

予備審査の学位論文の要旨
(又は, 学位論文の要旨)

No.....

論文題名 Coenzyme Q ₁₀ 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	
氏 名 峯 幸稔	（ 学籍番号若しくは 所属機関名 9416103 ）
主 論 文	
1. Mine Y., Takahashi T., Ichihashi M., Okamoto T. Stimulatory effects of collagen production induced by coenzyme Q ₁₀ in cultured skin fibroblasts. <i>J. Clin. Biochem. Nutr.</i> , https://doi.org/10.3164/jcfn.20-187 (in press)	
2. Mine Y., Takahashi T., Okamoto T. Protective effects of coenzyme Q ₁₀ on cell damage induced by hydrogen peroxides in cultured skin fibroblasts. <i>J. Clin. Biochem. Nutr.</i> , 69 (3): 247-255 (2021)	

序 章

Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) 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担っている。また、還元型 CoQ₁₀ は脂溶性の抗酸化物質として生体内の種々の酸化ストレスに対して強い防御作用を示す。生体中の CoQ₁₀ は酸化型と還元型の両方で存在しており、血清や肝臓中ではとくに CoQ₁₀ の還元比 (還元型 CoQ₁₀/総 (酸化型+還元型) CoQ₁₀) が高い。さらに、還元型 CoQ₁₀ は酸化型より抗酸化作用が強いが、空気中では不安定であり容易に酸化されてしまう。このような二つの重要な生理作用を有する CoQ₁₀ は、ヒト組織に広く分布しているが、それぞれの組織の間で CoQ₁₀ 含量は異なっている。一方、生体内 CoQ₁₀ 含量は加齢とともに減少することが知られており、このことから老化や加齢性疾患との関りが強く示唆されている。そのため我が国のような高齢化社会では、CoQ₁₀ への関心が高く、その有効性が期待されているところである。しかしながら、CoQ₁₀ の皮膚線維芽細胞に及ぼす影響や安定な還元型 CoQ₁₀ の作製方法やその生体内動態、さらには、老化様モデル細胞を用いた CoQ₁₀ のアンチエイジング作用についての詳細な検討は未だなされていない。

そのため、この研究では、老化関連疾患の予防や健康寿命延伸の一助となることを目的として、水溶化 CoQ₁₀ の皮膚老化に対するアンチエイジング効果の基礎的検討を行った。

第 1 章 CoQ₁₀ 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

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 2m² の面積を持つ。真皮に存在する細胞外マトリックス (ECM : extracellular matrix) の代表的な一つであるコラーゲンは線維芽細胞から産生され、真皮の約 70% 以上を構成している重要なタンパク質であり、皮膚に張りや弾力を与える役割を持っている。このコラーゲンは加齢とともに産生が減少し、コラーゲン分解酵素である MMP (matrix metalloproteinase) の発現が増加することが知られている²⁾。このような状況を鑑み、CoQ₁₀ は 2001 年から健康食品やサプリメントとして広く流通され、加齢に伴う生活習慣病の予防のために利用されている。しかしながら、CoQ₁₀ の皮膚線維芽細胞に対する詳細な生理作用は不明である。そのため、我々は系統的かつ詳細な研究が十分なされていない培養ヒト皮膚線維芽細胞に対する CoQ₁₀ のコラーゲン産生に対する効果を検討した。

ヒト皮膚線維芽細胞 (新生児由来) は Lonza Inc. より購入し、培養 5 日目の細胞を実験に供した。細胞増殖能は MTT アッセイ法、I、IV、VII 型コラーゲン、II、VIII 型 MMP、エラスチンならびに HSP47 の mRNA 量は RT-PCR 法、I 型コラーゲンタンパク質量は蛍光免疫染色法、細胞内の CoQ₁₀ 量は HPLC-ECD 法にて測定した。水溶化 CoQ₁₀ (アクア Q10 P40) は日清ファルマより恵与を受けた。

1 μM 以上の CoQ₁₀ の添加は、培養ヒト皮膚線維芽細胞内の CoQ₁₀ 量や細胞増殖能を上昇させた。また、CoQ₁₀ は I、IV、VII 型コラーゲン、エラスチンならびに HSP47 の mRNA 量も上昇させ、I 型コラーゲンタンパク質量も増加させた。一方、II 型、VIII 型 MMP の mRNA 量には影響を与えなかった。

これらの結果は、コラーゲン産生増加をはじめとする CoQ₁₀ の皮膚線維芽細胞への有効性、また、皮膚老化に対するアンチエイジング作用への可能性、さらには、高齢者社会を迎えたわが国での CoQ₁₀ の新たな生理作用に基づく可能性を示唆した。

第 2 章 CoQ₁₀ によるヒト皮膚線維芽 SIPS モデル細胞へのアンチエイジング効果

細胞老化は、細胞に不可逆的な細胞周期の停止が起こる現象であり 1960 年代に Hayflick によって見出された現象である³⁾。細胞老化には DDR (DNA damage response)、テロメアの短縮、テロメアの摩耗、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などが原因として知られている⁴⁾。この中でも特に、酸化ストレスによる細胞老化はフリーラジカル仮説として提唱されており⁵⁾、老化や加齢性疾患に強く関与しているとされる。これまでに、加齢性疾患の発症予防には、細胞老化の特徴的な表現型である SA-βgal (Senescence-associated β-galactosidase) の陽性染色や細胞の扁平化、活性酸素種 (ROS) や Senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子の産生を抑制することが有効な手段であると考えられている。さらに、SIPS (Stress-induced premature senescence) モデルと呼ばれる老化様モデル細胞の作製も盛んに報告されており、加齢性疾患の予防を

目的とした老化研究が急速に進展しつつある。そのため今回、過酸化水素により誘導した SIPS モデルを作成し、CoQ₁₀ のアンチエイジング作用について検討した。

ヒト皮膚線維芽細胞（新生児由来）は Lonza 社より購入し、培養 5 日目の細胞を実験に供した。細胞生存率は MTT アッセイ法、DAPI 染色により測定した。また、コラーゲン、MMP、IL-6、IL-8、p21 の mRNA 量は、RT-PCR 法にてそれぞれ測定した。細胞内の CoQ₁₀ 量は HPLC-ECD 法にて定量し、細胞内の ROS の検出は CM-H₂DCFDA 試薬により行った。細胞老化の特異的マーカーには SA-βgal の陽性染色を観察した。水溶化 CoQ₁₀（アクア Q10 P40）は日清ファルマより恵与を受けた。

CoQ₁₀ は SIPS モデルである老化様モデル細胞での ROS の産生増加や SA-βgal の陽性染色を抑制した。また、CoQ₁₀ は SASP 因子である IL-6、8 や MMP、そして老化マーカーである p21 の発現量を有意に減少させた。さらに、CoQ₁₀ は I 型コラーゲンタンパク質量を増加させた。

これらの結果より、過酸化水素により作成した SIPS モデルの老化様モデル細胞に対して観察される多くの細胞機能の低下を抑制できたことから CoQ₁₀ がアンチエイジング作用を発揮すること、また老化予防による健康寿命の増加に寄与する可能性を示唆した。

第 3 章 化学的に安定な還元型 CoQ₁₀ 含有新規ドリンク剤の開発

生体の CoQ₁₀ は生合成に由来する内因性 CoQ₁₀ と食品から供給される外因性 CoQ₁₀ によって賄われるとされている。この CoQ₁₀ はヒト血液中での存在型はそのほとんどが還元型である。これは生体内の酸化型 CoQ₁₀ が、NAD(P)H 依存性 CoQ 還元酵素、リポアミド脱水素酵素、チオレドキシニン還元酵素、さらには NAD(P)H-キノン酸化還元酵素 1 により還元されるためである。Yan らは還元型 CoQ₁₀ の食餌摂取により老化促進モデルマウスの加齢速度が減少したと報告している⁶⁾。しかしながら、還元型 CoQ₁₀ は空気中では極めて不安定であり容易に酸化型に変換されてしまう。そのため、空気中や水溶液中では不安定な外因性の還元型 CoQ₁₀ の生体内挙動などの詳細はいまだ明らかではない。そのため今回、酸化型 CoQ₁₀ とアスコルビン酸（Vit.C）を水溶液中で共存させて還元型 CoQ₁₀ の作製を行い、その細胞内への取り込み量などの基礎的検討を行った。

酸化型 CoQ₁₀ は Vit.C と水溶液中で共存させて、一定時間後の酸化型から還元型 CoQ₁₀ への変換量を HPLC-ECD 法で測定した。また、新生児培養皮膚線維芽細胞、HepG2 細胞への CoQ₁₀ 取り込み量などもあわせて検討した。なお、酸化型 CoQ₁₀（水溶化 CoQ₁₀（アクア Q10P40））は、日清ファルマ株式会社健康科学研究所から恵与を受けた。

25°C 遮光下、水溶液中で酸化型 CoQ₁₀ を Vit.C と共存させると、Vit.C の濃度依存的に水溶液中での酸化型から還元型 CoQ₁₀ への変換量は上昇した。なかでも、水溶液中での酸化型 CoQ₁₀ と Vit.C との含量比が 1 : 100 の際には、その還元型 CoQ₁₀ への変換量は共存 30 日後に約 70% まで上昇した。また、酸化型から還元型 CoQ₁₀ への変換量は、共存温度によっても差が見られた。さらに酸化型と還元型 CoQ₁₀ の細胞内取り込み量を比較したところ、還元型 CoQ₁₀ 添加群の方が両細胞とも高い細胞内 CoQ₁₀ 含量を示した。

これらの比較的安定な還元型 CoQ₁₀ の作製は、アンチエイジング作用を基盤とした加齢性疾患への還元型 CoQ₁₀ の代謝研究、さらには新しい還元型 CoQ₁₀ 含有ドリンク剤への開発を通じた健康寿命の延伸に有用な手段となる可能性を示唆した。

総括

皮膚老化には、生体内コラーゲン量が重要な役割を果たしている。これは、老化とともにコラーゲン含量が減少し、コラーゲン分解や酸化ストレスなどの原因となる SASP 因子（特に MMP）が増加することに由来している。これらを改善することは、アンチエイジング作用による皮膚老化の改善作用に大きく貢献できる。本研究の第 1 章では、コラーゲンを産生する皮膚線維芽細胞への CoQ₁₀ の影響を検討した。その結果、CoQ₁₀ のコラーゲン産生増加作用、エラスチンや HSP47 の増加による成熟したコラーゲンタンパク質量の増加を認めた。第 2 章では、過酸化水素を用いて作成した SIPS 由来の老化様モデル細胞を作成して CoQ₁₀ のアンチエイジング効果を観察した。その結果、CoQ₁₀ は ROS や SASP 因子の産生抑制作用やコラーゲン分解抑制効果を有することが観察された。

ヒト生体中の CoQ₁₀ 含量は加齢に伴い減少する⁷⁾。それゆえ CoQ₁₀ をサプリメント等の形で経口的に摂取することで、加齢による生体内 CoQ₁₀ 含量の減少を防止することができる。

しかしながら、CoQ₁₀は消化管や皮膚からの吸収性が低いため、吸収性の向上を目指した製剤開発（ミセル化や包接化）が多くなされており、外因性 CoQ₁₀の吸収率の向上が求められている。第3章では、Vit.C と CoQ₁₀を水溶液中で共存させることで還元型への変換率が向上すること、細胞内への CoQ₁₀の取り込み率が酸化型と比較し還元型で上昇することが認められた。

近年、我が国は超高齢社会に直面しており、健康寿命を延長すべく公衆衛生上のさまざまな対策が立案されている。本研究により得られた知見が、今後、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、健康寿命延伸のために少しでも寄与できれば幸いである。

文 献

- 1) 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)
- 2) Varani J., Warner R. L., Gharaee-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**: 480-486 (2000)
- 3) Hayflick L., The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp Cell Res*, **37**: 614-636 (1965)
- 4) Carlos López-Otín, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, Guido Kroemer, The hallmarks of aging, *Cell*, **153**(6): 1194-1217 (2013)
- 5) Harman D., Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry, *J Gerontol*, **11**(3): 298-300 (1956)
- 6) Yan J., Fujii K., Yao J., Kishida H., Hosoe K., Sawashita J., Takeda T., Mori M., Higuchi K., Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in SAMP1 mice, *Exp Gerontol*, **41**(2): 130-140 (2006)