

総 説

皮膚の酸化ストレス
Oxydative Stress in Skin

川 内 康 弘
Yasuhiro KAWACHI

東京医科大学茨城医療センター皮膚科
Department of Dermatology, Ibaraki Medical Center, Tokyo Medical University

はじめに

活性酸素種やフリーラジカルは、生体の恒常性維持に欠かせない生理活性物質であると同時に、過剰に存在すると核酸、蛋白、脂質を酸化することにより生体に有害な作用を及ぼし、これを酸化ストレスと呼ぶ。皮膚においても、酸化ストレスは、様々な皮膚疾患、発癌、老化などに密接に関わっていると考えられている。一方、生体は酸化ストレスを消去・中和する仕組みも備えており、表皮においても他臓器と同様にグルタチオンやカタラーゼなど多様な因子が抗酸化因子として働いている。表皮においては、ロリクリン、SPRR (small proline-rich protein) などのシステイン残基に富む角層構成蛋白が表皮特異的抗酸化因子としても機能している。本稿では、表皮の酸化ストレスと抗酸化ストレス機構の種類と構成、最近同定された誘導的抗酸化機構の鍵となるNrf2-Keap1システムについて概説する。

1. 活性酸素種と酸化ストレス

活性酸素種 (Reactive oxygen species ; ROS) は、定常状態の酸素分子に比べて化学反応性が高まった酸素分子とその関連分子種のことである¹⁾。一方、ROSと混同されやすい用語としてフリーラジカル

があるが、フリーラジカルは、1個以上の不対電子を持つ分子種のことであり、ROSとは定義が異なる。ROSは不対電子を持つ①ラジカル種と不対電子を持たない②非ラジカル種に大きく分けられる。①ラジカル種には、スーパーオキシド ($\cdot\text{O}_2^-$)、ヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$)、ヒドロペルオキシルラジカル ($\text{HOO}\cdot$)、一酸化窒素 (NO) などがあり、②非ラジカル種には過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、ペルオキシニトライト ($\text{ONOO}\cdot$)、脂質ヒドロペルオキシド (LOOH)、次亜塩素酸 (HOCl)、オゾン (O_3)、などがある²⁾。表1に皮膚に関連の深いROSを挙げる (表1)³⁾。これらのROSは、MAPキナーゼ系、チロシンリン酸化系、イノシトールリン脂質系など主要なシグナル伝達系のセカンドメッセンジャーとなり、細胞の増殖と分化の制御やマクロファージなどの食細胞における殺菌作用など生命活動に欠かせない必須分子であると同時に、過剰のROSは細胞・組織に障害を与え、有害であると考えられている。このROSによる生体への有害作用を酸化ストレスと呼ぶ¹⁾。皮膚に対して酸化ストレスは、皮膚炎反応の増強、サンバーン・シミ・シワなどの紫外線による急性・慢性皮膚反応促進、扁平上皮癌、悪性黒色腫などの発癌促進など種々の皮膚疾患や皮膚老化促進などに重要な役

平成27年3月19日受付、平成27年4月10日受理

キーワード：表皮、活性酸素種、酸化ストレス、紫外線、Nrf2、Keap1

(別冊請求先：〒300-0395 茨城県稲敷郡阿見町中央3-20-1 東京医科大学茨城医療センター)

TEL : 029-887-1161 FAX : 029-887-6266

表1 皮膚に関係の深い ROS³⁾

	記号	産生源	半減期 (秒)
一重項酸素	$^1\text{O}_2$	紫外線 (UV)	10^{-6}
ヒドロゲンペルオキシド	HOOH	代謝系	長時間
スーパーオキシド	O_2^-	代謝系・UV	長時間
ヒドロキシラジカル	$\cdot\text{OH}$	金属触媒反応	10^{-6}
アルコキシラジカル	$\text{R}\cdot$	二次化学反応	10^{-6}
アルキルペルオキシラジカル	$\text{RCOO}\cdot$	二次化学反応	1-10
一酸化窒素	$\text{NO}\cdot$	代謝系・環境汚染	1-10
ペロキシニトライト	ONOO^-	環境汚染	長時間
オゾン	O_3	環境汚染	短時間

割を果たしていると考えられている。

2. ROSの産生系

生体内では、細胞ミトコンドリアにおける呼吸過程や解毒 (チトクロム P-450 レダクターゼ)、虚血・再灌流・プリン体代謝 (キサンチンオキシダーゼ)、脂質酸化 (リポキシゲナーゼ)、好中球・単球マクロファージの食作用 (ミエロペルオキシダーゼ、NADPH オキシダーゼ)、アラキドン酸代謝 (シクロオキシゲナーゼ) などの際に ROS が生じる。これらの内因性 ROS に加えて、電離放射線、紫外線、重金属、化学オキシダントなどの環境・外的要因でも大量の ROS が産生される (図1)。これらの反応では最初にスーパーオキシドが産生される。このスーパーオキシドからスーパーオキシドジムスター

ゼ (SOD) の作用により過酸化水素が産生され、さらに過酸化水素は鉄イオン、銅イオンなどの金属イオン存在下でフェントン反応によりヒドロキシラジカルを生じる (図2)。紫外線の場合はスーパーオキシドに加え、一重項酸素も産生される。ヒドロキシラジカルと一重項酸素は、寿命は短いが特に反応性の高い ROS として知られ^{4,5)}、細胞・組織を強く傷害する。主として紫外線によって産生される一重項酸素は、皮膚における酸化ストレス源として重要である。

3. ROSの消去系

上記のように、過剰な ROS は、DNA、蛋白、脂質、糖などの生体構成物質を攻撃し、酵素不活性化、脂質や糖の酸化、DNA 切断や塩基修飾などを引き起

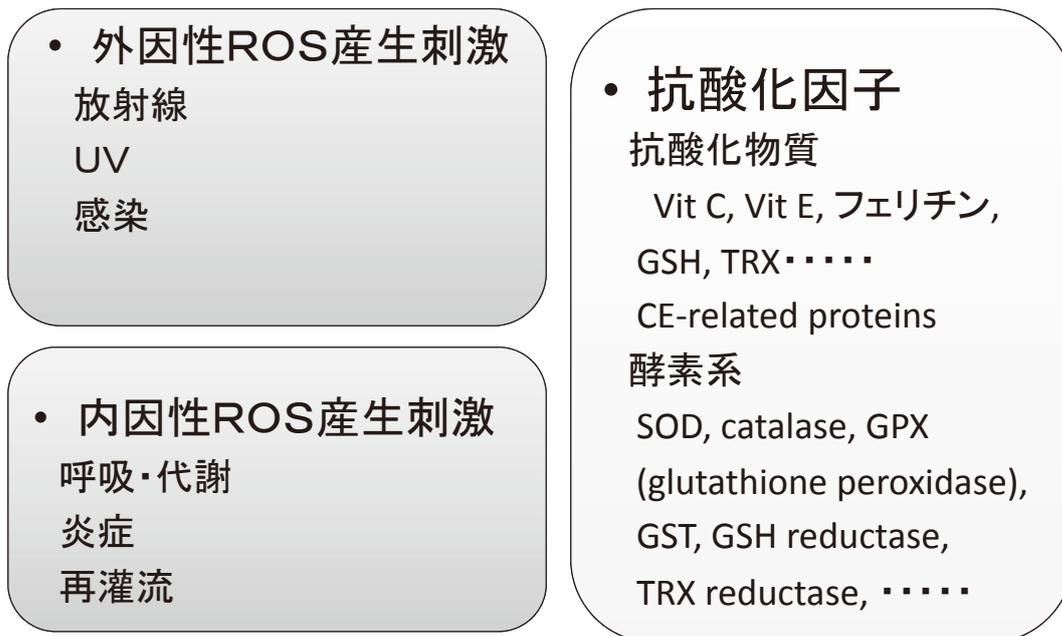


図1 ROSの産生刺激と抗酸化因子

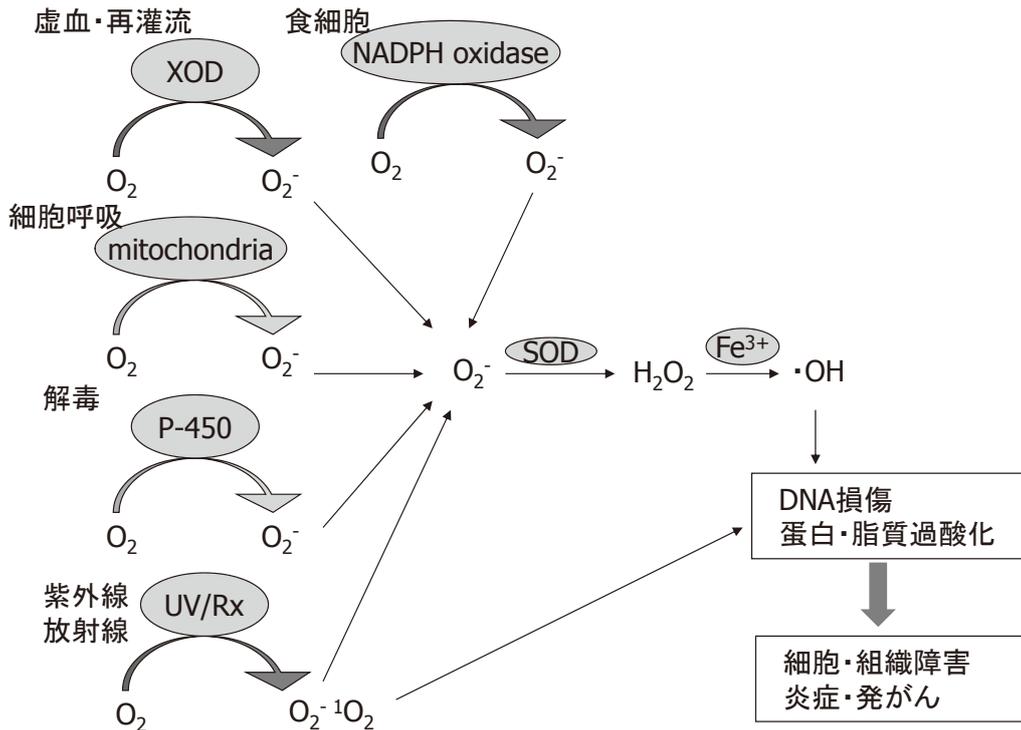


図2 ROSの産生系

表2 抗酸化物質の種類

ROS 産生抑制系	カタラーゼ、スーパーオキシドジムスターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX)、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) グルタチオンレダクターゼ、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) など
スカベンジャー (補足) 系	尿酸、カロテノイド、ビリルビン、アルブミン、フラボノイド ビタミンC、ビタミンE、など
修復・再生系	DNA 修復酵素、プロテアーゼ、リパーゼなど

こすことによって様々な生命活動の阻害や疾病、発癌、老化の促進などに関わっていると考えられている⁶⁾。これらの過剰な ROS による有害作用 (酸化ストレス) に対して、生体は酸化ストレスを防御するしくみを備えており、これらを抗酸化機構と呼ぶ。この抗酸化機構は、① ROS 産生抑制系、② スカベンジャー (補足) 系、③ 修復・再生系、の3つに分類される (表2)。また、抗酸化機構を担う担体は抗酸化因子と呼ばれ、大きく① 酵素系・② 非酵素系の2種類に分類される。大部分の酵素系抗酸化因子は ROS 産生抑制系に属し、非酵素系抗酸化物質はスカベンジャー系に属するものが多い。

1) ROS 産生抑制系

図1で示した ROS 産生経路を抑制することにより ROS 産生を防止する機構であり、主としてカタラーゼ、SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX)

などの酵素蛋白から構成され、酵素反応により ROS 産生を抑制・防止する (図3)。活性酸素種は、スーパーオキシドから過酸化水素、ヒドロキシラジカルと移り変わるが、その過程でスーパーオキシドジムスターゼ (SOD) はスーパーオキシドの消去、カタラーゼは過酸化水素の消去を担う。また、グルタチオンパーオキシターゼ、グルタチオンレダクターゼ、チオレドキシソレダクターゼ、パーオキシレドキシソは、グルタチオンやチオレドキシソの酸化・還元状態を制御することにより過酸化水素やヒドロキシラジカルを消去する。皮膚においては、特に SOD とカタラーゼの酵素活性が高く、皮膚における主要な ROS 産生抑制系である (表3)³⁾。

2) スカベンジャー (補足) 系

外因性、内因性を問わず既に発生した ROS が、標的分子を攻撃し酸化ストレスを与える前に捕捉

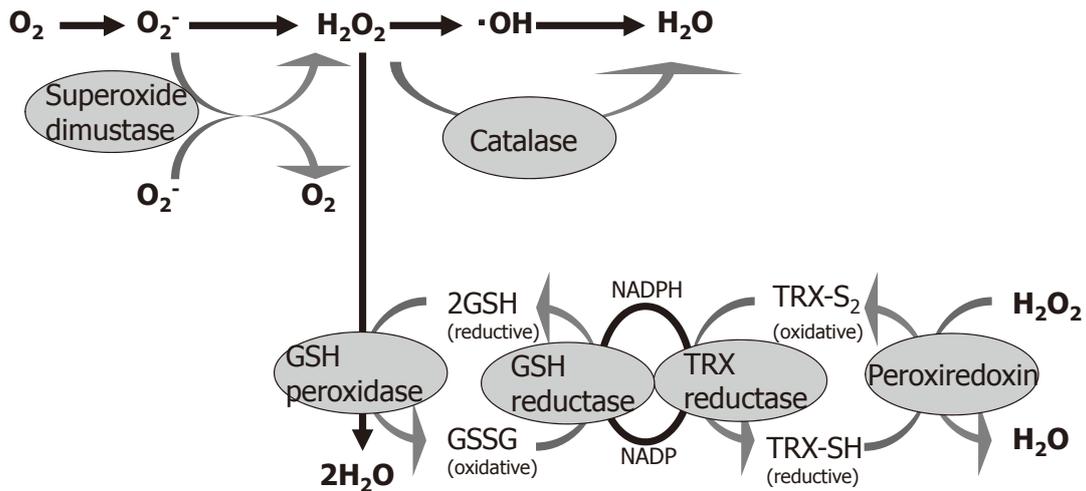


図3 ROSの消去系

表3 皮膚における抗酸化酵素活性分布³⁾

	酵素活性 (Unit/g 組織)	
	表皮	真皮
スーパーオキシドジムスターゼ (SOD)	816	361
カタラーゼ	2,912	355
グルタチオンペルオキシダーゼ	0.71	0.44
グルタチオンレダクターゼ	0.63	0.2
チオレドキシシンレダクターゼ	検出	検出
メチオニンスルフォキシドレダクターゼ	検出	検出

表4 皮膚における抗酸化物質濃度分布³⁾

	濃度 (nmol/mg 組織)	
	表皮	真皮
ビタミンE	34.2	18
ユビキノロン	7.66	3.15
ビタミンC	7,600	1,311
尿素	1,071	182
グルタチオン	484.3	84.8

し、中和・消去する。このカテゴリーに属するのは、ビタミンC、ビタミンE、β-カロテン、尿素、ビリルビン、ユビキノールなどの非酵素分子である。特に皮膚においては、ビタミンC、ビタミンE、尿素、グルタチオンなどが主要な抗酸化物質であり(表4)⁷⁾、さらに後述する角層構成蛋白やケラチン、フィラグリン分解産物であるアミノ酸などがROSに対する表皮特異的なスカベンジャーとして作用する。

3) 修復・再生系

酸化ストレスにより傷害を受けた分子を修復・再

生または分解処理を行うシステムであり、酸化変異を受けたDNAを修復する酵素であるオキシグアニングリコシラーゼ(OGG1)や酸化変性した蛋白を選択的に分解するマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)などのプロテアーゼがある。

4. 表皮特異的抗酸化機構

生体は、外界の高濃度酸素、紫外線、感染性病原体、化学物質等の酸化ストレス源に常にさらされている。特に紫外線は表皮に対する強力な酸化ストレス源である⁸⁾。表皮は未分化な基底層のケラチノサイトが外方へと移動しつつ分化(角化)し、有棘層、顆粒層、角層を形成する。すなわち外方の層ほど分化が進んでいる。これまでの研究では、種々の抗酸化因子は表皮の外方ほど多く分布しており⁹⁻¹¹⁾、これは外界からの酸化ストレスは外方の層ほど強くなるため、表皮を酸化ストレスから保護するための合目的方法であると考えられる(図4)。この抗酸化因子の濃度勾配は、主として後述する転写因子

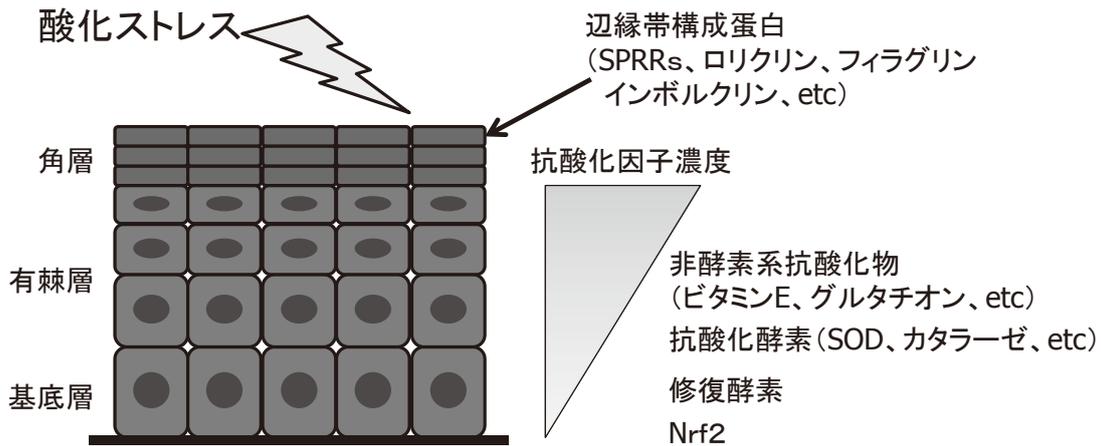


図4 表皮の酸化ストレスと抗酸化因子

Nrf2 の発現勾配により形成されている¹²⁻¹⁵⁾。角層は人体の最外層に位置して、外界からの有害刺激から生体内を守るバリア機構の要である¹⁶⁾。角層は、ROS に対してもその防御の最前線であり、特に、角層細胞の細胞膜である *cornified envelope* (角化外膜) とその構成タンパクが重要な役割を果たしていることがわかりつつある。角層の *cornified envelope* には、ロリクリンや SPRP などのシステイン残基やヒスチジン残基を豊富に含む蛋白群が大量に存在し、これらが表皮の抗酸化活性に寄与する¹⁷⁻²⁰⁾。フィラグリン分解産物であるアミノ酸も角質の抗酸化因子として作用する。特にこれらの蛋白、アミノ酸の SH 基 (チオール基) が酸化されて SS 結合 (ジスルフィド結合) を形成することで ROS を還元消去する。角層内でも外層ほど抗酸化因子濃度が高まる濃度勾配が存在する²¹⁾。

5. ROS と細胞内シグナル伝達系

紫外線や感染・炎症などの酸化ストレスにさらされた細胞では、酸化ストレスに対する応答として、細胞周期停止、DNA 損傷修復、抗酸化酵素系活性化などが誘導され、引き続いて細胞増殖、細胞分化、サイトカイン分泌などが誘導される。さらに修復できない程大量の酸化ストレスを受けると、アポトーシスを誘導するシグナル伝達系が誘導される (図5)。これらの酸化ストレスに対する反応は、レドックス感受性シグナル伝達系と呼ばれ、MAP キナーゼ系、イノシトールリン脂質系、プロテインチロシンキナーゼ系などが含まれる。レドックス感受性シグナル伝達系の下流にある代表的な転写因子は

NF-κB と AP-1 である。NF-κB と AP-1 は炎症や急性期反応を惹起する転写因子として知られており、サイトカインやケモカインの産生、血管内皮細胞の活性化、マトリクスメタロプロテナーゼの活性化を通して、皮膚の炎症症状悪化をプロモートする。レドックス感受性シグナル伝達系は、それらを構成する因子の反応残基の酸化還元状態がシグナル伝達のスイッチとなっている。多くの場合、酸化反応を受ける残基はシステイン残基のチオール基であり、細胞ストレスに対する反応においてセンサーの役割を果たしている。たとえば、ケラチノサイトの増殖やサイトカイン分泌を誘導する活性化された EGF 受容体や PDGF 受容体シグナルであるチロシンキナーゼ (PTK) シグナルでは、チロシンホスファターゼ (PTP) が、PTK によってリン酸化されたチロシン残基を脱リン酸化することにより PTK と動的平衡を保っている。そこに酸化ストレスがかかり、PTP のチオール基が酸化され、脱リン酸化活性が失活する。これにより PTK のリン酸化活性が充進し、シグナルが ON の状態となる。

6. 抗酸化ストレス応答系 Nrf2-Keap1

前述のように、細胞は酸化ストレスに対してこれを中和・消去するシステムを進化の過程で獲得した。多くの抗酸化蛋白質遺伝子の転写調節 (プロモーター) 領域には、抗オキシダント反応配列 (Anti-oxidant Responsive Element; ARE; 5'-A/GTGAC/GNNGCA/G-3') が存在し、酸化ストレスに反応して抗酸化蛋白質の転写を充進させることが知られていた²²⁾。この抗酸化蛋白群の発現を誘導・増強さ

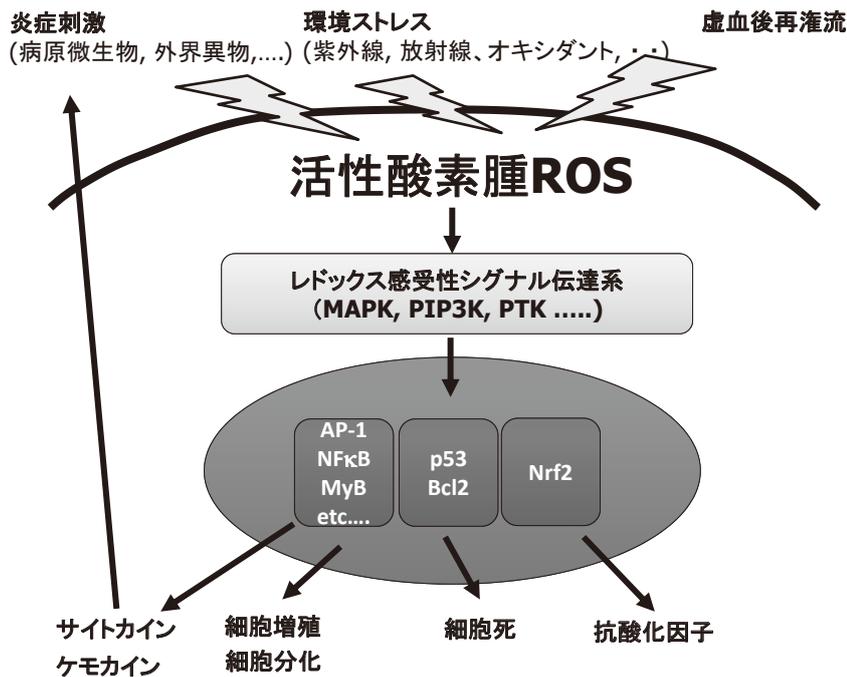


図5 細胞の酸化ストレス応答系

せる中心的システムが Nrf2-Keap1 系である^{23,24)}。

Nrf2 はロイシンジッパー構造をもつ転写因子で、皮膚を含む広範な組織に発現している²⁵⁾。Nrf2 は、定常状態ではアダプター蛋白 Keap1 と会合している。Keap1 は細胞質で Cullin3 (Cul3) と会合し、プロテアソーム分解酵素 E3 酵素複合体を形成することから、Keap1 との会合により細胞質にトラップされた Nrf2 は、ユビキチン化されプロテアソームにより分解されている²⁶⁾。細胞に ROS による酸化ストレスがかかると、Keap1 上のシステイン残基が酸化修飾を受けることにより、Keap1 による Nrf2 トラップが解除される²⁷⁾。Keap1 のトラップがはずれると、Nrf2 は核に移動する。この課程は、活性化刺激がかかると IκB のトラップがはずれて核に移動する NFκ-B と類似する。核に移行した Nrf2 は small Maf とヘテロダイマーを形成して、抗酸化酵素遺伝子群のプロモーターに存在する抗オキシダント反応配列 (ARE) を認識してその下流の遺伝子の転写を活性化する (図 6)。ARE は多くの抗酸化タンパク、抗酸化酵素遺伝子の転写調節領域に存在する²⁸⁾。すなわち、細胞の定常状態では「アイドリング」されている Nrf2 が、酸化ストレス刺激により活性化され、核内に移行し抗酸化蛋白群の転写を活性化することにより、細胞の抗酸化機構がフル動員される。

7. 表皮の酸化ストレス・抗酸化因子と Nrf2

表皮では、内側の基底層から外界に接している角層に向かって抗酸化因子 (グルタチオンや NQO-1、HO-1、GST、Prx 等) の濃度勾配が形成されていることが知られている¹²⁻¹⁴⁾。すなわち、表皮においては外側ほど抗酸化因子濃度が高く、内側の基底層では抗酸化因子濃度は低い。これは、酸化ストレスを受けやすい外方ほど抗酸化因子の濃度を高くして保護するとともに、幹細胞を含む基底層の細胞の保護を緩くして、アポトーシスを促すことで、遺伝子変異の蓄積を防ぎ将来の発癌や老化を予防する合目的なしくみである。前述したように、表皮内では角層に近いほど Nrf2 が活性化されており、これが Nrf2 の標的分子である抗酸化因子群の濃度勾配のもとになっていると考えられる。また、Nrf2 は前述のようにシステインを多く含み表皮の抗酸化蛋白としての役割も担う SPRP などの角層蛋白の発現を亢進させることも報告されている¹⁵⁾。紫外線は皮膚における強力な酸化ストレス源だが、紫外線照射により、Nrf2 の発現が誘導されることにより細胞内抗酸化因子濃度が増加し、細胞をアポトーシスから保護することが報告された²⁹⁾。Nrf2 ノックアウトマウスにおける紫外線反応の解析では、サンバーン反応と光老化が増強するが、紫外線発がんは野生型と有意差

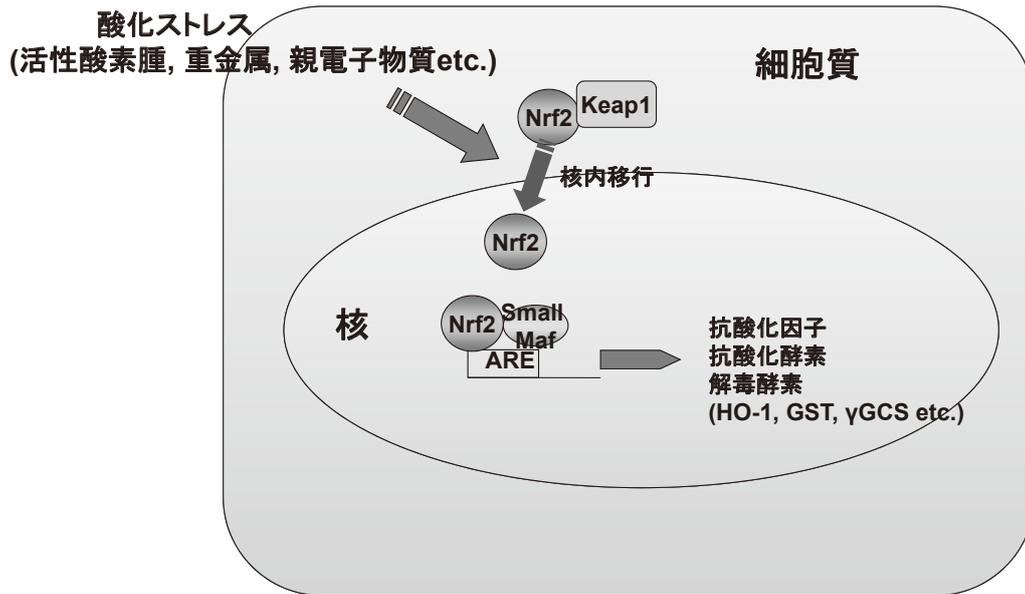


図6 酸化ストレスによる Nrf2 活性化

がなかった^{30,31)}。これは、抗酸化システムが単純に紫外線発がんの抑制方向だけに働かないことを示唆する結果であり、生体の酸化ストレスに対する防御システムの複雑さを示している。

文 献

- 1) Kamata H, Hirata H : Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11** : 1-14, 1999
- 2) Sies H : Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **215** : 213-219, 1993
- 3) Polefka TG, Meyer TA, Agin PP, Bianchini RJ : Cutaneous oxidative stress. *J Cosmet Dermatol* **11** : 55-64, 2012
- 4) Fang YZ, Yang S, Wu G : Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18** : 872-879, 2002
- 5) Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE : Free radicals, antioxidants, and human disease : where are we now ? *J Lab Clin Med* **119** : 598-620, 1992
- 6) Totter JR : Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77** : 1763-1767, 1980
- 7) 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** : 122-124, 1994
- 8) Hanson KM, Clegg RM : Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in ex vivo human skin. *Photochem Photobiol* **76** : 57-63, 2002
- 9) Carr WJ, Oberley-Deegan RE, Zhang Y, Oberley CC, Oberley LW, Dunnwald M : Antioxidant proteins and reactive oxygen species are decreased in a murine epidermal side population with stem cell-like characteristics. *Histochem Cell Biol* **135** : 293-304, 2011
- 10) Sasaki H, Itoh T, Akamatsu H, Okamoto H, Horio T : Effects of calcium concentration on the SOD activity and UVB-induced cytotoxicity in cultured human keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **21** : 9-14, 2005
- 11) Vessey DA, Lee KH, Boyer TD : Differentiation-induced enhancement of the ability of cultured human keratinocytes to suppress oxidative stress. *J Invest Dermatol* **104** : 355-358, 1995
- 12) Piao MS, Choi JY, Lee DH, Yun SJ, Lee JB, Lee SC : Differentiation-dependent expression of NAD(P)H : quinone oxidoreductase-1 via NF-E2 related factor-2 activation in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* **62** : 147-153, 2011
- 13) Piao MS, Park JJ, Choi JY : Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res* **304** : 387-395, 2012
- 14) Schafer M, Dutsch S, auf dem Keller U : Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes Dev* **24** : 1045-1058, 2010
- 15) Schafer M, Farwanah H, Willrodt AH : Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Mol Med* **4** : 364-379, 2012
- 16) Schafer M, Werner S : The cornified envelope : a first line of defense against reactive oxygen species. *J Invest Dermatol* **131** : 1409-1411, 2011
- 17) Thiele JJ : Oxidative targets in the stratum corneum. A new basis for antioxidative strategies. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14 Suppl 1** : 87-91, 2001

- 18) Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L : The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol* **29** : 26-42, 2001
- 19) Vermeij WP, Alia A, Backendorf C : ROS quenching potential of the epidermal cornified cell envelope. *J Invest Dermatol* **131** : 1435-1441, 2011
- 20) Vermeij WP, Backendorf C : Skin cornification proteins provide global link between ROS detoxification and cell migration during wound healing, *PLoS One* **5** : e11957, 2010.
- 21) Weber SU, Thiele JJ, Cross CE, Packer L : Vitamin C, uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure. *J Invest Dermatol* **113** : 1128-1132, 1999
- 22) Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB : The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* **266** : 11632-11639, 1991
- 23) Surh YJ, Kundu JK, Na HK : Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* **74** : 1526-1539, 2008
- 24) Zhang Q, Pi J, Woods CG, Andersen ME : A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicol Appl Pharmacol* **244** : 84-97, 2010
- 25) Itoh K, Chiba T, Takahashi S : An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236** : 313-322, 1997
- 26) Kobayashi A, Kang MI, Okawa H : Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24** : 7130-7139, 2004
- 27) Kobayashi M, Yamamoto M : Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* **46** : 113-140, 2006
- 28) Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A : Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through CHIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res* **38** : 5718-5734, 2010
- 29) Hirota A, Kawachi Y, Itoh K : Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts : protective role in UVA-induced apoptosis. *J Invest Dermatol* **124** : 825-832, 2005
- 30) Hirota A, Kawachi Y, Yamamoto M, Koga T, Hamada K, Otsuka F : Acceleration of UVB-induced photoageing in nrf2 gene-deficient mice. *Exp Dermatol* **20** : 664-668, 2011
- 31) Kawachi Y, Xu X, Taguchi S : Attenuation of UVB-induced sunburn reaction and oxidative DNA damage with no alterations in UVB-induced skin carcinogenesis in Nrf2 gene-deficient mice. *J Invest Dermatol* **128** : 1773-1779, 2008