

# 博士論文

分子量と硫酸化度の異なる種々コンドロイチン硫酸類の  
ヒト皮膚線維芽細胞に対する影響

北澤 和之

# 目次

略語集	1
緒言	4
第1章 CSのヒト皮膚線維芽細胞に対する影響	
第1節 培養正常ヒト皮膚線維芽細胞における高硫酸化コンドロイチン硫酸 の線維系タンパク質発現に対する影響	
1-1 緒論	8
1-2 実験方法	11
1-2-1 実験材料	11
1-2-2 使用細胞	11
1-2-3 細胞培養	11
1-2-4 MTT試験による細胞毒性評価	11
1-2-5 Real-Time PCR	12
1-2-6 ELISA	13
1-2-7 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用ゲル作成	14
1-2-8 ウェスタンブロット	15
1-2-9 データ解析	16
1-3 結果	17
1-3-1 CS246の細胞毒性への影響	17
1-3-2 分子量の異なるCS246の各種遺伝子発現量への影響	18
1-3-3 DCS246のI型コラーゲンタンパク質発現量への影響	・・・20
1-3-4 DCS246のエラスチンタンパク質発現量への影響	・・・20

1-4	考察	21
第2節 培養ヒト皮膚線維芽細胞の酸化ストレス傷害に対する 二糖コンドロイチン硫酸の効果		
2-1	緒論	24
2-2	実験方法	26
2-2-1	実験材料	26
2-2-2	細胞培養	27
2-2-3	MTT 試験による細胞生存率測定	27
2-2-4	細胞内 ROS 量測定	27
2-2-5	CAT 活性測定	28
2-2-6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 消去能測定	28
2-2-7	Real-Time PCR	28
2-2-8	CAT 活性阻害剤を用いた細胞生存率測定	29
2-2-9	UVA 照射	30
2-2-10	データ解析	30
2-3	結果	31
2-3-1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理線維芽細胞における種々CS の細胞生存率に対する影響	・・・ 31
2-3-2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理線維芽細胞における種々CS の細胞内 ROS 量に対する影響	・・・ 34
2-3-3	二糖 CS (DCS4 及び DCS24) の H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 消去能測定	37
2-3-4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理線維芽細胞における二糖 CS (DCS4 及び DCS24) の CAT 遺伝子発現量に対する影響	・・・ 38
2-3-5	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理線維芽細胞における種々二糖 CS の CAT 活性に対する影響	

	・・・	39
2-3-6	カタラーゼ活性阻害剤（3-AT）及び二糖 CS の同時添加による 細胞生存率に対する影響	・・・ 40
2-3-7	UV 照射線維芽細胞における種々二糖 CS の細胞生存率に対する影響	・・・ 41
2-4	考察	43
第 2 章 種々 CS の皮膚透過性の評価		
1	緒論	46
2	実験方法	48
2-1	実験材料	48
2-2	実験動物	48
2-3	皮膚透過試験	48
2-4	高分子 CS の定量	49
2-5	二糖 CS の定量	50
3	結果	51
3-1	高分子 CS の皮膚透過性	51
3-2	二糖 CS の皮膚透過性	51
4	考察	53
	結論	55
	謝辞	59
	参考論文	60

## 略語集

- 3-AT : 3-amino-1, 2, 4-triazole
- CAT : catalase
- COL1A1 : collagen, alpha I, type I
- CS : chondroitin sulfate
- DCN : decorin
- DEPC : diethylpyrocarbonate
- DMEM : dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO : dimethyl sulfoxide
- DS : dermatan sulfate
- EBP : elastin binding protein
- ELN : elastin
- FBS : fetal bovine serum:
- GAG : glycosaminoglycan
- GalNAc : *N*- acetylgalactosamine
- GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- GlcA : glucuronic acid
- HA : hyaluronan
- HPLC : high performance liquid chromatography
- HRP : horseradish peroxidase
- HS : heparan sulfate
- KS : keratan sulfate
- LOX : lysyl oxidase
- MTT : 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

- NHDFs : normal human dermal fibroblasts
- PBS : phosphate buffered saline
- PCR : polymerase chain reaction
- PVDF : polyvinylidene difluoride
- ROS : reactive oxygen species
- SDS : sodium dodecyl sulfate
- SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis
- SMAD2 : SMAD family member 2
- SMAD3 : SMAD family member 3
- SOD : superoxide dismutase
- TGF : transforming growth factor
- UA : uronic acid
- UFLC : ultra fast liquid chromatograph
- UV : ultraviolet
- $\triangle$  :unsaturated

#### コンドロイチン硫酸略語表

- DCS : disaccharide chondroitin sulfate:
- DCS4 : disaccharide chondroitin sulfate 4S
- DCS6 : disaccharide chondroitin sulfate 6S
- DCS24 : disaccharide chondroitin sulfate 24S
- DCS26 : disaccharide chondroitin sulfate 26S
- DCS46 : disaccharide chondroitin sulfate 46S
- DCS246 : disaccharide chondroitin sulfate 246S

- HCS : high molecular weight chondroitin sulfate:
- HCS4 : high molecular weight chondroitin sulfate 4S
- HCS6 : high molecular weight chondroitin sulfate 6S
- HCS246 : high molecular weight chondroitin sulfate 246S
- LCS246 : low molecular weight chondroitin sulfate 246S

## 緒言

生体内において糖鎖は、細胞間相互作用、細胞の識別やタンパク質の保護などの役割を持ち、タンパク質や核酸に次ぐ、「第三の生命鎖」と呼ばれるほど、重要な働きをしている。

糖鎖の一種であるグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan: GAG) は、ウロン酸とヘキソサミンの二糖が交互に連なった水溶性高分子であり、高い水分保持機能を有する。GAG は、硫酸基の有無により分類され、非硫酸化 GAG (ヒアルロン酸 (hyaluronan: HA) ) と硫酸化 GAG (コンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate: CS)、デルマタン硫酸 (dermatan sulfate: DS)、ヘパラン硫酸 (heparan sulfate: HS) 、ケラタン硫酸 (keratan sulfate: KS) など) の二種類に分けられる。GAG の特徴として、負電荷を持つこと、分子量 (糖鎖長) が幅広く存在していること、主に生体内でコアとなるタンパク質と結合したプロテオグリカンとして存在していることなどがあげられる<sup>1)</sup>。

非硫酸化 GAG の HA は、生体内でタンパク質に結合せずに存在しており、様々な生理活性をもつ<sup>2)</sup>。興味深いことに、HA は、分子量によって異なる生理活性を持つことが報告されている。例えば、低分子 HA は、血管新生促進作用を示す<sup>3)</sup>。反対に、高分子 HA は血管新生抑制作用を示す<sup>4)</sup>。また、低分子 HA ( $2.8 \times 10^5$  Da) は、マクロファージによるサイトカイン及びケモカインの産生を誘導する。しかし、高分子 HA ( $6.0 \times 10^6$  Da) はこれらを誘導しない<sup>5)</sup>。このことから、分子量は、HA の生理活性に重要であることが考えられている。

代表的な硫酸化 GAG である CS は、動物の軟骨から発見・単離され、プロテオグリカンとして、あらゆる組織の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在し、生理機能に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた<sup>6)</sup>。特に、CS の生理機能は、神経<sup>7)</sup>、軟骨<sup>8)</sup>、発生<sup>9)</sup> などの分野を中心に研究されて



きた。

CS は、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) の二糖ユニットが連なった水溶性高分子である (Fig. 1)。CS の基本骨格は、生合成の過程で、複数の硫酸基転移酵素により、GlcA の C-2 位や GalNAc の C-4 位及び C-6 位に硫酸化修飾をうける<sup>10)</sup>。したがって、生合成された CS は、多様な構造となる<sup>11)</sup>。CS は、硫酸化度 (硫酸基の結合位置や数) によって種類が異なる。主に、低硫酸化 CS は、GalNAc の C-4 位に硫酸基が結合した CS4 及び GalNAc の C-6 位に硫酸基が結合した CS6 の二種類がある。高硫酸化 CS は、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 DCS46 及び 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 の四種類がある。これらの CS の構成糖を Table 1 にまとめた。

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 (elastin: ELN) 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及び線維芽細胞の数の減少が引き起こされ<sup>12),13)</sup>、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。

CS は、生体内においてコラーゲンと結合することや<sup>14)</sup>、平滑筋細胞において ELN タンパク質の発現を上昇させることが報告されている<sup>15)</sup>。また、線維形成に重要なデコリン (decorin: DCN) やバーシカンなどのタンパク質は、CS プロテオグリカンとして知られている。これらのことから、CS は線維の形成に関与していることが考えられる。さらに、CS は酸化ストレス障害を与えた線維芽細

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<sup>16)</sup>。これらにより、CSは皮膚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。

化合物の皮膚適用において、角層は皮膚透過の最大の障壁であり、水溶性化合物や高分子化合物（分子量が500 Da以上<sup>17)</sup>）の透過性は低いものの、肝初回通過効果をうけないことや投与の簡便さなどの利点を持つことから重要な化合物の投与経路と考えられている。しかし、CSは、分子量が2万～5万と大きいことから、皮膚を透過しないことが考えられるため、分子量が小さい二糖CS（分子量500 Da）に着目した。

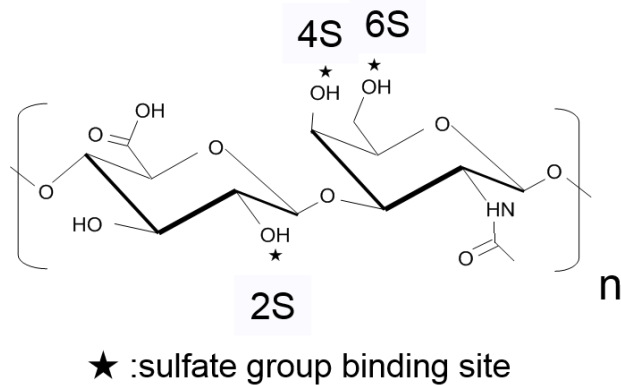
前述したとおり、HAの生理作用は、分子量により異なる。CSは、負電荷をもち、構成糖がグルクロン酸であることから構造的な類似点がある。このことから、CSもHAと同様に分子量により生理作用が異なることが想定される。しかしながら、二糖CSの皮膚生理作用は明らかとなっていない。

CSの生理作用は、硫酸化度によって異なることが報告されている。例えば、CS4は、線維芽細胞の細胞接着及び細胞増殖を促進する。一方、CS6は、線維芽細胞の細胞増殖を促進するが、細胞接着は抑制する<sup>18)、19)</sup>。また、CS4及びCS6は、神経突起伸長に影響を与えない。一方、CS46及びCS26は、神経細胞の突起伸長を促進する<sup>20)</sup>。したがって、線維形成関連タンパク質の産生促進や細胞生存率増加作用を有する二糖CSの硫酸化度を明らかにする必要がある。

そこで、本研究では、分子量や硫酸化度の異なるCSを用いて正常皮膚線維芽細胞における線維関連タンパク質の発現に対する影響及び皮膚線維芽細胞の酸化ストレス障害に対する種々CSの抑制効果を検討し、その構造と生理作用の関連を明らかにすることを目的とした。

第1章では、培養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及び培養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の抑制効果の検討を行なった。第2章では、CSの皮膚透過性評価を行なった。



**Fig.1 Structure of chondroitin sulfate.**

**Table 1 Types of CS**

Types of CS	Components
CS4	GlcA + GalNAc (4S)
CS6	GlcA + GalNAc (6S)
CS24	GlcA (2S) + GalNAc (4S)
CS26	GlcA (2S) + GalNAc (6S)
CS46	GlcA + GalNAc (4S, 6S)
CS246	GlcA(2S) + GalNAc (4S, 6S)

# 第1章 CS のヒト皮膚線維芽細胞に対する影響

## 第1節 培養正常ヒト皮膚線維芽細胞における高硫酸化

### コンドロイチン硫酸による線維系タンパク質に対する影響

#### 1-1. 緒論

真皮に存在する線維芽細胞は、皮膚の支持体である細胞外マトリックスを産生する重要な役割を持つ。特に、コラーゲンや ELN のような線維系タンパク質は、皮膚の構造を維持するために重要である<sup>21)</sup>。

コラーゲン線維は、様々な結合組織に存在し、強力な支持組織としての役割を果たしている。皮膚におけるコラーゲン線維は、真皮の大部分を占めており<sup>22)</sup>、皮膚の強度を保つ役割を果たしている。特に、I型コラーゲンは、皮膚に豊富に存在し、コラーゲン線維の主要なタンパク質である。また、DCN は、コラーゲン線維の太さや間隔を調節する分子であるため、コラーゲン線維の安定化に必要である<sup>23)</sup>。これらのタンパク質の減少は、コラーゲン線維の強度低下や線維束の乱れが生じる原因となる。

一方、ELN 線維は、皮膚、肺及び動脈などの弾力性を要する組織に存在し、コラーゲン線維と同様に支持組織としての役割を果たしている<sup>24) -26)</sup>。また、皮膚における ELN 線維は、コラーゲン線維と比較して量が少ないが、コラーゲン線維の弾性を補うために存在し、皮膚の弾力性を保つ役割がある<sup>27), 28)</sup>。そのため、ELN 線維の主成分である ELN の減少は、皮膚の弾力性減少や皮膚弛緩症の原因となる。

ELN カスケード (SMAD/トランスフォーミング増殖因子- $\beta_1$  (Transforming growth factor: TGF- $\beta_1$ ) 経路) の下流タンパク質である SMAD family member 2 (SMAD2) 及び SMAD family member 3 (SMAD3) は、リン酸化された後、SMAD2、

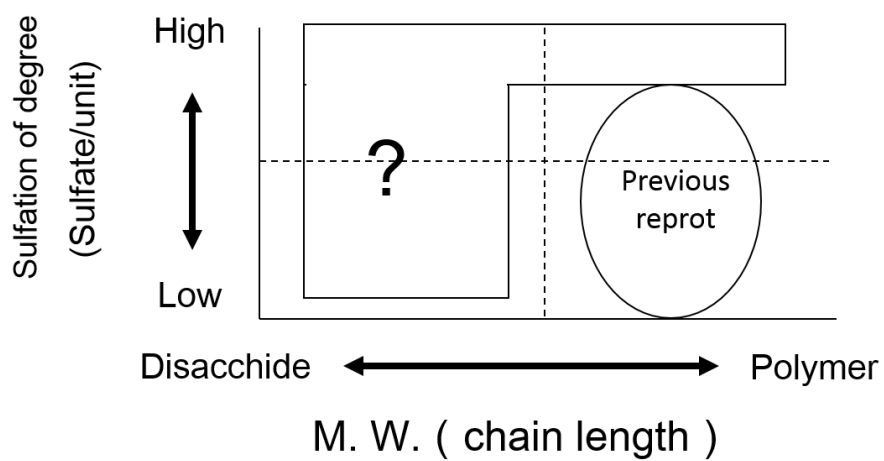
SMAD3 及び SMAD family member 4 (SMAD4) が複合体を形成することで、核内へ移行し、ELN などの目的遺伝子の発現を調節していることが知られている<sup>29)</sup>。コラーゲンや ELN は、架橋反応することによって線維を形成する。リシルオキシターゼ (lysyl oxidase: LOX) は、コラーゲン線維及び ELN 線維の架橋反応を行う酵素であり、線維の形成に必要なタンパク質である<sup>30)</sup>。

緒言で述べたとおり、CS は、線維形成関連タンパク質と密接に関係していると考えられる。また、DCS は、分子量が小さいため、皮膚適用によって皮膚を透過することや、分子量や硫酸化度によって作用が異なることが考えられる。したがって、DCS を皮膚に適用することで線維形成を促進することが期待できる。

CS は、タンパク質との相互作用の親和性が硫酸化の程度によって異なることが報告されている<sup>31), 32)</sup>。さらに、IL-10 と DCS (DCS2、DCS4、DCS6、DCS24、DCS26、DCS46、DCS246) の相互作用は、硫酸基の数が増えるほど解離定数が下がることが報告されている<sup>33)</sup>。CS の硫酸基は、タンパク質との相互作用に影響を及ぼすことから、CS の皮膚生理作用にも大きく関係する可能性が考えられる。しかし、線維形成関連タンパク質を産生する線維芽細胞と CS に関連しては、低硫酸化高分子 CS (high molecular weight chondroitin sulfate: HCS) を用いた報告が多く<sup>34)-36)</sup>、高硫酸化低分子 CS (low molecular weight chondroitin sulfate: LCS) や高硫酸化二糖 CS (disaccharide chondroitin sulfate: DCS) の報告は全く存在しない (Fig. 2)。

そこで、本章では、分子量の異なる高硫酸化 CS (CS246) の線維芽細胞の線維系タンパク質への影響を検討することを目的とし、線維形成に関連する I 型コラーゲン、DCN、ELN、LOX、SMAD2 及び SMAD3 の遺伝子発現量に対する影響を検討した。また、皮膚の構造に極めて重要なコラーゲン線維及び ELN 線維の

主成分である I 型コラーゲン及び ELN のタンパク質発現量に対する影響も検討した。



**Fig. 2 The findings of chondroitin sulfatate and skin fibroblasts**

## 1-2. 実験方法

### 1-2-1. 実験材料

HCS246（平均分子量：47,000 Da, 硫酸化度: 38.57%）及び LCS246（平均分子量：3,700 Da, 硫酸化度: 38.74%）はマルホ株式会社（大阪、日本）から供与された。DCS246（ $\Delta$ UA-2S $\rightarrow$ GalNAc-4S-6S Na<sub>2</sub>, M.W.: 707 Da）は、Dextra Laboratories（Earley Gate, Reading, UK）から購入した。3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)は Sigma-Aldrich シグマアルドリッチ（St. Louis, MO, USA）から購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から購入した。

### 1-2-2. 使用細胞

正常ヒト皮膚線維芽細胞は、倉敷紡績株式会社（大阪、日本）より、新生児男性のものを購入した。

### 1-2-3. 細胞培養

正常ヒト皮膚線維芽細胞は、10% ウシ胎児血清（fetal bovine serum: FBS）含有ダルベッコ改変イーグル培地（dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM）で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### 1-2-4. MTT 試験による細胞毒性評価

正常ヒト皮膚線維芽細胞は、 $0.5 \times 10^5$  cells/dish になるように 60 mm ディッシュに播種した。正常ヒト皮膚線維芽細胞に各種 CS を添加し、24 時間培養した。MTT をリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline: PBS）で最終濃度を 5 mg/mL になるように調製し、濾過滅菌をした。培地と MTT 溶液を 9:1 の割合で

混合した。細胞を PBS で洗浄後、MTT 混合培地を 2 mL 添加し、3 時間インキュベートした。細胞を PBS で洗浄後、0.04 mol HCl/isopropyl alcohol を 1 mL 添加し、ホルマザンを溶解した。ホルマザン溶解液をマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e) で 570 nm の吸光度を測定した。細胞生存率は、normal を 100% とした時の相対値で評価した。

#### 1-2-5. Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

正常ヒト皮膚線維芽細胞は、 $0.5 \times 10^5$  cells/dish になるように 60 mm ディッシュに播種した。正常ヒト皮膚線維芽細胞に各種 CS を添加し、24 時間培養した。細胞を PBS で洗浄した後、RNAiso Plus (タカラバイオ株式会社、大津、滋賀、日本) を 1 mL 添加し、ピペッティングにより細胞を破壊した。細胞溶解液をマイクロチューブに移し、200  $\mu$ L のクロロホルムと混合した後、12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上清を回収し、再度、200  $\mu$ L のクロロホルムと混合した後、12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上清を回収し、500  $\mu$ L のイソプロパノールと混合し、-30 $^{\circ}$ C、over night で静置した。混合溶液を 12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心し、上清を除去した。得られた RNA に冷 70%エタノールを 500  $\mu$ L 添加し、12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。再度、上清を除去し、冷 70%エタノールを 500  $\mu$ L 添加した後、12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上清を除去し、RNA を半透明になるまで乾燥させた。RNA に diethylpyrocarbonate (DEPC) 水を加え、10 分間、氷中に静置した。RNA 溶液を 1  $\mu$ L 採取し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e) で 260 nm 及び 280 nm の吸光度で RNA 量を算出し、Prime Script RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて逆転写を行った。

Real-Time PCR は SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社) を用いて、Step One Plus<sup>TM</sup> Real Time PCR system (Life Technologies



Corporation, Foster City, CA, USA)で行った。本研究では、I型  $\alpha$ I コラーゲン (collagen, alpha I, type I: *COL1A1*)、*DCN*、*ELN*、*LOX*、*SMAD2* 及び *SMAD3* の遺伝子発現量に対する影響を評価した。各遺伝子発現量は、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) で補正し、normal を「1」とした時の相対値で評価した。評価を行った遺伝子のプライマー配列は Table 2 に示した。

**Table 2 Primers used for real-time PCR**

Primer	Forward Primer	Reverse Primer
<i>COL1A1</i>	5'-CCGCCGCTTCACCTACAGC-3'	5'-TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC-3'
<i>DCN</i>	5'-TGTCATAGAACTGGGCACCAAT-3'	5'-GGAAAGCCCCATTTTCAATTC-3'
<i>ELN</i>	5'-GGGCAATTCCTGGAATTGGA-3'	5'-CTGCTTCTGGTGACACAACCC-3'
<i>LOX</i>	5'-TTGTGCGCTGTGACATTCG-3'	5'-TTCCCACTTCAGAACACCAGG-3'
<i>Smad2</i>	5'-ACTAACTCCCAGCAGGAAT-3'	5'-GTTGGTCACTTGTTTCTCCA-3'
<i>Smad3</i>	5'-CTGTGTGAGTTCGCCTTCAA-3'	5'-AATGGCTGTAGTCGTCCAGT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'

#### 1-2-6. Competitive Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

培地中のコラーゲンは、ELISA 法を用いて測定した。1.25  $\mu$ g/mL のヒト I 型コラーゲン溶液 (第一ファインケミカル株式会社、高岡、富山、日本) を ELISA 用 96well プレート (AGC テクノガラス株式会社) に添加し、室温で 24 時間インキュベートし、コラーゲンを固層化した。PBST (0.05% Tween-20 含有 PBS) で各 well を洗浄した後、ブロッキング溶液 (1% BlockAce; DS Pharma Biomedical, 大阪、日本) を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。

正常ヒト皮膚線維芽細胞を  $8.0 \times 10^4$  cells/well になるように培養用 96well プレート (AGC テクノガラス株式会社、双葉、千葉、日本) に播種した。正常ヒト

皮膚線維芽細胞に各 CS を添加し、72 時間インキュベートした後、培地を回収した。また、細胞は、タンパク抽出液 (2% sodium dodecyl sulfate (SDS)、10% Glycerol、6.27 mM Tris-HCl、pH 6.8) を用いてタンパク質を抽出し、Lowry 法にてタンパク質の定量を行った。回収した培地とビオチン標識抗コラーゲン抗体 (Biotin-anti-type I collagen antibody; Rockland、Limerick、PA、USA) を等量混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。コラーゲン固定化プレートを PBST で洗浄し、ビオチン標識抗コラーゲン抗体と混合した培地を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。コラーゲン固定化プレートを PBST で洗浄し、西洋ワサビペルオキシターゼ (horseradish peroxidase: HRP) 標識ストレプトアビジン (R&D Systems、Minneapolis、MN、USA) を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine 溶液 (R&D Systems) を添加し、10 分間静置した。マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e) で 450 nm の吸光度を測定し、コラーゲンタンパク質を定量した。検量線は、ヒト I 型コラーゲン溶液 (第一ファインケミカル株式会社) を用いて、0、0.078、0.158、0.313、0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で作成した。

#### 1-2-7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-Poly-Acrylamide Gel

##### Electrophoresis: SDS-PAGE) 用ゲル

分離ゲル溶液 (精製水 9.13 mL、30% アクリルアミド、7.6 mL、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 5.7 mL、10% SDS 227  $\mu\text{L}$ 、10% ammonium peroxodisulfate 76  $\mu\text{L}$ 、tetramethylethylenediamine 11.3  $\mu\text{L}$ ) を調製した。調製した分離ゲル溶液を二枚のガラス板の間に流し込み、その上に水飽和 1-ブタノールを乗せ、40 分間静置した。濃縮ゲル溶液 (精製水 3.85 mL、30% アクリルアミド、1.1 mL、0.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 1.7 mL、10% SDS 67  $\mu\text{L}$ 、10% ammonium peroxodisulfate 22.7  $\mu\text{L}$ 、

tetramethylethylenediamine 6.7  $\mu$ L) を調製した。調製した濃縮ゲル溶液をガラス板の間に流し込み、15 well コームを挿し込み、40 分間静置し、ゲルを固めた。

#### 1-2-8. ウェスタンブロット法

正常ヒト皮膚線維芽細胞は、 $0.5 \times 10^5$  cells/dish になるように 60 mm ディッシュに播種した。正常ヒト皮膚線維芽細胞に各種 CS を添加し、24 時間培養した。細胞を PBS で洗浄した後、タンパク質抽出液 (2% SDS、10% Glycerol、6.27 mM Tris-HCl、pH 6.8) を添加し、可溶化した。可溶化したタンパク質は、Lowry 法にて定量し、濃度が同じになるように調整した。SDS-PAGE 用サンプルバッファー (2.5 mM Tris-HCl、2% SDS、10% glycerol、1% bromophenol blue) に等量で混合し、95°C で 3 分間加温した。7%ゲルを泳動槽にセットした。U 字ガスケット内に泳動用バッファー (2.5 mM Tris、0.19 M グリシン、0.1% SDS) を注いだ。泳動槽を電源 (パワーパック HC; BioRad、Hercules、CA、USA) に繋ぎ、200 V、3 A、300 W で泳動した。トランスブロットセルのタンクに転写用バッファー (2.5 mM Tris、0.19 M グリシン、15%メタノール) を注いだ。トランスブロットセルのタンクにアイスブロックを入れセットした。セルセッティングブロックでゲル及び親水化処理を行なったポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride: PVDF) 膜をセットした。トランスブロットセルのタンクを電源に繋ぎ、100 V、3 A、300 W で 40 分間転写した。転写後、PVDF 膜を TBS-T (1% Tween-20、0.13 M NaCl、2.0 mM Tris-HCl、pH 7.2) に 15 分間浸盪し、これを 3 回繰り返した。PVDF 膜を洗浄した後、ブロッキングバッファー (5% skim milk、1% Tween-20、0.13 M NaCl、2.0 mM Tris-HCl、pH 7.2) で 1 時間浸盪した。ブロッキング後、PVDF 膜を 1 次抗体反応 (Rabbit Anti-elastin polyclonal antibody, Unconjugated; Bioss、Woburn、MA、USA、 $\beta$ -actin (13E5) Rabbit mAb; Cell signaling technology

Inc., Danvers, MA, USA) を over night で行なった。1次抗体反応後、PVDF膜を TBS-T で 15 分間洗浄し、これを 3 回繰り返した。PVDF 膜を洗浄した後、2次抗体反応 (ECL<sup>TM</sup> Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody from Donkey; GE healthcare、 Little Chalfont、 Buckinghamshire、 UK) を 1 時間行なった。2次抗体反応後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、これを 3 回繰り返した。検出試薬 (ECL Prime western blotting detection、 Bio-Rad) を PVDF 膜へ添加し、ルミノイメージアナライザー LAS-1000 plus (富士フィルム、東京、日本) を用いて ELN タンパク質のバンドを検出した。検出したバンドは、マルチゲージソフトウェア (富士フィルム) を用いて分析した。

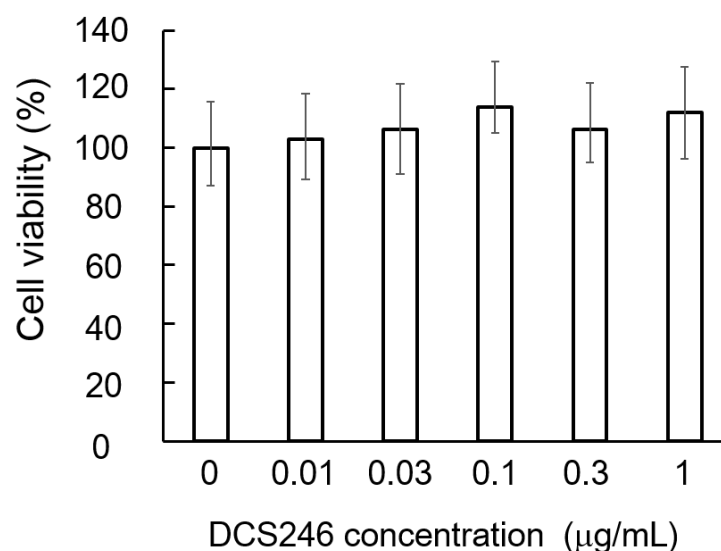
#### 1-2-9. データ解析

データの解析は、SAS 統計解析システム ver. 9.2 を使用し、 $p$  値を算出した。統計解析法は、*Tukey* の多重検定または *Student* の  $t$  検定で行った。

### 1-3. 結果

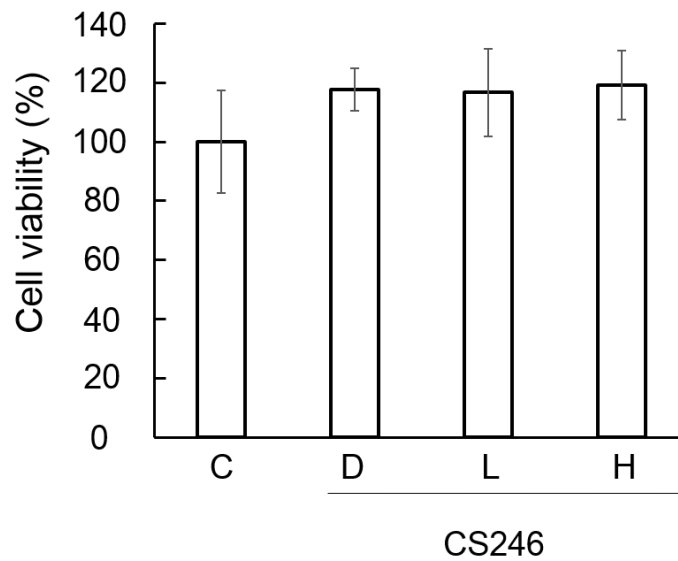
#### 1-3-1. CS246 の細胞毒性への影響

培養正常ヒト皮膚線維芽細胞に DCS246 を添加し、24 時間後に細胞生存率を測定した。DCS246 は、いずれの濃度でも細胞生存率に影響を与えなかった ( $p>0.05$ ) (Fig. 3)。また、正常ヒト皮膚線維芽細胞を 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の DCS246、LCS246 または HCS246 で処理し、24 時間後に細胞生存率を測定した。いずれの CS も線維芽細胞に対する細胞生存率に影響を与えなかった ( $p>0.05$ ) (Fig. 4)。



**Fig. 3 Effects of various concentrations of DCS246 on cell viability in normal human dermal fibroblasts (NHDFs).**

NHDFs were treated for 24 h with DCS246 of different concentrations. Cell viability was determined by MTT assay. Values are means  $\pm$  S.D. (n = 4).

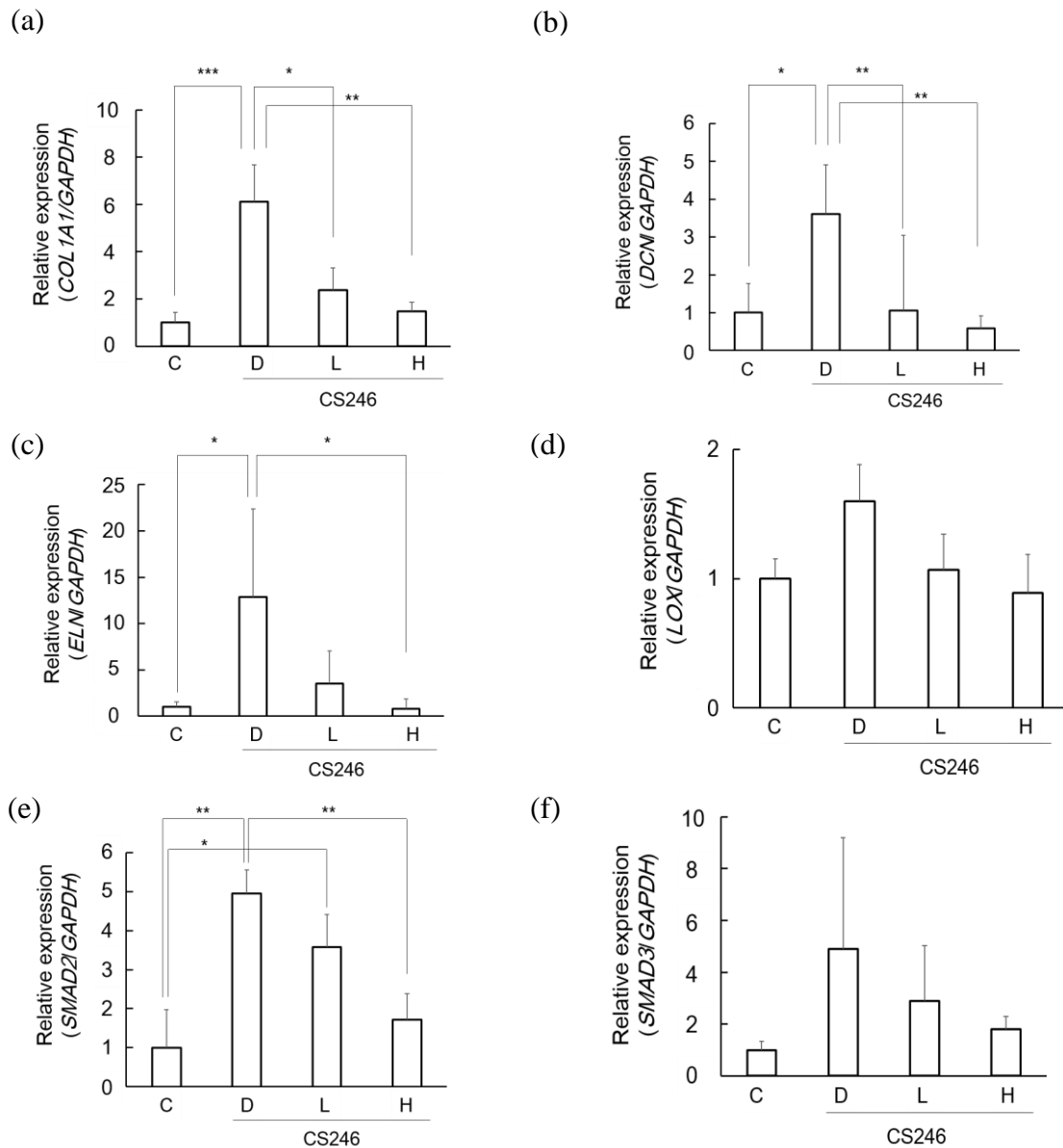


**Fig. 4 Effects of various molecular weights of CS246 on cell viability of NHDFs.**

NHDFs were treated for 24 h with CS (concentration: 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cell viability was determined by MTT assay. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ). C is control (untreated), D is disaccharide CS, L is low molecular weight CS and H is high molecular weight CS.

### 1-3-2. 分子量の異なる CS246 の各種遺伝子発現量への影響

培養正常ヒト皮膚線維芽細胞に分子量の異なる CS246 を添加し、12 時間後に RNA を回収した。*COL1A1*、*DCN*、*ELN*、*LOX*、*SMAD2* 及び *SMAD3* の遺伝子発現量を、real-time PCR で測定した。DCS246 処理では、control 及び HCS246 処理と比較し、*COL1A1*、*DCN*、*ELN* 及び *SMAD2* の遺伝子発現量が有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5a-c, 5e)。特に、DCS246 は、他のすべての群と比較して *COL1A1* 及び *DCN* の遺伝子発現量を有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5a, b)。さらに、DCS246 処理は、control と比較して *LOX* 及び *SMAD3* の遺伝子発現量を増加する傾向が見られた ( $0.05 < p < 0.1$ )。一方、LCS246 が *SMAD2* の発現量を有意に増加させ ( $p < 0.05$ )、*COL1A1* の発現量を増加させる傾向を示した ( $0.05 < p < 0.1$ )。一方、HCS246 処理は、いずれの遺伝子発現量にも影響を与えなかった ( $p > 0.1$ ) (Fig. 5)。



**Fig. 5 Effects of various molecular weights of CS246 on mRNA expression levels of extracellular matrix-related proteins in NHDF.**

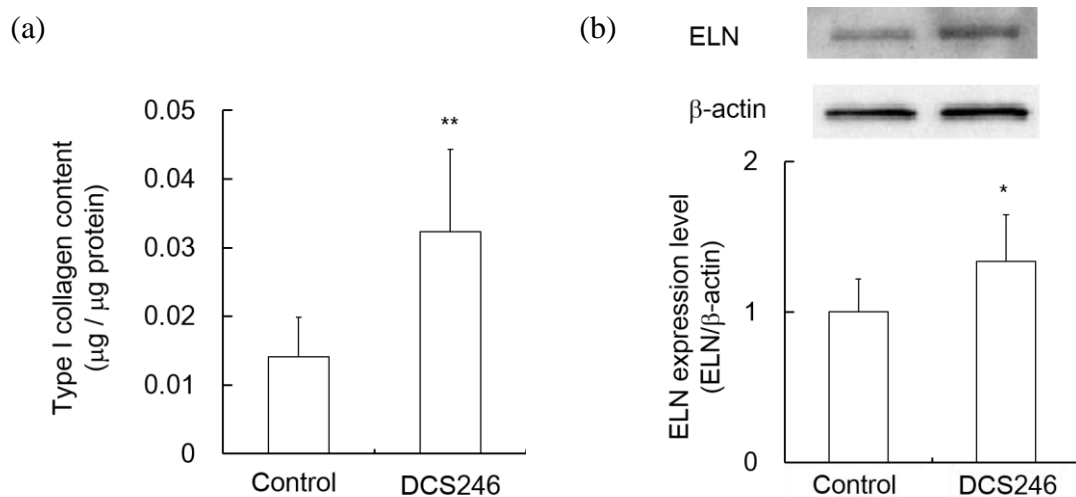
NHDFs cells were incubated with 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of various molecular weight of CS246 (or medium) and gene expression levels were determined for (a) *COL1A1*, (b) *DCN*, (c) *ELN*, (d) *LOX*, (e) *SMAD2* and (f) *SMAD3*. Gene expression was measured by real-time PCR after exposure to CS for 12 h. Results show relative quantification where gene expression in control samples is “1”. mRNA levels were normalized by dividing by the quantity of *GAPDH* in each sample. Values are means  $\pm$  S.D. (n = 3-4). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , as compared with untreated cells. Statistical analysis was conducted using *Tukey's* multiple statistical tests. C is control (untreated), D is disaccharide CS, L is low molecular weight CS and H is high molecular weight CS.

### 1-3-3. DCS246 の I 型コラーゲンタンパク質発現量への影響

正常ヒト皮膚線維芽細胞に DCS246 を添加し、72 時間培養後、培地中の I 型コラーゲンタンパク質を ELISA で定量した。DCS246 処理では、control と比較して、I 型コラーゲンのタンパク質発現量が有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6a)。

### 1-3-4. DCS246 の ELN タンパク質発現量への影響

正常ヒト皮膚線維芽細胞に DCS246 を添加し、48 時間培養後、細胞内 ELN タンパク質をウエスタンブロットで定量した。DCS246 処理は、control と比較して、ELN タンパク質発現量を有意に増加させた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6b)。



**Fig. 6 Effects of DCS246 on type I collagen and ELN proteins expression levels in NHDFs.**

Proteins expression levels were determined by ELISA (a) and Western blotting (b). The band of ELN and β-actin were detected about 65 kDa and 45 kDa. Values are means ± S.D. (n = 3-6). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , compared with untreated cells (control).

Statistical analysis was conducted using *Student's* t-tests.



#### 1-4. 考察

本章では、培養正常ヒト皮膚線維芽細胞における分子量の異なる CS246 の線維形成関連タンパク質発現に対する作用に着目し、検討することを目的とした。

初めに、CS246 の細胞毒性を MTT 試験で測定した。DCS246 は、0~0.3  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で細胞毒性を評価した。また、LCS246 または HCS246 は、0.3  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で細胞毒性を評価した。その結果、CS246 は、細胞数に影響を与えなかったことから、0.3  $\mu\text{g/mL}$  までの濃度の CS246 には細胞毒性がないことが示唆された。

次に、培養正常ヒト皮膚線維芽細胞に分子量の異なる CS246 を適用し、12 時間後に線維形成関連タンパク質の遺伝子発現量を評価した。DCS246 は、*COL1A1*、*DCN*、*ELN* 及び *SMAD2* の発現量を有意に増加させた。しかし、HCS246 は、これらの遺伝子発現量に影響を与えなかった。また、本研究では、DCS246 の線維形成に関与していることを検討するために、線維形成に主要なタンパク質である I 型コラーゲン、*ELN* 発現量に対する影響を検討した。その結果、DCS246 は、培養正常ヒト皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲン及び *ELN* タンパク質発現量を、有意に増加させたことから、DCS246 は、線維形成促進作用を持つことが示唆された。このことから、CS は分子量によって線維形成関連タンパク質発現に与える影響が異なることが示されたが、その作用機構は、不明なままである。

DCS246 の線維形成関連タンパク質発現促進作用の機構については、DCS246 が「直接細胞内へ取り込まれることによる発現誘導の可能性」と「受容体に結合することによる発現誘導の可能性」が考えられる。まず、CS が細胞内に直接取り込まれる機構としては、受動拡散による細胞内取り込み、能動輸送による細胞内取り込み及びエンドサイトーシスによる細胞内取り込みが考えられる。

細胞膜は、リン脂質を主要構成成分として脂質二重層を形成している<sup>37)</sup>。脂質二重層を形成しているリン脂質は、疎水性部位が細胞外側に存在しているために、親水性分子が受動拡散で細胞膜を透過しにくいと考えられている。また、スクロース (342 Da) やマンニトール (182 Da) は、分子半径がそれぞれ 4.5 Å 及び 4.0 Å であり、細胞膜の細孔が 4.0 Å とされているため、透過しないと考えられている<sup>38)</sup>。このことから、DCS246 (707.4 Da) は、スクロースやマンニトールよりも分子量が大きいため、細胞膜を受動拡散により透過しないことが考えられる。上皮細胞は、3-O-methylglucose、6-deoxyglucose 及び  $\alpha$ -methylglucoside のような単糖を能動輸送により細胞内に取り込んでいることが報告されている<sup>39)</sup>。また、赤血球は、単糖を能動輸送で取り込んでいることが報告されている<sup>40)</sup>。線維芽細胞は、グルコースを細胞内に取り込むトランスポーター (glucose transporter: GLUT) が存在することが報告されている<sup>41)</sup>。しかし、これらの報告は、単糖の細胞内取り込みの報告であるため、能動輸送により DCS が取り込まれることは考えにくい。また、代表的な二糖であるスクロース (ショ糖) は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが報告されている<sup>42)</sup>。HA は、高分子多糖であるにも関わらず RHAMM (Receptor of hyaluronic acid mediated-motility) や HARE (Hyaluronic acid receptor for endocytosis) のようなタンパク質との結合を介し、エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれることが報告されている<sup>43), 44)</sup>。また、肝細胞は、HARE を介して CS を細胞内に取り込んでいると考えられている<sup>45), 46)</sup>。実際に、CS (CS4、CS6、CS26、CS46) は、HARE に結合することや、CS が HARE に結合することによって HA の HARE を介した NF- $\kappa$ B 遺伝子の発現促進作用を抑制する報告がされている<sup>47), 48)</sup>。したがって、CS は、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれることによって、線維形成関連タンパク質の発現を増加させていることが考えられる。

本研究において、DCS246は、SMAD2及びSMAD3の遺伝子発現量を増加させた。SMAD2及びSMAD3は、ELNカスケード（SMAD/TGF- $\beta_1$ 経路）のタンパク質である。また、*in vitro*の研究においてCSがTGF- $\beta$ と相互作用すること<sup>49)</sup>や、軟骨細胞においてTGF- $\beta$ やCSを単独で処理してもERKに影響がないのに対し、TGF- $\beta$ とCSを同時に処理することによってERKが活性化することが報告されている<sup>50)</sup>。そして、TGF- $\beta$ は、コラーゲン及びLOXの発現を誘導する<sup>51)</sup>、<sup>52)</sup>ことが報告されており、本研究の結果と類似している。このことから、CS246の線維形成促進作用は、細胞外でのTGF- $\beta$ シグナル伝達系を介している可能性が考えられる。CSの受容体は、前述したHARE以外にも存在する。例えば、CD44は、CSが結合することにより、HAの炎症作用を阻害することが報告されている<sup>53)</sup>。エラスチン結合タンパク質（elastin binding protein: EBP）は、血管平滑筋細胞において、CSが結合することにより、ELNタンパク質の発現を増加させることが報告されている<sup>54)</sup>。また、線維芽細胞においてEBPは、細胞増殖を促進することが報告されている<sup>55)</sup>。Contactin-1は、CS4やCS6は親和性を示さないが、CS46が結合することにより神経細胞の神経突起伸長を促進することが報告されている<sup>56)</sup>。そして、N-cadherinとcadherin-11は、CS4と親和性を示さないが、マウス骨芽細胞（MC3T3-E1）において、CS46が結合することにより、細胞増殖を促進することが報告されている<sup>57)</sup>。DCS246は、これらの受容体と相互作用している可能性がある。しかしながら、CSとCS受容体の親和性は、CSの硫酸化度によって異なる。そのため、高度に硫酸化されたCS246は、他CSと異なる受容体と結合していることも考えられる。DCS246の線維形成タンパク質発現促進作用は、これらの受容体やTGF- $\beta$ に関係していることが考えられるが、詳細は不明である。受容体探索は、今後の課題であると考えられる。

## 第2節 培養ヒト皮膚線維芽細胞の酸化ストレス障害に対する

### 二糖コンドロイチン硫酸の効果

#### 2-1. 緒論

第1章第1節では、DCS246が線維芽細胞の線維形成関連タンパク質の産生を促進させることを明らかにした。前述したとおり、真皮に存在する線維芽細胞は、皮膚の支持体である細胞外マトリックスを産生する重要な役割を果たしていることが知られている。

皮膚線維芽細胞では、UVによって、細胞内に活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）が発生し<sup>58) -61)</sup>、細胞外マトリックス分解酵素の産生<sup>62) -64)</sup>、DNAへのダメージによる細胞死<sup>65) -68)</sup>、炎症性サイトカインの産生促進<sup>69) ,70)</sup>及び過酸化脂質の産生促進<sup>71)</sup>などが誘導されることが報告されている。

過酸化水素（ $\text{H}_2\text{O}_2$ ）は、ROSの一種であり、弱い酸化作用を示すことが知られている。一般的に $\text{H}_2\text{O}_2$ は、抗菌作用及び細胞増殖といった生理的作用に関与することが報告されている<sup>72) -74)</sup>。また、 $\text{H}_2\text{O}_2$ は、ROSの中でも寿命が長く、強い酸化作用を持つヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）に変換されることが知られている。 $\text{H}_2\text{O}_2$ は、UV照射により皮膚線維芽細胞において過剰産生されることが報告されている<sup>75)</sup>。また、 $\text{H}_2\text{O}_2$ は、細胞膜を容易に透過することから、線維芽細胞内に発生した $\text{H}_2\text{O}_2$ を除去することは、健康な皮膚の維持に繋がることが考えられる。

HCS4は、酸化ストレス障害を与えた線維芽細胞の細胞生存率を増加させること、カタラーゼ（catalase: CAT）及びスーパーオキシドディスムターゼ（superoxide dismutase: SOD）の活性を増加させること、DNAの断片化を抑制することや細

胞内 $\cdot\text{OH}$ 濃度を減少させることが報告されている<sup>16)</sup>。しかし、これらの報告は、すべてHCSの報告であり、DCSの報告は存在しない。

本節では、 $\text{H}_2\text{O}_2$ を添加し、酸化ストレス障害を与えた培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、各種CSが細胞生存率、細胞内ROS量、CAT活性に与える影響を検討し、CSの構造と抗酸化作用の関連を検討した。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 実験材料

DCS ( $\Delta$ UA $\rightarrow$ GalNAc-4S Na<sub>2</sub>、 $\Delta$ UA $\rightarrow$ GalNAc-6S Na<sub>2</sub>、 $\Delta$ UA-2S $\rightarrow$ GalNAc-4S Na<sub>3</sub>、 $\Delta$ UA-2S $\rightarrow$ GalNAc-6S Na<sub>3</sub>、 $\Delta$ UA $\rightarrow$ GalNAc-4S-6S Na<sub>4</sub>、 $\Delta$ UA-2S $\rightarrow$ GalNA-4S-6S Na<sub>2</sub>) は、Dextra Laboratories (Earley Gate, Reading, UK) から購入した。MTT は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。Dichlorohydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。本章で用いた CS の組成を Table 3 に示した。

**Table 3 Types of chondroitin sulfate in this study.**

Types of CS	Unit	components	M. W. (Da)
DCS4	Disaccharide	GlcA + GalNAc (4S)	503.3
DCS6	Disaccharide	GlcA + GalNAc (6S)	503.3
DCS24	Disaccharide	GlcA (2S) + GalNAc (4S)	605.4
DCS26	Disaccharide	GlcA (2S) + GalNAc (6S)	605.4
DCS46	Disaccharide	GlcA + GalNAc (4S, 6S)	605.4
DCS246	Disaccharide	GlcA(2S) + GalNAc (4S, 6S)	707.42
HCS4	High molecular	GlcA + GalNAc (4S)	-
HCS6	High molecular	GlcA + GalNAc (6S)	-

- : unknown

### 2-2-2. 細胞培養

正常ヒト皮膚線維芽細胞を 10% FBS 含有 DMEM で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。細胞は、 $0.25 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、培養した。

### 2-2-3. MTT 試験による細胞生存率測定

正常ヒト皮膚線維芽細胞を  $0.5 \times 10^5$  cells/dish になるように 24 well 培養用プレート (AGC テクノガラス株式会社) に播種し、24 時間培養した。正常ヒト皮膚線維芽細胞に 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及び各種 CS を添加し、24 時間培養した。MTT を PBS で 5 mg/mL の濃度になるように調製し、濾過滅菌をした。培地と MTT 溶液を 9:1 の割合で混合した。正常ヒト皮膚線維芽細胞を PBS で洗浄後、MTT 混合培地を添加し、3 時間インキュベートした。細胞を PBS で洗浄後、0.04 mol HCl/isopropyl alcohol を添加し、ホルマザンを溶解した。ホルマザン溶解液をマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e) で 570 nm の吸光度を測定し、分子量の異なる各種 CS の細胞毒性を評価した。細胞生存率は、normal を 100% とした時の相対値で評価した。

### 2-2-4. 細胞内 ROS 測定

正常ヒト皮膚線維芽細胞を  $0.5 \times 10^5$  cells/dish になるように 24 well 培養用プレート (AGC テクノガラス株式会社) に播種し、24 時間培養した。正常ヒト皮膚線維芽細胞に 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及び各種 CS を添加し、24 時間培養した。細胞を PBS で洗浄後、20 μM H<sub>2</sub>DCFDA を添加し、30 分間インキュベートした。細胞を PBS で洗浄後、0.1% TritonX-100 を添加し、細胞を溶解し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e) で蛍光強度を測定した (励起波長: 502 nm, 蛍光波長: 523 nm)。また、タンパク質量は、Lowry 法にて測定した。細胞内 ROS 量は、normal を「1」

とした時の相対値で評価した。

#### 2-2-5. CAT 活性測定

正常ヒト皮膚線維芽細胞を  $0.5 \times 10^5$  cells/dish になるように 24 well 培養用プレート (AGC テクノガラス株式会社) に播種し、24 時間培養した。CAT の活性は、Fujimoto の方法で測定した<sup>71)</sup>。正常ヒト皮膚線維芽細胞に  $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  及び各種 CS を添加し、24 時間培養した。細胞を PBS で洗浄後、タンパク抽出液 (2% Triton X-100) を添加し細胞を溶解させた。細胞溶解液と等量の  $20 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  含有イミダゾール HCL バッファーを混和し、30 分間反応させた。Ti (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 溶液 (10% Ti (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) と混和し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e) で 410 nm の吸光度を測定した。

#### 2-2-6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去能測定

$100 \mu\text{g/mL CS}$  及び  $50 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  を混合した。1、2 時間及び 24 時間後に、混合液を採取し、Ti (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 溶液と混和したものを測定に供した。マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e) で 410 nm の吸光度を測定し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度を測定した。

#### 2-2-7. Real-Time PCR

正常ヒト皮膚線維芽細胞を  $0.5 \times 10^5$  cells/dish になるように 60 mm ディッシュ (AGC テクノガラス株式会社) に播種した。正常ヒト皮膚線維芽細胞に各種 CS を添加し、24 時間培養した。細胞を PBS で洗浄した後、RNAiso Plus を 1 mL 添加し、ピペッティングにより細胞を破壊した。細胞溶解をマイクロチューブに移し、 $200 \mu\text{L}$  のクロロホルムと混合した後、 $12,000 \times \text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$  で 15 分間遠心した。上清を回収し、再度、 $200 \mu\text{L}$  のクロロホルムと混合した後、 $12,000 \times \text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$



で 15 分間遠心した。上清を回収し、500  $\mu$ L のイソプロパノールと混合し、-30°C、over night で静置した。混合溶液を 12,000 $\times$ g、4°C で 15 分間遠心し、上清を除去した。得られた RNA に冷 70%エタノールを 500  $\mu$ L 添加し、12,000 $\times$ g、4°C で 15 分間遠心した。再度、上清を除去し、冷 70%エタノールを 500  $\mu$ L 添加した後、12,000 $\times$ g、4°C で 15 分間遠心した。上清を除去し、RNA を半透明になるまで乾燥させた。RNA に DEPC 水を加え、10 分間、氷中に静置した。RNA 溶液から 1 $\mu$ L 採取し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e) で 260 nm 及び 280 nm の吸光度で RNA 量を算出し、PrimeScript RT reagent Kit を用いて逆転写を行った。

Real-Time PCR は SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社) を用いて、Step One Plus™ Real Time PCR system (Life Technologies Corporation) で行った。本研究では、*CAT* の遺伝子発現量を測定した。各遺伝子発現量は、*GAPDH* で補正し、normal を「1」とした時の相対値で評価した。評価を行った遺伝子のプライマー配列は、Table 4 に示した。

**Table 4 Primers used for real-time PCR**

Primer	Forward Primer	Reverse Primer
<i>CAT</i>	5'-CCATTATAAGACTGACCAGGGC -3'	5'-AGTCCAGGAGGGGTACTTTCC -3'
<i>GAPDH</i>	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'.

#### 2-2-8. *CAT* 活性抑制剤を用いた細胞生存率測定

*CAT* 活性阻害剤として、3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) を用いた。正常ヒト皮膚線維芽細胞を  $0.5 \times 10^5$  cells/dish の細胞数になるように 24 well 培養用プレート (AGC テクノガラス株式会社) に播種し、24 時間培養した。正常ヒト皮膚線維

芽細胞に 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 、各種 CS 及び 20  $\mu\text{M}$  3-AT を同時に添加し、24 時間培養した。MTT 試験により細胞生存率に対する影響を検討した。細胞生存率は、normal を 100%とした時の相対値で評価した。

#### 2-2-9. UVA 照射

正常ヒト皮膚線維芽細胞を  $0.5 \times 10^5$  cells/dish になるように 60 mm ディッシュ (AGC テクノガラス株式会社) に播種した。培地を PBS に交換し、UVA (10  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) を照射した。各種 CS を含有した培地に交換し、24 時間培養した。MTT 試験により細胞生存率を測定した。細胞生存率は、normal を 100%とした時の相対値で評価した。

#### 2-2-10. データ解析

データの解析は、SAS 統計解析システム ver. 9.2 を使用し、 $p$  値を算出した。統計解析法は、*Tukey* 及び *Dunnett* の多重検定を用いた。

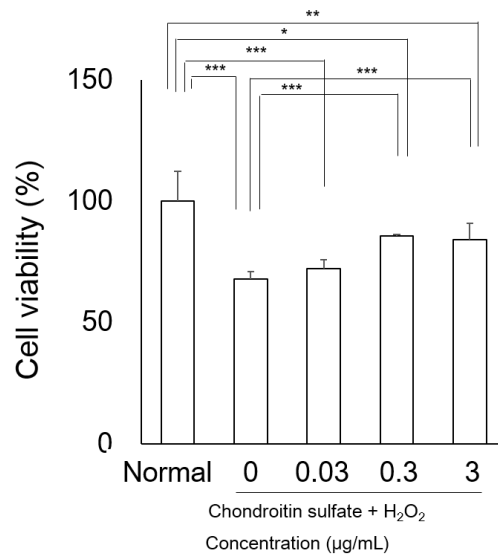
## 2-3. 結果

### 2-3-1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理線維芽細胞における種々 CS の細胞生存率に対する影響

細胞生存率は、MTT 試験で評価した。最初に、DCS4 を用いて 0~3 µg/mL で検討を行なった (Fig. 7)。DCS4 は、濃度依存的に細胞生存率を増加させた ( $p < 0.001$ )。また、DCS4 は、0.3 µg/mL で細胞生存率が一定となったことから、以降の検討は、0.3 µg/mL で行なった。

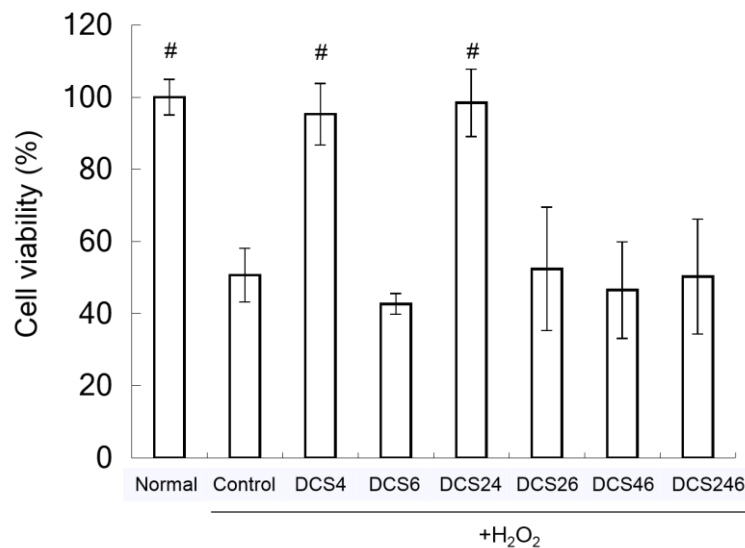
次に、種々 DCS を用いて H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理線維芽細胞の細胞生存率に対する影響の検討を行なった (Fig. 8)。DCS4 処理及び DCS24 処理は、control (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理のみ) 及びその他の CS 処理と比較して細胞生存率が有意に増加した ( $p < 0.001$ )。また、その他の CS 処理は、細胞生存率に影響を与えなかった ( $p > 0.05$ )。各群の  $p$  値は、Table 5 に示した。

さらに、分子量の異なる CS を用いて H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理線維芽細胞の細胞生存率に対する影響を検討した。CS は、CS4 及び CS6 を用いた。その結果、CS4 については、control と比較して DCS4 処理で細胞生存率が増加したのに対し ( $p < 0.001$ )、HCS4 処理においては、細胞生存率に影響が認められなかった ( $P > 0.05$ )。一方、CS6 については、DCS6 処理及び HCS6 処理のどちらにおいても control と比較して細胞生存率に影響が見られなかった ( $p > 0.05$ ) (Fig. 9)。



**Fig. 7 Effects of various concentrations of DCS4 on cell viability in NHDFs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

NHDFs were treated 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. NHDFs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were exposed to DCS4 for 24 h. Values are the mean ± S.D. (n = 4), \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, Tukey's post hoc multiple comparisons test.



**Fig. 8 Effects of CS treatments on the cell viability in NHDFs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

NHDFs were treated 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. NHDFs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were exposed to different types of CS for 24 h. Control was the treatment of only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Values are the mean ± S.D. (n = 4). The “#” symbol group had a significant difference with compared to the no symbol group. Tukey's post hoc multiple comparisons test.

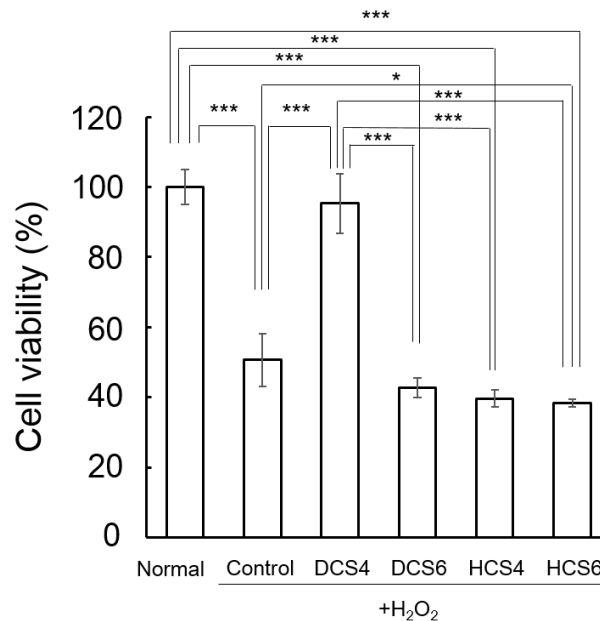
**Table 5 Significant differences observed between the samples in figure 10 (*p* values).**

	Normal	Control	DCS4	DCS6	DCS24	DCS26	DCS46	DCS246
Normal	×	***	N.S.	***	N.S.	***	***	***
Control	***	×	***	N.S.	***	N.S.	N.S.	N.S.
DCS4	N.S.	***	×	***	N.S.	***	***	***
DCS6	***	N.S.	***	×	***	N.S.	N.S.	N.S.
DCS24	N.S.	***	N.S.	***	×	***	***	***
DCS26	***	N.S.	***	N.S.	***	×	N.S.	N.S.
DCS46	***	N.S.	***	N.S.	***	N.S.	×	N.S.
DCS246	***	N.S.	***	N.S.	***	N.S.	N.S.	×

N.S.=Not Significant, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Significant differences are shown in gray.

Tukey's post hoc multiple comparisons test.



**Fig. 9 Effects of CS of different molecular weights on the cell viability in NHDFs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

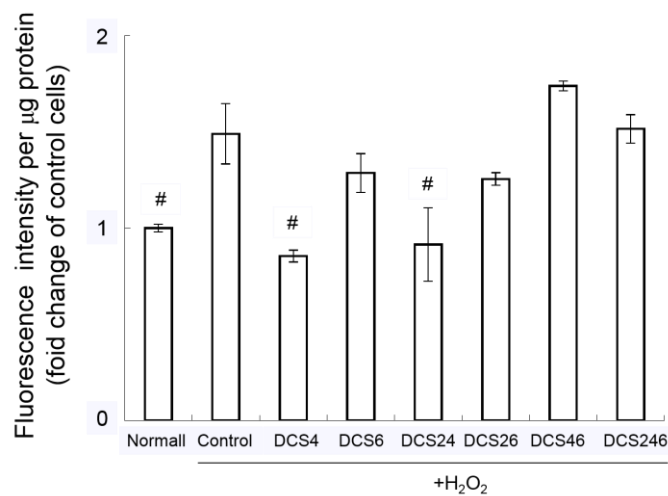
NHDFs were treated with 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and then exposed to CS4 or CS6 of various molecular weights for 24 h. Control was the treatment of only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Values are the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Tukey's post hoc multiple comparisons test.

### 2-3-2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理線維芽細胞における種々CSの細胞内ROS量に対する影響

細胞内ROS量は、H<sub>2</sub>DCFDAを用いて評価した (Fig. 10)。DCS4処理及びDCS24処理では、control (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理のみ) 及びその他のCS処理と比較して細胞内ROS量が有意に減少した ( $p < 0.001$ )。しかし、その他のCS処理では、controlと比較して細胞内ROS量に影響が見られなかった ( $p > 0.05$ )。各群の  $p$  値は、Table 6に示した。

また、分子量の異なるCSを用いて細胞内ROS量に対する影響の検討を行った。CSは、CS4及びCS6を用いた。その結果、CS4は、controlと比較してDCS4) 処理において細胞内ROS量を有意に減少したのに対し ( $p < 0.001$ )、HCS4

処理においては細胞内 ROS 量に影響を与えなかった ( $p > 0.05$ )。一方、CS6 は、DCS6 処理及び HCS6 処理のどちらの群においても control と比較して細胞内 ROS 量に影響を与えなかった ( $p > 0.05$ ) (Fig. 11)。



**Fig. 10 Effects of each disaccharide CS treatment on the intracellular ROS concentrations in NHDFs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

NHDFs were treated 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and then exposed to different types of CS for 24 h. Control was the treatment of only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Values are the mean ± S.D. (n = 4). The “#” symbol group had a significant difference with compared to the no symbol group. *Tukey's* post hoc multiple comparisons test.

**Table 5 Significant differences observed between the samples in figure 11 (*p* values).**

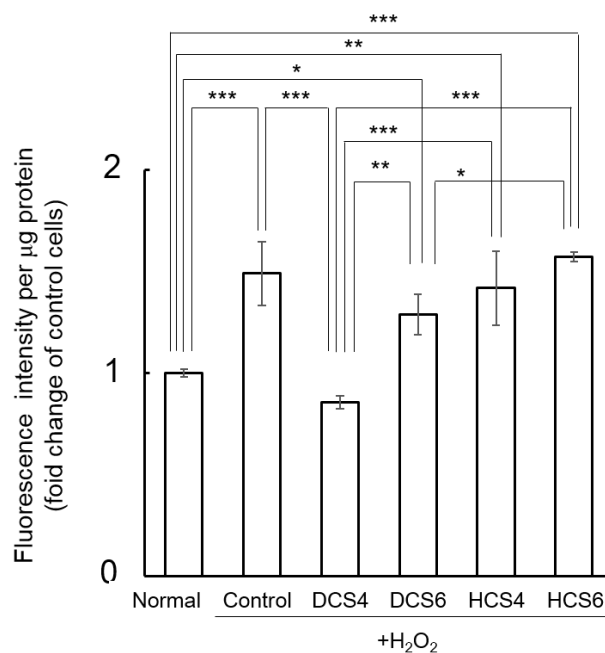
	Normal	Control	DCS4	DCS6	DCS24	DCS26	DCS46	DCS246
Normal	×	***	N.S.	***	N.S.	***	***	***
Control	***	×	***	N.S.	***	N.S.	N.S.	N.S.
DCS4	N.S.	***	×	**	N.S.	**	***	***
DCS6	***	N.S.	***	×	**	N.S.	N.S.	N.S.
DCS24	N.S.	***	N.S.	***	×	**	***	***
DCS26	***	N.S.	***	N.S.	***	×	N.S.	N.S.
DCS46	***	N.S.	***	N.S.	***	N.S.	×	N.S.
DCS246	***	N.S.	***	N.S.	***	N.S.	N.S.	×

N.S. =Not Significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

Significant differences are shown in gray.

Tukey's post hoc multiple comparisons test.



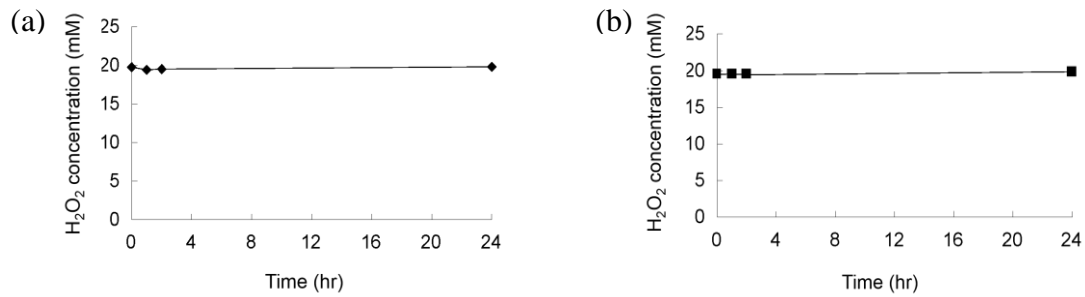


**Fig. 11 Effects of CS of various molecular weights on the intracellular ROS concentrations in NHDFs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

NHDFs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were exposed to CS4 (a) or CS6 (b) of various molecular weight for 24 h. Control was the treatment of only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Values are the mean ± S.D. (n = 3). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Tukey's post hoc multiple comparisons test.

### 2-3-3. DCS (DCS4 及び DCS24) の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去能測定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去能は、DCS (100 µg/ mL) 及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) を混合し、Fujimoto の方法<sup>76)</sup> を用いて H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度を測定した。DCS4 及び DCS24 は、いずれも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度を減少させなかった (Fig. 12)。



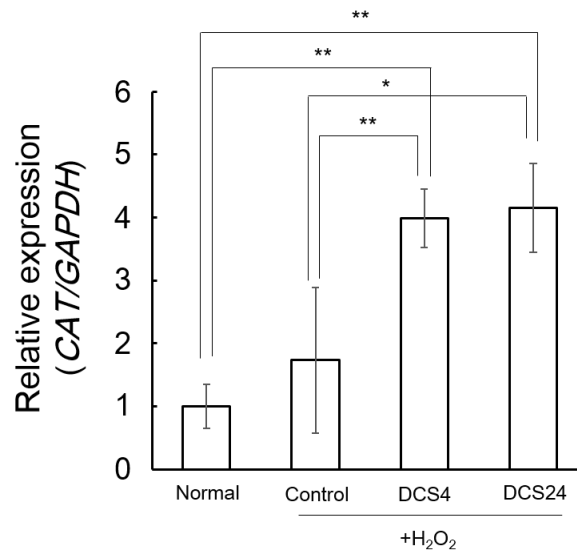
**Fig. 12 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity of disaccharide CS.**

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activities of CS were measured by the *Fujimoto's* method.

DCS4 (a) or DCS24 (b) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) were mixed and incubated at 4°C for 1, 2, and 24 h. Values are the mean ± S.D. (n = 4).

#### 2-3-4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理線維芽細胞における DCS (DCS4 及び DCS24) の CAT 遺伝子発現量に対する影響

CAT 遺伝子発現量を、real-timePCR で測定した。DCS4 処理及び DCS24 処理のどちらにおいても control (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理のみ) と比較して CAT 遺伝子発現量が有意に増加した ( $p < 0.01$ ) (Fig. 13)。

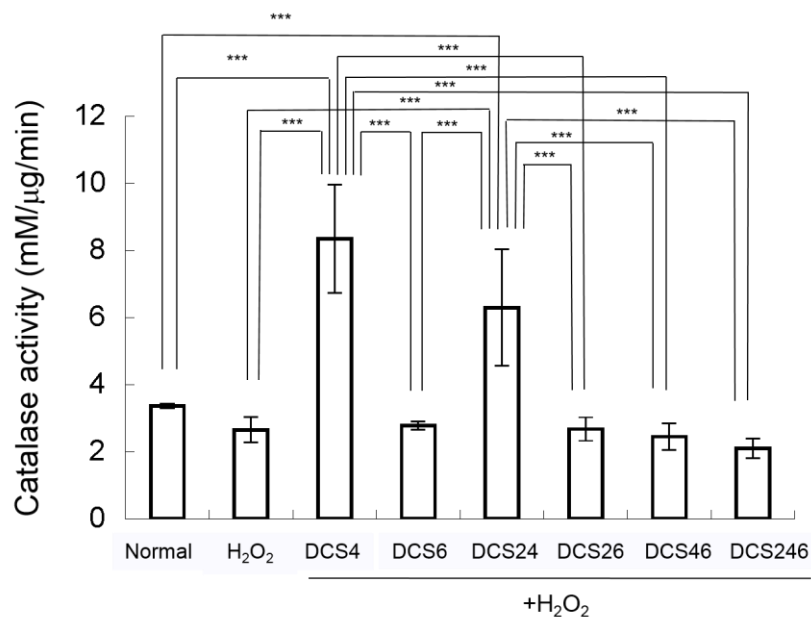


**Fig. 13 Effects of disaccharide CS on the *CAT* gene expression level in  $H_2O_2$ -treated NHDFs.**

*CAT* gene expression level was measured in NHDFs exposed to disaccharide CS (DCS4 or DCS24) and  $H_2O_2$  for 24 h using real-time PCR. Values are the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, Tukey's post hoc multiple comparisons test.

### 2-3-5. $H_2O_2$ 処理線維芽細胞における種々DCSのCAT活性に対する影響

CAT活性を、Fujimotoの方法で測定した。DCS4処理及びDCS24処理は、その他の群と比較してCAT活性を有意に増加させた ( $p$ <0.001)。しかし、その他のCS処理は、controlと比較してCAT活性に影響を与えなかった ( $p$ >0.05) (Fig. 14)。



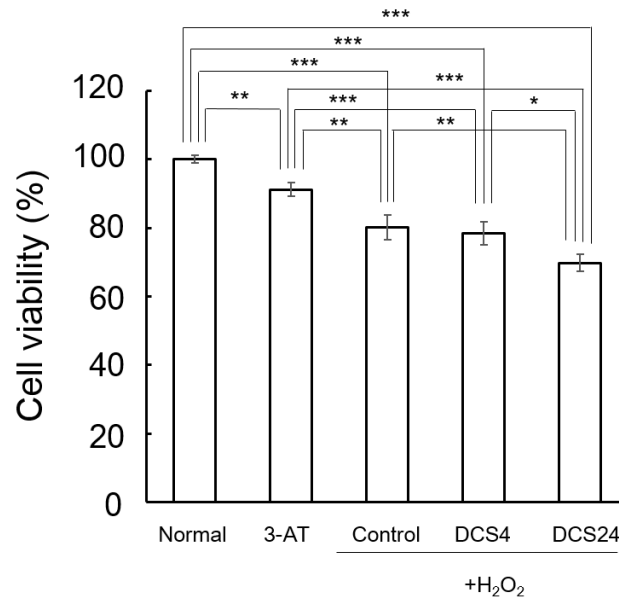
**Fig. 14 Effects of various disaccharide CS on the CAT activity in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated NHDFs.**

CAT activity was measured in NHDFs exposed to CS for 24 h using *Fujimoto's* method. Control was the treatment of only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Values are the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Tukey's post hoc multiple comparisons test.

### 2-3-6. CAT 活性阻害剤 (3-AT) 及び DCS の同時添加による細胞生存率に対する影響

細胞生存率は、MTT 試験を用いて測定した。3-AT 処理は、normal と比較して細胞生存率を有意に減少させた ( $p < 0.05$ )。Control (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理のみ) は、3-AT 処理群及び normal と比較して細胞生存率を有意に減少させた ( $p < 0.05$ )。

DCS4+3-AT 処理及び DCS24+3-AT 処理は、control と比較して細胞生存率に影響を与えなかった。 ( $p > 0.05$ ) (Fig. 15)。

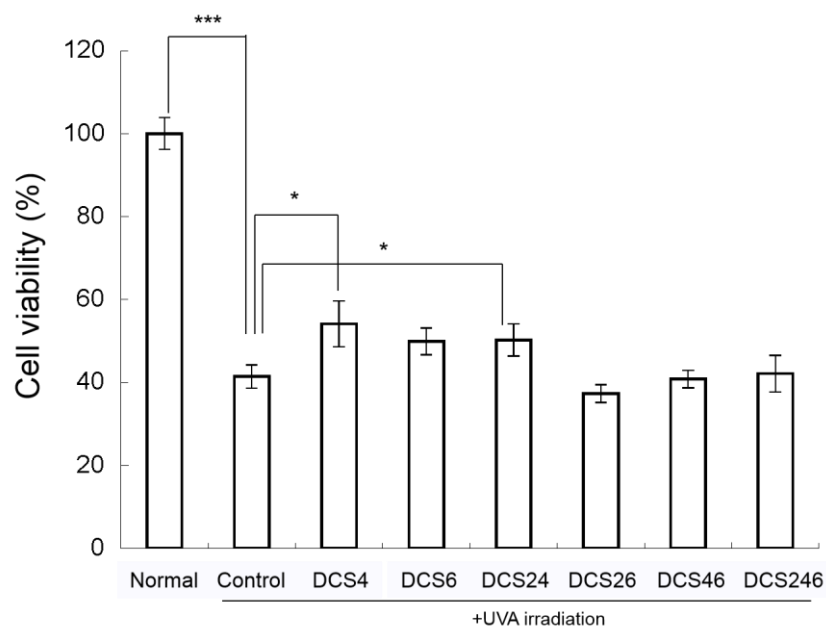


**Fig. 15 Decrease of cell viability by a CAT activity inhibitor (3-AT).**

The effects of  $H_2O_2$ , 3-AT, or chondroitin sulfate disaccharides (DCS4 or DCS24) on the NHDFs viability were examined 24 h after treatments, using MTT assay. Control was the treatment of only  $H_2O_2$ . Values are the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Tukey's post hoc multiple comparisons test.

### 2-3-7. UV 照射線維芽細胞における種々DCS の細胞生存率に対する影響

細胞生存率は、MTT 試験を用いて測定した。DCS4 処理及び DCS24 処理は、control (UV 照射のみ) と比較して細胞生存率を有意に増加させた ( $p < 0.05$ )。また、その他の CS 処理は、control と比較して細胞生存率に影響を与えなかった。( $p > 0.05$ ) (Fig. 16)。



**Fig. 16 Effect of various CSs treatment on viability in NHDFs with irradiated UVA.**

The cell viability effect of various disaccharide CS-treated UVA irradiation NHDFs were measured using MTT assay. Values are the mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , *Dunnet's* post hoc multiple comparisons test.

## 2-4. 考察

本節では、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理及び UV 照射培養ヒト皮膚線維芽細胞における硫酸化度や分子量が異なる CS の細胞生存率に対する影響を検討した。また、 $\text{H}_2\text{O}_2$  処理培養ヒト皮膚線維芽細胞の細胞内 ROS 量、CAT 遺伝子発現量及び CAT 活性に対する CS の影響も検討した。

最初に、線維芽細胞に  $\text{H}_2\text{O}_2$  及び各種 CS を処理し、細胞生存率の測定を行なった。その結果、DCS4 及び DCS24 は、線維芽細胞の細胞生存率を増加させた。しかし、その他の DCS 及び HCS は、細胞生存率に影響を与えなかった。過剰産生された  $\text{H}_2\text{O}_2$  は、 $\cdot\text{OH}$  に変換されることにより細胞死を引き起こす。DCS4 処理及び DCS24 処理した線維芽細胞は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  による細胞死が引き起こされていないことから、 $\text{H}_2\text{O}_2$  が  $\cdot\text{OH}$  に変換される以前に、細胞内の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を除去している可能性が考えられる。

次に、線維芽細胞に  $\text{H}_2\text{O}_2$  及び各種 CS を処理し、細胞内 ROS 量の測定を行なった。その結果、DCS4 及び DCS24 は、線維芽細胞の細胞内 ROS 量を減少させた。しかし、その他の DCS 及び HCS は、細胞内 ROS 量に影響を与えなかった。細胞内 ROS 量は、細胞生存率の結果と相関した結果が得られた。したがって、DCS4 及び DCS24 は、細胞内の ROS を除去することにより、細胞生存率を増加させていることが示唆された。しかし、DCS4 及び DCS24 は、Fujimoto の方法において  $\text{H}_2\text{O}_2$  を直接分解しなかったことから、 $\text{H}_2\text{O}_2$  分解酵素などの活性を増加させ、間接的に分解していることが示唆された。生体内の  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解酵素は、CAT やグルタチオンペルオキシダーゼが良く知られている<sup>77)</sup>。特に、CAT は、CS によって活性が増加することが報告されている<sup>16)</sup>。このことから、DCS は、HCS と同様に、CAT の活性を増加させている可能性が考えられる。そこで、線維芽細胞に  $\text{H}_2\text{O}_2$  及び DCS (DCS4 及び DCS24) を適用し、CAT 遺伝子発現量及び

CAT 活性に及ぼす影響について検討した。その結果、DCS4 及び DCS24 は、CAT 遺伝子発現量及び CAT 活性を増加させた。このことから、DCS4 及び DCS24 は、CAT 活性を増加させることで、間接的に細胞内の ROS を減少させていることが示唆された。そこで、CAT 活性阻害剤である 3-AT を用いて検討したところ、3-AT は DCS4 及び DCS24 の細胞生存率の増加作用を完全に抑制した。このことから、DCS4 及び DCS24 は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理線維芽細胞において CAT 活性を増加させることにより、細胞生存率を増加させていることが示唆された。

また、CS が UV 照射線維芽細胞の細胞生存率へ与える影響を検討した。その結果、DCS4 及び DCS24 は、線維芽細胞の細胞生存率を増加させた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理と UV 照射は、ROS の発生メカニズムが異なる。しかし、DCS4 及び DCS24 は、CAT 活性を増加させることによって、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理した線維芽細胞の細胞生存率を増加させたことから、同様のメカニズムにより細胞生存率を増加させていることが考えられる。また、HCS において、UV 照射線維芽細胞の SOD や CAT 活性を増加させることや、DNA の断片化の抑制が報告されている<sup>16)</sup>。このことから、DCS4 及び DCS24 においても、同様の効果を示している可能性が示唆された。生体内の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去機構には、CAT だけでなく、グルタチオンや SOD のような酵素も存在する。したがって、これらの酵素の影響に対する検討は、今後の課題であると考えている。

本節において、DCS4 及び DCS24 は、酸化ストレス障害を与えた線維芽細胞の細胞生存率を増加させた。DCS4 及び DCS24 の共通した構造の特徴は、どちらも GalNAc の C-6 に硫酸基が結合していないことである。一方、GalNAc の C-6 に硫酸基が結合している CS には、すべて細胞生存率の増加や細胞内 ROS 量の減少が認められなかった。このことから、DCS による酸化ストレス障害線維芽細胞の細胞生存率増加作用は、硫酸基の結合位置が関連しており、特に GalNAc



の C-6 位の硫酸基への結合の有無が重要であることが考えられる。また、CS の構造が受容体との相互作用や細胞内取り込みに影響を与えていることが考えられる。

CAT の遺伝子発現は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) によって制御されている<sup>78)</sup>。PPAR $\gamma$  は、核内受容体であり、Wnt/ $\beta$ -カテニン経路によって制御されていることが知られている<sup>79)</sup>。Wnt シグナルは、CS46 が欠損するとシグナルが減弱することから、硫酸化グリコサミノグリカンによって制御されていると考えられている<sup>80)</sup>。したがって、DCS4 及び DCS24 の線維芽細胞 CAT 遺伝子発現促進作用は、Wnt 受容体 Frizzled が関与している可能性が想定されるが、Wnt シグナルと DCS が相互作用する報告がない。

今後、DCS の受容体の探索、Wnt と DCS の相互作用、DCS による PPAR $\gamma$  に対する影響や DCS の細胞内取り込みの検討を行なうことで、DCS の酸化ストレス障害線維芽細胞の細胞生存率増加作用の詳細なメカニズムを明らかにすることができると考えられる。

## 第2章 種々CSの皮膚透過性の評価

### 1. 緒論

第1章では、DCS246が線維芽細胞の線維形成関連タンパク質の発現を上昇させることや酸化ストレス障害線維芽細胞の細胞生存率を増加させることを報告した。このことから、DCSを皮膚適用し、皮膚内に送達させることで、線維芽細胞の線維形成関連タンパク質の発現の上昇や細胞生存率の増加が期待できる。したがって、第2章では、CSの皮膚透過性を明らかにすることを目的とした。

皮膚は、身体の外側から表皮（角層、顆粒層、有棘層、基底層）及び真皮の二層により構成されている。皮膚の最外層に存在する角層中の細胞間脂質には、セラミド、遊離コレステロールや遊離脂肪酸などが含まれ<sup>81),82)</sup>、ラメラ構造をとっている<sup>83)</sup>。また、角層は、体内からの水分蒸散や外部からの化学物質や細菌などの侵入を防ぐ生体の防御器官として重要な役割を果たしている<sup>84)</sup>。しかし、この生体防御機構は、医薬品や化粧品などを皮膚適用するときの障壁となり、皮膚内に化合物を送達することは困難とされている<sup>85)</sup>。実際に、テープストリッピングやUVによって角層がダメージを受けると、化合物の皮膚透過性は上昇することが知られている<sup>86),87)</sup>。また、グルコースのポリマーであるデキストランは、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識され、水溶性化合物のモデルとして用いられている。このFITC標識デキストラン10（分子量9.6 kDa）は、角層を除去した皮膚であれば、透過することが報告されている<sup>88)</sup>。

分子量が1万～120万の高分子HAは、24時間の*in vitro*全層ヘアレスマウス皮膚透過試験において受動拡散で皮膚を透過しないこと<sup>89)</sup>から、分子量1万～5万の水溶性高分子であるCSも皮膚内に送達させることが困難であることが想定される。しかし、分子量が約800 Daの四糖ヒアルロン酸（HA4）は、受動拡

散においても皮膚を透過することが報告されている<sup>89)</sup>。DCS は、約 500 Da であるため、皮膚を透過することが期待できる。また、CS は、硫酸化度によって硫酸基結合の位置や数が異なるため、種類により異なる物性を持つ。このことから、CS は、種類によって皮膚透過性が異なる可能性もある。

そこで本章では、硫酸化度の異なる DCS の *in vitro* 皮膚透過試験を行い、種々の CS の皮膚透過性を比較検討した。

## 2. 実験方法

### 2-1. 実験材料

DCS ( $\triangleleft$ UA $\rightarrow$ GalNAc-4S Na<sub>2</sub>、 $\triangleleft$ UA $\rightarrow$ GalNAc-6S Na<sub>2</sub>、 $\triangleleft$ UA-2S $\rightarrow$ GalNAc-4S Na<sub>3</sub>、 $\triangleleft$ UA-2S $\rightarrow$ GalNAc-6S Na<sub>3</sub>、 $\triangleleft$ UA $\rightarrow$ GalNAc-4S-6S Na<sub>4</sub>、 $\triangleleft$ UA-2S $\rightarrow$ GalNA-4S-6S Na<sub>2</sub>) は、Dextra Laboratories (Earley Gate, Reading, UK) から購入した。HCS 及びその他の試薬は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。Table 3 に本研究で用いた CS を示した。

### 2-2. 実験動物

雄性ヘアレスマウス (Hos: HR-1、7 週令) は、株式会社星野試験動物飼育所 (坂東、茨城、日本) より購入した。12 時間ごとに明暗サイクル (on-off 時間: 7 時~19 時) を設定した部屋で飼育し、水と飼料 (ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、横浜、神奈川、日本) は自由摂取可能とした。なお、動物実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得て、「城西大学動物実験規定」に従い行なった。

### 2-3. 皮膚透過試験

透過試験に用いた各種 CS は Table 2 に示した。5 mg の各種 CS を 1 mL の PBS に溶解させ、ドナー溶液とした。適用した CS のモル濃度を Table 8 に示した。雄性ヘアレスマウスを頸椎脱臼し、腹部の正中線を避けるように皮膚を摘出した。摘出した皮膚の脂肪 (真皮側) を除去した。摘出した皮膚は、有効透過面積 1.77 cm<sup>2</sup> の縦型拡散セルに、表皮をドナー側、真皮をレシーバー側となるように挟んだ。レシーバーには、精製水を充填させた。そして、ドナー側には、各種 CS 溶液を 1 mL 添加した。また、PBS を 1 mL 添加したものを Blank とした。

サンプルから Blank を引くことにより、皮膚内因性の CS の影響を除去した。拡散セル内は、32°Cに保ち、スターラーで攪拌した。レーザー溶液は、サンプル添加 24 時間後に回収した。

**Table 8 CS concentration**

Types of DCS	M. W. (Da)	Concentration (mM)
DCS4	503.3	2.0
DCS6	503.3	2.0
DCS24	605.4	1.7
DCS26	605.4	1.7
DCS46	605.4	1.7
DCS246	707.42	1.4

#### 2-4. 高分子 CS の定量

アルシアンブルー染色法を用いて、高分子 CS の定量を行なった。採取したレーザー溶液に等量のメタノールを添加し、混和後 15,000×g、4°Cで 15 分間遠心した。上清を回収し、アルシアンブルー溶液（武藤化学株式会社、東京、日本）と混合し、攪拌後、15 分間静置した。12,000×g、4°Cで 15 分間遠心し、上清を除去した。沈殿物に DMSO 溶液を添加し、攪拌後、15 分間静置した。12,000×g、4°Cで 15 分間遠心し、上清を除去した。沈殿物に 1-プロパノール溶液を添加し、攪拌後、15 分間静置したものを測定に供した。マイクロプレートリーダー（SpectraMax M2e: Molecular Devices, LLC、 Sunnyvale、 CA、 USA）を用いて、610 nm の波長で測定した。

## 2-5. DCS の定量

採取した皮膚透過試験サンプルに等量のメタノールを添加し、混和後 15,000 ×g、4°Cの条件で 15 分間遠心した。上清を回収し、HPLC を用いて CS を定量した。HPLC の条件を Table 9 に示す。HPLC システムは、UFLC システム（株式会社島津製作所、京都、日本）（オートインジェクター（STL-20AC）、ポンプ（LC-20AD）、カラムオーブン（CTO-20AC）コミュニケーションバスモジュール（CBM-20A））を用いた。また、カラム及び検出器は、ODS カラム（CAPCELL PACK C18, 3.0 mm I.D. × 250 mm; 株式会社資生堂、東京、日本）、ナノ量検体検出器（NQAD 5600; 株式会社資生堂）を用いて測定した。

**Table 9 High performance liquid chromatography condition**

<b>Column</b>	<u>ODS colum (CAPCELL PACK C18, 3.0 mm I.D. × 250 mm)</u>
<b>Mobile Phase</b>	A) 0.1% HCOOH B) CH <sub>3</sub> CN
<b>Flow</b>	0.4 mL/min A→B : 0→50%
<b>Column temperature</b>	40°C
<b>Injection volume</b>	50 µL

### 3. 結果

#### 3-1. HCS の皮膚透過性

HCS4 及び HCS6 の皮膚透過性をアルシアンブルー染色法で定量し、評価した。24 時間後の HCS4 及び HCS6 の単位面積当たりの皮膚透過量は、いずれの場合も検出限界以下 ( $<1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) であった (data not shown)。

#### 3-2. DCS の皮膚透過性

各種 DCS の皮膚透過率を HPLC (NQAD 5600 検出器) で定量し、評価した。24 時間後の DCS (DCS4、DCS6、DCS24、DCS26、DCS46 及び DCS246) の皮膚透過率は、それぞれ 0.34、0.68、0.35、0.42、0.25 及び 0.34% であった (Table 10)。硫酸化度による DCS の皮膚透過性には、有意な差が認められなかった ( $p>0.05$ )。

**Table 10 Effect of disaccharide CS of different types on the *in vitro* skin permeation.**

<b>Chondroitin sulfate</b>	<b>CS amount (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Penetrate (%)</b>
<b>DCS4</b>	1.42 $\pm$ 1.57	0.34 $\pm$ 0.27
<b>DCS6</b>	4.47 $\pm$ 1.31	0.68 $\pm$ 0.055
<b>DCS24</b>	1.50 $\pm$ 1.80	0.35 $\pm$ 0.032
<b>DCS26</b>	1.76 $\pm$ 1.81	0.42 $\pm$ 0.030
<b>DCS46</b>	1.08 $\pm$ 1.26	0.25 $\pm$ 0.022
<b>DCS246</b>	1.44 $\pm$ 2.03	0.34 $\pm$ 0.39

Amount of each disaccharide CS permeated through full-thickness hairless mice skin after 24 h. Disaccharide CS was using DCS4 (a), DCS6 (b), DCS24 (c), DCS26 (d), DCS46 (e) and DCS246 (f). Values are means  $\pm$  S.D. (n = 3). \* $p < 0.05$ , Tukey's post hoc multiple comparisons test.



#### 4. 考察

HCS 及び DCS の *in vitro* 透過試験を、全層ヘアレスマウス摘出皮膚を用いて行なった。高分子 CS は、HCS4 及び HCS6 のどちらにおいても単位面積あたりの皮膚透過量は検出限界以下であった。これは、CS が水溶性の高分子（2 万～5 万）であるので、角層バリア機能により CS が角層に分配しないことが理由であると思われる。分子量 1 万～10 万の HA は、受動拡散で皮膚を透過しないことが報告されており<sup>89)</sup>、このことから、高分子の GAG は、受動拡散で皮膚を透過しないことが示唆された。

一方、今回用いた DCS は、すべて受動拡散で皮膚透過が認められた。DCS よりも分子量が大きい HA4（約 800 Da）は、24 時間の *in vitro* 全層ヘアレスマウス皮膚透過試験で、ドナー側に 0.5%（約 6.4 mM）の HA4 を添加した場合、受動拡散で約  $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の量が皮膚を透過することが報告されている<sup>89)</sup>。そして、HA4 は、0.1% で UVA 照射したヘアレスマウスに塗布した場合、角層水分量や皮膚粘弾性を改善することが報告されている<sup>90)</sup>。本研究で用いた CS は、0.1% の濃度で用いており、HA4 よりも低濃度であるにも関わらず、どの DCS も  $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上の量が受動拡散で皮膚を透過している。また、水溶性化合物であるカルセイン（622 Da）<sup>91)</sup> や FITC 標識デキストラン 4（4.4 kDa）<sup>92)</sup> は、ラットの皮膚を用いて皮膚透過試験を行った場合、受動拡散でわずかに皮膚を透過することが報告されている。今回使用した各種 DCS の分子量は、約 500 Da と低分子であるために、他の水溶性化合物と同様に受動拡散で皮膚を透過したと考えられる。しかし、硫酸化度による DCS の皮膚透過性は、CS 間で若干の差があるものの、有意な差が認められなかった ( $p > 0.05$ )。このことから、DCS の皮膚透過性は、硫酸基の影響が少ないことが示唆された。

以上の結果から、DCSは、皮膚へ塗布することによっても、皮膚内に浸透する可能性が示唆された。しかし、本章における皮膚透過試験は、24時間のみの検討である。今後は、経時的なサンプリング、角層剥離皮膚を用いた検討、投皮膚中濃度の検討、投与溶液の濃度検討及び基材の検討を行うことにより、DCSの適正な適用時間、適正濃度及び適正基材を明らかにすることができると考えられる。

## 結論

皮膚に存在する線維は、加齢や UV によって、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。CS は線維形成に関与することや、酸化ストレス障害を与えられた線維芽細胞の細胞生存率を増加させることが報告されている。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。

HA は、GlcA と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の二糖ユニットで構成される GAG である。HA は、単純な構造にも関わらず、多様な生理活性をもつ。生体内における HA の特徴は、分子量に依存した生理活性を示すことである。CS は、HA と構造的な類似点があることから、分子量によって作用が異なることが考えられる。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。

CS の基本骨格は、GlcA と GlcNAc の二糖ユニットで構成され、1 つのユニットにつき、最大 4 つの硫酸基が修飾される。CS は、硫酸基の修飾をうけるため、硫酸化度による構造多様性を持ち、硫酸化度（硫酸基の結合位置及び数）に応じた生理作用を示すことが知られている。したがって、DCS 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。また、CS は、皮膚において低硫酸化 CS が線維形成や細胞増殖に関わっていることが明らかにされてきた。一方、脳、神経、骨及

び軟骨では、高硫酸化 CS の機能が明らかにされてきているにも関わらず、皮膚では、高硫酸化 CS の機能が明らかとされていない。

以上のことから、本研究は、CS の皮膚透過性を明らかにし、分子量や硫酸化度の異なる CS を用いて正常皮膚線維芽細胞における線維関連タンパク質の発現に対する影響及び皮膚線維芽細胞の酸化ストレス障害に対する種々CS の抑制効果を検討し、その構造と生理作用の関連を明らかにすることを目的とした。

第 1 章第 1 節では、硫酸化 CS (CS246) の機能の一端を解明することを目的とし、正常ヒト皮膚線維芽細胞に分子量の異なる高硫酸化 CS を添加し、線維形成関連タンパク質の遺伝子及びタンパク質発現量に対する影響を検討した。その結果、DCS246 は、*COL1A1*、*DCN*、*ELN* 及び *SMAD2* において遺伝子発現量を有意に増加させた。また、DCS246 は、I 型コラーゲン及び *ELN* のタンパク質発現量も増加させた。このことから、DCS246 は、線維形成を促進させる作用をもつことが示唆された。一方、HCS246 は、これらの遺伝子発現量やタンパク質の発現量に対して影響を与えなかった。このことから、CS246 による線維形成関連タンパク質の遺伝子に対する影響は、分子量により異なることが示唆された。

第 1 章第 2 節では、酸化ストレス障害線維芽細胞モデルとして、 $H_2O_2$  処理線維芽細胞を用いて、各種 CS の抗酸化作用を検討した。CS は、HCS4、HCS6、DCS4、DCS6、DCS24、DCS26、DCS46 及び DCS246 を用いた。その結果、DCS4 と DCS24 は、 $H_2O_2$  処理線維芽細胞の細胞生存率の増加、細胞内 ROS 量の減少、*CAT* 遺伝子発現量及び *CAT* 活性の増加が認められた。また、DCS4 と DCS24 は、UV 照射した線維芽細胞の細胞生存率の増加が認められた。一方、HCS4 及び HCS6 は、細胞増殖の促進や細胞内 ROS 量の減少が認められなかった。DCS4 及び DCS24 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、これらの作用と CS の構造が密接に関係することが明らかとなった。しかし、詳細なメカニズムの解明は今後の課題であると考えている。

第 2 章では、CS の皮膚透過性を検討するために、ヘアレスマウス全層皮膚を用いて *in vitro* 皮膚透過試験を行なった。CS は、HCS4、HCS6、DCS4、DCS6、DCS24、DCS26、DCS46 及び DCS246 を用いた。その結果、HCS4 及び HCS6 は、ヘアレスマウス全層皮膚を受動拡散で透過しないことが示唆された。一方、DCS は、硫酸化度に関係なく、ヘアレスマウス全層皮膚を受動拡散で透過することが示唆された。これにより、DCS は、皮膚内に送達することができ、皮膚内に皮膚生理機能を与えることが想定された。

以上の結果から、HCS は、受動拡散で皮膚を透過せず、皮膚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ないことが示唆された。一方、DCS は、皮膚適用により、皮膚内に送達させることができ、皮膚内の線維芽細胞に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 (Fig. 16)。したがって、DCS は、加齢や UV による線維の減少を防ぐ可能性があることから、アンチエイジングや日々のスキンケアへの応用が可能であることが示唆された。また、DCS は、線維芽細胞の細胞生存率増加作用が分子量や硫酸基によって異なったことから、CS の構造が CS の生理活性に大きく関係す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。

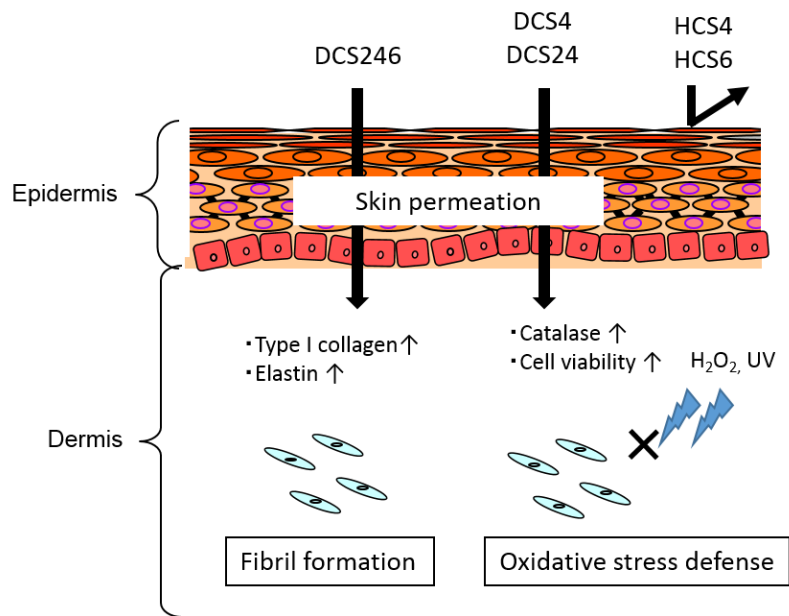


Fig. 16 Graphical summary

## 謝辞

本研究に際して、終始懇切な御指導、御鞭撻を承りました城西大学薬粧品動態制御学・皮膚生理学講座教授 杉林堅次 先生に深く感謝致します。

また、本研究の遂行に当たり、終始熱心な御指導、多大なる有益な御助言を承りました城西大学薬粧品動態制御学・皮膚生理学講座准教授 徳留嘉寛 先生に深く感謝致します。

さらに、お忙しい中、御指導頂きました城西大学薬粧品動態制御学・皮膚生理学講座助手 横田麻美 先生に深く感謝致します。

本研究に使用したコンドロイチン硫酸を供与して頂いたマルホ株式会社 京都 R&D センター 加納聰 氏に感謝致します。

本学位論文の作成に際し、ご教示を承りました城西大学機能性食品科学講座 和田政裕 教授ならびに 食品機能学講座 真野博 教授、薬品作用学講座 岡崎真里 教授に心より感謝致します。

最後に、研究にご協力頂いた城西大学薬粧品動態制御学・皮膚生理学講座の皆様にお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Gandhi N. S., Mancera R. L., The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins., *Chem. Biol. Drug. Des.*, **72**, 455-482 (2008).
- 2) Laurent T. C., Fraser J. R., Hyaluronan., *FASEB J.*, **6**, 2397-2404 (1992).
- 3) West D. C., Hampson I. N., Arnold F., Kumar S., Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid., *Science*, **228**, 1324-1326 (1985).
- 4) Feinberg R. N., Beebe D. C., Hyaluronate in vasculogenesis., *Science*, **220**, 1177-11779 (1983).
- 5) Hodge-Dufour J., Noble P. W., Horton M. R., Bao C., Wysoka M., Burdick M. D., Strieter R. M., Trinchieri G., Puré E., Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages., *J. Immunol.*, **159**, 2492-2500 (1997).
- 6) Mizuguchi S., Uyama T., Kitagawa H., Nomura K. H., Dejima K., Gengyo-Ando K., Mitani S., Sugahara K., Nomura K., Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*., *Nature*, **423**, 443-448 (2003).
- 7) Schwartz N. B., Domowicz M. S., Chemistry and function of glycosaminoglycans in the nervous system., *Adv. Neurobiol.*, **9**, 89-115 (2014).
- 8) Monfort J., Pelletier J. P., Garcia-Giralt N., Martel-Pelletier J., Biochemical basis of the effect of chondroitin sulphate on osteoarthritis articular tissues., *Ann. Rheum. Dis.*, **67**, 735-740 (2008).
- 9) Sugahara K., Mikami T., Uyama T., Mizuguchi S., Nomura K., Kitagawa H., Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 612-620 (2003).
- 10) Kusche-Gullberg M., Kjellén L., Sulfotransferases in glycosaminoglycan



- biosynthesis., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 605-611 (2003).
- 11) Mikami T., Kitagawa H., Biosynthesis and function of chondroitin sulfate., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1830**, 4719-4733 (2013).
  - 12) Uitto J., Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin., *Dermatol. Clin.*, **4**, 433-446 (1986).
  - 13) Pustisek N., Situm M., UV-radiation, apoptosis and skin., *Coll. Antropol.*, **2**, 339-341 (2011).
  - 14) Raspanti M., Viola M., Forlino A., Tenni R., Gruppi C., Tira M. E., Glycosaminoglycans show a specific periodic interaction with type I collagen fibrils., *J. Struct. Biol.*, **164**, 134-139 (2008).
  - 15) Hinek A., Mecham R. P., Keeley F., Rabinovitch M., Impaired elastin fiber assembly related to reduced 67-kD elastin-binding protein in fetal lamb ductus arteriosus and in cultured aortic smooth muscle cells treated with chondroitin sulfate., *J. Clin. Invest.*, **88**, 2083-2094 (1991).
  - 16) Campo G. M., Avenoso A., Campo S., D'Ascola A., Ferlazzo A. M., Calatroni A., Reduction of DNA fragmentation and hydroxyl radical production by hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in iron plus ascorbate-induced oxidative stress in fibroblast cultures., *Free Radic Res.*, **38**, 601-611 (2004).
  - 17) Bos J. D., Meinardi M. M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs., *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000).
  - 18) Zou X. H., Jiang Y. Z., Zhang G. R., Jin H. M., Nguyen T. M., Ouyang H. W., Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing., *Acta. Biomater.*, **5**, 1588-1595 (2009).
  - 19) van der Smissen A., Hintze V., Scharnweber D., Moeller S., Schnabelrauch M.,

- Majok A., Simon J. C., Anderegg U., Growth promoting substrates for human dermal fibroblasts provided by artificial extracellular matrices composed of collagen I and sulfated glycosaminoglycans., *Biomaterials.*, **32**, 8938-8946 (2011).
- 20)Nadanaka S., Clement A., Masayama K., Faissner A., Sugahara K., Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from shark cartilage chondroitin sulfate D with a neurite outgrowth promoting activity., *J. Biol. Chem.*, **273**, 3296-3307 (1998).
- 21) Weinstein G. D., Boucek R. J., Collagen and elastin of human dermis., *J. Invest. Dermatol.*, **35**, 227-229 (1960).
- 22) Alimohamad H., Habijanac T., Larjava H., Häkkinen L., Colocalization of the collagen-binding proteoglycans decorin, biglycan, fibromodulin and lumican with different cells in human gingiva., *J. Periodontal. Res.*, **40**, 73-86 (2005).
- 23) Daly C. H., Biomechanical properties of dermis., *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 17s-20s (1982).
- 24) Patel A., Fine B., Sandig M., Mequanint K., Elastin biosynthesis: the missing link in tissue-engineered blood vessels., *Cardiovasc. Res.*, **71**, 40-49 (2006).
- 25) Kozel B. A., Rongish B. J., Czirol A., Zach J., Little C. D., Davis E. C., Knutsen R. H., Wagenseil J. E., Levy M. A., Mecham R. P., Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters., *J. Cell Physiol.*, **207**, 87-96 (2006).
- 26) Vrhovski B., Weiss A. S., Biochemistry of tropoelastin., *Eur. J. Biochem.*, **258**, 1-18 (1998).
- 27) Wise S. G., Weiss A. S., Tropoelastin., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 494-497 (2008).

- 28) Mithieux S. M., Weiss A. S., Elastin., *Adv. Protein Chem.*, **70**, 437-461. (2005).
- 29) Yang S., Nugent M. A., Panchenko M. P., EGF antagonizes TGF-beta-induced tropoelastin expression in lung fibroblasts via stabilization of Smad corepressor TGIF., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **295**, L143-151 (2008).
- 30) Kagan H. M., Lysyl oxidase: mechanism, regulation and relationship to liver fibrosis., *Pathol. Res. Pract.*, **190**, 910-919 (1994).
- 31) Shen B., Shimmon S., Smith M. M., Ghosh P., Biosensor analysis of the molecular interactions of pentosan polysulfate and of sulfated glycosaminoglycans with immobilized elastase, hyaluronidase and lysozyme using surface plasmon resonance (SPR) technology., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 83-93 (2003).
- 32) S. Mizumoto, D. Fongmoon, K. Sugahara, Interaction of chondroitin sulfate and dermatan sulfate from various biological sources with heparin-binding growth factors and cytokines., *Glycoconj. J.*, **30**, 619-632 (2013).
- 33) Künze G., Gehrcke J. P., Pisabarro M. T., Huster D., NMR characterization of the binding properties and conformation of glycosaminoglycans interacting with interleukin-10., *Glycobiology*, **24**, 1036-1049 (2014).
- 34) Craciunescu O., Moldovan L., Moisei M., Trif M., Liposomal formulation of chondroitin sulfate enhances its antioxidant and anti-inflammatory potential in L929 fibroblast cell line., *Liposome Res.*, **23**, 145-153 (2013).
- 35) Campo G. M., D'Ascola A., Avenoso A., Campo S., Ferlazzo A. M., Micali C., Zanghì L., Calatroni A., Glycosaminoglycans reduce oxidative damage induced by copper ( $\text{Cu}^{+2}$ ), iron ( $\text{Fe}^{+2}$ ) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in human fibroblast

- cultures., *Glycoconj. J.*, **20**, 133-141 (2004).
- 36) Wang T. W., Wu H. C., Huang Y. C., Sun J. S., Lin F. H., Biomimetic bilayered gelatin-chondroitin 6 sulfate-hyaluronic acid biopolymer as a scaffold for skin equivalent tissue engineering., *Artif. Organs.*, **30**, 141-149 (2006).
- 37) Singer S. J., Nicolson G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes., *Science*, **175**, 720-731 (1972).
- 38) LINDEMANN B., SOLOMON A. K., Permeability of luminal surface of intestinal mucosal cells., *J. Gen. Physiol.*, **45**, 801-810 (1962).
- 39) Kinter W. B., Wilson T. H., AUTORADIOGRAPHIC STUDY OF SUGAR AND AMINO ACID ABSORPTION BY EVERTED SACS OF HAMSTER INTESTINE., *J. Cell Biol.*, **25**, 19-39 (1965).
- 40) LEFEVRE P. G., MARSHALL J. K., The attachment of phloretin and analogues to human erythrocytes in connection with inhibition of sugar transport., *J. Biol. Chem.*, **234**, 3022-3026 (1959).
- 41) Nakashima N., Haji M., Sakai Y., Ono Y., Umeda F., Nawata H., Effect of dehydroepiandrosterone on glucose uptake in cultured human fibroblasts., *Metabolism.*, **44**, 543-548 (1995).
- 42) Appleton T. C., Pelc S. R., Dingle J. T., Fell H. B., Endocytosis of sugars in embryonic skeletal tissues in organ culture. 3. Radioautographic distribution of [14C] sucrose., *J. Cell Sci.*, **4**, 133-137 (1969).
- 43) Collis L., Hall C., Lange L., Ziebell M., Prestwich R., Turley E. A., Rapid hyaluronan uptake is associated with enhanced motility: Implications for an intracellular mode of action., *FEBS*, **440**, 444-449 (1998).
- 44) Harris E. N., Kyosseva S. V., Weigel J. A., Weigel P. H., Expression, processing, and

- glycosaminoglycan binding activity of the recombinant human 315-kDa hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE)., *J. Biol. Chem.*, **282**, 2785-2797 (2007).
- 45) Harris E. N., Weigel J. A., Weigel P. H., Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)., *J. Biol. Chem.*, **27**, 36201-36209 (2004).
- 46) Laurent T. C., Fraser J. R., Pertoft H., Smedsrød B., Binding of hyaluronate and chondroitin sulphate to liver endothelial cells., *Biochem. J.*, **234**, 653-658 (1986).
- 47) Pandey M. S., Weigel P. H., The ligand-binding profile of HARE: hyaluronan and chondroitin sulfates A, C, and D bind to overlapping sites distinct from the sites for heparin, acetylated low-density lipoprotein, dermatan sulfate, and CS-E., *Glycobiology.*, **18**, 638-648 (2008).
- 48) Pandey M. S., Weigel P. H., Hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE)-mediated endocytosis of hyaluronan, heparin, dermatan sulfate, and acetylated low density lipoprotein (AcLDL), but not chondroitin sulfate types A, C, D, or E, activates NF- $\kappa$ B-regulated gene expression., *J. Biol. Chem.*, **17**, 1756-1767 (2014).
- 49) Hintze V., Miron A., Moeller S., Schnabelrauch M., Wiesmann H. P., Worch H., Scharnweber D., Sulfated hyaluronan and chondroitin sulfate derivatives interact differently with human transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)., *Acta. Biomater.*, **8**, 2144-2152 (2012).
- 50) Holzmann J., Brandl N., Zemann A., Schabus R., Marlovits S., Cowburn R., Huettinger M., Assorted effects of TGFbeta and chondroitinsulfate on p38 and ERK1/2 activation levels in human articular chondrocytes stimulated with LPS., *Osteoarthritis. Cartilage*, **14**, 519-525 (2006).

- 51) Varga J., Jimenez S. A., Stimulation of normal human fibroblast collagen production and processing by transforming growth factor-beta., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**, 974-980 (1986).
- 52) Voloshenyuk T. G., Landesman E. S., Khoutorova E., Hart A. D., Gardner J. D., Induction of cardiac fibroblast lysyl oxidase by TGF- $\beta$ 1 requires PI3K/Akt, Smad3, and MAPK signaling., *Cytokine.*, **55**, 90-97 (2011).
- 53) Ruffell B., Poon G. F., Lee S. S., Brown K. L., Tjew S. L., Cooper J., Johnson P., Differential use of chondroitin sulfate to regulate hyaluronan binding by receptor CD44 in Inflammatory and Interleukin 4-activated Macrophages., *J. Biol. Chem.*, **286**, 19179-19190 (2011).
- 54) Hinek A., Boyle J., Rabinovitch M., Vascular smooth muscle cell detachment from elastin and migration through elastic laminae is promoted by chondroitin sulfate-induced "shedding" of the 67-kDa cell surface elastin binding protein., *Exp. Cell Res.*, **203**, 344-353 (1992).
- 55) Hinek A., Smith A. C., Cutiongco E. M., Callahan J. W., Gripp K. W., Weksberg R., Decreased elastin deposition and high proliferation of fibroblasts from Costello syndrome are related to functional deficiency in the 67-kD elastin-binding protein., *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 859-872 (2000).
- 56) Mikami T., Yasunaga D., Kitagawa H., Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E., *J. Biol. Chem.*, **284**, 4494-4499 (2009).
- 57) Koike T., Izumikawa T., Tamura J., Kitagawa H., Chondroitin sulfate-E fine-tunes osteoblast differentiation via ERK1/2, Smad3 and Smad1/5/8 signaling by binding to N-cadherin and cadherin-11., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **420**, 523-529 (2012).

- 58) Lo H. L., Nakajima S., Ma L., Walter B., Yasui A., Ethell D. W., Owen L. B., Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest., *B.M.C. Cancer*, **19**, 135-144 (2005).
- 59) Ma Y., Ogino T., Kawabata T., Li J., Eguchi K., Okada S., Cupric nitrilotriacetate induces oxidative DNA damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells., *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 568-575 (1998).
- 60) Masaki H., Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects., *J. Dermatol. Sci.*, **58**, 85-90 (2010).
- 61) Peak J. G., Peak M. J., MacCoss M., DNA breakage caused by 334-nm ultraviolet light is enhanced by naturally occurring nucleic acid components and nucleotide coenzymes., *Photochem. Photobiol.*, **39**, 713-716 (1984).
- 62) Gu W., Liu W., Yang X., Zhao X., Yuan X., Ma H., Tian Y., Meng R., Effects of intense pulsed light and ultraviolet A on metalloproteinases and extracellular matrix expression in human skin., *Photomed. Laser Surg.*, **29**, 97-103 (2011).
- 63) Petersen M. J., Hansen C., Craig S., Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts., *J. Invest. Dermatol.*, **99**, 440-444 (1992).
- 64) Scharffetter-Kochanek K., Brenneisen P., Wenk J., Herrmann G., Ma W., Kuhr L., Meewes C., Wlaschek M., Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms., *Exp. Gerontol.*, **35**, 307-316 (2000).
- 65) Kielbassa C., Roza L., Epe B., Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light., *Carcinogenesis*, **18**, 811-816 (1997).
- 66) Kino K., Sugiyama H., UVR-induced G-C to C-G transversions from oxidative DNA damage., *Mutat. Res.*, **571**, 33-42 (2005).
- 67) Kvam E., R. M. Tyrrell, Induction of oxidative DNA base damage in human skin

- cells by UV and near visible radiation., *Carcinogenesis*, **18**, 2379-2384 (1997).
- 68) Tsang S.Y., Tam S.C., Bremner I., Burkitt M. J., Research communication copper-1, 10-phenanthroline induces internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells, resulting from direct oxidation by the hydroxyl radical., *Biochem. J.*, **317**, 13-16 (1996).
- 69) Wlaschek M., Bolsen K., Herrmann G., Schwarz A., Wilmroth F., Heinrich P. C., Goerz G., Scharffetter-Kochanek K., UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived-collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage?, *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 164-168 (1993).
- 70) Wlaschek M., Wenk J., Brenneisen P., Briviba K., Schwarz A., Sies H., Scharffetter-Kochanek K., Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts *in vitro.*, *FEBS Lett.*, **413**, 239-242 (1997).
- 71) Moysan A., Marquis I., Gaboriau F., Santus R., Dubertret L., Morlière P., Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts., *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 692-698 (1993)..
- 72) Stone J. R., Yang S., Hydrogen peroxide: a signaling messenger., *Antioxid. Redox Signal*, **8**, 243-270. (2006).
- 73) Ha B. J., Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate., *Arch. Pharm. Res.*, **27**, 867-872 (2004).
- 74) Masaki H., Sakurai H., Increased generation of hydrogen peroxide possibly from mitochondrial respiratory chain after UVB irradiation of murine fibroblasts., *J. Dermatol. Sci.*, **14**, 207-216 (1997).
- 75) Fujimoto S., Studies on estimation of catalase activity by the use of titanium sulfate.,



- Cancer Res.*, **25**, 534-538 (1965).
- 76) Masaki H., Okano Y., Sakurai H., Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ultraviolet B light., *Arch. Dermatol. Res.*, **290**, 113-118 (1998).
- 77) Ha B. J., Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate., *Arch. Pharm. Res.*, **27**, 867-872 (2004).
- 78) Okuno Y., Matsuda M., Miyata Y., Fukuhara A., Komuro R., Shimabukuro M., Shimomura I., Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse., *Endocr. J.*, **57**, 303-309 (2010).
- 79) Qian J., Niu M., Zhai X., Zhou Q., Zhou Y.,  $\beta$ -Catenin pathway is required for TGF- $\beta$ 1 inhibition of PPAR $\gamma$  expression in cultured hepatic stellate cells., *Pharmacol. Res.*, **66**, 219-225 (2012).
- 80) Willis C. M., Klüppel M., Inhibition by chondroitin sulfate E can specify functional Wnt/ $\beta$ -catenin signaling thresholds in NIH3T3 fibroblasts., *J. Biol. Chem.*, **287**, 37042-37056 (2012).
- 81) Bowser P. A., White R. J., Isolation, barrier properties and lipid analysis of stratum compactum, a discrete region of the stratum corneum., *Br. J. Dermatol.*, **112**, 1-14 (1985).
- 82) Elias P. M., Goerke J., Friend D. S., Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure., *J. Invest. Dermatol.*, **69**, 535-546 (1977).
- 83) Bouwstra J. A., Dubbelaar F. E., Gooris G. S., Ponc M., The lipid organisation in the skin barrier., *Acta. Derm. Venereol. Suppl (Stockh.)*, **208**, 23-30 (2000).
- 84) Landmann L., The epidermal permeability barrier., *Annu. Meet. Am. Inst. Oral. Biol.*,

- 178**, 71-82. (1988).
- 85) Marzulli F. N., Barriers to skin penetration., *J. Invest. Dermatol.*, **39**, 387-393 (1962).
- 86) Rougier A., Rallis M., Krien P., Lotte C., In vivo percutaneous absorption: a key role for stratum corneum/vehicle partitioning., *Arch. Dermatol. Res.*, **282**, 498-505 (1990).
- 87) Haratake A., Uchida Y., Schmuth M., Tanno O., Yasuda R., Epstein J. H., Elias P. M., Holleran W. M., UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response., *J. Invest. Dermatol.*, **108**, 769-775 (1997).
- 88) Wu X. M., Todo H., Sugibayashi K., Effects of pretreatment of needle puncture and sandpaper abrasion on the *in vitro* skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran., *Int. J. Pharm.*, **316**, 102-108 (2006).
- 89) 鹿毛 まどか、四糖ヒアルロン酸オリゴ糖の皮膚における機能解析、博士論文 (2013).
- 90) Kage M., Tokudome Y., Hashimoto F., Permeation of hyaluronan tetrasaccharides through hairless mouse skin: an *in vitro* and *in vivo* study., *Arch. Dermatol. Res.*, **305**, 69-77 (2013).
- 91) Tokudome Y., Sugibayashi K., The synergic effects of various electrolytes and electroporation on the *in vitro* skin permeation of calcein., *J. Control. Release.*, **92**, 93-101 (2003).
- 92) Li Y. Z., Quan Y. S., Zang L., Jin M. N., Kamiyama F., Katsumi H., Tsutsumi S., Yamamoto A., Trypsin as a novel potential absorption enhancer for improving the transdermal delivery of macromolecules., *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 1005-1012

(2009).