

学位論文要旨

紫外線、大気汚染物質、および乾燥による 皮膚細胞傷害への活性酸素の関与と防御法

学位申請者氏名：横田 真理子

皮膚は我々ヒトの身体の最外層を担う組織であり、生命の維持に不可欠である。皮膚の中でも最も外側に位置する角層は、体内の水分を保持するとともに外界からの微生物や物理化学的な刺激を防ぐ重要なバリア機能を担っている。皮膚は恒常的に外部からの刺激（環境因子）に曝されており、このような刺激の蓄積が皮膚組織の損傷を招くことがあり、結果として角層のバリア機能の低下を招くことがある。そこで本研究では、環境因子である紫外線、大気汚染物質、および乾燥の三種の因子を中心に、各因子に曝露された皮膚内部での細胞の応答性と活性酸素種（ROS）の関与について明らかにし、その防御法について議論することを目的とした。

第1章では紫外線（UVB）に注目し、正常ヒト表皮角化細胞（NHEKs）を選択して研究を行った。まず、アルキルグリセリルエーテル類（AKGs）の抗炎症作用を中心として、UVB曝露によって生じたNHEKs炎症に対する抑制効果とその作用メカニズムについて検証した。その結果、AKGsの1つであるキミルアルコール（CA）が、UVBによるcyclooxygenase 2（COX-2）発現とプロスタグランジン E₂（PGE₂）産生の亢進を抑制することでNHEKsの細胞傷害を緩和していること、さらに、これらと関係して、peroxisome proliferator activated receptor- γ （PPAR- γ ）のアゴニストとしてnuclear factor erythroid 2-related factor 2（Nrf2）シグナル経路が活性化され、UVB曝露によるNHEKs細胞内のROSレベルの上昇や一連の皮膚（NHEKs）炎症応答を抑制することを明らかとした。

第2章では、大気汚染物質（DPE）に起因する皮膚細胞傷害とROS発生の関連性を明らかにすると共に、細胞傷害を改善するための有効成分の探索を行った。本章では前章で用いたNHEKsと三次元再構築ヒト表皮モデル（RHEEs）を選択して研究を行った。はじめに、ビタミンB5（VB5）およびその誘導体がDPEに対するNHEKsの炎症に対して顕著な効果を示したので、次に、それら物質の抗炎症作用メカニズムについて検証した。その結果、VB5誘導体の1つであるethyl 2,4-dicarboethoxy pantothenate（EDCEP）が、DPEによる芳香族炭化水素受容体（AHR）シグナル経路を活性化し、cytochrome P450 family 1

subfamily A polypeptide 1 (CYP1A1) 発現の亢進を抑制することで細胞傷害を緩和すること、さらに、Nrf2 シグナル経路を活性化して細胞内抗酸化システムを亢進することで、DPE 曝露による細胞内 ROS レベルの上昇や一連の酸化ストレス応答を抑制することなどを見出して、EDCEP に皮膚細胞傷害に対する複合的な効果があることを示唆した。

第3章では、まず RHEEs を低湿度環境下に維持してその表面を乾燥状態にし、かつその RHEEs を長期培養できる装置を開発した。次に、この装置を用いて「*in vitro* 乾燥皮膚モデル」を確立した。その後、この *in vitro* 乾燥皮膚モデルにおいてカルボニルタンパク質 (CPs) の上昇が認められることを確認した。さらに、この *in vitro* 乾燥皮膚モデルと正常ヒト真皮線維芽細胞 (NHDFs) を用いて低湿度環境に曝された NHDFs の応答性と ROS 発生との関連性について検討した。その結果、皮膚生理に及ぼす乾燥刺激の影響を検証できる可能性があることを指摘した。さらに、大変興味あることに、この *in vitro* 乾燥皮膚モデルにおける ROS を起点とする幾つかのパラメータが、乾燥によって引き起こされるヒト皮膚で得られるパラメータのいくつかを再現していたことから、この *in vitro* 乾燥皮膚モデルが新たな評価ツールとして利用できる可能性を示した。

すでに、健康で美しい皮膚を維持するためには ROS をトリガーとした細胞内外の酸化ストレスの修復が重要であることが報告されている。また特に、紫外線曝露による皮膚への影響については ROS の寄与が大きいと数多くの論文で示されている。本研究から、大気汚染物質や乾燥などの他の環境因子についても同様に ROS 発生が関与していることが示唆された。特に最近の研究では、ブルーライトなど紫外線以外の光線曝露によっても皮膚内部で ROS が生じることが報告されていることから、我々人類が日常的に曝露しうる他の環境因子惹起ストレスに対しても ROS 発生の制御が有効である可能性が期待される。

以上、本研究では環境因子である、紫外線、大気汚染物質、および乾燥の三種に焦点をあてて皮膚生理への影響について検討した結果、紫外線に加え大気汚染物質によっても細胞内 ROS レベルが上昇すること、さらにはいずれの環境因子の曝露に対しても皮膚細胞の傷害が認められ、酸化ストレスの寄与を示唆するに至った。

また、本研究によって、CA や EDCEP が種々環境因子により引き起こされる皮膚細胞傷害や炎症を防御する新たな有効成分となる可能性を示した。くわえて、*in vitro* 乾燥皮膚モデルは乾燥による皮膚状態を検証するための評価ツールとしても今後利用できる可能性を示した。

Thesis abstract

**A study on the skin protection
from the ultraviolet light, air pollutant, and dryness
and the involvement of oxidative stress**

Degree applicant: Mariko Yokota

The skin is the outermost organ of the human body and is essential for the maintenance of our life. The upper most layer of the skin is the stratum corneum, which is composed by the proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes, and plays an important barrier function to retain water in the body and to prevent irritation from the external environment. However, the skin is constantly exposed to environmental factors, and accumulation of such stimuli may result in decreased skin function. Therefore, this study aimed to clarify the involvement of cellular responsiveness and reactive oxygen species (ROS) after exposure to three environmental factors: ultraviolet light, air pollutant, and dryness and to discuss the skin protection.

In the first chapter, we focused on ultraviolet light and investigated whether chymyl alcohol (CA), which is an alkyl glyceryl ether, suppresses the inflammatory process. The suppression of cell damage and the reduction of intracellular levels of ROS in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) after UVB (Ultraviolet B) exposure was evaluated using the Neutral red (NR) and the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) assays, respectively. Moreover, the expression levels of mRNAs and proteins related to inflammation were evaluated by Realtime RT-PCR and ELISA assays, respectively. CA suppressed prostaglandin E₂ (PGE₂) production in UVB-exposed NHEKs according to the down-regulated expression level of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA. Furthermore, CA up-regulated the mRNA expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ , nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) and γ -glutamyl cysteine synthase (γ -GCS) in NHEKs. Finally, we examined the effects of CA on siPPAR- γ transfected NHEKs. siPPAR- γ transfection of NHEKs abolished the mRNA expression levels of Nrf2 and UVB-stimulated PGE₂ secretion that were regulated by CA. Hence, CA suppresses the UVB-induced COX-2 mRNA expression and PGE₂ production through PPAR- γ as an agonist. We conclude that CA provides useful protection and/or alleviation against UV damage.

In the second chapter, we focused on air pollutant and investigated the effects of a novel pantothenic acid (PA) derivative, ethyl 2,4-dicarboethoxy pantothenate (EDCEP), on a diesel particulate extract (DPE) as a representative air pollutant that generates ROS through the activation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling. We characterized the effects of PA and EDCEP on NHEKs exposed to DPE or H₂O₂ as a general oxidative stress stimulator. Cell viability and intracellular ROS levels were evaluated using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and the DCFDA assay, respectively.

Further, we investigated the substantial effects and the underlying mechanism of EDCEP, which elicited a reduction of intracellular ROS. In results, PA and EDCEP restored the decreases of cell viability induced by DPE and also repressed the up-regulation of CYP1A1 mRNA expression induced by DPE. Interestingly, the effects of PA and EDCEP on intracellular ROS levels showed different responses. EDCEP reduced intracellular ROS levels stimulated by DPE or by exposure to H₂O₂. EDCEP suppressed the secretion of tumor necrosis factor (TNF- α) and reduced the level carbonylated proteins (CPs) in reconstructed human epidermal equivalents (RHEEs) topically treated with DPE. EDCEP up-regulated the mRNA expression levels of Nrf2, γ -GCS, heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 (NQO1) and in addition, increased intracellular glutathione (GSH) levels. Thus, we conclude that EDCEP reduces cellular damage initiated by environmental pollutants by stimulating the intracellular defense system against ROS through the activation of Nrf2, and by interfering with AHR signaling pathway activation.

In the third chapter, we focused on skin dryness and established an *in vitro* dry epidermal model using RHEEs and to elucidate the relationship between skin dryness and alterations of the dermal matrix which is one of the causes for the formation of wrinkles. An *in vitro* dry epidermal model was prepared by loading a CaCl₂-filled ampoule on the surface of an RHEE. To evaluate whether the *in vitro* model reproduced the characteristics of *in vivo* skin dryness, histological studies and biological assays using a protein array were carried out. Histologically, a distinct fluorescence which originated from CPs were observed in the stratum corneum. In addition, conditioned medium from RHEEs cultured under dry conditions for 24 h revealed the secretion of several proteins compared with normal RHEEs. It has been reported that an increase in IL-1 α and the accumulation of carbonylated proteins are observed in the intact stratum corneum in the low humidity winter season. Thus, the *in vitro* dry epidermal model expresses the features of *in vivo* skin dryness observed in the winter season. Furthermore, the conditioned medium from RHEEs cultured under dry conditions enhanced MMP-1 secretion by normal human dermal fibroblasts. Taken together, we propose the hypothesis that skin dryness contributes to alterations of the dermal matrix through the elevation of MMP-1 secretion.

In this study, we focused on three environmental factors: ultraviolet light, air pollutant, and dryness. We found that not only ultraviolet light but also air pollutant could elevate intracellular ROS levels and skin dryness could elevate CPs in the stratum corneum of *in vitro* dry epidermal models. These results suggested that oxidative stress, which was induced by environmental factors, contributed to the process of skin cell damage. To maintain a healthy and beautiful skin, it's very important to control intra-/extra-cellular oxidative stress triggered by ROS.

論文審査の結果の要旨

ヒトの皮膚の最外層に位置する角層は体内の水分量を維持するとともに外界からの各種刺激を防ぐ重要なバリア機能を担っている。しかし、その角層は、ヒトが日常の生活をするうえで避けることができない紫外線、数種の大気汚染物質、および過度の乾燥などの外部環境危険因子に常時曝されている。また、この曝露量（濃度）が多く（高く）かつ曝露時間が長くなると皮膚組織の損傷を招くことがあり、結果として角層のバリア機能も低下するような事態に及ぶこともある。

横田真理子氏は、前述した三環境因子の皮膚への曝露と活性酸素種（ROS）発生との関係について研究し、かつそれら環境因子の曝露に対する対処法について検討することを目的として本研究をスタートさせた。本研究は3章よりなるので、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UVBに注目し、皮膚モデルとして正常ヒト表皮角化細胞（NHEKs）を選択して研究を行っている。まず、アルキルグリセリルエーテル類（AKGs）の抗炎症作用を中心として、UVB曝露によって生じたNHEKs炎症に対する抑制効果とその作用メカニズムについて検証した。その結果、AKGsの1つであるキミルアルコールが、UVBによるcyclooxygenase-2（COX-2）発現とprostaglandin E₂（PGE₂）産生の亢進を抑制することでNHEKs細胞の傷害を緩和していること、さらに、これらと関係して、peroxisome proliferator activated receptor- γ （PPAR- γ ）のリガンドとしてnuclear factor erythroid 2-related factor 2（Nrf2）シグナル経路が活性化され、UVB曝露によるNHEKs細胞内のROSレベルの上昇や一連の皮膚（NHEKs）炎症応答を抑制することを明らかにした。

第2章では、大気汚染物質に起因する皮膚細胞傷害とROS発生の関連性を明らかにすると共に、細胞傷害を改善するための有効成分の探索を行った。本章では前章で用いたNHEKsと三次元再生ヒト表皮モデル（RHEEs）を皮膚モデルとして選択している。また、大気汚染物質としてはディーゼルエンジン由来の排気ガス成分であるdiesel particulate extracts（DPE）を選択した。本章の研究を始めたときに、ビタミンB₅およびその誘導体がDPEに対する皮膚（NHEKs）の炎症に対して顕著な効果を示したので、次に、それら物質の抗炎症作用メカニズムについて検証した。その結果、ビタミンB₅誘導体の1つであるethyl 2,4-dicarboethoxy pantothenate（EDCEP）が、DPEによるアリルヒドロカーボン受容体（AHR）シグナル経路を活性化し、CYP1A1発現の亢進を抑制することで細胞傷害を緩和すること、さらに、Nrf2シグナル経路を活性化して細胞内抗酸化系を亢進することで、DPE曝露による細胞内ROSレベルの上昇や一連の酸化ストレス応答を抑制することなどを見出して、EDCEPに皮膚の傷害に対し複合的な効果があることを示唆した。

第3章では、まずRHEEsを低湿度環境下に維持してその表面を乾燥状態にし、かつその表皮モデルを長期培養できる装置を開発した。次に、この装置を用いて「乾燥皮膚モデル」を確立した。その後、この乾燥皮膚モデルにおいてカルボニル化タンパク質の上昇が認められることを確認した。さらに、このRHEEsや正常ヒト真皮線維芽細胞（NHDFs）を用いて低湿度環境に曝された繊維芽細胞の応答性とROS発生との関連性について検討した。その結果、皮膚生理に及ぼす乾燥刺激の影響を検証できる可能性があることを指摘した。さらに、大変興味あることに、この乾燥皮膚モデルにおける活性酸素を起点とする幾つかのパラメータが、冬季の我が国太平洋側の乾燥によって引き起こされるヒト皮膚で得られるパ

ラメータのいくつかを再現していたことから、この乾燥皮膚モデルが新たな評価ツールとして利用できる可能性を示した。

すでに、健康で美しい皮膚を維持するためには活性酸素をトリガーとした細胞内外の酸化ストレスの修復が重要であることが報告されている。また特に、紫外線曝露による皮膚への影響については ROS の寄与が大きいと数多くの論文で示されている。今回の横田氏の研究から、大気汚染物質や乾燥などの他の環境因子についても同様に ROS 発生が関与していることが示唆された。特に最近の研究では、ブルーライトなど紫外線以外の光線曝露によっても皮膚内部で ROS が生じることが報告されていることから、我々人類が日常的に曝露する他の環境因子惹起ストレスに対しても ROS 発生の制御が有効である可能性が期待される。

以上、本論文では環境因子である、紫外線、大気汚染物質、および乾燥の三種に焦点をあてて皮膚生理への影響について検討した結果、紫外線に加え大気汚染物質によっても細胞内 ROS レベルが上昇すること、さらにはいずれの環境因子の曝露に対しても皮膚細胞の傷害が見られ、酸化ストレスが引き起こされたことを示唆するに至った。

また、本研究によって、キミルアルコールや EDCEP が、種々環境因子により引き起こされる皮膚組織の損傷や炎症を防止する新たな有効成分となる可能性を示した。くわえて、本論文で発表された乾燥皮膚モデルは乾燥による皮膚状態を検証するための評価ツールとしても今後利用できる可能性を示した。

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、横田真理子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。