

学位論文

表皮ヒアルロン酸の生理機能と皮膚の抗老化に関する研究

2023年 9月

遠藤 洋子

略語表

4MU	: 4-methylumbelliferone
4MU- α -NAG	: 4-methylumbelliferyl <i>N</i> -acetyl- α -D-glucosaminide
4MU- β -NAG	: 4-methylumbelliferyl <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminide
BPE	: bovine pituitary extract
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
dsDNA	: double-stranded DNA
EGF	: epidermal growth factor
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	: fetal bovine serum
FLG	: filaggrin
GlcUA	: glucuronic acid
H&E	: hematoxylin and eosin
HA	: hyaluronan
HABP	: HA-binding protein
HAS	: HA synthase
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulphonic acid
HPLC	: high-performance liquid chromatography
KGF	: keratinocyte growth factor
LC-MS/MS	: liquid chromatography-tandem mass spectrometry
NAG	: <i>N</i> -acetylglucosamine
NAG-6P	: <i>N</i> -acetylglucosamine-6 phosphate
NAGK	: NAG kinase
NAGase	: <i>N</i> -acetylglucosaminidase
PBS	: phosphate-buffered saline
PCNA	: proliferating cell nuclear antigen
PUGNAc	: <i>o</i> -(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino <i>N</i> -phenylcarbamate
RA	: All- <i>trans</i> retinoic acid
RPLP0	: ribosomal protein lateral stalk subunit P0
St-HAase	: <i>Streptomyces</i> hyaluronidase
TGM1	: transglutaminase 1
UDP	: uridine diphosphate
siRNA	: small interfering RNA
α -NAG2	: 1-ethyl- α - <i>N</i> -acetylglucosaminide
β -NAG2	: 1-ethyl- β - <i>N</i> -acetylglucosaminide

目次	
序論	1
第1章 β -NAG2の選択的なHA産生促進メカニズム	5
1-1 小序	5
1-2 材料および実験方法	5
1-2-1 試薬	5
1-2-2 正常ヒト表皮細胞の培養	6
1-2-3 HA量の測定	6
1-2-4 リアルタイム定量PCR法	6
1-2-5 細胞内UDP-NAGの定量	6
1-2-6 NAGase活性の測定およびNAGの定量	7
1-2-7 NAGおよび β -NAG2の定量	7
1-2-8 統計解析	7
1-3 結果	8
1-3-1 正常ヒト表皮細胞における α -NAG2および β -NAG2のHA産生促進	8
1-3-2 β -NAG2がHAS3遺伝子発現および細胞内UDP-NAG量へ与える影響	9
1-3-3 正常ヒト表皮細胞に内在する β -NAGase活性と β -NAG2からNAGへの変換	10
1-4 考察	13
第2章 表皮HAの選択的な産生促進と表皮ターンオーバーとの関係性	15
2-1 小序	15
2-2 材料および実験方法	15
2-2-1 試薬	15
2-2-2 ヒト皮膚組織の器官培養	15
2-2-3 器官培養ヒト皮膚からの表皮の剥離	15
2-2-4 正常ヒト表皮細胞の培養	15
2-2-5 3次元培養ヒト皮膚モデルの構築	15
2-2-6 表皮HA量の測定	16
2-2-7 HA分子量分布の測定	16
2-2-8 リアルタイム定量PCR法	17
2-2-9 組織学的および免疫組織化学的解析	17
2-2-10 統計解析	18
2-3 結果	18
2-3-1 ヒト皮膚器官培養を用いた β -NAG2による表皮HA産生促進と表皮ターンオーバーとの関係性評価	18
2-3-2 3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた β -NAG2による表皮HA産生促進と	

表皮ターンオーバーとの関係性評価	20
2-3-3 β -NAG2 による表皮細胞への増殖促進効果	24
2-3-4 β -NAG2 による表皮 HA 産生促進を介した表皮細胞の増殖促進	26
2-3-5 β -NAG2 による表皮細胞への分化促進効果	27
2-3-6 β -NAG2 による表皮 HA 産生促進を介した表皮細胞の分化促進	29
2-4 考察	33
第3章 表皮 HA の産生低下と表皮ターンオーバーとの関係性	35
3-1 小序	35
3-2 材料および実験方法	35
3-2-1 正常ヒト表皮細胞の培養	35
3-2-2 <i>HAS3</i> 遺伝子ノックダウンによる 3 次元培養ヒト表皮モデル (<i>HAS3</i> ノックダウンモデル) の構築	35
3-2-3 HA 量の測定	35
3-2-4 リアルタイム定量 PCR 法	35
3-2-5 組織学的および免疫組織学的解析	36
3-2-6 統計解析	36
3-3 結果	36
3-3-1 <i>HAS3</i> 遺伝子発現が特異的に低下した 3 次元培養表皮モデルの作出	36
3-3-2 <i>HAS3</i> 遺伝子ノックダウンを介した HA 産生の低下と表皮細胞の 増殖・分化の低下	38
3-4 考察	40
第4章 表皮 HA をターゲットとした β -NAG2 の皮膚の抗老化効果	42
4-1 小序	42
4-2 材料および実験方法	42
4-2-1 材料	42
4-2-2 器官培養ヒト皮膚の角層上からの β -NAG2 配合製剤塗布	42
4-2-3 組織学的解析	43
4-2-4 3 次元培養ヒト表皮モデル角層上からの β -NAG2 配合製剤適用	43
4-2-5 表皮 HA 量の測定	43
4-2-6 ヒト有効性試験	43
4-2-7 統計解析	44
4-3 結果	45
4-3-1 β -NAG2 配合製剤の外的塗布による HA 産生促進効果の確認	45
4-3-2 β -NAG2 配合製剤による目尻シワの改善	47
4-3-3 β -NAG2 配合製剤による角層水分量および皮膚粘弾性の改善	49
4-4 考察	52

総論	53
参考文献	55
謝辞	63
論文目録	64
主論文を構成する論文	64
参考論文	65

序論

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 (GlcUA) が交互に直鎖状に結合した、分子量が 10^7 kDa にも及ぶ非常に分子量の大きい多糖である (Figure 1)。糖自体が保有する水和能に加え、鎖の様な構造が組織中に網目状に広がって存在し、水和ゲルとして水を保持する能力に優れた生体分子である。生体内においては、関節、硝子体、皮膚をはじめとしてあらゆる組織に広く存在しているが、その絶対量の 50%以上を皮膚が占めている[1]。皮膚の真皮において、HA は細胞外マトリックスの主要な構成成分として組織全体に存在しており、他の細胞外マトリックス成分であるコラーゲンやエラスチンと相互作用している (Figure 2) [2]。その機能としては、水分保持の他、粘弾性や進展性という物理的な特徴から、空間を満たして皮膚に弾力性を付与するなど、真皮の構造や機能の維持において重要な役割を果たしている[1]。一方、皮膚における HA は長らく真皮層に限局されていると考えられていたが、1988 年に HA 特異的な結合タンパク質を利用した HA の検出方法が開発され、表皮層にも HA が存在することが明らかとなった[3]。HA 以外のグリコサミノグリカンは、コアタンパク質を有するプロテオグリカン分子として生合成されるが、コアタンパク質を有していない HA は、ユニークな方法で生合成される。すなわち細胞膜上に存在する HA 合成酵素 (HAS, HA synthase) が、細胞内に存在する 2 種類の基質である uridine diphosphate (UDP)-NAG と UDP-GlcUA を交互に結合し、細胞外へ直接伸長させていく (Figure 1) [4]。HAS には 3 種類のアイズォイム (HAS1-3) が存在し、互いに高い相同性を有するが、組織によってその発現パターンには違いがあり、また合成される HA の分子量サイズや合成活性にも違いがあると報告されている[5-9]。Sayo, Kakizaki らは、ヒトの真皮線維芽細胞においては主に *HAS1* および *HAS2* が HA 合成を担っているのに対し、表皮細胞では *HAS3* が主要な HA 合成酵素であることを報告している[10-13]。

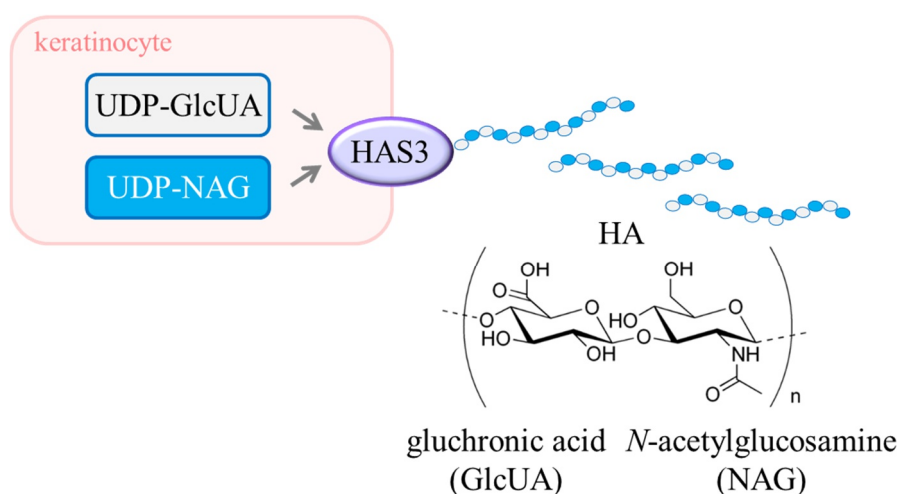


Figure 1. Scheme of hyaluronan synthesis in keratinocytes.

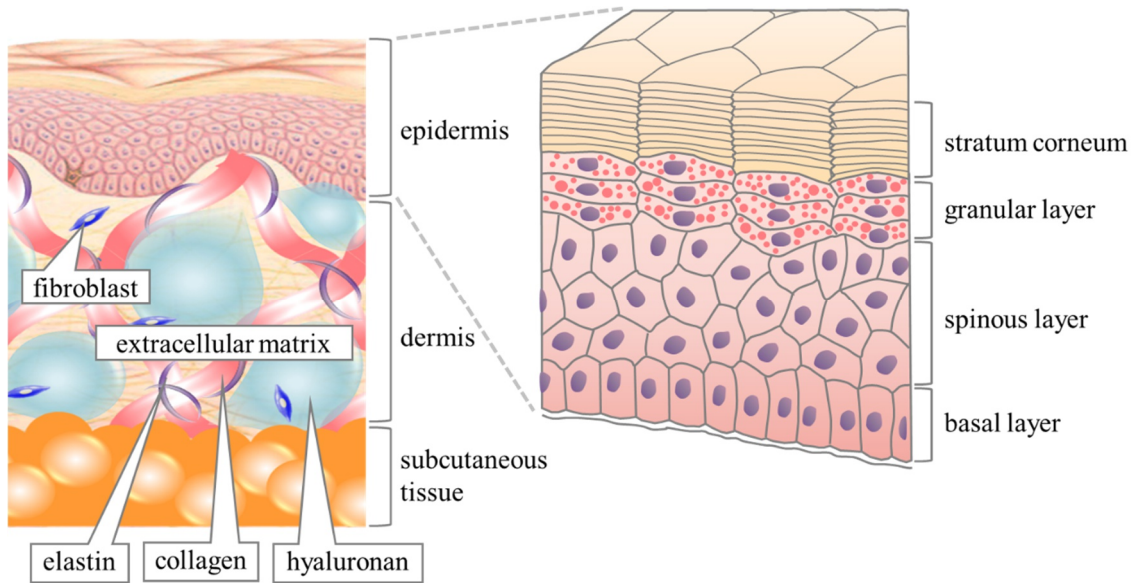


Figure 2. Structure of the skin. Modified from [14]

表皮では、基底層で増殖した表皮細胞が、有棘層、顆粒層、角層と移動しながら、その形や性質を変えていく分化を繰り返すターンオーバーによって構造や機能が維持されており、外界からの刺激を防ぐと共に、生体内の水分環境を守るバリアとして重要な役割を果たしている (Figure 2) [14]。皮膚に存在する HA のうち、表皮に含まれる HA の絶対量は真皮よりも圧倒的に少ないものの、基底層から顆粒層にかけて高濃度に存在し、細胞と細胞の間の限られた空間では 2 mg/ml を超えることが示されている[3]。その機能として、組織の水分環境を保つことに加え、血管の通わない重層化した細胞同士の空間を維持し、栄養や代謝物の拡散に寄与すると考えられている[1]。加えて、表皮 HA は表皮ターンオーバーに関わることが報告されているが[15-18]、その詳細は十分に明らかにされていない。例えばレチノイン酸 (RA) やレチノールなどのレチノイドは、*HAS* 遺伝子発現の誘導を介して表皮 HA を産生促進すると同時に、細胞増殖を亢進させ、細胞分化を低下させることが報告されている[19, 20]。また epidermal growth factor (EGF) や keratinocyte growth factor (KGF) などの増殖因子も、表皮 HA を増加させると同時に、細胞増殖を亢進させた一方、細胞分化は低下させた[16, 21]。加えて、HA 合成阻害剤 4-methylumbelliferone (4MU) は、ラット表皮細胞の細胞増殖を阻害し[22]、また 3 次元ヒト表皮モデルでも細胞増殖を低下させる[23]など、レチノイドや増殖因子の作用と矛盾しない結果が報告されている。一方、HA 特異的な分解酵素である *Streptomyces hyaluronidase* (St-HAase) で 3 次元ヒト表皮モデルにおける表皮 HA を低下させた場合、細胞の増殖・分化に変化は認められないことが報告された[23]。さらに HA 受容体 CD44 のノックアウトマウスでは、表皮 HA の減少と同時に、細胞の分化も低下した[17]。以上の様に、表皮 HA と表皮細胞の増殖・分化との関連性については相反する結果も報告されており、その原因としては、例えばレチノイドや増殖因子はいずれも表皮細胞の機能や活

性に直接影響を及ぼす可能性があるなど、その特異性に課題があると考えられた。また、高分子HA (>1,000 kDa) は抗血管新生および抗炎症効果を有しているのに対し、低分子HA (10-250 kDa) は血管新生および炎症性細胞を強く誘導するなど[24, 25]、HA はその分子量サイズに応じて細胞機能へ及ぼす影響に違いがあると報告されているが、上述の報告ではHA の分子量サイズまでは十分調べられていなかった。そこで本論文では、表皮HA の生理機能の解明を目的とし、表皮のHA 産生を選択的に制御する方法を開発し、さらにHA の分子量の変化を調べることで、表皮HA の量や分子量の変化と表皮ターンオーバーとの関係性を詳細に調べた。

これまでに Sayo らは、HA の構成糖の1つであるNAG が、表皮細胞において優れたHA 産生促進効果を有することを見出している[13]。NAG によるHA 産生促進は、表皮細胞内においてHA の直接の基質であるUDP-NAG へと変換され、自らがHA に取り込まれることによる。またその際、NAG を構成糖とする硫酸化グリコサミノグリカンの産生を促進せず、さらにグルコースやGlcUA は表皮HA 産生を促進しなかったことから、NAG は表皮HA 産生促進において高い選択性を有しており、表皮HA が表皮機能へ及ぼす影響を調べる上で有用であると考えられた。しかしながらNAG は還元糖であるため、メイラード反応により褐変を生じるなど、最終的に化粧品などへ配合して活用することを考えた場合、その安定性に課題があった。そこで、メイラード反応の原因となっている還元末端にエチル基を導入した1-エチル- β -N-アセチルグルコサミニド (β -NAG2) を新たに開発した。 β -NAG2 がNAG と同様なメカニズムにて選択的にHA 産生を促進することができれば、表皮HA が表皮の生理機能へ与える影響を調べる上で、最適なツールになると考えられる。そこで、まずは β -NAG2 の有効性を調べた上で、表皮の増殖・分化への影響を調べることにした。

また、表皮のHA は加齢に伴って減少することが報告されている[26, 27]。加齢に伴う表皮の変化としては、細胞増殖能の低下や[28]、それに起因すると考えられる表皮の菲薄化が挙げられる[29]。もし、表皮HA が細胞の増殖・分化といった基本的な細胞機能に関与する場合、表皮HA の減少は皮膚機能の低下にも関わると考えられる。これまでに、皮膚の老化の改善を目的とした検討において、表皮HA 産生を促進するレチノイドがシワの改善などに有効であることが報告されている[30, 31]。しかしながらレチノイドは、HAS を含む様々な遺伝子発現誘導など多様な作用があり、また製剤中での安定性や皮膚への刺激性などの課題も存在する。そこで、 β -NAG2 がシワなどの皮膚の老化に伴う症状に及ぼす影響についても調べ、表皮HA の皮膚の抗老化における重要性を検証した。

本論文では、HA 産生を特異的に制御することにより、表皮の構造や恒常性維持における表皮HA の生理機能と、抗老化における表皮HA 産生促進の有効性を示すことを目的とした。

第1章では、 β -NAG2 が正常ヒト表皮細胞においてHA を選択的に産生促進するメカニズムを示した。

第2章では β -NAG2 を用い、表皮HA 産生促進が、表皮細胞の増殖・分化に促進的に働く

ことを示した。

第 3 章では、*HAS3* 遺伝子のノックダウンによる HA 産生の低下が、表皮細胞の増殖・分化に抑制的に働くことを示した。

第 4 章では β -NAG2 による表皮 HA の産生促進がシワなどの皮膚老化の改善に有効な手段であり、表皮 HA は抗老化の重要な標的分子となり得ることを示した。

第1章 β -NAG2の選択的なHA産生促進メカニズム

1-1 小序

これまでに Sayo らは、NAG (Figure 3) が *HAS3* 遺伝子発現に影響を与えず、HA の前駆体である細胞内 UDP-NAG を増加させることにより、培養正常ヒト表皮細胞の HA 産生を促進することを見出している[13]。しかしながら還元糖である NAG は、メイラード反応を生じさせるなど、その安定性に課題があった。そこで、NAG の還元末端にエチル基を導入して安定性を高めた β -NAG2 (Figure 3) を新たに開発した。本章では、NAG、 β -NAG2 および β -NAG2 の立体異性体である 1-エチル- α -*N*-アセチルグルコサミニド (α -NAG2) (Figure 3) を直接比較することで、 β -NAG2 の選択的な HA 産生メカニズムを詳細に調べた。その結果、 β -NAG2 は表皮細胞に取り込まれると、内在性の β -*N*-acetylglucosaminidase (β -NAGase) によって NAG へと変換され、その後、UDP-NAG となり、最終的に自らが HA に取り込まれることにより表皮細胞の HA 産生を促進することが示された。

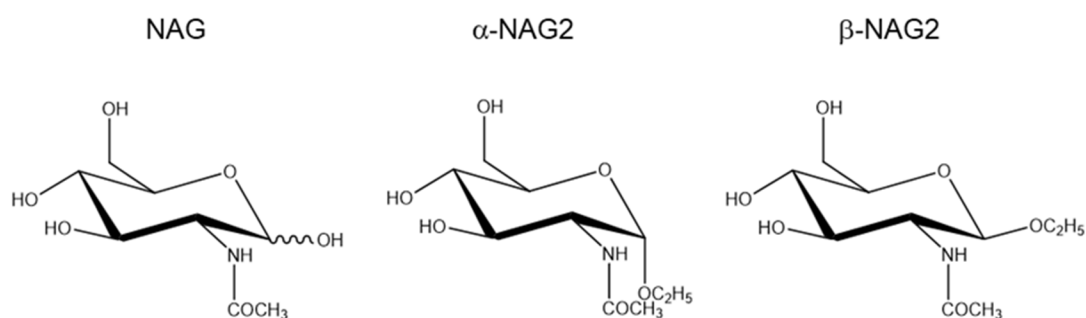


Figure 3. Chemical structures of *N*-acetylglucosamine (NAG), 1-ethyl- α -*N*-acetylglucosaminide (α -NAG2), and 1-ethyl- β -*N*-acetylglucosaminide (β -NAG2).

1-2 材料および実験方法

1-2-1 試薬

α -NAG2 と β -NAG2 は T. Hasegawa Co., Ltd (Tokyo, Japan) から入手した。NAG は Tokyo Chemical Industry から購入した。Uridine 5'-diphospho-*N*-acetylglucosamine sodium salt、4-methylumbelliferyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide (4MU- β -NAG) と *o*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino *N*-phenyl carbamate (PUGNAc) は Sigma-Aldrich (MO, USA)から購入した。4-Methylumbelliferyl *N*-acetyl- α -D-glucosaminide (4MU- α -NAG) は Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) から購入した。All-*trans* retinoic acid (RA) は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。

1-2-2 正常ヒト表皮細胞の培養

正常ヒト表皮細胞 (Kurabo, Osaka, Japan) は、サプリメントとして 5 mg/L insulin、180 µg/L hydrocortisone、6.1 mg/L 2-aminoethanol、14.1 mg/L *o*-phosphorylethanolamine、100 ng/L EGF および 0.4% (vol/vol) bovine pituitary extract (BPE) (Kurabo) を添加した Ca²⁺濃度 0.1 mM の MCDB153HAA2 培地 (Wako Pure Chemical Industries) にて播種した。サブコンフルエントに達した後、BPE 濃度を 0.04% (vol/vol) に変更し、その翌日から 10 mM α-NAG2、β-NAG2、NAG もしくは 10 nM RA を添加した MCDB153HAA2 培地にてさらに培養した。β-NAGase の阻害剤である PUGNAc[32]は、α-NAG2、β-NAG2 もしくは NAG と同時に添加した。

1-2-3 HA 量の測定

培養上清の HA 量は、QnE Hyaluronic Acid (HA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Assay Kit (Biotech Trading Partners, CA, USA) を用い、添付のプロトコールに従って定量した。

1-2-4 リアルタイム定量 PCR 法

正常ヒト表皮細胞から、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出し、NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) により濃度を測定した。cDNA への逆転写には High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を用いた。cDNA 中の標的遺伝子の発現量は、TaqMan real-time quantitative PCR assay (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems) にて解析した。*HA synthase 1-3* (*HAS1-3*)、*NAG kinase* (*NAGK*)、*β-N-acetylglucosaminidase* (*ENGASE*) および内部標準遺伝子である *ribosomal protein lateral stalk subunit P0* (*RPLP0*) の発現量は、以下に示す Taqman Gene Expression Assay ID の primers と probe のセット (Applied Biosystems)により求めた。結果は、ΔΔCT 法にて相対定量した。

Gene name	Gene symbol	TaqMan Gene Expression Assay ID
<i>hyaluronan synthase 1</i>	<i>HAS1</i>	Hs00758053_m1
<i>hyaluronan synthase 2</i>	<i>HAS2</i>	Hs00193435_m1
<i>hyaluronan synthase 3</i>	<i>HAS3</i>	Hs00193436_m1
<i>N-acetylglucosamine kinase</i>	<i>NAGK</i>	Hs00895033_m1
<i>endo-beta-N-acetylglucosaminidase</i>	<i>ENGASE</i>	Hs00224267_m1
<i>ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>	<i>RPLP0</i>	Hs99999902_m1

1-2-5 細胞内 UDP-NAG の定量

正常ヒト表皮細胞に 10 mM α-NAG2、β-NAG2 もしくは NAG を添加し、さらにそれぞれについて 0.05 mM PUGNAc を添加もしくは添加していない培地にて 24 時間培養した。細胞を 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulphonic acid (HEPES) buffer にて 2 回洗浄後、trypsin

処理した細胞を 3,000 回転で 5 分間遠心分離して回収し、蒸留水に再懸濁した。細胞懸濁液を 5 分間沸騰させた後、速やかに氷冷した。凍結融解により細胞を破碎し、得られた細胞粗抽出液を Whatman 13 mm GD/X filter (GE-Healthcare, WI, USA) にてろ過した。細胞粗抽出液中の UDP-NAG 濃度は、high-performance liquid chromatography (HPLC) システムである 10AVP series (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、CAPCELL PAK C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm particle size) (Osaka Soda, Osaka, Japan) にて測定した。カラムオープン温度は 40°C とし、0.2% triethylamine (Junsei Chemical, Tokyo, Japan) を添加した 0.1% formic acid (Wako Pure Chemical Industries) にて 1 mL/min の流速で溶出し、260 nm で検出した。

1-2-6 NAGase 活性の測定および NAG の定量

正常ヒト表皮細胞を phosphate-buffered saline (PBS) 中にてホモジナイズおよびソニケーションし、遠心分離にて上清を回収して細胞粗抽出液を得た。細胞粗抽出液中の α -N-acetylglucosaminidase (α -NAGase) もしくは β -NAGase 活性を次に示す方法にて測定した。細胞粗抽出液 50 μl に対し、25 μl の 2 mM 4MU- α -NAG もしくは 4MU- β -NAG 水溶液および 25 μl の 0.2 M acetate buffer (pH 4.3) を混合し、37°C にて 2 時間インキュベートした。0.5 M glycine-NaOH buffer (pH 10.3) を添加することにより反応を停止させ、HPLC システムに mass spectrometry を装着した liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) にて、1-2-7 に示す方法で 4MU- α -NAG もしくは 4MU- β -NAG の分解産物である NAG 濃度を測定した。細胞粗抽出液のタンパク濃度は、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, CA, USA) にて測定した。

1-2-7 NAG および β -NAG2 の定量

NAG および β -NAG2 の定量は、HPLC システム LC-1200 series (Agilent Technology, CA, USA) に mass spectrometry 3200 Q TRAP (Sciex, MA, USA) を装着した LC-MS/MS にて実施した。HPLC では PC HILIC column (2.0 mm × 150 mm, 5 μm particle size) (Osaka Soda) を使用し、カラムオープン温度は 40°C とした。0.1% formic acid/acetonitrile = 20/80 の均一溶媒にて 0.2 mL/min の流速で溶出した。Mass spectrometry では、electrospray イオン化および negative ion mode を用いた。Characteristic fragment ions として、それぞれ NAG では m/z 220 → 59.1、 β -NAG2 では m/z 248 → 100 のピーク面積から、細胞粗抽出液中の NAG および β -NAG2 を定量した。

1-2-8 統計解析

統計的有意差検定は、Microsoft® Excel® software (Office 365) (WA, USA) もしくは IBM® SPSS® Statistics 25.0 (NY, USA) を用い、Dunnett's test、Tukey's multiple comparison test もしくは Student's *t*-test を実施した。なお、*p* 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。

1-3 結果

1-3-1 正常ヒト表皮細胞における α -NAG2 および β -NAG2 の HA 産生促進

培養正常ヒト表皮細胞における β -NAG2 (Figure 3) の HA 産生への影響について、添加濃度および培養期間依存的な変化を調べた。Figure 4A に示す通り、 β -NAG2 は 2 mM から 10 mM において添加濃度依存的に HA 産生を促進し、添加濃度 10 mM においては、添加 1 日後にコントロールと比較して HA 量を 2.4 倍に増加させた。経時的な変化については、10 mM β -NAG2 処理後 1 日目から、コントロールと比較して HA 産生が促進し、その効果は 4 日目においても持続していた (Figure 4B)。続いて、正常ヒト表皮細胞を 10 mM の β -NAG2、 α -NAG2、NAG (Figure 3) もしくは 10 nM RA で処理し、HA 産生量を比較した。Figure 5A に示す通り、10 mM β -NAG2 は 10 mM NAG および 10 nM RA とほぼ同程度に HA 産生を促進したが、10 mM α -NAG2 にはその様な効果は見られなかった。この時、 β -NAG2、 α -NAG2 もしくは NAG 処理によって正常ヒト表皮細胞数に変化はなく、細胞に対する細胞毒性は認められなかった (Figure 5B)。以上の結果から、 β -NAG2 は添加濃度および培養期間依存的に正常ヒト表皮細胞の HA 産生を促進し、その効果は NAG および RA と同程度だった。

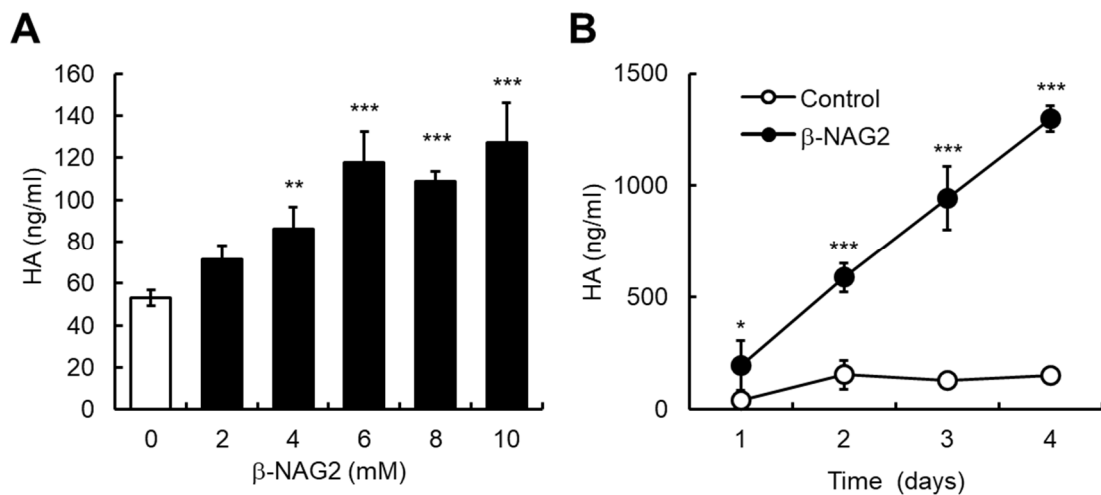


Figure 4. Effect of β -NAG2 on HA production in cultured normal human epidermal keratinocytes. (A and B) The dose- and time-course dependent HA production in β -NAG2-treated keratinocytes. (A) The cells were treated with β -NAG2 (0, 2, 4, 6, 8, or 10 mM) for 1 day, and ELISA quantified HA concentrations in the media. Values represent mean \pm SD ($n = 3$) and are shown as ng/ml. Dunnett's test was used for statistical analysis. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (B) The cells were cultured in the absence (Control) or presence of 10 mM β -NAG2 for 1, 2, 3, or 4 days, and HA concentrations in the media were quantified by ELISA. Values represent mean \pm SD ($n = 3$) and are shown as ng/ml. The Student's t -test was used for statistical analysis. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

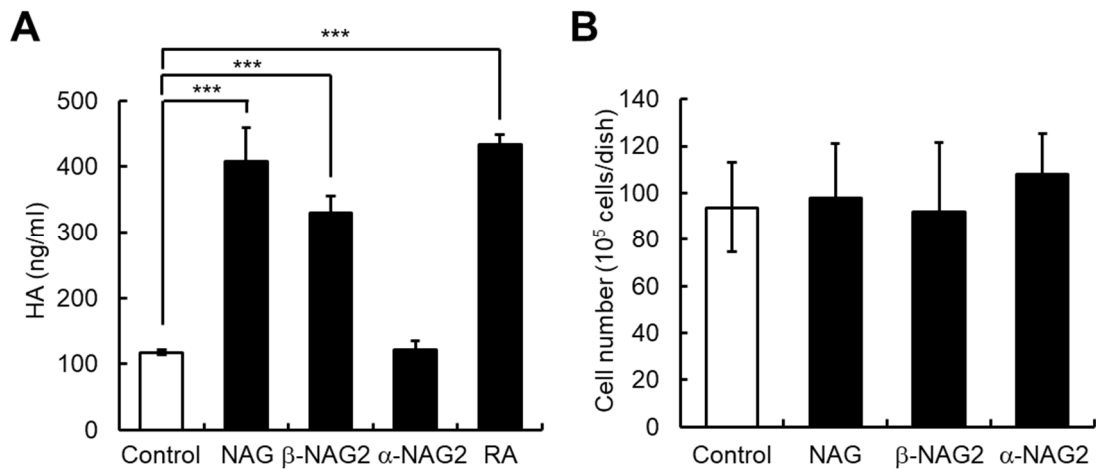


Figure 5. Effect of β -NAG2, α -NAG2, NAG, and all-*trans* retinoic acid (RA) on HA production in cultured normal human epidermal keratinocytes. (A) Effect of β -NAG2, α -NAG2, NAG, and RA on HA production. Keratinocytes were cultured in the absence (Control) or presence of 10 mM β -NAG2, α -NAG2, or NAG or 10 nM RA for 24 h, and HA concentrations in the media were quantified by ELISA. Values represent mean \pm SD ($n = 3$) and are shown as ng/ml. Dunnett's test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$. (B) Effect of β -NAG2, α -NAG2, and NAG on the number of keratinocytes. Keratinocytes were cultured in the absence (Control) or presence of 10 mM β -NAG2, α -NAG2, or NAG for 24 h, and the number of cells was counted. Values represent mean \pm SD ($n = 3$) and are shown as 10^5 cells/dish.

1-3-2 β -NAG2 が *HAS3* 遺伝子発現および細胞内 UDP-NAG 量へ与える影響

これまでに Sayo らは、NAG は培養正常ヒト表皮細胞の *HAS3* 遺伝子発現に影響を与えず HA 産生を促進するのに対し、RA は *HAS3* 遺伝子の発現誘導により HA 産生を促進することを示している[10, 11, 13]。そこで、 β -NAG2 の HA 産生促進メカニズムを明らかにすることを目的とし、まず、10 nM RA、10 mM NAG、 α -NAG2 および β -NAG2 が正常ヒト表皮細胞の *HAS3* 遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。その結果、RA は *HAS3* 遺伝子発現を有意に上昇させたのに対し、NAG、 α -NAG2 および β -NAG2 ではその様な変動は認められなかった (Figure 6A)。次に、NAG、 α -NAG2 および β -NAG2 が、HA の前駆体である UDP-NAG の細胞内プールサイズに及ぼす影響を調べたところ、 β -NAG2 および NAG は UDP-NAG 量を有意に増加させたのに対し、 α -NAG2 ではその様な変化は見られなかった (Figure 6B)。なお、この結果は HA 産生量 (Figure 5A) の変動と良く一致していた。以上の結果から、NAG と同様、 β -NAG2 は正常ヒト表皮細胞の *HAS3* 遺伝子発現に影響を与えず、細胞内 UDP-NAG 量を増加させることにより HA 産生を促進することが示唆された。

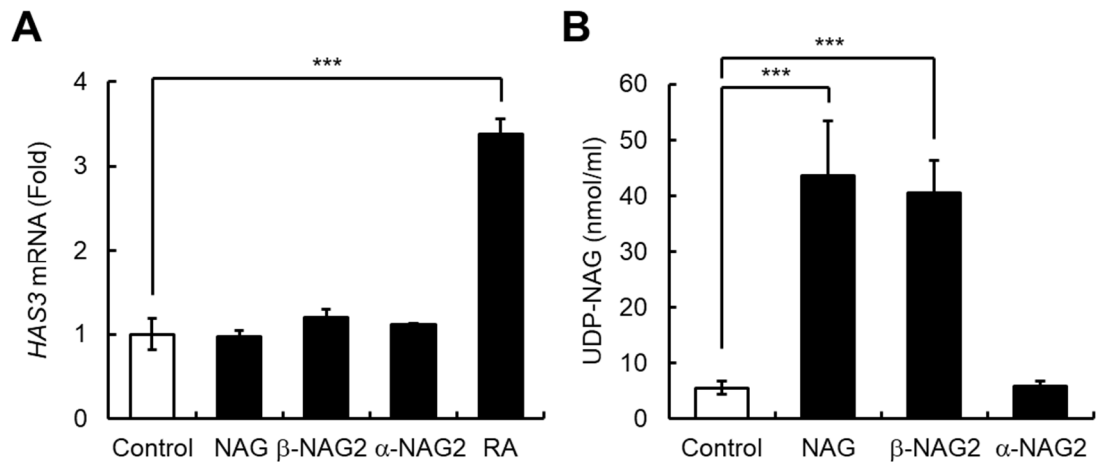


Figure 6. Effect of β -NAG2, α -NAG2, NAG, and RA on *HAS3* mRNA expression and intracellular UDP-NAG in cultured normal human epidermal keratinocytes. (A) Effect of β -NAG2, α -NAG2, NAG, and RA on *HAS3* mRNA expression. Keratinocytes were cultured in the absence (Control) or presence of 10 mM β -NAG2, α -NAG2, or NAG or 10 nM RA for 24 h, and mRNA expression of *HAS3* was measured by quantitative real-time PCR analysis. Values are expressed as mean \pm SD (n = 3) and shown as a -fold increase in mRNA expression relative to control cells. Dunnett's test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$. (B) Effect of β -NAG2, α -NAG2, and NAG on intracellular UDP-NAG content. Keratinocytes were cultured in the absence (Control) or presence of 10 mM β -NAG2, α -NAG2, or NAG for 24 h, and the amount of UDP-NAG in the cells was measured by HPLC. Values are expressed as mean \pm SD (n = 3) and shown as nmol/ml. Dunnett's test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$.

1-3-3 正常ヒト表皮細胞に内在する β -NAGase 活性と β -NAG2 から NAG への変換

これまでの結果より、 β -NAG2 は細胞内において NAG へ変換されることで、HA 産生を促進すると推測された。そこで、糖タンパク質の β -1,4-グリコシド結合を切断する β -NAGase 活性に着目し[33, 34]、それが正常ヒト表皮細胞内に存在するか、そしてその活性が β -NAG2 による HA 産生促進に関与するか、 β -NAGase の阻害剤を用いて調べることにした。 β -NAGase の薬理的阻害剤である PUGNAc は、NAG のアナログとして働くことで β -NAGase を阻害する[32]。まず、PUGNAc を β -NAG2 あるいは NAG と同時に添加した結果、PUGNAc は正常ヒト表皮細胞において β -NAG2 による HA 産生促進 (Figure 7A) と細胞内 UDP-NAG 量の増加を抑制したのに対し (Figure 7B)、NAG による HA 産生および UDP-NAG 量の増加には影響を与えなかった。このことから、PUGNAc の阻害効果が β -NAG2 に特異的であり、 β -NAG2 が β -NAGase により NAG へ変換されることが示唆された。次に合成基質を用い、正

常ヒト表皮細胞内における β -NAGase および α -NAGase 活性の有無を検討した。4MU- β -NAG および 4MU- α -NAG は、それぞれ β -NAGase および α -NAGase により、4MU と NAG に分解されることが分かっている。Figure 8A に示す通り、正常ヒト表皮細胞粗抽出液と 4MU- α -NAG もしくは 4MU- β -NAG をインキュベートした結果、4MU- α -NAG からは NAG は放出されなかったのに対し、4MU- β -NAG からは NAG が放出された。加えて、 β -NAG2 と細胞粗抽出液をインキュベートした場合にも、NAG の放出が認められた (Figure 8B)。また、正常ヒト表皮細胞を β -NAG2 で処理した場合、4 時間から 24 時間後において、細胞内 NAG 量がコントロールと比較して有意に増加した (Figure 8C)。さらに、 β -NAG2 単独では細胞内 β -NAG2 量の増加はごくわずかだったが、 β -NAG2 と PUGNAc を組み合わせた場合、細胞内に β -NAG2 の蓄積が認められた (Figure 8D)。これらの結果より、正常ヒト表皮細胞には内在性の β -NAGase 活性が存在しており、 β -NAG2 から NAG への変換に関与することが強く示唆された。なお、NAG から UDP-NAG への代謝経路において NAG を NAG-6 リン酸にリン酸化する *NAG kinase* の遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR で調べたところ、平均 C_T 値は 27.44 ± 0.130 (平均 C_T 値 \pm SD, $n = 3$) であり、*ENGAGE* (β -NAGase) 遺伝子発現量の 30.67 ± 0.327 (平均 C_T 値 \pm SD, $n = 3$) より顕著に高かった。以上の結果より、 β -NAG2 は内在性 β -NAGase の作用によってエチル基の切断を受けて NAG に変換され、さらに NAG kinase により NAG-6 リン酸に変換後、最終的に UDP-NAG となり、HA へ取り込まれると考えられた (Figure 9)。

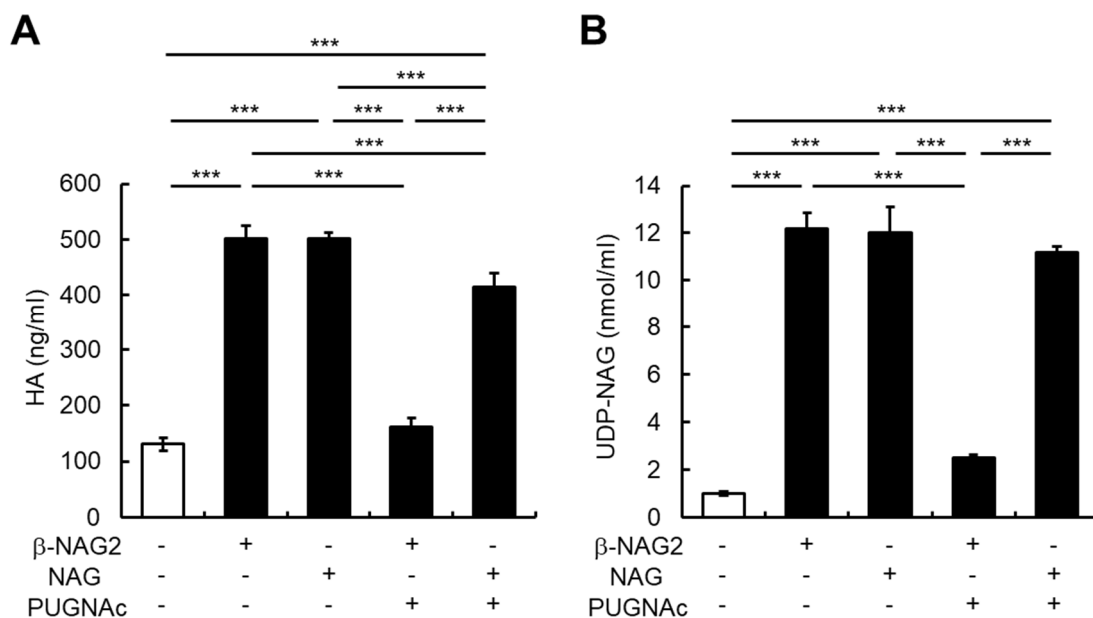


Figure 7. β -NAGase activity and effect of PUGNAc on β -NAG2-induced UDP-NAG content and HA production in cultured normal human epidermal keratinocytes. (A and B) Effect of β -NAG2,

NAG, and PUGNAc on the intracellular HA production (A) and UDP-NAG content (B) in cultured keratinocytes. The cells were treated with 10 mM β -NAG2 or NAG in the absence or presence of 0.05 mM PUGNAc for 24 h, followed by ELISA for HA production or HPLC analysis for intracellular UDP-NAG content. Values represent mean \pm SD ($n = 3$) and are shown as nmol/ml for UDP-NAG content and ng/ml for HA production. Tukey's multiple comparison test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$.

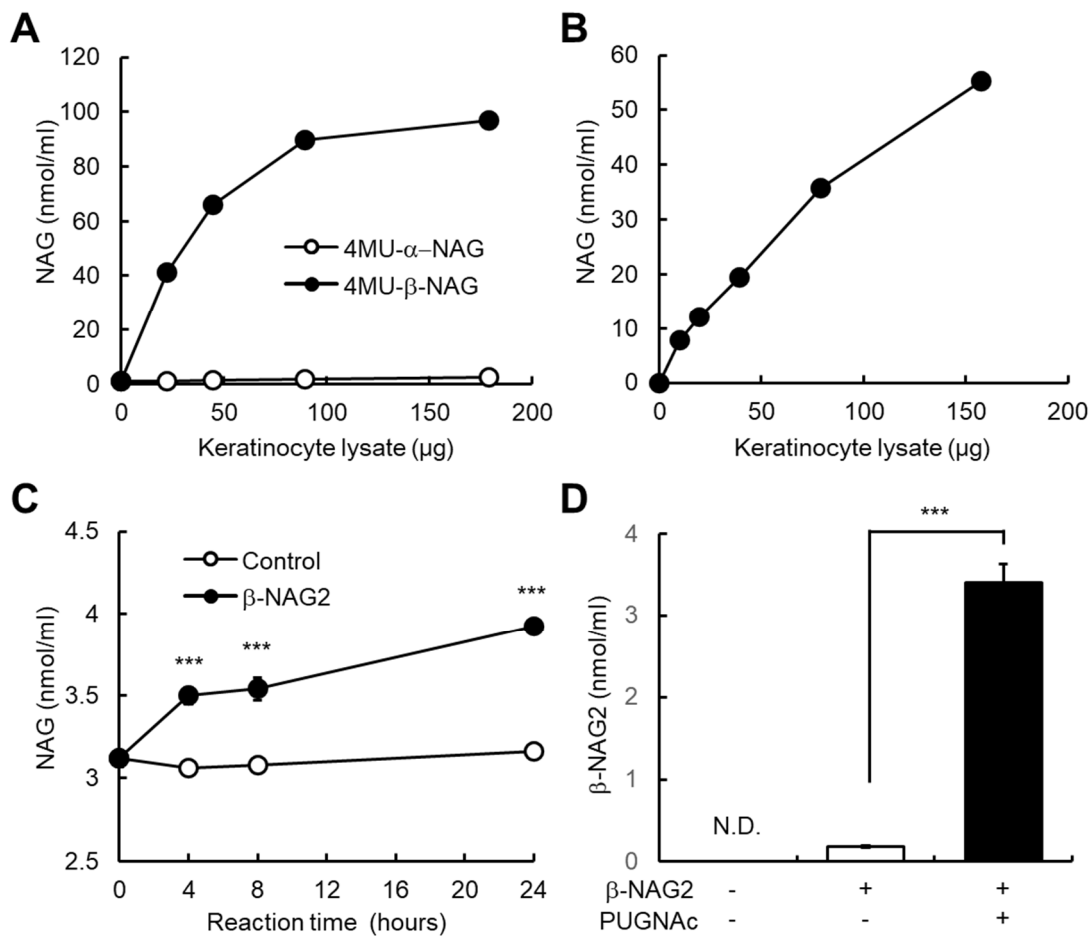


Figure 8. β -NAGase activity and effect of PUGNAc on β -NAG2-induced UDP-NAG content and HA production in cultured normal human epidermal keratinocytes. (A) α -NAGase and β -NAGase activities in cultured keratinocytes. Different protein concentrations of keratinocyte lysates were incubated with 100 nmol 4MU- α -NAG (open circles) or 4MU- β -NAG (closed circles) for 2 h, and LC-MS/MS quantified the fractionated NAG. (B) Conversion of β -NAG2 to NAG by keratinocyte lysates. Different protein concentrations of keratinocyte lysates were incubated with 100 nmol β -NAG2 for 24 h, and LC-MS/MS quantified the fractionated NAG. (C) Conversion of β -NAG2 to NAG in cultured keratinocytes. The cells were cultured in the absence (Control) or presence of 10 mM β -

NAG2 for 4, 8, or 24 hours, and the intracellular NAG content was quantified by LC-MS/MS. Values represent mean \pm SD ($n = 3$) and are shown as nmol/ml. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$. (D) Effect of β -NAG2 and PUGNAc on the intracellular β -NAG2 content. The cells were treated with 10 mM β -NAG2 in the absence or presence of 0.05 mM PUGNAc for 24 h; LC-MS/MS measured the intracellular β -NAG2 content. Values represent mean \pm SD ($n = 3$) and are shown as nmol/ml. N.D., not detected. Tukey's multiple comparison test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$.

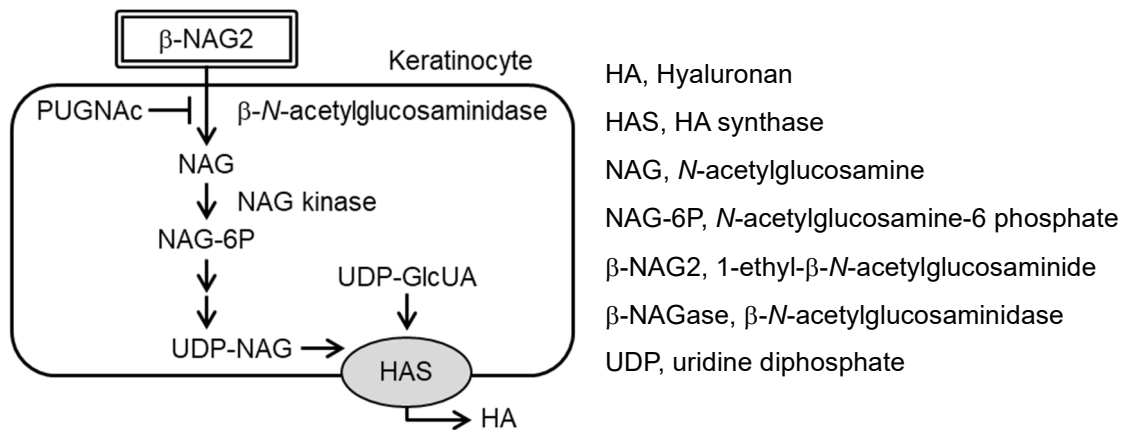


Figure 9. Scheme of β -NAG2-mediated HA synthesis. Schematic diagram of HA synthesis in β -NAG2-treated keratinocytes. β -NAG2 is converted to NAG by intracellular β -NAGase, and then metabolized to UDP-NAG via NAG-6P, which is one of the substrates of HA. PUGNAc is an inhibitor of β -NAGase.

1-4 考察

本章では、正常ヒト表皮細胞には β -NAG2 を NAG へ変換する内在性の β -NAGase が存在しており、この β -NAGase 活性の阻害により、 β -NAG2 から NAG への変換も阻害されることを示した。これまでに、 β -NAGase は細胞質にも存在するエンドグリコシダーゼであり、*N,N'*-diacetylchitobiose core における β -1,4-グリコシド結合を切断することにより、糖タンパク質から *N*-結合型糖鎖を放出することが報告されている [33, 34]。本検討の結果から、 β -NAGase は、NAG の還元末端に存在する分子量的に小さいエチル基の β -グリコシド結合も切断し得る活性を有することが示された。また今回、 α -NAG2 と β -NAG2 の 2 種類の 1-ethyl-*N*-acetylglucosaminide 立体異性体のうち、 β -NAG2 のみが正常ヒト表皮細胞において HA 産生を促進した。その理由として、正常ヒト表皮細胞粗抽出液には β -NAGase 活性が検出されたのに対し、 α -NAGase 活性は欠如していたことに起因していると考えられた。これまでに β -NAGase と α -NAGase は異なる組織分布パターンが報告されている。ヒトでは β -NAGase

は、胸腺、脾臓、脳、胎盤、骨格筋、心臓、腎臓、膵臓、肝臓を含む様々な組織での発現が報告されているが[33]、皮膚においては正常真皮線維芽細胞において α -NAGase の発現が報告されている[35]。このことから、組織や細胞における α -NAGase もしくは β -NAGase 活性の有無により、 α -NAG2 と β -NAG2 は異なる作用分布を示す可能性があり、真皮線維芽細胞においては α -NAG2 が HA 産生促進効果を示す可能性がある。

今回、 β -NAG2 は正常ヒト表皮細胞内の UDP-NAG 量の増加を伴い HA 産生を促進することを示した。UDP-NAG は哺乳類の細胞において最も豊富に存在する糖ヌクレオチドであり[36]、その細胞内プールサイズは、もう 1 つの HAS の基質となる UDP-GlcUA よりも大きい[37, 38]。一方で、HAS1-3 に対する UDP-NAG のミカエリス定数 (K_m) の値は UDP-GlcUA よりも大きく、酵素と基質の親和性が低いことが示されている[39]。そのため、細胞内 UDP-NAG 量が正常ヒト表皮細胞における HA 産生の律速段階となり得る可能性があり、すなわち高濃度の細胞内 UDP-NAG が HAS による効率的な HA 合成において必要と考えられる。このことは、表皮細胞における HA 産生が、細胞内 UDP-NAG プールサイズを減少させるマンノースによって阻害され[40]、また UDP-NAG の生合成に関与する glutamine fructose-6-phosphate-amidotransferase を siRNA によりノックダウンした場合においても HA 産生が減少する[41]という報告とも一致する。一方、UDP-NAG は HA 産生以外にも *O*-linked NAG としてタンパク質の糖鎖修飾に使用されるという報告もある。さらには、HAS2 タンパク質の安定性が細胞内 UDP-NAG によって増加し[42]、*O*-linked NAG 修飾が HAS3 の細胞内輸送、エンドサイトーシスおよびリソソーム分解に関与することも報告されている[43]。従って、 β -NAG2 から代謝されて生じた UDP-NAG が、*O*-linked NAG 修飾を介して HAS の活性もしくは安定性に寄与し、それが HA 産生に影響を与えている可能性も考えられ、さらなる検証が必要である。

本章では、 β -NAG2 が表皮細胞内において、NAG に変換され、最終的に HA の基質の 1 つである UDP-NAG 量を増加させることにより HA 産生を選択的に促進することを示した。また β -NAG2 の代謝経路においては β -NAGase による NAG への変換が必須であり、表皮細胞にはこの反応を担う内在性の β -NAGase 活性が存在することを示した。以上より、 β -NAG2 は表皮細胞において、選択的な HA 産生促進剤として有用であると考えられた。

第2章 表皮HAの選択的な産生促進と表皮ターンオーバーとの関係性

2-1 小序

第1章の結果より、 β -NAG2は正常ヒト表皮細胞のHA産生を選択的に促進することから、表皮HAの生理機能を調べる上で適したHA産生促進剤であると考えられた。本章では、ヒト皮膚器官培養系、3次元培養ヒト皮膚モデルおよび培養正常ヒト表皮細胞を用い、表皮におけるHAの産生、分子量サイズおよび組織内分布に β -NAG2が及ぼす影響を調べた後、細胞の増殖・分化(ターンオーバー)との関連性を検討した。

2-2 材料および実験方法

2-2-1 試薬

β -NAG2はT. Hasegawa Co., Ltdから入手した。PUGNAcはSigma-Aldrichから購入した。

2-2-2 ヒト皮膚組織の器官培養

正常ヒト皮膚は、健常日本人女性3名(40代)の腹部手術検体の余剰皮膚組織から採取した。得られた皮膚組織を直径8mmのバイオプシーパンチで切り出し、Netwell™ Inserts (CORNING, NY, USA)上に設置した。その後、0.04% (vol/vol) BPE (Kurabo) および第1章に示すサプリメントを添加した Ca^{2+} 濃度1.4 mMのMCDB153HAA培地 (Wako Pure Chemical Industries)にて培養した。皮膚組織の採取は、東海大学病院および花王株式会社の倫理審査委員会によって承認され、手術前に全ての被験者からインフォームドコンセントを入手した。

2-2-3 器官培養ヒト皮膚からの表皮の剥離

既報を参考に[44, 45]、皮膚組織を3.8% (wt/vol) ammonium thiocyanateを含むPBS中にて4°Cで3時間インキュベートした。PBSにて洗浄後、ピンセットを用いて表皮を真皮から剥離した。

2-2-4 正常ヒト表皮細胞の培養

正常ヒト表皮細胞 (Kurabo) は、0.4% (vol/vol) BPE および第1章に示すサプリメントを添加した Ca^{2+} 濃度0.1 mMのMCDB153HAA2培地 (Wako Pure Chemical Industries)にて培養した。コンフルエントに達した後、 Ca^{2+} 濃度を1.8 mM、BPE濃度を0.04% (vol/vol)に変更し、10 mM β -NAG2を添加した培地にてさらに培養した。

2-2-5 3次元培養ヒト皮膚モデルの構築

3次元培養ヒト皮膚モデルは、既報を参考に[46]、以下に示す方法で構築した。2×

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 5 vol に対して、fetal bovine serum (FBS) 1.3 vol、DMEM 1.2 vol および 10% FBS を含む DMEM にて 1.5×10^6 cells/ml の濃度で調製した正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Kurabo) 懸濁液 2.5 vol からなる溶液を、5 vol の氷冷した I 型コラーゲン溶液 (Koken, Tokyo, Japan) と混ぜ合わせ、セルカルチャーインサート上に注ぎ入れた。37°C にて重合させた後に、10% FBS を含む DMEM 中で 5 日間培養し、コラーゲンを収縮させて真皮層を作製した。Ca²⁺濃度 0.1 mM の MCDB153HAA2 培地にて懸濁した正常ヒト表皮細胞を、コラーゲンの凹状の表面に播種し、増殖用培地 (組成は後述) にて浸漬培養を行った。表皮細胞がコンフルエントに達したところで、分化用培地 (組成は後述) にて空気暴露状態での培養を開始した。表皮を回収する際は、ピンセットを用いて真皮から剥離した。

分化用培地は、1% FBS を含む Ham's F-12:DMEM (1:3, vol/vol) 培地に、0.1 mM ethanolamine、0.1 mM *o*-phosphoethanolamine、0.4 µg/ml hydrocortisone、5 µg/ml insulin、0.9 mM adenine、5 µg/ml transferrin、20 pM triiodothyronine、0.64 mM choline chloride、1 mM serine、20 µg/ml linoleic acid および 50 µg/ml ascorbic acid を添加した組成である。増殖用培地は、0.3% FBS を含む Ham's F-12:DMEM (1:1, vol/vol) に、10 nM progesterone と分化用培地と同様のサプリメントを添加した組成である。

2-2-6 表皮 HA 量の測定

皮膚組織もしくは 3 次元培養ヒト皮膚モデルから採取した表皮を 0.2 mg/ml proteinase K (Thermo Fisher Scientific) を含む 0.1 M Tris-HCl (pH7.4)、0.2 M NaCl、5 mM ethylenediaminetetraacetic acid および 0.4% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate 溶液中で、55°C で 2 時間インキュベートした。95°C で 10 分間加熱後、同量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1, vol/vol/vol) を添加し、十分に攪拌後、遠心分離にて水層を回収した。さらに水層と同量のクロロホルムを添加し、十分に攪拌後、遠心分離にて水層を回収した[47]。HA 量は第 1 章に記載した方法に従って定量した。同サンプルについて Fluorescent detection type double-stranded DNA (dsDNA) assay kit (Quant-iT dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) を用いて dsDNA 量を測定し、得られた値で HA 量を除して標準化した。

2-2-7 HA 分子量分布の測定

上記の方法で回収した HA 水溶液を、Shodex OHpak SB-807 HQ column (8.0×300 mm) (Showa Denko, Tokyo, Japan) を用いたゲルろ過 HPLC 法により分画した[48]。カラム温度は 40°C とした。50 mM リン酸バッファー (pH7.0) にて平衡化し、流速 0.5 ml/min で 0.5 分毎に溶出液を回収した。各フラクション中の HA 量は第 1 章に記載した方法にて定量し、総 HA 量に対する各フラクション中の HA 量の百分率 (%) を求めた。カラムの校正にはピークトップの分子量サイズが 2,012 kDa、887 kDa、222 kDa および 55 kDa の HA 標準品 (PG research, Tokyo, Japan) を用いた。

2-2-8 リアルタイム定量 PCR 法

正常ヒト表皮細胞および3次元培養ヒト皮膚モデルから採取した表皮を用い、第1章に記載した方法に従って定量PCRを実施した。*RPLP0* および *HAS1-3* の検出に使用した predesigned の primers と probe のセットは、第1章に記載した。*proliferating cell nuclear antigen (PCNA)*、*transglutaminase 1 (TGMI)*、*filaggrin (FLG)* および *cluster of differentiation 44 (CD44)* については以下に示した。

Gene name	Gene symbol	TaqMan Gene Expression Assay ID
<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	<i>PCNA</i>	Hs00427214_g1
<i>transglutaminase 1</i>	<i>TGMI</i>	Hs01070310_m1
<i>filaggrin</i>	<i>FLG</i>	Hs00856927_g1
<i>CD44 molecule</i>	<i>CD44</i>	Hs01075861_m1

2-2-9 組織学的および免疫組織化学的解析

培養皮膚組織および3次元培養ヒト皮膚モデルは、酸性-ホルマリン/エタノール溶液 (組成は後述) [49]にて固定後、パラフィン包埋し、薄切した。キシレンにて脱パラフィン後、100%から70%のエタノール希釈系列にて水和し、各種染色を実施した。形態観察は、組織切片をヘマトキシリンおよびエオジン (H&E) (Merck, Darmstadt, Germany) にて染色した。免疫蛍光染色は、以下に示す1次抗体および2次抗体を用いて標的タンパク質およびHAを検出し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) にて撮影した。Ki67陽性細胞数は、200倍拡大観察にて基底細胞層700 μ mの当たりの細胞数をカウントした (n = 30)。表皮厚は、H&E染色の200倍拡大観察画像を用い、画像解析ソフトウェア ZEN 3.1 (blue edition) (Carl Zeiss Microscopy) にて測定した (n = 75)。

酸性-ホルマリン/エタノール溶液の組成は、4%ホルムアルデヒド、5%酢酸および70%エタノールである。

標的タンパク質	1次抗体	2次抗体
Ki67	ウサギモノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, UK)	DyLight488 標識 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch, PA, USA)
TGM1	ウサギポリクローナル抗体 (Abcam)	DyLight488 標識 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch)
FLG	マウスモノクローナル抗体	Cy3 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体

	(Biomedical Technologies, MA, USA)	(Jackson ImmunoResearch)
CD44	マウスモノクローナル抗体 (R&D Systems, MN, USA)	Cy3 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch)
HA	ビオチン標識 HA 結合タンパク質 (Hokudo, Hokkaido, Japan)	streptavidin-fluorescein conjugates (Molecular Probes, OR, USA)
核 (対比染色)	-	TO-PRO-3 (Molecular Probes)

2-2-10 統計解析

統計的有意差検定は、Microsoft® Excel® software (Office 365) もしくは IBM® SPSS® Statistics 25.0 を用い、Student's *t*-test、Dunnett's test もしくは Tukey's multiple comparison test を実施した。なお、*p* 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。

2-3 結果

2-3-1 ヒト皮膚器官培養を用いた β -NAG2 による表皮 HA 産生促進と表皮ターンオーバーとの関係性評価

はじめに、表皮 HA の生理機能を調べる上で、*in vivo* の環境に最も近いと考えられるヒト皮膚組織の器官培養系を選択した。まず、 β -NAG2 が器官培養系においても表皮 HA を増加させるか調べるため、培地中に 10 mM β -NAG2 を添加し、5 日間培養した。表皮組織から HA を抽出し、DNA 量当たりの HA 量を測定した結果、 β -NAG2 で処理した皮膚組織では、コントロールと比較して表皮 HA 量は有意に増加した (Figure 10A)。これまでに HA は分子量サイズに応じて異なる生理機能を有することが報告されている[24,25]。そこで、 β -NAG2 が表皮 HA の分子量分布に及ぼす影響を調べたところ、コントロールと β -NAG2 で処理した組織から抽出した HA の分子量に違いはなく、いずれもピークトップを 1,000-2,000 kDa とする分子量プロファイルであった (Figure 10B)。また、 β -NAG2 が HA の表皮組織内分布に及ぼす影響を調べたところ、コントロールの組織では過去の報告と一致し[50]、表皮の基底層から顆粒層にかけて細胞間隙に陽性シグナルが観察されたのに対し (Figure 10C)、 β -NAG2 で処理した組織ではその分布に変化はなく、より強い陽性シグナルが観察された (Figure 10C)。これらの結果より、ヒト皮膚組織の器官培養系において、 β -NAG2 は HA の分子量や組織内分布に影響を与えることなく、表皮 HA 産生を増加させることが示された。一方、この時の組織形態を H&E 染色により観察したところ、コントロールの組織と β -NAG2 で処理した組織で表皮の形態に特に変化は認められなかった (Figure 10C)。このことから、5 日間の培養期間では、表皮 HA の産生促進は表皮の増殖・分化には関与しない、あるいは表皮の増殖・分化を調べるには培養期間が不十分と考えられた。さらなる培養期間の延長を試みたものの、表皮の状態を良好に維持することができなかつたため、皮膚組織を用いて表

皮 HA と細胞の増殖と分化について検討を加えるのは難しいと判断した。そこで、本方法の代替として、真皮線維芽細胞を含むコラーゲンマトリックス上に表皮層を構築した 3 次元培養ヒト皮膚モデルを用い、さらなる検討を行うこととした。

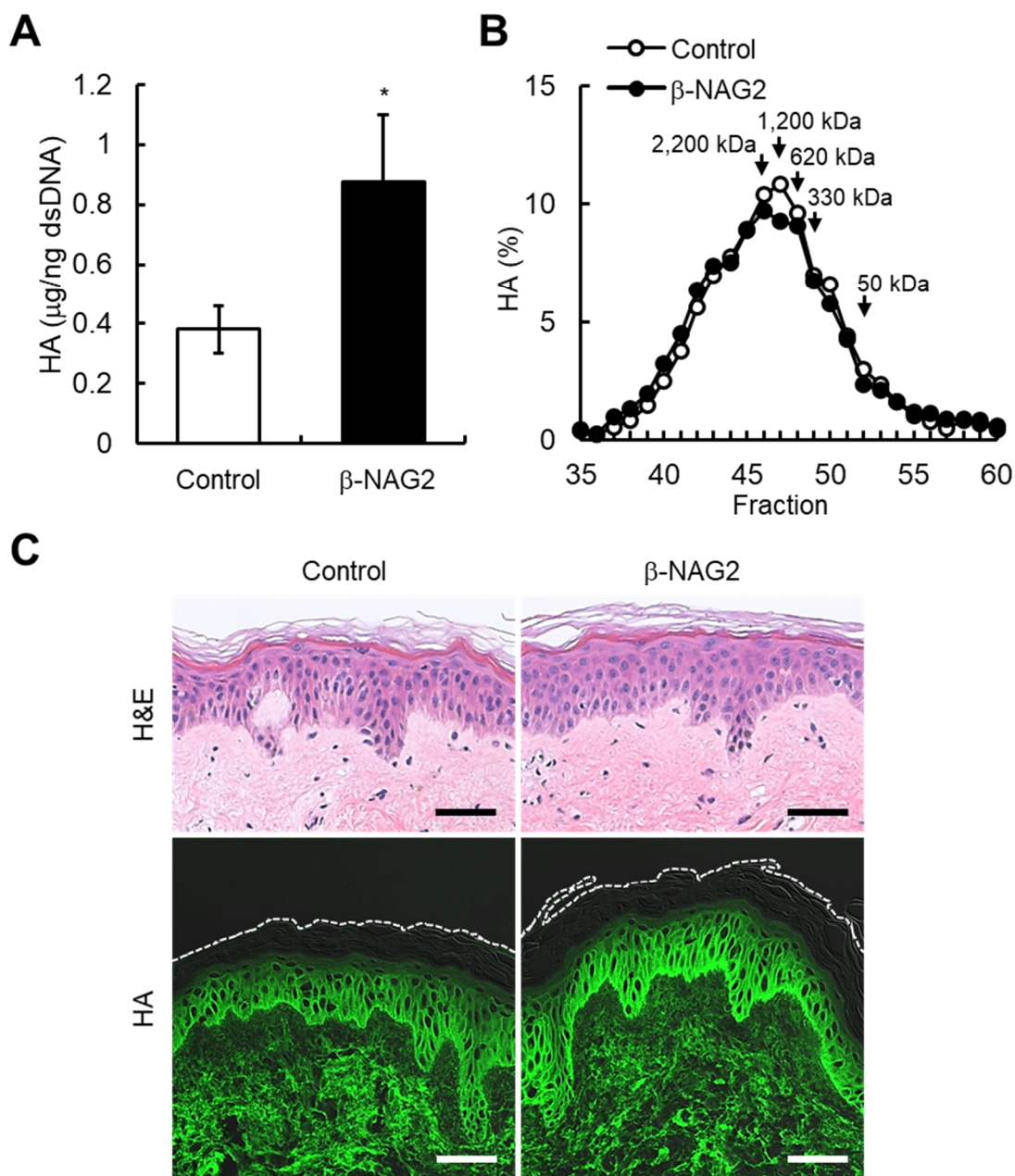


Figure 10. Effect of β-NAG2 on production, molecular weight distribution, and tissue distribution of epidermal HA in organ cultured human skin. (A) HA production in β-NAG2-treated skin tissues. The skin explants were treated with β-NAG2 (0 or 10 mM) for 5 days. The epidermal layer was separated, and ELISA and dye-binding assay quantified HA and dsDNA. Values

are expressed as mean \pm SD ($n = 3$) and shown as $\mu\text{g}/\text{ng}$ dsDNA. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. *, $p < 0.05$. (B) Size distribution of HA produced in the epidermis of skin explants cultured with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 5 days. Molecular weights were determined by size-exclusion chromatography. (C) Representative images of H&E and HA staining. The skin explants cultured with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 5 days were collected. The sections were stained for morphology (H&E) or HA (*green*). Dotted lines indicate the skin surface. Scale bars = 50 μm .

2-3-2 3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた β -NAG2 による表皮 HA 産生促進と表皮ターンオーバーとの関係性評価

3次元培養ヒト皮膚モデルを用い、培地に添加した β -NAG2 が表皮 HA に及ぼす影響を調べた。3次元培養ヒト皮膚モデルは、正常ヒト皮膚線維芽細胞を混ぜ込んで作製したコラーゲンゲル上に、正常ヒト表皮細胞を播種し、空気暴露状態で培養することにより構築した。Figure 11 に示す通り、 β -NAG2 で処理した3次元培養ヒト皮膚モデルでは、コントロールと比較して、空気暴露5日目から表皮 HA 量が有意に増加し、その増加は、空気暴露8日目と11日目においても維持された。空気暴露11日目における表皮 HA の分子量プロファイルを調べたところ、コントロールと β -NAG2 で処理した3次元培養ヒト皮膚モデルにおいて、共に 2,000 kDa 以上のフラクションにピークトップが存在しており、全体的に違いは認められなかった (Figure 12)。次に、 β -NAG2 が3次元培養ヒト皮膚モデルにおいても培養正常ヒト表皮細胞と同様のメカニズムで HA 産生を促進したかを調べるため、まず3次元培養ヒト皮膚モデルにおける主要な HAS のアイソザイムについて調べた。リアルタイム定量 PCR の結果、コントロールの皮膚モデルでは、*HAS3* 遺伝子発現量は 28.93 ± 0.047 (平均 C_T 値 \pm SD, $n = 3$) であったのに対し、*HAS2* 遺伝子発現量は 33.17 ± 0.144 (平均 C_T 値 \pm SD, $n = 3$) および *HAS1* 遺伝子発現量は検出限界以下であった。このことから、*HAS* 遺伝子産物のおよそ 95% は *HAS3* 由来であることが示され、培養正常ヒト表皮細胞と同様、ヒト3次元皮膚モデルにおける表皮 HA の産生は主に *HAS3* が担っていると考えられた。そこで、 β -NAG2 処理における *HAS1-3* 遺伝子発現を調べたところ、*HAS1* 遺伝子産物は検出されず、*HAS2* および *HAS3* 遺伝子発現量は有意な変動がなかった (Figure 13)。このことから、Figure 9 に示す通り、 β -NAG2 は3次元培養ヒト皮膚モデル表皮においても *HAS3* 遺伝子の発現誘導を介さず、HA 産生を促進すると考えられた。さらに組織学的観察により、表皮 HA の組織内分布を調べたところ、コントロール3次元培養ヒト皮膚モデルでは、ヒト皮膚組織表皮と同様 (Figure 10C)、基底層から顆粒層にかけて細胞間隙に陽性シグナルが観察された (Figure 14B)。また、 β -NAG2 で処理した3次元培養ヒト皮膚モデルにおいても HA の分布に変化はなく、コントロールと比較してより強い陽性シグナルが認められた。次に、表皮 HA 産生と細胞増殖・分化との関係性を調べるため、H&E 染色による組織形態を観察した結果、コントロールと比較して β -NAG2 処理において、表皮重層化の亢進、すなわち表皮厚が増加している様子が観察された (Figure 14A)。さらに、表皮厚を定量的に解析した結果、 β -NAG2 で処理し

た 3 次元培養ヒト皮膚モデルではコントロールと比較して、表皮が有意に厚くなっていることも確かめられた (Figure 15)。これらの結果から、3 次元培養ヒト皮膚モデルを用いることで、表皮 HA と細胞の増殖・分化との関係性を調べる事が可能であること、また β -NAG2 により表皮 HA の産生が増加し、同時に表皮厚を増加させることが示された。

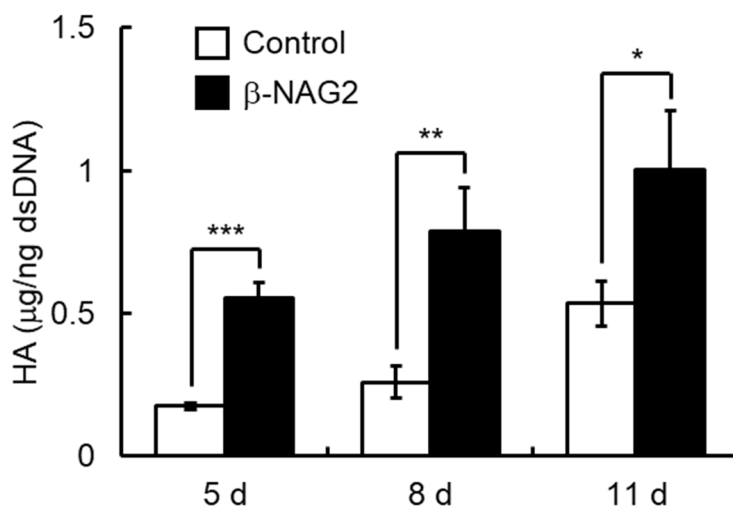


Figure 11. Effect of β -NAG2 on epidermal HA production in reconstructed human skin equivalents. The time-dependent HA production in β -NAG2-treated skin equivalents. The skin equivalents were treated with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 5, 8, or 11 days. ELISA and dye-binding assay quantified HA and dsDNA in the epidermal layer, respectively. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$) and shown as $\mu\text{g}/\text{ng}$ dsDNA. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

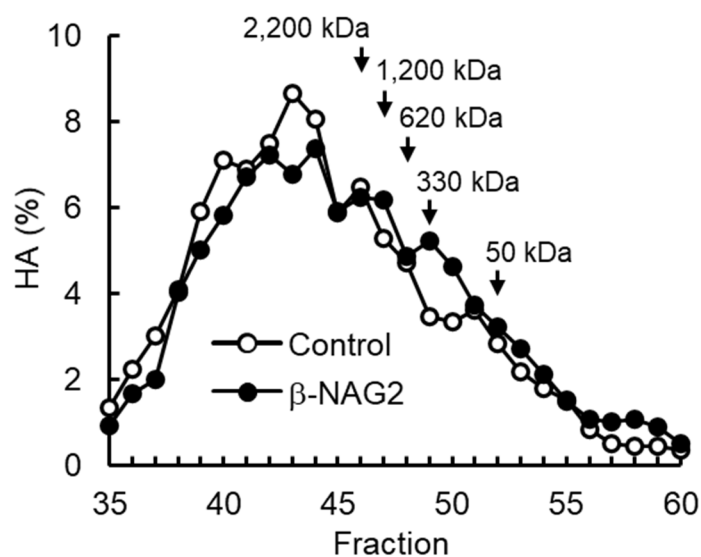


Figure 12. Effect of β -NAG2 on the molecular weight distribution of epidermal HA in reconstructed human skin equivalents. Size distribution of HA produced in the epidermis of skin equivalents cultured with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 11 days. Molecular weights were determined by size-exclusion chromatography.

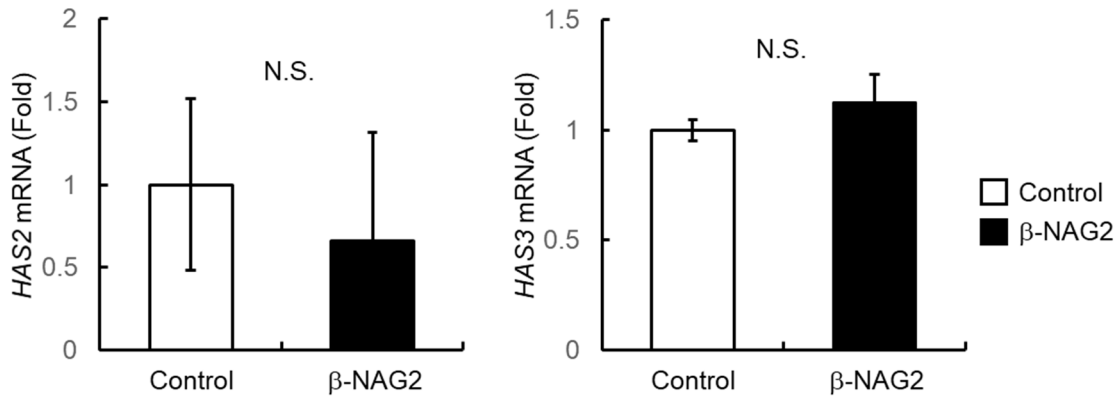


Figure 13. Effect of β -NAG2 on mRNA expression of *HAS* in reconstructed human skin equivalents. *HAS2* and *HAS3* mRNA expression in β -NAG2-treated skin equivalents. The skin equivalents were treated with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 9 days, and mRNA expression of *HAS2* and *HAS3* was measured by quantitative real-time PCR. Values are expressed as mean \pm SD (n = 3) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control samples. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. *N.S.*, not significant.

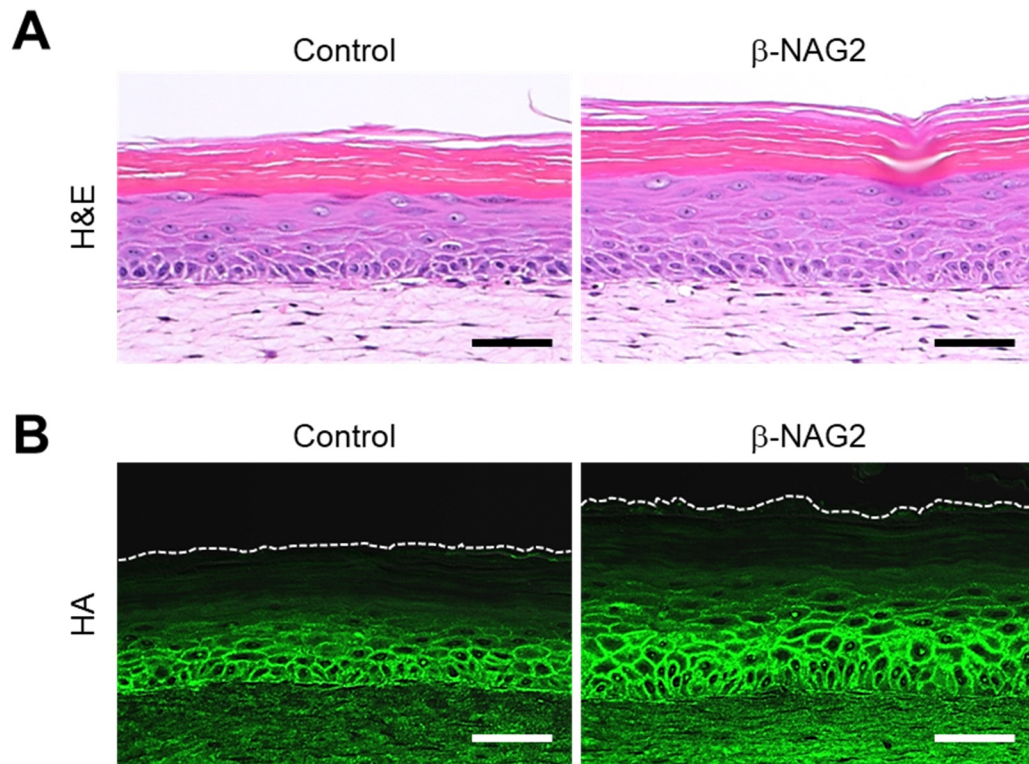


Figure 14. Effect of β -NAG2 on tissue distribution of epidermal HA and epidermal thickness in reconstructed human skin equivalents. Representative images of H&E (A) and HA staining (B). The skin equivalents cultured with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 11 days were collected. The sections were stained for morphology (H&E) or HA (*green*). Dotted lines indicate the skin surface. Scale bars = 50 μ m.

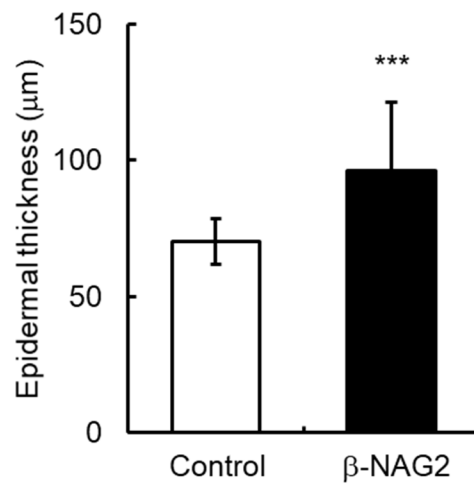


Figure 15. Effect of β -NAG2 on epidermal thickness in reconstructed human skin equivalents.

The epidermal thickness of β -NAG2-treated skin equivalents. The skin equivalents cultured with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 11 days were collected, and the epidermal thickness was measured. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 75$) and shown as μm . The Student's *t*-test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$.

2-3-3 β -NAG2 による表皮細胞への増殖促進効果

表皮組織の秩序だった構造と恒常性は、表皮細胞の増殖と分化のバランスによって維持される[51]。そこで、 β -NAG2による表皮厚増加の要因を明らかにするために、まずは β -NAG2が3次元培養ヒト皮膚モデルにおける表皮細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。Figure 16Aに示す通り、細胞増殖マーカーの一つであるKi67の免疫染色を実施したところ、コントロールではKi67陽性細胞は基底層に低頻度に存在していたのに対し、 β -NAG2で処理した3次元培養皮膚モデルでは基底層に多くのKi67陽性細胞が観察された。それらを計測した結果、コントロールと比較して β -NAG2で処理した3次元培養ヒト皮膚モデルにおいて、Ki67陽性細胞数が有意に増加していることが示された (Figure 16B)。また、Ki67とは異なる細胞増殖マーカーであるPCNA遺伝子発現についても調べたところ、コントロールと比較して β -NAG2で処理した3次元培養ヒト皮膚モデルでは、有意に上昇していた (Figure 16C)。これらの結果より、 β -NAG2で処理した3次元培養ヒト皮膚モデルにおいて表皮細胞の増殖が亢進していることが示唆された。

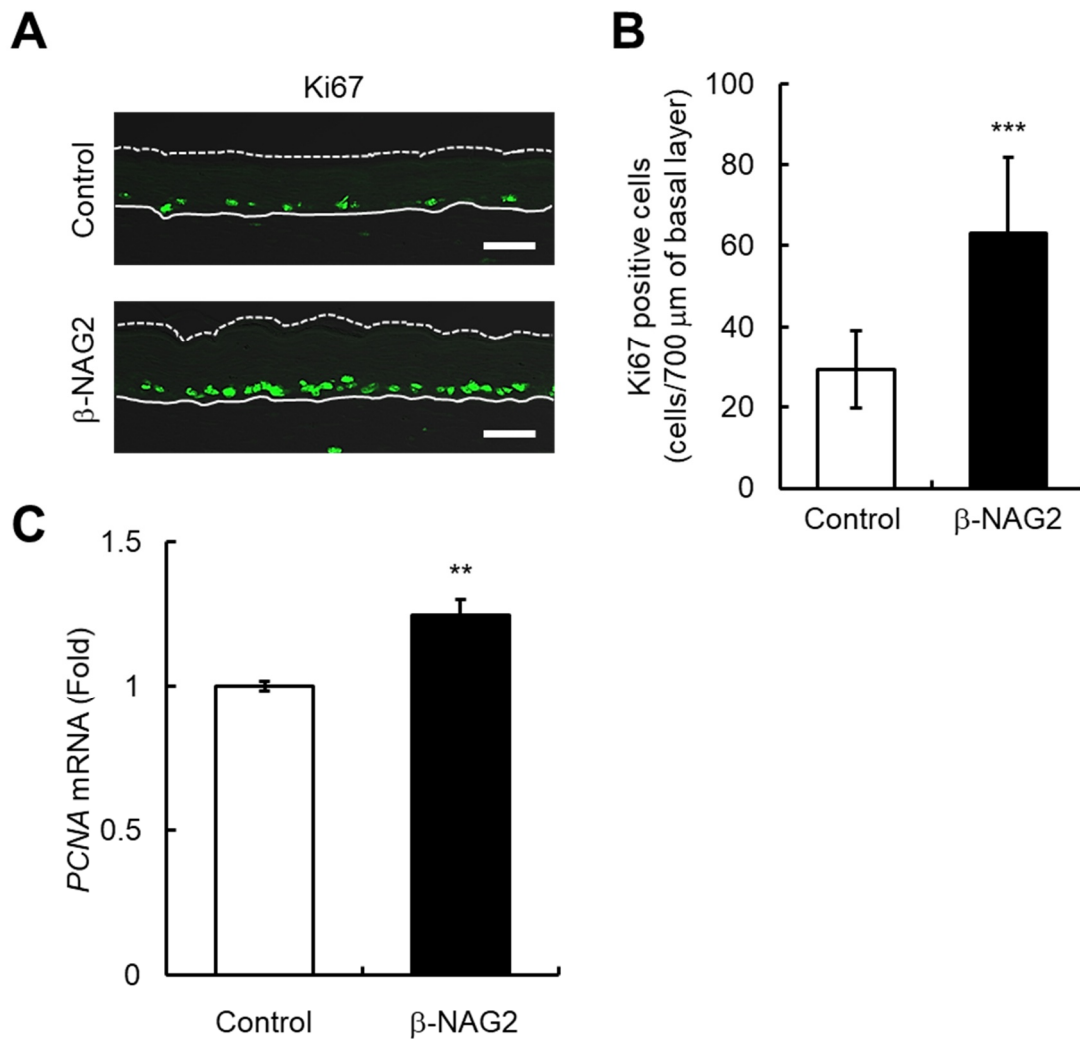


Figure 16. Effect of β -NAG2 on keratinocyte proliferation in reconstructed human skin equivalents. (A) Representative images of Ki67 staining. The skin equivalents cultured with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 5 days were collected. The sections were stained for Ki67 (green). Dotted lines indicate the skin surface and the solid lines mark the border between the epidermis and dermis. Scale bars = 50 μ m. (B) The Ki67-positive cells in β -NAG2-treated skin equivalents. The skin equivalents were treated with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 5 days, and the number of Ki67-positive cells in the epidermis was counted. Values are expressed as mean \pm SD (n = 30) and shown as cells/700 μ m of the basal layer. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$. (C) PCNA mRNA expression in β -NAG2-treated skin equivalents. The skin equivalents were treated with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 5 days, and PCNA mRNA expression was measured by quantitative real-time PCR. Values are expressed as mean \pm SD (n = 3) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control samples. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. **, $p < 0.01$.

2-3-4 β -NAG2 による表皮 HA 産生促進を介した表皮細胞の増殖促進

次に、 β -NAG2 による細胞増殖の亢進に、表皮 HA 産生の増加が関与しているかを調べた。第 1 章において、 β -NAG2 は表皮細胞の細胞内で β -NAGase の作用によって NAG へ変換された後、最終的に HA の基質の 1 つである UDP-NAG に代謝され、HA 産生を促進することを示している (Figure 9)。そこで、正常ヒト表皮細胞の単層培養系を用い、 β -NAGase の薬理的阻害剤である PUGNAc が β -NAG2 による HA 産生と細胞増殖促進に及ぼす影響を調べた。その結果、第 1 章の結果と同様に (Figure 7A)、PUGNAc は β -NAG2 によって培養上清中へ放出される HA 量の増加を完全に阻害し (Figure 17A)、同時に、 β -NAG2 による *PCNA* 遺伝子の発現上昇も抑制することを見出した (Figure 17B)。続いて 3 次元培養ヒト皮膚モデルを用い、同様の実験を行ったところ、PUGNAc は β -NAG2 による表皮 HA 産生促進を阻害すると同時に (Figure 18A)、 β -NAG2 による *PCNA* 遺伝子発現の発現上昇も抑制することを見出した (Figure 18B)。これらの結果より、 β -NAG2 は表皮 HA の産生促進を介し、正常ヒト表皮細胞の増殖を亢進させると考えられた。

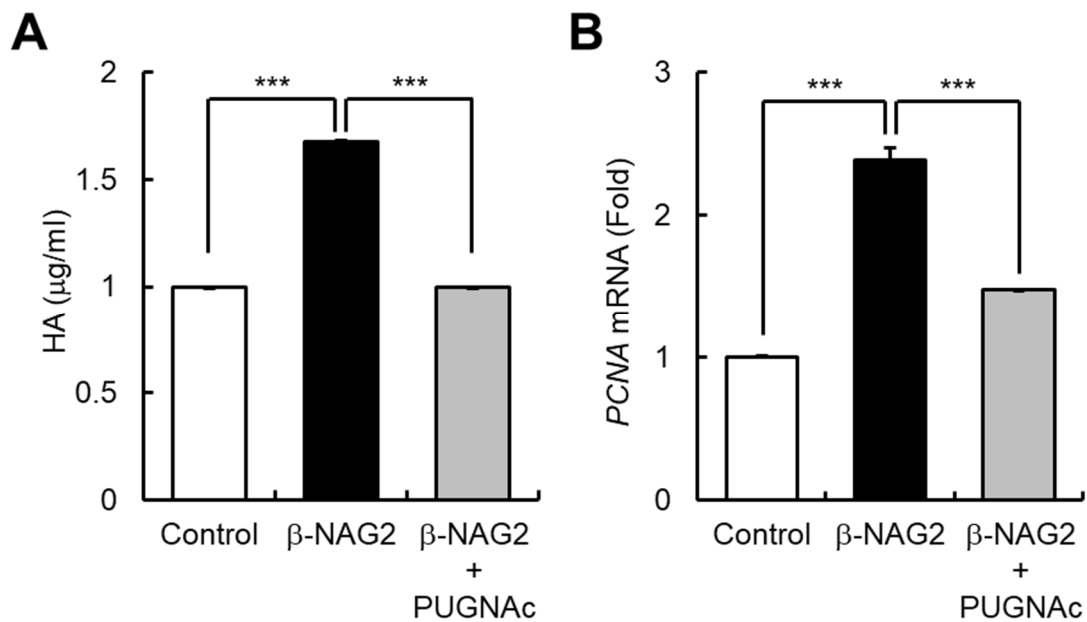


Figure 17. Effect of β -NAG2 and PUGNAc on HA production and *PCNA* mRNA expression in cultured normal human epidermal keratinocytes. Effect of β -NAG2 and PUGNAc on HA production (A) and *PCNA* mRNA (B) in cultured keratinocytes. The cells were treated with 10 mM β -NAG2 in the absence or presence of 0.2 mM PUGNAc for 3 days, followed by ELISA for HA production or quantitative real-time PCR analysis for *PCNA* mRNA expression. Values are expressed as mean \pm SD (n = 3) and shown as μ g/ml for HA production or mean \pm SD (n = 3) and shown as -

fold increase in mRNA expression relative to control cells for *PCNA* mRNA expression. Tukey's multiple comparison test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$.

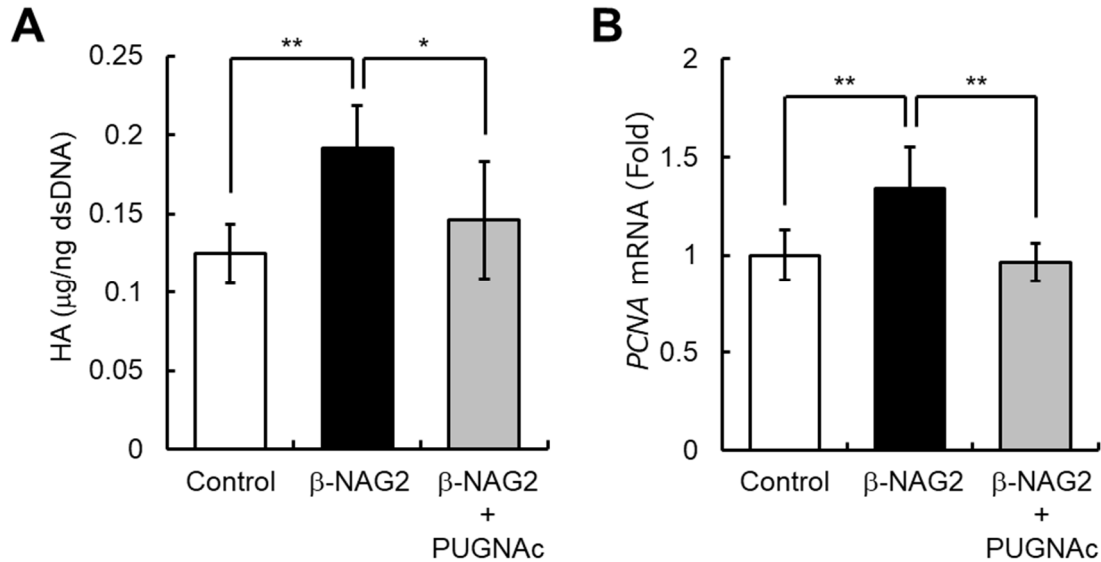


Figure 18. Effect of β -NAG2 and PUGNac on epidermal HA production and *PCNA* mRNA expression in reconstructed human skin equivalents. (A) Effect of β -NAG2 and PUGNac on HA production in skin equivalents. The skin equivalents were treated with 10 mM β -NAG2 in the absence or presence of 0.2 mM PUGNac for 9 days. ELISA and dye-binding assay quantified HA and dsDNA in the epidermal layer, respectively. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$) and shown as $\mu\text{g}/\text{ng}$ dsDNA. (B) Effect of β -NAG2 and PUGNac on *PCNA* mRNA expression in skin equivalents. The skin equivalents were treated with 10 mM β -NAG2 in the absence or presence of 0.2 mM PUGNac for 5 days, and *PCNA* mRNA expression was measured by quantitative real-time PCR. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control samples. Tukey's multiple comparison test was used for statistical analysis. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

2-3-5 β -NAG2 による表皮細胞への分化促進効果

さらに、 β -NAG2 による表皮細胞の分化に対する影響を調べるため、3次元培養ヒト皮膚モデルを用い、表皮の分化マーカーである TGM1 と FLG について免疫染色を実施した。ヒト皮膚組織と同様、コントロールの3次元培養ヒト皮膚モデルでは、TGM1 は有棘層から顆粒層の細胞膜上に (Figure 19A)、また FLG は顆粒層の細胞質に顆粒状のシグナルとして検出された (Figure 19B)。 β -NAG2 で処理した3次元培養ヒト皮膚モデルでは、TGM1 と FLG の局在性に変化はなかったが、いずれもコントロールと比較して染色シグナルの増加が観察された (Figure 19A と 19B)。また、コントロールと β -NAG2 で処理した3次元培養ヒト皮

膚モデルにおける *TGMI* と *FLG* のそれぞれの遺伝子発現を調べたところ、いずれの遺伝子発現も β -NAG2 で処理することにより有意に増加していた (Figure 19C と 19D)。これらの結果より、 β -NAG2 で処理した 3 次元培養ヒト皮膚モデルにおいては、表皮細胞の増殖のみならず、分化も亢進していることが示唆された。

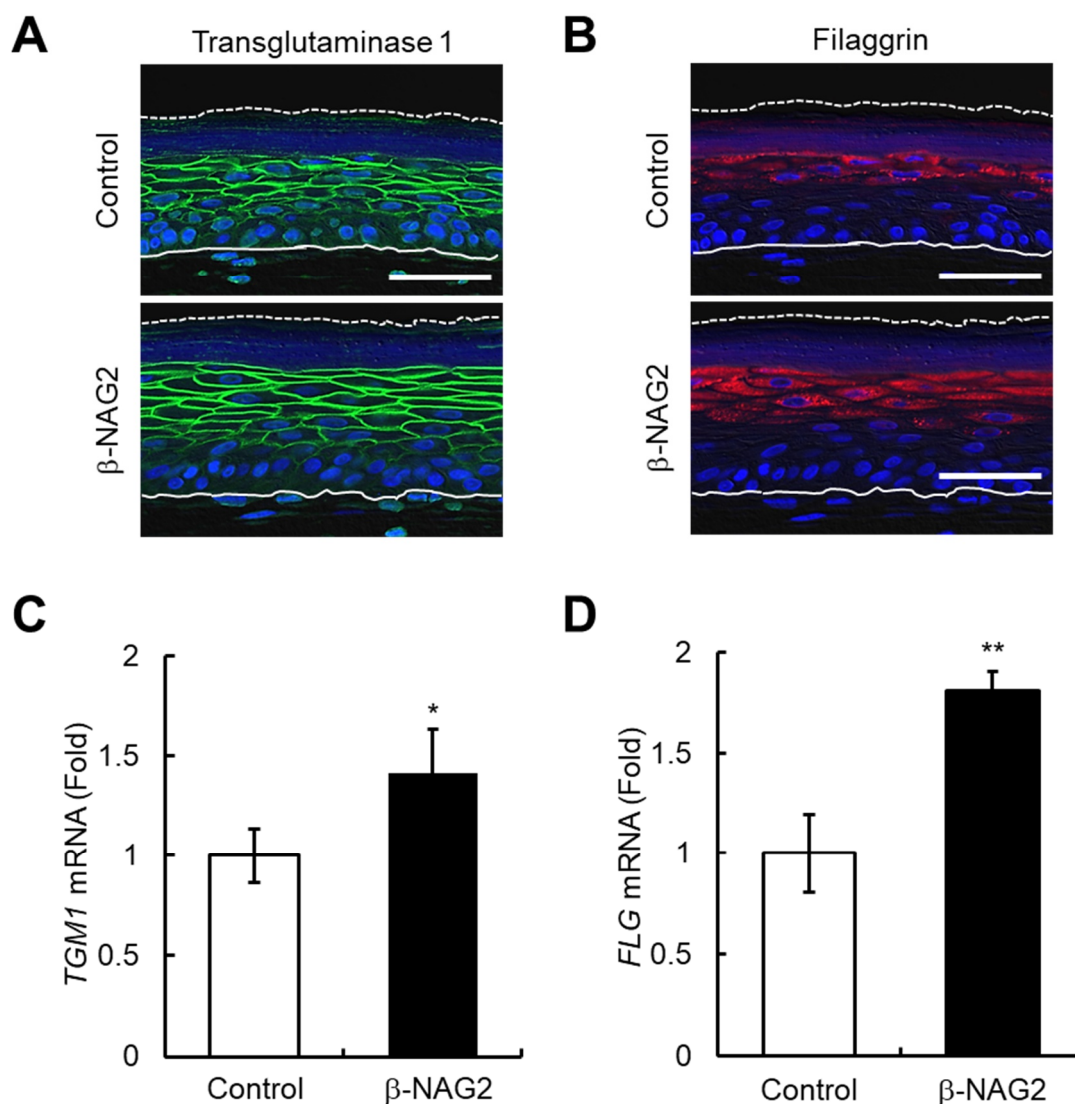


Figure 19. Effect of β -NAG2 on keratinocyte differentiation in reconstructed human skin equivalents. (A and B) Representative images of transglutaminase 1 (A) and filaggrin (B) staining. The skin equivalents cultured with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 9 days were collected. The sections were stained for transglutaminase 1 (green), filaggrin (red), and nuclei (TO-PRO-3, blue), respectively. Dotted lines indicate the skin surface and the solid lines mark the border between the epidermis and

dermis. Scale bars = 50 μm . (C and D) *TGMI* (C) and *FLG* (D) mRNA expression in β -NAG2-treated skin equivalents. The skin equivalents were treated with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 5 days, and *TGMI* and *FLG* mRNA expression was measured by quantitative real-time PCR. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control samples. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

2-3-6 β -NAG2 による表皮 HA 産生促進を介した表皮細胞の分化促進

β -NAG2 による細胞分化の亢進に、表皮 HA 産生の増加が関与しているかを検討した。まず、培養正常ヒト表皮細胞の単層培養系にて調べたところ、細胞増殖と同様、PUGNAc は β -NAG2 による *TGMI* および *FLG* 遺伝子発現の亢進を完全に抑制した (Figure 20A と 20B)。続いて 3 次元培養ヒト皮膚モデルを用い、同様の実験を行った結果、表皮細胞の結果と同様、PUGNAc は β -NAG2 による *TGMI* 遺伝子発現上昇を抑えた (Figure 21A)。さらに組織切片の H&E 染色像において、PUGNAc は β -NAG2 による表皮厚の増加を抑える様子が観察され (Figure 21C)、定量的な解析からも、PUGNAc が β -NAG2 による表皮厚増加を有意に阻害することが確認された (Figure 21B)。これらの結果より、表皮細胞の増殖に加え、 β -NAG2 による表皮 HA の増加が細胞分化の亢進にも寄与していることが示唆された。加えて、表皮細胞の増殖・分化との関連が報告されている細胞膜貫通型ヒアルロン酸受容体 CD44[17, 18, 24, 52]の関与についても調べた結果、空気暴露後 5 日目、9 日目の 3 次元培養ヒト皮膚モデルにおいて、*CD44* 遺伝子発現量はコントロールと β -NAG2 処理において違いはなかった (Figure 22A)。また組織学的な観察の結果、*CD44* は HA と同じく基底層から顆粒層にかけて分布しており、細胞膜上に染色が認められたが、コントロールと β -NAG2 で処理した 3 次元皮膚モデルにおいて局在性や染色強度に違いはなく、*CD44* の関与は低いと考えられた (Figure 22B)。以上の結果より、表皮 HA の産生促進は、表皮細胞の増殖と分化両方に対して促進的に働いており、表皮の形態と恒常性維持において重要な役割を果たしていることが示唆された。

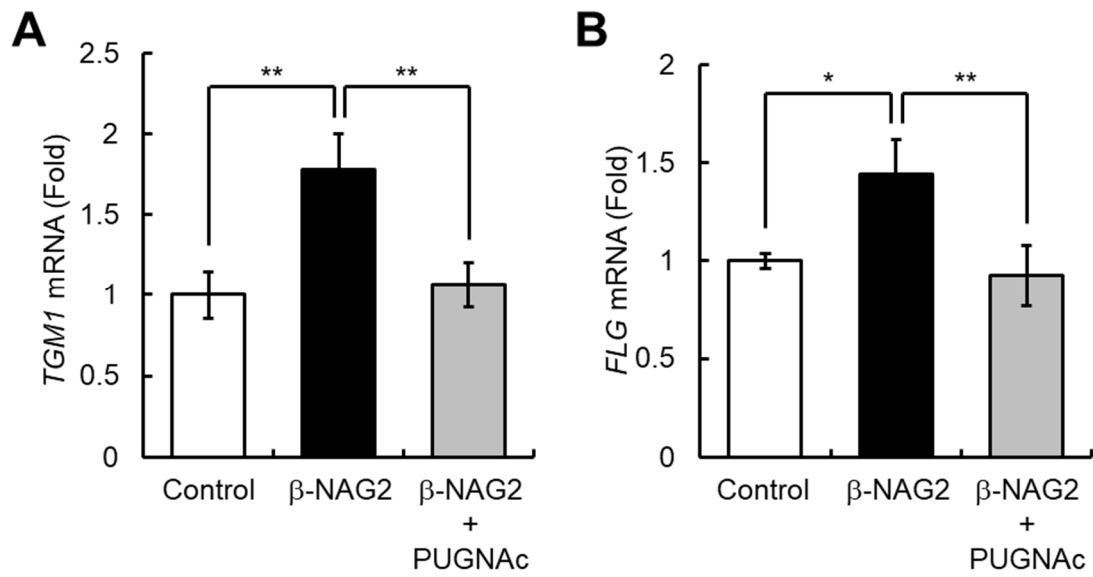


Figure 20. Effect of β -NAG2 and PUGNAc on *TGM1* and *FLG* mRNA expression in cultured normal human epidermal keratinocytes. Effect of β -NAG2 and PUGNAc on *TGM1* (A) and *FLG* (B) mRNA expression in cultured keratinocytes. The cells were treated with 10 mM β -NAG2 in the absence or presence of 0.2 mM PUGNAc for 3 days, followed by quantitative real-time PCR analysis. Values are expressed as mean \pm SD (n = 3) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control cells. Tukey's multiple comparison test was used for statistical analysis. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

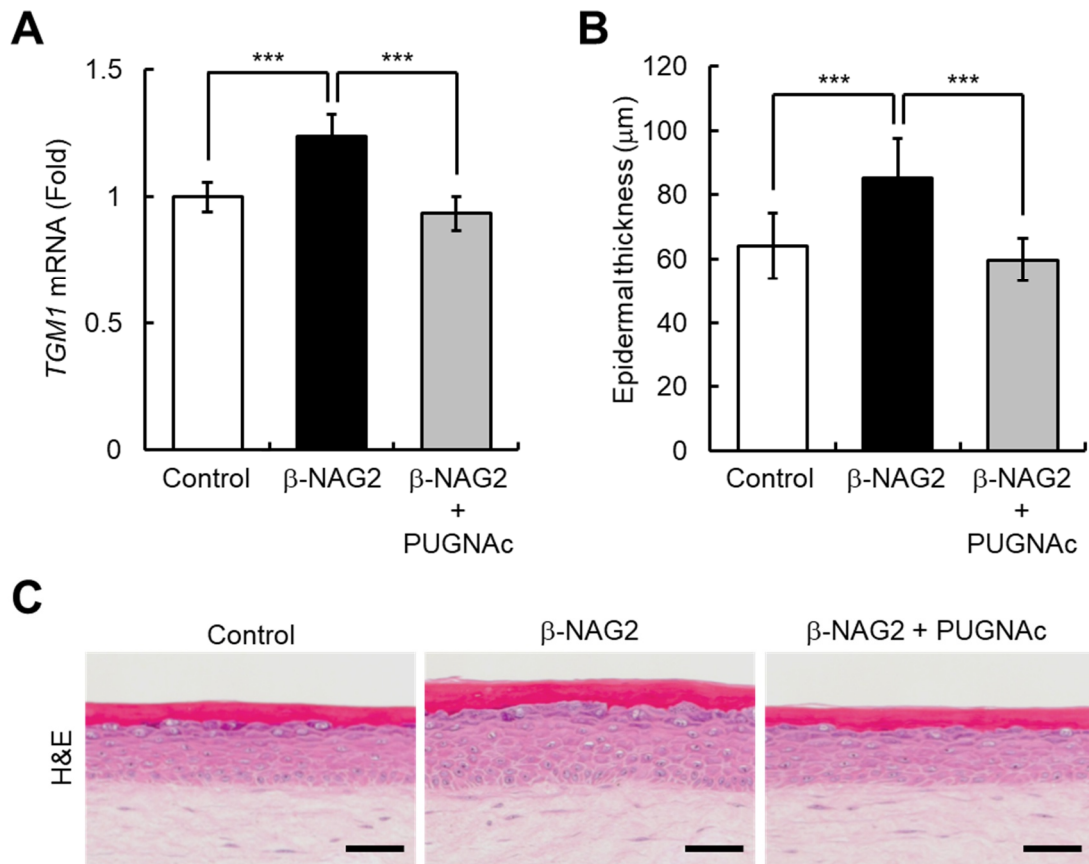


Figure 21. Effect of β -NAG2 and PUGNAc on *TGM1* mRNA expression and epidermal thickness in reconstructed human skin equivalents. (A) Effect of β -NAG2 and PUGNAc on *TGM1* mRNA expression in skin equivalents. The skin equivalents were treated with 10 mM β -NAG2 in the absence or presence of 0.2 mM PUGNAc for 6 days, and *TGM1* mRNA expression was measured by quantitative real-time PCR. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control samples. (B and C) Effect of β -NAG2 and PUGNAc on epidermal thickness (B) and morphology (C) of skin equivalent. The skin equivalents cultured with 10 mM β -NAG2 in the absence or presence of 0.2 mM PUGNAc for 9 days were collected. The sections were stained for H&E, and the epidermal thickness was measured. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 75$) and shown as μ m. Scale bars = 50 μ m. Tukey's multiple comparison test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$.

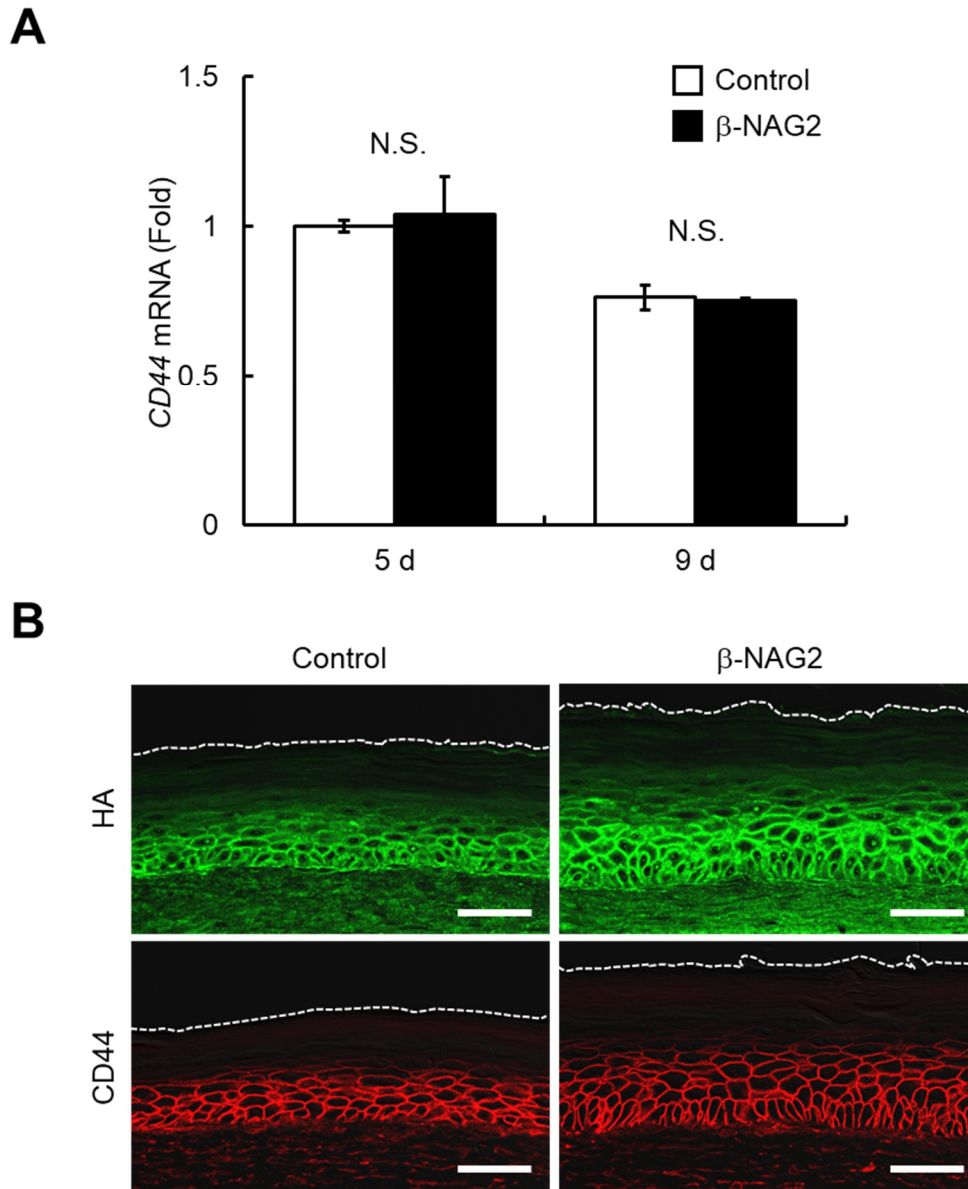


Figure 22. Effect of β -NAG2 on mRNA expression and tissue distribution of CD44 in reconstructed human skin equivalents. (A) *CD44* mRNA expression in β -NAG2-treated skin equivalents. The skin equivalents were treated with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 5 or 9 days, and *CD44* mRNA expression was measured by quantitative real-time PCR. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control samples. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. *N.S.*, not significant. (B) Representative images of HA and CD44 staining. The skin equivalents cultured with β -NAG2 (0 or 10 mM) for 11 days were collected. The sections were stained for HA (*green*) and CD44 (*red*). Dotted lines indicate the skin surface. Scale bars = 50 μ m.

2-4 考察

これまで表皮 HA は、表皮細胞の増殖に対して促進的に働くと考えられてきた[16, 22, 53-55]。本研究においても過去の知見と一致し、 β -NAG2 によって産生促進された HA が正常ヒト表皮細胞の増殖を亢進し、表皮厚を増加させることが示された。一方、表皮細胞の分化における表皮 HA の役割については相反する知見が報告されてきた。具体的には、HA 受容体である CD44 を欠損したマウスでは表皮 HA と細胞分化の両方が低下したのに対し[17]、ラット表皮細胞の 3 次元培養系もしくはヒト皮膚器官培養系では、EGF、KGF もしくは RA は表皮 HA を増加させたものの、細胞分化は低下させた[16, 19, 21]。本研究においては、表皮 HA の選択的促進剤 β -NAG2 を用いることで、正常ヒト表皮細胞の単層培養系および 3 次元培養ヒト皮膚モデルにおいて、表皮 HA の増加に伴い表皮細胞の分化が亢進することを示した。さらに表皮細胞の分化の亢進は、PUGNAc による表皮 HA 産生促進の阻害により完全にキャンセルされた。従って、表皮 HA は表皮細胞の増殖だけでなく、分化も亢進する作用を有するものと考えられた。一方で、 β -NAG2 は細胞内 UDP-NAG プールサイズの変化を通し、表皮 HA 産生以外の経路で表皮細胞の挙動に影響を与えた可能性も考えられる。すなわち、 β -NAG2 から生成した UDP-NAG はケラタン硫酸、ヘパラン硫酸およびヘパリンなど HA 以外のグリコサミノグリカンの基質としても使用され得る他、O-linked NAG として糖鎖修飾にも使用される可能性もある[56, 57]。また、巨大なコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるバーシカンや、ヘパラン硫酸が結合した膜貫通プロテオグリカンであるシンデカン は表皮で発現し[58]、様々な種類の細胞の増殖や分化に関わることが知られている[59-65]。従って、 β -NAG2 による HA 産生促進と表皮の増殖・分化との関連性については、例えば表皮 HA 産生を主に担う HAS3 をノックダウンするなど、さらなる検証が必要と考える。

HA はその分子量サイズに応じた細胞機能への関与が報告されており、一般的に 1,000 kDa から 6,000 kDa の高分子ヒアルロン酸は生体の恒常性維持に働くのに対し、250 kDa 以下の低分子ヒアルロン酸は病態との関連が示されている[24, 25]。表皮 HA に関してはこれまでに、マウス表皮細胞に外的に中程度の分子量サイズの HA (50-400 kDa) を添加培養すると細胞増殖が誘導されることが報告されている[52]。さらに、ヒト表皮細胞に低分子 HA (<27 kDa) を添加培養すると細胞増殖が高まり、一方、高分子 HA (500-1,000 kDa) の添加では細胞分化が誘導されると報告されている[18]。この様に、HA の分子量サイズは表皮細胞の増殖と分化において重要な役割を担っていることが示されている。加えて、細胞が産生したのか、もしくは外的に添加したのかによっても細胞機能へ及ぼす影響が異なる可能性が考えられる。本研究では、3 次元培養ヒト皮膚モデル表皮における HA 分子量サイズは $>2,000$ kDa であり、 β -NAG2 添加により HA 分子量分布に変化はなかったことから、 $>2,000$ kDa の高分子の HA 量が表皮の恒常性維持において重要であると考えられた。一方、本研究では 3 次元

培養ヒト皮膚モデルの表皮全体から HA を抽出していることから、局所的な HA 分子量サイズの変化が表皮細胞の挙動に影響を及ぼしている可能性もあり、今後さらなる検証も必要である。

HA は細胞膜上に存在する主要な HA 受容体である CD44 に結合し、細胞内へシグナルを伝達することも知られている。例えば、CD44 欠損マウスモデルを用いた検討から、HA によって活性化された CD44 シグナルは、表皮の細胞接着、増殖、移動および分化に影響を与えることが報告されている[17, 18, 24, 52]。本研究では、CD44 は 3 次元培養ヒト皮膚モデル表皮に強く発現しており、その発現レベルは β -NAG2 によって変化しなかった。従って、CD44 の発現レベルは β -NAG2 による表皮の増殖・分化の亢進への関与は低いと考えられた。一方、CD44 と HA の表皮における局在性が重なっていることから、HA と CD44 との結合が β -NAG2 が介する表皮の増殖・分化の亢進に関与している可能性や、CD44 が HA を表皮細胞間にアンカーすることで細胞間スペースを確保し、細胞の恒常性維持に欠くことができない栄養素や代謝物の交換を促している可能性も考えられた。

以上の結果より、 β -NAG2 は表皮 HA 産生促進を介して、正常ヒト表皮細胞の増殖・分化を亢進することが示された。また、HA の分子量サイズや CD44 の発現パターンに変化は見られなかったことから、 β -NAG2 による表皮 HA 産生促進を介した表皮のターンオーバー促進には、表皮 HA の量的な増加が寄与したと考えられた。

第3章 表皮 HA の産生低下と表皮ターンオーバーとの関係性

3-1 小序

第2章では、 β -NAG2 は表皮 HA の選択的な産生促進を介し、表皮細胞のターンオーバーを促進することを示した。しかしながら、その特異性を調べるために用いた PUGNAc は、 β -NAG2 から NAG への変換を阻害して HA 産生を抑制するため、 β -NAG2 が表皮 HA 産生以外の経路で表皮の増殖・分化へ影響を与えた可能性も否定できなかった。そこで、本章では siRNA を用いて *HAS3* 遺伝子発現を特異的に抑制 (ノックダウン) し、表皮 HA の産生低下と表皮細胞のターンオーバーとの関係性をさらに検証した。

3-2 材料および実験方法

3-2-1 正常ヒト表皮細胞の培養

正常ヒト表皮細胞 (Kurabo) は、第1章に記載した方法に従い培養した。

3-2-2 *HAS3* 遺伝子ノックダウン細胞による3次元培養ヒト表皮モデル (*HAS3* ノックダウンモデル) の構築

ノックダウン実験は、*HAS3* 用に合成された Silencer[®] Select siRNAs (IDs: s6460 および s194496) と、control non-silencing siRNA (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。これらの siRNA を、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて表皮細胞にトランスフェクトし、コントロールもしくは *HAS3* 遺伝子ノックダウン細胞を作製した。ポリカーボネート製のカルチャーインサート (ポアサイズ 0.4 μ m、メンブレン面積 0.6 cm² (Millipore, KS, USA)) 上に、コントロールもしくは *HAS3* 遺伝子ノックダウン表皮細胞を播種し、カルチャーインサート内において、再度コントロールもしくは *HAS3* siRNA のトランスフェクトを行った。24 時間後にカルチャーインサート内の培地を取り除き、カルチャーインサート外の培地を CELLnTEC Prime 3D Barrier Culture Medium (CELLnTEC, Bern, Switzerland) に交換して、空気暴露状態での培養を継続した。

3-2-3 HA 量の測定

カルチャーインサート内の表皮を回収し、第2章に記載した方法に従い HA 量を測定した。

3-2-4 リアルタイム定量 PCR 法

第1章に記載した方法に従い、リアルタイム定量 PCR を実施した。*RPLP0*、*HAS1-3*、*CD44*、および *PCNA* の検出に使用した predesigned の primers と probe のセットは、第1章もしくは第2章に記載した。*involucrin (IVL)* および *loricrin (LOR)* については以下に示した。

gene name	gene symbol	TaqMan Gene Expression Assay ID
<i>involucrin</i>	<i>IVL</i>	Hs00846307_s1
<i>loricrin</i>	<i>LOR</i>	Hs01894962_s1

3-2-5 組織学および免疫組織学的解析

第2章に記載した方法に従い、組織学および免疫組織学的解析を行った。FLG および HA の検出に使用した試薬は、第2章に記載した。Ki67 および LOR については以下に示した。表皮厚は、H&E 染色の 200 倍拡大観察画像に対し、画像解析ソフトウェア ZEN 3.1 (blue edition) (Carl Zeiss Microscopy) を用いてランダムに測定した (n = 30)。

標的タンパク質	1次抗体	2次抗体
Ki67	ウサギモノクローナル抗体 (Abcam)	Cy3 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch)
LOR	ウサギポリクローナル抗体 (Covance, WI, USA)	DyLight488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch)

3-2-6 統計解析

統計的有意差検定は、Microsoft® Excel® software (Office 365) を用い、Student's *t-test* にて実施した。なお、*p* 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。

3-3 結果

3-3-1 *HAS3* 遺伝子発現が特異的に低下した 3次元培養表皮モデルの作出

第2章と同様、まずは3次元培養ヒト皮膚モデル表皮を用い、*HAS3* 遺伝子の特異的に発現抑制した実験系の構築を試みた。しかしながら、本モデルでは表皮細胞を播種してから表皮構造が構築されるまでの培養期間が長く、siRNA による *HAS3* 遺伝子の発現低下を長期間維持することが困難であった。そこで、より短期間で表皮構造が完成する3次元培養表皮モデルに切り替えて検討を行うこととした。そこではじめに、3次元培養表皮モデルにおける3種類の *HAS* 遺伝子発現の相対量をリアルタイム定量 PCR にて調べ、培養正常ヒト表皮細胞および3次元培養ヒト皮膚モデルと同様、本モデルも *HAS3* が主要なアイソザイムであり、*HAS1-3* 遺伝子発現の約 98%を占めていることを確認した。そこで、正常ヒト表皮細胞に *HAS3* siRNAs を導入し3次元培養表皮モデルを作製した。その結果、*HAS3* mRNA の発現は、コントロールレベルと比較して培養3日でおおよそ 25%、培養6日でおおよそ 60%まで低下した (Figure 23A)。この時、コントロールと *HAS3* ノックダウンモデルとの間において、*HAS1* と *HAS2* mRNA に違いはなかったことから (Figure 24A と 24B)、長期間の *HAS3* 特異

的なノックダウンが達成されたと考えられた。また、*HAS3* のノックダウンにより培養 6 日における表皮 HA 量もおよそ 41%にまで有意に減少し(Figure 23B)、この効果は HA 染色においても確認された (Figure 23C)。なお、*CD44* mRNA の発現量に違いは認められなかった (Figure 24C)。

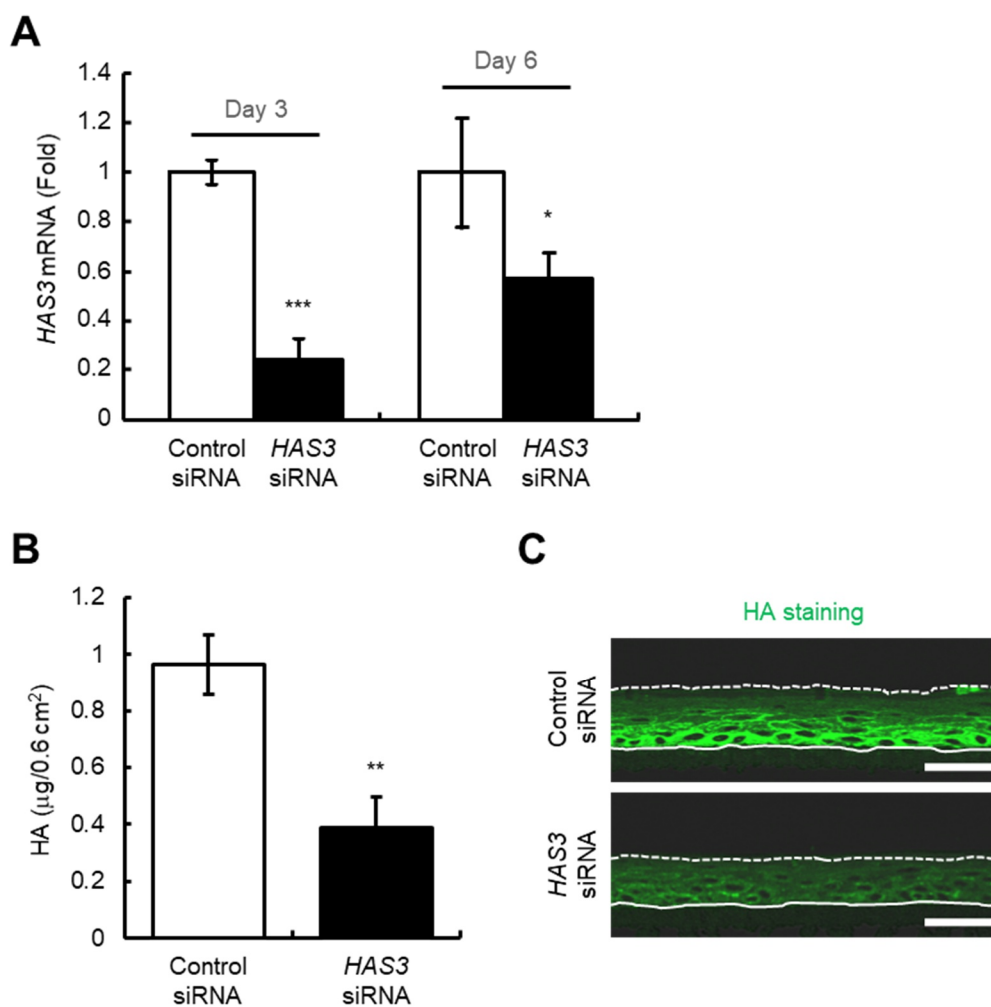


Figure 23. Effect of *HAS3* siRNA transfection on *HAS3* mRNA expression and epidermal HA in reconstructed human epidermal equivalents. (A) Knockdown efficiency for *HAS3*. The expression levels of *HAS3* mRNA 3 and 6 days after treatment of keratinocytes with siRNA were evaluated by quantitative real-time PCR. As for controls, keratinocytes were transfected with control non-silencing siRNA (Control siRNA). Values are expressed as mean \pm SD (n = 3) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control samples. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$. (B and C) HA amount (B) and distribution (C) in *HAS3*-knocked down epidermal equivalents. The epidermal equivalents were collected 6 days after treatment of

keratinocytes with siRNA, and HA was quantified by ELISA (B). Values are expressed as mean \pm SD (n = 3) and shown as $\mu\text{g}/0.6\text{ cm}^2$. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. **, $p < 0.01$. The sections of samples collected on 6 days were stained for HA (green) (C). Dotted lines indicate the skin surface, and the solid lines mark the border between the epidermis and membrane. Scale bars = 50 μm .

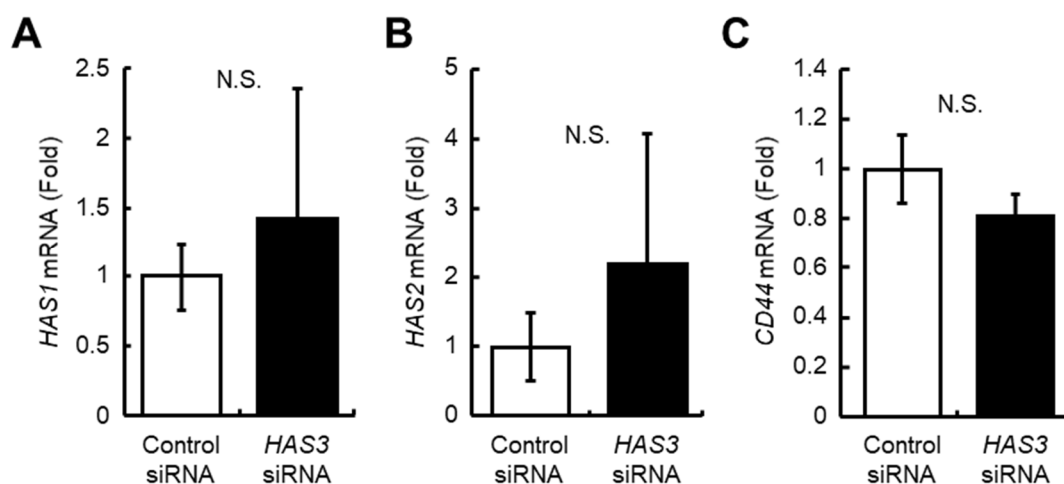


Figure 24. Effect of *HAS3* knockdown on *HAS1*, 2, and *CD44* mRNA expression in reconstructed human epidermal equivalents. (A-C) The expression levels of *HAS1*-2 (A and B) and *CD44* (C) mRNA on 3 days after treatment of keratinocytes with *HAS3* siRNA were evaluated by quantitative real-time PCR. As for controls, keratinocytes were transfected with control non-silencing siRNA (Control siRNA). Values are expressed as mean \pm SD (n = 3) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control samples. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. *N.S.*, not significant.

3-3-2 *HAS3* 遺伝子ノックダウンを介した HA 産生の低下と表皮細胞の増殖・分化の低下
次に、*HAS3* 遺伝子をノックダウンした 3 次元培養表皮モデルにおける HA 産生と表皮ターンオーバーとの関係性を調べた。まず H&E 染色による組織切片の観察では、コントロールと比較して、*HAS3* ノックダウンモデルにおいて表皮厚が低下している様子が観察された (Figure 25A)。表皮厚を計測した結果、*HAS3* ノックダウンモデルではコントロールと比較して、表皮厚が有意に低下していることが確認された (Figure 25B)。また、細胞増殖マーカーである Ki67 の免疫組織染色では、コントロールと比較して、*HAS3* ノックダウンモデルにおいて基底層での Ki67 陽性細胞の出現頻度が低下している様子が認められた (Figure 25A)。さらに Ki67 とは別の細胞増殖マーカーである *PCNA* 遺伝子発現変動も、コントロールと比較して、*HAS3* ノックダウンモデルでは有意に低下していた (Figure 25C)。このことから *HAS3*

ノックダウンモデルでは、細胞増殖が低下していることが示された。また、顆粒層で高発現する分化マーカーである FLG および LOR の免疫染色においても、コントロールと比較して、*HAS3* ノックダウンモデルにおいて染色シグナルが減少していた (Figure 25A)。さらに *LOR* 遺伝子発現も、コントロールと比較して、*HAS3* ノックダウンモデルでは発現低下が認められた (Figure 25D)。このことから、*HAS3* ノックダウンモデルでは、表皮細胞の増殖だけでなく、分化も低下していることが示された。以上の結果より、*HAS3* 遺伝子発現抑制による HA 産生の特異的な低下に伴い、表皮細胞の増殖・分化も低下し、表皮厚の低下を引き起こしたと考えられた。

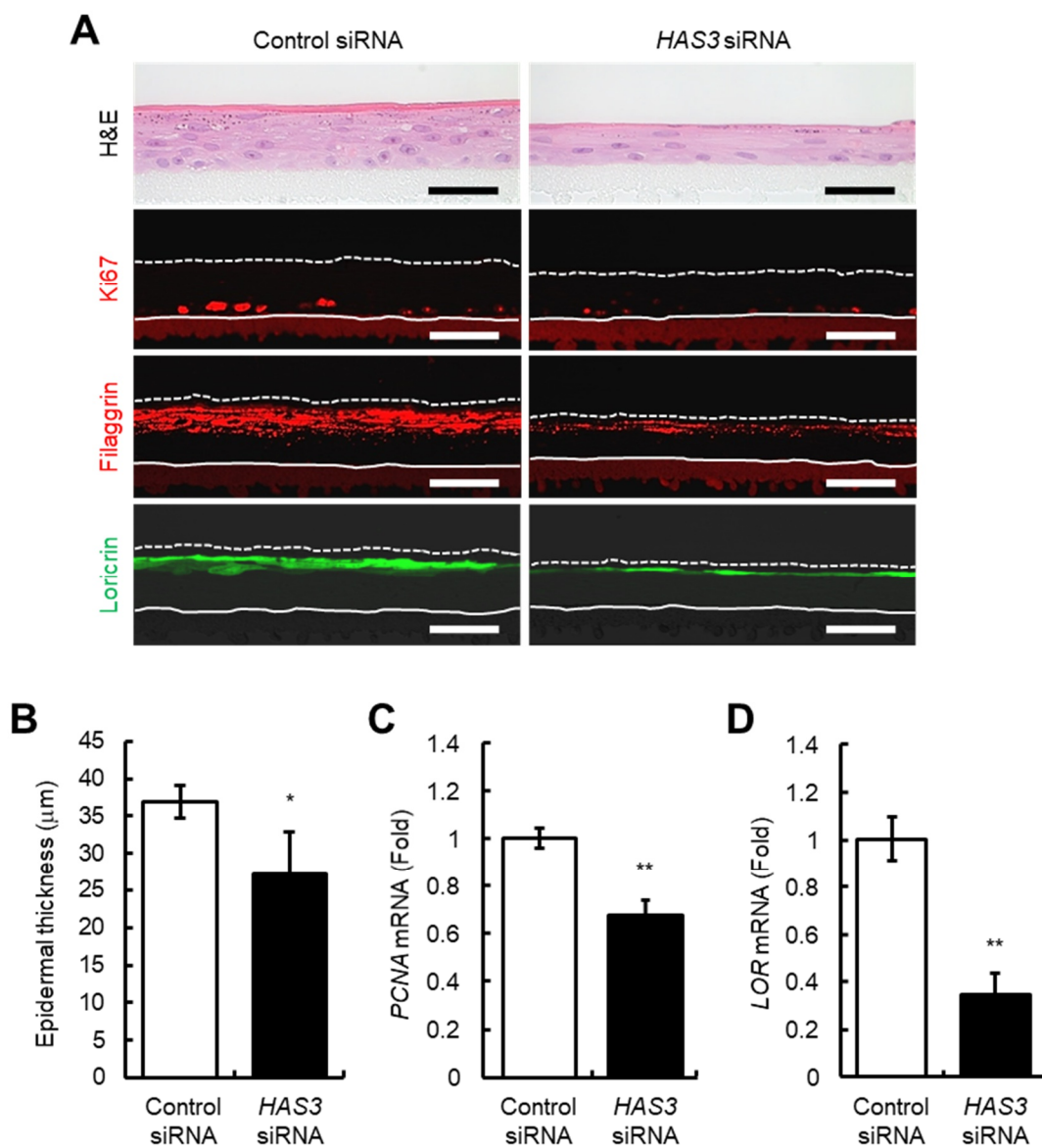


Figure 25. Effect of *HAS3* knockdown on epidermal structure and turnover in reconstructed human epidermal equivalents. (A) Representative images of H&E, Ki67, filaggrin, and loricrin staining. The epidermal equivalents were collected 6 days after treatment of keratinocytes with *HAS3* siRNA. The sections were stained for morphology (H&E) and immunostained for Ki67 (*red*), filaggrin (*red*), or loricrin (*green*). As for controls, keratinocytes were transfected with control non-silencing siRNA (Control siRNA). Dotted lines indicate the skin surface, and the solid lines mark the border between the epidermis and membrane. Scale bars = 50 μ m. (B) The epidermal thickness of *HAS3* knocked-down epidermal equivalents. Epidermal equivalents were collected 6 days after treatment of keratinocytes with *HAS3* siRNA, and the epidermal thickness was measured. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$) and shown as μ m. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. *, $p < 0.05$. (C and D) *PCNA* (C) and *LOR* (D) mRNA expression in *HAS3* knocked-down epidermal equivalents. The expression levels of *PCNA* mRNA on 3 days (C) and *LOR* mRNA on 6 days (D) after treatment of keratinocytes with *HAS3* siRNA were evaluated by quantitative real-time PCR. As for controls, keratinocytes were transfected with control non-silencing siRNA (Control siRNA). Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$) and shown as -fold increase in mRNA expression relative to control samples. The Student's *t*-test was used for statistical analysis. **, $p < 0.01$.

3-4 考察

第2章において、表皮 HA 産生の促進は、表皮細胞の増殖・分化を亢進させることを示した。そこで第3章では、表皮 HA 産生を特異的に抑制した時に表皮細胞の増殖・分化に及ぼす影響について詳しく検討した。3次元培養ヒト表皮モデルの HA 産生を担う *HAS3* 遺伝子発現をノックダウンした結果、表皮 HA 産生の低下に伴い、表皮細胞の増殖・分化いずれも低下し、表皮の菲薄化が引き起こされた。これらの結果は、第2章で導き出された結論、すなわち HA 産生促進剤である β -NAG2 が表皮 HA 産生促進を介して表皮細胞の増殖・分化を亢進させ、表皮厚の増加をもたらした結果を裏付けるものであった。このことから、*HAS3* を介した表皮 HA 産生は、表皮細胞の増殖・分化の両方に対し促進的に作用するものと考えられた。一方、これまでに3次元培養ヒト表皮モデルの表皮 HA を HA 分解酵素である St-HAase により減少させた場合、増殖・分化への影響は認められないと報告されている[23]。このことから、表皮 HA が表皮細胞影響を及ぼすには、HA が単純に細胞の外部環境として働いているのではなく、何らかのシグナルを細胞に与えている可能性もある。また、本研究では、表皮 HA と表皮の増殖・分化との関連性について、*in vitro* の実験系でのみ行っており、*in vivo* での検証がなされていない。これまでに、*HAS1*、*HAS3* 両方を機能的に欠失したマウスでは、コントロールと比較して表皮の構造に変化はなく[66]、創傷治癒過程においては *HAS2* 遺伝子発現の増加を伴ってコントロールよりも早く閉塞することが報告されている。従って、*in vitro* においても *HAS* のアイソザイムがお互いの機能を補填し合う可能性

も考慮する必要がある。また、表皮 HA 産生における HAS1、HAS2 および HAS3 の相対的な寄与度についても異なる報告がある。例えば、ヒト表皮細胞単層培養系および 3 次元培養ヒト表皮モデルでは HAS1 が優勢なアイソザイムであり[67]、バイオプシーしたヒト皮膚や[67]、培養正常ヒト表皮細胞およびヒト表皮細胞株 HaCaT では HAS2 が豊富に発現しているという報告もある[12, 68, 69]。このような背景には、表皮細胞の状態や実験材料によって HA 合成の仕組みも異なる可能性も考えられ、今後それぞれの実験において、HAS1、HAS2 および HAS3 の発現パターンを調べていく必要がある。

以上、第 2 章および第 3 章の結果より、表皮 HA は表皮細胞のターンオーバー (増殖・分化) に対して促進的に作用することが示され、表皮構造の構築や恒常性維持に寄与している可能性が考えられた。なお、これまでに、表皮 HA 量は皮膚の加齢により減少することが報告されており[26, 27]、加齢した皮膚では表皮の菲薄化やバリア機能の異常が特徴として挙げられる[29, 70, 71]。さらに glucocorticoids は、アトピー性皮膚炎や乾癬を含む多くの炎症性疾患の治療に広く使用されるが、長期間の使用により表皮 HA を含む細胞外マトリックスの減少により皮膚が萎縮することが知られている[72, 73]。これらの現象は表皮細胞の増殖・分化の低下と密接に関係していることから、表皮 HA をターゲットとすることにより、これらの症状を改善できる可能性も考えられた。

第4章 表皮HAをターゲットとした β -NAG2の皮膚の抗老化効果

4-1 小序

皮膚の老化は、自然に起こる内因性の老化と、紫外線により引き起こされる外因的な老化に区別される、複雑な生物学的現象である。一般的に加齢した皮膚の特徴として、水分量および弾力性の低下、真皮の細胞外マトリックス成分の減少や劣化が挙げられ、これらに起因すると考えられるシワ、たるみ、肌荒れ、皮膚脆弱性の増加などが生じる[74-76]。特にシワの形成に関しては、真皮乳頭層におけるHAの減少[77, 78]、真皮網状層における異常な弾性物質や損傷を受けた無秩序なコラーゲン線維の大量の蓄積が関連することが示唆されている[74, 75, 79-81]。さらに、これらの真皮の変化に加えて、表皮水分量の減少や表皮の菲薄化など、表皮に関連した変化も特徴とする[29, 70, 71]。

表皮HA量は皮膚の加齢に伴って減少することが報告されており[26, 27]、高保水能を有するHAの性質から、水分や粘弾性の低下やシワなどの臨床的な加齢の兆候を引き起こすと推測される。従って、加齢に関連して減少した表皮HAを正常化するアプローチは、皮膚の老化を改善もしくは予防することが期待できる。実際に、RAやレチノールなどのレチノイドは、*in vitro* および *in vivo* において、HAS 遺伝子発現誘導を介して表皮HA産生を促進し[19, 20, 30, 82]、シワを含む老化の兆候を顕著に予防または改善することが報告されている[30, 31]。しかしながら、レチノイドの化学的な不安定性や皮膚への刺激性から、化粧品や医薬品における使用には制限があるとされてきた[30, 83, 84]。これまでに第1章および第2章では、化学的に安定なNAG誘導體である β -NAG2が、HA産生を顕著に促進し、表皮細胞の増殖・分化を亢進して表皮厚を増加させることを示した。そこで第4章では、目尻にシワを有する健常日本人女性に β -NAG2を適用し、表皮HA産生促進をターゲットとしたアプローチが皮膚の抗老化において有望な手段となり得るか詳細に調べた。

4-2 材料および実験方法

4-2-1 材料

ヒト3次元表皮モデル (EpiDerm™ EPI-200) は、MatTek Corporation (MA, USA) から購入した。

4-2-2 器官培養ヒト皮膚の角層上からの β -NAG2配合製剤塗布

ヒト皮膚組織の器官培養は、第2章に記載した方法に従い実施した。塗布に用いた β -NAG2配合製剤の組成は、10% (wt/wt) dipropylene glycol、5% (wt/wt) glycerol、5% (wt/wt) ethanol、2% (wt/wt) dimeticone、0.5% (wt/wt) polyoxyethylene hydrogenated castor oils、0.3% (wt/wt) phenoxyethanol、0.3% (wt/wt) corboxyvinyl polymer、0.16% (wt/wt) potassium hydroxide および 0.01% (wt/wt) edetate disodium である。 β -NAG2を0%、1%もしくは2% (wt/wt)含む製剤を、

1日1回、4日間、器官培養皮膚角層上に7.4 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ で適用し、ポリエチレンフォームを用いて塗り広げた。培養終了後、直径8mmのバイオプシーパンチで5片を切り出し、第2章に記載した方法に従い、真皮から表皮を剥離した。

4-2-3 組織学的解析

第2章に記載した方法に従い、器官培養後のヒト皮膚の薄切切片を作製し、H&E染色を実施した。

4-2-4 3次元培養ヒト表皮モデル角層上からの β -NAG2配合製剤適用

3次元培養ヒト表皮モデル (EpiDerm™ EPI-200) は、EPI-100NMM 培地 (MatTek Corporaion) にて培養した。 β -NAG2配合製剤の組成は、4-2-2に記載した。 β -NAG2を0%, 0.5%, 1%, 2%もしくは3.5% (wt/wt) 含む製剤を、表皮モデルの角層上から1日おきに2 $\mu\text{l}/\text{mm}^2$ で適用し、4日間培養した。

4-2-5 表皮HA量の測定

第2章に記載した方法に従い、器官培養ヒト皮膚およびヒト3次元培養表皮モデルの表皮HA量を測定した。

4-2-6 ヒト有効性試験

臨床試験には、33人の健常日本人女性(40-58歳; 平均47.1歳)に参加して頂いた。試験は半顔二重盲検にて実施し、4-2-2に記載の組成で3.5% (wt/wt) β -NAG2を含む β -NAG2配合製剤と、コントロールとして β -NAG2のみを含まないプラセボ製剤で、顔の左右の半分ずつに朝・夜の一日2回、8週間塗布することとした。角層水分量は、それぞれの被験者の目尻付近において、静電容量法にて表面からおよそ15 μm までの角層中の水分量を測定するCorneometer® CM825 + MPA5 (Courage and Khazaka, Cologne, Germany)を用いて3回測定した。皮膚粘弾性はそれぞれの被験者の目尻付近において、Cutometer® DUAL CT580 + MPA 580 (Courage and Khazaka, Cologne, Germany)を用いて1回測定した。測定には直径2mmのプロブを用い、陰圧200 mbarにて5秒吸引後、陰圧を解放して2秒の条件にて行った。計測から得られる波形から各種力学特性を表すパラメーターが算出されるが、そのうち U_a/U_f (皮膚の復元率 = 吸引時の皮膚の最大進展長に対する吸引開放時の最終の皮膚の戻り率)、 U_r/U_e (弾性の回復率 = 吸引時の瞬時の皮膚の進展長に対する吸引解放時の瞬時の皮膚の戻り率)、 U_v/U_e (粘性と弾性の比率 = 吸引時の瞬時の皮膚の進展長に対する変位の遅れ(遅延的変位量)の割合)および U_r/U_f (全変形に対する弾性回復の比率 = 吸引時の皮膚の最大進展長に対する吸引解放時の瞬時の皮膚の戻り率)の4種類を使用した(Figure 26)。目尻部位のシワ改善効果は、連用0、4および8週において、皮膚科専門医による目視でのスコア付けと、画像解析による方法で実施した。目視での評価は、日本化粧品学会が定

める新規効能取得のための抗シワ製品評価ガイドラインに従い、7から0のグレードでシワの程度を評価した。それぞれのグレードは、グレード7= 著しく深いシワが認められる、グレード6= 明瞭な深いシワが認められる、グレード5= やや深いシワが認められる、グレード4= 明瞭な浅いシワの中に、やや深いシワが僅かに認められる、グレード3= 明瞭な浅いシワが認められる、グレード2= 明瞭な浅いシワが僅かに認められる、グレード1= 不明瞭な浅いシワが僅かに認められる、グレード0 = シワは無い状態を示し、1/4 刻みのスコア値 (0.25) も使用可とした。画像解析での評価は、Silflo® (Flexico Developments, Potters Bar, UK)を用いて採取した目尻シワ部位の3次元皮膚レプリカを、3次元イメージアナライザーPrimos system (GFMesstechnik GmbH, Teltow, Germany)にて解析した。それぞれの被験者には、洗顔後、皮膚計測とシワのスコア付けの前に、温度 20-23°C、湿度 40-60%の室内で少なくとも15分間馴化して頂いた。本試験は、花王株式会社のヒト試験研究倫理委員会と、日本美容皮膚研究会の認定臨床研究審査委員会にて承認されており、試験前に全ての被験者からインフォームドコンセントを取得した。

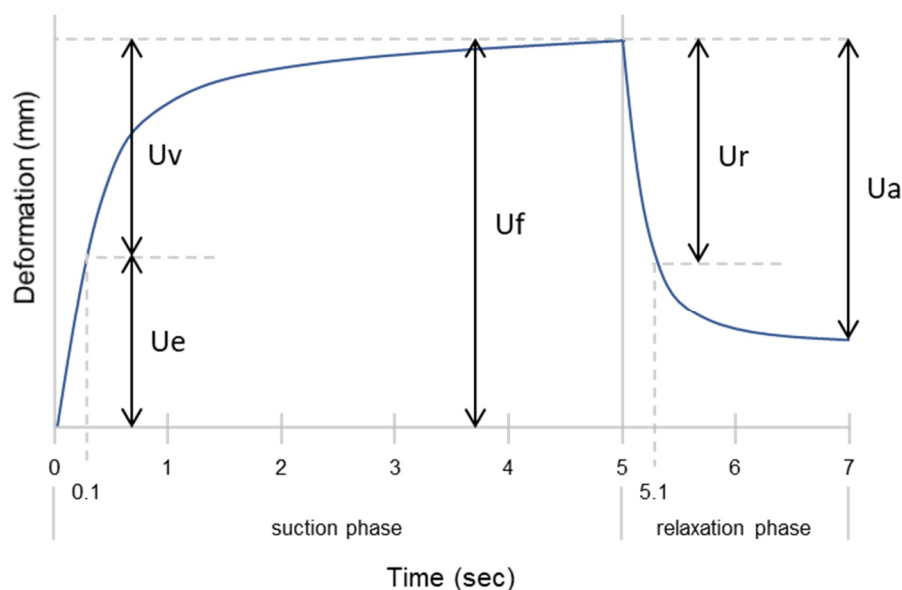


Figure 26. Skin deformation profile and parameters provided by Corneometer®. The two-mm-diameter probe was used at a reduced pressure of 200 mbar with 5 sec of suction followed by 2 sec of release. Skin deformation is expressed as mm. The parameters used were: delayed distention (U_v), immediate distention (U_e), final deformation (U_f), immediate retraction (U_r), and final retraction (U_a).

4-2-7 統計解析

EXSUS Ver. 8.0.0 (CAC EXICARE Corporation, Tokyo, Japan) もしくは Microsoft Excel software (Office 365)を用いて、Wilcoxon signed-rank test, ANOVA, Dunnett test および paired Student's *t*-test を実施した。なお、*p* 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意な差があると判

断した。

4-3 結果

4-3-1 β -NAG2 配合製剤の外的塗布による HA 産生促進効果の確認

第 2 章において、ヒト皮膚組織器官培養系および 3 次元培養ヒト皮膚モデルの培地に β -NAG2 を添加した場合、表皮 HA 産生が増加することを示した (Figure 10A および 11)。そこで、*in vivo* での連用塗布を想定し、 β -NAG2 配合製剤を角層上から外的塗布した場合、HA 産生量が増加するか検討した。まず、器官培養ヒト皮膚に対し、0%、1%もしくは 2% (wt/wt) の β -NAG2 配合製剤を 1 日 1 回、4 日間塗布した結果、2%の β -NAG2 配合製剤塗布において、0% β -NAG2 配合製剤塗布と比較して表皮 HA が有意に増加することを確認した (Figure 27A)。この時、H&E 染色により組織に目立ったダメージは観察されなかった (Figure 27B)。続いて 3 次元培養ヒト表皮モデル角層上に、0%、0.5%、1%、2%、3.5%の β -NAG2 配合製剤を 1 日おきに 4 日間塗布した結果、 β -NAG2 濃度依存的に表皮 HA 量の増加が認められ、3.5%では 0%に対して HA 産生量が 1.9 倍に増加した (Figure 28)。以上の結果から、角層上から β -NAG2 配合製剤を適用した場合においても、製剤中の β -NAG2 が表皮細胞に到達し、表皮 HA 産生を高めると考えられた。

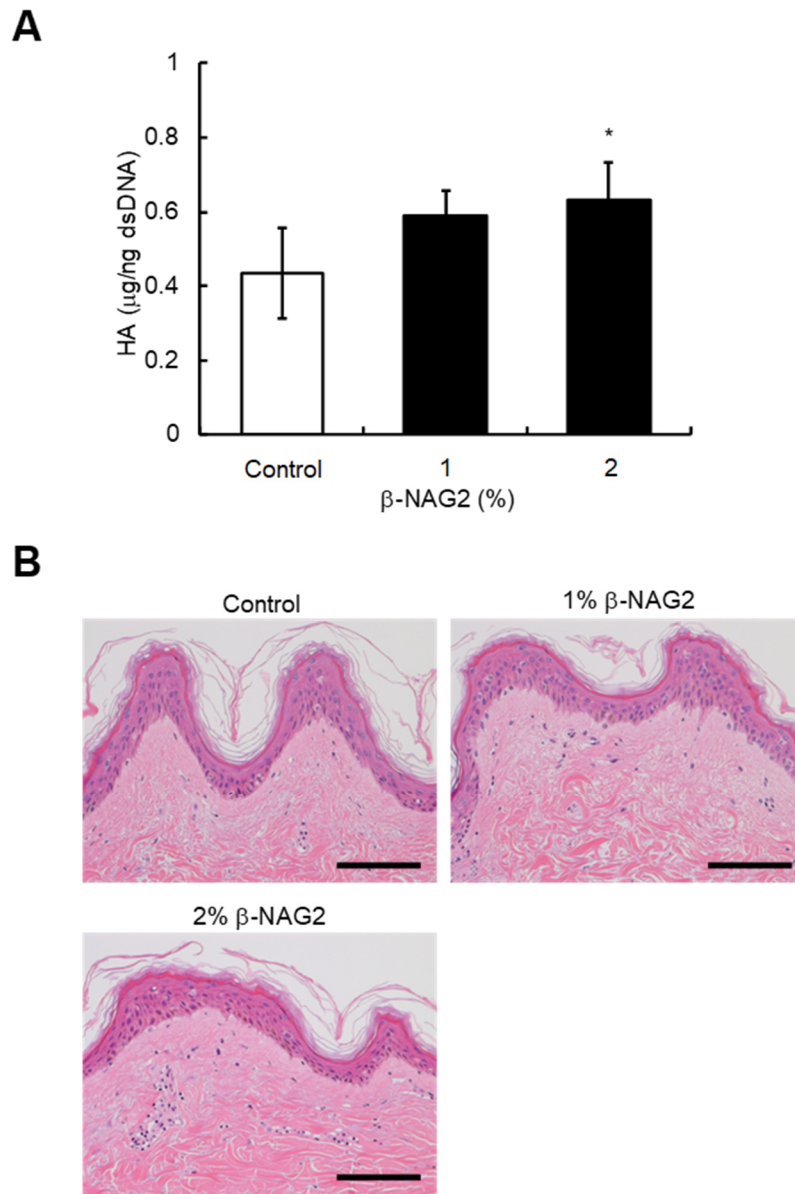


Figure 27. Effect of topically applied β -NAG2 on epidermal HA production in organ cultured human skin. (A) HA production in skin tissues topically treated with β -NAG2. The skin explants were topically treated with formulations containing β -NAG2 (0, 1, or 2%) for 4 days. ELISA and dye-binding assay quantified HA and dsDNA in the epidermal layer, respectively. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 5$) and shown as $\mu\text{g}/\text{ng}$ dsDNA. Dunnett's test was used for statistical analysis. *, $p < 0.05$. (B) Representative images of H&E staining. The formulations containing β -NAG2 (0, 1, or 2%) were topically applied to the skin explants for 4 days. The samples were fixed, embedded in paraffin, and sectioned. The sections were stained for morphology (H&E). Scale bars = 100 μm .

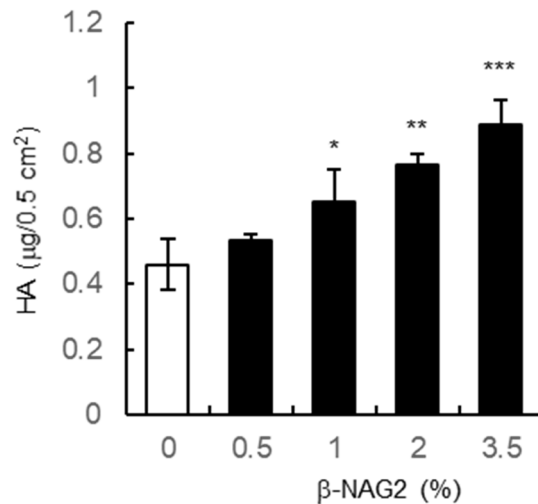


Figure 28. Effect of topically applied β-NAG2 on HA production in the reconstructed human epidermal model. HA production in epidermal models topically treated with β-NAG2. The epidermal models were topically treated with formulations containing β-NAG2 (0, 0.5, 1, 2, or 3.5%) for 4 days. HA in the epidermal models was quantified by ELISA-like assay. Values are expressed as mean ± SD (n = 3) and shown as μg/0.5 cm². Dunnett's test was used for statistical analysis. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

4-3-2 β-NAG2 配合製剤による目尻シワの改善

健常日本人女性 33 名を対象に β-NAG2 配合製剤の連用塗布を実施し、目尻シワに対する β-NAG2 の有効性を調べた。4-3-1 では、β-NAG2 濃度 3.5% を最大として、濃度依存的な HA 量の増加が認められたことから (Figure 28)、本試験では製剤の処方上配合可能な最大濃度である 3.5% にて実施した。製剤の塗布方法として、顔の片側に 3.5% β-NAG2 を含む製剤、反対の片側に β-NAG2 のみを除いたプラセボ製剤を、朝・夜の一日 2 回、8 週間塗布することとした。その結果、連用 4 週間および 8 週間において、皮膚科専門医による目視シワスコアが β-NAG2 配合製剤塗布側で有意に低下した (Figure 29A)。また、連用開始前からの両製剤によるシワスコアの差異を比較すると、連用 4 週間および 8 週間において、β-NAG2 配合製剤塗布側の方が有意に大きかった (Figure 29B)。Figure 29C には 3 次元皮膚レプリカイメージングにてシワ改善の著効例を示した。これらの結果より、β-NAG2 には優れた目尻シワ改善効果があることが示された。

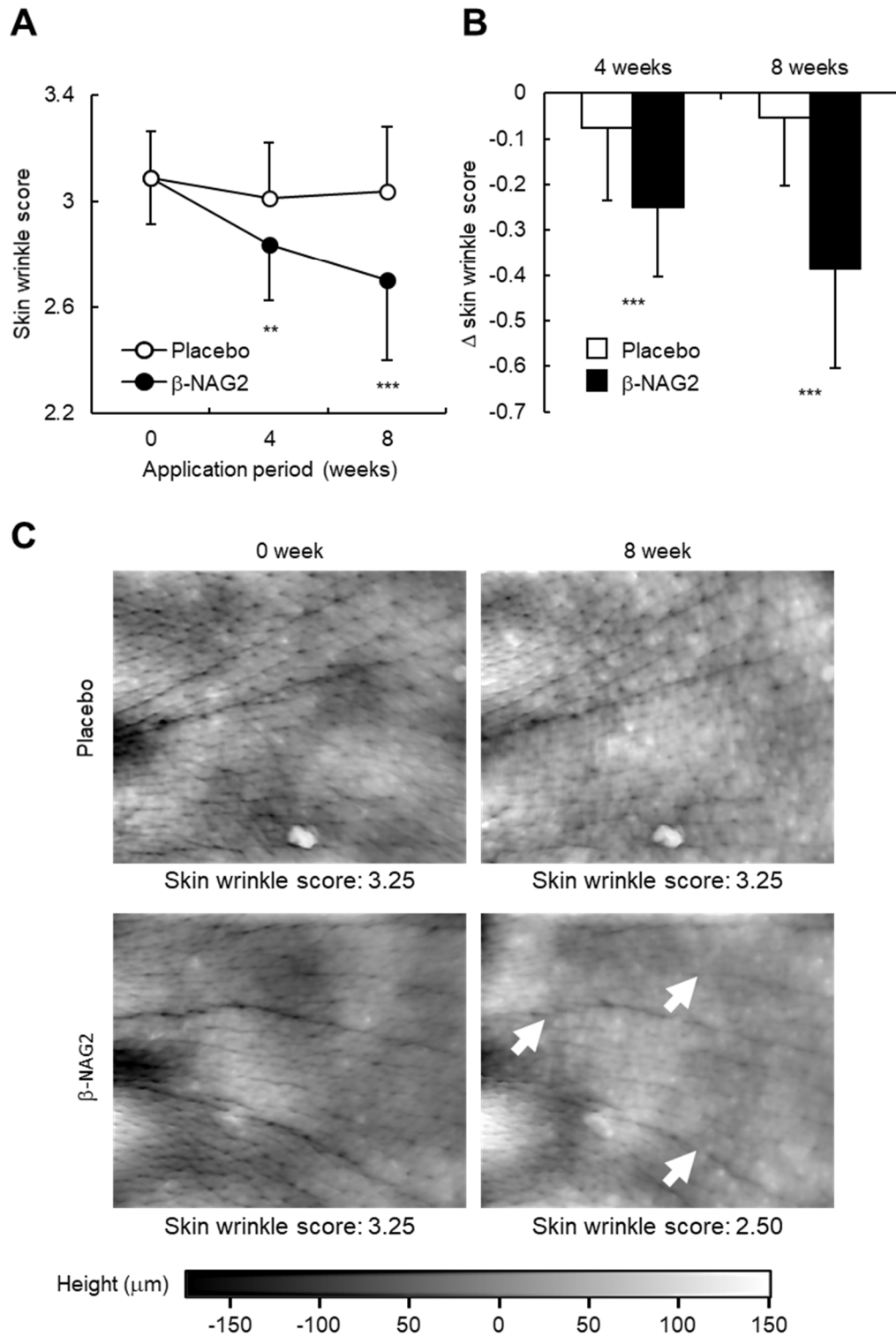


Figure 29. Changes in skin wrinkle score at the eye corner of the healthy Japanese females after the placebo treatment or the formulation containing 3.5% β -NAG2 for 8 weeks. (A and B) A

dermatologist conducted the visual evaluation via a double-masked method. The time course of changes in skin wrinkle score (A) and extent of changes in skin wrinkle score at 4 and 8 weeks compared to 0 weeks (B) are shown. Values are expressed as mean \pm SD (n = 33). The Wilcoxon signed-rank test was used for statistical analysis when compared with placebo. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (C) Representative 3-D replica images of the outer corner of the eye before (0 weeks) and after 8-week treatment with the placebo or the formulation containing 3.5% β -NAG2. The Primos system obtained a 3-D replica image. Significant improvements in skin wrinkles (arrows) were observed.

4-3-3 β -NAG2 配合製剤による角層水分量および皮膚粘弾性の改善

これまでに、角層水分量と皮膚粘弾性は、皮膚の粗さと負に相関することが報告されている[85, 86]。そこで、シワ計測を実施した近傍部位について角層水分量と皮膚粘弾性を評価し、 β -NAG2 による目尻シワ改善との関係性を調べた。角層水分量の測定には、皮膚表面から約 15 μ m の深さまでのキャパシタンスを測定する corneometer[®]を用いた。その結果、連用 4 週後および 8 週後において、プラセボ製剤と比較して β -NAG2 配合製剤により角層水分量が有意に上昇した (Figure 30A)。プラセボ製剤と β -NAG2 配合製剤との角層水分量の変動量についても、4 週後および 8 週後において有意な差が見られた (Figure 30B)。皮膚粘弾性の測定には、陰圧によってプローブの開口部から皮膚を吸引/開放し、皮膚の変位量の推移を測定する Cutometer[®]を用いた。算出される力学特性を表すパラメーターとして、 U_a/U_f 、 U_r/U_e 、 U_v/U_e および U_r/U_f を用いた (Figure 26)。皮膚は、瞬時に変形する性質 (弾性) と、ゆっくりと変形する性質 (粘性) の両方をあわせ持つ (粘弾性) が、これら 4 つのパラメーターのうち、皮膚の弾性特性を表す U_a/U_f 、 U_r/U_e および U_r/U_f は加齢により低下し、皮膚の粘性特性を表す U_v/U_e は加齢により上昇することが報告されている[87]。今回、 β -NAG2 配合製剤連用 4 週および 8 週後において、プラセボ製剤と比較して、 U_a/U_f 、 U_r/U_e および U_r/U_f が有意に増加し、逆に U_v/U_e が有意に減少した (Figure 31A、31C、31E および 31G)。これらは全て、加齢に伴う変動と逆の方向への変化であった。また、連用 4 週および 8 週後のプラセボ製剤と β -NAG2 配合製剤との変化量を調べたところ、 U_a/U_f と U_r/U_f は 4 週および 8 週において、 U_v/U_e は 8 週において、有意な差が認められた (Figure 31B、31F および 31H)。これらの結果から、 β -NAG2 配合製剤は角層水分量および皮膚粘弾性を高め、これらの効果が目尻シワの改善に寄与していると考えられた。なお本試験では、発赤、かゆみ、かぶれなど、被験者からの申告や試験監督医師による試験参加中止などの有害事象は発生しておらず、 β -NAG2 は化粧品配合成分としても安全な性質を有していると考えられた。

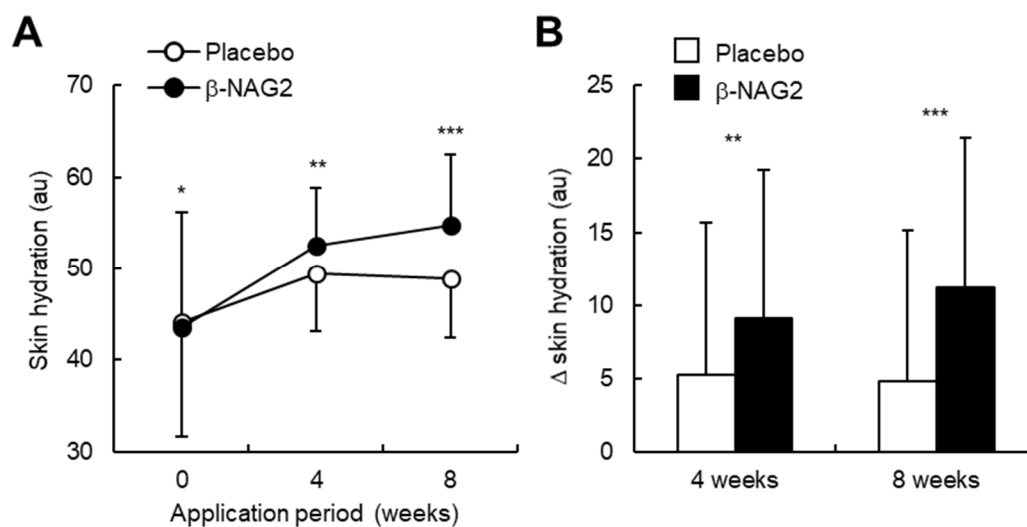


Figure 30. Changes in skin hydration at the eye corner of the healthy Japanese females after the placebo treatment or the formulation containing 3.5% β -NAG2 for 8 weeks. (A and B) The time course of changes in skin hydration (A) and extent of changes in skin hydration (B) at 4 and 8 weeks compared to 0 weeks are shown. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 33$). The paired Student's *t*-test was used for statistical analysis compared with placebo. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

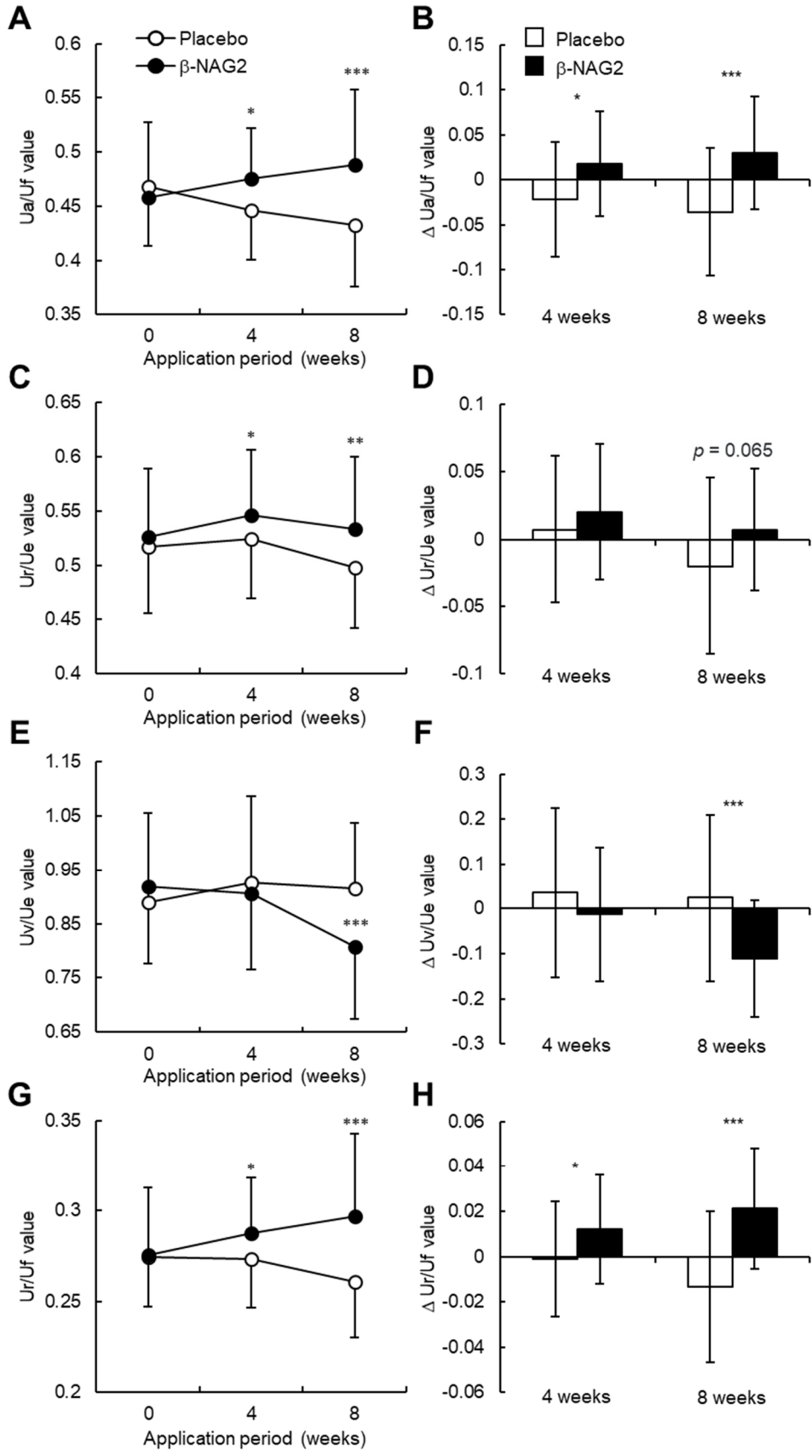


Figure 31. Changes in skin elasticity parameters (Ua/Uf, Ur/Ue, Uv/Ue, and Ur/Uf) at the eye corner of the healthy Japanese females after the placebo treatment or the formulation containing 3.5% β -NAG2 for 8 weeks. (A – H) The time course of changes in Ua/Uf (A), Ur/Ue (C), Uv/Ue (E), and Ur/Uf (G), and the extent of changes in Ua/Uf (B), Ur/Ue (D), Uv/Ue (F), and Ur/Uf (H) at 4 and 8 weeks compared to 0 weeks are shown. Values are expressed as mean \pm SD (n = 33). The paired Student's *t*-test was used for statistical analysis compared with placebo. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

4-4 考察

本章では、ヒト皮膚器官培養系および 3 次元培養ヒト表皮モデルにおいて、角層上からの β -NAG2 適用が表皮 HA 産生に効果を発揮することを示した。さらに、 β -NAG2 配合製剤を顔面へ塗布することにより、角層水分量と皮膚粘弾性の改善、さらにはシワの減少に有効であることを示した。

HA は優れた水分保持能により皮膚の保湿と粘弾性において重要な分子であることが知られている[88]。従って、加齢による表皮 HA の減少は、光老化あるいは生理的に老化した皮膚で認められる水分や粘弾性の低下と関連が深いと考えられる[26, 27]。本章では、 β -NAG2 配合製剤の連用により、角層水分量と皮膚粘弾性のパラメーター (Ua/Uf、Ur/Ue、Uv/Ue および Ur/Uf) が顕著に改善したことを示したが、これまでの *in vitro* の実験結果も考え合わせると、 β -NAG2 による表皮 HA の産生促進がこれらの変化に寄与したと考えられた。加えて、顔面への β -NAG2 配合製剤の塗布が、目尻シワを顕著に改善することも示した。過去の検討では、Ua/Uf、Uv/Ue、Ur/Uf および角層水分量は、皮膚の粗さと関連性があることが報されている[85, 86]。このことから、 β -NAG2 による表皮 HA の産生促進が角層水分量や皮膚の弾力性を改善し、その結果シワの減少につながった可能性が推測された。一方、Yoshida らはシワ形成には真皮乳頭層の HA の減少も関連することを報告している[77, 78]。 β -NAG2 が HA 産生促進効果を発揮するには NAG への変換が必須であり、その変換に関わる β -NAGase は様々な組織での発現が報告されているが[33]、真皮線維芽細胞における発現については報告がない。もし β -NAGase が真皮線維芽細胞でも発現している場合、 β -NAG2 は真皮線維芽細胞の HA 産生促進も含めてシワを改善した可能性も考えられ、今後更なる検証も必要である。

以上より、選択的な表皮 HA の産生促進効果を有する β -NAG2 に優れたシワ改善効果が示されたことから、表皮 HA は抗老化の重要な標的分子となり得ると考えられた。

総論

本論文では、表皮 HA 産生を選択的に制御する方法を開発し、表皮 HA が表皮の増殖・分化に対して促進的に働くことを示した。また、表皮 HA 産生促進をターゲットとしたアプローチが皮膚の抗老化において有望な手段であり、表皮 HA は皮膚の抗老化における重要な標的分子となり得ることを示した。

第 1 章では、NAG の誘導体である β -NAG2 を新たに開発し、その選択的な HA 産生促進メカニズムを詳細に調べた。 β -NAG2 は細胞内において NAG に変換され、最終的に HA の基質の 1 つである UDP-NAG を増加させることにより HA 産生を選択的に促進することを示した。また β -NAG2 の代謝経路においては、 β -NAGase による NAG への変換が必須であり、表皮細胞にはこの反応を担う内在性の β -NAGase 活性が存在することを示した。このことより、 β -NAG2 が選択的な表皮 HA 産生促進剤であることが示された。

第 2 章では、3 次元培養ヒト皮膚モデルを用い、 β -NAG2 による選択的な表皮 HA 産生促進が表皮の増殖・分化に及ぼす影響を調べた。まず、 β -NAG2 による表皮 HA 産生促進に必須の過程である β -NAG2 から NAG への変換を阻害することにより、表皮 HA 産生促進効果のキャンセルと共に、増殖・分化および表皮重層化の促進効果も阻害されることが示され、 β -NAG2 による表皮機能への影響が表皮 HA 産生促進を介したものであることが示された。さらに、 β -NAG2 によって増加した HA は、コントロールにおける HA 分子量分布と大きな違いは認められなかった。以上の結果から、表皮の増殖・分化には HA の量に関連しており、表皮 HA 量の増加は表皮の増殖・分化に促進的に作用すると考えられた。

さらに第 3 章では、表皮 HA 産生を特異的に抑制させた時に表皮細胞の増殖・分化に及ぼす影響について検討した。3 次元培養ヒト表皮モデルを用い、表皮 HA 産生を担う *HAS3* 遺伝子発現を siRNA にて特異的にノックダウンした結果、表皮 HA 産生の低下に伴い、表皮の増殖・分化いずれも低下し、表皮の菲薄化が引き起こされた。これらの結果は、第 2 章で導き出された結論、すなわち表皮 HA 量は表皮細胞の増殖・分化に促進的に作用し、表皮厚の増加をもたらした結果を裏付けるものであった。

第 4 章においては、表皮 HA が皮膚の抗老化において有望なターゲットとなり得るか調べた。はじめに、器官培養ヒト皮膚および 3 次元培養ヒト表皮モデルにおいて、角層上からの β -NAG2 配合製剤の適用が表皮 HA 産生促進効果を発揮することを示した。さらに、 β -NAG2 配合製剤を顔面へ塗布することにより、角層水分量と皮膚粘弾性の増加、さらには目尻のシワの改善に有効であることを示した。角層水分量および皮膚粘弾性はいずれも皮膚の粗さに関連することから、 β -NAG2 配合製剤による表皮 HA 産生促進が角層水分量および皮膚粘弾性を高め、これらが目尻シワの改善に寄与していると考えられた。以上より、選択的な表皮 HA の産生促進効果を有する β -NAG2 は、シワ改善をはじめとする皮膚の抗老化効果を有しており、表皮 HA は皮膚の抗老化における重要な標的分子となり得ると考えら

れた。

序論でも述べた通り、 β -NAG2 は製剤中での安定性も高いため、化粧品素材としての利用が期待される。また NAG 誘導体を NAG に変換する β -NAGase は生体内に広く存在しているため、表皮以外の組織における HA 産生をも制御することが可能と考えられる。その際、修飾する官能基の疎水性を工夫し、NAG 誘導体の細胞膜への親和性を高めることで、より高い HA 産生促進効果も期待される。今後、その様な NAG 誘導体の化粧品以外への製剤への応用も期待される。

参考文献

- [1] T.C. Laurent, J.R. Fraser, Hyaluronan, *FASEB J.* 6(7) (1992) 2397-2404.
- [2] K. Hasegawa, M. Yoneda, H. Kuwabara, O. Miyaishi, N. Itano, A. Ohno, M. Zako, Z. Isogai, Versican, a major hyaluronan-binding component in the dermis, loses its hyaluronan-Binding ability in solar elastosis, *J. Invest. Dermatol.* 127(7) (2007) 1657-1663. <http://doi.org/10.1038/sj.jid.5700754>
- [3] R. Tammi, J.A. Ripellino, R.U. Margolis, M. Tammi, Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe, *J. Invest. Dermatol.* 90(3) (1988) 412-414. <http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12456530>
- [4] M. Yoshida, N. Itano, Y. Yamada, K. Kimata, In vitro synthesis of hyaluronan by a single protein derived from mouse HAS1 gene and characterization of amino acid residues essential for the activity, *J. Biol. Chem.* 275(1) (2000) 497-506. <http://doi.org/10.1074/jbc.275.1.497>
- [5] N. Itano, K. Kimata, Molecular cloning of human hyaluronan synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222(3) (1996) 816-820. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0827>
- [6] A.M. Shyjan, P. Heldin, E.C. Butcher, T. Yoshino, M.J. Briskin, Functional cloning of the cDNA for a human hyaluronan synthase, *J. Biol. Chem.* 271(38) (1996) 23395-23399. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23395>
- [7] K. Watanabe, Y. Yamaguchi, Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase, *J. Biol. Chem.* 271(38) (1996) 22945-22948. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.38.22945>
- [8] P.H. Weigel, V.C. Hascall, M. Tammi, Hyaluronan synthases, *J. Biol. Chem.* 272(22) (1997) 13997-14000. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.22.13997>
- [9] K. Rilla, H. Siiskonen, A.P. Spicer, J.M. Hyttinen, M.I. Tammi, R.H. Tammi, Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity, *J. Biol. Chem.* 280(36) (2005) 31890-31897. <http://doi.org/10.1074/jbc.M504736200>
- [10] T. Sayo, Y. Sugiyama, Y. Takahashi, N. Ozawa, S. Sakai, O. Ishikawa, M. Tamura, S. Inoue, Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 118(1) (2002) 43-48. <http://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01613.x>
- [11] T. Sayo, Y. Sugiyama, S. Inoue, Lutein, a nonprovitamin A, activates the retinoic acid receptor to induce HAS3-dependent hyaluronan synthesis in keratinocytes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77(6) (2013) 1282-1286. <http://doi.org/10.1271/bbb.130124>
- [12] I. Kakizaki, N. Itano, K. Kimata, K. Hanada, A. Kon, M. Yamaguchi, T. Takahashi, K. Takagaki, Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation, *Arch. Biochem. Biophys.* 471(1) (2008) 85-93. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2007.12.004>
- [13] T. Sayo, S. Sakai, S. Inoue, Synergistic effect of N-acetylglucosamine and retinoids on hyaluronan production in human keratinocytes, *Skin Pharmacol. Physiol.* 17(2) (2004) 77-83. <http://doi.org/10.1159/000076017>
- [14] T. Matsui, M. Amagai, Dissecting the formation, structure, and barrier function of the stratum corneum,

- Int. Immunol. 27(6) (2015) 269-280. <http://doi.org/10.1093/intimm/dxv013>
- [15] Y. Endo, H. Yoshida, Y. Ota, Y. Akazawa, T. Sayo, U. Hanai, K. Imagawa, M. Sasaki, Y. Takahashi, Accelerated human epidermal turnover driven by increased hyaluronan production, *J. Dermatol. Sci.* 101(2) (2021) 123-133. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.12.002>
- [16] S. Pasonen-Seppanen, S. Karvinen, K. Torronen, J.M. Hyttinen, T. Jokela, M.J. Lammi, M.I. Tammi, R. Tammi, EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation, *J. Invest. Dermatol.* 120(6) (2003) 1038-1044. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12249.x>
- [17] L.Y. Bourguignon, M. Ramez, E. Gilad, P.A. Singleton, M.Q. Man, D.A. Crumrine, P.M. Elias, K.R. Feingold, Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis, *J. Invest. Dermatol.* 126(6) (2006) 1356-1365. <http://doi.org/10.1038/sj.jid.5700260>
- [18] L.Y. Bourguignon, G. Wong, W. Xia, M.Q. Man, W.M. Holleran, P.M. Elias, Selective matrix (hyaluronan) interaction with CD44 and RhoGTPase signaling promotes keratinocyte functions and overcomes age-related epidermal dysfunction, *J. Dermatol. Sci.* 72(1) (2013) 32-44. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.05.003>
- [19] R. Tammi, J.A. Ripellino, R.U. Margolis, H.I. Maibach, M. Tammi, Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ culture, *J. Invest. Dermatol.* 92(3) (1989) 326-332. <http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12277125>
- [20] S.M. Pasonen-Seppanen, E.V. Maytin, K.J. Torronen, J.M. Hyttinen, V.C. Hascall, D.K. MacCallum, A.H. Kultti, T.A. Jokela, M.I. Tammi, R.H. Tammi, All-trans retinoic acid-induced hyaluronan production and hyperplasia are partly mediated by EGFR signaling in epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 128(4) (2008) 797-807. <http://doi.org/10.1038/sj.jid.5701098>
- [21] S. Karvinen, S. Pasonen-Seppänen, J.M. Hyttinen, J.P. Pienimäki, K. Törrönen, T.A. Jokela, M.I. Tammi, R. Tammi, Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3, *J. Biol. Chem.* 278(49) (2003) 49495-49504. <http://doi.org/10.1074/jbc.M310445200>
- [22] K. Rilla, S. Pasonen-Seppanen, J. Rieppo, M. Tammi, R. Tammi, The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor, *J. Invest. Dermatol.* 123(4) (2004) 708-714. <http://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23409.x>
- [23] J. Malaise, V. Pendaries, F. Hontoir, V. De Glas, D. Van Vlaender, M. Simon, C. Lambert de Rouvroit, Y. Poumay, B. Flamion, Hyaluronan Does Not Regulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Differentiation, *J. Biol. Chem.* 291(12) (2016) 6347-6358. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.661348>

- [24] L.Y. Bourguignon, Matrix hyaluronan-activated CD44 signaling promotes keratinocyte activities and improves abnormal epidermal functions, *Am. J. Pathol.* 184(7) (2014) 1912-1919. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.03.010>
- [25] J. Monslow, P. Govindaraju, E. Pure, Hyaluronan - a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment, *Front. Immunol.* 6 (2015) 1-19. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00231>
- [26] J.H. Oh, Y.K. Kim, J.Y. Jung, J.E. Shin, K.H. Kim, K.H. Cho, H.C. Eun, J.H. Chung, Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin, *J. Dermatol. Sci.* 62(3) (2011) 192-201. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.02.007>
- [27] J.H. Oh, Y.K. Kim, J.Y. Jung, J.E. Shin, J.H. Chung, Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin in vivo, *Exp. Dermatol.* 20(5) (2011) 454-456. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01258.x>
- [28] A. Gilhar, Y. Ullmann, R. Karry, R. Shalaginov, B. Assy, S. Serafimovich, R.S. Kalish, Ageing of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and telomerase, *Br. J. Dermatol.* 150(1) (2004) 56-63. <http://doi.org/>
- [29] T. Tsugita, T. Nishijima, T. Kitahara, Y. Takema, Positional differences and aging changes in Japanese woman epidermal thickness and corneous thickness determined by OCT (optical coherence tomography), *Skin Res. Technol.* 19(3) (2013) 242-250. <http://doi.org/10.1111/srt.12021>
- [30] S. Tucker-Samaras, T. Zedayko, C. Cole, D. Miller, W. Wallo, J.J. Leyden, A stabilized 0.1% retinol facial moisturizer improves the appearance of photodamaged skin in an eight-week, double-blind, vehicle-controlled study, *J Drugs Dermatol.* 8(10) (2009) 932-936.
- [31] W.H. Li, H.K. Wong, J. Serrano, M. Randhawa, S. Kaur, M.D. Southall, R. Parsa, Topical stabilized retinol treatment induces the expression of HAS genes and HA production in human skin in vitro and in vivo, *Arch. Dermatol. Res.* 309(4) (2017) 275-283. <http://doi.org/10.1007/s00403-017-1723-6>
- [32] M. Horsch, L. Hoesch, A. Vasella, D.M. Rast, N-acetylglucosaminono-1,5-lactone oxime and the corresponding (phenylcarbamoyl)oxime. Novel and potent inhibitors of beta-N-acetylglucosaminidase, *Eur. J. Biochem.* 197(3) (1991) 815-818. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15976.x>
- [33] T. Suzuki, K. Yano, S. Sugimoto, K. Kitajima, W.J. Lennarz, S. Inoue, Y. Inoue, Y. Emori, Endo-beta-N-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in processing of free oligosaccharides in the cytosol, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(15) (2002) 9691-9696. <http://doi.org/10.1073/pnas.152333599>
- [34] Y. Bi, M. Might, H. Vankayalapati, B. Kuberan, Repurposing of Proton Pump Inhibitors as first identified small molecule inhibitors of endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) for the treatment of NGLY1 deficiency, a rare genetic disease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27(13) (2017) 2962-2966. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.010>
- [35] K. von Figura, A. Hasilik, F. Steckel, J. van de Kamp, Biosynthesis and maturation of alpha-N-

- acetylglucosaminidase in normal and Sanfilippo B-fibroblasts, *Am. J. Hum. Genet.* 36(1) (1984) 93-100.
- [36] S. Oikari, T. Venäläinen, M. Tammi, Borate-aided anion exchange high-performance liquid chromatography of uridine diphosphate-sugars in brain, heart, adipose and liver tissues, *J. Chromatogr. A.* 1323 (2014) 82-86. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.004>
- [37] C. Sweeney, D. Mackintosh, R.M. Mason, UDP-sugar metabolism in Swarm rat chondrosarcoma chondrocytes, *Biochem. J.* 290 (Pt 2)(Pt 2) (1993) 563-570. <http://doi.org/10.1042/bj2900563>
- [38] K. Rilla, S. Oikari, T.A. Jokela, J.M. Hyttinen, R. Karna, R.H. Tammi, M.I. Tammi, Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3, *J. Biol. Chem.* 288(8) (2013) 5973-5983. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.443879>
- [39] N. Itano, T. Sawai, M. Yoshida, P. Lenas, Y. Yamada, M. Imagawa, T. Shinomura, M. Hamaguchi, Y. Yoshida, Y. Ohnuki, S. Miyauchi, A.P. Spicer, J.A. McDonald, K. Kimata, Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties, *J. Biol. Chem.* 274(35) (1999) 25085-25092. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.35.25085>
- [40] T.A. Jokela, M. Jauhiainen, S. Auriola, M. Kauhanen, R. Tiihonen, M.I. Tammi, R.H. Tammi, Mannose inhibits hyaluronan synthesis by down-regulation of the cellular pool of UDP-N-acetylhexosamines, *J. Biol. Chem.* 283(12) (2008) 7666-7673. <http://doi.org/10.1074/jbc.M706001200>
- [41] S. Oikari, K. Makkonen, A.J. Deen, I. Tyni, R. Karna, R.H. Tammi, M.I. Tammi, Hexosamine biosynthesis in keratinocytes: roles of GFAT and GNPDA enzymes in the maintenance of UDP-GlcNAc content and hyaluronan synthesis, *Glycobiology.* 26(7) (2016) 710-722. <http://doi.org/10.1093/glycob/cww019>
- [42] D. Vigetti, S. Deleonibus, P. Moretto, E. Karousou, M. Viola, B. Bartolini, V.C. Hascall, M. Tammi, G. De Luca, A. Passi, Role of UDP-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of hyaluronan synthase 2 in the control of chondroitin sulfate and hyaluronan synthesis, *J. Biol. Chem.* 287(42) (2012) 35544-35555. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.402347>
- [43] A.J. Deen, U.T. Arasu, S. Pasonen-Seppanen, A. Hassinen, P. Takabe, S. Wojciechowski, R. Karna, K. Rilla, S. Kellokumpu, R. Tammi, M. Tammi, S. Oikari, UDP-sugar substrates of HAS3 regulate its O-GlcNAcylation, intracellular traffic, extracellular shedding and correlate with melanoma progression, *Cell. Mol. Life Sci.* 73(16) (2016) 3183-3204. <http://doi.org/10.1007/s00018-016-2158-5>
- [44] A. Trost, J.W. Bauer, C. Lanschutzer, M. Laimer, M. Emberger, H. Hintner, K. Onder, Rapid, high-quality and epidermal-specific isolation of RNA from human skin, *Exp. Dermatol.* 16(3) (2007) 185-190. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00534.x>
- [45] A. Clemmensen, M. Thomassen, O. Clemmensen, Q. Tan, T.A. Kruse, T.K. Petersen, F. Andersen, K.E. Andersen, Extraction of high-quality epidermal RNA after ammonium thiocyanate-induced dermo-epidermal separation of 4 mm human skin biopsies, *Exp. Dermatol.* 18(11) (2009) 979-984. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00921.x>

- [46] L. Yang, Y. Shirakata, K. Tamai, X. Dai, Y. Hanakawa, S. Tokumaru, Y. Yahata, M. Tohyama, K. Shiraishi, H. Nagai, X. Wang, S. Murakami, K. Sayama, Y. Kaneda, K. Hashimoto, Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents, *J. Dermatol. Sci.* 40(2) (2005) 105-114. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2005.07.001>
- [47] M. Tobiishi, T. Sayo, H. Yoshida, A. Kusaka, K. Kawabata, Y. Sugiyama, O. Ishikawa, S. Inoue, Changes in epidermal hyaluronan metabolism following UVB irradiation, *J. Dermatol. Sci.* 64(1) (2011) 31-38. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.06.006>
- [48] Y. Sasaki, M. Uzuki, K. Nohmi, H. Kitagawa, A. Kamataki, M. Komagamine, K. Murakami, T. Sawai, Quantitative measurement of serum hyaluronic acid molecular weight in rheumatoid arthritis patients and the role of hyaluronidase, *Int. J. Rheum. Dis.* 14(4) (2011) 313-319. <http://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2011.01683.x>
- [49] W. Lin, S. Shuster, H.I. Maibach, R. Stern, Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques, *J. Histochem. Cytochem.* 45(8) (1997) 1157-1163. <http://doi.org/10.1177/002215549704500813>
- [50] C. Wang, M. Tammi, R. Tammi, Distribution of hyaluronan and its CD44 receptor in the epithelia of human skin appendages, *Histochemistry.* 98(2) (1992) 105-112. <http://doi.org/10.1007/bf00717001>
- [51] T. Matsui, M. Amagai, Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum, *Int. Immunol.* 27(6) (2015) 269-280. <http://doi.org/10.1093/intimm/dxv013>
- [52] G. Kaya, C. Tran, O. Sorg, R. Hotz, D. Grand, P. Carraux, L. Didierjean, I. Stamenkovic, J.H. Saurat, Hyaluronate fragments reverse skin atrophy by a CD44-dependent mechanism, *PLoS Med.* 3(12) (2006) e493. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030493>
- [53] U.M. Agren, M. Tammi, R. Tammi, Hydrocortisone regulation of hyaluronan metabolism in human skin organ culture, *J. Cell. Physiol.* 164(2) (1995) 240-248. <http://doi.org/10.1002/jcp.1041640204>
- [54] R. Tammi, M. Tammi, Correlations between hyaluronan and epidermal proliferation as studied by [³H]glucosamine and [³H]thymidine incorporations and staining of hyaluronan on mitotic keratinocytes, *Exp. Cell Res.* 195(2) (1991) 524-527. [http://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90405-j](http://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90405-j)
- [55] R. Tammi, S. Pasonen-Seppanen, E. Kolehmainen, M. Tammi, Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury, *J. Invest. Dermatol.* 124(5) (2005) 898-905. <http://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23697.x>
- [56] V.C. Hascall, A. Wang, M. Tammi, S. Oikari, R. Tammi, A. Passi, D. Vigetti, R.W. Hanson, G.W. Hart, The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc, *Matrix Biol.* 35 (2014) 14-17. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.01.014>
- [57] D.H. Lee, J.H. Oh, J.H. Chung, Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging, *J. Dermatol. Sci.* 83(3) (2016) 174-181. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.05.016>
- [58] D.R. Zimmermann, M.T. Dours-Zimmermann, M. Schubert, L. Bruckner-Tuderman, Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the

- dermis, *The Journal of Cell Biology*. 124 (1994) 817 - 825. <http://doi.org/10.1083/jcb.124.5.817>
- [59] H. Qiu, F. Liu, T. Tao, D. Zhang, X. Liu, G. Zhu, Z. Xu, R. Ni, A. Shen, Modification of p27 with O-linked N-acetylglucosamine regulates cell proliferation in hepatocellular carcinoma, *Mol. Carcinog.* 56(1) (2017) 258-271. <http://doi.org/10.1002/mc.22490>
- [60] J. Andrés-Bergós, L. Tardio, A. Larranaga-Vera, R. Gómez, G. Herrero-Beaumont, R. Largo, The increase in O-linked N-acetylglucosamine protein modification stimulates chondrogenic differentiation both in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.* 287(40) (2012) 33615-33628. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.354241>
- [61] K. Ishihara, I. Takahashi, Y. Tsuchiya, M. Hasegawa, K. Kamemura, Characteristic increase in nucleocytoplasmic protein glycosylation by O-GlcNAc in 3T3-L1 adipocyte differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398(3) (2010) 489-494. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.105>
- [62] M. Delehedde, M. Lyon, N. Sergeant, H. Rahmoune, D.G. Fernig, Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 6(3) (2001) 253-273. <http://doi.org/10.1023/a:1011367423085>
- [63] G. Perrot, C. Colin-Pierre, L. Ramont, I. Prault, C. Garbar, V. Bardey, C. Jeanmaire, S. Mine, L. Danoux, N. Berthélémy, F.X. Maquart, Y. Wegrowski, S. Brézillon, Decreased expression of GPC1 in human skin keratinocytes and epidermis during ageing, *Exp. Gerontol.* 126 (2019) 110693. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110693>
- [64] N. Ojeh, K. Hiilesvuo, A. Wärrri, M. Salmivirta, T. Henttinen, A. Määttä, Ectopic expression of syndecan-1 in basal epidermis affects keratinocyte proliferation and wound re-epithelialization, *J. Invest. Dermatol.* 128(1) (2008) 26-34. <http://doi.org/10.1038/sj.jid.5700967>
- [65] M. Ogawa, H. Mizofuchi, Y. Kobayashi, G. Tsuzuki, M. Yamamoto, S. Wada, K. Kamemura, Terminal differentiation program of skeletal myogenesis is negatively regulated by O-GlcNAc glycosylation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1820(1) (2012) 24-32. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.011>
- [66] J.A. Mack, R.J. Feldman, N. Itano, K. Kimata, M. Lauer, V.C. Hascall, E.V. Maytin, Enhanced inflammation and accelerated wound closure following tetraphorbol ester application or full-thickness wounding in mice lacking hyaluronan synthases Has1 and Has3, *J. Invest. Dermatol.* 132(1) (2012) 198-207. <http://doi.org/10.1038/jid.2011.248>
- [67] J. Malaisse, V. Bourguignon, E. De Vuyst, C. Lambert de Rouvroit, A.F. Nikkels, B. Flamion, Y. Poumay, Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3, *J. Invest. Dermatol.* 134(8) (2014) 2174-2182. <http://doi.org/10.1038/jid.2014.147>
- [68] M. Averbek, C.A. Gebhardt, S. Voigt, S. Beilharz, U. Anderegg, C.C. Termeer, J.P. Sleeman, J.C. Simon, Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation, *J. Invest. Dermatol.* 127(3) (2007) 687-697. <http://doi.org/10.1038/sj.jid.5700614>

- [69] L. Rauhala, T. Jokela, R. Kärnä, G. Bart, P. Takabe, S. Oikari, M.I. Tammi, S. Pasonen-Seppänen, R.H. Tammi, Extracellular ATP activates hyaluronan synthase 2 (HAS2) in epidermal keratinocytes via P2Y(2), Ca(2+) signaling, and MAPK pathways, *Biochem. J.* 475(10) (2018) 1755-1772. <http://doi.org/10.1042/bcj20180054>
- [70] M.A. Farage, K.W. Miller, P. Elsner, H.I. Maibach, Structural characteristics of the aging skin: a review, *Cutan. Ocul. Toxicol.* 26(4) (2007) 343-357. <http://doi.org/10.1080/15569520701622951>
- [71] D.J. Tobin, Introduction to skin aging, *J Tissue Viability.* 26(1) (2017) 37-46. <http://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.03.002>
- [72] C. Gebhardt, M. Averbeck, N. Diedenhofen, A. Willenberg, U. Anderegg, J.P. Sleeman, J.C. Simon, Dermal hyaluronan is rapidly reduced by topical treatment with glucocorticoids, *J. Invest. Dermatol.* 130(1) (2010) 141-149. <http://doi.org/10.1038/jid.2009.210>
- [73] L. Barnes, F. Ino, F. Jaunin, J.H. Saurat, G. Kaya, Inhibition of putative hyalurosomes platform in keratinocytes as a mechanism for corticosteroid-induced epidermal atrophy, *J. Invest. Dermatol.* 133(4) (2013) 1017-1026. <http://doi.org/10.1038/jid.2012.439>
- [74] L. Baumann, Skin ageing and its treatment, *J. Pathol.* 211(2) (2007) 241-251. <http://doi.org/10.1002/path.2098>
- [75] J. Uitto, The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure, *J Drugs Dermatol.* 7(2 Suppl) (2008) s12-16.
- [76] T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J.J. Voorhees, G.J. Fisher, Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 14(1) (2009) 20-24. <http://doi.org/10.1038/jidsymp.2009.8>
- [77] H. Yoshida, A. Komiya, R. Ohtsuki, A. Kusaka-Kikushima, S. Sakai, K. Kawabata, M. Kobayashi, S. Nakamura, A. Nagaoka, T. Sayo, Y. Okada, Y. Takahashi, Relationship of hyaluronan and HYBID (KIAA1199) expression with roughness parameters of photoaged skin in Caucasian women, *Skin Res. Technol.* 24(4) (2018) 562-569. <http://doi.org/10.1111/srt.12467>
- [78] H. Yoshida, A. Nagaoka, A. Komiya, M. Aoki, S. Nakamura, T. Morikawa, R. Ohtsuki, T. Sayo, Y. Okada, Y. Takahashi, Reduction of hyaluronan and increased expression of HYBID (alias CEMIP and KIAA1199) correlate with clinical symptoms in photoaged skin, *Br. J. Dermatol.* 179(1) (2018) 136-144. <http://doi.org/10.1111/bjd.16335>
- [79] R.M. Lavker, A.M. Kligman, Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells, *J. Invest. Dermatol.* 90(3) (1988) 325-330. <http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12456193>
- [80] S. Sakai, N. Nakagawa, M. Yamanari, A. Miyazawa, Y. Yasuno, M. Matsumoto, Relationship between dermal birefringence and the skin surface roughness of photoaged human skin, *J. Biomed. Opt.* 14(4) (2009) 044032. <http://doi.org/10.1117/1.3207142>
- [81] E.F. Bernstein, Y.Q. Chen, K. Tamai, K.J. Shepley, K.S. Resnik, H. Zhang, R. Tuan, A. Mauviel, J.

- Uitto, Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin, *J. Invest. Dermatol.* 103(2) (1994) 182-186. <http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12392693>
- [82] K. Saavalainen, S. Pasonen-Seppänen, T.W. Dunlop, R. Tammi, M.I. Tammi, C. Carlberg, The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary retinoic acid and epidermal growth factor responding gene, *J. Biol. Chem.* 280(15) (2005) 14636-14644. <http://doi.org/10.1074/jbc.M500206200>
- [83] H.S. Jeon, J.E. Seo, M.S. Kim, M.H. Kang, D.H. Oh, S.O. Jeon, J. Seong Hoon, Y.W. Choi, S. Lee, A retinyl palmitate-loaded solid lipid nanoparticle system: effect of surface modification with dicetyl phosphate on skin permeation in vitro and anti-wrinkle effect in vivo, *Int. J. Pharm.* 452(1-2) (2013) 311-320. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.023>
- [84] H. Kim, J. Koh, J. Baek, Y. Seo, B. Kim, J. Kim, J. Lee, H. Ryoo, H. Jung, Retinyl retinoate, a novel hybrid vitamin derivative, improves photoaged skin: a double-blind, randomized-controlled trial, *Skin Res. Technol.* 17(3) (2011) 380-385. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2011.00512.x>
- [85] J.W. Choi, S.H. Kwon, C.H. Huh, K.C. Park, S.W. Youn, The influences of skin visco-elasticity, hydration level and aging on the formation of wrinkles: a comprehensive and objective approach, *Skin Res. Technol.* 19(1) (2013) e349-355. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2012.00650.x>
- [86] T. Fujimura, K. Haketa, M. Hotta, T. Kitahara, Loss of skin elasticity precedes to rapid increase of wrinkle levels, *J. Dermatol. Sci.* 47(3) (2007) 233-239. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.05.002>
- [87] N. Krueger, S. Luebberding, M. Oltmer, M. Streker, M. Kersch, Age-related changes in skin mechanical properties: a quantitative evaluation of 120 female subjects, *Skin Res. Technol.* 17(2) (2011) 141-148. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2010.00486.x>
- [88] E. Papakonstantinou, M. Roth, G. Karakiulakis, Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging, *Dermatoendocrinol.* 4(3) (2012) 253-258. <http://doi.org/10.4161/derm.21923>

謝辞

本論文の作成にあたり、有益なご助言とご校閲を賜りました東京理科大学 薬学部 薬学科 花輪 剛久教授、ならびに廣瀬 香織嘱託助教に深甚なる謝意を表しますとともに、厚く御礼申し上げます。

数々の有意義なるご助言を賜り、本論文を審査して下さいました東京理科大学 薬学部 薬学科 西川 元也教授、東 達也教授、吉澤 一巳教授、東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科 山下 親正教授、東京理科大学 創域理工学部 先端化学科 四反田 功准教授に深く感謝の意を表します。

本研究は、花王株式会社にて行われたものであり、ご懇篤なるご指導ご鞭撻を賜りました花王株式会社 吉田 浩之博士、高橋 慶人博士をはじめ、本研究にご支援、ご協力頂きました皆様に厚くお礼申し上げます。

論文目録

主論文を構成する論文

1. Accelerated human epidermal turnover driven by increased hyaluronan production.
(ヒアルロン酸産生促進は表皮ターンオーバーを正に制御する)
Yoko Endo, Hiroyuki Yoshida, Yukiko Ota, Yumiko Akazawa, Tetsuya Sayo, Ushio Hanai, Kotaro Imagawa, Masashi Sasaki, Yoshito Takahashi
Journal of Dermatological Science, Vol. 101, No. 2, pp. 123-133 (2021 年 02 月)
DOI : 10.1016/j.jdermsci.2020.12.002
2. A Connecting Link between Hyaluronan Synthase 3-Mediated Hyaluronan Production and Epidermal Function.
(ヒアルロン酸合成酵素-3 が介するヒアルロン酸産生と表皮機能との関連性)
Yukiko Ota, Hiroyuki Yoshida, Yoko Endo, Tetsuya Sayo, Yoshito Takahashi
International Journal of Molecular Sciences, Vol. 23, No. 5, p. 2424 (2022 年 03 月)
DOI : 10.3390/ijms23052424
3. Antiwrinkle efficacy of 1-ethyl- β -*N*-acetylglucosaminide, an inducer of epidermal hyaluronan production.
(表皮ヒアルロン酸産生促進剤 1-ethyl- β -*N*-acetylglucosaminide によるシワ改善効果)
Yoko Endo, Hiroyuki Yoshida, Yumiko Akazawa, Kohei Yamazaki, Yukiko Ota, Tetsuya Sayo, Yoshito Takahashi
Skin Research and Technology, Vol. 28, No. 1, pp. 58-65 (2022 年 01 月)
DOI : 10.1111/srt.13090

参考論文

1. 1-Ethyl- β -*N*-acetylglucosaminide increases hyaluronan production in human keratinocytes by being converted to *N*-acetylglucosamine via β -*N*-acetylglucosaminidase-dependent manner
Yumiko Akazawa, Hiroyuki Yoshida, Yoko Endo, Jun Sugita, Masafumi Yakumaru, Tetsuya Sayo
(1-Ethyl- β -*N*-acetylglucosaminide は β -*N*-acetylglucosaminidase 活性を介して *N*-acetylglucosamine に変換されることにより表皮細胞のヒアルロン酸産生を促進する)
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 85, No. 6, pp. 1433-1440 (2021 年 06 月)
DOI : 10.1093/bbb/zbab060