

氏名（本籍） えん どう よう こ 遠藤洋子（東京都）  
学位の種類 博士（薬科学）  
学位記番号 乙第64号  
学位授与の日付 2023年9月30日  
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
学位論文題目 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

論文審査委員 （主査）教授 山下 親正  
教授 西川 元也 教授 花輪 剛久  
教授 東 達也 教授 吉澤 一巳  
准教授 四反田 功

## 論文内容の要旨

ヒアルロン酸 (HA) は、*N*-アセチルグルコサミン (NAG)とグルクロン酸が交互に結合した高分子多糖で、高い粘性と水分保持能を有している。また、高分子 HA は生体の恒常性維持に働くのに対し、低分子 HA は病態との関連があるなど、分子量依存的な生理活性も知られている。皮膚の最外層である表皮組織は、主に表皮角化細胞で構成されており、絶えず繰り返される細胞の増殖・分化 (ターンオーバー) により構造や機能が維持されている。HA は生体の至る組織に存在するが、表皮では主に基底層から顆粒層にかけて存在し、重層化した細胞と細胞の間に高濃度で存在している。これまでに、表皮 HA の生理機能として、細胞間隙を確保し、血管の通わない表皮組織に栄養素を運び、老廃物を拡散させることが知られている。加えて、成長因子やレチノイン酸などの各種生理活性物質で表皮細胞の HA 産生を変動させた場合、表皮細胞の増殖・分化も並行して変動したことから、表皮 HA は表皮細胞のターンオーバーにも関与すると考えられてきた。しかしながら、特に表皮細胞の分化については結果が相反するなど、表皮 HA の生理機能は未だ十分に解明されていない。その理由として、過去の研究に使われた生理活性物質は、いずれも表皮 HA 以外にも表皮細胞の機能や活性に影響を及ぼす可能性があるなど、その特異性に課題があった。また、表皮 HA は加齢により減少することが報告されている。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、表皮 HA は抗老化の有望な標的分子になり得る可能性がある。

本申請論文では、表皮 HA の生理機能を解明することを目的とし、表皮 HA 選択的産生促進物質 1-エチル-β-N-アセチルグルコサミニド (β-NAG2) を用いて、表皮 HA と表皮ターンオーバーとの関係性を調べた。加えて、β-NAG2 が老化皮膚に及ぼす影響を明らかにし、抗老化における表皮 HA の重要性を検証した。

## 第1章 β-NAG2 の選択的な HA 産生促進メカニズム

これまでに、NAG は単純拡散により表皮細胞に取り込まれた後、NAG-6 リン酸を経て UDP-NAG に変換され、HA の基質となって、その産生を促進することが示されている。しかし、還元糖である NAG は安定性に課題があったことから、還元末端にエチル基を付加してメイラード反応の発生を抑え、安定性を高めた β-NAG2 を新たに開発した。β-NAG2 は正常ヒト表皮細胞の単層培養系において、濃度依存のかつ経時的に HA 産生を促進した。その際、表皮細胞の HA 産生を主に担う HA 合成酵素 3 (*HAS3*, *HA synthase3*) の遺伝子発現は変動させなかった。一方、β-NAG2 は細胞内の NAG、および UDP-NAG の量を増加させた。さらに、表皮細胞は β-NAG2 を NAG へ変換する β-N-acetylglucosaminidase (β-NAGase) 活性を有することを新たに見出し、さらに β-NAGase 選択的阻害剤である PUGNAc が、β-NAG2 から NAG への変換、β-NAG2 による細胞内 UDP-NAG 量の増加および HA 産生促進をいずれもキャンセルすることを示した。以上の結果より、β-NAG2 は細胞の β-NAGase により NAG に変換された後、UDP-NAG に代謝され、HA 産生を選択的に促進すると考えられた。

## 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

表皮 HA の生理機能を明らかにすることを目的とし、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・分化に及ぼす影響を調べた。皮膚モデルの培地中に β-NAG2 を添加したところ、*HAS3* 遺伝子発現量は変動せず、表皮組織中の HA 量が有意に増加した。また組織観察の結果、β-NAG2 は基底層から顆粒層までの HA の組織分布は変化させず、表皮厚を有意に増加させた。免疫組織染色、および定量的 PCR の結果、β-NAG2 を添加した 3 次元培養ヒト皮膚モデルでは、細胞増殖マーカーである Ki67 タンパク質陽性細胞数や *PCNA* 遺伝子発現の増加に加え、分化マーカーである transglutaminase 1 (*TGM1*) や filaggrin (*FLG*) のシグナル強度、また *TGM1* および *FLG* 遺伝子発現の増加が認められた。一方、これらの効果はいずれも PUGNAc によってキャンセルされた。このことから、β-NAG2 は単層培養系と同様のメカニズムで HA 産生を促進し、表皮細胞の増殖・分化を亢進したと考えられた。なお、β-NAG2 は表皮細胞の増殖・分化と関連が知られる HA の分子量、および細胞表面上の HA 受容体 CD44 の発現量や局在には変動を与えなかった。以上の結果より、表皮 HA の増加は表皮ターンオーバーに対して促進的に働くことが示され、表皮 HA は表皮の形態や恒常性維持において重要な役割を果たすと考えられた。

## 第3章 表皮 HA 産生の減弱と表皮ターンオーバーとの関係性

表皮 HA の選択的な産生促進が表皮ターンオーバーに対して促進的に働くことが示されたが、これまでに表皮 HA の特異的な減少が表皮ターンオーバーに及ぼす影響については

十分調べられていない。そこで、表皮 HA の生理機能のさらなる検証を目的とし、siRNA を用いた RNA 干渉技術により *HAS3* 遺伝子発現を低下させた 3 次元培養ヒト表皮モデルを作出した。このモデルでは無処理に比べ、表皮組織中の HA 量が有意に減少しており、組織観察により表皮厚の有意な低下を認めた。免疫組織染色、および定量的 PCR の結果、細胞増殖マーカーである Ki67 タンパク質陽性細胞数、および *PCNA* 遺伝子発現の低下と、分化マーカーである loricrin (LOR) および FLG のシグナル強度、また *LOR* および *FLG* 遺伝子発現の低下が認められた。以上の結果より、表皮 HA の産生低下は表皮ターンオーバーに対して抑制的に働くことが示され、 $\beta$ -NAG2 によって見出された表皮の形態や恒常性維持における表皮 HA の重要性を裏付けるものと考えられた。

#### 第 4 章 表皮 HA をターゲットとした $\beta$ -NAG2 の抗老化効果

加齢による表皮 HA 量の減少や、細胞増殖の低下を伴った表皮の菲薄化は、シワなどの皮膚老化に関連すると考えられている。実際、表皮 HA 産生促進効果のあるレチノイン酸やレチノールは優れたシワ改善効果を示すが、一方で表皮 HA 以外への多様な生理活性や皮膚への刺激性も多く報告されている。そこで、抗老化における表皮 HA の重要性を調べるため、 $\beta$ -NAG2 による選択的な表皮 HA 産生促進が、皮膚老化症状の一つである目尻シワを改善するか調べた。まず、 $\beta$ -NAG2 配合化粧水を 3 次元培養ヒト表皮モデルや器官培養したヒト皮膚の表面に連続的に塗布したところ、表皮組織中の HA 量が増加した。このことから、外的に適用した  $\beta$ -NAG2 も表皮に到達し、表皮細胞の HA 産生を促進し得ると考えられた。次に、8 週間における  $\beta$ -NAG2 配合化粧水とプラセボ化粧水の二重盲検半顔比較試験を実施したところ、皮膚科専門医の目視評価によるシワスコアが、 $\beta$ -NAG2 配合化粧水塗布側において有意に低下した。また、 $\beta$ -NAG2 配合化粧水塗布側では、プラセボ化粧水塗布側に対して、角層水分量、および皮膚弾力性が有意に向上した。角層水分量、および皮膚弾力性の低下は、シワ形成に関連することが知られていることから、これらの皮膚性状の改善が、 $\beta$ -NAG2 による目尻シワ改善の要因と考えられた。なお、本試験においては、有害事象は一切認められなかった。以上の結果より、 $\beta$ -NAG2 による表皮 HA の産生促進は、シワ等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が示された。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景】

ヒアルロン酸 (HA) は、*N*-アセチルグルコサミン (NAG) とグルクロン酸が交互に結合した高分子多糖で、高い粘性と水分保持能を有している。また、高分子 HA は生体の恒常性維持に働くのに対し、低分子 HA は病態との関連があるなど、分子量依存的な生理活性も知られている。皮膚の最外層である表皮組織は、主に表皮角化細胞で構成されて

おり、絶えず繰り返される細胞の増殖・分化 (ターンオーバー) により構造や機能が維持されている。HA は生体の至る組織に存在するが、表皮では主に基底層から顆粒層にかけて存在し、重層化した細胞と細胞の間に高濃度で存在している。これまでに、表皮 HA の生理機能として、細胞間隙を確保し、血管の通わない表皮組織に栄養素を運び、老廃物を拡散させることが知られている。加えて、成長因子やレチノイン酸などの各種生理活性物質で表皮細胞の HA 産生を変動させた場合、表皮細胞の増殖・分化も並行して変動したことから、表皮 HA は表皮細胞のターンオーバーにも関与すると考えられてきた。しかしながら、特に表皮細胞の分化については結果が相反するなど、表皮 HA の生理機能は未だ十分に解明されていない。

本研究では、表皮 HA の生理機能を解明することを目的とし、表皮 HA 選択的産生促進物質 1-エチル- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニド ( $\beta$ -NAG2) を用いて、表皮 HA と表皮ターンオーバーとの関係性を調べた。加えて、 $\beta$ -NAG2 が老化皮膚に及ぼす影響を明らかにし、抗老化における表皮 HA の重要性を検証した。

#### 【 $\beta$ -NAG2 の選択的な HA 産生促進メカニズムの解明】

申請者は、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。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  $\beta$ -NAG2 を新たに開発した。

その結果、 $\beta$ -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  $\beta$ -NAG2 の代謝経路において  $\beta$ -NAGase による NAG への変換が必須であり、表皮細胞にこの反応を担う内在性の  $\beta$ -NAGase 活性が存在することを明らかにした。

#### 【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の解明】

$\beta$ -NAG2 は正常ヒト表皮細胞の HA 産生を選択的に促進すると考えられたことから、ヒト皮膚組織培養系、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  $\beta$ -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。

その結果、 $\beta$ -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を示した。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、 $\beta$ -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することを見出した。

#### 【表皮 HA 産生の減弱と表皮ターンオーバーとの関係性の解明】

$\beta$ -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(増殖・分化)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、 $\beta$ -NAG2 から NAG への変換を阻害して HA 産生を抑制するため、 $\beta$ -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、

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（増殖・分化）との関係性をさらに検証し、表皮 HA が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、表皮の構造や恒常性維持に寄与していることを明らかにした。

#### 【表皮 HA をターゲットとした $\beta$ -NAG2 の抗老化効果の解明】

上述の  $\beta$ -NAG2 の作用を検証するため、目尻にシワを有する健常日本人女性に  $\beta$ -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結果、選択的な表皮 HA の産生促進効果を有する  $\beta$ -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ことを明らかにした。

本研究を通して  $\beta$ -NAG2 をはじめとする NAG 誘導体は製剤中での安定性も高く、化粧品をはじめ様々な素材への利用が期待されることを見出した。

以上、本論文は、博士（薬科学）の学位論文として十分に価値あるものと認められる。