

学位論文要旨

学位申請者 氏名 横田 麻美

化粧品や医薬品の皮膚への適用は、局所および全身への効果を期待して日常的に行われている。皮膚は、外界と体内を隔てる境界に位置し、刺激や微生物の感染、体内の水分蒸散や放熱防止等、生体にとって重要なバリアとして機能しており、化合物の経皮送達の観点からはその非侵襲性や投与量コントロールの簡便性、肝初回通過効果を避けられる代謝面での優位性から魅力的な投与部位として注目されている。皮膚は最外面に位置する角層の下に生きた表皮層、真皮層を有し、生きた表皮層は分化状態によりさらに顆粒層、有棘層、基底層に分類される。バリア機能において最大の透過律速となるのが、角層である。角層は、レンガに例えられる角質細胞とモルタルに例えられる角層細胞間脂質より構成される。角層細胞間脂質の本体は、およそ等モルで構成されたセラミド (CER)、コレステロール (Chol)、脂肪酸 (FA) であり、ラメラ構造を形成する。化合物の透過はこの角層細胞間脂質を通るルートがほとんどを占めるため、これら脂質の代謝や構成比率の理解は、健やかな皮膚状態を保つ上でも、化合物の適用を考慮する上でも重要である。

近年、急激な人口の高齢化や食習慣の変化に直面し、慢性的な高血糖状態を示す糖尿病患者の増加が世界的に問題となっている。これにより引き起こされる終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts: AGEs) の臓器への蓄積は、糖尿病性合併症の発症と強く相関する他、様々な疾患に関連し生活習慣病の増悪に寄与していることが明らかになっている。糖化はグルコース等の還元糖のカルボニル基とタンパク質、特に塩基性アミノ酸残基中のアミノ基との間で起こる非酵素的なメイラード反応を介して起こり、脱水・縮合を経て AGEs が生成される。AGEs は、タンパク質や一部の脂質、核酸に対し非生理的な架橋形成による変性を引き起こす他、受容体である Receptor for AGEs (RAGE) に結合し、下流の Reactive oxygen species-Nuclear Factor- κ B 経路を介し炎症反応を誘導する。皮膚においては、AGEs は表皮ではケラチン、真皮ではコラーゲンやエラスチン線維等の構造タンパク質に蓄積し、シワや皮膚の黄変の原因となると考えられている。さらに、表皮角化細胞には RAGE の発現が認められており、RAGE の発現量変化を介した炎症反応の誘起も報告されている。このように AGEs は皮膚の老化に大きく関与しているが、これまでバリア機能、特に角層細胞間脂質へ与える影響について明らかになっていない。本研究では糖と脂質は一部その代謝経路を共有していることに着想を得、糖化表皮のバリア機能の変化およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

三次元培養表皮に糖化誘導剤である glyoxal (GO) を種々濃度にて基底層側より適用することにより糖化表皮モデルを作製し、健常な皮膚からの変化は成熟モデルを、慢性的な糖化の影響は角層をほとんど有さない幼若モデルを用いて模倣した。皮膚バリアの指標である Transepidermal water loss (TEWL) は、両モデルとも糖化により増加した。また、High performance thin layer chromatography (HPTLC) により角層細胞間脂質の含有量を測定したところ、成熟モデルでは CER、Chol については GO 濃度依存的な変動は認められなかったが、FA は有意に増加した ($p < 0.001$)。また、幼若糖化モデルにおいては CER [NS]、Chol は有意に減少し ($p < 0.05$, $p < 0.01$)、FA は増加した ($p < 0.001$)。また、審美的な観点から重要視されている皮膚の黄色化を様々な濃度の GO 暴露により糖化誘導した成熟モデルを用いて測定すると、脂質代謝の変化は色調の変化に先行して起こっていることがわかった。これらのことから、初期の糖化においても変動が見られた FA の増加が、糖化における脂質代謝の変動に重要な役割を果たすことが示唆されたため、脂肪酸種に関する Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 分析によりさら

に詳細な検討を実施した。培養表皮角化細胞である HaCaT 細胞に G0 を暴露し AGEs の蓄積を免疫蛍光染色にて確認したものを糖化細胞とし、抽出した脂質を HPTLC にて分離後、遊離 FA 画分を GC-MS 分析に供したところ、正常な表皮角化細胞と比較し、糖化した細胞では主に C16:0、C18:0 の脂肪酸が有意に増加していた ($p=0.07$, $p<0.05$)。これらのことから、FA の増加に伴い予想される角層細胞間脂質の流動性の変化や、蓄積した FA が引き起こす生理的な現象がバリア機能の低下に寄与することが示唆された。また、これら角層細胞間脂質の変動のメカニズムを調査するため、糖化細胞の代謝関連酵素の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。FA 代謝関連として C16 までの合成を担う Fatty acid synthase (FAS)、その伸長を担う Elongation of very long chain fatty acids protein (ELOVL) ファミリー、CER 代謝関連として、*de novo* 合成の律速酵素である Serine palmitoyl transferase (SPT)、合成を担う Ceramide synthase (CERS) 3、CERS4、CER を分解する acid Ceramidase (aCDase) の遺伝子発現量を測定した。FAS、ELOVL ファミリーのうち皮膚に多く発現する ELOVL3 の遺伝子発現量は糖化によりそれぞれ 2.7 倍、8.9 倍に増加した ($p<0.05$, $p<0.01$)。一方、SPT、CERS の発現は糖化により減少し、aCDase の発現量には有意な変化は確認されなかった。これらのことから、三次元培養表皮における脂肪酸の増加、およびセラミドの減少は、いずれも表皮角化細胞における生合成の経路に起因することが示唆された。

さらに、物理的な構造変化によるバリア機能の変化を明らかにするため、摘出したヘアレスマウス (Hos:HR-1) 皮膚を使用しモデル化合物の透過試験を実施した。摘出皮膚への糖化誘導はフランツセルに、真皮側がレシーバー溶液に接するように皮膚を装着し、G0 を含んだレシーバー溶液で 32°C 、24 時間水和させることにより行った。作製した *in vitro* 糖化皮膚モデルは、黄身を示す b^* の増加、表面粗さの増加等、糖化に特徴的な老化様の形態を示した。糖化した皮膚に角層側より低分子水溶性モデル化合物として sodium fluorescein (FL-Na: MW 376.28)、低分子脂溶性モデル化合物として nile red (MW 318.37) を適用し、Flux を比較すると、FL-Na の Flux は正常皮膚と比較し 2.1 倍に増加したが、nile red では変化は認められなかった。この相違に対する角層の寄与を調査するため、FL-Na の皮膚への全層皮膚への浸透を切片の蛍光顕微鏡画像にて確認すると、正常皮膚と比較し糖化皮膚では角層への分配が速いことが観察された。また、角層を除去したヘアレスマウス皮膚に糖化を誘導し、FL-Na および高分子水溶性モデル化合物として fluorescein isothiocyanate-dextran (FD4: average MW 4,000) を表皮側より適用すると、糖化により FL-Na の Flux は 0.64 倍に減少し、その差は分子量の増加に伴い大きくなった。つまり、糖化皮膚においては透過律速である角層と生きた表皮-真皮層は水溶性化合物の透過に対し、正常な皮膚とは逆の挙動を示すことが明らかとなった。

AGEs は糖化誘導剤の種類により少なくとも 7 種に分類されている。中でも糖代謝中間体であるグリセルアルデヒド由来の AGEs (Glycer-AGEs) は、RAGE との結合活性が高い等の理由から近年様々な代謝性疾患との関連性が指摘されているが、皮膚における存在の有無や局在は不明であった。そこで、Glycer-AGEs に特異的に結合する抗体を用い、ヒト皮膚組織における局在を調査した。Glycer-AGEs は G0 由来の AGEs とは異なり、表皮角化細胞や真皮線維芽細胞内に局在することが明らかとなった。

以上の検討から、糖化による角層細胞間脂質代謝の変動は表皮中角層細胞間脂質の構成比率を乱すこと、さらに架橋変性による構造変化を介しても、水溶性分子に対する皮膚バリア機能を変化させることが明らかとなり、これらの現象はヘテロな AGEs 集団により引き起こされると予想される。本研究より、皮膚バリア機能の観点からも糖化予防の重要性が示された。

Thesis abstract

Degree applicant: Mami Yokota

As the outermost organ of the body, the skin is essential for protecting the host from external stimuli including ultraviolet light, chemicals, mechanical insults, pathogens, as well as preventing loss of water from the body. The skin also attracts much attention because of the non-invasiveness, ease of administration and dose control, and absorption without hepatic first-pass metabolism from transdermal drug delivery systemic point of view. Viable epidermis exists under the outermost layer, stratum corneum (SC) and is divided into three layers, stratum granulosum, stratum spinosum, and stratum basale by their differentiation state. Viable epidermis has a unique mechanism of lipid metabolism and contributes to the production of the SC. In the SC, corneocytes (brick) are embedded in an intercellular lipid matrix (mortar), composed of approximately equimolar concentrations of various species of ceramides (CERs), cholesterol (chol) and fatty acids (FAs), forming a lamellar structure. Thus, understanding of metabolism and component ratio of these SC lipids is quite important because most of compounds applied to the skin go through SC intercellular lipids route.

Advanced glycation end products (AGEs) are generated via the non-enzymatic Maillard reaction between the aldehyde group of reducing sugars and amino group of proteins, lipids or nucleic acids. As the population ages, accumulation of AGEs in tissues has attracted much attention as a cause of diabetic complications and are also thought to be related to other lifestyle-related diseases. For skin, where AGEs can be seen, developing an anti-AGEs strategy is important from an aesthetic as well as a functional point of view. AGEs accumulate in both dermis (e.g. collagen and elastic fibers) and epidermis (e.g. keratin 10) causing wrinkles and yellowish change in skin color. Additionally, AGEs can be ligands for receptor for AGEs (RAGE) and provoke inflammatory signaling via a reactive oxygen species (ROS)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway. However, the effect of glycation on skin barrier function, especially SC lipids remain to be elucidated. Thus, the aim of this study is to elucidate the barrier function of glycated epidermis and their mechanism.

We first evaluated the component ratio of SC intercellular lipids using mature and immature reconstructed epidermal model to mimic early and chronic state of glycation, respectively. Transepidermal water loss, which is indicator of inside-out water barrier function, was increased in both model. In mature model, the content of FA determined by High performance thin layer chromatography (HPTLC) was significantly increased by GO exposure ($p<0.001$). In immature model, CER[NS], Chol was significantly decreased ($p<0.05$, $p<0.01$) and FA was increased by GO exposure ($p<0.001$). Next, to clarify the detailed mechanism, the content of various lengths of FA was measured using spontaneously immortalized keratinocytes cell line, HaCaT cells. The amounts of C16:0 and C18:0 contained in lipid extracts from GO exposed HaCaT cells were significantly increased compared with normal one ($p=0.07$, $p<0.05$). These results indicate that the change in SC lipids fluidity or physiological phenomena caused by production and accumulation of saturated FAs accelerated by cellular glycation. To address whether the increase in FA was derived from *de novo* synthesis, we examined *FASN* and *ELOVL* mRNA expression in glycated HaCaT cells. *FASN* contributes to the production of C16, while *ELOVL* contributes to that of $16<C$. *FASN* and *ELOVL3* were upregulated 2.7- and 8.9-fold respectively in glycated HaCaT cells after exposure to GO ($p<0.05$, $p<0.001$). The expression of ceramide synthase (CERS), which contribute to synthesis of ceramide was significantly decreased by GO exposure ($p<0.01$), though the expression

of acid ceramidase (aCDase) was not changed. From these results, the increase in FA and decrease in CER may be caused by *de novo* synthesis pathway in viable epidermis.

To clarify the effect of skin glycation on the permeation of compounds, we established a simple *in vitro* model of full-thickness glycated skin. Excised hairless mice (Hos:HR-1, 7-9 wk, ♂) skin was mounted on franz cells and incubated for 24 h at 32°C with PBS containing various concentration of GO as receptor solution. This model has the features of aged skin including a yellowish and rough macroscopic appearance. Using this model, we investigated permeation of sodium fluorescein (FL-Na: MW 376.28) as hydrophilic model molecules, and Nile red as a lipophilic model molecules. The flux of FL-Na across glycated skin was 2.1-fold increased compared with normal one, though Nile red showed no significant difference between two types of skin. To investigate the contribution of the SC to differences in permeation, the penetration of FL-Na to SC was determined by observation of skin section using fluorescence microscopy. FL-Na was distributed faster to glycated SC than normal skin. Next, fluorescein isothiocyanate-dextran (FD4: average MW 4,000) was applied to the SC-stripped skin. Contrary to full-thickness skin, the flux of FD4 across glycated skin was 0.64-fold decreased and the larger the MW is, the more different the flux becomes. Taken together, in glycated skin model, SC and viable epidermis-dermis showed inverse behavior to hydrophilic compound in glycated skin.

AGEs are classified into at least 7 groups by their glycation inducer. Above all, glyceraldehyde, which is an intermediate product of both glycolysis and polyol metabolism, plays an important role in the pathogenesis of lifestyle-related diseases through the formation of glyceraldehyde-derived AGEs (Glyceral-AGEs). For example, Glyceral-AGEs contribute to microvascular complications of diabetes, i.e., retinopathy and nephropathy and the malignancy of cancer via RAGE signal transduction followed by enhancement of intercellular ROS production. A previous report showed that Glyceral-AGEs in melanoma cells enhanced tumor growth and metastasis. It is thus expected that the presence of Glyceral-AGEs is highly related to intracellular metabolism in normal skin cells. However, the presence of Glyceral-AGEs in epidermal cells, 95% of which are keratinocytes, has not been shown. Glyceral-AGEs in skin were determined using a Glyceral-AGE-specific antibody by immunohistochemistry and the rates of AGEs formation with glyceraldehyde and GO were analyzed by amino acid analysis. Glyceral-AGEs were detected in the epidermis and dermis of human skin, especially in the cell, but they were not found in skin pretreated with blocking peptides. A few Glyceral-AGEs were detected in the extracellular matrix. To describe the presence of Glyceral-AGEs in epidermis, which has a turnover rate of about 1 month, we compared the rates of AGEs formation induced by GO and GA from the dermal side. The modification rate of Lys from 6 to 24 h with 50 mM GA was greater than that of GO (26 vs. 6 nmol/h). Further studies are required to elucidate the biological and physiological significance of Glyceral-AGEs in skin, but this study suggests that they may influence normal human keratinocytes and fibroblasts by different mechanisms and accumulate to a different degree than GO-induced AGEs.

From these studies, it is suggested that change in metabolism of SC lipids may cause disruption of SC lipids composition and also non-physiological cross linking may induce skin barrier disruption to hydrophilic molecules. Furthermore, these phenomena are expected to be caused by heterogeneous AGEs. Taken together, this study showed the importance of prevention of glycation to maintain proper skin barrier function.

論文審査の結果の要旨

近年、我が国は、人口の高齢化や食習慣の変化に直面し、慢性的な高血糖状態を示す糖尿病患者の増加が問題となっているが、この傾向は欧米諸国だけでなく、隣国の韓国、中国やアセアン諸国でも見られている。そもそも、糖化はグルコース等の還元糖のカルボニル基とタンパク質、特に塩基性アミノ酸残基中のアミノ基との間で起こる非酵素的なメイラード反応を介して起こる。したがって、慢性的な高血糖状態により糖化が高頻度で引き起こされ、こうして得られた最終糖化産物 (AGEs: Advanced glycation end-products) が臓器に蓄積される。最近、AGEs は糖尿病性合併症の発症と強く関連し、様々な疾患に関連していること、また、AGEs が生活習慣病の増悪にも寄与していることがわかってきた。さらに、AGEs はタンパク質や一部の脂質、核酸に対し非生理的な架橋形成による変性を引き起こすほか、受容体である Receptor for AGEs (RAGE) に結合し、下流の reactive oxygen species- nuclear factor-kappa B 経路を介し炎症反応を誘導することも理解されてきた。このように AGEs は身体の老化に大きく関与しているが、皮膚に目を向けると、表皮ではケラチン、真皮ではコラーゲンやエラスチン等の構造タンパク質に蓄積し、シワの原因や皮膚の黄変の原因となると考えられている以外では、これまで皮膚のバリア機能、特に角層細胞間脂質へ与える AGEs の影響についてはほとんど明らかになっていない。

このような背景で、横田麻美氏は、糖と脂質の一部が、その代謝経路を共有していることに着想を得、糖化表皮のバリア機能の変化およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とし計 3 章に亘って検討を行った。以下、各章別に申請者の成果と審査結果を示す。

第 1 章では 3 次元培養表皮に糖化誘導剤である glyoxal (GO) を種々濃度にて基底層側より適用することにより糖化表皮モデルを作製した。なお、ここで作成した糖化表皮モデルは、健常皮膚の変化を評価するための成熟モデルと、慢性的な糖化の影響を評価するための角層が未成熟の幼若モデルの 2 種類である。まず、皮膚バリアの指標である経表皮水分損失 (TEWL) 値に対する糖化の影響を評価した結果、両モデルとも糖化によって TEWL は増加した。次に、角層細胞間脂質 (セラミド、コレステロール、脂肪酸、それぞれ CER、Chol、FA と略記) の 3 次元培養表皮中含有量を HPTLC により測定したところ、FA が糖化によって有意に増加した ($p < 0.001$) もの、CER と Chol については GO の濃度依存的な変動は認められなかった。一方、幼若モデルを用いて試験したところ、CER [NS] と Chol は糖化によって有意に減少し ($p < 0.05$, $p < 0.01$)、FA は増加した。また、審美的な観点から問題視されている皮膚の黄色化を様々な濃度の GO 暴露により糖化誘導した成熟モデルを用いて測定すると、脂質代謝の変化が黄色化に先行して起こっていることがわかった。これらのことから、初期の糖化において変動が見られた FA の増加が、糖化における脂質代謝の変動に重要な役割を果たすことが示唆された。

そこで、糖化によって増加した脂肪酸種に関し、GC-MS 分析によりさらに詳細な検討を実施した。実験では、培養表皮角化細胞である HaCaT 細胞に糖化を誘導し、抽出した脂質を HPTLC にて分離後、遊離脂肪酸画分を GC-MS 分析に供した。その結果、正常な表皮角化細胞と比較して糖化した細胞では主に C16:0、C18:0 の脂肪酸が有意に増加していることが明らかになった。これらのことから、脂肪酸の増加に伴い予想される角層細胞間脂質の流動性の変化や、蓄積した脂肪酸が皮膚バリア機能の低下に関与することが示され、皮膚の黄色化が顕在化する前に、脂質代謝を正常化させることの重要性が示唆された。

また、これら角層細胞間脂質の変動メカニズムを調査するため、代謝関連酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。GO を暴露し AGEs の蓄積を免疫蛍光染色にて確認した HaCaT 細胞を糖化細胞とし、FA 代謝関連 CER 代謝関連酵素の遺伝子発現量を測定したところ、脂肪酸生合成の活性化およびセラミド合成が抑制される傾向が確認された。これら角層細胞間脂質の構成比率の変化が脂質ラメラに与える影響を Stratum Corneum Lipid Liposomes (SCLL) を作製し物性評価したところ、ESR 法により測定した膜流動性は AGE 化を模倣した角層細胞間脂質で増加した。以上のことから、皮膚における脂質代謝異常は、膜流動性の増加を介して表皮バリア機能の低下に寄与している可能性が示された。

第 2 章では、物理的な構造変化によるバリア機能の変化を明らかにするため、摘出したヘアレスマウス (Hos:HR-1) 皮膚を使用し *in vitro* 糖化皮膚モデルを作製して実験に供した。老化様の表現型を示す本糖化モデルに角層側より低分子水溶性モデル化合物として sodium fluorescein (FL-Na: MW 376.28)、低分子脂溶性モデル化合物として Nile Red (MW 318.37) を適用し、皮膚透過速度を比較した。その結果、FL-Na は正常皮膚と比較し 2.1 倍に増加したが、Nile red では変化は認められなかった。この相違に対する角層バリアの寄与を調査するため全層皮膚切片の蛍光顕微鏡画像にて確認すると、正常皮膚と比較し糖化皮膚では角層への分配が速いことが観察された。また、角層を除去したヘアレスマウス皮膚に糖化を誘導し、FL-Na および高分子水溶性モデル化合物として fluorescein isothiocyanate-dextran (平均 MW 4,000, FD-4) を表皮側より適用すると、糖化により FL-Na の皮膚透過 Flux は 0.64 倍になり、FD-4 では 0.40 倍になった。つまり、水溶性化合物の糖化皮膚透過性においては、角層バリアと生きた表皮真皮層バリアの関係は、正常な皮膚とは逆の挙動を示すことが明らかとなった。

第 3 章では、抗グリセルアルデヒド由来 AGEs 抗体を用いた免疫蛍光染色によってヒト皮膚における AGEs の蓄積性を評価した。その結果、表皮真皮共に細胞内に AGEs 種に起因する強い蛍光を認めた。なお、皮膚中の AGEs 種はヘテロな集団であり、グリセルアルデヒド由来の AGEs はより初期の病態でも蓄積することが示唆された。

以上、本論文より、糖化によって角層細胞間脂質代謝が変動し、表皮中角層細胞間脂質の正常な構成比率を乱すこと、さらに架橋変性による構造変化が生じ、水溶性分子の皮膚透過機構を変化させることが明らかとなった。また、これらの変化は実際のヒト皮膚ではヘテロな AGEs 集団により引き起こされ、AGEs 種により作用が異なる可能性が示された。本結果から、皮膚のバリア機能の観点からも皮膚の糖化予防や糖化皮膚に対する化合物透過を検討することの重要性が示され、本研究は新規性の高いものと判断した。

以上まとめると、本論文は、その独創性および研究意義の観点から、本研究科において課程によらない博士 (薬科学) の論文として十分に値するものであると判断した。また、横田氏の人物に関しても博士とするに十分であると判断した。