

学位論文要旨

学位申請者氏名 北澤 和之

Skin fibroblasts produce the fibers, which play an important role as supportive materials in for the dermis. Collagen fibers and elastic fibers are of the main fibers in the dermis, and maintained the skin strength and elasticity. These fibers decreased by environmental factors such as ultraviolet (UV) and aging, resulting in decreases in fibril formation related-proteins and fibroblast numbers. The increased fibers must be related for prevention of premature and maintenance of skin strength and elasticity.

Chondroitin sulfate (CS) is a hydrophilic polymer consisted of repeating disaccharide (D) units composed of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) and glucuronic acid (GlcA). CS is one of glycosaminoglycans (GAGs). It has been reported that CS increases elastin (ELN) expression in the smooth muscle cells and that decorin (CS proteoglycan) is required for stabilizing the collagen fibers. CS increases cell viability in fibroblasts exposed to oxidative stress due to an increase in catalase. Therefore, increases in the fiber and the cell numbers can be expected with CS application to skin.

The effect of GAG depends on the molecular weight (M. W.) of CS. In a GAG like heparin and hyaluronan (HA), for example, the interaction with IL-10 varies depending on the M.W. of GAG. Low M. W. of HA shows angiogenesis, whereas high M. W. of HA does not. The effects of CS are different depending on the degree of sulfation. For example, CS with a high degree of sulfation promotes neurite outgrowth, whereas these effects are not observed with low sulfation of CS. The CS affinity to protein (e.g., receptor, cytokine) depends on the degree of sulfation.

In this study, the effect of highly sulfated CS with different M. W. on the fiber related-protein expressions in normal human dermal fibroblast (NHDFs), the effect of different types of CS on the viability in oxidized fibroblasts, and the skin permeation of several of CS were evaluated in Chapter 1 – section 1, Chapter 1 - section 2 and Chapter 2, respectively. CS4 (sulfate binding to GalNAc of C-4), CS6 (sulfate binding to GalNAc of C-6), CS24 (GlcA of C-2 and GalNAc of C-4), CS26 (GlcA of C-2 and GalNAc of C-6), CS46 (GalNAc of C-4 and C-6) and CS246 (GlcA of C-2 and GalNAc of C-4 and C-6) were used as tested CSs.

Chapter 1; The effect of CS on the dermal fibroblasts.

Section 1; The effect of highly sulfated CS with different M. W. on the fibril formation related-protein expressions in NHDFs.

Low sulfated CS was found to affect to fibril formation and proliferation of fibroblasts, but not for highly sulfated CS. In this section, the effects of highly sulfated CS with different M.W. in NHDFs were evaluated, and aimed to have investigated it. NHDFs were treated with each CS. The expression of various genes was assessed by real-time PCR. Type I collagen content and elastin protein expression level were assessed by ELISA and Western blotting, respectively. Highly

sulfated DCS significantly increased expression of genes required for fibril formation-related genes (collagen, type I, alpha I, decorin, elastin, lysyl oxidase, SMAD2 and SMAD3). Additionally, I confirmed that collagen and elastin increased the protein levels. In contrast, high- and low-M.W. CS had no significant effect. Therefore, highly sulfated DCS increased the expression of fibril formation-related genes and proteins, suggesting that they improve the firmness and elasticity of skin. In addition, the present results suggested that highly sulfated CS effect on the fibril formation related-protein expressions was dependent on their M. W..

Section 2; The effect of CS with different types on the oxidized fibroblasts.

In this section, the effect of CS (using same as section 1) was evaluated on the oxidized fibroblasts. Initially, the effects of various CSs on cell viability and intracellular reactive oxygen species (ROS) concentrations were examined in H₂O₂-treated fibroblasts. DCS4 and DCS24 increased the cell viability, catalase gene expression and catalase activity. In contrast, they decreased intracellular ROS concentrations in H₂O₂-treated fibroblasts, but not with CS polymers and the other CSs. Then, the effects of various chondroitin sulfates on the cell viability were examined in UV irradiation fibroblasts. DCS4 and DCS24 increased the cell viability in UV irradiation fibroblasts, but not with CS polymers and the other CSs. Therefore, CS without a sulfate group to the C6-position of GalNAc may have an important role on the ROS activity.

Chapter 2; Permeability of CS in skin.

The stratum corneum, outermost layer of skin, is a primary barrier to protect the invasion and skin penetration of chemical substances. Generally, only small molecular compounds less than 500 Da are capable of significant passive permeation through the skin barrier (known as the 500 Dalton rule), suggesting that CS is not permeated through the skin. Thus, DCS was focused in the present study.

In chapter 2, the aim was aimed to investigate the skin permeability of different types of CS (sulfation degree and M.W.). The skin permeation of CS was determined using excised hairless mouse skin over 24 h. A modified Franz type diffusion cell was used in this study. Phosphate-buffered saline (PBS) containing CS (high M. W. (H) CS (HCS4 or HCS6) or DCS (DCS4, DCS6, DCS24, DCS26, DCS46 or DCS246) was used for the donor cell, whereas distilled water was used for receiver. The skin permeation of HCS was undetectable (<1 µg / mL), suggesting that HCS is not permeated through the skin by the passive diffusion. In contrast, DCS was permeated through skin.

This finding suggests that DCS can permeate skin, and increase the fibril formation and the cell viability in dermal fibroblasts, and the effect of CS was dependent on the CS types (degree of sulfation and M.W.). However, the mechanisms of CS effects are still unclear. The future progress on the CS study is expected in the future.

学位論文要旨

学位申請者氏名 北澤 和之

真皮に存在する線維芽細胞は皮膚の支持体である線維を形成するためのタンパク質を産生している。ここで、皮膚に存在する線維には主にコラーゲン線維とエラスチン線維があり、それぞれ皮膚の適度な強度や弾力性に寄与している。しかし、加齢や紫外線 (ultraviolet : UV) によって、線維形成関連タンパク質の産生低下や線維芽細胞の数の減少が引き起こされ、結果として線維が減少することが知られている。したがって、線維の減少の予防は皮膚の強度・弾力性の維持及び早期加齢の防止に繋がると考えられる。

コンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate : CS) は、硫酸化グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan : GAG) に属し、グルクロン酸 (glucuronic acid : GlcA) と *N*-アセチルガラクトサミン (*N*-acetylgalactosamine : GalNAc) の二糖ユニットで構成される水溶性高分子である。CS はデコリン (CS プロテオグリカン) がコラーゲン線維に結合するために必要であり、エラスチンの産生を促進するなど、線維形成に関与するとの報告がある。さらに、CS は酸化ストレスを与えられた線維芽細胞の細胞生存率を増加させ、カタラーゼの活性を増加させるとも報告されている。これらにより、CS は皮膚に適用することにより線維の減少や線維芽細胞数の減少を防止する作用が期待できる。

しかし、皮膚最外層に存在する角層は、皮膚バリア機能としての役割を果たしており、500 Da 以上の化合物を皮膚内へ送達させるときの障壁となる。そのため、高分子 CS を皮膚内へ送達させることは困難であることが考えられたので、分子量が約 500 Da の二糖 CS に着目した。

GAG は分子量によって作用が異なることが考えられる。実際に、硫酸化 GAG であるヘパリンは、低分子よりも高分子の方が IL-10 との解離定数が低いと報告されている。また、非硫酸化 GAG であるヒアルロン酸 (hyaluronan : HA) は、低分子 HA が血管新生抑制作用を示すのに対し、高分子 HA では血管新生促進作用を示すと報告されている。しかしながら、高分子 CS において皮膚線維芽細胞に対する影響が報告されているが、二糖 CS の皮膚線維芽細胞に対する影響は報告されていない。

また、CS は、1 つのユニットにつき最大 4 つの硫酸基の修飾をうけるため、硫酸化度 (硫酸基の結合位置及び数) によって構造多様性を有し、硫酸化度に応じた生理作用を示す。実際に、CS は硫酸化度によってサイトカインや CS 受容体との親和性が異なり、低硫酸化 CS が神経突起伸長を示さないのに対し高硫酸化 CS は神経突起伸長を誘導すると報告されている。したがって、二糖 CS は、線維形成関連タンパク質の産生促進や線維芽細胞の細胞生存率増加作用を有する硫酸化度を明らかにする必要がある。

本研究では、CS の皮膚透過性を明らかにし、正常ヒト皮膚線維芽細胞の線維形成関連タンパク質の発現とヒト皮膚線維芽細胞の酸化ストレス障害に対する種々 CS の効果を検討することを目的とした。

第 1 章第 1 節では、正常皮膚線維芽細胞に対する高硫酸化 CS の影響を検討し、第 2 節で酸化ストレス障害皮膚線維芽細胞に対する種々 CS の効果を検討し、第 2 章では CS の皮膚透過性を検討した。

なお、本研究では、GalNAc の C-4 位に硫酸基が結合した「CS4」、GalNAc の C-6 位に硫酸基が結合した「CS6」、GlcA の C-2 位と GalNAc の C-4 位に硫酸基が結合した「CS24」、GlcA の C-2 位と GalNAc の C-6 位に硫酸基が結合した「CS26」、GalNAc の C-4 位及び C-6 位に硫酸基が結合した「CS46」、そして GlcA の C-2 位と GalNAc の C-4 位及び C-6 位に硫酸基が結合した「CS246」の 6 種類の CS を用いた。

第1章 CSの線維芽細胞に対する影響

第1節 正常ヒト皮膚線維芽細胞における高硫酸化CSの線維系タンパク質発現に対する影響

低硫酸化CSは皮膚中で線維形成や線維芽細胞の増殖に関与することが明らかにされてきたが、CSが硫酸化度に応じた生理作用を示すことが報告されているにも関わらず、高硫酸化CSの機能については報告がない。本節では、高硫酸化CS（CS246）の機能の一端を解明することを目的とし、培養正常ヒト皮膚線維芽細胞において分子量の異なるCS246の線維形成タンパク質関連遺伝子（I型 α Iコラーゲン、デコリン、エラスチン、リシルオキシターゼ、SMAD2及びSMAD3）の発現量及びI型コラーゲンタンパク質とエラスチンタンパク質の発現量に対する影響を検討した。その結果、二糖CS246は、線維形成タンパク質関連遺伝子、I型コラーゲンタンパク質及びエラスチンタンパク質の発現量を増加させた。一方、高分子CS246は、線維形成関連遺伝子に対して影響を与えなかった。これらの結果から、二糖CS246は線維形成促進作用をもつことや、CS246の線維形成タンパク質の発現に与える影響は分子量によって異なることが示唆された。

第2節 ヒト皮膚線維芽細胞の酸化ストレス障害に対する種々CSの効果

本節は、分子量や硫酸化度の異なる種々CS（高分子CS4、高分子CS6、二糖CS4、二糖CS6、二糖CS24、二糖CS26、二糖CS46及び二糖CS246）を用いて、酸化ストレス障害を与えた培養ヒト皮膚線維芽細胞に対する影響を検討した。最初に、種々CSの過酸化水素処理線維芽細胞に対する影響を検討した。その結果、二糖CS4及び二糖CS24の添加により、細胞生存率の増加、細胞内活性酸素種量の減少、カタラーゼ遺伝子発現量の増加及びカタラーゼ活性の増加が認められた。しかし、高分子CS及びその他の二糖CSは、細胞生存率、細胞内活性酸素種量、カタラーゼ遺伝子発現量及びカタラーゼ活性に対して影響を与えなかった。次に、種々二糖CSのUV照射線維芽細胞の細胞生存率に対する影響について検討した。その結果、二糖CS4及び二糖CS24の添加により、細胞生存率を有意に増加させた。一方、その他の二糖CSは、細胞生存率に影響を与えなかった。二糖CS4及び二糖CS24の共通した特徴は、GalNAcのC-6位に硫酸基が結合していないことであることから、ヒト皮膚線維芽細胞の細胞生存率増加作用及び活性酸素種除去作用とGalNAcのC-6位のヒドロキシ基や硫酸基が密接に関係することが示唆された。

第2章 CSの皮膚透過性

本章では、*in vitro*へアレスマウス皮膚透過試験を行い、分子量や硫酸化度の異なる種々CSの皮膚透過性を明らかにすることを目的とした。高分子CS4、高分子CS6、二糖CS4、二糖CS6、二糖CS24、二糖CS26、二糖CS46及び二糖CS246をサンプルとして選択し、PBSに溶解させてドナー溶液とした。皮膚透過試験では縦型拡散セルを用い、レシーバー側に精製水を充填し、24時間後にレシーバー溶液中の各種CSを定量し、皮膚透過性を確認した。その結果、高分子CSの皮膚透過量は検出限界以下(<1 μ g/mL)であり、皮膚を受動拡散で透過しないことが示唆された。一方、本章で用いた二糖CSは、硫酸化度に関わらず、すべて皮膚を透過した。

以上のことから、二糖CSは皮膚適用により皮膚内に送達することができ、線維芽細胞の線維形成促進作用や細胞生存率増加作用を与える可能性が考えられた。また、酸化ストレス障害線維芽細胞の細胞生存率に対するCSの作用は、硫酸化度や分子量によって異なることが示唆された。しかし、これらの詳細なメカニズムは依然不明で、今後、更なるCSの研究の進展が期待される。

論文審査の結果の要旨

真皮に存在する線維芽細胞は皮膚の支持体である線維を形成するためのタンパク質を産生している。皮膚に存在する線維には主にコラーゲン線維とエラスチン線維があり、それぞれ皮膚の適度な強度や弾力性に寄与している。しかし、加齢や紫外線 (ultraviolet : UV) によって、線維形成関連タンパク質の産生低下や線維芽細胞の数の減少が引き起こされ、結果として線維が減少することが知られている。したがって、線維の減少の予防は皮膚の強度・弾力性の維持及び早期加齢の防止に繋がると考えられる。

コンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate : CS) は、硫酸化グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan : GAG) に属し、グルクロン酸 (glucuronic acid : GlcA) と *N*-アセチルガラクトサミン (*N*-acetylgalactosamine : GalNAc) の二糖ユニットで構成される水溶性高分子である。CS はデコリン (CS プロテオグリカン) がコラーゲン線維に結合するために必要であり、エラスチンの産生を促進して線維形成に関与すること、さらに、線維芽細胞の酸化ストレスに対する抵抗性を増加させることが報告されている。これらにより、CS を皮膚に適用することにより線維の減少や線維芽細胞数の減少を防止する作用が期待できる。

北澤和之氏は、皮膚における線維形成関連タンパク質の発現に及ぼす CS の影響と皮膚障害性に対する修復効果を明らかにする目的で、正常皮膚線維芽細胞に対する高硫酸化 CS の影響を検討するとともに酸化ストレス障害皮膚線維芽細胞に対する種々 CS の効果を検討した。また、これらの CS の皮膚送達を明らかにする目的で皮膚透過性の検討を行った。

第 1 章では、CS の線維芽細胞に対する影響について、高硫酸化 CS (CS246) の線維形成関連タンパク質発現に対する影響とヒト皮膚線維芽細胞の酸化ストレス障害に対する種々 CS の効果を検討している。低硫酸化 CS は皮膚中で線維形成や線維芽細胞の増殖に関与することが明らかにされているが、高硫酸化 CS の機能についての報告はこれまでみられなかった。CS246 の機能の一端を解明することを目的とし、培養正常ヒト皮膚線維芽細胞において分子量の異なる CS246 を作用させ、線維形成タンパク質関連遺伝子 (I 型 α I コラーゲン、デコリン、エラスチン、リシルオキシターゼ、SMAD2 及び SMAD3) の発現量及び I 型コラーゲンタンパク質とエラスチンタンパク質の発現量に対する影響を検討した。その結果、二糖 CS246 は、線維形成タンパク質関連遺伝子、I 型コラーゲンタンパク質及びエラスチンタンパク質の発現量を増加させることを見出した。一方、高分子 CS246 は、発現量に影響を与えなかった。これらの結果より、二糖 CS246 は線維形成促進作用を有すること、CS246 の線維形成タンパク質の発現に与える

影響は分子量によって異なることを示唆した。

一方、ヒト皮膚線維芽細胞の酸化ストレス障害に対する種々CSの効果については、分子量と硫酸化度の異なるCS（高分子CS4、高分子CS6、二糖CS4、二糖CS6、二糖CS24、二糖CS26、二糖CS46及び二糖CS246）を用いて、酸化ストレス障害を与えた培養ヒト皮膚線維芽細胞に対する影響を検討している。過酸化水素処理線維芽細胞に対する影響を検討した結果、二糖CS4及び二糖CS24の添加により、細胞生存率の増加、細胞内活性酸素種量の減少、カタラーゼ遺伝子発現量の増加及びカタラーゼ活性の増加が認められた。しかし、高分子CS及びその他の二糖CSは、細胞生存率、細胞内活性酸素種量、カタラーゼ遺伝子発現量及びカタラーゼ活性に対して影響を与えなかった。次に、種々二糖CSのUV照射線維芽細胞の細胞生存率に対する影響について検討した。その結果、二糖CS4及び二糖CS24の添加により、細胞生存率を有意に増加させた。一方、その他の二糖CSは、細胞生存率に影響を与えなかった。この効果は、二糖CS4及び二糖CS24の構成糖GalNAcのC-6位に硫酸基が結合していないことによってもたらされるものと考えられた。このことからGalNAcのC-6位のヒドロキシ基や硫酸基がヒト皮膚線維芽細胞の細胞生存率増加作用及び活性酸素種除去作用と密接に関係することを示唆した。

第2章では、*in vitro*ヘアレスマウス皮膚透過試験を行い、分子量や硫酸化度の異なる種々CSの皮膚透過性を検討している。高分子CS4、高分子CS6、二糖CS4、二糖CS6、二糖CS24、二糖CS26、二糖CS46及び二糖CS246について、縦型拡散セルを用い、24時間後に透過したCSを定量し、皮膚透過性を確認した。その結果、高分子CSの皮膚透過量は検出限界以下（ $<1 \mu\text{g/mL}$ ）であり、皮膚を受動拡散で透過しないことが明らかとなった。一方、本章で用いた二糖CSは、硫酸化度に関わらず、すべて皮膚を透過した。

以上、本論文によって、CSのうち二糖CSは、適用により皮膚内に送達させることが可能であり、透過した二糖CSは線維芽細胞に作用し、線維形成促進作用や酸化ストレスに対する抵抗性を増加させる作用を発現することが明らかとなった。また、酸化ストレス障害線維芽細胞の細胞生存率に対するCSの作用は、硫酸化度や分子量によって異なることが示唆された。これらの詳細なメカニズムについては今後の研究の進展に期待するものであるが、本論文は低分子CSの皮膚適用素材、機能性化粧品素材としての有用性を初めて見出したもので、化粧品学分野における基礎的知見および科学的情報を提示するものである。よって、本論文は、本研究科課程による博士（薬科学）論文に十分に値するものと判定した。