

東京工科大学
博士学位論文

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

平成 28年 7月

寺澤 周子

目次

略字一覧	4
第1章 緒論	6
第1節 紫外線 UVB がもたらす皮膚障害	6
第1項 UVB 誘導の皮膚の炎症	8
第2項 UVB 誘導の角化亢進	8
第3項 UVB 誘導の色素沈着	9
第2節 アスタキサンチン(AX)について	12
第1項 AX の物性	12
第2項 AX の抗炎症効果に関する知見	13
第3項 AX の色素沈着抑制効果に関する知見	14
第3節 ウィザフェリン A(WFA)について	15
第1項 WFA の物性	15
第2項 WFA の薬理活性に関する知見	15
第4節 本研究の目的	17
第2章 UVB 曝露 HPK 誘導 PGE ₂ /IL-8 に対する AX の効果とその作用メカニズム	18
第1節 研究の目的	18
第2節 実験材料及び方法	20
第1項 細胞培養	20
第2項 UVB 照射	20
第3項 AX 含有培地調製	20
第4項 阻害剤調製	20
第5項 サイトカイン定量法(ELISA 法)	20
第6項 ウェスタンブロット解析法	20
第7項 リアルタイム RT-PCR 法	21
第8項 共焦点レーザー顕微鏡による解析	21
第9項 統計処理	22
第3節 実験結果	23
第1項 UVB 誘導 PGE ₂ 及び IL-8 分泌亢進に対する AX の効果	23
第2項 UVB 曝露 HPK の COX2 遺伝子・タンパク発現への AX の効果	23
第3項 UVB 曝露 HPK の IL-8 遺伝子発現への AX の効果	24
第4項 UVB 誘導 PGE ₂ 及び IL-8 分泌亢進に対する NF-κB 阻害剤の効果	24
第5項 UVB 誘導 MAPK 活性化に対する AX の効果	25
第6項 UVB 曝露 HPK の NF-κB 核移行に対する AX の効果	25
第7項 UVB 曝露 HPK における MSK1, CREB 及び NF-κB のリン酸化に対する AX の効果	26
第8項 UVB 誘導 PGE ₂ 及び IL-8 分泌亢進に対する MSK1 阻害剤の効果	27
第4節 考察	28

第3章	UVB 曝露 HPK 誘導 TGase1 発現に対するシグナル伝達経路の解明	30
第1節	研究の目的	30
第2節	実験材料及び方法	32
第1項	細胞培養	32
第2項	UVB 照射	32
第3項	AX 含有培地調製	32
第4項	阻害剤調製	32
第5項	ウエスタンブロット解析法	32
第6項	RNA 干渉法	33
第7項	統計処理	33
第3節	実験結果	34
第1項	UVB 曝露 HPK の TGase1 遺伝子・タンパク発現への影響	34
第2項	シグナル伝達阻害剤を用いた UVB 誘導 TGase1 タンパク発現への影響	34
第3項	AX を用いた UVB 誘導 TGase1 タンパク発現への影響	35
第4項	UVB によるシグナル分子のリン酸化のタイムコースの測定	35
第5項	UVB 誘導シグナル分子活性化に対する AX の効果	36
第6項	UVB 誘導 CK2 のリン酸化及び I- κ B に対する AX の効果	38
第7項	UVB 誘導 NF- κ B のリン酸化に対する AX の効果	38
第8項	UVB 誘導 MSK1 のリン酸化に対する AX の効果	39
第9項	UVB 誘導 CREB のリン酸化に対する AX の効果	39
第10項	MSK1 阻害剤を用いた UVB 誘導 NF- κ B/CREB のリン酸化及び TGase1/COX2 タンパク発現への影響	40
第11項	MSK1 siRNA を用いた UVB 誘導 TGase1 タンパク発現への影響	40
第4節	考察	41
第4章	HM における SCF 誘導色素沈着に対する WFA の効果とその作用メカニズム	43
第1節	研究の目的	43
第2節	実験材料及び方法	45
第1項	細胞培養	45
第2項	3次元培養表皮モデル(HEE)培養方法	45
第3項	WFA 含有培地調製	45
第4項	チロシナーゼ活性測定	45
第5項	ユーメラニン定量法	45
第6項	ウエスタンブロット解析法	45
第7項	リアルタイム RT-PCR 法	46
第8項	統計処理	47
第3節	実験結果	48
第1項	HEE における SCF 誘導色素沈着への WFA の効果	48
第2項	HEE における SCF 誘導メラニン合成関連遺伝子発現への WFA の効果	49
第3項	HEE における SCF 誘導メラニン合成関連タンパク発現への WFA の効果	50
第4項	HM における細胞生存率への WFA の効果	52

第5項	HMにおけるSCF誘導チロシナーゼ活性へのWFAの効果	52
第6項	HMにおけるSCF誘導シグナル伝達経路へのWFAの効果	53
第7項	HMにおけるWFAのSCF誘導シグナル分子活性抑制に対するDTTの効果	54
第8項	HMにおけるWFAのSCF/c-Kit結合性への影響	55
第4節	考察	56
第5章	UVB曝露HPK-HM共培養における色素沈着へのAX及びWFAの効果とその作用メカニズム	57
第1節	研究の目的	57
第2節	実験材料及び方法	58
第1項	細胞培養	58
第2項	セルインサートによる共培養	58
第3項	AX含有培地調製	58
第4項	WFA含有培地調製	58
第5項	チロシナーゼ活性測定	59
第6項	サイトカイン定量法(ELISA法)	59
第7項	ウエスタンブロット解析法	59
第8項	リアルタイムRT-PCR法	60
第9項	EDN1中和抗体処理	60
第10項	統計処理	60
第3節	実験結果	61
第1項	HPK-HM共培養におけるUVB曝露HPKによるHMのメラニン合成関連遺伝子発現およびチロシナーゼ活性への影響	61
第2項	UVB曝露HPKによるサイトカイン分泌への影響	62
第3項	UVB曝露HPK-HM共培養におけるEDN1中和抗体の効果	63
第4項	UVB曝露HPK-HM誘導チロシナーゼ活性に対するAXの効果	64
第5項	UVB誘導サイトカイン分泌亢進に対するAXの効果	65
第6項	UVB曝露HPK-HM誘導チロシナーゼ活性に対するWFAの効果	66
第7項	UVB曝露HPKのサイトカイン分泌亢進に対するWFAの効果	66
第8項	EDN1誘導HMチロシナーゼ活性に対するWFAの効果	67
第9項	EDN1誘導HMシグナル伝達経路に対するWFAの抑制効果	68
第4節	考察	69
第6章	総括	70
第7章	謝辞	72
第8章	参考文献	73

略字一覽

AX	: Astaxanthin
COX2	: Cyclooxygenase 2
DCT	: Dopachrome tautomerase
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
DTT	: Dithiothreitol
END1	: Endothelin1
FBS	: Fetal bovine serum
FM	: Fontana Masson
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	: Granulocyte macrophage colony stimulatory factor
HEE	: Human epidermal equivalent
HE	: Hematoxylin and eosin
HM	: Human melanocyte
HPK	: Human primary keratinocyte
HPR	: Horseradish peroxidase
IKK	: Inhibitor of kappa B Kinase
IL-1 α	: Interleukin-1 α
IL-6	: Interleukin-6
IL-8	: Interleukin-8
I κ B	: Inhibitor of kappa B
L-DOPA	: 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine
LPS	: Lipopolysaccharide
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MBTH	: 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazone Hydrochloride
MITF	: Microphthalmia-associated transcription factor
MSK1	: Mitogen- and stress- activated kinase 1 activated kinase 1
PBS	: Phosphate-buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
PFA	: Paraformaldehyde
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
PTCA	: Pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid
PVDF	: Polyvinylidene difluoride membranes
ROS	: Reactive oxygen species
RT	: Reverse transcription
SCF	: Stem Cell factor
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TGase1	: Transglutaminase 1

TNF α : Tumor necrotic factor- α
TYRP1 : Tyrosinase-related protein 1
TYR : Tyrosinase
UVB : Ultraviolet light B
WFA : Withaferin A
siRNA : Short interfering RNA
 α MSH : α melanocyte stimulating hormone

第1章 緒論

第1節 紫外線 UVB がもたらす皮膚障害

地球に降り注ぐ太陽光線は、生体リズムを整えるなど人類にさまざまな恩恵を与えている反面、太陽光線に含まれる紫外線は健康被害を与えうることも周知の事実である。紫外線は生物学的作用によって長波長紫外線(UVA ; 320~400nm)、中波長紫外線(UVB ; 280~320nm)、短波長紫外線(UVC;190~290nm)、真空紫外線(100~190nm)に分類され¹⁾、その中でも UVC はオゾン層で吸収され地上に到達しないが、地上に到達する最小波長である UVB は皮膚炎症反応、色素沈着増強、光老化、皮膚がんなどを引き起こす生物学的作用が強い。

皮膚は紫外線やその他の外的要因からの侵襲を防ぎ生体を防御する役割を持っている。この皮膚バリア機能の最重要部ともいえる角層を形成させる表皮には、表皮細胞であるケラチノサイトが整然と配列し、角層細胞間はセラミドを主成分とする細胞間脂質で満たされ、水分が保持されることにより正常な機能を保っている(Fig. 1)。紫外線に晒された皮膚では炎症反応やメラニン産生の促進などが防御反応として誘発される。紫外線による皮膚の炎症はケラチノサイトが分泌する炎症性サイトカインにより発赤・腫れ・痛みが生じる。色素沈着増強反応も、紫外線(おもに UVB)に曝露されたケラチノサイトが産生する因子により、周辺に存在するメラノサイト(表皮細胞の一つ)が活性化されることによって引き起こされる。生体防御反応であるはずのこれらの反応も過剰になると皮膚障害となる(Fig. 2)。皮膚は生命維持のための不可欠な器官であると同時に、人の外見的個性を決定づける器官でもあるゆえ、皮膚障害の悩みは深刻であり予防や改善が切望されている。

紫外線による皮膚障害の一番の予防策は紫外線に皮膚を晒さないことであるが、日常生活において完全に紫外線を遮断するのは困難である。それゆえ有用性の高い化粧品や医薬部外品・医薬品等の皮膚外用剤が求められる。化粧品及び医薬部外品の開発にあたり、動物愛護の観点から動物実験廃止の動きが広がっている今、動物実験にとって代わる効果・効能・安全性を評価できる実験系の構築が急がれる。

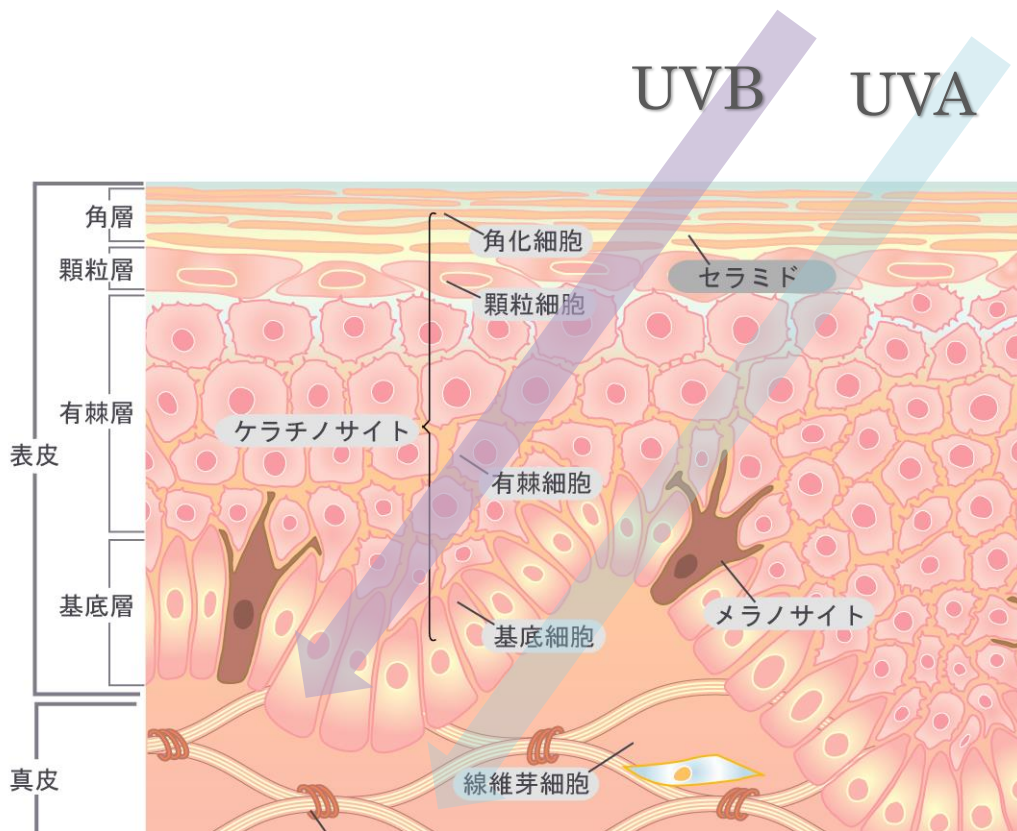


Figure 1. 健全な皮膚の構造

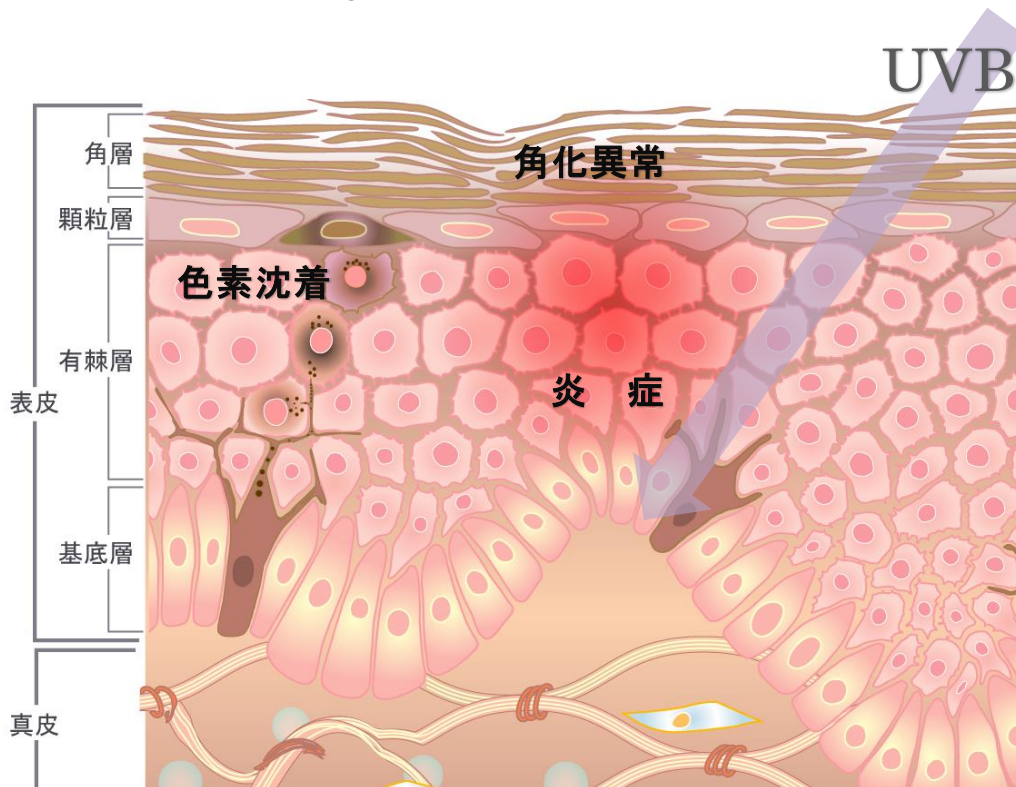


Figure 2. 紫外線(UVB)曝露による皮膚障害

第1項 UVB 誘導の皮膚の炎症

紫外線により誘発される炎症は、「日焼け(Sunburn)」と「光線過敏症」の2つがある。前者はUVBにより引き起こされ、後者はUVA曝露と遺伝的要因あるいは薬剤などによる外因要因により生じる。UVBに曝露された皮膚では、まず一次性炎症サイトカインであるIL-1 α 及びTNF α がケラチノサイトから分泌され²⁾³⁾、その刺激により炎症応答に関与する転写因子NF- κ Bが活性化され⁴⁾、種々の炎症メディエータが産生される。その炎症メディエータの一つであるPGE₂やIL-8は、血管拡張作用及び白血球遊走作用により、曝露8~24時間後をピークとして熱感を伴う紅斑、高度の場合は腫脹、水泡の形成などの炎症兆候をもたらす。

PGE₂は細胞膜の構成脂質であるリン脂質からホスホリパーゼA2により遊離されたアラキドン酸を原料とし、律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)によって産生される。定常時では恒常的に発現するCOX1によってPGE₂が一定量産生されるが、炎症誘発因子によって活性化されたNF- κ BはCOX2の発現を増強させ、PGE₂分泌を亢進させる。

第2項 UVB 誘導の角化亢進

紫外線に曝露された皮膚では、皮膚表面がゴワゴワとした粗造化が見られ、角層肥厚や落屑が生じることが知られている。これはケラチノサイトの細胞膜を裏打ちするコーニファイドセルエンベロープ(CE)と呼ばれる膜周辺帯が分厚くなることが要因の一つと考えられるが、詳細なメカニズムはまだ解明されていない。CEの主な構成要素は、有棘細胞が産生するインボルクリン及び顆粒細胞が産生するロリクリンであり、ケラチノサイトの分化(角化)の際、これらのタンパク質がトランスグルタミナーゼ1(TGase1)などによって架橋されCEが形成される(Fig. 3)⁵⁾。

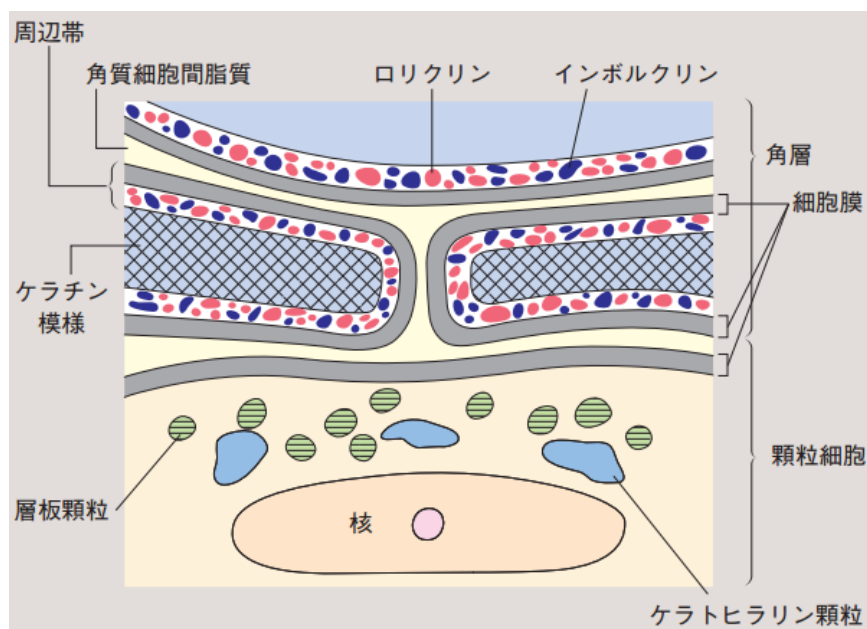


Figure 3. コーニファイドセルエンベロープ(周辺帯)
(清水宏,あたらしい皮膚科学 第2版,p9より引用)

UVBによる角化への影響について、Bernerd F et al.がおこなった *ex vivo*におけるUVB曝露ヒト正常皮膚組織では、ロリクリン、インボルクリン、TGase1のタンパク発現がUVBにより減少し、ケラチノサイト分化マーカーであるケラチン 10 やフィラグリンも減少している⁶⁾。一方、Del Bino S et al.はヒト正常皮膚をヌードマウスに移植し、UVB曝露した *in vivo* で得られた知見は、Bernerd F et al.の報告とは逆にロリクリン、インボルクリン、TGase1、K10のタンパク発現はUVBにより増強されるとしている⁷⁾。これらの結果の不一致は、UVBの照射量の違いやUVB曝露後に起きる分化フェーズの違いにより起きていることが考えられる。

第3項 UVB誘導の色素沈着

UVB曝露から数時間後に炎症(sunburn)が起き、12~24時間をピークとし消退後、色素沈着(suntan)が認められるようになる。UVBに曝露されたケラチノサイトはIL-1 α やTNF α などの炎症性サイトカインを分泌し⁸⁾、そのオートクライン作用により色素沈着誘導因子が産生・分泌され、その異種細胞間相互作用(パラクライン作用)によりメラノサイトはメラニン産生し、最終的にケラチノサイトへのメラニン転送によって色素沈着として認識される。

色素沈着誘導因子としてbasic fibroblast growth factor(b-FGF)⁹⁾、Endothelin-1 (EDN1)¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾、 α melanocyte-stimulating hormone(α - MSH)¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、Stem cell factor (SCF)¹⁰⁾²⁰⁾、一酸化窒素(NO)²¹⁾が同定されたが、ラットやマウスを使用した実験系ではヒトの色素沈着の作用機序と異なることや、ヒトメラノサイトを使用した実験系において α MSHはb-FGFの存在下かつ高濃度(100nM以上)でしかメラニン産生を誘導しないこと、またb-FGFは細胞内で生合成されるがシグナルペプチドを持たないためほとんど分泌されないことから、UVBで引き起こされるヒト表皮の色素沈着にはEDN1とSCFが主な色素沈着誘導因子であると考えられている¹⁰⁾²²⁾²³⁾。

ケラチノサイトから産生される膜結合型SCF及びEDN1はメラノサイト膜表面に存在するそれぞれの受容体c-Kit(またはCD117)及びEndothelin receptor B (EDNRB)と結合し、シグナル伝達を開始される。SCF-c-Kitシグナル経路において、受容体型チロシンキナーゼであるc-KitはSCFと結合すると二量体を形成し²⁴⁾、そのチロシン残基の自己リン酸化により活性化され、アダプタータンパクであるSrc homology domain (Shc)、Growth factor receptor binding protein 2(Grb2)、SOSをリクルートして一連のリン酸化を引き起こす²⁵⁾²⁶⁾。会合したGrb2/SOSによりGTPaseであるRasが活性型に変換され²⁷⁾²⁸⁾、Mitogen-activated Protein Kinase (MAP Kinase)カスケード：Raf1(MAPKKK) \rightarrow MEK(MAPKK) \rightarrow ERK(MAPK)の活性化を経て、その下流にあるRibosomal S6 kinase (RSK)を介し、転写因子であるcAMP-response element binding proteins (CREB)がリン酸化され、それによりメラニン産生に関与するマスター転写因子であるMicrophthalmia-Associated Transcription Factor (MITF)の発現が誘導される²²⁾²⁹⁾ (Fig. 4)。EDN1-EDNRBシグナル経路は、EDN1がGタンパク質共役受容体であるEDNRBに結合すると、Gタンパク質が活性化され、近傍の細胞膜上にあるホスホリパーゼC γ (PLC γ)が活性化される。PLC γ はPhosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)の加水分解によりDiacylglycerol(DAG)を産生し、DAGはprotein kinase C(PKC)を細胞質から細胞膜へのtranslocationを通じて活性化させる³⁰⁾³¹⁾。PKCは直接Raf1をリン酸化し³²⁾、以降はSCF-c-Kitシグナル経路と同経

路を経由する(Fig. 5)。各シグナル伝達経路を経て CREB より遺伝子発現した MITF は、タンパク発現後メラニン合成関連タンパクである Tyrosinase³³⁾、Tyrosinase-related protein-1 (TYRP1)³⁴⁾、Dopachrome tautomerase (DCT)³⁵⁾、PMEL17³⁵⁾、EDNRB³⁶⁾、c-KIT³⁷⁾ の遺伝子発現を促進させる。

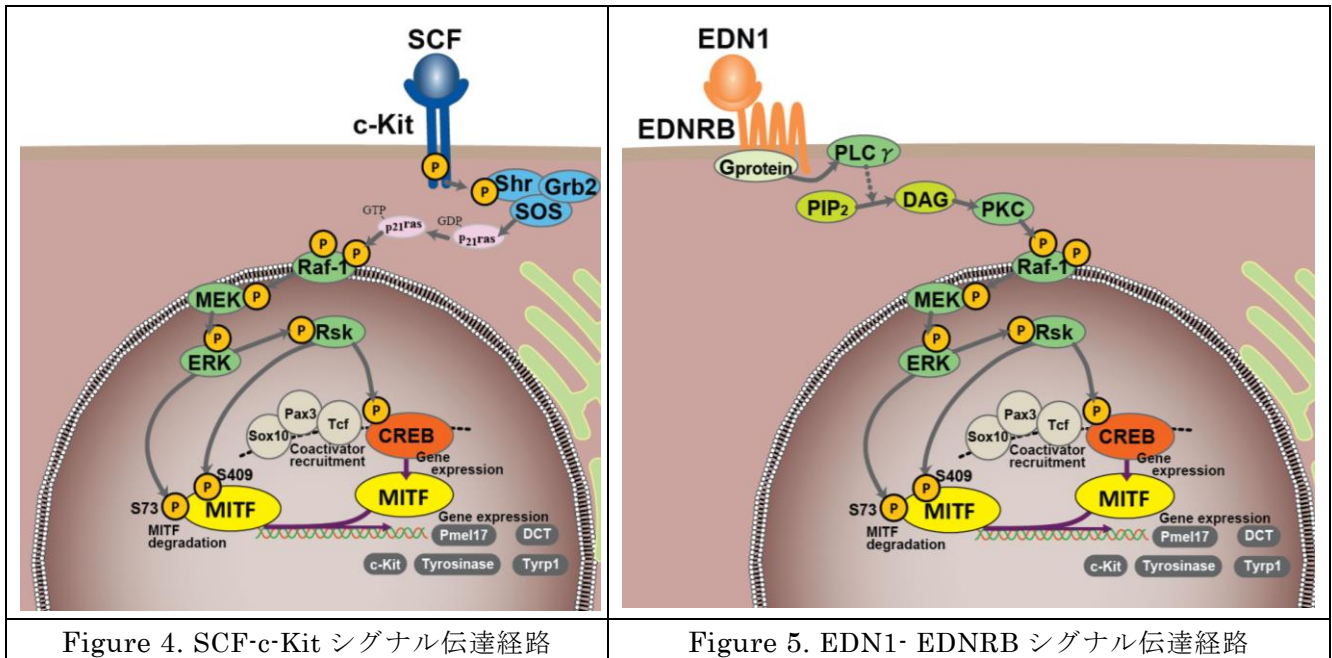


Figure 4. SCF-c-Kit シグナル伝達経路

Figure 5. EDN1- EDNRB シグナル伝達経路

メラニンの合成は、細胞内小器官であるメラノソームにて行われ、Tyrosinase により血中から供給されるチロシンを DOPA に代謝させることで開始される。さらに Tyrosinase は DOPA から DOPA quinone に変換させる。この Tyrosinase による代謝反応が起きなければメラニンは産生されない。メラニンには黒色～暗褐色の Eumelanin と黄色～赤褐色の Pheomelanin の 2 種類が存在し、この 2 種が複合体となって皮膚や髪などに分布され、その 2 種の比率により色調が決定される。Eumelanin 合成経路は DOPA quinone の自動酸化により Leukodopachrome、Dopachrome となり、Tyrosinase、TYRP1、TYRP2(DCT)により種々のインドール化合物に代謝され重合することで Eumelanin となる。また Pheomelanin 合成経路はシステインやグルタチオンの存在下で DOPA quinone は非酵素的に CysteinylDopa となり、それがさらに DOPA quinone により酸化されベンゾチアジン中間体を経て Pheomelanin が生成する(Fig. 6)³⁸⁾。

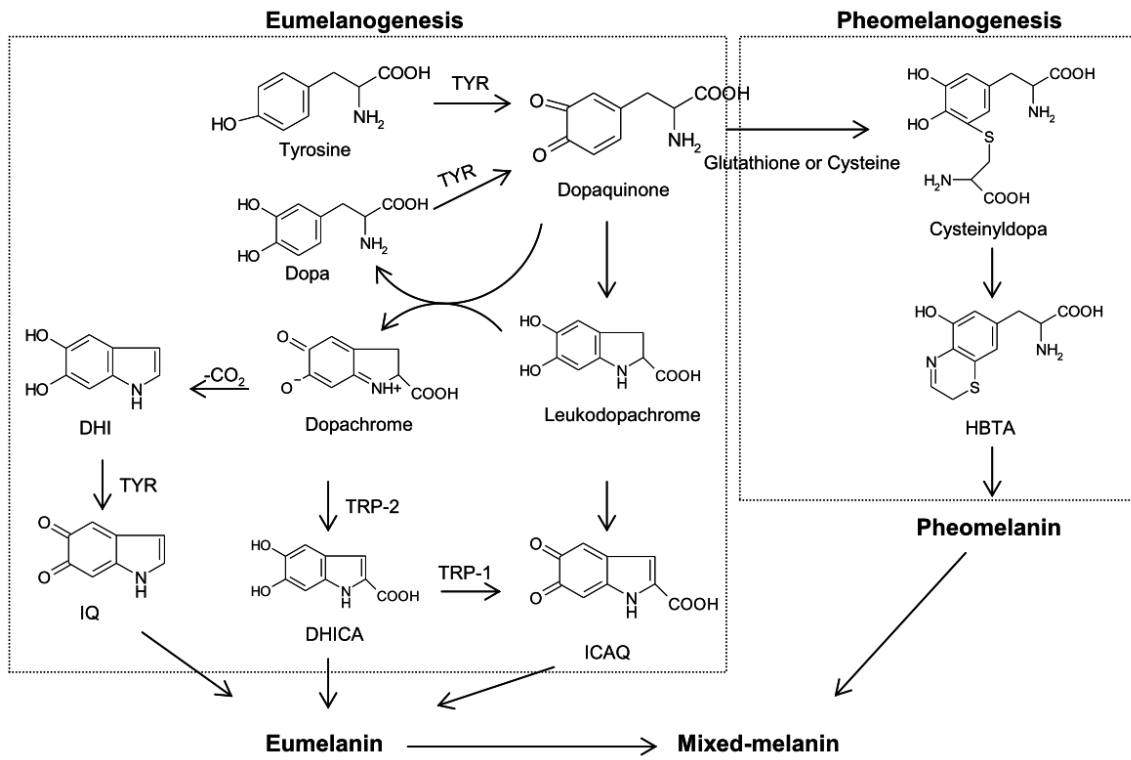


Figure 6.メラニン合成経路
 (Te-Sheng Chang, Int. J. Mol. Sci. 2009, 10, 2440-2475 より引用)

第2節 アスタキサンチン(AX)について

第1項 AXの物性

AXは藻類や鮭などに含まれる赤色の色素であり、キサントフィルカロテノイドに分類され、強力な抗酸化剤として知られる。AXはカロテノイドの中でも共役二重結合の数が最も多く、両末端のβ-イオン環にあるケト基と水酸基により疎水性と親水性を有する(Fig. 7)。この構造により、細胞膜のリン脂質と親和性が高く、細胞膜を縦貫するようにして体内に取り込まれ³⁹⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾(Fig. 8)⁴²⁾、細胞の内外で活性酸素種の除去効果を発揮できるものと考えられる。その他の抗酸化剤との比較では、ゼアキサンチン、ルテイン、カンタキサンチン、βカロテンの10倍、α-トコフェロールの100倍の抗酸化効果があると報告されている⁴³⁾⁴⁴⁾。

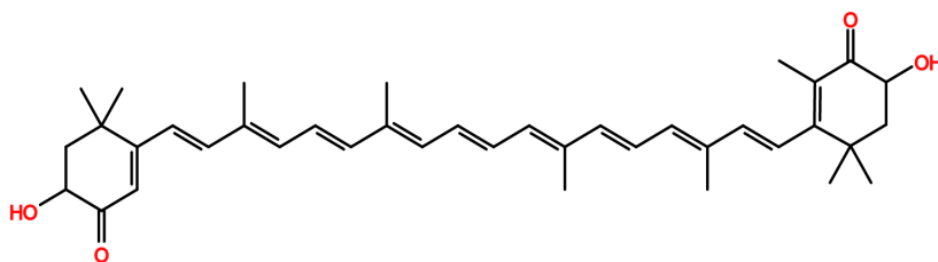


Figure 7. アスタキサンチンの構造

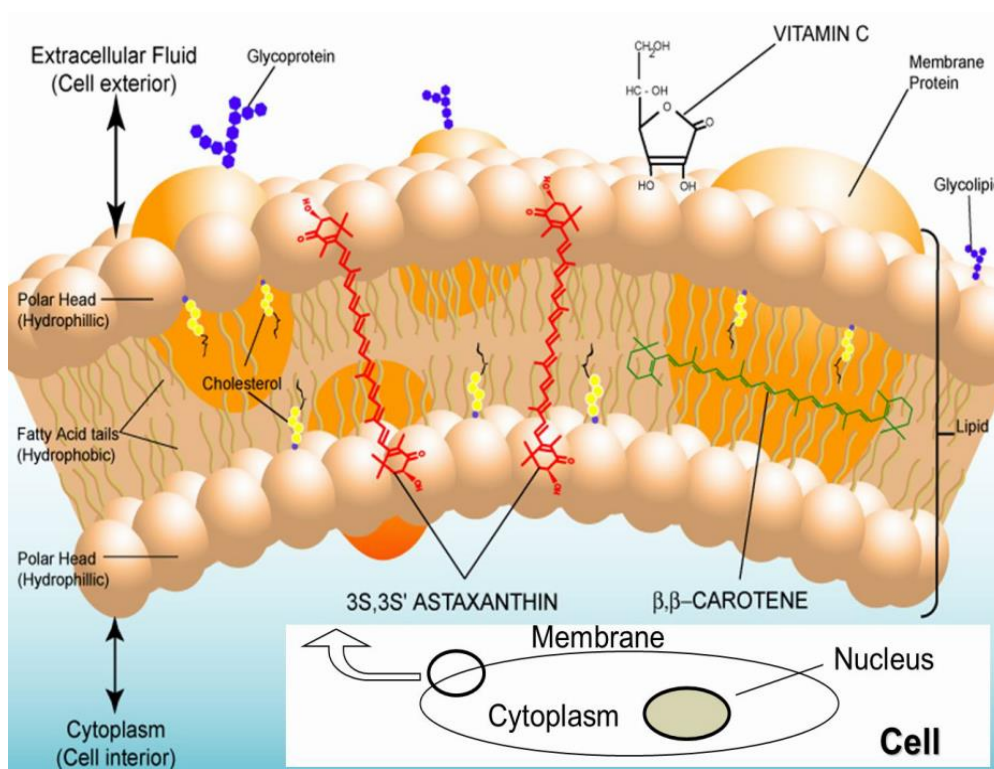


Figure 8. アスタキサンチンの細胞内局在
(Goto, S. Biochim. Biophys. Acta 2001, 1512, 251–258.より引用)

第2項 AXの抗炎症効果に関する知見

本研究(第2章)ではUVB誘導の皮膚の炎症反応に対するAXの抑制効果についてヒトケラチノサイトを用い評価したが、本研究以前にその抗炎症効果は *in vitro* 及び *in vivo* ともすでに皮膚以外で多数報告されている。*in vitro* の評価系において、エンドトキシン刺激下 RAW264.7 細胞では炎症メディエータである一酸化窒素(NO)及びその合成酵素(iNOS)の活性抑制、PGE₂ 産生及び TNF- α 産生に対し、AX の濃度依存的な抑制効果が認められ⁴⁵⁾、LPS 刺激あるいは H₂O₂ 刺激下 RAW264.7 細胞においても同様に、炎症性サイトカインの分泌亢進を AX は抑制する⁴⁶⁾。これら炎症メディエータおよび炎症性サイトカインの AX による抑制は、その転写因子である NF- κ B の核移行阻害、NF- κ B の抑制因子の I κ B α 分解抑制、I κ B kinase (IKK)活性への阻害効果などからなり、NF- κ B 経路の阻害作用をその主要な作用と結論付けている(Fig. 9)。しかし、これらの研究では炎症誘発因子で細胞を刺激する前に AX で処理しているため、強力な抗酸化剤である AX が活性酸素種を除去し、NF- κ B の活性化以前シグナル経路の抑制が推察され、NF- κ B 経路周辺の抑制は 2 次的な作用である可能性が考えられる。

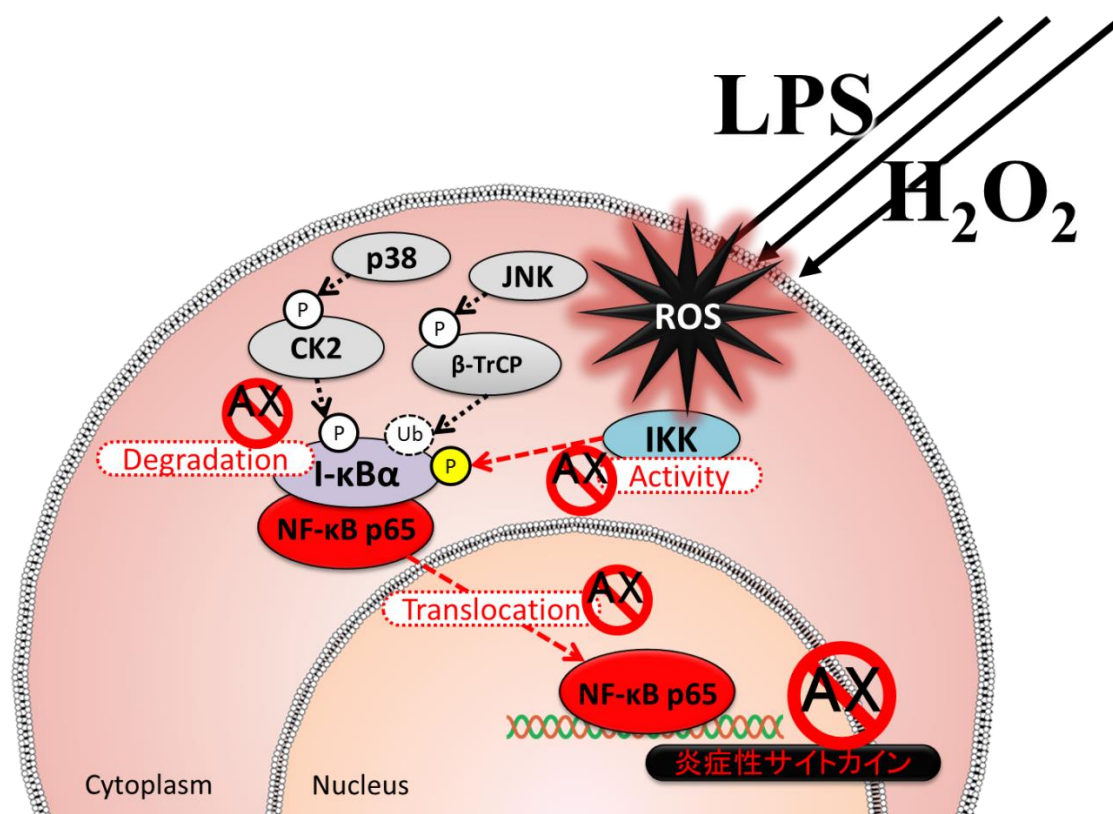


Figure 9. AXの抗炎症作用の作用機序

第3項 AXの色素沈着抑制効果に関する知見

本研究(第5章)ではAXのUVBで誘導されるパラクライン的色素沈着の抑制効果を評価した。AXの色素沈着抑制効果はヒト試験において経口投与により、UVB曝露後の色素沈着を有意に抑制したと報告されている⁴⁷⁾。Nakajima H. et al.は色素沈着誘導サイトカインであるSCF及びEDN1刺激下のヒト色素沈着促進表皮モデルにおける色素沈着抑制効果を評価しており、EDN1誘導の色素沈着促進には効果が認められなかったが、SCF誘導の色素沈着促進に対してはSCFシグナル経路上流部(MEK)を抑制することにより、顕著な色素沈着抑制効果を示すと報告している⁴⁸⁾(Fig. 10)。メラニン合成はチロシナーゼによるチロシンの酸化反応により開始されることから、一般に抗酸化剤はこの酵素反応を阻害しやすいが、興味深いことにAXはチロシナーゼに対する直接阻害作用はもたないことが報告されている⁴⁸⁾。

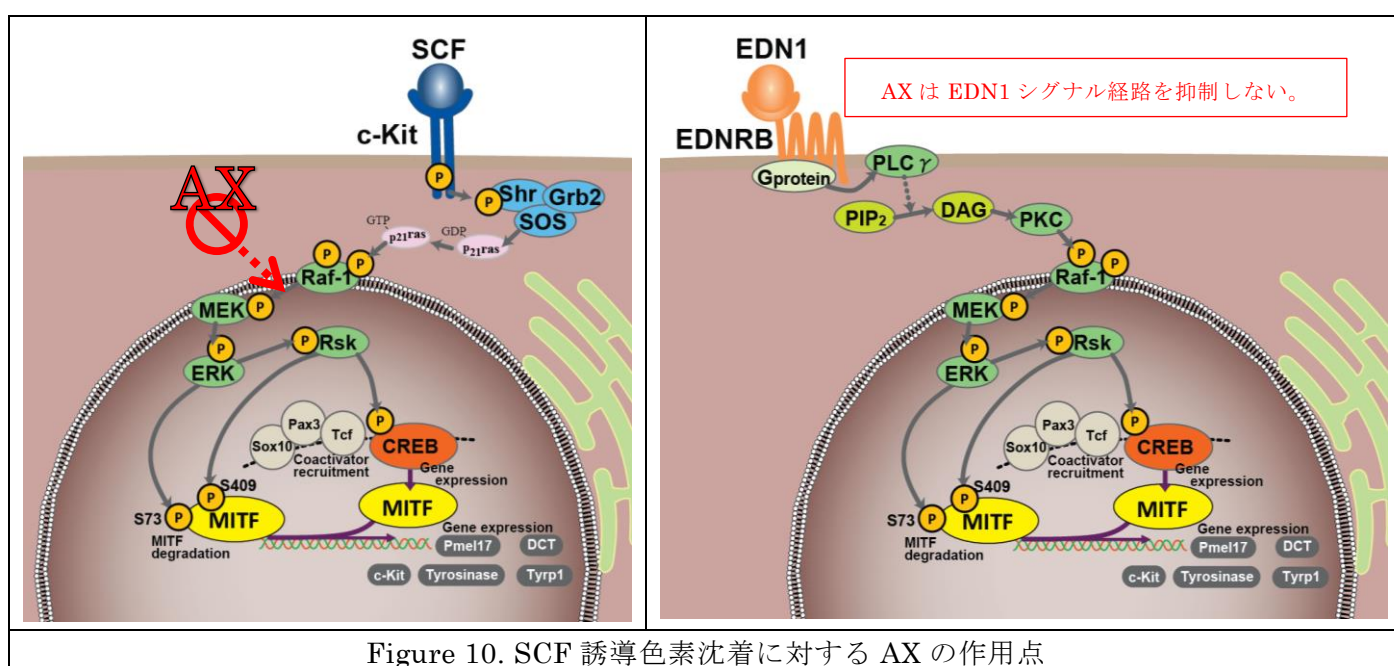


Figure 10. SCF 誘導色素沈着に対する AX の作用点

第3節 ウィザフェリン A(WFA)について

第1項 WFA の物性

WFA は、インドで古くから伝統医薬として慣用されるインド原産の植物アシュワガンダ (学名 *Withania somnifera*) (Fig. 11)⁴⁹⁾の活性成分の一つであり、その構造はステロイド骨格に不飽和ラクトン環を有する (Fig. 12)。

第2項 WFA の薬理活性に関する知見

WFA に関する研究は多く、*in vitro* においては様々な細胞種に対し、NF- κ B 活性抑制⁵⁰⁾⁵¹⁾⁵²⁾、アポトーシス誘導作用⁵³⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾、抗血管新生作用⁵⁶⁾⁵⁷⁾⁵⁸⁾、悪性種細胞増殖抑制⁵⁹⁾⁶⁰⁾⁶¹⁾などが知られ、*in vivo* においても抗炎症作用⁶²⁾⁶³⁾⁶⁴⁾、異種移植腫瘍モデルに対する治癒効果⁶⁵⁾⁶⁶⁾⁶⁷⁾、放射線増感作用⁶⁸⁾⁶⁹⁾、化学増感作用⁷⁰⁾など主に抗ガン作用について報告されている。これらの作用機序は WFA の構造により、SH 基を持ったタンパク質とアルキル化反応を起こし、そのターゲットとなるタンパク質と WFA が結合することに起因している。細胞骨格タンパクの一つであるビメンチンはガン細胞に高発現することが知られ⁷¹⁾、WFA 処理によりビメンチンと結合しビメンチンの分解へと誘導することでガン細胞増殖を抑える⁷²⁾。LPS や TNF などの炎症誘導サイトカインで刺激した種々の細胞 (RAW264.7、HUVEC、HEK 細胞など) においては、WFA 処理により NF- κ B の上流にある IKK との結合によって、その活性を抑制し炎症を抑えることが報告され⁷³⁾⁷⁴⁾⁷⁵⁾⁷⁶⁾、その他のキナーゼ (PKC、Akt など) に対しても WFA の抑制作用によりアポトーシスが誘導されると報告されている⁷⁷⁾⁷⁸⁾⁷⁹⁾⁸⁰⁾。



Figure 11. アシュワガンダ
(Vanden W, Biochem Pharmacol. 2012
Nov 15;84(10):1282-91 より引用)

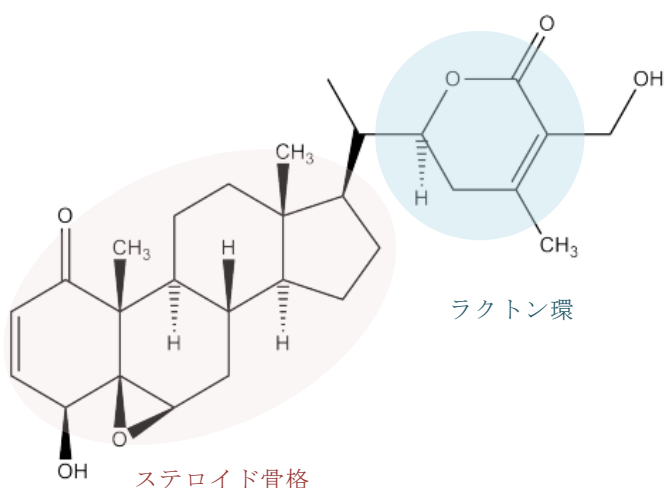


Figure 12. ウィザフェリン A の構造

WFA の様々な細胞に対する多くの研究知見の中で、メラノサイトにおける melanogenesis に関連した研究報告はなく、本研究(第4章)では WFA による色素沈着抑制効果とそのメカニズムの解析をおこなった。以前我々は WFA を含むアシュワガンダエキス(WSE :Withania Somnifera Extract)の SCF 及び EDN1 誘導の色素沈着抑制効果とそのシグナル抑制メカニズムを解析しており、その作用機序はそれぞれのシグナル上流部である MEK⁸¹⁾あるいは PKC⁸²⁾の活性化を阻害することにより転写因子 MITF の産生を抑制しその下流のメラニン合成関連酵素や蛋白の発現を抑制することで色素沈着が抑制されることを明らかにしている (Fig. 13)。

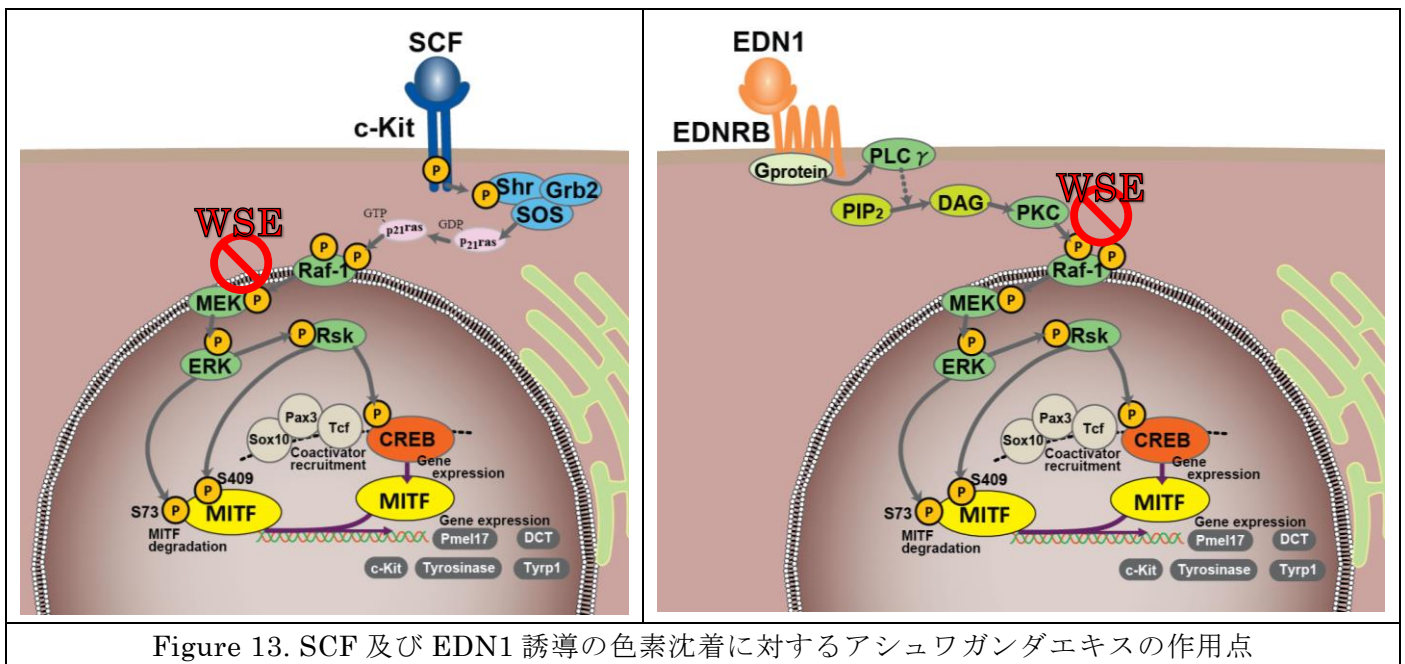


Figure 13. SCF 及び EDN1 誘導の色素沈着に対するアシュワガンダエキスの作用点

第4節 本研究の目的

本研究では UVB により表皮で起こる皮膚障害—炎症・角化亢進・色素沈着に対する AX 及び WFA の抑制効果の有無について培養ヒト表皮細胞を用いて解析した。実際起こりうる現象に沿って、刺激に対する反応—ストレスシグナル伝達を評価し、その作用機序を解明することを目的とした。抑制の作用点が明確になれば安全で有用性の高い各種の皮膚障害抑制剤となることが期待される。

第2章では UVB で引き起こされる炎症に対する AX の抗炎症作用の評価を行うにあたり、ヒトケラチノサイト (HPK) に対し、80mJ/cm² の UVB を照射した。この照射量は個人差があるが日本人の平均の 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) に相当し、真夏の日本の晴れた日に 20 分間日光浴したのに状況に近い。本研究ではこの照射量の UVB で分泌促進される炎症サイトカイン PGE₂ 及び IL-8 に対する AX の抑制効果を評価した。すでにある AX の抗炎症作用の評価方法では炎症誘導因子刺激前に AX で処理しているが、本研究では HPK に UVB を照射し、その後 AX で処理を行った。活性酸素種の消去能を十分に発揮させない処理条件にもかかわらず、UVB で誘導される PGE₂ 及び IL-8 分泌亢進を AX が抑制することを見出し、その抗炎症効果の作用機序を明らかにすることを目的とした。

第3章では、第2章で得た AX の特異的な作用様式を利用し、UVB で引き起こされる角化亢進メカニズムについて解析を行った。本研究では紫外線誘導の角化亢進の作用機序を解明する第一段階として、TGase1 に焦点をあて、UVB 曝露 HPK 及び HaCaT 細胞 (ヒト表皮由来の不死化細胞) におけるその発現への影響とシグナル伝達経路の解明を目的とした。周知の通り TGase1 の架橋作用の基質蛋白であるインボルクリンやロリクリンなどの解析も重要であるが、これらの解析は次期の研究課題とした。

第4章では、UVB 誘導の色素沈着評価系として、ヒト 3 次元培養モデル (HEE) 及びヒトメラノサイト (HM) を用い、SCF 誘導の色素沈着に対する WFA の抑制効果とその作用機序の解明を行った。

第5章では UVB が引き起こすケラチノサイトとメラノサイトのパラクライン作用により誘導される表皮色素沈着モデルをセルインサート共培養を用い構築するとともに、AX 及び WFA の色素沈着抑制効果の作用機序を明らかにすることを目的とした。

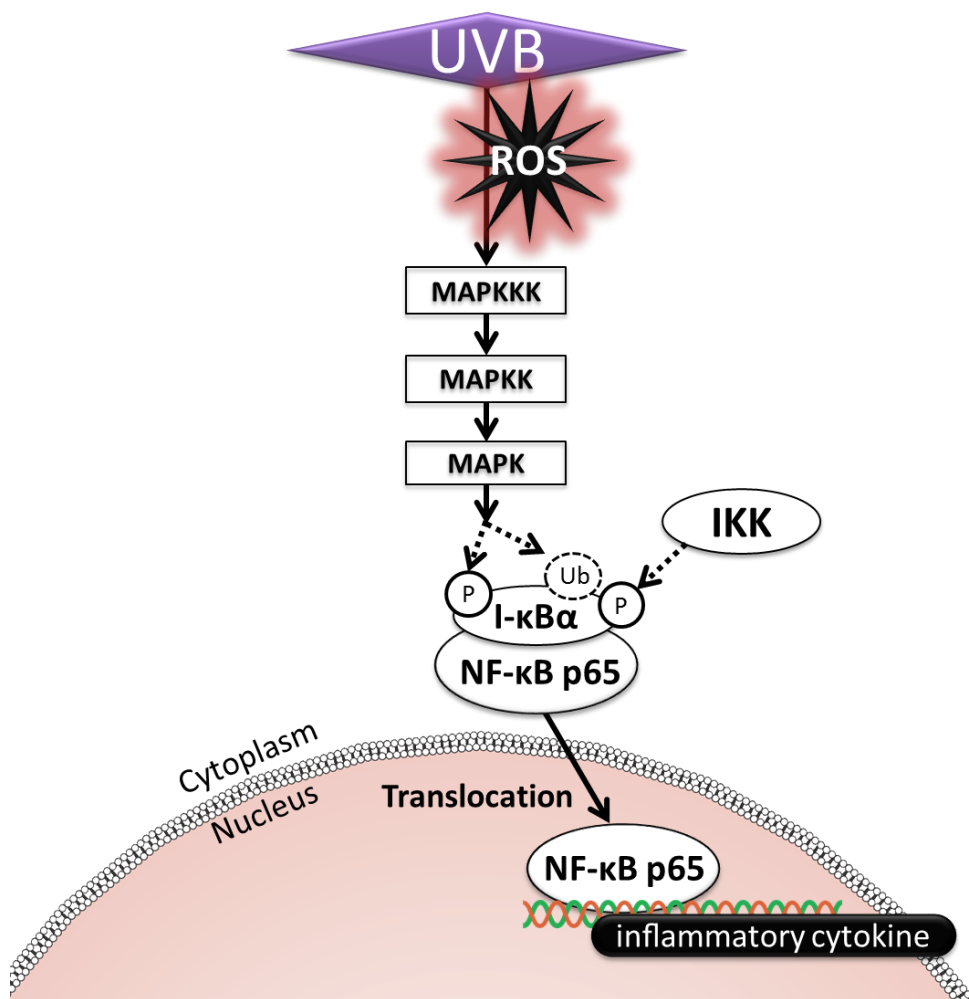
第2章 UVB 曝露 HPK 誘導 PGE₂/IL-8 に対する AX の効果とその作用メカニズム

第1節 研究の目的

日常生活において UVB は有害なレベルでの皮膚炎を誘発する主要な外的要因である。UVB による ROS の発生を発端とし、ストレスシグナルである MAPK カスケードが活性化されることが知られている⁸³⁾。この活性化が炎症性サイトカインやケモカイン及びエイコサノイドの発現を惹起していることが考えられ、その中でも代表的な血管拡張因子の PGE₂ や好中球の遊走因子の IL-8 はそれぞれ炎症反応を進行させる⁸⁴⁾⁸⁵⁾⁸⁶⁾⁸⁷⁾。近年、生体内の酸化還元反応のバランス(レドックスバランス)の不均衡が細胞応答に大きく影響することが示され⁸⁸⁾、レドックスバランスは ROS や内因性の抗酸化剤であるグルタチオンなどにより制御されていることが解明されてきている。ROS は MAPK カスケードを含む数種のシグナル伝達経路の制御に関与しているが、MAPK カスケードにおいて ROS は直接的な影響というよりは副次的である可能性があり、レドックスバランスの変化がそのシグナルに強く影響していることが考えられる。このことについて、MAPK は自身もリン酸化され活性化する一方で、MAPK phosphatase により脱リン酸化され不活性化し⁸⁹⁾⁹⁰⁾⁹¹⁾⁹²⁾、この活性化と不活性化に対し抗酸化剤が ROS の有無にかかわらず、それぞれ阻害因子または刺激因子になることが根拠として示されている。

AX はキサントフィルカロテノイドで、主に藻類及び鮭やエビなどの海洋生物から発見され、強力な抗酸化剤として知られる⁹³⁾⁹⁴⁾⁹⁵⁾。AX の効果効能に対する研究データは多く、特に炎症において LPS 誘導 NF- κ B 活性に対する IKK kinase 阻害、I κ B 分解抑制による NF- κ B 核移行阻害により炎症関連因子の遺伝子発現を抑制すること⁹⁶⁾⁹⁷⁾など、AX が NF- κ B 活性化を抑制することで抗炎症作用を有すると結論付けている。しかし、これらの研究結果において AX が NF- κ B に関与するシグナルを直接阻害しているのか、二次的な要素で NF- κ B の活性を抑制しているのか明らかではない。なぜならば、ROS 産生を誘導する LPS や H₂O₂ などによる刺激の前に AX を加える実験系を用いているためであり、いままで MAPK カスケードに対する AX の効果を評価した報告はなかった。

本研究では、UVB で誘導される皮膚の炎症において、ケラチノサイトを用い UVB で誘導されるシグナル伝達経路を解明するとともに、抗炎症剤としての AX の有用性を評価し、その作用点を明らかにすることを目的とした。



UVB 誘導炎症シグナル伝達の概要

第2節 実験材料及び方法

第1項 細胞培養

正常ヒトケラチノサイト (Human primary keratinocyte:HPK,KURABO 社製)は Medium154S(GIBCO 社製)に HKGS(Human Keratinocyte Growth Supplement)(GIBCO 社製)を加えた培地にて培養した。

第2項 UVB 照射

SE fluorescent lamp (Clinical Supply 社製)を使用し、UVB radiometer photodetector (Torex 社製)で紫外線照射エネルギーを測定することで UVB 照射量を算出した。

第3項 AX 含有培地調製

AX(SIGMA ALDRICH 社製)と DMSO(Wako 社製)を混合し 8mM に調製した後、ヒートブロックで 80℃・約 20 分間加熱し、完全に溶解させた。無血清培地に 1000 倍希釈で加え 8μM AX 含有無血清培地を調製した。

第4項 阻害剤調製

各阻害剤はそれぞれ下記濃度になるよう DMSO で調製し、無血清培地に 1000 倍希釈で加えた。

阻害剤名	製品名	型番	メーカー	最終濃度
NF-κB 阻害剤	JSH-23	481408	MERCK	5μM
MSK1 阻害剤	H89	H0003	Calbiochem	5μM,10μM,15μM

第5項 サイトカイン定量法 (ELISA 法)

回収した細胞上清から ELISA Kit: IL-8 (ThermoFisher Scientific 社製)、PGE₂ (Cayman Chemical 社製)を使用しプロトコールに従い定量した。

第6項 ウェスタンブロット解析法

細胞ライセートを BCA 法 (BCA Protein Assay Kit/Pierce 社製使用)によりタンパク定量し一定濃度に調製した後、Sample buffer 混合後 95℃5 分加熱処理しこれをサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE により分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、下記 1 次抗体 (Can get signal solution1/TOYOBO 製で希釈)と反応させ洗浄後、下記 HRP 標識の 2 次抗体 (Can get signal solution2/TOYOBO 製で希釈)と反応させた。バンドの検出には ECL 及び ECL plus (GE ヘルスケア社製)を用い、X 線フィルム (Hyperfilm ECL/GE ヘルスケア社)と現像機 (MAX RHEIN MR-SE-2S/ニックス社製)を使用した。

1次抗体名	希釈倍率	抗体の由来	分子量	メーカー	型番
CREB antibody	1/1000	Mouse	43 kDa	Cell signaling Technology	9104
Phospho-ser133 CREB	1/2000	Rabbit	43kDa	Cell signaling Technology	9191
ERK	1/5000	Rabbit	42,44kDa	Cell signaling Technology	9102
Phospho-ERK(p-p44/42MAPK)	1/1000	Rabbit	42,44kDa	Cell signaling Technology	9101
β -actin	1/10000	Mouse	42kDa	SIGMA ALDRICH	A5316
MSK1	1/1000	Rabbit	90kDa	Cell signaling Technology	3489
Phospho-MSK1(Ser360)	1/500	Rabbit	90kDa	Cell signaling Technology	9594
Phospho-MSK1(Ser376)	1/500	Rabbit	90kDa	Cell signaling Technology	9591
Phospho-MSK1(Thr581)	1/500	Rabbit	90kDa	Cell signaling Technology	9595
NF- κ B p65 Antibody	1/1000	Rabbit	65kDa	Cell signaling Technology	3034
Phospho-NF- κ B p65(Se276)	1/1000	Rabbit	65-80kDa	Cell signaling Technology	3037
p38 MAPK Antibody	1/1000	Rabbit	43kDa	Cell signaling Technology	9212
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	1/1000	Rabbit	43kDa	Cell signaling Technology	9215
SAPK/JNK	1/1000	Rabbit	46,54kDa	Cell signaling Technology	9252
p-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)	1/1000	Rabbit	46,54kDa	Cell signaling Technology	9251

2次抗体名	希釈倍率	メーカー	型番
Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey	1/10000	GE ヘルスケア	NA934-1ML
Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep	1/10000	GE ヘルスケア	NA931-1ML

第7項 リアルタイム RT-PCR 法

Total RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen 社製) を用い、cDNA 合成には Rever Tra Ace qPCR RT kit(TOYOBO 社製)を用いた。下記配列の PCR プライマーと Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社製)を使用しリアルタイム RT-PCR をした。

	Forward	Reverse
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	5'-AGTCCTTCCACGATAACCAAAGTTG-3'
COX1	5'-ATGAGCAGCTTTTCCAGACG-3'	5'-ATTGGAAGTGGACACCGAAC-3'
COX2	5'-TGAGCATCTACGGTTTGCTG-3'	5'-AACTGCTCATCACCCATTC-3'
IL-8	5'-AAGAGCCAGGAAGAAACCACC-3'	5'-ATTGCATCTGGCAACCCTACA-3'

第8項 共焦点レーザー顕微鏡による解析

3.5cm シャーレに滅菌したカバーガラスを一枚敷き、その上に細胞を 15 万個播種し培養後 UVB 照射等の処理を行った。4%PFA で細胞を固定し PBS で洗浄、冷メタノール浸漬 20 分処理し再度洗浄後、Signal Enhancer (Image-iT TM FX Signal Enhancer/Invitrogen 製)と細胞を接触させて室温・30 分静置した。5%BSA でブロッキング後洗浄し、

下記 1 次抗体溶液と細胞を接触させて 4°C・Over night 反応させた。カバーガラス洗淨後、下記 2 次抗体溶液と細胞を接触させて暗所・室温・1 時間反応させた。カバーガラスを洗淨後、細胞播種面に封入剤(ProLong Gold antifade reagent with DAPI/ Invitrogen 製)を滴下し、マニキュアでカバーガラスをシーリングしプレパラートを作製した後、共焦点レーザー顕微鏡(LSM510-V3.2/ Carl Zeiss 社製)で核の検出は Laser Diode405nm 照射、NF- κ B の検出は Argon2 488nm 照射にて行った。

1 次抗体名	型番	抗体の由来	メーカー	希釈倍率
NF- κ Bp65(E498)Antibody	3987	Rabbit	Cell signaling	1/100

2 次抗体名	型番	抗体の由来	メーカー	希釈倍率
Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rabbit IgG	A-21206	Rabbit	Invitrogen	1/400

第9項 統計処理

統計解析は JSTAT により実施した。一対比較の場合は Student's t-test または Welch's t-test、多重比較の場合は Tukey's test または Dunnett's test で解析し、P 値 0.05 未満を統計的に有意とした。

第3節 実験結果

第1項 UVB 誘導 PGE₂ 及び IL-8 分泌亢進に対する AX の効果

HPK に UVB 80mJ/cm² を照射後、培養上清中の PGE₂ 及び IL-8 の経時的分泌量を ELISA 法により測定したところ、PGE₂ は照射から 12 時間後以降、IL-8 では 24 時間以降から分泌量が増加し、48 時間後までその増加が続いた(Fig. 1、2)。また UVB による PGE₂ 及び IL-8 分泌量の増強は、UVB 照射直後に添加した AX8μM により有意に抑制された(Fig. 1、2)。

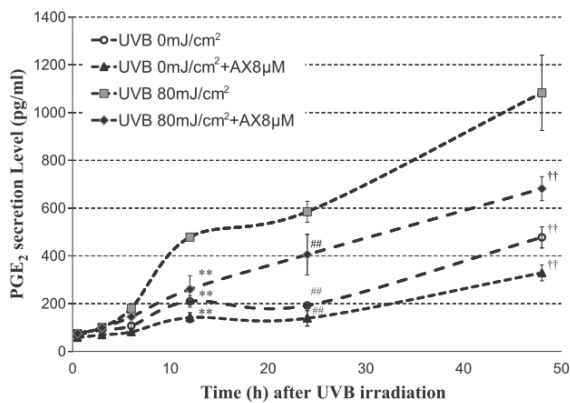


Figure 1. Time course of PGE₂ secretion after UVB irradiation of HPK and the effects of AX on PGE₂ secretion at 0.5- to 48 h postirradiation. *n* = 3, ***P* < 0.01 versus UVB irradiation (12 h), ##*P* < 0.01 versus UVB irradiation (24 h), ††*P* < 0.01 versus UVB irradiation (48 h).

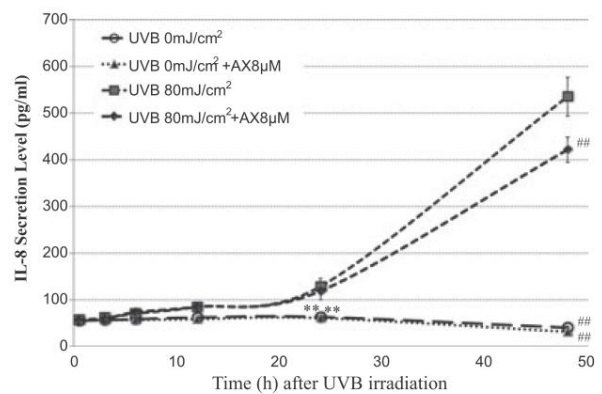


Figure 2. Time course of IL-8 secretion after UVB irradiation of HPK (a) and the effects of AX on IL-8 secretion at 0.5- to 48 h postirradiation (b). *n* = 3, ***P* < 0.01 versus UVB irradiation (24 h), ##*P* < 0.01 versus UVB irradiation (48 h).

第2項 UVB 曝露 HPK の COX2 遺伝子・タンパク発現への AX の効果

PGE₂ 産生の律速酵素である COX2 について、UVB 80mJ/cm² 曝露 HPK の遺伝子発現及びタンパク発現を解析するとともに AX の効果を評価した。COX2 遺伝子発現は照射から 3~6 時間後に有意に発現が増強し、UVB 照射直後添加の AX4、8μM によりその増強が抑制された(Fig. 3-A)。COX2 タンパク発現は照射から 3~24 時間で有意にその発現が増強され、UVB 照射直後添加の AX8μM によりその増強が抑制された(Fig. 3-B)。

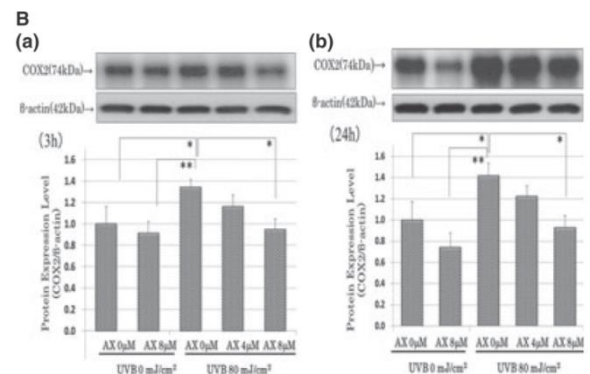
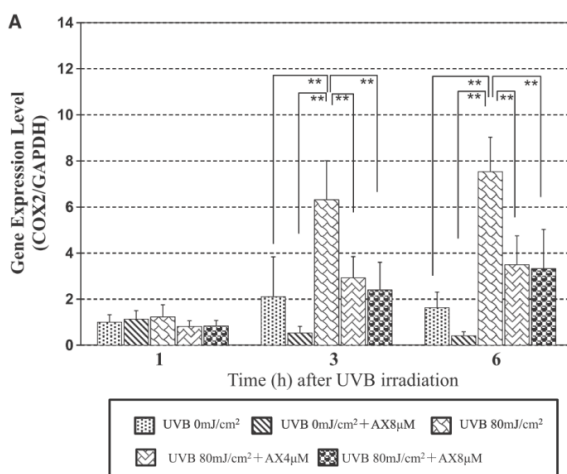


Figure 3. Effects of AX on the gene (A) and protein (B) expression of COX-2 by UVB-exposed HPK at 3 (a) and 24 h (b) postirradiation. (b) Representative immunoblots from three independent experiments are shown. *n* = 3, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

第3項 UVB 曝露 HPK の IL-8 遺伝子発現への AX の効果

UVB 80mJ/cm² 曝露 HPK の IL-8 遺伝子発現を解析するとともに AX の効果を評価した。IL-8 遺伝子発現は照射から 6~12 時間後、有意に発現が増強し、UVB 照射直後添加の AX8μM によりその増強が有意に抑制された(Fig. 4)。

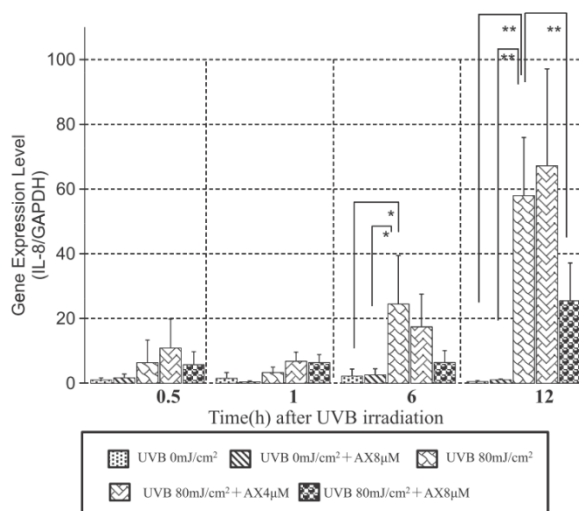


Figure 4. Effects of AX on the gene expression of IL-8 by UVB-exposed HPK. $n = 3$, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$.

第4項 UVB 誘導 PGE₂ 及び IL-8 分泌亢進に対する NF-κB 阻害剤の効果

NF-κB 核移行の阻害剤である JSH-23 を HPK に添加し 3 時間培養した後、UVB 80mJ/cm² 照射し、48 時間後の培養上清中の PGE₂ 及び IL-8 分泌量を測定したところ、JSH-23 添加により UVB で増強されるそれぞれの分泌量は有意に低下した(Fig. 5)。

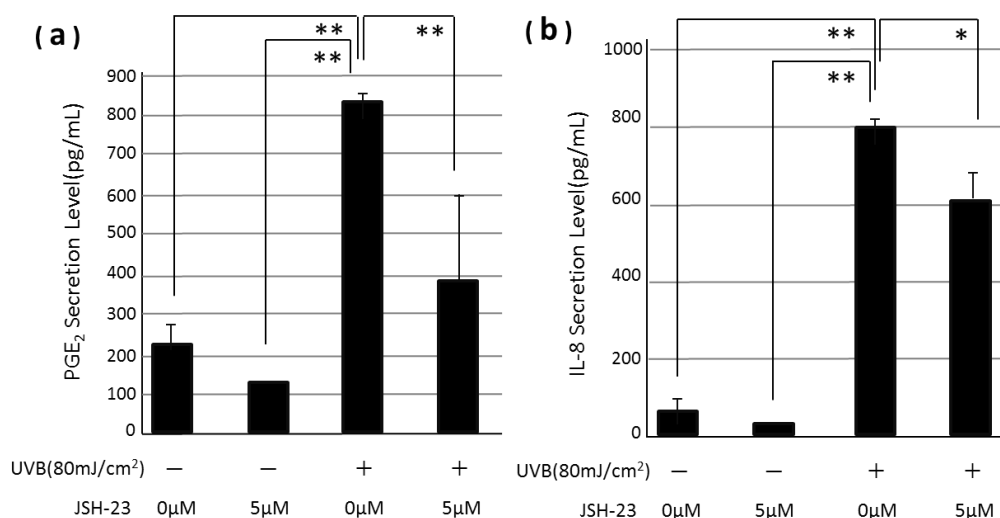


Figure 5. Effects of a NF-κB translocation inhibitor (JSH-23) on the secretion of PGE₂ (a) and IL-8 (b) by UVB-exposed HPK. $n = 3$, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$.

第5項 UVB 誘導 MAPK 活性化に対する AX の効果

HPK への UVB 80mJ/cm² 照射により、MAPK である p38、ERK、JNK のリン酸化が増強され、UVB 照射前 AX 添加により p38 及び ERK は顕著にその増強が抑制されたが、JNK のリン酸化の増強への抑制は認められなかった (Fig. 6-a)。また UVB 照射直後 AX 添加では UVB 誘導の p-38、ERK、JNK のリン酸の増強は抑制されなかった (Fig. 6-b)。

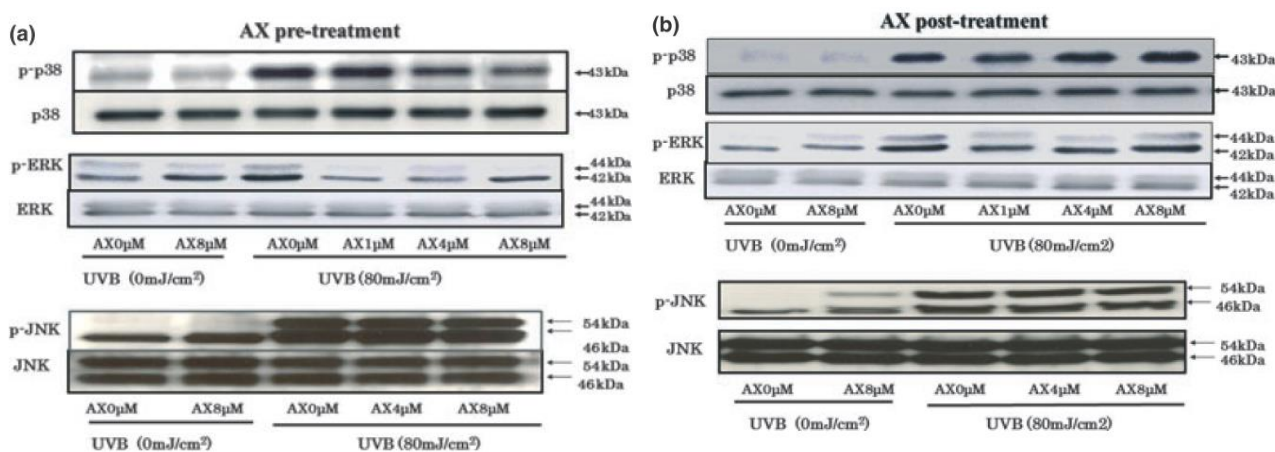


Figure 6. Effects of AX on the UVB-induced phosphorylation of p38 and ERK. (a) Preirradiation treatment of HPK, (b) postirradiation treatment of HPK. Representative immunoblots from three independent experiments are shown.

第6項 UVB 曝露 HPK の NF-κB 核移行に対する AX の効果

UVB 80mJ/cm² 曝露 HPK における NF-κB 核移行を共焦点レーザー顕微鏡で解析するとともに AX の効果を評価した。UVB 照射 15 分後、UVB により NF-κB 核移行が認められ、AX の照射後直後の添加ではその核移行は阻害されなかった (Fig. 7)。

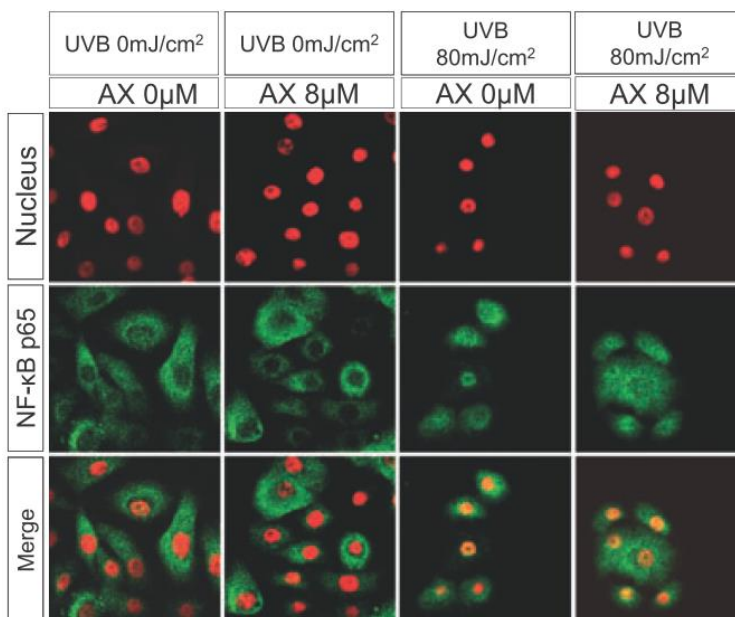


Figure 7. Effects of UVB radiation and AX on the nuclear translocation of NF-κB p65 in HPK. Immunostaining with anti-NF-κBp65 and DRAQ5 was observed as green and red colours, respectively. Merged images are seen as a yellow colour.

第7項 UVB曝露HPKにおけるMSK1,CREB及びNF-κBのリン酸化に対するAXの効果

MSK1及び転写因子であるCREB及びNF-κBにおいて、UVB 80mJ/cm²曝露HPKにおけるこれらリン酸化酵素及び転写因子のリン酸化を解析するとともにAXの効果の評価した。UVB照射15分後MSK1(ser376)のリン酸化が(Fig. 8-c)、UVB照射20分後CREB(ser133)のリン酸化が(Fig. 8-b)、UVB照射30分後NF-κB(ser276)のリン酸化が増強され(Fig. 8-a)、UVB照射直後添加のAX4、8μMによりその増強は有意に抑制された(Fig. 8-a,b,c)。

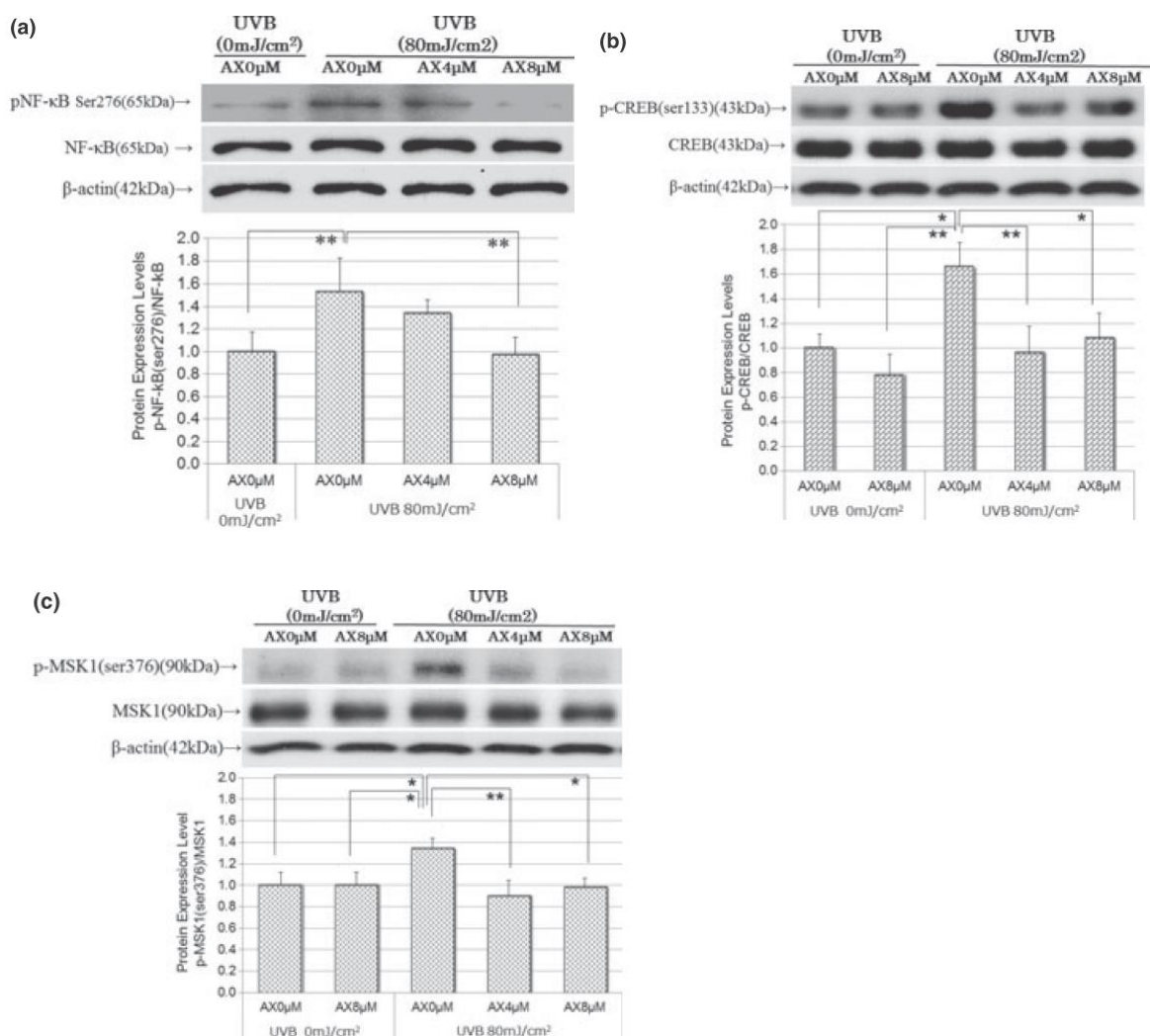


Figure 8. Effects of AX on the Ser276, Ser133 and Ser376 phosphorylation of NF-κB (a), CREB (b) and MSK1 (c) in UVB-exposed HPK at 30-, 20- and 15 min postirradiation, respectively.

第8項 UVB 誘導 PGE₂ 及び IL-8 分泌亢進に対する MSK1 阻害剤の効果

HPK を UVB 80mJ/cm² 照射し、その直後に MSK1 阻害剤である H9 を添加し、48 時間後に培養上清中の PGE₂ 及び IL-8 分泌量を測定したところ、H9 10、15 μ M 添加により UVB で増強されるそれぞれの分泌量が有意に抑制された (Fig. 9)。

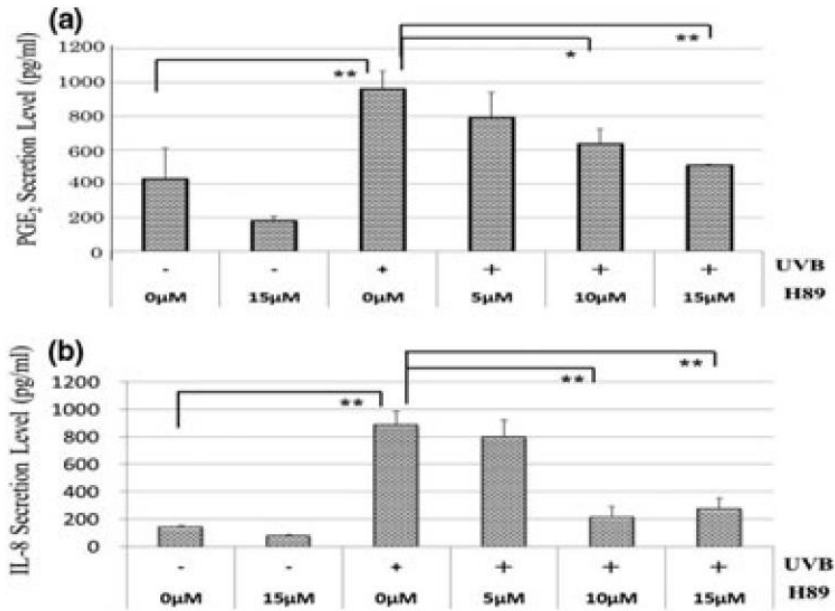


Figure 9. Effects of the MSK inhibitor H9 on the secretion of PGE₂ (a) and IL-8 (b) at 48 h postirradiation (b) by postirradiation treatment. $n = 3$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

第4節 考察

本研究の結果により、UVB 曝露 HPK から分泌亢進される PGE₂ 及び IL-8 に対し、UVB 照射直後に AX 添加しても抑制することが明らかとなった(Fig. 1,2)(UVB 照射前 AX 添加による PGE₂ 及び IL-8 分泌亢進抑制データは未発表)。これは UVB で誘導される、PGE₂ 産生の律速酵素である COX2 の遺伝子/タンパク発現の抑制及び IL-8 遺伝子発現抑制に起因することが判明した(Fig. 3,4)。次に UVB 誘導 PGE₂ 及び IL-8 分泌亢進に関わるシグナル伝達経路の解明において、ケラチノサイトに対する UVB やその他の刺激により、MAPK である p38 や ERK が活性化し COX2 や IL-8 の発現を誘導するとの報告があるため⁹⁸⁾⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾¹⁰¹⁾¹⁰²⁾¹⁰³⁾¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾、UVB 照射前または照射後に AX 添加し、MAPK に対する AX の効果を評価した。その結果、UVB 照射前 AX 添加では UVB で誘導される p38 及び ERK のリン酸化を抑制したのに対し(Fig. 6-a)、UVB 照射直後 AX ではその抑制効果は認められなかった(Fig. 6-b)。このことから UVB 照射直後 AX 添加により抑制される PGE₂ 及び IL-8 分泌亢進の抑制の作用点は、MAPK より下流で COX2/IL-8 遺伝子発現より前のどこかに存在することが示唆され、次に COX2/IL-8 の転写因子として知られる NF- κ B に対する AX の効果を解析した。NF- κ B 核移行阻害剤である JSH-23 は UVB 誘導 PGE₂/IL-8 分泌亢進を抑制したが(Fig. 5)、UVB 誘導の NF- κ B の核移行に対し、AX の照射直後の添加による阻害作用は認められなかった(Fig. 7)。いままで報告された AX の研究結果では、AX が IKK 活性を阻害することで NF- κ B の核移行を阻害すると結論づけていたが¹⁴⁾、刺激前に AX 添加する実験系ではこれらの阻害効果が ROS を消去したことによる副次的な作用であることが今回の結果で明らかとなった。AX 照射直後添加では UVB 誘導の NF- κ B 核移行を阻害しなかったため、NF- κ B の DNA 結合活性に関わるリン酸化部位 Ser276 への AX の効果を評価したところ、UVB で増強される NF- κ B Ser276 のリン酸化は UVB 照射直後 AX 添加により抑制されることが明らかとなった(Fig. 8-a)。NF- κ B Ser276 は核移行後にリン酸化酵素である MSK1 によって核内でリン酸化され¹⁰⁶⁾、その MSK1 の活性化は p38 または ERK により MSK1 の Ser360 及び Thr581 がリン酸化され¹⁰⁷⁾、そのあと自己リン酸化部位である Ser376 がリン酸化されることで引き起こされる¹⁰⁸⁾。そのため MSK1 Ser376 のリン酸化に対する AX の影響を評価した結果、UVB で増強されるそのリン酸化は AX 照射直後添加で抑制されることが判明した(Fig. 8-c)。また MSK1 は CREB のリン酸化酵素でもあるため²⁶⁾、CREB Ser133 のリン酸化への AX の影響を評価したところ、UVB で増強される CREB Ser133 のリン酸化に対する AX 照射直後添加による抑制効果が確認された(Fig. 8-b)。さらに AX が MSK1 の活性を阻害することにより UVB 誘導 PGE₂/IL-8 分泌亢進を抑制しているのかどうかを確認するため、MSK1 の阻害剤である H89 を用い評価した結果、UVB 照射直後 H89 添加により UVB 誘導 PGE₂/IL-8 分泌亢進を濃度依存的に抑制することが明らかとなった(Fig. 9)。

以上より UVB 照射直後に AX を添加する実験系において、Fig. 10 に示す通り AX の作用点は MSK1 の活性化抑制にあると考えられ、その結果 NF- κ B の DNA 結合活性を弱め COX2/IL-8 遺伝子発現が抑制され、UVB 誘導の PGE₂/IL-8 分泌亢進が抑えられるシグナル伝達抑制メカニズムが示唆された。

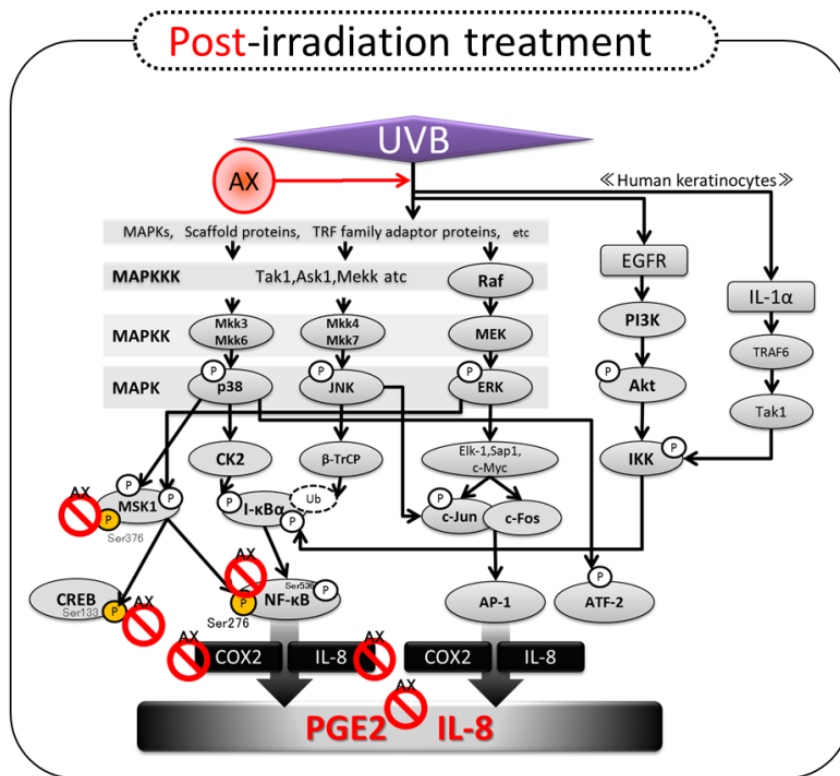
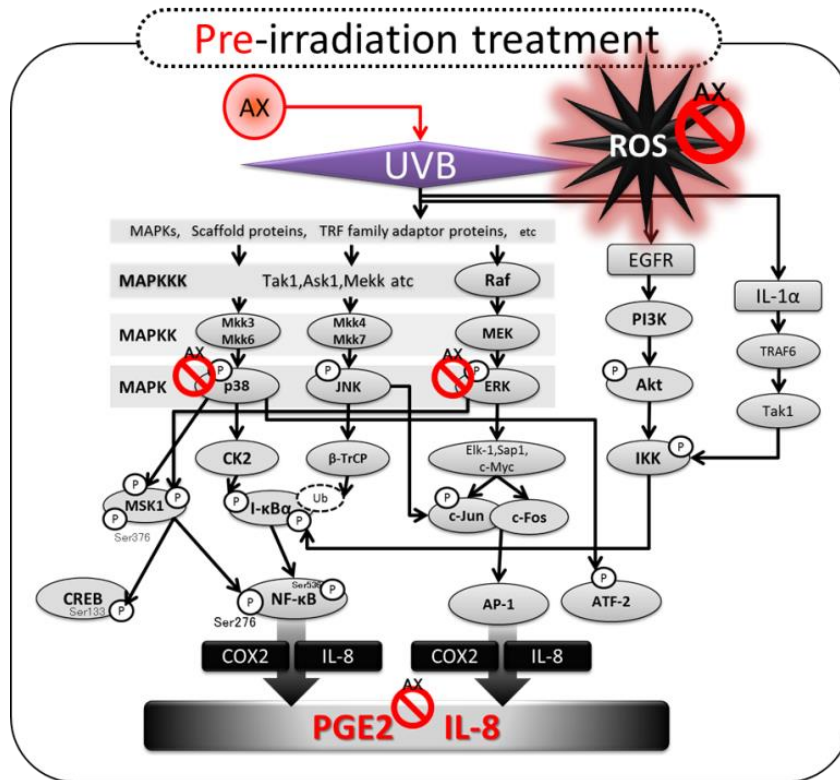


Figure 10. UVB 照射前 AX 添加及び照射後 AX 添加の PGE2/IL-8 分泌抑制の作用点

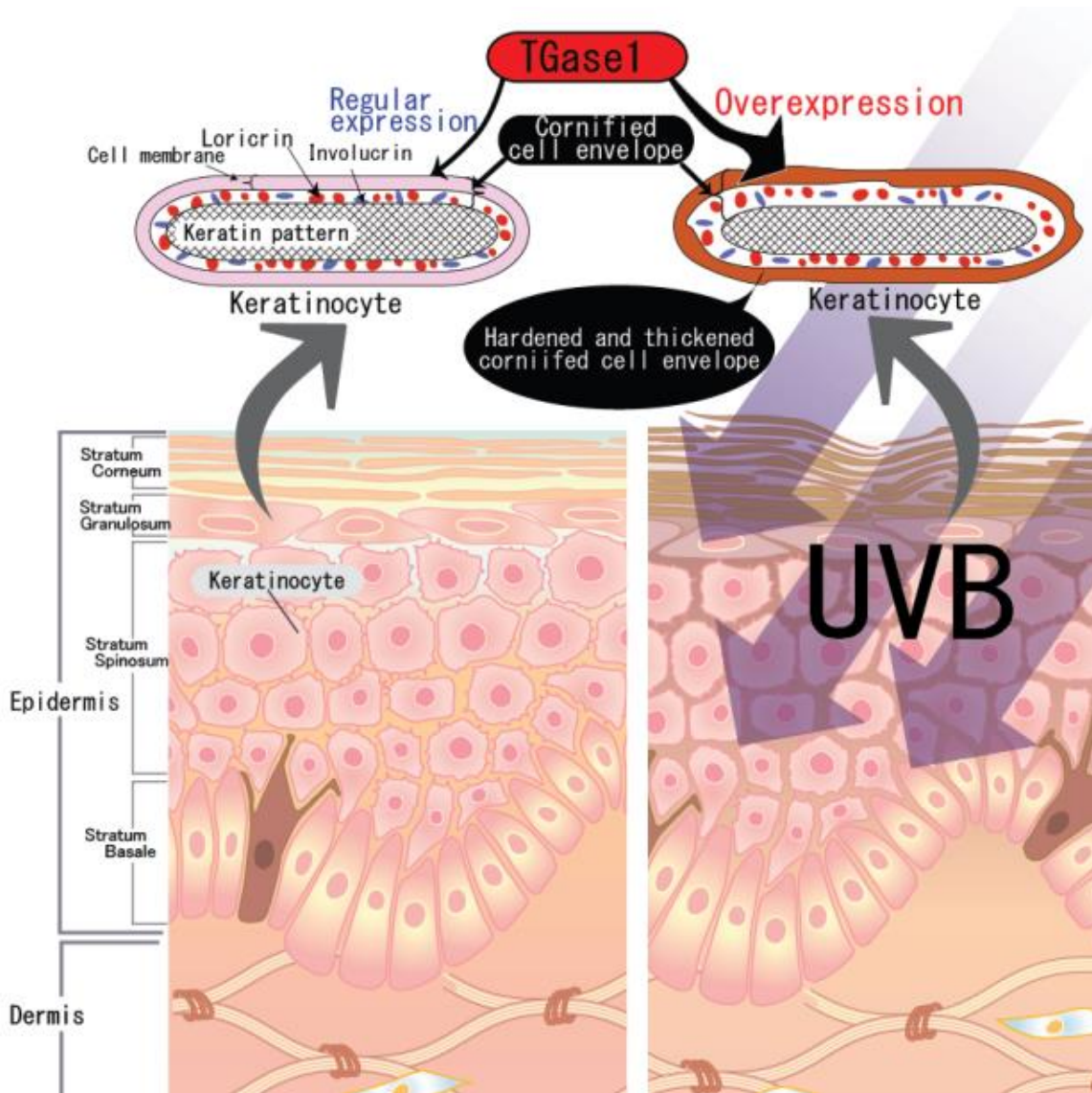
第3章 UVB 曝露 HPK 誘導 TGase1 発現に対するシグナル伝達経路の解明

第1節 研究の目的

UVB 曝露により皮膚の炎症が起き、表皮基底細胞の分裂促進とそのあと角化が亢進されることが報告されている¹⁰⁹⁾。角化亢進が起きた皮膚はザラツキやゴワツキのある粗造な皮膚表面を特徴とし、これは **Cornified cell envelope(CE)** と呼ばれる角質細胞の辺縁帯が通常より硬く分厚くなることによると考えられているが、詳細なメカニズムはまだ知られていない。CE は **Involucrin** 及び **Loricrin** が主な構成タンパクであり、これらのタンパクを **Transglutaminase(TGase)** が架橋することで形成される。本研究では UVB 曝露で生じる角化亢進は、UVB による TGase 活性増強の結果引き起こされるとの仮説に基づき、このメカニズムを解明することを目的とした。TGase は タンパク質を ϵ -(γ -glutamyl) lysine 結合により架橋する Ca 依存性の酵素で、4 種のアイソザイム(TGase1,2,3,X)が存在し、表皮などの上皮組織に恒常的に発現している¹¹⁰⁾¹¹¹⁾。その中でも TGase1 及び 3 が表皮の角化に関与しているとの報告があるが¹¹²⁾¹¹³⁾¹¹⁴⁾、TGase1 は膜結合型酵素として有棘層や顆粒層の表皮上層部に圧倒的に多く発現しており¹¹⁵⁾¹¹⁶⁾、CE 形成に最も深くかかわっている可能性が示唆されている¹¹⁷⁾¹¹⁸⁾。一方 TGase3 は分泌型酵素として角質細胞や毛包で発現しており¹¹⁹⁾、TGase3 ノックアウトマウスのフェノタイプでは体毛が細く変化するが、皮膚への顕著な変化は見られないことが報告されている¹²⁰⁾。これらの知見から、表皮の角化には TGase1 が最も影響する酵素と考えられる。

表皮の TGase1 に対する UVB の影響について、HPK における TGase1 活性は UVB では誘導されないとの報告がある¹²¹⁾一方、UVB による TGase1 の過剰発現が表皮組織染色で確認されており、この過剰発現によって表皮過形成(表皮の肥厚)が生じるとの報告もある¹²²⁾。TGase1 の活性には **Cathepsin D** あるいはその他のプロテアーゼによるプロセッシングを受けるなどいくつかの工程を必要としており、UVB による TGase1 への影響を評価するのに、前述の TGase1 の酵素活性測定や表皮組織の免疫染色だけでは不十分といえる。このため、まず UVB より HPK の TGase1 遺伝子/タンパク発現が増強されるかどうか、またそのシグナル伝達経路を解明することが UVB 曝露による角化亢進を理解するのに重要と考えられる。

本研究では UVB により誘導されるストレスシグナルに関わる阻害剤を使用し、TGase1 の発現の評価を行った。またこのシグナル伝達経路解明のためのアイテムの 1 つとして、AX の UVB 照射前・照射直後添加による特異作用(第 2 章に記述)を利用した。



紫外線誘導の角化亢進の仮説

第2節 実験材料及び方法

第1項 細胞培養

正常ヒトケラチノサイト(Human primary keratinocyte:HPK,KURABO 社製)は Medium154S(GIBCO 社製)に HKGS(Human Keratinocyte Growth Supplement)(GIBCO 社製)を加えた培地にて培養した。ヒト表皮由来の不死化細胞である HaCaT 細胞(九州大皮膚科・古江教授より供与)は 10%牛胎児血清(FBS)(Hyclone 社製)を含有した DMEM 培地にて継代培養した。

第2項 UVB 照射

SE fluorescent lamp (Clinical Supply 社製)を使用し、UVB radiometer photodetector (Torex 社製)で紫外線照射エネルギーを測定することで UVB 照射量を算出した。

第3項 AX 含有培地調製

AX(SIGMA ALDRICH 社製)と DMSO(Wako 社製)を混合し 8mM に調製した後、ヒートブロックで 80℃・約 20 分間加熱し、完全に溶解させた。無血清培地に 1000 倍希釈で加え 8 μ M AX 含有無血清培地を調製した。

第4項 阻害剤調製

各阻害剤はそれぞれ下記濃度になるよう DMSO で調製し、無血清培地に 1000 倍希釈で加えた。

阻害剤名	製品名	型番	メーカー	最終濃度
p38 阻害剤	SB203580	559389	MERCK	10 μ M
MEK 阻害剤	PD98059	513000	MERCK	20 μ M
JNK 阻害剤	JNK Inhibitor II	420119	MERCK	1 μ M
NF- κ B 阻害剤	JSH-23	481408	MERCK	5 μ M
MSK1 阻害剤	H89	H0003	Calbiochem	0.05 μ M,0.1 μ M,0.5 μ M

第5項 ウェスタンブロット解析法

細胞ライセートを BCA 法(BCA Protein Assay Kit/Pierce 社製使用)によりタンパク定量し一定濃度に調製した後、Sample buffer 混合後 95℃5 分加熱処理しこれをサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE により分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、下記 1 次抗体(Can get signal solution1/TOYOBO 製で希釈)と反応させ洗浄後、下記 HRP 標識の 2 次抗体(Can get signal solution2/TOYOBO 製で希釈)と反応させた。バンドの検出には ECL 及び ECL plus(GE ヘルスケア社製)を用い、X 線フィルム(Hyperfilm ECL/GE ヘルスケア社)と現像機(MAX RHEIN MR-SE-2S/ニックス社製)を使用した。

1次抗体名	希釈倍率	抗体の由来	分子量	メーカー	型番
Transglutaminase 1	1/1000	Rabbit	89.8 kDa	NOVUS	NB100-1844
CREB antibody	1/1000	Mouse	43 kDa	Cell signaling Technology	9104
Phospho-ser133 CREB	1/2000	Rabbit	43kDa	Cell signaling Technology	9191
ERK	1/5000	Rabbit	42,44kDa	Cell signaling Technology	9102
Phospho-ERK(p-p44/42MAPK)	1/1000	Rabbit	42,44kDa	Cell signaling Technology	9101
Phospho-c-Jun (Ser73)	1/1000	Rabbit	48kDa	Cell signaling Technology	3270
c-Jun (60A8)	1/1000	Rabbit	43,48kDa	Cell signaling Technology	9165
p-AKT(Thr308)	1/1000	Rabbit	60kDa	Cell signaling Technology	9275
Akt	1/1000	Rabbit	60kDa	Cell signaling Technology	4691
p-ATF2(Thr71)	1/1000	Rabbit	70kDa	Cell signaling Technology	9221
ATF2	1/1000	Rabbit	65-75kDa	Cell signaling Technology	9226
β -actin	1/10000	Mouse	42kDa	SIGMA ALDRICH	A5316
MSK1	1/1000	Rabbit	90kDa	Cell signaling Technology	3489
Phospho-MSK1(Ser360)	1/500	Rabbit	90kDa	Cell signaling Technology	9594
Phospho-MSK1(Ser376)	1/500	Rabbit	90kDa	Cell signaling Technology	9591
Phospho-MSK1(Thr581)	1/500	Rabbit	90kDa	Cell signaling Technology	9595
NF- κ B p65 Antibody	1/1000	Rabbit	65kDa	Cell signaling Technology	3034
Phospho-NF- κ B p65(Se276)	1/1000	Rabbit	65-80kDa	Cell signaling Technology	3037
p38 MAPK Antibody	1/1000	Rabbit	43kDa	Cell signaling Technology	9212
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	1/1000	Rabbit	43kDa	Cell signaling Technology	9215
SAPK/JNK	1/1000	Rabbit	46,54kDa	Cell signaling Technology	9252
p-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)	1/1000	Rabbit	46,54kDa	Cell signaling Technology	9251
I κ B α (44D4) Rabbit mAb	1/1000	Rabbit	39kDa	Cell signaling Technology	4812
CK2 α Antibody	1/1000	Rabbit	42kDa	Cell signaling Technology	2656

2次抗体名	希釈倍率	メーカー	型番
Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey	1/10000	GE ヘルスケア	NA934-1ML
Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep	1/10000	GE ヘルスケア	NA931-1ML

第6項 RNA 干渉法

MSK1 に対する siRNA は Silencer® Select Pre-Designed siRNA(Life Technologies 社製) を使用し、Lipofectamine2000(Invitrogen 社製)を用いて細胞に導入した。

第7項 統計処理

統計解析は JSTAT により実施した。一対比較の場合は Student's t-test または Welch's t-test、多重比較の場合は Tukey's test または Dunnett's test で解析し、P 値 0.05 未満を統計的に有意とした。

第3節 実験結果

第1項 UVB 曝露 HPK の TGase1 遺伝子・タンパク発現への影響

HPK に UVB 80mJ/cm² を照射し、24 時間後の TGase1 遺伝子発現(Fig. 1-A)、48 時間後のタンパク発現(Fig. 1-B)を解析したところ、UVB によって TGase1 遺伝子発現量およびタンパク発現は有意に増強された。

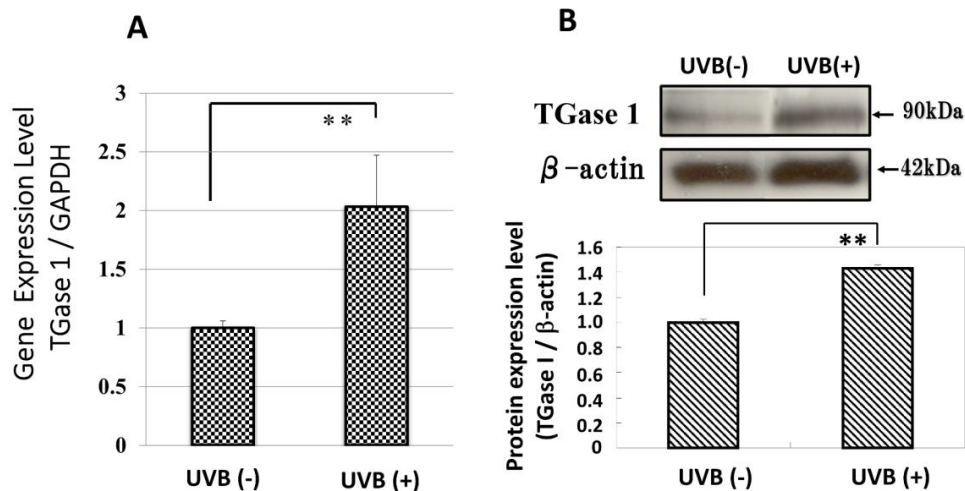


Fig 1. Effects of UVB radiation on the gene and protein expression levels of TGase 1. HPKs were exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² and were cultured for 24 and 48 h and then analyzed by real-time RT-PCR and Western blotting, respectively. (A) The gene expression level. RT-PCR results are normalized to GAPDH; values are means ± S.D. derived from 3 independent experiments. **: p<0.01. (B) The protein expression level. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means ± S.D. derived from 3 independent experiments. **: p<0.01.

第2項 シグナル伝達阻害剤を用いた UVB 誘導 TGase1 タンパク発現への影響

MAPK 阻害剤(p38/MEK/JNK inhibitor)及び NF-κB 核移行阻害剤(JSH-23)のシグナル伝達経路に対する阻害剤を HPK に添加し、3 時間後に UVB 80mJ/cm² を照射した。その 48 時間後の TGase1 タンパク発現を解析したところ、すべての阻害剤により UVB 誘導の TGase1 タンパク発現は有意に抑制された(Fig. 2)。

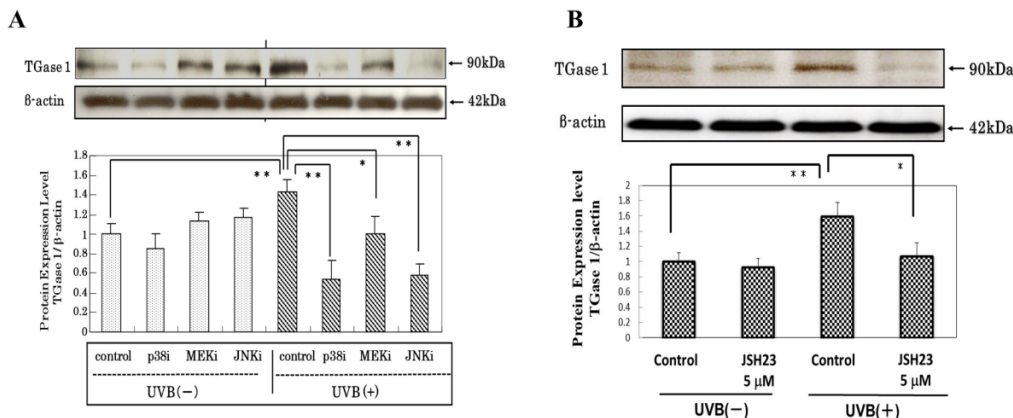


Fig 2. Effects of stress signaling inhibitors on the UVB-stimulated expression of TGase 1 protein. (A) Inhibitors of p38 (at 20 μM), MEK (at 20 μM) and JNK (at 20 μM). (B) Inhibitor of NFκB translocation (at 5 μM). HPKs were incubated with signaling inhibitors as noted for 3 h, then were exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² and were cultured for 48 h after which cell lysates were subjected to Western blotting analysis. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means ± S.D. derived from 3 independent experiments. **: p<0.01, *: p<0.05.

第3項 AXを用いた UVB 誘導 TGase1 タンパク発現への影響

AX(1~8 μ M)を HPK に添加し、3 時間後に UVB 80mJ/cm²を照射した。その 48 時間後の TGase1 タンパク発現を解析したところ、4~8 μ M AX により UVB 誘導の TGase1 タンパク発現を有意に抑制された(Fig. 3-A)。また UVB 80mJ/cm²照射直後に AX(1~8 μ M)を HPK に添加し 48 時間後の TGase1 タンパク発現を解析した結果、興味深いことに UVB 照射後添加でも AX(1~8 μ M)は UVB 誘導の TGase1 タンパク発現を有意に抑制することが判明した(Fig. 3-B)。

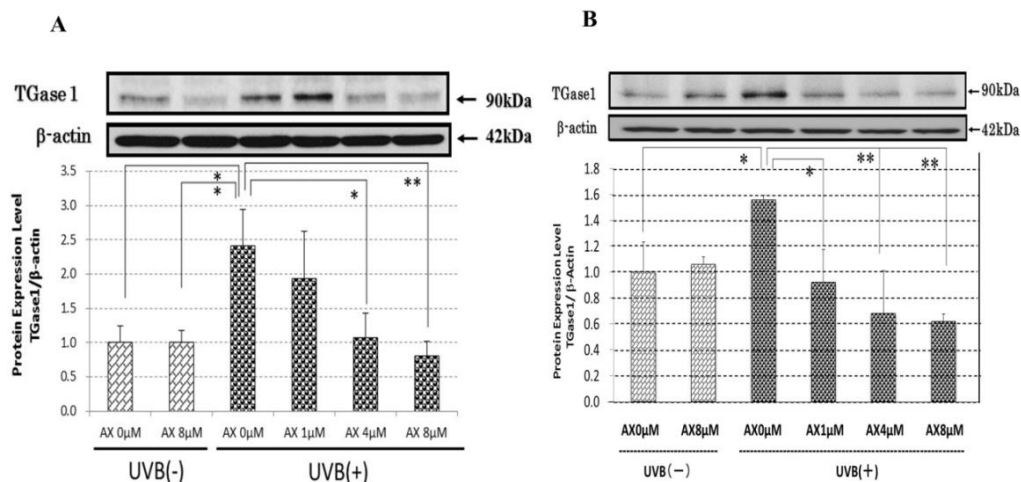


Fig 3. Inhibitory effects of AX on the UVB-stimulated protein expression of TGase 1. (A) HPKs were treated for 3 h with AX at concentrations of 1, 4 or 8 μ M, exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² and were then cultured for 48 h prior to Western blotting analysis. (B) Immediately after UVB irradiation at a dose of 80 mJ/cm², AX was added at concentrations of 1, 4 or 8 μ M after which HPKs were cultured for 48 h and subjected to Western blotting analysis. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means \pm S.D. derived from 3 independent experiments. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

第4項 UVB によるシグナル分子のリン酸化のタイムコースの測定

シグナル分子 p38、ERK、JNK 及び AKT について、UVB 曝露 HaCaT におけるタイムコースの測定を行った。UVB 80mJ/cm²照射 0~30 分後、ERK 及び JNK は UVB 照射の有無にかかわらず 15 分後にリン酸化が増強されたが、UVB 照射のほうがやや増強が強いもしくは長くなる傾向があり、p38、ERK、JNK リン酸化のピークは 15 分後にあると考えられた(Fig. 4-A)。また AKT のリン酸化は、UVB 照射 30 分後から増強が見られ、照射 6 時間後まで継続した(Fig. 4-B)。

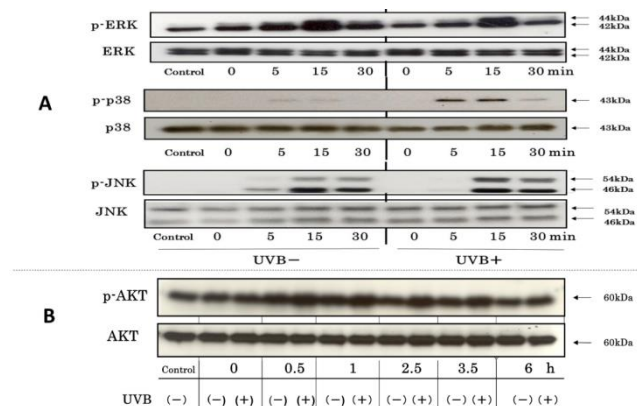


Fig 4. Time course study of the phosphorylation of several stress-activated kinases after UVB exposure. (A) Effects on the phosphorylation of ERK/p38/JNK. (B) Effects on the phosphorylation of AKT. Human HaCaT keratinocytes were exposed to UVB at 80 mJ/cm² and were cultured for the indicated times. Whole cell lysates were prepared and were analyzed by Western blot using antibodies to phospho-p38, p38, phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-JNK1/2 and JNK1/2, and to phospho-AKT and AKT. Representative data from 3 independent experiments are shown.

第5項 UVB 誘導シグナル分子活性化に対する AX の効果

UVB 曝露 HPK におけるシグナル分子への AX の効果は、UVB 照射前 AX 添加により UVB で増強される p38 及び ERK のリン酸化 (照射から 15 分後) を抑えることができるが、UVB 照射直後 AX 添加では抑制されないことは前述した(第 2 章 Fig. 6-b)。ここでは HaCaT 細胞に対し、同様に UVB 照射直後 AX を添加しシグナル分子への AX の効果を評価した。UVB 80mJ/cm² 照射から 15 分後の p38、ERK、JNK において UVB 誘導のこれらのリン酸化増強は AX によって抑制されず、HPK を使用した実験と同様の結果であった(Fig. 5-A)。またそのほかのシグナル分子 c-Jun、ATF2 のリン酸化および c-Fos のタンパク発現への AX の効果を評価したところ、UVB で誘導される c-Jun 及び ATF2 のリン酸化(照射から 0.5~6 時間後)、c-Fos のタンパク発現増強(照射から 3~6 時間後)は、いずれも AX によって抑制されなかった(Fig. 5-B、6、7)。

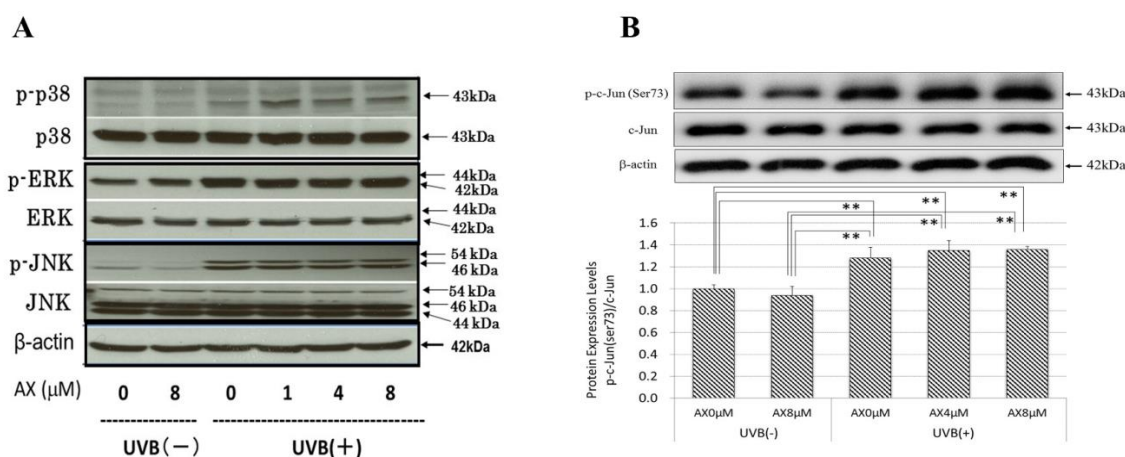


Fig 5. Effects of AX on the UVB-induced phosphorylation of p38/ERK/JNK/c-Jun. (A) Effects of post-irradiation treatment with AX on the UVB-induced phosphorylation of p38, JNK and ERK in human HaCaT keratinocytes. (B) Post-irradiation treatment for the phosphorylation of c-Jun in HPKs. HPKs or human HaCaT keratinocytes were exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² immediately after which the cells were treated with AX at the indicated concentrations. Lysates were harvested at the indicated times after UVB irradiation and were immunoblotted with antibodies to phosphorylated or non-phosphorylated p38/ERK/JNK/c-Jun. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means \pm S.D. from 3 independent experiments. **: p<0.01; *: p<0.05.

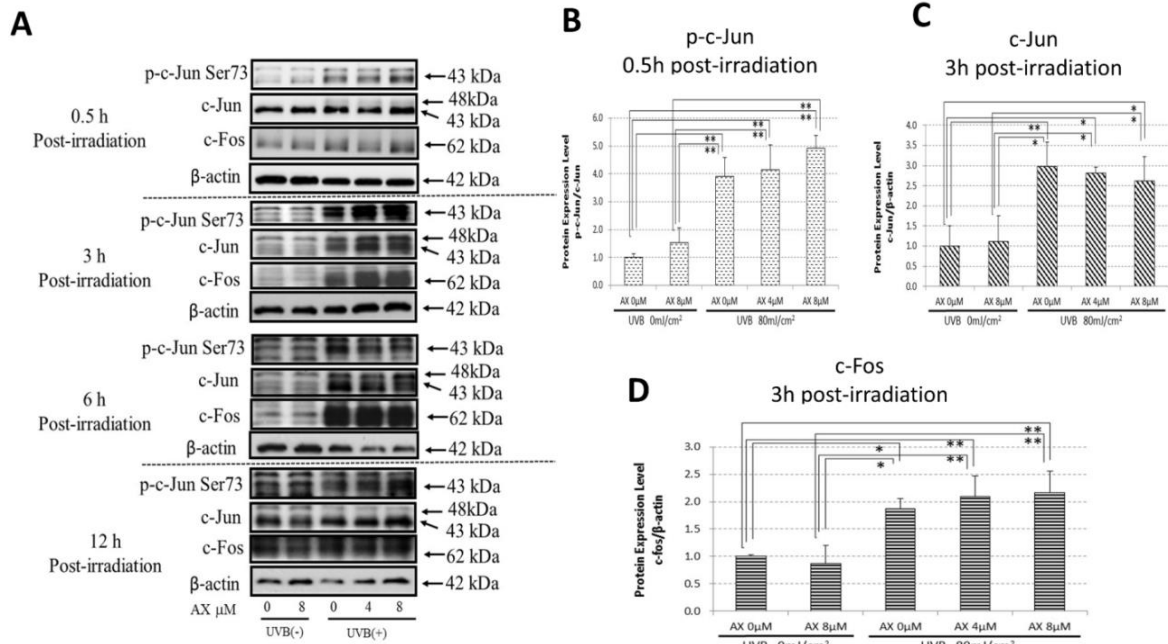


Fig 6. Effects of AX on the UVB-induced phosphorylation of c-Jun and on the UVB-induced protein expression of c-Jun and c-Fos. (A) Western blotting for the phosphorylation of c-Jun and the protein expression of c-Jun and c-Fos. (B) Densitometric analysis for the phosphorylation of c-Jun at 0.5 h post-irradiation. (C) Densitometric analysis for the protein level of c-Jun at 3 h post-irradiation. (D) Densitometric analysis for the protein level of c-Fos at 3 h post-irradiation. Human HaCaT keratinocytes were exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² immediately after which the cells were treated with AX at the indicated concentrations. Lysates were harvested at the indicated times after UVB irradiation and were immunoblotted with antibodies to phosphorylated or non-phosphorylated c-Jun or c-Fos. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means \pm S.D. from 3 independent experiments. **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

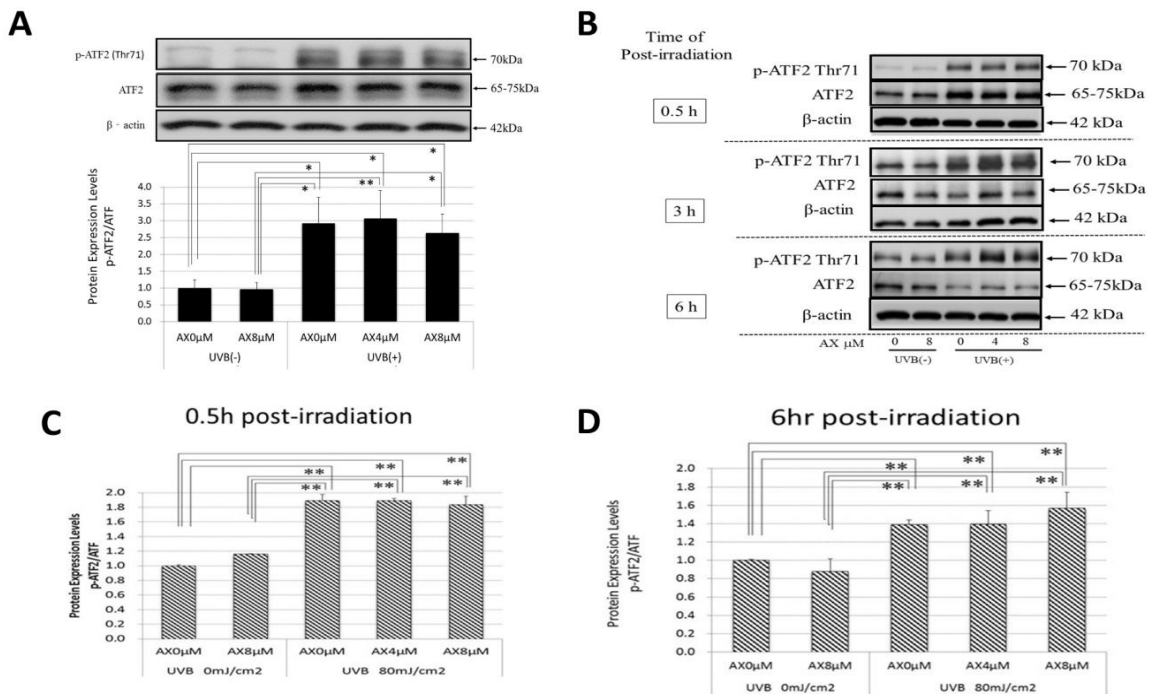


Fig 7. Effects of AX on the UVB-induced phosphorylation of ATF2. (A) Western blotting for the phosphorylation of ATF-2 in HPKs. (B) Western blotting for the phosphorylation of ATF-2 in human HaCaT keratinocytes. (C) Densitometric analysis for phosphorylation of ATF-2 at 0.5 h post-irradiation. (D) Densitometric analysis for the phosphorylation of ATF-2 at 6 h post-irradiation. HPKs or human HaCaT keratinocytes were exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² immediately after which the cells were treated with AX at the indicated concentrations. Lysates were harvested at the indicated times after UVB irradiation and were immunoblotted with antibodies to phosphorylated or non-phosphorylated ATF-2. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means \pm S.D. from 3 independent experiments. **: $p < 0.01$.

第6項 UVB 誘導 CK2 のリン酸化及び I- κ B に対する AX の効果

UVB 80mJ/cm² 照射直後に AX(4~8 μ M)を HaCaT 細胞に添加し、照射から 0.5~6 時間後の CK2 のリン酸化と 0.5~72 時間後の I- κ B タンパク発現を解析したところ、UVB によってリン酸化されたと考えられる分子の出現に依存し、わずかに上方シフトした CK2 や UVB による I- κ B タンパク分解によるタンパクレベルの低下に対し、AX 照射後添加は影響しないことが明らかとなった(Fig. 8-A,B)。

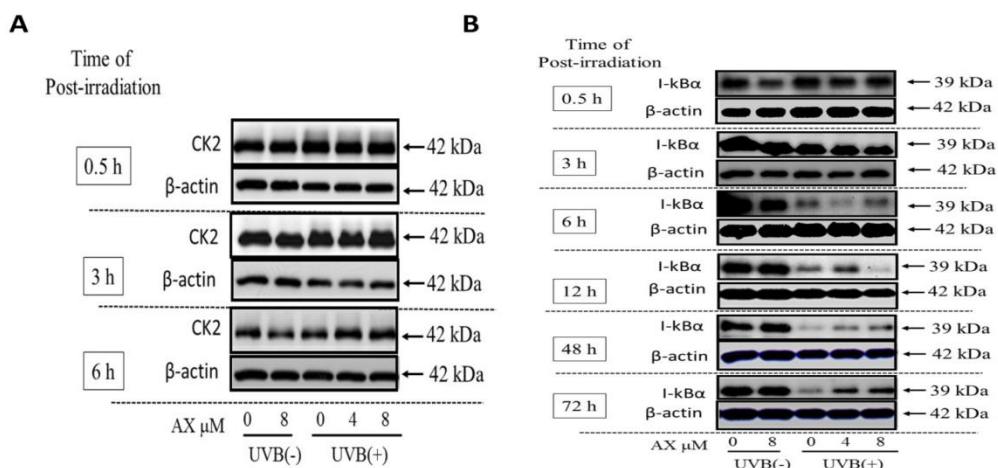


Fig 8. Effects of AX on the UVB-induced phosphorylation of CK2 and the degradation of I- κ B α . (A) CK2, (B) I- κ B α . Human HaCaT keratinocytes were exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² immediately after which the cells were treated with AX at the indicated concentrations. Lysates were harvested at the indicated times after UVB irradiation and were immunoblotted with antibodies to CK2 or I- κ B α . Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown.

第7項 UVB 誘導 NF- κ B のリン酸化に対する AX の効果

UVB 80mJ/cm² 照射直後に AX(4~8 μ M)を HaCaT 細胞に添加し、照射から 0.5~6 時間後の NF- κ B(ser276/536/468) リン酸化を解析したところ、UVB で増強される NF- κ B(ser276/536/468)リン酸化は、AX 照射後添加によって唯一 ser276 だけが抑制された(Fig. 9)。

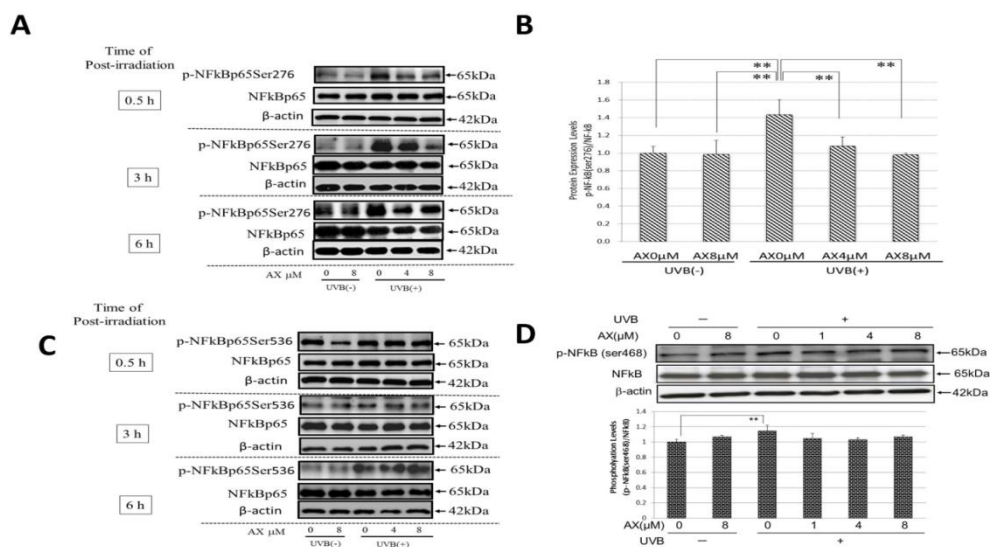


Fig 9. Effects of AX on the Ser276/468/536 phosphorylations of NF κ Bp65 in UVB-exposed human HaCaT keratinocytes. (A) Ser276 phosphorylation of NF κ Bp65 at 0.5, 3 and 6 h post-irradiation. (B) Densitometric analysis for Ser276 phosphorylation of NF κ Bp65 at 0.5 h post-irradiation. (C) Ser536 phosphorylation of NF κ Bp65 at 0.5, 3 and 6 h post-irradiation. (D) Ser468 phosphorylation of NF κ Bp65 at 0.5 h post-irradiation. Human HaCaT keratinocytes were exposed to UVB irradiation at a dose of 80 mJ/cm² immediately after which the cells were treated with AX at the indicated concentrations. Lysates were harvested at 0.5, 3 or 6 h after UVB irradiation and were immunoblotted with antibodies to NF κ Bp65 and phosphorylated NF κ Bp65Ser276/Ser536/Ser468. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means \pm S.D. from 3 independent experiments. **, p<0.01.

第8項 UVB 誘導 MSK1 のリン酸化に対する AX の効果

UVB 80mJ/cm² 照射直後に AX(1~8μM)を HaCaT 細胞に添加し、照射から 0.5 時間後の MSK1(Thr581,Ser376/360)リン酸化を解析したところ、UVB で増強される MSK1(Thr581,Ser376/360)リン酸化は、すべて AX(4~8μM)照射後添加によって抑制された (Fig. 10)。

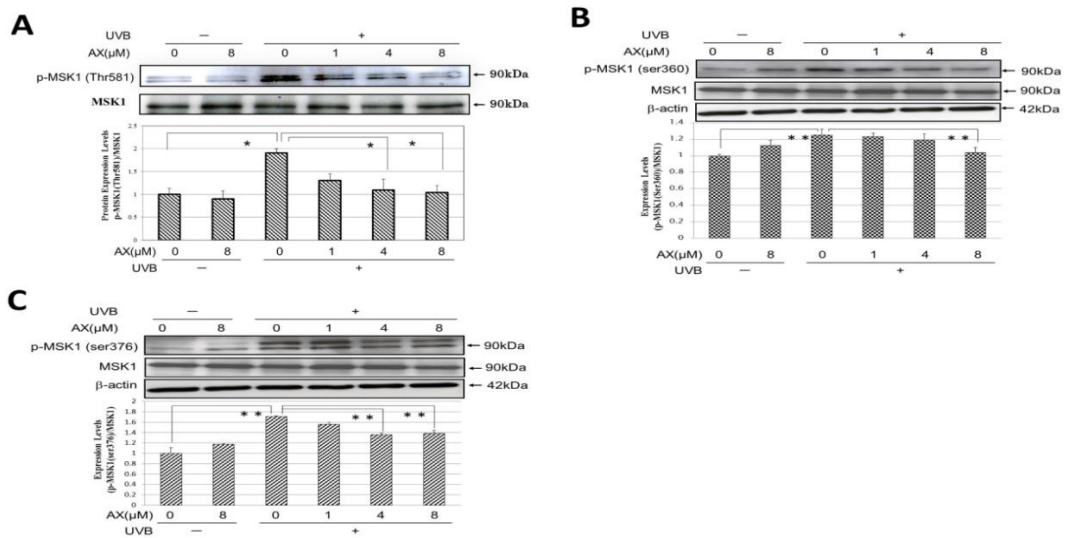


Fig 10. Effects of UVB irradiation on the Thr581/Ser360/Ser376 phosphorylation of MSK1 and the inhibitory effect of AX. (A) Thr581 phosphorylation of MSK1 in HPKs at 0.5 h post-irradiation. (B), (C) Ser360/ Ser376 phosphorylation of MSK1 in human HaCaT keratinocytes at 0.5 h post-irradiation. HPKs or human HaCaT keratinocytes were exposed to UVB irradiation at a dose of 80 mJ/cm² immediately after which the cells were treated with AX at the indicated concentrations. Lysates were harvested at 30 min after UVB irradiation and were immunoblotted with antibodies to Thr581/Ser376/360 phosphorylated MSK1. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means ± S.D. from 3 independent experiments. *: p<0.05, **: p<0.01.

第9項 UVB 誘導 CREB のリン酸化に対する AX の効果

UVB 80mJ/cm² 照射直後に AX(4~8μM)を HaCaT に添加し、照射から 0.5~3 時間後の CREB(Ser133)リン酸化を解析したところ、UVB で増強される CREB(Ser133)リン酸化は、AX(4~8μM)照射後添加によって抑制された (Fig. 11)。

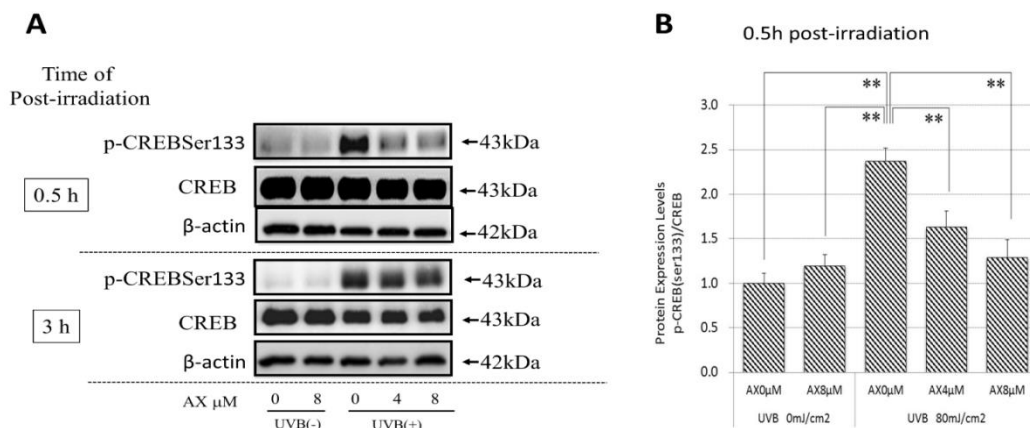


Fig 11. Effects of AX on the Ser133 phosphorylation of CREB in UVB-exposed human HaCaT keratinocytes at 0.5 and 3 h min post-irradiation. (A) Western blotting for the phosphorylation of CREB Ser133. (B) Densitometric analysis for Ser133 phosphorylation of CREB at 0.5 h post-irradiation. Human HaCaT keratinocytes were exposed to UVB irradiation at a dose of 80 mJ/cm² immediately after which they were treated with AX at the indicated concentrations. Lysates were harvested at 0.5 and 3 h after UVB irradiation and were immunoblotted with antibodies to phosphorylated or non-phosphorylated CREB. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means ± S.D. from 3 independent experiments. **: p<0.01.

第10項 MSK1 阻害剤を用いた UVB 誘導 NF- κ B/CREB のリン酸化及び TGase1/COX2 タンパク発現への影響

UVB 80mJ/cm² 照射直後に MSK1 の阻害剤である H89(0.05~0.5 μ M)を HPK に添加し、照射から 0.5 時間後の NF- κ B(Ser276)及び CREB(Ser133)リン酸化と、照射から 48 時間後の TGase1 及び COX2 タンパク発現を解析したところ、UVB で増強される NF- κ B(Ser276)及び CREB(Ser133)リン酸化は H89(0.05~0.5 μ M)によって抑制され (Fig. 12-A)、TGase1 及び COX2 タンパク発現も H89(0.1~0.5 μ M)照射後添加によって抑制された(Fig. 12-B)。

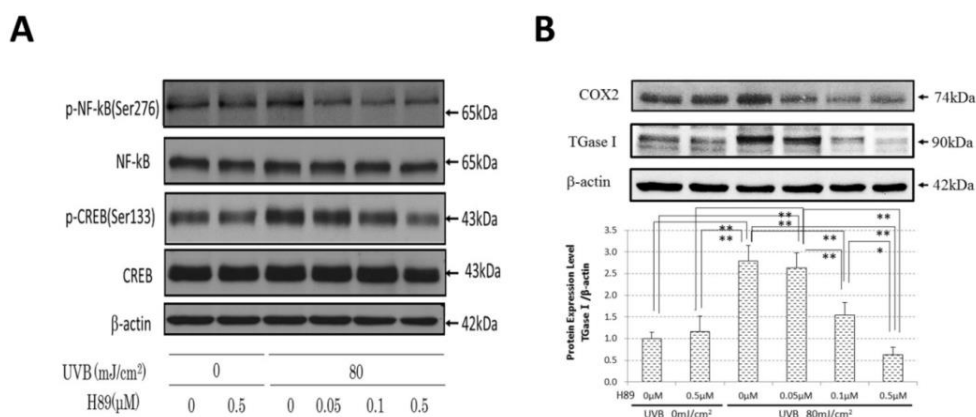


Fig 12. Effects of the MSK1 inhibitor H89 on the increased phosphorylation of NF κ Bp65Ser276 and CREBSer133 as well as on the protein expression of TGase 1 and COX-2 in UVB-exposed human keratinocytes. (A) Effects on the phosphorylation of NF κ Bp65Ser276 and CREBSer133. (B) Effects on the protein expression of TGase 1 and COX-2. HPKs were incubated with H89 at the indicated concentrations immediately after UVB radiation at a dose of 80 mJ/cm² and were subsequently cultured for 0.5 h for the phosphorylation analysis or 48 h for the protein expression analysis prior to Western blotting. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means \pm S.D. derived from 3 independent experiments. ** p < 0.01, * p < 0.05.

第11項 MSK1 siRNA を用いた UVB 誘導 TGase1 タンパク発現への影響

HPK に MSK1 siRNA を導入し、UVB 80mJ/cm² 照射 48 時間後の TGase1 タンパク発現を解析したところ、UVB によって増強される TGase1 タンパク発現は MSK1 siRNA により顕著に抑制された(Fig. 13)。

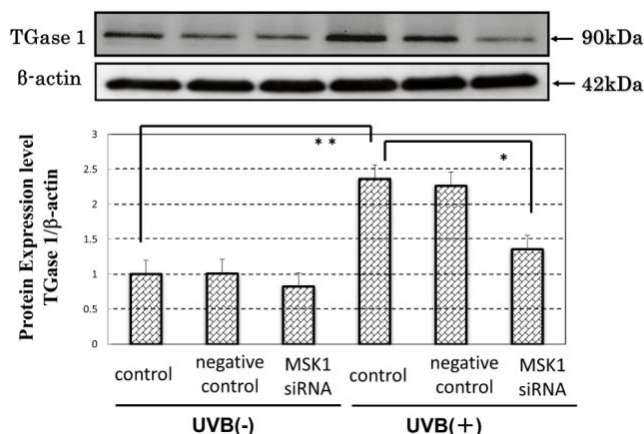


Fig 13. Effects of silencing of MSK1 mRNA on the UVB-stimulated expression of TGase 1 protein. HPKs were transfected with a pre-designed siRNA against MSK1 to down-regulate MSK1 along with a negative control siRNA. Twenty-four h after transfection, HPKs were exposed to UVB irradiation at a dose of 80 mJ/cm² and were cultured for 48 h after which whole cell lysates were prepared for Western blot analysis using antibodies to TGase 1 and β -actin. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown; values are means \pm S.D. derived from 3 independent experiments. *: p < 0.05; **: p < 0.01.

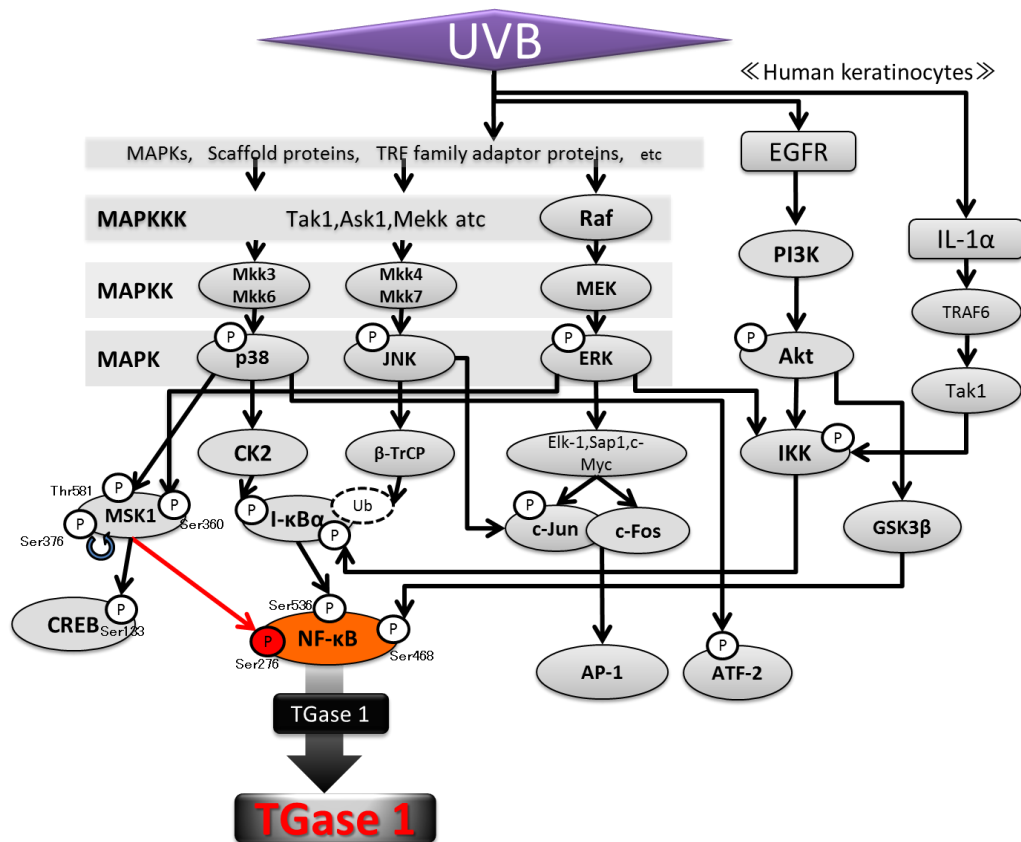
第4節 考察

本研究で初めて UVB 曝露によって HPK の TGase1 遺伝子発現及びタンパク発現が増強されることを明らかにした(Fig. 1)。この結果は UVB 曝露により生じる角化亢進や皮膚の落屑が TGase1 発現増強により引き起こされる可能性を示唆している。また本研究では UVB で惹起される細胞内シグナル伝達経路において、ストレスシグナル上流部 MAPK(p38/ERK/JNK)の活性化(リン酸化)は照射 15 分後をピークとし(Fig. 4)、その下流にあると考えられる NF- κ B, IKK, CK-2/I- κ B α , AP-1(c-Fos/c-Jun), ATF-2, MSK1 が活性化(リン酸化)することを明らかにした(Fig. 6,7,8,9,10)。UVB 誘導 TGase1 発現に関わるシグナルを特定するために使用した p38/ERK/JNK の各阻害剤は UVB 誘導の TGase1 発現を抑制し(Fig. 2)、これら MAPK が TGase1 発現に関与していることを示した。UVB 曝露ケラチノサイトにおいて、IL-1 α 分泌のオートクライン作用あるいは p38 や ERK の活性を上流とし、IKK の活性化及び I κ B のリン酸化による NF- κ B 核移行といった NF- κ B シグナル伝達経路の活性化¹²³⁾メカニズムはよく知られているため、NF- κ B 核移行阻害剤である JSH-23 を使用し UVB 誘導 TGase1 発現への影響を評価した。JSH-23 添加により UVB 誘導 TGase1 発現はベースラインにまで抑制されたことから、TGase1 の発現は NF- κ B の活性が必須であることが推察された。さらに UVB 誘導 TGase1 発現のシグナル伝達経路を絞り込むため、AX の特異効果を利用することにした。第 2 章で述べたとおり、AX は UVB 照射前添加と照射後添加でシグナルに対する作用点が違う¹²⁴⁾。本研究では UVB 照射後 AX 添加によるシグナル分子への影響をさらに広範囲に調べ、UVB で増強される TGase1 発現のシグナル伝達経路を特定した。まず UVB 誘導 TGase1 発現増強は、UVB 照射前 AX 添加及び照射後 AX 添加の両方で抑制されることを確認した(Fig. 3)。UVB 照射後 AX 添加において、UVB 誘導の JNK/cJun のリン酸化及び cFos タンパク発現は抑制されず(Fig. 5,6)、また p38/ATF2 のリン酸化も同様に AX では抑制されなかったため(Fig. 7)、UVB 誘導 TGase1 は cJun/cFos の複合体からなる AP1 系統および ATF2 系統ではなく、NF- κ B が転写因子となって発現することが示唆された。ケラチノサイトにおける TGase1 発現は AP1 により調整されているとされていたが¹²⁵⁾¹²⁶⁾¹²⁷⁾¹²⁸⁾、ここで初めてケラチノサイトの TGase1 発現において NF- κ B シグナル経路が関与していることを明らかにした。

UVB 照射後 AX 添加による UVB 誘導 TGase1 発現の抑制効果について、その作用点の特定を行った。p38/CK2/I- κ B/NF- κ B のシグナル経路において、UVB 誘導のリン酸化による CK2 上方シフトや I- κ B タンパク分解に対し AX は影響しなかった(Fig. 8)。NF- κ B の活性に関わる 3 つのリン酸化部位(Ser276/536/486)に対し、UVB で増強されるリン酸化を AX 添加により抑制できたのは唯一 NF- κ B(Ser276)だけであった(Fig. 9)。Ser536 は NF- κ B 核移行に関わるリン酸化部位であり、AX は p38/CK2/I- κ B/NF- κ B(Ser536)や ERK/IKK/I- κ B/NF- κ B(Ser536)の経路を抑制せず、機能は不明だが Ser468 における PI3K/Akt/GSK3/NF- κ B(Ser468)の経路¹²⁹⁾も抑制しないことが示めされた。Ser276 は NF- κ B の DNA 結合活性に関わる部位で、核移行後 MSK1 によりリン酸化される¹³⁰⁾¹³¹⁾¹³²⁾¹³³⁾。このため MSK1 活性に関わる 3 つのリン酸化部位、Thr581, Ser376/360 における AX の効果を評価した結果、UVB で誘導される MSK1 Thr581, Ser376/360 のリン酸化増強は、UVB 照射後 AX 添加で抑制されることが明らかとなった(Fig. 10)。MSK1 は p38 による Thr581 のリン酸化をはじめとし、

その後 ERK による Ser360 のリン酸化や自己リン酸化部位である Ser376 がリン酸化されることによって活性化する¹³⁴⁾¹³⁵⁾¹³⁶⁾。活性化した MSK1 は核内で NF- κ B Ser276 及び CREB Ser133 をリン酸化することから、MSK1 活性化への AX の抑制効果が CREB 活性化の抑制に連動していることを確認するため、UVB 照射後 AX 添加による CREB のリン酸化への影響を評価した。その結果、UVB で誘導される CREB Ser133 のリン酸化を AX 添加により抑制されることが確認された(Fig. 11)。これらの結果より、UVB 照射後 AX 添加による MSK1 のリン酸化阻害を基軸とし、NF- κ B Ser276 のリン酸化が抑制され TGase1 発現が抑制されることが推察されたため、MSK1 の阻害剤である H89 添加及び MSK1 siRNA 導入により UVB 誘導の TGase1 発現が抑制されるか評価した。UVB 照射後 H89 添加により NF- κ B Ser276 及び CREB Ser133 のリン酸化が抑制されるとともに、TGase1 タンパク発現が抑制されることが確認され (Fig. 12)、NF- κ B シグナル経路で発現する代表的なタンパク COX2 の発現も H89 で同様に抑制されたこと(Fig. 12)は MSK1 による NF- κ B Ser276 リン酸化が NF- κ B 活性に必須であることを示唆している。また MSK1 siRNA 導入により UVB 誘導の TGase1 が有意に抑制されることも確認された(Fig. 13)。

以上の結果から下図に示す通り、ヒトケラチノサイトにおける UVB 照射による TGase1 発現増強は NF- κ B 転写因子とし、MSK1 による NF- κ B Ser276 のリン酸化を必須としていることが示唆された。



UVB 誘導 TGase1 発現のシグナル伝達経路

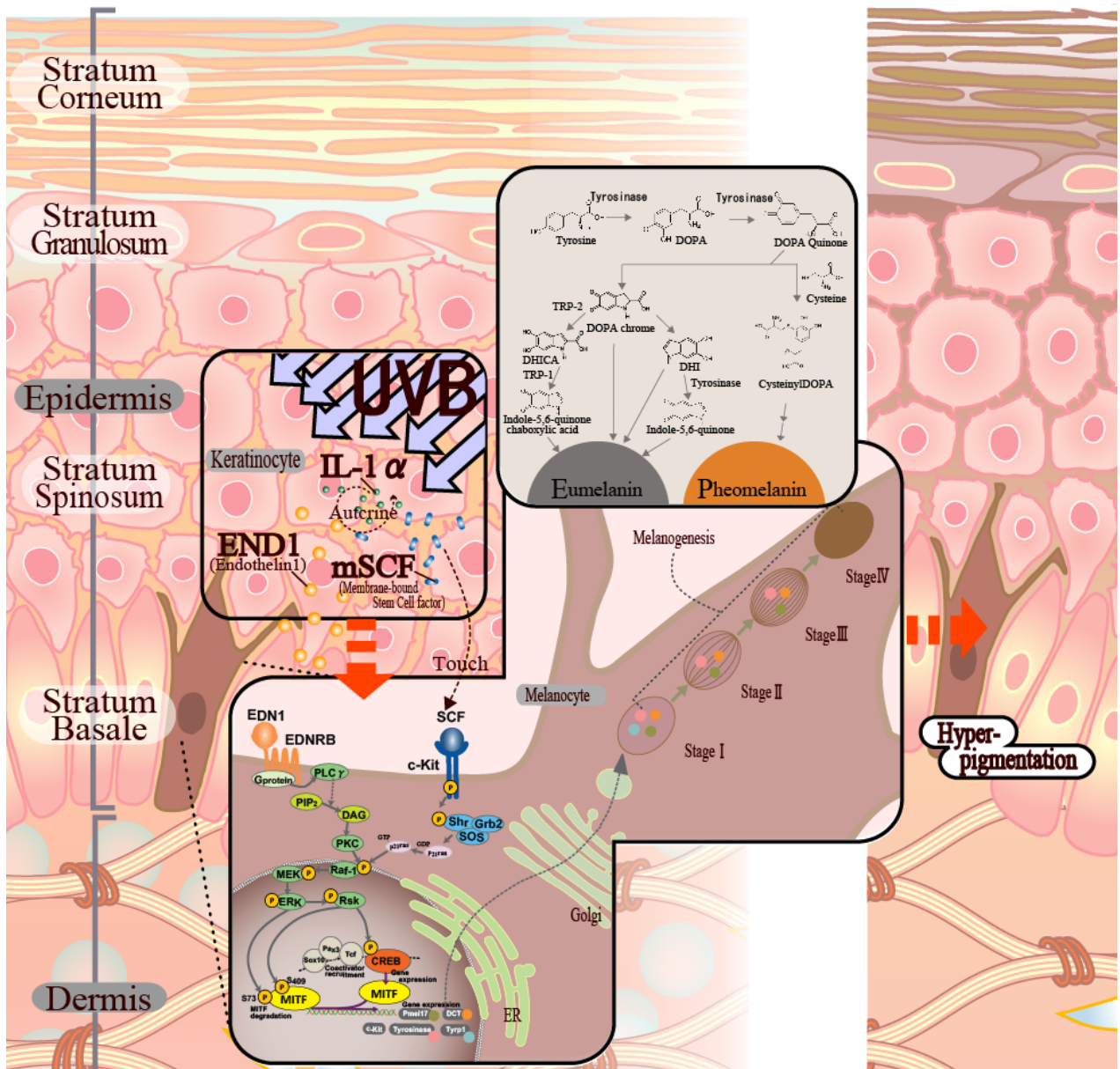
第4章 HMにおけるSCF誘導色素沈着に対するWFAの効果とその作用メカニズム

第1節 研究の目的

UVBは皮膚障害を引き起こす有害な外的因子の一つであり、その主たる障害には炎症や色素沈着が挙げられる。UVBの曝露を受けた皮膚では、まず表皮に存在するケラチノサイトがその刺激を受け、炎症性サイトカインであるIL-1 α を分泌し、そのオートクライン作用によりEND1やSCFなどのサイトカインが産生される。ケラチノサイトで発現された膜結合型SCF及び分泌されたEND1は、近隣に存在するメラノサイトの各々の受容体c-Kit及びEDNRBと結合し、各経路のシグナル分子の活性化を通してメラニンの合成が促進される。メラニン産生に関わるマスター転写因子であるMITFはチロシナーゼ(TYR)、TRP1、TRP2、DCT、Pmel17などのメラニン合成関連タンパクを発現し、メラニン合成の場であるメラノソーム内でチロシンを基質としメラニン合成が開始される。メラノソームは4つのステージで成熟しながらメラノサイトの樹枝状突起先端部に移動し、最終目的地であるケラチノサイトに受け渡される。受け渡されたメラノソーム(メラニン顆粒)はケラチノサイトの核の上部を覆う(核帽子と呼ばれる)ようにして紫外線から核を保護すると同時に、皮膚の色素沈着として認識されるようになる。

色素沈着抑制剤いわゆる美白剤の多くは、チロシナーゼ活性を直接阻害したり、チロシナーゼタンパクを分解することでチロシナーゼ活性を低下させるタイプやメラノサイトからケラチノサイトへのメラニン顆粒の受け渡しを阻害(PAR2受容体の不活性化)するタイプなどが挙げられる。このような抑制メカニズムで色素沈着を抑制した場合、この色素形成メカニズムは正常な皮膚の色に維持にも寄与しているため、正常な皮膚色までも抜け落ち、いわゆる白斑を引き起こすおそれがある。美白剤に求められる効果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などの刺激を受け過剰に産生されるメラニンをベースラインまで抑え、行き過ぎないことが望ましい。この条件を満たす美白剤のデザインは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であると考えられる。

我々はこの観点から美白剤になりうる素材を探し、アシュワガンダ(学名 *Withania somnifera*)といわれる植物の抽出液を見出した。アシュワガンダエキスはEND1及びSCFで誘導されるメラニン産生に対し、シグナル上流部であるPKCあるいはMEKを抑制することでメラニン産生を阻害することが判明している⁵⁰⁾⁸⁴⁾⁸⁵⁾¹³⁷⁾。また本エキスはチロシナーゼ直接阻害作用及び細胞毒性は持たないことを確認している。本研究ではアシュワガンダエキスの活性成分の一つであるWFAを用い、SCF誘導のメラニン産生に対する阻害効果を評価し、そのメカニズムを解明することを目的とした。



UVB 誘導色素沈着のメカニズム

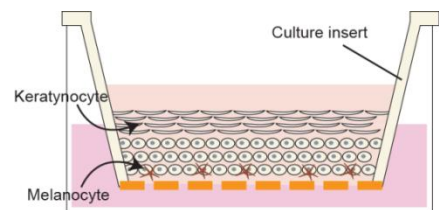
第2節 実験材料及び方法

第1項 細胞培養

正常ヒトメラノサイト(Human Epidermal melanocyte:HM, KURABO 社製)は Medium254 (GIBCO 社製)に HMGS(Human Melanocyte Growth Supplement) (GIBCO 社製)を加えた培地にて培養した。

第2項 3次元培養表皮モデル(HEE)培養方法

新生児包皮由来ケラチノサイトと新生児包皮由来メラノサイトを細胞比 10 : 1 で共培養し重層化された LabCyte MELANO-MODEL(ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング社製)を使用した。HEE は D-MEM(0.5 lg/ml hydrocortisone, 5 ng/ml epidermal growth factor (EGF)を含む)で 14 日間培養した。



第3項 WFA 含有培地調製

WFA(SIGMA ALDRICH 社製)を DMSO(Wako 社製)に溶解させ 50 μ M に調製し、無血清培地に 1000 倍希釈で加え、50nM WFA 含有無血清培地を調製した。

第4項 チロシナーゼ活性測定

チロシナーゼ活性測定は MBTH 法(Winder A. et al., 1991, Eur.J. Biochem. 198:317-326)を改変し下記方法で行った。Lysis Buffer(0.5% sodium deoxycholate, 0.5% TritonX-100, 1mM PMSF)で細胞を回収し、その細胞ライセート 20 μ L と 100 μ L Assay buffer(100mM sodium phosphate buffer(pH7.1)、4%N-N-dimethyl formamide)及び 50 μ L 5mM L-DOPA、50 μ L 20.7mM MBTH を混合し、37°C 30 分間インキュベート後、505nm の吸光度で測定した。

第5項 ユーメラニン定量法

PTCA をユーメラニンの指標する HPLC 法(Ito S. et al., Anal Biochem. 1985 Feb 1;144(2):527-36.参照)で定量を行った。

第6項 ウェスタンブロット解析法

細胞ライセートを BCA 法(BCA Protein Assay Kit/Pierce 社製使用)によりタンパク定量し一定濃度に調製した後、Sample buffer 混合後 95°C 5 分加熱処理しこれをサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE により分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、下記 1 次抗体(Can get signal solution1/TOYOBO 製で希釈)と反応させ洗浄後、下記 HRP 標識の 2 次抗体(Can get signal solution2/TOYOBO 製で希釈)と反応させた。バンドの検出には ECL 及び ECL

plus(GE ヘルスケア社製)を用い、X線フィルム(Hyperfilm ECL/GE ヘルスケア社)と現像機(MAX RHEIN MR-SE-2S/ニックス社製)を使用した。

1次抗体名	メーカー
Phospho-c-Kit	abcam
c-kit	abcam
CREB antibody	Cell signaling Technology
Phospho-ser133 CREB	Cell signaling Technology
ERK	Cell signaling Technology
Phospho-ERK(p-p44/42MAPK)	Cell signaling Technology
MITF	Dr.D.E.Fisher(Harvard Medical School)から供与
PMEL17(α PEP13)	Dr.Hearing(NIH)から供与
TYR	Invitrogen
TYRP1	Invitrogen
DCT	SantaCruz
β -actin	SIGMA ALDRICH
p38 MAPK Antibody	Cell signaling Technology
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell signaling Technology
MEK1/2 Antibody	Cell signaling Technology
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9) Rabbit mAb	Cell signaling Technology
Phospho-c-Raf (Ser338)	Cell signaling Technology
c-Raf	Cell signaling Technology
Shc Antibody	Cell signaling Technology
Phospho-Shc (Tyr239/240)	Cell signaling Technology

2次抗体名	希釈倍率	メーカー	型番
Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey	1/10000	GE ヘルスケア	NA934-1ML
Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep	1/10000	GE ヘルスケア	NA931-1ML

第7項 リアルタイム RT-PCR 法

Total RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen 社製)を用い、cDNA 合成には Rever Tra Ace qPCR RT kit(TOYOBIO 社製)を用いた。下記配列の PCR プライマーと Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社製)を使用しリアルタイム RT-PCR をした。

	Forward	Reverse
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	5'-AGTCCTTCCACGATAACCAAAGTTG-3'
TYR	5'-CCTCAAAGCATGCACAAT-3'	5'-GACGACCAGCAAGCTCACAAG-3'
MITF	5'-TCCGTCTCTCACTGGATGGTG-3'	5'-CGTGAATGTGTGTTTCATGCCTGG-3'
TYRP1	5'-TCATCTATTCTGAATGGAACAGG-3'	5'-AATGAGTGCAACCAGTAACAAAGC-3'
DCT	5'-TCCGCTAGCCATGGGCTTGTGGGATGGGG-3'	5'-ACCGTCGACTGGTAGGCTTCCTCCGTGTAT-3'

PMEL17	5'-TCTGGGCTGAGCATTGGG-3'	5'-AGACAGTCACTTCCATGGTGTGTG-3'
c-KIT	5'-GCTGAGCTTTTCTTACCAGGTGG-3'	5'-TATGTCATACATTCAGCAGGTGC-3'

第8項 統計処理

統計解析は JSTAT により実施した。一対比較の場合は Student's t-test または Welch's t-test、多重比較の場合は Tukey's test または Dunnett's test で解析し、P 値 0.05 未満を統計的に有意とした。

第3節 実験結果

第1項 HEE における SCF 誘導色素沈着への WFA の効果

SCF(5nM)刺激下の HEE では 14 日間培養で色素沈着が目視レベルで明瞭に確認でき、WFA(50 nM)添加によりこの色素沈着形成は顕著に抑えられた(Fig. 1-a)。HEE の切片を HE 染色(表皮組織染色)及び FM 染色(メラニン顆粒染色)したところ、WFA による表皮組織の変性は見られず、WFA 無添加と比較しメラニン顆粒量の減少が認められた(Fig. 1-b)。また HPLC を用いてユーメラニン量を測定した結果、SCF(5nM)刺激により増加したユーメラニン量は WFA(50 nM)添加によって有意に抑制され(Fig. 1-c)、MTT assay の結果では WFA(50 nM)添加による細胞生存率への影響は認められなかった(Fig. 1-d)。

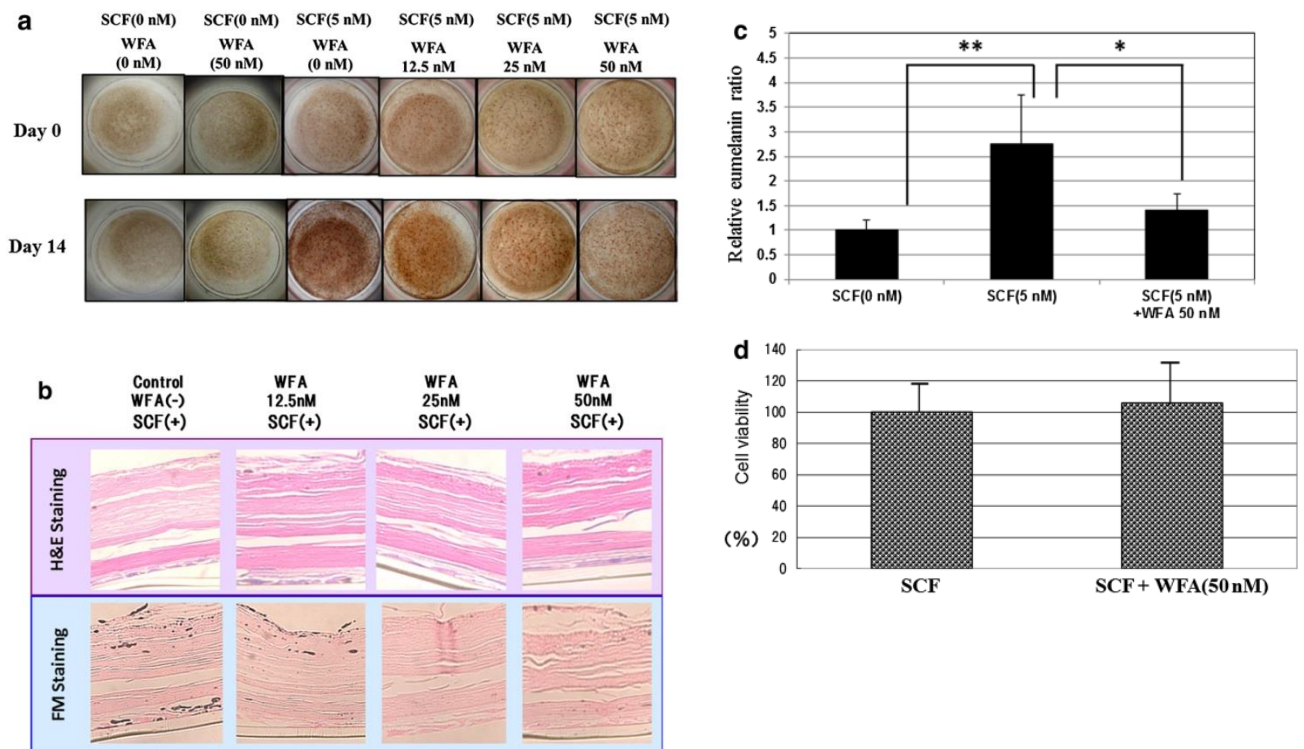


Fig. 1

Inhibitory effects of WFA on the SCF-stimulated pigmentation of HEEs. a Visible pigmentation, b H&E and FM staining at days 0 and 14, c Eumelanin content (PTCA) of HEEs at day 14. d MTT assay at day 14. a HEEs were cultured at 37°C for 14 days in DMEM supplemented with 0 or 5 nM SCF and with or without WFA at concentrations of 12.5, 25 and 50 nM. The media containing PBS (as a control), SCF (at 0 nM) +WFA (at 50 nM), SCF(at 5 nM) and SCF (at 5 nM)+ WFA (at 12.5, 25 and 50 nM) were exchanged every 2 days. b H&E and FM staining of HEEs were performed using paraffin sections at day 14. c Chemical degradation and analysis of eumelanin were performed using homogenates of HEEs (treated with WFA at 50 nM) at day 14 and was quantitated as described in the ‘‘Materials and methods’’. Eumelanin content is expressed as ng PTCA/mg tissue. d HEEs were cultured for 14 days in DMEM supplemented with 5 nM SCF in the presence or absence of WFA at 50 nM after which cell viability was evaluated for the last 24 h using the MTT assay. Cell viability is expressed as % cell viability. Values are mean \pm SD derived from three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 vs Control SCF- or SCF+ at day 14

第2項 HEE における SCF 誘導メラニン合成関連遺伝子発現への WFA の効果

WFA による色素沈着抑制の作用機序を明らかにするため、リアルタイム RT-PCR によりメラニン合成関連遺伝子の発現に対する WFA の効果を評価した。SCF(5nM)刺激下 HEE でのメラニン合成関連遺伝子(MITF、TYR、TYRP1、DCT、PMEL17、c-Kit)の発現ピーク 7 日目⁸¹⁾⁸²⁾において、SCF(5nM)誘導の各遺伝子発現増強は WFA(50 nM)添加によって有意な抑制が認められた(Fig. 2-a,b,c,d,e,f)

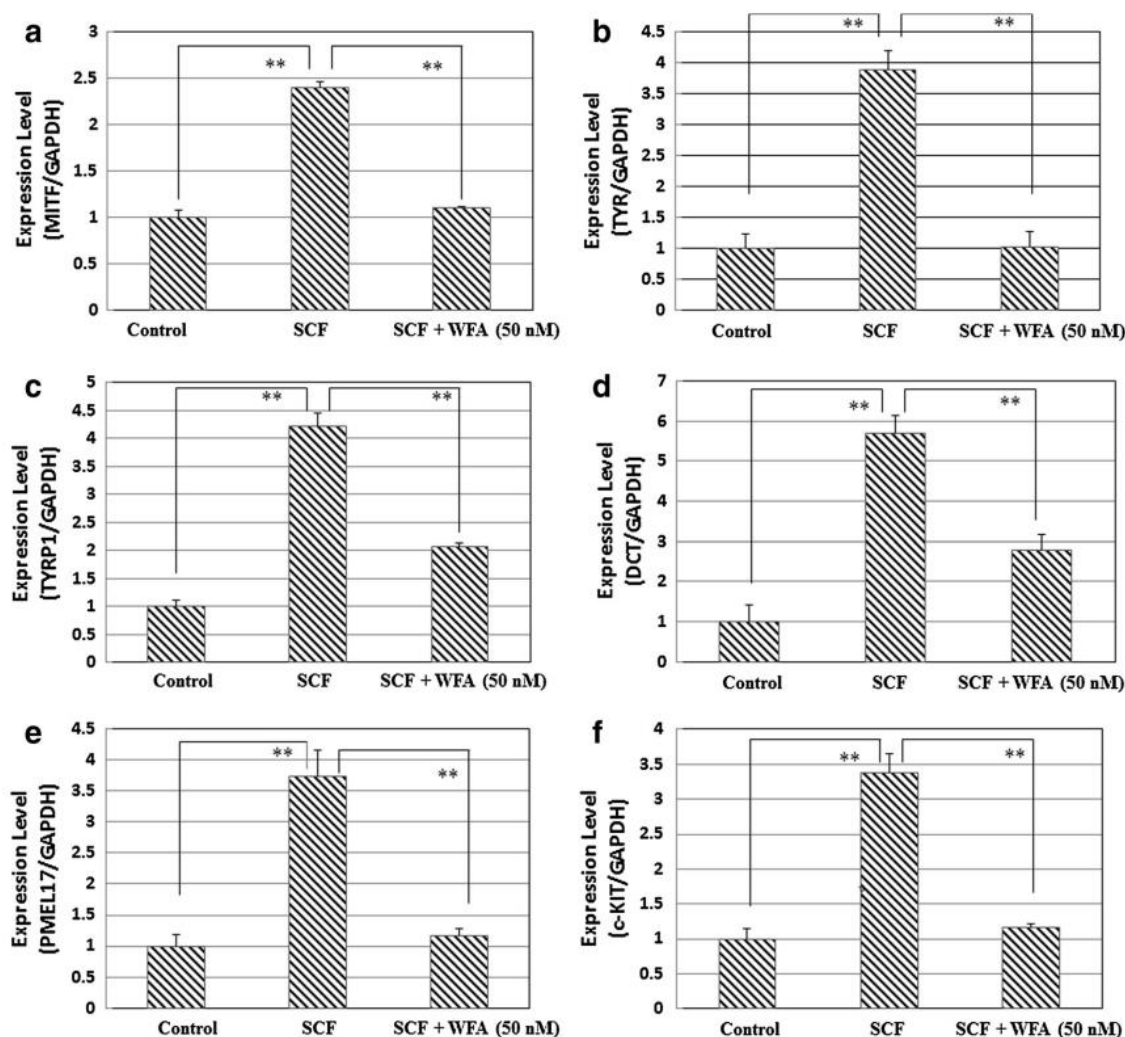


Fig. 2

Abrogating effects of WFA on the SCF-stimulated levels of melanocyte-specific mRNAs of HEEs. WFA was added at 50 nM to HEEs 24 h prior to the SCF stimulation. The media containing SCF and WFA were exchanged every 2 days. HEEs at day 7 of treatment were subjected to real-time RT-PCR. Results were normalized to GAPDH. Values are mean \pm SD derived from three independent experiments. Control: 0 nM SCF at day 7, SCF: 5 nM SCF at day 7, SCF + WFA: 5 nM SCF+50 nM WFA at day 7, ** $p < 0.01$ vs. SCF or Control, a MITF, b TYR, c TYRP1, d DCT, e PMEL17, f c-KIT

第3項 HEE における SCF 誘導メラニン合成関連タンパク発現への WFA の効果

Western Blotting によりメラニン合成関連タンパク発現に対する WFA の効果を評価した。SCF(5nM)刺激下 HEE でのメラニン合成関連タンパク (MITF、TYR、TYRP1、DCT、PMEL17、c-Kit) の発現ピーク 10 日目において、SCF(5nM)誘導の各タンパク発現増強は WFA(50 nM) 添加によって有意な抑制が認められた (Fig. 3)。SCF(5nM)誘導の MITF、TYR、TYRP1、DCT、c-Kit のタンパク発現増強に対し、WFA12.5~50 nM の濃度依存的な抑制が認められ (Fig. 4-a,b,c,d,f)、PMEL17 は WFA 12.5nM 以上で抑制が顕著に認められた (Fig. 4-e)。

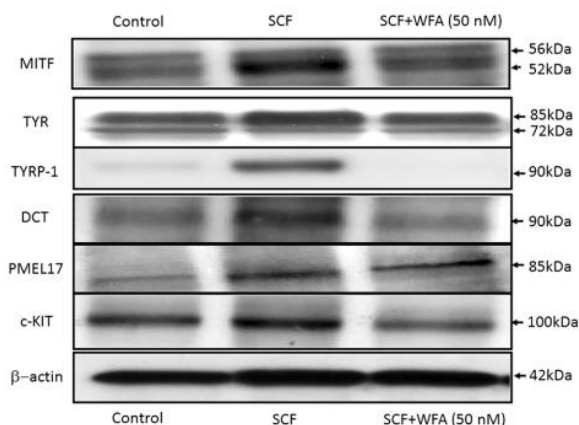


Fig. 3 Abrogating effects of WFA on the SCF-stimulated levels of melanocyte-specific proteins of HEEs at 50 nM. WFA was added at the indicated concentration to HEEs 24 h prior to the SCF stimulation. The media containing SCF and WFA were exchanged every 2 days. HEEs at day 10 of treatment were subjected to Western blotting. Representative immunoblots from three independent experiments are shown. Protein expression levels were measured in Control, 5 nM SCF and 5 nM SCF + 50 nM WFA-treated HEEs at day 10

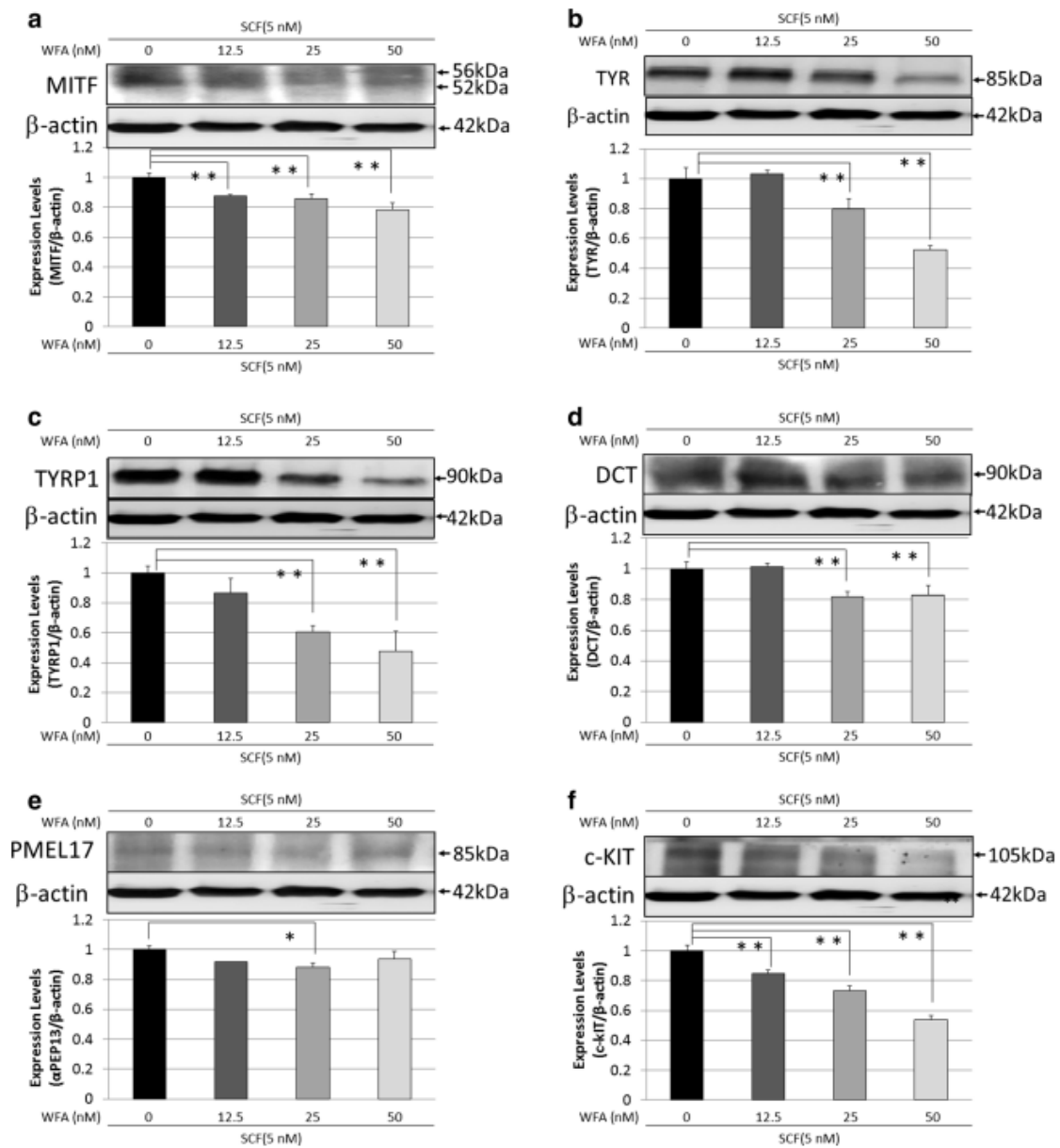


Fig. 4 Abrogating effects of WFA on the SCF-stimulated levels of melanocyte-specific proteins of HEEs at different concentrations. WFA was added at the indicated concentration to HEEs 24 h prior to the SCF stimulation. The media containing SCF and WFA were exchanged every 2 days. HEEs at day 10 of treatment were subjected to Western blotting. Protein expression levels in 5 nM SCF and 5 nM SCF + WFA (12.5, 25 and 50 nM) at day 10. Representative immunoblots from three independent experiments are shown. Values are mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. a MITF, b TYR, c TYRP1, d DCT, e PMEL17, f c-KIT

第4項 HM における細胞生存率への WFA の効果

HM を WFA(50 nM)で 3 時間プレインキュベーションし、SCF(5nM)添加 72 時間培養後、MTT assay にて細胞生存率への影響を評価したところ、SCF(5nM) 刺激の有無にかかわらず WFA 添加による細胞生存率及び細胞形状変化への影響は認められなかった (Fig. 5-a,b)。

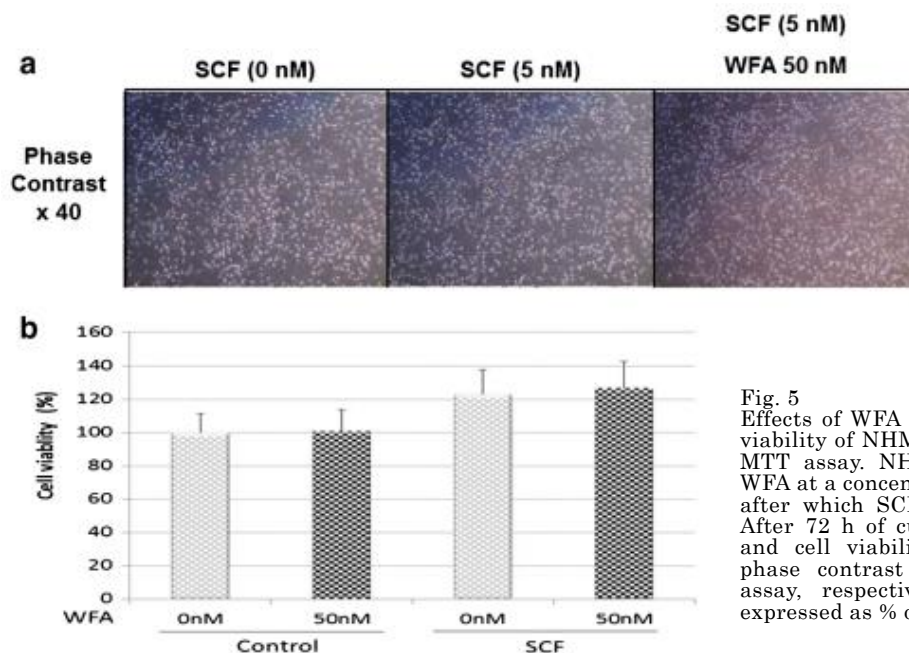


Fig. 5 Effects of WFA on the morphology and viability of NHMs. a Cell morphology, b MTT assay. NHMs were treated with WFA at a concentration of 50 nM for 3 h after which SCF was added at 5 nM. After 72 h of culture, cell morphology and cell viability were evaluated by phase contrast microscopy and MTT assay, respectively. Cell viability is expressed as % of cell viability

第5項 HM における SCF 誘導チロシナーゼ活性への WFA の効果

HM を WFA(50 nM)で 3 時間プレインキュベーションし、SCF(5nM)添加 72 時間培養後のチロシナーゼ活性を測定した結果、SCF 誘導のチロシナーゼ活性亢進を WFA 添加により有意に抑制した(Fig. 6-a)。また HM の細胞 Lysate における SCF 誘導のチロシナーゼ活性亢進に対して WFA 添加によるその抑制は認められなかったため(Fig. 6-b)、WFA はチロシナーゼ直接阻害作用を有しないことが確認された。

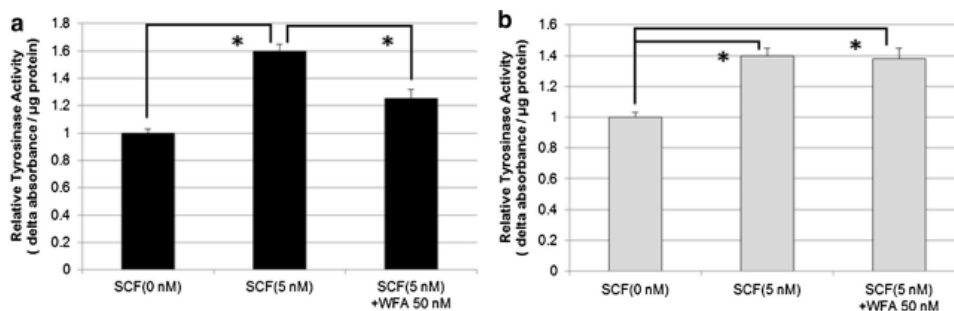


Fig. 6 Effects of WFA on TYR activity in SCF-treated NHMs a NHMs were cultured in the presence of WFA at a concentration of 50 nM for 3 h, then were treated with SCF (5 nM) and maintained in culture for 72 h, after which cell lysates were prepared for the measurement of TYR activity. b NHMs were cultured in the absence of WFA for 72 h after SCF stimulation after which the cell lysates were prepared and TYR activity was measured after adding WFA at a concentration of 50 nM. TYR activity was measured as delta absorbance (505 nm)/µg protein and is expressed as relative to the control (0 nM SCF). Values are mean \pm SD derived from three independent experiments. * $p < 0.05$

第6項 HM における SCF 誘導シグナル伝達経路への WFA の効果

WFA の色素沈着抑制効果は MITF 遺伝子発現以前の上流に作用点があることが考えられたため、SCF 誘導 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 の影響を Western Blotting にて評価した。HM を WFA(12.5、25、50 nM)で 3 時間プレインキュベーションし、SCF(5nM)添加から 15 分培養後の各因子のリン酸化を評価した結果、SCF 誘導の各シグナル分子及び転写因子のリン酸化増強を WFA(50 nM)添加によって有意に抑制することが確認された (Fig. 7-a,b,c,d,e,f,g)。

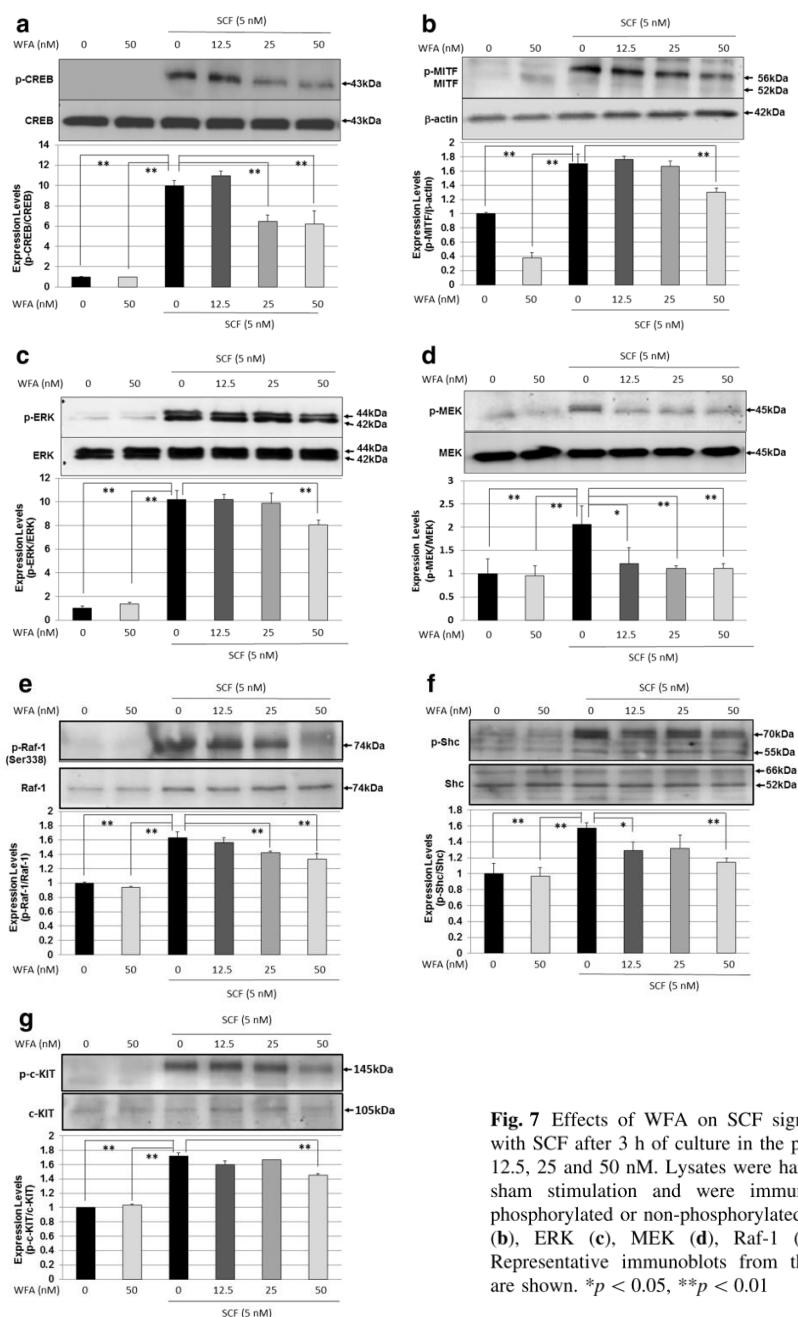


Fig. 7 Effects of WFA on SCF signaling NHMs were stimulated with SCF after 3 h of culture in the presence or absence of WFA at 12.5, 25 and 50 nM. Lysates were harvested at 15 min after SCF or sham stimulation and were immunoblotted with antibodies to phosphorylated or non-phosphorylated CREB (a), MITF and β -actin (b), ERK (c), MEK (d), Raf-1 (e), Shc (f) and c-KIT (g). Representative immunoblots from three independent experiments are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

第7項 HM における WFA の SCF 誘導シグナル分子活性抑制に対する DTT の効果

WFA は c-Kit の自己リン酸化部位である Tyr936 に対して、SCF で誘導されるこの部位のリン酸化増強を抑制すること明らかとなった(Fig. 7-g)。また WFA は SH 基を活性部位に持つプロテインキナーゼと結合し、その活性を制御する作用が知られおり¹³⁸⁾、本研究の場合も同様なメカニズムが働き c-Kit の自己リン酸化が抑制されているのかどうかを確認するため、Dithiothreitol(DTT)を用い検証した。HM を WFA(50 nM)及び DTT で 3 時間プレインキュベーションし、SCF(5nM)添加から 15 分培養後、c-Kit/CRBE/MITF のリン酸化を Western Blotting にて評価した。WFA(50 nM)により SCF 誘導 c-Kit/CRBE/MITF のリン酸化を抑制するのに対し、WFA(50 nM) +DTT 処理によってその抑制効果が消失されることが明らかとなった(Fig. 8)。

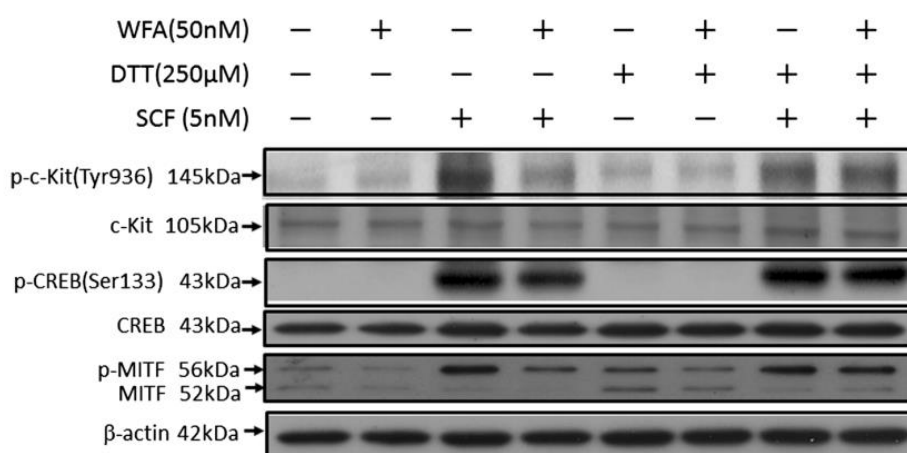


Fig. 8 DTT reverses the WFA-suppressed phosphorylation of c-KIT and the subsequent series of phosphorylations of signaling intermediates in SCF-treated NHMs. NHMs were co-treated with 250 µM DTT and 50 nM WFA for 1 h and were then treated with 5 nM SCF for 5 min. Lysates were harvested at 5 min after SCF or sham stimulation and were immunoblotted with antibodies to phosphorylated or non-phosphorylated c-KIT, CREB, MITF and β-actin. Representative immunoblots from three independent experiments are shown

第8項 HM における WFA の SCF/c-Kit 結合性への影響

WFA による SCF 誘導 c-KIT リン酸化の抑制効果は、SCF/c-Kit の結合性を阻害することに起因しているのかどうかを確認した。HM を 4°C 下で WFA(50 nM)+SCF(5nM)添加 2 時間培養後、4°C 下で新しい培地でリンスした後、37°C の培地を添加し 5 分/10 分/15 分培養後、c-Kit/ERK/CRBE/MITF のリン酸化を Western Blotting にて評価した。WFA 有無にかかわらず、どの時間帯においても SCF 添加により c-Kit/ERK/CRBE/MITF のリン酸化が誘導されたため、WFA は SCF/c-Kit 結合を阻害する作用を有しないことが示唆された(Fig. 9-a,b,c)。

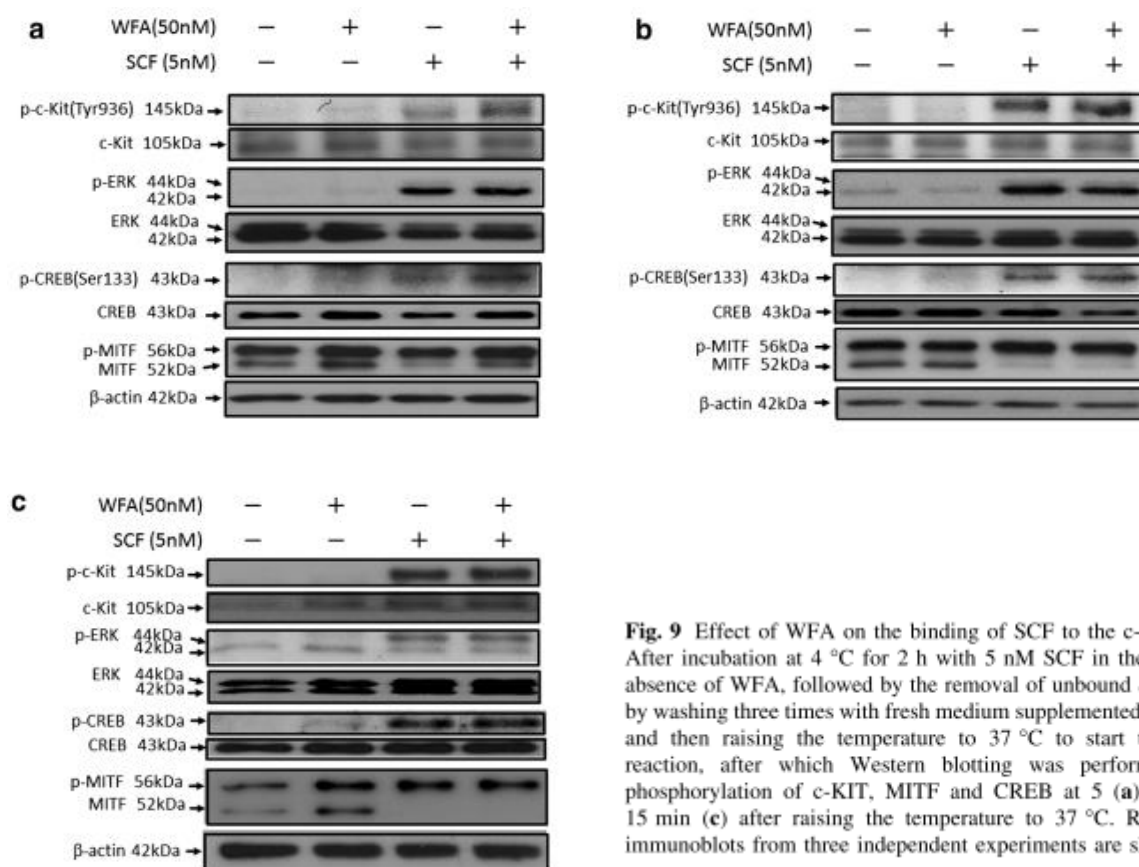
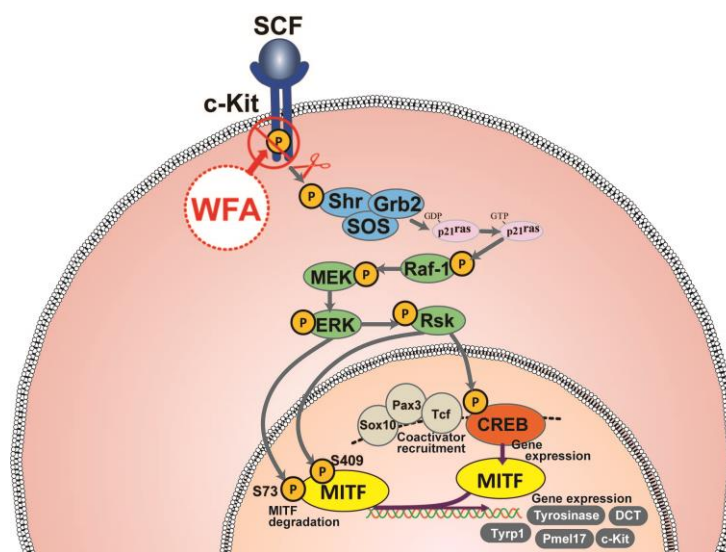


Fig. 9 Effect of WFA on the binding of SCF to the c-KIT receptor. After incubation at 4 °C for 2 h with 5 nM SCF in the presence or absence of WFA, followed by the removal of unbound SCF or WFA by washing three times with fresh medium supplemented by 1 % BSA and then raising the temperature to 37 °C to start the signaling reaction, after which Western blotting was performed for the phosphorylation of c-KIT, MITF and CREB at 5 (a), 10 (b) and 15 min (c) after raising the temperature to 37 °C. Representative immunoblots from three independent experiments are shown.

第4節 考察

本研究により 50nM という低濃度の WFA に SCF で誘導される HEE の色素沈着に対する抑制効果が認められた(Fig. 1-a)。このとき 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)の遺伝子発現(Fig. 2)、タンパク発現(Fig. 3,4)の抑制効果が認められたため、WFA の作用点は MITF 遺伝子発現以前の上流にあることが推察された。これを確認するため HM を用い、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。その結果、SCF 誘導の各シグナル分子及び転写因子のリン酸化増強を WFA(50 nM)は有意に抑制し(Fig. 7)、SCF 受容体である c-Kit Tyr936(自己リン酸化部位)のリン酸化に対する抑制効果も認められた。ここで WFA の SCF 誘導色素沈着抑制効果における作用点として 3 つの可能性が考えられた。①Phosphatase を活性化し、リン酸化を抑制している。②c-Kit の活性をダイレクトに抑制している。③SCF と c-Kit の結合を阻害している(アンタゴニストとして作用している)。①の可能性において、WFA は Phosphatase に影響しない、もしくは不活性化に影響しているとの報告があり¹³⁹⁾、除外できる。②の可能性において、活性部位に SH 基を有するプロテインキナーゼに対し、WFA はその SH 基と結合しキナーゼ活性を抑制することが報告されているため¹⁴⁷⁾¹⁴⁸⁾、受容体型チロシンキナーゼである c-Kit に SH 基の活性部位があり、そこに WFA が結合し c-Kit の活性を抑制していると仮定し、Dithiothreitol(DTT)を用い検証した。その結果、SCF 誘導の c-Kit リン酸化に対する WFA の抑制効果は DTT 処理により失効された。つまり SH 基を 2 つ有する DTT と WFA が結合し、c-Kit の活性を阻害できなくなった可能性が示された。③の可能性においては、シグナル伝達は一般に低温下でリガンドと受容体の結合は起きるが、シグナルの活性化は起きないという温度依存性特性を利用し、WFA が c-Kit のアンタゴニスト様作用を有するか検証した。4℃下で HM を WFA(50 nM) と SCF で 2 時間培養後、培地でリンスし、37℃下で培地を加え 5~15 分培養した結果、WFA 添加の有無にかかわらず c-Kit のリン酸化が誘導されたため、WFA は SCF と c-Kit の結合に対する阻害作用を有しないことが確認された。

以上のことから右図に示す通り SCF 誘導の色素沈着抑制効果に対する WFA の作用点は c-Kit 活性の阻害にあると考えられ、以降のシグナル伝達を抑制することでメラニン産生増強を抑制することが示唆された。また HEE 及び HM における WFA の細胞生存率への影響(Fig. 1-d,5)やチロシナーゼ直接阻害作用(Fig.6-b)は認められず、WFA は安全で有用性の高い美白剤になりうると考えられる。



SCF 誘導色素沈着に対する WFA の抑制作用機序

第5章 UVB 曝露 HPK-HM 共培養における色素沈着への AX 及び WFA の効果とその作用メカニズム

第1節 研究の目的

紫外線に晒された皮膚はまず炎症が起き、その後色素沈着が認められるようになる。皮膚の炎症は、ケラチノサイト内で紫外線により発生した ROS をトリガーとし数種類の炎症性サイトカインが分泌されることにより引き起こされる¹²⁸⁾。一方、皮膚の色素沈着では紫外線曝露したケラチノサイトから分泌される炎症性サイトカインをトリガーとし、そのあと産生されるメラニン産生誘導サイトカインによって引き起こされる。つまり紫外線誘導の色素沈着は、紫外線に曝露されたケラチノサイト同士による細胞間相互作用(オートクライン作用)の後、ケラチノサイトとメラノサイトとの異種細胞相互作用(パラクライン作用)により引き起こされる。UVB 誘導の色素沈着では、メラニン産生誘導サイトカインとして EDN1、SCF、 α MSH の関与が知られ^{8)11) 14) 20)140)}、UVA では GM-CSF¹⁴¹⁾がケラチノサイトから分泌されることにより引き起こされる。これらのサイトカインの中でも EDN1 及び SCF は UVB 誘導の色素沈着に最も影響しており、EDN1 と SCF は相乗的にメラノサイトの増殖及びメラニン産生を増強させる²²⁾。

本研究では UVB で誘導されるケラチノサイトからの液性因子とメラノサイトの相互作用についてセルインサート共培養系を用い解析するとともに、UVB 誘導メラニン産生増強に対する WFA 及び AX の効果とその作用メカニズムを解明することを目的とした。

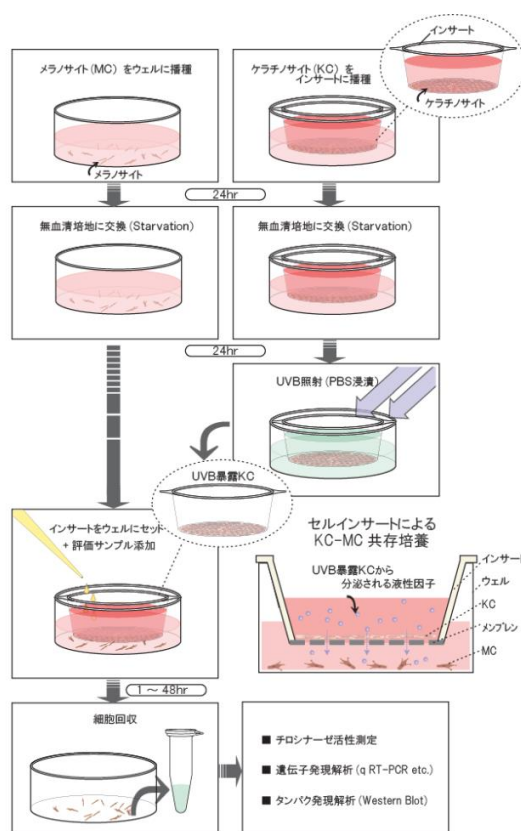
第2節 実験材料及び方法

第1項 細胞培養

正常ヒトケラチノサイト(Human primary keratinocyte:HPK,KURABO 社製)は Medium154S(GIBCO 社製)に HKGS(Human Keratinocyte Growth Supplement)(GIBCO 社製)を加えた培地にて培養した。正常ヒトメラノサイト(Human Epidermal melanocyte:HM, KURABO 社製)は Medium254 (GIBCO 社製)に HMGS(Human Melanocyte Growth Supplement) (GIBCO 社製)を加えた培地にて培養した。

第2項 セルインサートによる共培養

セルカルチャーインサート(BD Falcon 社製)のプレートに HM を、インサートに HPK を播種し各々別々に培養後、UVB 照射した HPK を HM が播種されているプレートにセッティングし共培養した。このとき、HPK から分泌される液性因子がインサート底部のメンブレンを透過することで HM に対する刺激を誘発させた。



第3項 AX 含有培地調製

AX(SIGMA ALDRICH 社製) と DMSO(Wako 社製) を混合し 8mM に調製した後、ヒートブロックで 80°C・約 20 分間加熱し、完全に溶解させた。無血清培地に 1000 倍希釈で加え 8 μ M AX 含有無血清培地を調製した。

第4項 WFA 含有培地調製

WFA(SIGMA ALDRICH 社製) を DMSO(Wako 社製) に溶解させ 50 μ M に調製し、無血清培地に 1000 倍希釈で加え、50nM WFA 含有無血清培地を調製した。

第5項 チロシナーゼ活性測定

チロシナーゼ活性測定は MBTH 法(Winder A. et al., 1991, Eur.J. Biochem. 198:317-326) を改変し下記方法で行った。Lysis Buffer(0.5% sodium deoxycholate,0.5% TritonX-100,1mM PMSF)で細胞を回収し、その細胞ライセート 20 μ L と 100 μ L Assay buffer(100mM sodium phosphate buffer(pH7.1) 、4%N-N-dimethyl formamide)及び 50 μ L 5mM L-DOPA、50 μ L 20.7mM MBTH を混合し、37°C 30 分間インキュベート後、505nm の吸光度で測定した。

第6項 サイトカイン定量法(ELISA 法)

回収した細胞上清から ELISA Kit : Interleukin(IL)-1a, IL-6, IL-8, GM-CSF , TNFa (ThermoFisher Scientific 社製)、 α MSH、END1 (免疫生物研究所社製)、PGE₂(Cayman Chemical 社製)を使用しプロトコールに従い定量した。

第7項 ウェスタンブロット解析法

細胞ライセートを BCA 法(BCA Protein Assay Kit/Pierce 社製使用)によりタンパク定量し一定濃度に調製した後、Sample buffer 混合後 95°C 5 分加熱処理しこれをサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE により分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、下記 1 次抗体(Can get signal solution1/TOYOBO 製で希釈)と反応させ洗浄後、下記 HRP 標識の 2 次抗体(Can get signal solution2/TOYOBO 製で希釈)と反応させた。バンドの検出には ECL 及び ECL plus(GE ヘルスケア社製)を用い、X 線フィルム(Hyperfilm ECL/GE ヘルスケア社)と現像機(MAX RHEIN MR-SE-2S/ニックス社製)を使用した。

1 次抗体名	メーカー
CREB antibody	Cell signaling Technology
Phospho-ser133 CREB	Cell signaling Technology
ERK	Cell signaling Technology
Phospho-ERK(p-p44/42MAPK)	Cell signaling Technology
MITF	Dr.D.E.Fisher(Harvard Medical School)から供与
β -actin	SIGMA ALDRICH
MEK1/2 Antibody	Cell signaling Technology
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9) Rabbit mAb	Cell signaling Technology
Phospho-c-Raf (Ser338)	Cell signaling Technology
c-Raf	Cell signaling Technology

2 次抗体名	希釈倍率	メーカー	型番
Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey	1/10000	GE ヘルスケア	NA934-1ML
Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep	1/10000	GE ヘルスケア	NA931-1ML

第8項 リアルタイム RT-PCR 法

Total RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen 社製) を用い、cDNA 合成には Rever Tra Ace qPCR RT kit(TOYOBO 社製)を用いた。下記配列の PCR プライマーと Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社製)を使用しリアルタイム RT-PCR をした。

	Forward	Reverse
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	5'-AGTCCTTCCACGATAACCAAAGTTG-3'
TYR	5'-CCTCAAAGCATGCACAAT-3'	5'-GACGACCAGCAAGCTCACAAG-3'
MITF	5'-TCCGTCTCTCACTGGATTGGTG-3'	5'-CGTGAATGTGTGTTTCATGCCTGG-3'
TYRP1	5'-TCATCTATTCTGAATGGAACAGG-3'	5'-AATGAGTGCAACCAGTAACAAAGC-3'

第9項 EDN1 中和抗体処理

Anti-Human END1 antibody (免疫生物研究所社製使用)を滅菌水で 100 μ g/mL に希釈後、最終濃度が 0.1~10ng/mL になるよう培地に直接添加した。

第10項 統計処理

統計解析は JSTAT により実施した。一対比較の場合は Student's t-test または Welch's t-test、多重比較の場合は Tukey's test または Dunnett's test で解析し、P 値 0.05 未満を統計的に有意とした。

第3節 実験結果

第1項 HPK-HM 共培養における UVB 曝露 HPK による HM のメラニン合成関連遺伝子発現およびチロシナーゼ活性への影響

HPK に UVB 80mJ/cm² 照射し HM と共培養後、メラニン合成関連遺伝子発現への影響をリアルタイム RT-PCR によりを評価した結果、MITF は UVB 照射から 24 時間後有意にその発現が増加し(Fig. 1-a)、TYR は 24~48 時間後に(Fig. 1-b)、TYRP1 は 36~72 時間後に(Fig. 1-c)発現が増強された。チロシナーゼ活性は UVB 照射 40、60、80 mJ/cm² 曝露 HPK と HM の共存培養 72 時間において、照射量に依存して増強が認められ(Fig. 2-a)、メンブレンポアサイズ 1.0 及び 3.0 μm には依存しないことを確認した(Fig. 2-b)。

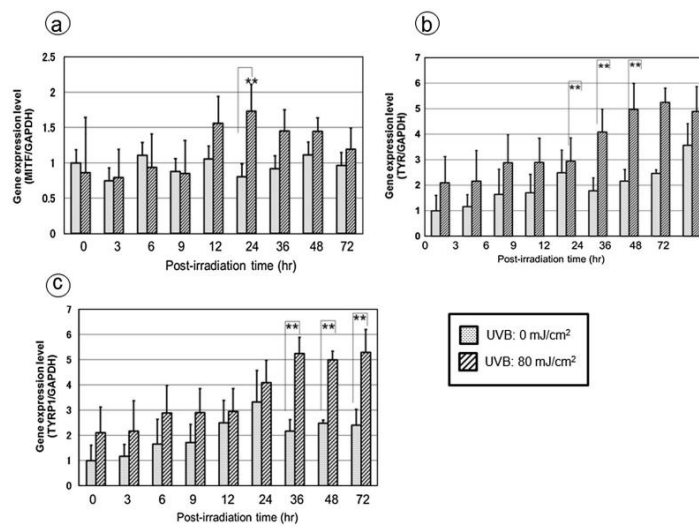


Fig. 1. Effects of UVB-exposure of HKs on gene expression levels of MITF, TYR and TYRP1 in HMs in co-culture. HKs cultured in cell culture inserts were washed twice with PBS and were then exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm². HMs in co-culture units with UVB-exposed HKs in cell culture inserts were cultured for 72 h to measure expression of MITF (a), TYR (b) and TYRP1 (c) at the mRNA level at the indicated post-irradiation times. Results are normalized to GAPDH. Values are means \pm S.D. derived from 3 independent experiments. **: $p < 0.01$ vs 0 mJ/cm².

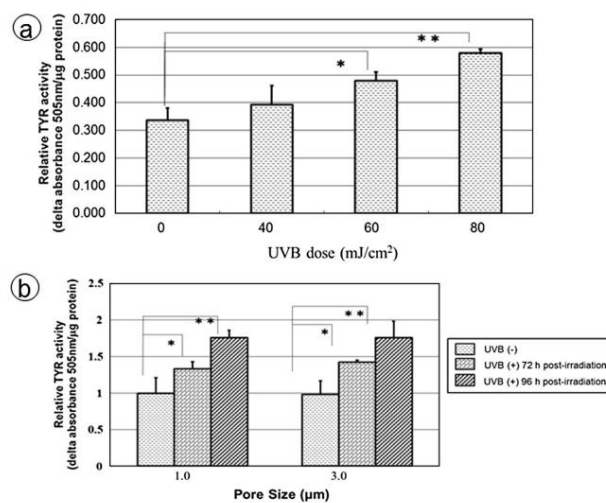


Fig. 2. Effects of UVB-exposure of HKs on TYR activity in HMs in co-culture. (a) pore size 1.0 μm , at 72 h post-irradiation. (b) pore size 1.0 and 3.0 μm , at 72 and 96 h post-irradiation. HKs cultured in cell culture inserts were washed twice with PBS and were then exposed to UVB at doses of 0, 40, 60 and 80 mJ/cm². HMs in co-culture units with UVB-exposed HKs in cell culture inserts were cultured for 72 or 96 h to measure TYR activity at the indicated post-irradiation times. Values are means \pm S.D. derived from 3 independent experiments. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ vs 0 mJ/cm².

第2項 UVB 曝露 HPK によるサイトカイン分泌への影響

HPK に UVB 80mJ/cm² を照射し、0~72 培養後のサイトカインの分泌量を ELISA 法により定量した結果、IL-1 α /TNF- α /IL-6/IL-8/EDN1 は 24~72 時間後有意に分泌亢進し、PGE₂/GM-CSF は 72 時間後に分泌亢進が認められたが、 α MSH の分泌は認められなかった (Fig. 3)。

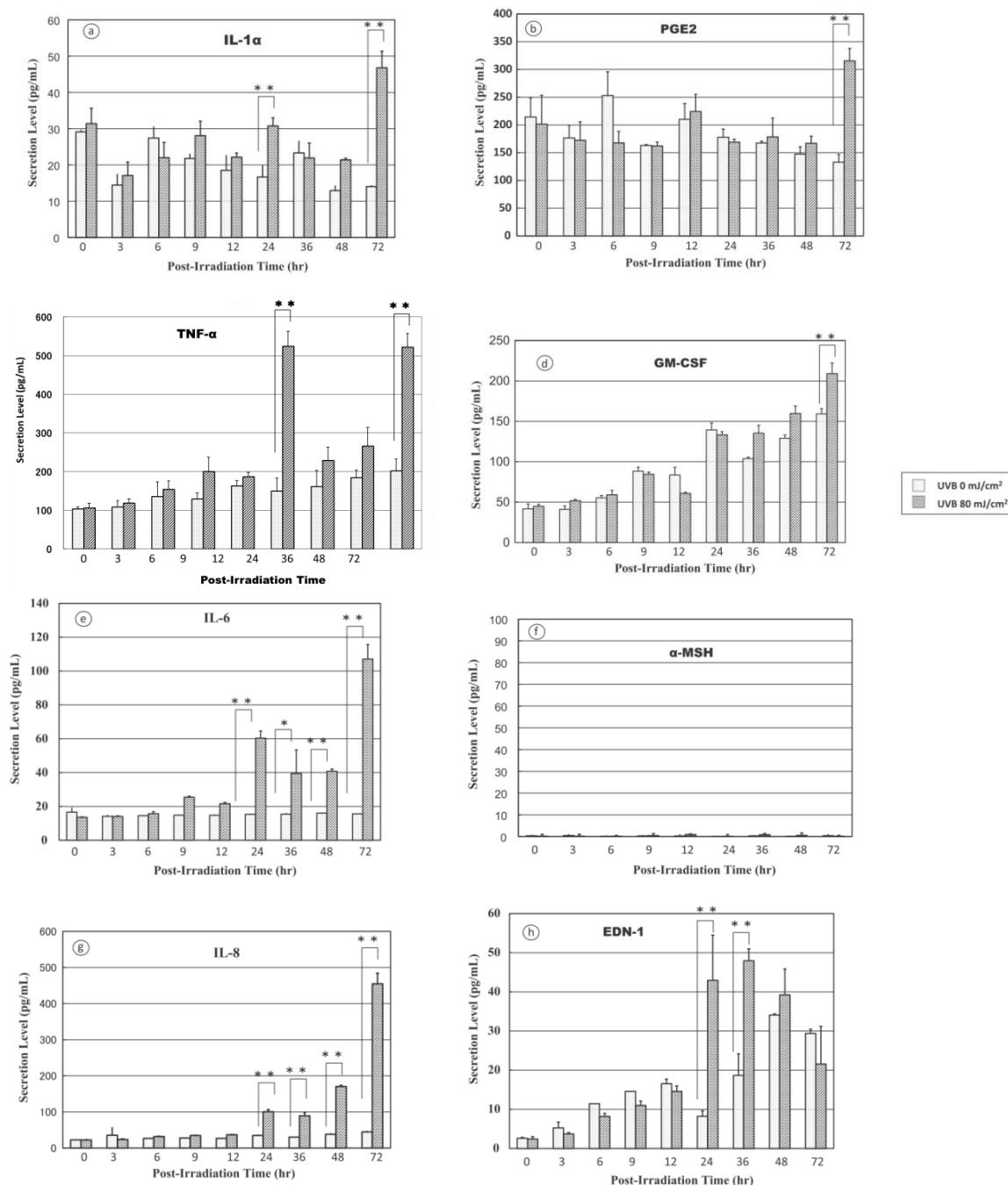


Fig. 3. Levels of cytokines secreted into the medium by HKs after UVB irradiation. (a) IL-1 α , (b) PGE₂, (c) TNF α , (d) GM-CSF, (e) IL-6, (f) α MSH, (g) IL-8, (h) EDN1. HKs cultured in cell culture inserts were exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² and levels of cytokines secreted into the conditioned medium were measured by ELISA kits at 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 and 72 h post-irradiation. Values are means \pm S.D. derived from 3 independent experiments. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ vs non-UVB irradiation.

第3項 UVB 曝露 HPK-HM 共培養における EDN1 中和抗体の効果

UVB 曝露 HPK からメラニン産生誘導サイトカインである EDN1 分泌亢進が確認されたため、EDN1 中和抗体を使用し UVB 曝露 HPK-HM で誘導されるチロシナーゼ活性が抑制されるか検証した。HPK に UVB 80mJ/cm² 照射し HM と共培養において、UVB 照射 0~24 時間後 EDN1 中和抗体を添加し、48 時間後のチロシナーゼ活性を測定した結果、照射 12 時間後及び 24 時間後の EDN1 中和抗体添加により UVB 誘導のチロシナーゼ活性を有意に抑制した。また HM 単独培養において、EDN1 添加 0~36 時間前に EDN1 中和抗体で前処理し、EDN1 添加 48 時間後のチロシナーゼ活性を測定した結果、EDN1 添加直前および 12 時間前の中和抗体添加により EDN1 により誘導されるチロシナーゼ活性の有意な抑制が認められた。HPK への UVB 照射直後の EDN1 中和抗体処理及び HM への EDN1 処理 24~36 時間前の EDN1 中和抗体の前処理ではチロシナーゼ活性が抑制されなかったのは、EDN1 中和抗体の前処理時間が長く、失活するためと考えられる。

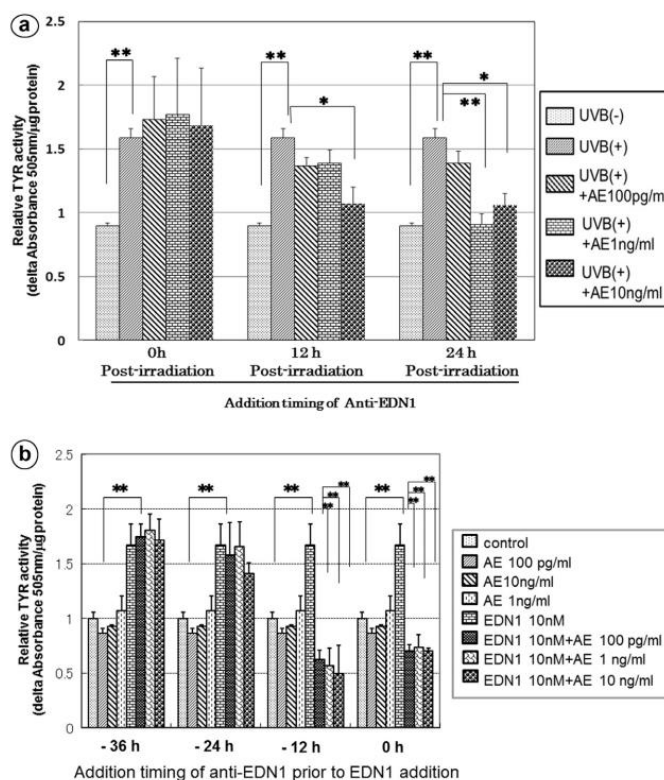


Fig. 4. Abrogation by EDN1 antibodies of the stimulated TYR activity. (a) Co-culture system with UVB-exposed HKs. Neutralizing antibodies to EDN1 (AE) were added at concentrations of 100 pg/ml, 1 ng/ml and 10 ng/ml to the co-culture system with UVB-exposed HKs 0, 12, and 24 h after UVB irradiation at a dose of 80 mJ/cm², after which the co-culture system was continued for 48 h. The lysates of HMs were then assessed for TYR activity at 48 h post-irradiation. Values are means \pm S.D. from 3 independent experiments. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$. (b) EDN1-treated HMs alone. Neutralizing antibodies to EDN1 (AE) were added at concentrations of 100 pg/ml, 1 ng/ml and 10 ng/ml to HMs 0, 12, 24 and 36 h before the addition of EDN1 at a concentration of 10 nM, after which HMs were cultured for 48 h. The lysates of HMs were then assessed for TYR activity at 48 h post-EDN1-treatment. Values are means \pm S.D. from 3 independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

第4項 UVB 曝露 HPK-HM 誘導チロシナーゼ活性に対する AX の効果

UVB 曝露 HPK との HM 共培養で誘導されるチロシナーゼ活性に対する AX の効果を評価した結果、UVB 照射直後 AX 添加により、UVB 曝露 HPK で誘導される HM のチロシナーゼ活性は AX(1、4、8 μ M)添加により有意に抑制されることが確認された (Fig. 5)。

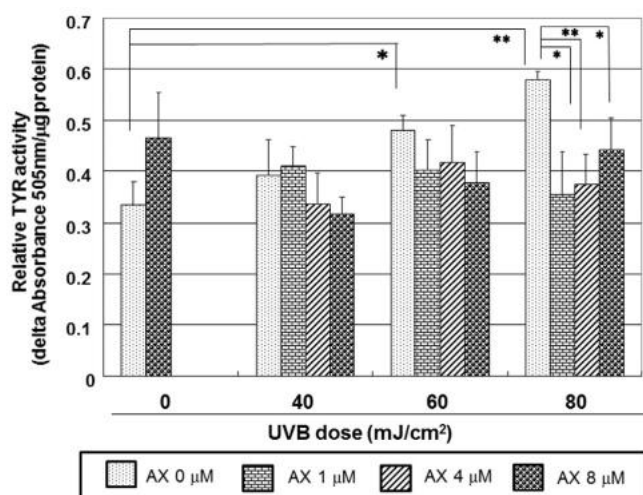


Fig. 5. Abrogation of the stimulated TYR activity by AX in co-culture with UVB-exposed HKs. AX was added at concentrations of 1, 4 and 8 μ M to the co-culture system with UVB-exposed HKs immediately after UVB irradiation at a dose of 80 mJ/cm², after which the co-culture system was continued for 48 h. The lysates of HMs were then assessed for TYR activity at 48 h post-irradiation. Values are means \pm S.D. from 3 independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

第5項 UVB 誘導サイトカイン分泌亢進に対する AX の効果

UVB 曝露 HPK との HM 共培養によりチロシナーゼ活性が増強され、AX によりその増強が抑制されることが確認された。このチロシナーゼ活性増強は UVB 曝露 HPK から分泌亢進される EDN1 によるものと示唆されたため、UVB 曝露 HPK から分泌亢進される EDN1 やその他のサイトカインに対する AX の効果について、HaCaT 細胞を使用し検証した。HaCaT 細胞に対し UVB 80mJ/cm² 照射直後に AX(4~8μM)を添加し 6~72 時間培養後の培養上清中のサイトカインを ELISA 法により定量した結果、UVB により分泌亢進される EDN1(培養 12~72 時間)は、AX8μM 添加により有意な抑制が認められ、その他 IL-8/GM-CSF/IL-1α/PGE₂/IL-6(培養 72 時間)の UVB 誘導の分泌亢進に対し、すべて AX8μM 照射後添加により抑制されたが、分泌亢進される TNF-α に対する AX の抑制効果は認められなかった (Fig. 6)。

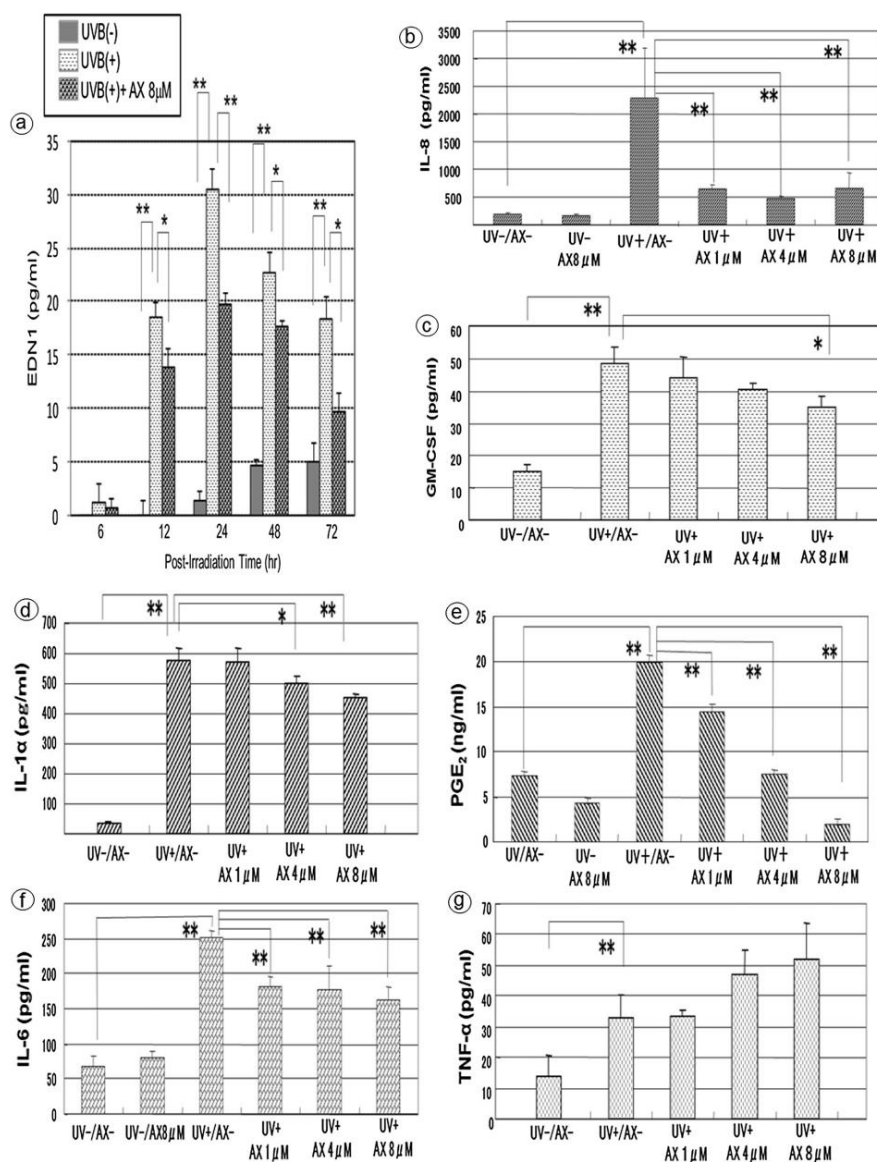


Fig. 6. Abrogating effects of WFA on the increased secretion of cytokines in UVB-exposed HaCaT cells. HaCaT cells were exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² immediately after the addition of AX at the indicated concentrations (1–8 μM) and levels of cytokines secreted into the conditioned medium were measured for EDN1 (a) at the indicated h post-irradiation, and for IL-8 (b), GM-CSF (c), IL-1α (d), IL-6 (e), PGE₂ (f) and TNFα (g) at 72 h post-irradiation using ELISA kits. Values are means ± S.D. derived from 3 independent experiments. **: p < 0.01, *: p < 0.05.

第6項 UVB 曝露 HPK-HM 誘導チロシナーゼ活性に対する WFA の効果

UVB 曝露 HPK との HM 共培養で誘導されるチロシナーゼ活性に対する WFA の効果を評価した。HPK に対し WFA(12.5、25、50 nM)で 2 時間プレインキュベーションし、UVB 80mJ/cm² 照射後、HM と共培養し 96 時間培養後のチロシナーゼ活性を測定した結果、UVB 曝露 HPK で誘導される HM のチロシナーゼ活性は WFA(12.5、25、50 nM)添加により有意に抑制されることが確認された (Fig. 7)。

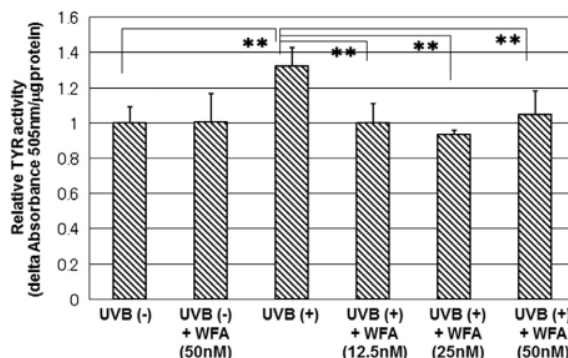


Fig. 7. Abrogation of the stimulated TYR activity by WFA in co-culture with UVB-exposed HKs. WFA was added at concentrations of 12.5, 25 and 50 nM to the co-culture with UVB-exposed HKs 2 h before UVB irradiation at a dose of 80 mJ/cm², after which the co-culture was continued for 96 h. The lysates of HMs were then assessed for TYR activity at 96 h post-irradiation. Values are means \pm S.D. from 3 independent experiments. **: $p < 0.01$.

第7項 UVB 曝露 HPK のサイトカイン分泌亢進に対する WFA の効果

HPK に対し WFA(50 nM)で 2 時間プレインキュベーションし、UVB 80mJ/cm² 照射後、12~72 時間培養後の培養上清中のサイトカインを ELISA 法により定量した結果、UVB により分泌亢進される EDN1(培養 24~48 時間)は、WFA 添加により有意な抑制が認められ(Fig. 8-c)、その他 IL-6/ IL-8 の UVB 誘導の分泌亢進(培養 24~72 時間)に対し、WFA 添加により抑制された (Fig. 8-a,b)。

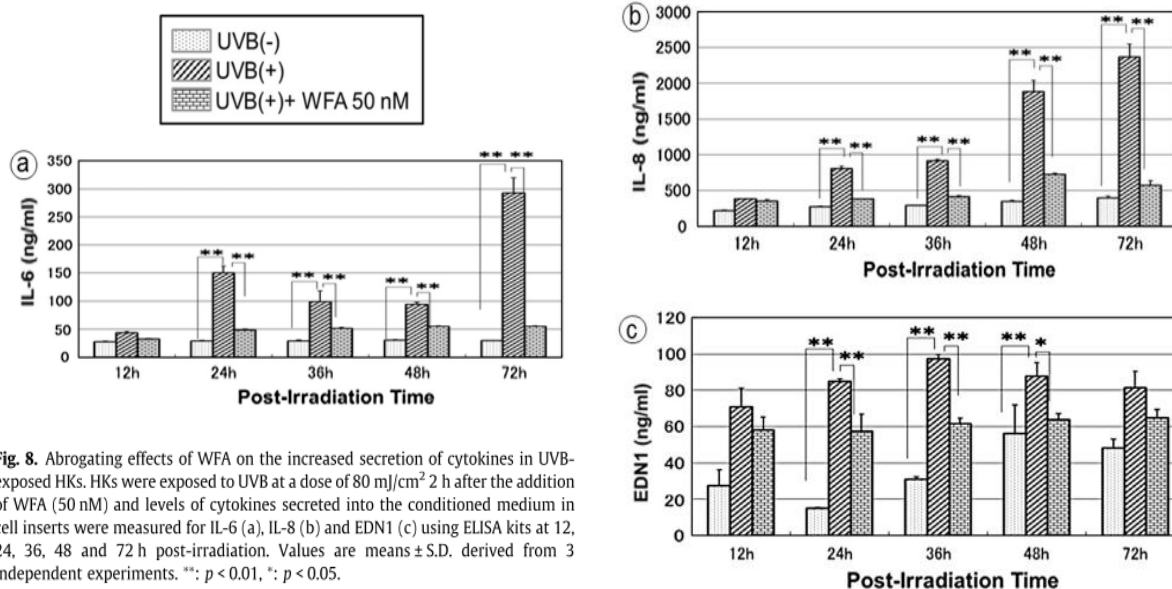


Fig. 8. Abrogating effects of WFA on the increased secretion of cytokines in UVB-exposed HKs. HKs were exposed to UVB at a dose of 80 mJ/cm² 2 h after the addition of WFA (50 nM) and levels of cytokines secreted into the conditioned medium in cell inserts were measured for IL-6 (a), IL-8 (b) and EDN1 (c) using ELISA kits at 12, 24, 36, 48 and 72 h post-irradiation. Values are means \pm S.D. derived from 3 independent experiments. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$.

第8項 EDN1 誘導 HM チロシナーゼ活性に対する WFA の効果

HM に対し WFA(50 nM)で 2 時間プレインキュベーション後、EDN1 添加 72 時間後のチロシナーゼ活性を測定した結果、WFA(50 nM)添加により EDN1 誘導のチロシナーゼ活性の増強に対する有意な抑制が認められた。また HM ライセートに EDN1 添加で誘導されるチロシナーゼ活性に対し WFA(50 nM)は抑制作用を示さなかったことより、WFA はチロシナーゼ直接阻害作用を有しないことが確認された (Fig. 9)。

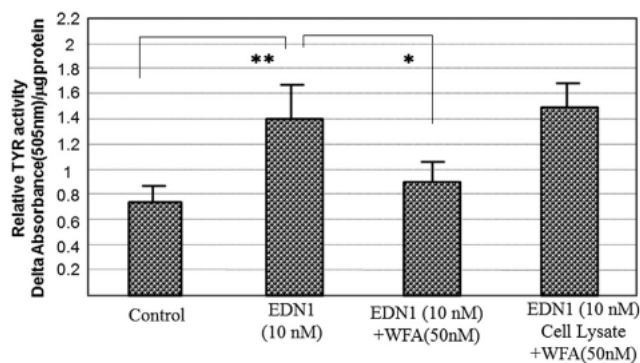


Fig. 9. Effects of WFA on TYR activity in EDN1-stimulated HMs. HMs were cultured in the presence of WFA at a concentration of 50 nM for 2 h, then were treated with EDN1 (10 nM) and maintained in culture for 72 h, after which cell lysates were prepared for the measurement of TYR activity. In another experiment, HMs were cultured in the absence of WFA for 48 h after EDN1 stimulation after which cell lysates were prepared and TYR activity was measured after adding WFA at a concentration of 50 nM. TYR activity was measured as delta absorbance (505 nm)/µg protein and is expressed as relative to the control without EDN1. Values are means ± S.D. derived from 3 independent experiments. **: $p < 0.01$.

第9項 EDN1 誘導 HM シグナル伝達経路に対する WFA の抑制効果

WFA による EDN1 誘導 HM のチロシナーゼ活性抑制作用は、EDN1 刺激によるシグナル伝達の阻害であることが推察されたため、EDN1 誘導の Raf/MEK/ERK/MITF/CREB の活性化に対する WFA の効果を評価した。HM に対し WFA(12.5、25、50 nM)で 2 時間プレインキュベーションし、EDN1 添加 15 分後の各シグナル分子・転写因子のリン酸化を Western blotting で評価した結果、EDN1 で誘導される Raf/MEK/ERK/MITF/CREB のリン酸化を WFA(50 nM)が有意に抑制することが確認された(Fig. 10)。

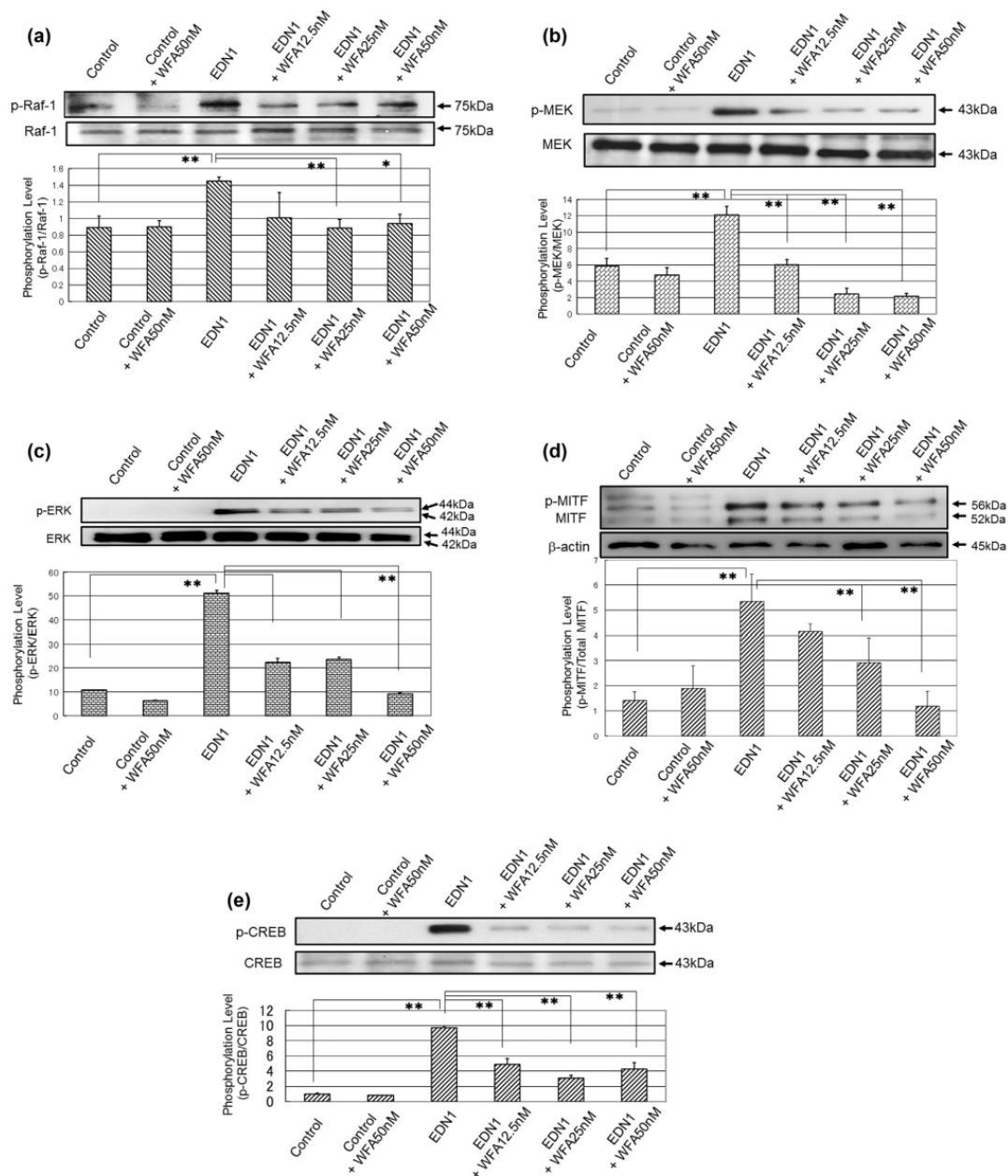


Fig. 10. Effects of WFA on the EDN1-stimulated phosphorylation of Raf-1 (a), MEK (b), ERK (c), MITF (d) and CREB (e) in HMs. HMs were treated with 10 nM EDN1 in the presence or absence of WFA at concentrations of 12.5, 25 and 50 nM. Lysates were harvested at 15 min post-treatment with EDN1 and were immunoblotted with antibodies to MITF and phosphorylated or non-phosphorylated Raf-1/MEK/ERK/CREB. Values are means \pm S.D. derived from 3 independent experiments. Representative immunoblots from 3 independent experiments are shown. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

第4節 考察

表皮の色素沈着はケラチノサイトーメラノサイト及び真皮線維芽細胞ーメラノサイトとのサイトカインを介したパラクライン作用により引き起こされる。本研究では UVB で惹起されるケラチノサイトーメラノサイト間のパラクライン作用を介した色素沈着について、セルインサートを用いた共培養系でチロシナーゼ活性を指標とし、この相互作用を解析するとともに、色素沈着抑制剤としての AX 及び WFA の効果とそのメカニズムを解明した。UVB で曝露された HPK と HM を共培養すると、UVB 照射量に依存してチロシナーゼ活性の増強が認められ(Fig. 2)、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(Fig. 1)。UVB 曝露 HPK-HM 共培養の上清から IL-1 α /TNF- α /IL-6/IL-8/EDN1/PGE₂/GM-CSF の分泌亢進が認められたが、 α MSH は全く検出されなかった(Fig. 3)。また UVB 曝露 HPK-HM 共培養系に EDN1 中和抗体で処理すると UVB で誘導されるチロシナーゼ活性の増強の抑制が認められ(Fig. 4)、UVB 曝露 HPK-HM 共培養系において HPK より分泌される液性因子の中で EDN1 がメラニン産生を誘導する主要な因子であることが示唆された。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。

次に HPK-HM 共培養システムを用い、UVB 誘導色素沈着に対する AX 及び WFA の効果を評価した。UVB 曝露 HPK における WFA の照射前添加または AX の照射後添加によって UVB で誘導されるチロシナーゼ活性の増強に対する抑制効果が認められた(Fig. 5、7)。AX は UVB 曝露 HaCaT 細胞(HPK とほぼ同じ挙動を示すと考えられる)から分泌促進される EDN1 の抑制効果が認められたが (Fig. 6)、EDN1 で誘導される HM のメラニン産生に関わるシグナル分子及び転写因子に対しての抑制効果は見られなかった(未発表データ)。WFA は UVB 曝露 HPK から分泌促進される EDN1 の抑制効果(Fig. 8)が認められるとともに、EDN1 添加 HM における EDN1 誘導シグナル分子 Raf1/MEK/ERK/MITF/CREB のリン酸化増強が有意に抑制された(Fig. 10)。

以上の結果より、セルインサートを用いた HPK-HM 共培養システムはパラクラインで作用する液性因子の特定やその抑制作用の解析に有益な評価系といえ、パラクライン的色素沈着抑制剤として AX 及び WFA は有効であることが示唆された。

第6章 総括

一般に紫外線によるストレスシグナル伝達に応じた増減を定常状態に戻すことが安全で有用性の高い化粧品及び医薬部外品になると考えられる。紫外線で惹起されるシグナル伝達経路を特異的に抑制できれば、紫外線により起きる皮膚障害に対し、安全で理想的な抑制剤及び予防剤になる可能性がある。この観点に基づき、本研究では紫外線 UVB がもたらす皮膚障害 - 炎症・角化亢進・色素沈着に対する AX 及び WFA の抑制効果とその作用機序を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では UVB で引き起こされる炎症・角化亢進・色素沈着の発症機序を解説した。また AX 及び WFA のこれまでの研究についてまとめた。

第 2 章では UVB 誘導の炎症に対し AX の抗炎症効果を評価するうえで、AX を UVB 照射前または照射後とタイミングを変えて添加した。このタイミングの違いにより炎症に関わるシグナル分子の阻害に対し AX の作用点が異なることを見出した。既に存在する AX の抗炎症効果に関する知見では、LPS あるいは H₂O₂ などの刺激因子の添加前に AX で処理するため、AX の作用点は ROS 消去による初期炎症関連シグナル活性部位の阻害であるにもかかわらず、シグナル下流部の NF- κ B 経路周辺の阻害という誤った結論が多く導き出されている。本研究では UVB 照射後の AX 添加でも PGE₂/IL-8 の分泌亢進を有意に抑えることを初めて見出し、この炎症サイトカイン分泌亢進の AX による抑制作用は MSK1 の活性阻害に起因するという新たな知見を得ることができた。この効果は AX の抗酸化作用によるものかどうかは不明だが、核内リン酸化酵素である MSK1 の活性を抑制することから、AX は核内もしくは核膜にまで到達していることが予測され、UVB で起きるレドックスバランスの不均衡を調節している可能性が考えられる。また AX は刺激を受けた後の処理においても、修復効果を有する機能性の高い素材であることが示唆される。本研究では 1MED に相当する UVB(80mJ/cm²) を照射したが、HPK にとって過酷な条件下であるため、アポトーシスに陥ったケラチノサイト(サンバーン細胞)が見られ、DNA の損傷の中でも最も重篤な損傷である DNA 二本鎖切断(double strand break)が生じている可能性がある。UVB 曝露ケラチノサイトにおける AX の DNA 損傷抑制効果の報告があるが、AX は UVB 照射前処理であるため、照射後処理での AX の本効果の有無について今後の研究課題として評価を考えている。

第 3 章の研究ではヒトケラチノサイトにおいて UVB 曝露により TGase1 発現が増強されることを初めて明らかにした。また UVB 誘導の TGase1 は UVB 照射前 AX 添加及び照射後 AX 添加でも抑制されたことから、第 2 章の研究で得た AX のシグナル分子阻害の特性を利用し、UVB 誘導の TGase1 発現のシグナル伝達経路を明らかにした。ケラチノサイトにおける TGase1 発現は AP1 系統により起きるとの報告はあるが、本研究での UVB 誘導 TGase1 発現は NF- κ B 系統であることが新しい知見として得られた。AX を用いることで UVB 誘導の TGase1 発現には NF- κ B と MSK1 の活性化が必須であることが示され、これらの活性部位の制御が UVB 曝露による角化亢進の治療に応用できる新たなターゲットになりうることを期待されるが、今後角化に関わるロリクリン、インボルクリンなどの細胞周辺帯構成タンパクや分化マーカーの UVB による影響も評価する必要がある、今後の研究課題としたい。

第 4 章では UVB 誘導の色素沈着モデルとして HEE 及び HM を用い、UVB 誘導のメラニン産生誘導サイトカインである SCF で刺激し、色素沈着抑制剤としての WFA の効果を評価

した。WFAは50nMという低濃度でSCF誘導の色素沈着を抑制し、チロシナーゼ直接阻害作用や細胞生存率への影響がなく、安全で有用性の高い色素沈着抑制剤になりうることが示唆された。WFAによるSCF誘導色素沈着に対する抑制効果は、SCFの受容体であるc-Kitの活性を抑制することが作用点になっている。これはc-KitはSH基部に活性ドメインを有し、WFAの分子構造内に有するラクトン環がSH基部と結合しその活性を阻害していることが考えられる。この新たな知見が今後のSCF誘導色素沈着におけるc-Kitの不活性化素材のスクリーニングに有益な情報となることが考えられる。

第5章ではケラチノサイトーメラノサイト間のパラクライン作用を介したUVB誘導の色素沈着に対する抑制剤の評価系として、セルインサート共培養システムを構築した。HPKにUVBを照射しHMと共培養すると、チロシナーゼ活性やメラニン合成関連タンパクの遺伝子発現の増強が認められ、UVB曝露HPKから分泌されるチロシナーゼ活性増強を誘発する因子はEDN1であることを確認した。この結果はImokawa G, et al. (J Biol Chem 1992)らが報告した、UVB誘導色素沈着におけるHPK-HM間のパラクライン因子がEDN1であると同定したことと一致しており、セルインサート共培養系を用いたこのシステムがパラクライン的色素沈着の阻害剤評価に有効であることが示された。この評価システムにより、AX及びWFAはUVB曝露HPKのEDN1分泌亢進を抑制し、さらにWFAはEDN1で活性化されるシグナル上流部(Raf1のリン酸化)も抑制することがわかった。第4章で使用したHEEは、ヒト正常皮膚に近い構造を持つHPK-HM共培養であり、目視で色素沈着を確認することができるなど利点も多いが、実際のUVB曝露実験では色素沈着増強を再現性よく観察できないため、この試験には向かない。本研究のセルインサート共培養系を用いたHPK-HM共培養では、HPK単独でのUVB曝露や液性因子の分泌の解析、HM単独での遺伝子発現・タンパク発現の解析等ができるため、より幅広くより詳細にパラクライン的色素沈着抑制の作用点の特定が可能である。しかしUVB曝露HPKで産生増強されるSCFはHPKの細胞膜上のみ発現し分泌されないため、セルインサート底面のメンブレンを透過せず、メラノサイトへのパラクライン作用を評価できない欠点があり、HEE評価系との使い分けが必要となる。また今後の研究課題としては、UVB曝露HPKから分泌亢進されるEDN1のAX及びWFAの抑制機序を明らかにするとともに、SCF/c-Kitシグナル経路とEDN1/EDNRBシグナル経路に及ぼすAXの作用様式の違いを解明することが考えられる。

以上、本研究によりAX及びWFAが紫外線UVBで引き起こされる皮膚障害の予防剤及び抑制剤として有用であることを示した。また本研究での表皮細胞を用いた*in vitro*評価方法は、化粧品及び医薬部外品の開発において動物実験にとって代わる有用性の高い実験系として貢献できることが大いに期待できる。

第7章 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき多大なる御指導と深いご理解を賜った中部大学 客員教授、芋川 玄爾 先生に謹んで感謝の意を表します。また、本研究にあたり、有益な御指導と御助言を頂いた東京工科大学 教授 山本 順寛 先生に深く感謝の意を表します。さらに本研究の遂行にあたり、多大な協力頂いた東京工科大学 芋川研究室の卒業生の皆様に対して心より感謝いたします。本研究を進めるにあたり、素晴らしい研究環境を与えて頂くとともに、多大なるご助言を賜りました中部大学 禹 濟泰 教授並びに禹研究室の皆様に誠意を表わすとともに厚く御礼申し上げます。

第8章 参考文献

- 1 岡本祐之 : スキンケア最前線 p136
- 2 Corsini E, Bruccoleri A, Marinovich M, Galli CL. : In vitro mechanism(s) of ultraviolet-induced tumor necrosis factor- α release in a human keratinocyte cell line. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1995 Jun;11(3):112-8.
- 3 Takashima A, Bergstresser PR. : Impact of UVB radiation on the epidermal cytokine network. *Photochem Photobiol*. 1996 Apr;63(4):397-400.
- 4 Abeyama K, Eng W, Jester JV, Vink AA, Edelbaum D, Cockerell CJ, Bergstresser PR, Takashima A. A role for NF- κ B-dependent gene transactivation in sunburn. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(12):1751-9.
- 5 清水宏 : あたらしい皮膚科学 第2版, p9
- 6 Bernerd F, Asselineau D. : Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro. *Dev Biol*. 1997 Mar 15;183(2):123-38.
- 7 Del Bino S, Vioux C, Rossio-Pasquier P, Jomard A, Demarchez M, Asselineau D, Bernerd F. : Ultraviolet B induces hyperproliferation and modification of epidermal differentiation in normal human skin grafted on to nude mice. *Br J Dermatol*. 2004 Apr;150(4):658-67.
- 8 Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M: Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem* 1992, 267:24675–24680.
- 9 Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, Moellmann G, McGuire J: Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol* 1988,107:1611–1619.
- 10 Imokawa G, Yada Y, Kimura M: Signaling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis in human melanocytes. *Biochem J* 1996, 314:305–312.
- 11 Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, Higashi K, Yada Y: The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res* 1997,10:218–228.
- 12 Tada A, Suzuki I, Im S, Davis MB, Cornelius J, Babcock G, Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA: Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ* 1998, 9:575–584.
- 13 Yada Y, Higuchi K, Imokawa G: Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J Biol Chem* 1991, 266:18352–18357.
- 14 Imokawa G, Miyagishi M, Yada Y: Endothelin-1 as a new melanogen:coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVBexposed human epidermis. *J Invest Dermatol* 1995, 105:32–37.
- 15 Yohn JJ, Morelli JG, Walchack SJ, Rundell KB, Norris DA, Zamora MR: Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1. *J Invest Dermatol* 1993, 100:23–26.
- 16 Abdel-Malek ZA, Swope VB, Suzuki I, Akcali C, Harriger MD, Boyce ST, Urabe K, Hearing VJ: Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:1789–1793
- 17 Schauer E, Trautinger F, Kočak A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA: Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest* 1994, 93:2258–2262.
- 18 Hedley SJ, Gawkrödger DJ, Weetman AP, MacNeil S: Alpha-MSH and melanogenesis in normal human adult melanocytes. *Pigment Cell Res* 1998, 11:45–56.
- 19 Funasaka Y, Chakraborty AK, Hayashi Y, Komoto M, Ohashi A, Nagahama M, Inoue Y,

-
- Pawelek J, Ichihashi M: Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumor necrosis factoralpha. *Br J Dermatol* 1998, 139:216–224.
- ²⁰ Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, Takema Y, Imokawa G: The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol* 2001, 116:578–586.
- ²¹ Rome' ro-Gaillet C, Aberdam E, Cle'ment M, Ortonne J-P, Ballotti R: Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest* 1997, 99:635–642.
- ²² Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M: Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes: cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase C-kit receptor. *J Biol Chem* 2000, 275:33321–33328.
- ²³ Imokawa G, Ishida K: Inhibitors of Intracellular Signaling Pathways that Lead to Stimulated Epidermal Pigmentation: Perspective of Anti-Pigmenting Agents. *Int J Mol Sci.* 2014 May 12;15(5):8293-315.
- ²⁴ Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermarck B, Heldin CH: Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J.* 1991, 10, 4121–4128.
- ²⁵ Cutler RL, Liu L, Damen JE, Krystal G: Multiple cytokines induce the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 in hemopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 21463–21465.
- ²⁶ Liu L, Damen JE, Cutler RL, Krystal G: Multiple cytokines stimulate the binding of a common 145-kilodalton protein to Shc at the Grb2 recognition site of Shc. *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14, 6926–6935.
- ²⁷ Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Ponten E, Carlberg M, Ronnstrand L: Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* 1999, 18, 5546–5553.
- ²⁸ Marais R, Light Y, Mason C, Paterson H, Olson MF, Marshall CJ: Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science.* 1998 Apr 3;280(5360):109-12.
- ²⁹ Sato-Jin K, Nishimura EK, Akasaka E, Huber W, Nakano H, Miller A, Du J, Wu M, Hanada K, Sawamura D: Epistatic connections between MITF and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders. *FASEB J.* 2008, 22, 1155–1168.
- ³⁰ Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M: Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 24675–24680.
- ³¹ Yada Y, Higuchi K, Imokawa G: Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 18352–18357.
- ³² Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR: Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 1993, 364, 249–252.
- ³³ Bentley NJ, Eisen T, Goding CR: Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: Activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14, 7996–8006.
- ³⁴ Fang D, Setaluri V: Role of microphthalmia transcription factor in regulation of melanocyte differentiation marker TRP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 256, 657–663.

-
- ³⁵ Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE: MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am. J. Pathol.* 2003, 163, 333–343.
- ³⁶ Sato-Jin K, Nishimura EK, Akasaka E, Huber W, Nakano H, Miller A, Du J, Wu M, Hanada K, Sawamura D: Epistatic connections between MITF and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders. *FASEB J.* 2008, 22, 1155–1168.
- ³⁷ Mizutani Y, Hayashi N, Kawashima M, Imokawa G: A single UVB exposure increases the expression of functional KIT in human melanocytes by up-regulating MITF expression through the phosphorylation of p38/CREB. *Arch. Dermatol. Res.* 2010, 302, 283–294.
- ³⁸ Te-Sheng Chang: An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 2440–2475
- ³⁹ Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG: Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Mar. Drugs* 2014, 2, 128–152.
- ⁴⁰ Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL: Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 2008, 101, 58D–68D.
- ⁴¹ Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, Terada H: Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1512, 251–258.
- ⁴² Eiji Yamashita: *Functional Foods in Health and Disease* 2013, 3(7):254-258
- ⁴³ Ursoniu S, Sahebkar A, Serban MC, Banach M: Lipid profile and glucose changes after supplementation with astaxanthin: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch. Med. Sci.* 2015, 11, 253–266.
- ⁴⁴ Ryu SK, King TJ, Fujioka K, Pattison J, Pashkow FJ, Tsimikas S: Effect of an oral astaxanthin prodrug (CDX-085) on lipoprotein levels and progression of atherosclerosis in IDIR (-/-) and ApoE (-/-) mice. *Atherosclerosis* 2012, 222, 99–105.
- ⁴⁵ Ohgami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S: Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003, 44, 2694–2701.
- ⁴⁶ Lee SJ, Bai SK, Lee KS, Namkoong S, Na HJ, Ha KS, Han JA, Yim SV, Chang K, Kwon YG, Lee SK, Kim YM: Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol. Cells*, 2003, 16, 97–105.
- ⁴⁷ 山下栄次: オキアミ由来スタキサンチンの色素沈着抑制効果, *Fregance J*, 1995, 14, 180–185.
- ⁴⁸ Nakajima H, Fukazawa K, Wakabayashi Y, Wakamatsu K, Senda K, Imokawa G : Abrogating effect of a xanthophyll carotenoid astaxanthin on the stem cell factor-induced stimulation of human epidermal pigmentation. *Arch Dermatol Res.* 2012 Dec, 304(10):803-16.
- ⁴⁹ Vanden Berghe W, Sabbe L, Kaileh M, Haegeman G, Heyninx K. : Molecular insight in the multifunctional activities of Withaferin A. *Biochem Pharmacol* 2012 Nov 15; 84(10):1282-91.
- ⁵⁰ Oh JH, Lee TJ, Park JW, Kwon TK: Withaferin A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF-kappaB in RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol.* 2008 Dec 3; 599(1-3):11-7.

-
- ⁵¹ Singh D, Aggarwal A, Maurya R, Naik S: Withania somnifera inhibits NF-kappaB and AP-1 transcription factors in human peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells. *Phytother Res.* 2007 Oct;21(10):905-13.
- ⁵² Suttana W1, Mankhetkorn S, Poompimon W, Palagani A, Zhokhov S, Gerlo S, Haegeman G, Berghe WV.: Differential chemosensitization of P-glycoprotein overexpressing K562/Adr cells by withaferin A and Siamois polyphenols. *Mol Cancer.* 2010 May 3;9:99.
- ⁵³ Franchitto A, Torrice A, Semeraro R, Napoli C, Nuzzo G, Giuliani F, Alpini G, Carpino G, Berloco PB, Izzo L, Bolognese A, Onori P, Renzi A, Cantafora A, Gaudio E, Alvaro D.: Prostate apoptosis response-4 is expressed in normal cholangiocytes, is down-regulated in human cholangiocarcinoma, and promotes apoptosis of neoplastic cholangiocytes when induced pharmacologically. *Am J Pathol.* 2010 Oct;177(4):1779-90.
- ⁵⁴ Srinivasan S, Ranga RS, Burikhanov R, Han SS, Chendil D. Par-4-dependent apoptosis by the dietary compound withaferin A in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2007,67:246–53.
- ⁵⁵ Mehrotra A, Kaul D, Joshi K: LXR-alpha selectively reprogrammes cancer cells to enter into apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011,349:41–55.
- ⁵⁶ Yokota Y, Bargagna-Mohan P, Ravindranath PP, Kim KB, Mohan R: Development of withaferin A analogs as probes of angiogenesis. *Bioorg Med Chem Lett* 2006,16:2603–7.
- ⁵⁷ Mohan R, Hammers HJ, Bargagna-Mohan P, Zhan XH, Herbstritt CJ, Ruiz A: Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis. *Angiogenesis* 2004,7:115–22.
- ⁵⁸ Bargagna-Mohan P, Ravindranath PP, Mohan R: Small molecule anti-angiogenic probes of the ubiquitin proteasome pathway: potential application to choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006,47:4138–45.
- ⁵⁹ Zhang X, Mukerji R, Samadi AK, Cohen MS: Down-regulation of estrogen receptor-alpha and rearranged during transfection tyrosine kinase is associated with withaferin A-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2011,11:84.
- ⁶⁰ Mayola E, Gallerne C, Esposti DD, Martel C, Pervaiz S, Larue L: Withaferin A induces apoptosis in human melanoma cells through generation of reactive oxygen species and down-regulation of Bcl-2. *Apoptosis* 2011,16:1014–27.
- ⁶¹ Choi MJ, Park EJ, Min KJ, Park JW, Kwon TK: Endoplasmic reticulum stress mediates withaferin A-induced apoptosis in human renal carcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 2011,25:692–8.
- ⁶² Mohan R, Hammers HJ, Bargagna-Mohan P, Zhan XH, Herbstritt CJ, Ruiz A: Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis. *Angiogenesis* 2004,7:115–22.
- ⁶³ Sabina EP, Chandal S, Rasool MK: Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by withaferin A. *J Pharm Pharm Sci* 2008;11:46–55.
- ⁶⁴ Kaileh M, Vanden Berghe W, Heyerick A, Horion J, Piette J, Libert C: Withaferin A strongly elicits I-kappaB kinase beta hyperphosphorylation concomitant with potent inhibition of its kinase activity. *J Biol Chem* 2007,282:4253–64.
- ⁶⁵ Samadi AK, Mukerji R, Shah A, Timmermann BN, Cohen MS: A novel RET inhibitor with potent efficacy against medullary thyroid cancer in vivo. *Surgery* 2010,148:1228–36.
- ⁶⁶ Munagala R, Kausar H, Munjal C, Gupta RC: Withaferin A induces p53-dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and upregulation of tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* 2011,32:1697–705.
- ⁶⁷ Stan SD, Hahm ER, Warin R, Singh SV: Withaferin A causes FOXO3a- and Bim-dependent apoptosis and inhibits growth of human breast cancer cells in vivo.

-
- Cancer Res 2008;68:7661–9.
- ⁶⁸ Ganasoundari A, Zare SM, Devi PU: Modification of bone marrow radiosensitivity by medicinal plant extracts. *Br J Radiol* 1997,70:599–602.
- ⁶⁹ Devi PU, Kamath R: Radiosensitizing effect of withaferin A combined with hyperthermia on mouse fibrosarcoma and melanoma. *J Radiat Res (Tokyo)* 2003,44:1–6.
- ⁷⁰ Fong MY, Jin S, Rane M, Singh RK, Gupta R, Kakar SS. Withaferin A synergizes the therapeutic effect of doxorubicin through ROS-mediated autophagy in ovarian cancer. *PLoS ONE* 2012,7:e42265.
- ⁷¹ Satelli A, Li S: Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011,68:3033–46.
- ⁷² Lahat G, Zhu QS, Huang KL, Wang S, Bolshakov S, Liu J, et al. Vimentin is a novel anti-cancer therapeutic target: insights from in vitro and in vivo mice xenograft studies. *PLoS ONE* 2010,5:e10105.
- ⁷³ Grover A, Shandilya A, Punetha A, Bisaria VS, Sundar D: Inhibition of the NEMO/IKKbeta association complex formation, a novel mechanism associated with the NF-kappaB activation suppression by *Withania somnifera*'s key metabolite withaferin A. *BMC Genomics* 2010,11(Suppl. 4):S25.
- ⁷⁴ Bernier M, Kwon YK, Pandey SK, Zhu TN, Zhao RJ, Maciuk A: Binding of manumycin A inhibits IkappaB kinase beta activity. *J Biol Chem* 2006;281:2551–61.
- ⁷⁵ Gupta SC, Prasad S, Reuter S, Kannappan R, Yadav VR, Ravindran J: Modification of cysteine 179 of IkappaBalpha kinase by nimbolide leads to down-regulation of NF-kappaB-regulated cell survival and proliferative proteins and sensitization of tumor cells to chemotherapeutic agents. *J Biol Chem* 2010,285:35406–17.
- ⁷⁶ Kim BH, Lee JY, Seo JH, Lee HY, Ryu SY, Ahn BW: Artemisolide is a typical inhibitor of IkappaB kinase beta targeting cysteine-179 residue and downregulates NF-kappaB-dependent TNF-alpha expression in LPS-activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:593–8.
- ⁷⁷ Sen N, Banerjee B, Das BB, Ganguly A, Sen T, Pramanik S: Apoptosis is induced in leishmanial cells by a novel protein kinase inhibitor withaferin A and is facilitated by apoptotic topoisomerase I-DNA complex. *Cell Death Differ* 2007,14:358–67.
- ⁷⁸ Oh JH, Lee TJ, Kim SH, Choi YH, Lee SH, Lee JM: Induction of apoptosis by withaferin A in human leukemia U937 cells through down-regulation of Akt phosphorylation. *Apoptosis* 2008,13:1494–504.
- ⁷⁹ Oh JH, Kwon TK: Withaferin A inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of cell adhesion molecules by inactivation of Akt and NF-kappaB in human pulmonary epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 2009,9:614–9.
- ⁸⁰ Oh JH, Lee TJ, Park JW, Kwon TK: Withaferin A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF-kappaB in RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol* 2008,599:11–7.
- ⁸¹ Nakajima H, Fukazawa K, Wakabayashi Y, Wakamatsu K, Imokawa G: *Withania somnifera* extract attenuates stem cell factor-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through interruption of ERK phosphorylation within melanocytes. *J Nat Med*. 2012, Jul;66(3):435–46.
- ⁸² Nakajima H, Wakabayashi Y, Wakamatsu K, Imokawa G. An extract of *Withania somnifera* attenuates endothelin-1-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through the interruption of PKC activity within melanocytes. *Phytother Res*. 2011, Sep;25(9):1398–411.
- ⁸³ Yoon J H, Lim T G, Lee K M: Tangeretin reduces ultraviolet B (UVB)-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse epidermal cells by blocking

-
- mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and reactive oxygen species (ROS) generation. *J Agric Food Chem* 2010; 59: 222–228.
- ⁸⁴ Rhodes LE, Belgi G, Parslew R, McLoughlin L, Clough GF, Friedmann PS: Ultraviolet-B-induced erythema is mediated by nitric oxide and prostaglandin E2 in combination. *J Invest Dermatol* 2001, 117: 880–885
- ⁸⁵ Black AK, Greaves MW, Hensby CN, Plummer NA: Increased prostaglandins E2 and F2alpha in human skin at 6 and 24 h after ultraviolet B irradiation (290–320 nm). *Br J Clin Pharmacol* 1978, 5: 431–436.
- ⁸⁶ Warren J B: Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light. *FASEB J* 1994, 8: 247–251.
- ⁸⁷ Strickland I, Rhodes LE, Flanagan BF, Friedmann PS: TNF-alpha and IL-8 are upregulated in the epidermis of normal human skin after UVB exposure: correlation with neutrophil accumulation and E-selectin expression. *J Invest Dermatol* 1997, 105: 763–768.
- ⁸⁸ Matsuzawa A, Ichijo H: Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1780: 1325–1336.
- ⁸⁹ Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H: Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK)1. *EMBO J* 1998, 17: 2596–2606.
- ⁹⁰ Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M: Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005, 120: 649–661.
- ⁹¹ Pham CG, Bubici C, Zazzeribu F, Papa S, Jones J, Alvarez K, Jayawardena S, De Smaele E, Cong R, Beaumont C, Torti FM, Torti SV, Franzoso G: Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 2004, 119: 529–542.
- ⁹² Goldman EH, Chen L, Fu H: Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation. *J Biol Chem* 2004, 279: 10442–10449.
- ⁹³ Shimizu N, Goto M, Miki W: Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organism. *Fish Sci* 1996, 62: 134–137.
- ⁹⁴ Miki W: Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem* 1991, 63: 141–146.
- ⁹⁵ Krinsky NI: Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 617–635.
- ⁹⁶ Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K, Jin XH, Ilieva I, Koyama Y, Yazawa K, Yoshida K, Kase S, Ohno S: Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway. *Exp Eye Res* 2006, 82: 275–281.
- ⁹⁷ Kim YH, Koh HK, Kim DS: Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NF-kappaB-mediated signals in activated microglia. *Int Immunopharmacol* 2010, 12: 1560–1572.
- ⁹⁸ Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT: Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* 2001, 20: 3921–3926.
- ⁹⁹ Fernau NS, Fugmann D, Leyendecker M, Reimann K, Grether-Beck S, Galban S,

-
- Ale-Agha N, Krutmann J, Klotz LO: Role of HuR and p38MAPK in ultraviolet B-induced post-transcriptional regulation of COX-2 expression in the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Biol Chem* 2010, 285:3896–3904.
- ¹⁰⁰ Sur R, Babad J M, Garay M, Liebel FT, Southall MD: Anti-inflammatory activity of sertaconazole nitrate is mediated via activation of a p38-COX-2-PGE2 pathway. *J Invest Dermatol* 2008, 128:336–344.
- ¹⁰¹ He G, Sung Y M, Fischer S M: Troglitazone induction of COX-2 expression is dependent on ERK activation in keratinocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006, 74:193–197.
- ¹⁰² Kim H J, Kim T Y: IGF-II-mediated COX-2 gene expression in human keratinocytes through extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Invest Dermatol* 2004, 23:547–555.
- ¹⁰³ Lee H J, Lee J, Lee S K, Lee S K, Kim E C: Differential regulation of iron chelator-induced IL-8 synthesis via MAP kinase and NF-kappaB in immortalized and malignant oral keratinocytes. *BMC Cancer* 2007, 7:176.
- ¹⁰⁴ Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K: All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2004, 123:1078–1085.
- ¹⁰⁵ Kang J S, Kim H N, Jung D J, Kim J E, Mun G H, Kim Y S, Cho D, Shin D H, Hwang Y I, Lee W J: Regulation of UVB-induced IL-8 and MCP-1 production in skin keratinocytes by increasing vitamin C uptake via the redistribution of SVCT-1 from the cytosol to the membrane. *J Invest Dermatol* 2007, 127:698–706.
- ¹⁰⁶ Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G: Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J* 2003, 22:1313–1324.
- ¹⁰⁷ Deak M, Clifton A D, Lucocq L, Alessi D R: Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 1998, 7:4426–4441.
- ¹⁰⁸ McCoy C E, Campbell D G, Deak M, Bloomberg G B, Arthur J S: MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochem J* 2005, 387: 507–517.
- ¹⁰⁹ Del Bino S, Vioux C, Rossio-Pasquier P, Jomard A, Demarchez M, Asselineau D, Bernerd F: Ultraviolet B induces hyperproliferation and modification of epidermal differentiation in normal human skin grafted on to nude mice. *Br J Dermatol* 2004, 150:658–667.
- ¹¹⁰ Reichert U, Michel S, Schmidt R: The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes. In: Darmon M, Blumenberg M, editors. *Molecular Biology of the Skin*. New York: Academic Press; 1993. pp. 107–150.
- ¹¹¹ Kim H C, Idler W W, Kim I G, Han J H, Chung S I, Steinert P M: The complete amino acid sequence of the human transglutaminase enzyme deduced from the nucleic acid sequences of cDNA clones. *J Biol Chem* 1991, 266:536–539.
- ¹¹² Candi E, Melino G, Mei G, Tarcsa E, Chung S I, Marekov L N, Steinert P M: Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J Biol Chem* 1995, 270:26382–26390.
- ¹¹³ Candi E, Oddi S, Terrinoni A, Paradisi A, Ranalli M, Finazzi-Agro A, Melino G: Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin, and small proline-rich

-
- proteins in vitro. *J Biol Chem*.2001,276:35014–35023.
- ¹¹⁴ Candi E, Schmidt R, Melino G: The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*.2005,6:328–340.
- ¹¹⁵ Parenteau NL, Pilato A, Rice RH: Induction of keratinocyte type-I transglutaminase in epithelial cells of the rat. *Differentiation* 1986,33:130–141.
- ¹¹⁶ Kim SY, Chung SI, Yoneda K, Steinert PM: Expression of transglutaminase 1 in human epidermis. *J Invest Dermatol*.1995,04:211–217.
- ¹¹⁷ Rubin AL, Rice RH: Differential regulation by retinoic acid and calcium of transglutaminases in cultured neoplastic and normal human keratinocytes. *Cancer Res*.1986,46:2356–2361.
- ¹¹⁸ Lichti U, Yuspa SH: Modulation of tissue and epidermal transglutaminases in mouse epidermal cells after treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and/or retinoic acid in vivo and in culture. *Cancer Res*.1988,48:74–81.
- ¹¹⁹ Hitomi K, Horio Y, Ikura K, Yamanishi K, Maki M: Analysis of epidermal-type transglutaminase(TGase3) expression in mouse tissues and cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*.2001,33:491–498.
- ¹²⁰ John S, Thiebach L, Frie C, Mokkapati S, Bechtel M, Nischt R, Rosser-Davies S, Paulsson M, Smyth N: Epidermal transglutaminase(TGase 3) is required for proper hair development, but not the formation of the epidermal barrier. *PLoS One* 2012,7:e34252.
- ¹²¹ Takahashi H, Aoki N, Nakamura S, Asano K, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Cornified cell envelope formation is distinct from apoptosis in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*.2000,23:161–169.
- ¹²² Del Bino S, Vioux C, Rossio-Pasquier P, Jomard A, Demarchez M, Asselineau D, Bernerd F: Ultraviolet B induces hyperproliferation and modification of epidermal differentiation in normal human skin grafted on to nude mice. *Br J Dermatol*. 2004,150:658–667.
- ¹²³ Yoon JH, Lim TG, Lee KM, Jeon AJ, Kim SY, Lee KW: Tangeretin reduces ultraviolet B (UVB)-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse epidermal cells by blocking mitogen-activated protein kinase(MAPK) activation and reactive oxygen species(ROS) generation. *J Agric Food Chem*.2010,59:222–228.
- ¹²⁴ Terazawa S, Nakajima H, Shingo M, Niwano T, Imokawa G: Astaxanthin attenuates the UVB-induced secretion of prostaglandin E2 and interleukin-8 in human keratinocytes by interrupting MSK1 phosphorylation in a ROS depletion-independent manner. *Exp Dermatol*.2012,21 Suppl 1:11–17.
- ¹²⁵ Ryborg AK, Johansen C, Iversen L, Kragballe K: Lysophosphatidylcholine induces keratinocyte differentiation and upregulation of AP-1- and NF-kappaB DNA-binding activity. *Acta Derm Venereol*.2004,84:433–438.
- ¹²⁶ Jessen BA, Qin Q, Phillips MA, Phillips DL, Rice RH: Keratinocyte differentiation marker suppression by arsenic: mediation by AP1 response elements and antagonism by tetradecanoylphorbol acetate. *Toxicol Appl Pharmacol*.2001,174:302–311.
- ¹²⁷ Rossi A, Catani MV, Candi E, Bernassola F, Puddu P, Melino G: Nitric oxide inhibits cornified envelope formation in human keratinocytes by inactivating transglutaminases and activating protein 1. *J Invest Dermatol*.2000,115:731–739.
- ¹²⁸ Rossi A, Jang SI, Ceci R, Steinert PM, Markova NG: Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal human epidermal

-
- keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998, 110:34–40.
- ¹²⁹ T Gong R, Rifai A, Ge Y, Chen S, Dworkin LD: Hepatocyte growth factor suppresses proinflammatory NF-kappaB activation through GSK3beta inactivation in renal tubular epithelial cells. *J Biol Chem.* 2008, 283:7401–7410.
- ¹³⁰ Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W: I-kappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem.* 1999, 274:30353–30356.
- ¹³¹ Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P: Transcriptional activation of the NF- κ B p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* 2003, 22:1313–1324.
- ¹³² Zhong H, Voll RE, Ghosh S: Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1998, 1:661–671.
- ¹³³ Reber L, Vermeulen L, Haegeman G: Ser276 phosphorylation of NF- κ B p65 by MSK1 controls expression in inflammation. *PLoS One* 2009, 4:4393.
- ¹³⁴ Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR: Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 1998, 17:4426–4441.
- ¹³⁵ McCoy CE, Campbell DG, Deak M, Bloomberg GB, Arthur JSE: MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochem J.* 2005, 387:507–517.
- ¹³⁶ McCoy CE, Macdonald A, Morrice NA, Campbell DG, Deak M, Toth R, McIlrath J, Arthur JSC: Identification of novel phosphorylation sites in MSK1 by precursor ion scanning MS. *Biochem J* 2007, 402:491–501.
- ¹³⁷ Nakajima H, Wakabayashi Y, Wakamatsu K, Imokawa G: An extract of *Melia toosendan* attenuates endothelin-1-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through the interruption of PKC activity within melanocytes. *Arch Dermatol Res* 2011, 303:263–276
- ¹³⁸ Yokota Y, Bargagna-Mohan P, Ravindranath PP, Kim KB, Mo-han R: Development of withaferin A analogs as probes of angiogenesis. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16:2603–2607
- ¹³⁹ Kaileh M, Vanden BW, Heyerick A, Horion J, Piette J, Libert C, De Keukeleire D, Essawi T, Haegeman G (2007) Withaferin A strongly elicits I-kappaB kinase beta hyperphosphorylation concomitant with potent inhibition of its kinase activity. *J Biol Chem* 282:4253–4264
- ¹⁴⁰ Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA: Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 1996, 137:1627–33.
- ¹⁴¹ Imokawa G, Yada Y, Morisaki N, Kimura M. Granulocyte/macrophage-colony-stimulatory factor is an intrinsic keratinocyte-derived growth factor for human melanocytes in UVA-induced melanosis. *Biochem J* 1996, 313:625–31.