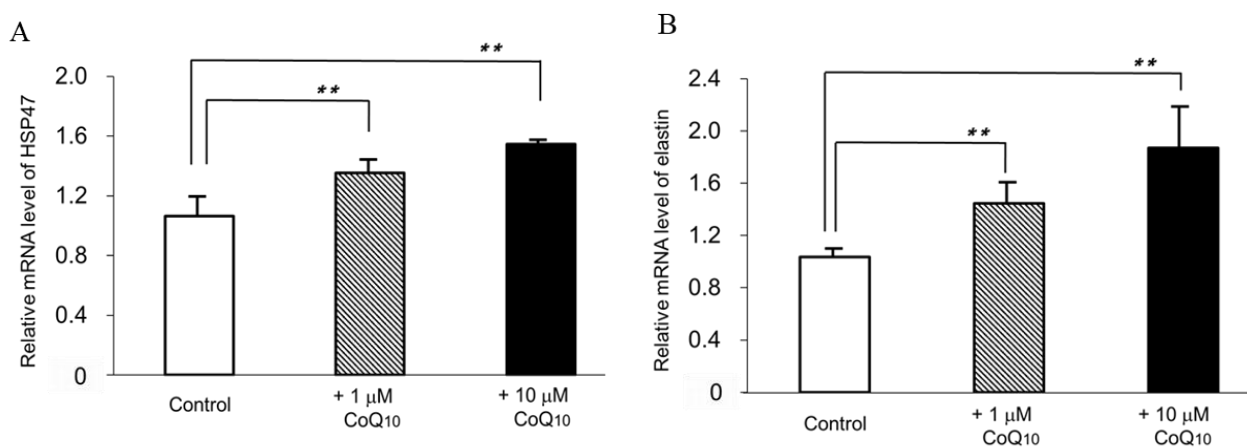


**Fig. 4** Relative mRNA expression of type II and VIII MMP were determined by RT-PCR method and the mRNA levels of MMP were normalized to the housekeeping gene 18sRNA. (A) Type II MMP participate in the degradation of type IV and VII collagen. There was no significant difference in mRNA expression of type II MMP between treated of 1 or 10  $\mu$ M P40 group and control group Results are means  $\pm$  SD. n=3. (B) Type I collagen is disassembled by type VIII MMP in skin. Treatment of P40 in fibroblasts showed that mRNA level of type VIII MMP were no longer significant compared with control group. Results are means  $\pm$  SD. n=6.

#### 1-3-5. HSP47、エラスチン mRNA 発現量

Control 群の mRNA 発現量との相対比率はそれぞれ、HSP47 ; 1  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> : 1.35、10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群 : 1.55、エラスチン ; 1  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> : 1.44、10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群 : 1.87 であり

(Fig. 5 A, B) 、1, 10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群では、HSP47、エラスチンの mRNA 量が有意に増加した。



**Fig. 5** Relative mRNA expression of HSP47 and elastin were determined by RT-PCR method and the target gene levels were normalized to the housekeeping gene 18sRNA.

(A) The mRNA level of HSP47 was increased by treatment of P40, and it also dose-dependently enhanced in fibroblasts. Results are means  $\pm$  SD. n=4-5, \*\*P<0.01.

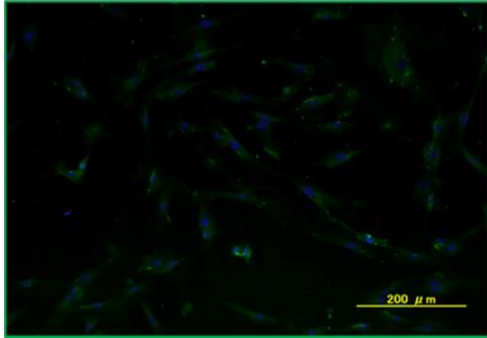
(B) Treatment of P40 in fibroblasts showed to increase mRNA expression of elastin in a dose-dependent manner. Results are means  $\pm$  SD. n=6, \*\*P<0.01.

#### 1-3-6. I型コラーゲンの免疫染色

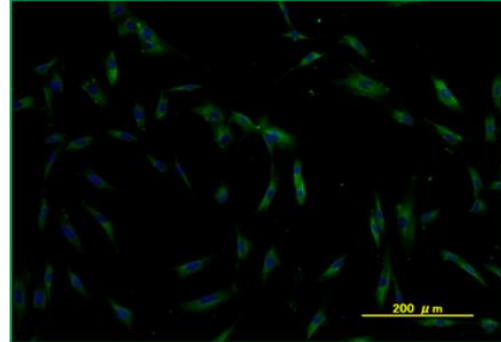
I型コラーゲンのタンパク質量を検討するため、免疫染色を行った。Control 群ではI型コラーゲンを示す緑色蛍光が観察された (Fig. 6 A)。また、1  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群ではその緑色蛍光の増大が観察され (Fig.6 B) 、10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群では緑色蛍光がより増強した (Fig.6 C) 。



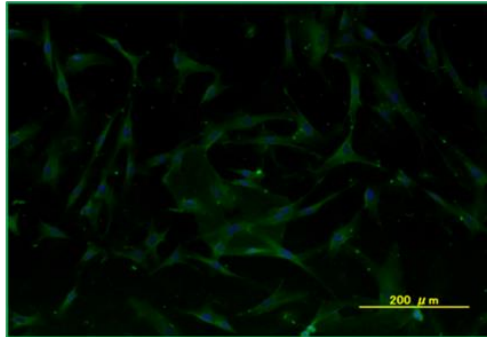
A



B



C



**Fig. 6** Type I collagen protein expression in fibroblasts was determined by immunofluorescence, cell nuclei are stained blue with DAPI, and type I collagen protein is stained green with Alexa Fluor 488 probe. Scale bar shows 200 μm.

#### 第4節 考察

第1章の結果から、CoQ<sub>10</sub>が皮膚老化に対して有効性を発揮する可能性を明らかにした。しかしながら、水溶化 CoQ<sub>10</sub>による皮膚老化に関する知見は少なく、コラーゲンとの関連性についても不明なままであった。そこで、皮膚老化と関わりの深いコラーゲンに着目し、水溶化 CoQ<sub>10</sub>によるコラーゲンの産生作用について検討を行った。

本研究では、水溶化 CoQ<sub>10</sub>を線維芽細胞に添加することで、細胞内 CoQ<sub>10</sub>含量が濃度依存的に増加することが観察された (Fig. 1)。また、10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub>は細胞増殖率を有意に上昇させた (Fig. 2)。そして CoQ<sub>10</sub>はI, IV, VII型コラーゲンの mRNA 産生量を増加させたが (Fig. 3)、II, VIII型 MMP の mRNA 産生量には影響を与えなかった (Fig. 4)。なお、この MMPには多くの種類が存在することが知られているが<sup>42)</sup>、その中でも II型 MMPはIV, VII型コラーゲン<sup>43)</sup>、VIII型 MMPはI型コラーゲンの基質であり<sup>44)</sup>、コラーゲンの分解に寄与している。一方、CoQ<sub>10</sub>は線維芽細胞中のI型コラーゲンのタンパク質量も増加した (Fig. 6)。したがって、今回の結果より CoQ<sub>10</sub>は抗酸化作用等による MMP 産生抑制に依存した相対的なコラーゲン量の増加ではなく、コラーゲンの産生量を増加したことを示唆している。

コラーゲンが生体内で生理的意義を果たすためには、I型コラーゲンのトリプルヘリックスが互いに束ねられてコラーゲン線維を構築することが必要である。その際、コラーゲン特異的分子シャペロンである heat shock protein 47 (HSP47)は、小胞体のなかでプロコラーゲンと結合することで三重らせん構造の形成を補助しコラーゲンの成熟化に寄与している<sup>45-47)</sup>。そして、エラスチンは皮膚の構造や弾力を維持する上で重要な役割を担っており、その成熟化にはフィブリリンからなる線維上に球状のタンパク質のトロポエラスチンが沈着・架橋することで必要とされている。このように HSP47 やエラスチンは皮膚の生理機能を保つうえで必要不可欠な分子であり、CoQ<sub>10</sub>は濃度依存的に HSP47、エラスチンの mRNA 産生量を増加させた (Fig. 5)。なお、HSP47 やエラスチンは加齢により減少することが示唆されているため<sup>48,49)</sup>、今回の結果は、CoQ<sub>10</sub>が皮膚老化に対して有効性を発揮する可能性を示唆している。

これまで、CoQ<sub>10</sub>はIV, VII型コラーゲンの産生増加作用を持つことが報告されていたが、I型コラーゲンへの影響は無いとされていた<sup>36-38)</sup>。だが、I型コラーゲンはコラーゲンの中で最も豊富に存在しており、皮膚の堅牢な構造を維持するためには必須の分子である。そして、I型コラーゲンの減少が加齢とともに出現するしわの形成に主に関与するため、加齢とともに減弱する皮膚機能の維持のためにはI型コラーゲンの維持または増加が重要である。しかしながら、今回の結果では水溶化 CoQ<sub>10</sub>の添加により、I型コラーゲンの産生も増加することが確認された (Fig. 3A, Fig. 6)。この理由の一つとして、水溶化 CoQ<sub>10</sub>を使用したため細胞への吸収性が向上し、細胞内 CoQ<sub>10</sub>含量が増加したために起こったのではないかと考えている。CoQ<sub>10</sub>は高い脂溶性を持つ分子であり、吸収性の悪さから<sup>50,51)</sup>、多様な製剤化 (ミセル化<sup>52)</sup>、水溶化<sup>53,54)</sup>など)が行われている。また、CoQ<sub>10</sub>はヒト組織中に幅広く分布しているが、それぞれの組織間での CoQ<sub>10</sub>量は大きく異なっており、皮膚では心臓や肝臓な

どと比較して特に低い含有量を示す<sup>6,55,56)</sup>。そのため、脂溶性の CoQ<sub>10</sub> を使用した時と比較して水溶性 CoQ<sub>10</sub> を使用した時の方が、皮膚線維芽細胞内 CoQ<sub>10</sub> 含量が多くなり、同様の濃度では見られなかった I 型コラーゲンの産生増加作用があらわれたのではないかと考えている。CoQ<sub>10</sub> は加齢とともに減少することが知られているため<sup>27)</sup>、超高齢社会を迎えているわが国での水溶化 CoQ<sub>10</sub> の使用はとても有意義なものであると考えられる。

今回の結果は、皮膚老化の際に見られる細胞増殖の低下や細胞中のコラーゲン量の減少などを水溶化 CoQ<sub>10</sub> が改善し、CoQ<sub>10</sub> が皮膚老化に対してコラーゲン産生増強作用を介したアンチエイジング作用を示す可能性を示唆した。

## 第2章 CoQ<sub>10</sub>によるヒト線維芽 SIPS モデル細胞へのアンチエイジング効果

### 第1節 緒言

細胞老化は複雑で多因子性の現象であり、それには DNA ダメージによる不可逆的な細胞増殖の停止、テロメアの短縮や摩耗、がん遺伝子の活性化、タンパク質の凝縮、ミトコンドリア機能不全、炎症や酸化ストレス（フリーラジカル仮説<sup>57)</sup>）などの表現型が認められる<sup>58)</sup>。さらに、老化細胞は扁平化や肥大化という特別な形態変化、SA-βgal (senescence-associated-β galactosidase) の陽性染色や ECM の合成の低下を示す<sup>59)</sup>。なかでも、酸化ストレスは老化に密接に関係しており、細胞内でのエネルギー代謝過程で生じる ROS (reactive oxygen species) が過剰に産生されることにより、生体内分子が攻撃される<sup>60)</sup>。その際、ROS の持続的な蓄積により DDR (DNA damage response) が惹起され、細胞老化を誘導し細胞周期を停止させる<sup>61)</sup>。この DDR 経路では SASP (senescence associated secretory phenotype) 因子の活性化が必須とされており、炎症性サイトカインである IL-6 (interleukin-6)、NF-κB、ケモカインや MMP などの発現上昇などが観察されている<sup>62,63)</sup>。これらの理由から、スーパーオキシドアニオン (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、ヒドロキシラジカル (OH<sup>-</sup>) や過酸化水素 (Hydrogen peroxide : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) などの分子は複製老化に似た現象を惹起するため、ストレス誘導性細胞老化 (SIPS : stress-induced premature senescence) と呼ばれる老化モデル細胞の作製に広く用いられている<sup>64-66)</sup>。さらに、紫外線 (UV : ultraviolet) やがん遺伝子である RAS でも SASP 因子の分泌を介して細胞老化を誘導できることが報告されている<sup>67, 68)</sup>。SASP 因子の分泌は SIPS と複製老化の両方で観察される現象である<sup>69)</sup>。SASP 因子の制御は個体老化ならびに細胞老化や加齢性疾患の予防にとって重要な観点であると考えられる。

CoQ<sub>10</sub> はミトコンドリア電子伝達系の必須構成成分であり、エネルギー産生系で重要な役割を果たしている。また、CoQ<sub>10</sub> はフリーラジカルスカベンジャーとして働き、ヒト生体内で酸化ストレスを抑制する。そのうえ、CoQ<sub>10</sub> は炎症性プロセス<sup>70,71)</sup>、アポトーシス<sup>72,73)</sup>や遺伝子発現<sup>74,75)</sup>などにも関与することが知られている。このことから、CoQ<sub>10</sub> は II 型糖尿病治療<sup>76)</sup>、高血圧や心臓血管疾患治療<sup>77)</sup>にも用いられており、現在では、神経変性疾患であるアルツハイマー病<sup>78)</sup>やパーキンソン病<sup>79)</sup>などにも CoQ<sub>10</sub> の有用性が明らかとなっている。上述の様な加齢性疾患に CoQ<sub>10</sub> が有効性を示すことが発見されることになったのは、「生体内の CoQ<sub>10</sub> 含量は 20 歳を境に減少する」という 1989 年の Kalén らの報告に端を発している<sup>27)</sup>。それから、老化モデルマウスである SAMP1 マウスでの老化速度を CoQ<sub>10</sub> が遅延すること<sup>80, 81)</sup>や、多価不飽和脂肪酸豊富食を与えたラットで生じる老化関連性 DNA 二本鎖切断を CoQ<sub>10</sub> が抑制することでラットの寿命を増加させること<sup>82)</sup>など、老化に関連する内容が多く報告されている。皮膚老化に関連する内容では、コラーゲンの分解酵素である MMP が、老化した皮膚で発現や活性が上昇していること<sup>29)</sup>や、ROS に誘導される SASP 因子の一因である MMP が、細胞の老化過程に重要な役割を果たして

いること<sup>83,84)</sup>など、皮膚老化に伴うしわの形成や肌の張りに関与している ECM がその中心として論じられている。現在では、ROS を介して SASP 因子である MMP の発現が上昇し、コラーゲンの分解が促進され、皮膚老化が誘導されているのではないかと考えられている。著者は強い抗酸化作用を有する CoQ<sub>10</sub> を使用することで、MMP や ROS の抑制による皮膚老化へのアンチエイジング作用を発揮できるのではないかと考えた。そのため、この章では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で ROS を誘導することで作製した SIPS モデルの皮膚線維芽細胞を用いて、CoQ<sub>10</sub> のアンチエイジング効果を検討した。

## 第2節 実験方法

### 2-2-1. 細胞培養

第1章(2-1)と同様の実験材料および方法に従った。なお、SIPSモデル細胞を作製するため、測定直前に100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ を2時間添加することで、皮膚線維芽細胞由来のSIPSモデル細胞を作製した。

### 2-2-2. 細胞生存率

細胞生存率はCell Counting Kit WST-8を用いたMTTアッセイ法で測定した<sup>41)</sup>。その実験は第1章(2-4)と同様の方法で行った。また、細胞生存の確認のためにDAPI染色を用いて核の可視化も行った。35 mm dishに播種した線維芽細胞をPBSで二回洗浄し、PBSに希釈したDAPI染色液(400倍希釈)をCO<sub>2</sub>インキュベーターで30分間インキュベートした。その後、形成されたDAPI-DNA複合体の青色蛍光は、蛍光顕微鏡(IX-71, オリンパス)を使用して観察した。

### 2-2-3. 細胞内 ROS 産生量

細胞内 ROS の検出のため、線維芽細胞を2.5  $\mu\text{M}$  CM-H<sub>2</sub>DCFDA (life technologies) 試薬とともに37°C、30分間CO<sub>2</sub>インキュベーターでインキュベートした。その後、産生したCM-H<sub>2</sub>DCFDAの酸化産物である2',7'-dichlorodihydrofluoresceinを蛍光顕微鏡で観察した。

### 2-2-4. 老化細胞の検出

線維芽細胞のSA- $\beta$ gal (senescence-associated- $\beta$  galactosidase) の陽性染色はSenescence Detection Kit (BioVision) を用いて観察した。染色はSenescence Detection Kitのプロトコールの規定通りに行った。

### 2-2-5. リアルタイム PCR 法

第1章(2-5)と同様の実験方法に従った。その際、用いた各プライマーの配列はCOL1 : forward, 5'-GGGATTCCCTGGACCTAAAG-3' and reverse, 5'-GGAACACCTCGCTCTCCA-3'、COL4 : forward, 5'-AGGAGAGAAGGGCGCTGT-3' and reverse, 5'-TCCAGGTAAGCCGTCAACA-3'、MMP2 : forward, 5'-CCCCAAAACGGACAAAGAG-3' and reverse, 5'-TGTCC TTCAGCACAAACAGG-3'、MMP8 : forward, 5'-TGACAGAGACCTCATTTTCCTATTTA-3' and reverse, 5'-CTGCGTCAATTGCTTGGA-3'、GLB1 : forward, 5'-GCTCCTCCGACCCAGATT-3' and reverse, 5'-CTGGCCCTCCATTCTGATAG-3'、IL-6 : forward, 5'-CAGGAGCCCAGCTATGAACT-3' and reverse, 5'-GAAGGCAGCAGGCAACAC-3'、IL-8 : forward, 5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC-3' and reverse, 5'-AGGAAGGCTGCCAAGAGAG-3'、p21 : forward, 5'-CCGAGGCACTCAGAGGAG-3' and reverse, 5'-AGCTGCTCGCTGTCCACT-3'であった。

#### 2-2-6. 免疫染色

第 1 章 (2-6) 同様の実験方法に従った。

#### 2-2-7. タンパク定量

第 1 章 (2-3) 同様の実験方法に従った。

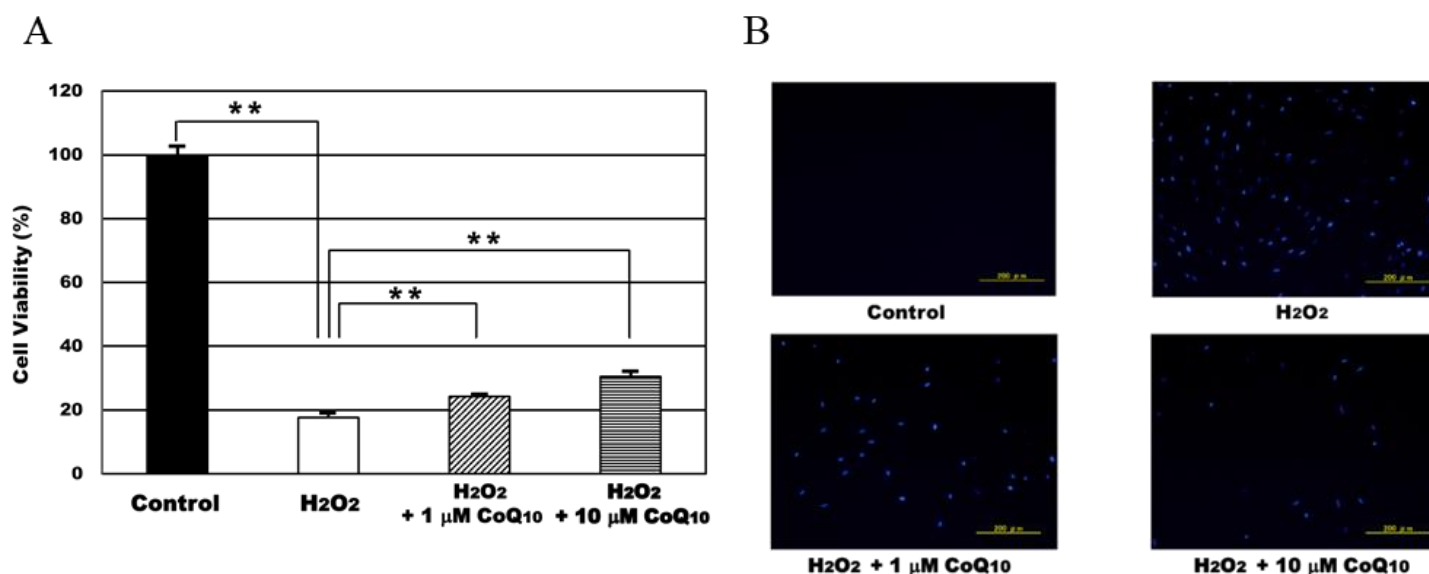
#### 2-2-8. 統計学的処理

第 1 章 (2-7) 同様の実験方法に従った。

### 第3節 実験結果

#### 2-3-1. CoQ<sub>10</sub>による過酸化水素誘導性細胞死の抑制

100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を2時間添加することにより誘導された細胞死は、MTT アッセイ法と DAPI 染色を用いて観察した。MTT アッセイ法で測定した細胞生存率は、100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加により 17.0%まで有意に減少した (Fig. 7 A) が、1  $\mu$ M と 10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub>はその細胞生存率を 24.2%と 30.6%まで有意に回復させた (Fig. 7 A)。また、DAPI による死細胞染色を行った際、SIPS モデル細胞群では、青色蛍光の増加が観察された (Fig. 7 B)。さらに 1  $\mu$ M もしくは 10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub>の添加群では、MTT アッセイ法測定結果と同様の細胞死保護効果が観察された (Fig. 7 B)。

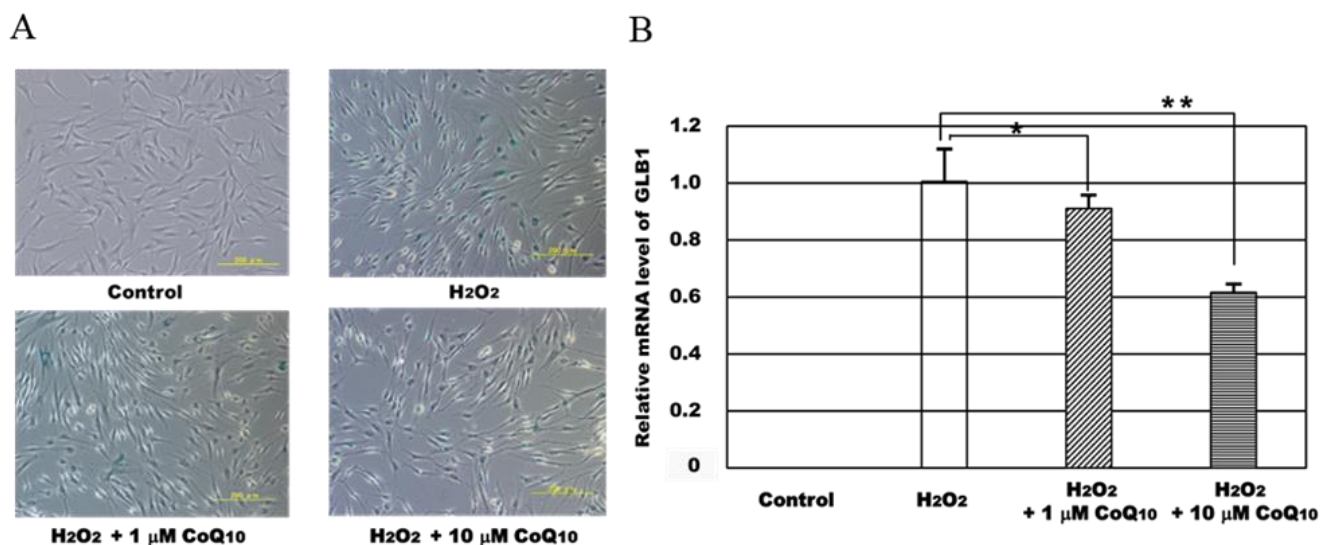


**Fig. 7** Cell viability in fibroblasts were detected with MTT assay and DAPI staining methods. (A) The cell viability was 100% (closed bar), 17.7 % (open bar), 24.2% (hatched bar), 30.6% (horizontal striped bar), respectively. (B) The image of cell death was obtained using DAPI staining in fibroblasts under the fluorescence microscopy. Results are means  $\pm$  SD. n=3-5.

#### 2-3-2. SIPS モデル細胞の SA- $\beta$ gal 陽性染色

GLB1 遺伝子はリソソーム酵素である SA- $\beta$ gal をコードしており、複製老化やストレス誘導性老化などの重要なマーカーとして知られている<sup>85)</sup>。SA- $\beta$ gal の陽性染色は Control 群では観察されず (Fig. 8 A)、GLB1 mRNA 発現も検出されなかった (Fig. 8 B)。しかしながら、SIPS モデル細胞群の SA- $\beta$ gal 陽性染色率と GLB1 mRNA 発現量は有意に増加した (Fig. 8 A, B)。一方、1  $\mu$ M もしくは 10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群では、SA- $\beta$ gal の陽性染色率と GLB1 発現量の減少が観察された (Fig. 8 A, B)。



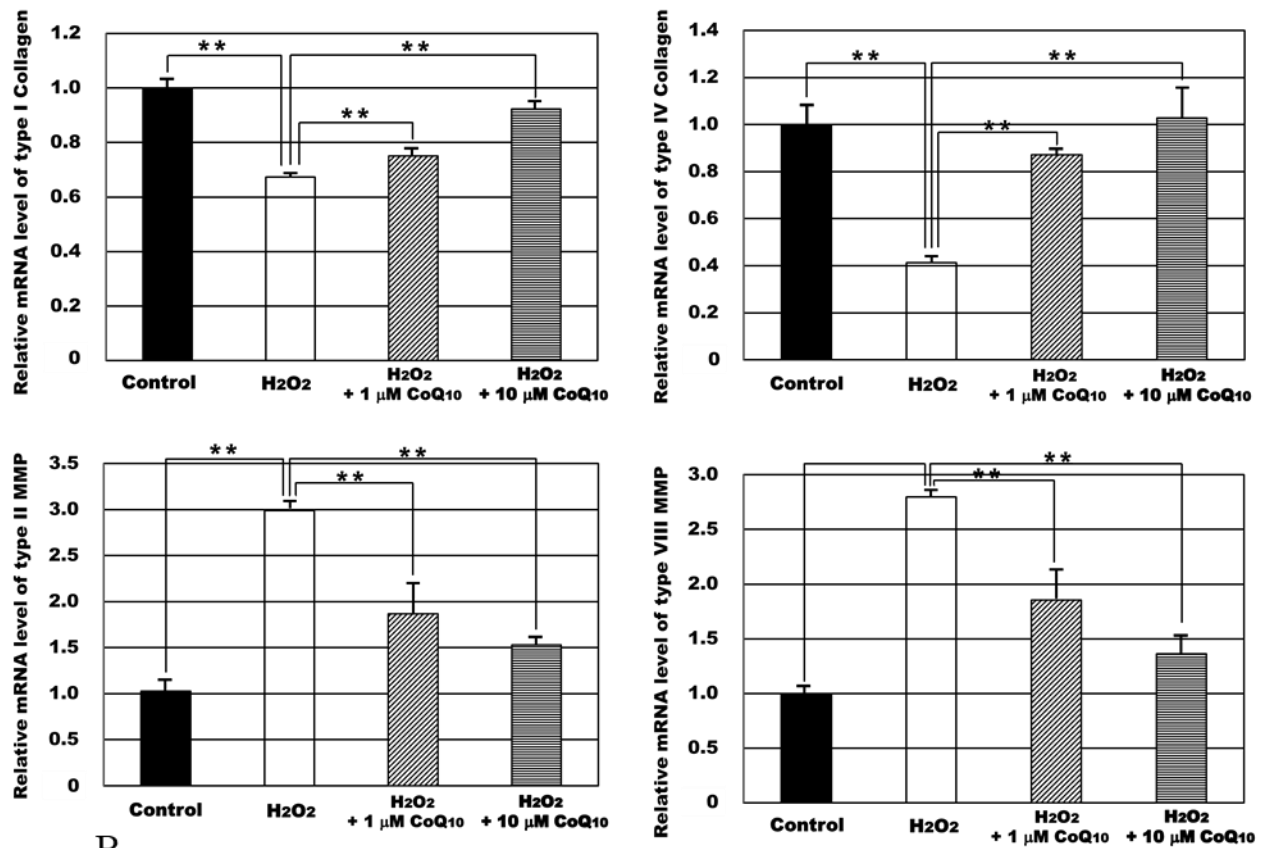


**Fig. 8** We experimented the role of CoQ<sub>10</sub> in the fibroblasts of SIPS model induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. GLB1 genes expression encoding the SA-βgal activity is marker of cell senescence. (A) The mRNA level of GLB1 was increased by treatment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (open bar), and CoQ<sub>10</sub> treatment also dose-dependently decreased in fibroblasts of SIPS model. Results are means ± SD. n=3-7, \*P<0.05, \*\*P<0.01. (B) We performed an immunohistochemical analysis of SA-βgal positive, and CoQ<sub>10</sub> decreased the number of SA-βgal positive cells of fibroblasts of SIPS model.

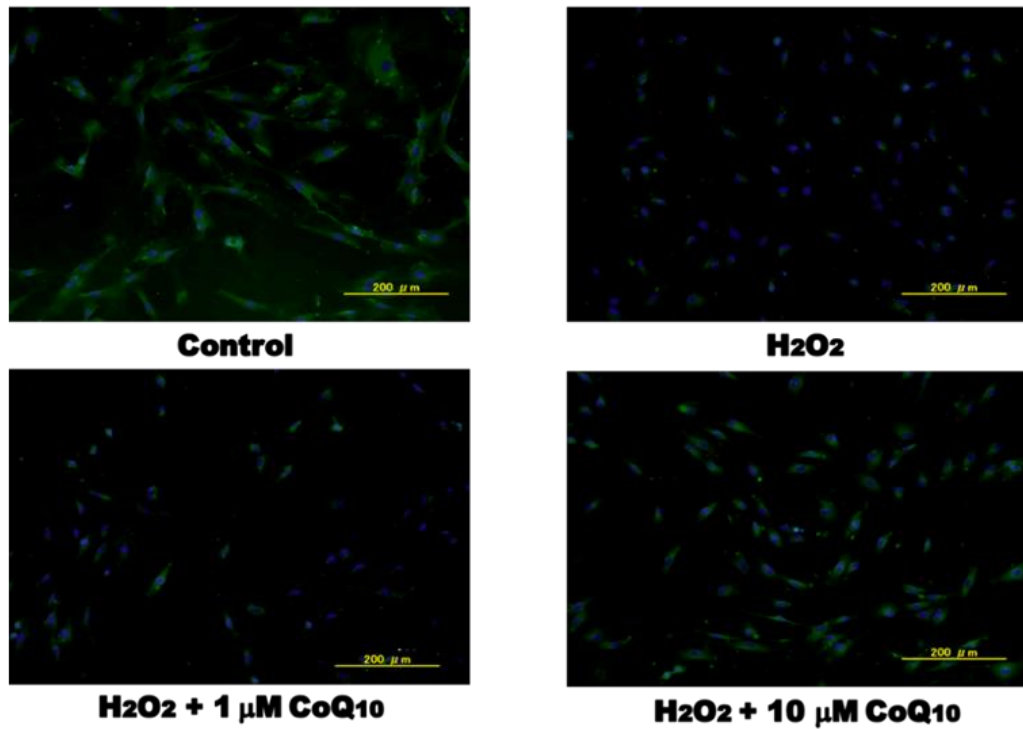
### 2-3-3. SIPS モデル細胞でのコラーゲンおよび MMP 発現量

SIPS モデル細胞では I, IV 型コラーゲンの mRNA 発現量が有意に減少したが、II, VIII 型 MMP の mRNA 発現量は有意に上昇した (Fig. 9 A)。一方、CoQ<sub>10</sub> 添加群では濃度依存的に I, IV 型コラーゲンの mRNA 発現量が増加し、II, VIII 型 MMP の mRNA 発現量は減少した (Fig. 9 A)。さらに、SIPS モデル細胞では I 型コラーゲンのタンパク質量の減少が、免疫染色により観察されたが、1 μM もしくは 10 μM CoQ<sub>10</sub> の添加によりその減少が抑制されることが認められた (Fig. 9 B)。

A



B

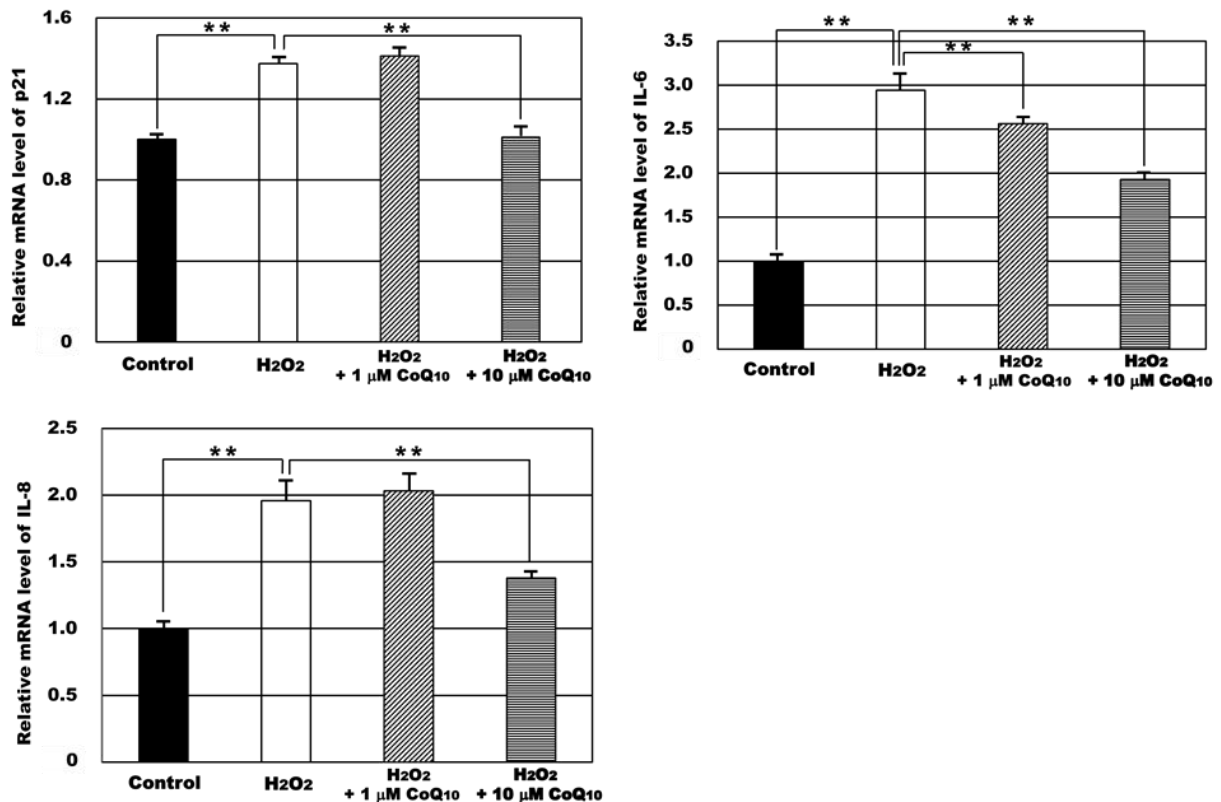


**Fig. 9** Relative mRNA expression of type I, IV collagens and type II, VIII MMP were determined by RT-PCR method and the target gene levels were normalized to the housekeeping gene 18sRNA.

(A) The mRNA level of type I, IV collagen was increased by treatment of CoQ<sub>10</sub>, and it also dose-dependently enhanced in fibroblasts. Conversely, CoQ<sub>10</sub> treatment decreased the mRNA levels of type II, VIII MMP. Results are means  $\pm$  SD. n=3-7, \*P<0.05, \*\*P<0.01. (B) Type I collagen protein expression in fibroblasts of SIPS model was determined by immunofluorescence, cell nuclei are stained blue with DAPI, and type I collagen protein is stained green with Alexa Fluor 488 probe.

#### 2-3-4. SIPS モデル細胞での SASP 因子発現量

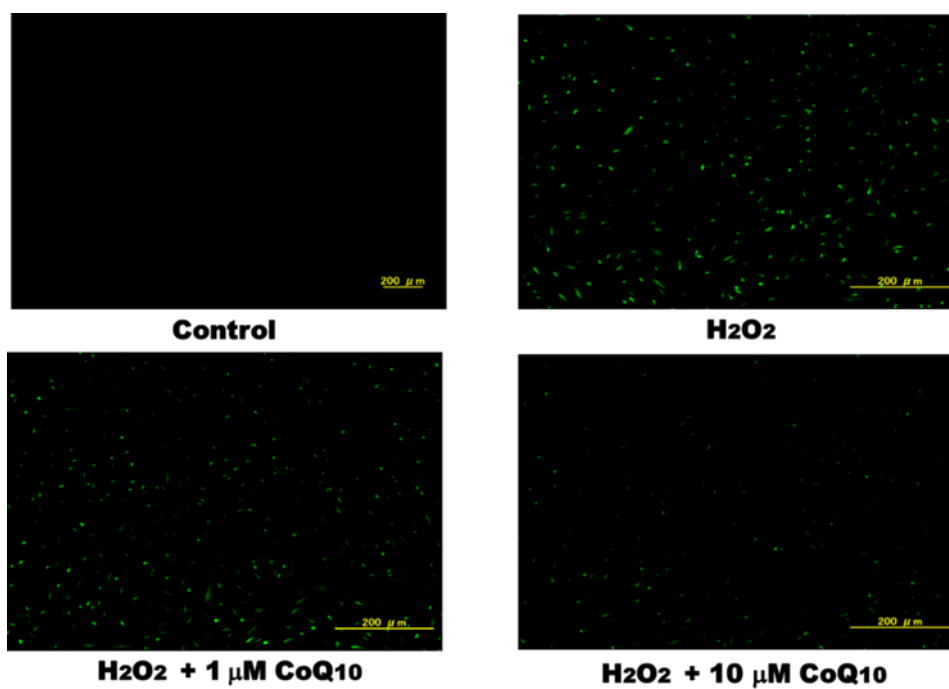
老化細胞から分泌される SASP 因子は、腫瘍の形成促進、慢性炎症の惹起や老化関連疾患の病状を促進することが知られており<sup>86)</sup>、老化関連因子である p21 や炎症性サイトカインである IL-6, 8 などがその因子とされている。そのため、SIPS モデル細胞での p21, IL-6, 8 の mRNA レベルを測定したところ、その発現量はそれぞれ有意に増加していた (Fig. 10)。また 10  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub> 添加群ではそれぞれの mRNA 量が有意に減少することが確認された (Fig. 10)。



**Fig. 10** We confirmed effects of CoQ<sub>10</sub> on IL-6, 8 and p21 gene expression in fibroblasts of SIPS model. The SASP (such as IL-6, 8 and p21) related to aging was increased by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while it decreased the mRNA levels of IL-6, 8 and p21 with CoQ<sub>10</sub> treatment. Results are means  $\pm$  SD. n=3-6.

#### 2-3-5. SIPS モデル細胞での ROS 産生量

SIPS モデル細胞では、ROS の産生を示す緑色蛍光の増大が観察された (Fig. 11)。また、CoQ<sub>10</sub> 添加群では、濃度依存的に緑色蛍光の減少が観察された (Fig. 11)。



**Fig. 11** We observed intracellular ROS levels with CM-H<sub>2</sub>DCFDA in fibroblast of SIPS model, and the green fluorescence intensity was monitored by fluorescence microscopy.

## 第4節 考察

細胞老化は細胞増殖の停止や SASP 因子の分泌などの複合的な機能障害を示し、がん化の抑制と老化の寄与に重要であると認識されている<sup>87)</sup>。現在では、加齢に伴う動脈硬化巣や脂肪組織の中に SA- $\beta$ gal 陽性染色細胞の蓄積が発見されたり<sup>88,89)</sup>、p16 陽性細胞の除去が早老症マウスの筋肉低下や白内障の発症を遅らせ<sup>90)</sup>、正常マウスでは寿命の延長効果も観察されたり<sup>91)</sup>と、細胞老化と個体老化を関係づける研究結果が数多く報告されている。そのため、超高齢社会を迎えたわが国では、細胞老化のメカニズムの解明が早急に求められており、老化モデル細胞の作製も盛んに行われている。なかでも、酸化ストレスは細胞老化にとって特に重要な役割を示すため、ROS の 1 つである  $H_2O_2$  を用いた SIPS モデル細胞は近年の老化関連研究で広く使用されている<sup>92)</sup>。しかしながら、皮膚線維芽細胞由来の SIPS モデル細胞での抗酸化能や、ECM 産生量への検討は行われておらず、その詳細は不明な点が多い。したがって、本研究では、SIPS モデル細胞の老化抑制効果に対する基礎的メカニズムの解明を目的として、主に、コラーゲン合成と分解に対する CoQ<sub>10</sub> の効果を評価した。

本研究では、SIPS モデル細胞を作製するため、100  $\mu$ M  $H_2O_2$  を 2 時間添加した。本研究の様な早期老化である SIPS モデル細胞を作製するためには、適切な  $H_2O_2$  濃度とその添加時間を検討しなければならない。なぜならば、ROS による急激な細胞障害は細胞死のみを誘導してしまい、弱い細胞障害では DDR を惹起することはできないからである。そして、この SIPS モデル細胞では ROS により誘導された細胞老化に焦点をあてているため、テロメアの関与を極力避けるように作製することが望ましい。このためには、 $H_2O_2$  を長時間添加することは避けたほうが良いとされている<sup>93)</sup>。上記の理由から、本研究では、100  $\mu$ M  $H_2O_2$  を短時間である 2 時間添加することで、SIPS モデル細胞の細胞生存率の検討を行った。 $H_2O_2$  を添加することで、細胞生存率は有意に減少し (Fig. 7 A)、DAPI 染色による蛍光観察でも、細胞死を示す青色の蛍光が確認された (Fig. 7 B)。さらに、SIPS モデル細胞では、Control 群のほとんどすべての細胞で SA- $\beta$ gal の陽性染色が観察されたが、CoQ<sub>10</sub> 添加群では濃度依存的にその陽性染色率が減少していた (Fig. 8 A)。今回の結果から、酸化ストレスは老化プロセスに重要な役割を果たしていることが考えられる。また、CoQ<sub>10</sub> は皮膚老化に対してアンチエイジング効果を発揮できる可能性が示唆された。

第 1 章でも述べたように、皮膚老化ではコラーゲン量の減少が観察される<sup>29,30)</sup>。これには、MMP 発現量の増加が関係しているが、MMP 発現量の増加には老化細胞が分泌する SASP 因子のなかでも特に、炎症性サイトカインのインターロイキンが関与している<sup>94-96)</sup>。その他にも、老化細胞は IL-6, 8 の分泌を介して、細胞増殖阻害因子である p16 や p21 の発現を増加させることで細胞増殖を停止させることが知られている<sup>69,97)</sup>。このような理由から、2014 年には加齢に伴う炎症の活性化や、慢性炎症に起因する炎症性疾患の増加から inflammaging という概念が提唱され<sup>98,99)</sup>、炎症と老化の関係性が近年では注目されて始めたところである。そのため、著者は SIPS モデル細胞のコラーゲンおよび MMP の mRNA

量を測定した。このとき、SIPS モデル細胞の I, IV 型コラーゲンの mRNA 発現量、I 型コラーゲンのタンパク質量は有意に減少し、II, VIII 型 MMP の mRNA 発現量は有意に上昇した (Fig. 9 A, B)。さらには、SIPS モデル細胞では p21、IL-6, 8 の mRNA 量や ROS の産生量も増加した (Fig. 10, 11)。このことから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の添加により発生した ROS が SIPS モデル細胞の作製に関与し、SIPS モデル細胞から分泌される SASP 因子 (IL-6, 8 や MMP) は複合的にコラーゲンを分解している可能性が示唆された。なお、加齢に伴う抗酸化酵素群の変化<sup>100-102)</sup>、ROS による SASP 因子の産生増加<sup>103-105)</sup>やコラーゲンの分解<sup>106-108)</sup>など、多くの研究報告がこの可能性を支持しており、酸化ストレスと皮膚老化の関係性については広く認識されている。一方、CoQ<sub>10</sub> の添加は、II, VIII 型 MMP、p21、IL-6, 8 の mRNA 量や ROS の産生量を減少し、I, IV 型コラーゲンの mRNA 発現量、I 型コラーゲンのタンパク質量を増加した (Fig. 9-11)。コラーゲンは、加齢とともに減少するため<sup>109)</sup>、皮膚老化の評価の際の重要な指標の 1 つである。さらに、皮膚の「はり」を与えるコラーゲンが減少してしまうと、顔の皮膚老化による容貌の変化のため、QOL (quality of life) を著しく低下させる原因にもなってしまう。そのため、CoQ<sub>10</sub> には線維芽細胞のコラーゲン産生増加を通した、高齢者の QOL 改善の可能性もあると著者は考えている。

ヒトは生活をするうえで、様々な酸化ストレスを受けている。通常、抗酸化酵素群 (カタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼなど) が酸化ストレスから身を守ってくれているが、過剰な酸化ストレスによるダメージや、加齢による抗酸化システムの破綻の際には、SIPS 細胞が我々の身体に産生されてしまう。そうなれば、SIPS 細胞から分泌される SASP 因子が生体内のレドックスバランスを崩し、加齢性疾患の罹患率の増加や健康寿命の低下など悪影響を与えることも考えられる。しかしながら、今回の結果から CoQ<sub>10</sub> を普段から服用しておくことで、老化への予防効果を発揮する可能性が示唆された。今回の研究が、超高齢社会を迎えたわが国の健康寿命の増加の一助となり、老化メカニズムの解明や老化調節方法の研究開発の助けとなることを祈っている。

### 第3章 化学的に安定な還元型 CoQ<sub>10</sub> 含有新規ドリンク剤の開発

#### 第1節 緒言

CoQ<sub>10</sub> はミトコンドリア内膜、小胞体、ゴルジ体や細胞膜などの細胞内小器官で *p*-hydroxybenzoate と isopentenylpyrophosphate から生合成される<sup>23, 110)</sup>。当時より、ミトコンドリア内膜で生合成される CoQ<sub>10</sub> は、ATP 産生に寄与することが知られていたが、その他の細胞内小器官中の CoQ<sub>10</sub> の生理的意義については不明な点も多かった。近年では、血管内皮細胞内の CoQ<sub>10</sub> がゴルジ体膜中での一酸化窒素 (NO) 合成に重要であること<sup>111)</sup> など、CoQ<sub>10</sub> の新たな役割が徐々に明らかとされつつある。さらに、CoQ<sub>10</sub> は基礎研究のみならず、心疾患<sup>77)</sup> や代謝性疾患<sup>112)</sup>、神経変性疾患<sup>113, 114)</sup> などの臨床試験での有効性も多く報告されている。上記の報告中では、1 日当たり 2400 mg を摂取しているものもあるが、わが国では、医療用医薬品として CoQ<sub>10</sub> の服用量は、1 日の目安量として 30 mg が推奨されている。これには、CoQ<sub>10</sub> が脂溶性物質であり、生体への吸収率がとても低いことが要因として挙げられる。

CoQ<sub>10</sub> は生体内で酸化型と還元型の両者の形で存在し、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> は脂溶性の抗酸化剤として働いている。この抗酸化作用のメカニズムとしては、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> が直接的に脂質ペルオキシラジカルを消去し、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> が  $\alpha$ -トコフェロールと脂質ペルオキシラジカルの間で反応することで、間接的に  $\alpha$ -トコフェロキシラジカルを  $\alpha$ -トコフェロールに再生し、抗酸化作用を発揮するというものである。そのため、 $\alpha$ -トコフェロールと CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> が共存すると、最初に減少するのは CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> であり、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の存在する間は  $\alpha$ -トコフェロールの減少が抑制される ( $\alpha$ -トコフェロールの儉約効果)<sup>115, 116)</sup>。このことより、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の酸化電位が  $\alpha$ -トコフェロールのそれよりも低いことが予想される。一方、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> は空気中では非常に不安定であるため、容易に酸化型に変換されてしまう。この強力な抗酸化作用を有する CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> は、老化促進マウスである SAMP1 マウスに投与することで、加齢速度を減じることができるとの報告もある<sup>36, 80, 81)</sup>。しかしながら、CoQ<sub>10</sub> と CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> は加齢と共に生体内含量が減少してしまうため<sup>27)</sup>、超高齢社会を迎えたわが国では、CoQ<sub>10</sub> もしくは CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の生体内含量の維持または増加が重要であると考えられている。わが国では 2006 年に Hosoe らより、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の摂取は、CoQ<sub>10</sub> 摂取時に比べて生体内 CoQ<sub>10</sub> 含量が有意に増加することが報告されている<sup>117)</sup>。CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> は強い抗酸化作用のために、空気中ではすぐに CoQ<sub>10</sub> へと変換されてしまい、それを防ぐための製剤化には非常に高い費用を有することとなる。そのため、外来的に摂取された CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の生体内挙動や CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の化学的な安定性については、いまだ不明な点も多い。この研究では化学的に安定な CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の開発を目的とし、今回、水溶液中での酸化型 CoQ<sub>10</sub> から CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> への変換とその安定性について検討した。さらに、ビタミン C を用いて作製した CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の添加による、皮膚線維芽細胞と Hep G2 の細胞内 CoQ<sub>10</sub> 含量についても併せて調査した。

## 第2節 実験方法

### 3-2-1. 細胞培養

新生児皮膚線維芽細胞と Hep G2 細胞 (Cell bank) は第1章 (2-1) と同様の実験方法で培養した。また、実験材料も第1章 (2-1) と同様のものを使用した。

### 3-2-2. 酸化型および還元型 CoQ<sub>10</sub> 量の測定

CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の安定性を確認するため、新鮮なハマチを屠殺し、4°Cで保存した。その後、測定の直前にハマチの肝臓を Polytron homogenizer (Type PT 10/35; Kinematica, Lucerne, Switzerland) at setting of 7 to 30 seconds の条件下、蒸留水中でホモジナイズしたものをサンプルとし、実験に供した。

一方、測定試料を作製するため、水溶化 CoQ<sub>10</sub> とビタミン C もしくはアスコルビン酸ナトリウム (アスコルビン酸 Na) を、蒸留水もしくは PBS (136.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 含有) 中に共存した。これらすべての測定試料は全量が 10 ml となるように調製した。また、水溶化 CoQ<sub>10</sub> 含量は 0.2 mg/ml となるよう 2 mg を添加し、ビタミン C とアスコルビン酸 Na はそれぞれ、2, 20, 100, 200 mg を添加した。そして、この状態を一定期間、湿気と直射光を避けて保存したのち、total CoQ<sub>10</sub> (酸化型+還元型) 量と CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> 量を HPLC-ECD 法を用いて測定した<sup>39)</sup>。

### 3-2-3. 統計学的処理

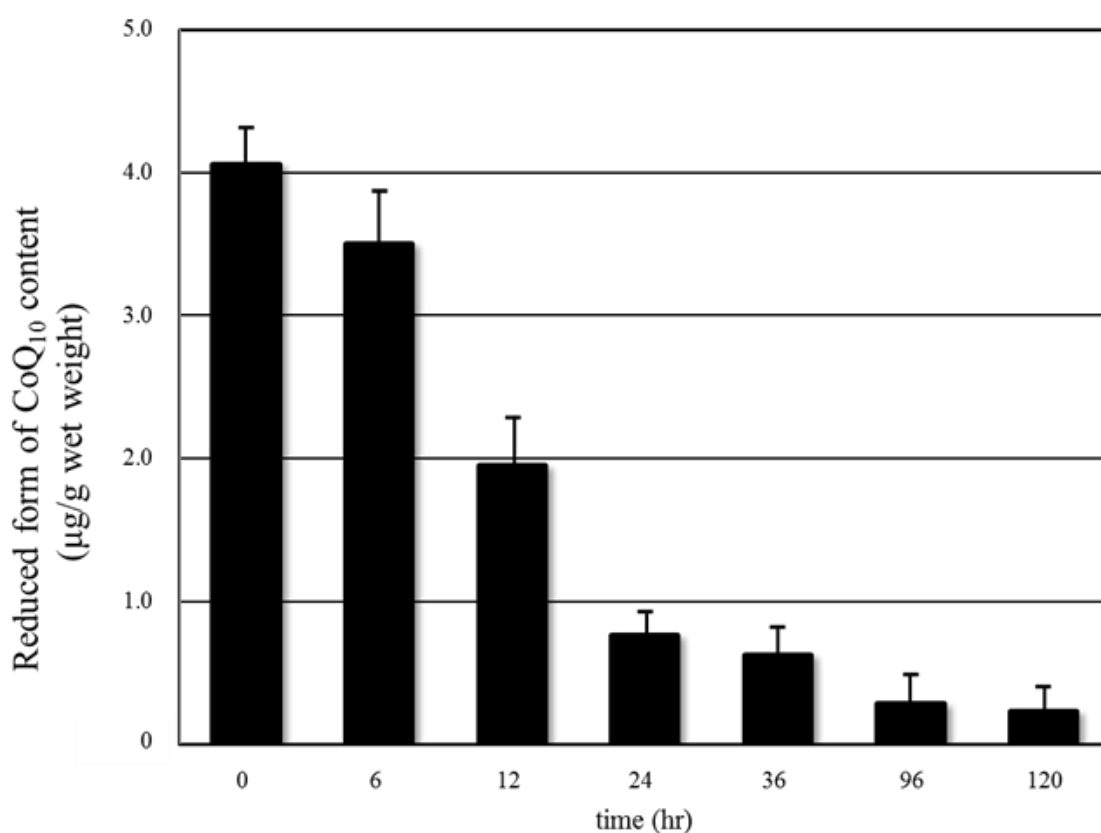
統計学的処理は Unpaired student t-test により行い、測定結果は平均値±SE で示した。



### 第3節 実験結果

#### 3-3-1. 還元型 CoQ<sub>10</sub> の安定性

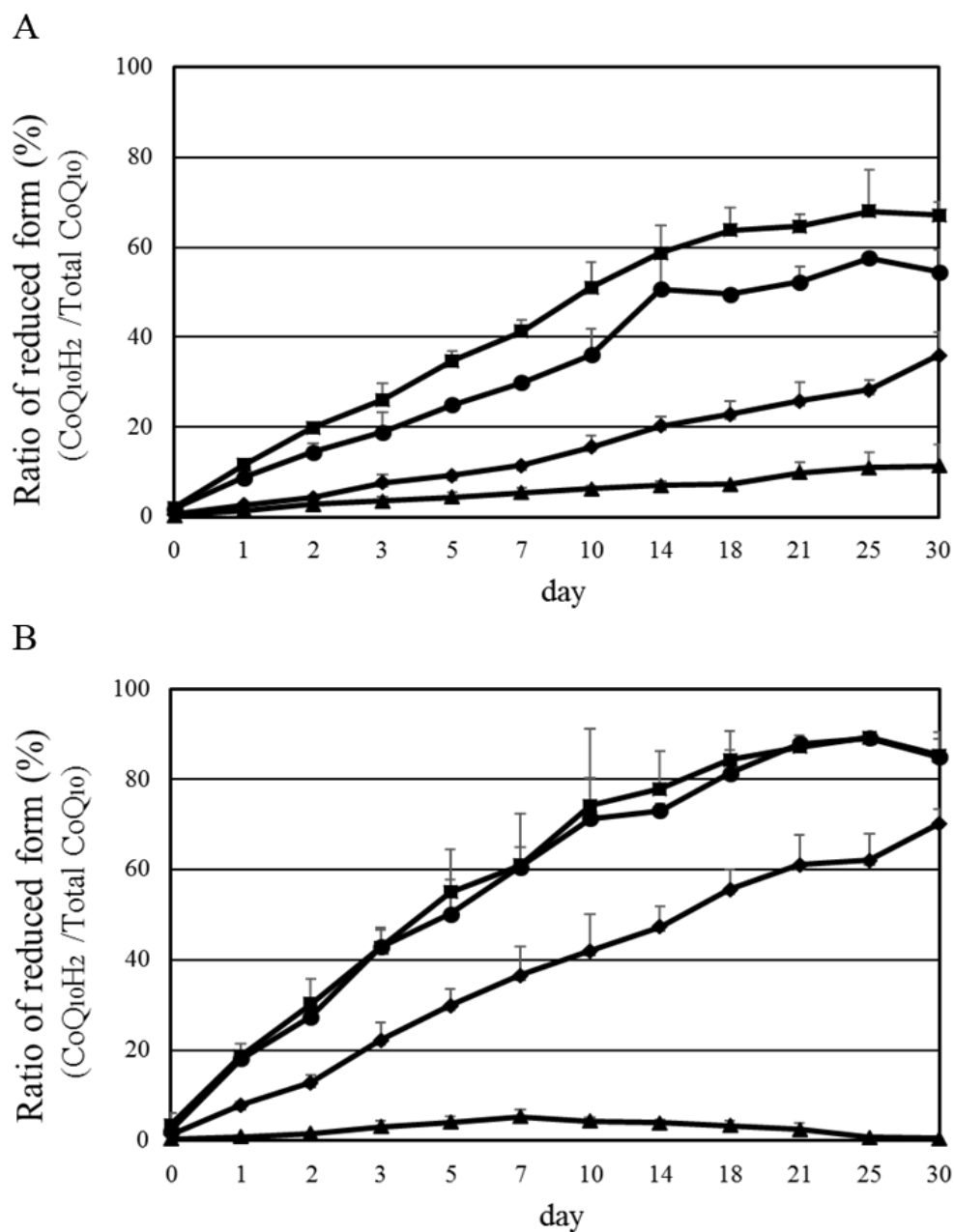
CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>は空气中で不安定なことはよく知られているが、その安定性についての統計的な解析は少ない。そのため、著者は CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の安定性を魚類であるハマチの肝臓を用いて調査した。屠殺直後のハマチ肝臓中の CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> 含量は 4 µg/g (湿重量) であったが、時間経過とともに減少し、4°C、24 時間保存の後、測定した CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> 含量は 0.7 µg/g (湿重量) であった (Fig. 12)。そのため、4°C条件下での保存にもかかわらず、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> は約 80%が空気酸化されることが確認された。一方、ハマチ肝臓中の total CoQ<sub>10</sub> 含量は測定期間中に変化はなかった。



**Fig. 12** For examine stability of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>, CoQ<sub>10</sub> and CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> levels were measured by HPLC methods. After 24h, CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> level declined from 4 µg/g to 0.7 µg/g. Namely, about 80% of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> was converted to CoQ<sub>10</sub> in 24h. Results are means ±SE. n=3-5.

### 3-3-2. ビタミンCを用いた還元型 CoQ<sub>10</sub>の作製

著者の研究室では、2007年にCoQ<sub>10</sub>とビタミンCやビタミンEが共存していると、一定時間後にCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>に変換されることを報告している<sup>118)</sup>。そのため、今回の研究では、水溶性CoQ<sub>10</sub>を一定温度条件下(25°C)、各濃度のビタミンC(2、20、100、200 mg)と蒸留水もしくはPBS中で共存させ、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の産生を試みた。その際、ビタミンCの濃度依存的に蒸留水中のCoQ<sub>10</sub>はCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>に変換された(Fig. 13 A)。さらに、PSBを用いた試料でも、ビタミンCの濃度依存的にCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>への変換がなされたが、蒸留水を用いたときよりその変換速度は早く、変換率も高かった(Fig. 13 B)。

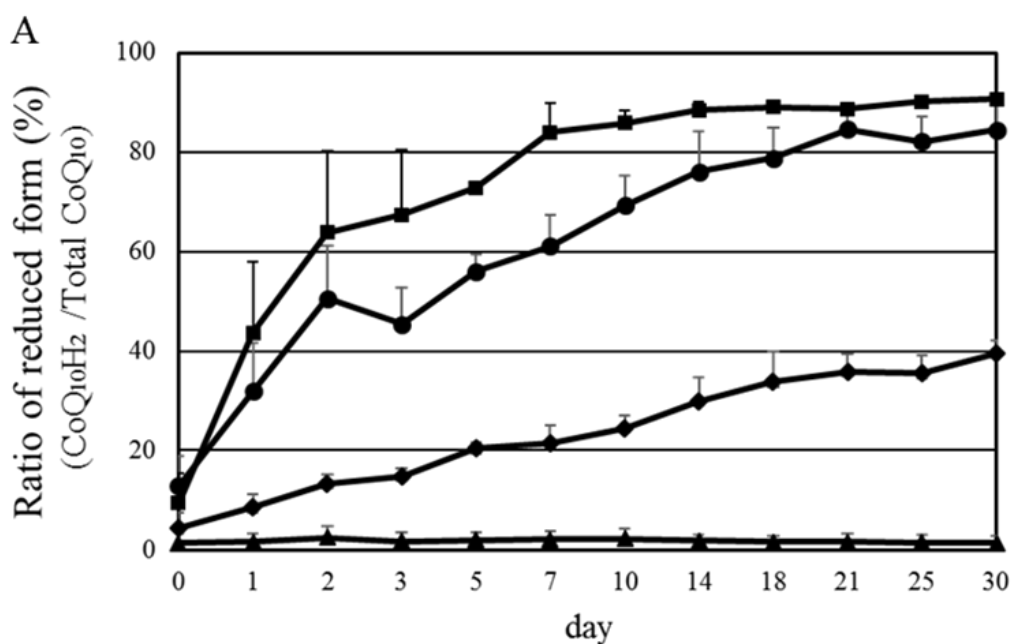


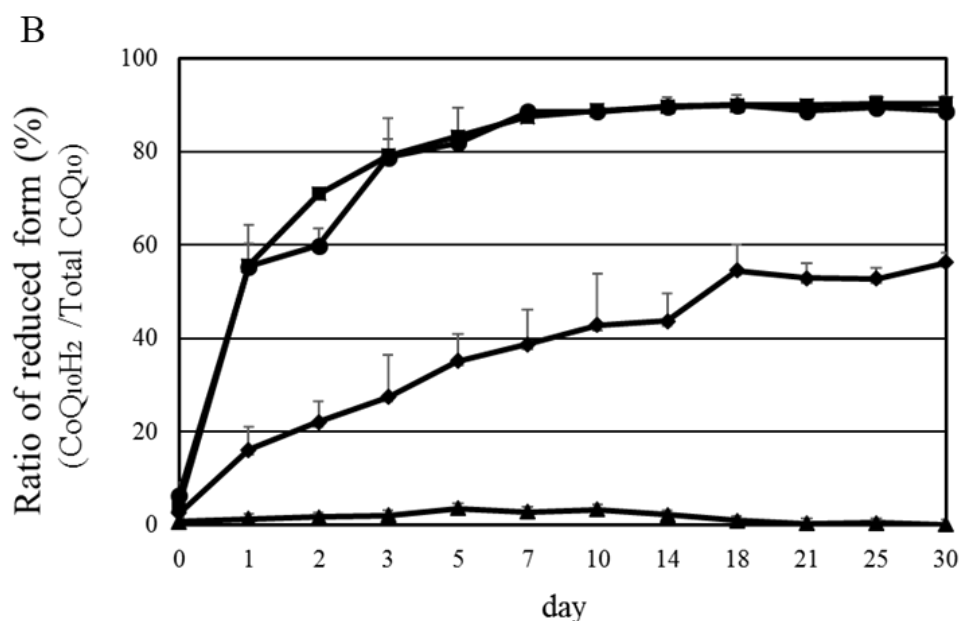
**Fig. 13** The solutions (containing 2 mg P40 and the volume of 10 ml DW or PBS) having different Vitamin C dose (2, 20, 100, 200 mg) are prepared for measurement of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>. The symbols: square, 200 mg Vitamin C; circle, 100 mg Vitamin C; diamond, 20 mg Vitamin C; triangle, 2 mg Vitamin C. (A) CoQ<sub>10</sub> was converted to CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> in the coexistence of Vitamin C in DW. After 30 days, the rate of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> was 11.3% (▲), 36.0% (◆), 54.5% (●) and 67.2% (■), respectively. (B) Vitamin C contributed to reduce CoQ<sub>10</sub>, and CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> was produced in PBS. After 30 days, the rate of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> was 0.5% (▲), 70.2% (◆), 85.0% (●) and 85.4% (■), respectively. Results are means ±SE. n=3-5.

### 3-3-3. アスコルビン酸 Na を用いた還元型 CoQ<sub>10</sub> の作製

アスコルビン酸 Na は食品添加物や動物・ヒトの医薬品として使用されている。また、アスコルビン酸 Na はビタミン C のように、pH が酸性に偏らない性質を持っている。各濃度のビタミン C (2、20、100、200 mg) を蒸留水中に溶解した際、試料溶液の pH は約 2~4 となった。一方、アスコルビン酸 Na (2、20、100、200 mg) を溶解した試料溶液はその濃度によらず pH が 7.4 に保たれていた。このことから、アスコルビン酸 Na を用いて、中性条件下での CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> への変換速度の検討を行った。

アスコルビン酸 Na と CoQ<sub>10</sub> を一定温度条件下 (25°C)、蒸留水中または PBS 中で共存させたものは、濃度依存的に CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> への変換率が増加した (Fig. 14 A, B)。また、2、20 mg のビタミン C を含有する水溶液を除いて、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> への変換速度はアスコルビン酸 Na の方が早かった。さらに、100、200 mg のビタミン C を含有する水溶液と比較したとき、100、200 mg のアスコルビン酸 Na を含有する水溶液の方が、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の割合は高い値となった。これらの結果より、アスコルビン酸 Na は CoQ<sub>10</sub> を還元することができ、ビタミン C による CoQ<sub>10</sub> の還元反応には pH が重要な役割を果たすことが示された。



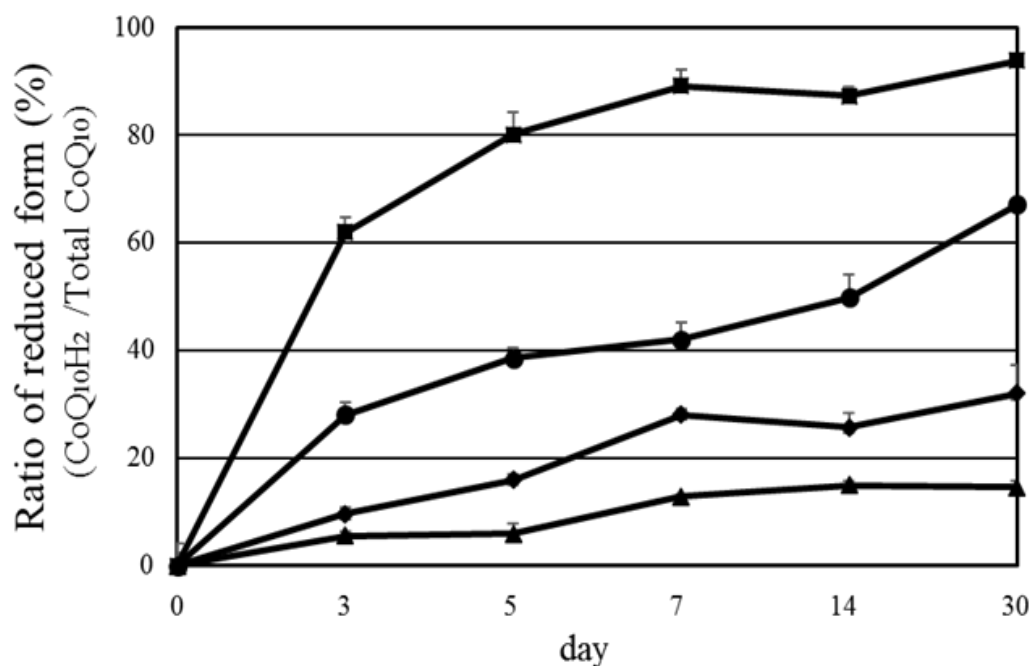


**Fig. 14** In this result, sodium ascorbate was used substituted for Vitamin C, so that the pH of aqueous solutions was in a neutral region. The symbols: square, 200 mg sodium ascorbate; circle, 100 mg sodium ascorbate; diamond, 20 mg sodium ascorbate; triangle, 2 mg sodium ascorbate. (A) CoQ<sub>10</sub> was reduced to CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> by sodium ascorbate in DW. After 30 days, the rate of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> was 1.4% (▲), 40.0% (◆), 84.6% (●) and 90.7% (■), respectively. Results are means ±SE. n=3-5. (B) Sodium ascorbate reduced CoQ<sub>10</sub> in PBS, and its reaction was in dose-dependent manner. After 30 days, the rate of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> was 0.2% (▲), 56.2% (◆), 88.7% (●) and 90.3% (■), respectively. Results are means ±SE. n=3-5.

#### 3-3-4. ビタミン C を用いた異なる温度条件下での還元型 CoQ<sub>10</sub> の作製

温度は化学反応速度に影響を与える重要な因子である。そのため、CoQ<sub>10</sub> から CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> への還元反応を異なる温度条件下 (4、25、37、60℃) で検討した。

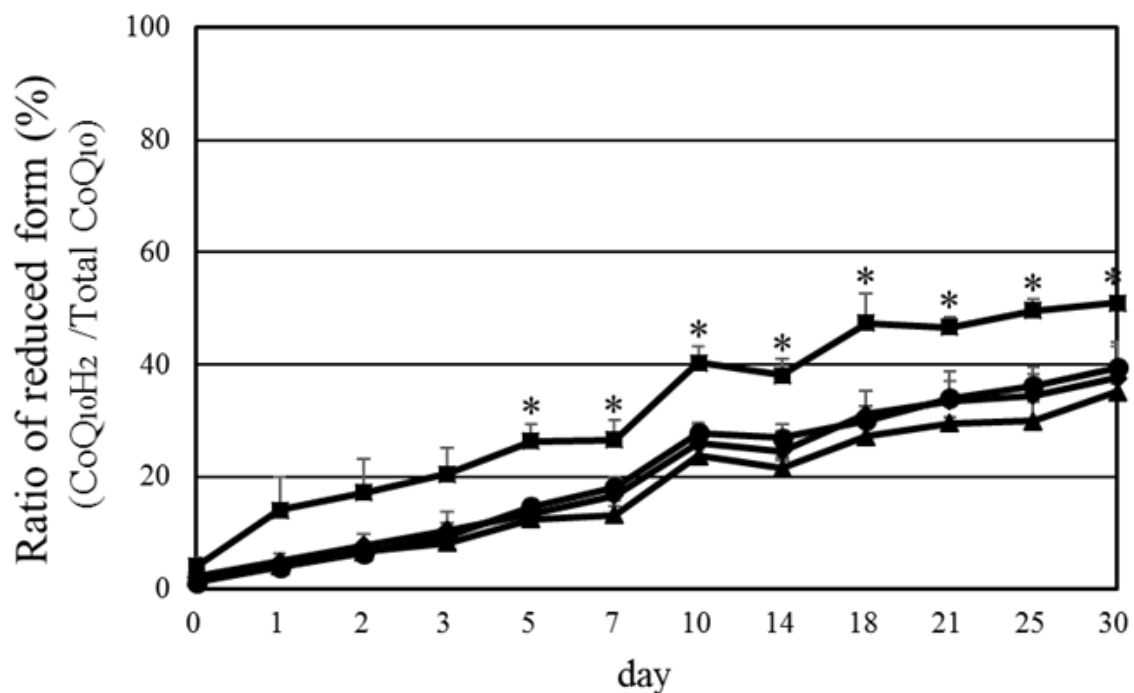
温度変化による CoQ<sub>10</sub> から CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> への変換率を検討するため、ビタミン C 添加量を 200 mg に固定し、蒸留水に溶解して、各温度条件下に保存することで測定試料を作製した。その際、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> への変換量は温度依存的に増加し (Fig. 15)、最も温度の高い 60℃で保存した試料は 6 日後には CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の生成量が 90.4%まで上昇した。なお、今回の実験では、CoQ<sub>10</sub> が高温条件下で分解されることが知られているため、60℃より高温の条件では実験を行わなかった。また、今回の測定条件では total CoQ<sub>10</sub> 量には変化は見られなかった。



**Fig. 15** In this study, it was evaluated conversion rate of CoQ<sub>10</sub>H on differential temperature (4, 25, 37, 60°C) in DW containing 2 mg P40 and 200 mg Vitamin C. The symbols: square, 60°C; circle, 37°C; diamond, 25°C; triangle, 4°C. The conversion rate from CoQ<sub>10</sub> to CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> increased in temperature dependent manner. After 30 days, the rate of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> was 14.5% (▲), 31.9% (◆), 67.1% (●) and 94.0% (■), respectively. Results are means ±SE. n=3-5.

### 3-3-5. 各 PBS 構成成分中での還元型 CoQ<sub>10</sub> への変換速度

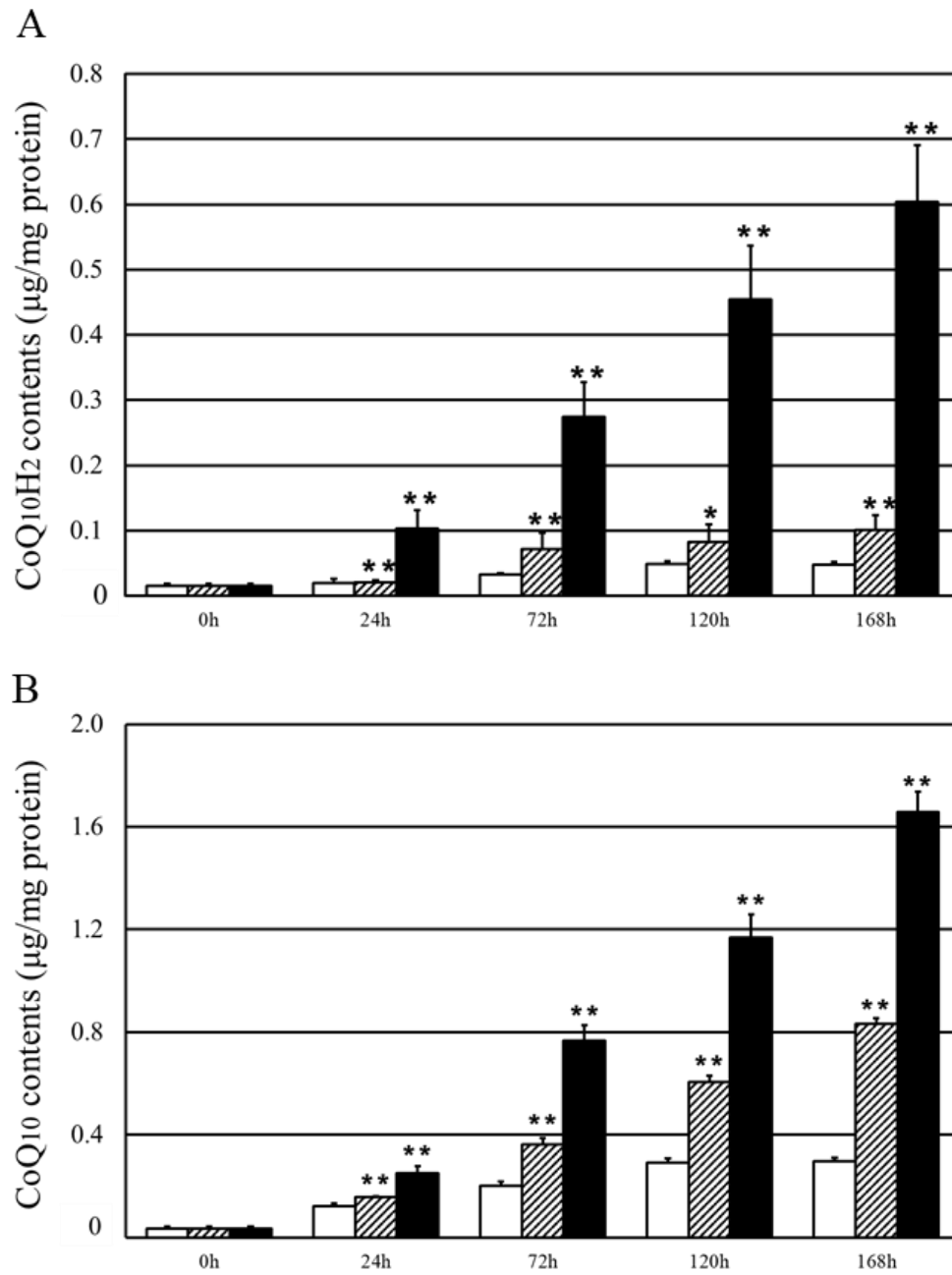
これまで、ビタミン C とアスコルビン酸 Na を用いた CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の作製を行ってきた (Fig. 13, 14)。蒸留水と PBS で作製した試料の両者を比較すると、PBS に溶解した試料の方が CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> への変換率が高かった。そのため、PBS を構成している成分である 136.9 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、7.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O の各 4 つの水溶液を作製し、その試料に 20 mg のビタミン C を添加して還元型 CoQ<sub>10</sub> への変換効率の検討を行った。その際、7.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O を用いた水溶液では、その他の成分と比較して有意に還元比率が高かった (Fig. 16)。



**Fig. 16** We evaluated conversion rate from CoQ<sub>10</sub> to CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> by each PBS components. The symbols: square, 7.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:12H<sub>2</sub>O; circle, 136.9 mM NaCl; diamond, 2.7 mM KCl; triangle, 1.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. After 30 days, the rate of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> was 35.2% (▲), 37.7% (◆), 39.5% (●) and 51.0% (■), respectively. Results are means ±SE. n=3. A significant difference at \*P < 0.05 as compared with corresponding data of 136.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, respectively.

### 3-3-6. 線維芽細胞内 CoQ<sub>10</sub> 含量

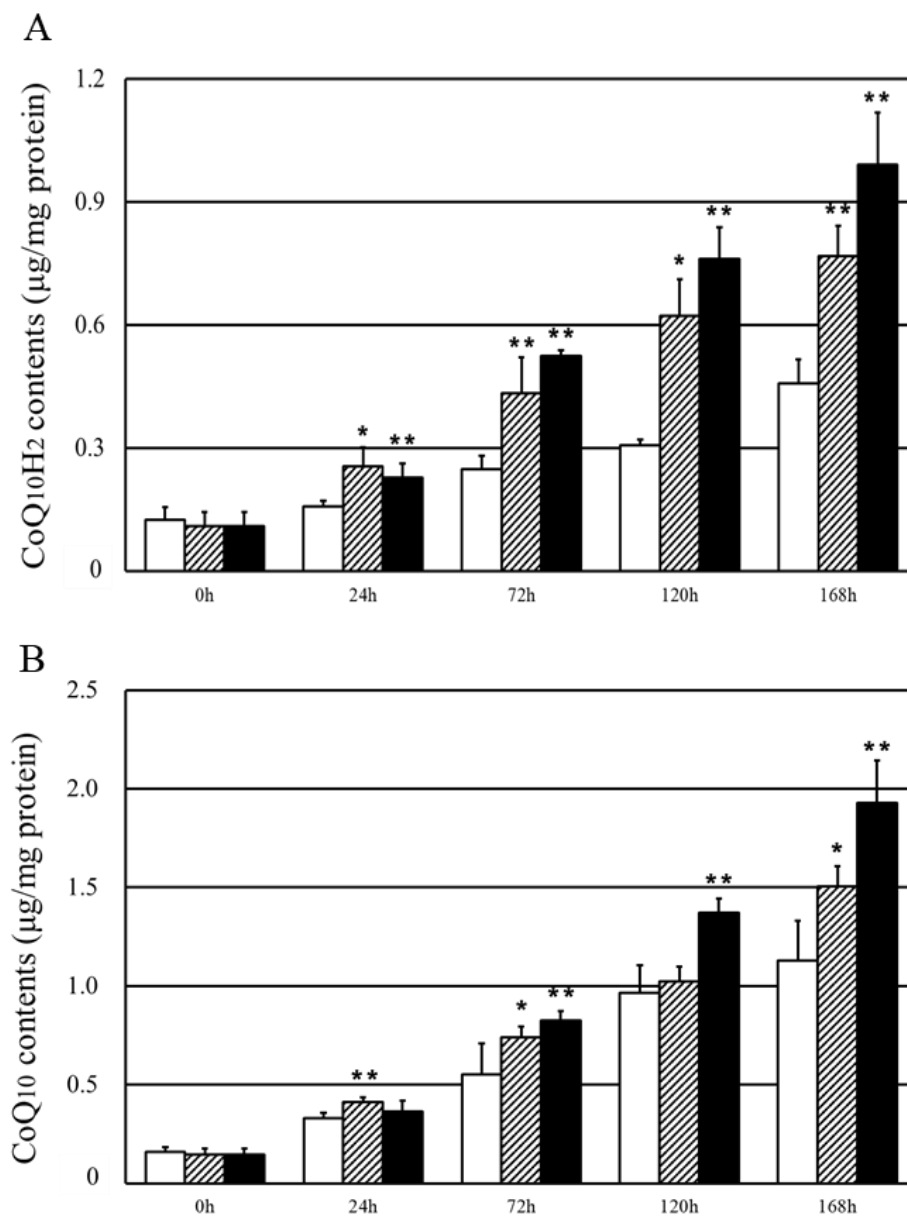
線維芽細胞にビタミン C (20 mg) を用いて作製した試料である還元型比率が 30%、50% の 1 μM CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> をそれぞれ 1 週間添加した。その際、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の還元比率に依存して線維芽細胞内の CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> と total CoQ<sub>10</sub> 含有量が増加した (Fig. 17 A, B)。



**Fig. 17** CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> and total CoQ<sub>10</sub> levels in fibroblasts were increased by supplementation of P40, 30% or 50% CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>. The open bar, hatched bar and closed bar indicate the supplementation group of P40, 30% CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> and 50% CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>, respectively. A significant difference at \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 as compared with P40 group. Results are means ±SE. n=3-5.

### 3-3-7. Hep G2 細胞内 CoQ<sub>10</sub> 含量

Hep G2 細胞に還元型比率が 30%、50%の 1  $\mu$ M CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> をそれぞれ 1 週間添加した。その際、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の還元比率に依存して Hep G2 細胞内の CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> と total CoQ<sub>10</sub> 含有量が増加した (Fig. 18 A, B)。



**Fig. 18** CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> and total CoQ<sub>10</sub> levels in HepG2 cells were increased by supplementation of P40, 30% or 50% CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>. The open bar, hatched bar and closed bar indicate the supplementation group of P40, 30% CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> and 50% CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>, respectively. A significant difference at \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 as compared with P40 group. Results are means  $\pm$ SE. n=3-5. A significant difference at \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 as compared with control. Results are means  $\pm$ SE. n=3-5.



#### 第4節 考察

CoQ<sub>10</sub>は、生体内で抗酸化作用とエネルギー産生賦活作用の二つの大きな生理作用を発揮する生体内での必須因子である。そのCoQ<sub>10</sub>は、酸化型では化学的に安定であるが、還元型では極めて不安定であり、空气中で容易に酸化されてしまう。しかしながら、ヒトの血液中のCoQ<sub>10</sub>はその90%以上が還元型で存在している<sup>6)</sup>。生体内で抗酸化作用を発揮するためには、CoQ<sub>10</sub>はCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の形で存在する必要があるため、その還元型への変換機構や抗酸化機構についてはこれまで多くの報告がなされてきた<sup>8-16, 119)</sup>。一方、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>は不安定であることは知られているが、その化学的な不安定さを示した報告はほとんど存在しない。そのため、著者は、魚類であるはまちの肝臓を用いてCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の化学的安定性について検証した (Fig. 12)。実験開始直後、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>量は4 µg/g (湿重量)であったが、4℃条件下でも還元型比率は経時的に減少し、24時間後にはCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>量は0.7 µg/g (湿重量)となった (Fig. 12)。このとき、total CoQ<sub>10</sub>量には変化がなかったため、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>は空気酸化を受け、酸化型に変換されたことが示唆された。このように、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>は空気中では非常に不安定であることは、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>がもつ強い抗酸化作用に由来することは容易に想像できる。だが、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>はこの不安定性のために、研究を行う際の弊害が多くその研究データは極めて少ない状況である。その中でも特に、吸収性という点はいまだ不明な点が多く存在する。そのため、著者は、安定なCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>を作製することを試みた。その際、ビタミンCやアスコルビン酸Naと共存したCoQ<sub>10</sub>は、蒸留水中もしくはPBS中でCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>に変換されることが認められた (Fig. 13, 14)。さらに、温度が上昇するにつれて、あるいはpHが中性領域に近づくにつれてCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>への変換率は高く、またその速度は速いことが示された (Fig. 15, 16)。今回の研究では、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>への変換機構までは分からなかったが、おそらく酸化還元電位が関与していると考えている。しかしながら、それだけでは説明できない点も多々あり、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の変換機構のメカニズムについてはこれから検討しなければならないと考えている。

上述のように、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>はその化学的な不安定さから、吸収性についての報告は極めて少ない。これまでは、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>をヒト (健常者) に経口摂取させた際の吸収性は、酸化型と比べて約2倍高いことが知られている<sup>120)</sup>が、細胞を用いた際のCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の吸収性についてはほとんど知られていない。そのため、著者は水溶液中でビタミンとCoQ<sub>10</sub>を共存することで作製したCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の細胞内取り込み量を、CoQ<sub>10</sub>の還元比率が低い皮膚線維芽細胞と、還元比率が高いHep G2細胞の両者を用いて検討した。その際、細胞内のCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>、total CoQ<sub>10</sub>含量は、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の還元比率が上昇するに従い、有意に増加することが観察された (Fig. 17, 18)。さらに、その上昇率は細胞内でのCoQ<sub>10</sub>の還元比率が低い線維芽細胞の方が高い結果となった。今回の結果のように、還元比率を変化させることで、その吸収性の違いを示した報告はほとんどない。そして、この吸収性はCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の生体内比率が低い細胞で、より高いことが示唆されたため、加齢とともに減少する生体内CoQ<sub>10</sub>含量やCoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>比率の低下の改善にとって重要であると考えられる。一方、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>には、ミトコンドリア機能不全の改

善<sup>121-124</sup>、疲労改善効果<sup>125, 126</sup>、抗加齢効果<sup>81, 127</sup>など、加齢に伴い生じる様々な要因を改善するという報告が数多くなされている。そのため、著者の研究結果である CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の安定化、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の簡易な作製方法の開発は、吸収性の改善を介したわが国の健康寿命の改善の一助となることと思われる。さらに、本研究では水溶液中での CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の開発に注力している。これは、水溶化 CoQ<sub>10</sub>の方が、CoQ<sub>10</sub>よりも吸収性が高いこと、また、水溶液にすることで服用性を向上させることが可能であると考えたためである。実際に、本研究では、線維芽細胞に水溶化 CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>（還元比率 50%）を添加した際、CoQ<sub>10</sub>を添加したときと比較して約 5 倍の細胞内 CoQ<sub>10</sub> 含有量が検出された（Fig. 17）。既知の報告よりも高い吸収性を示した背景には、水溶化 CoQ<sub>10</sub>を使用したことが考えられ、安定な水溶液中での CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>が開発できた際には、吸収率の改善の面ではかなりの進捗がみられると思われる。これらのことから著者は将来的には、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> 含有ドリンク剤の開発に着手したいと考えている。しかしながら、厚生労働省が定めた成人のビタミン C の推奨量は一日当たり 100 mg であるため、今回の研究で使用した 200 mg のビタミン C 量は過剰である可能性がある。そのため、細胞実験では、ドリンク剤 500 ml あたりに 100 mg を添加すると仮定した際のビタミン C 濃度として、20 mg のビタミン C を共存したものを使用している。そのなかで、このような結果が得られたことは、今後の CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> 含有ドリンク剤の開発の大きな一歩であると考えている。

先にも述べたが、ヒトの生体中には化学的に不安定な CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> が検出されるが、外来的に摂取された CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> の生体内挙動については、いまだ不明な点も多い。わが国では、今後、平均寿命より健康寿命を延命することが公衆衛生上の大きな課題となっている。そのなかで、サプリメント（いわゆる健康食品）の活用は代替医療として大きな地位を築いてきているように見える。著者の今回の研究結果が日本の健康寿命の延長に、ひいては、CoQ<sub>10</sub>の吸収性の増加や、抗加齢効果を通じて健康寿命の延伸につながることを期待している。

## 総括

本研究では、CoQ<sub>10</sub>による培養ヒト線維芽細胞でのコラーゲン産生増強作用と健康科学への応用について検討を行い、以下の結果を得た。

### 第1章

CoQ<sub>10</sub>を皮膚線維芽細胞に添加することで、I, IV, VII 型コラーゲンの mRNA 発現量を増加し、I 型コラーゲンのタンパク質量を増加することが認められた。さらに、CoQ<sub>10</sub>は、コラーゲンの成熟化に関与する HSP47 やエラスチンの mRNA 発現量を増加することで、老化の際に減弱する皮膚の生理機能の改善に寄与する可能性が示唆された。

### 第2章

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いて作製した SIPS モデル細胞で観察される SA-βgal の陽性染色を CoQ<sub>10</sub>は抑制した。また、CoQ<sub>10</sub>は SIPS モデル細胞で減少した I, IV 型コラーゲンの mRNA 発現量を増加し、ECM の分解や炎症に関与する II, VIII 型 MMP の mRNA 発現量を減少した。さらに、老化関連因子である p21、炎症性サイトカインである IL-6、IL-8 の mRNA 発現量を減少し、ROS の産生量も減少した。今回の結果から、CoQ<sub>10</sub>は酸化ストレスに依存する、細胞老化への予防効果を発揮する可能性が示唆された。

### 第3章

これまで、化学的知見の乏しかった CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の安定性については、ハマチの肝臓を用いることでそれを証明した。また、水溶液中で CoQ<sub>10</sub>とビタミン C やアスコルビン酸 Na を共存することで、化学的に安定な CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>を作製することに成功した。そして、その還元作用は、温度、pH、溶媒に影響を受けることが観察された。さらに、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>を皮膚線維芽細胞と Hep G2 細胞に添加することで、CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>の細胞内への取り込み作用が CoQ<sub>10</sub>よりも高いことを証明した。これらの結果は、極めて低かった CoQ<sub>10</sub>の吸収性を改善し、上述の様な抗加齢効果やコラーゲン産生作用などを増強する可能性が示唆された。

以上より、本研究では皮膚老化で見られるコラーゲン量の減少を CoQ<sub>10</sub>が改善し、老化モデル細胞に見られる表現型を CoQ<sub>10</sub>が改善することで皮膚老化に対するアンチエイジング作用を発揮することを示唆した。さらに、水溶液中で化学的に安定な CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>を作製することで、加齢とともに減少する CoQ<sub>10</sub>量と CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>比率を改善できる可能性を示唆した。近年、我が国は超高齢社会に直面しており、健康寿命を延伸することが公衆衛生上の大きな課題となっている。今回得られた、CoQ<sub>10</sub>によるコラーゲン産生増強作用が健康科学の発展に役立つこと、さらには、細胞老化を制御するシグナル伝達経路の同定や老化メカニズムの解明などの健康寿命延伸を図るための基礎・応用研究の発展に寄与することを期待している。

## 謝辞

本研究は著者が神戸学院大学大学院薬学研究科博士課程在学中に、同大学薬学部社会薬学部門生化学研究室 岡本 正志教授の指導のもとに行ったものである。本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、激励やご指導、ご鞭撻を賜りました神戸学院大学薬学部社会薬学部門生化学研究室 岡本 正志教授に心より感謝申し上げます。本論文の作成にあたり、ご校閲ならびにご助言を賜りました神戸学院大学 主査 徳山 尚吾 教授、同大学薬学部 副査 糟谷 史代 教授に謹んで深謝致します。本研究の遂行ならびに論文作成に際し、多大なるご指導、ご助言を賜りました、神戸学院大学薬学部社会薬学部門生化学研究室 高橋 隆幸 講師に心から御礼申し上げます。また、実験に協力して頂いた後輩達をはじめ、共に研究室生活を過ごし、苦楽を共にした本研究室の皆様および卒業生の皆様に心から感謝申し上げます。末筆になりましたが、これまで大変な心配とご苦勞をおかけしたにも関わらず、温かく見守り、多大なるご支援を頂きました家族に心より感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) Shunk C.H., Linn B.O., Wong E.L., Wittreich P.E., Robinson F.M., Folkers K., Coenzyme Q II, Synthesis of 6-farnesyl-and 6-phytyl-derivatives of 2,3-dimethoxy-5-methylbenzoquinone and related analogs, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**: 4753 (1958)
- 2) Takahashi T., Okamoto T., Mori K., Sayo H., Kishi T., Distribution of ubiquinone and ubiquinol homologues in rat tissues and subcellular fractions., *Lipids*, **28**(9): 803-809 (1993)
- 3) Green D.E., Tzagoloff A., The mitochondrial electron transfer chain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**(1): 293-304 (1966)
- 4) Mitchell P., Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity, *Biochem. Soc. Trans.*, **4**(3): 399-430 (1976)
- 5) Kroger A., Klingenberg M., Further evidence for the pool function of ubiquinone as derived from the inhibition of the electron transport by antimycin, *Eur. J. Biochem.*, **39**, 313-323 (1973)
- 6) Miles M.V., Horn P.S., Morrison J.A., Tang P.H., DeGrauw T., Pesce A.J., Plasma coenzyme Q10 reference intervals, but not redox status, are affected by gender and race in self-reported healthy adults, *Clin. Chim. Acta*, **332**(1-2): 123-132 (2003)
- 7) Mellors A., Tappel A.L., The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol, *J. Biol. Chem.*, **241**(19): 4353-4356 (1966)
- 8) Takayanagi R., Takeshige K., Minakami S., NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of electron flow in the respiratory chain and an antioxidant role of ubiquinol, *Biochem. J.*, **192**(3): 853-860 (1980)
- 9) Quinn P.J., Fabisiak J.P., Kagan V.E., Expansion of antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q, *Biofactors*, **9**(2-4): 149-154 (1999)
- 10) Takahashi T., Yamaguchi T., Shitashige M., Okamoto T., Kishi T., Reduction of ubiquinone in membrane lipids by rat liver cytosol and its involvement in the cellular defence system against lipid peroxidation, *Biochem. J.*, **309**(3): 883-890 (1995)
- 11) Kishi T., Takahashi T., Mizobuchi S., Mori K., Okamoto T., Effect of dicumarol, a NAD(P)H: Quinone acceptor oxidoreductase 1 (DT-diaphorase) inhibitor on ubiquinone redox cycling in cultured rat hepatocytes, *Free Radic. Res.*, **36**(4): 413-419 (2002)
- 12) Olsson J.M., Xia L., Eriksson L.C., Björnstedt M., Ubiquinone is reduced by lipoamide dehydrogenase and this reaction is potently stimulated by zinc, *FEBS Lett.*, **448**(1): 190-192 (1999)
- 13) Xia L., Björnstedt M., Nordman T., Eriksson L.C., Olsson J.M., Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway, *Eur. J. Biochem.*, **268**(5): 1486-1490 (2001)
- 14) Xia L., Nordman T., Olsson J.M., Damdimopoulos A., Björkhem-Bergman L., Nalvarte I., Eriksson L.C., Arnér E.S., Spyrou G., Björnstedt M., The mammalian cytosolic selenoenzyme

- thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **278**(4): 2141-2146 (2003)
- 15) Beyer R.E., Segura-Aguilar J., Di Bernardo S., Cavazzoni M., Fato R., Fiorentini D., Galli M.C., Setti M., Landi L., Lenaz G., The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(6): 2528-2532 (1996)
- 16) Landi L., Fiorentini D., Galli M.C., Segura-Aguilar J., Beyer R.E., DT-Diaphorase maintains the reduced state of ubiquinones in lipid vesicles thereby promoting their antioxidant function, *Free Radic. Biol. Med.*, **22**(1-2): 329-335 (1997)
- 17) Okamoto T., Fukui K., Nakamoto M., Kishi T., Kanamori N., Kataoka K., Nishii S., Kishi H., Hiraoka E., Okada A., Serum levels of coenzyme Q<sub>10</sub> and lipids in patients during total parenteral nutrition, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**(1): 1-12 (1986)
- 18) Olson R.E., Rudney H., Biosynthesis of ubiquinone, *Vitam. Horm.*, **40**: 1-43 (1983)
- 19) Runquist M., Ericsson J., Thelin A., Chojnacki T., Dallner G., Isoprenoid biosynthesis in rat liver mitochondria. Studies on farnesyl pyrophosphate synthase and trans-prenyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **269**(8): 5804-5809 (1994)
- 20) Stefely J.A., Pagliarini D.J., Biochemistry of mitochondrial coenzyme Q biosynthesis, *Trends Biochem. Sci.*, **42**(10): 824-843 (2017)
- 21) Kalén A., Appelkvist E.L., Chojnacki T., Dallner G., Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate transferase, an enzyme involved in ubiquinone biosynthesis, in the endoplasmic reticulum-Golgi system of rat liver, *J. Biol. Chem.*, **265**(2): 1158-1164 (1990)
- 22) Sweiczewska E., Dallner G., Andersson B., Ernster L., Biosynthesis of ubiquinone and plastoquinone in the endoplasmic reticulum-Golgi membranes of spinach leaves, *J. Biol. Chem.*, **268**(2): 1494-1499 (1993)
- 23) Kalén A., Norling B., Appelkvist E.L., Dallner G., Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **926**(1): 70-78 (1987)
- 24) Jayaraman J., Ramasarma T., Intracellular distribution of coenzyme Q in rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**: 258-266 (1963)
- 25) Willis R.A., Folkers K., Tucker J.L., Ye C.Q., Xia L.J., Tamagawa H., Lovastatin decreases coenzyme Q levels in rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(22): 8928-8930 (1990)
- 26) Folkers K., Langsjoen P., Willis R., Richardson P., Xia L.J., Ye C.Q., Tamagawa H., Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(22): 8931-8934 (1990)
- 27) Kalén A., Appelkvist E. L., Dallner G., Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues, *Lipids*, **24**(7): 579-84 (1989)
- 28) Piez K.A., Trus B.L., A new model for packing of type-I collagen molecules in the native fibril, *Bioscience Reports*, **1**(10): 801-810 (1981)

- 29) Varani J., Warner R.L., Gharraee-Kermani M., Phan S.H., Kang S., Chung J.H., Wang Z.Q., Datta S.C., Fisher G.J., Voorhees J.J., Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **114**(3): 480-486 (2000)
- 30) Fisher G.J., Quan T., Purohit T., Shao Y., Cho M.K., He T., Varani J., Kang S., Voorhees J.J., Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin, *Am. J. Pathol.*, **174**(1): 101-114 (2009)
- 31) Crane F.L., Hatefi Y., Lester R.L., Widmer C., Isolation of a quinone from beef heart mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **25**(1): 220-221 (1957)
- 32) Bianchi C., Fato R., Genova M.L., Parenti Castelli G., Lenaz G., Structural and functional organization of Complex I in the mitochondrial respiratory chain, *Biofactors*, **18**(1-4): 3-9 (2003)
- 33) Frei B., Kim M.C., Ames B.N., Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(12): 4879-4983 (1990)
- 34) Kettawan A., Takahashi T., Kongkachuichai R., Charoenkiatkui S., Kishi T., Okamoto T., Protective effects on Coenzyme Q<sub>10</sub> on decreased oxidative stress resistance induced by simvastatin, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **40**(3): 194-202 (2007)
- 35) Hoppe U., Bergemann J., Diembeck W., Ennen J., Gohla S., Harris I., Jacob J., Kielholz J., Mei W., Pollet D., Schachtschabel D., Sauermann G., Schreiner V., Stäb F., Steckel F., Coenzyme Q<sub>10</sub>, a cutaneous antioxidant and energizer, *Biofactors*, **9**(2-4): 371-378 (1999)
- 36) Inui M., Ooe M., Fujii K., Matsunaka H., Yoshida M., Ichihashi M., Mechanisms of inhibitory effects of CoQ<sub>10</sub> on UVB-induced wrinkle formation in vitro and in vivo, *Biofactors*, **32**(1-4): 237-243 (2008)
- 37) Muta-Takada K., Terada T., Yamanishi H., Ashida Y., Inomata S., Nishiyama T., Amano S., Coenzyme Q<sub>10</sub> protects against oxidative stress-induced cell death and enhances the synthesis of basement membrane components in dermal and epidermal cells, *Biofactors*, **35**(5): 435-441 (2009)
- 38) Zhang M., Dang L., Guo F., Wang X., Zhao W., Zhao R., Coenzyme Q<sub>10</sub> enhances dermal elastin expression, inhibits IL-1 $\alpha$  production and melanin synthesis in vitro, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **34**(3): 273-279 (2012)
- 39) Okamoto T., Fukunaga Y., Ida Y., Kishi T., Determination of reduced and total ubiquinones in biological materials by liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, **430**(1): 11-19 (1988)
- 40) Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254 (1976)
- 41) Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**(1-2): 55-63 (1983)
- 42) Murphy G., Docherty A.J., The matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Am. J. Respir.*

*Cell Mol. Biol.*, **7**(2): 120-125 (1992)

43) Fujimoto N., Mouri N., Iwata K., Ohuchi E., Okada Y., Hayakawa T., A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 2 (72-kDa gelatinase/type IV collagenase) using monoclonal antibodies, *Clin. Chim. Acta*, **221**(1-2): 91-103 (1993)

44) Matsuki H., Fujimoto N., Iwata K., Knäuper V., Okada Y., Hayakawa T., A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) using monoclonal antibodies, *Clin. Chim. Acta*, **244**(2): 129-143 (1996)

45) Nagata K., Saga S., Yamada K.M., A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein, *J. Cell Biol.*, **103**(1): 223-229 (1986)

46) Nagata K., Yamada K.M., Phosphorylation and transformation sensitivity of a major collagen-binding protein of fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **261**(16): 7531-7536 (1986)

47) Saga S., Nagata K., Chen W.T., Yamada K.M., pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein, *J. Cell. Biol.*, **105**(1): 517-527 (1987)

48) Miyaishi O., Kozaki K., Saga S., Sato T., Hashizume Y., Age-related alteration of proline hydroxylase and collagen-binding heat shock protein (HSP47) expression in human fibroblasts, *Mech. Ageing Dev.*, **85**(1): 25-36 (1995)

49) Ezure T., Sugahara M., Amano S., Senescent dermal fibroblast negatively influence fibroblast extracellular matrix-related gene expression partly via secretion of complement factor D, *Biofactors*, **45**(4): 556-562 (2019)

50) Weber C., Bysted A., Hølmer G., Coenzyme Q<sub>10</sub> in the diet-daily intake and relative bioavailability, *Mol. Aspects Med.*, **18**: 251-254 (1997)

51) Zhang Y., Åberg F., Appelkvist E.L., Dallner G., Ernster L., Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats, *J. Nutr.*, **125**(3): 446-453 (1995)

52) Bhagavan H.N., Chopra R.K., Craft N.E., Chitchumroonchokchai C., Failla M.L., Assessment of coenzyme Q10 absorption using an *in vitro* digestion-Caco-2 cell model, *Int. J. Pharm.*, **333**(1-2): 112-117 (2006)

53) Bergamini C., Moruzzi N., Sblendido A., Lenaz G., Fato R., A water soluble CoQ<sub>10</sub> formulation improves intracellular distribution and promotes mitochondrial respiration in cultured cells, *PLoS One*, **7**(3): e33712 (2012)

54) Nukui K., Yamagishi T., Miyawaki H., Kettawan A., Okamoto T., Belardinelli R., Tiano L., Littarru G.P., Sato K., Blood CoQ<sub>10</sub> levels and safety profile after single-dose or chronic administration of PureSorb-Q<sup>TM</sup>40: Animal and human studies, *Biofactors*, **32**(1-4): 209-219 (2008)

55) Shindo Y., Witt E., Han D., Epstein W., Packer L., Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **102**(1): 122-124 (1994)

56) Åberg F., Appelkvist E.L., Dallner G., Ernster L., Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues, *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**(2): 230-234 (1992)



- 57) Harman D., Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **11**(3): 298-300 (1956)
- 58) López-Otin C., Blasco MA., Partridge L., Serrano M., Kroemer G., The hallmarks of aging, *Cell*, **153**(6): 1194-1217 (2013)
- 59) Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley G., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(20): 9363-9367 (1995)
- 60) Wang J., Huang J., Wang L., Chen C., Yang D., Jin M., Bai C., Song Y., Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK-NF- $\kappa$ B signaling pathway, *J. Thorac. Dis.*, **9**(11): 4398-4412 (2017)
- 61) Rodier F., Campisi J., Bhaumik D., Two faces of p53: aging and tumor suppression, *Nucleic Acids Res.*, **35**(22): 7475-7484 (2007)
- 62) Rodier F., Coppé J.P., Patil C.K., Hoeijmakers W.A., Muñoz D.P., Raza S.R., Freund A., Campeau E., Davalos A.R., Campisi J., Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion, *Nat. Cell Biol.*, **11**(8): 973-979 (2009)
- 63) Freund A., Patil C.K., Campisi J., p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype, *EMBO J.*, **30**(8): 1536-1548 (2011)
- 64) Yzydorczyk C., Li N., Chehade H., Mosig D., Bidho M., Keshavjee B., Armengaud J.B., Nardou K., Siddeek B., Benahmed M., Vergely C., Simeoni U., Transient postnatal overfeeding causes liver stress-induced premature senescence in adult mice, *Sic. Rep.*, **7**(1): 12911 (2017)
- 65) Xiao H., Xiong L., Song X., Jin P., Chen L., Chen X., Yao H., Wang Y., Wang L., *Angelica sinensis* polysaccharides ameliorate stress-induced premature senescence of hematopoietic cell via protecting bone marrow stromal cells from oxidative injuries caused by 5-fluorouracil, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(11): E2265 (2017)
- 66) Chen Q.M., Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **908**: 111-125 (2000)
- 67) Qin D., Ren R., Jia C., Lu Y., Yang Q., Chen L., Wu X., Zhu J., Yang P., Zhou Y., Zhu N., Bi B., Liu T., Rapamycin protects skin fibroblasts from ultraviolet B-induced photoaging by suppressing the production of reactive oxygen species, *Cell Physiol. Biochem.*, **46**(5): 1849-1860 (2018)
- 68) Coppé J.P., Patil C.K., Rodier F., Sun Y., Muñoz D.P., Goldstein J., Nelson P.S., Desprez P.Y., Campisi J., Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor, *PLoS Biol.*, **6**(12), 2853-2868 (2008).
- 69) Maciel-Barón L.A., Morales-Rosales S.L., Aquino-Cruz A.A., Triana-Martínez F., Galván-Arzate S., Luna-López A., González-Puertos V.Y., López-Díazguerrero N.E., Torres C., Königsberg M., Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli, *Age*, **38**(1): s11357-016-9886-1 (2016)

- 70) Schmelzer C., Lorenz G., Rimbach G., Döring F., *In vitro* effects of the reduced form of Coenzyme Q<sub>10</sub> on secretion levels of TNF- $\alpha$  and chemokines in response to LPS in the human monocytic cell line THP-1, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **44**(1): 62-66 (2009)
- 71) Schmelzer C., Lorenz G., Lindner I., Rimbach G., Niklowitz P., Döring F., Effects of Coenzyme Q<sub>10</sub> on TNF- $\alpha$  secretion in human and murine monocytic cell lines, *Biofactors*, **31**(1): 35-41 (2007)
- 72) Sumi K., Okura T., Fujioka Y., Kato M., Imamura T., Taniguchi S.I., Yamamoto K., Coenzyme Q<sub>10</sub> suppresses apoptosis of mouse pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6, *Diabetol. Metab. Syndr.*, **10**(47): s13098-018-0351-4 (2018)
- 73) Chen C.C., Liou S.W., Chen C.C., Chen W.C., Hu F.R., Wang I.J., Lin S.J., Coenzyme Q<sub>10</sub> rescues ethanol-induced corneal fibroblast apoptosis through the inhibition of caspase-2 activation, *J. Biol. Chem.*, **288**(17): 11689-11704 (2013)
- 74) Groneberg D.A., Kindermann B., Althammer M., Klapper M., Vormann J., Littarru G.P., Döring F., Coenzyme Q<sub>10</sub> affects expression of genes involved in cell signaling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**(6): 1208-1218 (2005)
- 75) Schmelzer C., Döring F., Identification of LPS-inducible genes downregulated by ubiquinone in human THP-1 monocytes, *Biofactors*, **36**(3): 222-228 (2010)
- 76) Zahedi H., Eghtesadi S., Seifirad S., Rezaee N., Shidfar F., Heydari I., Golestan B., Jazayeri S., Effects of CoQ<sub>10</sub> supplementation on lipid profiles and glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized, double blind, placebo-controlled trial, *J. Diabetes metab. Disord.*, **13**(81): s40200-014-0081-6. (2014)
- 77) Kumar A., Kaur H., Devi P., Mohan V., Role of coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) in cardiac disease, hypertension and meniere-like syndrome, *Pharmacol. Ther.*, **124**(3): 259-268 (2009)
- 78) Dumont M., Kipiani K., Yu F., Wille E., Katz M., Calingasan N.Y., Gouras G.K., Lin M.T., Beal M.F., Coenzyme Q<sub>10</sub> decreases amyloid pathology and improves behavior in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **27**(1): 211-223 (2011)
- 79) Muthukumar K., Leahy S., Harrison K., Sikorska M., Sandhu J.K., Cohen J., Keshan C., Lopatin D., Miller H., Borowy-Borowski H., Lanthier P., Weinstock S., Pandey S., Orally delivered water soluble Coenzyme Q<sub>10</sub> (Ubisol-Q<sub>10</sub>) blocks on-going neurodegeneration in rats exposed to paraquat: potential for therapeutic application in Parkinson's disease, *BMC Neurosci.*, **15**(21): 1471-2202-15-21 (2014)
- 80) Stocker R., Bowry V.W., Frei B., Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does  $\alpha$ -tocopherol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**(5): 1646-1650 (1991)
- 81) Yan J., Fujii K., Yao J., Kishida H., Hosoe K., Sawashita J., Takeda T., Mori M., Higuchi K., Reduced coenzyme Q<sub>10</sub> supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice, *Exp. Gerontol.*, **41**(2): 130-140 (2006)

- 82) Quiles J.L., Ochoa J.J., Huertas J.R., Mataix J., Coenzyme Q supplementation protects from age-related DNA double-strand breaks and increases lifespan in rats fed on a PUFA-rich diet, *Exp. Gerontol.*, **39**(2): 189-194 (2004)
- 83) Chen B.H., Wen Y., Li H., Polan M.L., Collagen metabolism and turnover in women with stress urinary incontinence and pelvic prolapse, *Int. Urogynecol. J. Floor Dysfunct.*, **13**(2): 80-87 (2002)
- 84) Dasgupta J., Kar S., Liu R., Joseph J., Kalyanaraman B., Remington S.J., Chen C., Melendez J.A., Reactive oxygen species control senescence-associated matrix metalloproteinase-1 through c-Jun-N-terminal kinase, *J. Cell. Physiol.*, **255**(1): 52-62 (2010)
- 85) Lee B.Y., Han J.A., Im J.S., Morrone A., Johung K., Goodwin E.C., Kleijer W.J., DiMaio D., Hwang E.S., Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase, *Aging Cell*, **5**(2): 187-195 (2006)
- 86) Yoshimoto S., Loo T.M., Atarashi K., Kanda H., Sato S., Oyadomari S., Iwakura Y., Oshima K., Morita H., Hattori M., Honda K., Ishikawa Y., Hara E., Ohtani N., Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome, *Nature*, **499**(7456): 97-101 (2013)
- 87) Rodier F., Campisi J., Four faces of cellular senescence, *J. Cell Biol.*, **192**(4): 547-556 (2011)
- 88) Minamino T., Miyauchi H., Yoshida T., Ishida Y., Yoshida H., Komuro I., Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction, *Circulation*, **105**(13): 1541-1544 (2002)
- 89) Minamino T., Orimo M., Shimizu I., Kunieda T., Yokoyama M., Ito T., Nojima A., Nabetani A., Oike Y., Matsubara H., Ishikawa F., Komuro I., A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance, *Nat. Med.*, **15**(9): 1082-1087 (2009)
- 90) Baker D.J., Wijshake T., Tchkonian T., LeBrasseur N.K., Childs B.G., van de Sluis B., Kirkland J.L., van Deursen J.M., Clearance of p16<sup>Ink4a</sup>-positive senescent cells delays ageing-associated disorders, *Nature*, **479**(7372): 232-236 (2011)
- 91) Baker D.J., Childs B.G., Durik M., Wijers M.E., Sieben C.J., Zhong J., Saltness R.A., Jeganathan K.B., Verzosa G.C., Pezeshki A., Khazaie K., Miller J.D., van Deursen J.M., Naturally occurring p16<sup>Ink4a</sup>-positive cells shorten healthy lifespan, *Nature*, **530**(7589): 184-189 (2016)
- 92) Satoh A., Yokozawa T., Tanaka T., Okamoto Y., Sei Y., The antioxidative activity of Kangen-karyu extract delays senescence of human lung fibroblasts, *J. Trad. Med.*, **21**(2): 87-93 (2004)
- 93) 井出 利憲, 細胞増殖のしくみ-細胞周期, 癌遺伝子, 細胞老化-, *YAKUGAKU ZASSHI*, **126**(11): 1087-1115 (2006)
- 94) Lambert C.A., Lapierre C.M., Nusgens B.V., An interleukin-1 loop is induced in human skin fibroblasts upon stress relaxation in a three-dimensional collagen gel but is not involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase 1, *J. Biol. Chem.*, **273**(36): 23143-23149 (1998)
- 95) Grimm S., Wolff E., Walter C., Pabst A.M., Mundethu A., Jacobs C., Wehrbein H., Jacobs C., Influence of clodronate and compressive force on IL-1 $\beta$ -stimulated human periodontal ligament

- fibroblasts, *Clin. Oral Investig.*, **24**(1): 343-350 (2020)
- 96) Vincenti M.P., Coon C.I., Mengshol J.A., Yocum S., Mitchell P., Brinckerhoff C.E., Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblasts: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1), *Biochem. J.*, **331**(1): 341-346 (1998)
- 97) Nakamura M., Ohsawa S., Igaki T., Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*, *Nat. Commun.*, **5**(5264): 6264 (2014)
- 98) Franceschi C., Campisi J., Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **1**: S4-S9 (2014)
- 99) Shaw A.C., Goldstein D.R., Montgomery R.R., Age-dependent dysregulation of innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **13**(12): 875-887 (2013)
- 100) Zhang H., Davies K.J.A., Forman H.J., Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**: 314-336 (2015)
- 101) Rizvi S.I., Maurya P.K., Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans, *Mol. Biotechnol.*, **37**(1): 58-61 (2007)
- 102) Vranković J., Age-related changes in antioxidant and glutathione S-transferase enzyme activities in the Asian clam, *Biochemistry*, **81**(3): 22-232 (2016)
- 103) Esposito D., Overall J., Grace M.H., Komarnytsky S., Lila M.A., Alaskan Berry extracts promote dermal wound repair through modulation of bioenergetics and integrin signaling, *Front. Pharmacol.*, 2019
- 104) Shin J.S., Han H.S., Lee S.B., Myung D.B., Lee K., Lee S.H., Kim H.J., Lee K.T., Chemical constituents from leaves of *hydrangea serrata* and their anti-photoaging effects on UVB-irradiated human fibroblasts, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**(3): 424-431 (2019)
- 105) Wu P.Y., Huang C.C., Chu Y., Huang Y.H., Lin P., Liu Y.H., Wen K.C., Lin C.Y., Hsu M.C., Chiang H.M., Alleviation of Ultraviolet B-induced photodamage by *Coffea arabica* extract in human skin fibroblasts and hairless mouse skin, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(4): E782 (2017)
- 106) Seo H., Kim C., Kim M.B., Hwang J.K., Anti-photoaging effect of korean mint (*Agastache rugosa* Kuntze) extract on UVB-irradiated human dermal fibroblasts, *Prev. Nutr. Food Sci.*, **24**(4): 442-448 (2019)
- 107) Wu P.Y., Lin T.Y., Hou C.W., Chang Q.X., Wen K.C., Lin C.Y., Chiang H.M., 1,2-bis [(3-methoxyphenyl)methyl] ethane-1,2-dicarboxylic acid reduces UVB-induced photodamage in vitro and in vivo, *Antioxidants*, **8**(10): E452 (2019)
- 108) Deng M., Xu Y., Yu Z., Wang X., Cai Y., Zheng H., Li W., Zhang W., Protective effect of fat extract on UVB-induced photoaging *in vitro* and *in vivo*, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019
- 109) Castelo-Branco C., Pons F., Gratacós E., Fortuny A., Vanrell J.A., González-Merlo J.,

- Relationship between skin collagen and bone changes during aging, *Maturitas.*, 18(3): 199-206 (1994)
- 110) Momose K., Rudney H., 3-Polyprenyl-4-hydroxybenzoate synthesis in the inner membrane of mitochondria from *p*-hydroxybenzoate and isopentenylpyrophosphate. A demonstration of isoprenoid synthesis in rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **247**(12): 3930-3940 (1972)
- 111) Mugoni V., Postel R., Catanzaro V., De Luca E., Turco E., Digilio G., Silengo L., Murphy M.P., Medana C., Stainier D.Y., Bakkers J., Santoro M.M., Ubiad1 is an antioxidant enzyme that regulates eNOS activity by CoQ<sub>10</sub> synthesis, *Cell*, **152**(3): 504-518 (2013)
- 112) Hamilton S.J., Chew G.T., Watts G.F., Coenzyme Q<sub>10</sub> improves endothelial dysfunction in statin-treated type 2 diabetic patients, *Diabetes Care*, **32**(5): 810-812 (2009)
- 113) Henchcliffe C., Beal M.F., Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis, *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, **4**(11): 600-609 (2008)
- 114) Shults C.W., Haas R., Clinical trials of coenzyme Q<sub>10</sub> in neurological disorders, *Biofactors*, **25**(1-4): 117-126 (2005)
- 115) Yamamoto Y., Komuro E., Niki E., Antioxidant activity of ubiquinol in solution and phosphatidylcholine liposome, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **36**(5): 505-511 (1990)
- 116) Landi L., Cabrini L., Fiorentini D., Stefanelli C., Pedulli G.F., The antioxidant activity of ubiquinol-3 in homogeneous solution and in liposomes, *Chem. Phys. Lipids*, **61**(2): 121-130 (1992)
- 117) Hosoe K., Kitano M., Kishida H., Kubo H., Fujii K., Kitahara M., Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH<sup>TM</sup>) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **47**(1): 19-28 (2006)
- 118) Kettawan A., Kunthida C., Takahashi T., Kishi T., Chikazawa J., Sakata Y., Yano E., Watabe K., Yamamoto Y., Okamoto T., The quality control assessment of commercially available coenzyme Q<sub>10</sub>-containing dietary and health supplements in Japan, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **41**(2): 124-131 (2007)
- 119) Takahashi T., Mine Y., Okamoto T., Extracellular coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) is reduced to ubiquinol-10 by intact Hep G2 cells independent of intracellular CoQ<sub>10</sub> reduction, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **672**: 108067 (2019)
- 120) Langsjoen P.H., Langsjoen A.M., Comparison study of plasma coenzyme Q<sub>10</sub> levels in healthy subjects supplemented with ubiquinol versus ubiquinone, *Clin. Pharmacol. Drug Dev.*, **3**(1): 13-17 (2014)
- 121) Schniertschauer D., Gebhard D., Bergemann J., Age-dependent loss of mitochondrial function in epithelial tissue can be reversed by Coenzyme Q<sub>10</sub>, *J. Aging Res.*, 2018
- 122) Nakazawa H., Ikeda K., Shinozaki S., Yasuhara S., Yu Y.M., Martyn J.A.J., Tompkins R.G., Yorozu T., Inoue S., Kaneki M., Coenzyme Q<sub>10</sub> protects against burn-induced mitochondrial dysfunction and impaired insulin signaling in mouse skeletal muscle, *FEBS Open Bio*, **9**(2): 348-363 (2019)

- 123) Niu Y.J., Zhou W., Nie Z.W., Zhou D., Xu Y.N., Ock S.A., Yan C.G., Cui X.S., Ubiquinol-10 delays postovulatory oocyte aging by improving mitochondrial renewal in pigs, *Aging*, **12**(2): 1256-1271 (2020)
- 124) Andreani C., Bartolacci C., Guescini M., Battistelli M., Stocchi V., Orland F., Provinciali M., Amici A., Marchini C., Tiano L., Orlando P., Silvestri S., Combination of Coenzyme Q<sub>10</sub> intake and moderate physical activity counteracts mitochondrial dysfunctions in a SAMP8 mouse model, *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2018
- 125) Alf D., Schmidt M.E., Siebrecht S.C., Ubiquinol supplementation enhances peak power production in trained athletes: a double-blind, placebo controlled study, *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 2013
- 126) Chen H.C., Huang C.C., Lin T.J., Hsu M.C., Hsu Y.J., Ubiquinol supplementation alters exercise induced fatigue by increasing lipid utilization in mice, *Nutrients*, 2019
- 127) Tian G., Sawashita J., Kubo H., Nishio S.Y., Hashimoto S., Suzuki N., Yoshimura H., Tsuruoka M., Wang Y., Liu Y., Luo H., Xu Z., Mori M., Kitano M., Hosoe K., Takeda T., Usami S., Highchi K., Ubiquinol-10 supplementation activates mitochondria functions to decelerate senescence in senescence-accelerated mice, *Antioxid. Redox Signal*, **20**(16): 2606-2620 (2014)

## 主論文

1. Mine Y., Takahashi T., Okamoto T., Stimulatory effects of collagen production induced by coenzyme Q<sub>10</sub> in cultured skin fibroblasts. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, <https://doi.org/10.3164/jcbn.20-187> (in press)
2. Mine Y., Takahashi T., Okamoto T., Protective effects of coenzyme Q<sub>10</sub> on cell damage induced by hydrogen peroxides in cultured skin fibroblasts. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **69**(3): 247-255 (2021)

## 副論文

1. Takahashi T., Mine Y., Okamoto T., 2,3-Dimethoxy-5-methyl-*p*-benzoquinone (coenzyme Q<sub>0</sub>) disrupts carbohydrate metabolism of HeLa cells by adduct formation with intracellular free sulfhydryl-groups, and induces ATP depletion and necrosis, *Biol. Pharm. Bull.*, **41**(12): 1809-1817 (2018)
2. Takahashi T., Mine Y., Okamoto T., Intracellular reduction of coenzyme Q homologues with a short isoprenoid side chain induces apoptosis of HeLa cells, *J. Biochem.*, **163**(4): 329-339 (2018)
3. Takahashi T., Mine Y., Okamoto T., Extracellular coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) is reduced to ubiquinol-10 by intact Hep G2 cells independent of intracellular CoQ<sub>10</sub> reduction, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **672**: 108067 (2019)
4. 岡本正志, 峯幸稔, 健康食品の安全性と品質管理ーコエンザイム Q<sub>10</sub> 含有健康食品の品質管理, *FRAGRANCE JOURNAL*, **47**(1): 19-24 (2019)