

(様式5)

学 位 論 文 要 旨

平成 28年 7月 25日

学位申請者
寺澤 周子



学位論文題目

アスタキサンチンとウィザフェリンAによる紫外線UVB誘導皮膚障害の抑制
：炎症・角化亢進・色素沈着抑制の分子機構

学位論文の要旨

皮膚は外界との境界をなす厚さ約2mmの精巧な防御壁であると同時に、その色調や凹凸により外見的個性を表す。それゆえ皮膚を健康にする、健康に保つことは切実な問題である。皮膚に障害をもたらす最大の外的要因は紫外線であり、中でもUVB(280~320nm)は生理学的作用が強く、皮膚の最外層である表皮に影響し炎症、角化亢進、色素沈着などを誘発させる。

本研究ではこれらの皮膚障害に対するAstaxanthin (AX) またはWithaferin A (WFA) の抑制効果及びその作用機序を表皮細胞であるヒトケラチノサイト (HPK)、ヒト表皮由来の不死化細胞 (HaCaT細胞) 及びヒトメラノサイト (HM) を使用し解析をおこなった。またこれらを評価するにあたり、より実際の皮膚反応に近く、かつ安全で有用性の高い素材の評価が可能となる評価系の構築を目的とした。

第2章では日本人の平均の1MED(照射24時間後、皮膚に紅斑を生じさせるのに要した最少光線量。個人差あり)に相当する80mJ/cm²のUVBをHPKに照射し、UVB誘導の炎症サイトカインPGE₂及びIL-8に対するAXの抑制効果とその作用機序の解明を行った。AXの効果効能に関する研究は多数あり、すでにAXが抗炎症作用を有することも知られている。これらはLPSやH₂O₂などの炎症誘発因子処理前にAXで処理する実験系を用いており、抗酸化剤であるAXは炎症誘発因子によって発生する活性酸素種(ROS)を除去していることが推察される。つまり刺激を受けシグナルが活性化される以前の段階にAXの作用点があるにもかかわらず、今までの関連論文ではAXはCOX(PGE₂産生律速酵素)及びIL-8遺伝子発現の転写因子であるNF-κB周辺部の活性阻害であると報告している。本研究では、ROS消去効果の発揮が不十分となるUVB照射後のAX添加でも、UVB誘導のPGE₂/IL-8分泌亢進が抑制されることを見出した。UVB照射前AX添加ではUVBで誘導されるストレスシグナル活性化の最前線であるMAPKのp38及びERKの活性化(リン酸化)を抑制していたが、UVB照射後AX添加では抑制せず、UVB誘導のNF-κBの核移行への阻害効果も認められなかった。そこで核移行後のNF-κB活性化に関わるシグナル抑制部位の探索を行った結果、NF-κBのDNA結合活性部位であるser276のUVBによるリン酸化増強を抑制し、この部位をリン酸化する核内酵素であるMSK1のser376(自己リン酸化部位)を抑制していることが判明した。AXはUVB曝露後でも抗炎症効果を発揮することから、UVB曝露後の修復効果を有する可能性が示唆される。

第3章では紫外線で誘導される角化亢進のメカニズムをUVB(80mJ/cm²)曝露HPK及びHaCaT細胞を用い解析を行った。紫外線により角化(ケラチノサイトの分化)が亢進し、皮膚表面が粗

造になることは知られているが、詳細なメカニズムは知られていない。本研究では表皮の角化に関与すると考えられる酵素Transglutaminase 1(TGase1)がUVBによって発現増強され、角化亢進が引き起こされるとの仮説を立てた。UVBによるTGase1発現への影響に関し、HPKのTGase1活性はUVBでは誘導されないとする報告がある一方で、UVB誘導のTGase1過剰発現が表皮過形成(表皮の肥厚)を引き起こすとの報告もあるが、どちらもTGase1発現に対するシグナル経路の解析はしていない。そこで、UVBで誘導される角化亢進機序を解き明かす第一歩として、まずUVB曝露HPKのTGase1遺伝子及びタンパク発現が増強されるかどうかを確認し、そのシグナル伝達経路の解明を行った。その結果、本研究で初めてUVB曝露HPKのTGase1遺伝子及びタンパク発現が増強されることが明らかとなり、UVB曝露により生じる角化亢進や皮膚の落屑がTGase1発現増強に起因している可能性が示唆された。つぎに、UVB誘導TGase1発現増強のシグナル伝達経路はMAPK及びNF- κ B阻害剤を用いた実験結果から、TGase1発現増強はMAPK(p38、ERK、JNK)を上流とするNF- κ Bの活性化を経由していることが判明した。またUVB誘導TGase1発現はUVB照射後AX添加によって抑制されたことから、第2章で得たAXの知見を利用し、UVB誘導TGase1発現のシグナル伝達経路の特定を試みた。AXはUVB照射後添加において、AP1系統及びATF2系統を抑制せず、MSK1の活性化を抑制しNF- κ Bの活性を阻害することから、UVB誘導のTGase1発現に関与する転写因子はAP1及びATF2ではなく、NF- κ Bであり、かつMSK1の活性が必須であることが明らかとなった。この新たな知見は、MSK1の活性阻害がUVB曝露により生じる角化亢進の治療の新たなターゲットになりうることやAXがその改善に有効である可能性を示唆した。

第4章ではUVBで誘導される色素沈着に対するWFAの抑制効果とその作用機序の解明を行った。UVBで引き起こされる色素沈着は以下の工程を経る。①UVBにより表皮を覆い尽くすケラチノサイトから炎症性サイトカインであるIL-1 α を分泌される。②ケラチノサイトはそのオートクライン作用によりEndothelin1(END1)やStem Cell factor(SCF)などのサイトカインを産生する。③近隣に存在するメラノサイト上のEND1及びSCFの受容体であるEDNRB及びc-Kitに結合し、それぞれのシグナル分子経路が活性化される。④そのシグナルを受け、メラニン産生に関わる転写因子であるMITFが増加し、チロシナーゼなどのメラニン合成関連タンパクの発現が増強する。⑤チロシナーゼはチロシンを基質とし、メラニン合成の場であるメラノソームでメラニンポリマーを合成する。⑥成熟したメラノソームはメラノサイトからケラチノサイトに転送され色素沈着として認められるようになる。工程⑤や⑥は正常な皮膚の色調を維持することにも寄与しているため、色素沈着抑制剤としてのターゲットとすると、正常な皮膚の色調が抜け落ちる可能性が考えられる。本来求められる色素沈着抑制剤の機能は、色素沈着部を薄くし皮膚の色調を明るく均一にすることであり、UVBなどの刺激に応じて活性化するシグナル伝達経路を阻害することが理想の阻害剤となりうると思われる。すなわち遺伝的に制御されたアジア人に見られる通常レベルの色素沈着にはこのシグナル伝達経路の活性化は関与していないゆえである。我々はこの観点から色素沈着抑制剤になりうる素材を探索した結果、*Ashwaganda*(学名 *Withania somnifera*)との名をもつ植物の抽出液を見出した。本研究では*Ashwaganda*抽出液の活性成分と考えられるWFAの効果をもつ3次元培養表皮モデル(HEE)及びHMを用い、SCFで刺激することで評価を行った。WFAは50nMという低濃度で、SCF誘導HEEのメラニン量増加を抑制し、SCFで増強されるメラニン合成関連タンパク(MITF、TYR、TYRP1、DCT、PMEL17、c-Kit)の遺伝子及びタンパク発現を抑制した。さらにHMを使用し、SCF誘導のMITF発現に関わるシグナル分子(ERK、MEK、Raf1、Shc、c-Kit)及び転写因子(CREB)に対するWFAの効果を検証した結果、SCF誘導の各因子のリン酸化増強に対しすべてWFAは有意な抑制を示した。SCFのシグナル伝達経路の最上流部である受容体c-KitのTyr936(自己リン酸化部位)に対するWFAの抑制効果が認められたため、この阻害がc-Kit活性阻害あるいはSCFとc-Kitの結合阻害に起因するかどうかを検証した結果、WFAはSCF/c-Kit結合阻害作用は有さず、c-Kitの活性を阻害することが明らかとなった。これはWFAの構造内に有するラクトン環とc-Kitの活性部位が結合し、その活性を阻害していることが考えられた。WFAは細胞生存率への影響及びチロシナーゼ活性の直接阻害作用を有しないことを確認しており、SCF誘導のc-Kit活性抑制を作用点としていることから、安全で有効性の高い色素沈着阻害剤になりうることを示唆された。

第5章ではUVBで惹起されるケラチノサイトーメラノサイト間の異種細胞間相互作用(パラ

クライン作用)を介した色素沈着において、セルインサート共培養系を用いてその抑制剤の評価系を構築し、AX及びWFAの色素沈着抑制効果の作用機序の解明を行った。UVB曝露HPKとHMを共培養すると、UVB照射量に応じたチロシナーゼ活性の増強が認められ、メラニン産生関連タンパク(TYR, TYRP1)やその転写因子(MITF)の遺伝子発現が増強された。またUVB曝露HPKからHMにもたらされるチロシナーゼ活性増強のパラクライン因子はEDN1であることが確認された。この結果はImokawa G, et al. (J Biol Chem 1992)らが報告したUVBによる色素沈着誘導サイトカインの主要因子としてEDN1が同定されたことと一致しており、このセルインサートを用いたHPK-HM共培養システムが新しいUVB誘導色素沈着モデルになりうる可能性が示された。この評価システムを用い、AX及びWFAの色素沈着抑制剤としての作用を評価した結果、AX及びWFAはともにUVB曝露HPKから産生促進されるEDN1の分泌を抑制し、WFAはEDN1誘導シグナル分子であるRaf1/MEK/ERK/MITF/CREBのリン酸化増強も有意に抑制した。本評価システムはUVB誘導HPK-HMパラクライン作用を介した色素沈着評価系として、より幅広くより詳細に作用機序を特定することが可能であると考えられる。

紫外線誘導の皮膚障害に対する安全で有用性の高い抑制剤とは、実際に起こりうる紫外線で惹起されるストレスシグナル伝達阻害が有効であると考えられる。それゆえ以上の研究を通しAX及びWFAはUVB誘導の炎症・角化異常・色素沈着の抑制剤として安全で有用であると考えられる。また正確な作用点を解明することは、有効性及び有用性のみならず、副作用なども推察できる知見となることが考えられる。