

「博士学位論文」

表皮ヒアルロン酸合成制御機構の解明

佐用 哲也

論文要旨

表皮ヒアルロン酸合成制御機構の解明

研究分野 生 化 学
紹介教授 野水 基義
学位申請者 佐用 哲也

ヒアルロン酸(HA)は、N-アセチルグルコサミン(NAG)とグルクロン酸(GlcA)の二糖が交互に結合した高分子多糖で、哺乳動物の結合組織に広く存在するグリコサミノグリカンのひとつである。その分子量は 10^7 Da にも及び、構成単糖のもつ水和能に加え、オーバーラップした三次元ネットワークが水分子を束縛することにより、高い水和体積を獲得する。HA は水和ゲルとして組織の水分保持を担い、また組織に機械的特性を賦与する。皮膚真皮に存在する HA は、細胞外マトリックスを構築する分子として機能する一方で、表皮の HA は重層した表皮細胞の細胞間隙に存在して細胞間スペースを維持し、細胞の増殖や分化に寄与する。皮膚の HA は生体 HA の約 50%を占めるが、加齢により減少することが知られている。細胞の増殖・分化といった基本的な細胞機能に関与する HA の減少は、皮膚機能の低下に関わると考えられ、HA 代謝制御剤は抗老化機能性素材として有望である。

皮膚 HA の半減期は 0.5-1.5 日と短く、そのターンオーバーを担う HA 合成系は、厳密に制御されていると推測される。HA 合成酵素(HAS)には 3 種のアイソザイムが存在することが知られているものの(HAS1, HAS2, HAS3)、ヒト表皮において、いずれのアイソザイムにより HA 合成が調節されているかは不明である。

本申請論文では、表皮 HA の合成制御機構を明らかにするとともに、抗老化機能性素材につながる化合物を探索することを目的とし、以下の 3 章において正常ヒト表皮細胞における HA 合成制御因子の作用機構を詳細に検討した。

第 1 章 HA 合成酵素遺伝子 (HAS) 発現変動による HA 合成制御

ヒト表皮細胞の HA 合成を惹起するサイトカインとして IFN- γ 、逆に抑制するサイトカインとして TGF- β を見出した。それぞれのサイトカイン刺激後の HAS 遺伝子の発現について検討したところ、HA 合成変動と一致した発現挙動を示したのは、表皮細胞でドミナントに発現する HAS3 mRNA であった(Fig. 1)。表皮ヒアルロン酸合成を促進させるレチノイン酸の刺激でも HAS3 遺伝子の顕著な発現誘導が観察された。これらの結果から表皮 HA の合成は、3 種の HAS 遺伝子のうち、主に HAS3 遺伝子の発現を介して制御されると考えられた。

ヒト真皮線維芽細胞において HA 合成を調節する合成酵素遺伝子は、主に HAS2 であることから、表皮と真皮では HAS の発現パターンが異なると推測される。表皮細胞の

HA 合成を抑制した TGF- β は、線維芽細胞では主に *HAS2* mRNA 発現誘導を介して HA 合成を促進する。TGF- β が、表皮細胞の増殖を抑制し、逆に線維芽細胞の増殖を促進するサイトカインであることを考えあわせると、TGF- β によるHA合成制御は、細胞増殖時にスペースを確保するという HA の役割を支持する応答であると考えられた。

ヒト表皮細胞により合成される HA 分子量サイズは、サイトカインによる刺激の有無に関わらず、高分子量 ($>1 \times 10^6$ Da) であった。したがって、*HAS3*により合成される HA の分子量サイズは、高分子であると考えられた。

本研究により、表皮細胞における HA の合成制御には、3 種の *HAS* 遺伝子のうち主に *HAS3* 遺伝子の発現が重要な役割を担っていることが明らかになった。表皮における速い HA のターンオーバーを勘案すると、合成機構だけでなく分解機構の解明も必要である。

第2章 レチノイン酸レセプターを介した HA 合成制御

レチノイン酸(RA)はビタミン A の活性本体で、細胞増殖および分化の制御に重要な役割を演ずるが、その前駆体は β -カロテンや β -クリプトキサンチンに代表される食餌性のプロビタミン A カロテノイドである。 β -カロテンが RA と同様に、*HAS3* mRNA の発現を誘導すること、加えてその HA 合成誘導が レチノイン酸レセプター (RAR)拮抗薬である LE540 により阻害されたことにより、表皮細胞におけるプロビタミン A から RA に至る代謝経路の存在が示された。一方、哺乳類ではレチノイドに代謝されないルテイン、ゼアキサンチンおよびアスタキサンチンなどのノンプロビタミン A カロテノイドにも *HAS3* mRNA 発現誘導活性およびその発現挙動と一致する HA 合成の誘導が観察された。HA 合成に及ぼすルテインの効果は β -カロテンと同様、LE540 で抑制された。ルテインによる刺激後に RARE 依存の転写活性が増大したことから(Fig. 2),

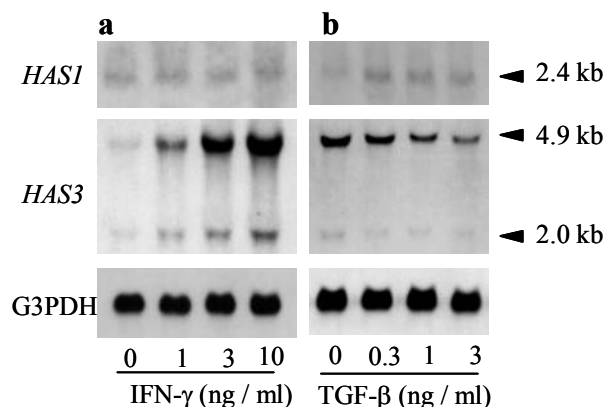


Fig. 1 The *HAS3* transcript level of human keratinocytes was upregulated by IFN- γ but downregulated by TGF- β in a dose-dependent manner. Human keratinocytes were cultured in various concentrations of IFN- γ (a) or TGF- β (b).

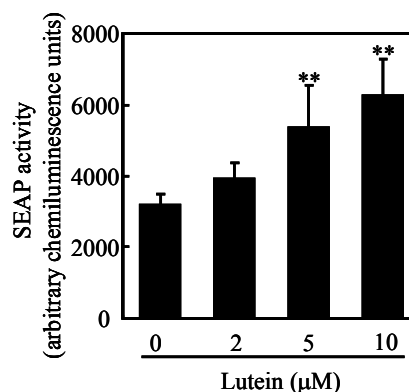


Fig. 2 Effect of lutein on RAR activation. Significantly different from the control value; ** $P < 0.01$ (William's test).

ルテインの代謝物あるいはルテイン自体が RAR のリガンドとして機能していることが示された。さらに表皮細胞での HA 合成に対するルテインの効果が、レチナール脱水素酵素(RALDH)の阻害剤であるシトラールにより抑制されたことから、ルテインはプロビタミン A 同様、表皮細胞内でアルデヒド化合物に変換され、続いて酸化反応を受けて RA 類似体に代謝されることで生理活性を発揮させることが示唆された。

第3章 細胞内 HA 基質プールの変動による HA 合成制御機構

表皮細胞の HA 合成を高める化合物として、N-アセチルグルコサミン(NAG)を見出した。細胞内には複合糖質のリソソーム分解物として NAG が存在する。この NAG は、NAG キナーゼ(NAGK)により NAG6-リン酸に、最終的には糖供与体である UDP-NAG に変換されることで、糖タンパクや糖脂質の糖付加に再利用される。

表皮細胞で NAGK mRNA の発現を認め、さらに NAG の添加により細胞内 UDP-NAG 量が増加したことから(Fig. 3), NAG の HA 産生促進作用は、細胞内基質の増大によるものであることが示された。加えて、HA 生合成過程において基質の合成が律速になっていると考えられた。表皮細胞に RA と NAG を同時に作用させることにより、相乗的な HA 合成促進効果を認めたことから、HA のもう一つの糖供与体である UDP-GlcA の細胞内プールは、HA 合成の律速にはなっていないことが示唆された。

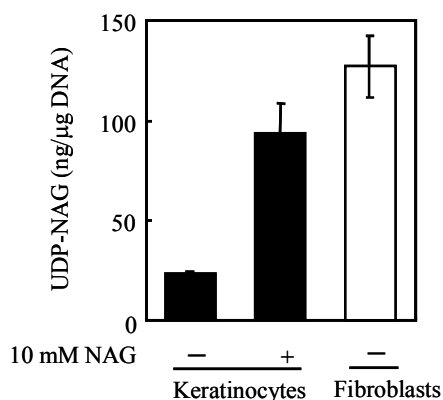


Fig. 3 Effect of NAG on UDP-NAG pools.

次に、NAG の細胞内取り込みについても検討した。NAG の取り込みはグルコーストランスポーター (GLUT)を介するものでなく、単純拡散により取り込まれると予想し、細胞内で NAG へと変換可能な親油性の NAG グリコシド誘導体を合成・評価した。NAG グリコシド誘導体は NAG に比して低濃度域で作用を示した。この結果は、NAG が単純拡散により細胞内に取り込まれることを示唆した。

これらの結果から、HA の合成調節が転写レベルだけでなく、細胞や組織においては細胞内基質レベルにおいても制御されることが示唆された。

以上、Fig. 4 に示すように、表皮 HA 代謝に関わる新たな知見について記載した。

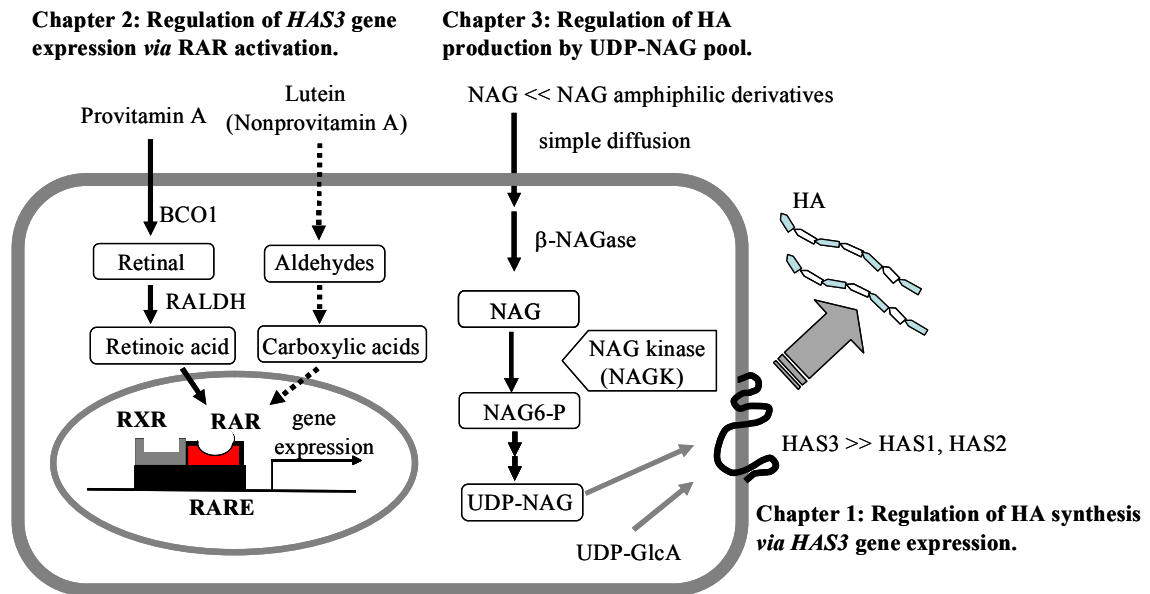


Fig. 4 Regulation of HA synthesis in keratinocyte.

まず、表皮の転写レベルにおける HA 合成の制御は主に *HAS3* mRNA が担うことを見出した。このことにより、表皮 HA 合成制御剤開発において、*HAS3* mRNA 発現を指標にした薬剤探索が可能となることが期待される。

次に、RAR 活性化を機序とし、かつ安全性の高い HA 合成制御剤の候補として、プロビタミン A およびシクロヘキセン環とポリエン構造を有するノンプロビタミン A カロテノイドを見出した。

最後に、HA 合成促進剤として細胞内基質プールを増大させる NAG を見出し、転写レベルによる制御だけではなく、細胞内基質プールへ作用も HA 合成制御剤開発の重要な戦略になることを示した。膜透過を考慮した両親媒性 NAG 誘導体の開発により、効率的に HA 合成を亢進させることが可能なことも示した。

本研究結果の掲載

- 1) J. Invest. Dermatol., **118**, 43-48 (2002).
- 2) Biosci. Biotechnol. Biochem., **77**, 1282-1286 (2013).
- 3) Skin Pharmacol. Physiol., **17**, 77-83 (2004).

目次	頁
諸論	1
第1章 ヒアルロン酸(HA)合成酵素遺伝子(<i>HAS</i>)発現変動による ヒアルロン酸合成制御	
第1節：序論	4
第2節：実験材料および実験方法	
1-2-1 培養器具および試薬	4
1-2-2 細胞培養	4
1-2-3 HA 合成能評価および HA 定量	5
1-2-4 HA 分子量分布の測定	5
1-2-5 <i>HAS3</i> cDNA の単離	6
1-2-6 ノザンブロット解析	6
1-2-7 統計処理	6
第3節：実験結果	
1-3-1 サイトカインの表皮細胞 HA 合成に及ぼす影響	6
1-3-2 IFN- γ および TGF- β の <i>HAS</i> 遺伝子発現に及ぼす影響	9
1-3-3 レチノイン酸の <i>HAS</i> 遺伝子発現に及ぼす影響	10
第4節：考察	10
第2章 レチノイン酸レセプターを介した HA 合成制御	
第1節：序論	12
第2節：実験材料および実験方法	
2-2-1 培養器具および試薬	12
2-2-2 細胞培養	13
2-2-3 RT-PCR 法	13
2-2-4 HA 定量	14
2-2-5 DNA 定量	14
2-2-6 レポーターアッセイ法	14

2-2-7	統計処理	14
第3節：実験結果		
2-3-1	カロテノイドの <i>HAS3</i> 遺伝子発現を介した HA 合成促進作用	14
2-3-2	ルテインによる RAR 活性化	17
2-3-3	ルテインの HA 合成誘導に対するシトラールの効果	18
第4節：考察		
第4節：考察		
第3章 細胞内 HA 基質プール変動による HA 合成制御		
第1節：序論		
第1節：序論		
第2節：実験材料および実験方法		
3-2-1	培養器具および試薬	21
3-2-2	両親媒性 NAG 誘導体の合成	21
3-2-3	細胞培養	22
3-2-4	DNA 定量	22
3-2-5	HA 定量	22
3-2-6	HAS 活性測定	22
3-2-7	硫酸化 GAG 合成能評価	23
3-2-8	NAGK cDNA の単離	23
3-2-9	ノザンブロット解析	23
3-2-10	細胞内 UDP-NAG の定量	23
3-2-11	NAG の細胞内取り込み評価	24
3-2-12	統計処理	24
第3節：実験結果		
3-3-1	NAG による表皮細胞の HA 合成促進作用	24
3-3-2	NAG の <i>HAS3</i> mRNA 発現に及ぼす影響	25
3-3-3	NAG の HAS 活性に及ぼす影響	26
3-3-4	NAG による細胞内 UDP-NAG プールの増大	26
3-3-5	両親媒性 NAG 誘導体による HA 合成促進作用	28
第4節：考察		
第4節：考察		

総括	32
謝辞	34
掲載論文	35
引用文献	36

略語一覧

HA: hyaluronan

HAS: hyaluronan synthase

HABP: hyaluronan binding protein

GAG: glycosaminoglycan

IFN- γ : interferon-gamma

TGF- β : transforming growth factor-beta

RA: all-*trans* retinoic acid

RAL: all-*trans* retinal

RAR: retinoic acid receptor

RARE: retinoic acid responsive element

SEAP: secreted alkaline phosphatase

BCO1: β -carotene 15, 15'-monooxygenase

RALDH: retinal dehydrogenase

NAG: N-acetylglucosamine

GlcN: glucosamine

GlcA: glucuronic acid

Glc: glucose

UDP-NAG: uridinediphosphate-N-acetylglucosamine

UDP-GlcA: uridine diphosphate glucuronic acid

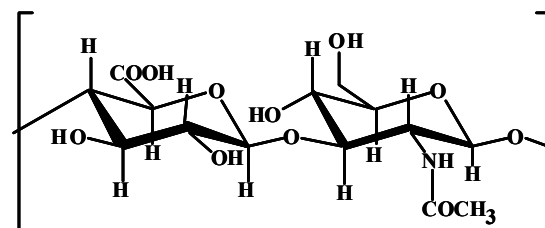
NAGK: N-acetylglucosamine kinase

β -NAGase: β -N-acetylglucosaminidase

GLUT: glucose transporter

諸論

ヒアルロン酸 (HA)は、 β -N-アセチルグルコサミン (NAG) と β -D-グルクロン酸 (GlcA)の二糖が交互に結合した高分子多糖で、哺乳動物の結合組織に広く存在するグリコサミノグリカン(GAG)のひとつである (Scheme 1). HA の分子量は 10^7 Da

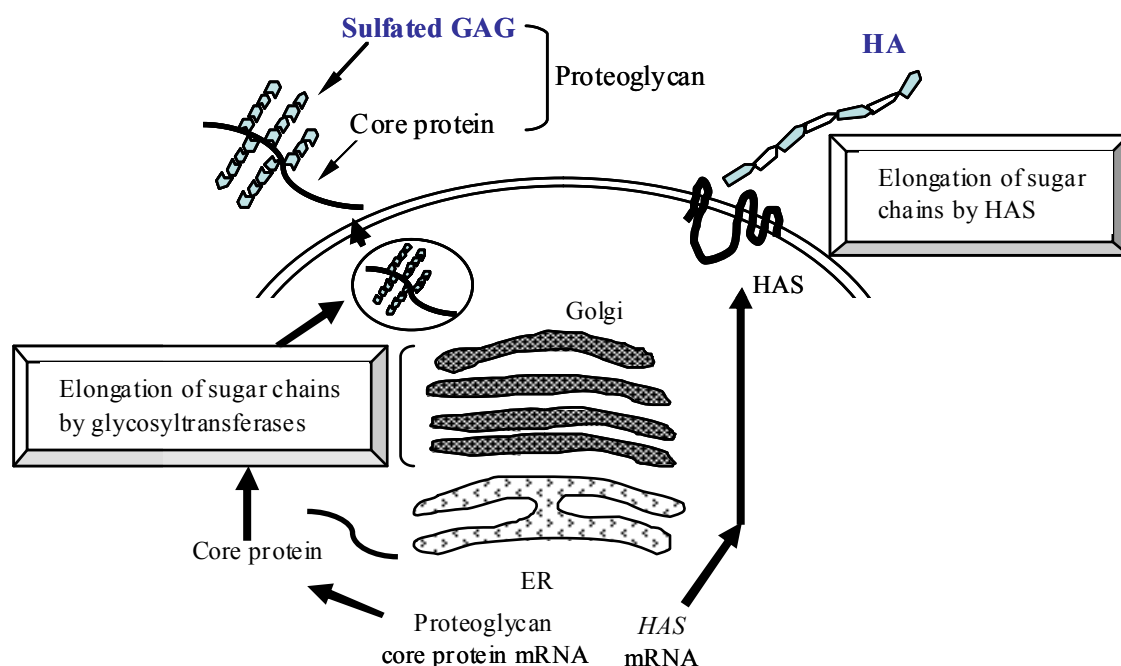


Scheme 1. Structure of hyaluronan (HA)

にも及び、糖自体がもつ水和能に加え、オーバーラップした三次元ネットワークに水分子を束縛することにより、高い水和体積を獲得する。生体内では水和ゲルとして存在し、組織の水分維持や機械特性に関わっている。

組織の HA 濃度は、臍帯で最も高く、皮膚および硝子体がこれに続く。しかしながら絶対量では皮膚に存在する HA が圧倒的に多く、全身の約 50 % を占める。¹⁾ 皮膚は、乾燥や紫外線などの外部刺激から生体を守る最前線にある。皮膚 HA は、組織の水分保持、弾力性の維持だけでなく、多様な皮膚生理に関わると考えられる。例えば、HA 合成能を亢進させたモデルマウスでは創傷治癒が促進されること²⁾、他方で HA を分解除去すると表皮細胞の最終分化が促進されること³⁾が報告されており、HA の細胞増殖や分化への密接な関係が示唆されている。申請者らは、UVB 照射後の皮膚炎症過程において、組織 HA 量だけでなく、その分子量サイズが大きく変動することを示した。⁴⁾ したがって HA は、さまざまな環境に対して、柔軟にその量と分子サイズを変化させ、物理的・生理的な特徴を発揮していると考えられる。皮膚の組織中では、0.5-1.5 日^{5,6)}という半減期で新たな HA に置換されていることから、その活発な合成と分解の平衡が、HA の機能発現に重要であると考えられる⁷⁾。一方、皮膚の HA は加齢に伴い減少することが報告されている。⁸⁻¹⁰⁾ また、加齢に伴い脱アセチル化された HA が増加すること、¹¹⁾ さらに光老化皮膚のエラスターシス部位で HA が減少すること¹²⁾が報告されている。細胞の増殖・分化といった基本的な細胞機能に関与する HA の量的および質的变化は、皮膚機能の低下に関わると考えられ、HA 代謝制御剤は皮膚老化を予防する機能的素材として有望である。

HA 代謝を担う HA の合成機構は、他の GAG のそれとは大きく異なる (Scheme 2)。HA 以外の GAG は、コアタンパクを有するプロテオグリカン分子として生合成される。すなわち、リボソームで翻訳されたコアタンパクが粗面小胞体に移行し、次いで、ゴルジ複合体に組み込まれた多くの酵素群により GAG 鎖が伸長、修飾された後に細胞外へ分泌されることになる。一方、HA 生合成の場合は細胞膜であり、合成に必要な酵素は HAS のみである。膜酵素である HAS は、UDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-NAG) と UDP-グルクロン酸 (UDP-GlcA) の 2 つの糖ヌクレオチドを基質として、2 糖の繰り返し配列である HA を細胞外へ直接伸長させていく。¹³⁾



Scheme 2. Sugar chain elongation of sulfated GAG and HA

HASをコードする遺伝子(*HAS1*, *HAS2*, *HAS3*)は, 1996 年以降, ヒトおよびマウスで相次いで同定された.¹⁴⁻¹⁸⁾ ヒトの *HAS1-3* はアミノ酸レベルで互いに 64.9-78.4 % の高いホモロジーを持ち, 何れも 6 つの膜貫通ドメインと 1 つの膜結合ドメインから成る. 近年, 真皮線維芽細胞培養系において, 細胞外マトリックス(ECM)構築に重要なサイトカインの TGF- β が, 主に *HAS2* 遺伝子発現誘導を介して HA 合成を促進することが明らかにされている.¹⁹⁾ 従来, HA は結合組織の ECM を構成する分子として知られ, 皮膚 HA の研究対象は主に真皮であった. その一方で, 1988 年 Tammi らの免疫組織染色より, 重層上皮組織の表皮にも HA が存在することが示された.²⁰⁾ 表皮層では, 基底細胞が増殖・分化を経て, 脱核・脱顆粒・辺縁体形成によりバリア機能を有する角層が形成され, 表皮層全体が 1-2 カ月でターンオーバーすることが知られている.²¹⁾ 表皮基底層, 有棘層のみならず, 角層にも HA が存在することが報告され,²²⁾ 表皮細胞自身が HA を合成することが示された. 表皮層の乾燥重量当たりの HA 量は, 真皮のその約 20 % と少ないが, 主に構造タンパクにより構築される真皮結合組織と異なり, 細胞が密接に隣接する表皮細胞間の HA 濃度は, 約 2 mg/ml に達する.²³⁾ 細胞間スペースが限られている表皮では, HA の量と質の両方が, 細胞の生存および生理機能発現に必要な水環境の変化に関係

すると考えられ、その代謝を担う HA 合成系も、さらに厳密に制御される必要がある。しかしながら、表皮組織の HA 合成の調節機構については未だ不明な点が多い。

本論文では、表皮 HA の合成制御機構を明らかにするとともに、抗老化機能性素材を目指した HA 合成制御剤を開発することを目的とした。第 1 章では、ヒト表皮細胞の HA 合成の調節因子であるサイトカインおよびレチノイドを用い、既知の HA 合成酵素 3 種(*HAS1*, *HAS2*, *HAS*)のうち、いずれのアイソザイムを介して HA 合成が制御されているかについて検討した。第 2 章では、レチノイン酸の前駆体であるプロビタミン A、さらにレチノイン酸に代謝されないノンプロビタミン A カロテノイド類の *HAS* 遺伝子発現に及ぼす効果と、レチノイン酸レセプター(*RARs*)活性化の関与について検討した。第 3 章では、*HAS* 遺伝子発現の変動を伴わずに表皮細胞の HA 合成を促進する化合物として、N-アセチルグルコサミン(*NAG*)を見出し、細胞内基質(*UDP-NAG*)プール変動による HA 合成制御機構について検討した。

第 1 章 HA 合成酵素遺伝子 (HAS) 発現変動による HA 合成制御

第 1 節：序論

創傷治癒の過程は、炎症、肉芽形成、結合組織化の大きく 3 つの過程から成る。その際、真皮 HA は肉芽形成時に増加し、細胞遊走・増殖・血管新生・コラーゲン分解および再構築のための水和スペースの提供などに寄与する。²⁴⁾ 線維芽細胞培養系では、IL-1, TNF- α , β -FGF, PDGF, IGF-1 および TGF- β などの炎症性サイトカインや増殖因子が HA の合成を惹起する。²⁵⁻²⁷⁾ ヒト皮膚線維芽細胞では、ECM 構築に重要な役割を担う TGF- β が、主に *HAS2* mRNA の発現誘導を介して HA の合成を促進させることが示された。¹⁹⁾ 一方、表皮においては、EGF 刺激後の HA 合成惹起に、*Has2* mRNA の発現誘導を伴うことが、ラット由来表皮株化細胞を用いた実験で報告されたが、²⁸⁾ ヒト組織・細胞におけるその制御機構は未だ不明である。

そこで本研究では、ヒト表皮における HA 合成制御機構を明らかにする目的で、ヒト由来表皮細胞に発現する *HAS* 遺伝子を同定するとともに、サイトカイン添加による HA 合成変動と *HAS* mRNA 発現変動の挙動について検討した。さらに、表皮 HA の合成を亢進することが知られるレチノイン酸(RA)²⁹⁾の応答性についても検討した。

第 2 節：実験材料および実験方法

1-2-1 培養器具および試薬

以下の試薬、キット等は、それぞれ市販品を購入し使用した。

Normal human foreskin keratinocytes (Kurabo 社製), Bovine pituitary extraxt (BPE) (Kurabo 社製), MCDB153 medium (Wako Pure Chemical 社製), Recombinant human IL-1 α , TNF- α , IL-8 および IL-10 (Intergen 社製), Recombinant human IFN- γ および TGF- β 1 (R&D 社製), all-*trans* retinoic acid (Sigma 社製), Superscript II (Gibco BML 社製), GeneAmp PCR kit (Perkin-Elmer 社製), Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) cDNA (Clontech 社製), pSPT18 (Roche 社製), Digoxigenin (DIG) RNA labeling kit, DIG nucleic acid detection kit および anti-DIG alkaline phosphatase conjugate (Roche 社製), Positively charged nylon membrane (Roche 社製), RNaid kit (Bio101 社製), *Streptomyces hyalurolyticus* 由来 hyaluronidase (Seikagaku 社製), D-[1,6-³H(N)]glucosamine hydrochloride (62 Ci/mmol)(NEN Research Products 社製), Sephadex G-50 および Sepharose CL-2B (Pharmacia 社製), DE-52 (Whatman 社製), Chugai Hyaluronan plate (Chugai Diagnostics Science 社製)。

1-2-2 細胞培養

正常ヒト表皮細胞を, 5 mg/l insulin, 180 µg/l hydrocortisone, 14.1 mg/l *O*-phosphorylethanolamine, 6.1 mg/l 2-aminoethanol, 100 ng/l EGFおよび0.4 % (vol/vol) BPEを含有したMCDB153培地(0.1 mM Ca^{2+}) を用いて24-well plateに播種し, コンフルエントの状態に至るまで培養した. 上記培地からEGFおよびBPEを除いた培地を用いて24 h培養した後, サイトカインを添加した. サイトカイン存在下でさらに6から24h培養した. サイトカイン添加後6 h培養した細胞からTotal RNAを抽出した. 一方, 18 h培養した細胞の培養上清を採取し, その上清を用いてHAの評価を実施した. さらにall-*trans*RAについては, 添加24 h後のtotal RNAおよび培養上清を試験に供した.

角化不溶性膜の評価は, Shimadaらの方法³⁰⁾に従った. 0.25 %トリプシンで処理した細胞を1.2 mM CaCl_2 および20 µM Calcium ionophore含有培地で懸濁した. この懸濁を37℃にて2 hインキュベートした後, 2 % SDS含有20 mM dithiothreitol水溶液中で100 °C, 5 min処理した. 角化不溶性膜形成で, SDS耐性となった細胞数を血球計算盤を用いて計測した.

ヒト皮膚線維芽細胞Detroit 551 (ATCC CCL100)は, 10 % FBSを含有したMEM培地を用いてコンフルエントの状態に至るまで培養した後, Poly(A)⁺ RNAを抽出した.

1-2-3 HA 合成能評価および HA 定量

IFN- γ , TGF- β , IL-1 α , TNF- α , IL-8, IL-10 とともに [³H]glucosamine (10 µCi/ml) を表皮細胞培養系に添加し, 18 h 培養した. HA 合成能は, 培養上清 の hyaluronidase 感受性画分への取り込み量を評価した.³¹⁾ 培養上清を hyaluronidase (1.5 TRU/ml) で消化した後, Sephadex G-50 カラム (1.5×5 cm) にアプライし, 分取した void 画分の放射活性を測定した. hyaluronidase 未処理および処理サンプルの放射活性差を算出し, HA への取り込み量とした. HA 産生量は, ヒアルロン酸結合タンパクを利用した Chugai hyaluronan plate を用い, プロトコールに従い評価した.

1-2-4 HA 分子量分布の測定

プロナーゼ処理 (30 µg/ml) した培養上清 を DE-52 イオン交換カラム (1.0 ×12 cm) に供し, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4)により平衡化した. その後, NaCl のリニアグラジェント (0-0.6 M)により溶出し, HA 画分を分取した. HA 画分を Sepharose CL-2B ゲルろ過カラム (1.0×55 cm)に供し, 1.0M NaCl 溶液により溶出させた. 2.5ml/フラクションで分取し, 各画分の放射活性を測定した.

1-2-5 HAS3 cDNA の単離

ヒト *HAS3* 遺伝子 cDNA は、RT-PCR および second PCR により単離した。まず、ヒト表皮細胞から抽出した Total RNA を用い、mRNA のシーケンス (GenBank accession number AF232772) を元に、下記のプライマーを設計し、RT-PCR を行った。Human *HAS3* sense primer 5'-GGAAAGCTT GGCAT GTACCGCAACAG-3'; Human *HAS3* antisense primer 5'-AGAGGAGGGAGTAGAGGGAC -3' (30 cycle)。次に、得られた RT-PCR 産物をアガロース電気泳動に供し、ゲルから回収したサイズフラクションを鋳型として、second PCR を下記の primer を用いて行った。Human *HAS3* sense primer 5'-GGAAAGCTT GGCAT GGACCGCAACAG-3'; Human *HAS3* antisense primer 5'-AGGGAATTCGGAAGCAGGCGTAGGT G-3' (30 cycle, 下線部は *HindIII* および *EcoRI* 制限酵素サイト)。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動の後、ゲルから切りし精製した。精製した cDNA を *HindIII/EcoRI* で消化し、プラスミドベクター (pSPT18) *HindIII/EcoRI* サイトに組み込み、シーケシングにより、目的とする *HAS3* cDNA が得られたことを確認した。DIG 標識した antisense/sense RNA プロブの調製は、DIG RNA labeling kit プロトコールに従い実施した。

1-2-6 ノザンブロット解析

細胞より抽出した Total RNA を 0.8 % formaldehyde/agarose ゲルを用いた電気泳動により分離し、ナイロンメンブレンに転写した。ハイブリダイゼーションは DIG Nucleic Acid Detection Kit のプロトコールに従い実施し、化学発光法により検出した。

1-2-7 統計処理

統計解析は SAS システムにより実施した。Dunnett's multiple comparison test でコントロールとの有意性を解析し、用量依存性の評価には William's test を用いた。p 値 0.05 未満を統計的に有意とした。

第 3 節：実験結果

1-3-1 サイトカインの表皮細胞 HA 合成に及ぼす影響

[³H]glucosamine の HA への取り込み活性を HA *de novo* 合成能の指標とし、IFN- γ , TGF- β , IL-1 α , TNF- α , IL-8 および IL-10 の表皮細胞 HA 合成に及ぼす影響について検討した。その結果、IFN- γ により HA の合成が惹起され、TGF- β 添加により合成能の低下が認められた (Fig. 1-1)。評価に供した他のサイトカイン類は HA 合成に影響を及ぼさなかった。

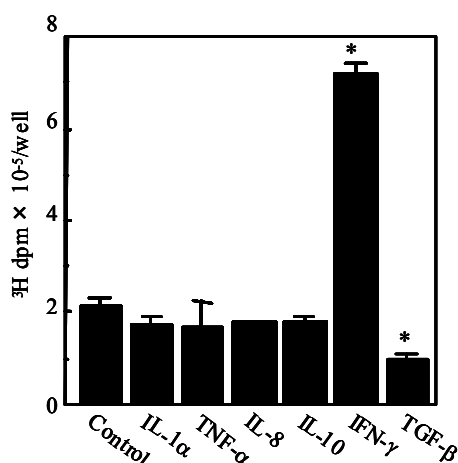


Fig. 1-1 Effect of cytokines on hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. Confluent human keratinocytes were incubated in the absence or presence of 10 ng/ml IL-1 α , TNF- α , IL-8, IL-10, IFN- γ , or TGF- γ with [^3H]glucosamine. The incorporation of [^3H]glucosamine into hyaluronan during 18 h incubation period was determined. Each column represents the mean $\pm$ SD of 4 separate experiments. *Significantly different from the control value; $p < 0.01$.

さらに、IFN- γ および TGF- β の作用について用量に対する応答性を検討したところ、IFN- γ は添加 1-10 ng/mlまで用量依存的に HA 合成を促進した。一方で、TGF- β は添加 0.3 ng/ml以上で HA 合成を抑制し、1.0 ng/ml以上の添加濃度では、その作用が飽和した(Fig. 1-2)。両サイトカイン添加により培養上清中に蓄積される HA の絶対量を定量し (Table 1-1)、IFN- γ および TGF- β が実際に HA 産生量を変動させていることを確認した。また、本培養条件下において IFN- γ と TGF- β は、細胞数および角化不溶性膜形成に影響を及ぼさず (Table 1-2)、これらのサイトカインの HA に及ぼす効果は、増殖および分化に依存した現象ではないことが示された。

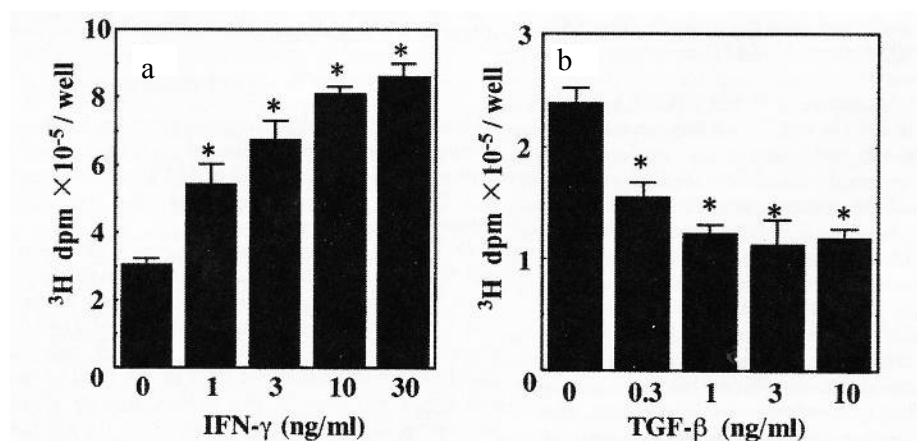


Fig. 1-2 The hyaluronan synthesis of human keratinocytes was upregulated by IFN- γ but down regulated by TGF- β in a dose dependent manner. Confluent human keratinocytes were incubated with fresh medium for 24 h followed by cultivating with [^3H]glucosamine and various concentrations of (a) IFN- γ (1-30 ng/ml) or (b) TGF- β (0.3-10 ng/ml) for 18 h. The incorporation of [^3H]glucosamine into hyaluronan was determined. Each column represents the mean $\pm$ SD of 4 separate experiments. *Significantly different from the control value; $p < 0.01$.

Table 1-1. Effect of IFN- γ and TGF- β on hyaluronan production

Treatment	Concentration (ng/ml)	Hyaluronan production ^a (ng/ml)
Control	0	126 $\pm$ 9
IFN- γ	1	185 $\pm$ 34*
	10	473 $\pm$ 14 *
TGF- β	1	64 $\pm$ 5 *
	10	64 $\pm$ 4 *

^aKeratinocytes were grown in the same condition as for Fig. 1-2. Hyaluronan content was measured as described in *Materials and Methods*. The data represent the mean $\pm$ SD of 4 separate experiments.

*Significantly different from the control value; $p < 0.01$.

Table 1-2. Effect of IFN- γ and TGF- β on total cell and cornified cell number

Treatment	Concentration (ng/ml)	Total cell number ($\times 10^{-5}$ cells/well)	Cornified cell number ^a ($\times 10^{-5}$ cells/well)
Control	0	4.86 $\pm$ 0.34	1.33 $\pm$ 0.25
IFN- γ	1	4.58 $\pm$ 0.46	1.56 $\pm$ 0.18
	10	4.56 $\pm$ 0.57	1.18 $\pm$ 0.18
TGF- β	1	4.48 $\pm$ 0.71	1.32 $\pm$ 0.11
	10	4.38 $\pm$ 0.66	1.30 $\pm$ 0.21

^aKeratinocytes were grown in the same conditions as for Fig. 1-2. The number of cornified cells formed in response to calcium ionophore were estimated as described in *Materials and Methods*. The results are the means of 4 wells $\pm$ SD.

次に、IFN- γ およびTGF- β が、産生されるHAの分子量に及ぼす効果について検討した。培養上清から精製したHAをSephacryl CL-2Bゲルろ過カラムに供し、それから得られたクロマトグラムを比較した(Fig. 1-3)。サイトカイン刺激および

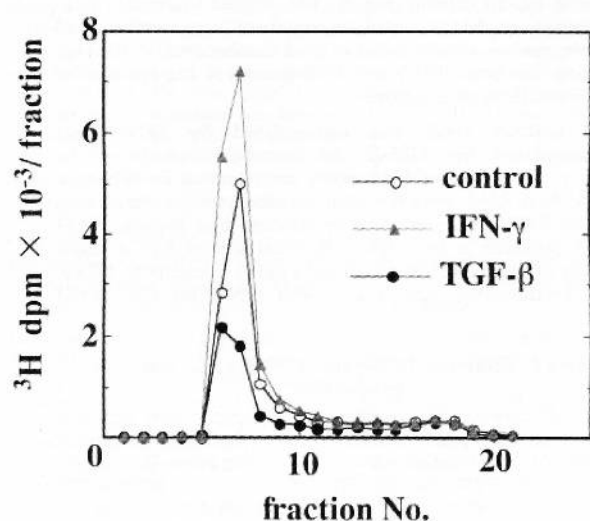


Fig. 1-3 Human keratinocytes synthesized high-molecular mass hyaluronan under basal or cytokine-stimulated conditions. Confluent human keratinocytes were incubated with [³H]glucosamine only (*open circles*), [³H]glucosamine and 10 ng/ml IFN- γ (*closed triangles*) or 10 ng/ml TGF- β (*closed circles*) for 18 h. Hyaluronan in media fraction was purified using DE-52 ion-exchange chromatography and chromatographed using a Sepharose CL-2B column

無刺激のいずれの場合も産生された HA は主に void 画分に溶出した. つまりそれらの分子量は 1×10^6 Da よりも大きいことを示しており, IFN- γ および TGF- β は, いずれも高分子 HA の産生を誘導することがわかった.

1-3-2 IFN- γ および TGF- β の *HAS* 遺伝子発現に及ぼす影響

表皮細胞の HA 合成がこれまで報告されている *HAS* ファミリーのいずれにより調節されているかを調べるため, IFN- γ および TGF- β で刺激した表皮細胞を用いノザンブロット解析を実施した. *HAS3* mRNA には約 4.9 kb の主な転写産物と約 2.0 kb の異なるサイズの転写産物が存在した. IFN- γ の刺激により両シグナルの強度が顕著に上昇した (Fig. 1-4a). 一方, TGF- β の添加した用量に応じて, *HAS3* の転写レベルは減少した (Fig. 1-4b). この *HAS3* mRNA の顕著な発現変動に対し, 2.4 kb の *HAS1* mRNA は TGF- β 刺激後にわずかに発現量が上昇するものの (Fig. 1-4b), IFN- γ 添加による発現変動は認められなかった (Fig. 1-4a). *HAS2* mRNA は, 培養ヒト皮膚線維芽細胞では高い発現レベルにあることをすでに確認しているが,¹⁹⁾ 表皮細胞から抽出した Total RNA を用いた本検討においては, サイトカイン刺激, 無刺激に関わらず発現を検出することができなかった. しかしながら, Poly(A)⁺ RNA を用いた解析で, 痕跡量の *HAS2* シグナルが検出されたことから (Fig. 1-4c), 表皮細胞は皮膚

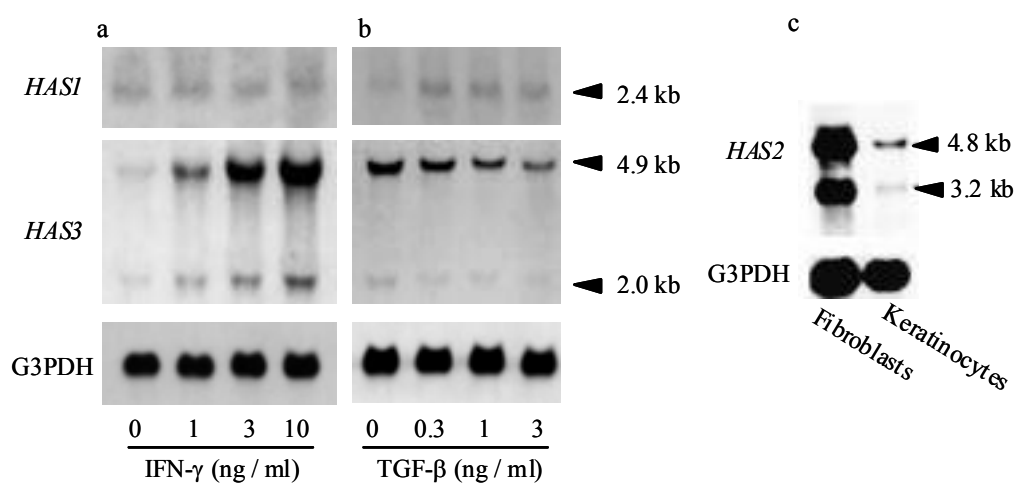


Fig. 1-4 The *HAS3* transcript level of human keratinocytes was upregulated by IFN- γ but downregulated by TGF- β in a dose-dependent manner. Human keratinocytes were cultured in various concentrations of IFN- γ (0-10 ng/ml) (a) or TGF- β (0.3-3 ng/ml) (b) for 6 h and total RNA was extracted. Equal amount of samples (5 μ g/lane) were hybridized with *HAS1* and *HAS3* probes. (c) Poly(A)⁺ RNA extracted from confluent cells was used for northern blot analysis. Equal amounts of samples (2 μ g/lane) from fibroblasts and keratinocytes were hybridized with *HAS2* probe. Blots were stripped and rehybridized with a G3PDH probe to control for variation in loading. Similar results were obtained in two independent experiments.

線維芽細胞に比して極めて低レベルではあるものの, *HAS2* mRNA を発現している

ことがわかった。

以上の結果から, IFN- γ および TGF- β の刺激による表皮細胞の HA 合成変動は, 主に *HAS3* mRNA の発現変動を介していると考えられた。

1-3-3 レチノイン酸の *HAS* 遺伝子発現に及ぼす影響

表皮 HA 合成を惹起することがすでに報告されているレチノイン酸(RA)²⁹⁾を用いて, RA が培養表皮細胞の HA 合成と *HAS* 遺伝子発現に及ぼす効果について検討した. RA は, *HAS3* mRNA の発現を強力に誘導するとともに, HA 合成を顕著に亢進させた(Fig. 1-5). IFN- γ による応答と同様, *HAS1* mRNA に顕著な誘導を認めず, *HAS2* mRNA は本条件では検出できなかった。

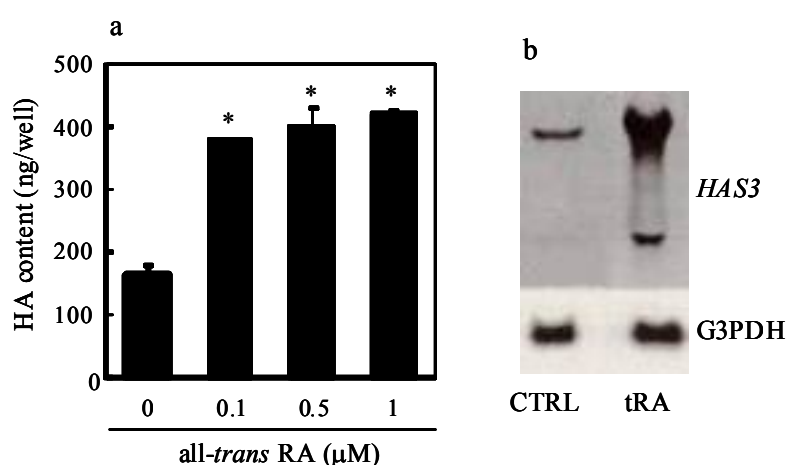


Fig. 1-5 The *HAS3* transcript level of human keratinocytes was upregulated by all-trans RA. (a)

Human keratinocytes were cultured in various concentrations of all-trans RA (0-1.0 μM) for 24 h and hyaluronan production was measured as described in *Materials and Methods*. The data represent the mean $\pm$ SD of three separate experiments. *Significantly different from the control value; $p < 0.01$.

(b) Keratinocytes were incubated for 24 h in the presence of all-trans RA at a concentration of 1.0 μM. Total RNA was extracted and subjected to northern blot as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in two independent experiments.

第 4 節：考察

HAS には 3 種のアイソザイムが存在する (*HAS1*, *HAS2*, *HAS3*). 本研究では, ヒト表皮細胞の HA 合成を惹起するサイトカインとして IFN- γ , 逆に抑制するサイトカインとして TGF- β を見出した. これらサイトカインによる HA 合成挙動と一致した発現挙動を示す HAS 遺伝子が *HAS3* mRNA であることも明らかにした. さらに, サイトカイン以外の表皮 HA 合成促進因子として, RA について検討したところ, RA は, IFN- γ と同様, 顕著に *HAS3* mRNA 発現量を増加させることを見出した。

真皮線維芽細胞でドミナントに発現し, かつ HA 合成を主に調節する合成酵素

遺伝子が *HAS2* である¹⁹⁾のに対し、表皮細胞で主に発現している遺伝子は *HAS3* mRNA であった。このことから、皮膚組織の表皮と真皮では、*HAS* の発現様式が異なると考えられた。線維芽細胞で *HAS2* mRNA 発現を誘導する TGF- β は、表皮細胞では *HAS3* mRNA 発現を抑制し、HA 合成能を低下させた。真皮における TGF- β は、創傷治癒時の真皮マトリックス再構築に中心的な役割を担い、線維芽細胞の増殖を促進する。^{32, 33)} 一方、表皮では、基底層から有棘層にかけて TGF- β が恒常的に発現しており、^{34, 35)} 表皮細胞増殖に対し、抑制的に働く。³⁶⁾ 同一のサイトカインが表皮と真皮で逆の HA 合成制御を担うことは、応答性の異なるアイソザイムの存在を示唆するものである。また、それぞれの細胞に対する TGF- β の異なる HA の合成制御は、組織の再構築、あるいは細胞増殖の際の水和スペースの確保などの HA の複雑な役割を担う応答性と考えられる。

IFN- γ は、活性化 T 細胞から放出される代表的なサイトカインであり、それ自体は表皮細胞の増殖を抑制する。³⁷⁾ その一方で細胞増殖を促進する TGF- α の誘導等を介して、^{38, 39)} 表皮過増殖を伴うさまざまな病変にも関与する。急性湿疹における病理学的特徴の表皮海綿状浮腫の形成に関与するサイトカインの一つとして IFN- γ が知られており、急性湿疹の病変部において *HAS3* mRNA の顕著な発現上昇と E-カドヘリンの減少が示された。⁴⁰⁾ 海綿状浮腫での HA の病態生理的な役割は、表皮細胞間スペースを広げることで細胞間接着を減弱させることである。したがって海綿状組織における HA 量の増加は、有害化合物の濃度を低下させるための生体適応過程であると推察される。

3 種ある *HAS* アイソザイムによる生成 HA の明確な違いは明らかにされていない。それぞれの *HAS* 強制発現系で、合成酵素の比活性は *HAS3* > *HAS2* > *HAS1* の順で *HAS3* が最も高い活性を発揮するが、*HAS1* と *HAS2* は平均分子量 $\sim 2 \times 10^6$ Da の高分子量の HA を合成するのに対し、*HAS3* は 2×10^5 - 2×10^6 Da の比較的低分子を合成する⁴¹⁾ことが報告されている。一方、本研究ではヒト表皮細胞により合成される HA 分子量サイズは、サイトカインによる刺激の有無に関わらず、高分子量 ($> 1 \times 10^6$) であった。したがって上記の報告とは異なり、表皮細胞培養系においては *HAS3* により合成される HA も高分子量のものとなることが示された。無細胞系と細胞培養系による検討結果の相違と考えると、分泌される HA の分子量サイズの調節は、*HAS* 以外のアクセサリタンパクが担っている可能性も考えられた。

本研究では、3 種の *HAS* 遺伝子の中で主に *HAS3* 遺伝子の発現が、表皮細胞の HA 合成の調節に重要な役割を担っていることを示した。

第2章 レチノイン酸レセプターを介した HA 合成制御

第1節：序論

第1章において, RA は, *HAS3* 遺伝子発現を誘導し, 表皮細胞の HA 合成を促進させることを示した. RA はビタミン A の活性体であり, 細胞の分化増殖の制御など重要な生理活性を有する. さらに尋常性乾癬, 一部角化性疾患, 尋常性座瘡および悪性腫瘍の薬物治療にも用いられる. 美容面でも *in vivo* および *in vitro* 両面から多くの研究がなされ, 欧米ではシワ等の光障害皮膚の改善剤として認可されている⁴²⁾. しかしながら, RA はその効果だけでなく, 副作用として皮膚刺激, 落屑性紅斑および掻痒等を引き起こす. Tadaki らは, RA がシワに改善効果がある一方, 特に日本人皮膚に対する刺激性が高いことを指摘している.⁴³⁾ このことから, RA にかわる安全性が高く, かつ有効な改善剤が望まれている.

RA の前駆体は, β -カロテンおよび β -クリプトキサンチンに代表される食餌性のプロビタミン A カロテノイドである. プロビタミン A は小腸上皮細胞に吸収された後, β -カロテン-15,15'-モノオキシゲナーゼ(BCO1)により中央開裂してレチナールに変換, さらにレチナールデヒドロゲナーゼ(RALDHs)により酸化され, RA を生成する.⁴⁴⁾ *all-trans* RA は, 核内レセプターであるレチノイン酸レセプター(RARs)と結合し, 9-*cis* RA レセプターのレチノイン酸 X レセプター(RXR γ)とヘテロダイマーを形成して DNA のレチノイン酸応答配列(RARE)に結合してその下流の遺伝子発現を制御する. 近年, *HAS2* 遺伝子は RAR シグナルの直接のターゲット遺伝子であることが報告された.⁴⁵⁾ しかし一方で, RA の HA 合成促進作用に, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)活性化を介した二次的な応答が関与することが示唆されている.⁴⁶⁾

本研究では, 経口摂取により RA へ変換されるプロビタミン A カロテノイドが, 表皮細胞の RAR シグナルを介して HA 合成を誘導するか否かについて検討した. さらに哺乳類ではレチノイドへ変換されないノンプロビタミン A カロテノイド⁴⁷⁾ の RAR 活性化を介した HA 代謝に及ぼす効果についても検討した.

第2節：実験材料および実験方法

2-2-1 実験器具および試薬

LE540 および Am80 (Wako Pure Chemical 社製), β -cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, astaxanthin, lycopene, α -ionone, β -ionone および citral (Extrasynthese 社製), phytoene (Carotenature 社製), *all-trans* retinoic acid, *all-trans* retinal および β -carotene (Sigma 社製). Ch55(Tocris Bioscience 社製), Hyaluronan binding protein (HABP) (Seikagaku 社製), EZ-Link maleimide activated horseradish peroxidase kit (Pierce 社製), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate

solution (Moss 社製), TRIzol reagent (Invitrogen 社製), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche), pRARE-TA-SEAP および pSEAP2-basic vector および EscApe SEAP chemiluminescence detection kit (Clontech 社製), Fugene 6 transfection reagent (Roche).

その他の試薬については、第 1 章で記載したものを用いた。

2-2-2 細胞培養

ヒト表皮細胞は第 1 章で記載した方法に従い培養した。24-well プレートおよび 12-well プレートに播種した細胞がコンフルエントに達した後、0.04 % (v/v) BPE を含有し、hydrocortisone および EGF を除去した培地に変換し、評価化合物を添加した。HA 産生量の評価は 24-well プレートの培養上清を用い、細胞画分は RT-PCR による評価に用いた。12-well プレートの細胞は、レポーターアッセイに用いた。

2-2-3 RT-PCR 法

表皮細胞から TRIzol 試薬により Total RNA を抽出し、逆転写反応は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit プロトコールに従い実施した。*HAS3*, *G3PDH*, *BCO1*, *RALDH1*, *RALDH2* および *RALDH3* mRNA 検出に用いる PCR プライマーセットは、primer 3 を利用し、エキソジャンクションに設計した。

HAS3 sense: 5'-CTGCACCTGCTCATTCAGAG-3',

HAS3 anti-sense: 5'-GAGTCGCACACCTGGATGTA-3',

G3PDH sense: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',

G3PDH anti-sense: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',

BCO1 sense: 5'-ACAGAGATGTGAAGGAGGGAAG-3',

BCO1 anti-sense: 5'-TCCAAACTCAGACACCACAATC-3',

RALDH1 sense: 5'-CTCTGCCAGGTAGAAGAAGGAG-3',

RALDH1 anti-sense: 5'-GTGGAGAGCAGTGAGAGGAGTT-3'

RALDH2 sense: 5'-AGAACTCAGAGAGTGGGAGAGTGT-3'

RALDH2 anti-sense: 5'-ATGTAGAGTGAAGTGGTGGT-3'

RALDH3 sense: 5'-GGAGCAGGTCTACTCTGAGTTTGT-3'

RALDH3 anti-sense: 5'-AAGCGTATTCACCTAGTTCTCTGC-3'

PCR サイクルおよび増幅 cDNA プロダクトサイズは、*HAS3*: 25cycles, 488 bp; *G3PDH*: 22cycles, 452 bp. *BCO1*: 22cycles, 441 bp; *RALDH1*: 22cycles, 486 bp; *RALDH2*: 22cycles, 526 bp; *RALDH3*: 22cycles, 512 bp. PCR により得られた cDNA を ethidium bromide 含有 2 % アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した。

2-2-4 HA 定量

培養上清 HA の定量は, hyaluronan binding protein (HABP)を用いた Rilla ら⁴⁸⁾のサンドイッチアッセイ法に従った. 96 well プレートに HABP をコーティングし, 標準サンプルおよび評価サンプルをアプライした. 室温にて 2 h 静置の後, EZ-Link maleimide activated horseradish peroxidase kit を用いてペルオキシダーゼ標識した HABP (HRP-HABP)を反応させ, サンドイッチを形成させた. 次に, HRP の基質である 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution を添加し, 450 nm の吸光度を測定した. サンプル中の HA 濃度は, 標準サンプルにより作成した検量線を用いて算出した.

2-2-5 DNA 定量

DNA 量の定量は, Johnson-Wint ら⁴⁹⁾による蛍光試薬(3, 5-diaminobenzoic acid) (DABA)を用いた手法で実施した. 24-well プレート上の細胞を 80 % 冷エタノールで固定した後, DABA (400 mg/ml)を添加し, 60 °C, 45 min インキュベートした. 反応後, 1N HCl を 0.5 ml 添加し, 蛍光強度(励起波長: 420 nm, 蛍光波長: 540 nm)を測定した. 標準サンプルにより作成した検量線より DNA 量を算出した.

2-2-6 レポーターアッセイ法

RARE トランス活性化の評価は, 2 コピーの RARE シーケンスおよび Secreted alkaline phosphatase (SEAP)レポーター遺伝子が組み込まれた pRARE-TA-SEAP ベクターを用いた. またバックグラウンド測定用はプロモーターを欠く pSEAP2-basic ベクターを用いた. 12-well プレートに培養した表皮細胞に, Eugene 6 トランスフェクション試薬を用いてそれぞれのベクターを導入した. トランスフェクション 24 h 後にルテインを添加し, さらに 24 h 培養した. 培養上清の SEAP 活性は, EscApe SEAP chemiluminescence detection システムを用いて評価した.

2-2-7 統計処理

統計解析は SAS システムにより実施した. Dunnett's multiple comparison test でコントロールとの有意性を解析し, 用量依存性の評価には William's test を用いた. p 値 0.05 未満を統計的有意とした.

第 3 節: 実験結果

2-3-1 カロテノイドの HAS 遺伝子発現を介した HA 合成促進作用

さまざまなカロテノイドおよびその関連化合物を用い, ヒト表皮細胞の HA 合成への関与を検討した (Fig. 2-1). 本研究の検討に用いた化合物を Fig. 2-2 に示した. 表皮細胞の HA 合成は, プロビタミン A のβ-カロテンおよびβ-クリプトキサン

チンだけでなく、ノンプロビタミン A に属するルテイン、ゼアキサントシンおよびアスタキサントシンの存在下で亢進した (Fig. 2-1a). 一方、リコピン、フィトエン、 α -イオノンおよび β -イオノンにはその効果を認めなかった (それぞれの処理群の HA 産生量, 254, 183, 274, 274 ng/well vs コントロール群の HA 産生量, 288 ng/ml). これらのことから, HA 合成を促進するにはシクロヘキセン環とポリエン部の両方を併せ持つ構造が必要と考えられた. これらカロテノイドによる HA 合成変動の挙動は, 誘導される *HAS3* 遺伝子の発現挙動と一致した (Fig. 2-1b).

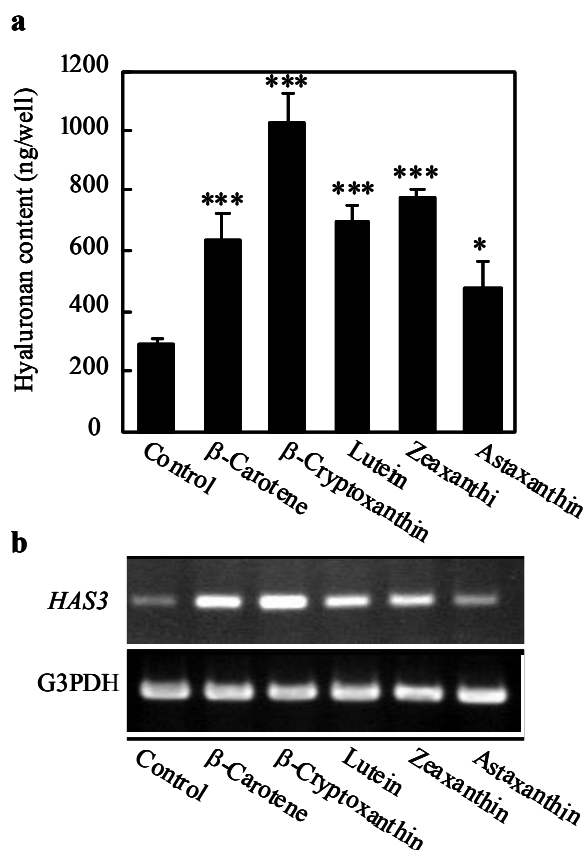


Fig. 2-1 Effects of carotenoids on hyaluronan synthesis in keratinocytes. Confluent human keratinocytes were incubated for 48 h in the absence or presence of β -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, and astaxanthin at a concentration of 5 μ M. (a) Hyaluronan content was measured as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD of 3 replicate assays. Significantly different from the control value; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Dunnett's test). (b) Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR. The PCR products were visualized in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

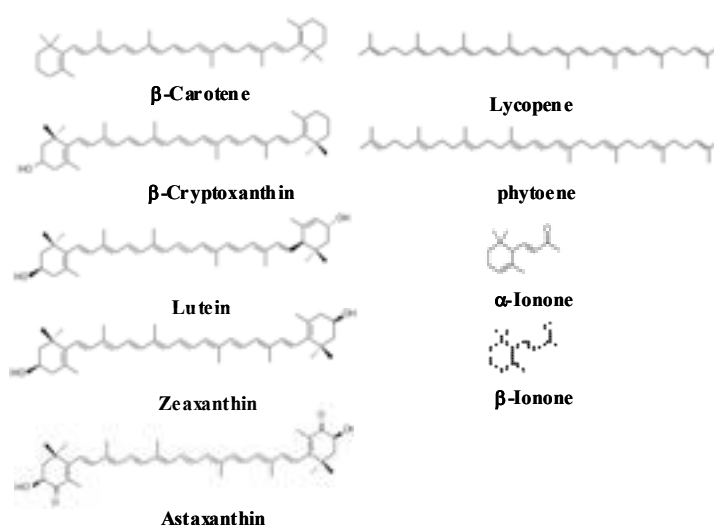


Fig. 2-2 Chemical structure of compounds examined in this study. Carotenoids used in this study were in the all-*trans* configuration.

表皮細胞がプロビタミン A から RA に至る代謝経路を有するかを調べるため、BCO1 および RALDHs の発現を転写レベルで検討した。表皮細胞は BCO1 mRNA を発現し、RALDHs(RALDH1-3)のうち RALDH3 をドミナントに発現した(Fig. 2-3)。

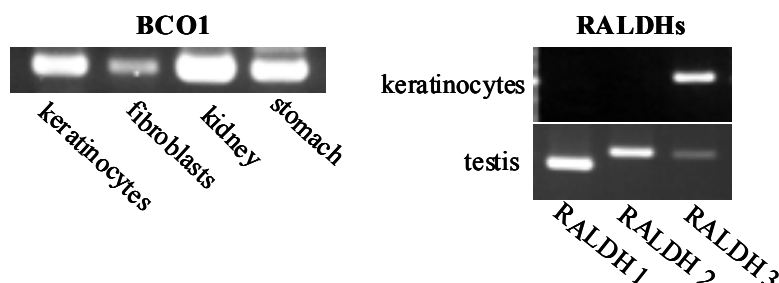


Fig. 2-3 BCO1 mRNA and RALDH3 mRNA are expressed in human keratinocytes.

Total RNA was subjected to RT-PCR. The PCR products were visualized in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

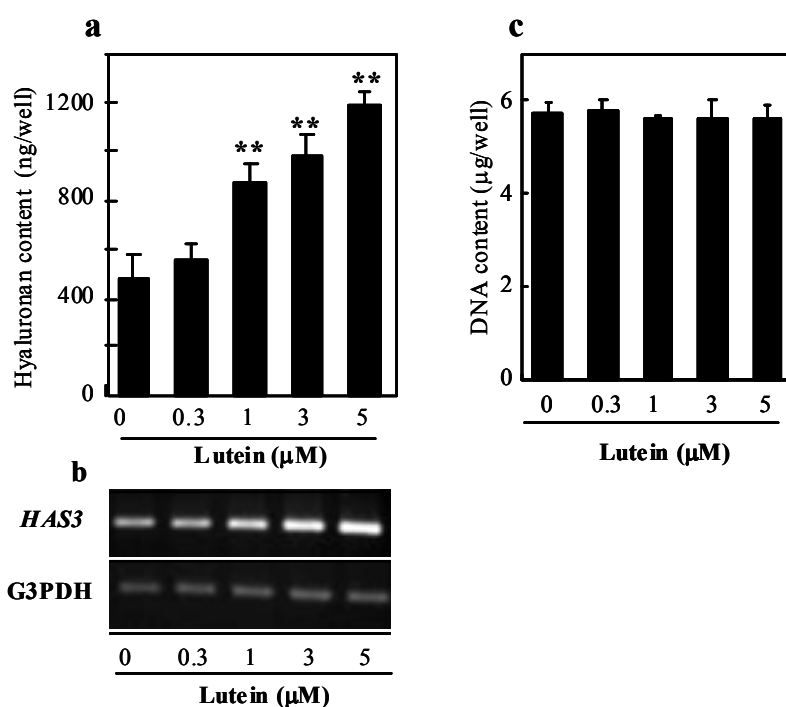


Fig. 2-4 The hyaluronan synthesis of human keratinocytes was upregulated by lutein in a dose dependent manner. Confluent human keratinocytes were incubated with various concentrations of lutein (0.3-5 mM) for 48h. (a) Hyaluronan content was measured as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD of 3 replicate assays. Significantly different from the control value; **P < 0.01 (William's test). (b) Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR. The PCR products were visualized in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. (c) DNA content was measured as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD of 3 replicate assays.

ノンプロビタミン A がどのような機構で HAS 遺伝子発現を介した HA 合成を惹

起するのかを調べるため、評価したノンプロビタミン A のうち、ルテインを用いて検討を進めた。ルテインは、添加 1-5 μM で用量依存的な *HAS3* mRNA 発現誘導を伴って HA 産生を亢進した(Fig. 2-4 a, b). 本実験条件下においてルテインは細胞のウェル当たりの DNA 量に影響しなかったことから、この *HAS3* mRNA 発現量の増加に細胞増殖が関与しないことを示した(Fig2-4 c).

2-3-2 ルテインによる RAR 活性化

ノンプロビタミン A のルテインによる HA 合成誘導に RARs の関与の有無を明らかにするため、RAR パンアンタゴニストである LE540⁵⁰⁾を用いた。LE540 の添加により、プロビタミン A の β -カロテンのみならず、ルテインの HA 産生促進作用も抑制された(Fig. 2-5a). コントロール群の HA 合成も LE540 存在下で一部阻害された。さらに、ルテインの RARs 活性化をレポーターアッセイで評価したところ、HA 合成を亢進する濃度域にて RARE 作動による SEAP 活性を用量依的に上昇させた(Fig. 2-5b). したがってルテイン自体あるいはその代謝物が、表皮細胞の RAR リガンドとして機能することが示された。

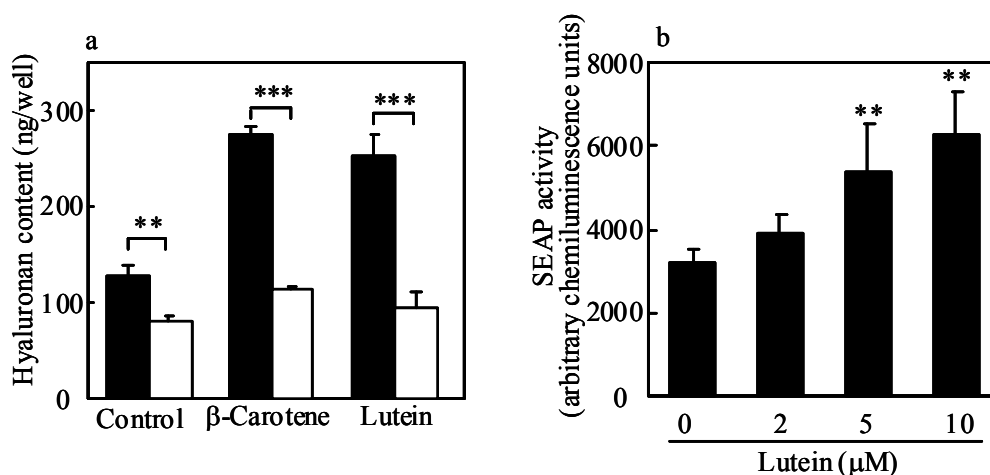


Fig. 2-5 Effect of lutein on RAR activation. (a) Following 30min incubation of human keratinocytes in the presence (*open columns*) or absence (*closed columns*) of 0.2 μM LE540, β -carotene or lutein were added to the culture at a concentration of 5 μM and incubated for 24 h. Hyaluronan content was measured as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD of 3 replicate assays. Significantly different from the value of LE540 untreated cells; **P < 0.01, ***P < 0.001 (Dunnett's test). (b) Keratinocytes transfected with pRARE-TA-SEAP reporter vector and an internal control vector were treated with the indicated concentration of lutein (2-10 μM) for 24 h. SEAP activity was measured by the EscApe SEAP Chemiluminescence system. Values represent mean $\pm$ SD of 3 replicate assays. Significantly different from the control value; **P < 0.01 (William's test).

2-3-3 ルテインの HA 合成誘導に対するシトラールの効果

表皮細胞はレチナールをレチノイン酸へと変換する能力を有する.⁵¹⁾ RALDHs の阻害薬であるシトラール⁵²⁾を用い、ルテインの HA 合成誘導に及ぼす影響を検討した. シトラールは, RA 刺激による HA 合成誘導には影響しなかったが, ルテイン存在下での HA 合成誘導を阻害した (Fig. 2-6). この結果から, ルテインはプロビタミン A の代謝と同様, 表皮細胞によりアルデヒドに変換され, 引き続き RALDH 依存的な酸化反応によりレチノイン酸様のカルボン酸へと代謝され, その代謝物が RAR のリガンドとして機能すると考えられた (Fig. 2-7).

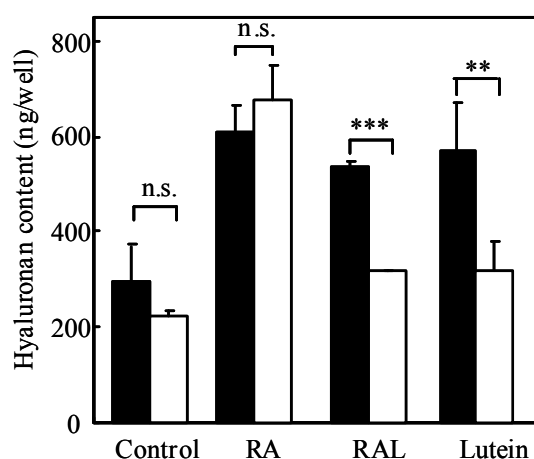


Fig. 2-6 Citral inhibits the effect of lutein on hyaluronan synthesis. Following 30 min incubation of human keratinocytes in the presence (*open columns*) or absence (*closed columns*) of 20 μ M citral, 10 nM retinoic acid (RA), 50 nM retinal (RAL) and 10 μ M lutein were added to the culture and incubated for 48 h. Hyaluronan content was measured as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD of 3 replicate assays. Significantly different from the value of citral untreated cells; **P < 0.01, ***P < 0.001 (Dunnett's test).

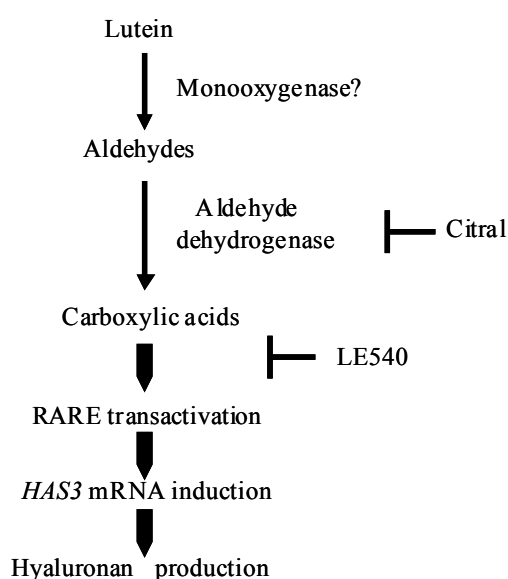


Fig. 2-7. Possible metabolic transformation of lutein in keratinocytes.

第 4 節：考察

本研究により、プロビタミン A に属する β -カロテンのみならず、ノンプロビタミン A であるルテインも RAR 依存的に表皮細胞の HA 合成を亢進することが明らかになった。

β -カロテンは重要なビタミン A 源であり、2 つのレチニル基から構成される。小腸の粘膜中で BCO1 により中央開裂し、2 分子のレチナールを生成する。さらにこのレチナールが RALDHs により活性型レチノイドである RA に変換される。BCO1^{53, 54)}、RALDH⁵⁵⁾ともに表皮での発現が確認されている。本研究で用いた培養ヒト正常表皮細胞でも BCO1 が発現していること、かつ RALDHs(RALDH1-3)のうち RALDH3 がドミナントに発現していることを mRNA レベルで確認した。したがって、プロビタミン A の一種である β -カロテンおよび β -クリプトキサンチンが、表皮細胞でレチノイドに変換される可能性は十分ある。 β -カロテンが RA と同様に、HAS3 mRNA の発現を誘導すること、またその HA 合成誘導が RAR 拮抗薬である LE540 の存在下で阻害されたことにより、表皮細胞におけるプロビタミン A 代謝経路の存在が裏付けられた。

一方、哺乳類でレチノイドに代謝されないノンプロビタミン A カロテノイドのルテイン、ゼアキサンチンおよびアスタキサンチンといったノンプロビタミン A カロテノイド⁴⁷⁾にも HAS3 mRNA 発現誘導活性および HA 合成促進作用が観察された。これらキサントフィル類は、カロテンの水素原子のいくつかがヒドロキシル基、または同じ炭素原子に結合する水素原子のペアがオキシ基と置換した構造を持つ。これら基本骨格はカロテンと同じくシクロヘキセン環とポリエンから構成される構造類似体である。ノンプロビタミンであるルテインの作用が β -カロテンと同様、LE540 で抑制され、さらにルテインの刺激により RARE 依存の転写活性が増大したことから、ルテインの代謝物あるいはルテイン自体が RAR のリガンドとして機能していることが示された。

これまでに、Matsumoto ら⁵⁶⁾は、無細胞系においてルテインが RAR に結合することを報告している。しかしながら、本検討において、表皮細胞へのルテインの効果が、RALDH の阻害剤であるシトラールにより抑制されたことから、ルテインはプロビタミン A 同様、表皮細胞によりアルデヒド化合物に変換され、さらに酸化反応を受けて RA 様のアナログに代謝されることで生理活性を示すと考えられる。表皮細胞におけるルテインの代謝経路の詳細、および実際に RAR リガンドとして機能する代謝化合物についてはさらなる検討が必要である。

ノンプロビタミン A の一種であるルテインは、ゼアキサンチンとともに主に網膜に存在する。黄斑色素にとって必須の栄養素⁵⁷⁾であり、皮膚でもその存在が確認されている。⁵⁸⁾ これらのキサントフィルは、優れた抗酸化物質であり、^{59, 60)} UVB 照射により惹起される表皮炎症、⁶¹⁾ 光老化あるいは光発癌⁶²⁾に対して抑制効果が

あることが報告されている。さらに **Paolmbo** らは、ルテインおよびゼアキサンチンの外用による皮膚弾力性、皮膚水分および脂質過酸化に対する有用性⁶³⁾ を報告している。これら皮膚に対するルテインの多彩な効果は、その化学的性質の抗酸化作用だけでなく、レチノイド様の活性が関与している可能性も考えられる。

本章では、プロビタミン A だけでなく、ノンプロビタミン A の代謝産物も **RAR** に対するアゴニスト活性を有し、*HAS3* mRNA 発現誘導を伴って表皮細胞の HA 合成を促進させることを明らかにした。抗酸化活性とともにレチノイド様の生理活性を併せもつカロテノイド類は、自然老化や光老化により低下した皮膚機能を改善させる可能性が示された。

第3章 細胞内 HA 基質プールの変動による HA 合成制御機構

第1節：序論

表皮細胞の HA 合成能を高める天然物質の探索を行ったところ、N-アセチルグルコサミン(NAG)にその作用を見出した。NAG は、カニ、エビなどの甲殻類の外殻を起源とする天然多糖類キチンを構成する単糖であり、すでに食品分野で広く応用されている。⁶⁴⁾ 生体においては、HA の他にヘパリンおよびヘパラン硫酸などの硫酸化 GAG の構成単糖であると同時に、様々な糖タンパク、糖脂質を修飾するアミノ糖である。NAG が糖供与体として機能するには、高いエネルギーを持たなければならないため、ヌクレオチドに活性化される必要がある。糖ヌクレオチドの UDP-NAG は、グルコーストランスポーター(GLUT)により取り込まれたグルコースから、その 2-5%がヘキソサミン経路を経て生合成される。⁶⁵⁾ 近年、UDP-NAG を糖供与体として O-NAG 転移酵素により触媒される O-グリコシル化の修飾部位が、タンパクのリン酸化部位と同一、あるいはその近傍であることから、NAG は細胞内シグナル伝達においても重要な役割を担うことが解明されつつある。^{66, 67)}

本研究では、培養表皮細胞における NAG の HA 合成促進機序を、RA の作用点と比較することで検討した。

第2節：実験材料および実験方法

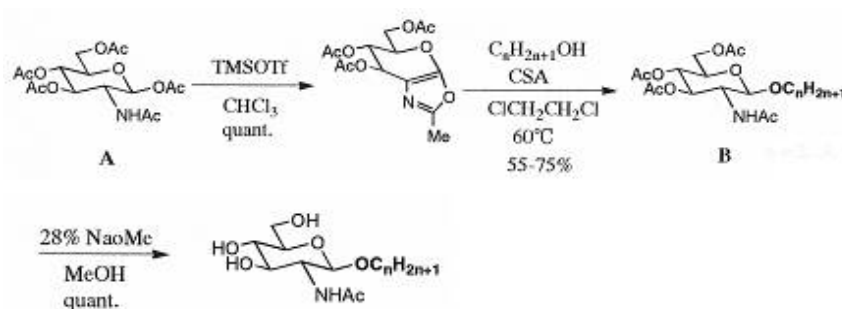
3-2-1 培養器具および試薬

Human skin fibroblasts (Detriut 551, ATCC CCL110) (ATCC 製), Retinol および Retinoic acid (Sigma 社製), N-acetylglucosamine (NAG) (Seikagaku 社製), Eagle's minimal essential medium (MEM) (ICN Biomedicals 社製), Fetal bovine serum (FBS) (Irvine Scientific 社製), 3, 5-diaminobenzoic acid (Sigma 社製), DC protein assay kit (Bio rad 社製), Sodium[³⁵S]Sulfate (100 mCi/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech 社製), UDP-[¹⁴C]GlcA (300 mCi/mmol) および [1,6-³H(N)]N-acetylglucosamine(60 μCi/mmol)(American Radiolabeled Chemicals 社製), Partisphere SAX (Whatman 社製), UDP-N-acetylglucosamine (Kyowa 社製)。

その他の試薬については、第1章および第2章で記載したものを用いた。

3-2-2 両親媒性 NAG 誘導体の合成

NAG の 1 位に親油性残基を付加した NAG 誘導体を、一般的な方法に従って合成した (Scheme 3)。1,2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranose A を、TMSOTf 存在下で、グリコシル化反応の際の脱離基として反応性が高いオキサゾリンドナーへと誘導した。CSA 存在下、オキサゾリンドナーと各脂肪族アルコール



Scheme 3. Design and synthesis of NAG derivatives

ル($n=2, 4, 5, 6, 8, 12$) とのグリコシル化を行い、それぞれ 55-75% の収率で β -グリコシド **B** を得た。 β -グリコシドの脱アセチル化により、目的とする 1 位に親油性をもつ NAG 誘導体を定量的に得た。⁶⁸⁾

3-2-3 細胞培養

ヒト表皮細胞の培養は第 1 章に記載した方法で実施した。ヒト皮膚線維芽細胞 (Detroit 551) は、10 % FBS 含有 MEM 培地を用いて 24-well プレートに播種した。コンフルエントに達するまで培養の後、FBS 不含培地で培地交換をおこない 24 h 馴化させた。次に評価化合物を添加し、24 h 後の培養上清中 HA 量を定量した。

3-2-4 DNA 定量

DNA 量の定量は、第 2 章に記載した方法に準じて実施した。

3-2-5 HA 定量

培養上清中の HA 量は、第 1 章に記載した方法に準じて実施した。

3-2-6 HAS 活性測定法

HA 合成酵素活性の測定は、Itano らの方法⁴¹⁾に従い実施した。NAG (5 mM) あるいは all-*trans* Retinoic acid (RA) (1 μ M) で 24 h 刺激した表皮細胞を回収し、0.5 mM dithiothreitol および 0.25 mM sucrose を含有する 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.1) 中で超音波破碎した。次に、細胞破碎画分を超遠心 (105,000g, 1 h) することにより粗膜画分を得た。UDP- $[^{14}\text{C}]$ GlcA (10 μ Ci/ml), 5 mM dithiothreitol, 15 mM MgCl_2 , 0.2 mM UDP-GlcA, 1.0 mM UDP-NAG を含む 25 mM HEPES-NaOH (pH 7.1) に粗膜画分を添加することにより酵素反応を開始し (total volume 200 μ l), 37°C で 1 h インキュベートした。酵素反応は、2 % sodium dodecyl sulfate 存在下で 100°C, 1 min 処理することに停止した。酵素反応物を Sephadex G-50 ゲルろ過カラム (15 x 50 mm) に供し、その素通し画分の

放射活性を測定した。

3-2-7 硫酸化 GAG 合成能評価

硫酸化グリコサミノグリカン(硫酸化 GAG)の *de novo* 合成能は, [35 S]Sulfate の培養上清 GAG 画分への取り込み活性により評価した。培養表皮細胞に NAG (5 mM), あるいは RA (1 μ M) を添加し, [35 S]Sulfate (20 μ Ci/ml)とともに 48 h 培養した, 培養上清をプロナーゼで消化(30 μ g/ml)した後, Sephadex G-50 ゲルろ過カラム(15x50 mm)に供し, その素通し画分の放射活性を測定した。

3-2-8 NAGK cDNA の単離

ヒト N-acetylglucosamine kinase (NAGK)遺伝子の cDNA は RT-PCR より単離した。ヒト表皮細胞から抽出した Total RNA を用い, mRNA のシーケンス (GenBank accession number AJ242910)を元に下記のプライマーを設計し, RT-PCR を行った。Human NAGK sense primer 5'-GGAAAGCTTGGCACACGATCCGAGGTC-3'; Human NAGK antisense primer 5'-AGGGAATTCGGAGCCGCCTCTAGGTTG-3' (30 cycle, 下線部は *HindIII* および *EcoRI* 制限酵素サイト)。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動の後, ゲルから切りし精製した。精製した cDNA を *HindIII/EcoRI* で消化し, プラスミドベクター (pSPT18) *HindIII/EcoRI* サイトに組み込んだ。シーケンシングにより, 目的とする NAGK cDNA が得られたことを確認し, DIG RNA labeling kit プロトコルに従い, DIG 標識した antisense/sense RNA プローブを調製した。

3-2-9 ノザンブロット解析

ノザンブロット解析は, 第 1 章で記載した方法に準じて実施した。

3-2-10 細胞内 UDP-NAG の定量

90 mm dish に播種した表皮細胞を, サブコンフルエントまで培養し, 0.04% BPE 含有, EGF および hydrocortisone 除去培地にて 24 h 馴化した。10 mM NAG を添加し, 24 h 培養の後, 0.25 % Trypsin 溶液を用いて細胞を回収した。ヒト皮膚線維芽細胞は, 10 % FBS 含有 MEM 培地を用いて 90 mm dish に播種し, コンフルエントまで培養した。その後, FBS 除去培地でさらに 24 h 培養し, 0.25 % Trypsin 溶液を用いて細胞を回収した。それぞれの細胞懸濁液は 100 $^{\circ}$ C, 4 min 熱処理した後, -20 $^{\circ}$ C で凍結した。凍結融解後, サンプルを 0.22 μ m メンブレンフィルターでろ過し, Sweeney らの方法⁶⁹⁾に従い HPLC による分析を実施した。HPLC 条件は, 充填カラム: Partisphere SAX (4.6 mm $\times$ 12.5cm), 溶離液: 30 mM KH₂PO₄ (pH 3.5), 流速; 1 ml/min に設定し, 260 nm の UV 吸収により検出した。標品として UDP-NAG を使用

し、予め作成した検量線をもとに定量をおこなった。

3-2-11 NAG の細胞内取り込み評価

24-well プレートに播種した表皮細胞をコンフルエントの状態まで培養し、培地を除去の後、細胞表面をグルコース不含 Krebs-Ringer リン酸緩衝液(KRP)で洗浄した。細胞に、 $[^3\text{H}]\text{GlcN}$ ($1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ KRP, 20 nM)あるいは $[^3\text{H}]\text{NAG}$ ($1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ KRP, 17 nM)を添加し、それぞれの添加群にグルコーストランスポーター阻害薬であるサイトカラシン B を添加した ($0\text{--}30\text{ }\mu\text{M}$)。 $37\text{ }^\circ\text{C}$ で 10 min 静置後、上清を除去し、ice-cold PBSで細胞表面を3回洗浄した。 $0.2\text{ }\%$ SDS 溶液で細胞を溶解させ、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

3-2-12 統計処理

統計解析は SAS システムにより実施した。 Dunnett's multiple comparison test でコントロールとの有意性を解析し、用量依存性の評価には William's test を用いた。 p 値 0.05 未満を統計的に有意とした。

第3節：実験結果

3-3-1 NAG による表皮細胞の HA 合成促進作用

単糖の HA 合成に及ぼす影響を把握するため、グルコース、ガラクトース、マンノース、グルクロン酸および NAG をそれぞれ最終濃度 10 mM でヒト表皮細胞に添加したところ、NAG 添加群のみ顕著に HA 合成が促進された (Fig. 3-1)。 NAG が作用を発現する添加濃度域について調べたところ、添加 3 mM より 10 mM まで用量依存的に HA 合成が亢進された (Fig. 3-2a)。

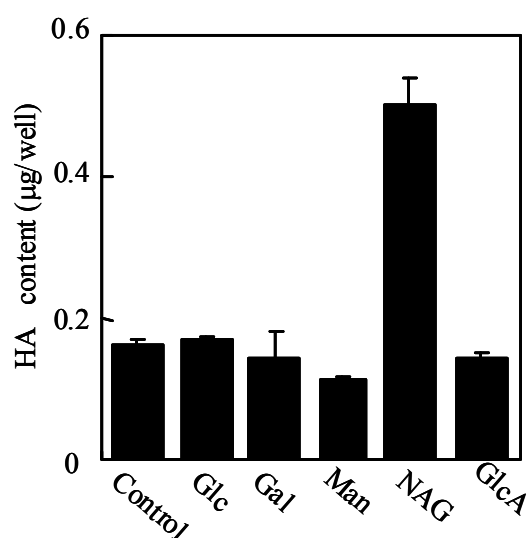


Fig. 3-1 Effects of monosaccharides on HA production in keratinocytes. Normal human keratinocytes were cultured with glucose, galactose, mannose, NAG or glucuronic acid at the concentrations of 10 mM for 24 h and hyaluronan production was measured as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD from three individual wells.

次に、NAGのヒト皮膚線維芽細胞のHA合成能に及ぼす作用について検討したところ、表皮細胞に作用を示す濃度域では、HA産生に影響しなかった(Fig. 3-2b)。尚、本実験条件下では表皮細胞、線維芽細胞ともにDNA量に顕著な変動を認めず、HA産生量の増減が細胞数に依存する結果でないことも確認した(Fig. 3-2a, b)。

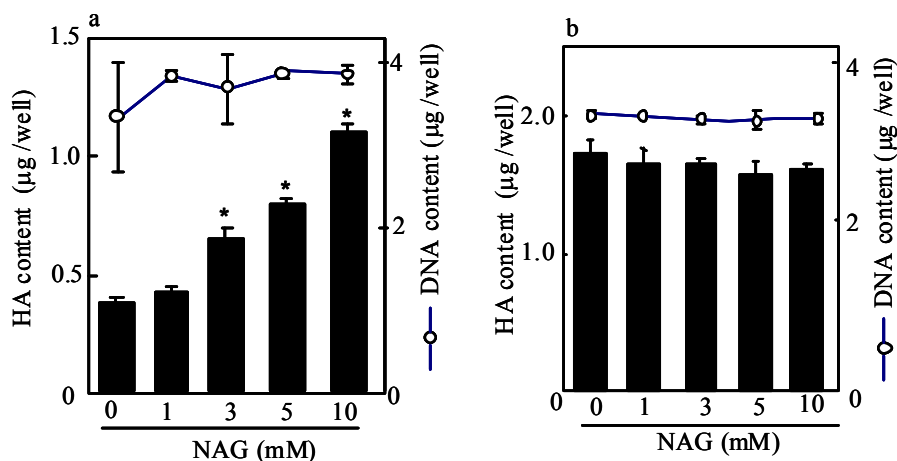


Fig. 3-2 NAG enhanced HA production in human keratinocytes. NAG (1-10 mM) added to a culture of human keratinocytes (a) or human skin fibroblasts (b) for 48 h. HA content (solid bar) and DNA content (open circles) were measured as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD from three individual wells. * $P < 0.05$ (William's test).

3-3-2 NAGのHAS3 mRNA発現に及ぼす影響

第1章および第2章において、表皮細胞のHA合成は主にHAS3遺伝子の発現を介して調節されていることを示した。そこでNAGおよびレチノイドのHA合成促進作用へのHAS3 mRNA発現の寄与について検討した。ノザンブロット解析の結果から、RAあるいはレチノールの刺激でHAS3 mRNAの顕著な発現誘導が認められた(Fig. 3-3a, b)が、NAGはHA合成を促進する濃度(5 mM)でHAS3遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。NAGとRAとの同時添加群においては、RA単独添加群と同レベルの発現量の増大に留まった(Fig. 3-3a)。

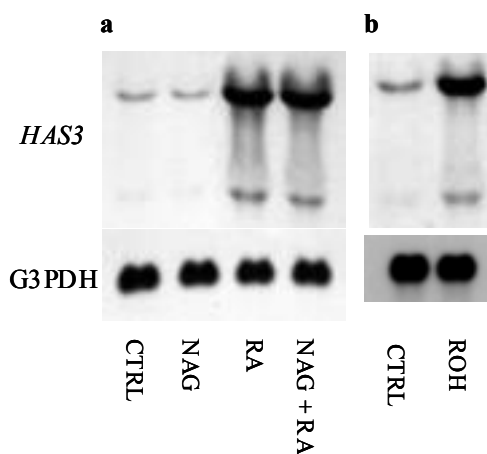


Fig. 3-3. Effects of NAG and retinoids on the expression of HAS3 mRNA in keratinocytes.

Keratinocytes were incubated for 24 h in the presence of NAG (5 mM) and RA (1 μ M), alone and in combination (a), retinol (1 μ M) (b). Equal amounts of total RNA (5 μ g per lane) were hybridized with an HAS3 probe. Blots were stripped and rehybridized with a G3PDH probe to control for variation in loading. Similar results were obtained in two independent experiments.

3-3-3 NAG の HAS 活性に及ぼす影響

NAG が HA 合成酵素活性に及ぼす効果について検討した。Fig. 3-4 に示すように、RA が顕著に HAS 活性を増大させたのに対し、NAG 添加では HAS 活性変動が認められなかった。

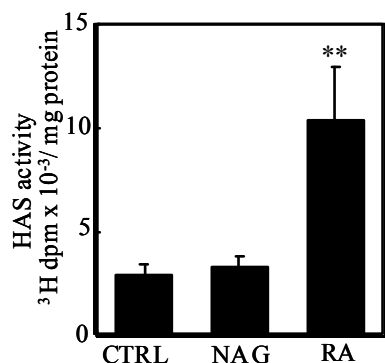


Fig. 3-4. Effect of NAG and RA on HAS activity in keratinocytes. Keratinocytes were incubated for 24 h in the presence of NAG (5 mM) or RA (1 μ M). HAS activity was determined as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD of four experiments. ** $P < 0.01$ (Dunnett's test).

3-3-4 NAG による細胞内 UDP-NAG プールの増大

NAG は、NAG kinase(NAGK)によるリン酸化を介して最終的に UDP-NAG へ変換される。⁷⁰⁾ 表皮細胞および皮膚線維芽細胞の NAGK 発現について転写レベルで検討した。ノザンブロット解析の結果、表皮細胞および皮膚線維芽細胞は、共に NAGK mRNA を発現していることを確認した(Fig. 3-5a)。次に、表皮細胞に NAG を添加後、細胞内 UDP-NAG プールサイズを HPLC にて解析した(Fig. 3-5b)。NAG の添加により表皮細胞内 UDP-NAG 量が顕著に増大したことから、表皮細胞に取り込まれた NAG は、UDP-NAG に変換されると考えられた。通常培養条件下における皮膚線維芽細胞の UDP-NAG プールは、DNA 当たり表皮細胞の約 4 倍の値を示した。このことから、線維芽細胞培養系で NAG による HA 合成誘導が認められなかったのは(Fig. 3-2b)、線維芽細胞の UDP-NAG プールが HA 合成の律速にならないことがその一因と推測された。

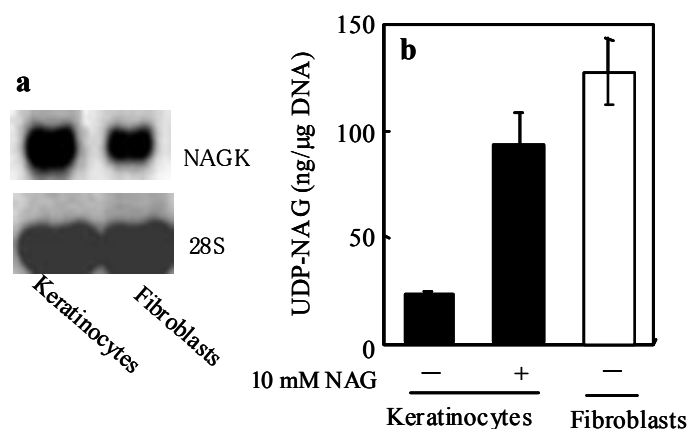


Fig. 3-5. Effect of NAG on UDP-NAG pools.

(a) The expression of NAG kinase (NAGK) mRNA in Keratinocytes and skin fibroblasts. Total RNA were extracted from keratinocytes and skin fibroblasts. Equal amount of samples were hybridized with NAGK probes. (b) The pool sizes of UDP-NAG in untreated keratinocytes and fibroblasts and NAG-treated keratinocytes. Keratinocytes were incubated with NAG for 24 h. Cells were extracted with boiling water and analysis for UDP-NAG by HPLC as described in *Materials and Methods*.

次に、細胞内基質プールサイズを増大させることがわかった NAG と、HA 合成を転写レベルで制御する RA について、HA 合成誘導に至る経時的变化を比較検討した(Fig. 3-6). RA 刺激により、添加 1 日目までに HA 産生量が顕著に増加し、それ以降はコントロール群と同様の合成挙動を示した。一方、NAG による上清中の HA 蓄積量は、添加 2 日目ではじめて有意に増加した後、3 日後まで直線的に増加し、RA に比して遅れたタイミングで HA 合成が促進された。

細胞内 UDP-NAG は、HA のみならず硫酸化 GAG の基質にもなり得ることから、NAG の効果が HA 合成に特異的か否かを調べるために、硫酸化 GAG 合成に及ぼす NAG 添加の影響について検討した。RA は、添加した $[^{35}\text{S}]$ Sulfate の上清への取り込み活性を増大させたのに対し、NAG は取り込み活性に影響を及ぼさなかった(Fig. 3-7). したがって NAG は、硫酸化 GAG 合成には関与せず、HA 合成を特異的に亢進すると考えられた。

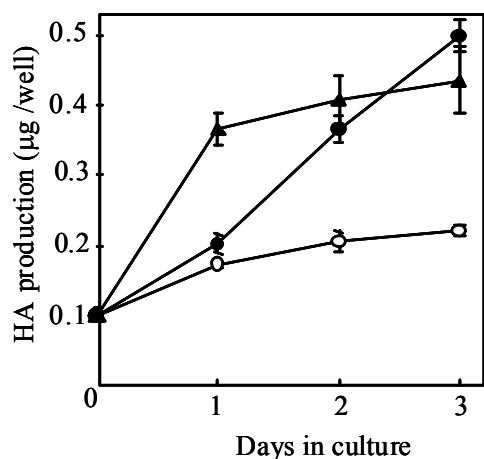


Fig. 3-6 Time course of the effects of NAG and RA on HA production in human keratinocytes. Human skin keratinocytes were incubated in medium only (*open circles*), in the presence of NAG (5mM)(*closed circle*) or RA (1μM)(*closed triangles*). HA production was estimated. Values represent mean $\pm$ SD of four experiments.

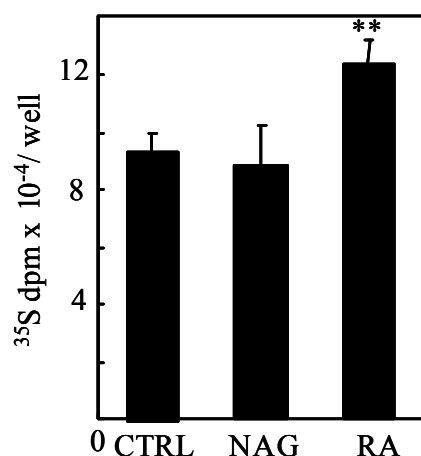


Fig. 3-7 Effects of NAG and RA on the incorporation of $[^{35}\text{S}]$ Sulfate into glycosaminoglycans. Keratinocytes were incubated for 48 h with medium only or medium supplemented with NAG (5 mM) or RA (1 μM). The $[^{35}\text{S}]$ Sulfate incorporated into $[^{35}\text{S}]$ glycosaminoglycan in the supernatant was determined as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD of four experiments. ** $P < 0.01$ (Dunnett's test).

Fig. 3-8 に、NAG とレチノイドを同時に添加した際の表皮細胞の HA 産生量を示す。レチノール、RA とともに NAG との同時添加により相乗的に HA の産生量を増加

させた．添加した RA の添加濃度(1 μ M)は, RA 単独添加においてはすでに作用が飽和する濃度であることから(第 1 章 Fig. 1-5), NAG との同時添加により UDP-NAG プールが増大し, HA 産生が相乗的に亢進したと推測された．

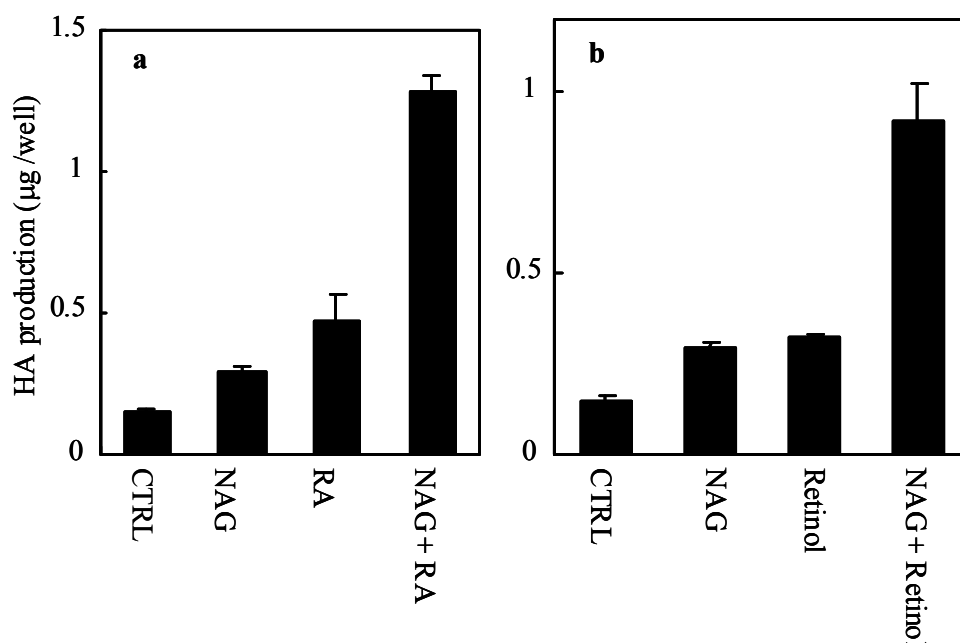


Fig. 3-8. Synergistic stimulation of keratinocyte HA production by NAG and retinoids.

Keratinocytes were incubated for 24 h in the presence of NAG (10mM) and RA (1 μ M) (a), NAG (10 mM) and retinol (1 μ M) (b), alone and in combination. HA production was assessed as described in *Materials and Methods*. Values represent mean $\pm$ SD of three experiments.

3-3-5 両親媒性 NAG 誘導体による HA 合成促進作用

NAG の HA 合成促進作用の発現には, 本研究の実験条件では 3 mM 以上の添加濃度が必要である. NAG の細胞内への輸送を, グルコーストランスポーター(GLUT)を介して輸送される GlcN と比較検討した. 細胞に添加した [3 H]GlcN は, 10 min 後, その放射活性の約 0.7% が細胞内に取り込まれ, さらに GLUT 阻害薬のサイトカラシン B を添加することでその取り込みが阻害された. 一方, [3 H]NAG を添加した細胞画分の放射活性は, [3 H]GlcN のそれに比して極めて低いレベルであり, サイトカラシン B の添加で放射活性に変化が認められなかった(Fig. 3-9). 得られた放射活性は, 細胞に非特異的に吸着した [3 H]NAG を検出している可能性もある. この結果から, NAG は GlcN と異なり, GLUT を介して輸送されないことが示された. したがって NAG の作用発現に高濃度の添加が必要な理由は, 水溶性が高い NAG が, 単純拡散で細胞膜を透過する必要があるためと推測された. そこで NAG の疎水性を向上させるために 1 位に C2 から C12 のアルキル鎖を導入した NAG 誘導体を合成

した.⁶⁸⁾ それぞれ 0.1 mM の濃度で表皮細胞培養系に添加したところ, アルキル鎖長 C8(CLogP, 2.417)で最大の HA 合成促進作用を認め, 10 mM NAG 添加群と同レベルの作用を示した (Fig. 3-10).

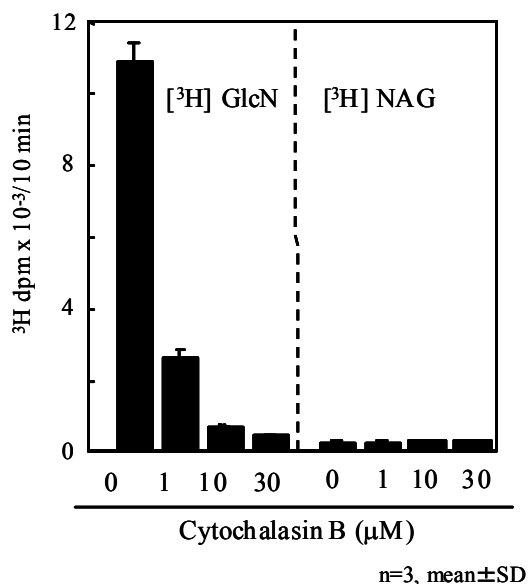
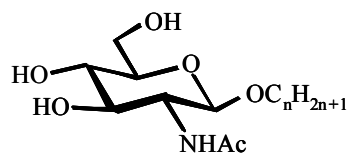
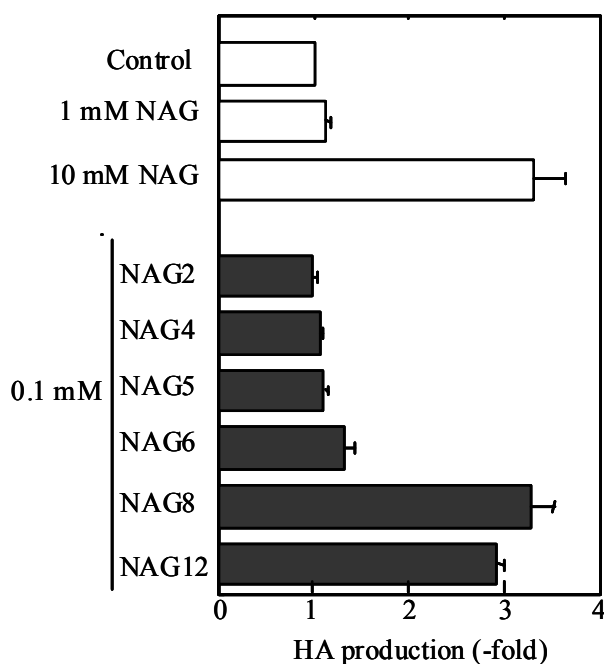


Fig. 3-9 Entry of radiolabelled GlcN and NAG into keratinocytes. Human keratinocytes were incubated in KRP buffer with [³H]GlcN (1 μCi/ml) or [³H]NAG (1 μCi/ml) in the presence and the absence of cytochalasin B for 10 min at 37 C°. Sugar transport was measured as described in *Materials and Methods*. Values represent mean±SD of three experiments.



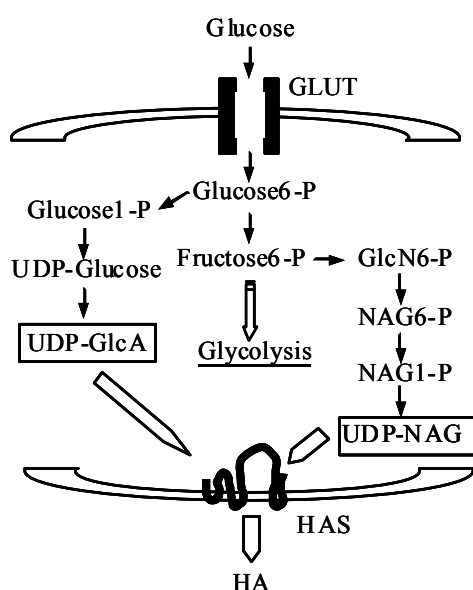
Compd	n	CLogP
NAG2	2	-0.757
NAG4	4	0.301
NAG5	5	0.830
NAG6	6	1.360
NAG8	8	2.417
NAG12	12	4.533

Fig. 3-10 Effects of NAG and NAG analogues on HA production in keratinocytes. Human keratinocytes were cultured with NAG (1 or 10 mM) or 0.1mM NAG analogues (NAG2, NAG4, NAG5, NAG6, NAG8 and NAG12) for 48 h. HA content was assessed as described in *Materials and Methods*. Values represent mean±SD of three experiments.

第 4 節：考察

本研究において、NAG が培養表皮細胞の HA 合成を促進することを示した。その合成促進機序は、転写レベルにおける合成制御(第 1 章および第 2 章)とは異なり、細胞内基質レベルにおける制御によるものであった。

NAG は、HA を含む GAG、種々の糖タンパク質および糖脂質を構成する単糖である。一方、リン酸化部位の O-NAG によるタンパク修飾が、細胞内シグナル伝達に関与することが示唆されている。⁶⁷⁾ そこで、転写レベルにおける制御を想定し、表皮細胞の *HAS* 遺伝子発現および *HAS* 酵素活性を測定したが、NAG はいずれにも影響を及ぼさなかった。そこで、添加した NAG が表皮細胞内に取り込まれ、HA の細胞内基質へと変換されている可能性について検討した。HA に対する細胞内の糖供与体は UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-NAG)と UDP-グルクロン酸(UDP-GlcA)であり、GLUT より取り込まれたグルコースから Scheme 4 に示す経路により合成される。UDP-NAG は、その前駆体自体がヌクレオチド、グルコース、アミノ酸および脂肪酸の代謝系から供給されるため、その合成は複雑に制御されていると予想される。



Scheme 4. Biosynthetic pathways of UDP-NAG and UDP-GlcA

一方、細胞内には複合糖質のリソソーム分解物として NAG が存在する。細胞内の NAG は NAG キナーゼ(NAGK)により NAG6-リン酸に、最終的には糖供与体である UDP-NAG に変換されることで、糖タンパク質や糖脂質の糖付加に再利用される。⁷⁰⁾ そこで、表皮細胞および真皮線維芽細胞での NAGK の発現を転写レベルで調べたところ、いずれの細胞においても NAGK mRNA が発現していることを確認した。したがって

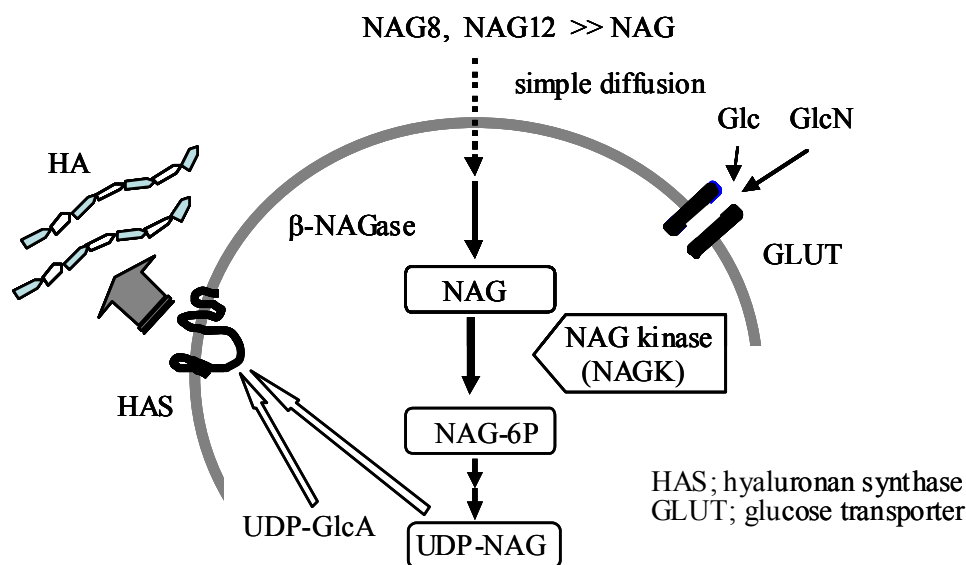
添加した NAG が細胞内に取り込まれると、その NAG は速やかに UDP-NAG へと変換されると予想された。NAG の細胞内基質プール量を定量したところ、NAG を添加された表皮細胞で UDP-NAG 量の増加が観察された。これらの結果から、NAG の作用は、細胞内基質増大作用によるものであり、HA 生合成過程において基質の合成が律速になっていると考えられた。一方、皮膚線維芽細胞では、細胞あたりの UDP-NAG が表皮細胞の約 4 倍と高かったことから、UDP-NAG の細胞内プールが

HA 合成の律速になっておらず、そのことが線維芽細胞培養系にて NAG の作用を認めない原因であると推測された。

また、表皮細胞に RA と NAG を同時に添加することにより、相乗的な HA 合成促進効果を認めたが、このことより HA のもう一つの糖供与体である UDP-GlcA の細胞内プールは、HA 合成の律速になっていないことが示唆された。

NAG により表皮細胞の HA 合成を促進させるには、mM オーダーの添加が必要である。アイソトープ標識体を用いた実験から NAG の細胞内取り込みは、グルコサミンに比して極めて低レベルであったことから、NAG はグルコースやグルコサミンのようにグルコーストランスポーター(GLUT)を介した取り込みではなく、単純拡散により取り込まれると予想された。そこで NAG の疎水性を向上させるために 1 位に C2 から C12 のアルキル鎖を導入した NAG 誘導体を合成した。 β -N-Acetyl-D-glucosaminidase (β -NAGase)がヒト皮膚に存在することがすでに知られ,⁷¹⁾ さらに培養表皮細胞にも β -NAGase 活性が確認されたことから(結果省略)、NAG 誘導体 1 位の立体は、細胞内で NAG へ変換可能な β -体とした。1 位にアルキル鎖を 8, あるいは 12 付加した NAG 誘導体は、NAG 有効濃度の 100 分の 1 濃度で、ほぼ同等の作用を発揮した。この結果により、NAG が単純拡散により細胞内に取り込まれることが示唆された(Scheme 5)。

本研究により、HA の合成調節が HAS の発現変動だけでなく、細胞や組織においては細胞内の基質レベルでも制御され得ることが示された。



Scheme 5. Possible mechanism for modulation of hyaluronan production by NAG derivatives

総括

ヒアルロン酸(HA)の特徴は、その高い水分保持能にあり、生体内の水を水和ゲルとして保持する役割を担っている。表皮細胞間を埋める HA は、増殖・分化・移動・接着といった基本的な細胞機能と密接な関係があり、加齢に伴う HA の減少は皮膚機能の低下に関与すると考えられている。表皮 HA の代謝制御剤は抗老化機能性素材を開発する上で有用である。しかし HA 研究の対象は、関節、眼および皮膚真皮などの結合組織が主体であり、重層上皮組織である表皮の HA 代謝機構については未だ不明な点が多い。

本研究では、表皮におけるヒアルロン酸合成制御機構の解明とその制御剤の開発を主眼として検討を進めた。

第 1 章では、表皮での HA 合成が 3 種類ある HA 合成酵素遺伝子のうち、表皮ではいずれにより制御されているかを明らかにするため、まず種々サイトカインの HA 合成に及ぼす影響について検討した。その結果、IFN- γ が HA の合成を促進し、TGF- β が逆に抑制することを見出した。両サイトカインによる合成変動と一致する発現挙動を示すのはヒト表皮細胞で恒常的に発現している *HAS3* であった。表皮 HA の合成を促進させることが知られるレチノイン酸(RA)も *HAS3* mRNA の発現を顕著に増加させた。これらのことから、転写レベルにおける表皮細胞の HA 合成制御は、主に *HAS3* が担うことを示した。

HAS3 遺伝子発現を強力に惹起した RA は、細胞の分化増殖の制御など重要な役割を担うビタミン A の活性体であり、美容面においても、欧米ではしわなどの光障害皮膚の改善薬として認可されている。しかしながら、多岐にわたる強い生理活性を有する RA は、皮膚刺激等の副作用を生じることがあり、安全かつ有効な改善剤が望まれていた。

第 2 章では、ビタミン A 源であるカロテノイド類に着目し、HA 合成へのビタミン A 関連物質の関与について調べた。その結果、RA へと代謝される β -カロテンや β -クリプトキサンチンといったプロビタミン A カロテノイドだけでなく、哺乳類においてはビタミン A に変換されないルテイン、ゼアキサンチンおよびアスタキサンチンのノンプロビタミン A カロテノイドも、*HAS3* mRNA 発現誘導に伴って HA の産生を亢進させた。ノンプロビタミン A のルテインの効果は、RA レセプター(RAR)阻害剤である LE540 により抑制された。加えてルテインは、レポーターアッセイで、RAR を活性化する能力を有することもわかった。さらにルテインによる作用がレチナル脱水素酵素(RALDH)阻害剤のシトラールにより抑制されたことから、ルテイン自体よりむしろ、その代謝化合物が、RAR アゴニストとして機能することを示した。したがって、ヒト表皮細胞は、ノンプロビタミン A カロテノイドを RAR と結合可能な RA アナログに代謝する能力を有し、それにより RA 様の生理活

性が惹起されると考えられた。

第3章においては、天然化合物の中から表皮細胞のHA合成制御因子を探索したところ、N-アセチルグルコサミン(NAG)にその効果を見出した。NAGは*HAS*遺伝子発現および酵素活性には影響せず、第1章および第2章における転写レベルでの制御とは異なる作用点があると考えられた。そこで、NAGが細胞内の糖供与体のUDP-NAGへ変換される可能性について検討した。複合糖質のリソソーム分解物であるNAGをUDP-NAGに変換し再利用するためのNAGキナーゼ(NAGK)に着目し、その発現を検討したところ、表皮細胞は、NAGK mRNAを恒常的に発現していることがわかった。したがって添加したNAGは、HAの細胞内基質であるUDP-NAGへと変換されることが示唆された。NAG処理した細胞のUDP-NAG量が実際に増加したことから、NAGの作用点は細胞内基質プールの増大にあることを明らかにした。次に、NAGの作用を高めることを目的として、両親媒性のNAG誘導体を合成した。NAG誘導体は、NAGの添加有効濃度の約1%濃度でHA合成を促進させ、HA合成の制御剤の可能性を示した。さらにNAGが輸送担体による取り込みというよりむしろ単純拡散により細胞内に取り込まれることを示唆した。これらの結果から、細胞、組織においては転写レベルにおける制御だけでなく、細胞内基質プールもHA合成の制御機構として機能すると考えられた。

以上、本申請論文では、抗老化機能性素材開発に向けた表皮HA代謝制御に関わる新たな知見を提示した。

まず、表皮の転写レベルにおけるHA合成の制御は主に*HAS3* mRNAが担うことを見出した。このことにより、表皮HA合成制御剤開発において、*HAS3* mRNA発現を指標にした薬剤探索が可能となる。

次に、RAR活性化を機序とすることからRA様の生理活性が期待でき、かつ安全性が高いHA合成制御剤として、プロビタミンAおよびシクロヘキセン環とポリエン構造を有するノンプロビタミンAカロテノイドの可能性を示した。

最後に、HA合成促進剤として細胞内基質プールを増大させるNAGを見出し、転写レベルによる制御だけではなく、細胞内基質プールへの着眼もHA合成制御剤開発の重要な戦略になることを示した。さらに、膜透過を考慮した両親媒性NAG誘導体が、より効率的にHA合成を亢進させることを示した。

謝 辞

本申請論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導を賜りました伊東 晃教授ならびに野水 基義教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、ご親切なご指導をいただきましたカネボウ化粧品価値創成研究所 井上紳太郎博士に心から感謝の意を表します。さらに、本研究にあたり、ご懇切なご助言をいただきました価値創成研究所の方々に厚く感謝致します。

掲載論文

本研究の内容は以下の論文に発表した.

第 1 章

Sayo T, Sugiyama Y, Takahashi Y, Ozawa N, Sakai S, Ishikawa O, Tamura M and Inoue S, Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 43-48 (2002).

第 2 章

Sayo T, Sugiyama Y and Inoue S, Lutein, a nonprovitamin A, activates the retinoic acid receptor to induce HAS3-dependent hyaluronan synthesis in keratinocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1282-1286 (2013).

第 3 章

Sayo T, Sakai T and Inoue S, Synergistic effect of N-acetylglucosamine and retinoids on hyaluronan production in human keratinocytes. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **17**, 77-83 (2004).

引用文献

- 1) Laurent TC, and Fraser JR, *FASEB J*, **6**, 2397-404 (1992).
- 2) Mack JA, Abramson SR, Ben Y, Coffin JC, Rothrock JK, Maytin EV, Hascall VC, Largman C, and Stelnicki EJ, *FASEB J*, **17**, 1352-4 (2003).
- 3) Passi A, Sadeghi P, Kawamura H, Anand S, Sato N, White LE, Hascall VC, and Maytin EV, *Exp Cell Res*, **296**, 123-34 (2004).
- 4) Tobiishi M, Sayo T, Yoshida H, Kusaka A, Kawabata K, Sugiyama Y, Ishikawa O, and Inoue S, *J Dermatol Sci*, **64**, 31-8 (2011).
- 5) Reed RK, Laurent UB, Fraser JR, and Laurent TC, *Am J Physiol*, **259**, H532-5 (1990).
- 6) Tammi R, Saamanen AM, Maibach HI, and Tammi M, *J Invest Dermatol*, **97**, 126-30 (1991).
- 7) Inoue S, and Sayo T, *Seikagaku*, **77**, 1152-64 (2005).
- 8) Longas MO, Russell CS, and He XY, *Carbohydr Res*, **159**, 127-36 (1987).
- 9) Ghersetich I, Lotti T, Campanile G, Grappone C, and Dini G, *Int J Dermatol*, **33**, 119-22 (1994).
- 10) Fleischmajer R, Perlish JS, and Bashey RI, *Biochim Biophys Acta*, **279**, 265-75 (1972).
- 11) Longas MO, Russell CS, and He XY, *Biochim Biophys Acta*, **884**, 265-9 (1986).
- 12) Tsuji T, *Rinsho hifu*, **51**, 53-57 (1997).
- 13) Yoshida M, Itano N, Yamada Y, and Kimata K, *J Biol Chem*, **275**, 497-506 (2000).
- 14) Itano N, and Kimata K, *J Biol Chem*, **271**, 9875-8 (1996).
- 15) Watanabe K, and Yamaguchi Y, *J Biol Chem*, **271**, 22945-8 (1996).
- 16) Shyjan AM, Heldin P, Butcher EC, Yoshino T, and Briskin MJ, *J Biol Chem*, **271**, 23395-9 (1996).
- 17) Spicer AP, Augustine ML, and McDonald JA, *J Biol Chem*, **271**, 23400-6 (1996).
- 18) Spicer AP, Olson JS, and McDonald JA, *J Biol Chem*, **272**, 8957-61 (1997).
- 19) Sugiyama Y, Shimada A, Sayo T, Sakai S, and Inoue S, *J Invest Dermatol*, **110**, 116-21 (1998).
- 20) Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, and Tammi M, *J Invest Dermatol*, **90**, 412-4 (1988).
- 21) Grove GL, and Kligman AM, *J Gerontol*, **38**, 137-42 (1983).
- 22) Sakai S, Yasuda R, Sayo T, Ishikawa O, and Inoue S, *J Invest Dermatol*, **114**, 1184-7 (2000).
- 23) Tammi R, MacCallum D, Hascall VC, Pienimäki JP, Hyttinen M, and Tammi M, *J*

- Biol Chem*, **273**, 28878-88 (1998).
- 24) Chen WY, and Abatangelo G, *Wound Repair Regen*, **7**, 79-89 (1999).
 - 25) Kennedy CI, Diegelmann RF, Haynes JH, and Yager DR, *J Pediatr Surg*, **35**, 874-9 (2000).
 - 26) Jacobson A, Brinck J, Briskin MJ, Spicer AP, and Heldin P, *Biochem J*, **348 Pt 1**, 29-35 (2000).
 - 27) Kuroda K, Utani A, Hamasaki Y, and Shinkai H, *J Dermatol Sci*, **26**, 156-60 (2001).
 - 28) Pienimäki JP, Rilla K, Fulop C, Sironen RK, Karvinen S, Pasonen S, Lammi MJ, Tammi R, Hascall VC, and Tammi MI, *J Biol Chem*, **276**, 20428-35 (2001).
 - 29) Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, Maibach HI, and Tammi M, *J Invest Dermatol*, **92**, 326-32 (1989).
 - 30) Shimada A, Ota Y, Sugiyama Y, Sato S, Kume K, Shimizu T, and Inoue S, *J Invest Dermatol*, **110**, 889-93 (1998).
 - 31) Sakai S, Sayo T, Kodama S, and Inoue S, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, **12**, 276-83 (1999).
 - 32) Soma Y, and Grotendorst GR, *J Cell Physiol*, **140**, 246-53 (1989).
 - 33) Jutley JK, Wood EJ, and Cunliffe WJ, *Matrix*, **13**, 235-41 (1993).
 - 34) Fowlis DJ, Flanders KC, Duffie E, Balmain A, and Akhurst RJ, *Cell Growth Differ*, **3**, 81-91 (1992).
 - 35) Escherick JS, DiCunto F, Flanders KC, Missero C, and Dotto GP, *Cancer Res*, **53**, 5517-22 (1993).
 - 36) Shipley GD, Pittelkow MR, Wille JJ, Jr., Scott RE, and Moses HL, *Cancer Res*, **46**, 2068-71 (1986).
 - 37) Shirakata Y, *J Dermatol Sci*, **59**, 73-80 (2010).
 - 38) Nickoloff BJ, Mitra RS, Elder JT, Fisher GJ, and Voorhees JJ, *Br J Dermatol*, **121**, 161-74 (1989).
 - 39) Fransson J, Emilson A, Scheynius A, and Hammar H, *Arch Dermatol Res*, **287**, 517-23 (1995).
 - 40) Ohtani T, Memezawa A, Okuyama R, Sayo T, Sugiyama Y, Inoue S, and Aiba S, *J Invest Dermatol*, **129**, 1412-20 (2009).
 - 41) Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lénas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, and Kimata K, *J Biol Chem*, **274**, 25085-92 (1999).
 - 42) Sayo T, *The Pharmaceutical Society of Japan*, **44**, 421-5 (2008).
 - 43) Tadaki T, Watanabe M, Kumasaka K, Tanita Y, Kato T, Tagami H, Horii I, Yokoi T,

- Nakayama Y, and Kligman AM, *Tohoku J Exp Med*, **169**, 131-9 (1993).
- 44) Olson JA, *Journal of Nutrition*, **119**, 105-8 (1989).
 - 45) Saavalainen K, Pasonen-Seppanen S, Dunlop TW, Tammi R, Tammi MI, and Carlberg C, *J Biol Chem*, **280**, 14636-44 (2005).
 - 46) Pasonen-Seppanen SM, Maytin EV, Torronen KJ, Hyttinen JM, Hascall VC, MacCallum DK, Kultti AH, Jokela TA, Tammi MI, and Tammi RH, *J Invest Dermatol*, **128**, 797-807 (2008).
 - 47) Bendich A, and Olson JA, *FASEB Journal*, **3**, 1927-32 (1989).
 - 48) Rilla K, Pasonen-Seppanen S, Rieppo J, Tammi M, and Tammi R, *J Invest Dermatol*, **123**, 708-14 (2004).
 - 49) Johnson-Wint B, and Hollis S, *Anal Biochem*, **122**, 338-44 (1982).
 - 50) Umemiya H, Fukasawa H, Ebisawa M, Eyrolles L, Kawachi E, Eisenmann G, Gronemeyer H, Hashimoto Y, Shudo K, and Kagechika H, *J Med Chem*, **40**, 4222-34 (1997).
 - 51) Siegenthaler G, Saurat JH, and Poncet M, *Biochem J*, **268**, 371-8 (1990).
 - 52) Kikonyogo A, Abriola DP, Dryjanski M, and Pietruszko R, *Eur J Biochem*, **262**, 704-12 (1999).
 - 53) Redmond TM, Gentleman S, Duncan T, Yu S, Wiggert B, Gantt E, and Cunningham FX, Jr., *J Biol Chem*, **276**, 6560-5 (2001).
 - 54) Takeda A, Morinobu T, Takitani K, Kimura M, and Tamai H, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **49**, 69-72 (2003).
 - 55) Cheung C, Smith CK, Hoog JO, and Hotchkiss SA, *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 100-7 (1999).
 - 56) Matsumoto A, Mizukami H, Mizuno S, Umegaki K, Nishikawa J, Shudo K, Kagechika H, and Inoue M, *Biochem Pharmacol*, **74**, 256-64 (2007).
 - 57) Neuringer M, Sandstrom MM, Johnson EJ, and Snodderly DM, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 3234-43 (2004).
 - 58) Wingerath T, Sies H, and Stahl W, *Arch Biochem Biophys*, **355**, 271-4 (1998).
 - 59) Zhang LX, Cooney RV, and Bertram JS, *Carcinogenesis*, **12**, 2109-14 (1991).
 - 60) Martin KR, Failla ML, and Smith JC, Jr., *J Nutr*, **126**, 2098-106 (1996).
 - 61) Gonzalez S, Astner S, An W, Goukassian D, and Pathak MA, *J Invest Dermatol*, **121**, 399-405 (2003).
 - 62) Astner S, Wu A, Chen J, Philips N, Rius-Diaz F, Parrado C, Mihm MC, Goukassian DA, Pathak MA, and Gonzalez S, *Skin Pharmacol Physiol*, **20**, 283-91 (2007).
 - 63) Palombo P, Fabrizi G, Ruocco V, Ruocco E, Fluhr J, Roberts R, and Morganti P,

- Skin Pharmacol Physiol*, **20**, 199-210 (2007).
- 64) Matahira Y, *New Food Industry*, **41**, 9-13 (1999).
 - 65) McClain DA, and Crook ED, *Diabetes*, **45**, 1003-9 (1996).
 - 66) Comer FI, and Hart GW, *Biochemistry*, **40**, 7845-52 (2001).
 - 67) Haltiwanger RS, Busby S, Grove K, Li S, Mason D, Medina L, Moloney D, Philipsberg G, and Scartozzi R, *Biochem Biophys Res Commun*, **231**, 237-42 (1997).
 - 68) Fukunaga K, Sayo T, Sakai S, and Inoue S, *Japan Tokkyo koho*, P4589865 (2010).
 - 69) Sweeney C, Mackintosh D, and Mason RM, *Biochem J*, **290 (Pt 2)**, 563-70 (1993).
 - 70) Hinderlich S, Nohring S, Weise C, Franke P, Stasche R, and Reutter W, *Eur J Biochem*, **252**, 133-9 (1998).
 - 71) Orlacchio A, Maffei C, Beccari T, and Lisi P, *Clin Chim Acta*, **141**, 127-33 (1984).