

東京工科大学

博士學位論文

皮膚の光老化進行における皮膚構成細胞の  
相互作用の機構解明とその解決策の提案

西暦 2021 年 3 月

遠藤 香凜

# 目次

序論.....	1
<b>第 1 章 光老化を誘導した線維芽細胞の表現型の変化.....</b>	<b>8</b>
1-1. 緒言.....	8
1-2. 実験.....	9
1-2-1. 試薬 .....	9
1-2-2. 細胞培養実験方法 .....	10
1-2-3. 光老化モデル線維芽細胞の作成 .....	10
1-2-4. SA $\beta$ -ガラクトシターゼ染色 .....	10
1-2-5. MTT アッセイ法.....	10
1-2-6. 細胞内 ROS の測定 .....	10
1-2-7. 培養細胞のカルボニルタンパクの蛍光ラベル .....	10
1-2-8. リアルタイム PCR 法 .....	11
1-2-9. 正常ヒト線維芽細胞へのヒドロキシクロロキン (HCQ)処理 .....	12
1-2-10. Western Blotting 法 .....	12
1-2-11. CYTO-ID キットを用いたオートファゴゾームの検出.....	13
1-2-12. LysoTracker によるリソソーム染色 .....	14
1-2-13. カテプシン酵素活性測 .....	14
1-2-14. 細胞内リソソーム活性測定 .....	14
1-3. 結果.....	15
1-3-1. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞の SA- $\beta$ -ガラクトシターゼ発現 .....	15
1-3-2. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞の細胞内 ROS およびカルボニルタンパクレベル.....	15
1-3-3. 複数回 UVA 照射線維芽細胞の遺伝子発現の変化 .....	17
1-3-4. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞におけるオートファジー関連タンパク質と mRNA 発現レベルの変化 .....	20
1-3-5. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞のオートファジー機能.....	22
1-3-6. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞のリソソーム機能 .....	25
1-4. 考察.....	26
1-5. 結論.....	27
<b>第 2 章 光老化を誘導した線維芽細胞の真皮マトリックス形成能低下に対するトラネキサム酸の効果.....</b>	<b>28</b>
2-1. 緒言.....	28
2-2. 実験.....	29

2-2-1. 試薬 .....	29
2-2-2. 細胞培養実験方法 .....	29
2-2-3. 光老化モデル線維芽細胞の作成および TA 処理.....	29
2-2-4. SA $\beta$ -ガラクトシターゼ染色 .....	29
2-2-5. 細胞老化アッセイ .....	29
2-2-6. 細胞内 ROS の測定.....	30
2-2-7. リアルタイム PCR 法 .....	30
2-2-8. PGE <sub>2</sub> 定量 .....	30
2-2-9. I型プロコラーゲン定量 .....	31
2-2-10. 免疫染色 .....	31
2-3. 結果.....	32
2-3-1. 老化マーカーの発現および細胞内 ROS レベルへの効果 .....	32
2-3-2. 光老化モデル線維芽細胞の PGE <sub>2</sub> 産生に対する TA の抑制作用 .....	32
2-3-3. 光老化モデル線維芽細胞のコラーゲンおよび弾性線維形成に対する効果 .....	33
2-3-4. PGE <sub>2</sub> によるコラーゲンおよび弾性線維形成の低下と SA- $\beta$ -ガラクトシターゼの 発現変化 .....	34
2-4. 考察.....	37
2-5. 結論.....	38
<b>第3章 光老化を誘導した線維芽細胞の色素細胞へ及ぼす影響とトラネキサム酸の効果</b> 39	
3-1. 緒言.....	39
3-2. 実験.....	39
3-2-1. 試薬 .....	39
3-2-2. 光老化モデル線維芽細胞の馴化培地による色素細胞の培養.....	39
3-2-3. MTT アッセイ法.....	40
3-2-4. カルセイン-AM 染色 .....	40
3-2-5. リアルタイム PCR 法 .....	40
3-2-6. 光老化線維芽細胞と表皮メラニンモデル-MEL-300-B との共培養とメラニン定 量.....	41
3-3. 結果.....	41
3-3-1. 光老化モデル線維芽細胞の馴化培地が色素細胞に及ぼす作用 .....	41
3-3-2. 光老化線維芽細胞の遺伝子発現変化 .....	42
3-3-3. トラネキサム酸処理を行った光老化モデル線維芽細胞の色素細胞への作用 ..	43
3-3-4. 光老化モデル線維芽細胞と共培養した表皮メラニンモデル MEL-300-B のメラニ ン量の変化.....	44
3-4. 考察.....	45
3-5. 結論.....	46

<b>第4章 酸化ストレスがケラチノサイトのメラノソーム貪食に及ぼす作用と西洋カボチャ種子エキスの効果</b> .....	<b>47</b>
4-1. 緒言.....	47
4-2. 実験.....	48
4-2-1. 試薬 .....	48
4-2-2. 西洋カボチャ種子エキス (RPS) の作成.....	48
4-2-3. 細胞培養.....	48
4-2-4. UVB、H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 曝露したケラチノサイトの培養上清 (CM) を用いたケラチノサイトへの蛍光ビーズ取り込み .....	48
4-2-5. MC1R ノックダウンケラチノサイトの調製 .....	49
4-2-6. リアルタイム PCR 法 .....	49
4-2-7. 細胞内 ROS の測定.....	49
4-2-8. 免疫染色による Nrf2 の核内移行 .....	50
4-2-9. GSH の定量 .....	51
4-3. 結果.....	51
4-3-1. ケラチノサイトのメラノソーム貪食能について .....	51
4-3-2. 西洋カボチャ種子エキス (RPS) の UVB 及び H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 曝露により亢進するケラチノサイトの MS 貪食能抑制効果 .....	54
4-3-3. RPS の細胞内 ROS への作用 .....	56
4-3-4. RPS の細胞内抗酸化系におよぼす効果 .....	57
4-4. 考察 .....	59
4-5. 結論 .....	59
<b>第5章 ケラチノサイトを介した色素斑形成に対する <math>\alpha</math>-トコフェロール脂肪酸エステル</b> <b>の抑制効果</b> .....	<b>60</b>
5-1. 緒言.....	60
5-2. 実験.....	60
5-2-1. 試薬 .....	60
5-2-2. 細胞培養.....	60
5-2-3. HaCaT ケラチノサイトの馴化培地で培養した色素細胞の細胞増殖および樹状突起の伸長.....	61
5-2-4. HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズ取り込み .....	61
5-2-5. PGE <sub>2</sub> 定量 .....	62
5-3. 結果.....	62
5-3-1. HaCaT ケラチノサイトの細胞内 ROS レベルに対する作用 .....	62
5-3-2. 色素細胞の増殖と樹状突起の伸長.....	63
5-3-3. HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズの取り込み .....	64

5-3-4. HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズ貪食能に対する PGE <sub>2</sub> の効果 .....	65
5-4. 考察 .....	67
5-5. 結論 .....	67
<b>第 6 章 総括</b> .....	<b>68</b>
参考文献 .....	73

## 序論

### 皮膚の構造と機能

皮膚は人体の最外層に位置し外部の環境に適応しながら、皮膚内部からの水分や生体内物質の漏出を防ぎ、外界からの異物の侵入を防ぐことで生体の恒常性を維持する重要な臓器である。皮膚組織は外側から内側に向かって、表皮、真皮、皮下組織の 3 つに大別される。

表皮は 0.1~0.2 mm ほどの厚さがあり、9 割以上を表皮角化細胞 (Keratinocyte : ケラチノサイト) と呼ばれる細胞によって占められている。さらに、細胞の形態的な特徴から表皮は表面から角層、顆粒層、有棘層、基底層の 4 つの層に分けられている。有棘層より上層にある細胞は基底層に存在する基底細胞から派生し、基底細胞が分裂した娘細胞が角化 (分化) の過程において形態を変え、保湿機能やバリア機能などの表皮が持つ本質的な機能を発揮する。表皮はこのように、絶えず生まれ変わることにより組織としての恒常性を保っている<sup>1)</sup>。表皮を形成するその他の細胞には色素細胞 (Melanocyte : メラノサイト) やランゲルハンス細胞などが存在する。色素細胞は基底層に存在しており、細胞内小器官であるメラノソーム (MS) 内でメラニンを合成する。メラニンを含んだ MS は色素細胞の樹状突起の先端より放出され隣接するケラチノサイトに受け渡され、核上部に集合した核帽 (Melanin cap) を形成することでケラチノサイトの DNA を紫外線の障害から保護している<sup>2)</sup>。

真皮は表皮の下層に存在し、主な真皮細胞外マトリックスは真皮線維芽細胞 (Fibroblast : ファイブロブラスト) において合成されるコラーゲン線維 (膠原繊維)、弾性線維、プロテオグリカンにより皮膚の力学的強度や弾力性が維持されている。

### 真皮の構造

真皮と表皮は基底膜により隔てられており、その厚さは表皮の 15~40 倍である。真皮は解剖学的に 3 つに分類され、表皮突起に食い込んでいる真皮部分を乳頭層 (papillary layer)、乳頭層直下の部分を乳頭下層 (subpapillary layer)、真皮の大部分を占め、線維成分が密な部分を網状層 (reticular layer) と呼ぶ。真皮の約 70% がコラーゲン線維により構成されており、そのほかに弾性線維、線維間を埋める間質としてプロテオグリカンが存在する。細胞成分には、線維芽細胞、肥満細胞、マクロファージおよび血管構成細胞が存在する。コラーゲン線維は線維の走行方向への抵抗が強く、伸張性が弱いのが特徴であることから皮膚の力学的強度を保つ支持線維として働いている。コラーゲン分子は線維芽細胞の粗面小胞体で翻訳合成され、3 本の  $\alpha$  鎖がらせん構造をとった三重らせん構造を持つプロコラーゲンとして細胞外へ分泌される。プロコラーゲンの N 末端、および C 末端に存在するペプチド鎖がプロコラーゲンペプチダーゼにより切断された後に、コラーゲン分子間にリジルオキシダーゼ (lysyl oxidase, LOX) による架橋がされることによりコラーゲン線維が形成される<sup>3)</sup>。コラーゲン分子には  $\alpha$  鎖の違いから 20 種類のサブタイプが存在し、真皮を構成する大部分の

ラーゲン線維はI型コラーゲンである。

弾性線維は皮膚に弾力性を付与する線維である。弾力性に富み、真皮以外では動脈や腱などに多く存在する。真皮における弾性線維は、乳頭層では線維が細く、表皮に対して垂直に走行しているが、深部にいくに従い太くなり網状層では表皮に対して平行に走行する。弾性線維は複数のタンパク質からなる会合体であるが、その基本はマイクロフィブリル (microfibril) の上にトロポエラスチン (tropoelastin) が沈着している構造である。マイクロフィブリルはフィブリリン-1 (fibrillin-1) およびフィブリリン-2 (fibrillin-2) により構成され、分子内架橋によって安定化した線維束である。弾性線維の形成過程は以下のように現在では説明されている。トロポエラスチンは、リジルオキシダーゼ (LOX)、フィブリン (fibrin) -4 と会合体を形成する。この会合体が、さらにフィブリン (fibrin) -5 と会合することによりコアセルベーションしマイクロフィブリル上に沈着する。マイクロフィブリル上に存在する latent TGF $\beta$  binding protein 4 (LTBP-4) と、トロポエラスチン会合体の fibrin-5 とが会合し、LOX による架橋反応によりマイクロフィブリル上にトロポエラスチン固着される<sup>4)</sup>。乳頭層の表皮に対して垂直に走行する弾性線維はオキシタラン線維とよばれ、マイクロフィブリル上にわずかなトロポエラスチンが固着した細線維である。一方、網状層の表皮に平行に走行する弾性線維はエラスチン線維と呼ばれ、マイクロフィブリル上にトロポエラスチンが固着した太い線維である。

## 皮膚と老化

老化した皮膚の特徴的な外観変化としては、色素斑の出現などによる色調の変化とシワやタルミの出現による形態の変化が挙げられる。一般的に、老化は加齢に伴って起こる変化を指し、これを生理的老化と呼ぶ。皮膚では、この生理的老化に加え太陽光に曝露されることで加速する光老化が存在する。太陽光に曝露されている顔面皮膚の老化は、約 80%が光による影響を受けていると言われている。

## 皮膚色の決定因子 -メラニン-

ヒトの皮膚色は、メラニン、ヘモグロビン、カロチンなどの皮膚における存在量と比率により決定される。その中でも、メラニンは皮膚色の決定に最も強く寄与している。

メラニンを合成する色素細胞は、神経堤由来の遊走性細胞であり、樹状突起を持つことを特徴としている。色素細胞は皮膚以外に目や粘膜にも存在する。色素細胞の数は、基底細胞の 9~10 個に 1 個の割合で存在し、部位差にもよるが平均すると 1500 個/mm<sup>2</sup>と報告されている。色素細胞の数は人種による違いはなく、民族間での皮膚色の違いは合成されるメラニンのタイプやメラノソーム (Melanosome: MS) の大きさと数、分布パターンにより決定されると考えられている<sup>5)</sup>。ヒトが生産するメラニンのタイプは黒色のユウメラニン (Eumelanin) と赤色のフェオメラニン (Pheomelanin) があり、この 2 種類のメラニンの存在量と比率により皮膚色や体毛の色が表現される<sup>6)</sup>。

## メラニンの合成とメラノソーム移送

メラニンの合成はチロシンを基質とし、チロシナーゼ (Tyrosinase: TYR) の触媒反応によって開始される。TYR によりチロシンの芳香族環の 3 位に水酸基が導入されたドーパ (Dopa) は、TYR によりさらに酸化されドーパキノン (Dopaquinone) となる。ドーパキノンは自動酸化を受け Dopachrome となり、Tyrosinase related tautomerase-2/ Dopachrome tautomerase (TRP-2/DCT) の触媒反応によりジヒドロキシインドールカルボン酸 (5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid: DHICA) になる。DHICA は Tyrosinase related protein-1 (TRP-1) の触媒反応により Indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid quinone に酸化され自動酸化重合によりポリマー化形成され、ユウメラニンが合成される。フェオメラニンは TYR の触媒反応により生成したドーパキノンが非酵素的にシステインあるいはグルタチオンと結合しシステイニルドーパとなり、このシステイニルドーパが重合することによりフェオメラニンになる。

メラニンの合成は色素細胞内の細胞小器官である、MS 内で合成される。MS はリソソームと同様にエンドソームを起源として形成されると考えられている。MS はメラニン合成のステップに伴いステージI-IVに分類される。MS の構造タンパクである Silver locus protein/ premelanosome protein 17 (Pmel17) はステージIの MS に輸送され MS の構造が形成される (ステージ II)。その後、TYR、TRP-1、TRP-2/DCT が MS へ輸送されメラニンが合成されステージIII-IVとなる。この過程を MS の成熟と呼び、成熟した MS は色素細胞内の核周辺から樹状突起の先端まで輸送される。MS は核周辺から樹状突起に向かって、微小管上をキネシン (Kinesin) と呼ばれるモータータンパクに乗って輸送され、樹状突起先端から核周辺に戻る際はダイニン (Dynein) に乗って逆輸送される。微小管上を輸送された MS がアクチンフィラメントに受け渡されると、MS 上に局在する Ras-related protein Rab-27A (Rab27A) がエフェクタータンパクである Slac2-a/ Melanophilin を介してミオシン Va と複合体を形成する<sup>7)</sup>。細胞膜付近では、Rab27A が Slac2a と入れ替わり Slp2-a/ Exophilin4 エフェクタータンパクと結合し、Slap2-a は細胞膜と結合する活性を有するため、MS は細胞膜につなぎ留められ樹状突起の先端に集結する<sup>8)</sup>。色素細胞の樹状突起の末端まで輸送された MS は複合体を形成し、小胞として色素細胞の樹状突起の先端から放出される。この MS 複合体小胞をケラチノサイトが貪食することにより、メラニンがケラチノサイトへと受け渡される。

一般的にケラチノサイトの MS 貪食の分子機構は Protease-activated receptor-2 (PAR-2) の活性化により説明されている<sup>9,10)</sup>。PAR-2 は 7 回膜型貫通型 G タンパク質を備えた受容体であり、セリンプロテアーゼにより細胞膜から外側に飛び出した部分が切断され、切断部分が受容体に結合することで活性化する自己活性型受容体である<sup>11,12)</sup>。さらに活性化した PAR-2 は細胞膜周辺にアクチンフィラメントの重合、凝集による偽足構造を形成することにより MS をケラチノサイト内へ貪食する。

また、ケラチノサイトの強力な有糸分裂促進因子として知られる keratinocyte growth

factor/Fibroblast growth factor 7 (KGF) も Rho-Rac 依存性経路を介してアクチン重合を促し、メラノソーム貪食に関与すると考えられている<sup>13)</sup>。さらに、ケラチノサイトが産生する  $\alpha$ -MSH は色素細胞でミオシン Va やエキソサイトーシス関連遺伝子の発現を促し MS の放出を増加させるとともに、ケラチノサイトの貪食能を亢進させる<sup>14)</sup>。ケラチノサイトに貪食された MS はメラニン顆粒まで分解され細胞質内に拡散されると考えられている。

## 老人性色素斑

老人性色素斑は太陽光への慢性的な曝露により皮膚表面に顕在化する色素斑である。色素斑の形成は、色素細胞の細胞増殖、メラニン産生の増加および MS のケラチノサイトへの移送亢進、ケラチノサイトの分化能の低下によるメラニンの長期間表皮内滞留に起因する<sup>15, 16)</sup>。

メラニンの合成や MS のケラチノサイトへの移送は UV 曝露により亢進することが実証されている。紫外線に曝露された皮膚では、色素細胞刺激因子 (Melanocyte stimulate factors: MSFs) がオートクライン的に、あるいはパラクライン的に作用することで色素沈着形成を誘発する<sup>17)</sup>。これまでの研究では、太陽光曝露後の皮膚の色素沈着は色素細胞とケラチノサイトさらに真皮線維芽細胞との相互作用により引き起こされることが報告されている<sup>18, 19)</sup>。色素沈着形成を促す因子には、色素細胞刺激ホルモン ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone:  $\alpha$ -MSH) /メラノコルチン 1 受容体 (melanocortin 1 receptor: MC1R)、幹細胞刺激因子 (stem cell factor: SCF) /c-kit、エンドセリン 1 (endothelin-1) /エンドセリン-B 受容体 (endothelin B receptor)、Hepatocyte growth factor (HGF) /c-met、Granulocyte macrophage colony-stimulating factor : GM-CSF)、Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) /EP 受容体などがあり<sup>20)</sup>、これらの MSFs は紫外線曝露により合成、分泌が促進される<sup>21, 22)</sup>。

このように、UV による色素沈着メカニズムに関しては多くのことが明らかにされているが、限局性に出現してくる色素斑形成のメカニズムについては残念ながら明らかにはされていない。しかしながら、代表的な色素斑である老人性色素斑部位では基底膜の損傷や老化の形質を発現する線維芽細胞の存在が報告されている<sup>23)</sup>。この事実から、限局性色素斑の形成には真皮線維芽細胞が強く関与している可能性が示唆される。

## シワ

シワは皮膚表面に現れる立体的な形状変化であり、一般的に表皮性のシワと真皮性のシワとに大別される。表皮性のシワとして定義される小じわは皮膚の乾燥により一過性に出現するものであるが、真皮性の深いシワは真皮乳頭層の構造変化に起因すると考えられている。真皮乳頭層の具体的な構造変化としては、コラーゲン線維の減少とオキシタラン線維の消失がある<sup>24, 25, 26, 27)</sup>。また、光老化皮膚では網状層では無配向性のエラスチン線維が増生することも観察されており、日光性弾性線維症 (solar elastosis) として知られている<sup>28)</sup>。

真皮線維芽細胞のコラーゲン合成量の減少と<sup>29, 30)</sup>、コラゲナーゼである Matrix

metalloproteinase-1 (MMP-1) の合成、分泌増加によるコラーゲン線維の分解促進がコラーゲン代謝のアンバランスを引き起こし、真皮乳頭層におけるコラーゲン線維減少の原因となっている<sup>24, 25, 26)</sup>。

一方、光老化皮膚では、IL-8 の分泌亢進に伴う好中球の乳頭層への浸潤を誘導し、浸潤した好中球エラスターゼによるオキシタラン線維の分解がオキシタラン線維の消失の原因として説明されている。

## オートファジーと老化

オートファジーとは細胞質内にある変性したタンパク質や損傷により機能低下したオルガネラをリソソームと融合、分解する細胞内自浄システムの総称である。一般的に、オートファジーは細胞内の栄養が枯渇したときに活性化され、不要になったタンパク質およびオルガネラなどを細胞自身が分解しリサイクルすることで栄養枯渇時の細胞機能の恒常性を維持する重要な役割を担っている。

オートファジーサイクルは以下のようなステップで進行する。まず、細胞質内に隔離膜と呼ばれる膜が分解の対象となるタンパク質、あるいはオルガネラを包み込みながら伸長し二重膜構造体のオートファゴソームが形成される。続いて、オートファゴソームがリソソームと融合することでオートリソソームが形成され、リソソーム内に存在するタンパク加水分解酵素によってオートリソソームの内容物が消化分解される。このオートファジーサイクルは複数のオートファジー関連遺伝子群 (Autophagy-related genes : ATG) により厳密に制御されている。

このオートファジーにより分解される対象物は、酸化ストレスや UV 照射などによって障害されたタンパクやミトコンドリアなども含まれ、細胞内代謝機能の維持にも重要な役割を果たしていることが報告されている。

これまでの研究から、老化個体におけるオートファゴソーム形成機能の低下やタンパク質分解活性の低下が報告されている<sup>31)</sup>。さらに、抗老化遺伝子として知られている Sirtuin-1 がオートファゴソーム形成に関わるタンパク質と直接相互作用をすることも示されており、オートファジーが老化と深い関係にあることが示唆されている<sup>32)</sup>。

## 活性酸素と老化

老化の加速因子として、ROS などのフリーラジカル類が提唱されている。一般的に細胞内のレドックスは Kelch-like ECH-associated protein (Keap-1) -Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) によって制御されている。定常状態において Nrf2 は Keap-1 と複合体を形成し細胞質に存在しているが、酸化ストレス条件下において Keap-1 が解離し Nrf2 が細胞核内に移行する<sup>33)</sup>。Nrf2 は antioxidant response element (ARE) に結合し、抗酸化関連遺伝子である NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1 (NQO1)、Heme Oxygenase 1 (HO-1)、 $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) の発現を亢進することで酸化ストレスに対する生体防御に働い

ている<sup>34,35)</sup>。

## 研究目的

皮膚老化は加齢による生理的老化と慢性的な太陽光曝露による光老化に大別される。皮膚は体の最外層に位置することから、皮膚の老化は環境要因の影響を強く受ける光老化であると考えられる。深いシワは、光老化皮膚の特徴的な外観変化の一つである。浅いシワは皮膚保湿機能の低下による乾燥に起因する表皮性のシワであり、深いシワは真皮の構造変化に起因すると考えられている。その構造変化は、真皮細胞外マトリックスであるコラーゲン線維や弾性線維の乳頭層での減少、消失である。

また、光老化皮膚のもう一つの特徴的变化として老人性色素斑に代表される色素斑の形成がある。老人性色素斑はUVへの曝露履歴に依存することが報告されている。一方、UVに曝露された皮膚では、ケラチノサイトや色素細胞から様々な色素細胞刺激因子が放出され、それら因子がパラクライン及びオートクライン的に作用することで色素沈着を誘導する。UVによる色素沈着メカニズムについてはこれまで多くの研究により明らかにされてきた。しかしながら、限局性に出現する色素斑形成のメカニズムについては未だ不明な点が多くある。近年、老人性色素斑の色素斑部位では基底膜の損傷や老化の形質を発現する線維芽細胞の存在が報告されている。この事実から、色素斑形成には、線維芽細胞の寄与の可能性が強く示唆されている。

一方、近年、加齢とオートファジー機能不全の関係が指摘されており、環境因子が皮膚におけるオートファジー機能に及ぼす影響を明らかにすることは皮膚老化のプロセスを理解するために重要である。

そこで本研究は、UVAを反復照射し光老化の表現型を発現した光老化モデル線維芽細胞を作成し、光老化皮膚を特徴付けるシワ、色素斑の形成に焦点を当て、皮膚構成細胞の相互作用を明らかにし、それに対する改善策を提案すること、さらに、UVB照射したケラチノサイトへのMSの移送におけるケラチノサイトの分泌成分のオートクライン的な作用、ケラチノサイトと色素細胞の相互作用に注目した素材の作用評価による改善策の提案を目的として行った。

第1章ではUVAを連続曝露した真皮線維芽細胞の形質変化を明らかにし、すでに報告されている光老化真皮に存在する線維芽細胞の表現型を発現する、光老化モデル線維芽細胞の作成を目的として実施した。

第2章ではUVA連続照射による光老化モデル線維芽細胞の真皮マトリックスを構成する線維形成能の低下に対する改善策の提案として、トラネキサム酸のアンチエイジング作用の可能性を評価した。

第3章ではUVA連続曝露した線維芽細胞が色素細胞および色素細胞を含む再生表皮モデルの色素斑形成に及ぼす作用を確認した。

第4章ではUVBおよびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がケラチノサイトのメラノソーム貪食に及ぼす作用と赤カボチャ種子エキスの改善効果、さらに赤カボチャ種子エキスの活性酸素消去機序について評価を行った。

第5章ではケラチノサイトを介した色素斑形成として、UVB照射を行ったケラチノサイトの培養上清を用いて色素細胞を培養し細胞増殖、樹状突起の伸長、さらにケラチノサイトのメラノソーム貪食に対する $\alpha$ -トコフェロール脂肪酸エステルの効果を確認した。

## 第1章 光老化を誘導した線維芽細胞の表現型の変化

### 1-1. 緒言

光老化とは紫外線をはじめとする太陽光線に過度に曝露されることで引き起こされる皮膚老化であり、色素斑、シワ、たるみなどの光学的、形態的皮膚変化を発現する。

光老化皮膚では、コラーゲン分子の合成が低下、および既存コラーゲン線維の分解に由来するコラーゲン線維の消失が報告されている<sup>36, 37)</sup>。コラーゲン線維の消失は、紫外線の曝露により過剰に生成される活性酸素 (ROS; Reactive oxygen species) が MMP-1 の合成を促進し、コラーゲン線維の分解が促進されること、コラーゲン合成のフィードバックタンパクである CCN1/CYR61 の増加によるコラーゲン分子の合成の低下によって説明されている<sup>38)</sup>。また、MMP-1 により分解されたコラーゲンフラグメントに囲まれた線維芽細胞は正常な代謝を行うことができないことから、その環境の改善が重要となる。通常、コラーゲンフラグメントが存在する線維芽細胞の周辺環境は、コラーゲン受容体である End180 によりコラーゲンフラグメントが線維芽細胞内へ取り込まれ除去・分解され、新たなコラーゲン線維の再生に使用される。しかしながら、光老化皮膚では Endo180 の低下が報告されており<sup>39)</sup>、Endo180 のノックダウン線維芽細胞では、コラーゲン合成の低下が観察されていることから<sup>40)</sup>、Endo180 の減少もコラーゲン合成の低下に関与している可能性が考えられる。一方、皮膚の機械的ストレス応答を担う弾性線維は、コラーゲン線維とは異なり複雑な線維形成過程を有する。弾性線維は、マイクロフィブリル (microfibrils) 上にトロポエラスチン (tropoelastin) が沈着した基本構造を持ち、トロポエラスチンの沈着比率の少ないものから、オキシタラン線維、エラウニン線維、エラスチン線維の三種類に分けられる。また、日常的に紫外線に曝露される部位では、網状層において無配向性のエラスチン線維が増生され、真皮乳頭層のオキシタラン線維は消失する<sup>41)</sup>。しかし、生理的加齢ではエラスチン線維は減少することが報告されており<sup>42)</sup>、弾性線維の老化における変化に対する対応については非常に難しいものがある。生体における弾性線維のターンオーバー速度は非常に長く、消失した線維を再構築することは困難であると考えられている<sup>43)</sup>。

一方で、バルクの細胞内分解系として働くオートファジーが老化を抑制する機構として研究がなされており、オートファジーは加齢とともに機能が低下することが報告されている。また、高齢者由来の皮膚線維芽細胞では若年者由来の線維芽細胞と比較してオートファゴソームは増加しているが、オートファジー活性は低いことが報告されている<sup>44)</sup>。オートファジーシステムは機能不全となった細胞小器官やたんぱく質を分解し、分解された物質をリサイクルすることにより細胞内の恒常性を保つ細胞内分解システムであることから<sup>45, 46)</sup>、その機能不全は異常なミトコンドリアの蓄積に伴う細胞内 ROS の増加により老化を加速させる可能性が示唆されている。また、オートファジーの分解阻害作用を有するプロテアーゼ阻害剤、leupeptin や pepstatin A を処理した線維芽細胞ではI型コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックス成分の合成が低下し、コラーゲン線維の分解が加

速されることも報告されている<sup>47)</sup>。このようなオートファジーの機能不全に伴う線維芽細胞の機能変化は、光老化真皮に見られる組織学的変化を再現する。しかしながら、現状ではオートファジーの機能不全が皮膚の老化を進行させる要因として作用するのか、または老化の結果としてオートファジー機能が損なわれるのかという疑問が提起されている。

## 目的

紫外線への慢性的な皮膚への曝露は光老化皮膚の進行を促進することが報告されている。一方、光老化皮膚の組織変化としてコラーゲン線維、エラスチン線維の減少、機能変化としてオートファジー機能の低下が報告されている。これまでの抗老化研究においては、紫外線の単回照射による真皮線維芽細胞の真皮マトリックス産生機能の低下改善を目的とした素材探索が主に行われてきた。しかしながら、前述のように光老化皮膚は慢性的な紫外線曝露により進行することから、光老化皮膚に存在する線維芽細胞モデルを作成し、その光老化モデル線維芽細胞を用いて素材探索を行うことが妥当な方法である。

そこで、本章ではUVAの複数回照射により光老化モデル線維芽細胞を作成することを目的として検討を行った。作成したモデル細胞が光老化モデル線維芽細胞であることを検証するために、光老化皮膚に存在する線維芽細胞の形質である細胞老化マーカー、細胞内ROSレベル、真皮マトリックス関連遺伝子発現の変化、オートファジー機能の観点に焦点を当て評価を行った。

## 1-2. 実験

### 1-2-1. 試薬

試薬は以下のものを使用した。

MTT: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide; ナカライテスク (京都), X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside; 和光純薬工業株式会社 (大阪), BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific (MA, USA), BSA: Albumin, from bovine serum; (SIGMA-Aldrich, Darmstadt, Germany), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA); Merck (Darmstadt, Germany), Fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Hoechst 33342; Nacalai Tesque, 京都, LysoTracker™ Red DND-99 (Life Technologies, USA), Hydroxychloroquine (HCQ) (東京化成工業株式会社, 東京) CYTO-ID® Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences, USA) BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific (MA, USA)).

### 1-2-2. 細胞培養実験方法

正常ヒト真皮線維芽細胞 (KURABO) (NHDF : p=3~8)は 5%の FBS を含む DMEM を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。継代培養は 0.25%トリプシンおよび 0.02%EDTA を含有する PBS-を用いて細胞を剥離した。

### 1-2-3. 光老化モデル線維芽細胞の作成

NHDF を 96 well plate に  $2.0 \times 10^4$  cells/well、35 mm dish に  $40 \times 10^4$  cells/well の密度で播種し 24 時間培養した。HBSS にて 1 回洗浄後、フェノールレッド不含有 (5 %FBS 含む)DMEM に置換した。3 J/cm<sup>2</sup>の照射強度で UVA を NHDF へ照射した。UVA ランプは BLB ランプ (東芝製) を用いた。1 日 1 回、連続 4 日間繰り返し UVA 照射を行い、線維芽細胞の光老化誘導を行った。

### 1-2-4. SA $\beta$ -ガラクトシターゼ染色

NHDF を PBS-で洗浄後、4%ホルムアルデヒド溶液を添加し 15 分間静置して細胞を固定した。PBS-にて洗浄後、1 mg/mL の X-Gal を添加し 37°Cで 24 時間インキュベートした。PBS-にて洗浄を行い、光学顕微鏡で画像を撮影した。

### 1-2-5. MTT アッセイ法

0.4 mg/mL の MTT を含む DMEM を用いて、NHDF を 37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で 2 時間インキュベートした。DMEM を除去後、イソプロピルアルコールを添加し 10 分間アジテーションを行い生成したフォルマザンを抽出した。抽出液の 550 nm における吸光度 (Reference: 650 nm) を測定し、細胞生存率を算出した。

### 1-2-6. 細胞内 ROS の測定

NHDF を HBSS で洗浄し、HBSS にて 20  $\mu$ M に調製した H<sub>2</sub>DCFDA を各 well に添加した。37°C、5 %CO<sub>2</sub>濃度の環境下で 30 分間インキュベートした。その後、プレートリーダーにて蛍光強度 (Ex; 485 nm / Em; 530 nm) を測定した。0.5 %TritonX-100 にて細胞を溶解して、細胞内タンパク量を BCA Protein Assay Kit により測定した。測定した蛍光強度とタンパク量から、タンパク量あたりの細胞内 ROS レベルを算出した。

### 1-2-7. 培養細胞のカルボニルタンパクの蛍光ラベル

NHDF を PBS-で洗浄し、冷メタノールを各 Well に添加、-20°Cで 10 分間静置し細胞を固定した。PBS-で洗浄を行い、20  $\mu$ M FTSC を含む 0.1 M MES-Na 緩衝液 (pH 5.5) を添加して室温、遮光下で 1 時間静置した。PBS-にて洗浄後、プレートリーダーにて蛍光強度 (Ex; 492 nm /Em; 516 nm) を測定した。4  $\mu$ M Hoechst33342 を調製し、37°Cで 30 分間静置した。PBS-にて洗浄後、蛍光強度 (Ex; 360 nm/Em; 461 nm) を測定した。その後、蛍光顕微鏡にて

画像を取得した。FTSC の蛍光値を Hoechst33342 の蛍光値で補正し、これを細胞内カルボニルタンパクレベルとした。

### 1-2-8. リアルタイム PCR 法

#### RNA 抽出

NHDF を PBS-にて洗浄し、RNeasy Mini kit (Qiagen) を使用して total RNA を抽出した。RNeasy Mini kit 付属のプロトコルを参照。

#### 逆転写反応

Total RNA と ReverTraAce qPCR RT Master Mix (×5) (TOYOBO)、Nuclease-Free Water (TOYOBO) を 2: 2: 6 で混合させ、Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystem) を使用して 37°C で 30 分、50°C で 5 分、98°C で 5 分の条件で逆転写反応を行い、cDNA を調製した。

#### RT-PCR

Nuclease-Free water にて希釈した cDNA を 4.8 μL、Power Up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 5 μL、各プライマーの forward および reverse を 0.1 μL ずつ、合計 10 μL になるよう Nuclease-Free water にて調整しウェルに添加した。Gene Amp StepOne RT-PCR system (Applied Biosystems) を用いて、Holding Step 50°C, 1 min、95°C, 15 sec、Cycling Step 95°C, 3 sec、60°C, 30 sec を 40 サイクル、Melt curve Step 95°C, 15 sec、60°C, 1 min、95°C 15 sec の条件で反応させた。mRNA の発現を、 $\Delta\Delta C_t$  法を用いて算出した。

Table. 1 Primer sequence

Gene	Forward	Reverse
<i>COL1A</i>	GCTTGGTCCACTTGCTTGAAGA	GAGCATTGCCTTTGATTGCTG
<i>MMP1</i>	AAGGTGGACCAACAATTTTCAGA	TGAAGGTGTAGCTAGGGTACATCAA
<i>TIMP1</i>	CCTTATACCAGCGTTATGAGATCAA	AGTGATGTGCAAGAGTCCATCC
<i>CYR61</i>	CCAAGCAGCTCAACGAGGA	TGATGTTTACAGTTGGGCTGGAA
<i>MRC2</i>	GCTTGCACCAACATCACCAT	GGGAGAAGCTGCTCTGCTCA
<i>elastin</i>	GCTGACGCTGCTGCAGCCTA	CAGCAAAAGCTCCACCTACA
<i>FN1</i>	CTTCCACCTAACAGGCCATTAACA	CTATCACATGGTTCCATAGGTGCAG
<i>EMILIN1</i>	CCTTCGACAGAGTCCTGCTCAA	CGCTCAGCAAGTAGCGTCCA
<i>MFAP4</i>	CTTTGTGGCAGGCTTTGAGGA	AACTTCTGGCCACTGTGGTAGGAC
<i>LOX</i>	TTCTTACCCAGCCGACCAAGATA	GTGTTGGCATCAAGCAGGTCA
<i>FBLN4</i>	GCTGCTACTGTTGCTCTTGGG	GGGATGGTCAGACACTCGTTG
<i>COL71</i>	GAGAAGGGAGAAGCTGCACTGAC	GGCAGTGTCTGCAGCATAACTAGG
<i>COL4A2</i>	CGGAGTTTGTGGATCGGATA	GCATTCGATGAATGGTGTGG
<i>LAMC2</i>	TTTCAGATGCCAGTGACAAGACC	GCTTCCAAGTTCAGACTCCCAAT
<i>HSPG2</i>	CCGTCACAGCAAGCCAAATG	AATTCACCAGGGCTCGGAAATAA
<i>CXCL8</i>	AACTGCGCCAACACAGAAATTA	TTTGCTTGAAGTTTCACTGGCATC
<i>ULK1</i>	TCGAGTTCTCCCGCAAGG	CGTCTGAGACTTGGCGAGGT
<i>Atg4</i>	GATGGAGGAAATCAGAAGGTTG	CGCAGGGGAATGAGAAGTA
<i>Atg5</i>	GGGCCATCAATCGGAAAC	AGCCACAGGACGAAACAG
<i>Atg7</i>	CAGCAGTGACGATCGGATGA	GACGGGAAGGACATTATCAAACC
<i>Atg12</i>	AGTAGAGCGAACACGAACCATC	CCATCACTGCCAAAACACTCAT
<i>LC3</i>	GAGAAGCAGCTTCCTGTTCTGG	GTGTCCGTTACCAACAGGAAG,
<i>GAPDH</i>	GGGAAATCGTGCGTGACAT-3	CAGGAGGAGCAATGATCTC

### 1-2-9. 正常ヒト線維芽細胞へのヒドロキシクロロキン (HCQ) 処理

NHDF を 96 well plate に  $2.0 \times 10^4$  cells/well の密度で播種し 24 時間培養した。HCQ を終濃度 10 nM になるよう 5 %FBS を含む DMEM にて調整した培地と交換して、さらに 24 時間培養を行った。

### 1-2-10. Western Blotting 法

#### Sample 回収

光老化モデル線維芽細胞および HCQ 処理線維芽細胞を PBA -にて回収し、Sample Buffer Solution (2ME+) と Sample を 1:3 の割合で混合して  $5 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$  のタンパク濃度になるよう調整した。

### 電気泳動用ポリアクリルアミドゲルの作製

アトー株式会社の電気泳動作業手順書を参考に、30% アクリルアミド保存液 (A 液) と 1.5 M Tris-HCl 緩衝液 (0.4% SDS 含有) (B 液)、10% 過硫酸アンモニウム (D 液)、純水、TEMED を加え、ミニスラブゲル作製キットに流し込み、ゲルが乾かぬよう上に純水を少量流し込み、約 1 時間静置して分離ゲルを作成した。ゲルが重合したら、純水を捨て、30% アクリルアミド保存液 (A 液)、0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (0.4% SDS 含有) (C 液)、10% 過硫酸アンモニウム (D 液) と TEMED を混合した濃縮ゲルを分離ゲルの上に流し込んだ。コームを差し込み、約 30 分静置させてゲルを重合させた。分離ゲルは、10% と 15% でそれぞれの分子量に対応したものを作製した。

### 電気泳動

電気泳動槽 (ATTO) に泳動用バッファー (25 mM Tris、0.1% SDS、192 mM グリシン) を流し込んでミニスラブゲルをセットし、Sample 溶液を各ウェルに流し込み、250 V、20 mA/ゲル 1 枚、90 min の条件で電気泳動を行った。同時に分子量マーカー (BIORAD, #161-0374) 3  $\mu$ L を泳動した。

### ブロッキング

泳動中にメンブレン (PVDF 膜) をメタノールに 20 秒間浸し、ブロッキング B 液に室温で 1 時間浸漬させた。同時にブロッキング用濾紙をメンブレン一枚につき、ブロッキング A 液に 2 枚、ブロッキング B 液に 1 枚、ブロッキング C 液に 3 枚浸漬した。泳動終了後、泳動ゲルをブロッキング B 液で洗浄し、ブロッキング装置 (ATTO) の上に、A 液に浸した濾紙 2 枚、B 液に浸した濾紙 1 枚、泳動ゲル、C 液に浸した濾紙 3 枚の順で重ねて軽く余分な液を拭き取り、40 V、144 mA/ゲル 1 枚、45 min の条件でブロッキングを行った。

### 抗原抗体反応

ブロッキング終了後、PVDF 膜を 1% BSA 溶液に室温で 2 時間、浸漬振盪させブロッキングを行った。0.05% PBS-T で 5 分間、3 回洗浄を行い、0.3% BSA 溶液で希釈した一次抗体 LC3A/B Antibody、p62、LAMP1 (1:1000) または、 $\beta$ -actin (1:2000) を PVDF 膜に添加してビニールバックに挟み込み 4°C でオーバーナイトした。0.05% PBS-T で 5 分間振盪を 3 回を行い、0.3% BSA 溶液で二次抗体 HRP conjugate Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody (Invitrogen) (1:3000) を希釈して室温で 2 時間反応させた。0.05% PBS-T で 5 分間、3 回洗浄を行い、ECL Western Blotting Detection Regents 1 と ECL Western Blotting Detection Regents 2 を 1:1 で混合させ、PVDF 膜に滴下し 1 分間反応させた。X 線フィルムにて感光させ現像機でバンドの検出を行った。Image J を用いて検出したバンドを数値化しグラフを作成した。

### **1-2-11. CYTO-ID キットを用いたオートファゴゾームの検出**

1-2-3. の手順で作成した光老化モデル線維芽細胞および HCQ 処理 NHDF を PBS - で洗浄し、20 nM CYTO-ID (Enzo) 含有培地と交換し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 濃度の環境下で 30 分間イン

キュベートした。細胞を PBS -で洗浄し、CYTO-ID 由来の蛍光は 480 nm にて励起時の 530 nm における蛍光を測定した。HBSS にて調製した 4  $\mu$ M Hoechst33342 (Life science) と NHDF を 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 濃度の環境下で 30 分間インキュベートし核染色を行った。核由来の蛍光は、360 nm にて励起時の 461 nm における蛍光を測定した。蛍光顕微鏡にて画像を取得した。

#### 1-2-12. LysoTracker によるリソソーム染色

光老化モデル線維芽細胞および HCQ 処理 NHDF を PBS -で洗浄し、10 nM LysoTracker Red DND-99 (Life science) 含有培地と交換を行い、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 濃度の環境下で 1 時間インキュベートした。細胞を PBS -で洗浄し、LysoTracker 由来の蛍光は 577 nm にて励起時の 590 nm における蛍光を測定した。HBSS にて調製した 4  $\mu$ M Hoechst33342 (Life science) と NHDF を 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 濃度の環境下で 30 分間インキュベートし核染色を行った。核由来の蛍光は 360 nm にて励起時の 461 nm における蛍光を測定した。蛍光顕微鏡にて画像を取得した。

#### 1-2-13. カテプシン酵素活性測

光老化モデル線維芽細胞を PBS -で洗浄し、0.5 % TritonX-100 含有 PBS -を 96-well plate の 1well 当たり 100  $\mu$ L 添加して細胞を溶解して粗酵素液を調製した。蛍光基質として、20  $\mu$ M MOCac-Pro-Leu-Gly-Leu-Gly-Phe-Ile-Leu-Phe-Arg-Leu-Ile (DNP) (ペプチド研究所) を用いて、50 mM AcONa/NaCl (pH 4.0) buuffer 中で 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 濃度の環境下で反応させた。素酵素液と合成基質の混合直後を 0 時間として、10 分毎に 327 nm 励起時の 393 nm における蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定した。10 分毎に測定した蛍光値から反応直後 0 時間の蛍光値を引き、検量線の傾きより MOCac の生成量を算出した。また、算出した値から単位時間あたりの生成量を求め、単位タンパク量で補正を行いカテプシン活性とした。

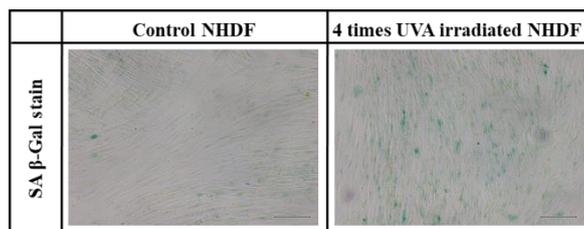
#### 1-2-14. 細胞内リソソーム活性測定

光老化モデル線維芽細胞を PBS -で洗浄し、リソソーム内活性アッセイ蛍光プローブ (Lysosomal Intracellular Activity Assay Kit, Biovision) (1:100) を処理し 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 濃度の環境下で 1 時間インキュベートした。細胞を PBS -で洗浄し、485 nm にて励起時の 530 nm における蛍光を測定した。HBSS にて調製した 4  $\mu$ M Hoechst33342 (Life science) と NHDF を 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 濃度の環境下で 30 分間インキュベートし核染色を行った。核由来の蛍光は、360 nm にて励起時の 461 nm における蛍光を測定した。

### 1-3. 結果

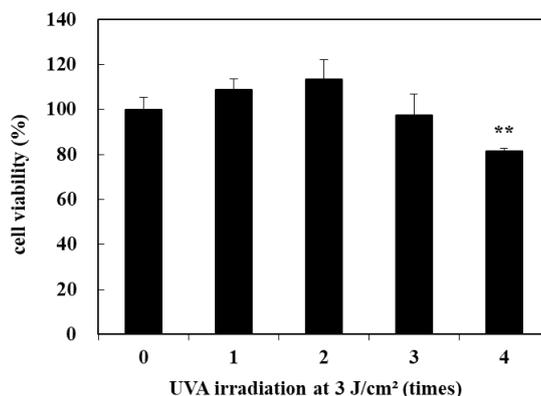
#### 1-3-1. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞の SA-β-ガラクトシターゼ発現

UVA (3 J/cm<sup>2</sup>) を 1 日 1 回、4 日間連続して照射を行った線維芽細胞の SA-β-ガラクトシターゼ染色を行った。UVA 連続照射を行った線維芽細胞では SA-β-ガラクトシターゼ陽性細胞率が増加しているのが確認された (Fig. 1-1)。また、細胞生存率を MTT アッセイで確認したところ、4 日間の連続照射で生存率は 75%程度に減少した (Fig. 1-2)。



**Fig. 1-1 Influence on the cell senescence markers in UVA-irradiated (photoaging) NHDFs.**

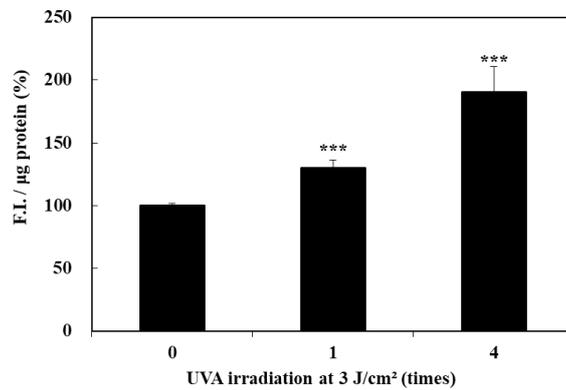
NHDFs were irradiated 3 J/cm<sup>2</sup> UVA for 4 continuous days. Cells were treated with 1mg/mL X-gal, and the staining levels of X-gal were observed using a microscope. Bar scale: 100 μm.



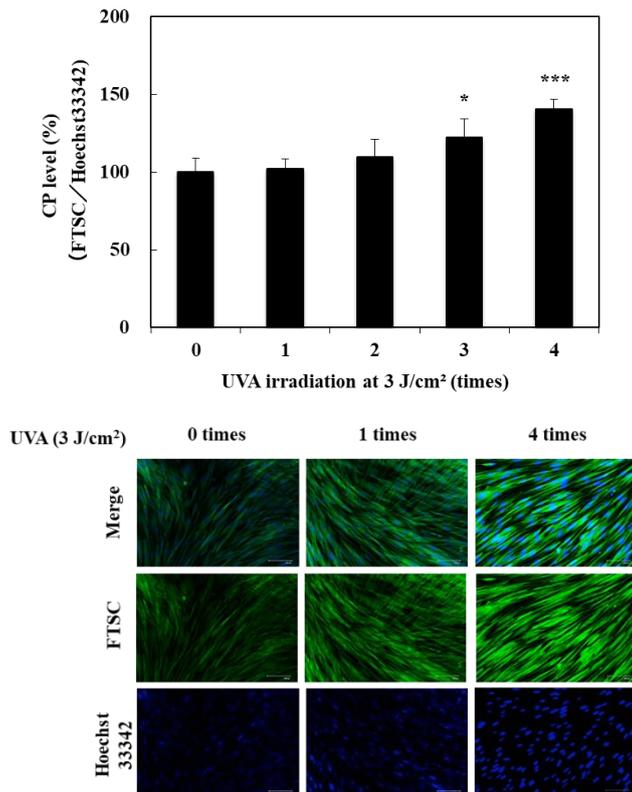
**Fig. 1-2 Cell viability at UVA-irradiated (photoaging) NHDFs.** NHDFs were irradiated 3 J/cm<sup>2</sup> UVA for 4 continuous days. Cell viability was measured by using the MTT method. The data are expressed as the mean ± standard deviation of 5 independent examinations. Significance \*\* p<0.01.

#### 1-3-2. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞の細胞内 ROS およびカルボニルタンパクレベル

UVA 照射線維芽細胞の細胞内 ROS およびカルボニルタンパクの測定を行った。複数回 UVA 照射線維芽細胞では有意な細胞内 ROS レベルの亢進が確認され、単回で UVA 照射を行った線維芽細胞よりも高い値が示された (Fig. 1-3)。さらに、酸化タンパク質として知られているカルボニルタンパクをアルデヒド基に対する特異的反応蛍光プローブである FTSC でラベル化することで検出したところ、複数回 UVA 照射線維芽細胞では有意な増加が認められた (Fig. 1-4)。



**Fig. 1-3 Intracellular ROS levels in UVA-irradiated (photoaging) NHDFs.** NHDFs were irradiated 3 J/cm<sup>2</sup> UVA for 4 continuous days. After preloading of NHDFs by 30 min incubation with H2DCFDA. After dissolution, the fluorescence intensity of each lysate was measured (Ex; 485 nm, Em; 530 nm). Intracellular ROS levels are expressed as F.I./ug protein. Data are expressed as mean  $\pm$  SD from 5 independent experiments. Significance: \*\*\* p <0.001



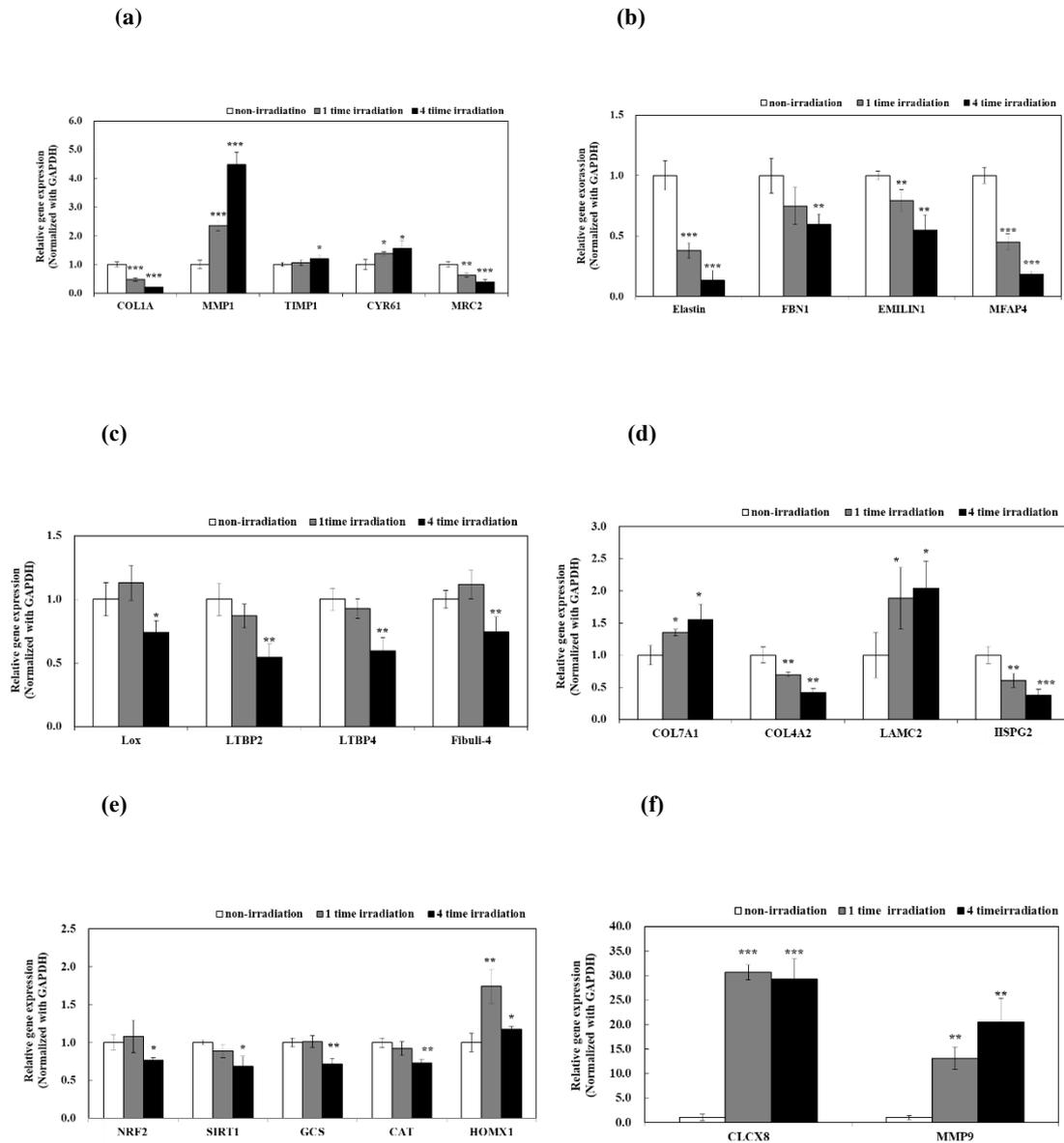
**Fig. 1-4 Intracellular ROS levels in UVA-irradiated (photoaging) NHDFs.** NHDFs were irradiated 3 J/cm<sup>2</sup> UVA for 4 continuous days. After preloading NHDFs by including with FTSC for 60 min, Hoechst for 15min cells were washed and fluorescence intensity was measured (FTSC: Ex; 485 nm, Em; 530 nm, Hoechst: Ex; 350 nm, Em: 460 nm). The intracellular CP levels are expressed as FTSC/Hoechst. Data are expressed as means  $\pm$  SDs from 5 independent experiments. Significance: \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001

### 1-3-3. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞の遺伝子発現の変化

複数回 UVA 照射線維芽細胞にて、コラーゲン線維、弾性線維、基底膜構成タンパク、酸化系酵素群に関連する遺伝子発現を確認した。複数回 UVA 照射線維芽細胞では、COL1A1 の有意な発現減少、MMP-1 の発現増加が確認された。さらに、コラーゲン合成を抑制し、MMP-1 の発現を誘導することが知られている CCN1 の発現増加、分解された断片化コラーゲンを取り込む MRC2 (Endo180) の発現低下が確認された (Fig. 1-5a)。また、弾性線維形成に関連する遺伝子において有意な発現低下が確認され (Fig. 1-5b)、好中球遊走因子として知られている CLCX8 (IL-8) の有意な発現増加も認められた (Fig. 1-5f)。これらの結果より、複数回 UVA 照射線維芽細胞はコラーゲンおよび弾性線維形成の抑制、さらにその分解の亢進を誘導する可能性が示唆された。複数回 UVA 照射線維芽細胞では、基底膜を構成している COL4A2 (4 型コラーゲン)、HSPG (パールカン) の遺伝子発現が低下し (Fig. 1-5d)、基底膜を分解する MMP-9 の有意な発現増加も確認された。一方で、COL7A1 および LAMC2 (ラ

ミニン) の遺伝子発現は増加が確認された。基底膜の構成分子として広く分布する 4 型コラーゲン、パールカン、ラミニンの遺伝子発現が大きく変化していること、MMP-9 の遺伝子発現が増加していることから複数回 UVA 照射線維芽細胞は正常な基底膜の形成能が低下している可能性が示唆された。

長寿遺伝子と呼ばれ老化と強い関連が報告されている Sirt1 (サーチュイン) 遺伝子は複数回 UVA 照射線維芽細胞で有意に低下していることが確認された。さらに、複数回 UVA 照射線維芽細胞では、一般的な細胞内レドックスを制御する Nrf2 とその下流にコードされている抗酸化関連タンパク質の  $\gamma$ GCS、CAT、HOMX1 も有意な遺伝子発現の低下が認められた (Fig. 1-5e)。

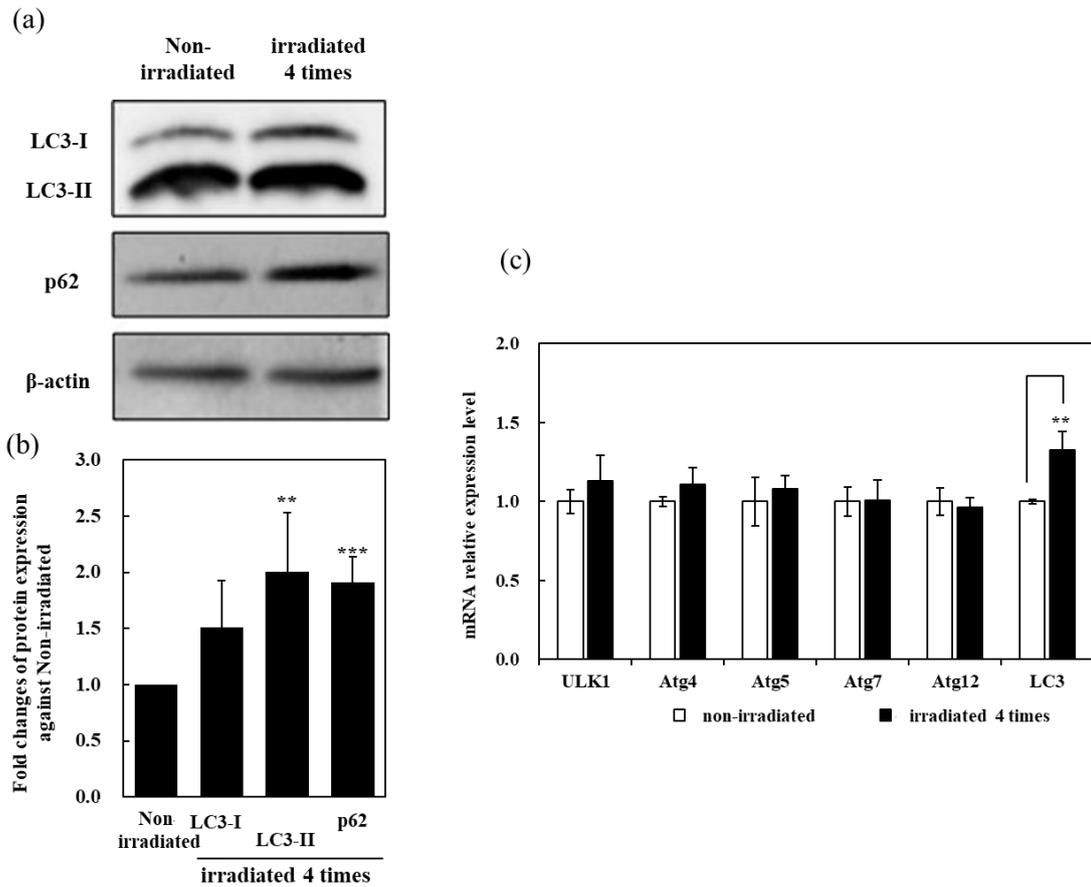


**Fig. 1-5 The change of relative gene expression levels in UVA-irradiated (photoaging) NHDFs.** NHDFs were irradiated 3 J/cm<sup>2</sup> UVA for 4 continuous days Total RNAs were extracted from the cells and cDNAs were synthesized. mRNA expression levels were measured by real-time PCR. Data are expressed as means ± SDs from 4 independent experiments. Significance: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

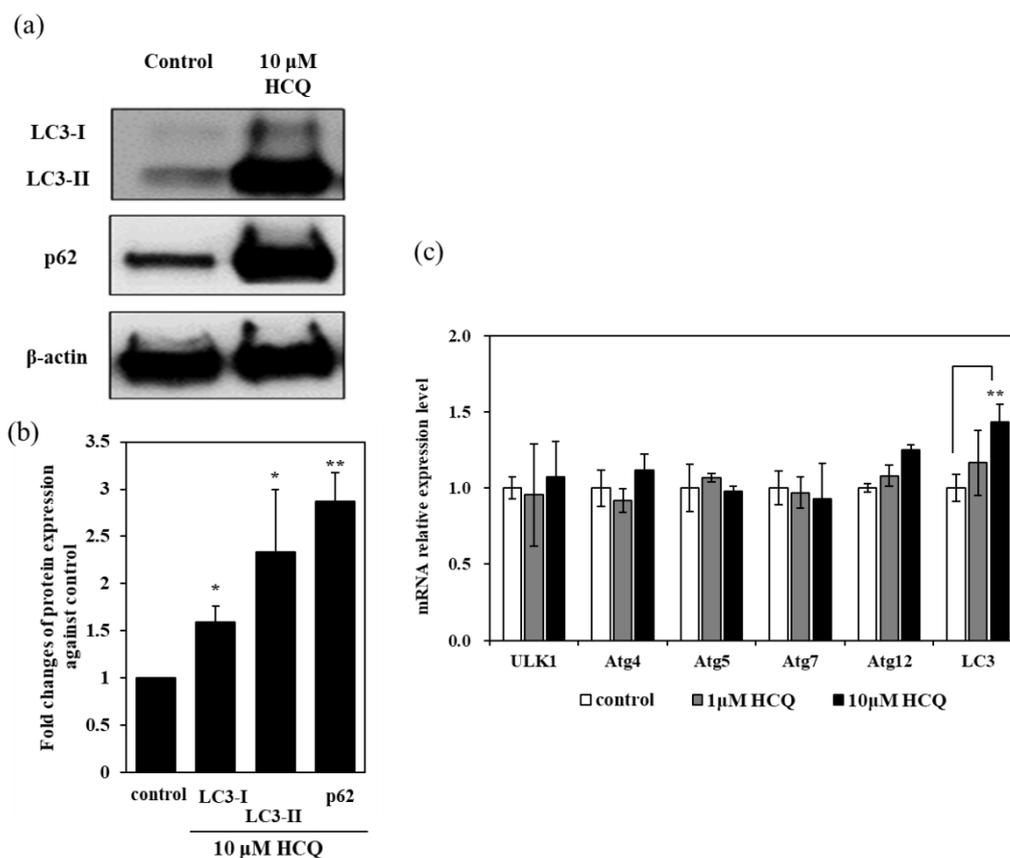
#### 1-3-4. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞におけるオートファジー関連タンパク質と mRNA 発現レベルの変化

オートファジーのプロセスでは機能不全となった細胞小器官などがオートファゴソーム内に取り込まれるとき、LC3-Iから変換された LC3-IIによって隔離膜形成が開始される。さらに、p62 は LC3-IIとの相互作用を通じてオートファゴソームの形成に関与し、基質としてオートファジーによって選択的に分解される。したがって、LC3-IIと p62 を測定することは細胞内のオートファジー活性を評価する基準の一つとなると考えられている。

複数回 UVA 照射した線維芽細胞の LC3-IIと p62 タンパクレベルは、UVA 照射を行っていない線維芽細胞と比較して有意に高いことが示された (Fig. 1-6a, b)。複数回 UVA 照射した線維芽細胞のオートファジープロセスを調べるために Atg 関連遺伝子発現をリアルタイム PCR 法を使用して調べたところ、複数回 UVA 照射した線維芽細胞では LC3 の遺伝子発現が亢進していることが確認された (Fig. 1-6c)。さらに、オートファジー阻害剤である HCQ を処理した線維芽細胞においても、LC3-II、p62 タンパク質レベルは増加し、LC3 mRNA レベルも有意に高い値が示された (Fig. 1-7)。



**Fig. 1-6 Influence of repetitive UVA irradiation of NHDFs on protein and mRNA expression levels of autophagy-related proteins.** NHDFs were repetitively irradiated with or without UVA. (a) Representative images of LC3-I, LC3-II, p62 and  $\beta$ -actin proteins assessed by western blotting. (b) Digitalized values of LC3-I, LC3-II and p62 protein bands from western blotting with the ChemiDoc system. Data are expressed as fold changes normalized with the value of non-irradiated control NHDFs corrected by the value of  $\beta$ -actin ( $n = 3$ ). (c) mRNA expression levels of Atg proteins quantified by real-time PCR. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of 3 independent examinations. Significance: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

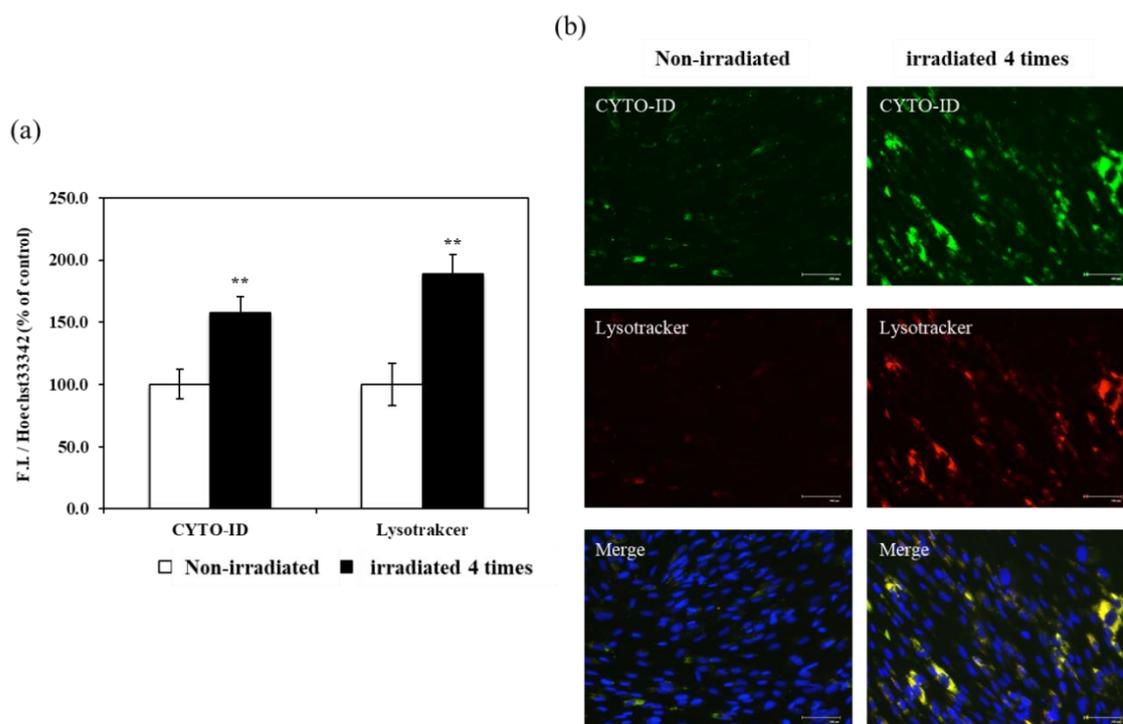


**Fig. 1-7 Influence of HCQ on protein and mRNA expression levels of autophagy-related proteins in NHDFs.** NHDFs were treated with or without 1 μM or 10 μM HCQ for 24 h. (a) Representative images of LC3-I, LC3-II, p62 and β-actin proteins assessed by western blotting. (b) Digitalized values of LC3-I, LC3-II and p62 protein bands from western blotting with the ChemiDoc system. Data are expressed as fold changes normalized with the value of non-irradiated control NHDFs corrected by the value of β-actin (n = 3). (c) mRNA expression levels of Atg proteins were quantified by real-time PCR. The data are expressed as the mean ± standard deviation of 3 independent examinations. Significance: \*\*p<0.01.

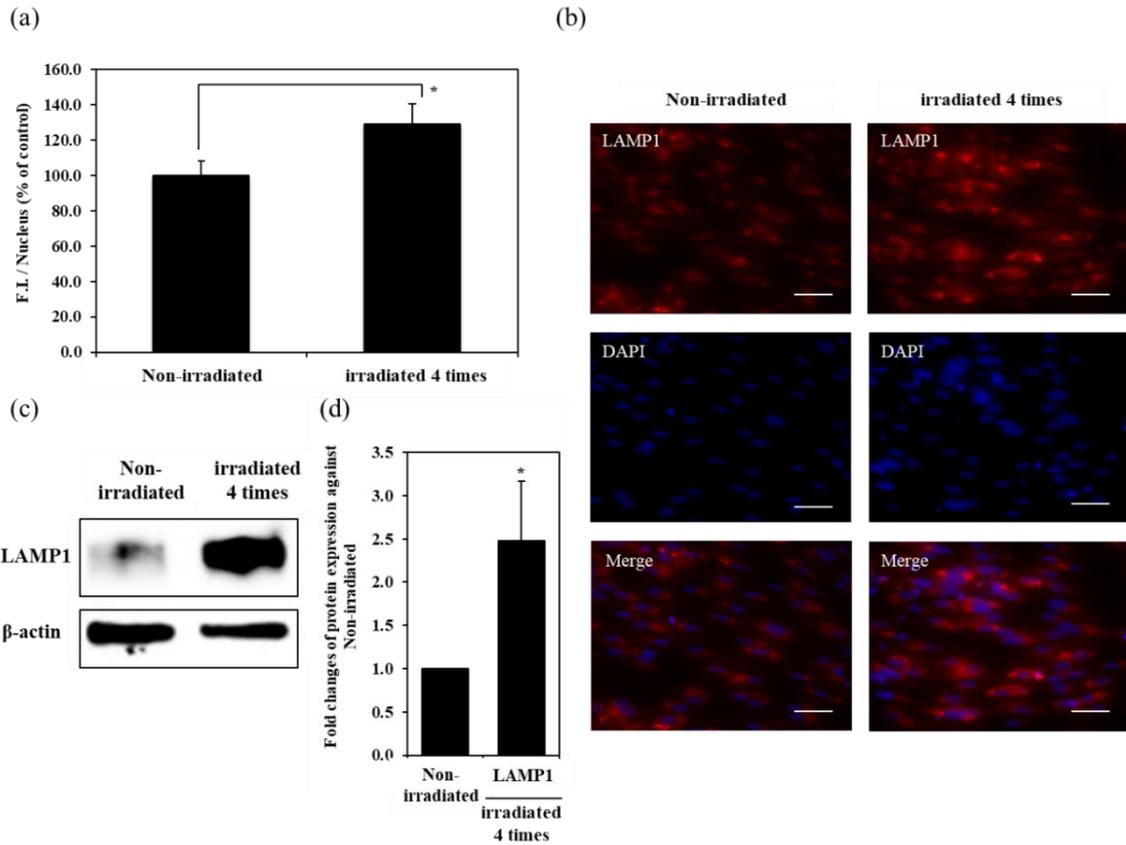
### 1-3-5. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞のオートファジー機能

複数回 UVA 照射した線維芽細胞のオートファジーの状態を調べるため、CYTOID®GreenDetection Reagent を使用してオートファゴソームの検出を行った。また、細胞内リソソームを、LysoTracker™RedDND-99 および LAMP1 タンパク質を指標として検出した。複数回 UVA 照射した線維芽細胞の CYTO-ID、Lyso Tracker の蛍光値は UVA 未照射の線維芽細胞と比較して有意に高い値が示された (Fig. 1-8a, b)。また、CYTO-ID、Lyso Tracker の染色画像は 2 つの局在が一致していることが確認された (Fig. 1-8b)。リソソームの特異的マーカータンパクである LAMP1 を検出したところ、複数回 UVA 照射した線維芽細胞では

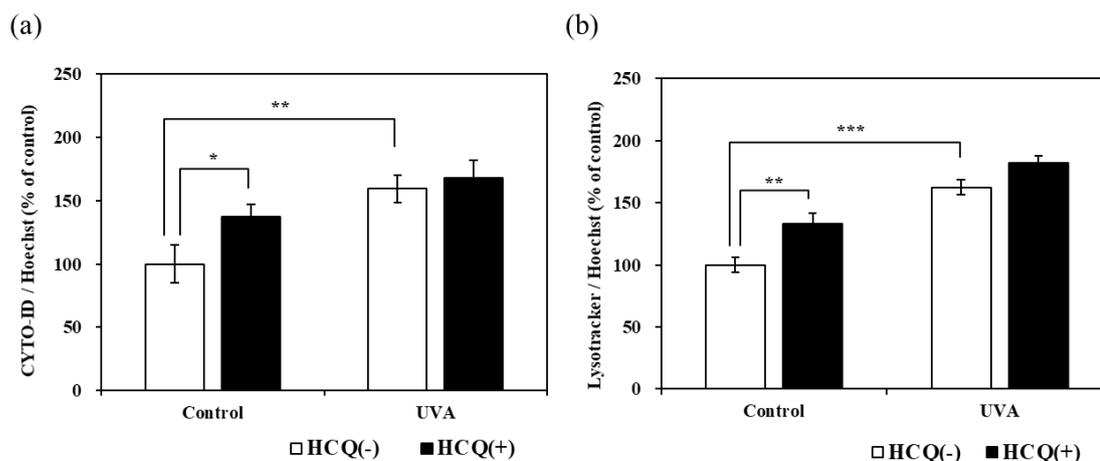
LAMP1 の増加が認められた (Fig. 1-9)。これらの結果から、複数回 UVA 照射した線維芽細胞ではオートファゴソーム、リソソームの数が増加していることが示された。さらに、HCQ 処理を行った線維芽細胞でも同様にオートファゴソームおよびリソソームの数が大きく増加していることが確認された。



**Fig. 1-8 Influence of repetitive UVA irradiation of NHDFs on autophagosomes and lysosomes.** NHDFs irradiated with or without UVA were loaded with CYTO-ID® or LysoTracker™ Red DND-99 to detect autophagosomes or lysosomes, respectively. Nuclei were stained with Hoechst 33342. (a) Fluorescence intensities in NHDFs were measured using an Enspire™ 2300 microplate reader. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of 3 independent examinations. Significance: \*\* $p < 0.01$ ; (b) Representative images of autophagosomes and lysosomes. Green: CYTO-ID (autophagosomes), Red: LysoTracker (Lysosomes), Blue: nuclei. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .



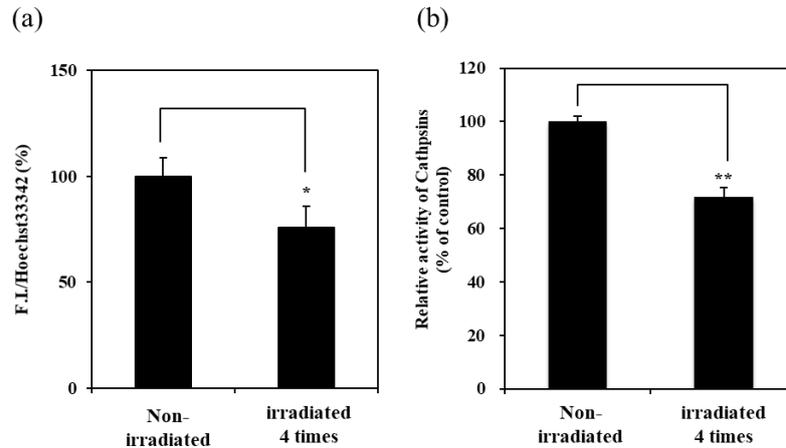
**Fig. 1-9 Influence of repetitive UVA irradiation of NHDFs on LAMP1 expression.** NHDFs were irradiated with or without UVA and were then incubated with a primary antibody specific for LAMP1, followed by incubation with goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 594 at room temperature for 1 h. Nuclei were stained with DAPI. (a) Fluorescence intensities in NHDFs were measured using an Enspire<sup>TM</sup> 2300 microplate reader. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of 3 independent examinations. Significance: \* $p < 0.05$ ; (b) Fluorescence images were observed using a BZ-X810 fluorescence microscope. Red: LAMP1, Blue: nuclei. Scale bars: 50  $\mu$ m. (c) Representative images of LAMP1 and  $\beta$ -actin proteins assessed by western blotting. (d) Digitalized values of LAMP1 protein bands from western blotting with the ChemiDoc system. Data are expressed as fold changes normalized with the value of non-irradiated control NHDFs corrected by the value of  $\beta$ -actin (n = 3).



**Fig. 1-10 Influence of HCQ on autophagosomes and lysosomes in NHDFs.** NHDFs were irradiated with or without repetitive UVA and then were treated with or without 10  $\mu$ M HCQ for 24 h after which they were loaded with CYTO-ID® (a) or LysoTracker™ Red DND-99 (b) to detect autophagosomes or lysosomes, respectively. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Fluorescence intensities in NHDFs were measured using an Enspire™ 2300 microplate reader. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of 3 independent examinations. Significance: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

### 1-3-6. 複数回 UVA 照射した線維芽細胞のリソソーム機能

複数回 UVA 照射した線維芽細胞のリソソーム活性を確認するために、細胞内リソソーム活性アッセイキット (Lysosomal Intracellular Activity Assay Ki) を用いて測定を行った。さらに、リソソーム内のプロテインキナーゼであるカテプシン B および L のタンパク質分解活性の測定を行った。複数回 UVA 照射した線維芽細胞の細胞内リソソーム活性は UVA 未照射の線維芽細胞と比較して低いことが確認された (Fig. 1-11a)。さらに、複数回 UVA 照射した線維芽細胞のカテプシン活性も UVA 未照射の線維芽細胞と比較して有意な減少を示した (Fig. 1-11b)。



**Fig. 1-11 Lysosomal function in NHDFs.** NHDFs were irradiated with or without repetitive UVA and then were loaded with Lysosomal Intracellular Activity Assay K reagent. Nuclei were stained with Hoechst 33342. (a) To determine the activity of cathepsins, NHDFs were treated with 0.1 mM Z-Phe-Arg-MCA, which is a synthetic fluorescent substrate, for 30 min. The activity of cathepsins in NHDFs irradiated with repetitive UVA is expressed as the relative activity against that of non-irradiated control NHDFs by measuring the fluorescence intensity. (b) Fluorescence intensities in NHDFs were measured using an Enspire™ 2300 microplate reader. The data are expressed as the mean ± standard deviation of 3 independent examinations. Significance: \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 1-4. 考察

実験的に光老化モデル線維芽細胞を作成することを目的として、UVA 複数回照射による細胞形質の変化を評価した。UVA を 3 J/cm<sup>2</sup>の照射強度にて 1 日 1 回、4 日間連続照射した線維芽細胞では、細胞老化マーカーである SA-β-ガラクトシターゼの発現細胞率の増加が確認され (Fig. 1-2)、細胞老化が誘導されていると考えられた。さらに複数回 UVA 照射線維芽細胞では、細胞内 ROS レベル (Fig. 1-3)、カルボニルタンパクレベル (Fig. 1-4) の増加が認められた。ROS の上昇やカルボニルタンパクレベルの増加は、特に高齢者の露光部で増加していることが報告されていることから今回の結果と一致が確認された<sup>48)</sup>。

複数回 UVA 照射線維芽細胞では、コラーゲン、および弾性線維形成に関与する遺伝子発現が有意に低下し、これら線維の分解に関与する遺伝子の発現は増加していることが確認された (Fig. 1-5)。さらに、コラーゲン合成のフィードバックタンパクである CCN1/CYR61 の発現増加、コラーゲン受容体である Endo180/MRC2 の遺伝子発現低下が認められ、これらの形質は光老化皮膚で認められる状態と一致を示した。これらの結果は、コラーゲン合成の低下をさらに増強する環境を形成していると考えられる。

また、老化皮膚ではエラスチン線維形成に関与する遺伝子の LTBP2 や LTBP4、FBLN4 の遺伝子発現が低下することが報告されているが<sup>49)</sup>、これらの遺伝子についても複数回 UVA 照射線維芽細胞では発現の低下が確認された。これらの遺伝子発現の変化は単回照射より複

数回照射を行った線維芽細胞にて顕著に確認された (Fig. 1-5)。

また、オートファジーの観点から光老化モデル線維芽細胞としての特性評価を行ったところ、複数回 UVA 照射した線維芽細胞では、LC3-IIおよび p62 タンパク質の蓄積が確認され、オートファジー機能の低下が認められた (Fig. 1-6)。一方で、複数回 UVA 照射した線維芽細胞ではリソソーム数と LAMP1 タンパク質発現の増加が確認され、オートリソソームの形成も観察された (Fig.1-9)。一般的にオートファジーシステムは複数の Atg タンパク質により制御されている。Atg1/ULK1 は、ULK1-Atg13 複合体を形成することで下流の Atg 因子を呼び寄せる足場となりオートファゴソーム形成が進行する<sup>45, 46)</sup>。LC3/Atg8 および Atg7 は PE 結合後、Atg5-Atg12 複合体と結合しオートファゴソーム形成に関与する<sup>44, 45, 46)</sup>。今回の結果では、複数回 UVA 照射した線維芽細胞において LC3 のみの遺伝子発現が亢進し、そのほかの遺伝子発現は変化しなかった (Fig. 1-6c)。これは、複数回 UVA 照射した線維芽細胞ではオートファジーの初期段階であるオートファゴソーム形成を促し、リソソームの増加を誘導したと示唆される。そこで複数回 UVA 照射した線維芽細胞のオートファジー機能の低下が、リソソームの機能不全による可能性を明らかにするために、リソソーム内 pH の上昇を誘導することでオートファジーを阻害する HCQ を用いて確認を行った。HCQ を処理した線維芽細胞では、オートファゴソームおよびリソソームの増加、LC3-II、p62 タンパク質発現、Atg 関連遺伝子発現について複数回 UVA 照射した線維芽細胞と同様の挙動が確認された (Fig. 1-7)。実際に HCQ 処理細胞はオートファジーの機能不全に関与する LC3-I、II および p62 を増加させることが報告されており<sup>50)</sup>、今回の結果と一致する。最後に、複数回 UVA 照射した線維芽細胞におけるリソソーム活性およびカテプシン活性を測定したところ有意な活性低下が認められた (Fig. 1-11)。実際に高齢者由来の露光部皮膚と若年者由来の露光部皮膚を観察すると高齢者露光部由来皮膚においてオートファゴソーム数の増加が報告されており<sup>51)</sup>、今回の培養細胞系で得られた結果と類似する。この事実を総合的に考えると、複数回 UVA 照射した線維芽細胞は細胞内に生じる不要タンパクを効率的に分解することができず、細胞内で garbage-stress が生じることにより真皮線維再生機能低下に陥る可能性が示唆された。

## 1-5. 結論

以上の結果をまとめると、複数回 UVA 照射線維芽細胞では老化形質マーカーである SA- $\beta$ -ガラクトシターゼは発現増加を示し、コラーゲン、および弾性線維の形成能の低下を示した。さらに、UVA を連続照射した線維芽細胞はリソソーム機能不全に由来するオートファジー機能の低下が確認された。これらの結果は、すでに報告されている皮膚老化の形質と一致することから、複数回 UVA 照射した線維芽細胞は光老化真皮に存在する線維芽細胞の老化形質にシフトしたものと考えられた。よって、複数回 UVA 照射線維芽細胞は光老化皮膚に存在する線維芽細胞の形質を発現する線維芽細胞であると結論付けられた。

## 第2章 光老化を誘導した線維芽細胞の真皮マトリックス形成能低下に対する トラネキサム酸の効果

### 2-1. 緒言

皮膚老化は加齢による自然老化と慢性的な太陽光曝露による光老化に大別される。太陽光線の中でも紫外線は酸化ストレスとなる ROS の強力なイニシエーターであり、光老化皮膚の進行を加速する主たる原因であると考えられている。基礎化粧品は主にターゲットである顔面皮膚は特に日光曝露の影響を強く受けるため、アンチエイジング化粧品には光老化の進行を遅延させること、もしくは光老化皮膚に特徴的なシワ、タルミのような外観的変化の改善効果が期待される。

深いシワは光老化皮膚に特徴的な外観的変化の1つである。浅いシワは皮膚保湿機能の低下による乾燥に起因する表皮性のシワであるが、深いシワは真皮マトリックスの変性に起因するものと考えられている。つまり、その形成は真皮細胞外マトリックスであるコラーゲン線維や弾性線維の量的減少、およびその構造変化に由来するところが大きいと考えられる。組織学的観察からは、光老化皮膚の真皮上層ではコラーゲン線維の減少、コラーゲン線維束構造の脆弱化<sup>36, 37)</sup>、およびトロポエラスチンの沈着が少ない弾性線維であるオキシタラン線維の細線維構造の消失が見られ、真皮中層部では最もトロポエラスチンが沈着している弾性線維であるエラスチン線維の無配向化が増加すると報告されている。真皮線維芽細胞は、真皮マトリックスを産生する細胞であるため、その機能低下は皮膚老化の進行に繋がる。事実、若年者皮膚と高齢者皮膚から単離培養した線維芽細胞のコラーゲン合成能には差があり、老年者由来の線維芽細胞ではコラーゲン合成能が低下していることが報告されている<sup>52)</sup>。さらに、紫外線曝露皮膚では、コラーゲン分解に関与する MMP-1 の発現が高く、加えて新たなコラーゲン産生が低下していることが報告されており<sup>53, 54)</sup>、紫外線曝露皮膚で過剰に生成される ROS は c-Jun N-terminal kinase (JNK) と nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) のシグナル伝達により調節される Activated protein-1 (AP-1) の合成亢進を引き起こし MMP-1 および CCN1/CYR61 の転写活性を亢進し、コラーゲンの分解を促進し合成を抑制することが明らかにされている<sup>55, 56, 57)</sup>。

一方、プラスミン活性阻害剤としてよく知られたトラネキサム酸 (TA) は PGE<sub>2</sub> 合成の抑制<sup>58)</sup>による抗炎症作用があることから、医薬部外品としては UVB 誘発性の色素沈着に対する美白主剤として<sup>59)</sup>、また、皮膚科では肝斑に対する有効な内服薬として汎用されている<sup>60)</sup>。

近年の研究では、PGE<sub>2</sub> がコラーゲン合成と弾性線維関連タンパク質の発現を抑制することが明らかにされており、過剰に合成される PGE<sub>2</sub> が光老化の進行に寄与する可能性が示されている<sup>61)</sup>。実際、老化した皮膚では PGE<sub>2</sub> 合成量の増加が報告されていることから<sup>62, 63)</sup>、TA に光老化皮膚の予防または改善作用が期待される。しかしながら、TA が光老化皮膚の予防または改善に有効であるかどうかについての報告は少ない。

## 目的

第2章では光老化皮膚で過剰合成される PGE<sub>2</sub>に焦点を当てて、光老化モデル線維芽細胞の線維形成能に対する TA のアンチエイジング効果を明らかにすることを目的として行った。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 試薬

試薬は下記のものを使用した。

トラネキサム酸 (TA) (日本精化, 大阪), 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal) (Nacalai tesque, Kyoto), Anti-collagen Type I (Rockland Immunochemicals, Pottstown, PA, USA), Streptavidin-HRP, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Fibrillin 1 Monoclonal Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody, Alexa fluor 488, goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor 546 (Abcam, Cambridge, UK), 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate; H2DCFDA (Merck, Darmstadt, Germany).

### 2-2-2. 細胞培養実験方法

正常ヒト真皮線維芽細胞 (KURABO) (NHDF : p=3~8) は5%の FBS を含む DMEM を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で培養した。継代培養は0.25%トリプシンおよび0.02% EDTA を含有する PBS-を用いて細胞を剥離した。

### 2-2-3. 光老化モデル線維芽細胞の作成および TA 処理

NHDF を 96 well plate に  $2.0 \times 10^4$  cells/well の密度で播種し24時間培養した。HBSS にて1回洗浄後、フェノールレッド無含有 (5% FBS 含む) DMEM に交換した。3 J/cm<sup>2</sup>の照射強度で UVA を NHDF へ照射した。UVA ランプは BLB ランプ東芝製を用いた。1日1回、連続4日間繰り返し UVA 照射を行い、線維芽細胞の光老化誘導を行った。4回目の照射後、TA を最終濃度 500  $\mu$ M になるよう DMEM にて調製した培地と交換し培養した。

### 2-2-4. SA $\beta$ -ガラクトシターゼ染色

NHDF を PBS-で洗浄後、4%ホルムアルデヒド溶液を添加し15分間静置して細胞を固定した。PBS-にて洗浄後、1 mg/mL の X-Gal を添加し37°Cで24時間インキュベートした。PBS-にて洗浄を行い、光学顕微鏡で画像を撮影した。

### 2-2-5. 細胞老化アッセイ

NHDF を PBS-で洗浄後、トリプシンで細胞剥離、細胞数をカウントした。遠心分離にて細胞ペレットを作成し、96-well Cellular Senescence Assay (SA- $\beta$ -Gal Activity) (Cell Biolabs, Inc, USA) のプロトコルに従い細胞を溶解し SA- $\beta$ -Gal Assay buffer を添加し37度で1時

間インキュベートした。プレートリーダーにて蛍光強度 (Ex; 360nm, Em; 460 nm) を測定した。測定した蛍光強度を細胞数で補正し、SA- $\beta$ -Gal 陽性細胞率を算出した。

### 2-2-6. 細胞内 ROS の測定

NHDF を HBSS で洗浄し、HBSS にて 20  $\mu$ M に調製した H<sub>2</sub>DCFDA を各 well に添加した。37°C, 5 %CO<sub>2</sub>濃度の環境下で 30 分間インキュベートした。その後、プレートリーダーにて蛍光強度 (Ex; 485 nm/Em; 530 nm) を測定した。0.5 %TritonX-100 にて細胞を溶解して、細胞内タンパク量を BCA Protein Assay Kit により測定した。測定した蛍光強度とタンパク量から、タンパク量あたりの細胞内 ROS レベルを算出した。

### 2-2-7. リアルタイム PCR 法

#### RNA 抽出

NHDF を PBS-にて洗浄し、RNeasy Mini kit (Qiagen)を使用して total RNA を抽出した。RNeasy Mini kit 付属のプロトコルを参照。

#### 逆転写反応

Total RNA と ReverTraAce qPCR RT Master Mix ( $\times$ 5) (TOYOBO)、Nuclease-Free Water (TOYOBO)を 2: 2: 6 で混合させ、Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystem)を使用して 37°Cで 30 分、50°Cで 5 分、98°Cで 5 分の条件で逆転写反応を行い、cDNA を調製した。

#### RT-PCR

Nuclease-Free water にて希釈した cDNA を 4.8  $\mu$ L、Power Up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 5  $\mu$ L、各プライマーの forward および reverse を 0.1  $\mu$ L ずつ、合計 10  $\mu$ L になるよう Nuclease-Free water にて調整しウェルに添加した。Gene Amp StepOne RT-PCR system (Applied Biosystems) を用いて、Holding Step 50°C, 1 min、95°C, 15 sec、Cycling Step 95°C, 3 sec、60°C, 30 sec を 40 サイクル、Melt curve Step 95°C, 15 sec、60°C, 1 min、95°C 15 sec の条件で反応させた。mRNA の発現を、 $\Delta \Delta$ Ct 法を用いて算出した。

Table. 1 Primer sequence

Gene	Forward	Reverse
<i>PTGS2</i>	AGCCTGAATGTGCCATAAGACTGA	AAACCCACAGTGCTTGACACAGA
<i>COL1A</i>	GCTTGGTCCACTTGCTTGAAGA	GAGCATTGCCTTTGATTGCTG
<i>MMP1</i>	AAGGTGGACCAACAATTCAGA	TGAAGGTGTAGCTAGGGTACATCAA
<i>FBN1</i>	CTTCCACCTAACAGGCCATTAACA	CTATCACATGGTTCATAGGTGCAG
<i>GAPDH</i>	GGGAAATCGTGCGTGACAT-3	CAGGAGGAGCAATGATCTC

### 2-2-8. PGE<sub>2</sub>定量

2-2-3.の手順で作成した光老化モデル線維芽細胞の培養上清を回収し Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA Monoclonal Antibody (CAYMAN CHEMICAL COMPANY) を用いて、培養上清中の PGE<sub>2</sub> 量を測定した。BCA Protein Assay Kit を使用してタンパク量を定量し、タンパク量あたりの PGE<sub>2</sub> 量を算出した。

### 2-2-9. I 型プロコラーゲン定量

2-2-3.の手順で作成した光老化モデル線維芽細胞の培養上清を回収し、96 well ELISA Assay plate (住友ベークライト) に各サンプルおよび検量線用 I 型コラーゲンをコーティングし 2 時間インキュベートした。1% BSA で 1 時間ブロッキングした後、2 µg/mL rabbit anti-collagen Type I antibody を各ウェルに添加し 4°Cで一晩インキュベートした。0.05 % PBS-T で洗浄後、40 ng/mL HISTOFINE シンプルステイン MAX-PO (R) (ニチレイ株式会社) を添加し室温で 1 時間インキュベートした。0.05 % PBS-T で洗浄後、0.3 mg/mL の濃度で 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt を含む 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.0) と少量の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加し室温にて反応させた。反応液の 405 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。作成した検量線から I 型プロコラーゲン量を算出した。BCA Protein Assay Kit を使用してタンパク量を定量し、タンパク量あたりの I 型プロコラーゲン量を算出した。

### 2-2-10. 免疫染色

2-2-3.の手順で作成した光老化モデル線維芽細胞を 1 週間または 2 週間培養した。PBS-で 1 回洗浄し、4%ホルムアルデヒド溶液 100 µL を各 well に添加し、15 分間静置して細胞を固定した。PBS-で洗浄後、1% BSA (Sigma-Aldrich) 含有 PBS-を添加して室温で 1 時間静置し、ブロッキング処理を行った。0.05 % PBS-T で洗浄し、rabbit anti-collagen type I polyclonal antibody (1:500) または mouse anti-fibrillin1 antibody (1: 250) を添加して 4°Cでオーバーナイトした。0.05 % PBS-T 洗浄を行い、goat anti-rabbit IgG secondary antibody または goat anti-mouse IgG secondary antibody を添加して室温、斜光下で 2 時間インキュベートした。DAPI で細胞核を染色し、蛍光顕微鏡にて画像を取得した。画像解析ソフト (BZ-H4M/計測アプリケーション、株式会社キーエンス) を用いて、100 µm<sup>2</sup>以上の線維状構造をコラーゲン、フィブリリン 1 線維と定義し線維形成の評価を行った。

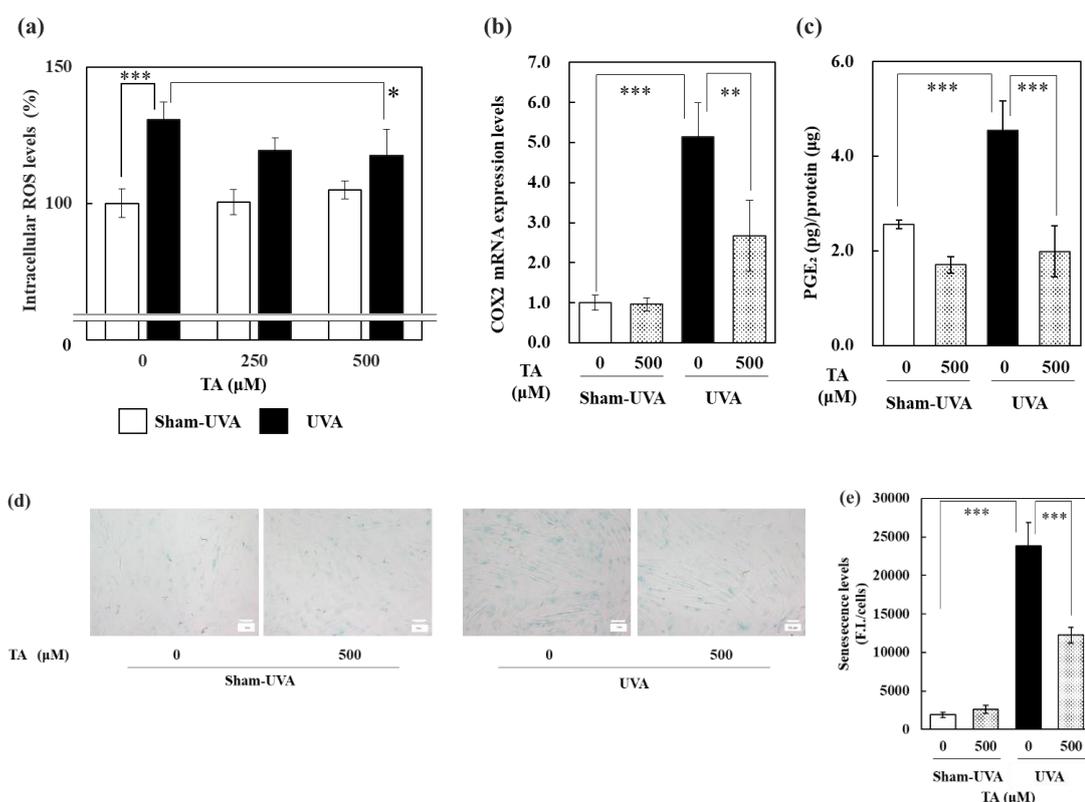
## 2-3. 結果

### 2-3-1. 老化マーカーの発現および細胞内 ROS レベルへの効果

光老化は、主に太陽光線曝露時に皮膚内で発生する ROS による酸化ストレスが原因とされる。そこで、細胞内 ROS 発生に対する TA の効果を検討した。結果、500  $\mu$ M の TA は光老化モデル線維芽細胞の ROS レベルを抑制することが確認された (Fig. 2-1a)。さらに、光老化モデル線維芽細胞で亢進する SA- $\beta$ -ガラクトシターゼ陽性細胞数は TA を共存培養することで低下することが観察された (Fig. 2-1d, e)。

### 2-3-2. 光老化モデル線維芽細胞の PGE<sub>2</sub> 産生に対する TA の抑制作用

TA はケラチノサイトのプラスミン活性を阻害することで PGE<sub>2</sub> の産生を抑制することが知られている<sup>64,65</sup>)。光老化モデル線維芽細胞では、UVA 未照射細胞と比較して COX-2 の遺伝子発現および PGE<sub>2</sub> 産生量の顕著な増加が認められた (Fig. 2-1b, c)。一方で、TA を共存培養した光老化モデル線維芽細胞では亢進した COX-2 遺伝子発現、PGE<sub>2</sub> 産生量の有意な抑制が確認された (Fig. 2-1b, c)。

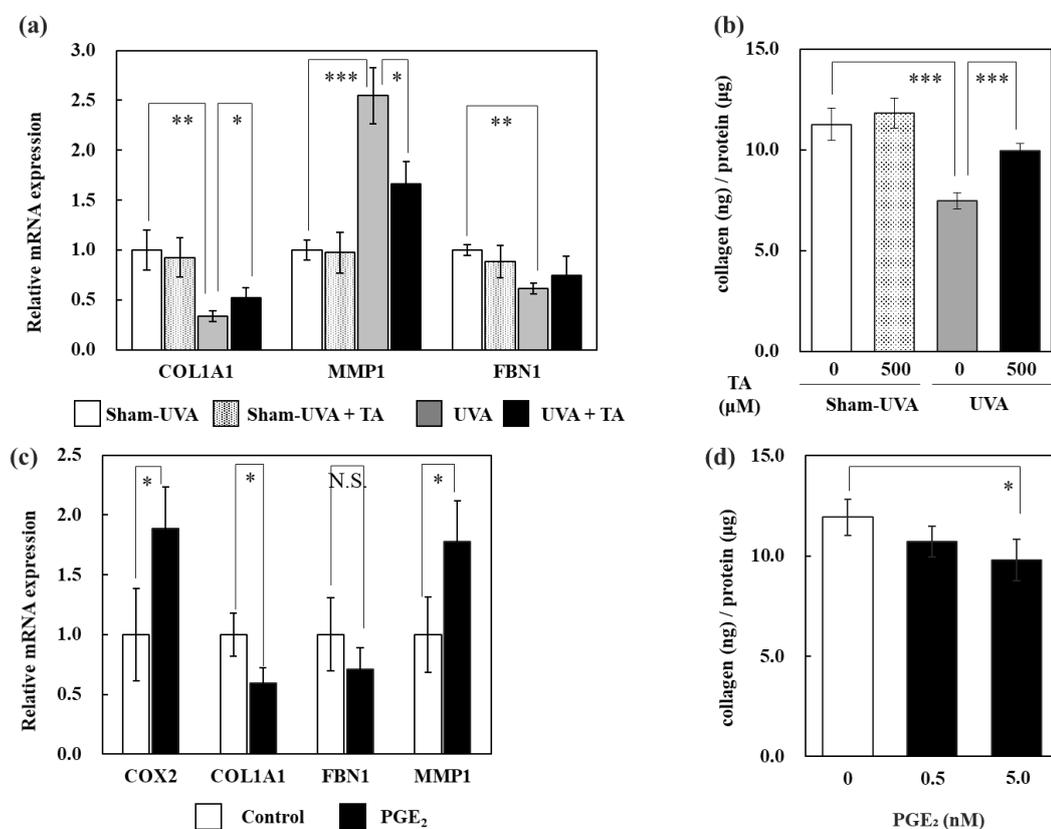


**Fig. 2-1 Intracellular ROS, secretion of PGE<sub>2</sub> and SA-β-gal activity in repetitively UVA-irradiated NHDFs.** Repetitively UVA-irradiated NHDFs were treated with or without TA (250 or 500 μM) for 24 h. (a) After loading with H2DCFDA for 30 min, the cells were rinsed and solubilized. The fluorescence intensity (F.I.) of each lysate was measured (Ex, 485 nm; Em, 530 nm). (b) Total RNA was extracted from NHDFs and cDNAs were synthesized. The mRNA expression level of COX2 was measured by real-time PCR. (c) PGE<sub>2</sub> level in the conditioned media was quantified by ELISA. (d) Repetitively UVA-irradiated NHDFs were treated with or without TA (500 μM) for 72 h, then were treated with 1 mg/mL X-gal, after which X-gal staining was observed using a microscope. Bar scale: 50 μm. Data are expressed as means ± S.D. from five independent experiments. Significance: \*\*\*p < 0.001.

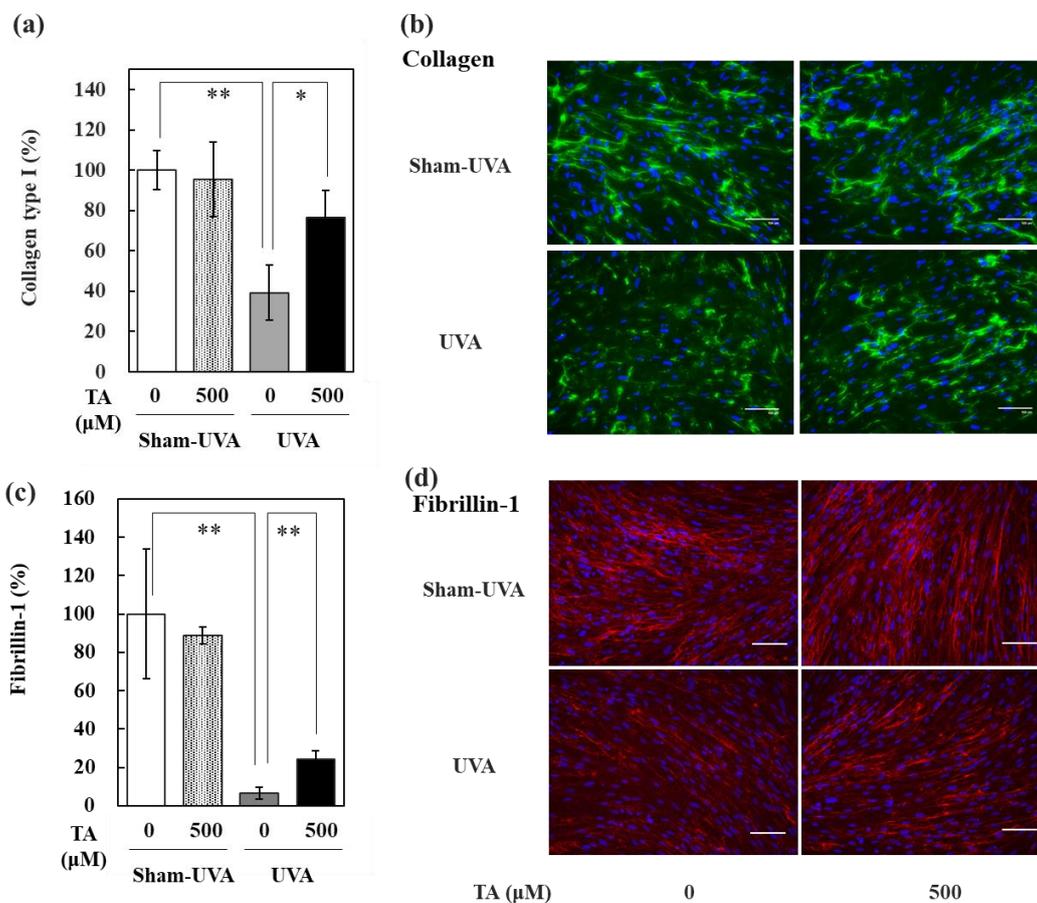
### 2-3-3. 光老化モデル線維芽細胞のコラーゲンおよび弾性線維形成に対する効果

光老化モデル線維芽細胞のコラーゲン、弾性線維形成能を免疫染色法にて確認したところ UVA 未照射細胞と比較して線維構造の形成が低下することが観察された (Fig. 2-3)。また、培養上清中の I 型プロコラーゲン量も有意に低下していることが認められた (Fig. 2-2b)。さらに光老化モデル線維芽細胞の線維形成関連遺伝子の発現を確認したところ、COL1、FBN1 の有意な発現低下と MMP1 の発現増加が確認された (Fig. 2-2a)。TA を共存培養した光老化モデル線維芽細胞では I 型プロコラーゲン量の低下が抑制され、コラーゲンおよび弾性線維形成能の改善が観察された。さらに、TA は COL1 遺伝子発現の低下と MMP1 遺伝

子発現の増加を回復させることが確認された (Fig. 2-2)。



**Fig. 2-2 Collagen and elastic-fiber related gene expression levels in repetitively UVA-irradiated or PGE<sub>2</sub>-treated NHDFs.** (a) Repetitively UVA-irradiated NHDFs were cultured with or without TA (500 µM) for 24 h, after which total RNA was extracted and cDNAs were synthesized. The mRNA expression level of COL1A1, FBN1 and MMP1 were measured using real-time PCR. (b) Level of type 1 collagen in the conditioned medium measured by ELISA. (c) NHDFs were treated with PGE<sub>2</sub> (5 nM) for 24 h, after which total RNA was extracted from the cells and cDNAs were synthesized. mRNA expression levels of COX2, COL1A1, FBN1 and MMP1 were measured using real-time PCR. (d) Level of type 1 collagen in the conditioned medium was measured using an ELISA.

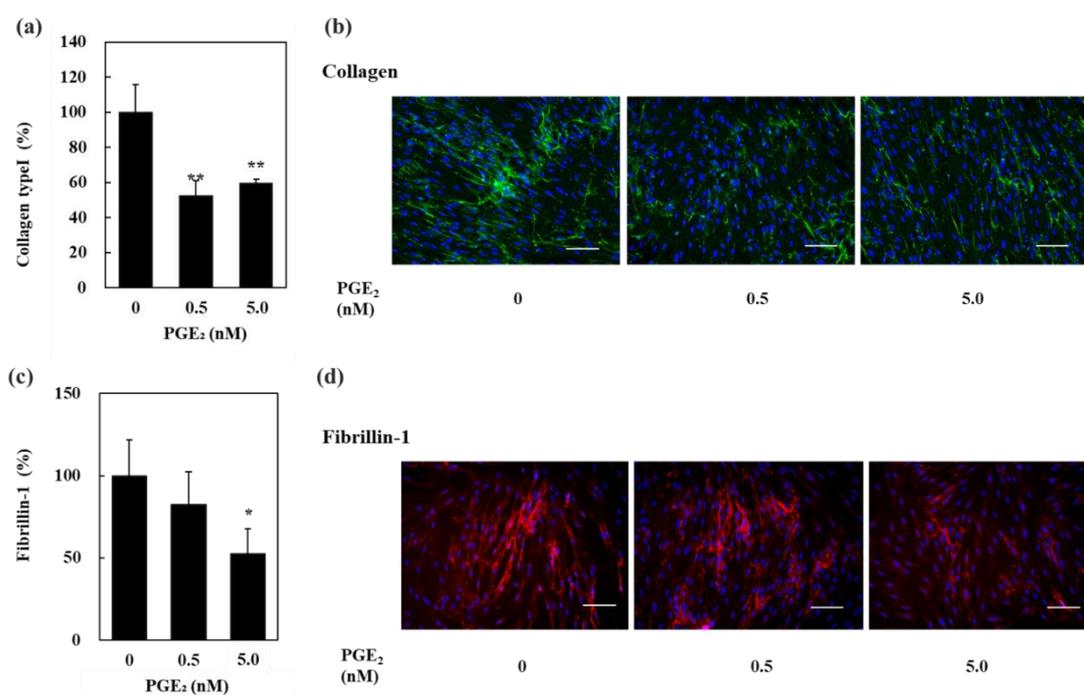


**Fig. 2-3 Formation of collagen and elastic fibers in repetitively UVA-irradiated NHDFs treated with TA.** (a, b) Repetitively UVA-irradiated NHDFs were cultured with or without TA (500 μM) for 2 weeks. Representative images of Type I collagen fiber formation. green: Type I collagen, blue: nuclei, scale bars; 100 μm. (c, d) Repetitively UVA-irradiated NHDFs were cultured with or without TA (500 nM) for 1 week. Representative images of fibrillin-1 fiber formation. red: fibrillin-1, blue: nuclei, scale bars; 100 μm. Bars indicate means ± S.D. (n = 4). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 indicate a significant difference compared with the control.

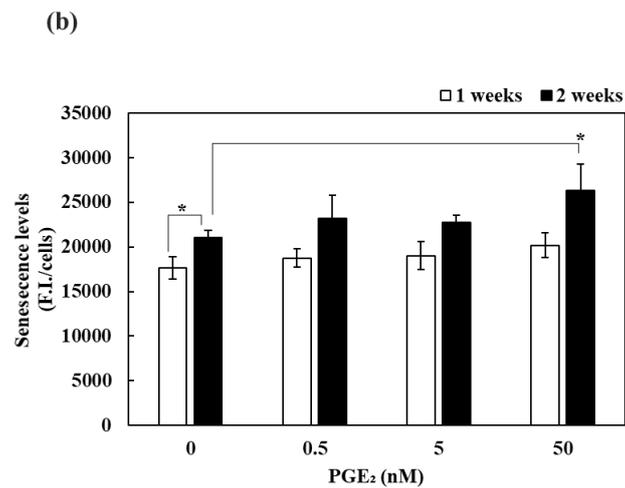
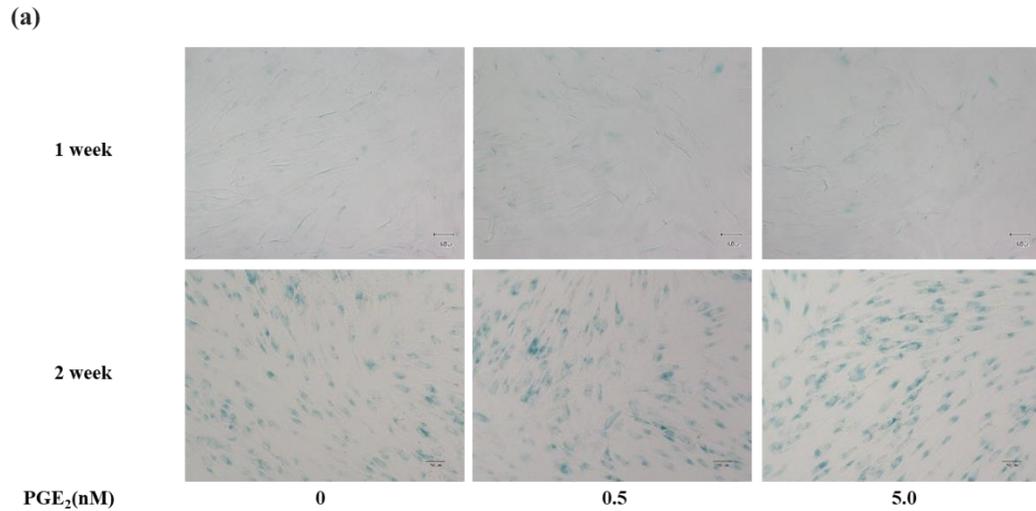
#### 2-3-4. PGE<sub>2</sub>によるコラーゲンおよび弾性線維形成の低下と SA-β-ガラクトシターゼの発現変化

PGE<sub>2</sub>は酸化ストレス負荷時に誘導される COX-2 が合成に関与する炎症メディエーターであり、メラニン生成を促進することが知られている。加えて、PGE<sub>2</sub>は線維芽細胞のコラーゲン産生<sup>61)</sup>や弾性線維関連因子である LOX の発現を抑制する可能性が報告されている<sup>66)</sup>。これは、PGE<sub>2</sub>が過剰なメラニン産生を引き起こすだけでなく、線維芽細胞の機能低下を介して、皮膚老化の誘導因子として働く可能性を示唆している。PGE<sub>2</sub>添加培養による線維芽細胞の真皮マトリックス形成に及ぼす影響を調べるために、以下の検討を実施した。コラーゲ

ン及び弾性線維関連因子の遺伝子発現の変化を確認したところ、PGE<sub>2</sub>添加により COL1 の発現低下と MMP1 の増加および FBN1 の発現低下の傾向が認められた (Fig.2-2c, d)。また、I 型コラーゲン産生が抑制されることも示された。さらに COX-2 の遺伝子発現も増加が認められた (Fig. 2-2c)。真皮マトリックスの線維形成に対する PGE<sub>2</sub>の影響を免疫染色法によって確認したところ、1 週間または 2 週間の PGE<sub>2</sub>添加培養は、コラーゲン線維形成と弾性線維形成を有意に低下させることが示された (Fig.2-4)。さらに、2 週間の PGE<sub>2</sub>添加培養により SA-β-ガラクトシターゼの陽性細胞率が増加することも確認された (Fig. 2-5)。これらの結果は、PGE<sub>2</sub>が線維芽細胞の機能低下を誘発する因子の 1 つである可能性を示唆している。



**Fig. 2-4 Collagen production and Fibrillin-1 fiber formation by PGE<sub>2</sub>-treated NHDFs.** (a, b) NHDFs were treated with or without PGE<sub>2</sub> (0.5 or 5 nM) for 2 weeks. Representative images of Type I collagen (green). (c, d) NHDFs were treated with or without PGE<sub>2</sub> (0.5 or 5 nM) for 1 week. Representative images of fibrillin-1 fiber formation. green: Type I collagen, red: fibrillin1, blue: nuclei, scale bars; 100 μm. Bars indicate means ± S.D. (n = 4). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01



**Fig. 2-5 SA-β-gal activity in NHDFs treated with PGE<sub>2</sub>.** NHDFs were treated with 5 nM PGE<sub>2</sub> for 1 or 2 weeks, then were treated with 1 mg/mL X-gal, after which X-gal staining was observed using a microscope. Bar scale: 50 μm.

#### 2-4. 考察

本章では、第 1 章で作成した光老化モデル線維芽細胞の線維形成能の変化に対する効果を明らかにすることで TA のアンチエイジング効果を確認した。光老化モデル線維芽細胞では PGE<sub>2</sub> 産生量が有意に亢進していることが確認され、PGE<sub>2</sub> はコラーゲン線維および弾性線維の形成能を抑制することが確認された (Fig. 2-4)。さらに、2 週間の PGE<sub>2</sub> 添加培養では SA-β-ガラクトシターゼの陽性細胞率が増加することも認められた (Fig. 2-5)。さらに、PGE<sub>2</sub> は線維芽細胞の COX-2 発現を上昇させた。この結果は、PGE<sub>2</sub> がプロスタグランジン受容体の下流シグナルの活性化を通じて COX-2 発現を上昇させ、さらに PGE<sub>2</sub> の産生を増加させるポ

ジティブなフィードバックがかかるとする、Ansariy らによる報告と一致する<sup>67)</sup>。これらの結果から、PGE<sub>2</sub>の合成亢進は新たに過剰な PGE<sub>2</sub>の合成を促し、真皮マトリックスの線維形成をさらなる低下、細胞老化の形質発現を誘導する負のループの存在が示唆された。これらの事実を総合的に考察すると、過剰に合成される PGE<sub>2</sub>はコラーゲン線維および弾性線維の形成低下に寄与し光皮膚の進行に関与している可能性を強く示唆した。

一方、プラスミン阻害剤としてよく知られた TA は、光老化モデル線維芽細胞で亢進する PGE<sub>2</sub>の産生を有意に抑制したことからコラーゲン線維、弾性線維の減少および分解を抑制することによる真皮マトリックスの構造変化を改善し、アンチエイジング効果を発揮する可能性が期待された (Fig. 2-2, 2-3)。事実、TA は、光老化モデル線維芽細胞のコラーゲン関連遺伝子の変化を回復し、I 型プロコラーゲン量の低下を抑制した。また、TA は COX-2 発現を抑制することで、PGE<sub>2</sub>-COX-2 負のループを断ち切り線維芽細胞の機能を回復、改善させる可能性が考えられた。

加えて、TA は、光老化モデル線維芽細胞内 ROS を抑制することが確認された。TA はその構造上、抗酸化剤のような作用を発揮することは難しいと考えられる。そのため細胞内 ROS の抑制作用は、COX-2 活性が ROS の発生源となることが報告されているため<sup>68, 69)</sup>、COX-2 発現の抑制を介した作用であると考えられることができる。

## 2-5. 結論

本章の結果をまとめると以下のようなになる。既に美白主剤として良く知られ、汎用されてきた TA には、光老化モデル線維芽細胞の過剰な PGE<sub>2</sub>合成を抑制することにより真皮マトリックスの線維形成の低下を改善し、光老化皮膚の進行を抑制するアンチエイジング剤としての可能性が見いだされた。

## 第3章 光老化を誘導した線維芽細胞の色素細胞へ及ぼす影響とトラネキサム酸の効果

### 3-1. 緒言

高齢者由来の真皮線維芽細胞は若年者由来の真皮線維芽細胞と比較して、抗酸化関連タンパク質であるカタラーゼの活性が低く、常に高い酸化状態にさらされている<sup>70)</sup>。また色素斑は、太陽光への慢性的な曝露により引き起こされシワ、タルミとともに光老化皮膚に特徴的な外観変化である。色素斑形成のステップは、色素細胞の細胞増殖、色素細胞の活性化に伴うメラニン産生の増加、ケラチノサイトへのメラニンを含むメラノソーム輸送の亢進が関与している。この複雑なプロセスはケラチノサイトや色素細胞、線維芽細胞から分泌されるサイトカイン、ケモカインなどによりオートクライン的、パラクライン的に制御されている。

光老化皮膚の代表的な色素斑である老人性色素斑部位では、真皮線維芽細胞が老化の形質を示すことが報告されており<sup>71)</sup>、色素斑の出現、皮膚表面での滞留の原因の一つに真皮線維芽細胞が関与している可能性が示唆されている。

### 目的

本章では、UVA 連続照射にて作成した光老化モデル線維芽細胞を用いて、老化した線維芽細胞が色素細胞に与える作用を確認することにより老人性色素斑形成への線維芽細胞の影響を明らかにすることを目的とした。

さらに、第2章において光老化の進行抑制および改善効果を示したトラネキサム酸 (TA) の新たな色素斑形成抑制経路の発見を目的として、光老化モデル線維芽細胞と色素細胞との相互作用を介した経路に注目して評価を行った。

### 3-2. 実験

#### 3-2-1. 試薬

試薬は以下のものを使用した。

トラネキサム酸; TA (日本精化, 大阪), MTT: 3- (4,5-Dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyltetrazolium Bromid (ナカライテスク, 京都), 表皮メラニンモデル-MEL-300-B ([MatTek corporation](#), USA).

#### 3-2-2. 光老化モデル線維芽細胞の馴化培地による色素細胞の培養

NHEM を 96-well plate に  $2.0 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で Medium254 (Thermo Fisher Scientific) に HMGS 特注増殖添加剤セット (KURABO) を添加した培地を用いて播種し、24 時間培養した。1-2-3. の手順で作成した光老化モデル線維芽細胞に Medium254 に HMGS 特注増殖添加剤セットのヘパリン、FBS を添加した培地で馴化培地を作成した。NHEM に作成した光老化モデル線維芽細胞の馴化培地を処理し、さらに 24 時間培養した。

### 3-2-3. MTT アッセイ法

NHEM を PBS- で洗浄し、MTT を 0.4 mg/mL の濃度になるよう培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で2時間インキュベートした。培地を除去後、イソプロピルアルコールを添加し10分間アジテーションを行い生成したフォルマザンを抽出した。抽出液の 550 nm および 650 nm における吸光度を測定し 550 nm と 650 nm の差を用いて細胞増殖率を算出した。

### 3-2-4. カルセイン-AM 染色

NHEM を 1 µg/mL のカルセイン-AM を含む HBSS を用いて 15 分間染色を行った。Fluor Cell Imaging Station (Life Technologies) で蛍光画像を撮影し、細胞の中心から樹状突起先端までの距離を測定した。分析値は 4 つの顕微鏡視野から 10 細胞ずつ全 40 細胞の測定を行い算出した。

### 3-2-5. リアルタイム PCR 法

#### RNA 抽出

NHEM を PBS-にて洗浄し、RNeasy Mini kit (Qiagen)を使用して total RNA を抽出した。RNeasy Mini kit 付属のプロトコルを参照。

#### 逆転写反応

Total RNA と ReverTraAce qPCR RT Master Mix (×5) (TOYOBO)、Nuclease-Free Water (TOYOBO)を 2: 2: 6 で混合させ、Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystem)を使用して 37°Cで 30 分、50°Cで 5 分、98°Cで 5 分の条件で逆転写反応を行い、cDNA を調製した。

#### RT-PCR

Nuclease-Free water にて希釈した cDNA を 4.8 µL、Power Up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 5 µL、各プライマーの forward および reverse を 0.1 µL ずつ、合計 10 µL になるよう Nuclease-Free water にて調整しウェルに添加した。Gene Amp StepOne RT-PCR system (Applied Biosystems)を用いて、Holding Step 50°C, 1 min, 95°C, 15 sec、Cycling Step 95°C, 3 sec、60°C, 30 sec を 40 サイクル、Melt curve Step 95°C, 15 sec、60°C, 1 min、95°C 15 sec の条件で反応させた。mRNA の発現を、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。

Table. 1 Primer sequence

Gene	Forward	Reverse
<i>DKK1</i>	GACCCAGGCTTGCAAAGTGAC	CGCTACCATCGCGACAAAGA
<i>KITLG</i>	GGCTACCCAATGCGTGGACTA	GCAGCTGAAGATAAATGCAAGTGAG
<i>TYR</i>	CCAGCATCATTCTTCTCCTCTTG	GTGGACTAGCAAATCCTTCCAG
<i>GAPDH</i>	GGGAAATCGTGCGTGACAT-3	CAGGAGGAGCAATGATCTC

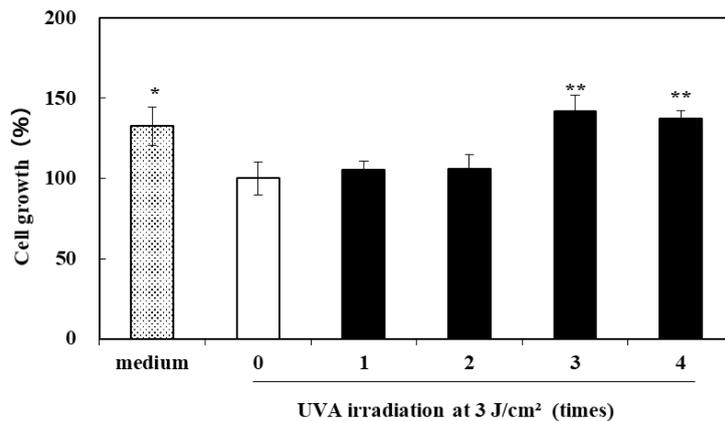
### 3-2-6. 光老化モデル線維芽細胞と表皮メラニンモデル-MEL-300-B との共培養とメラニン定量

光老化モデル線維芽細胞を TA 含有または無含有 EPI-100 長期維持培地 ( $\alpha$ -MSH 不含有) で 72 時間培養した。その後、光老化モデル線維芽細胞を培養した well に表皮メラニンモデル-MEL-300-B を設置し、EPI-100 長期維持培地 ( $\alpha$ -MSH 無含有) で 2 週間共培養した。表皮メラニンモデル-MEL-300-B は表面を顕微鏡で観察、画像の撮影を行った。その後、支持体から表皮シートを剥離し、5%トリクロロ酢酸含有 PBS-、エタノール/ジエチルエーテル (3:1)、ジエチルエーテルで脱脂処理を行い風乾した。乾燥表皮シートは 1 M 水酸化ナトリウム中で加熱 (100°C、10 分) を行い、沈殿物を除去しメラニン溶解液を作成した。メラニン溶解液をプレートに移し、マイクロプレートリーダーにて 405 nm 吸光度を測定した。

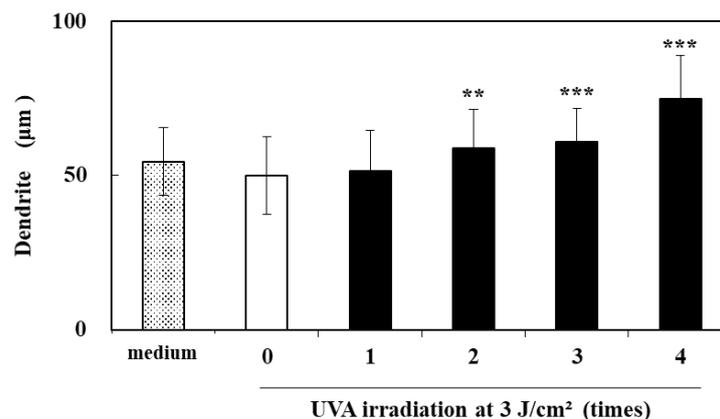
### 3-3. 結果

#### 3-3-1. 光老化モデル線維芽細胞の馴化培地が色素細胞に及ぼす作用

光老化モデル線維芽細胞が老人性色素斑の形成に及ぼす影響を確認するために、光老化モデル線維芽細胞を培養した培養上清 (馴化培地) を用いて NHEM を培養し、NHEM の細胞増殖、樹状突起の伸長について確認を行った。4 回目の UVA 照射が終わった線維芽細胞を色素細胞の基礎培地と交換し、24 時間培養することで馴化培地を作成した。光老化モデル線維芽細胞の馴化培地で培養した NHEM は照射を行っていない線維芽細胞の馴化培地で培養した NHEM と比較して、細胞増殖率の亢進が認められた (Fig. 3-1)。興味深いことに、未照射線維芽細胞の馴化培地で培養した NHEM は基礎培地で培養した NHEM と比較して有意に増殖が抑制されていることも確認された。同様に、光老化モデル線維芽細胞の馴化培地で培養した NHEM の樹状突起の伸長測定を行ったところ、光老化モデル線維芽細胞の馴化培地で培養した NHEM では樹状突起の伸長が確認された (Fig. 3-2)。これらの結果より、光老化モデル線維芽細胞より分泌される液性因子が色素細胞を活性化させている可能性が示唆された。



**Fig. 3-1 Proliferation of NHEMs treated with CM prepared from UVA-irradiated (photoaging) NHDFs.** NHDFs were irradiated 3 J/cm<sup>2</sup> UVA for 4 continuous days. CMs were prepared by cultivating the cells in Medium 254 for 24 h. NHEMs were then cultured with each CM for 24 h. Proliferation of NHEMs was examined using the MTT assay. Data are expressed as means ± S.D. (n=4). Significance: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

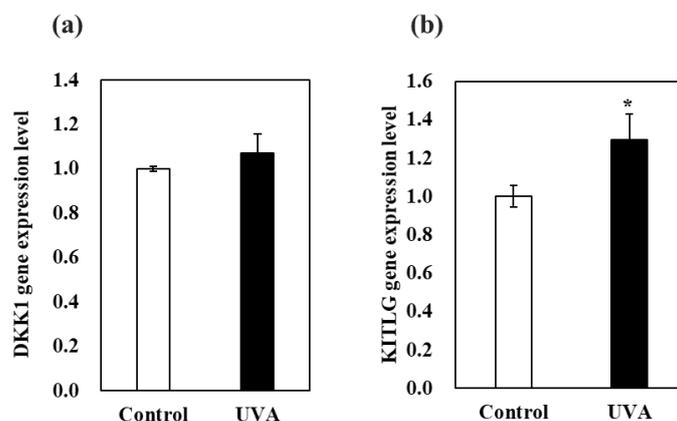


**Fig. 3-2 Proliferation and elongation of dendrites of NHEMs treated with CM prepared from UVA-irradiated (photoaging) NHDFs.** NHDFs were irradiated 3 J/cm<sup>2</sup> UVA for 4 continuous days. CMs were prepared by cultivating the cells in Medium 254 for 24 h. NHEMs were then cultured with each CM for 24 h. Elongation of dendrites of NHEMs was observed with a Fluid Cell Imaging Station after staining with calcein-AM. Lengths of dendrites of NHEMs (40 cells) were digitalized with image analysis (image-J). Data are expressed as means ± S.D. Significance: \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

### 3-3-2. 光老化モデル線維芽細胞の遺伝子発現変化

線維芽細胞での発現とメラニン産生に寄与することが報告されている、KITLG/SCF および Dkk1 の遺伝子発現変化を光老化モデル線維芽細胞にて行った。光老化モデル線維芽細

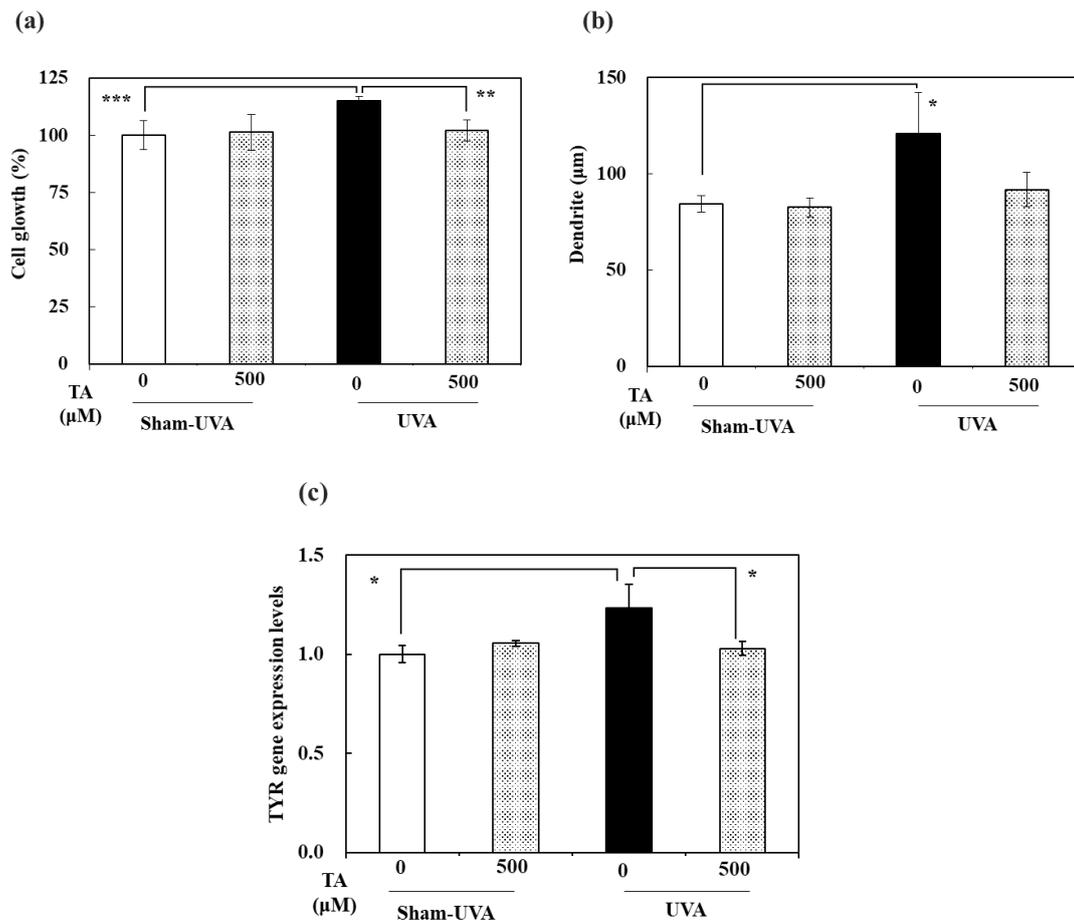
胞では KITLG/SCF の遺伝子発現の増加が確認されたが、Dkk1 の有意な変化は認められなかった (Fig. 3-3)。



**Fig. 3-3 DKK1 and KITLG gene expression levels in NHEMs treated with CM prepared from UVA-irradiated (photoaging) NHDFs.** NHDFs were irradiated 3 J/cm<sup>2</sup> UVA for 4 continuous days. CMs were prepared by cultivating the cells in Medium 254 for 24 h. NHEMs were then cultured with each CM for 24 h, after which total RNA was extracted and cDNAs were synthesized. The mRNA expression level of COL1A1, FBN1 and MMP1 were measured using real-time PCR.

### 3-3-3. トラネキサム酸処理を行った光老化モデル線維芽細胞の色素細胞への作用

光老化モデル線維芽細胞を 500  $\mu$ M の TA 含有培地で培養し作成した馴化培地で NHEM を培養し、細胞増殖、樹状突起の伸長を確認した。光老化モデル線維芽細胞の馴化培地で培養した NHEM は細胞増殖が亢進し、樹状突起が伸長するのに対して TA 含有培地で培養した光老化モデル線維芽細胞の馴化培地では細胞増殖の亢進、樹状突起の伸長が確認されなかった (Fig. 3-4a, b)。さらに、NHEM の TYR 遺伝子発現について確認を行ったところ、TA 含有培地で培養した光老化モデル線維芽細胞の馴化培地で培養した NHEM は光老化モデル線維芽細胞の馴化培地で培養した NHEM と比較して TYR 遺伝子発現の低下が確認された (Fig. 3-4c)。

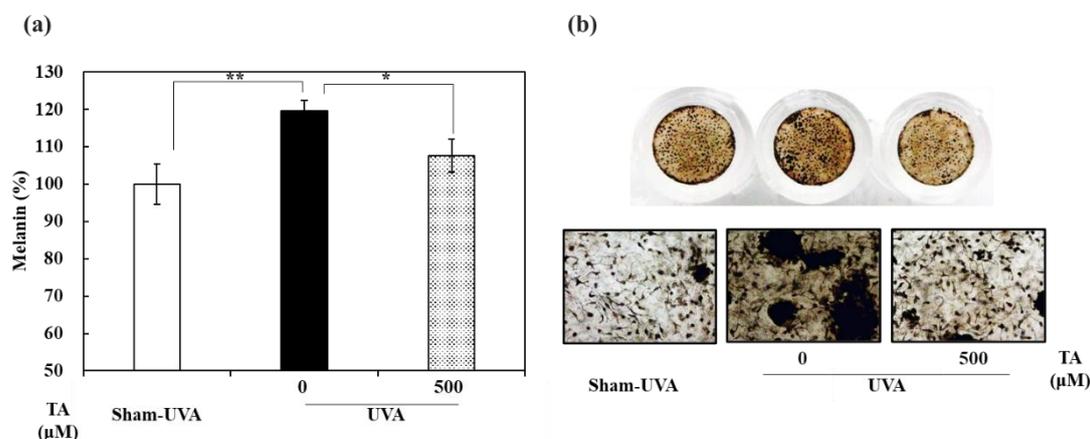


**Fig. 3-4 Proliferation and elongation of dendrites of NHEMs treated with CM prepared from repetitively UVA-irradiated NHDFs treated with TA.** Repetitively UVA-irradiated NHDFs were treated with or without TA (500 μM) for 24 h. CMs were prepared by cultivating the cells in Medium 254 for 24 h. NHEMs were then cultured with each CM for 24 h. (a) Proliferation of NHEMs was examined using the MTT assay. (b) Elongation of dendrites of NHEMs was observed with a Fluid Cell Imaging Station after staining with calcein-AM. Lengths of dendrites of NHEMs (40 cells) were digitalized with image analysis (image-J). (c) total RNA was extracted and cDNAs were synthesized. The mRNA expression level of TYR was measured using real-time PCR. Data are expressed as means ± S.D. Significance: \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

### 3-3-4. 光老化モデル線維芽細胞と共培養した表皮メラニンモデル MEL-300-B のメラニン量の変化

光老化モデル線維芽細胞と 2 週間共培養した表皮メラニンモデルは未照射の線維芽細胞と共培養した場合と比較してモデル表面の黒化が進行し、メラニン含有量が増加していることが確認された。一方、光老化モデル線維芽細胞を 72 時間 TA 含有培地で培養した後、2 週間共培養した表皮メラニンモデルは、モデル表面の黒化度が低下しメラニン含有量も低

下していることが確認された (Fig. 3-5)。



**Fig. 3-5 Changes of melanin contents in the epidermal melanin model-MEL-300-B co-cultured with UVA-irradiated (photoaging) NHDFs.** Repetitively UVA-irradiated NHDFs were treated with or without TA (500 μM) for 72 h. The epidermal melanin model and UVA irradiation (photoaging) NHDF were co-cultured for 2 weeks, and the amount of melanin was measured. Data are expressed as means ± S.D. Significance: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### 3-4. 考察

老人性色素斑部位の線維芽細胞は老化の形質を示すことが報告されている<sup>71)</sup>。そこで、第1章で作成した光老化モデル線維芽細胞の馴化培地を用いて色素細胞を培養し、細胞機能に与える影響を評価した。光老化モデル線維芽細胞の馴化培地で培養した色素細胞は、老化を誘導していない線維芽細胞の馴化培地と比較して高い細胞増殖、樹状突起の伸長、チロシナーゼ遺伝子発現の増加が確認された。さらに、光老化モデル線維芽細胞と共培養した表皮メラニンモデルは UVA 未照射線維芽細胞と共培養した場合と比較してメラニン産生量の増加が確認された。一方、コントロールの線維芽細胞の馴化培地は新鮮な培地に比較して有意な細胞増殖の低下が確認された。この結果から、線維芽細胞は定常時には色素細胞の活性を抑制的に制御する因子を分泌している可能性が考えられた。光老化モデル線維芽細胞の色素細胞および表皮メラニンモデルに対する作用を考えると、光老化モデル線維芽細胞では色素細胞の活性化抑制因子の分泌低下、あるいは活性化因子を分泌している可能性が考えられる。第2章の結果から、光老化モデル線維芽細胞では COX-2 の遺伝子発現の亢進と PGE<sub>2</sub> の分泌増加が確認されている (Fig. 2-1)。PGE<sub>2</sub> は色素細胞を活性化する因子の一つとして報告されていることから<sup>72)</sup>、光老化モデル線維芽細胞の馴化培地が色素細胞を活性化させた一つの因子として PGE<sub>2</sub> の関与が考えられる。さらに、CCN1, 2 は老化により発現が亢進すること、CCN は色素斑の形成と色素細胞の細胞増殖を誘導することも報告されている<sup>73)</sup>。光老化モデル線維芽細胞において CCN-1 (CYR61) の遺伝子発現の亢進が確認されてい

ることから (Fig. 1-5a)、CCN-1 も色素細胞の活性化に関与した可能性が考えられる。

第 2 章の結果から TA は光老化モデル線維芽細胞の PGE<sub>2</sub> 産生量を抑制することも確認されており、本章での色素細胞活性化因子として PGE<sub>2</sub> の関与が強く示唆される。また、TA 含有培地で 72 時間培養した光老化モデル線維芽細胞と共培養した表皮メラニンモデルでは、メラニン産生量の亢進が抑制された。これは TA が光老化モデル線維芽細胞の PGE<sub>2</sub> 産生を抑制しただけではなく、UVA 連続照射による線維芽細胞の老化形質発現を抑制したことにも起因している可能性が示唆される (第 2 章)。

### 3-5. 結論

これらの結果から、光老化モデル線維芽細胞は色素細胞に作用することで色素斑形成を制御している可能性が示唆された。

TA は、既知とされている UVB 照射されたケラチノサイトの PGE<sub>2</sub> の過剰合成抑制による色素細胞活性化抑制作用に由来する色素沈着抑制経路だけではなく、慢性的な UVA 照射による線維芽細胞の老化形質の発現抑制、さらに光老化モデル線維芽細胞の PGE<sub>2</sub> 過剰合成の抑制を介した、色素斑形成の抑制経路を有する可能性が見いだされた。

## 第4章 酸化ストレスがケラチノサイトのメラノソーム貪食に及ぼす作用と 西洋カボチャ種子エキスの効果

### 4-1. 緒言

皮膚の色素沈着のプロセスは、色素細胞の細胞増殖、メラニン合成、および色素細胞からケラチノサイトへのメラノソーム移送の亢進の3つの主要ステップに分類される。色素細胞からケラチノサイトへのメラノソーム移送は紫外線曝露により亢進することが報告されており、これは紫外線に曝露されたケラチノサイトや色素細胞から分泌されるオートクライン因子、パラクライン因子により制御されている。色素細胞の活性化因子には、 $\alpha$ -MSH/MC1R、SCF/c-kit、エンドセリン 1/エンドセリン-B 受容体、HGF/c-met、GM-CSF、PGE<sub>2</sub>/EP 受容体などがある<sup>21, 22)</sup>。 $\alpha$ -MSHは以下のステップで紫外線曝露されたケラチノサイト内で合成される。紫外線曝露されたケラチノサイトでは、前駆体タンパク質であるプロオピオメラノコルチン (POMC) が合成され、変換酵素によりプロセッシングを受けることにより $\alpha$ -MSHが切り出される。 $\alpha$ -MSHは色素細胞を刺激して cyclic AMP/CREB シグナル伝達を介して、細胞増殖の亢進、樹状突起の伸長を誘導する。さらに $\alpha$ -MSHは、成熟したメラノソーム (MS) の色素細胞から周辺ケラチノサイトへの移送を刺激することも報告されている<sup>74)</sup>。

一般的にケラチノサイトへの紫外線曝露は、NADPH オキシダーゼの活性化を通して細胞内 ROS レベルを増加させる<sup>75, 75)</sup>。一方、紫外線曝露後に誘導される $\alpha$ -MSHの合成は抗酸化剤であるN-アセチルシステインによって抑制されることが報告されている<sup>76)</sup>。よって、ROSは $\alpha$ -MSH合成の引き金となることが示唆される。これらの事実から、過剰に生成される細胞内 ROS の抑制は紫外線曝露後に誘導される皮膚の色素沈着を改善するための有効な手段であると考えられる。

細胞内レドックスの恒常性は nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)シグナル伝達系によって制御されている。Nrf2は Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)と複合体を形成して細胞質内に存在しているが、酸化ストレス環境下ではKeap1と解離して核内に移行し、Nrf2の下流にコードされている heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase, catalase, and  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS)などのレドックス関連遺伝子の発現を促進することで抗酸化に働くことが知られている<sup>34, 35)</sup>。したがって、Nrf2シグナル伝達の活性化は皮膚の色素沈着を予防、改善するための効果的なアプローチであることが期待される。

### 目的

西洋カボチャは金山赤カボチャと呼ばれ、限界集落である福島県金山町の特産品で、地元で人気の食材の一つである。一方、西洋カボチャの果肉以外の部分は農業廃棄物として処理されており、これらの有効利用は農業廃棄物の削減と地域農業の活性化につながる。さらに、近年ではファイトケミカルが、商品の付加価値を高めるものとして注目されている。そこで、

本章ではこの西洋カボチャの果肉以外の部分の抽出物の Nrf2 シグナル活性化に着目した皮膚色素沈着の予防、改善効果について評価を行った。



## 4-2. 実験

### 4-2-1. 試薬

試薬は以下のものを使用した。

Blue and Red fluorescent beads; FluoSpheres® carboxylate modified 0.2  $\mu\text{m}$  (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate; H2DCFDA (Merck, Darmstadt, Germany), Hoechst33342 (Invitrogen), Bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent kit (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

### 4-2-2. 西洋カボチャ種子エキス (RPS) の作成

粉砕機 EG-45 (Kalita) で西洋カボチャ種子を粉砕した後、種粉末 40 g を 50 % エタノール水溶液 400 mL 加え、室温で 2 週間浸漬した。濾過により種子粉末と抽出溶液に分離し、ロータリーエバポレーターNAJ-160 (Tokyo Rikakikai) を用いて溶媒を留去し、固形物を得た。この固形物を西洋カボチャ種子エキス (RPS) として以下の実験に供した。

### 4-2-3. 細胞培養

NHEK を Humedia-KG2 (KURABO)を用いて培養した。継代培養は、0.05 % Trypsin (ナカライテスク)、0.004 % EDTA (ナカライテスク) 含有 PBS-を用いて 2~3 分間 37°C でインキュベートし細胞を剥離した。Trypsin 活性の中和液には 2 % FBS 含有 PBS-を用いた。

### 4-2-4. UVB、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 曝露したケラチノサイトの培養上清 (CM) を用いたケラチノサイトへの蛍光ビーズ取り込み

NHEK を 96-well plate に  $2.5 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で播種し 24 時間培養した。RPS エキス含有培地と交換し、NHEK をさらに 24 時間培養を行った。

#### $\text{H}_2\text{O}_2$ 曝露

24 時間培養後、HBSS で 2 回洗浄し、HBSS で 500  $\mu\text{M}$  に調製した  $\text{H}_2\text{O}_2$  を 1 時間 NHEK

へ曝露させ、KB2 に交換して再び 24 時間培養した。

#### UVB 曝露

24 時間培養後、HBSS で 2 回洗浄し、HBSS に置換し UV ランプ (Broadband TL 20W/12RS lamps) を用いて 20 mJ/cm<sup>2</sup>照射した。このとき、NHEK を 96-wellplate に 2.0×10<sup>4</sup> cells/well の細胞密度で播種し 24 時間培養した。

#### UVB、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露したケラチノサイトの培養上清 (CM)

UVB、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を曝露後、24 時間 NHEK を培養した上清を回収した。培養上清を遠心分離し上清のみを回収し、UVB、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露したケラチノサイトの培養上清 (CM)として蛍光ビーズの取込み実験に供した。

#### 蛍光ビーズのケラチノサイトへの取込み

0.004 %蛍光ビーズを CM に添加し、あらかじめ 96-well plate に播種した NHEK の培地と交換し、6 時間培養した。HBSS で 2 回洗浄した後、1well 当たり 50 μL の 0.1% TritonX-100 含有 PBS- を添加して Twin Mixer TM-282 (アズワン)を用いて 5 分間攪拌し細胞溶解液を調製した。プレートリーダーで細胞溶解液の蛍光強度 (Ex; 365 / Em; 415) を測定した。その後、BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク定量を行い、タンパク量当たりの蛍光ビーズの取込み量を算出した。

#### **4-2-5. MC1R ノックダウンケラチノサイトの調製**

NHEK を 48-well plate に 3.0×10<sup>4</sup> cells/well の細胞密度で播種し 24 時間培養した。MC1R-small interfering RNA (siMC1R)または random sequence siRNA as a control (siNC)を 100 nmol/mL と RNAiMAX を混合 (室温、5 分間静置) し、20μL/well 添加して 48 時間培養した。MC1R の遺伝子発現はリアルタイム PCR 法を用いて確認した。

#### **4-2-6. リアルタイム PCR 法**

##### RNA 抽出

NHEKs を PBS-にて洗浄し、RNeasy Mini kit (Qiagen)を使用して total RNA を抽出した。RNeasy Mini kit 付属のプロトコルを参照。

##### 逆転写反応

Total RNA と ReverTraAce qPCR RT Master Mix (×5) (TOYOBO)、Nuclease-Free Water (TOYOBO)を 2: 2: 6 で混合させ、Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystem)を使用して 37°Cで 30 分、50°Cで 5 分、98°Cで 5 分の条件で逆転写反応を行い、cDNA を調製した。

##### RT-PCR

Nuclease-Free water にて希釈した cDNA を 4.8 μL、Power Up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 5 μL、各プライマーの forward および reverse を 0.1 μL ずつ、合計 10 μL になるよう Nuclease-Free water にて調整しウェルに添加した。Gene Amp StepOne RT-PCR system (Applied Biosystems)を用いて、Holding Step50°C, 1 min、95°C, 15 sec、Cycling Step 95°C, 3 sec、

60°C, 30 sec を 40 サイクル、Melt curve Step 95°C, 15 sec、60°C, 1 min、95°C 15 sec の条件で反応させた。mRNA の発現を、 $\Delta\Delta C_t$  法を用いて算出した。

Table. 1 Primer sequence

Gene	Forward	Reverse
<i>POMC</i>	CCCCTACAGGATGGAGCACT	CGTTCCTTGATGATGGCGTTT
<i>Nrf2</i>	TTCTGTTGCTCAGGTAGCCCC	TCAGTTTGGCTTCTGGACTTGG
<i><math>\gamma</math>-GCS</i>	TTGCAGGAAGGCATTGATCA	GCATCATCCAGGTGTATTTTCTCTT
<i>HMOX1</i>	TTGCCAGTGCCACCAAGTTC	TCAGCAGCTCCTGCAACTCC
<i>CAT</i>	TCCAAGGCAAAGGTATTTGAGCA	CAACGAGATCCCAGTTACCATCTTC
<i>GAPDH</i>	GGGAAATCGTGCGTGACAT-3	CAGGAGGAGCAATGATCTC

#### 4-2-7. 細胞内 ROS の測定

NHEK を 96-well plate に  $2.5 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で播種し 24 時間培養した。RPS 含有培地と交換しさらに 24 時間培養を行った。NHEK を HBSS で洗浄し、HBSS にて 20  $\mu$ M に調製した H<sub>2</sub>DCFDA を各 well に添加した。37°C, 5 %CO<sub>2</sub>濃度の環境下で 30 分間インキュベートした。その後、プレートリーダーにて蛍光強度 (Ex; 485 nm / Em; 530 nm) を測定した。0.5 %TritonX-100 にて細胞を溶解して、細胞内タンパク量を BCA Protein Assay Kit により測定した。測定した蛍光強度とタンパク量から、タンパク量あたりの細胞内 ROS レベルを算出した。

#### 4-2-8. 免疫染色による Nrf2 の核内移行

NHEK を 96-well plate に  $1.0 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で播種し 24 時間培養した。RPS を含有させた KG2 と培地交換しさらに 6 時間培養した。NHEKs を PBS- で 1 回洗浄し、4 %ホルムアルデヒド溶液 100 $\mu$ L を各 well に添加し、15 分間静置して細胞を固定した。PBS- で洗浄後、0.1% TritonX-100 含有 PBS- を添加して室温で 5 分間静置し、透過処理を行った。PBS- で洗浄後、1 % BSA (Sigma-Aldrich) 含有 PBS- を添加して室温で 1 時間静置し、ブロッキング処理を行った。0.05 % PBS-T で洗浄し、Rabbit anti-Nrf2 polyclonal antibody (1:250) を添加して 4°Cで一晩インキュベートした。0.05 % PBS-T 洗浄を行い、Biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (H&L)(1:1000)を添加して室温、斜光下で 2 時間インキュベートした。0.05 % PBS-T を 1well 当たり 200  $\mu$ L 添加して洗浄を 3 回を行い、0.3 % BSA 含有 PBS- で調製した DyLight 650 conjugated Streptavidin (Thermo Fisher Scientific) (1:1000) を、1well 当たり 50  $\mu$ L 添加して室温、斜光下で 1 時間静置した。0.05 % PBS-T を 1well 当たり 200  $\mu$ L 添加して洗浄を 3 回を行い、4  $\mu$ M Hoechst33342 含有 PBS- を添加して室温、斜光下で 30 分間インキュベートした。PBS- で 1 回洗浄を行い、蛍光顕微鏡にて画像を取得した。

#### 4-2-9. GSH の定量

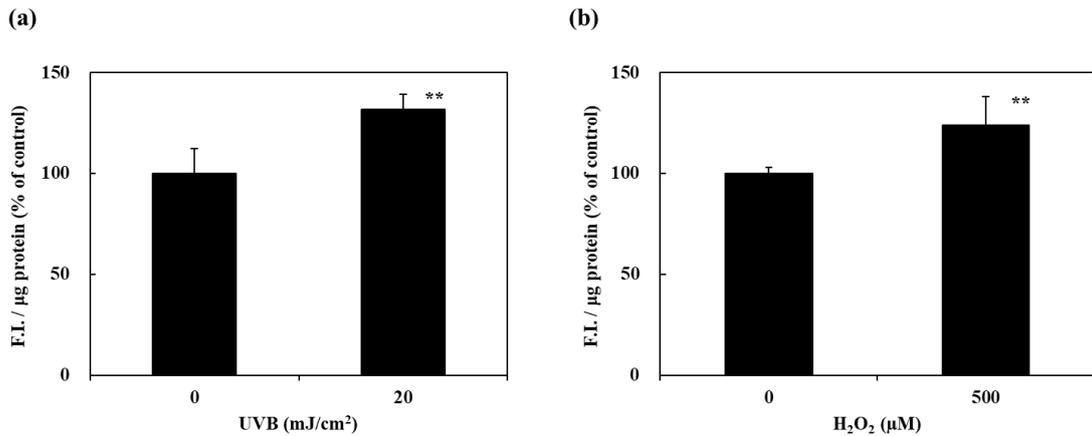
NHEK を 96-well plate に  $2.5 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で播種し 24 時間培養した。RPS を含有した KG2 と培地交換しさらに 24 時間培養した。0.1% TritonX-100 含有 PBS- を 1well 当たり 100  $\mu$ L 添加して細胞溶解液を調製した。細胞溶液中の総 GSH のレベルを、GSH レダクターゼリサイクリングアッセイ法<sup>77)</sup>を用いて定量した。BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク量を定量し、タンパク量当たりの総 GSH 量を算出した。

### 4-3. 結果

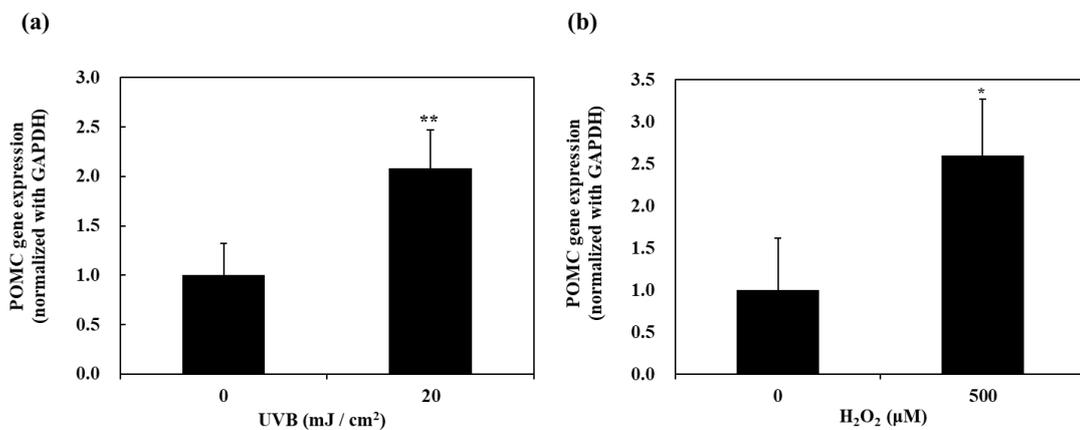
#### 4-3-1. ケラチノサイトのメラノソーム貪食能について

UVB を照射したケラチノサイトの CM で培養したケラチノサイトでは蛍光ビーズ (擬似 MS) の取り込み量の有意な増加が確認された。さらに、 $H_2O_2$  をケラチノサイトに処理して調製した CM で培養したケラチノサイトでも、同様に蛍光ビーズの取り込み量の増加が確認された (Fig. 4-1a, b)。

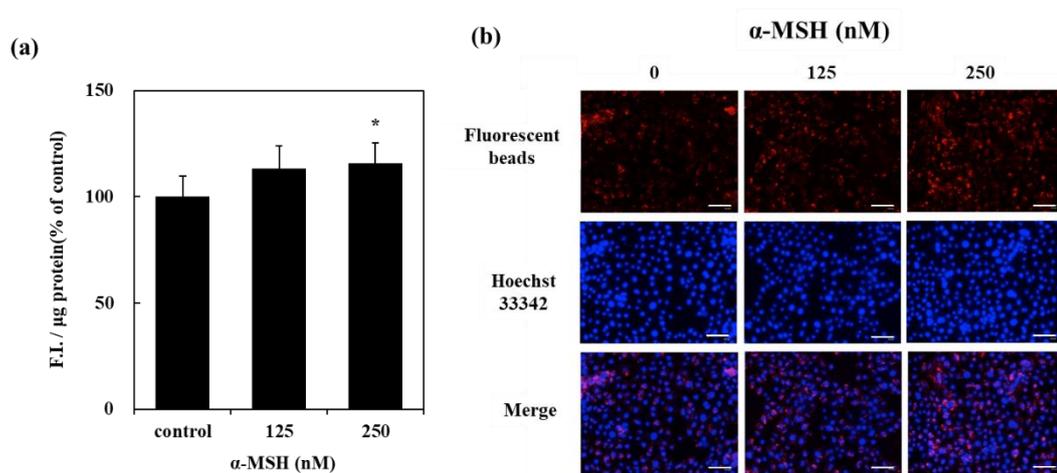
$\alpha$ -MSH は POMC を前駆体とし、ケラチノサイトで合成され、色素細胞の増殖、メラニン産生の増加、細胞内 MS の輸送ならびにケラチノサイトへの MS 移送を刺激することが報告されている。そこで、UVB および  $H_2O_2$  に曝露されたケラチノサイトの MS 貪食亢進の要因の一つとして、 $\alpha$ -MSH に着目し実験を行った。UVB、 $H_2O_2$  曝露を行ったケラチノサイトの POMC の遺伝子発現を確認したところ有意な発現の増加が確認された (Fig. 4-2a, b)。さらに、 $\alpha$ -MSH を含有させた Humedia-KB2 で培養したケラチノサイトでは蛍光ビーズの取り込み量の増加が確認された (Fig. 4-3)。そこで  $\alpha$ -MSH の受容体である MC1R をノックダウン処理したケラチノサイトにおいて蛍光ビーズの取り込み確認を行った。MC1R ノックダウンケラチノサイトでは、UVB および  $H_2O_2$  曝露したケラチノサイトの CM で亢進した蛍光ビーズの取り込みが抑制されていることが確認された (Fig. 4-4)。これらの結果から、酸化ストレスにより産生亢進された POMC 由来の  $\alpha$ -MSH がケラチノサイトの MS 移送に大きく関与していることが示唆された。



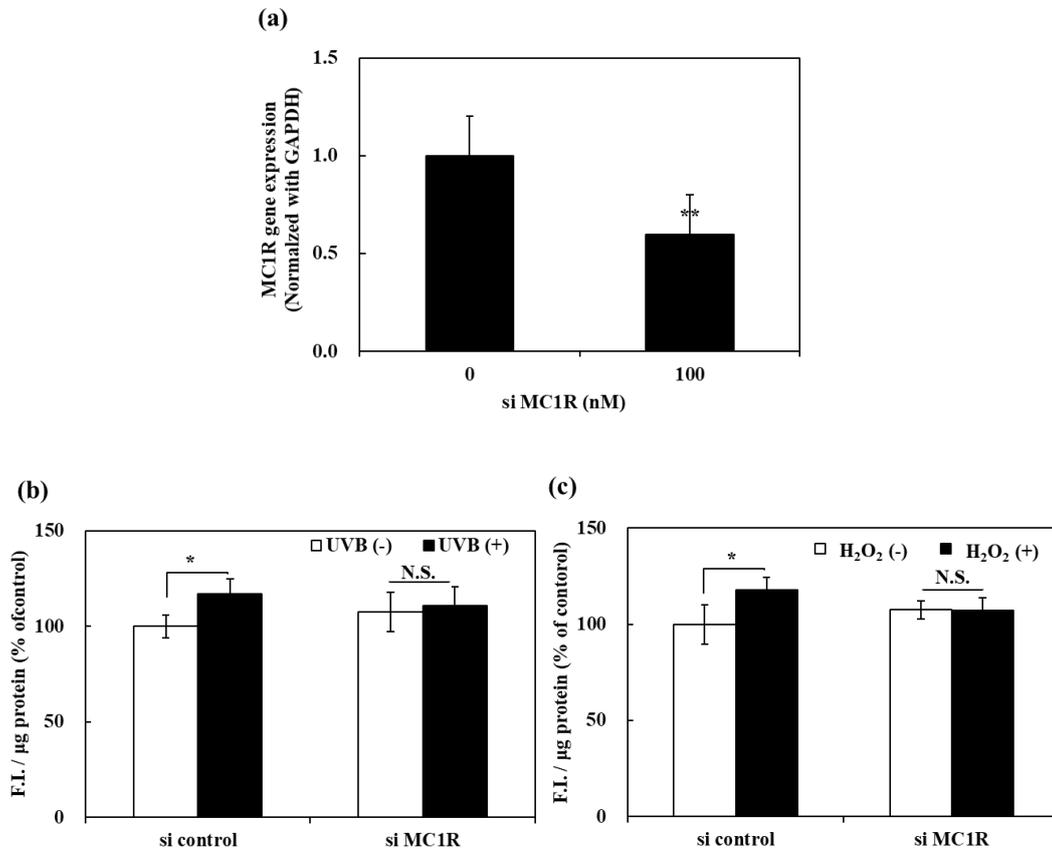
**Fig. 4-1 Incorporation of fluorescent beads into NHEKs treated with CM prepared from NHEKs exposed to UVB or to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** NHEKs were exposed to UVB at an energy density of 20 mJ/cm<sup>2</sup> (a) or to 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min (b). NHEKs were then further cultured in fresh medium for 24 h to prepare CM. NHEKs were cultured with a cocktail of the CM and fluorescent beads for 6 h, after which the incorporation of fluorescent beads was quantified by measurement of the fluorescence. Data are expressed as means ± SDs from five independent experiments. Significance: \*\*p<0.01



**Fig. 4-2 mRNA expression levels of POMC in UVB or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposed NHEKs.** NHEKs were exposed to UVB at an energy density of 20 mJ/cm<sup>2</sup> (a) or to 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min (b). Cells were then cultured for 6 h, and total RNAs were extracted. The mRNA expression level of POMC was determined using real-time RT-PCR. mRNA expression levels are expressed as means ± SD (n=4) of data normalized with GAPDH from four independent experiments. Significance: \*p<0.05, \*\*p<0.01



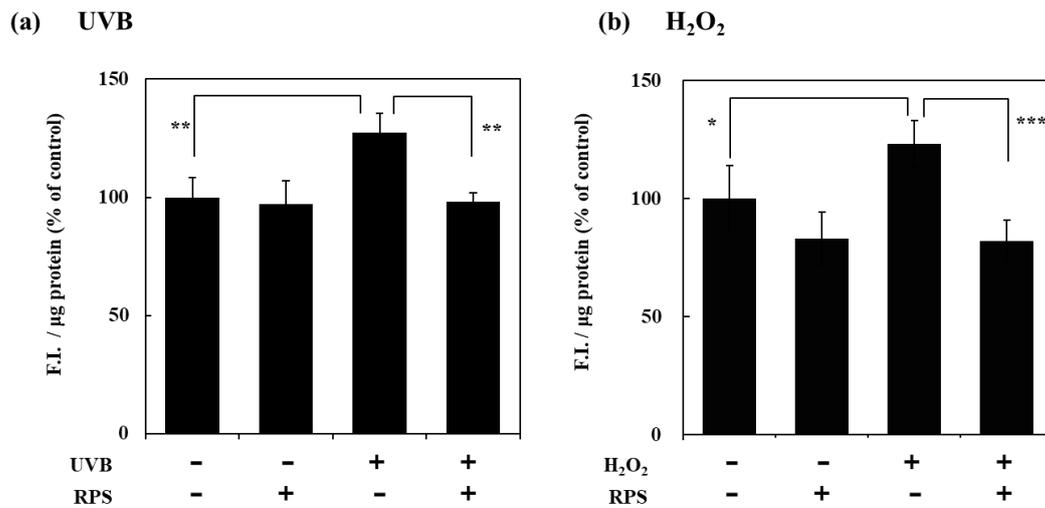
**Fig. 4-3 Incorporation of fluorescent beads by  $\alpha$ -MSH-treated NHEKs.** NHEKs were cultured with  $\alpha$ -MSH and fluorescent beads for 6 h (a). after which the incorporation of fluorescent beads was quantified by measurement of fluorescence. Data are expressed as means  $\pm$  SDs from five independent experiments. Significance: \* $p < 0.05$ . Representative images of fluorescent beads incorporated into NHEKs (b), red: fluorescence beads, blue: nuclei, scale bar; 100  $\mu$ m



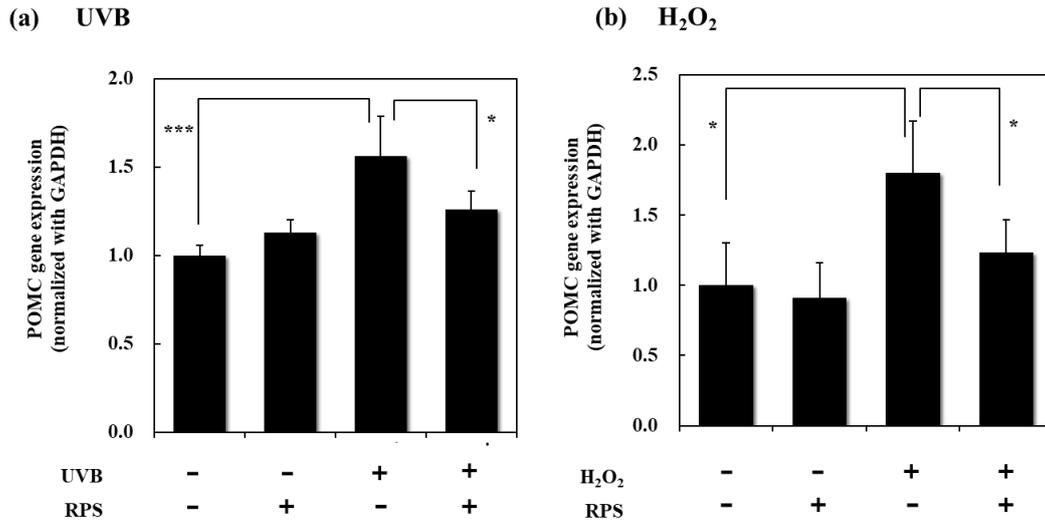
**Fig. 4-4 Incorporation of pseudo-melanosomes (fluorescent beads) in MC1R knockdown NHEKs treated with CMs prepared from NHEKs exposed to UVB or to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** NHEKs were treated with si-control or si-MC1R (100 nM) for 48 h, after which the MC1R mRNA expression level was determined using real time-RT-PCR (a). Data are reported as means  $\pm$  SD of twice independent experiments. NHEKs were pre-treated with si-control or si-MC1R for 48 h and then were exposed to UVB at an energy density of 20 mJ/cm<sup>2</sup> (b) or to 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min (c). NHEKs were then further cultured in fresh medium for 24 h to prepare CM. NHEKs were then cultured with a cocktail of each CM and fluorescent beads for 6 h. Incorporation of fluorescent beads was quantified by measurement of fluorescence

#### 4-3-2. 西洋カボチャ種子エキス (RPS) の UVB 及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露により亢進するケラチノサイトの MS 貪食能抑制効果

RPS を前処理し、その後に UVB 及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を曝露したケラチノサイトの培養上清で培養したケラチノサイトでは蛍光ビーズの貪食が抑制されていることが確認された (Fig.4-5a, b)。さらに、RPS を前処理し、その後に UVB 及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を曝露したケラチノサイトの POMC の遺伝子発現を確認したところ、有意な遺伝子発現亢進の抑制が確認された (Fig.4-6a, b)。



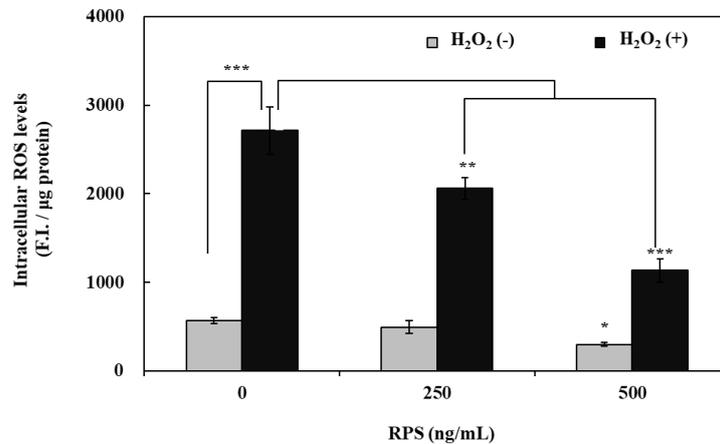
**Fig. 4-5 Incorporation of pseudo-melanosomes (fluorescent beads) in NHEKs treated with CMs prepared from NHEKs exposed to UVB or to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after pre-treatment with RPS.** NHEKs were pre-treated with RPS for 24 h and then were exposed to UVB at an energy density of 20 mJ/cm<sup>2</sup> (a) or to 500  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min (b). NHEKs were then further cultured in fresh medium for 24 h to prepare CM. NHEKs were then cultured with a cocktail of each CM and fluorescent beads for 6 h. Incorporation of fluorescent beads was quantified by measurement of fluorescence.



**Fig. 4-6 POMC mRNA expression in NHEKs treated with RPS.** NHEKs were pre-treated with RPS for 24 h and then were exposed to UVB at an energy density of 20 mJ/cm<sup>2</sup> (a) or to 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min (b). Total RNAs were extracted from NHEKs after further culture for 6 h. POMC mRNA levels were quantified using real-time RT-PCR. POMC mRNA expression levels are expressed as means ± SD in four independent experiments after normalization with GAPDH. Significance: \*p<0.05, \*\*\*p<0.001

#### 4-3-3. RPS の細胞内 ROS への作用

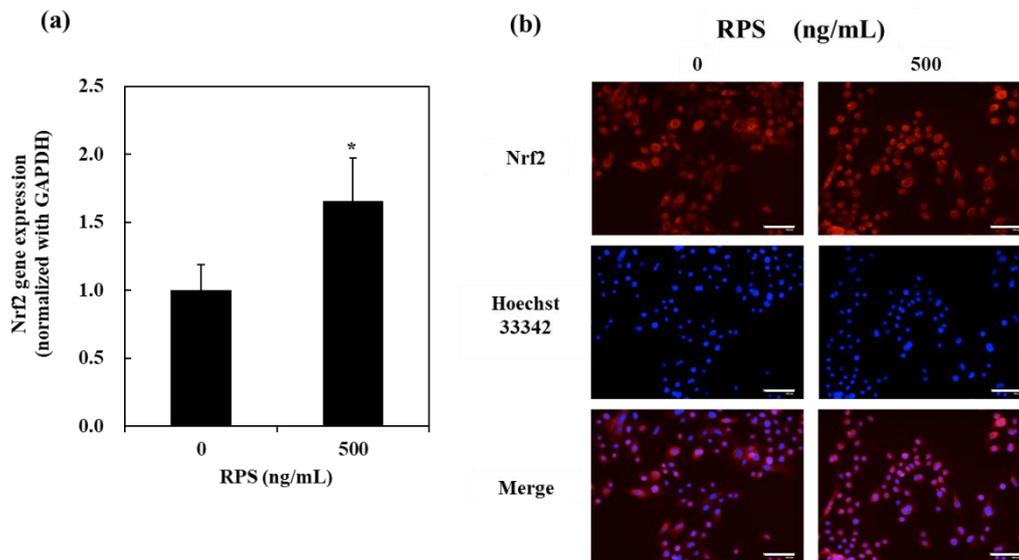
RPS を 24 時間処理したケラチノサイトでは 500 ng/mL の濃度で細胞内 ROS レベルの低下が確認された。さらに、RPS を 24 時間前処理し、RPS を培地中から除去した後に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を曝露したケラチノサイトにおいて濃度依存的な細胞内 ROS の抑制効果を示した (Fig.4-7)。この結果より、RPS は細胞内の抗酸化システム増強を介した細胞内 ROS の低減を示している可能性が示唆された。



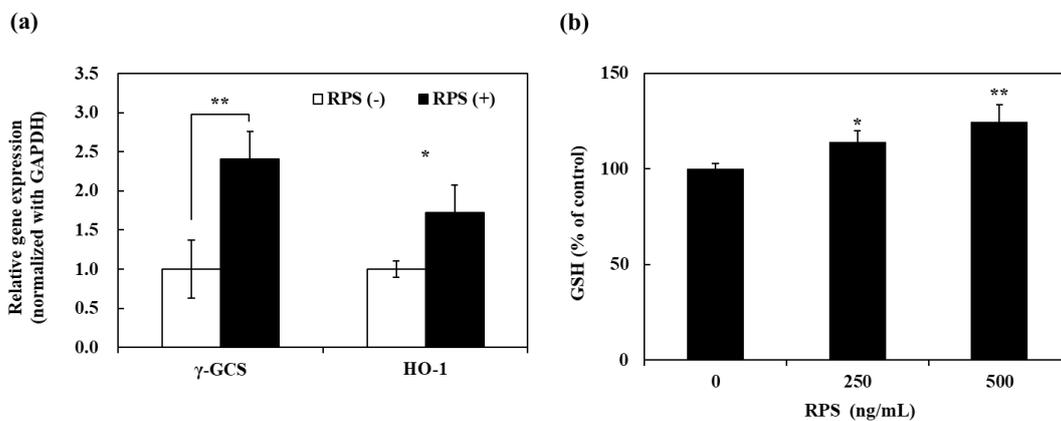
**Fig. 4-7 Intracellular ROS suppression in NHEKs treated with or without RPS after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.** NHEKs were cultured with RPS for 24 h. After preloading NHEKs by incubation with H<sub>2</sub>DCFDA for 30 min, cells were further cultured with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μM) for 30 min. After lysing, the fluorescence intensity of each lysate was measured (Ex; 485 nm, Em; 530 nm). Intracellular ROS levels are expressed as F.I./μg protein. Data are expressed as means ± SDs from five independent experiments. Significance: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

#### 4-3-4. RPS の細胞内抗酸化系におよぼす効果

一般的に細胞内のレドックスを担っているのが、Keap1-Nrf2 システムである。RPS は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と共存しない細胞培養条件下において細胞内 ROS レベルの抑制に効果を示したことから、Nrf2 のシグナルの活性化が示唆された。RPS は、Nrf2 の核内移行を促すことが確認された。さらに、RPS を処理したケラチノサイトの Nrf2 の遺伝子発現を、リアルタイム PCR 法を用いて測定した。RPS は、Nrf2 の遺伝子発現も有意に増加した (Fig. 4-8a, b)。転写因子である Nrf2 は核内に移行することで、その下流にコードされている抗酸化関連遺伝子の発現が誘導される。そこで、HO-1 と γ-GCS の遺伝子発現と細胞内総グルタチオン量の定量を行った。RPS を処理したケラチノサイトでは、HO-1、γ-GCS の遺伝子発現の亢進が確認された (Fig. 4-9a)。同様に、RPS を処理したケラチノサイトでは細胞内の総グルタチオン量が RPS の濃度依存的に増加した (Fig. 4-9b)。



**Fig. 4-7 mRNA expression and nuclear translocation of Nrf2 in NHEKs treated with RPS.** NHEKs were treated with RPS for 6 h, after which total RNA was extracted (a). The mRNA expression level of Nrf2 was determined using real-time RT-PCR. mRNA expression levels are expressed as means  $\pm$  SD of data normalized with GAPDH in four independent experiments. Significance: \* $p$ <0.05. Representative images of Nrf2 nuclear translocation in NHEKs treated with RPS for 6 h (b). red: Nrf2, blue: nuclei, scale bar; 100  $\mu$ m



**Fig. 4-8 Intracellular GSH and  $\gamma$ -GCS, HMOX1 mRNA levels in NHEKs treated with RPS.** NHEKs were treated with RPS for 24 h, after which the  $\gamma$ -GCS and HMOX1 mRNA expression level was determined using real time-RT-PCR (a). Data are reported as means  $\pm$  SD of four independent experiments. NHEKs were treated with RPS for 24 h, after which intracellular GSH levels were measured (b). Data are expressed as means  $\pm$  SDs from five independent experiments, Significance: \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01

#### 4-4. 考察

UVB および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を曝露したケラチノサイトの CM で培養したケラチノサイトでは、擬似 MS である蛍光ビーズの貪食が亢進することが確認された (Fig. 4-1a, b)。この結果より、紫外線曝露によるケラチノサイトの MS 貪食能亢進には、紫外線により生成された ROS が関与していることが示唆された。α-MSH は、UVB および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露によりケラチノサイトから分泌が亢進することが報告されている。事実、UVB および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露はケラチノサイトの α-MSH 前駆タンパクである POMC の遺伝子発現を亢進することが確認された (Fig. 4-2a, b)。さらに、α-MSH はケラチノサイトの蛍光ビーズの貪食能を有意に増加させることが確認された (Fig. 4-3)。この事実をまとめると、紫外線や ROS はケラチノサイトの α-MSH の合成を促進し、α-MSH がオートクライン的にケラチノサイトへ作用することにより蛍光ビーズの貪食能を亢進している可能性が考えられる。

そこで、RPS を処理後、UVB および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露したケラチノサイトの CM による、ケラチノサイトの蛍光ビーズ貪食能を確認した。RPS を前処理し、UVB および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露を行って作成した CM を用いて培養したケラチノサイトでは蛍光ビーズの貪食亢進が有意に抑制された (Fig. 4-5a, b)。さらに、RPS は UVB および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を曝露したケラチノサイトで亢進する POMC の遺伝子発現も抑制した (Fig. 4-6a, b)。RPS を処理したケラチノサイトでは、定常状態の細胞内 ROS 減少が確認され、さらに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露により増加する細胞内 ROS に対しても抑制効果を示した (Fig. 4-7)。細胞に処理している濃度の RPS には H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ヒドロキシラジカルの消去能は有さないことが確認されていることから、RPS は細胞内の抗酸化系を活性化させていることが示唆された。そこで、細胞内レドックスを制御している Nrf2 について確認を行った。RPS を処理したケラチノサイトでは Nrf2 の核内移行の亢進と遺伝子発現の増加が確認され (Fig. 4-8)、さらに Nrf2 の下流にコードされている HO-1、γ-GCS の遺伝子発現の亢進も確認された (Fig. 4-9)。これらの結果より、RPS は細胞内の抗酸化システムを増強することで、UVB および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で亢進する POMC の遺伝子発現を抑制しケラチノサイトの蛍光ビーズ貪食抑制に効果を示したと考えられる。

#### 4-5. 結論

以上の結果をまとめると、本章では UVB 照射による MS のケラチノサイトへの移送には ROS により合成が刺激される α-MSH が関与していること、RPS は Nrf2 シグナルを活性化し細胞内抗酸化システムを増強することにより MS のケラチノサイトへの移送を抑制する可能性が示された。さらに、RPS は MS のケラチノサイトへの移送を抑制することで色素沈着の出現をおさえる美白剤として有用である可能性が示された。

## 第5章 ケラチノサイトを介した色素斑形成に対する $\alpha$ -トコフェロール脂肪酸エステル抑制効果

### 5-1. 緒言

老人性色素斑 (Solar lentigos : SL) は日光への曝露履歴に応じて皮膚に顕在化し、光老化皮膚の典型的な表現型の一つである。太陽光に含まれる紫外線は活性酸素の強力なイニシエーターであり、皮膚の色素沈着の主要な誘発因子である。皮膚色素沈着に対する ROS の影響は多く報告されており、ROS または紫外線曝露により生成される PGE<sub>2</sub> は色素細胞の増殖や樹状突起の伸長、メラニン合成を増加させることが報告されている<sup>78,79)</sup>。さらに PGE<sub>2</sub> は、メラノソームの色素細胞からケラチノサイトへの移送を亢進させることも報告されている<sup>80)</sup>。これらの事実から、皮膚の色素沈着プロセスには ROS が強く関与しており、抗酸化剤は色素沈着抑制剤として有用であると考えられている。事実、よく知られた抗酸化剤であるアスコルビン酸 (ビタミン C) とその誘導体は抗色素沈着剤として広く使用されている<sup>81)</sup>。一方、脂溶性ビタミンの一種である  $\alpha$ -トコフェロール (ビタミン E、VE) とその誘導体は、主に酸化に対する製品安定性を保つために食品や化粧品に配合されるが、抗色素沈着剤としての生理学的作用はほとんど報告されておらず、抗色素沈着剤としての製品への配合もなされていない。 $\alpha$ -トコフェロールはグルタチオンの律速酵素である  $\gamma$ -GCS 遺伝子発現を増加させることが報告されていることから<sup>82)</sup>、 $\alpha$ -トコフェロールは化学的抗酸化特性に加えて抗酸化作用を生物学的に強化する可能性が示唆される。これらの事実から、 $\alpha$ -トコフェロールやそのエステル類も皮膚の色素沈着を予防、改善する効果が期待される。

### 目的

本章では、リノール酸を高比率 (58%以上) で含む天然由来の混合脂肪酸でエステル化されたトコフェロールエステル (VE-FA) の色素沈着抑制剤としての可能性を評価することを目的とした。

### 5-2. 実験

#### 5-2-1. 試薬

試薬は以下のものを使用した。

$\alpha$ -トコフェロールエステル; VE-FA (三菱ケミカルフーズ株式会社, 東京), Blue and Red fluorescent beads (FluoSpheres® carboxylate-modified 0.2  $\mu$ m) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) (Merck, Darmstadt, Germany), Hoechst33342 (Invitrogen), Bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent kit (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

### 5-2-2. 細胞培養

HaCaT ケラチノサイトを 5 %FBS 含有 DMEM を用いて培養した。正常ヒト表皮色素細胞 (NHEM) (KURABO) は、Medium254 (Thermo Fisher Scientific) に HMGS 特注増殖添加剤セット (KURABO) を添加した培地で培養した。継代培養は、0.125 % Trypsin, 0.01 % EDTA 含有 PBS- を 1 分間室温で処理し細胞を剥離した。Trypsin 活性の中和液には 1 % FBS 含有 PBS- を用いた。

### 5-2-3. HaCaT ケラチノサイトの馴化培地で培養した色素細胞の細胞増殖および樹状突起の伸長

HaCaT ケラチノサイトを 96-well plate に  $3.5 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で播種し 24 時間培養した。VE-FA 含有培地と交換しさらに 24 時間培養後、UVB ランプ (Broadband TL 20W/12RS lamps) を用いて  $40 \text{ mJ/cm}^2$  の照射強度で HaCaT ケラチノサイトへ UVB 照射を行った。サプリメントを含まない Medium254 培地と交換し 24 時間培養し馴化培地を作成した。NHEM は、96-well plate に  $2.5 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で播種し 24 時間培養し、HaCaT ケラチノサイトの馴化培地に置換後さらに 24 時間培養した。細胞増殖は MTT アッセイを用いて、樹状突起の伸長はカルセイン-AM を用いて染色を行い測定した。

#### MTT アッセイ法

NHEM を  $0.4 \text{ mg/mL}$  の MTT を含む Medium254 を用いて、 $37^\circ\text{C}$ 、5 % $\text{CO}_2$  条件下で 2 時間インキュベートした。培地を除去後、イソプロピルアルコールを添加し 10 分間アジテーションを行い生成したフォルマザンを抽出した。抽出液の  $550 \text{ nm}$  および  $650 \text{ nm}$  における吸光度を測定し、その差分を用いて細胞増殖率を算出した。

#### カルセイン-AM 染色

NHEM を  $1 \mu\text{g/mL}$  のカルセイン-AM 含有 HBSS で 15 分間染色を行った。Fluid Cell Imaging Station (Life Technologies) で蛍光画像を撮影し、細胞の中心から樹状突起先端までの距離を測定した。分析値は 4 つの顕微鏡視野から 10 細胞ずつ全 40 細胞の測定を行い算出した。

### 5-2-4. HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズ取り込み

HaCaT ケラチノサイトを  $35 \text{ mm}\Phi$  dish に  $9.0 \times 10^5$  cells/well の細胞密度で播種し 24 時間培養した。VE-FA 含有培地と交換しさらに 24 時間培養後、UVB ランプ (Broadband TL 20W/12RS lamps) を用いて  $40 \text{ mJ/cm}^2$  の照射強度で HaCaT ケラチノサイトへ UVB 照射を行った。FBS を含まない DMEM 培地と交換し、24 時間培養して馴化培地を作成した。馴化培地を遠心分離し上清のみを回収した。馴化培地上清へ 0.004 % 蛍光ビーズを添加し、新しく  $2.0 \times 10^4$  cells/well の細胞密度で播種した HaCaT ケラチノサイトの培地と交換し 6 時間培養した。HBSS で 2 回洗浄した後、1well 当たり  $50 \mu\text{L}$  の 0.1% TritonX-100 含有 PBS- を添加して Twin Mixer TM-282 (アズワン) を用いて 5 分間攪拌し細胞溶解液を調製した。プレートリーダーで細胞溶解液の蛍光強度 (Ex;  $365 \text{ nm}$  / Em;  $415 \text{ nm}$ ) を測定し蛍光ビーズの取込み

量を求めた。その後、BCA Protein Assay Kit を用いて細胞溶解液のタンパク定量を行い、タンパク量当たりの蛍光ビーズの取り込み量を算出した。

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露

24 時間培養後、HBSS で 2 回洗浄し、HBSS で 500  $\mu$ M に調製した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 1 時間曝露させ、DMEM に交換して再び 24 時間培養し馴化培地を作成した。

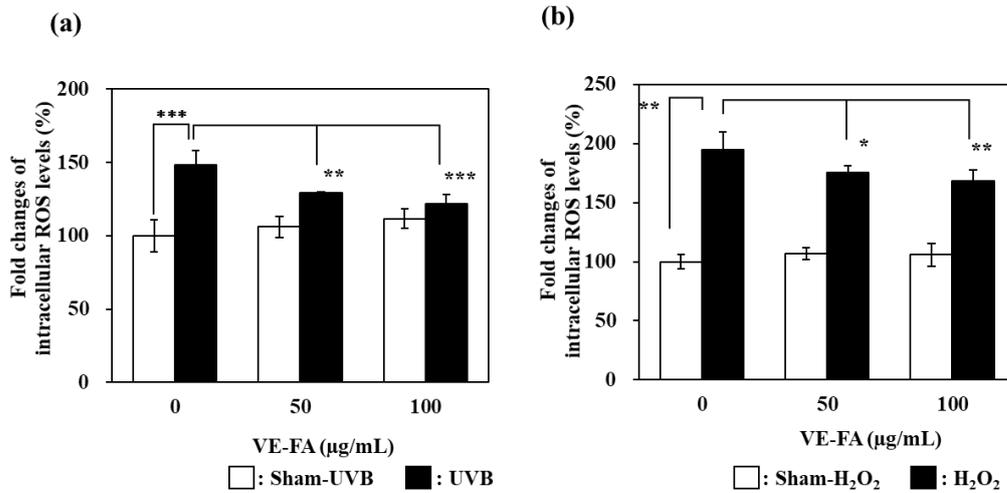
#### **5-2-5. PGE<sub>2</sub>定量**

Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA Monoclonal Antibody (CAYMAN CHEMICAL COMPANY) を用いて、馴化培地中の PGE<sub>2</sub> 量を測定した。BCA Protein Assay Kit を使用してタンパク量を定量し、タンパク量当たりの PGE<sub>2</sub> 量を算出した。

### **5-3. 結果**

#### **5-3-1. HaCaT ケラチノサイトの細胞内 ROS レベルに対する作用**

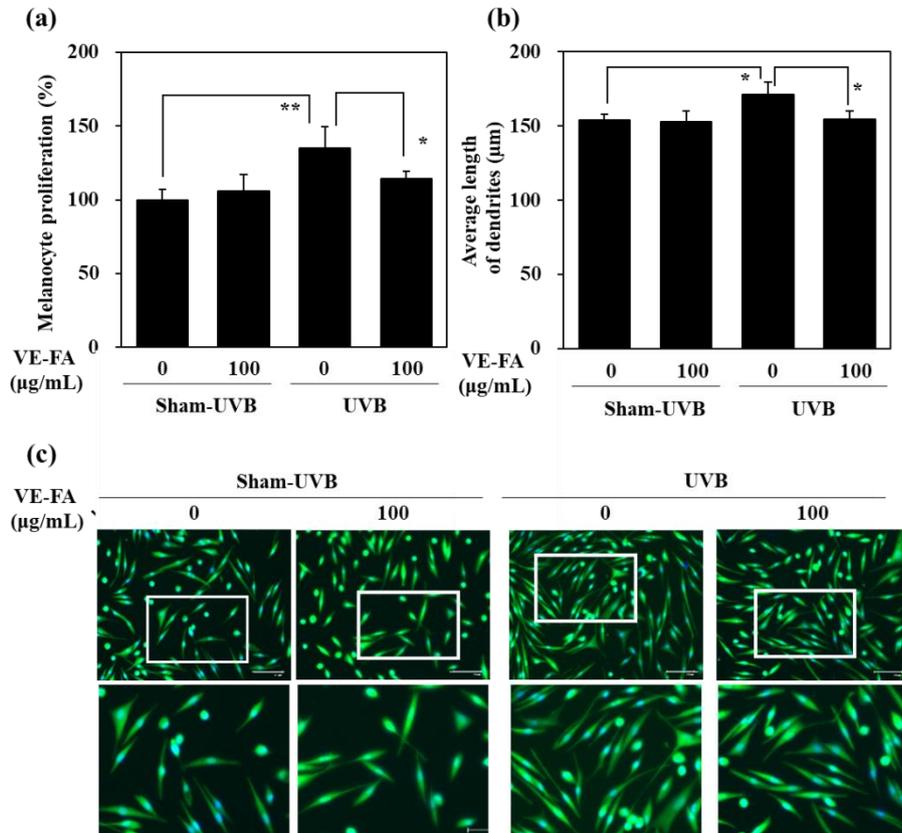
VE-FA の抗酸化作用を評価するために、UVB または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に曝露した HaCaT ケラチノサイトにおける細胞内 ROS レベルを測定した。50 または 100  $\mu$ g/mL の VE-FA を 24 時間前処理した HaCaT ケラチノサイトでは、UVB、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> への曝露後に上昇する細胞内 ROS レベルの有意な上昇抑制効果が確認された (Fig. 5-1a, b)。



**Fig. 5-1 Intracellular ROS levels in keratinocytes exposed to UVB or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Intracellular ROS levels in keratinocytes pretreated with 0, 50 or 100 µg/mL VE-FA for 24 h were measured by the fluorescence of oxidized H<sub>2</sub>DCFDA loaded into cells. After lysing the cells, the fluorescence intensity of each lysate was measured (Ex; 485 nm, Em; 530 nm). Protein levels in each lysate were quantified with a BCA protein assay kit. Intracellular ROS levels are expressed as F.I./µg protein. Data are expressed as means ± S.D. (n=5). Significance: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. a) Keratinocytes were pretreated with or without VE-FA as noted, then exposed to UVB (40 mJ/cm<sup>2</sup>) and loaded with H<sub>2</sub>DCFDA for 30 min. Intracellular ROS levels were measured after further culture for 6 h after UVB irradiation. b) Keratinocytes were pretreated with or without VE-FA as noted, then loaded with H<sub>2</sub>DCFDA for 30 min and then exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM). Intracellular ROS levels were measured after further culture for 15 min.

### 5-3-2. 色素細胞の増殖と樹状突起の伸長

HaCaT ケラチノサイトの分泌する液性因子が色素細胞活性化に及ぼす作用に対する VE-FA の効果を確認することを目的として、色素細胞の増殖および樹状突起伸長を確認した。UVB を曝露した HaCaT ケラチノサイトの馴化培地で培養した色素細胞は細胞増殖が亢進し、樹状突起の伸長が確認された (Fig. 5-2)。一方で、UVB 曝露前に VE-FA で 24 時間培養した HaCaT ケラチノサイトの馴化培地で培養した色素細胞では、増殖および樹状突起の伸長の抑制が示された (Fig. 5-2)。

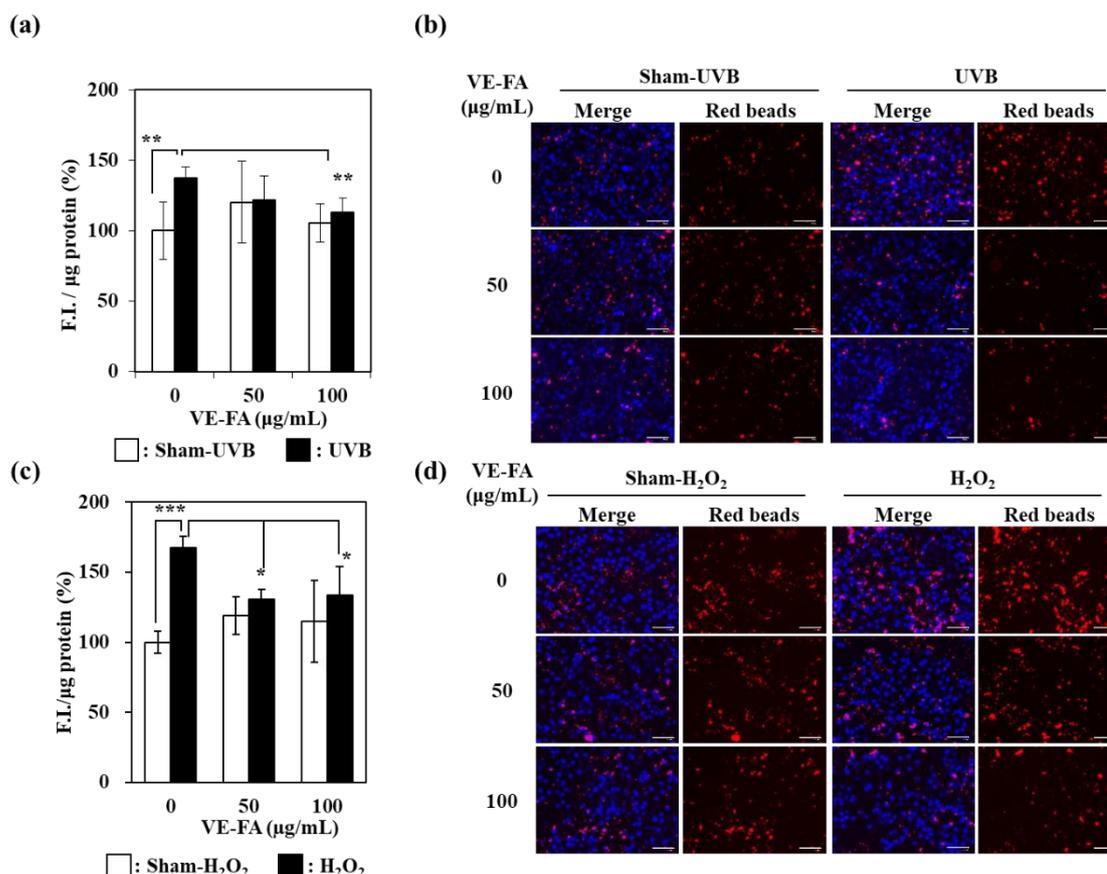


**Fig. 5-2 Proliferation and elongation of dendrites of NHEMs treated with CM prepared from keratinocytes exposed to UVB.** Keratinocytes were pretreated with 0, 50 or 100 μg/mL VE-FA for 24 h and then were exposed to UVB at an energy density of 40 mJ/cm<sup>2</sup>. CMs were prepared by cultivating the cells in Medium 254 for 24 h. NHEMs were then cultured with each CM for 24 h. a) Proliferation of NHEMs was examined using the MTT assay. Data are expressed as means ± S.D. (n=4). Significance: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. b) Elongation of dendrites of NHEMs was observed with a Fluid Cell Imaging Station after staining with calcein-AM. Lengths of dendrites of NHEMs (40 cells) were digitalized with image analysis (image-J). Data are expressed as means ± S.D. Significance: \*p < 0.05. c) Representative photos of NHEMs treated with each CM. scale bars; 100 μm. Photos at the bottom are magnified images of the areas indicated by the white boxes in the photos at the top.

### 5-3-3. HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズの取り込み

UVB または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露後の HaCaT ケラチノサイトの馴化培地による HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズ貪食能に対する VE-FA の効果を調べることにより、HaCaT ケラチノサイトのメラノソーム取り込みに対する VE-FA の効果を確認した。UVB または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に曝露された HaCaT ケラチノサイトの馴化培地は、HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズの貪食を有意に増加させた。100 μg/mL の VE-FA で 24 時間前処理した HaCaT ケラチノサイトで作成した

馴化培地では、蛍光ビーズの貪食亢進が抑制されることが確認された (Fig. 5-3)。

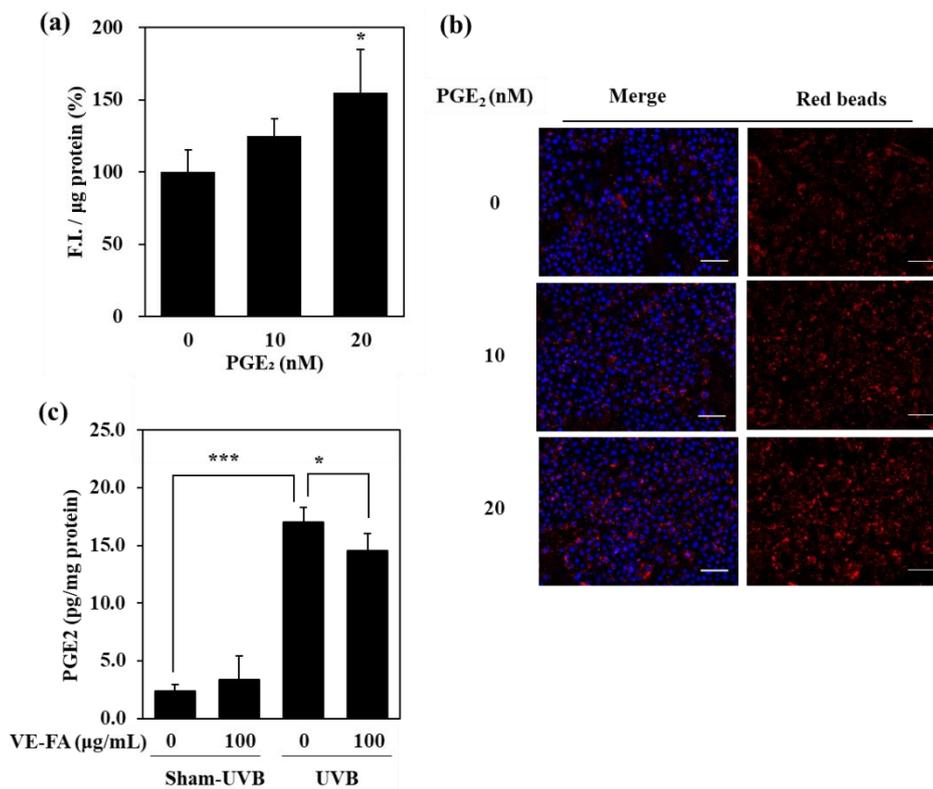


**Fig. 5-3 Incorporation of pseudo-MSs (fluorescent beads) into keratinocytes treated with CM prepared from keratinocytes exposed to UVB or to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Keratinocytes were pretreated with 0, 50 or 100 µg/mL VE-FA for 24 h and then were exposed to UVB (40 mJ/cm<sup>2</sup>) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM) for 30 min. CMs were prepared by cultivating the cells in DMEM for 24 h. Keratinocytes were cultured with a cocktail of each CM and fluorescent beads for 6 h. The incorporation of fluorescent beads was quantified by measuring fluorescence intensity and was observed with a Fluid Cell Imaging Station. a) UVB (40 mJ/cm<sup>2</sup>), c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM) for 30 min. Data are expressed as means ± S.D. (n=5). Significance: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001. b, d) Representative photos of fluorescent beads incorporated into keratinocytes cultured with CM of UVB-exposed or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-exposed keratinocytes, respectively. red: fluorescent beads, blue: nuclei, scale bars; 100 µm

#### 5-3-4. HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズ貪食能に対する PGE<sub>2</sub>の効果

PGE<sub>2</sub>は酸化ストレス条件下でHaCaT ケラチノサイトによって合成される生理活性脂質である。今回、VE-FA の作用機序の一つとして PGE<sub>2</sub>に焦点を当て検討を行った。初めに PGE<sub>2</sub> が HaCaT ケラチノサイトのメラノソーム貪食に及ぼす影響を確認した。10 または 20 nM の

PGE<sub>2</sub>存在下で培養された HaCaT ケラチノサイトは蛍光ビーズの取り込みが有意に増加した。この結果は PGE<sub>2</sub>が HaCaT ケラチノサイトのメラノソーム貪食に関与していることを示唆した。次に UVB 曝露後の HaCaT ケラチノサイトの PGE<sub>2</sub>分泌量の測定と、これに対する VE-FA の効果を確認した。UVB 曝露後の PGE<sub>2</sub>の分泌量は有意に増加し、VE-FA はこれを有意に抑制することが確認された (Fig. 5-4)。



**Fig. 5-4 Incorporation of fluorescent beads by PGE<sub>2</sub>-treated keratinocytes and the levels of PGE<sub>2</sub> in UVB exposed keratinocytes.** Keratinocytes were cultured in DMEM in the presence of 0, 10 or 20 nM PGE<sub>2</sub> and red or blue fluorescent beads for 6 h. The incorporation of blue fluorescent beads was quantified by measuring the fluorescence intensity and was observed using a Floid Cell Imaging Station. a) Incorporation of blue fluorescent beads was quantified by measuring the fluorescence. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5). Significance: \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01. b) Representative photos of red fluorescent beads incorporated into keratinocytes. nuclei stained blue with Hoechst 33342, scale bars; 100  $\mu$ m. c) Levels of PGE<sub>2</sub> in the CM of UVB-exposed HaCaT keratinocytes pretreated with or without VE-FA were quantified using an ELISA. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5). Significance: \* $p$  < 0.05, \*\*\* $p$  < 0.001.

#### 5-4. 考察

本章では、VE-FA が UVB 曝露による HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズ (擬似メラノソーム) の取り込みを抑制し、色素細胞の活性化を阻害する結果が示された。紫外線は ROS の強いイニシエーターであることが報告されていることから、ROS が皮膚の色素沈着に顕在化に関与していると考えられている。一般的に、トコフェロールエステルは、クロマン環の OH 基が抗酸化作用を発揮することから、その OH の水素がエステル化によって失われるため抗酸化特性を失うとされている。そのため、初めに UVB または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に曝露された HaCaT ケラチノサイトの細胞内 ROS レベルを確認することでプロビタミン E としての VE-FA の効果を確認した。VE-FA を前処理した HaCaT ケラチノサイトでは UVB または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により上昇する細胞内 ROS レベルを有意に抑制することが確認された。次に、HaCaT ケラチノサイト由来液性因子による色素細胞活性化に対する VE-FA の効果を確認した。VE-FA を前処理した HaCaT ケラチノサイトの馴化培地は、UVB 曝露による細胞増殖と樹状突起の伸長を抑制した。さらに、VE-FA は UVB および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露により亢進する HaCaT ケラチノサイトの蛍光ビーズの貪食抑制効果を示した。UVB および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露 HaCaT ケラチノサイトから分泌される液性因子として PGE<sub>2</sub> がある。そこで、PGE<sub>2</sub> 処理した HaCaT ケラチノサイトは蛍光ビーズの貪食が有意に増加することが確認された。また、VE-FA の UVB 曝露後の HaCaT ケラチノサイトにおける PGE<sub>2</sub> 産生量を確認したところ、VE-FA は UVB 曝露により亢進する PGE<sub>2</sub> の分泌を抑制することが確認された。

#### 5-5. 結論

これらの結果をまとめると、VE-FA は UVB 曝露後の HaCaT ケラチノサイトで亢進する PGE<sub>2</sub> 分泌を抑制することで、色素細胞の活性化および HaCaT ケラチノサイトのメラノソーム貪食を抑制し抗色素沈着剤として有効な可能性が示された。またこれらのメカニズムは VE-FA の細胞内 ROS 抑制効果による結果であると考えられる。

## 第6章 総括

飛躍的な医療技術の発展に伴い平均寿命は今後も延長することが予想される。皮膚は、年齢印象に直接影響を及ぼす臓器である。健康的な皮膚の維持は男女ともに若々しい印象を他者に与えることから、健康で且つ若々しい皮膚を維持するための抗老化スキンケアは永遠のテーマである。そのためには、皮膚老化のメカニズムを解明し、そのメカニズムに対応するスキンケアを確立、実施することが必要であり、その結果、人々の ADL(日常生活動作)や QOL(生活の質) の維持・向上に繋がると考えられる。

皮膚は生体の最外層に位置することで、外的な環境因子に常に曝されている特殊な器官である。これまでの研究により皮膚老化は太陽光線の紫外線により加速されることが明らかにされており、これらの老化は加齢に伴う老化と区別して光老化として定義されている。

本研究は、UVA を複数回照射し光老化の表現型を発現した光老化モデル線維芽細胞を作成し、光老化皮膚の特徴であるシワ、色素斑の形成を中心に、皮膚を構成する細胞間の相互作用を明らかにし、それに対する改善策を提案することを目的として行った。さらに、本研究は UVB 照射したケラチノサイトへの MS の移送におけるケラチノサイトの分泌成分のオートクライン的な作用、ケラチノサイトと色素細胞の相互作用に注目した素材の作用評価による改善策の提案も目的として行った。

第1章では、UVA を連続照射した線維芽細胞の形質変化を明らかにし光老化モデル線維芽細胞として今後の研究に使用可能であるかについての検証を行った。UVA を  $3 \text{ J/cm}^2$  の照射強度にて1日1回、4日間連続照射した線維芽細胞は SA- $\beta$ -ガラクトシターゼの陽性細胞の増加を示した。若年者由来細胞と比較して、高齢者由来の細胞では、細胞の増殖能力が低くなることが報告されており、さらに増殖能力が低下した細胞では SA- $\beta$ -ガラクトシターゼ陽性率が増加することが確認されている。よって、増殖能の低下を老化の形質として考えた時、SA- $\beta$ -ガラクトシターゼの陽性率は細胞老化マーカーとして認知されている。このことから、複数回 UVA を照射した線維芽細胞では細胞老化が誘導されていることが認められた。さらに複数回 UVA 照射した線維芽細胞では、細胞内レドックスを制御する Nrf2 と抗酸化関連遺伝子である  $\gamma$ GCS、CAT、HOMX1 も有意な発現低下を示した。この事実は、複数回 UVA を照射した線維芽細胞は抗酸化防御能の低下を示し、ROS により引き起こされる酸化ストレスの影響を容易に受ける状態にあることが示唆される。事実、複数回 UVA を照射した線維芽細胞では、細胞内 ROS レベル、カルボニルタンパクレベルの増加が認められた。さらに、複数回 UVA 照射した線維芽細胞では、コラーゲンおよび弾性線維形成に関与する遺伝子発現が有意に低下し、これら線維の分解に関与する遺伝子の発現は増加していることが確認された。

次にオートファジーの観点から複数回 UVA 照射線維芽細胞の評価を行った。細胞内バルク分解系として働くオートファジーは、細胞質内の代謝回転を担っていることから、オート

ファジー活性が低下すると変成タンパク質や異常なミトコンドリアなどの細胞内蓄積が起こる。異常なミトコンドリアは細胞内に過剰な ROS を放出し細胞障害を加速すると考えられる。オートファジー機能低下と老化の関係については多くの研究が行われており、老化細胞ではオートファゴソームの形成不全やリソソーム内のタンパク質分解酵素の活性低下などにより実質的な不要タンパク質および機能不全を示す細胞内小器官の蓄積が観察される。これまでの皮膚におけるオートファジーについての報告として、高齢者由来皮膚では若年者由来皮膚と比較してオートファゴソームの増加が報告されている。複数回 UVA 照射線維芽細胞では、LC3-IIの増加にオートファゴソームの存在増加が観察されているのにもかかわらず、オートファジー基質である p62 タンパク質の蓄積も確認されたことからオートファジー機能の不全が認められた。一方、複数回 UVA 照射線維芽細胞では LAMP1 タンパク質発現の増加およびリソソーム数の増加が確認された。さらに、オートファゴソームと LAMP1 タンパク質の共存が確認され、オートリソソームの形成も観察された。そこで Atg 関連遺伝子の発現を確認したところ LC3 のみの発現が亢進し、そのほかの遺伝子発現は有意な変化を示さなかった。これらの結果から、複数回 UVA 照射線維芽細胞においてもオートリソソームまでの経路は進行しているが、タンパク質分解機能が低下している可能性が考えられた。そこで、リソソーム機能について確認を行った。HCQ はリソソーム内 pH を上昇させることによりオートファジー機能を低下させるオートファジー阻害剤である。HCQ 処理を行った線維芽細胞では、オートファゴソームおよびリソソームの増加、LC3-II、p62 タンパク質発現、Atg 関連遺伝子発現について複数回 UVA 照射線維芽細胞と同様の挙動が確認された。最後に、複数回 UVA 照射線維芽細胞におけるリソソーム活性およびカテプシン活性を測定したところ有意な活性低下が認められた。これらの結果は、実際に報告されている高齢者由来の露光部皮膚においてオートファゴソーム数が増加する結果と類似する。以上の結果をまとめると、UVA を連続照射した複数回 UVA 照射線維芽細胞はリソソーム機能不全に由来するオートファジー機能の低下を示し、複数回 UVA 照射線維芽細胞が光老化モデル線維芽細胞のモデルとしてオートファジー機能の観点からも確認された。

これらの線維芽細胞の形質は、すでに報告されている光老化皮膚より単離した線維芽細胞の形質と一致を示し、光老化皮膚の組織学的変化の誘導を示唆したことから、複数回の UVA 照射は線維芽細胞の形質を光老化皮膚の真皮に存在する線維芽細胞の形質にシフトしたものと考えられる。よって、複数回 UVA 照射した線維芽細胞は光老化誘導された線維芽細胞であることが結論付け、この光老化モデル線維芽細胞を用いて以後の検討を進めることとした。(第1章)

第2章では、光老化モデル線維芽細胞の線維形成能の変化に対する効果を明らかにすることでトラネキサム酸 (TA) のアンチエイジング効果を確認した。TA は、1962年に開発された天然には存在しない合成アミノ酸であり<sup>83)</sup>、プラスミン活性阻害を基本機能とする止血剤・抗炎症剤として出血の予防・治療に用いられる。また、医薬部外品有効成分として

1995年に肌荒れ防止主剤、2002年に美白主剤として認可されている。TAの美白主剤としての作用機序は、紫外線などの酸化ストレスによってケラチノサイトから放出され、色素細胞を活性化するPGE<sub>2</sub>の合成阻害と考えられている。光老化モデル線維芽細胞ではPGE<sub>2</sub>産生量が有意に亢進していることが確認され、PGE<sub>2</sub>はコラーゲン線維および弾性線維の形成能を抑制することが確認された。さらに、2週間のPGE<sub>2</sub>添加培養ではSA-β-ガラクトシターゼの陽性細胞率が增加することも認められた。これらの事実から、過剰に合成されるPGE<sub>2</sub>はコラーゲン線維および弾性線維の形成低下に寄与し光老化皮膚形成の進行に関与している可能性が示唆された。一方、TAは、光老化モデル線維芽細胞で亢進するPGE<sub>2</sub>の産生を有意に抑制し、コラーゲン線維、弾性線維の減少および分解を抑制することによる真皮マトリックスの構造変化を抑制した。以上の結果をまとめる、既に肌荒れ防止主剤、美白主剤として良く知られ、汎用されてきたTAには、光老化モデル線維芽細胞の過剰なPGE<sub>2</sub>合成を抑制することにより真皮マトリックスの線維形成の低下を改善し、光老化皮膚の進行を抑制するアンチエイジング剤としての可能性が見いだされた。(第2章)

太陽光への慢性的な曝露により顕在化する老人性色素斑部位では、老化の形質を示す線維芽細胞の存在と基底膜の損傷が報告されている。そこで第3章では、光老化モデル線維芽細胞が色素斑形成に及ぼす作用を明らかにすることを目的として、線維芽細胞と色素細胞の相互作用について確認を行った。第1章で作成した光老化モデル線維芽細胞の馴化培地を用いて色素細胞を培養し、細胞機能に与える影響を評価したところ、光老化モデル線維芽細胞の馴化培地で培養した色素細胞は、老化を誘導していない線維芽細胞の馴化培地と比較して高い細胞増殖、樹状突起の伸長、チロシナーゼ遺伝子発現の増加が確認された。さらに、光老化モデル線維芽細胞と共培養した表皮メラニンモデルはUVA未照射線維芽細胞と共培養した場合と比較してメラニン産生量の増加が確認された。興味深いことに、コントロールの線維芽細胞の馴化培地では新鮮な培地に比較して有意な細胞増殖の低下が確認された。この結果から、線維芽細胞は定常時には色素細胞の活性を抑制的に制御する因子を分泌している可能性が考えられた。

一方、TAを処理した光老化モデル線維芽細胞で作成した馴化培地で培養した色素細胞では活性化が抑制された。第2章の結果からTAは光老化モデル線維芽細胞のPGE<sub>2</sub>産生量を抑制することが確認されており、第3章での光老化モデル線維芽細胞の馴化培地による色素細胞活性化には、PGE<sub>2</sub>が強く関与していることが示唆される。TA含有培地で培養した光老化モデル線維芽細胞と共培養した色素細胞含有表皮モデルでは、メラニン産生量の亢進の抑制が確認された。これはTAが光老化モデル線維芽細胞のPGE<sub>2</sub>産生を抑制しただけではなく、UVA連続照射による線維芽細胞の老化形質発現を抑制したことにも起因している可能性が示唆される。これらの結果から、光老化モデル線維芽細胞は色素細胞に作用することで色素斑形成を亢進している可能性が示唆され、TAは、慢性的なUVA照射による線維芽細胞の老化形質の発現抑制、さらに光老化モデル線維芽細胞からPGE<sub>2</sub>の過剰合成を抑

制することによる色素斑形成の顕在化、維持を改善する新しい作用を有している可能性が見いだされた。(第3章)

第4章ではUVB照射によるMSのケラチノサイトへの移送にはROSにより合成が刺激される $\alpha$ -MSHが関与していることを見出した。一般的に、UVB曝露後のケラチノサイトのMS貪食活性は、PAR2によって制御されていると考えられているが、ケラチノサイトが分泌する因子が周辺細胞に作用することで、MSを貪食しやすい環境が維持される可能性が示唆された。UVBおよび $H_2O_2$ を曝露したケラチノサイトの馴化培地で培養したケラチノサイトでは、擬似MSである蛍光ビーズの貪食が亢進されることが確認され、UVBおよび $H_2O_2$ 曝露したケラチノサイトでは、 $\alpha$ -MSH前駆タンパクであるPOMCの遺伝子発現が亢進されていることが確認された。西洋カボチャ種子エキス: RPS (*Cucurbita maxima*) を処理したケラチノサイトではNrf2の核内移行の亢進と遺伝子発現の増加が確認され、さらにHO-1、 $\gamma$ -GCSの遺伝子発現の亢進も確認された。RPSは細胞内の抗酸化システムを増強することで、UVBおよび $H_2O_2$ で亢進するPOMCの遺伝子発現の亢進を抑制し、ケラチノサイトの蛍光ビーズ貪食抑制に効果を示したと考えられる。以上の結果から、RPSはMSのケラチノサイトへの移送抑制による色素沈着の出現をおさえる美白剤として有用である可能性が見いだされた。(第4章)

第5章では、VE-FAがUVB曝露によるケラチノサイトの蛍光ビーズの取り込み抑制と、色素細胞の活性化を阻害する結果が示された。 $\alpha$ -トコフェロール脂肪酸エステル(VE-FA)を前処理したHaCaTケラチノサイトではUVBまたは $H_2O_2$ により上昇する細胞内ROSレベルを有意に抑制することが確認された。さらに、VE-FAはUVB曝露により亢進する $PGE_2$ の分泌を抑制することが確認された。VE-FAを前処理したHaCaTケラチノサイトの馴化培地は、UVB曝露による色素細胞の細胞増殖と樹状突起の伸長を抑制した。VE-FAはUVBおよび $H_2O_2$ 曝露後により亢進するケラチノサイトの蛍光ビーズの貪食抑制効果を示した。 $PGE_2$ 処理したHaCaTケラチノサイトは蛍光ビーズの貪食が有意に増加することが確認されたことから、VE-FAはUVB曝露後のケラチノサイトの細胞内ROSの亢進を抑制し、 $PGE_2$ 分泌を抑制することにより色素細胞の活性化およびケラチノサイトのメラノソーム貪食を抑制し抗色素沈着剤として有効な作用を示す可能性が示された。(第5章)

本研究は、慢性的な紫外線曝露により進行する光老化皮膚形成には皮膚に存在する細胞間の相互作用が関与していること、既に多く使用されている化粧品原料がこれらの予防、改善に有効であることを見出した。複数回UVAを照射した真皮線維芽細胞は、光老化皮膚の真皮に存在する線維芽細胞の形質発現を示したことから、光老化モデル線維芽細胞となりうることを確認された。また、光老化モデル線維芽細胞ではリソソームの活性低下によるオートファジー機能の低下が確認され、オートファジー機能の観点からも光老化モデル線維

芽細胞として適切であることが確認された。UVA を連続照射した光老化モデル線維芽細胞は、第 1、2 章で示したように真皮コラーゲン線維および弾性線維形成不全が認められた。この事実を総合的に考えると、光老化モデル線維芽細胞は細胞内に生じる不要タンパクを効率的に分解することができず、細胞内で garbage-stress が生じることにより真皮線維再生機能低下に陥る可能性が示唆された。しかしながら、現時点ではオートファジーの機能低下が老化によって引き起こされたのか、あるいはオートファジーの機能低下により老化の形質が現れたのかは定かではない。この因果関係の解明は、今後の皮膚老化研究において重要であることから、さらに詳細な検討を続けたいと考える。

これまで、色素斑の形成はケラチノサイトと色素細胞の関連がメインであると考えられてきた。本研究において、光老化モデル線維芽細胞も色素細胞を活性化することが確認され、ターンオーバーの早いケラチノサイトと比較して、色素斑部位の真皮に老化の形質を持つ線維芽細胞が存在し続けることは、色素斑が滞留する一つの原因となっている可能性が示唆される。

また、色素斑形成におけるケラチノサイト同士の相互作用として UVB 照射による ROS が MS 貪食亢進を誘導する成分を分泌しケラチノサイトの MS 貪食を亢進することが確認された。そしてこれは、ケラチノサイトが分泌する色素細胞活性化因子である  $\alpha$ -MSH や  $\text{PGE}_2$  がオートクライン的に作用している可能性が示された。

本学位論文研究では、光により加速される皮膚老化の皮膚に存在する細胞間の相互作用の存在が明らかにされ、さらに、その相互作用を妨げることにより皮膚老化を予防、改善する素材の提案が行われた。本研究の成果は、高齢化社会に向かう我が国の人たちに若々しく健やかな皮膚の維持を提供した。その結果、高齢者の ADL や QOL の維持・向上を実現し、我が国の活性化につながることを期待する。

## 参考文献

1. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10(3):207-17.
2. Byers HR, Maheshwary S, Amodeo DM, Dykstra SG. Role of cytoplasmic dynein in perinuclear aggregation of phagocytosed melanosomes and supranuclear melanin cap formation in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2003; 121(4):813-20.
3. D T Woodley 1, M Yamauchi, K C Wynn, G Mechanic, R A Briggaman. Collagen telopeptides (cross-linking sites) play a role in collagen gel lattice contraction. *J Invest Dermatol.* 1991; 97(3):580-5.
4. Kazuo Noda, Branka Dabovic, Kyoko Takagi, Tadashi Inoue, Masahito Horiguchi, Maretoshi Hirai, Yusuke Fujikawa, Tomoya O Akama, Kenji Kusumoto, Lior Zilberberg, Lynn Y Sakai, Katri Koli, Motoko Naitoh, Harald von Melchner, Shigehiko Suzuki, Daniel B Rifkin, Tomoyuki Nakamura. Latent TGF- $\beta$  binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(8):2852-7.
5. Ohshima H, Oyobikawa M, Tada A, Maeda T, Takiwaki H, Itoh M, Kanto H. Melanin and facial skin fluorescence as markers of yellowish discoloration with aging. *Skin Res Technol.* 2009;15(4):496-502.
6. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 2007;21(4):976-94.
7. Fukuda M, Kuroda TS, Mikoshiba K. Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem.* 2002;5;277(14):12432-6.
8. Kuroda TS, Fukuda M. Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes. *Nat Cell Biol.* 2004;6(12):1195-203.
9. Scott G, Leopardi S, Printup S, Malhi N, Seiberg M, Lapoint R. Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE2 and PGF2alpha on melanocyte dendricity. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1214-24.
10. Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M, Shapiro SS. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res.* 2000;254: 25-32.

11. Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M, Shapiro SS. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J Invest Dermatol.* 2000; 115(2):162-7.
12. Scott G, Leopardi S, Printup S, Malhi N, Seiberg M, Lapoint R. Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE2 and PGF2alpha on melanocyte dendricity. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1214-24.
13. Giorgia Cardinali , Simona Ceccarelli, Daniela Kovacs, Nicaela Aspite, Lavinia Vittoria Lotti, Maria Rosaria Torrisi, Mauro Picardo. Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2005;125(6):1190-9.
14. Hui-Jun Ma, Guang Zhao, Shao-Xia Zi, Dong-Guang Li, Wen Liu, Qing-Qi Yan. Efficacy of quantifying melanosome transfer with flow cytometry in a human melanocyte-HaCaT keratinocyte co-culture system in vitro. *Exp Dermatol.* 2010;19(8):e282-5.
15. Murase D, Hachiya A, Takano K, Hicks R, Visscher MO, Kitahara T, Hase T, Takema Y, Yoshimori T. Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2013;133(10):2416-2424.
16. Imbow K, Uesugi T. New melanogenesis and photobiological processes in activation and proliferation of precursor melanocytes after UV-exposure: ultrastructural differentiation of precursor melanocytes from Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 1982;78:108-15.
17. Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res.* 2004;17: 96-110.
18. Okazaki M, Yoshimura K, Uchida G, Harii K. Correlation between age and the secretions of melanocyte-stimulating cytokines in cultured keratinocytes and fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2005;153:23-9.
19. Wang Y, Viennet C, Robin S, Berthon JY, He L, Humbert P. Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation. *J Dermatol Sci.* 2017;88(2):159-166.
20. Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, Ichihashi M. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1313:130-8.
21. Virador VM, Muller J, Wu X, Abdel-Malek ZA, Yu ZX, Ferrans VJ, Kobayashi N, Wakamatsu K, Ito S, Hammer JA, Hearing VJ. Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and

- ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *FASEB J.* 2002;16: 105-7.
22. Valencia A, Kochevar IE. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2008;128: 214-22.
  23. Shunsuke Iriyama, Takayuki Ono, Hirofumi Aoki, Satoshi Amano. Hyperpigmentation in human solar lentigo is promoted by heparanase-induced loss of heparan sulfate chains at the dermal–epidermal junction. *J Dermatol Sci.* 2011;64, 223-228.
  24. Yong Li, Dan Lei, William R Swindell, Wei Xia, Shinuo Weng, Jianping Fu, Christal A Worthen, Toru Okubo, Andrew Johnston, Johann E Gudjonsson, John J Voorhees, Gary J Fisher. Age-Associated Increase in Skin Fibroblast-Derived Prostaglandin E2 Contributes to Reduced Collagen Levels in Elderly Human Skin. *J Invest Dermatol.* 2015;135(9):2181-2188.
  25. Utako Yokoyama 1, Susumu Minamisawa, Aki Shioda, Ryo Ishiwata, Mei-Hua Jin, Munetaka Masuda, Toshihide Asou, Yukihiko Sugimoto, Hiroki Aoki, Tomoyuki Nakamura, Yoshihiro Ishikawa. Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation.* 2014;28;129(4):487-96.
  26. Chao Liu, Ping Zhu, Wangsheng Wang, Wenjiao Li, Qun Shu, Zi-Jiang Chen, Leslie Myatt, Kang Sun. Inhibition of lysyl oxidase by prostaglandin E2 via EP2/EP4 receptors in human amnion fibroblasts: Implications for parturition. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;15;424:118-27.
  27. Kausar M Ansari, You Me Sung, Guobin He, Susan M Fischer. Prostaglandin receptor EP2 is responsible for cyclooxygenase-2 induction by prostaglandin E2 in mouse skin. *Carcinogenesis.* 2007;28(10):2063-8.
  28. Schwartz E, Feinberg E, Lebwohl M, Mariani TJ, Boyd CD. Ultraviolet radiation increases tropoelastin accumulation by a post-transcriptional mechanism in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1995;105(1):65-9.
  29. Uitto J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatol Clin.* 1986; 4(3):433-46.
  30. Schwartz E. Connective tissue alterations in the skin of ultraviolet irradiated hairless mice. *J Invest Dermatol.* 1988;91(2):158-61.
  31. Romero Y, Bueno M, Ramirez R, Álvarez D, Sembrat JC, Goncharova EA, Rojas M, Selman M, Mora AL, Pardo A. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell.* 2016;12514.
  32. Murase D, Hachiya A, Fullenkamp R, Beck A, Moriwaki S, Hase T, Takema Y, Manga P. Variation in Hsp70-1A Expression Contributes to Skin Color Diversity. *J Invest Dermatol.* 2016;136(8):1681-91.

33. Egger AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB, Mesecar AD. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. PNAS. 2005;102:10070-5.
34. Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. Toxicology. 2008;246:24-33.
35. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. J Biol Chem. 2000;275: 16023-9.
36. J H Chung, J Y Seo, H R Choi, M K Lee, C S Youn, G Rhie, K H Cho, K H Kim, K C Park, H C Eun. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. J Invest Dermatol. 2001;117(5):1218-24.
37. Y Nishimori, C Edwards, A Pearse, K Matsumoto, M Kawai, R Marks. Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles. J Invest Dermatol. 2001;117(6):1458-63.
38. Shangxi Liu, Katherine Thompson, Andrew Leask. CCN2 expression by fibroblasts is not required for cutaneous tissue repair. Wound Repair Regen. 2014;22(1):119-24.
39. Stefanie Tang, Ralph Lucius, Horst Wenck, Stefan Gallinat, Julia M Weise. UV-mediated downregulation of the endocytic collagen receptor, Endo180, contributes to accumulation of extracellular collagen fragments in photoaged skin. J Dermatol Sci. 2013;70(1):42-8.
40. Song Hua Xuan, Nam Ho Lee, Soo Nam Park. Atractyligenin, a terpenoid isolated from coffee silverskin, inhibits cutaneous photoaging. J Photochem Photobiol B. 2019;194:166-173.
41. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. Exp Gerontol. 2000; 35(3):307-16.
42. Suwabe H, Serizawa A, Kajiwara H, Ohkido M, Tsutsumi Y. Degenerative processes of elastic fibers in sun-protected and sun-exposed skin: immunoelectron microscopic observation of elastin, fibrillin-1, amyloid P component, lysozyme and alpha1-antitrypsin. Pathol. Int, 1999;49, 391-402.
43. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 2009;14,20-24.
44. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, A Yamamoto, T Kirisako, T Noda, E Kominami, Y Ohsumi, T Yoshimori. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. EMBO J. 2000;19:5720-5728.

45. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007;21:2861-2873.
46. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22:124-131.
47. Tashiro K, Shishido M, Fujimoto K, Yuko Hirota, Kazuyuki Yo, Takamasa Gomi, Yoshitaka Tanaka. Age-related disruption of autophagy in dermal fibroblasts modulates extracellular matrix components. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443:167-172.
48. Yoshimoto S, Yoshida M, Ando H, Ichihashi M. Establishment of Photoaging In Vitro by Repetitive UVA Irradiation: Induction of Characteristic Markers of Senescence and its Prevention by PAPLAL with Potent Catalase Activity. *Photochem. Photobiol.* 2018;94:438-444.
49. Noda K, Dabovic B, Takagi K, Inoue T, Horiguchi M, Hirai M, Fujikawa Y, Akama TO, Kusumoto K, Zilberberg L, Sakai LY, Koli K, Naitoh M, von Melchner H, Suzuki S, Rifkin DB, Nakamura T. Latent TGF- $\beta$  binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2013;110:2852-2857.
50. Liu Q, Luo XY, Jiang H, MH Yang, GH Yuan, Z Tang, H Wang. Hydroxychloroquine facilitates autophagosome formation but not degradation to suppress the proliferation of cervical cancer. SiHa cells. *Oncol Lett.* 2014;7:1057-1062.
51. Tashiro K, Shishido M, Fujimoto K, Hirota Y, Yo K, Gomi T, Tanaka Y. Age-related disruption of autophagy in dermal fibroblasts modulates extracellular matrix components. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443:167-172.
52. Y Ogura, Y Matsunaga, T Nishiyama, S Amano. Plasmin induces degradation and dysfunction of laminin 332 (laminin 5) and impaired assembly of basement membrane at the dermal-epidermal junction. *Br J Dermatol.* 2008; 159: 49-60
53. K Kadoya, T Sasaki, G Kostka, R Timpl, K Matsuzaki, N Kumagai, L Y Sakai, T Nishiyama, S Amano. Fibulin-5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis. *Br J Dermatol.* 2005;153(3):607-12.
54. Shinji Inomata, Yukiko Matsunaga, Satoshi Amano, Keiko Takada, Kouji Kobayashi, Makoto Tsunenaga, Toshio Nishiyama, Yoshiyuki Kohno, Minoru Fukuda. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol.* 2003;120(1):128-34.
55. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2009;14, 20-24.
56. Varani J, Schuger L, Dame MK, Leonard C, Fligel SE, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin. *J. Invest. Dermatol.* 2004;122, 1471-1479.

57. Lim TG, Jung SK, Kim JE, Kim Y, Lee HJ, Jang TS, Lee KW. NADPH oxidase is a novel target of delphinidin for the inhibition of UVB-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 2013;22, 428-430.
58. W C Chang 1, G Y Shi, Y H Chow, L C Chang, J S Hau, M T Lin, C J Jen, L Y Wing, H L Wu. Human plasmin induces a receptor-mediated arachidonate release coupled with G proteins in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1993;264:C271-81.
59. Li D, Shi Y, Li M, Liu J, Feng X. Tranexamic acid can treat ultraviolet radiation-induced pigmentation in guinea pigs. *Eur. J. Dermatol.* 2010;20,289-292.
60. Desai S, Ayres E, Bak H, Manco M, Lynch S, Raab S, Du A, Green DT, Skobowiat C, Wangari-Talbot J, Zheng Q. Effect of a Tranexamic Acid, Kojic Acid, and Niacinamide Containing Serum on Facial Dyschromia: A Clinical Evaluation. *Clin. Trial J. Drugs Dermatol,* 2019;18,454-459.
61. Li Y, Lei D, Swindell WR, Xia W, Weng S, Fu J, Worthen CA, Okubo T, Johnston A, Gudjonsson JE, Voorhees JJ, Fisher GJ. Age-Associated Increase in Skin Fibroblast-Derived Prostaglandin E2 Contributes to Reduced Collagen Levels in Elderly Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 2015;135,2181-2188.
62. Rundhaug JE, Fischer SM. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* 2008;84,322-329.
63. Yokota M, Yahagi S, Tokudome Y, Masaki H. Chimyl Alcohol Suppresses PGE 2 Synthesis by Human Epidermal Keratinocytes through the Activation of PPAR- $\gamma$ . *J. Oleo Sci.,* 2018;67,455-462.
64. Chang WC, Shi GY, Chow YH, Chang LC, Hau JS, Lin MT, Jen CJ, Wing LY, Wu HL. Human plasmin induces a receptor-mediated arachidonate release coupled with G proteins in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1993;264, C271.
65. Maeda K, Naganuma M. Topical trans-4-aminomethylcyclohexanecarboxylic acid prevents ultraviolet radiation-induced pigmentation. *J. Photochem. Photobiol. B,* 1998;47,136-141.
66. Liu C, Zhu P, Wang W, Li W, Shu Q, Chen ZJ, Myatt L, Sun K. Inhibition of lysyl oxidase by prostaglandin E2 via EP2/EP4 receptors in human amnion fibroblasts: Implications for parturition. *Mol. Cell Endocrinol,* 2016;424,118-127.
67. Kausar M Ansari, You Me Sung, Guobin He, Susan M Fischer. Prostaglandin receptor EP2 is responsible for cyclooxygenase-2 induction by prostaglandin E2 in mouse skin. *Carcinogenesis.* 2007;28(10):2063-8.
68. Z S Katusic. Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):443-8.
69. M K O'Banion. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol.* 1999;13(1):45-82.

70. Christina S Sander, Hong Chang, Susann Salzmann, Cornelia S L Müller, Swarna Ekanayake-Mudiyansele, Peter Elsner, Jens J Thiele. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2002;118(4):618-25.
71. Shunsuke Iriyama, Takayuki Ono, Hirofumi Aoki, Satoshi Amano. Hyperpigmentation in human solar lentigo is promoted by heparanase-induced loss of heparan sulfate chains at the dermal–epidermal junction. *J Dermatol Sci.*2011;64,223-228.
72. Scott G, Leopardi S, Printup S, Malhi N, Seiberg M, Lapoint R. Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE2 and PGF2alpha on melanocyte dendricity. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1214-24.
73. Quan, T., Shin, S., Qin, Z., Fisher, G.J. Expression of CCN family of genes in human skin in vivo and alterations by solar-simulated ultraviolet irradiation. *J. Cell Commun. Signal.* 2009;3:19–23.
74. Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, Ichihashi M. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1313:130-8.
75. Valencia A, Kochevar IE. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2008;128:214-22.
76. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:715-48.
77. Masaki H, Okano Y, Ochiai Y, Obayashi K, Akamatsu H, Sakurai H. alpha-tocopherol increases the intracellular glutathione level in HaCaT keratinocytes. *Free Radic Res.* 2002;36:705-9.
78. Ochiai, Y., Kaburagi, S., Obayashi, K., Ujiie, N., Hashimoto, S., Okano, Y., Masaki, H., Ichihashi, M., Sakurai, H.: A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP), prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. *J Dermatol Sci.,* 2006;44:37-44.
79. Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D.: The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol.,*2013; 64:409-421.
80. Ma, H.J., Ma, H.Y., Yang, Y., Li, P.C., Zi, S.X., Jia, C.Y., Chen, R.: a-Melanocyte stimulating hormone (MSH) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) drive melanosome transfer by promoting filopodia delivery and shedding spheroid granules: Evidences from atomic force microscopy observation. *J Dermatol Sci.,* 2014;76:222-230.
81. Ishikawa, Y., Niwano, T., Hirano, S., Numano, K., Takasima, K., Imokawa, G.: Whitening effect

of L-ascorbate-2-phosphate trisodium salt on solar lentigos. Arch Dermatol Res., 2019;311:183-191.

82. Masaki, H., Okano, Y., Ochiai, Y., Obayashi, K., Akamatsu, H., Sakurai, H.: alpha-tocopherol increases the intracellular glutathione level in HaCaT keratinocytes. Free Radic Res., 2002;36:705-709.
83. Okamoto S, Sato S, Takada Y, Okamoto U. AN ACTIVE STEREO-ISOMER (TRANS-FORM) OF AMCHA AND ITS ANTIFIBRINOLYTIC (ANTIPLASMINIC) ACTION IN VITRO AND IN VIVO. Keio J Med. 1964;13:177-85.

## 謝辞

本研究の実施において、終始ご丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました東京工科大学応用生物学部 正木仁 教授に心から感謝を申し上げます。また、実験の進行にあたってご指導を受け賜りました株式会社 CIEL 岡野由利 博士、水谷多恵子 博士に御礼申し上げます。

第 5 章の実験に携わってくださった東京工科大学光老化研究室卒業生の大澤鈴菜 様に感謝いたします。

さらに、東京工科大学での研究の機会を与えて下さり、ご指導と励ましの言葉を下さった日本精化株式会社 大橋幸浩 様、勝間田祐貴 様をはじめとする化粧品研究開発部の皆様、武庫川女子大学薬学部 仁木洋子 准教授に深く感謝いたします。