

博士学位論文

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

平成 30 年度

横田 真理子

## 目次

略号と記号 .....	6
緒言 .....	10
<b>第1章 紫外線 (UVB) による皮膚細胞傷害への活性酸素の寄与とキミルアル コールの有用性 .....</b>	<b>13</b>
<b>第1節 実験方法 .....</b>	<b>17</b>
1-1. 実験材料 .....	17
1-2. 細胞培養と UVB 曝露 .....	17
1-3. UVB 曝露後の細胞傷害 .....	18
1-4. UVB 曝露後の細胞内 ROS レベル .....	18
1-5. UVB 曝露後の炎症性生理活性物質 PGE <sub>2</sub> の定量 (ELISA 法) .....	18
1-6. mRNA 発現の定量 (Real-time RT-PCR 法) .....	19
1-7. 遺伝子のノックダウン (RNA 干渉法) .....	19
1-8. 統計解析 .....	20
<b>第2節 結果 .....</b>	<b>21</b>
2-1. UVB 曝露後の細胞傷害 .....	21
2-2. UVB 曝露後の細胞内 ROS レベル .....	23
2-3. UVB 曝露後の COX2 mRNA 発現 .....	24
2-4. UVB 曝露後の炎症性生理活性物質 PGE <sub>2</sub> 産生 .....	24

2-5. 細胞内抗酸化システムに対する影響.....	24
2-6. PPAR $\gamma$ -Nrf2 シグナル経路に対する影響.....	24
<b>第3節 考察.....</b>	<b>25</b>
<b>第4節 小括.....</b>	<b>32</b>
<b>第2章 大気汚染物質 (DPE) による皮膚細胞傷害への活性酸素の寄与とジカルボエトキシパントテン酸エチルの有用性.....</b>	<b>33</b>
<b>第1節 実験方法.....</b>	<b>37</b>
1-1. 実験材料.....	37
1-2. 細胞培養.....	37
1-3. DPE 曝露後の細胞傷害.....	38
1-4. mRNA 発現の定量 (Real-time RT-PCR 法).....	38
1-5. DPE あるいは H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 曝露後の細胞内 ROS レベル.....	39
1-6. DPE あるいは H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 曝露後の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ の定量 (ELISA 法) .....	39
1-7. RHEEs における DPE 曝露後の細胞傷害.....	39
1-8. 組織学的評価.....	39
1-9. 免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察.....	42
1-10. 細胞内 GSH レベル.....	42
1-11. 遺伝子のノックダウン (RNA 干渉法).....	39
1-12. 統計解析.....	42

第2節	結果	43
2-1.	DPE 曝露後の細胞傷害	43
2-2.	DPE 曝露後の AHR シグナル経路に対する影響	44
2-3.	DPE あるいは H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 曝露後の細胞内 ROS レベル	45
2-4.	DPE あるいは H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 曝露後の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 分泌	49
2-5.	細胞内抗酸化システムに対する影響	45
2-6.	Nrf2 シグナル経路に対する影響	45
2-7.	RHEEs における DPE 曝露後の CPs レベル	50
第3節	考察	59
第4節	小括	62
第3章	<i>In vitro</i> 乾燥表皮モデルを用いた乾燥による皮膚細胞傷害への活性酸素の寄与と真皮マトリックスへの影響	63
第1節	実験方法	65
1-1.	実験材料	65
1-2.	細胞培養	65
1-3.	乾燥刺激装置の作成	66
1-4.	乾燥刺激条件下での RHEEs の培養	68
1-5.	組織学的評価	68
1-6.	分泌型因子の網羅的解析 (Protein Array 法)	69
1-7.	炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha$ の定量 (ELISA 法)	69

1-8. 真皮マトリックスの分解酵素 MMP-1 の定量 (ELISA 法).....	69
1-9. 統計解析.....	69
<b>第 2 節 結果</b> .....	<b>70</b>
2-1. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs 表面の湿度.....	70
2-2. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs の組織学的変化.....	70
2-3. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs から分泌される因子の網羅的解析.....	74
2-4. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs のからの炎症性サイトカイン IL- $\alpha$ 分泌....	72
2-5. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs の培養上清を介した NHDFs からの MMP-1 分泌.....	75
<b>第 3 節 考察</b> .....	<b>76</b>
<b>第 4 節 小括</b> .....	<b>79</b>
<b>総括</b> .....	<b>80</b>
<b>謝辞</b> .....	<b>83</b>
<b>引用文献</b> .....	<b>84</b>

## 略号と記号

略号	正式名称
Abs.	absorbance
AHR	aryl hydrocarbon receptor
AKGs	alkyl glyceryl ethers
ARE	antioxidant response element
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear translocator
BaP	benzo[a]pyrene
CA	chimyl alcohol
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
COX2	cyclooxygenase2
CPs	carbonylated proteins
CYP1A1	cytochrome P450 family 1 subfamily A polypeptide 1
Cys-C	cystatin-C
DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DPE	diesel particulate extract
EDCEP	2,4-dicarboethoxy pantothenate
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
Em.	emission
Episkin <sup>TM</sup> -LM	Episkin <sup>TM</sup> large model

略号	正式名称
Ex.	excitation
FBS	fetal bovine serum
FGF-6	fibroblast growth factor-6
5-FTSC	fluorescein-5-thiosemicarbazide
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -glutamyl cysteine synthase
Glc	glucagon
GSH	glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide
HBSS(-)	Hanks' balanced salt solution (Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> free)
HO-1	heme oxygenase-1
IGFBP-2	insulin-like growth factor-binding protein-2
IGFBP-3	insulin-like growth factor-binding protein-3
IL-1 $\alpha$	interleukin-1 alpha
IL-1 $\beta$	interleukin-1 beta
IL-1ra	interleukin-1 receptor antagonist
IL-8	interleukin-8
Keap1	kelch-like ECH associated protein 1
KD	knock down
LPS	lypopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MED	minimal erythema dose

略号	正式名称
MES	2-morpholinoethane sulphonic acid
MMPs	matrix metalloproteinases
MMP-1	matrix metalloproteinase-1, Collagenase
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
mRNA	messenger RNA
NC	non-treated control
NQO1	quinone oxidoreductase-1
NHDFs	normal human dermal fibroblasts
NHEKs	normal human epidermal keratinocytes
NHEMs	normal human epidermal melanocytes
NIST	national Institute of standards and technology
NMF	natural moisturizing factor
NR	neutral red
Nrf2	nuclear factor E2-related factor 2
OPG	osteoprotegerin
PA	pantothenic acid
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons
PBS(-)	phosphate buffered saline (Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> free)
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PM2.5	particulate matter 2.5
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$



略号	正式名称
RHEEs	reconstructed human epidermal equivalents
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription -polymerase chain reaction
SC	stratum corneum
siRNA	small interference ribonucleic acid
SRM	standard reference material
TJ	tight junction
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TSP4	thrombospondin-4
UVA	ultraviolet A
UVB	ultraviolet B
VB5	vitamin B5
VEGF	vascular endothelial growth factor
VOC	volatile organic compounds
WHO	World Health Organization

## 緒言

「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」において、「化粧品とは、人の身体を清潔にし、美化し、魅力を増し、容貌を変え、又は皮膚若しくは毛髪を健やかに保つために、身体に塗擦、散布その他これらに類似する方法により使用されることが目的とされている物で、人体に対する作用が緩和なもの」と定義されている。化粧品には、保湿作用、肌荒れ防止作用、抗老化作用、美白作用、あるいは育毛作用などが様々な機能が求められるようになってきた。こうした効果を訴求した化粧品を特に機能性化粧品と称する。近年、消費者の機能性化粧品への関心と期待は大きくなっている。

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。組織学的には 2 層から構成され、ひとつは外胚葉から生じた表皮層と、他方は中胚葉から生じた真皮および皮下組織である [1]。さらに、ヒトの表皮は基底層、有棘層、顆粒層、および角層の 4 層からなり、基底層において分裂、増殖した細胞が分化成熟を経て角層になる。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 [2-3]。

皮膚組織の損傷には、紫外線に代表される太陽光線、日常的に曝露される化学物質、あるいは皮膚表面の乾燥などにより誘導される炎症が関与することが知られている。皮膚の炎症を惹起する環境因子のなかでも紫外線は、慢性的に皮膚へ曝露されることにより皮膚老化を加速することが広く知られており、このような皮膚老化は暦年齢で生じる生理的老化とは区別して光老化と定義されている [4]。よって、第 1 章では我々人類が恒常的に曝露される環境因子である紫外線のうち特に皮膚表面で吸収されることで皮膚への影響が最も懸念される Ultraviolet B (UVB) に注目した。UVB 曝露により表皮で惹起される炎症に対す

る Reactive oxygen species (ROS) の関与と Alkyl glyceryl ethers (AKGs) の抗炎症作用を中心にその作用メカニズムについて検証した。

UVB への関心に加えて、近年では大気汚染の問題にも注目が集まっている。世界保健機構 (World Health Organization, WHO) が 2018 年 5 月に発表した内容によれば、2016 年時点で大気汚染の環境基準に満たない地域で生活している人口は全世界の 91%にも達し、これが原因で年間 420 万人が死亡している [5]。日本においては、特に近隣の中国からの偏西風による Particulate matter 2.5 (PM 2.5) の飛来によって大きな影響が及ぼされ、各自治体より PM2.5 の飛来情報が公開されている。このような大気汚染物質は、吸引することにより呼吸器系への重篤な影響を及ぼすだけでなく、皮膚に付着することにより皮膚の炎症や皮膚色素沈着、さらには皮膚老化を加速することが疫学的な調査から明らかとなっている [6]。そこで第 2 章では、大気汚染物質に起因する皮膚細胞傷害のメカニズム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い、顕著な効果を示した Vitamin B5 (VB5) とその誘導体に注目して、それらの作用メカニズムについて検証した。

さらに、季節や天候により影響を受ける湿度環境によって発生する皮膚細胞傷害にも注目した。例えば東京では、冬期の気温低下に伴って低湿度環境となる。また、夏期の快適な生活を提供する空調システムも同時に低湿度環境を導く。このように年間を通して皮膚は低湿度環境に曝露されることにより、乾燥肌の発生頻度が高くなっている。よって、乾燥肌は常に肌悩みの上に挙げられている。これまでの疫学的調査研究から乾燥肌はスケーリングを伴い、肌理の浅化や肌理の等方性の発現等の外観的な変化が生じることが明らかとなっている [3, 7]。

ところで現在、化粧品業界においては動物実験が禁止されていることから、乾燥のような物理的な刺激は動物を用いた実験で研究を行うことは極めて困難であり、低環境下で発生する乾燥肌の皮膚内部においてどのような変化が生じているかについては、あまり報告がない。そこで第 3 章では、Reconstructed human epidermal equivalents (RHEEs) の表面を乾

燥させることで *in vitro* 乾燥表皮モデルを構築した。また、このモデルを用いて低湿度環境に曝された皮膚内部に存在する細胞内の低湿度環境に対する応答性と ROS との関連性、およびその結果から予想される皮膚症状について考察を行った。

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 ROS の関与について明らかとし、その防御法について議論することを目的とした。

## 第 1 章 紫外線 (UVB) による皮膚細胞傷害への活性酸素の寄与とキミルアルコールの有用性

光老化は長期間にわたって太陽光の曝露を受けた皮膚に認められる皮膚老化の症状であり、加齢による老化症状とは質的に異なっている [4]。光老化に伴う皮膚症状としては、老人性色素斑や脂漏性角化症といった色素沈着症、あるいは真皮マトリックスの変性を伴う深いシワの形成などが知られている [8-10]。

これは紫外線の繰り返し曝露による DNA 損傷や ROS の産生に起因することが知られている [10-11]。このことは疫学調査の結果からも明らかで、秋田県と鹿児島県の女性 (6~80 歳) それぞれ 350 人の色素斑の面積としわを計測した結果、鹿児島県の女性の方が色素斑は 20 歳早く、シワは 6~10 歳早く出現した [12]。さらに、皮膚ガンも例外ではなく、東北地方と九州地方の住民を比較したところ、九州地方の住民の皮膚ガン発症率は 4~5 倍も高く、また兵庫県と沖縄県の住民の比較では、前ガン症である日光角化症罹患率は沖縄県で約 5 倍高い結果を示した [13]。いずれも年間紫外線量の高い地域において、光老化に伴う皮膚症状が多く発症していることから、紫外線による皮膚細胞傷害を防御することで、色素斑やシワの形成といった代表的な皮膚老化の兆候を抑制できると考えられ、化粧品の訴求点として一般にも広く認知されてきた [3-4]。

これまで光老化は、その変化が真皮に大きく現れることから真皮組織内での Normal human dermal fibroblasts (NHDFs) 単独の作用、変化として捉えられた研究が中心になされてきた。しかしながら、皮膚の構造から考えると、NHDFs の紫外線に対する応答性は、Ultraviolet A (UVA) に対する NHDFs 自身の応答と、UVB に曝露された Normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) からのシグナルを受けた応答、そしてその両者の存在が寄与することが容易に推測される。すなわち、化粧品の作用点を考えた場合、UVB 曝露後に

NHEKs で起こる炎症応答を制御することは、光老化予防の観点から非常に重要であると考えられる。

実際に過剰な UVB 曝露による皮膚細胞傷害は ROS の生成によって引き起こされることが知られており [10]、ROS は皮膚の色素沈着、皮膚老化、そして皮膚ガンを引き起こすことも知られている [11]。表皮に対する UVB の曝露は Cyclooxygenase2 (COX2) の messenger RNA (mRNA) 発現と、これに付随する炎症性生理活性物質 Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の産生を亢進することが知られている [14-15]。また、PGE<sub>2</sub> は一酸化窒素とともに UVB 曝露により誘発される紅斑形成にも寄与することが知られている [16]。さらに、PGE<sub>2</sub> は Normal human epidermal melanocytes (NHEMs) においてメラニン合成を促進することや、細胞増殖および dendrocyte の伸長を制御することも報告されている [17-20]。一方、真皮において PGE<sub>2</sub> は Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) シグナル経路に対して特異的に干渉することで線維芽細胞におけるコラーゲン合成を抑制することが知られており [21]、この過程において真皮に浸潤したリンパ球は、コラーゲンやエラスチンのような真皮マトリックス構造を分解する Matrix metalloproteinases (MMPs) を分泌すると言われている [22]。実際に、線維芽細胞における PGE<sub>2</sub> レベルは加齢した皮膚で増加し、その結果として真皮細胞外マトリックスの分解を引き起こすことが知られている [23]。したがって、UVB 曝露後の COX2 発現増加と、これに付随する PGE<sub>2</sub> の産生を制御することは、光老化から皮膚を防御するために非常に重要であると考えられる。

著者は、Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) のアゴニストが COX2 mRNA 発現を抑制して抗炎症作用を示すと知られていることから [24]、CA が PPAR $\gamma$  シグナル経路を活性化し抗炎症作用を示すと仮説を立てた。PPAR $\gamma$  シグナル経路を活性化すると、UVB 曝露による COX2 発現増加と、これに付随する PGE<sub>2</sub> の産生を制御すると報告されている [25]。また、細胞内抗酸化システムは Nrf2-Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1) シグナル経路によって制御されていることがよく知られており [26-27]、Nrf2 は抗酸化剤応答配列

Antioxidant response element (ARE) を介した酸化ストレスの細胞内受容機構として重要な転写因子である [28]。通常、Nrf2 は細胞質内でその抑制性制御因子である Keap1 と結合することで不活性な状態として存在しているが、酸化ストレスによって Keap1 が失活して Nrf2 が活性化し、この活性化した Nrf2 が核内に移行して ARE に結合する [26-27]。核内において Nrf2 は、グルタチオン(Glutathione, GSH) 合成の失速酵素である  $\gamma$ -Glutamyl cysteine synthase ( $\gamma$ -GCS) などの抗酸化関連遺伝子の転写を促進することが知られている [29]。さらに、PPAR $\gamma$  は生体内の抗酸化防御システムである Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) シグナル経路を活性化することで、直接的に炎症プロセスを抑制することも知られている [30]。

AKGs はアルキル鎖がグリセロール骨格のヒドロキシル基にエーテル結合をした Figure 1-1 に示す化学構造を有し、化粧品製剤において乳化安定剤として広く使用されている。この AKGs は導入されるアルキル鎖長の違いにより、キミルアルコール (Chimyl alcohol, CA)、バチルアルコール、セラキルアルコールなど幾つかの種類が存在している。サメ肝油は欧州では伝承的に抗炎症作用を有することが知られているが、AKGs が豊富に含まれている [31]。

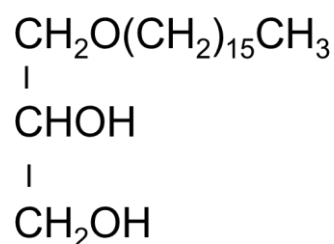
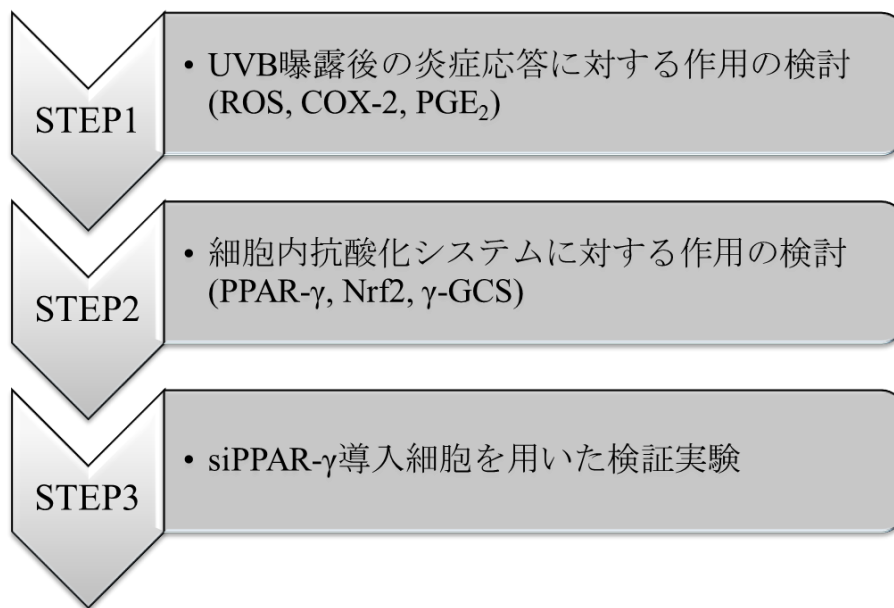


Figure 1-1 Chemical structure of CA is shown.

これまでに、いくつかの PPAR $\gamma$  アゴニストが報告されており、その中のひとつであるリノレン酸は長鎖の脂肪酸で CA とアルキル鎖長が近い構造である [32-33]。したがって、著者は CA もまた同様にして PPAR $\gamma$  アゴニストとして作用することで可能性を考えた。そこで、第1章では UVB 曝露後の炎症応答に対する CA の作用とこの抗炎症メカニズムを PPAR $\gamma$  アゴニスト作用に焦点をあて検証することを目的とした。なお、ここでは AKGs のうち予備検討により皮膚細胞傷害緩和作用が最も顕著であった CA について Figure 1-2 に示したフローチャートにしたがって検討を行った。



**Figure 1-2 Flow chart of experiment.**



## 第1節 実験方法

### 1-1. 実験材料

AKGs として CA は日光ケミカルズ (東京) より入手した。3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) は和光純薬工業 (大阪) より購入した。Neutral red (NR) はシグマアルドリッチジャパン(東京) から購入した。Ambion® Cells-to-CT™ TaqMan® Kits、TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix、Pierce™ BCA Protein Assay Kit および Alamar Blue® は Thermo Fisher Scientific (東京) より購入した。2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) は Calbiochem (CA, USA) から購入した。IL-1 $\alpha$  Enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) kit は R&D Systems (MN, USA) から購入した。PGE<sub>2</sub> ELISA kit は Cayman Chemical (MI, USA) から購入した。

### 1-2. 細胞培養と UVB 曝露

NHEKs は倉敷紡績 (大阪) より購入し、HuMedia KG2 培地 (倉敷紡績) を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。NHEKs は 20 mJ/cm<sup>2</sup> の UVB (TL20W/12RS lamp, Phillips, Hamburg, Germany) を Hanks' balanced salt solution (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free) (HBSS(-)) 中で曝露した。UVB 曝露はカットフィルターを用いることで UVB 領域以外の波長が曝露されない条件下で行った。さらに、UVB 線量は試験ごとに照度計で測定した照射強度をもとに、指定の線量となるように 1 分から 2 分の範囲で調整して曝露した。

### 1-3. UVB 曝露後の細胞傷害

NHEKs は  $2.0 \times 10^4$  cells/well の密度で 96 well plate に播種し、所定濃度の CA を含有した培地で 24 時間プレ処理をした。洗浄後、HBSS(-)に交換し、 $20 \text{ mJ/cm}^2$  の UVB を曝露した。その後、CA を含有した新鮮な培地でさらに 24 時間ポスト処理をした。1%の NR を含有する培地で 2 時間培養し、生細胞が取り込んだ NR の量は、30 %エタノール含有  $0.1 \text{ mol/L HCl}$  溶液で抽出後、吸光度 (Abs. 550nm と Abs. 650 nm の差) を測定することで定量した。細胞生存率は、試験試料および UVB 未曝露細胞 (Non-treated control, NC) を 100 とした Index (%) で表した。

### 1-4. UVB 曝露後の細胞内 ROS レベル

NHEKs を  $2.0 \times 10^4$  cells/well の密度で 96 well plate に播種し、所定濃度の CA を含有した培地で 24 時間プレ処理をした。次に、DCFDA を含有した HBSS(-)で 45 分間インキュベーションすることにより、細胞内に DCFDA を取り込ませた。洗浄後、HBSS(-)に交換し、 $20 \text{ mJ/cm}^2$  の UVB を曝露した。NHEKs は Triton X-100 含有 Phosphate buffered saline ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  free) (PBS(-)) で細胞を溶解し蛍光強度 (Ex. 485 nm/ Em. 530 nm) を測定することで、細胞内 ROS を定量した。同時に、BCA Protein Assay Kit を用いて細胞のタンパク質量を定量することで、細胞内 ROS レベルを単位タンパク質当たりの蛍光強度として表した。

### 1-5. UVB 曝露後の炎症性生理活性物質 $\text{PGE}_2$ の定量 (ELISA 法)

NHEKs は  $2.0 \times 10^4$  cells/well の密度で 96 well plate に播種し、所定濃度の CA を含有した培地で 24 時間プレ処理をした。洗浄後、HBSS(-)に交換し、 $20 \text{ mJ/cm}^2$  の UVB を曝露した。その後、CA を含有した新鮮な培地でさらに 24 時間後処理をした。培地中に分泌された  $\text{PGE}_2$  は、市販の ELISA キットを用いて定量した。同時に、BCA Protein Assay Kit を用いて細胞のタンパク質量を定量することで、単位タンパク質当たりの  $\text{PGE}_2$  分泌量として表した。

### 1-6. mRNA 発現の定量 (Real-time RT-PCR 法)

NHEKs は  $2.0 \times 10^4$  cells/well の密度で 96 well plate に播種し、所定濃度の CA を含有した培地で所定の時間処理をした。総 RNA を抽出後、Ambion® Cells-to-CT™ TaqMan® Kits を用いて cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid) を作成した。Real-time RT-PCR (Reverse transcription -polymerase chain reaction) は TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix を用いて Step One Plus™ Real-time PCR system を使用して行った。Thermo Fisher Scientific から入手したプライマーのアッセイ ID は Table 1 に示した。

**Table 1** プライマーのアッセイ ID

プライマー	アッセイ ID
PPAR $\gamma$	Hs00234592_m1
Nrf2	Hs00975961_g1
$\gamma$ -GCS	Hs00155249_m1
COX2	Hs00153133_m1
Cyclophillin	PPIA control mix

### 1-7. 遺伝子のノックダウン (RNA 干渉法)

NHEKs は  $1.0 \times 10^4$  cells/well の密度で 24 well plate に播種し、PPAR $\gamma$  の Small interference ribonucleic acid (siRNA) (siPPAR $\gamma$ ) およびランダムシーケンスの siRNA をコントロール (siNC) として Lipofectamine® 3000 を用いてトランスフェクションを行った。その後、CA を含有した新鮮な培地でさらに 24 時間ポスト処理をした。PPAR $\gamma$  の mRNA 発現は Real-time RT-PCR 法を用いて評価した。

## 1-8. 統計解析

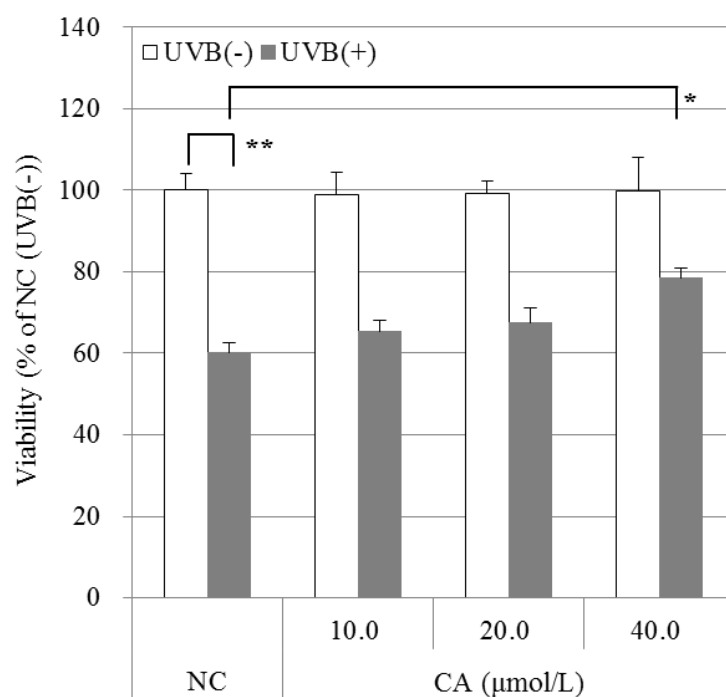
データは means  $\pm$  S.D. で表し、統計解析は 2 群比較に対しては Student の t 検定 (Microsoft Excel 2010) を、3 群以上の比較に対しては Tukey 検定 (IBM SPSS ver. 1.7) を行い、p 値 0.05 未満 (\*p<0.050) および p 値 0.01 未満 (\*\*p<0.010) を統計学的に有意差ありとした。

## 第2節 結果

### 2-1. UVB 曝露後の細胞傷害

予備検討の結果より、CA は細胞生存率の低下が認められない最大濃度である 40  $\mu\text{mol/L}$  を最高濃度として、また UVB 曝露量はおよそ 60% 生存率となる 20  $\text{mJ/cm}^2$  と設定して、第1章の一連の検討を行った。

NHEKs の細胞生存率は UVB 曝露により 60% 程度まで有意に減少した。UVB 曝露による細胞生存率の低下は CA をプレ処理することで改善し、CA 処理濃度 10~20  $\mu\text{mol/L}$  での有意差は認められなかったが、40  $\mu\text{mol/L}$  では NC と比較して有意に細胞生存率が上昇した (Fig. 1-3)。以上より、UVB による細胞傷害に対して、NHEKs を CA でプレ処理することでの緩和作用が示唆された。

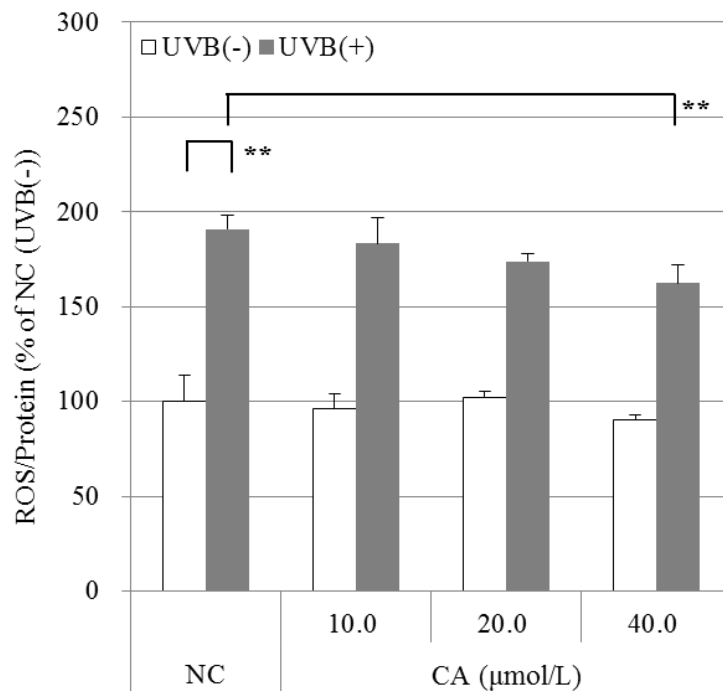


**Figure 1-3 Resistance to UVB-induced cell toxicity in NHEKs treated with CA.**

NHEKs were pre-treated with or without CA for 24 h, then were exposed to 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB and further incubated for 24 h as a post-treatment. Cell viabilities were evaluated using the NR assay and are expressed as fold index (%) compared with the NC without UVB. Results are expressed as means±S.D. (n=4). Significance; \*p<0.050, \*\*p<0.010.

## 2-2. UVB 曝露後の細胞内 ROS レベル

UVB 曝露は細胞内 ROS レベルを上昇させることが報告されている [7]。そこで、UVB 曝露後の NHEKs における細胞内 ROS レベルの上昇に対する CA の作用を評価した。その結果、UVB 曝露によって細胞内 ROS は有意に上昇した。UVB 曝露による細胞内 ROS の上昇は CA をプレ処理することで改善し、CA 処理濃度 10~20  $\mu\text{mol/L}$  での有意差は認められなかったが、40  $\mu\text{mol/L}$  では NC と比較して有意に抑制された (Fig. 1-4)。

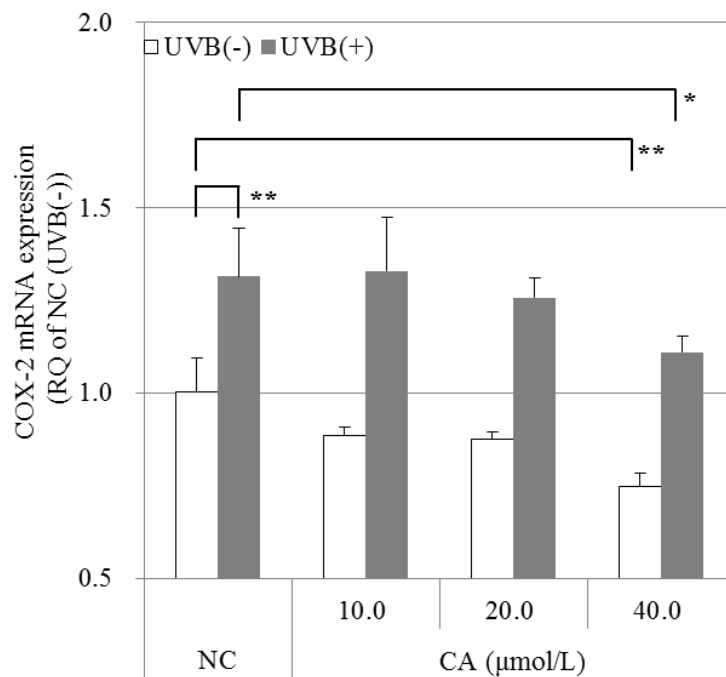


**Figure 1-4 Influence of CA on intracellular ROS levels in NHEKs after UVB exposure.**

NHEKs were pretreated with or without CA for 24 h, then were preloaded with DCFDA for 45 min in Hank's buffer and exposed to 20  $\text{mJ/cm}^2$  UVB, after which intracellular ROS levels were quantified. ROS levels are expressed as fold index (%) compared with the NC without UVB. Results are expressed as means $\pm$ S.D. (n=4). Significance ; \*\*p < 0.010.

### 2-3. UVB 曝露後の COX2 mRNA 発現

UVB 曝露は NHEKs における COX2 mRNA 発現を上昇させることが報告されている [9]。そこで、UVB 曝露後の NHEKs における COX2 mRNA 発現の上昇に対する CA の作用を評価した。その結果、UVB 曝露によって COX2 mRNA 発現は有意に増加した。UVB 曝露による COX2 mRNA 発現の増加は CA をプレ処理することで改善し、CA 処理濃度 10~20  $\mu\text{mol/L}$  での有意差は認められなかったが、40  $\mu\text{mol/L}$  では NC と比較して有意に抑制された (Fig. 1-5)。また、UVB 未曝露群においても同様の抑制作用が確認された (Fig. 1-5)。



**Figure 1-5 Inhibition of UVB-induced COX2 up-regulation in NHEKs treated with CA.**

NHEKs were pre-treated with or without CA for 24 h, then were exposed to 20  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB and further incubated for 6 h as a post-treatment prior to Real-time RT-PCR analysis. COX2 mRNA expression was normalized against cyclophilin mRNA expression and is expressed as fold induction compared with the NC. Results are expressed as means $\pm$ S.D. (n=4). Significance ; \* $p < 0.050$ , \*\* $p < 0.010$ .



#### 2-4. UVB 曝露後の炎症性生理活性物質 PGE<sub>2</sub> 産生

COX2 はアラキドン酸カスケードの律速酵素であることはよく知られている [24]。UVB 曝露された NHEKs において、COX2 の発現は PGE<sub>2</sub> 産生を亢進することが報告されている [25]。そこで、CA の抗炎症作用について明らかにするために、UVB 曝露後の NHEKs における PGE<sub>2</sub> 産生に対する CA の作用を評価した。その結果、UVB 曝露によって PGE<sub>2</sub> 産生は有意に亢進した。UVB 曝露による PGE<sub>2</sub> 産生の亢進は CA をプレ処理することで改善し、CA 処理濃度 10~40  $\mu\text{mol/L}$  の全ての濃度域において NC と比較して有意に抑制された (Fig. 1-6)。一方、前述の COX2 mRNA 発現は UVB 未曝露群においても有意に抑制されたが、PGE<sub>2</sub> 産生においては UVB 未曝露群での変化は認められなかった (Fig. 1-6)。

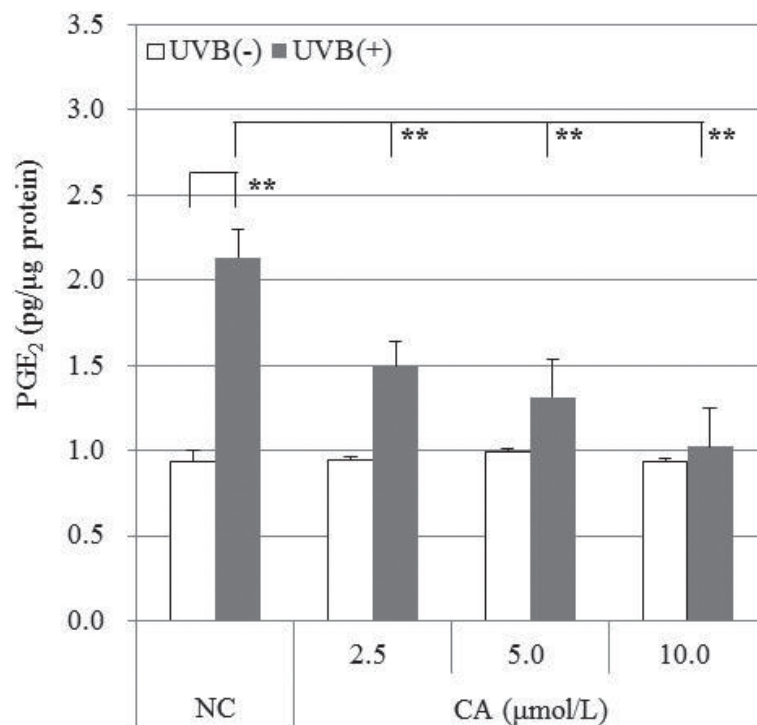
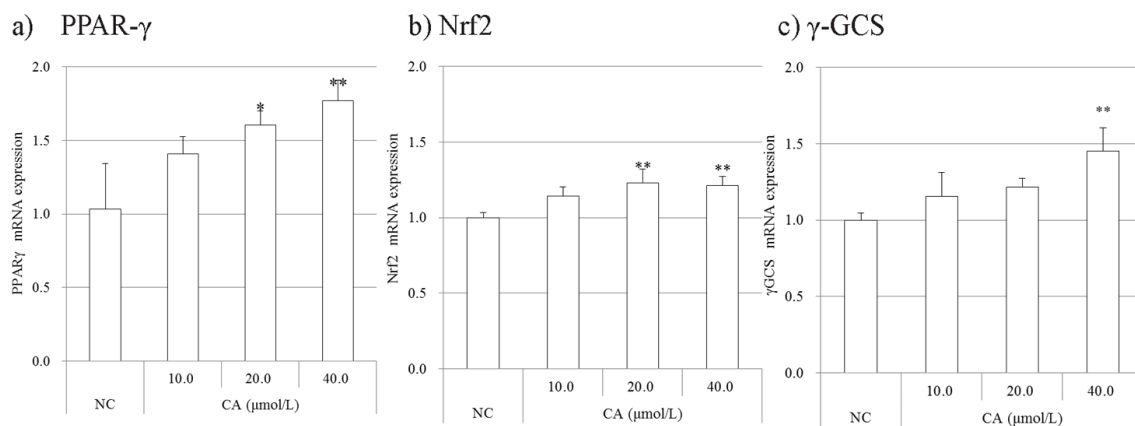


Figure 1-6 PGE<sub>2</sub> secretion from NHEKs pre-treated with CA before UVB exposure.

NHEKs were pre-treated with or without CA for 24 h, then were exposed to 20  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB and further incubated for 24 h as a post-treatment. PGE<sub>2</sub> secretion into the medium was quantified using an ELISA kit. Results are expressed as means $\pm$ S.D. (n=4). Significance; \*\*p<0.010.

## 2-5. 細胞内抗酸化システムに対する影響

PPAR $\gamma$  は脂肪細胞の分化や炎症抑制、NHEKs の分化に関与することが報告されている [25]。UVB 曝露による COX2 発現と PGE<sub>2</sub> 産生は PPAR $\gamma$  により制御されることが報告されていることから [24]、著者は最初に PPAR $\gamma$  の活性化に注目をした。そこで、この過程において CA が PPAR $\gamma$  のリガンドとして作用することで、細胞内抗酸化システムを増強する可能性について、より詳細に検討を行った。UVB 曝露による PGE<sub>2</sub> 産生に対する CA の抑制作用が PPAR $\gamma$ -Nrf2 シグナル経路の活性化を介したものであることを明らかにするために、最初に PPAR $\gamma$  および Nrf2 の mRNA 発現について評価を行った。その結果、PPAR $\gamma$  および Nrf2 の mRNA 発現は CA 処理によって増加し、CA 処理濃度 20~40  $\mu\text{mol/L}$  では有意であった (Fig. 1-7a, b)。さらに、細胞内抗酸化剤として知られている GSH の合成は、律速酵素である  $\gamma$ -GCS による *de novo* 合成によって生成されることが知られており [34]、Nrf2 の活性化に付随して起こることが報告されていることから [27]、 $\gamma$ -GCS の mRNA 発現についても評価を行った。その結果、 $\gamma$ -GCS の mRNA 発現もまた CA 処理によって増加し、CA 処理濃度 40  $\mu\text{mol/L}$  では有意であった (Fig. 1-7c)。



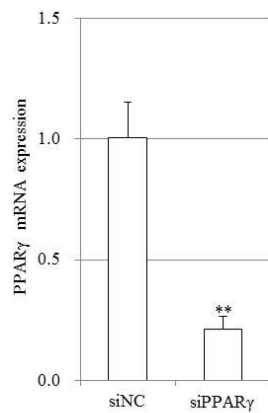
**Figure 1-7 Induction of PPAR $\gamma$  (a), Nrf2 (b) and  $\gamma$ -GCS (c) mRNA expression in NHEKs treated with CA.**

NHEKs were treated with or without CA for 24 h prior to Real-time RT-PCR analysis. PPAR $\gamma$ , Nrf2 and  $\gamma$ -GCS mRNA levels normalized against cyclophilin mRNA expression are expressed as fold induction compared with the NC. Results are expressed as means $\pm$ S.D. (n=4). Significance; \*p<0.050, \*\*p<0.010.

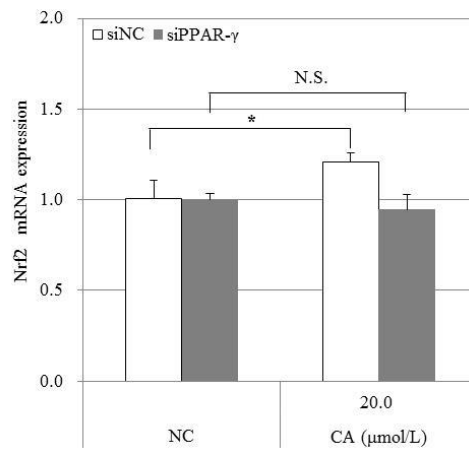
## 2-6. PPAR $\gamma$ -Nrf2 シグナル経路に対する影響

UVB 曝露による PGE<sub>2</sub> 産生に対する CA の抑制作用が PPAR $\gamma$ -Nrf2 シグナル経路の活性化を介したものであることを明らかにするために、著者は siPPAR $\gamma$  のトランスフェクションにより PPAR $\gamma$  を KD (Knock down) した NHEKs を用いて CA の作用を検証した。siPPAR $\gamma$  を導入した細胞の PPAR $\gamma$  発現はおおよそ 20%程度まで有意に低下した (Fig. 1-8a)。また、siNC 導入細胞では先の実験と同様に CA 処理による Nrf2 mRNA 発現の有意な増加が認められたが、siPPAR $\gamma$  導入細胞では CA 処理による Nrf2 mRNA 発現の増加作用は消失した (Fig. 1-8b)。さらに、CA は siNC 導入細胞では先の実験と同様に UVB 曝露によって誘導される PGE<sub>2</sub> 産生の亢進を有意に抑制したが (Fig. 1-8c)、siPPAR $\gamma$  導入細胞においては UVB 曝露によって誘導される PGE<sub>2</sub> 産生に対する作用は認められなかった (Fig. 1-8d)。

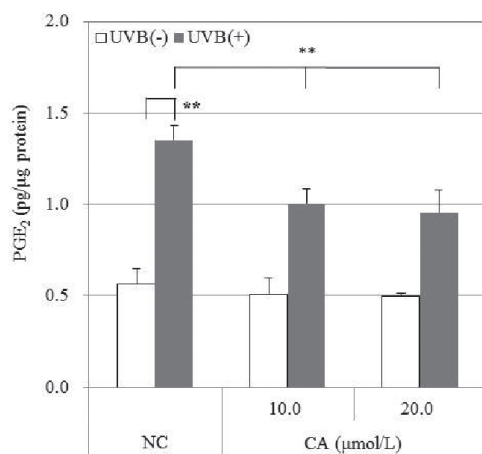
a) PPAR- $\gamma$  mRNA



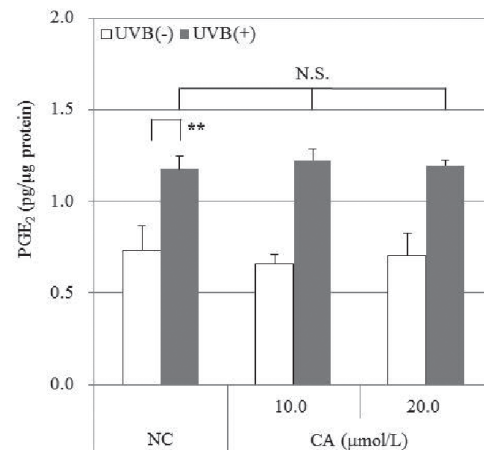
b) Nrf2 mRNA



c) PGE<sub>2</sub> secretion (siNC)



d) PGE<sub>2</sub> secretion (si PPAR- $\gamma$ )



**Figure 1-8 Effects of CA on Nrf2 mRNA expression and UVB-stimulated PGE<sub>2</sub> secretion in PPAR $\gamma$  knockdown NHEKs.**

NHEKs were transfected with siPPAR $\gamma$  or with an siRNA to a random sequence (siNC) and were further incubated with CA for 24 h. a) mRNA expression levels of PPAR $\gamma$  in siNC or siPPAR $\gamma$  transfected NHEKs, b) mRNA expression levels of Nrf2 in siNC or siPPAR $\gamma$  transfected NHEKs treated with CA for 24 h, PPAR $\gamma$  and Nrf2 mRNA levels were normalized against cyclophilin mRNA levels and are expressed as fold induction compared with the NC. c-d) PGE<sub>2</sub> secretion from siNC or siPPAR $\gamma$  transfected NHEKs exposed to 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. CA at various concentrations was pre-treated for 24 h before UVB irradiation. Results are expressed as means $\pm$ S.D. (n=4). Significance; N.S., Not Significance, \*p<0.05, \*\*p<0.010

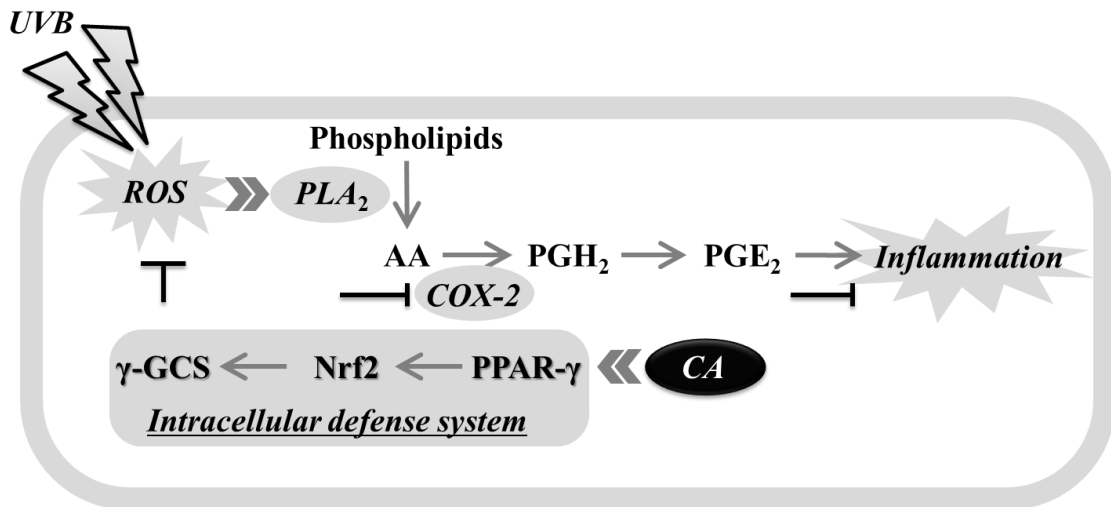
### 第3節 考察

UVB 曝露により誘導される皮膚の炎症は、COX2 mRNA 発現の亢進を介した PGE<sub>2</sub> の過剰生成によって引き起こされる [25]。UVB 曝露による COX2 mRNA 発現の亢進は、細胞内 ROS レベル上昇をトリガーとした p38 Mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) 活性化によって起こることが示されている [35]。これらの事実は、細胞内 ROS レベルの上昇を抑えることが UVB 誘導性の炎症を抑制するため重要であることを裏付けている [10]。

第1章では、UVB 曝露により誘導される皮膚の炎症に対する CA の抗炎症作用について、細胞内 ROS レベルの抑制を介した COX2 発現と PGE<sub>2</sub> 産生に焦点を当てて検討を行った。最初に、UVB 曝露後の細胞傷害に対して CA は緩和作用を見出した (Fig. 1-3)。UVB 曝露により NHEKs の細胞内 ROS レベルは有意に上昇したが、CA はこれを有意に抑制した (Fig. 1-4)。さらに CA は、細胞内 ROS により発現の亢進した COX2 を抑制することで、PGE<sub>2</sub> 産生に対しても抑制作用を示した (Fig. 1-5, 1-6)。また、CA は UVB 未曝露群においても COX2 発現を有意に減少させた (Fig. 1-5)。これらの事実を総合すると、CA は UVB に曝露された皮膚の炎症応答を抑制することが示唆された。事実、著者らのグループが以前に行った検討では、ヒトでの臨床試験において CA 配合剤の塗布により UVB 曝露後の Minimal erythema dose (MED) はプラセボ剤と比較して有意に減少した (Data not shown)。

そこで、著者は PPAR $\gamma$  に注目をしてさらに検討を進めることで、CA の抗炎症作用についてより詳細なメカニズムを明らかにすることとした。PPAR $\gamma$  アゴニストは抗炎症作用を示すことが報告されており [32]、さらに UVB 曝露による COX2 発現と PGE<sub>2</sub> 産生の亢進を PPAR $\gamma$  が制御していることが報告されている [24]。通常、UVB 曝露による COX2 mRNA 発現の増加は NF- $\kappa$ B シグナル経路を介して起こることが知られている [36-38]。PPAR $\gamma$  のアゴニストによる活性化は、Lypopolysaccharide (LPS) や Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) による COX2 発現増加に対しても抑制的に作用し、また直接的に Nrf2 シグナル経路も活性化することから [30]、著者は CA の PPAR $\gamma$  および Nrf2 に対する作用について検討を進めた。通常、ROS

に対する細胞内防御システムは、抗酸化剤や GSH およびカタラーゼのような酵素によって担われている。これらの遺伝子は Nrf2 の下流に存在することが知られていることから、著者は PPAR $\gamma$  および Nrf2、さらにその下流に存在する  $\gamma$ -GCS mRNA 発現に対する CA の作用を評価した。その結果、CA は PPAR $\gamma$  および Nrf2、 $\gamma$ -GCS の mRNA 発現レベルを増加させた (Fig. 1-7)。これらの結果は、CA が UVB 曝露による細胞内 ROS レベルの上昇を低下させるという事実と一致していた (Fig. 1-4)。最後に、CA の PPAR $\gamma$  に対する作用を検証する目的で siPPAR $\gamma$  導入細胞を用いた検証実験を行った。その結果、siPPAR $\gamma$  導入細胞では、Nrf2 発現に対する CA の作用は消失した (Fig. 1-8) ことから、CA の抗炎症作用に対する重要なメカニズムとして、PPAR $\gamma$ -Nrf2 シグナル経路の活性化が関与していると考えられた (Fig. 1-9)。



**Figure 1-9** Scheme showing the anti-inflammatory effects of CA : involvement of PPAR $\gamma$  activation.

ROS; Reactive oxygen species, PLA<sub>2</sub>; Phospholipase A<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>; Prostaglandin H<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>; Prostaglandin E<sub>2</sub>, COX2; Cyclooxygenase 2, CA; Chimyl alcohol, PPAR $\gamma$ ; Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , Nrf2; nuclear factor E2-related factor 2,  $\gamma$ -GCS;  $\gamma$ -Glutamyl cysteine synthase.

#### 第4節 小括

第1章の結果より、CAはUVBによるCOX2発現とPGE<sub>2</sub>産生の亢進を抑制することで細胞傷害の緩和作用を示すことを明らかとした。さらに、CAはPPAR $\gamma$ のリガンドとしてNrf2シグナル経路を活性化して細胞内抗酸化システムを高めることで、UVB曝露による細胞内ROSレベルの上昇に対して抑制作用を示した。その結果として、UVB曝露による一連の皮膚炎症応答を抑制することを明らかとした。



## 第2章 大気汚染物質 (DPE) による皮膚細胞傷害への活性酸素の寄与とジカルボエトキシパントテン酸エチルの有用性

近年では大気汚染の大気汚染の問題にも注目が集まっている。大気汚染物質は種々化学物質、生体異物及び粒子から成り、主要な物質としては自動車、火力発電所、焼却炉、暖炉などの排煙、火山噴火による噴出物、土壌粒子などが由来の粒子状物質 (PM)、粉塵、燃焼などが由来の一酸化炭素、硫黄酸化物 (二酸化硫黄など)、窒素酸化物 (二酸化窒素など) などの排出ガス、炭化水素と窒素酸化物などが光化学反応を起こして生じるオゾン (O<sub>3</sub>) や多環芳香族炭化水素 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) などの光化学オキシダント、燃焼や石油製品からの揮発などが由来の揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds, VOC) などの排出ガス・微粒子、鉱物や工業製品などが由来の石綿などの微粒子が知られている [39]。

日本では大気汚染防止法により、それらの多くが規制の対象となっており、排出基準等が定められるなどの対策が講じられている。しかしながら、粒子状物質に関しては、近隣諸国から日本に越境輸送されてくるのが、昨今深刻な問題となりつつある。なお、大気汚染防止法では法規制の対象である粒子状物質として「自動車排ガスの中の粒子状物質」が指定されており、同法関連法規では粒子状物質が「自動車排ガスの中の粒子状物質」に限定して用いられている。

これら大気汚染の原因とされる種々の化学物質及び生体異物及び粒子は直接吸入する恐れがあることから、呼吸器系に対する影響が広く論じられてきた。しかし、皮膚は生体における最外層の臓器であり常に外界に曝されていることから、呼吸器系と同様に、大気汚染の原因物質に直接接触する可能性を潜在的に有している。特に最近の疫学研究によって

大気汚染物質による皮膚機能の低下が報告されている。また、大気汚染物質の主要構成物質である PAHs が Aryl hydrocarbon receptor (AHR) シグナル経路を介して炎症性メディエーターを誘導することが報告されている [6, 40-41]。PAHs は非常に高い親和性をもって AHR に結合し、AHR リガンド複合体は核内へと移行し、芳香族炭化水素核内転写因子 (Aryl hydrocarbon nuclear translocator, ARNT) と結合する。PAHs は AHR 活性化、核内移行および AHR-ARNT 複合体形成を通じて、Cytochrome P450 family 1 subfamily A polypeptide 1 (CYP1A1) を含む AHR 制御遺伝子の発現増加を引き起こす [42]。誘導された CYP1A1 は、PAHs の一種である Benzo[a]pyrene (BaP) の代謝を促進することで求核性の高いエポキシド及びジオールエポキシド構造を形成し、これが直接的に DNA を傷害して、発がん性を示す [43-44]。すなわち、AHR 活性化を介した CYP1A1 の誘導は、ときに皮膚がんや炎症応答を誘導する [45]。それゆえに、CYP1A1 の過剰発現を抑制することは、PAHs により誘導される皮膚細胞傷害を予防する観点から非常に重要であると考えられる。

また、AHR 活性化による影響として ROS 産生も知られている [46]。第 1 章でも言及した通り、細胞内抗酸化システムは、Nrf2- Keap1 シグナル経路によって制御されている [23-24]。Nrf2 は核内において GSH 合成の律速酵素  $\gamma$ -GCS および Heme oxygenase-1 (HO-1)、Quinone oxidoreductase-1 (NQO1) などの抗酸化関連遺伝子を増加させると報告されている [26-28]。以上より、大気汚染物質は AHR 活性化とこれに付随する CYP1A1 の過剰生成、ならびに酸化ストレスによって皮膚に対して細胞傷害を引き起こす可能性が示唆される。

著者は、大気汚染物質のなかでも近年非常に注目を集めている PM2.5 に着目した。PM2.5 はカーボンパーティクルとそれに付着した PAHs、なかでも Diesel particulate extract (DPE) がその多くを占めていることから、大気汚染物質の人体に対する影響に関する研究ではモデル化合物として DPE が一般的に用いられている。そこで、第 2 章では DPE を用いて大気汚染物質による皮膚細胞傷害への活性酸素の寄与を検証することを目的とした。さらに、大気汚染物質による皮膚細胞傷害の緩和を目的として、20 種類以上の化合物のスクリーニン

グ試験を行った結果、VB5 として知られている Pantothenic acid (PA) およびその誘導体 2,4-Dicarboethoxy pantothenate (EDCEP) が顕著な作用を示したことから、これらについて Figure 2-1 に示したフローチャートにしたがって検討を行った。



**Figure 2-1 Flow chart of experiment.**

Figure 2-2 に PA および EDCEP の化学構造を示した。PA は水溶性ビタミンの一種である VB5 として広く知られており、皮膚において保湿作用、抗炎症作用、および育毛作用を示すことが報告されている [47]。しかしながら、パントテン酸は安定性や経皮吸収性が低いことから、著者らの研究グループは新規油溶性ビタミン B5 の誘導体である EDCEP を合成し、本検討に用いた。

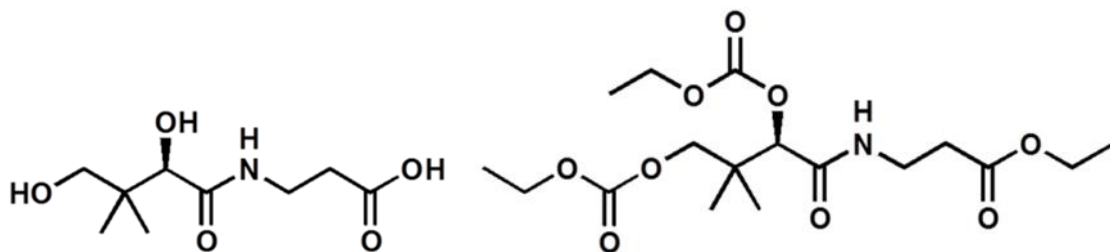


Figure 2-2 Chemical structures of PA (left) and its derivative EDCEP (right).

## 第1節 実験方法

### 1-1. 実験材料

パントテン酸ナトリウム、Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、MTT、マイヤーヘマトキシリン溶液、およびエオシン Y は和光純薬工業 (大阪) より購入した。PAHs の混合物である DPE はアメリカ国立標準技術研究所 (National Institute of Standards and Technology, NIST) (MD, USA) から Standard reference material (SRM) 1975 として購入した。Ambion<sup>®</sup> Cells-to-CT<sup>™</sup> TaqMan<sup>®</sup> Kits、TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix、および Pierce<sup>™</sup> BCA、Protein Assay Kit、Alamar Blue<sup>®</sup>、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat anti-rabbit IgG(H+L)、FITC rabbit anti-mouse IgG(H+L) は Thermo Fisher Scientific (東京) より購入した。DCFDA は Calbiochem (CA, USA) から購入した。腫瘍壊死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA kit は R&D Systems (MN, USA) から購入した。M.E CRYO COMPOUND はマイクロエッジ (大阪) より購入した。Fluorescein-5-thiosemicarbazide (5-FTSC) は Anaspec (CA, USA) から購入した。Hoechst33258 は同仁化学 (熊本) から購入した。マリノールは武藤化学 (東京) から購入した。Polyoxyethylenesorbitan monolaurate は Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。Anti-AHR mouse monoclonal IgG antibody (A-3) および anti-Nrf2 rabbit monoclonal IgG antibody (H-300) は Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) から購入した。Can Get Signal<sup>®</sup> Immunoreaction Enhancer Solution Solution 1 は東洋紡 (大阪) から購入した。

### 1-2. 細胞培養

NHEKs は倉敷紡績 (大阪) より購入し、HuMedia KG2 培地 (倉敷紡績) を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub>環境下で培養した。また、RHEEs は Episkin<sup>™</sup> large model (Episkin<sup>™</sup> -LM, EPISKIN) を購入し、附属の培地を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub>環境下で培養した。

### 1-3. DPE 曝露後の細胞傷害

NHEKs は所定濃度の PA と EDCEP、および DPE (5 mg/mL) を含有した培地で 24 時間処理した。その後、0.2 mg/mL の MTT を含有する培地で 1 時間培養し、培地を除去した。MTT の還元によって生成した細胞内のブルーホルマザンはイソプロパノールで抽出し、吸光度 (Abs. 550nm と Abs. 650 nm の差) を測定することで定量した。細胞生存率は、試験試料および DPE 未処理細胞 (NC) を 100 とした Index (%) で表した。

### 1-4. mRNA 発現の定量 (Real-time RT-PCR 法)

NHEKs は所定濃度の PA と EDCEP、および DPE (5 mg/mL) あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μmol/L) を含有した培地で所定の時間処理をした。NHEKs から総 RNA を抽出後、Ambion® Cells-to-CT™ TaqMan® Kits を用いて cDNA を作成した。Real-time RT-PCR は TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix を用いて Step One Plus™ Real-time PCR system を使用して行った。Thermo Fisher Scientific から入手したプライマーのアッセイ ID は Table 2 に示した。

**Table 2 プライマーのアッセイ ID**

プライマー	アッセイ ID
CYP1A1	Hs00153120_m1
Nrf2	Hs00975961_g1
γ-GCS	Hs00155249_m1
HO-1	Hs0110250_m1
NQO1	Hs1045993_g1
Cyclophilin	PPIA control mix

### 1-5. DPE あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露後の細胞内 ROS レベル

NHEKs は所定濃度の PA と EDCEP を含有した培地で 24 時間プレ処理をした後、DCFDA を含有した HBSS(-)で 45 分間インキュベーションすることにより、細胞内に DCFDA を取り込ませた。その後、DPE (5 mg/mL) あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μmol/L) を含有した HBSS(-)を 1 時間曝露した。NHEKs は Triton X-100 含有 PBS(-)で細胞を溶解し蛍光強度 (Ex. 485 nm/ Em. 530 nm) を測定することで、細胞内 ROS を定量した。同時に、BCA Protein Assay Kit を用いて細胞のタンパク質量を定量することで、細胞内 ROS レベルは単位タンパク質当たりの蛍光強度として表した。

### 1-6. DPE あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露後の炎症性サイトカイン TNF-α の定量 (ELISA 法)

NHEKs は所定濃度の EDCEP を含有した培地で 24 時間プレ処理をした後、DPE (5 mg/mL) あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μmol/L) を含有した HBSS(-)を 1 時間曝露した。その後、EDCEP を含有した新鮮な培地でさらに 48 時間ポスト処理をした。培地中に分泌された TNF-α は、市販の ELISA キットを用いて定量した。同時に、BCA Protein Assay Kit を用いて細胞のタンパク質量を定量することで、単位タンパク質当たりの TNF-α 分泌量として表した。

### 1-7. RHEEs における DPE 曝露後の細胞傷害

RHEEs は入荷後、附属の培地で 24 時間馴化を行った。その後、新鮮な培地に交換し、1%EDCEP 含有製剤およびプラセボ製剤を RHEEs の角層側から適用し、48 時間培養した。RHEEs を洗浄後、10% Alamar Blue® 含有培地で 2 時間培養した。Alamar Blue® によって RHEEs から培地中に放出された蛍光 (Ex.544 nm/Em.590 nm) を測定した。細胞生存率は、プラセボ製剤を適用した DPE 未曝露の RHEEs に対する Index (%) で表した。

## **1-8. 組織学的評価**

### **1-8-1. 凍結切片の作成と薄切**

細胞生存率測定後の RHEEs は PBS(-)にて洗浄した後、2 分割して凍結用コンパウンドに包埋後、液体窒素で凍結し凍結ブロックを作成した。これを、クライオスタットにて 6  $\mu\text{m}$  厚に薄切し、スライドガラスに貼り付けた。

### **1-8-2. 組織の形態評価 (HE 染色)**

組織切片はアセトンに 2 分間固定後、ヘマトキシリン溶液で 15 分、0.5%エオシン溶液で 10 分間染色を行い、包埋後に顕微鏡で観察した。

### **1-8-3. 酸化タンパク質の評価 (5-FTSC 染色)**

組織切片は 0.5  $\mu\text{mol/L}$  5-FTSC 含有 100  $\text{mmol/L}$  2-morpholinoethane sulphonic acid (MES) 緩衝液 (pH 5.5) で 15 分間染色を行うことで Carbonylated proteins (CPs) を染色した [48]。包埋した後、CPs は蛍光顕微鏡 (Ex.492 nm/Em.516 nm) で観察した。さらに、CPs に由来する蛍光強度は Adobe® Photoshop 7.0.1.を用いて輝度解析を行い、プラセボ製剤を適用した DPE 未曝露の RHEEs に対する Index (%) で表した。



### 1-9. 免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察

NHEKs はガラスボトムディッシュに播種した。AHR 染色に対しては、所定濃度の PA と EDCEP を含有した培地で 24 時間プレ処理をした後、DPE (5 mg/mL) を含有した HBSS(-) を 1 時間曝露した。その後、PA と EDCEP を含有した新鮮な培地でさらに 3 時間ポスト処理をした。Nrf2 染色に対しては、所定濃度の EDCEP を含有した培地で 6 時間処理をした。

NHEKs は冷メタノールで 10 分間固定した後、1% BSA 含有 0.1% Polyoxyethylenesorbitan monolaurate PBS(-) (PBS-T) で 1 時間ブロッキングを行った。NHEKs は 1 次抗体として、抗 AHR 抗体 (1:100) あるいは抗 Nrf2 抗体 (1:100) を Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution Solution 1 で希釈した溶液にて 4°C で一晩インキュベーションをした。NHEKs は PBS(-) にて洗浄後、PBS-T で希釈した 2 次抗体溶液にて室温で 1.5 時間インキュベーションをした。その後、1 µg/mL Hoechst33258 含有 PBS(-) にて室温で 5 分間インキュベーションをすることで細胞核を染色した。免疫染色を行った NHEKs は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した (AHR or Nrf2: Ex. 493 nm/ Em. 517 nm, Hoechst: Ex. 353 nm/ Em. 465 nm)。

### 1-10. 細胞内 GSH レベル

NHEKs は所定濃度の EDCEP を含有した培地で 48 時間プレ処理をした。総 GSH 量は、GSH reductase recycling assay [49] を用いて評価した。同時に、BCA Protein Assay Kit を用いて細胞のタンパク質量を定量することで、細胞内 GSH レベルは単位タンパク質当たりの GSH として表した。

### 1-11. 遺伝子のノックダウン (RNA 干渉法)

NHEKs は  $1.0 \times 10^4$  cells/well の密度で 24 well plate に播種し、Nrf2 の siRNA (siNrf2) およびランダムシークエンスの siRNA をコントロール (siNC) として Lipofectamine® 3000 を用いてトランスフェクションを行った。

### 1-12. 統計解析

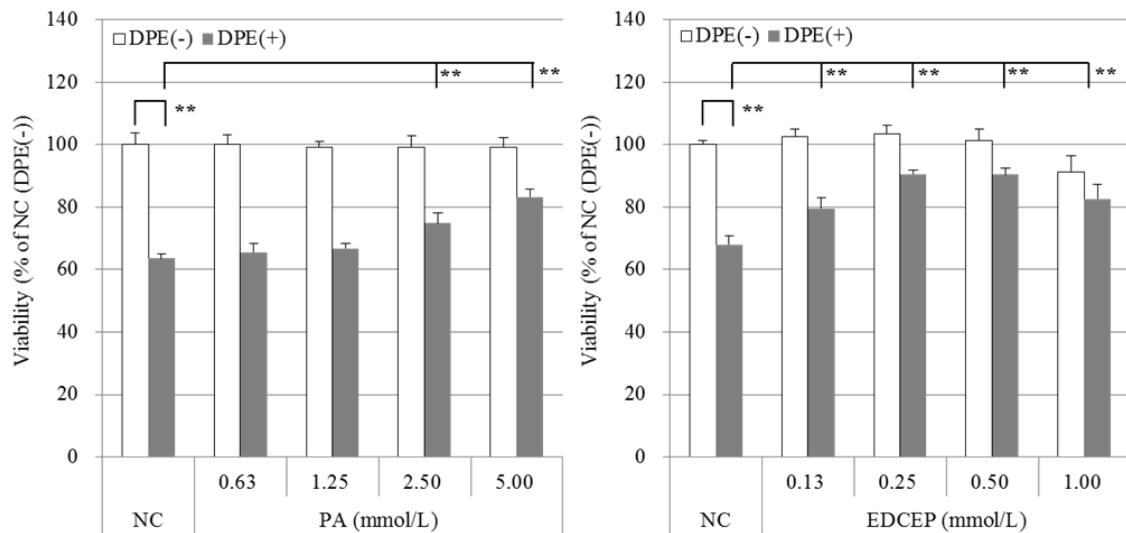
データは means  $\pm$  S.D. で表し、統計解析は 2 群比較に対しては Student の t 検定 (Microsoft Excel 2010) を、3 群以上の比較に対しては Tukey 検定 (IBM SPSS ver. 1.7) を行い、p 値 0.05 未満 (\* $p < 0.050$ ) および p 値 0.01 未満 (\*\* $p < 0.010$ ) を統計学的に有意差ありとした。

## 第2節 結果

### 2-1. DPE 曝露後の細胞傷害

予備検討の結果より、PA および EDCEP は細胞生存率の低下が認められない最大濃度である 5 mmol/L および 1mmol/L をそれぞれ最高濃度として、また DPE は曝露後におおよそ 60% 生存率となる 5 mg/mL を曝露濃度と設定して、第2章の一連の検討を行った。

NHEKs の細胞生存率は DPE 曝露により 60% 程度まで有意に減少した。DPE 曝露による細胞生存率の低下は PA および EDCEP をプレ処理することで改善し、PA 処理濃度 2.50~5.00 mmol/L および EDCEP は処理濃度 0.13~1.00 mmol/L 全ての濃度域において NC と比較して有意に細胞生存率が上昇した (Fig. 1-3)。以上より、DPE による細胞傷害に対して、NHEKs を PA および EDCEP で処理することでの緩和作用が示唆された (Fig. 2-3)。



**Figure 2-3 Recovery of DPE-induced cell toxicity in NHEKs treated with PA or with EDCEP.**

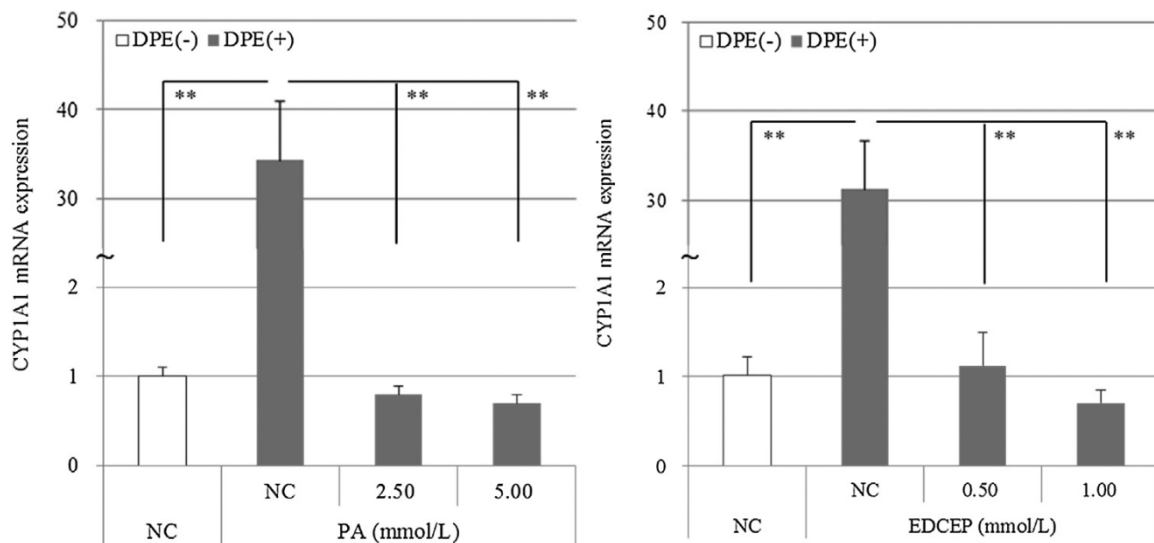
**NHEKs were treated with PA or EDCEP with or without DPE for 24 h.**

Cell viabilities were evaluated by the MTT assay and are expressed as fold index (%) compared with the NC without DPE. Results are expressed as means±S.D. (n = 4). Significance; \*\*p < 0.010

## 2-2. DPE 曝露後の AHR シグナル経路に対する影響

### 2-2-1. DPE 曝露後の CYP1A1 mRNA 発現

AHR のリガンドである PAHs は、これまでに NHEKs における CYP1A1 遺伝子の過剰発現を誘導することが報告されている [42]。今回大気汚染物質のモデル化合物として用いた DPE の構成成分は PAHs の混合物であることから、PA および EDCEP が AHR シグナル経路に干渉することで DPE 曝露による CYP1A1 過剰誘導を抑制するか評価を行った。その結果、DPE 曝露によって CYP1A1 mRNA 発現は有意に増加した。DPE 曝露による CYP1A1 mRNA 発現の増加は PA および EDCEP を処理することで抑制され、PA 処理濃度 2.5~5.0 mmol/L および EDCEP 処理濃度 0.5~1.0 mmol/L では NC と比較して有意であった (Fig. 2-4)。



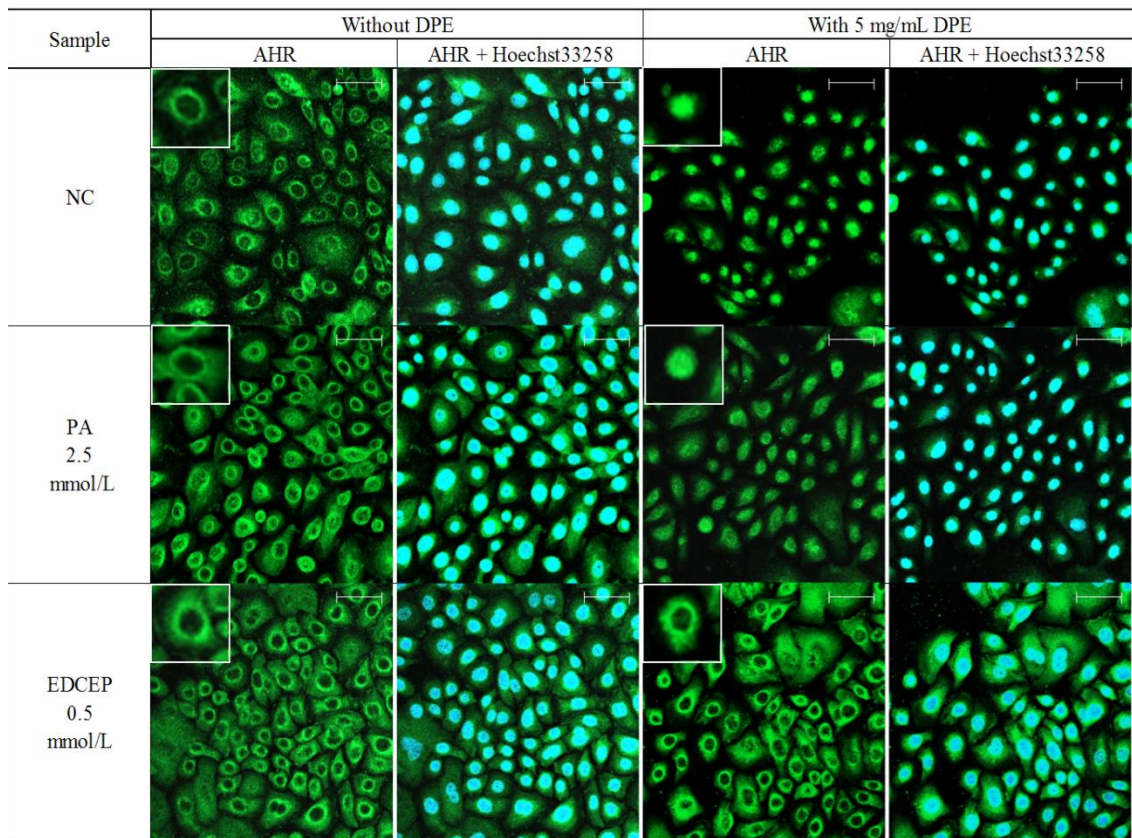
**Figure 2-4 Inhibition of DPE-induced cytochrome P450, family 1, member A1 (CYP1A1) up-regulation in NHEKs treated with PA or EDCEP.**

NHEKs were treated with PA or EDCEP with or without DPE for 24 h then subjected to Real-time RT-PCR analysis. CYP1A1 mRNA expression level normalized for cyclophilin mRNA expression is expressed as fold induction compared with NC. Results are expressed as means±S.D. (n = 4).

Significance; \*\*p < 0.010

### 2-2-2. DPE 曝露後の AHR 核内移行に対する影響

PA および EDCEP が AHR シグナル経路に対するメカニズムを明らかにするために、次に著者は DPE 曝露後の AHR の核内移行を評価した。その結果、NHEKs に対して DPE を曝露することで、細胞質に存在していた AHR 由来の緑色の蛍光は核内へと移行し、細胞核由来の青色の蛍光の局在と一致したことから、DPE 曝露が AHR の核内移行を促進させることが明らかとなった。このとき、PA を処理した細胞では DPE 曝露による AHR 核内移行に対する影響は認められなかったが、EDCEP を処理することで DPE 曝露によっても AHR は細胞質に局在していたことから、EDCEP は AHR の核内移行を阻害することが確認された (Fig. 2-5)。

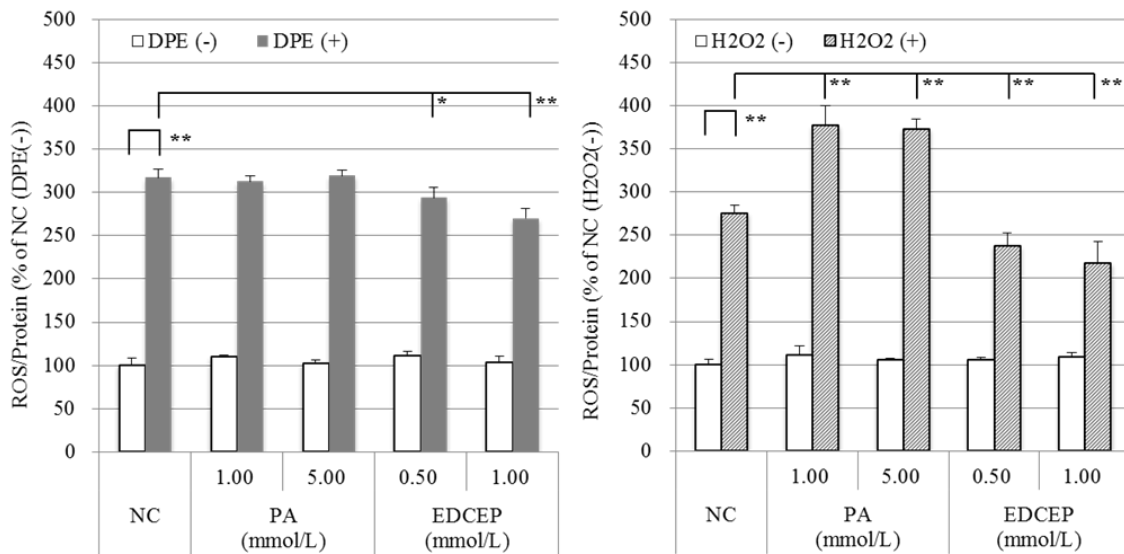


**Figure 2-5 Influence of PA and of EDCEP on AHR translocation in NHEKs after exposure to DPE.**

NHEKs were treated with or without EDCEP for 24 h, and then were exposed to DPE for 1 h. NHEKs were further incubated with or without EDCEP for 3 h, after which the distribution of AHR labeled by immunostaining was observed by confocal laser scanning microscopy. Scale bars: 20 mm. Green; AHR, Blue; nucleus.

### 2-3. DPE あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露後の細胞内 ROS レベル

CYP1A1 を含む AHR シグナル経路の活性化は細胞内 ROS レベルを上昇させることが知られていることから、著者は PA および EDCEP の DPE 曝露後の細胞内 ROS レベルに対する作用を評価した。PA および EDCEP で NHEKs を 24 時間プレ処理した後、DCFDA で処理して DCFDA を取り込ませた。その後、DPE あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露による細胞内 ROS レベルの変化を確認した。その結果、EDCEP のみが DPE 曝露により誘導される ROS レベルの上昇を有意に抑制した。さらに、一般的に細胞内 ROS レベルを上昇させることが知られている酸化ストレス誘導剤 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露に対する影響も同様に評価したところ、EDCEP のみが H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露により誘導される ROS レベルの上昇を有意に抑制した。一方で、PA は ROS レベルをむしろ増加させる結果となった (Fig. 2-6)。これらから、PA と EDCEP とは異なる作用メカニズムを有する可能性が示唆され、EDCEP は細胞内抗酸化システムを増強することで DPE による細胞傷害の緩和作用を示す可能性が示唆された。



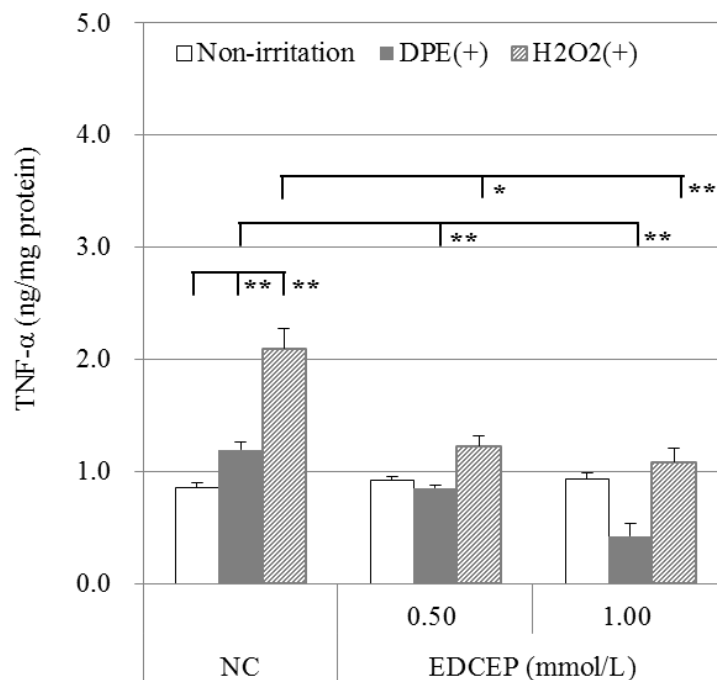
**Figure 2-6 Influence of PA and of EDCEP on intracellular ROS levels of NHEKs after exposure to DPE or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

NHEKs were treated with or without PA or EDCEP for 24 h. Cells preloaded with DCFDA were exposed to DPE or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h. Intracellular ROS levels were then quantified. ROS levels are expressed as fold index (%) compared with NC without DPE or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results are expressed as means±S.D. (n = 4). Significance; \*p< 0.050, \*\*p < 0.010



#### 2-4. DPE あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露後の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 分泌

次に DPE 曝露後に NHEKs から分泌されるサイトカインについて検討を行った。著者は細胞内 ROS レベル上昇により分泌が亢進される炎症性サイトカインで、さらに細胞内 ROS レベルの上昇にも関係する TNF- $\alpha$  に着目をして [50-51]、EDCEP の抗炎症作用を評価した。DPE および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露は NHEKs の TNF- $\alpha$  分泌を有意に上昇させた。また、EDCEP の処理によって DPE 曝露による TNF- $\alpha$  の分泌亢進を抑制することが確認された。さらに、EDCEP の処理によって H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により上昇した TNF- $\alpha$  の分泌亢進も有意に抑制することが確認された (Fig. 2-7)。



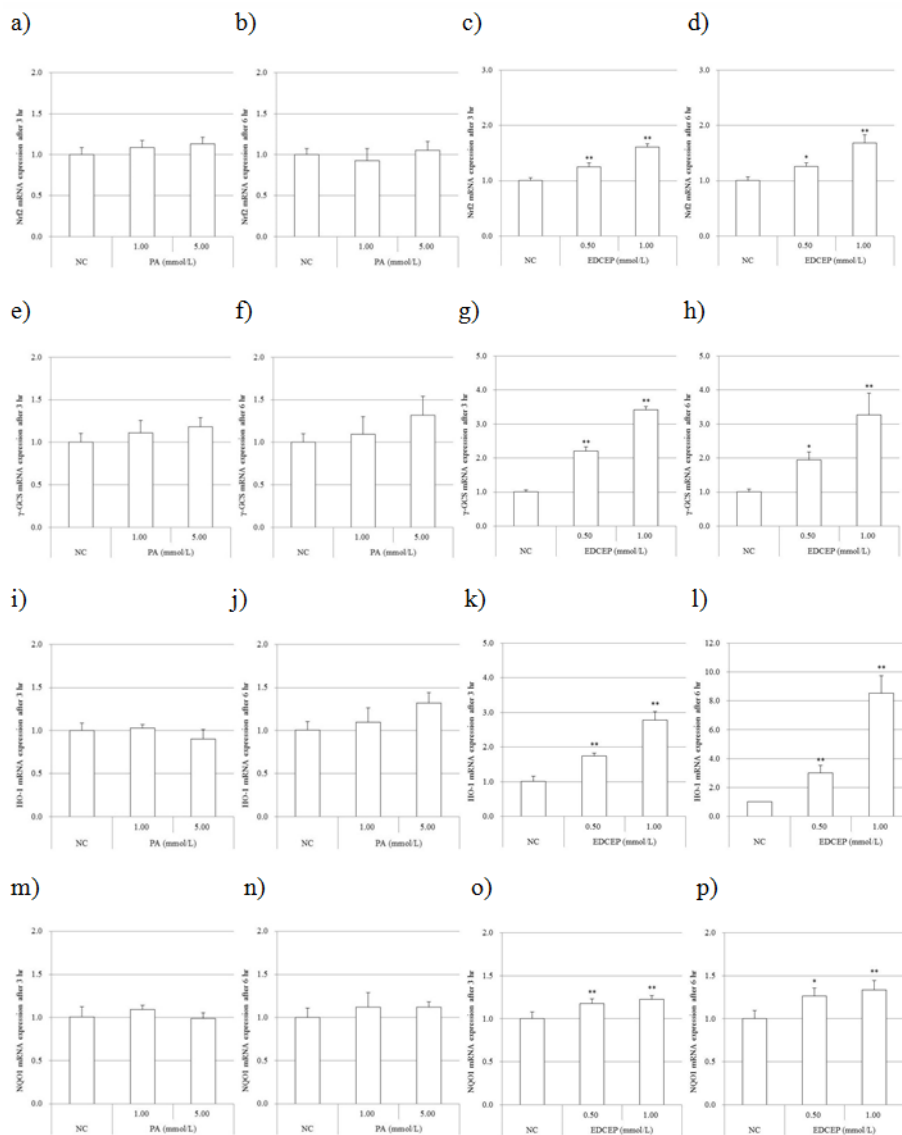
**Figure 2-7** TNF- $\alpha$  secretion from NHEKs treated with EDCEP after DPE or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure.

NHEKs were treated with or without EDCEP for 24 h, and then exposed to DPE or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h. NHEKs were further incubated with or without EDCEP for 24 h. TNF- $\alpha$  secretion into the medium was quantified using an ELISA kit. Results are expressed as means $\pm$ S.D. (n = 4). Significance; \*p < 0.050, \*\*p < 0.010

## 2-5. 細胞内抗酸化システムに対する影響

### 2-5-1. 細胞内抗酸化システム関連遺伝子の mRNA 発現

PA および EDCEP の作用をより詳細に明らかにするために、Nrf2 シグナル経路に関連する遺伝子を評価した。PA および EDCEP で処理した NHEKs を用いて Nrf2 とその下流に存在する  $\gamma$ -GCS および HO-1、NQO1 について評価を行った。その結果、EDCEP は 3 時間および 6 時間処理ともに、Nrf2 および  $\gamma$ -GCS、HO-1、NQO1 を有意に増加させたが、一方で PA ではいずれの時間でもこれ mRNA の発現増加は認められなかった (Fig. 2-8)。

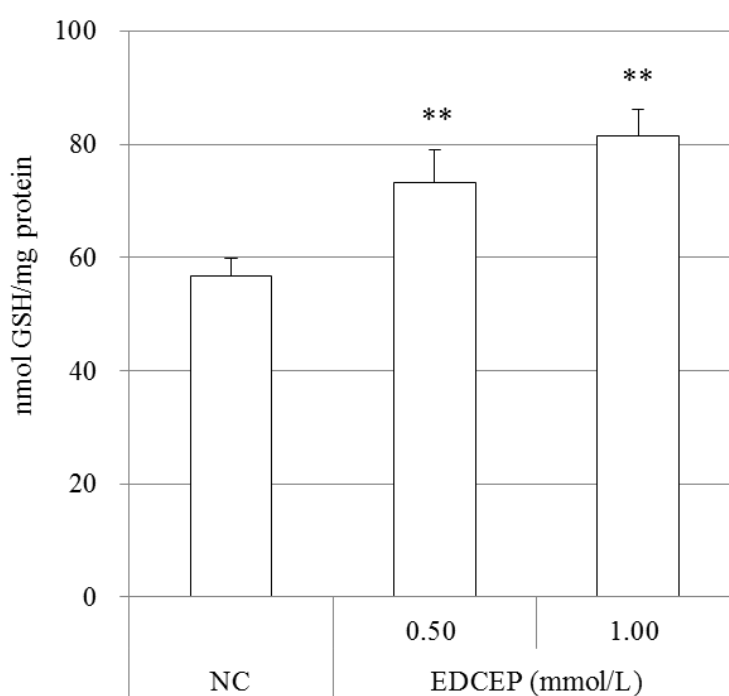


**Figure 2-8 Induction of mRNA expression levels of factors related to the intracellular defense system.**

NHEKs were treated with or without PA or EDCEP for 3 or 6 h then were subjected to Real-time RT-PCR analysis. a–d) Nrf2 mRNA expression, e–h) g-GCS mRNA expression, i–l) HO-1 mRNA expression, and m–p) NQO1 mRNA expression. a-b, e-f, i-j, m-n) mRNA expression after PA treatment and c-d, g-h, k-l, o-p) mRNA expression after EDCEP treatment. a, c, e, g, i, k, m, o) mRNA expression after 3 h treatment and b, d, f, h, j, l, n, p) mRNA expression after 6 h treatment. mRNA expression levels were normalized for cyclophilin mRNA expression and are expressed as fold induction compared with NC. Results are expressed as means±S.D. (n = 4). Significance; \*p < 0.050, \*\*p < 0.010

### 2-5-2. 細胞内 GSH レベルに対する影響

EDCEP は Nrf2 シグナル経路を活性化し、GSH 合成の律速酵素  $\gamma$ -GCS の mRNA 発現も増加させたことから、次に EDCEP の細胞内 GSH 合成に対する作用を評価した。その結果、細胞内 GSH 合成は EDCEP 処理によって増加し、EDCEP 処理濃度 0.50~1.00 mmol/L では有意であった (Fig. 2-9)。



**Figure 2-9 Intracellular GSH levels in NHEKs treated with or without EDCEP.**

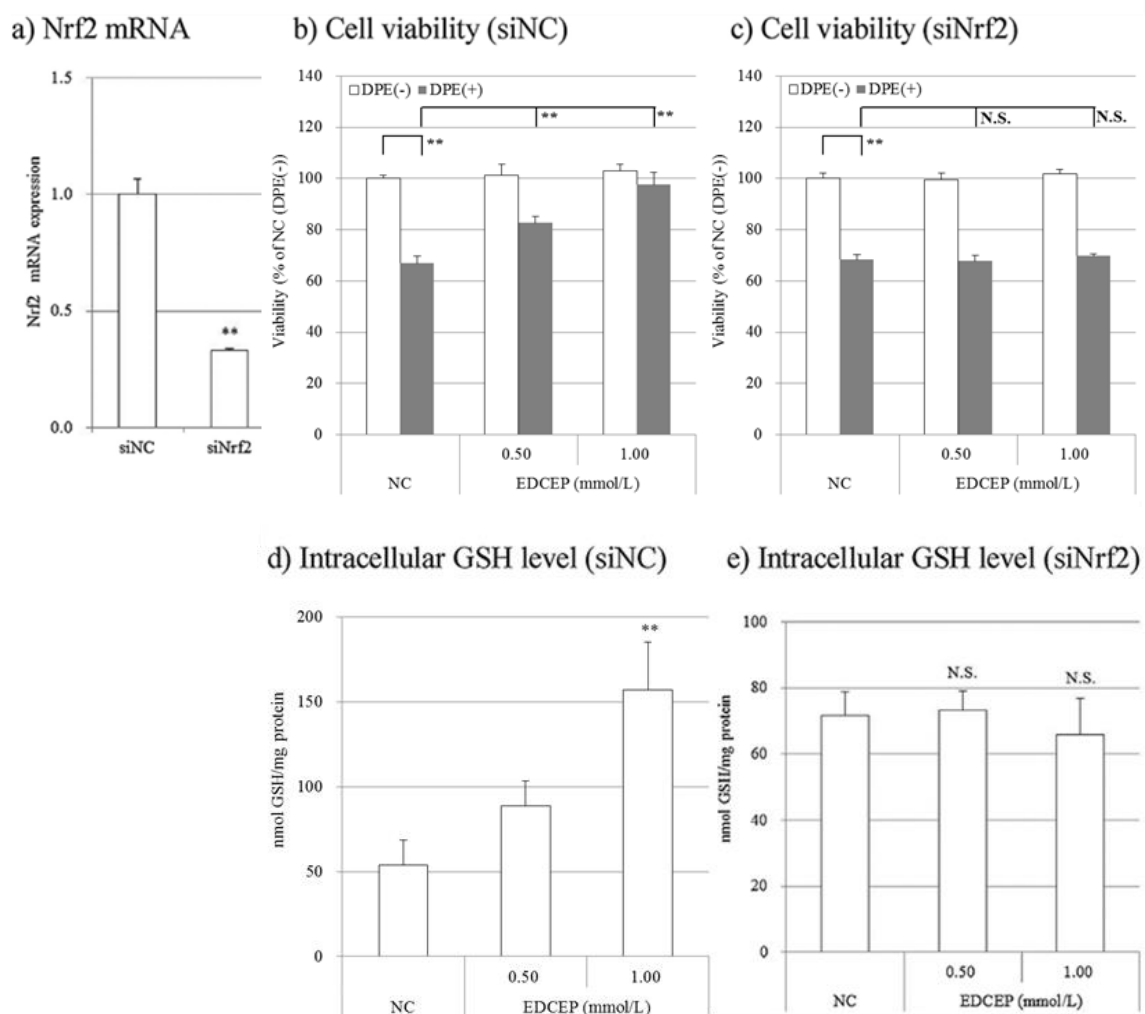
NHEKs were treated with or without EDCEP for 48 h. Total GSH levels of lysates of NHEKs were quantified using the GSH reductase recycling assay. Results are expressed as means $\pm$ S.D. (n = 4).

Significance; \*\*p < 0.010

## 2-6. Nrf2 シグナル経路に対する影響

### 2-6-1. Nrf2 シグナル経路に対する影響への検証実験

DPE 曝露による EDCEP の細胞傷害緩和作用が Nrf2 シグナル経路の活性化を介したものを明らかにするために、著者は siNrf2 のトランスフェクションにより Nrf2 を KD した NHEKs を用いて EDCEP の作用を検証した。siNrf2 を導入した細胞の Nrf2 発現はおよそ 30% 程度まで有意に低下した (Fig. 2-10a)。また、siNC 導入細胞において EDCEP は DPE 曝露後の細胞傷害に対する緩和作用を示したが、siNrf2 導入細胞ではその緩和作用は消失した (Fig. 2-10b, c)。さらに、siNC 導入細胞において細胞内 GSH の合成促進作用は認められたが、siPPAR $\gamma$  導入細胞では GSH 合成促進作用は認められなかった (Fig. 2-10d, e)。



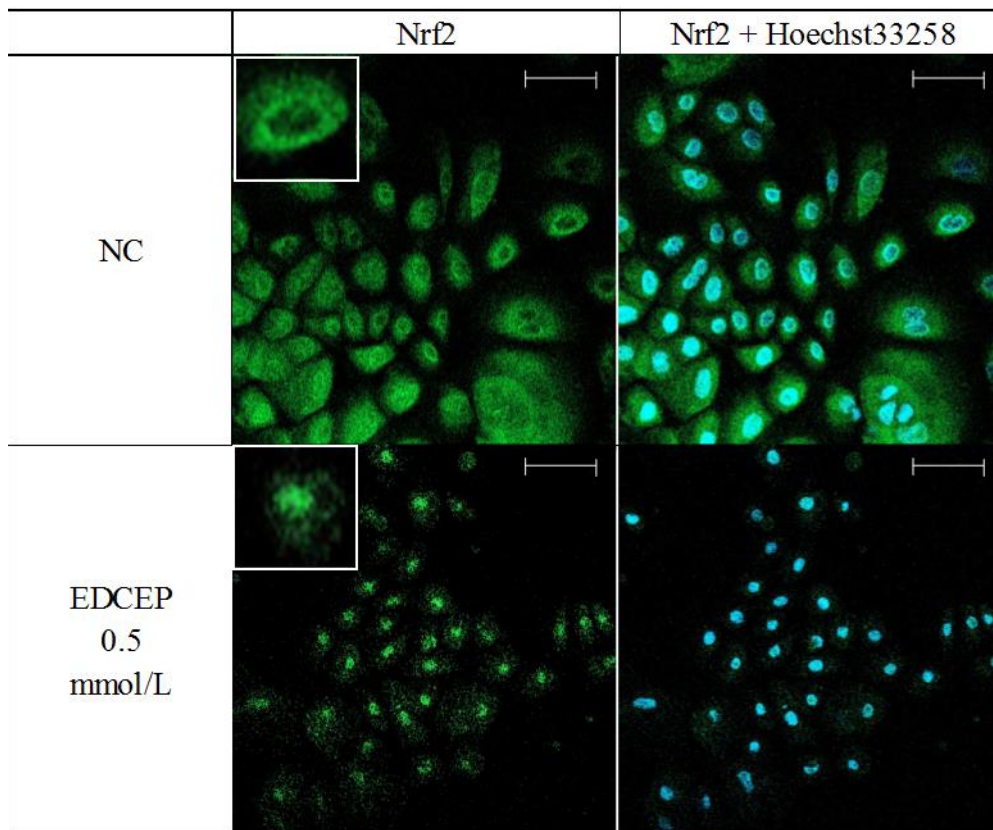
**Figure 2-10** Effects of EDCEP on intracellular GSH level in Nrf2 knockdown NHEKs.

NHEKs were transfected with siNrf2 or with an siRNA to a random sequence (siNC). a) mRNA expression levels of Nrf2 in siNC or siNrf2 transfected NHEKs, b–c) Recovery of DPE-induced cell toxicity in siNC or siNrf2 transfected NHEKs treated with EDCEP. NHEKs were treated with EDCEP with or without DPE for 24 h after transfection. Cell viabilities were evaluated by the MTT assay and are expressed as fold index (%) compared with the NC without DPE. Results are expressed as means S.D. (n = 4). d–e) intracellular GSH levels from siNC or siNrf2 transfected NHEKs treated with EDCEP. NHEKs were treated with or without EDCEP for 48 h after transfection. Total GSH levels of lysates of NHEKs were quantified using the GSH reductase recycling assay. Results are expressed as means±S.D. (n = 4). Significance; \*p < 0.050, \*\*p < 0.010

## 2-6-2. Nrf2 核内移行に対する影響

Nrf2 シグナル経路を活性化することで、EDCEP は DPE 曝露による細胞傷害を緩和することが示唆されたことから、Nrf2 シグナル経路を活性化の最初の応答である Nrf2 核内移行を評価した。NHEKs に対して EDCEP を 6 時間処理することで、細胞質に存在していた Nrf2 由来の緑色の蛍光は核内へと移行し、細胞核由来の青色の蛍光の局在と一致したことから、EDCEP が Nrf2 の核内移行を促進させることが明らかとなった (Fig. 2-11)。

これらの結果を総合すると、EDCEP は酸化ストレスに対して Nrf2 シグナル経路の活性化を介して細胞内抗酸化システムを増強することが示唆された。



**Figure 2-11 Influence of EDCEP on the nuclear translocation of Nrf2 in NHEKs.**

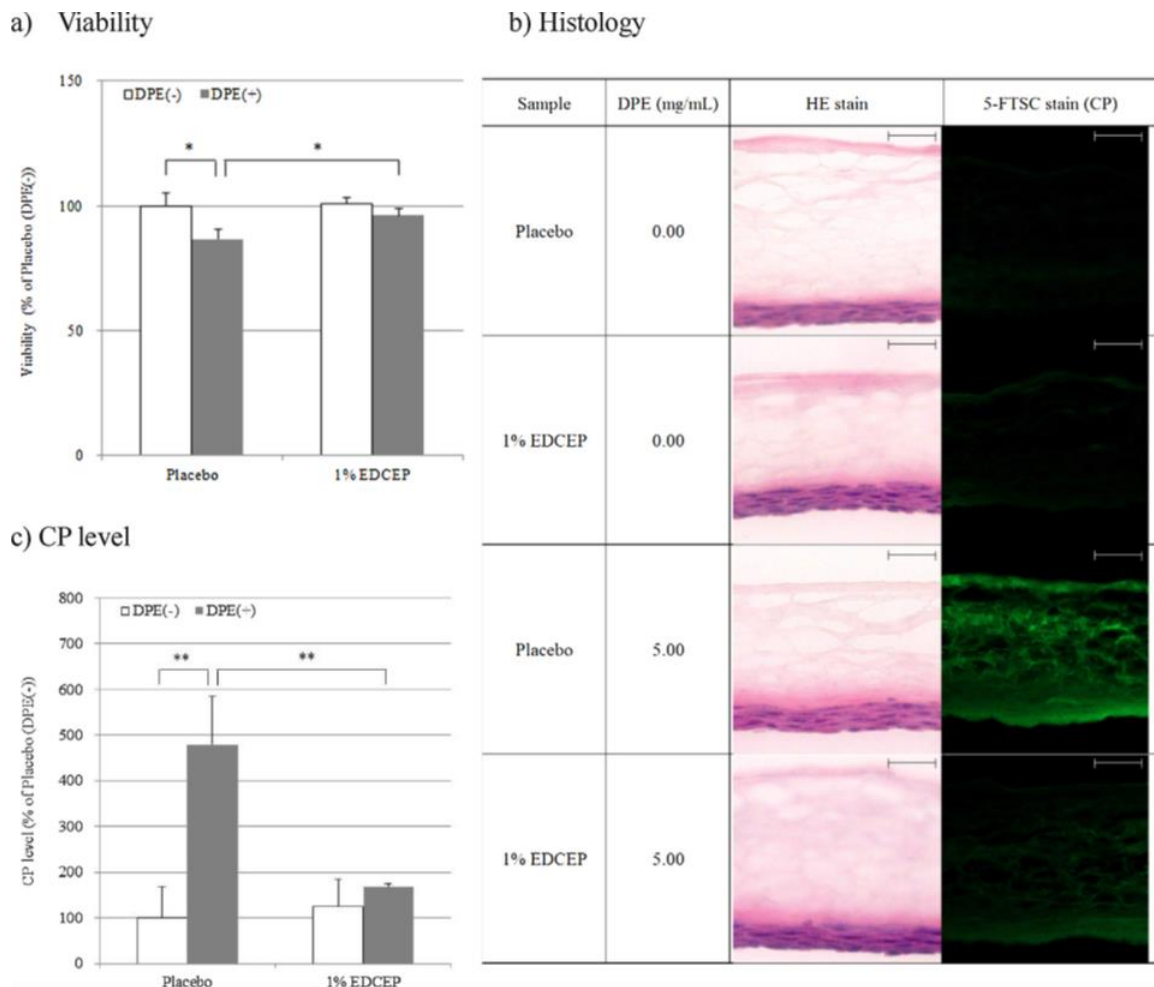
NHEKs were treated with or without EDCEP for 6 h. The distribution of Nrf2 labeled with immunostaining was then observed by confocal laser scanning microscopy. Scale bars: 20  $\mu$ m. Green; Nrf2, Blue; nucleus.



## 2-7. RHEEs における DPE 曝露後の CPs レベル

最後に、皮膚表面から曝露された大気汚染物質の影響を確認することを目的として、RHEEs を用いて検討を行った。試験試料として角層側から 1%EDCEP 配合製剤あるいはプラセボ製剤を適用した。また、これらの条件に対して DPE 曝露群と未曝露群を設け、48 時間培養した後、RHEEs の細胞生存率と CPs レベルに対する作用を評価した。プラセボ製剤を適用した RHEEs では DPE 曝露によって細胞生存率が有意に低下したが、1%EDCEP 配合製剤を適用した RHEEs では、DPE 曝露による細胞生存率の低下は認められなかった。また、DPE 曝露群では 1%EDCEP 配合製剤を適用した RHEEs ではプラセボ製剤と比較して細胞生存率が有意に増加した (Fig. 2-12a)。また、組織染色の画像からプラセボ製剤を適用した RHEEs では DPE 曝露によって CPs レベルの顕著な上昇が認められたが、1%EDCEP 配合製剤を適用した RHEEs では CPs レベルの上昇は認められなかった (Fig. 2-12b)。また、CPs レベルを輝度解析により数値化したところ、これらの結果を反映してプラセボ製剤を適用した RHEEs での DPE 曝露による CPs レベルの有意な上昇と、DPE 曝露群では 1%EDCEP 配合製剤を適用した RHEEs での CPs レベルの有意な抑制が認められた (Fig. 2-12c)。

以上のことから、角層をはじめとした皮膚三次元構造を有する RHEEs においても NHEKs 単層培養系と同様にして EDCEP 処理によって DPE 曝露後の細胞傷害と酸化ストレスが緩和されることが明らかとなった。



**Figure 2-12 Changes in RHEEs treated with a Placebo or 1% EDCEP with or without DPE.**

**RHEEs were treated topically with a Placebo or with 1% EDCEP for 48 h with or without DPE.**

a) Viabilities were evaluated by the Alamar Blue1 assay and are expressed as fold index (%) compared with RHEEs treated with the Placebo without DPE. b) Histology of RHEEs treated with the Placebo or with 1% EDCEP with or without DPE was observed by confocal laser scanning microscopy. Scale bar: 20 mm. HE stain (blue; nucleus, red; cytosol or SC), 5-FTSC stain (green; CPs) c) CPs levels were quantified by image analysis of the fluorescence intensity of 5-FTSC stain. Results are expressed as means±S.D. (n = 3). Significance; \*p < 0.050, \*\*p < 0.010

### 第3節 考察

近年、DPE を含む環境汚染の原因物質が、皮膚の老化やアトピー性皮膚炎といった皮膚の機能不全をもたらすと報告され始めている [6, 41, 52-55]。本章の結果より大気汚染物質のモデル化合物である DPE の主要構成因子である PAHs は CYP1A1 の mRNA 発現を著しく誘導し、また AHR シグナル経路を通じて NHEKs における細胞内 ROS レベルを上昇させることが明らかとなった。ROS および ROS により誘導される炎症応答は様々な皮膚トラブルのトリガーとなることが報告されている [10]。さらに、ROS もまた CYP1A1 の発現を上昇させることが知られている [56-57]。CYP1A1 は、PAHs の一種である BaP の代謝を促進することで求核性の高いエポキシド及びジオールエポキシド構造を形成し、これが直接的に DNA を傷害することで、発がん性を示すことが報告されている [58]。これらの事実から、CYP1A1 の生成は AHR シグナル経路とこの経路の活性化によって産生される ROS の両方によって負の連鎖反応が生じている可能性を示唆している。したがって、PAH によって活性化される AHR シグナル経路による CYP1A1 と ROS の産生を抑制することは皮膚のホメオスタシスを維持する上で非常に重要と考えられる [45]。

本章では、DPE によって活性化される AHR シグナル経路における PA とその誘導体 EDCEP の作用について、CYP1A1 と ROS の産生に注目して評価を行った。最初に、著者は DPE 曝露による細胞傷害に対して、PA と EDCEP が顕著な緩和作用を示すことを見出した (Fig. 2-3)。また、CYP1A1 発現は DPE によりおおよそ 30 倍程度まで上昇するが、PA と EDCEP はこの過剰誘導を有意に抑制することが示された (Fig. 2-4)。これらから PA と EDCEP 両化合物は DPE による細胞傷害を緩和することが明らかとなった。事実、EDCEP は DPE によって誘導される AHR の核内移行を阻害する (Fig. 2-5) ことから、EDCEP は DPE によって誘導される CYP1A1 に対して AHR シグナル経路依存的に制御していることが示唆される。

さらに、DPE は NHEKs における細胞内 ROS レベルを上昇させるが、過剰な ROS 産生に対して EDCEP は抑制的に作用する一方で PA による抑制作用は認められなかった (Fig. 2-6)。

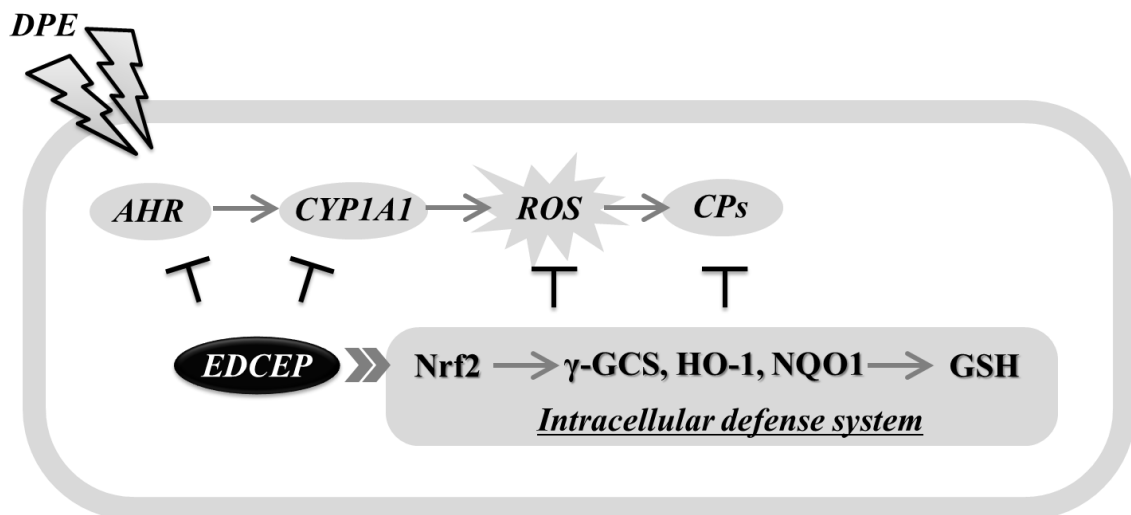
加えて、一般的な酸化ストレスの誘導剤である  $\text{H}_2\text{O}_2$  による ROS 産生に対しては、PA は有意に増加させた (Fig. 2-6)。これらから、PA には細胞内抗酸化システムの増強作用がないと考えられ、事実 PA は Nrf2 シグナル経路の活性化に対しても影響を及ぼさなかった (Fig. 2-8)。対照的に、PA は DPE による細胞傷害に対する緩和作用を示していることから、DPE 曝露による細胞傷害に対する PA と EDCEP の作用は、当初の著者の予想に反して、互いに異なる挙動を示すことが明らかとなった。PA の作用メカニズムについては明らかになっていない部分も多くあるが、それについては今後の課題とし、本検討では EDCEP に焦点をあて、さらに詳細な検討を行うこととした。

そこで著者は EDCEP の抗酸化作用とそのメカニズムに注目をした。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  は ROS 産生に付随する炎症応答に関与することが知られている [50]。EDCEP の抗酸化作用を検証するために、DPE あるいは  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって誘導される TNF- $\alpha$  分泌に対する作用を評価した。その結果、EDCEP は DPE あるいは  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって誘導される TNF- $\alpha$  分泌を抑制することが明らかになり (Fig. 2-7)、さらに RHEEs においては DPE による CPs レベルの上昇を抑制することが明らかになった (Fig. 2-12b, c)。CPs は細胞を構成するタンパク質に含まれるアルギニンやリジンのようなアミノ基と脂質の過酸化によって生じるアルデヒド化合物が反応することで生成される。EDCEP の化学構造を鑑みても、ROS に対して抑制的に作用するヒドロキシル基などは有さないことから、EDCEP は細胞内抗酸化システムを増強していると結論づけた。

通常、ROS に対する細胞内抗酸化システムは、抗酸化剤や GSH やカタラーゼのような酵素によって担われている。これらの因子は Nrf2 シグナル経路の下流に存在していることから、我々は Nrf2 mRNA 発現に対する EDCEP の作用を評価し、Nrf2 発現を増加させることを見出した (Fig. 2-8)。Nrf2 の活性化は PAHs 曝露による細胞傷害を緩和することが報告されている [59-60]。EDCEP の作用メカニズムについて、さらに詳細に検討するために Nrf2 シグナル経路の下流に存在する  $\gamma$ -GCS および HO-1、NQO1 の mRNA 発現に対する作用も

検討した結果、いずれも濃度依存的な発現の増加が認められ (Fig. 2-8)、GSH 合成に対しても促進作用を示す事が明らかとなった (Fig. 2-9)。さらに、Nrf2 を KD した細胞においてこれら EDCEP の作用は消失することが確認され (Fig. 2-10)、また EDCEP は Nrf2 の核内移行も促進することが確認された (Fig. 2-11)。

これらの結果から、EDCEP は DPE 曝露による細胞内 ROS レベルの上昇に対して Nrf2 シグナル経路を活性化に基づき抑制的に作用することが分かった (Figure 2-13)。一方で PA においては、Nrf2 シグナル経路に対する影響は認められなかった。



**Figure 2-12 Scheme showing the anti-pollution effects of EDCEP : involvement of Nrf2 activation**

AHR; Aryl hydrocarbon receptor, CYP1A1; Cytochrome P450 family 1 subfamily A polypeptide 1, ROS; Reactive oxygen species, CPs; Carbonylated proteins, EDCEP; 2,4-Dicarboethoxy pantothenate, Nrf2; nuclear factor E2-related factor 2, γ-GCS; γ-Glutamyl cysteine synthase, HO-1; Heme oxygenase-1, NQO1; Quinone oxidoreductase-1, GSH; Glutathione

#### 第4節 小括

第2章の結果より、EDCEPはDPE曝露によるAHRシグナル経路の活性化とCYP1A1発現の亢進を抑制することで細胞傷害の緩和作用を示すことを明らかとした。さらに、EDCEPはNrf2シグナル経路を活性化して細胞内抗酸化システムを高めることで、DPE曝露による細胞内ROSレベルの上昇に対して抑制作用を示した。その結果として、DPE曝露による一連の酸化ストレス応答を抑制することを明らかとした。

### 第3章 *In vitro* 乾燥表皮モデルを用いた乾燥による皮膚細胞傷害への活性酸素の寄与と真皮マトリックスへの影響

シワは皮膚老化におけるもっとも一般的な症状として一般にも広く認知されており、顔の年齢認知印象を大きく左右する要因であると言われている。2011年7月には「乾燥による小ジワを目立たなくする」という文言が56番目の化粧品の効能効果として追加承認をされ、さらに2016年には「シワを改善する」という文言で真皮をターゲットとした有効成分を含む医薬部外品が初めて承認をされた。このことから、高齢化に向かう我が国において老化予防は恒常的な消費者の要望になりつつある。

皮膚内部あるいは皮膚表面の水分量は、表皮組織の水分保持能およびバリア機能によって制御されており、Natural moisturizing factor (NMF) [61] およびに角層細胞間脂質のラメラ構造 [62]、表皮顆粒層の Tight junction (TJ) [63] の影響を受ける。これらの機能は紫外線や低湿度環境により変化すると報告されている。これら機能の変化は、皮膚表面において皮丘と呼ばれる凸部と皮溝と呼ばれる凹部からなる肌理構造の乱れ、すなわち皮丘の拡大や異方性低下、落屑の形成といった形態変化を伴う乾燥肌の原因となる。

冬季の低湿度環境が乾燥肌を引き起こすことは良く知られているが、実際に冬季のヒト皮膚で実施された研究によれば、角層から抽出した IL-1ra/IL-1 $\alpha$  比の上昇が報告されている [7]。また、低湿度環境下においては IL-1 $\alpha$  の分泌が亢進することが報告されている [64]。さらに、冬季の角層では CPs の増加が観察される [65]。これらの報告は、冬季の乾燥肌において微弱炎症ならびに酸化ストレスが誘導されている可能性を示唆している。実際に、このような現象は動物実験で再現をされている。つまり、ヘアレスマウスを低湿度環境下で飼育すると、角層層数の低下ならびにラメラボディの減少に起因して有意な皮膚バリア機能異常が認められ、結果として乾燥肌を引き起こすことが確認されている [66]。

通常、皮膚の乾燥は小ジワの形成に関与する。また、皮膚の乾燥は、さまざまな皮膚トラブルの原因となることが知られているが、その明確なエビデンスは報告されていない。間接的な乾燥がシワ形成を加速することが考えられる。これをサポートするエビデンスの一つが乾燥皮膚由来の角層において検出されている炎症性サイトカイン **IL-1 $\alpha$**  の産生亢進である。**IL-1 $\alpha$**  が真皮マトリックスの構成成分であるコラーゲンの分解酵素 (**Matrix metalloproteinase-1, MMP-1, Collagenase**) 産生を誘導することが知られていることから、**IL-1 $\alpha$**  の産生は真皮マトリックス構造の変性を伴うシワ形成を加速すると報告されている [67]。しかしながら、現在化粧品業界においては動物実験が禁止されていることから、皮膚の乾燥と ROS の生成、さらに **IL-1 $\alpha$**  を介したシワ形成の関係を客観的に証明することは困難である。そこで第 3 章では、RHEEs を用いて *in vitro* 乾燥皮膚モデルを作成し、乾燥による皮膚細胞傷害への影響と活性酸素の寄与を明らかにするとともに、*in vitro* 乾燥皮膚モデルに NHDFs を組み合わせることによって皮膚の乾燥とシワ形成の関係を明らかにすることを目的とした。



## 第1節 実験方法

### 1-1. 実験材料

顆粒状の塩化カルシウムは国産化学（東京）より購入した。アンプル管はマルエムより購入した。Alamar Blue<sup>®</sup> および Pierce<sup>™</sup> BCA、Protein Assay Kit は Thermo Fisher Scientific（東京）より購入した。プロテインアレイキット Biotin label-based Human Obesity Antibody Array1 は RayBiotech (GA, USA) から購入した。マイヤーヘマトキシリン溶液およびエオシン Y は 和光純薬工業（大阪）より購入した。5-FTSC は Anaspec (CA, USA) から購入した。M.E CRYO COMPOUND はマイクロエッジ（大阪）より購入した。IL-1 $\alpha$  ELISA キットおよび抗ヒト MMP-1 抗体 (AF-901)、抗ヤギ IgG-HRP 抗体 (FKA14) は R&D Systems (MN, USA) から購入した。

### 1-2. 細胞培養

NHDFs は倉敷紡績（大阪）より購入し、5% Fetal bovine serum (FBS) を含有した Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。また、RHEEs は Episkin<sup>™</sup>-LM (EPISKIN) を購入し、附属の培地を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。

### 1-3. 乾燥刺激装置の作成

乾燥刺激装置は、培養期間中 RHEEs の表面を低湿度環境下に保つことを想定し、顆粒状の塩化カルシウムを充填したアンプル管を予め乾熱滅菌した後、12 well plate に配置した RHEEs 上部に閉塞状態で設置した (Fig. 3-1a)。また、アンプル管と RHEEs を培養する 12 well plate の接続部位は白色ワセリンを用いて密閉した (Fig. 3-1b)。各々の RHEEs の表面湿度は塩化コバルト紙の色調変化を目安に予め検討した [68]。各アンプル管の湿度は飽和無機塩溶液により調整した。すなわち、20°C の環境下では  $\text{K}_2\text{SO}_4$  : 97%,  $\text{NaCl}$  : 75% および  $\text{MgCl}_2$  : 33% を指標とした (Fig. 3-22)。

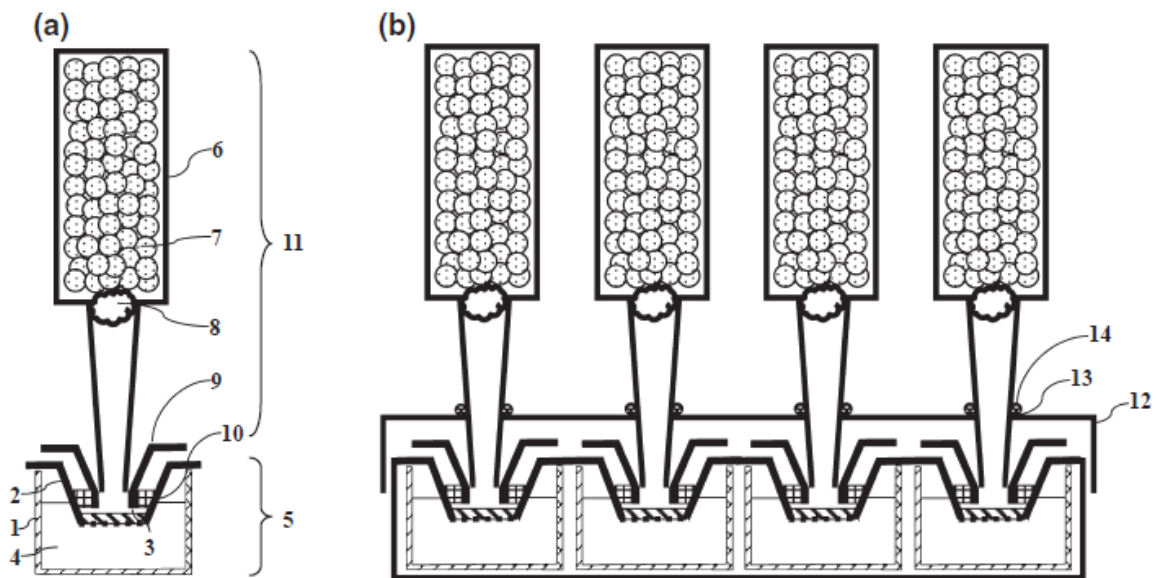
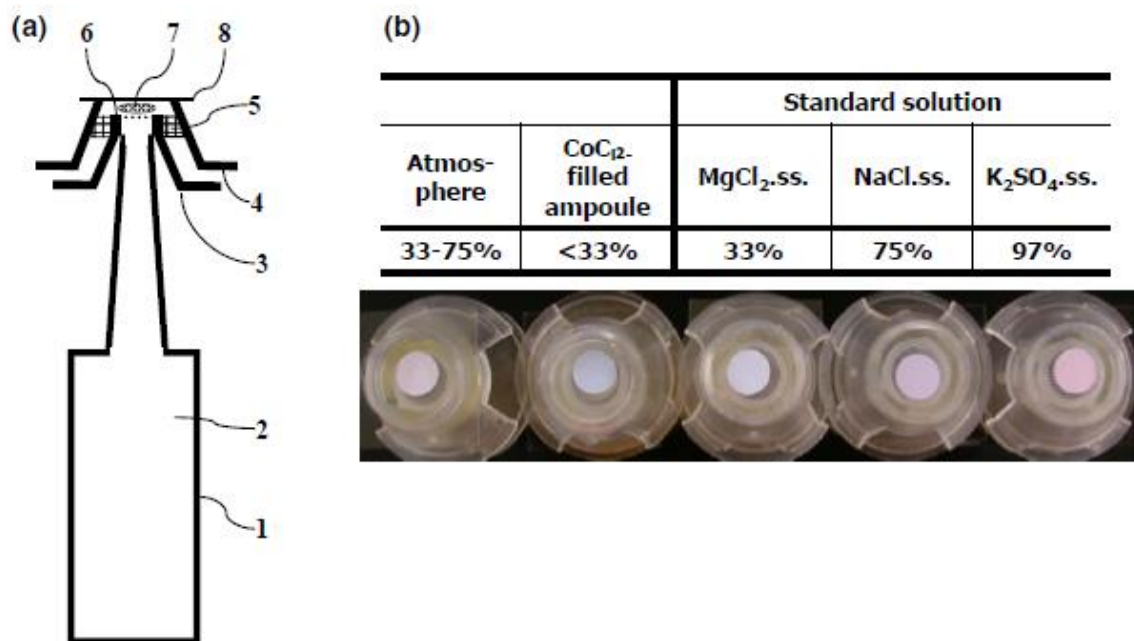


Figure 3-1 A  $\text{CaCl}_2$ -filled ampoule for preparation of dry conditions at the surface of RHEEs.

These images show the  $\text{CaCl}_2$ -filled ampoule used in the study.

(a) Details about each part of the  $\text{CaCl}_2$ -filled ampoule loaded on a RHEEs. (b) RHEEs with the  $\text{CaCl}_2$ -filled ampoule cultivated in 12 well plates. The name of each part is as follows, 1: culture well, 2: culture insert, 3: RHEEs, 4: medium, 5: RHEEs culture kit (1-4), 6: ampoule, 7:  $\text{CaCl}_2$  (desiccant), 8: cotton plug, 9: small culture insert, 10: silicon tube, 11:  $\text{CaCl}_2$ -filled ampoule (6-10), 12: culture plate cover, 13: through hole and 14: vaseline.



**Figure 2 Humidity measurement in the loaded CaCl<sub>2</sub>-filled ampoule. Humidity in the loaded CaCl<sub>2</sub>-filled ampoule was measured.**

(a) Details about each part of the humidity measurement device based on the dry instrument. The name of each part is as follows, 1: ampoule, 2: saturated solution of standard or CaCl<sub>2</sub>, 3: small culture insert, 4: culture insert, 5: silicon tube, 6: mesh, 7: CoCl<sub>2</sub> paper and 8: slide glass. (b) CoCl<sub>2</sub> papers in loading CaCl<sub>2</sub> and standard solution-filled ampoules

#### **1-4. 乾燥刺激条件下での RHEEs の培養**

RHEEs を 24 時間馴化した後、NC として通常培養を継続した RHEEs および乾燥刺激装置を設置した RHEEs を準備した。試験期間中、附属の維持培地で毎日に培地交換を行い、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で 6 日間培養した。RHEEs を洗浄後、10% Alamar Blue® 含有培地で 2 時間培養した。Alamar Blue® によって RHEEs から培地中に放出された蛍光 (Ex.544 nm/Em.590 nm) を測定した。細胞生存率は、NC に対する Index (%) で表し、乾燥刺激による細胞毒性が無いことを確認した。

#### **1-5. 組織学的評価**

##### **1-5-1. 凍結切片の作成と薄切**

細胞生存率測定後の RHEEs は PBS(-)にて洗浄した後、2 分割して凍結用コンパウンドに包埋後、液体窒素で凍結し凍結ブロックを作成した。これを、クライオスタットにて 6 μm 厚に薄切し、スライドガラスに貼り付けることで凍結切片を作成した。

##### **1-5-2. 組織の形態評価 (HE 染色)**

組織切片はアセトンに 2 分間固定後、ヘマトキシリン溶液で 15 分、0.5%エオシン溶液で 10 分間染色を行い、包埋後に顕微鏡で観察した。

##### **1-5-3. 酸化タンパク質の評価 (5-FTSC 染色)**

組織切片は 0.5 μmol/L 5-FTSC 含有 100 mmol/L MES 緩衝液 (pH 5.5) で 15 分間染色を行うことで CPs を染色した。包埋した後、CPs は蛍光顕微鏡 (Ex.492 nm/Em.516 nm) で観察した。

### 1-6. 分泌型因子の網羅的解析 (Protein Array 法)

乾燥刺激から 24 時間後までの培養上清を回収し、市販のプロテインアレイキット Biotin label-based Human Obesity Antibody Array1 (RayBiotech) を用いて、付属のプロコルに従って実施した。

### 1-7. 炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha$ の定量 (ELISA 法)

乾燥刺激から 7 日目までの培養上清を経時的に回収した。培養上清中に分泌された IL-1 $\alpha$  は、市販の ELISA キットを用いて定量し、RHEEs ごとの放出量の積算値として表した。

### 1-8. 真皮マトリックスの分解酵素 MMP-1 の定量 (ELISA 法)

48 時間乾燥刺激装置を設置した RHEEs の培養上清を NHDFs に 4 日間処理した。NHDFs 培養上清中に分泌された MMP-1 は、抗ヒト MMP-1 抗体 (AF-901) および抗ヤギ IgG-HRP 抗体 (FKA14) を用いたサンドイッチ ELISA 法で定量した。同時に、BCA Protein Assay Kit を用いて細胞のタンパク質量を定量することで、単位タンパク質当たりの MMP-1 分泌量として表した。

### 1-9. 統計解析

データは means  $\pm$  S.D. で表し、統計解析は 2 群比較に対しては Student の t 検定 (Microsoft Excel 2010) を、3 群以上の比較に対しては Tukey 検定 (IBM SPSS ver. 1.7) を行い、p 値 0.05 未満 (\*p<0.050) および p 値 0.01 未満 (\*\*p<0.010) を統計学的に有意差ありとした。

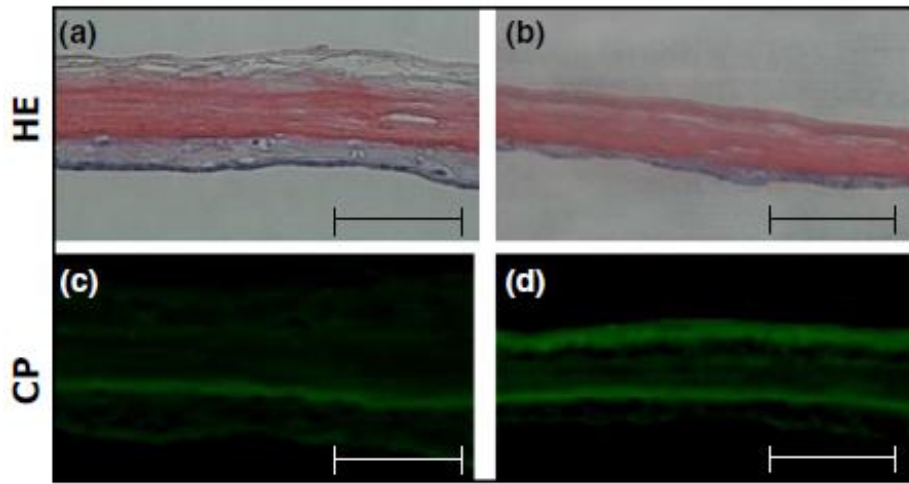
## 第 2 節 結果

### 2-1. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs 表面の湿度

顆粒状の塩化カルシウムを充填した乾燥刺激装置では、飽和塩化マグネシウム溶液を充填したことにより 33%以下の湿度環境に保たれている状況下の塩化コバルト紙と比較してより濃い青色を示した (Fig. 3-2)。したがって、顆粒状の塩化カルシウムを充填した乾燥刺激装置を設置することにより少なくとも RHEEs 表面は 33%以下の低湿度環境下に保たれていたと考えられる。なお、培養 6 日間までは乾燥刺激装置を設置することによる細胞生存率への影響は認められなかった (Data not shown)。

### 2-2. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs の組織学的変化

乾燥刺激装置の設置による影響を明らかにするために、組織学的評価を実施した。乾燥刺激装置を設置した RHEEs では、ヘマトキシリン-エオシン染色により組織の委縮傾向が認められた (Fig. 3-3a, b)。さらに、乾燥刺激装置の設置した RHEEs とヒト皮膚との整合性を確認するために、RHEEs の CPs を染色した。乾燥刺激装置を設置せずに培養した RHEEs の Stratum corneum (SC) では CPs 由来の蛍光は観察されなかったが、乾燥刺激装置を設置した RHEEs では明らかな CPs 由来の蛍光が観察された (Fig. 3-3c, d)。



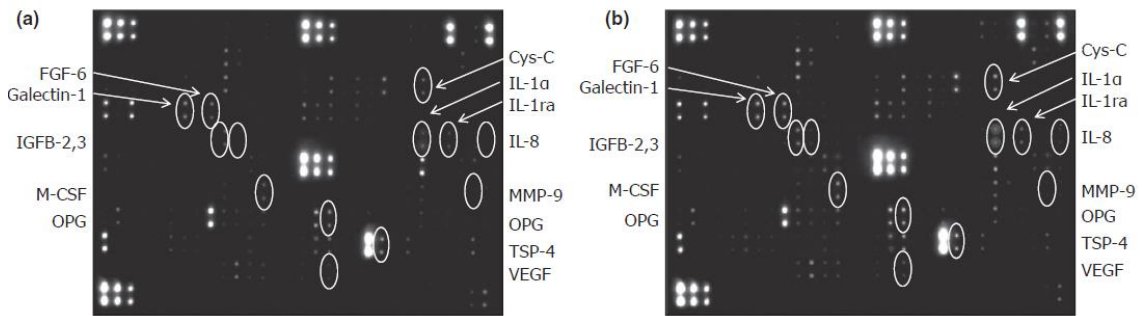
**Figure 3-3 Histology of RHEEs after cultivation under dry conditions.**

Representative histology of RHEEs without the CaCl<sub>2</sub>-filled ampoule (a, c) and RHEEs with the CaCl<sub>2</sub>-filled ampoule (b, d). A representative image of each staining is shown (a, b: HE, c, d: CPs). Scale bar: 50  $\mu$ m.

### 2-3. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs から分泌される因子の網羅的解析

乾燥刺激装置の設置による RHEEs に対する影響を明らかにするために、乾燥刺激装置設置 24 時間後の培養上清をプロテインアレイに供し、分泌型サイトカインあるいはタンパク質の同定を行った。乾燥刺激装置の設置により RHEEs から以下の因子の分泌増加が認められた：IL-1 $\alpha$ 、IL-1ra、および Interleukin-8 (IL-8)、Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)、Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2)、Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3)、Galectin-1、Cystatin-C (Cys-C)、Fibroblast growth factor-6 (FGF-6)、Osteoprotegerin (OPG)、Glucagon (Glc)、Thrombospondin-4 (TSP4) (Fig. 3-5)。





(c) Array map

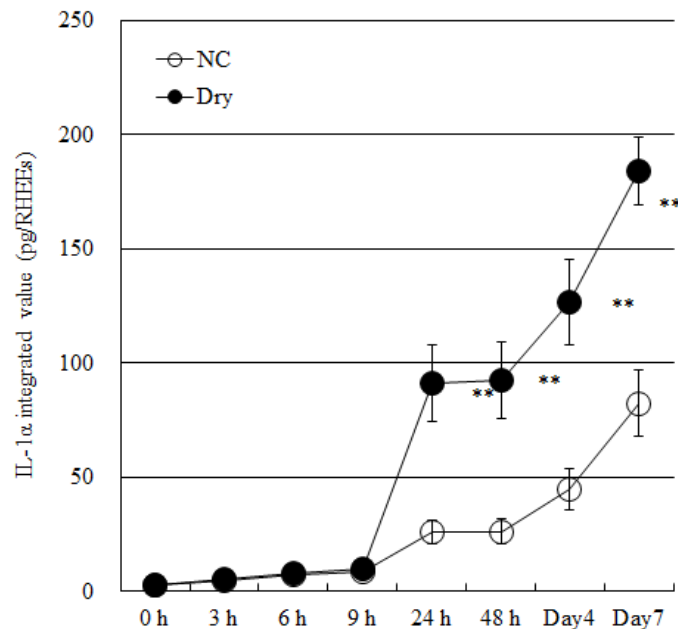
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30				
1	P-1a	P-1b	P-1c	Blank	Blank	NEG	NEG	Blank	ACE	ACE-2	ACTH	ADFP	Acrrp30	Blank	Blank	P-2a	P-2b	P-2c	Blank	Blank	NEG	NEG	Blank	Adipon (test or 1b)	AgPR	AMPKα	Amylin	Angiopoietin-1	Angiopoietin-2	Angiopoietin-like1	Angiopoietin-like2	Angiopoietin-like3		
2	P-1a	P-1b	P-1c	Blank	Blank	NEG	NEG	Blank	ACE	ACE-2	ACTH	ADFP	Acrrp30	Blank	Blank	P-2a	P-2b	P-2c	Blank	Blank	NEG	NEG	Blank	Adipon (test or 1b)	AgPR	AMPKα	Amylin	Angiopoietin-1	Angiopoietin-2	Angiopoietin-like1	Angiopoietin-like2	Angiopoietin-like3		
3	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Ang-libr factor	ANGPTL1	ANGPTL2	ANGPTL3	ANGPTL4	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	ApoB	ApoE	Axl	BDNF	bFGF	BMP-2				
4	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Ang-libr factor	ANGPTL1	ANGPTL2	ANGPTL3	ANGPTL4	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	ApoB	ApoE	Axl	BDNF	bFGF	BMP-2				
5	BMP-3	BMP-4	BMP-5	BMP-6	BMP-7	BMP-8	BMP-9	BMP-10	BMP-11	BMP-12	BMP-13	BMP-14	BMP-15	BMP-16	BMP-17	BMP-18	BMP-19	BMP-20	BMP-21	BMP-22	BMP-23	BMP-24	BMP-25	BMP-26	BMP-27	BMP-28	BMP-29	BMP-30	BMP-31	BMP-32	BMP-33	BMP-34	BMP-35	
6	BMP-3	BMP-4	BMP-5	BMP-6	BMP-7	BMP-8	BMP-9	BMP-10	BMP-11	BMP-12	BMP-13	BMP-14	BMP-15	BMP-16	BMP-17	BMP-18	BMP-19	BMP-20	BMP-21	BMP-22	BMP-23	BMP-24	BMP-25	BMP-26	BMP-27	BMP-28	BMP-29	BMP-30	BMP-31	BMP-32	BMP-33	BMP-34	BMP-35	
7	ET-1	FABP4	FAM65B	FAS/Apo1	FGF-10	FGF-5	FSH	Galactin-1	Galactin-3	Galactin-4	Galactin-6	GITR	GITRL	GLP-1	Blank	Blank	Glc	Glu1	Glu2	Glu3	Glu5	Glu6	Glu7	Glu8	Glu9	Glu10	Glu11	Glu12	Glu13	Glu14	Glu15	Glu16	Glu17	Glu18
8	ET-1	FABP4	FAM65B	FAS/Apo1	FGF-10	FGF-5	FSH	Galactin-1	Galactin-3	Galactin-4	Galactin-6	GITR	GITRL	GLP-1	Blank	Blank	Glc	Glu1	Glu2	Glu3	Glu5	Glu6	Glu7	Glu8	Glu9	Glu10	Glu11	Glu12	Glu13	Glu14	Glu15	Glu16	Glu17	Glu18
9	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6	IGFBP-7	IGFBP-8	IGFBP-9	IGFBP-10	IGFBP-11	IGFBP-12	IGFBP-13	IGFBP-14	IGFBP-15	IGFBP-16	IGFBP-17	IGFBP-18	IGFBP-19	IGFBP-20	IGFBP-21	IGFBP-22	IGFBP-23	IGFBP-24	IGFBP-25	IGFBP-26
10	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6	IGFBP-7	IGFBP-8	IGFBP-9	IGFBP-10	IGFBP-11	IGFBP-12	IGFBP-13	IGFBP-14	IGFBP-15	IGFBP-16	IGFBP-17	IGFBP-18	IGFBP-19	IGFBP-20	IGFBP-21	IGFBP-22	IGFBP-23	IGFBP-24	IGFBP-25	IGFBP-26
11	IC-1a	IC-1b	IC-1c	Blank	Blank	NEG	NEG	Blank	IL-10	IL-11	IL-12	IL-13	IL-14	IL-15	IL-16	IL-17	IL-18	IL-19	IL-20	IL-21	IL-22	IL-23	IL-24	IL-25	IL-26	IL-27	IL-28	IL-29	IL-30	IL-31	IL-32	IL-33	IL-34	
12	IC-1a	IC-1b	IC-1c	Blank	Blank	NEG	NEG	Blank	IL-10	IL-11	IL-12	IL-13	IL-14	IL-15	IL-16	IL-17	IL-18	IL-19	IL-20	IL-21	IL-22	IL-23	IL-24	IL-25	IL-26	IL-27	IL-28	IL-29	IL-30	IL-31	IL-32	IL-33	IL-34	
13	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	LOX	MCP-1	MCP-2	MCP-3	M-CSF	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	
14	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	LOX	MCP-1	MCP-2	MCP-3	M-CSF	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	
15	MMP-18	MMP-19	MMP-20	MMP-21	MMP-22	MMP-23	MMP-24	MMP-25	MMP-26	MMP-27	MMP-28	MMP-29	MMP-30	MMP-31	MMP-32	MMP-33	MMP-34	MMP-35	MMP-36	MMP-37	MMP-38	MMP-39	MMP-40	MMP-41	MMP-42	MMP-43	MMP-44	MMP-45	MMP-46	MMP-47	MMP-48	MMP-49	MMP-50	
16	MMP-18	MMP-19	MMP-20	MMP-21	MMP-22	MMP-23	MMP-24	MMP-25	MMP-26	MMP-27	MMP-28	MMP-29	MMP-30	MMP-31	MMP-32	MMP-33	MMP-34	MMP-35	MMP-36	MMP-37	MMP-38	MMP-39	MMP-40	MMP-41	MMP-42	MMP-43	MMP-44	MMP-45	MMP-46	MMP-47	MMP-48	MMP-49	MMP-50	
17	PYY	KANTEL	RBP4	RELAβ	Resistin	S100	S100A8	S100A10	SAA	SDF-1	SEMA3A	Serotonin	Syntenin-3	Blank	Blank	TACE	TDAGS1	TECK	TGF-α	TGF-β	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3	TGF-β4	TGF-β5	TGF-β6	TGF-β7	TGF-β8	TGF-β9	TGF-β10	TGF-β11	TGF-β12	TGF-β13	
18	PYY	KANTEL	RBP4	RELAβ	Resistin	S100	S100A8	S100A10	SAA	SDF-1	SEMA3A	Serotonin	Syntenin-3	Blank	Blank	TACE	TDAGS1	TECK	TGF-α	TGF-β	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3	TGF-β4	TGF-β5	TGF-β6	TGF-β7	TGF-β8	TGF-β9	TGF-β10	TGF-β11	TGF-β12	TGF-β13	
19	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	TNF-α	TNF-β	TNF-γ	TNF-δ	TNF-ε	TNF-ζ	TNF-η	TNF-ι	TNF-κ	TNF-λ	TNF-μ	TNF-ν	TNF-ξ	TNF-ο	TNF-π	TNF-ρ	TNF-σ	TNF-τ	TNF-υ	TNF-φ	TNF-χ	TNF-ψ	TNF-ω	TNF-1	TNF-2	
20	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	TNF-α	TNF-β	TNF-γ	TNF-δ	TNF-ε	TNF-ζ	TNF-η	TNF-ι	TNF-κ	TNF-λ	TNF-μ	TNF-ν	TNF-ξ	TNF-ο	TNF-π	TNF-ρ	TNF-σ	TNF-τ	TNF-υ	TNF-φ	TNF-χ	TNF-ψ	TNF-ω	TNF-1	TNF-2	
21	P-4a	P-4b	P-4c	Blank	Blank	NEG	NEG	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	
22	P-4a	P-4b	P-4c	Blank	Blank	NEG	NEG	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	

Figure 3-5 Secretion profiles of cytokines and proteins.

To identify cytokines and proteins secreted from RHEEs cultured under each condition, mixtures of conditioned media from 3 different RHEEs after 24 h culture were examined by the Biotin Label-based Human Obesity Antibody Array 1 kit. Array images are shown in (a) RHEEs without the CaCl<sub>2</sub>-filled ampoule and (b) RHEEs with the CaCl<sub>2</sub>-filled ampoule. The array map is shown in (c).

#### 2-4. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs のからの IL- $\alpha$ の分泌

乾燥刺激装置の設置による RHEEs に対する影響を明らかにするために、乾燥刺激装置設置から 7 日目までの培養上清中に分泌された IL-1 $\alpha$  について検討した。その結果、乾燥刺激後、9 時間から 24 時間の間に IL-1 $\alpha$  の分泌亢進が認められた。24 時間以降では IL-1 $\alpha$  分泌の積算値は、NC と比較して乾燥刺激装置を設置した RHEEs で有意に高い値を示した (Fig. 3-4)。

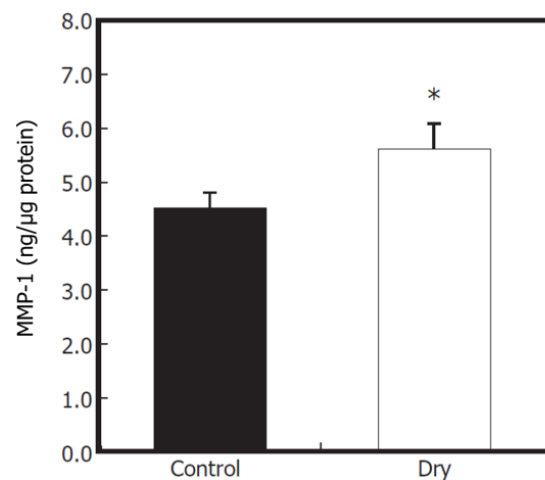


**Figure 3-4 Time-dependent profile of IL-1 $\alpha$  secretions in RHEEs after cultivation under dry conditions.**

RHEEs were cultivated under dry conditions for 6 days. IL-1 $\alpha$  secretions into the medium were quantified using ELISA kit. Results are expressed as means $\pm$ S.D. (n=3). Significance; \*\*p < 0.010

## 2-5. 乾燥刺激装置を設置した RHEEs の培養上清を介した NHDFs からの MMP-1 分泌

乾燥刺激装置の設置による RHEEs の NHDFs からの MMP-1 分泌に対する影響を明らかにするために、乾燥刺激装置を設置した RHEEs の培養上清を NHDFs に処理し、NHDFs から分泌される MMP-1 量の変化を評価した。乾燥刺激装置を設置せずに培養した RHEEs の培養上清を処理した NHDFs からの MMP-1 分泌量は 4.7 ng/ $\mu$ g protein であったが、乾燥刺激装置を設置した RHEEs の培養上清を処理した NHDFs からの MMP-1 分泌量は 5.5 ng/ $\mu$ g protein と有意な増加が認められた (Fig. 3-6)。この結果は、乾燥刺激装置を設置した RHEEs から分泌される何らかの物質が NHDFs からの MMP-1 分泌を促進している可能性を示唆している。



**Figure 3-6 MMP-1 secretion from fibroblasts cultured with conditioned media of RHEEs.**

NHDFs were cultured for 48 h with conditioned media from RHEEs cultured for 4 days with or without a CaCl<sub>2</sub>-filled ampoule. MMP-1 secreted into the medium was quantified using a sandwich ELISA system. Control: conditioned medium from RHEEs without the CaCl<sub>2</sub>-filled ampoule, dry: conditioned medium from RHEEs with the CaCl<sub>2</sub>-filled ampoule. Results are expressed as means $\pm$ S.D. (n=3). Significance; \*p < 0.050

### 第3節 考察

皮膚の乾燥は低湿度環境下に長期間曝されることによって引き起こされるが、低湿度環境下に曝された際の表皮の応答は未だ明らかとなっていない。本研究で著者は、皮膚の乾燥が真皮マトリックスの変化を誘導するのかどうかについて、乾燥刺激装置を設置して RHEEs の表面を低湿度環境に制御することで *in vivo* ヒト乾燥皮膚を再現した *in vitro* 乾燥表皮モデルを使用して検討を行った。

これまでに、低湿度環境下に曝された乾燥皮膚由来の角層中では IL-1ra /IL-1 $\alpha$  比率が増加すると報告されている [7]。これには、乾燥性皮膚での炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha$  の過剰分泌と、この IL-1 $\alpha$  分泌を阻止するために IL-1ra 産生が亢進されるものと解釈されている [64]。一方、乾燥刺激装置を設置した RHEEs は、IL-1 $\alpha$  の分泌亢進が確認され、*in vivo* ヒト角層で起こる現象との整合性が得られた。さらに、冬季乾燥皮膚において報告されている角層 CPs の増加も [7]、乾燥刺激装置を設置した RHEEs の組織内の CPs の増加と良好な一致が確認された。

これらの結果は、*in vitro* 乾燥表皮モデルが *in vivo* ヒト乾燥皮膚で観察されている現象と類似していることを示唆しており、この乾燥モデルを用いて真皮マトリックスに変化に由来する皮膚老化との関連性を議論を行うことは妥当であると考えられた。

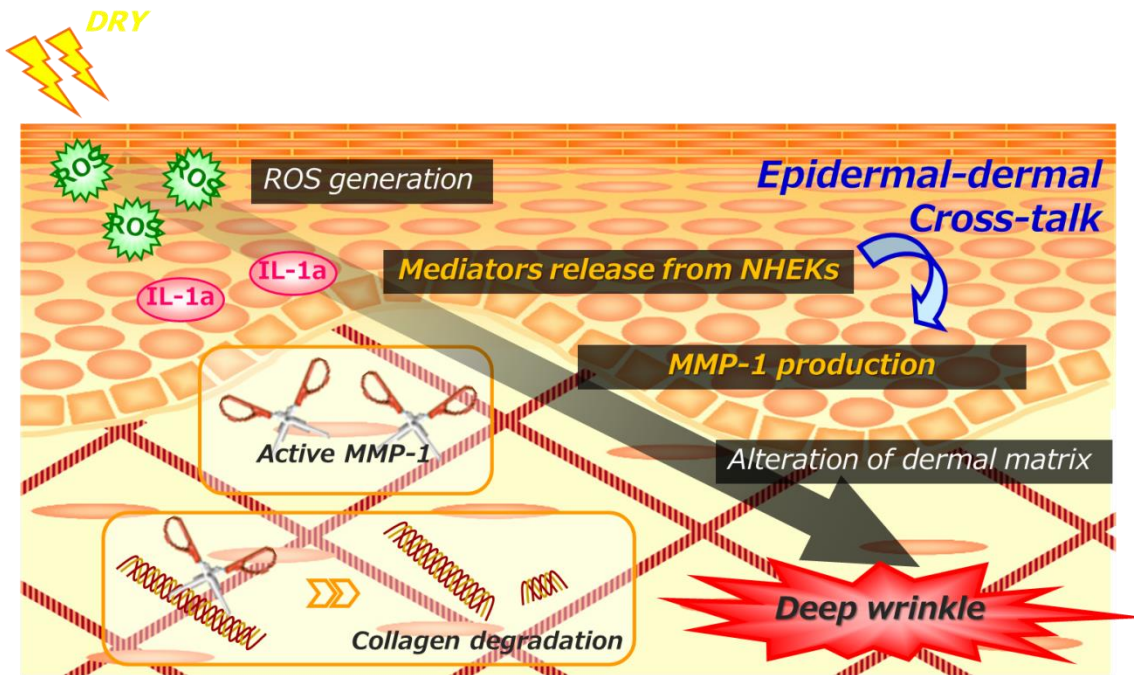
*in vitro* 乾燥表皮モデルから分泌される因子として IL-1 $\alpha$  および IL-1ra、IL-8、MMP-9、VEGF、M-CSF、IGFBP-2、IGFBP-3、Galectin-1、Cys-C、FGF-6、OPG、Glc、TSP4 の分泌増加が確認された。*In vitro* 乾燥表皮モデルの組織内 CPs の上昇は、乾燥刺激による ROS の産生亢進に由来していることが考えられ、MMP-9 の分泌亢進においても ROS の関与が報告されている。CPs はこれまで記載したように ROS と脂質との酸化反応により生成されるカルボニル化合物とタンパク質のアミノ酸残基により開始される酸化タンパク質の一種である [69]。以上の結果から、乾燥組織内では ROS 産生が亢進されたと示唆される。

真皮マトリックスの約 70 % を構成するコラーゲン線維は合成と分解のバランスを保つこ

とで維持されているが、皮膚の老化に伴って MMP-1 の過剰分泌が起こることによって、このバランスが崩壊する。そこで、皮膚の乾燥を起点として真皮マトリックス構造の異常が起こる可能性について、皮膚の乾燥状態が MMP-1 の過剰分泌を惹起しコラーゲン分解を促進するとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、*in vitro* 乾燥表皮モデルの培養上清を NHDFs に処理することで、NHDFs からのコラーゲン分解酵素 MMP-1 の分泌を評価した。その結果、*in vitro* 乾燥表皮モデルの培養上清を処理した NHDFs から分泌される MMP-1 の増加が確認された。この MMP-1 の増加は、低湿度環境下で乾燥した NHEKs から分泌される何らかの因子が真皮層へと拡散した結果と考えられ、真皮マトリックスの構成成分であるコラーゲンを分解に寄与している可能性を示唆していた。

乾燥皮膚が真皮マトリックスの変性を誘導するという我々の仮説は、以下の報告によっても支持されている。通常、IL-1 $\alpha$  および VEGF、ROS は MMP-1 産生を促進することが報告されている [67, 70]。今回、プロテインアレイによって増加が確認された因子のなかに MMP-1 産生を促進する IL-1 $\alpha$  と VEGF が含まれていたことから、これらの因子を介して NHDFs からの MMP-1 分泌が増加した可能性が示唆された。さらに、IL-1 $\alpha$  は好中球走化因子である IL-8 を誘導することが報告されている [71]。したがって、IL-8 の誘導は好中球の真皮への浸潤を促進することで、真皮エラスチンファイバーを分解およびデコリン分解を介したコラーゲンの MMP-1 による分解能の上昇に関与する可能性が考えられる。加えて、MMP-2 や MMP-9 は皮膚基底膜の構成成分であるラミニン 5、タイプ IV およびタイプ VII コラーゲンを分解することが報告されている [72]。

以上の結果から、皮膚の乾燥は皮膚内部において ROS 産生を亢進し、その結果、真皮構成成分の分解を亢進することにより皮膚老化を促進する作用が提案された (Fig.3-7)。



**Figure 3-7** Scheme showing the epidermal-dermal cross-talk after cultivation under dry conditions

#### 第4節 小括

化粧品業界における動物実験禁止の動向を受け、これまでに *in vitro* 培養系では乾燥のような物理刺激による影響を評価することは困難であった。第3章の結果より、RHEEsの皮膚表面を低湿度環境下に維持し、RHEEsを長期培養可能な装置を開発したことにより皮膚生理に及ぼす乾燥刺激の影響を検証することが可能となった。また、活性酸素を起点とする幾つかのパラメータにおいて冬季に乾燥したヒト皮膚と同様の現象を再現していることが確認されたことから、評価ツールとしての有用性を明らかとした。さらに、*in vitro* 乾燥表皮モデルから分泌された因子による真皮マトリックス破壊が示唆されたことからシワ発生のメカニズムを検証するツールとしての有用性が期待された。

## 総括

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 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 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- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 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。

## 謝辞

本研究に際して、始終懇切なご指導ならびにご鞭撻を賜りました、城西大学薬学部・皮膚生理学研究室 主研究指導教員 徳留 嘉寛 教授、東京工科大学応用生物学部・光老化研究室 正木 仁 教授に深甚なる謝意を表します。

また、本論文作成にあたりご教示とご校閲を頂きました城西大学薬学部・薬品作用学研究室 副研究指導教員 岡崎 真理 教授、城西大学薬学部・生物有機化学研究室 副研究指導教員 杉田 義昭 教授、および城西大学薬学部・薬粧品動態制御学研究室 主査 杉林 堅次 教授、城西大学薬学部・衛生化学研究室 副査 工藤 なをみ 教授、城西大学薬学部・生化学研究室 副査 畑中 朋美 教授に心より感謝の意を表します。

学位取得の機会を与えて頂きました株式会社コスモステクニカルセンター 矢作 彰一様に厚く御礼申し上げます。さらに、温かいご支援、ご助言を頂きました 井筒 ゆき子様、清水 健司 様、お二方の先輩に心より御礼を申し上げます。また、本研究の機会を与えてくださいました株式会社コスモステクニカルセンターの皆様へ深く御礼申し上げます。

最後に、本論文作成にあたりご理解とご協力、そして温かい励ましを頂きました家族に心より感謝を申し上げます。

## 引用文献

1. 青寺眞、II. 皮膚とその付属器、1. 皮膚の構造と機能のかかわり、*人体の組織学2、結合組織・皮膚とその付属器 第2版*、榊朝倉書店、107-117 (1984)
2. 清水宏、第1章 皮膚の構造と機能、*皮膚病治療情報・皮膚科教科書 あたらしい皮膚科学 第2版*、中山書店、1-13 (2011)
3. 市橋正光、第1章 皮膚老化のメカニズム、3 光老化発症のメカニズム、*皮膚の抗老化最前線*、榊エヌ・ティー・エヌ、24-31 (2006)
4. 皮膚の光老化とその予防に関するコンセンサスステートメント、*日本化粧品学会誌*、**41**, 240-243 (2017).
5. Ambient (outdoor) air quality and health, World Health Organization, <https://www.who.int/> (2018).
6. Krutmann J., Liu W., Li L., Pan X., Crawford M., Sore G. and Seite S. Pollution and skin: from epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *J. Dermatol. Sci.* **76**, 163-168 (2014).
7. Kikuchi K., Kobayashi H., Hirao T., Ito A., Takahashi H., Tagami H. Improvement of mild inflammatory changes of the facial skin induced by winter environment with daily applications of a moisturizing cream. A half-side test of biophysical skin parameters, cytokine expression pattern and the formation of cornified envelope. *Dermatol.* **207**, 269-75 (2003).
8. Hattori H., Kawashima M., Ichikawa Y., Imokawa G. The epidermal stem cell factor is over-expressed in lentigo senilis: implication for the mechanism of hyperpigmentation. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1256-1265 (2004).

9. Motokawa T., Kato T., Katagiri T., Matsunaga J., Takeuchi I., Tomita Y., Suzuki I. Messenger RNA levels of melanogenesis-associated genes in lentigo senilis lesions. *J. Dermatol. Sci.* **37**, 120-123 (2005).
10. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J. Dermatol. Sci.* **58**, 85-90 (2010).
11. Bickers D.R., Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2565-2575 (2006).
12. Hillebrand G.G., Miyamoto K., Schnell B., Ichihashi M., Shinkura R., Akiba S. Quantitative evaluation of skin condition in an epidemiological survey of females living in northern versus southern Japan. *J. Dermatol. Sci.*, **27**, S42-52 (2001).
13. 市橋正光、尾藤利憲、渡辺衣里、上田正登、荒木敬司、原田晋、長野徹他、日本人皮膚がんの疫学調査—皮膚癌検診と症例・対照研究、太陽紫外線防御研究委員会学術報告書、12、1-19 (2002).
14. Tripp C.S., Blomme E.A., Chinn K.S., Hardy M.M., LaCelle P., Pentland A.P. Epidermal COX2 induction following ultraviolet irradiation: suggested mechanism for the role of COX2 inhibition in photoprotection. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 853-861 (2003).
15. Isoherranen K., Punnonen K., Jansen C., Uotila P. Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **140**, 1017-1022 (1999).
16. Rhodes L.E., Belgi G., Parslew R., McLoughlin L., Clough G.F., Friedmann P.S. Ultraviolet-B-induced erythema is mediated by nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> in combination. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 880-885 (2001).
17. Sauk J.J., White J.G., Witkop C.J. Influence of prostaglandins E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, and arachidonate on melanosomes in melanocytes and keratinocytes of anagen hair bulbs in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **64**, 332-337 (1975).

18. Tomita Y., Iwamoto M., Masuda T., Tagami H. Stimulatory effect of prostaglandin E<sub>2</sub> on the configuration of normal human melanocytes in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **89**, 299-301 (1987).
19. Tomita Y., Maeda K., Tagami H. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Res.* **5**, 357-361 (1992).
20. Scott G., Jacobs S., Leopardi S., Anthony F.A., Learn D., Malaviya R., Pentland A. Effects of PGF<sub>2</sub> alpha on human melanocytes and regulation of the FP receptor by ultraviolet radiation. *Exp. Cell Res.* **304**, 407-416 (2005).
21. Sandulache V.C., Parekh A., Li-Korotky H., Dohar J.E., Hebda P.A. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibition of keloid fibroblast migration, contraction, and transforming growth factor (TGF)-beta1-induced collagen synthesis. *Wound Repair Regen.* **15**, 122-133 (2007).
22. Yano K., Kadoya K., Kajiya K., Hong Y.K., Detmar M. Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and by downregulation of thrombospondin-1. *Br. J. Dermatol.* **152**, 115-121 (2005).
23. Li Y., Lei D., Swindell W.R., Xia W., Weng S., Fu J., Worthen C.A., Okubo T., Johnston A., Gudjonsson J.E., Voorhees J.J., Fisher G.J. Age-associated increase in skin fibroblast-derived prostaglandin E<sub>2</sub> contributes to reduced collagen levels in elderly human skin. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2181-2188 (2015).
24. Du H., Chen X., Zhang J., Chen C. Inhibition of COX2 expression by endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is mediated via PPAR $\gamma$ . *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1533-1549 (2011).
25. Yoshizaki N., Fujii T., Masaki H., Okubo T., Shimada K., Hashizume R. Orange peel extract, containing high levels of polymethoxyflavonoid, suppressed UVB-induced COX2 expression and PGE<sub>2</sub> production in HaCaT cells through PPAR $\gamma$  activation. *Exp. Dermatol.* **23**, 18-22 (2014).

26. Nguyen T., Nioi P., Pickett C.B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **284**, 13291-13295 (2009).
27. Zhang D.D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* **38**, 769-789 (2006).
28. Maher J., Yamamoto M. The rise of antioxidant signaling the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **244**, 4-15 (2010).
29. Moinova H.R., Mulcahy R.T. Up-regulation of the human gamma-glutamyl cysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 661-668 (1999).
30. Polvani S., Tarocchi M., Galli A. PPAR $\gamma$  and oxidative stress: Con( $\beta$ ) catenating NRF2 and FOXO. *PPAR Res.* 641087 (2012).
31. Brohult A., Holmberg J. Alkylglycerols in the treatment of leucopenia caused by irradiation. *Nature* **174**, 1102-1103 (1954)
32. Xu H.E., Lambert M.H., Montana V.G., Parks D.J., Blanchard S.G., Brown P.J., Sternbach D.D., Lehmann J.M., Wisely G.B., Willson T.M., Kliewer S.A., Milburn M.V. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell.* **3**, 397-403 (1999).
33. Goldwasser J., Cohen P.Y., Yang E., Balaguer P., Yarmush M.L., Nahmias Y. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha$ . *PLoS One* **5**, e12399 (2010).
34. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease, *Biomed. Pharmacother.* **57**, 145-155 (2003).
35. Chen W., Tang Q., Gonzales M.S., Bowden G.T. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* **20**, 3921-3926 (2001).

36. Fisher G.J., Datta S.C., Talwar H.S., Wang Z.Q., Varani J., Kang S., Voorhees J.J. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* **379**, 335-339 (1996).
37. Breuer-McHam J., Simpson E., Dougherty I., Bonkobara M., Ariizumi K., Lewis D.E., Dawson D.B., Duvic M., Cruz P.D. Activation of HIV in human skin by ultraviolet B radiation and its inhibition by NFkappaB blocking agents. *Photochem. Photobiol.* **74**, 805-810 (2001).
38. Marwaha V., Chen Y.H., Helms E., Arad S., Inoue H., Bord E., Kishore R., Sarkissian R.D., Gilchrist B.A., Goukassian D.A. T-oligo treatment decreases constitutive and UVB-induced COX2 levels through p53- and NFkappaB-dependent repression of the COX2 promoter. *J. Biol. Chem.* **280**, 32379-32388 (2005).
39. 早川和一、IV-5 大気汚染と防止対策、*衛生化学・公衆衛生学 (改定第3版)*、榊南江堂、262-277 (2002)
40. Xu F., Yan S., Wu M., Li F., Xu X., Song W., Zhao J., Xu J., Kan H. Ambient ozone pollution as a risk factor for skin disorders. *Br. J. Dermatol.* **165**, 224-225 (2011).
41. Vierkötter A., Schikowski T., Ranft U., Sugiri D., Matsui M., Krämer U. and Krutmann J. Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2719-2726 (2010).
42. Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y., Dalton T.P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 65-85 (2000).
43. Janmohamed A., Dolphin C.T., Phillips I.R., Shephard E.A. Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450. *Biochem. Pharmacol.* **15**, **62**, 777-786 (2001).
44. Elbekai R.H., Korashy H.M., Wills K., Gharavi N., El-Kadi A.O. Benzo[a]pyrene,



- 3-methylcholanthrene and beta-naphthoflavone induce oxidative stress in hepatoma hepa 1c1c7 Cells by an AHR-dependent pathway. *Free Radic. Res.* **38**, 1191-1200 (2004).
45. Wu Z., Uchi H., Morino-Koga S., Nakamura-Satomura A., Kita K., Shi W. and Furue M. Z-Ligustilide inhibits benzo(a)pyrene-induced CYP1A1 upregulation in cultured human keratinocytes via ROS-dependent Nrf2 activation. *Exp. Dermatol.* **23**, 260-265 (2014).
46. Furue M., Takahara M., Nakahara T., Uchi H. Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch. Dermatol. Res.* **306**, 769-779 (2014).
47. Kobayashi D., Kusama M., Onda M., Nakahata N. The effect of pantothenic acid deficiency on keratinocyte proliferation and the synthesis of keratinocyte growth factor and collagen in fibroblasts. *J. Pharmacol. Sci.* **115**, 230-234 (2011).
48. Fujita H., Hirao T., Takahashi M. A simple and non-invasive visualization for assessment of carbonylated protein in the stratum corneum. *Skin Res. Technol.* **13**, 84-90 (2007).
49. Masaki H., Okano Y., Ochiai Y., Obayashi K., Akamatsu H., Sakurai H. The synthesis of intracellular glutathione level in HaCaT keratinocytes, *Free Radic. Res.* **36**, 705-709 (2002).
50. Morita M., Yano S., Yamaguchi T., Yamauchi M., Sugimoto T. Phenylacetic acid stimulates reactive oxygen species generation and tumor necrosis factor-alpha secretion in vascular endothelial cells. *Ther. Apher. Dial.* **15**, 147-150 (2011).
51. Tsuji G., Takahara M., Uchi H., Matsuda T., Chiba T., Takeuchi S., Yasukawa F., Moroi Y., Furue M. Identification of ketoconazole as an AhR-Nrf2 activator in cultured human keratinocytes: the basis of its anti-inflammatory effect. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 59-68 (2012).
52. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease, *Biomed. Pharmacother.* **57**, 145-155 (2003).
53. Song S., Lee K., Lee Y.-M., Lee J.-H., Lee S., Yu S.-D., Paek D. Acute health effects of urban fine and ultrafine particles on children with atopic dermatitis. *Environ. Res.* **111**, 394-399

- (2011).
54. Kim J., Kim E.-H., Oh I., Jung K., Han Y., Cheong H.-K., Ahn K. Symptoms of atopic dermatitis are influenced by outdoor air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 495-498 (2013).
  55. Ahn K. The role of air pollutants in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 993-999 (2014).
  56. Ranjit S., Midde NM., Sinha N., Patters BJ., Rahman MA., Cory TJ., Rao PS., Kumar S. Effect of polyaryl hydrocarbons on cytotoxicity in monocytic cells: Potential role of cytochromes P450 and oxidative stress pathways. *PLoS One* 29, **11**, e0163827 (2016).
  57. Tsuji G., Takahara M., Uchi H., Takeuchi S., Mitoma C., Moroi Y., Furue M. An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J. Dermatol. Sci.* **62**, 42-49 (2011).
  58. Shiizaki K., Kawanishi M., Yagi T. Modulation of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor. *Genes Environ.* Apr 10, **39**, 14 (2017).
  59. Han S.G., Han S.S., Toborek M., Hennig B., EGCG protects endothelial cells against PCB 126-induced inflammation through inhibition of AhR and induction of Nrf2-regulated genes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **261**, 181-188 (2012).
  60. Uchi H., Yasumatsu M., Morino-Koga S., Mitoma C., Furue, M. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **85**, 36-43 (2017).
  61. Rawlings A.V., Harding C.R. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* **17**, 43-48 (2004).

62. Elias P.M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* **80**, 44s-49s (1983).
63. Brandner J.M., Kief S., Wladykowski E., Houdek P., Moll I. Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol Physiol.* **19**, 71-77 (2006).
64. Ashida Y., Ogo M., Denda M. Epidermal interleukin-1 alpha generation is amplified at low humidity: implications for the pathogenesis of inflammatory dermatoses. *Br. J. Dermatol.* **144**, 238-243 (2001).
65. Kobayashi Y., Iwai I., Akutsu N., Hirao T. Increased carbonyl protein levels in the stratum corneum of the face during winter. *Int. J. Cosmet. Sci.* **30**, 35-40 (2008).
66. Sato J., Denda M., Chang S., Elias P.M., Feingold K. R. Abrupt decreases in environmental humidity induce abnormalities in permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 900-904 (2002).
67. Wlaschek M., Heinen G., Poswig A., Schwarz A., Krieg T., Scharffetter-Kochanek K. UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem. Photobiol.* **59**, 550-556 (1994).
68. Yamamura T., Masaki H., Sakon K., Suzuki K., Tezuka T. Simple monochromatic refractometer for trans-epidermal water loss (TEWL). *J. Dermatol. Sci.* **1**, 201-206 (1990).
69. Fujita H., Hirao T., Takahashi M. A simple and non-invasive visualization for assessment of carbonylated protein in the stratum corneum. *Skin Res. Technol.* **13**, 84-90 (2007).
70. Kim M.H. Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J Cell Biochem.* **89**, 529-538 (2003).
71. Wilmer J.L., Luster M.I. Chemical induction of interleukin-8, a proinflammatory chemokine, in human epidermal keratinocyte cultures and its relation to cytogenetic toxicity. *Cell Biol. Toxicol.* **11**, 37-50 (1995).

72. Amano S., Ogura Y., Akutsu N., Matsunaga Y., Kadoya K., Adachi E., Nishiyama T. Protective effect of matrix metalloproteinase inhibitors against epidermal basement membrane damage: skin equivalents partially mimic photoageing process. *Br. J. Dermatol.* **153**, 37-44 (2005).