

博士論文

皮膚科学における新規評価系の構築と素材開発  
(Development of novel evaluation methods and  
materials in dermatology)

2019年9月

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

田中 公輔

立命館大学審査博士論文

皮膚科学における新規評価系の構築と素材開発  
(Development of novel evaluation methods and  
materials in dermatology)

2019年9月

September 2019

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

Doctoral Program in Pharmacy

Graduate School of Pharmacy

Ritsumeikan University

田中 公輔

TANAKA Kosuke

研究指導教員 : 藤田 隆司准教授

Supervisor : Associate Professor FUJITA Takashi

## 目次

### 序論

#### 第1章 紫外線照射による日焼けに対する fucoxanthin の保護・治療効果

##### 1-1. 緒言

##### 1-2. 実験方法

##### 1-3. 結果

##### 1-4. 考察

##### 1-5. 結論

#### 第2章 N $\epsilon$ -(carboxymethyl) lysine (CML)は NF- $\kappa$ B 非依存的に Sonic hedgehog (Shh)発現を阻害することによって毛包形成を遅延させる

##### 1-1. 緒言

##### 1-2. 実験方法

##### 1-3. 結果

##### 1-4. 考察

##### 1-5. 結論

### 総括

### 結語

### 謝辞

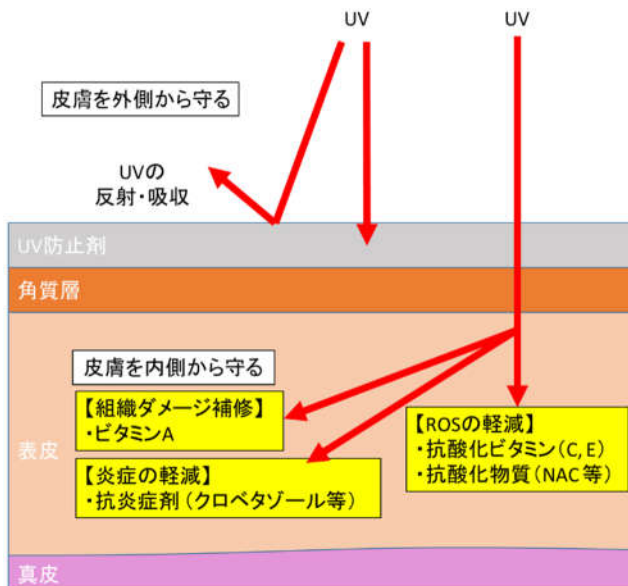
### 参考文献

## 序論

皮膚は体の最外層を覆う組織であり、外来抗原の侵入、水分蒸散の抑制、物理的刺激からの保護機能など、多くの役割を担うことが知られている。皮膚を構成する細胞は、他の組織と同様に代謝異常が生じることで様々な疾病をきたす (1-4)。また、体循環と機能連携した体内ネットワークが存在し、内臓異常は麻疹・水疱瘡として皮膚に現れる。したがって、皮膚組織は単なる覆いではなく、1つの臓器として捉えることができる。

加齢に伴って、皮膚、もしくは皮膚付属器官の恒常性が低下すると、様々な皮膚トラブルを引き起こす。具体的には、萎縮、しわ、たるみ、シミ（老人性色素斑を含む）などが存在し、頭髪は少なくなり、皮脂分泌が減少する (5-10)。これら機能低下に繋がる老化メカニズムには不明な点が多いが、最も寄与度の高い外的因子は、紫外線 (UV) による酸化ストレスであることが示唆されている (11)。通常の細胞エネルギー代謝で生成される活性酸素種 (ROS) とは別に、UV に暴露された皮膚組織内では、速やかに  $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$  等の活性酸素種 (ROS) が生成される (12-15)。皮膚組織内で生成されるこれら ROS は、タンパク質、脂質、糖、核酸に対して酸化ストレスをおよぼすことで、一部皮膚組織の機能低下や、各種皮膚疾患、皮膚ガンの発症に繋がると考えられている (16)。

抗酸化剤は、UV 照射による皮膚機能の低下への予防、もしくは治療を目的として使用される (17,18) (Fig1-1)。



**Fig.1-1 現行の UV 対策**

UV に対するケアは、大きく 2 つあり、角質層の外側と、内側でその対策方法が異なる。角質層の外側では、UV 防止剤を用いて反射、吸収することにより、UV による皮内ダメージを軽減する。一方、角質層の内側では、「ROS の軽減」、「組織ダメージ補修」、「炎症の軽減」を目的とした対策がなされる。「ROS の軽減」では、UV に起因する ROS を低減することを目的として、ビタミン C, E 等の抗酸化ビタミンや、N-acetylcysteine (NAC) 等の抗酸化物質の活用が挙げられる。「組織ダメージ補修」では、ビタミン A が用いられ、UV によって損傷した組織修復を目的とする。「炎症の軽減」では、クロベタゾール等のステロイド性抗炎症剤が用いられ、UV を起因とした炎症応答の沈静化を目的とする。

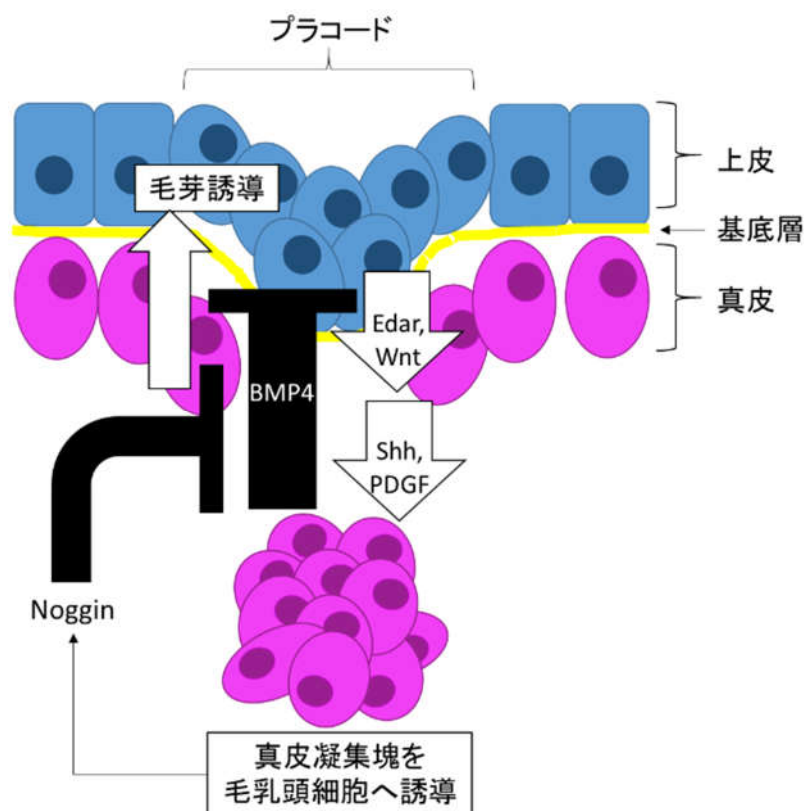
抗酸化剤に使用される主な物質としては、尿酸、還元型グルタチオン (GSH)、ビタミン C、ビタミン E、カロテノイドが存在する (19)。これらのうち、脂溶性の抗酸化物質として、ビタミン E、カロテノイドが分類され、細胞膜における脂質ドメインの抗酸化作用を示す (19)。水溶性の抗酸化物質として、ビタミン C、尿酸、還元型グルタチオン (GSH) が分類され、細胞質および、細胞外液における抗酸化作用を示す (19)。UV による皮膚機能低下の主なリスク因子が ROS であるならば、これら抗酸化剤には、UV 照射後に見られる発赤、腫脹、水疱の症状といった症状を効果的に改善しうるはずである。しかし、既存の

抗酸化剤では十分に満足のいく予防・改善作用が確認されず、UV 照射後に引き起こされるシワ、シミ、皮膚乾燥の皮膚老化症状が進行する。そこで、UV による皮膚機能の低下を、効果的に予防、もしくは治療するためには、抗酸化作用だけではなく、多面的な機能を持った薬剤の開発が必要であると考えた。

一方で、皮膚老化を導く内的因子の一つに、高血糖状態で生成される終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts: AGEs) が挙げられる。AGEs はタンパク質や一部の脂質、核酸に対して非生理的な架橋形成を引き起こす他、AGEs 受容体 (Receptor for AGEs: RAGE) を介して、Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 経路を活性化することで炎症応答を惹起する (20,21)。AGEs は表皮のケラチン、真皮の細胞外マトリクスに蓄積し、シワや皮膚黄変、乾燥等の皮膚老化症状を引き起こすと考えられている (22,23)。また、表皮角化細胞では RAGE の発現が報告されており、AGEs による炎症応答が起こることが明らかとなっている (24)。糖質の過剰な摂食により蓄積する AGEs は、網膜や腎臓の機能低下を引き起こすことから、内因性の環境因子として機能していることが示されてきた (25,26)。

皮膚付属器官の一つである毛包は、毛包不変部と可変部と呼ばれる2つの領域から形成されており、毛包下変部は縮退と再構築によって、生後唯一再生を繰り返す器官である (27)。上皮-間葉系の細胞群で構成される毛包は、発生過程で形成されるプラコードから Sonic hedgehog (Shh) と Platelet Derived Growth Factor (PDGF) の発現が起こることで、真皮凝集塊を毛乳頭へ分化誘導する (28)。分化誘導された毛乳頭細胞は、Noggin を発現し、上皮系細胞の増殖を阻害している Bone Morphogenetic Protein (BMP) 4 を解除することで毛芽形

成が完了し、毛包成長と形態形成が行われる (Fig.1-2) (29,30)。



**Fig.1-2 胎生期における毛芽の形成メカニズム**

マウス胎生期 14.5 日目の皮膚に形成されたプラコードでは、表皮側で発現する Edar, Wnt シグナルの制御を受けたのちに、Shh と PDGF の発現が起こり、真皮凝集塊に作用して毛乳頭への分化を誘導する。分化した毛乳頭で Noggin の発現が誘導されると、BMP4 によるプラコードの上皮細胞の増殖阻害が解除される。その結果、プラコードの上皮細胞の増殖が起こることで、毛芽の形成が開始される。

成体においても発生過程の分子機序が繰り返されている可能性が示唆されているが

(31)、内的因子である AGEs が成体の毛包形態形成の低下にどのように影響するのかは明らかになっていない。

私は、外的ストレスに対する抗老化作用を示す化合物の探索を目指した。外用塗布を選択することにより、血中を介さない薬理効果を達成することができる。本論の第 1 章では、

UV 照射による ROS の影響を最も受ける皮膚の光老化に着目した。UV 初期応答遺伝子として filaggrin (Flg)を同定し、この遺伝子の発現調節を解析して、皮膚の光老化を改善する新規化合物として fucoxanthin (FX)を見出したことについて述べる。次いで、第 2 章では、皮膚付属器官の一つである毛包に対して、AGEs の一つである Nε-(carboxymethyl)lysine (CML)を媒体とした毛包形態形成への影響に着目した。CML を皮内注射することによって糖化された毛包における低下した発毛イベントが、Shh の遺伝子発現が低下することに因み、薄毛を改善する薬剤探索に適した簡便かつ新たなモデルを構築した。



## 第1章

### 紫外線照射による日焼けに対する fucoxanthin の保護・治療効果

#### 1-1. 緒言

ヒトの皮膚は、外的因子である病原体や、化学物質による損傷に対して機械的抵抗性を伴ったバリア機能を有しており、生体防御における内的環境と外的環境との重要な境界として機能している。皮膚バリアの主な構成要素は、表皮の最外層に存在する角層であり、角層分化に至るまでには、基底膜上に存在する幹細胞からケラチノサイトが生み出され、周囲細胞の増殖とともに表皮上層へと遊走される過程を経る (32)。遊走は、基底層を起点として、有棘層、顆粒層を経て、角層へ到達し、遊走の過程で各層を構成する細胞へ成熟化する (33)。角層では、細胞核が消失したケラチノサイトが、10-20 層重なることで物理的な外部環境との境界を成すことで皮膚バリアを形成している (32)。

Flg は、皮膚バリアの形成に重要な役割を果たしている (32)。Flg は、表皮の顆粒層細胞内でプロフィラグリンとして存在しており (32,34)、角層分化の過程で Flg へと転換された後、角層でのケラチン繊維形成を促す (32)。更に Flg は分解されることで、天然保湿因子として角層の水分保持機能も担うことが報告されている (32)。Flg の皮膚バリア機能への重要性は、Flg 遺伝子の欠損モデルマウスを用いた実験で実証されている (35)。Flg 遺伝子の欠損によって魚鱗癬と、乾皮症が観察されることから、角質過剰形成による皮膚バリア機能の低下が認められた。更に、抗原を表皮に感作させることで、真皮層への浸透が観察されたことから、Flg 遺伝子の欠損は皮膚バリア機能の破綻を引き起こすことが示された

(36)。これら実証結果から、Flg が皮膚バリアの形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

表皮に発現している Flg は、加齢に伴い減少し、皮膚の水分蒸散の増大に寄与することが報告されている (37-39)。加齢による水分蒸散の増大は、皮膚老化症状である萎縮、シワ、キメの低下に繋がる (40,41)。一方、皮膚老化の外的要因である UV 照射においても、Flg の減少と同様な、萎縮、シワ、キメが誘発される (42)。皮膚への UV 照射は、ROS を介した、NF- $\kappa$ B シグナルによる炎症応答を惹起し、真皮の組織変性を引き起こす (42,43)。表皮における皮膚バリアの主な構成要素である Flg が、UV 照射によって受ける影響について明らかとなっていない。

FX は海洋植物に蓄積されるカロテノイドの 1 つであり、抗酸化作用やプロビタミン A 様作用などの生理活性を持つと考えられている (44)。近年の研究では、UV 照射による真皮層の皮膚機能低下に対する FX の保護作用が報告されている (45)。FX の皮膚保護作用は、UV 誘発性の ROS に対する抗酸化作用と、血管新生による血流を介した皮膚への栄養供給促進が関与していると推察されている (45)。その他の作用としては、高血圧状態における血管内皮細胞へのコラゲナーゼ阻害作用 (45)、ROS の消去作用 (46)、抗肥満作用 (47)、高血糖症の改善作用 (48)、メタボリックシンドロームの緩和作用 (49) が報告されており、多面的な作用を有することが明らかになりつつある。しかし、UV 照射による表皮層での皮膚バリア機能の変化について、FX が及ぼす影響や、その分子機序については不明な点が多い。

第1章では、UV照射による初期応答遺伝子を探索し、またUVによる日焼け効果を予防・治療する化合物を探索した。検討の結果、FXが、UV照射によって引き起こされる皮膚の発赤症状への予防、および治療効果を示し、皮膚バリア機能の低下を改善することがわかった。また、UV照射は、表皮層に存在するFlgの顕著な遺伝子発現低下を示し、FXがこれを抑制する成績を得た。一方で、既存の抗酸化剤であるN-アセチルシステイン（N-acetylcysteine: NAC）は、濃度依存的な抗酸化活性を示したが、FXで観察された皮膚の発赤改善や、Flgの発現低下の抑制作用を見出すことは出来なかった。更に、FXの詳細な分子メカニズムを検討した結果、Caudal related homeobox (Cdx)1の発現増強を介したFlg転写の活性化作用を示した。以上の結果から、UV照射による皮膚機能の低下には、NF- $\kappa$ B経路を介した炎症性サイトカインによる真皮層の皮膚損傷機構だけではなく、Flgの発現抑制を介した表皮層の皮膚バリア機能の低下作用が存在し、FXに特に顕著な改善作用があることを新たに見出した。

## 1-2. 実験方法

### 1-2-1. 海藻からの抽出および分画

鳴門市（徳島県）で採取された *Seaweed (Undaria pinnatifida)* の非可食部（根幹部）の乾燥固形物（2 kg）を 50°C のメタノール（3L）に1時間浸漬して成分抽出し、溶媒をエバポレーターにより濃縮して、暗緑色の濃縮物（79.2 g）を得た。これを n-ヘキサン、酢酸エチル（AcOEt）および純水により分配し、粗精製した分画（フラクション：Fr）を分離した。

後述する Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC)アッセイから、有機層における抗酸化活性が認められたことから、これらの Fr を混合し、混合 Fr (5.89 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wakosil C-200, WAKO Pure Chemicals, Osaka, Japan) によって各フラクションを単離精製した。具体的には、ヘキサン : AcOEt (10:0) (Fr.1)、ヘキサン : AcOEt (8:2) (Fr.2)、ヘキサン : AcOEt (8 : 6) (Fr.3)、ヘキサン : AcOEt (6:4) (Fr.4 : 緑色、Fr.5 : 淡赤色)、ヘキサン : AcOEt (5:5) (Fr.6 : 緑色)、AcOEt (Fr.7、Fr.8) および MeOH (Fr.9) の合計 9 フラクション (Fr.1 ~ Fr.9) を得た。メタノールへ各フラクション (1mg/ml) を溶解し、それぞれ 1 $\mu$ l を PF254 シリカプレート (WAKO Pure Chemicals) にスポットして、薄層クロマトグラフィーにより調べた。展開液は、ヘキサン : AcOEt (1:1) を用いた。展開後、プレートを乾燥させ、エタノールに溶解した 5% (w/v) リンモリブデン酸液と反応させた。Fr.7 はさらに silica gel 60 クロマトグラフィー (Silica gel 60, C Corp. Hayward, CA) により展開し、高純度 FX を精製した。具体的には、ヘキサン : アセトン (3:1) (Fr.7-1 : 緑色、Fr.7-2 : 黄色)、ヘキサン : アセトン (2:1) (Fr.7-3 : 赤色, purified Fr.7)、MeOH (Fr.7-4) の順で段階的に溶出し、4 画分を得た (Fr.7-1 ~ Fr.7-4)。

#### 1-2-2. ORAC (酸素ラジカル吸収能) アッセイ

ORAC アッセイは、2,2'-アゾビス (2-メチルプロピオンアミジン) 二塩酸塩 (AAPH) によって誘発されたペルオキシラジカルを除去する抗酸化能を室温で測定した。フルオレセイン (WAKO Pure Chemicals) を蛍光プローブとして使用した。フルオレセインの蛍光

の喪失は、ペルオキシラジカルとのその反応による損傷強度の指標として評価した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中にフルオレセイン二ナトリウム塩を溶解することによって、フルオレセイン溶液 (最終濃度:  $3\mu\text{M}$ ) を調製した。フルオレセイン溶液 ( $40\mu\text{l}$ ) とメタノール ( $10\mu\text{l}$ ) 中に溶解した各フラクションとの混合液を、PBS で調製した  $400\mu\text{M}$  AAPH  $50\mu\text{l}$  に溶解して曝露させた。反応混合液を 96well plate (Thermo Fischer Scientific, Inc., Yokohama, Japan) のウェルに入れ、マイクロプレートリーダー (Corona Electric model: SH-8100lab, Ibaraki, Japan) によって蛍光単位を 5 分間隔で測定した (Ex=480/Em=520)。マルチチャネルピペットを用いて AAPH 溶液を速やかに添加し、反応を開始させた。抗酸化物質 (陽性対照) として、 $1\mu\text{M}$  トロロックス (Sigma Chemicals, Saint Louis, MI) を、陰性対照として PBS を用いた。各フラクションにおける抗酸化活性は、濃度と濃度曲線下面積 (AUC) を ImageJ ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD) を用いて測定し、陰性対照の AUC を減算することによって、各フラクションに対応する AUC として算出した。

### 1-2-3. 動物倫理委員会

本章で実施する動物を使用したプロトコールは日本薬理学会の指針を満たしており、立命館大学実験動物倫理委員会 (BKC2013-017) の承認を受けて実施した。

### 1-2-4. 細胞内 ROS・細胞毒性解析

初代培養皮膚細胞は、E15.5 マウス胎仔皮膚を摘出し、 $0.1\%$  (w/v) コラゲナーゼ /  $0.1\%$

(w/v) トリプシン溶液中で酵素処理した後、細胞分散液をセルストレーナー (70 $\mu$ m メッシュ) にて濾過した。得られた細胞は、それぞれの試験に供した。ヒト真皮繊維芽細胞 (Human Dermal Fibroblasts:HDF) は、Takara Bio Co. Ltd (Shiga, Japan) から購入した。いずれの細胞も 10% (v/v) 牛胎仔血清 (FBS) と抗生物質を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Wako Pure Chemical) にて培養を行った。HDF を  $3 \times 10^4$  細胞/well の濃度で 96well plate に播種し、10% (v/v) FBS を含有する DMEM 培地を用いてコンフルエントになるまで培養した。培地を無血清 DMEM 培地 (SF-DMEM) に置き換え、次いで、細胞を 100 $\mu$ M の 2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA) (WAKO Pure Chemicals) とともに 1 時間インキュベートした。細胞を SF-DMEM で 5 回洗浄し、1mM 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 暴露または、UV (365nm: UV-A, 2.7J/cm<sup>2</sup>) により刺激した。HDF における細胞内 ROS 産生は、JuLI ライブセルムービーアナライザー (Nano Entek, Seoul, Korea) を用いて、 $H_2O_2$  曝露後 24 時間モニタリングすることで予備検討を行った。次に、50 $\mu$ l の Passive lysis buffer (Promega, Madison, WI) を用いて細胞を溶解した。蛍光強度は、蛍光マイクロプレートリーダーを用い、Ex:480nm/Em:530 の波長で測定した。

細胞生存率は、メーカー取扱説明書に従い、比色定量 Cell Count Reagent SF kit (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて測定した。細胞を WST-8 と共に 2 時間インキュベートした後、細胞生存率をマイクロプレートリーダー (model 680, Bio-Rad, Tokyo, Japan) にて 450nm の波長で吸光度測定した。

### 1-2-5. UV 照射試験

チオグリコール酸を含有する除毛剤を用いて、ddY 系統マウス (11-15 週齢、雌、n=6) の背部毛を除毛した。予防効果を検証する実験は、UV 照射 (365nm:UV-A) の 4 日前に、脊柱の左側にワセリン (対照) を塗布し、右側にワセリン含有の FX を 1 日 1 回、連続塗布した。UV は 1 時間 (2.7J/cm<sup>2</sup>) で照射した。対照研究としてワセリンは、本実験条件において mRNA 発現レベルを含む皮膚の表現型に影響を及ぼさなかった。治療効果を検証する実験は、UV 照射を 4 日間行った後、5 日目に FX の塗布を開始した。UV 照射の 2 時間後、ドルフィンスキンスコープ (COREFRONT, Tokyo, Japan) を用いて UV による皮膚発赤を観察した。

### 1-2-6. 組織解析

背側正中線をマーキングした後、マウス背側皮膚を採取した。得られた皮膚試料は、Tissue-Tek OTC コンパウンドにて包埋し、-20°Cでの予備冷却の後、-80°Cにて冷凍保存した。得られた凍結組織ブロックは、凍結切片 (20µm 厚) を作製した。その後、切片を 1 次抗体として、抗フィラグリン抗体 (M-290, 1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)、または抗ロリクリン抗体 (AF-62, 1:500) (Covance, Berkeley, CA) を用い、2 次抗体として、マウス抗ウサギ IgG-FITC (sc-2359, 1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) と反応させた。組織標本における各分子の発現パターンは、EVOS FL セルイメーキングシステム (Thermo Fischer Scientific) を用いて調べた。

### 1-2-7. 皮膚バリアアッセイ

皮膚バリアアッセイ用に、皮膚を 1% (w/v) フルオレセインイソチオシアネート (FITC) - デキストラン (FD-4 ; Sigma Chemicals) を含有するワセリンで 3 時間処置した。次に、皮膚を摘出し、4% (v/v) パラホルムアルデヒドで固定した。次に、クリオスタット (LEICA CM1850, Tokyo, Japan) を用いて 10 $\mu$ m 凍結切片を作製し、EVOS FL セルイメージングシステムによって組織化学的に解析した。

### 1-2-8. マイクロアレイ解析

マウス背側皮膚へ 4 日間 UV 照射を施した後、皮膚組織を採取した。得られた皮膚組織は、Sepazol (Nacalai Tesque) を用いて total RNA を抽出し、cDNA 合成を行った。試料は、Agilent マイクロアレイプレートに供し、スキャニングして分析した (Bio Matrix research Center, Chiba, Japan)。得られたシグナル強度を、Excel ソフトウェアを用いて解析した。解析の結果、絞り込んだ候補遺伝子について、Real time PCR にて解析した (data not shown)。

### 1-2-9. Real time PCR 解析

1 $\mu$ g の total RNA を ReverTra Ace cDNA 合成キット (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写反応を行った。Real time PCR は、5 $\mu$ l の 2 $\times$ KAPA マスターミックス (Nippon Gene, Tokyo, Japan) と cDNA pool、及び 0.5 $\mu$ M の各種プライマーと混合して反応液とした。目的遺伝子産物の増幅は、Piko Real PCR システム (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて解析



した。試験は 5 段階の cDNA pool の希釈溶液を用いて検量線を作製する検量線法を用いて実施した。遺伝子解析には、内在性遺伝子としてマウス *Gapdh* もしくは、ヒト  $\beta$ -ACTIN を用いて標準化を施し、Ct 値から比較を行った。測定は全て 4 回実施した。

#### 使用プライマー

mGapdh-F 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'

mGapdh-R 5'-GGATGCAGGGATGATGTTC-3'

hACTIN-F 5'-AGCCTCGCCTTTGCCGATCC-3'

hACTIN-R 5'-TTGCACATGCCGGAGCCGTT-3'

mFlg-F 5'-GCGAGCTCTTACAAGCAGCATGAGGTAG-3'

mFlg-R 5'-GCCTCGAGAAGACTGAATCGAATGCAGC-3'

mCdx1-F 5'-CTAGGACAAGTAGCTTGCCCTCTT-3'

mCdx1-R 5'-TCCAACAGGCTCACCACACA-3'

mCdx2-F 5'-CGATACATCACCATCAGGAGG-3'

mCdx2-R 5'-TGGCTCTGCGGTTCTGAAAC-3'

mCdx4-F 5'-GAGGAAGTCAGAGCTGGCAG-3'

mCdx-4-R 5'-GGCTCTGCGATTCTGAAACC-3'

hFLG-F 5'-TGAAGCCTATGACACCACTGA-3'

hFLG-R 5'-TCCCCTACGCTTTCTTGTCT-3'

#### 1-2-10. ウェスタンブロット解析

Sodium dodecyl sulfate (SDS) -10% (w/v) ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を展開した。ゲルをポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンに転写し、メンブレンをまず 1 次抗体として、ウサギ抗フィラグリン抗体 (1:1000)、ウサギ抗 actin 抗体 (I-19, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology)、ヤギ抗ロリクリン抗体 (1:1000)、ウサギ抗 Cdx1 抗体 (ab11611, 1:1000, Abcam, Tokyo, Japan) を用いてインキュベートした後、2 次抗体としてペルオキシターゼ標識抗ウサギもしくは抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) と反応させた。化学発光シグナルは、Chemi Lumi One Plus Reagent (Nacalai Tesque) と反応させ、LAS2000 システム (FUJI film, Tokyo, Japan) によって検出し、NIH Image ソフトウェアを用いて定量測定した。

#### 1-2-11. レポーターアッセイ

Flg プロモーター領域のレポーターアッセイのために、XhoI サイト (CTCGAG) を含む forward primer と、BglIII サイト (AGATCT) を含む reverse primer を用いて、2000bp の Flg 遺伝子プロモーター領域の PCR 産物を作製した。得られた PCR 産物と pGL4.10 ベクター (Promega) を XhoI-BglIII を用いて制限酵素処理し、ライゲーションを行った (Flg2000-luc)。作製した Flg2000-luc を鋳型に、Flg2000-luc を作製する際に用いた BglIII サイトを含む reverse primer と、XhoI サイトを含む forward primer を Flg プロモーター領域の 1200bp と 500bp の断片長になるように設計し PCR 産物を作製した。上述と同様に、得られた PCR 産物と

pGL4.10 ベクターに XhoI-BglIII を用いて制限酵素処理し、ライゲーションを行った (Flg1200-luc, Flg500-luc)。更に、得られた PCR 産物に対し、BglIII サイトと Flg プロモーター領域に存在する PstI 領域で制限酵素処理し、PCR 断片を得た後、pGL4.10 ベクターへ BglIII-PstI ブラントインライゲーションを行った (Flg120-luc)。

一方、ヒトエラスチンプロモーター領域のレポーターアッセイには、KpnI (GGTACC) サイトを含む forward primer、および HindIII (AAGCTT) サイトを含む reverse primer を用いて、2.5kb ヒトエラスチン (ELN) プロモーター領域の PCR 産物を作製した。得られた PCR 産物と pGL4.10 ベクター (promega) を KpnI-HindIII を用いて制限酵素処理し、ライゲーションを行った (ELN-luc)。ラット α1 鎖 I 型コラーゲン (Colla1) プロモーター領域を含むベクターは、B. de Crombrughe 博士 (The University of Texas, Houston, Texas) より提供を受けた。これを、XhoI サイトにより消化し、pGL3 ベクター (Promega) にサブクローン化した (Colla1-luc)。

作製したベクターは、0.2μg のルシフェラーゼコンストラクトと、0.002μg の pRL-CMV (Promega) と共に細胞へ一過性にトランスフェクションして、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を評価した。ルシフェラーゼ活性は、モデル TD20/20n ルミノメーター (Turner BioSystems, Sunnyvale, CA) を用いて測定した。CMV プロモーター制御下でウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定し、得られた結果を内部標準として用いることで、標準化処理を行った。

使用プライマー

- Flg2000-luc 用の PCR 産物作製

Flg promoter-F 5'-gcCTCGAGTTACAAGCAGCATGAGGTAG-3'

Flg promoter-R 5'-gcAGATCTAAGACTGAATCGAATGCAGC-3'

- Flg1200-luc の PCR 産物作製

Flg1200-F 5'- gcCTCGAGTATGATGCATGCATAAATGT-3'

Flg promoter-R 5'-gcAGATCTAAGACTGAATCGAATGCAGC-3'

- Flg500-luc の PCR 産物作製

Flg500-F 5'- gcCTCGAGATCAAAAATTAATGTGACCAC-3'

Flg promoter-R 5'-gcAGATCTAAGACTGAATCGAATGCAGC-3'

- Flg120-luc の PCR 産物作製

BglII-PstI ブラントインライゲーションにより調製した。

- ELN-luc の PRC 産物作製

elastin promoter-F 5'-gcGGTACCCTCGAGAAGAGAGGGGTCCA-3'

elastin promoter-R 5'-gcAAGCTTCTCGGGGAGAAATGCCCCAG-3'

## 1-2-12. Choromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

マウス Flag-*Cdx1* 発現ベクター：pRC/CMV-Flag *Cdx1* は、John P. Lynch 博士 (University of Pennsylvania) より供与頂いた。Flag-*Cdx1* 発現ベクターを、エレクトロポレーション (Bio-Rad, Gene Pulser Xcell, 250V, 650μF) によって初代培養皮膚細胞にトランスフェクションし

た。トランスフェクションの3時間後にFXを細胞へ暴露した。FXの暴露処理48時間後に、細胞を4% (v/v) パラホルムアルデヒドで固定し回収した後、超音波処理を施し、700bpの断片長になるようにしてDNAの断片化を行った。マウス抗Flag M2抗体 (Sigma Chemicals) を用いて、目的のタンパク質-DNA複合体を免疫沈降によって単離した。ChIPのコントロール抗体は、マウスHA抗体(sc-805, Santa Cruz Biotechnology)を用い、Dynabeads ヒツジ抗マウスIgG抗体 (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて、免疫沈降を行った。タンパク質-DNA複合体は、プロテイナーゼK処理およびフェノールクロロホルム抽出を行いタンパク質除去し、エタノール沈殿により精製DNA断片を得た。その後、得られたDNA断片についてReal time PCRにより解析した。

・使用プライマー

Flg-Chip F 5'-TAGAAATAGGAGCCTGGATG-3'

Flg-Chip R 5'-ATATTTTAATGCCATATATA-3'

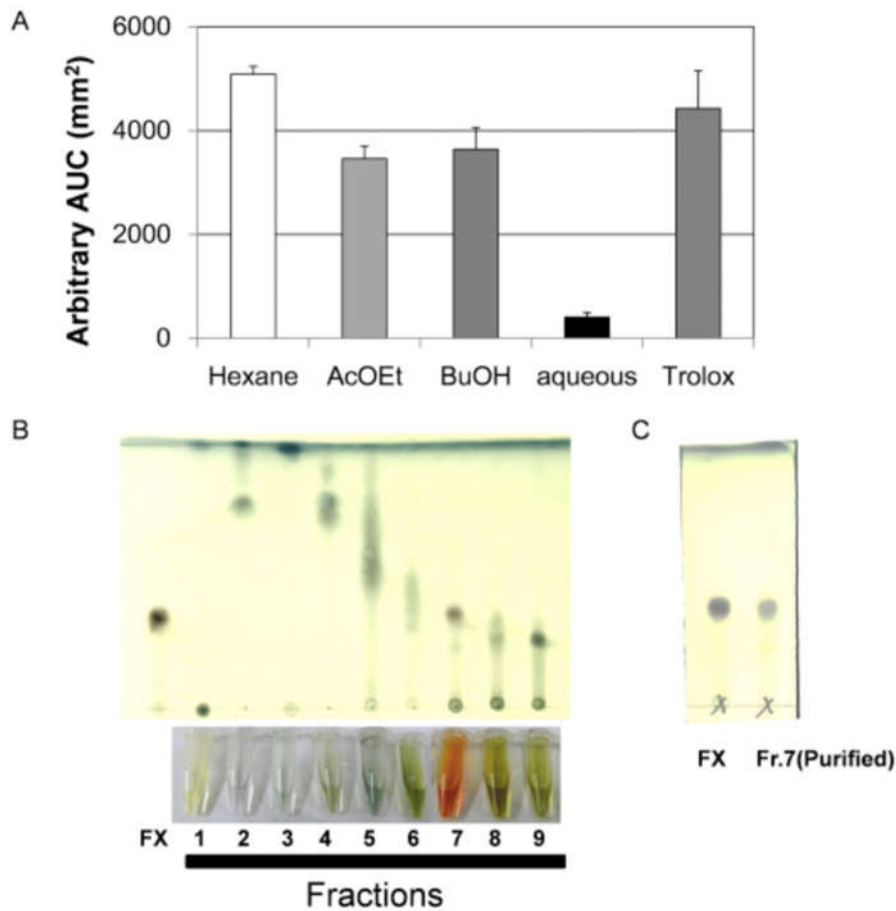
### 1-2-13. 統計処理

データは、2群間比較においては Student's t-test により、3群間以上の比較においては One-way analysis of variance (ANOVA)により検定し、数値 ± 標準誤差値で示した。検定の結果、P値が5%以下となる比較試験結果において有意と判定した。

### 1-3. 結果

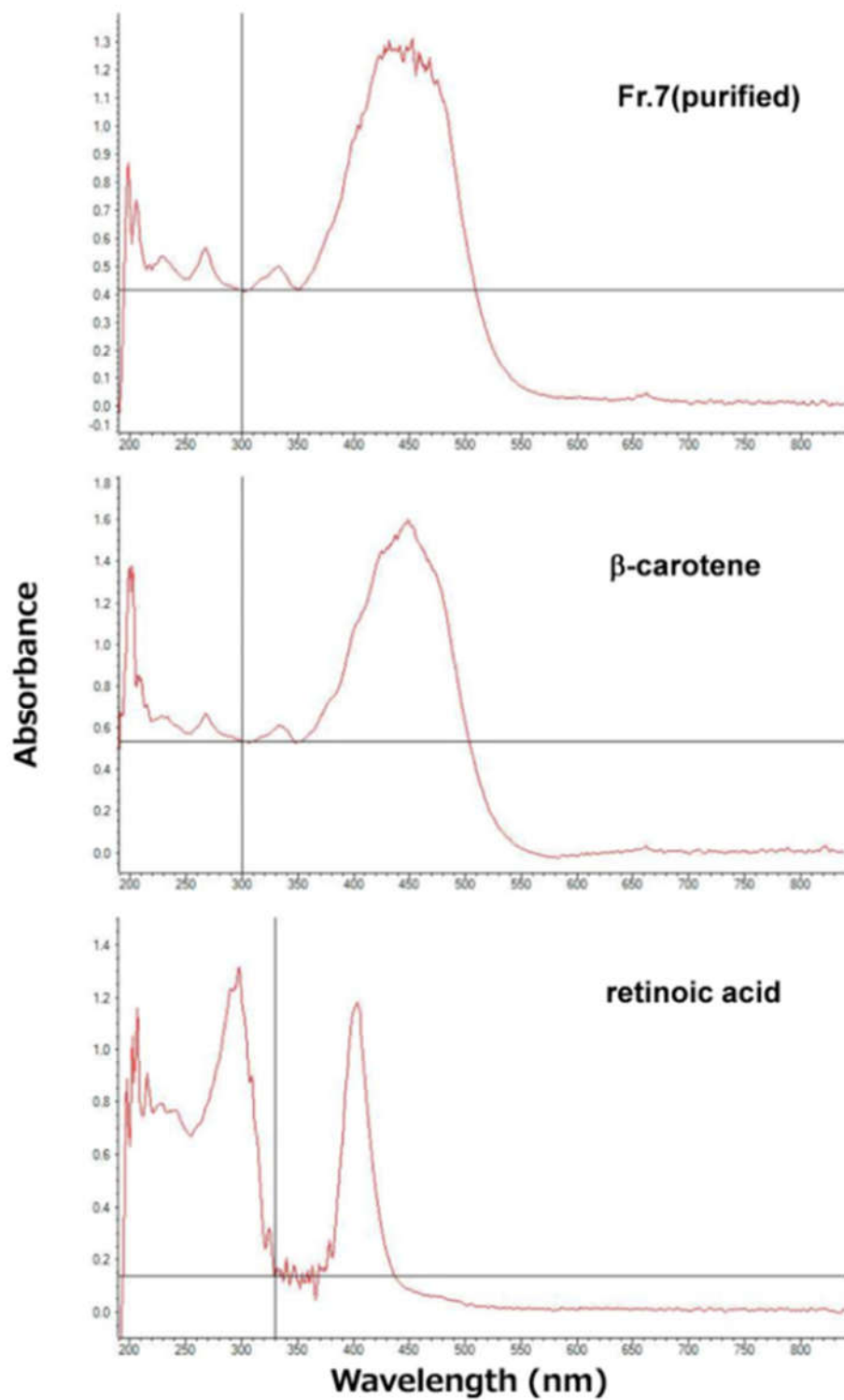
#### 1-3-1. 抗酸化フラクションの特定

本研究では、高い抗酸化活性を示す海藻抽出画分の探索を目指すことから始めた。得られた海藻メタノール抽出物から得られた各フラクションを用いて、ORAC 活性の解析を試みたところ、ヘキサフラクションに最も高い活性を認めた (Fig.2-1A)。更に本フラクションをシリカゲルクロマトグラフィーにより 9 つのフラクションに分画し (Fig.2-1B)、そのうちの 7 番目のフラクション (Fr.7) に最も高い抗酸化活性を認めた (data not shown)。精製した Fr.7 の UV スペクトル解析 (Fig.2-2)、質量分析解析 (Fig.2-3) から、精製した Fr.7 は、fucoxanthin: FX (CAS No.3351-86-8) であることが同定された。よって、以降は精製 Fr.7 成分を、FX とする (純度>95%) (Fig.2-1C)。



**Fig.2-1 Antioxidative characters of *seaweed* extracts and TLC analysis of separated fractions from hexane residue.**

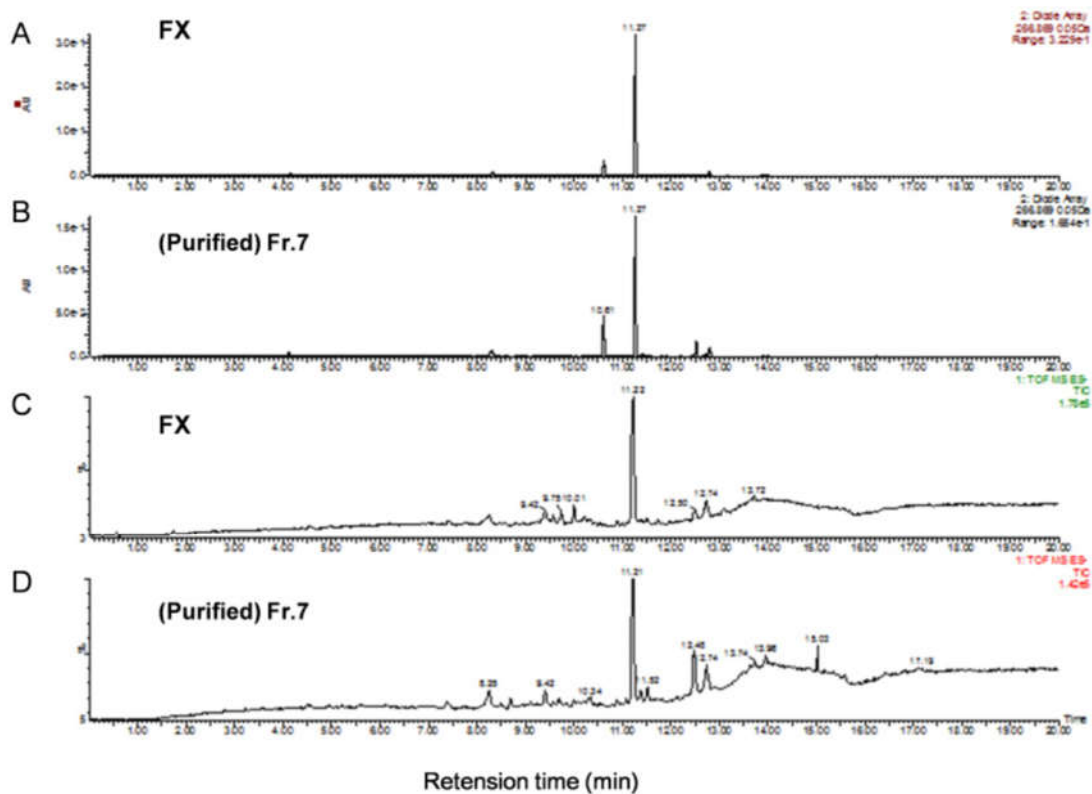
A, Antioxidative property of extracts from *seaweed* by ORAC assay. 0.1% (w/v) Respective extracts and 1 $\mu$ M trolox in methanol (pure solvent). AcOEt, ethyl acetate; BuOH, butanol; aqueous, dH<sub>2</sub>O. B, TLC analysis of hexane fraction from *seaweed*. 1mg/ml respective fractions were served to TLC plate. Fractions and detection procedures were described in “Materials and Methods”. Fr.7 detected as similar band from pure fucoxanthin (FX) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). C, Quality check of FX. purified FX was served to TLC plate.



**Fig.2-2 UV spectra of FX in methanol (pure solvent).**

UV spectra of were recorded by UV-Vas mode using NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). FX was freshly isolated from *seaweed* by silica gel chromatography.



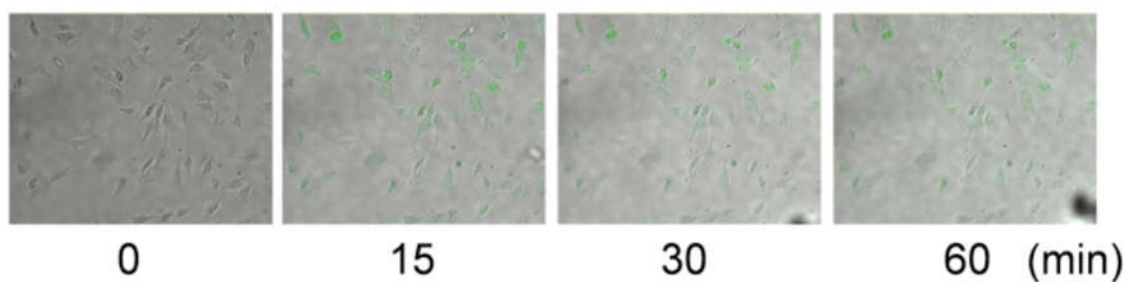


**Fig.2-3 Purity of fucoxanthin.**

We compared the purity between commercial FX (A, C) and purified Fr.7 (B, D). Purified Fr.7 from seaweed was analyzed by high-resolution-electrospray ionization-mass spectrometry (HR-ESI-MS, Waters UPLC Q-TOF premier). Purified Fr.7 was subjected to Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1×100mm, 1.7μm) with 0.1% (v/v) CHOOH in CH<sub>3</sub>CN at a flow rate of 0.4ml/min. The molecular formula of purified Fr.7 was determined to be  $m/z$  657.4124 [M-H]<sup>-</sup> (Calcd. For C<sub>42</sub>H<sub>57</sub>O<sub>6</sub>: 657.4155).

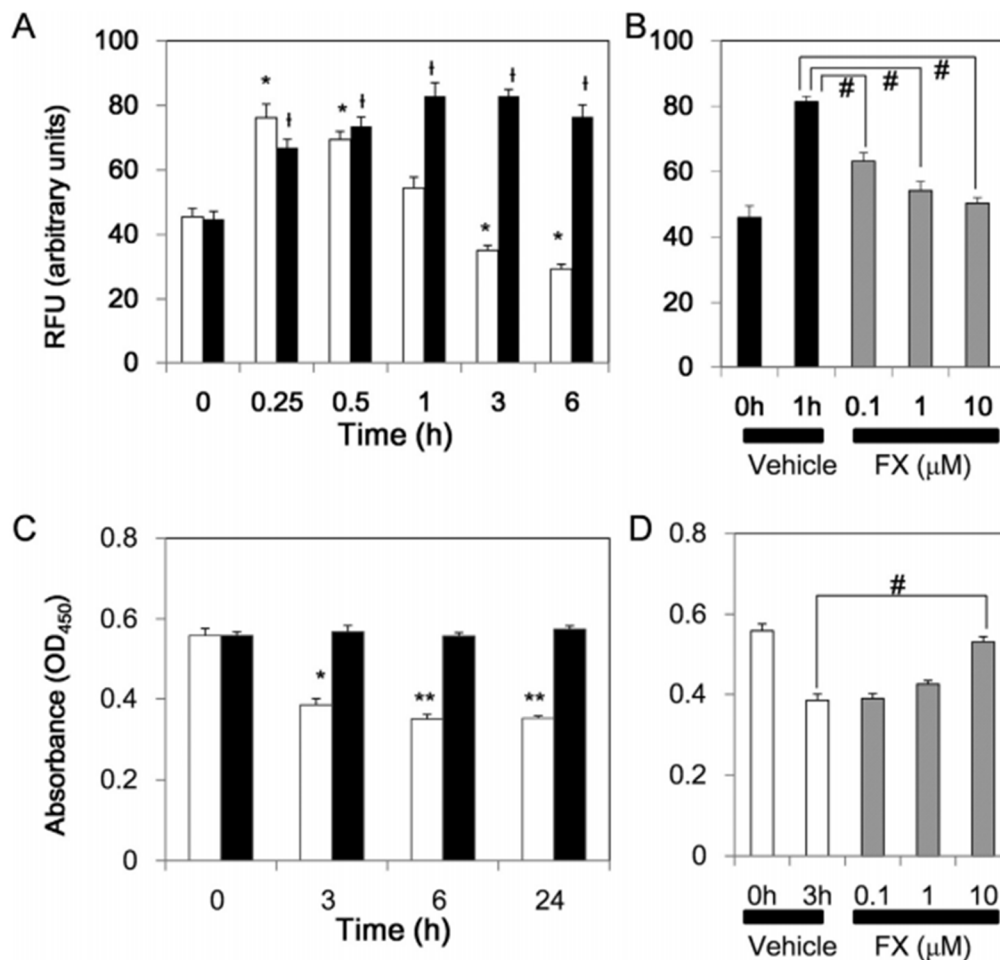
FX の ROS 抑制効果を検討するために、HDF における ROS 誘導条件を検討した。1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による ROS 誘導条件においては、細胞への暴露 15 分以内に細胞内 ROS の一過性の増加が生じ、暴露 1 時間以内に、DCFH-DA の蛍光活性は徐々に減弱した (Fig.2-4, 2-5A)。一方、UV 照射による ROS 誘導条件では、UV 照射 1 時間後に、細胞内 ROS の誘導が最大化し、その後 6 時間後まで DCFH-DA の蛍光活性は維持された (Fig.2-5A)。得られた ROS 誘導条件をもとに、FX の活性を評価したところ、UV 照射 1 時間後の ROS の増強を、濃度

依存的に抑制することが認められた (Fig.2-5B)。次に  $\text{H}_2\text{O}_2$  もしくは UV 照射による細胞毒性を調べた (Fig.2-5C)。 $\text{H}_2\text{O}_2$  暴露 3 時間目から細胞生存率は有意に低下し、暴露 24 時間目までそれ以上の細胞毒性増強は際立って観察されなかった。一方、UV 照射によつては、細胞毒性は認められなかった。 $\text{H}_2\text{O}_2$  を 3 時間暴露した際の細胞毒性に対して、FX は濃度依存的に細胞保護作用を示した (Fig.2-5D)。



**Fig.2-4 Time-rapes imaging of intracellular ROS production by  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

After exposure of 1mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  to HDF cells, the intracellular ROS production was monitored using DCFH-DA. Similar results were obtained from triplicate experiments.

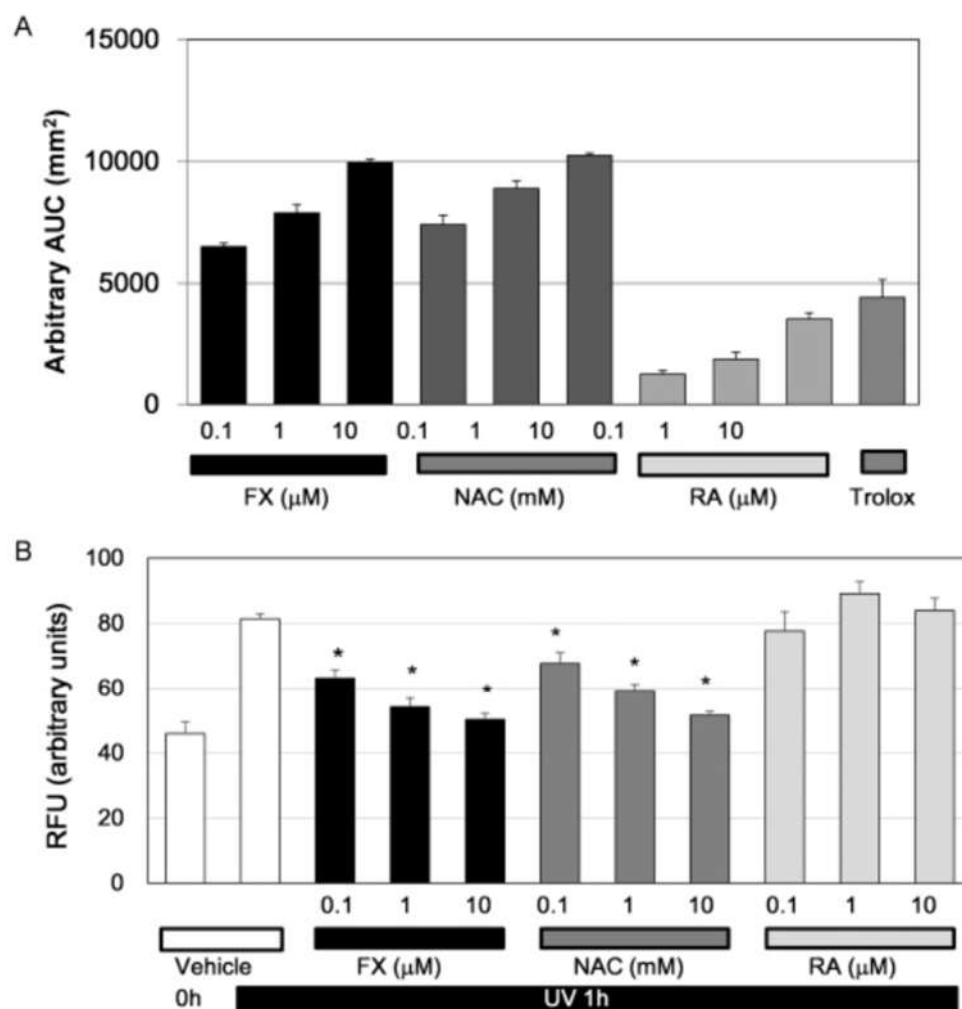


**Fig.2-5 Intracellular ROS quenching assays in HDF cells.**

(A), Intracellular ROS levels with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV irradiation in HDF cells. Cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (open column) or UV irradiation (closed column) for indicated times after incubation with 100 mM DCFH-DA for 1 h. Relative fluorescence units (RFU) are shown as arbitrary units. \**P* < 0.05, †*P* < 0.05, vs control. n=16. Similar results were obtained from quadruplicate experiments. (B), Effects of fucoxanthin (FX) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS production. Cells were treated with indicated concentration of FX (gray column). 30 min later, cells were exposed to UV irradiation (closed column). Representative data were shown. (C), Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or UV irradiation on cell viability. Cells cultured in SF-DMEM were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (open column) or UV irradiation (closed column) for indicated times. Cell viabilities were measured as described in “Materials and Methods”. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.001, vs control. n=8. Similar results were obtained from quadruplicate experiments. (D), Effect of FX on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell toxicity. #*P* < 0.05.

次に FX 以外の抗酸化化合物の活性について検討を行った。ORAC 活性評価の結果、FX は、*N*-アセチルシステイン (*N*-acetylcysteine: NAC) と同様に、濃度依存的に ROS の抑制活性を示したが、レチノイン酸 (RA) には同様の活性がなかった (Fig.2-6A)。

次に HDF における UV 照射によって誘導される細胞内 ROS に及ぼす影響を DCFH-DA を用いて調べたところ (Fig.2-6B)、FX と NAC は濃度依存的に UV による細胞内 ROS 産生を抑制したが、RA は同様の活性は示さなかった。



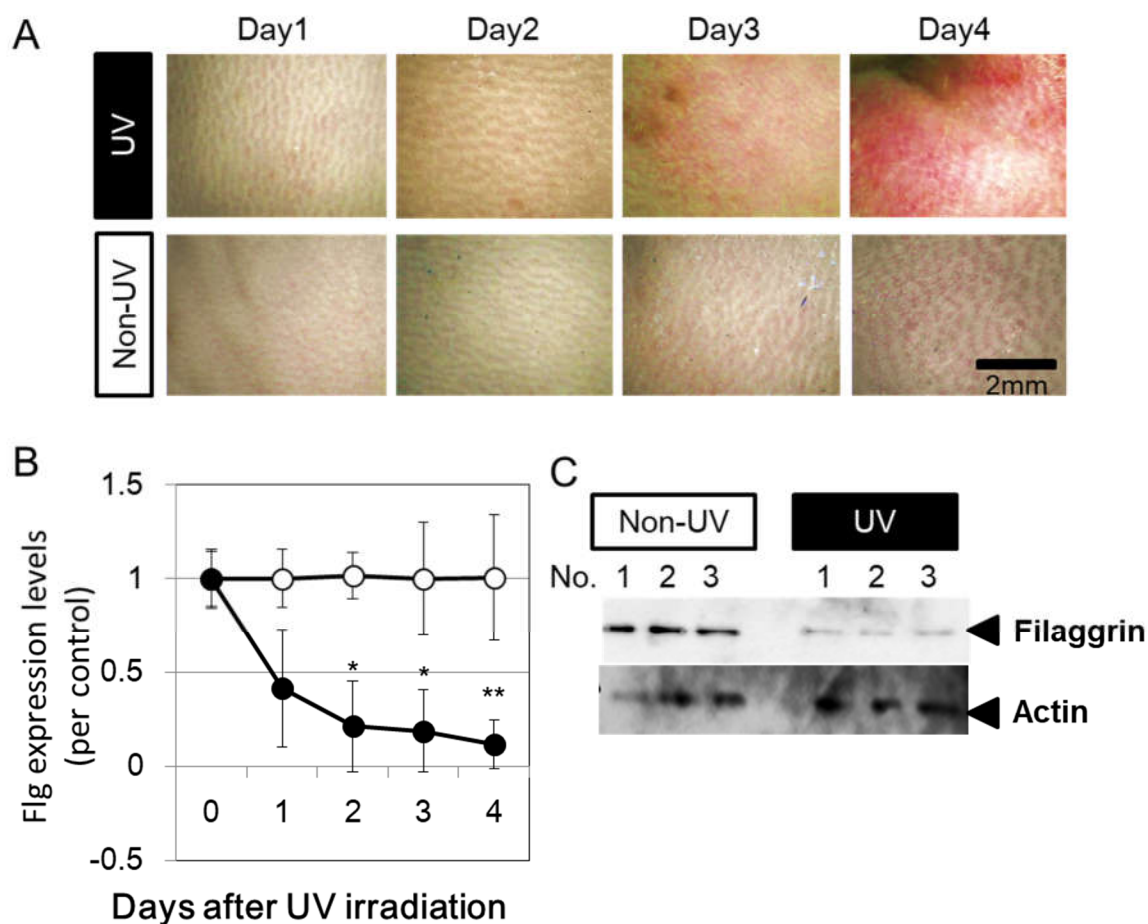
**Fig.2-6 ORAC assays and intracellular ROS quenching assays in HDF cells.**

A, ORAC assays were performed as described in “Materials and Methods”. T, trolox. B, FX and NAC elicited ROS quenching activities in HDF cells. Indicated concentration of reagents were added 30 minutes before the addition of 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, vs 1μM trolox. n=4. Similar results

were obtained from quadruplicate experiments.

### 1-3-2. 損傷皮膚に対する FX の修復作用

UV 照射による皮膚損傷は、持続性の炎症に起因する。そのため、UV 照射直後の皮膚変化を詳細に解析することは、皮膚損傷を改善する薬剤を探索する上で非常に重要であると考えられる。そこで、UV 照射直後の皮膚状態を把握するために、マイクロアレイ解析を実施した。まずは、マウスの背部領域へ、UV (2.7J/cm<sup>2</sup>) を4日間(1時間/日)暴露し、肌スコープを用いて皮膚状態を観察した。マウス背部の片側を UV 照射から保護して同一個体内で、陰性対照としての非対照部位を設けた。その結果、UV 照射しなかった皮膚に対して、UV 照射を行った皮膚は発赤を呈した (Fig.2-7A)。本条件下で、経日的に皮膚サンプルを回収した後、マイクロアレイ解析を実施した。試験には UV 照射を施したマウス背部皮膚と、UV 非照射皮膚から、それぞれ得られた結果についてデータマイニングを行った後、候補遺伝子について Real time PCR 解析によるスクリーニングを行った (data not shown)。その結果、Flg を UV による初期応答遺伝子として同定した。UV 照射を施した皮膚では Flg 遺伝子の発現量が経日的に減少している結果を得た (Fig.2-7 B,C)。特に、UV 照射によって皮膚の損傷状態が目視で認識できる照射4日目よりも前の照射1日目において、Flg 遺伝子発現の顕著な低下が確認された。本結果は、UV 照射がもたらす皮膚損傷の初期段階を判断しうる新たな評価マーカーになると考えた。

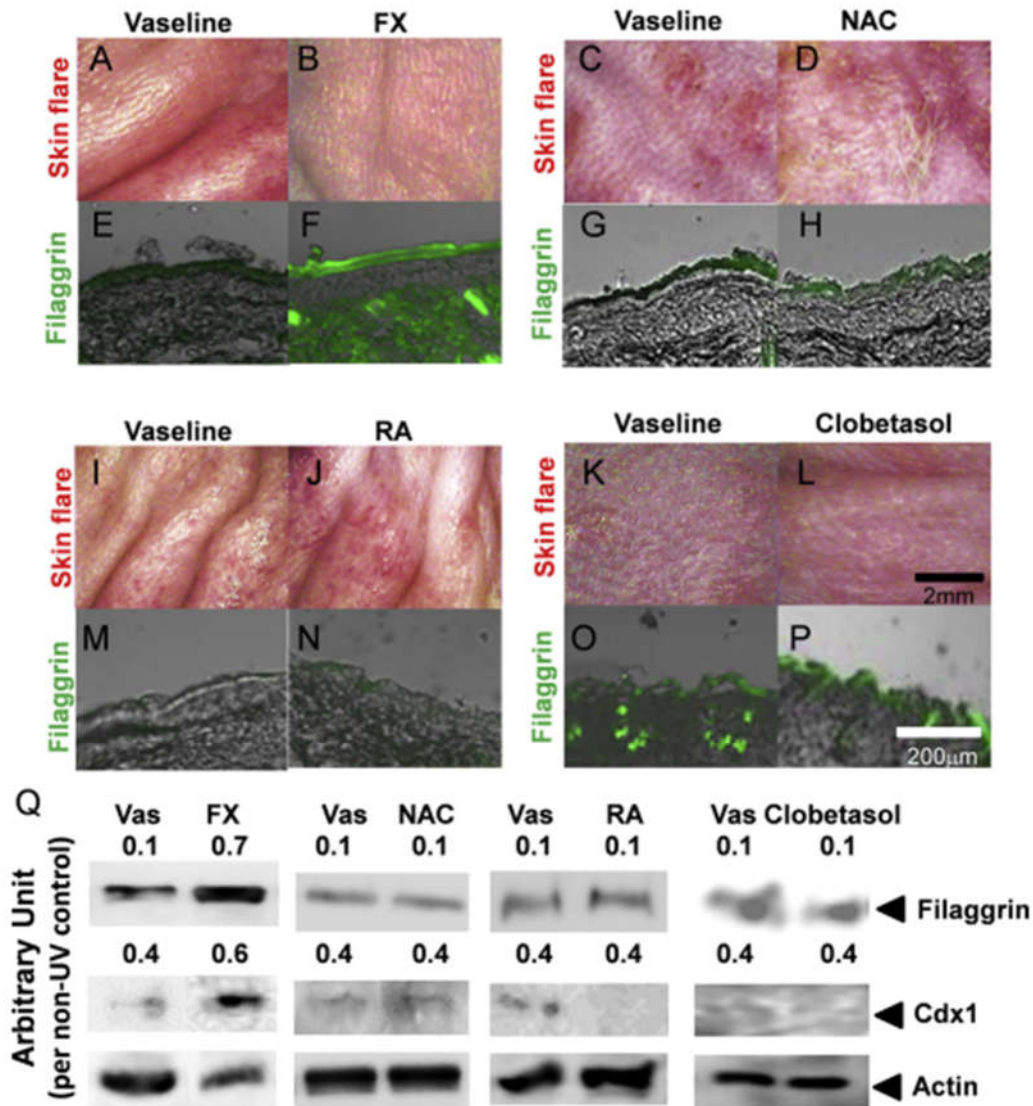


**Fig.2-7 UV-sensitive gene, Filaggrin (Flg).**

We examined gene expression profiling in skin with UV exposure ( $2.7 \text{ J/cm}^2$ ). (A), UV was exposed for four days (1-h/day) and skin conditions were monitored using a “skin scope”. Dorsal skin was shielded on one side from UV irradiation. Non UV control (Non-UV), UV-treated (UV).  $n=5$ . (B, C), UV irradiation caused downregulation of Flg mRNA (B). Flg expression levels were decreased by UV irradiation (closed circles) compared to without UV irradiation (open circles). The value without UV irradiation at day 0 was defined as 1, and relative values are shown. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM for six mice. Similarly, Flg protein levels were downregulated by UV irradiation (C).  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.005$  vs UV irradiated samples. For immunoblot analysis, dorsal skin samples were lysed and homogenized with Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, 10% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS), and were applied to the gel (50 mg proteins per lane). Reproductive data from three mice are shown. Non UV control (Non-UV), UV-treated (UV).

次に、FX、NAC および RA の本モデルでの利用可能性を検証するために、*in vivo* において各化合物が UV 誘発性の皮膚損傷に及ぼす影響を検討した。マウス背部毛を除毛し、

UV 照射 30 分前に背部の正中線を中心に左側を対照としてワセリンを塗布し、右側を 0.5% (w/w) FX 含有ワセリンで処理した。UV 照射を 4 日間施して、皮膚損傷を誘導した。その結果、0.5% (w/w) FX 含有ワセリンで処理した皮膚は、UV 誘発性の皮膚損傷に対して顕著な皮膚保護効果が確認された (Fig.2-8A, B)。更に、皮膚を採取し、免疫組織化学染色による解析を行ったところ、UV 照射による損傷皮膚では、Flg の発現は観察されなかったのに対して、FX を施した皮膚では、顕著な FX の発現が確認された (Fig.2-8E, F)。一方、10% (w/w) NAC または 0.5% (w/w) RA を同様に処理したところ、UV 照射による皮膚損傷の保護作用は確認されず (Fig.2-8C, D, I, J)、Flg の発現も認められなかった (Fig.2-8G, H, M, N)。さらに、強力なステロイド性抗炎症薬である 0.05% (w/w) クロベタゾール (Dermovate®) についても、UV による皮膚損傷の保護作用は確認されず (Fig.2-8K, L)、Flg の発現も改善しなかった (Fig.2-8O, P)。



**Fig.2-8 Effects of compounds on UV-induced skin damage in *in vivo*.**

FX protected skin from UV-induced sunburn. 0.5% (w/w) FX (A-B), but not 10% (w/w) NAC (C-D), 0.5% (w/w) RA (I-J), or 0.05% (w/w) clobetasol (K-L) were applied to dorsal skin. Treatment with the respective materials was performed 30 min before UV irradiation. Immunohistochemical and immunoblot analysis.

Dorsal skin was fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde in PBS for two days and specimens were prepared as described in “Materials and Methods”. For each individual sample, 10-20 specimens were exposed to antibodies and representative images are shown (M-P). Some of the skins were cut into 5 mm squares and dissolved prior to fixation, with storage at 85 C until needed for immunoblot analysis (Q). Only FX restored the expression of filaggrin, whereas NAC, RA and clobetasol had no effect. Representative data are shown from each of 6 mice samples. The expression level of proteins without UV irradiation was defined as 1, and the relative expression levels of proteins are shown. Vaseline control (Vaseline, Vas), fucoxanthin-treated (FX), N-acetylcysteine-treated (NAC), retinoic acid-



treated (RA), clobetasol-treated (Clobetasol). n=5.

続いて、UV 照射の皮膚損傷によるバリア機能の低下について、FX の作用を検討した。

マウス背部皮膚へ、4 日間の UV 暴露と FX の連続塗布を施した後、FITC デキストラン処理

を行った。該当皮膚について組織学的解析を行うことで、FITC デキストランの透過性を検

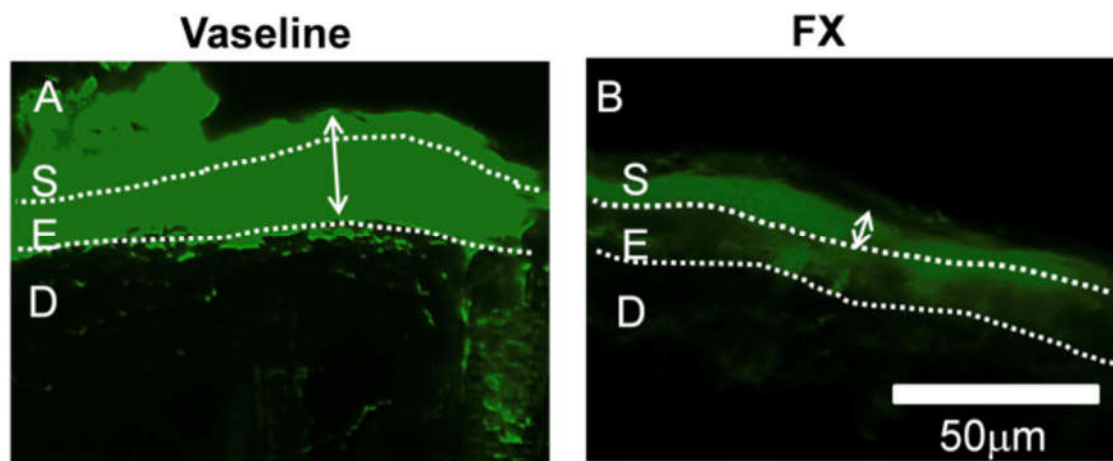
証したところ、対照であるワセリン塗布を施した皮膚では、FITC デキストランは、角層・

表皮層を透過したが、FX 塗布を施した皮膚では、角層のみ透過性を認めた (Fig2-9A, B)。

FITC デキストランは、いずれの塗布条件においても真皮層への到達は確認されなかった。

本結果から、UV 照射による皮膚損傷で破綻したバリア機能を、FX は効果的に改善する作

用を有することが示唆された。

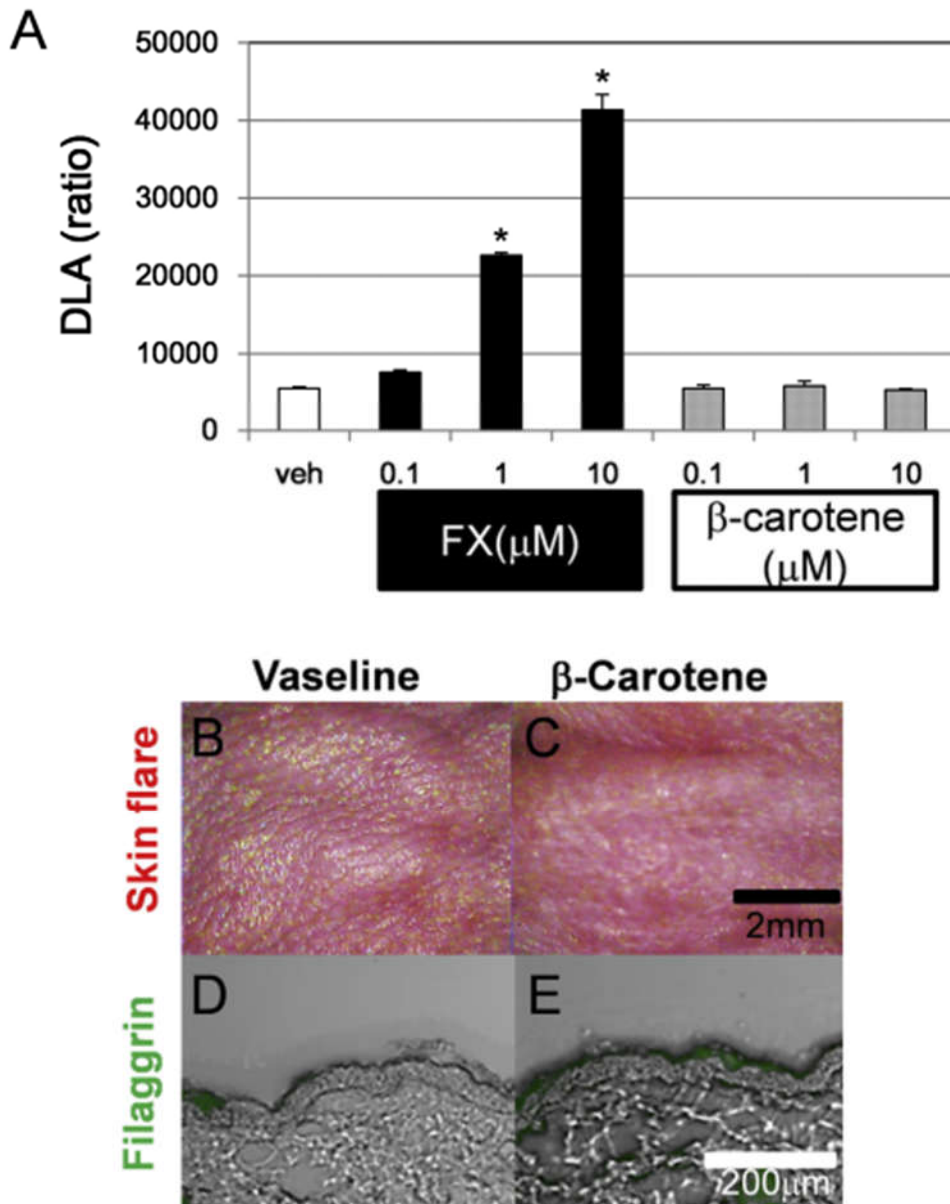


**Fig.2-9 Permeability assay of FITC-dextran**

(A, B): Histochemically analysis by FITC-dextran. Skins were irradiated UV for 4 days, and the treatment with or without FX was performed until day 8. Then, skins were treated with vaseline containing 1% (w/v) fluorescein isothiocyanate-conjugated dextran (FD-4; Sigma Chemicals) for 3 hours. Then, skins were isolated and fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde, and frozen sections were obtained and analyzed. S: stratum corneum, E:epidermis, D: dermis. FX-treated skin slightly immersed to epidermis, while vaseline-treated skin immersed to dermis of FITC-dextran across the epidermis.

### 1-3-3. $\beta$ カロテンとの比較

次に、Flg 遺伝子プロモーターに対する FX および、 $\beta$  カロテンの影響を調べるために、Flg2000-luc を一過的にトランスフェクションした初代培養皮膚細胞へ FX および  $\beta$  カロテンを暴露した (Fig.2-10)。その結果、Flg 遺伝子プロモーター活性は FX によって濃度依存的に増強したが、 $\beta$  カロテンによっては影響を受けなかった (Fig.2-10A)。in vivo において  $\beta$  カロテンは、UV 照射による皮膚損傷からの保護作用、または UV による Flg の発現の抑制を改善することはできなかった (Fig.2-10B-E)。



**Fig.2-10 β-carotene failed to protect against UV-induced sunburn and to induce filaggrin expression.**

(A), Reporter analysis of FLG p2000-luc. Luciferase vector transfected into primary skin fibroblast cells. FX or β-carotene (0.1μM, 1μM, 10μM) were treated after three hours of transfection. Veh: vehicle control (DMSO). Data are presented as mean ± SEM of four wells. Similar results were obtained from an additional four experiments. \* $P < 0.001$  vs DMSO control. (B-E), Effects of β-carotene on UV-induced skin damage and Flg expressions were analyzed immunohistochemically. Vaseline control (Vaseline), β-carotene-treated (β-carotene). n=5.

なお、ロリクリンの発現については、FXをはじめ、今回用いた抗酸化物質、抗炎症薬

剤による影響は認められなかった (data not shown)。これらの結果から、FX には、カロテノイド類である  $\beta$  カロテンには認められない Flg 遺伝子の誘導作用が認められた。

#### 1-3-4. Flg 遺伝子発現調節機構

UV 照射による皮膚損傷の初期応答として調節される Flg 遺伝子の発現制御機構を調べるために、TF サーチプログラム (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) を用いてマウス Flg 遺伝子プロモーター2000bp 領域の *in silico* 解析を行った。クラスター化した 3 つの RA 応答性エレメント (Cdx 結合部位; A,A/T,T,A/T,A,T,A/G) が認められた (Fig.2-11)。



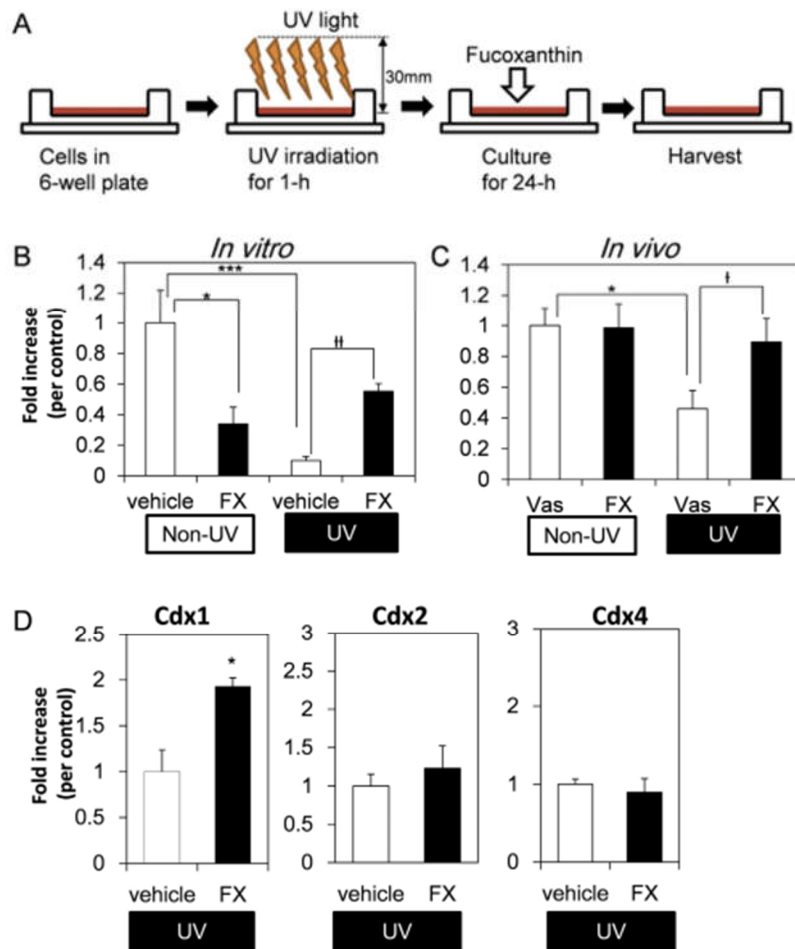
**Fig.2-11 The Cdxs binding site in the mouse FLG promoter region.**

The red character indicates predicted Cdxs binding sites.

エレメントに結合すると推定される結合因子 Cdx1 の発現量について、*in vivo* で検討を行った。ウエスタンブロット解析の結果、Cdx1 発現は FX のみによって回復したが、RA によって回復しなかった (Fig.2-8Q)。

次に、Flg 遺伝子発現への影響を詳細に解析するために、初代培養皮膚細胞を用いた UV 照射による実験モデルを設計した (Fig.2-12A)。解析の結果、*in vitro* での 1 時間の UV 照射は、Flg 遺伝子発現を顕著に低下させたのに対し、FX を添加すると Flg 遺伝子発現の低下が抑制された (Fig.2-12B)。しかし、*in vivo* においては、UV 照射を施さない条件下では、FX による Flg 遺伝子への影響は確認されず、UV 照射時においてのみ、Flg 遺伝子発現の低下が抑制される結果を得た (Fig.2-12C)。これらの結果から、FX の持つ Flg への影響は、UV 照射時における特異的な作用である可能性が示唆された。なお、初代培養皮膚細胞および、HDF 細胞に対する UV 照射は、細胞生存性に影響を示さなかった (data not shown)。

続いて、初代培養皮膚細胞への UV 照射における Cdx 遺伝子ファミリーの発現調節について、FX の影響を調べた (Fig.2-12D)。UV 照射によって、すべての Cdx 遺伝子ファミリーは、非照射条件と比較して最大 10%発現が低下した (data not shown)。FX の処理によって、Cdx 遺伝子ファミリーである Cdx 2, 4 は、UV 照射条件において、非照射条件と比較して遺伝子発現への影響が認められなかった。一方、Cdx1 遺伝子については、発現低下の抑制作用がみとめられた。



**Fig.2-12 The effect of FX on Flg gene expression.**

(A), *In vitro* culture model for evaluation of FX action. Embryonic skin fibroblastic cells were plated in 6-well plate. After confluent, cells were exposed to UV for 1 h from an indicated distance, and then cultured for 24 h with or without FX. Cells were harvested, and gene expression levels were analyzed by Real time PCR.

(B), the effect of FX on Flg gene expression *in vitro*. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 wells. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs vehicle control (DMSO) in non-UV condition, † $P < 0.01$ , vs vehicle control in UV exposed condition. Similar results were obtained from an additional two experiments.

(C), the effect of FX on Flg gene expression *in vivo*. The effect of FX on Flg expression levels in dorsal skins were analyzed under the conditions shown in Fig.1-7.  $n=5$ . \* $P < 0.05$ , vs vaseline control in non-UV condition, † $P < 0.05$ , vs Vaseline control in UV exposed condition. The expression level of Flg mRNA without UV irradiation was defined as 1, and the relative expression levels are shown (B, C).

(D), The effect of FX on Cdx family genes *in vitro*. The expression level of respective Cdx gene mRNAs with UV irradiation was defined as 1, and the relative expression levels are shown. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 wells. \* $P < 0.05$ , vs vehicle control (DMSO) in UV exposed condition. Similar results were obtained from an additional two experiments.

FX によって誘導される Flg 遺伝子発現の調節機構を解析するために、Flg プロモーターの deletional construct を作製した (Fig.2-13A)。通常の培養条件下では、Flg2000-luc の活性が強く検出されたのに対して、Flg1200-luc のレポーター活性は低下することを見出した。さらに、初代培養皮膚細胞において、Flg プロモーター領域の、-2000~-1200 領域まで FX に対して反応を示した。Cdx1 を過剰発現した初代培養皮膚細胞は、Flg の発現増加が認められた (Fig.2-13B, C)。ChIP アッセイの結果、Cdx1 が Flg プロモーター領域における、クラーター 1 領域と、実際に相互作用することを見出した (Fig.2-13D, 2-11)。以上の結果から、FX の Flg 遺伝子発現の調節機構には、Cdx1 を介した機序であることを明らかにした。

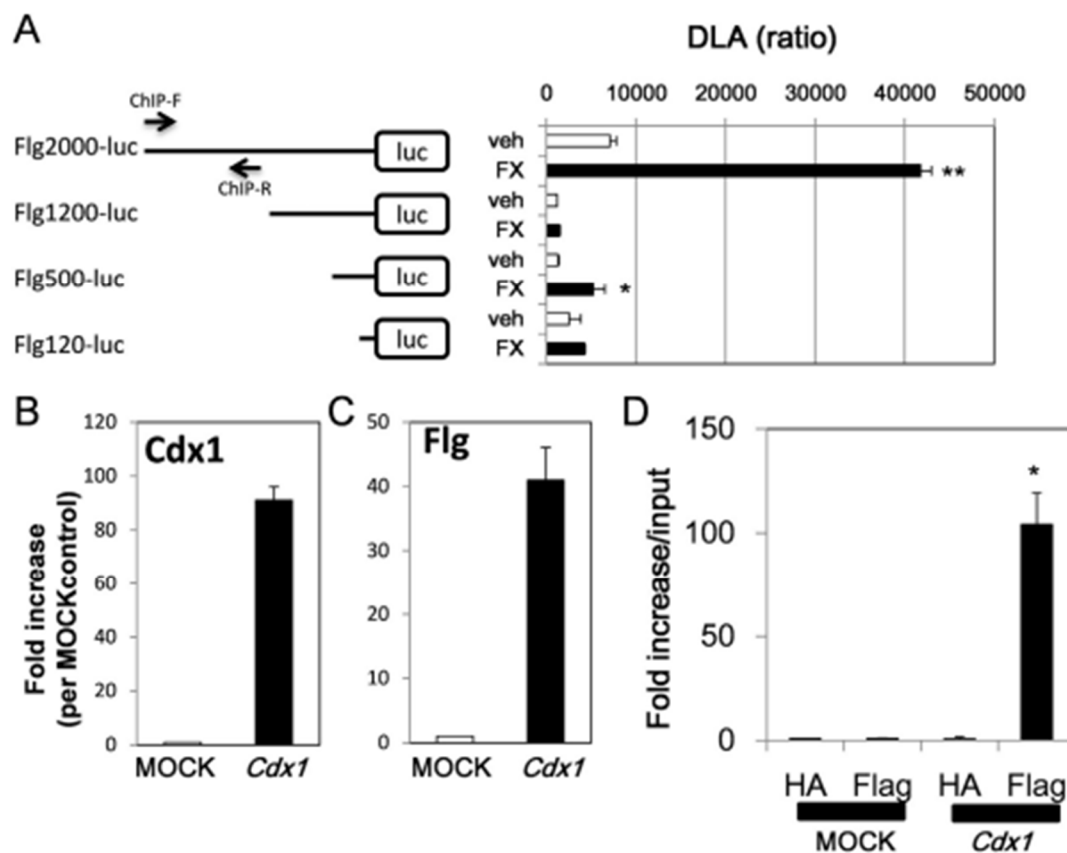


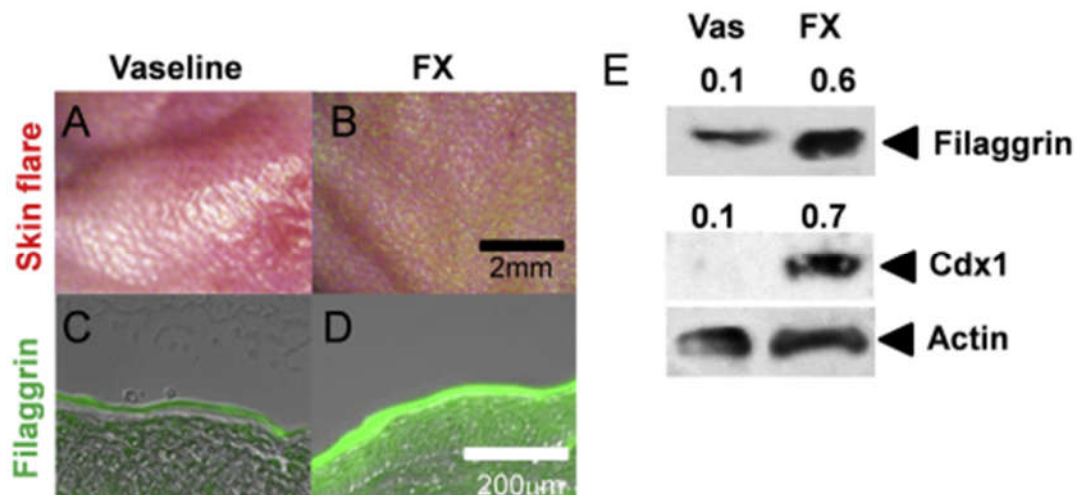
Fig.2-13 Direct interaction between Cdx1 and Flg gene promoter.



(A), Flg promoter activities regulated by FX. Cells were transfected with indicated Flg-luc constructs (left panel). Three hours after transfection, cells were treated with or without FX. Flg promoter activities were specifically potentiated by FX in Flg2000-luc, while FX had little influence on other deletional constructs (right panel). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 4-8 wells.  $*P < 0.05$  vs vehicle control (DMSO). (B, C), Overexpression of Cdx1 promoted Flg expression. We tested Flg gene expression levels in both MOCK and Cdx1 overexpressed cells. Real time PCR analysis was performed as described in “Materials and Methods”. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of four wells. (D), The interaction between Cdx1 and Flg promoter by ChIP analysis. Fragmented chromatin of MOCK or Cdx1-transfected cells were immunoprecipitated by FLAG M2 beads. Amplification input DNA was constant. Immunoprecipitated DNA-derived amplification by Flag-M2 beads was detected only in Cdx1-transfected cells.  $*P < 0.001$  vs MOCK control. Similar results were obtained from an additional three experiments.

### 1-3-5. *in vivo* における FX の治療効果

最後に、UV 照射による皮膚損傷への FX の治療効果を調べた。マウス背側に、UV 照射を 4 日間施すことで、皮膚損傷を誘導した (Fig.2-14)。照射 5 日目から、UV 照射と並行して、0.5% (w/w) FX を 4 日間処置した。その結果、UV 照射による皮膚損傷が改善した (Fig.2-14A,B)。試験終了時である UV 照射 8 日目に採取した皮膚サンプルを用いて、免疫組織化学染色解析と、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、UV 照射によって低減した Flg 発現が、FX 処置によって回復することを見出した (Fig.2-14C-E)。さらに、Cdx1 の発現も顕著に回復することを見出した (Fig2-14E)。これらの結果から、FX は、UV 照射による皮膚損傷の予防作用だけでなく、治療効果も有していることが示された。



**Fig.2-14 Restoration of UV-induced damaged skin by FX.**

(A, B), FX treatment cured sunburn. Skins were treated with 0.5% (w/w) FX from days 4-8, and UV irradiated from days 1-8. (C-E), Immunohistochemical and immunoblot analysis were performed. FX restored Flg expression that was decreased by UV exposure; Cdx was also restored by FX. The expression level of proteins without UV irradiation were defined as 1, and the relative expression levels of proteins are shown. Vaseline control (Vaseline, Vas), fucoxanthin-treated (FX). n=5.

#### 1-4. 考察

健康皮膚において、UV 照射による中程度の日焼けであれば皮膚損傷は重大な疾患に繋がる可能性は低い。しかし、アレルギー性接触皮膚炎 (50)、アトピー性皮膚炎 (51)、脂漏性皮膚炎 (52) を伴った皮膚の場合は、その症状を悪化させる可能性が報告されている。興味深いことに、これらの疾患のいずれにおいても、治療を目的とした UV 照射プロトコールで有効性を示す薬剤の使用が効果的である (53)。しかし、有効性を示す薬剤の詳細な作用機序については不明な点が多い。さらに、UV 照射に対する適切な治療は、年齢と重症度によって異なるはずである (54)。少なくとも健康皮膚では、水分が消失する主要な因子は、皮膚バリアの喪失であると考えられている (55, 56)。本研究では、UV 感

受性遺伝子を特定し、その遺伝子の機能回復を達成する化合物を探索することを目的とした。検討の結果、FX が UV 照射による皮膚損傷で減少した Flg の遺伝子発現に対して、高い改善効果を有することを認めた。

UV 感受性の高い遺伝子を、マイクロアレイ解析によって探索したところ、UV 照射による初期感受性を示す遺伝子として、Flg を同定した。さらに、Flg 遺伝子は、FX によって遺伝子発現の低下が抑制されたこと、UV 照射による皮膚損傷を回復したことから、初期の皮膚損傷状態を反映する重要な指標であることが示唆された。

FX の Flg への作用機序を検証するために、*in silico* を用いた解析によって、Flg 遺伝子プロモーター内の Cdx 遺伝子ファミリーの重要性を予測した(Fig.2-11)。Fig.1-8Q に示した通り、UV 照射によって発現が抑制された Cdx1 は、FX によって特異的に発現抑制が解除された。*in vivo* で確認された FX の Cdx1 への作用は、初代培養皮膚細胞を用いた試験によっても同様の結果を得た (Fig.2-12B)。しかし、UV 照射を施さない場合の FX の作用には、*in vitro* と *in vivo* において違いが認められた。*in vitro* では、Flg 発現を FX が阻害したのに対して、*in vivo* では、FX の塗布によって、Flg 発現に影響を示さなかった (Fig.2-12B,C)。

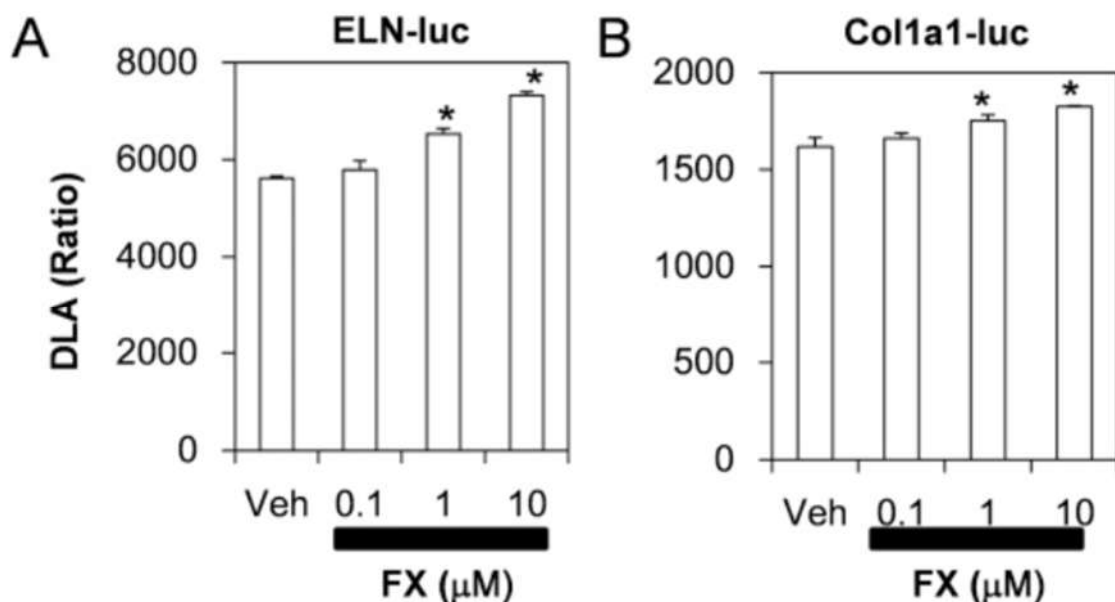
*In vitro* では、通常の培養条件下でも高い Flg 遺伝子の誘導活性が起こることで、FX の活性が検出しにくくなっている可能性が示唆された。*in vitro* と *in vivo* の差異について結論を得るには、更なる研究が必要であろう。Flg 遺伝子は、動物種によって異なる遺伝子座にコードされており、共通した遺伝子プロモーター領域は保持されていない。したがって、

Flg 遺伝子への応答性は、動物種の間で異なる反応を介する可能性が考えられる。しかし、今回得られたマウスモデルでの FX の Flg への作用機序は、少なくとも齧歯類においては、Flg 遺伝子の活性化を示すことが明らかとなった。

マウスおよびヒトの Cdx1, Cdx2 および Cdx4 は、初期発生の段階における体軸設定と、前後パターン形成に寄与する因子として報告されている (57)。さらに Cdx 遺伝子は、神経組織および内胚葉組織の発生を調節し、腸組織の恒常性や胃がんの発症において重要な因子として働くことが明らかとなっている (58)。しかし、皮膚における Cdx 遺伝子の役割には不明な点が多く、表皮の Flg 遺伝子を調節する因子として Cdx 遺伝子に着目した報告はない。本章では、初代培養皮膚細胞において Cdx1 が Flg 遺伝子の調節因子として機能したことを初めて報告した。FX が Cdx1 誘導後、Flg 遺伝子を活性化することを示した (Fig.2-13A-C)。Cdx1 は Flg プロモーター領域と直接相互作用することで、少なくとも *in vivo* では、Cdx1 によって厳密に調節されている可能性が示唆された (Fig.2-13D)。

ROS によって引き起こされる細胞内外の酸化ストレスは、皮膚老化を進行させることが知られている (59)。UV は細胞における ROS の生成を促進するため、皮膚老化は通常、UV 照射との関連で検討される (59)。近年の研究報告では、カロテノイドの一種であるリコピンに、ROS に起因する酸化ストレスの低減を介した、細胞保護作用が報告されている (60)。同じカロテノイドである FX は、強力な ROS の低減作用と、UV 照射に対する保護作用を示した (Fig.2-5, 2-8)。しかし、強力な ROS の抑制剤である NAC は、UV 照射による皮膚損傷への保護作用は見いだせなかった。抗酸化作用は、 $\beta$  カロテン、アス

タキサンチン、リコピンのようなカロテノイドの活性として最もよく知られている。FX は、好気条件下で強力な抗酸化作用を示すことが報告されている (44,61)。今回の実験条件を考慮すると、UV 照射に対する FX の作用は、好気条件下における ROS の低減効果に依存していないことが示唆される。しかし、UV 吸収性の有無による影響も排除しきれない。そのため、皮膚障害の主要なリスク因子である UV-A (315~400nm) に対して、FX による吸収性を確認した。その結果、FX は UV-A の吸収性を示さなかった (data not shown)。本結果から、FX の効果は、UV 吸収によるものではないことも示唆された。加えて、ヒト ELN、およびラット *Coll1a1* プロモーター活性が、FX の濃度依存的に活性化されることを見出した。これらの結果から、FX には、Flg 遺伝子の発現調節以外にも、いくつかの機序を介して皮膚代謝を活性化をもたらす可能性を明らかにした (Fig.2-15)。



**Fig.2-15 FX stimulated human elastin and rat *coll1a1* promoter activities.**

HDF cells were transiently transfected with ELN-luc (A) or *Coll1a1*-luc (B) with pRL-CMV. 3 hour after transfection, cells were treated with indicated concentration of FX. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs vehicle (Veh) control.  $n = 4-8$ . Similar results were obtained from triplicate experiments.

これらの作用は、FX では確認されたのに対して、RA では UV 照射による皮膚損傷、および Flg 遺伝子の発現低下を抑制できなかったため (Fig.2-8I, J, M, N, Q)、UV 照射に対する FX の保護作用が RA 様作用とは異なることが示された。FX は、カロテノイドの一種であり、 $\beta$  カロテンと化学的な類似性を有する。しかし、 $\beta$  カロテンは、UV 照射による皮膚損傷の保護作用が確認できず、Flg 発現および、Flg 遺伝子プロモーターの活性化は認められなかった (Fig.2-10)。これらの結果を考慮すると、抗酸化剤である NAC においても、UV に対する皮膚保護作用を有していないことが想定される (Fig.2-6)。

これまでの報告から、 $\beta$  カロテンは体内吸収後にビタミン A に代謝されることが知られている (62)。多量に投与することで、 $\beta$  カロテンは脂肪組織に蓄積される。しかし、皮膚に外用塗布された  $\beta$  カロテンは、内服による体内吸収とは異なる機序で作用する可能性が高く、RA への代謝を経ずに皮膚保護作用を発揮すると考えられている。野菜や海産物の多くは、FX を含む数種類のカロテノイドを含んでおり、プロビタミン A として機能していると考えられている (44)。これまでに、RA の皮膚への連続塗布は上皮ケラチノサイトの成長と分化を促すことが示唆されている (63)。FX は血液中にフコキサンチノールとして存在し、その後、アマルシアキサンチン A に代謝されることが報告されている (64)。このように、FX またはその代謝物が、カロテノイド類で特有の効果を持つという強い証拠が存在している。また、ステロイド性抗炎症剤であるクロベタゾールも、UV 照射による皮膚損傷への改善作用を示さなかったことから (Fig.2-8K,L)、少なくとも UV 照

射後の急性期においては、ステロイドだけでは改善することはできないと考える。

## 1-5. 結論

第1章では、UV照射によるFlgの発現低下の抑制を介したFXの予防・治療効果に焦点をあてた。アトピー性皮膚炎においては皮膚バリア機能が破綻しており、その発症因子としてFlgの発現低下が報告されている(65)。FXのFlgの発現低下の抑制作用から、アトピー性皮膚炎を含む、同様の皮膚状態でも有効に作用することが期待される。本事実を確認するためには、さらなる研究が必要である。本研究では、FXが真皮代謝の亢進と、表皮におけるCdx1を介したFlgの発現調節機構によって、UV照射による皮膚破壊の改善作用を発揮すると結論付けた。

## 第2章

**N $\epsilon$ -(carboxymethyl) lysine (CML)**は **NF- $\kappa$ B** 非依存的に **Sonic hedgehog (Shh)**発現を阻害することによって毛包形成を遅延させる

### 2-1.緒言

AGEs は、糖（グルコース等）とタンパク質との非酵素的グリコシル化反応を経て生成される最終反応生成物の総称であり（66）、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパチー等の糖尿病性合併症の発症や進行に直接関与している物質として研究されてきた（66）。CML は、非架橋性の AGEs の一種であり、皮膚に蓄積することで、加齢現象（シワ、たるみ等）が生じやすくなることが報告されている（67）。CML は、酸化ストレスや長期にわたるタンパク質の傷害を示すバイオマーカーとしても知られており（68）、RAGE を介して、NF- $\kappa$ B 経路を活性化させることが明らかとなっている（68）。

毛包の形態形成には、Ectodysplasin A (EDA)や Wingless-related mouse mammary tumour virus integration site (Wnt)を介した、BMP、Shh 等の複数のシグナル伝達経路が関与している（69-72）。Ectodysplasin A receptor (EDAR)のシグナル伝達は、初期のプラコード誘導での Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の調節に関与している。一方では、BMP シグナル伝達の抑制因子としても働き、プラコードの形成を阻害する（73）。EDA-A1/EDAR シグナル伝達経路は、細胞間情報伝達による毛包発生初期のプラコードでの Shh の発現を促進する（74）。Shh を欠くマウスにおいては、皮膚の毛包形成が阻害されることが報告されていることから（75）、Shh は主要な毛包形態形成因子と考えられる。Shh は、受容体である Patched (Ptch)1、Ptch2 に結合



した後、その下流で作用する転写因子 Glioma associated oncogene (Gli)1、Gli2、Gli3 に伝達される (76)。EDA-A1 と EDAR は、NF- $\kappa$ B を活性化させることから、Tumor necrosis factor receptor-associated factor (Traf) 6 を含むシグナル伝達カスケードの下流に関与しているものと考えられる (77)。したがって、NF- $\kappa$ B 経路が活性化すると、Shh の発現誘導および毛包形成につながる。AGEs は、糖尿病と密接に関連している物質であり、糖尿病患者には、しばしば脱毛がみられることが知られている。しかし、脱毛における AGEs の関与、ならびに RAGE を介した脱毛シグナルは明らかではない。

本章では、CML-BSA を生体の皮内に注射する方法で薄毛モデルを作製し、CML の蓄積による毛包形態形成への影響と、作用機序を把握することを目指した。CML-BSA の皮内注射は、毛球部の細胞凝集性を阻害することで、発毛障害と毛幹形成の脆弱化を引き起こすことを見出した。更に、その発症メカニズムは、NF- $\kappa$ B 非依存的な Shh の発現抑制である可能性が認められた。本モデルの活用により、既存薬の作用機序とは異なる、新たな作用機序による薬剤開発の可能性が期待される。

## 2-2.実験方法

### 2-2-1. CML-BSA 試料の調製

50mM グリオキシル酸と 150mM シアノ水素化ホウ素を添加したウシ血清アルブミン (BSA) 50mg/mL (Sigma-Aldrich) または無添加 BSA を、0.2M PBS (pH7.4) にそれぞれ添加し、37°Cで 24 時間インキュベートを行った。インキュベート後、PD-10 カラムを用い

たクロマトグラフィー (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) により精製した。目的外の低分子量の余剰物質を除去するために、Slide-A-Lyzer™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、PBS に対する透析処理を施した。得られたタンパク質を濾過濃縮 (VIVASPIN 500, 10,000 MWCO PES; Sartorius, Germany) し、ビスンコニン酸 (BCA) タンパク質定量キット (Nacalai Tesque) を用いてタンパク質濃度を定量した。CML-BSA は、Coomassie brilliant blue (CBB) による染色、もしくは抗 CML 抗体 (Abcam Co., Ltd.) を用いてウェスタンブロット解析により調べた。

### 2-2-2. 動物倫理委員会

本章で実施する動物を使用したプロトコールは日本薬理学会の指針を満たしており、立命館大学実験動物倫理委員会 (BKC2016-033) の承認を受けて実施した。

### 2-2-3. 細胞培養

初代培養皮膚細胞 (第 1 章 1-2-2.と同様の手法で細胞を調製)、およびヒト胎児腎細胞 293 細胞 (HEK293) (Riken cell bank, Ibaraki, Japan) は、10% (v/v) FBS を含有する DMEM 培地で培養した。初代真皮乳頭細胞は、8 週齢の雌性 C57BL/6N マウスの頬ヒゲから採取・調製した。具体的な採取方法は、採取した頬ヒゲ組織から毛包組織を摘出し、真皮乳頭組織を顕微鏡下で外科的手法を用いて単離した。得られた真皮乳頭組織は、毛乳頭細胞増殖培地

(TOYOBO) で培養した。継代培養を 1 ヶ月以内に 3 回継代培養を行うことで、真皮乳頭組織から out growth した単層真皮乳頭細胞を得た。得られた各種細胞は、24 well plate に播種した。コンフルエントに達した後、well 中央の単層細胞に、イエローチップを用いてスクラッチ処理を施した。スクラッチ処理の 24 時間後、EVOS FL セルイメージングシステムを用いて観察し、擦過個所の回復状態を解析した。細胞増殖または細胞毒性の検査には、Cell Count Reagent SF kit (Nacalai Tesque) を使用した。

#### **2-2-4. Forced hair depilation assay**

シリコン樹脂 (Cemedine Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、8~12 週齢の雌性 C57BL/6N マウス (n=6) の背部に脱毛を施すことで、毛周期を強制的に休止期へ同期させた。翌日、27G×1/2 の注射針 (NIPRO, Osaka, Japan) を用いて、脱毛領域のうち脊柱の左側 10 個所の皮内に BSA (1mg/mL) 200 $\mu$ l、右側 10 個所の皮内に CML-BSA (1mg/mL) 200 $\mu$ l をそれぞれ皮内注射した。注射部位には、墨汁で目印を付した。2 日後にマウスを安楽死させた後、強制脱毛を施した領域の皮膚を採取した。採取した皮膚サンプルは、筋層を除去した後、皮膚組織を Real time PCR 解析の試料として使用した。マウスは、いずれも日本 SLC (Shizuoka, Japan) から購入し使用した。

#### **2-2-5. 組織学的検査**

採取した試料は、中性 10% (v/v) ホルマリン緩衝液で 24 時間固定を行った。その後、パラフィン包埋を施した後、パラフィンブロックを作製した。得られたパラフィンブロックから、連切片標本を 5 $\mu$ m 厚で作製し、Hematoxylin-Eosin (HE)染色、または免疫組織化学染色を施した。蛍光染色には、マウスの Anti-Shh 抗体 (Abcam Co., Ltd.)、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。封入剤には、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 含有の Fluore-KEEPER を使用した。脱毛の程度の検証には、エピラット脱毛テープ (Kracie, Tokyo, Japan) を用いた。脱毛テープへの付着毛幹は、実体顕微鏡 (MZ10F/DFC7000T; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) で観察した。毛小皮 (キューティクル) の観察には、電子顕微鏡 (Keyence VE-8800; Keyence Co., Osaka, Japan) で確認した。アポトーシスの検出には、In situ Apoptosis Detection Kit (Takara Bio Co. Ltd) を使用した。

#### 2-2-6. アデノウィルスベクターの導入

特異的プライマーを用いて、マウス cDNA pool から KOD plus DNA ポリメラーゼで PCR 増幅した。PCR フラグメントを EcoRI で消化し、pACCMV-IRES-EGFP の ECORI サイトにサブクローニングした。得られたベクターと、pJM17 を HEK293 へ遺伝子導入し、DN-RAGE アデノウィルス (DN-RAGE-Ad) を作製した。HEK293 に連続的に感染させ、EGFP、DN-RAGE を発現する高効率のウィルス粒子を調製した。実験には、50MOI (multiplicity of infection) にて感染させた。プライマーを用いて Real time PCR で増幅するのと合わせて、GFP 発現をモ

ニタリングすることで、検出した。NF- $\kappa$ B inhibitor である *I-kB-SR-Ad* は、東京大学医科学研究所の井上純一郎博士より供与いただき、上述したように HEK293 にて高感染率のウイルス粒子を調製した。

#### プライマー配列

DN-*RAGE*

F 5'-gcGAATTCATGCCAGCGGGGACAGCAGC-3'

R 5'-gcGAATTCTCATCGCCACAGGATAGCCCCGA-3'

#### 2-2-7. Real time PCR 解析

第1章と同じ手法を用いて目的遺伝子の定量化を行った。

#### 使用プライマー

mGAPDH-F 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'

mGAPDH-R 5'-GGATGCAGGGATGATGTTC-3'

mShh-F 5'-GGAAAACACGGGAGCAGACC-3'

mShh-R 5'-CCACGGAGTTCTCTGCTTTC-3'

mGli-1-F 5'-GCTGTCGGAAGTCCTATT-3'

mGli-1-R 5'-ACTGGCATTGCTAAAGG-3'

mGli-2-F 5'-CTGACCCGCAACGCCTACT-3'

mGli-2-R 5'-CCGAATGCCGTCATCCAAG-3'

mGli-3-F 5'-AACCCCTATTCTACCCTCCAAA-3'

mGli-3-R 5'-GCTGATAGTGCTGGTATTGCT-3'

mPtch-1-F 5'-AAAGAAGTGCAGCAAGTTTTTTG-3'

mPtch-1-R 5'-CTTCTCCTATCTTCTGACGGGT-3'

mPtch-2-F 5'-GGTCCTCCGCACCTCATATC-3'

mPtch2-R 5'-GCGCAGTCTGAATCAACATC-3'

#### 2-2-8. 統計処理

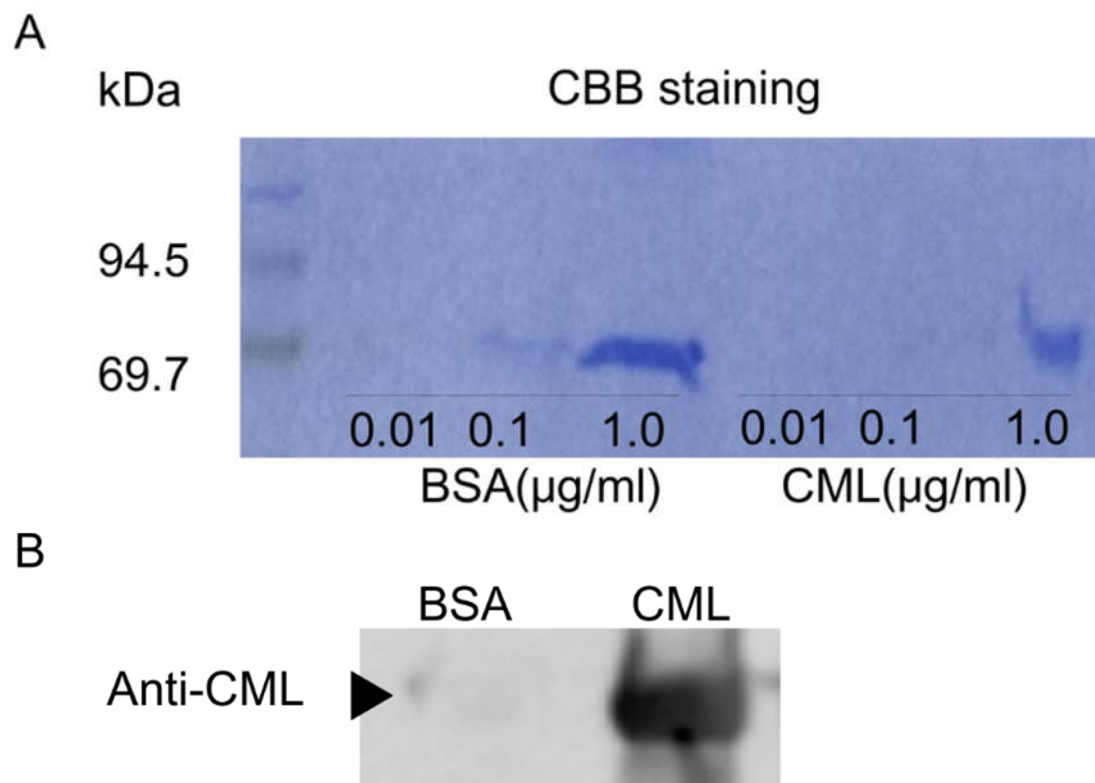
データは、2 群間比較においては Student's t-test により、3 群間以上の比較においては One-way analysis of variance (ANOVA)により検定し、数値 ± 標準誤差値で示した。検定の結果、P 値が 5%以下となる比較試験結果において有意と判定した。

## 結果

#### 2-3-1. CML による毛幹形成抑制作用

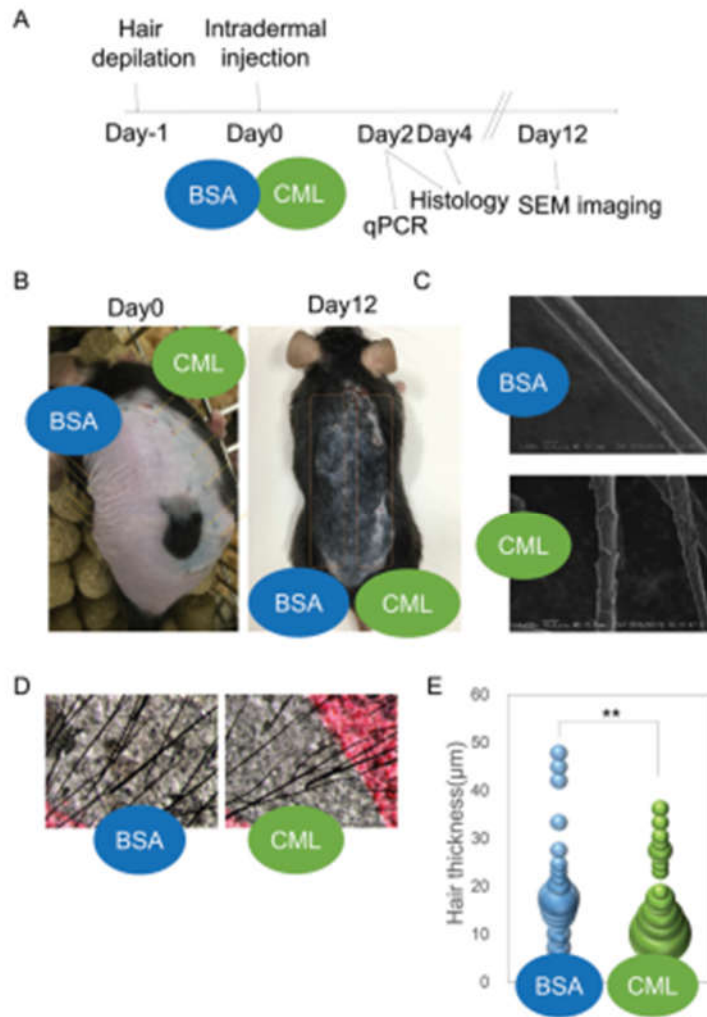
CML がマウス体毛に及ぼす影響を調べるために、マウス背部体毛を強制抜毛することによる休止期毛包への同期を行った。休止期毛包への同期後、合成した CML-BSA を皮内注射した (Fig.3-1, 3-2A)。皮内注射の結果、抜毛による休止期の同期後 12 日目に、注射部位を中心とする同心円状の領域に発毛障害が観察された (Fig.3-2B)。薄毛領域の毛幹を電子顕微鏡を用いて観察すると、毛幹直径の矮小化による形態学的脆弱化と、毛小皮

(キューティクル) の不全が観察された (Fig.3-2C-E)。



**Fig.3-1 Synthetic CML-BSA**

(A) BSA and CML-BSA stained with Coomassie brilliant blue. (B) The anti-CML immunoreactivity of CML-BSA. A total of 1 ng of BSA or CML-BSA was loaded onto a polyacrylamide gel for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to detect anti-CML antibodies.



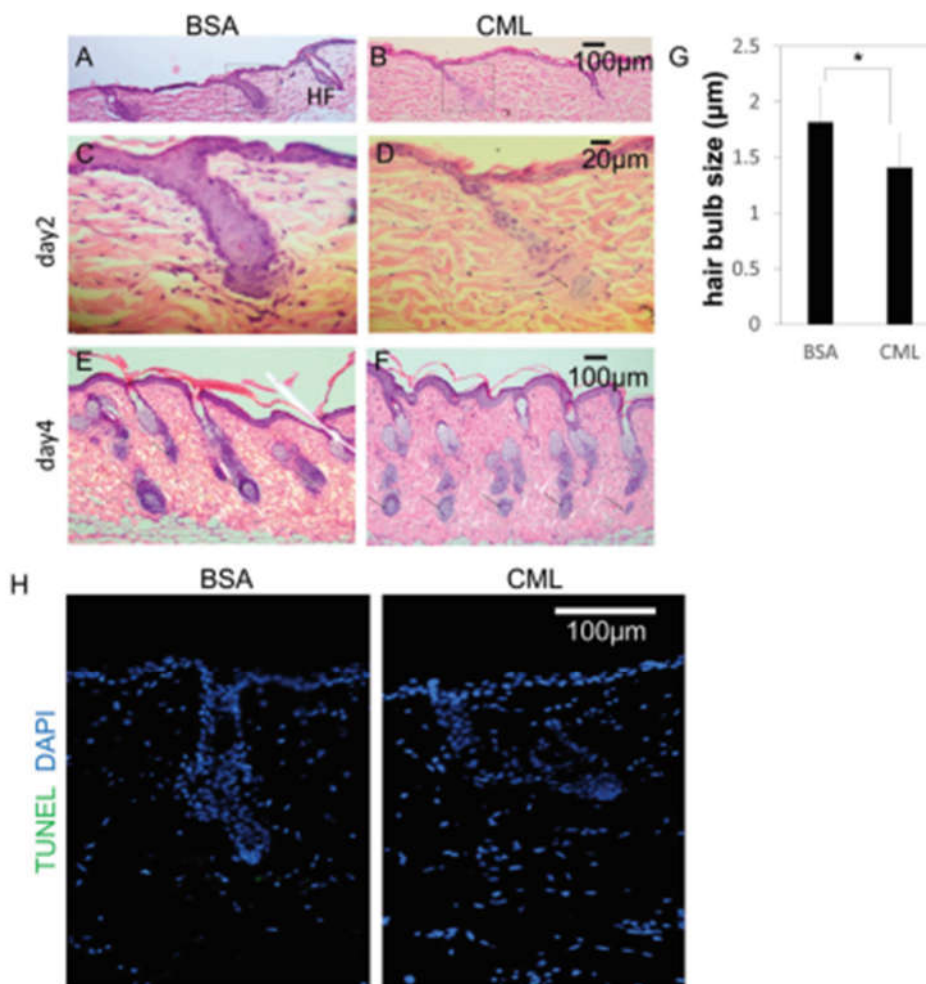
**Fig 3-2. Hair thinning effect of Nε-(carboxymethyl)lysine (CML) *in vivo***

(A) Experimental procedures. (B) Silicone resin was applied to the backs of the C57BL/6N mice and, after drying for 24 hours, the hairs were forcibly depilated. Subsequently, CML-BSA or BSA at a concentration of 1 mg/ml was intradermally injected into the depilated area at 10 sites. The mice were euthanized 2 or 4 days after the injections and the dorsal skin was removed to be used as the sample specimen. (C) Twelve days after the intradermal injection, hair shafts were collected with hair removal tape and examined under an electron microscope. (D) Hair shaft growth 12 days after intradermal injection. (E) CML reduced the hair shaft diameter. The hair shaft samples for the analysis were obtained from the area where BSA or CML was intradermally injected, marked and encircled with a red marker on a piece of clear tape. The thickness of the hair shafts attached to the tape within the encircled area was visualized using a stereoscopic microscope. Pictures inside the figure are representative images. Hair shaft diameter data represent the mean±SEM of 50 to 80 hair shafts collected per mouse. \*\*Compared to the BSA reference,  $P < 0.01$ .



### 2-3-2.CMLによる毛乳頭細胞凝集抑制

毛包形態への影響を調べるために組織学的解析を施した。先程と同様に、マウス背部体毛を休止期に同期させた後、CML-BSA皮内注射を行ったところ、同期後2日目には毛包ダウングロースの抑制が確認された (Fig.3-3A-F)。同期後4日目に、毛球部の細胞凝集が抑制され、毛球部直径の矮小化が観察された。TdT-mediated dUTP nickend labeling (TUNEL) 染色の結果、毛球部の細胞凝集抑制は、アポトーシスによる細胞障害ではないことが示された (Fig.3-3H)。



**Fig 3-3. Miniaturization of the HF size and the inhibition of cell aggregation in the hair bulb region by CML**

(A,B) Two days after forced depilation, CML intradermal injection weakened HF during down-growth

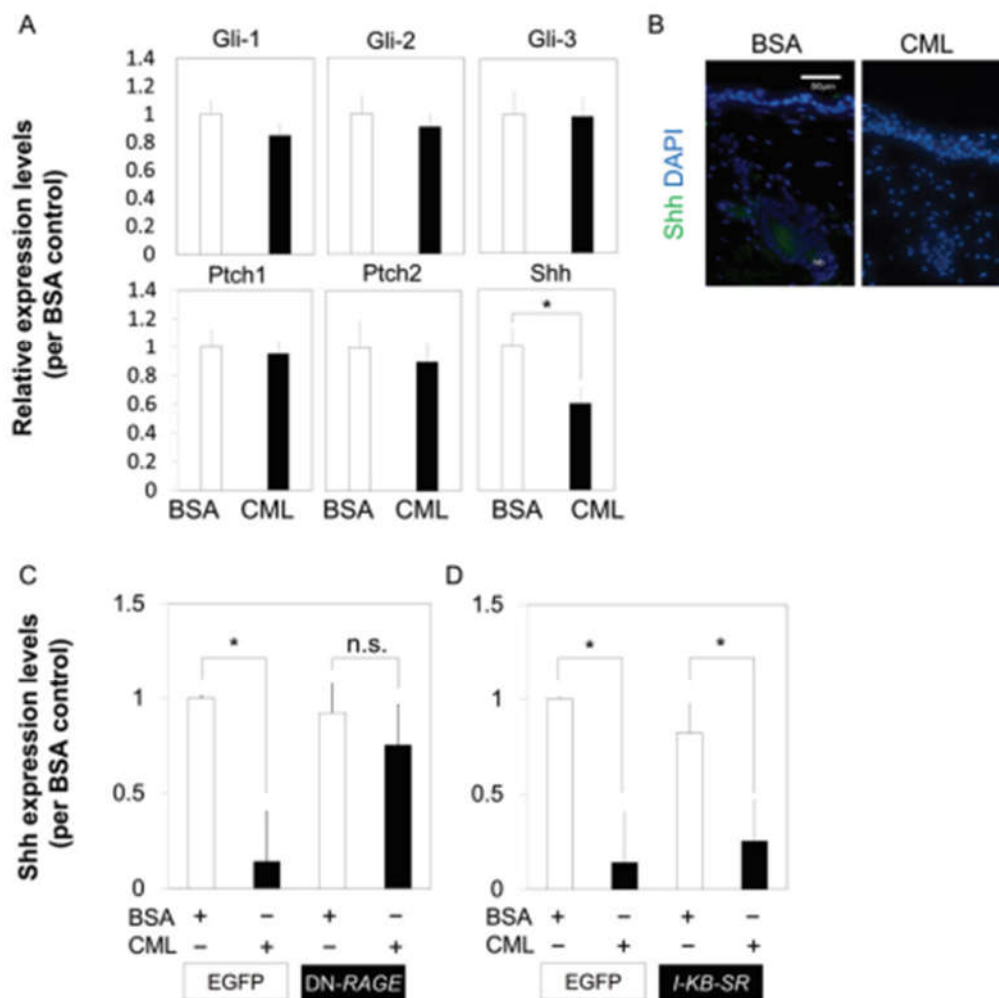
in the early anagen phase. The dorsal skin specimen 2 days after forced depilation was subjected to HE staining. (C,D) are images at high magnification. (E,F) Four days after forced depilation, growth in the hair bulb region was observed when BSA was intradermally injected. However, with CML-BSA, growth in the hair bulb region was inhibited. (G) The hair bulb diameter 4 days after forced depilation. The size of 10 HF's from each of the treatment samples (either BSA or CML-BSA) with an Auber's line, which indicated the maximum diameter of the hair bulb, was measured and shown as mean±SEM. \*\* $P < 0.01$ . (H, I) These are the results of the skin specimen on the second day after forced depilation, mounted in Fluore-KEEPER with DAPI and stained with TUNEL. These are representative images.

### 2-3-3. CML による NF- $\kappa$ B 非依存的な Shh 抑制作用

毛包形成阻害のメカニズムを解析するために、CML-BSA が Shh へ及ぼす影響を検証した。Shh は、毛包形態形成時に発現する主要な毛包形成因子であり、マウスにおいて Shh 遺伝子欠損は発毛障害を示す。CML-BSA 注射後の皮膚組織を採取し、Shh とその受容体および、その下流遺伝子である Ptch1、Ptch2、Gli1、Gli2、Gli3 の発現を Real time PCR により確認した。その結果 Shh の発現が有意に減少しており、受容体およびその下流遺伝子の発現に変化は認められなかった (Fig.3-4A,B)。

次に、毛包が形成される時期である E15.5 の皮膚から初代培養皮膚細胞を準備し、CML-BSA による影響を検討した。その結果、*in vivo* 同様に *in vitro* においても Shh 発現の抑制が確認された。本作用はドミナントネガティブ (DN) -RAGE-Ad によって、その抑制が解除されたことから (Fig.3-4C)、CML-BSA による Shh 発現抑制は、RAGE を介している可能性が示唆された。RAGE は Toll 様受容体 (TLR) とクロストークすることが知られており、その下流では Shh が NF- $\kappa$ B を介して調節されている。そこで、I- $\kappa$ B-SR-Ad を用いて NF- $\kappa$ B 阻害の影響を調べたところ、NF- $\kappa$ B 阻害条件下においても Shh の発現抑制

が維持されており、CML-BSA による作用は、RAGE を介した NF- $\kappa$ B 非依存的な Shh の発現調節機構であることが示唆された (Fig.3-4D)。



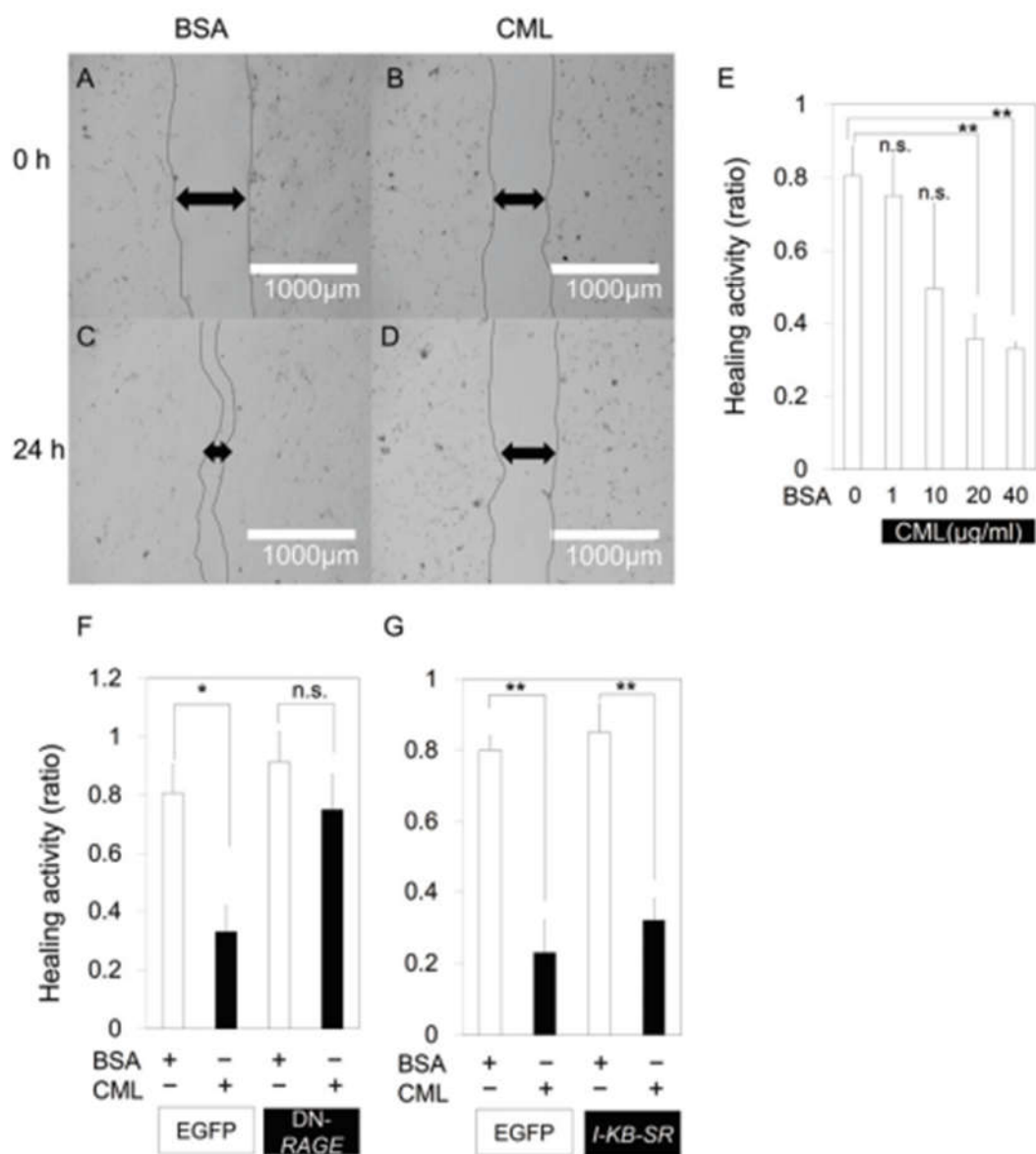
**Fig 3-4. RAGE-mediated Shh expression was modulated by CML**

(A) CML negatively modulated Shh *in vivo*. The skin on the second day after depilation was marked with India ink, and sampling of the total RNA and analyzed with Real time PCR. The results are expressed as the mean of three independent experiments. The results showed no significant difference in Gli and Ptch with the skin intradermally injected with CML-BSA or BSA. \*Compared to the BSA reference,  $P < 0.05$ . (B) The skin specimen on the second day after forced depilation was stained with DAPI and fluorescent immunostaining of Shh was performed. Negative Shh expression was observed in the skin intradermally injected with CML-BSA. The picture is a representative image. (C, D) The primary culture of E15.5 embryonic skin cells was adjusted and cell lines for the various genes were created by overexpressing the target gene with adenoviruses at an MOI50 or more. Shh expression repressed by CML was derepressed in the DN-RAGE-IRES-EGFP-infected cells (C). On the other hand, the I- $\kappa$ B-SR-infected cells (D) did not derepress Shh expression in the EGFP-infected cell

line. The graph shows the mean±SEM of the data from three independent experiments. \* $P < 0.05$ .

#### 2-3-4. CML による RAGE を介した細胞遊走性の阻害

最後に、CML-BSA による、毛乳頭細胞の移動性への影響を *in vitro* で検討した。初代真皮乳頭細胞を用いて、スクラッチ処理による healing activity を確認したところ、CML-BSA の添加条件では、濃度依存的に healing activity を低下させることが認められた (Fig.3-5A-E)。続いて、(DN) -RAGE-Ad、および *I-κB*-SR-Ad を強制発現させた初代培養皮膚細胞を用いて、healing activity を検討した。その結果、DN-RAGE を発現した初代培養皮膚細胞において、対照 EGFP 感染細胞と同様に CML-BSA の添加によって低下した healing activity が誘導された (Fig3-5F)。一方で、*I-κB*-SR を発現した初代培養皮膚細胞において、対照 EGFP 感染細胞と同様に CML-BSA の添加により healing activity の低下が抑制されなかった (Fig3-5G)。これらの結果から、CML-BSA は、RAGE を介した NF-κB 非依存的な機序によって、細胞遊走性の抑制を起こしていることが示唆された。



**Fig 3-5. RAGE-mediated repressed mobility of mesenchymal cells by CML**

(A-G) CML-BSA repressed wound healing in DPC. The DPC culture was maintained at confluency and after scratching, 40  $\mu\text{g/ml}$  of BSA or CML-BSA was added in the culture media. Twenty-four hours after the addition, the distance between cells after scratching was measured and evaluated. (A-D) show representative pictures. (E) Compared to BSA, CML-BSA repressed wound healing in a concentration-dependent manner. The graph shows the mean $\pm$ SEM of the data from three independent experiments. \*\* $P < 0.01$  vs. BSA reference. (F,G) The infected E15.5 mouse embryonic skin cells were maintained at confluency and after scratching, 40  $\mu\text{g/ml}$  of BSA or CML-BSA was added in the culture media. The inhibited wound healing was derepressed in the DN-RAGE-IRES-EGFP-infected cells (F). On the other hand, the I-kB-SR-infected cells (G) did not derepress the inhibited wound healing in the EGFP-infected cell line. The graph shows the mean $\pm$ SEM of the data from three independent experiments. \*  $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

## 2-4. 考察

発生過程における毛包形成には、Wnt シグナルの下流に Shh, BMP4, Notch, Tumor Necrosis Factor (TNF)ファミリー等、複数の分子による関与が示されている (78)。これらのシグナル伝達カスケードによって形成される毛包原基が、毛包へ成長するためには、Shh シグナルが重要であることが、Shh 遺伝子の欠損モデルマウスによって示されている。Shh 遺伝子の欠損は、毛包原基以降の毛包成長を阻害することから、Shh には、毛包原基の上皮系細胞の増殖を促すことで、毛包成長に導く働きがあると考えられる (76)。本研究で、CML の皮内注射が、毛球部の細胞凝集性の低下を引き起こすことで、毛包の形成阻害を引き起こし、その結果、毛幹の脆弱化を導くことが明らかとなった。CML による Shh の発現低下は、毛幹形成に寄与する毛母細胞や、毛包ダウングロースに関わる外毛根鞘といった毛包上皮性細胞群の増殖低下を起こし、CML による毛幹および毛包形態へ影響した可能性が考えられる。一方で、毛乳頭細胞および、初代培養皮膚細胞を用いたスクラッチ試験から、間葉系細胞における RAGE を介した NF- $\kappa$ B 非依存的な細胞増殖能の抑制と運動性の低下の可能性も示唆された。以上から、CML の標的細胞は毛包の上皮・間葉細胞であり、それら細胞機能を抑制することで、毛包形成を阻害している可能性が考えられる。

胎仔期における毛包発生と、生後の毛包可変部位の毛根再生は異なる機序であることが想定される。胎仔期において上皮直下に真皮細胞集塊が形成され始めると、Noggin と BMP4 を発現することが知られている (79)。BMP4 は上皮細胞へ働きかけて Shh の発現

を阻害する一方で、Noggin は BMP4 の発現抑制を行うことで、真皮細胞集塊と上皮細胞では Shh が発現する (80)。一方、真皮細胞集塊と接しない上皮細胞では BMP4 によって Shh 発現が抑制されると考えられており、これら器官形成と抑制の反応拡散波のカスケードによって、皮膚に規則的な毛包が形成される (81)。今回、毛乳頭細胞のスクラッチアッセイ試験の結果から、CML は直接的に細胞の増殖および運動性を阻害し、*in vivo* においては毛球部の細胞凝集阻害が認められた。胎仔期の毛包発生過程を、生後の毛包再生においても踏襲するのであれば、CML による毛球部の細胞集塊の阻害が、Noggin の発現低下を及ぼすことで NF- $\kappa$ B 非依存的に BMP4 による Shh の発現低下をもたらした可能性が考えられる。これら可能性を深く追求するためには、さらなる研究が必要であろう。

## 2-5. 結論

生体反応への糖化の影響は、従来、長い時間をかけて達成される摂食による糖化蓄積モデルにおいて調べられてきた。私は、CML を皮内注射することで簡便かつ短時間に糖化による毛包形成への影響を解析することができる、新しい方法論を開発した。本モデルは、毛幹が容易に脱毛することから、加齢の薄毛に類似した状態を模している可能性が考えられる。本モデルの使用方法の一つは、化合物のもつ脱毛改善作用や、抗糖化作用を評価することで、新たな薬剤の開発を目指す事に使用することができると思う。その他、毛包の形態形成メカニズムを解明研究に供することができると思う。毛包の形態形成に関与する上皮・間葉細胞の相互作用は、歯・涙腺・唾液腺などにおける器官形成に必須の細胞間連携で

あり (82-85)、単純単層培養系から器官・形態形成を再現する複雑な細胞間連携の調節を理  
解するための新しいツールになると考える。



## 総括

本研究では、皮膚老化を誘導する外的因子と内的因子に着目し、新たな作用機序の解明と薬剤評価を目的として、新しい評価系の構築を試みた。

第 1 章では、外的因子である UV に着目し、表皮層での分子機序の解明を目指した。

UV によって引き起こされる ROS を介した作用機序は、これまで数多くの報告がなされている。具体的には、PI3-K/Akt シグナル経路を介して NF- $\kappa$ B を活性化することで、Interleukin (IL) -1, IL-6, TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインを亢進させ、皮膚炎症を導く。さらに、Cyclooxygenase (COX)-2 や inducible nitric oxide synthase (iNOS) を誘導することで、Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, NO を亢進し、皮膚炎症を増強する (86-88)。炎症刺激は、誘導型の Matrix metalloproteinases (MMPs) を活性化し、真皮の細胞外マトリクスを切断することで、シワや萎縮等の皮膚老化症状を引き起こすと考えられている (89-92)。

しかし、皮膚への UV 照射が誘発する発赤、腫脹、水疱といった物理的ダメージには、症状の発症までに、12-24 時間の時間経過を必要とする (86)。この初期応答に関する、分子機序の詳細には不明な点が多く、特に表皮層における分子機序については明らかにされていない。今回の研究から、皮膚への UV 照射後の初期応答では、Flg 遺伝子の発現低下を介した、皮膚バリア機能の破綻が生じていることを明らかにした。一方で FX が、UV 照射による Flg 遺伝子の発現低下を抑制し、皮膚バリア機能を回復させることを見出した。その作用機序は、Cdx1 を介した Flg 遺伝子の転写活性を促進させることを新たに示した。

これまでの報告から、表皮層への UV 照射は、ケラチノサイトの増殖亢進を引き起こすことが知られている (93)。これは、表皮ターンオーバーが促進されることで、基底層細胞

から角質層細胞へ向かう際の、細胞の分化・成熟化が不完全な状態に進むことを意味している。UV 照射の 24 時間後には、顆粒層細胞のケラトヒアリン顆粒内に存在する、プロフィラグリン含量の低下を引き起こし、72 時間後には、Flg 遺伝子発現の大幅な低下を引き起こされることが知られている (94)。今回の研究では、*in vivo* において、UV 照射 24 時間後に Flg 遺伝子の顕著な発現低下が観察され (Fig.2-7 B,C)、*in vitro* においては、UV 照射 1 時間後に同様の結果が得られていることから (Fig.2-12B)、Flg 遺伝子は、非常に短時間のうちに、UV による影響を受けることが明らかとなった。UV 照射による Flg 遺伝子発現の低下が、表皮ターンオーバーの促進に起因するのであれば、一つの表皮細胞が分化・成熟化するまでの時間的制約に依存しているはずである。マウス表皮幹細胞のダイナミクスについて、ライブイメージングを用いた詳細な解析の結果によると、まずひとつの細胞が分化し、隣接する細胞が 1~2 日後に分裂するという時間的順序を有していることが報告されている (95)。この報告は、今回見出した UV による速やかな Flg 遺伝子発現の抑制が、細胞増殖の亢進を介した表皮ターンオーバーの促進による影響ではないことを示唆している。今回の結果から、UV 照射は Cdx1 の発現を速やかに低下させることと、Cdx1 は Flg 遺伝子プロモーターへの結合によって、プロモーター活性を増強することを報告した。本結果から、UV 照射は、Cdx1 をターゲットとして、Flg 遺伝子の発現を抑制するという、皮膚老化を誘導する新たな機構の存在が明らかとなった。一方で、FX には、UV 照射による Flg 遺伝子の発現低下の抑制作用が見出され、その作用は、Cdx1 の増強を介した分子機序であることが明らかとなった。

アトピー性皮膚炎は、Flg 遺伝子の発現抑制によって皮膚バリア機能が低下していることが報告されていることから、FX はアトピー性皮膚炎にも効果を発揮することが期待される。しかし、アトピー性皮膚炎における Flg 遺伝子の発現低下には、UV 照射と同様に Cdx1 を介した機序であるかどうかは明らかとなっていない。これらの可能性を明らかにするには、さらなる研究が必要であろう。

第 2 章では、内的因子として CML に着目し、毛包形態形成に与える影響と、その作用機序の解明を目指した。これまで、皮膚における AGEs の蓄積は、皮膚の色調を黄色化してクスマを引き起こす。真皮層に存在するコラーゲン、エラスチンといった細胞外マトリクスは半減期が長いことから、特に影響を受けやすいことが主因であると考えられている (96)。非架橋性 AGEs の 1 種である CML が蓄積したエラスチンは、好中球エラスターゼで分解されにくく、凝集能の亢進、繊維経の増加、弾性率や伸長率の低下を引き起こし、皮膚のターンオーバーが低下する。健常者の顔面皮膚組織を抗 CML で標識した場合、弾性繊維への CML の蓄積が 30-40 歳代から観察されはじめ、高齢になるとエラスチン繊維全体に蓄積が広がる (97)。更に、真皮層のコラーゲンは 20-80 歳までに 33% が CML 化することが報告されている (98)。以上のことから、CML は加齢に伴って、皮膚老化に大きく影響することが報告されているが、皮膚付属器官の一つである、毛包の形態形成への影響については、ほとんど明らかにされていない。

毛包のミニチュア化は、産生される毛幹の脆弱性に繋がることから、薄毛症状を発症する主因の一つと考えられている。若齢時における脱毛症、非脱毛症のいずれにおいても、加齢に

伴い、毛幹の脆弱化と毛周期の短縮化が観察され、男性型脱毛症（AGA）を発症することが知られている（99）。男性ホルモンに起因するAGAは、通常よりも症状の進行が早く、若年層からAGAを発症する（99）。既存薬は、2型5 $\alpha$ レダクターゼを阻害することで、男性ホルモンが、ジヒドロテストステロン（DHT）に変換されるのを抑制するfinasterideや（100）、増殖因子であるInsulin-like growth factor (IGF)-1、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)、Hepatocyte growth factor (HGF)を亢進することによって毛母細胞の増殖を促すMinoxidil等が挙げられる（101-103）。しかし、これら作用機序をターゲットとした既存薬だけではAGAの症状を根本的に改善するには不十分である。その理由は、未知の発症機序が存在しているためであると推察される。近年、新たな発症機序として、加齢による毛包幹細胞の機能低下が報告されているが（104）、その分子機序には不明な点が多く、効果的な薬剤の開発には至っていない。

本研究では、加齢と共に皮膚に蓄積するCMLが、毛包の形態形成にどのように影響を及ぼすのかを詳細に解析した。CML-BSAを皮内注射することで、簡易的に皮内へのCML蓄積を反映したモデルを確立した。本モデルでは、毛球部の細胞凝集性の低下による薄毛症状が観察された（Fig.3-2,3-3）。皮膚において、CMLが蓄積したコラーゲンは、RAGEを介した細胞外シグナル伝達によって繊維芽細胞のアポトーシスを誘導し（105）、ケラチノサイトの遊走性や、コラーゲンへの細胞接着能を低下させることが報告されている（106,107）。観察された毛球部の細胞凝集性の低下は、これらの可能性であるかどうかを検証した。その結果、毛球部の細胞凝集性の低下は、非アポトーシス性であることが明らかとなり（Fig.3-

3H)、初代真皮乳頭細胞および、初代培養皮膚細胞を用いた **healing activity** の試験結果から、細胞遊走性の低下が主因である可能性が示唆された (Fig.3-5)。また、RAGE を介した、NF- $\kappa$ B 非依存的な Shh 遺伝子の発現抑制機構であることが明らかとなった (Fig.3-4)。

これまでに Shh をターゲットとする薬剤の開発は実現されていない。本モデルを用いることで、既存薬の作用機序であるホルモン阻害および、増殖因子の亢進とは異なる、新たな作用機序による薬剤開発につながることを期待される。

## 結語

本研究では以下の知見を得た。

1. 皮膚への UV 照射は、速やかに Flg 遺伝子の発現低下を導き、FX が Cdx1 を介して UV 照射による Flg 遺伝子の発現低下を抑制する。
2. CML-BSA の皮内蓄積は、細胞遊走性の低下を介した毛球部の細胞凝集を低下させ、発毛障害を導く。その発症機構は、RAGE を介した NF- $\kappa$ B 非依存的な Shh 遺伝子の発現抑制による。

以上、著者は、皮膚老化における外的・内的要因に着目して、新たな発症機序の検討を行った。外的要因である UV によって速やかに Cdx1 および Flg 遺伝子の発現が抑制されることを見出した。

内的要因である CML は、Shh の発現低下を介した毛包形態形成の阻害を導くことを見出した。毛包形成は、成体の器官形成に共通したメカニズムを介していると考えられ、得られた知見は、皮膚科学や、発生学、医療分野において有益な情報を与えるものとする。

## 謝辞

研究討論に加わりご協力いただきました、立命館大学薬学部 稲津 哲也教授、藤田 隆司准教授に深く感謝します。

本研究を行うにあたり実験に熱心にご協力頂きました、立命館大学薬学部 水野 佳奈学士、夏目 知佳学士、高西 美沙紀学士、石原 直幸学士、更に討論に参加していただきました立命館大学薬学部薬学科分子薬効毒性学研究室の皆様にご深く感謝致します。

## 参考文献

1. 芋川玄爾. あたらしい眼科. **13**, 351-359 (1996).
2. Kambayashi H, Yamashita M, Odake Y, Takada K, Funasaka Y, Ichihashi M. *J. Dermatol Sci.* **27(1)**, S19-25 (2001).
3. Shuster S, Bottoms E. *Clin Sci.* **25(3)**, 487-491 (1963).
4. Harman D. *J Gerontol*, **11**. 298-300 (1956).
5. Kondo T, Ohno H, Kondo T, Shiimoto Y, Momii A. *Expt Anim.* **54**, 429-436 (2005).
6. Makrantonaki E, Zouboulis CC. *Ann NY Acad Sci.* **1119**, 40-50 (2007).
7. Rogers J, C Harding, Mayo A, Banks J, Rawlings A. *Arch Dermatol Res.* **288**, 765-770 (1996).
8. Wulf HC, Sanbdy-Moller J, Kobayashi T, Gniadecki R. *Micron.* **35**, 185-191 (2004).
9. Akimoto K, Yoshikawa N, Higaki Y, Kawashima M, Imokawa G. *J Dermatol.* **20**, 1-6 (1993).

10. 乾 重樹, 板見 智. *最新皮膚科学大系*. **17** 卷, 15-20 (2002).
11. Ou-Yang H, Stamatias G, Saliou C, Kollias N. *J.Invest.Dermatol.* **122(4)**, 1020-1029 (2004).
12. Lenaz G. *IUBMB life*. **52**,159-164 (2001).
13. Coyle JT, Puttfarcken P. *Science*. **262**,689-696 (1993).
14. Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. *Biol.Pharm.Bull.* **18(1)**, 162-166 (1995).
15. Valencia A, Kochevar IE. *J.Invest.Dermatol.* **128(1)**, 214-222 (2008).
16. Kunisada M, Sakumi K, Tominaga Y, Budiyoanto A, Ueda M, Ichihashi M, Nakabeppu Y, Nishigori C. *Cancer Res.* **65**, 6006-6010 (2005).
17. Reeve VE, Widyarini S, Domanski D, Chew E. *Photochem.Photo-biol.* **81**, 1548-1553 (2005).
18. Hwang IK, Yoo KY, Kim DW, Jeong SJ. *J. Med. Biol. Res.* **39**, 1181-1188 (2006).
19. Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L. *J. Invest. Dermatol.* **102 (1)**, 122-124 (1994).
20. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. *J.Clin.Invest.* **99**, 457-468 (1997).
21. Zhu P, Ren M, Yang C, Hu YX, Ran JM, Yan L. *Exp.Dermatol.* **21**,123-129 (2012).
22. Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmetts CA, Dauchot P, Kohn RR. *N.Engl.J.Med.* **314**,403-408 (1986).
23. Yoshinaga E, Kawada A, Ono K, Fujimoto E, Wachi H, Harumiya S, Nagai R, Tajima S. *J.Invest.Dermatol.* **132**, 315-323 (2012).
24. Lohwasser C, Neureiter D, Weigle B, Kirchner T, Schuppan D. *J.Invest.Dermatol.* **126**, 291-299 (2006).



25. Gkogkolou P, Bohm M. *Dermatoendocrinol.* **4**, 259-270 (2012).
26. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* **4(5)**, 285-293 (2008).
27. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. *Cell.* **118(5)**, 635-648 (2004).
28. Karlsson L, Bondjers C, Betsholtz C. *Development.* **126(12)**, 2611-2621 (1999).
29. Woo WM, Zhen HH, Oro AE. *Genes Dev.* **26(11)**, 1235-1246 (2012).
30. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, Lindner G, McMahon JA, Peters C, Lauster R, McMahon AP, Paus R. *Nat Cell Biol.* **1(3)**, 158-164 (1999).
31. Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE, Cotsarelis G. *Nature.* **447(7142)**, 316-320 (2007).
32. Ishitsuka Y. *Jpn.J.Clin.Immunol.* **40(6)**, 416-427 (2017).
33. Yurchenco PD, Patton BL. *Curr Pharm Des.* **15(12)**, 1277-1294 (2009).
34. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. *J Cell Sci.* **122**, 1285-1294 (2009).
35. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P, McLean WH. *Nat Genet.* **38**,337-342 (2006).
36. Presland RB, Boggess D, Lewis SP, Hull C, Fleckman P, Sundberg JP. *J Invest Dermatol.* **115**, 1072-1081 (2000).
37. 方甘棠. *皮膚.* **30(4)**, 455-460 (1998).
38. Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM. *J Clin Invest.* **95**, 2281-2290 (1995).

39. Jacobsen TM, Yuksel KU, Geesin JC. *J Invest Dermatol.* **95**, 296-300 (1990).
40. Haroun MT. *Geriatrics and aging.* **6**, 41-44 (2003).
41. Whillhelm K-P, Cua AB, Maibach HI. *Arch Dermatol.* **127**, 1806-1809 (1991).
42. Katharina R, Maria G, Marc M, Jean K, Jens W-F. *J. Biol. Chem.* **286**, 18268-18276 (2011).
43. Kageyama H, Rungaroon WS. *Mar. Drugs.* **17**, 222 (2019).
44. Pallela R, Na-Young Y, Kim SK. *Mar Drugs.* **8**, 1189-1202 (2010).
45. Urikura I, Sugawara T, Hirata T. *Biosci Biotechnol Biochem.* **75**, 757-760 (2011).
46. Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M. *J Agric Food Chem.* **55**, 8516-8522 (2007).
47. Beppu F, Hosokawa M, Yim MJ, Shinoda T, Miyashita K. *Lipids.* **48**, 449-455 (2013).
48. Nishikawa S, Hosokawa M, Miyashita K. *Phytomedicine.* **19**, 389-394 (2012).
49. Hosokawa M, Miyashita T, Nishikawa S, Emi S, Tsukui T, Beppu F. *Arch Biochem Biophys.* **504**, 17-25 (2010).
50. Van de Pas, CB, Kelly DA, Seed PT, Young AR, Hawk JL, Walker SL. *J Invest Dermatol.* **122**, 295-299 (2004).
51. Williams HC, Burney PG, Hay RJ, Archer CB, Shipley MJ, Hunter JJ. *Br J Dermatol.* **131**, 383-396 (1994).
52. Schwartz RA, Janusz CA, Janniger CK. *Am. Fam. Physician.* **74**, 125-132 (2006).
53. Sage RJ, Lim HW. *Dermatol Ther.* **23**, 72-81 (2010).

54. Garritsen FM, Brouwer MW, Limpens J, Spuls PI. *Br J Dermatol.* **170**, 501-513 (2014).
55. Silny W, Bartoszak L, Jenerowicz D, Zukiewicz-Sobczak W, Gozdziwska M. *Ann Agric Environ Med.* **20**, 55-60 (2013).
56. Oranje AP. *Indian J Dermatol.* **59**, 140-142 (2014).
57. Young T, Deschamps J. *Curr Top Dev Biol.* **88**, 235-255 (2009).
58. Guo RJ, Suh ER, Lynch JP. *Cancer Biol Ther.* **3**, 593-601 (2004).
59. Masaki H. *J Dermatol Sci.* **58**, 85-90 (2010).
60. Giudice A, Montella M. *Bioessays.* **28**, 169-181 (2006).
61. Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A, Kawakami Y. *Biochem Mol Biol Int.* **42**, 361-370 (1997).
62. Amengual J, Gouranton E, van Helden YG, Hessel S, Ribot J, Kramer E, Kiec-Wilk B, Razny U, Lietz G, Wyss A, Dembinska-Kiec A, Palou A, Keijer J, Landrier JF, Bonet ML, von Lintig J. *PLoS One.* **6**, e20644 (2011).
63. Kumar SR, Hosokawa M, Miyashita K. *Mar Drugs.* **11**, 5130-5147 (2013).
64. Kligman AM, Grove GL, Hirose R, Leyden JJ. *J Am Acad Dermatol.* **15**, 836-859 (1986).
65. Hashimoto T, Ozaki Y, Taminato M, Das SK, Mizuno M, Yoshimura K. *Br J Nutr.* **102**, 242-248 (2009).
66. Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Sugimoto T. *Diabetes Care.* **32(12)**, 2263-2268 (2009).
67. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, and Zouboulis CC. *Dermatoendocrinol.* **4(3)**, 308-319 (2012).

68. Haslbeck KM, Schleicher E, Bierhaus A, Nawroth P, Haslbeck M, Neundörfer B, Heuss D. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* **113(5)**, 288-291 (2005).
69. Headon DJ, Overbeek PA. *Nat. Genet.* **22(4)**, 370-374 (1999).
70. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, Lindner G, McMahon JA, Peters C, Lauster R, McMahon AP, Paus R. *Nat. Cell Biol.* **1(3)**, 158-164 (1999).
71. DasGupta R, Fuchs E. *Development.* **126(20)**, 4557-4568 (1999).
72. Laurikkala J, Pispa J, Jung HS, Nieminen P, Mikkola M, Wang X, Saarialho-Kere U, Galceran J, Grosschedl R, Thesleff I. *Development.* **129(10)**, 2541-2553 (2002).
73. Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P, Thesleff I, Mikkola ML. *Development.* **134(1)**, 117-25 (2007).
74. Schmidt-Ullrich R, Tobin DJ, Lenhard D, Schneider P, Paus R, Scheidereit C. *Development.* **133(6)**, 1045-1057 (2006).
75. St-Jacques B, Dassule HR, Karavanova I, Botchkarev VA, Li J, Danielian PS, McMahon JA, Lewis PM, Paus R, McMahon AP. *Curr. Biol.* **8(19)**, 1058-1068 (1998).
76. Chiang C, Swan RZ, Grachtchouk M, Bolinger M, Litingtung Y, Robertson EK, Cooper MK, Gaffield W, Westphal H, Beachy PA, Dlugosz AA. *Dev. Biol.* **205(1)**, 1-9 (1999).
77. Lee J, Tumbar T. *Semin Cell Dev Biol.* **23(8)**, 906-916 (2013).
78. Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. *Dev. Cell.* **2**, 643-653 (2002).
79. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, Lindner G,

- McMahon JA, Peters C, Lauster R, McMahon AP, Paus R. *Nat. Cell Biol.* **1**, 158-64 (1999).
80. Callahan CA, Oro AE. *Current Opinion in Genetics & Development.* **11(5)**, 541-546 (2001).
81. Sick S, Reinker S, Timmer J, Schlake T. *Science.* **314**, 1447-50 (2006).
82. Fuchs E. *Nature.* **445**, 834-842 (2007).
83. Hardy M,H. *Trends Genet.* **8**, 55-61 (1992).
84. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. *Nat. Methods.* **4**, 227-230 (2007).
85. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **106**, 13475-13480 (2009).
86. Kobayashi S. *YAKUGAKU ZASSHI.* **126(9)**, 677-693 (2006).
87. Kageyama H, Rungaroon WS. *Mar.Drugs.* **17**, 222 (2019).
88. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. *Nature.* **379**, 335-339 (1996).
89. Murphy G, Cockett M.I, Ward R.V, Docherty A.J. *Biochem.J.* **277**, 277-279 (1991).
90. Inomata S, Matsunaga Y, Amano S, Takada K. *J.Invest.Dermatol.* **120**, 128-134 (2003).
91. Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H. *Arch.Dermatol.Res.* **288**, 39-44 (1996).
92. Zeigler M.E, Chi Y, Schmidt T, Varani J. *J.Cell.Physiol.* **180**,271-284 (1999).
93. Baba H, Yoshida M, Yokota T, Uchiwa H, Watanabe S. *J Dermatol Sci.* **38(1)**, 41-46 (2005).
94. Simonsen S, Thyssen JP, Heegaard S, Kezic S, Skov L. *Acta Derm Venereol.* **97(7)**, 797-801

- (2017).
95. Kailin R. Mesa, Kyogo Kawaguchi, Katie Cockburn, David Gonzalez, Jonathan boucher, Tianchi Xin, Allon M. Klein, Valentia Greco. *Cell Stem Cell*. **23**, 677-686 (2018)
96. Dyer DG, Dum JA, Thorpe SR. *J. Clin. Invest.* **91**, 2463-2469 (1993).
97. Yoshinaga E, Kawada A, Ono K. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 315-323 (2012).
98. Dunn JA, McCance DR, Thorpe SR. *Biochemistry*. **30**, 1205-1210 (1991).
99. Courtois M, Loussouarn G, Hourseau C, Grollier JF. *Br J Dermatol.* **132(1)**, 86-93 (1995).
100. Bull HG, Garcia-Calvo M, Andersson S, Baginsky WF, Chan H.K, Ellsworth DE, Miller RR, Stearns RA, Bakshi RK, Rasmusson GH, Tolman RL, Myers RW, Kozarich JW, Harris GS. *J. Am. Chem. Soc.* **118(10)**, 2359-2365 (1996).
101. 安藤侑美, 板見 智, 吉川邦彦. *日皮会誌*. **109**, 511 (1999).
102. Lachgar S, Charveron M, Gall Y, Bonafe JL. *Br J Dermatol.* **138**, 407-411 (1998).
103. Yamazaki M. *J Invest Dermatol Symp Proc.* **4**, 312 (1999).
104. Matsumura H, Mohri Y, Thanh Binh N, Morinaga H, Fukuda M, Ito M, Kurata S, Hoeijmakers J, Nishimura E. *Science*. **351(6273)**, aad4395 (2016).
105. Morita K, Urabe K, Moroi Y. *Wound Repair Regen.* **13**, 93-101 (2005).
106. Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM. *J Biol Chem.* **280**, 12087-12095 (2005).
107. Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M. *AM. J Physiol Cell Physiol.* **292**, C850-856 (2007).