

ピリドキシンのフィラグリン増強作用と
皮膚への応用に関する研究

2021年9月

埼玉大学大学院理工学研究科 (博士後期課程)
生命科学専攻 (主指導教員 坂田一郎教授)

藤代 美有紀

要旨

ピリドキシシン (Pyridoxine, PN) は、ビタミン B6 様活性を有する vitamers (ビタミン) の 1 種である。PN が不足すると皮膚トラブルや脂漏性皮膚炎を引き起こし、臨床的に PN がニキビや肌荒れの治療に用いられる。しかしながら、表皮・角層の機能に対する PN の作用機序は詳細には明らかになっていない。そこで本研究では、表皮・角層の機能に対する PN の作用を明らかにするために、正常表皮細胞 (以下 NHEKs) および株化表皮細胞 (以下 HaCaT 細胞) を用いて検討した。また、PN は水溶性であるために脂溶性の高い角層に移行しにくく、経皮塗布で十分な効果が発揮されにくいと考えられることから、PN 誘導体 (トリスヘキシルデカン酸 PN, 以下 VB6-IP と略す) の三次元培養ヒト皮膚モデル (以下 3D Skin と略す) およびヒト皮膚に対する作用を検討した。

第一章では、PN の NHEKs に対する作用を検討した結果を述べている。PN は NHEKs における表皮分化マーカーの中で、プロフィラグリン mRNA 発現のみを増加させた。また、PN 処理は NHEKs のフィラグリンタンパク質産生量も濃度依存的に増加させた。一方、NHEKs に P2X 受容体アンタゴニストである pyridoxal phosphate-6-azo (benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate, 以下 PPADS) および 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate tetrasodium salt (以下 TNP-ATP) を処理すると、PN と効果と同様にフィラグリンタンパク質量が増加した。さらに、PN により増加したフィラグリンタンパク質は ATP (P2X 受容体のアゴニスト) によって抑制された。以上のことより、PN はフィラグリン遺伝子発現とタンパク質産生を増加させること、また、PN 誘導性フィラグリンタンパク質産生増加作用は P2X 受容体を介した作用であることが示唆された。

第二章では、PN の HaCaT 細胞に対する作用を検討した結果を述べている。PN は HaCaT 細胞のプロフィラグリン mRNA 発現を増加させたが、フィラグリンタンパ

ク質産生量は変化させなかった。また、PNによって増加したプロフィラグリン mRNA に対し、ATP 処理で抑制されなかった。以上より、HaCaT 細胞と正常表皮細胞で PN によるフィラグリンへの作用は異なることが示唆された。

第三章では、VB6-IP の 3D skin およびヒト皮膚に対する作用を検討した結果を述べている。VB6-IP は、NHEKs のプロフィラグリン mRNA 発現およびタンパク質産生量を増加させ、PN と同様の作用を有していた。また、1.5mM の VB6-IP を 3D skin の角層側から処理し、フィラグリンタンパク質に対する免疫組織化学を実施したところ、3D Skin の顆粒層上層および角層の一部にフィラグリンタンパク質産生が誘導された。VB6-IP と同じ条件で PN を 3D skin に処理した結果、誘導されたフィラグリンタンパク質産生の局在は、顆粒層の一部に限定され、VB6-IP により誘導されたフィラグリン産生領域よりも狭かった。また、フィラグリンタンパク質に由来する蛍光強度は、PN 処理条件よりも VB6-IP 処理条件で高かった。以上のことから、3D skin におけるフィラグリンタンパク質産生増加作用は PN よりも VB6-IP の方が顕著であった。さらに、ヒトで 3% の VB6-IP を配合した製剤を皮膚に 4 週間使用した結果、VB6-IP 配合製剤はプラセボ製剤と比較して有意に皮膚表面水分量が増加していた。VB6-IP による皮膚表面水分量の増加は、VB6-IP がヒト皮膚表皮細胞に作用しフィラグリンタンパク質産生を増加させ、その後角質細胞に分化する過程でアミノ酸に分解されることで保湿作用が増加したためであることが示唆された。

本研究により、PN が NHEKs のプロフィラグリン mRNA 発現とタンパク質産生を増加させること、また、P2X 受容体アンタゴニストに PN と同様の作用があることが明らかになった。このことは、PN が P2X 受容体に対し拮抗的に作用することを示唆しており、PN は ATP に誘導されたサイトカインやケモカインの産生と放出を抑制することでフィラグリンを増加させた経路の可能性が示唆される。また、角層移行性の高い VB6-IP は、ヒト皮膚の表皮細胞におけるフィラグリンタンパク質産生を増加さ

せることで、皮膚角層水分量の増加をもたらしたと考えられるため、VB6-IP は経皮投与して効果を発揮するフィラグリン増加成分として期待される。

要旨.....	1
序論.....	7
第一章 NHEKs における PN の作用検討.....	10
第一節 緒言.....	11
第二節 材料と方法.....	13
細胞培養.....	13
試薬.....	13
表皮細胞特異的分化マーカー発現に対する PN の作用.....	14
プロフィラグリン mRNA 発現に対する PN の作用.....	14
細胞内カルシウムイオン流入に対する PN の作用.....	14
細胞増殖と形態に対する PN の作用.....	15
フィラグリンタンパク質産生に対する PN の作用.....	16
フィラグリンタンパク質産生に対する P2X 受容体アンタゴニストの作用.....	16
PN によって増加したフィラグリンタンパク質産生に対する ATP の作用.....	17
PN によって増加したプロフィラグリン mRNA 発現に対する ATP の作用.....	17
フィラグリンタンパク質産生に対する ATP の作用.....	18
ドットプロット.....	18
定量 PCR.....	19
統計解析.....	20
第三節 結果.....	21
表皮細胞特異的分化マーカー発現に対する PN の作用.....	21
PN の NHEKs 分化に対する作用.....	21
プロフィラグリン mRNA 発現に対する PN 処理時間の検討.....	22
フィラグリンタンパク質産生に対する PN の作用.....	22

フィラグリントタンパク質産生に対する P2X 受容体アンタゴニストの作用	22
PN 誘導性プロフィラグリ mRNA 増加に対する ATP の作用	22
フィラグリントタンパク質産生に対する ATP の作用	23
第四節 考察	24
第二章 HaCaT 細胞における PN の作用検討	29
第一節 緒言	30
第二節 材料と方法	32
細胞培養	32
試薬	32
プロフィラグリ mRNA 発現に対する PN の作用	33
フィラグリントタンパク質産生に対する PN の作用	33
PN によって増加したプロフィラグリ mRNA に対する ATP の作用	33
ドットプロット	34
定量 PCR	35
統計解析	36
第三節 結果	37
プロフィラグリ mRNA に対する PN の作用	37
フィラグリントタンパク質産生に対する PN の作用	37
PN によって増加したプロフィラグリ mRNA に対する ATP の作用	37
第四節 考察	38
第三章 PN 誘導体の正常表皮細胞からヒト皮膚への作用検討	40
第一節 緒言	41
第二節 材料と方法	43
細胞培養	43
試薬	43

プロフィラグリン mRNA 発現に対する VB6-IP の作用.....	44
フィラグリンタンパクレベルに対する VB6-IP の作用	44
3D Skin におけるフィラグリンタンパク発現に対する作用.....	45
ドットプロット	45
定量 PCR.....	46
ヘマトキシリン・エオジン染色.....	47
免疫組織化学染色.....	47
臨床試験.....	48
統計解析.....	48
第三節 結果.....	50
NHEKs におけるプロフィラグリン mRNA 発現に対する VB6-IP の作用	50
NHEKs におけるフィラグリンタンパク質産生に対する VB6-IP の作用	50
3D Skin におけるフィラグリンタンパク質産生に対する作用 (Fig. 14 A-F).....	50
ヒト皮膚に対する VB6-IP 配合製剤の保湿作用	50
第四節 考察.....	52
総括.....	56
謝辞.....	58
引用文献.....	59
図.....	65

序論

ビタミン B6 (VB6) は、1930 年代に Rudolf Peters が報告したチアミンとリボフラビンのみの栄養源で生育したラットが発症する先端疼痛症 (重大な皮膚病変伴う) を改善する因子として発見された。その後、VB6 活性を有する物質としてピリドキシン (PN)、ピリドキサル (PL)、ピリドキサミン (PM) が同定された。PN、PL そして PM は、細胞内でピリドキサル-5 リン酸に代謝され、補酵素としての活性を有し、アミノ酸代謝、脂質代謝、糖新生などの反応を仲介する [1]。皮膚科学分野では、ヒトで PN が不足すると脂漏性皮膚炎 [2] や口内炎 [3] が誘発されること、また、脂漏性皮膚炎に対し 1~2 % の PN を配合した軟膏を用いたところ、1~2 週間で、紅斑、落屑、痂皮が改善し、3 週間後に全快したという PN 軟膏の効果 [4] が示されている。このように PN は古くから皮膚炎や口内炎などに臨床応用されているが、症状改善のメカニズムの詳細はよくわかっていない。そこで、本研究では、PN がヒト正常表皮細胞 (NHEKs) や表皮株化細胞である HaCaT 細胞に対する作用機序を明らかにすることを目的とした。

ヒト皮膚の表皮層は基底側から、基底層、有棘層、顆粒層と層状に細胞が並んで構成されており、最外層に角層が存在している [5]。基底層の細胞のみが分裂し、細胞は分化を始めると増殖活性を失い、細胞接着特性が変化して基底層から離脱し、角層側へと押し上げられる。その間、表皮細胞内では分化プロセスが進行し、皮膚バリアを形成するために必要な酵素やタンパクの産生、脂質の貯留などが起こる [6-9]。顆粒層までは生細胞から成っているが、角質細胞は死細胞であり、角層は外界と体内環境を隔てる皮膚バリアとして機能している。

皮膚バリアは、角質細胞とその細胞間が脂質で埋められた構造をしており、しばしば煉瓦とモルタルモデルとして説明され [10]、その機能は①周辺帯によるバリア、②角質細胞内アミノ酸・有機酸によるバリア、③角質細胞間脂質によるバリアで

ある。周辺帯は、有棘細胞で産生する周辺帯関連タンパク質が細胞膜領域に集まり、顆粒細胞を経て角質細胞へと分化していく過程の中で、周辺帯関連タンパク質がトランスグルタミナーゼにより架橋され、構造体を形成し、角質細胞を裏打ちすることにより形成される [11]。周辺帯を形成する主要なタンパク質は、インボルクリン、ロリクリン、エラフィン、スモールプロリンリッチプロテインであり、周辺帯は、角質細胞の物理的な強度を維持することに加えて、角質細胞間脂質のラメラ構造の足場として機能する [12]。

角質細胞内には、遊離アミノ酸やウロカニン酸などの有機酸が存在し、バリア機能を担っている。角層表層の角質細胞に存在する吸湿性アミノ酸は、水分を保持することにより角層の湿度を維持し [13]、柔軟な皮膚組織構造を維持している。また、ヒスチジンが代謝されて生成されるウロカニン酸は紫外線吸収性能を有し、紫外線防御としてのバリアとして機能している [14]。さらに、グルタミンから生成されるピロリドンカルボン酸 (PCA) などの有機酸により皮膚表面の pH は弱酸性に保たれる。弱酸性に保たれた皮膚表面の pH は、抗微生物効果を発揮し [15]、セラミド代謝酵素の活性化などに関与していることが報告されている [16]。

角質細胞間脂質は、角質細胞の細胞間スペースに充填されている脂質のことで、その主成分は、セラミド、遊離脂肪酸、コレステロールである。これらの脂質は、表皮顆粒細胞内で合成された後に小胞に貯留され、角層直下で内容物が細胞外に分泌される [17]。分泌された脂質は脂質ラメラ構造を形成しており、これまでに結晶構造の詳細な解析が行われている。結晶構造の違いにより、角層の物質透過性が変化するなど、脂質ラメラ構造とバリア機能の関係性の詳細が明らかになっている [18]。

以上の皮膚バリア機能の本質と考えられている、周辺帯、アミノ酸・有機酸、角質細胞間脂質の構成因子は、一連の表皮分化プロセスで表皮細胞内に連続的に発現する。また、何らかの要因により皮膚バリア機能が低下すると皮膚内部で炎症が発生

することから、PNの皮膚炎改善作用は、フィラグリンをはじめとする皮膚バリア機能(表皮細胞の分化)に影響を与えているのではないかと仮説を立て、研究を行った。

第一章 NHEKs における PN の作用検討

第一節 緒言

PNは、アミノ酸や脂質代謝に関与し、生体内のホメオスタシス維持に必須の成分である。皮膚では、PNの欠乏は脂漏性皮膚炎 [2]、口内炎 [3]を引き起こし、これらの病変にPNを経皮塗布することで症状が改善されることが示されている [19]。また、ニキビや肌荒れ改善剤としてPNが治療薬として使用されることもある。上記の臨床知見は、PNが表皮・角層の機能維持に重要な役割を果たしていることを強く支持しているが、その作用機序の詳細については未だ明らかになっていない。

フィラグリンは、表皮細胞の最終分化段階で、角質細胞の中でケラチン繊維の凝集に関与している凝集タンパク質として発見された [20]。フィラグリンは、表皮顆粒細胞のケラトヒアリン顆粒の中で、巨大分子のプロフィラグリン (>350 kDa) として合成される [21]。プロフィラグリンには、フィラグリンモノマーが複数含まれており [22]、そのセリン残基が高度にリン酸化されているため、ケラチンを凝集することができない [22, 23]。プロフィラグリンは顆粒細胞から角質細胞へと移行する際に、脱リン酸化と数段階のタンパク質分解を経て、フィラグリンモノマーに代謝される [21, 22, 24]。フィラグリンモノマーは角質細胞でケラチンフィラメントを束ね、角質細胞のさらなる成熟化過程でペプチダーゼによる分解を受け、ポリペプチドを経てアミノ酸や有機酸などに分解される [25, 26]。角層表層の角質細胞に存在する吸湿性アミノ酸は、水分を保持することで角層の湿度を維持し [13]、柔軟な皮膚組織構造を形成している。また、ヒスチジンが代謝されて生成されるウロカニン酸は紫外線吸収性能を有し、紫外線防御バリアとして機能している [14]。さらに、グルタミンから生成されるピロリドンカルボン酸 (PCA) などの有機酸は皮膚表面の pH を弱酸性に保ち、抗微生物効果や [15]、セラミド代謝酵素の活性化などに関与していることが報告されている [16]。

一方、表皮剥離性角質増殖症 (epidermolytic hyperkeratosis) や葉状魚鱗癬 (lamellar ichthyosis) などの皮膚疾患では、プロフィラグリントタンパク質がフィラグリントタンパク質に分解されずに皮膚中に蓄積しており、表皮の機能維持にフィラグリントタンパク質が重要な機能を担っていることが示唆される [27]。また、アトピー性皮膚炎患者では病変部位、非病変部位に関わらず皮膚組織中のフィラグリントタンパク質産生量が低下している [28] ことや、アイルランド人のアトピー性皮膚炎およびスコットランド人のアトピー性皮膚炎と喘息合併例におけるフィラグリント遺伝子変異に相関関係が示され、アトピー性皮膚炎とフィラグリントの関連性も示唆されている [29]。

表皮最終分化段階では、フィラグリントタンパク質はセリンプロテアーゼやリパーゼなどの脂質代謝酵素や [30]、周辺帯を形成するために必要なタンパク質と共に顆粒細胞で産生される [31]。表皮最終分化段階で産生される転写因子の機能や調節メカニズムについては、例えば、P63 欠損マウスの皮膚は、発生初期段階で発生が進まず、皮膚の重層化が欠落し、分化マーカーの発現が認められない [32] ことや、Notch シグナルは分化の最終段階に関与し [33]、胚発生時の表皮において亢進されていることが報告されている [33, 34]。一方、フィラグリント遺伝子の転写調節メカニズムは十分に理解されていない。そこで、PN の表皮機能に対する作用を明らかにするために、はじめに PN による NHEKs の表皮分化マーカー mRNA 発現の検討を行った。次に、PN によるプロフィラグリント mRNA 発現とフィラグリントタンパク質産生を検討した。さらに、フィラグリントタンパク質産生における P2X 受容体の関与を調べた。

第二節 材料と方法

細胞培養

正常ヒト新生児表皮角化細胞 (NHEKs) および MCDB153-modified specific medium HuMedia KG-2 (以下、KG2 と表記する) はラボウから購入した。NHEKs は、KG2 を用い、37 °C、5 % CO₂ 環境下で培養した。NHEKs に添加した試薬 (PN, ATP, PPADS, TNP-ATP) は、ウシ下垂体抽出物 (bovine pituitary extract, BPE) を含有しない KG2 (以下、KG2(-BPE) と表記する) に溶解し孔径 0.22 μm の PVDF メンブレン (マイクロレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを用いた。

試薬

ピリドキシン塩酸塩 (PN, P9755)、アデノシン 5'-三リン酸二ナトリウム水和物 (ATP, A2383)、ピリドキサーリン酸-6-アゾ(ベンゼン-2,4-ジスルホン酸) 四ナトリウム塩水和物 (PPADS, P178)、2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate tetrasodium salt (TNP-ATP, SML0740)、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF, P7626)、カルシウムイオノフォア A23187 (C7522) は Sigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。Triton X-100 (A16046) は、和光純薬 (東京、日本) から購入した。Fura-2-AM (細胞内カルシウムイオン測定試薬, F015) は同仁化学研究所 (熊本、日本) から購入した。塩化カルシウム溶液 (16973-64) はナカライテクス (京都、日本) から購入した。TaqMan™ Gene Expression Cells-to-CT™ Kit (AM1728) , TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (4352042), TaqMan® Gene Expression Assay, TaqMan® Endogeneous Controls および Pierce™ BCA Protein Assay kit (23227) は、サーモフィッシャー (神奈川、日本) から購入した。抗ヒトフィラグリン抗体 (Anti-filaggrin antibody (sc-80609, Lot. C2817)) は、サンタクルーズバイオテクノロジー (Dallas, TX, USA) から、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗マウス Ig-G (ヒストファインシンプルステイ

ン MAX-PO(M), 424131) は、ニチレイバイオサイエンス (東京、日本) から、電気化学発光試薬 (Lumi-Light Western blotting substrate, 12015200001) は Roche Diagnostics (Indianapolis, IA, USA) から購入した。

表皮細胞特異的分化マーカー発現に対する PN の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.5×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。KG2(-BPE) に PN を 200 μ M となるように溶解し孔径 0.22 μ m の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し 24 時間培養した。24 時間培養後、定量 PCR の項に示した手順でプロフィラグリン (FLG), セリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPTLC), ケラチン 10 (K10) インボルクリン (INV), コルネオデスモシン (CDSN) およびロリクリン (LOR) mRNA 発現に対する定量 PCR を実施した。

プロフィラグリン mRNA 発現に対する PN の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.5×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。KG2(-BPE) に PN を 200 μ M となるように溶解し、孔径 0.22 μ m の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加した。6、12、24 あるいは 48 時間培養した後、定量 PCR の項に示した手順で FLG mRNA 発現に対する定量 PCR を実施した。

細胞内カルシウムイオン流入に対する PN の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 2.0×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。Fura-2-AM を 3 mM となるように DMSO に溶解したものを Fura-2-AM のストック溶液とした。20 mM HEPES (pH 7.4) (以下 HEPES と表記する) に Fura-2-AM ストック溶液を 1000 倍希釈して加えワーキング溶液とした (Fura-2-AM

濃度は 3 μM)。播種後の NHEKs に対し Fura-2-AM ワーキング溶液を 1 well あたり 100 μL ずつ添加後、1 時間培養した。細胞を 1 well あたり 200 μL の PBS(-) にて洗浄後、0.03 mM 塩化カルシウムを含有した HEPES に所定濃度の PN を溶解したもの、あるいは陽性対照としてカルシウムイオノフォア A23187 を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように溶解したものを 1 well あたり 100 μL ずつ添加し、さらに 1 時間培養した。続いて細胞を 1 well あたり 200 μL の PBS(-) にて洗浄後、0.5 % 無蛍光 Triton X-100 を含有した HEPES を 1 well あたり 100 μL ずつ添加し 37 °C で 30 分間静置して細胞を溶解した。溶解液の蛍光強度 (Ex=340 nm, Em=510 nm) をマイクロプレートリーダー (EnSpire 2300, パーキンエルマー) で測定した。また、細胞溶解液のタンパク質量を Pierce™ BCA Protein Assay kit を用いて定量した。具体的な手順は以下の通りである。細胞溶解液および BSA 標準溶液それぞれ 100 μL に対し、Pierce™ BCA Protein Assay kit のプロトコールに従って調整した BCA Reagent を 100 μL ずつ添加し混合した後、37 °C で 30 分間反応させ、混合液の 550 nm 吸光度をマイクロプレートリーダー (EnSpire 2300, パーキンエルマー) で測定した。細胞内に流入したカルシウムイオン量は、単位タンパク量当たりの蛍光強度に換算し、未処理細胞の値を 100 とした相対値 (インデックス) で表した。

細胞増殖と形態に対する PN の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 12 穴プレートに 4.2×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (1 mL / well)。KG2(-BPE) に PN を 200 μM となるように溶解し、孔径 0.22 μm の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 1 mL ずつ添加し 72 時間培養した。陽性対照として KG2(-BPE) に塩化カルシウムを 1.8 mM となるように溶解し、孔径 0.22 μm の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを調整し、1 well あたり 1 mL ずつ添加し 72 時間培養した。72 時間培養後の細胞数は以下の手順で計測した。0.025 % トリプシン / 0.01 % EDTA を 1 well あ

たり 500 μL 添加し 37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間処理し、処理後 FBS を 1 % 含有する PBS を 1 well あたり 500 μL ずつ添加し酵素反応を止め軽くピペッティングを行い、細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液の細胞数は血球計算板を用い計測した。また 72 時間培養後の NHEKs の形態は光学顕微鏡 (Axiovert S100、ZEISS) を用いて観察し、デジタルカメラ (DS-Ri1、Nikon) を用いて写真撮影を行った。

フィラグリンタンパク質産生に対する PN の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.0×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μL / well)。KG2(-BPE) に所定濃度の PN を溶解し、孔径 0.22 μm の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μL ずつ添加し 72 時間培養した。細胞を 1 well あたり 200 μL の PBS(-) にて洗浄後、Triton X-100 を 0.5 % と PMSF を 2 mM となるように PBS に溶解したものを 1 well あたり 100 μL ずつ添加し、プローブ式ソニケーション (ULTRASONIC HOMOGENIZER, SMT company) を用い 1 well あたり 10 秒間細胞破碎処理し細胞溶解液を得た。その後ドットブロットの項に示した手順でフィラグリンタンパク質産生に対するドットブロットを実施した。

フィラグリンタンパク質産生に対する P2X 受容体アンタゴニストの作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.0×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μL / well)。KG2(-BPE) に所定濃度の P2X 受容体アンタゴニスト (PPADS, TNP-ATP) を溶解し、孔径 0.22 μm の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μL ずつ添加し 72 時間培養した。細胞を 1 well あたり 200 μL の PBS(-) にて洗浄後、Triton X-100 を 0.5 % と PMSF を 2 mM となるように PBS に溶解したものを 1 well あたり 100 μL ずつ添加し、プローブ式ソニケーション (ULTRASONIC HOMOGENIZER, SMT company) を用い 1 well あたり

10 秒間細胞破碎処理し細胞溶解液を得た。その後ドットブロットの項に示した手順でフィラグリンタンパク質産生に対するドットブロットを実施した。

PN によって増加したフィラグリンタンパク質産生に対する ATP の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.0×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。KG2(-BPE) に PN を 200 μ M となるように溶解し、孔径 0.22 μ m の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し 72 時間培養した。72 時間培養後、KG2(-BPE) に所定濃度の ATP を溶解しフィルター滅菌したもので培地交換し (1 well あたり 100 μ L) さらに 24 時間培養した。細胞を 1 well あたり 200 μ L の PBS(-) にて洗浄後、Triton X-100 を 0.5 % と PMSF を 2 mM となるように PBS に溶解したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し、プローブ式ソニケーション (ULTRASONIC HOMOGENIZER, SMT company) を用い 1 well あたり 10 秒間細胞破碎処理し細胞溶解液を得た。その後ドットブロットの項に示した手順でフィラグリンタンパク質産生に対するドットブロットを実施した。

PN によって増加したプロフィラグリン mRNA 発現に対する ATP の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.5×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。KG2(-BPE) に PN を 200 μ M となるように溶解し、孔径 0.22 μ m の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し 24 時間培養した。24 時間培養後、KG2(-BPE) に ATP を 100 μ M となるように溶解しフィルター滅菌したもので培地交換し (1 well あたり 100 μ L) さらに 24 時間培養した。その後定量 PCR の項に示した手順で FLG mRNA 発現に対する定量 PCR を実施した。

フィラグリンタンパク質産生に対する ATP の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.0×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。KG2(-BPE) に所定濃度の ATP を溶解し、孔径 0.22 μ m の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し 72 時間培養した。細胞を 1 well あたり 200 μ L の PBS(-) にて洗浄後、Triton X-100 を 0.5 % と PMSF を 2 mM となるように PBS に溶解したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し、プローブ式ソニケーション (ULTRASONIC HOMOGENIZER, SMT company) を用い 1 well あたり 10 秒間細胞破碎処理し細胞溶解液を得た。その後ドットブロットの項に示した手順でフィラグリンタンパク質産生に対するドットブロットを実施した。

ドットブロット

細胞溶解液を孔径 0.45 μ m のニトロセルロースメンブレン (BIO-RAD, 162-0145) に 2 μ L ずつ直接ブロットし、室温で一晩乾燥させた。細胞溶解液がブロットされたメンブレンをブロッキング溶液 (1% ウシ血清アルブミン含有 PBS) に浸漬し室温で振とうしながら 1 時間ブロッキングした。その後メンブレンを 0.1 % Triton X-100 を含む PBS(-) で室温 10 分間洗浄し、PBS(-) で 4000 倍希釈した抗ヒトフィラグリン抗体を室温で 1 時間反応させた。メンブレンを 0.1 % Triton X-100 を含む PBS(-) で室温 10 分間 2 回洗浄し、PBS(-) で 100 倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗マウス Ig-G を室温で 1 時間反応させた。メンブレンを 0.1 % Triton X-100 を含む PBS(-) で室温 10 分間 2 回洗浄し、電気化学発光試薬をインストラクションに従って調整しメンブレン上に滴下し室温で 5 分反応させた。試薬反応後のメンブレンはライトキャプチャー (CoolSaver AE-955, ATTO) を用いて発光輝度を検出した。また、細胞破碎液のタンパク質量を Pierce™ BCA Protein Assay kit を用いて定量した。具体的な手順は以下の通りである。細胞破碎液および BSA 標準溶液それぞれ 100 μ L に対し、

Pierce™ BCA Protein Assay kit のインストラクションに従って調整した BCA Reagent を 100 μ L ずつ添加し混合した後、37 °C で 30 分間反応させ、混合液の 550 nm 吸光度をマイクロプレートリーダー (EnSpire 2300, パーキンエルマー) で測定した。フィラグリタンパク質量は、単位タンパク量当たりの化学発光強度に換算し未処理細胞の値を 100 とした相対値 (インデックス) で表した。

定量 PCR

細胞は 1 well あたり 200 μ L の PBS(-) にて洗浄したのち、TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit のプロトコールに従い cDNA を作成した。具体的な手順は以下の通りである。1 well あたり 30 μ L の DNase 1 を含む Lysis solution を加えプレートシェーカーにて室温 1 分溶解処理を行い、さらに室温で 4 分間静置した。1 well あたり 3 μ L の stop solution を加えタッピング混和し室温にて 2 分間静置したものを細胞溶解液とした。10 μ L の細胞溶解液に対し 40 μ L の RT Master Mix solution を加えボルテックス混合後、サーマルサイクラー (T3 Thermocycler, Biometra) を用いて RT 反応を行い cDNA を得た。RT 反応は 37 °C で 60 分間行い、その後酵素活性失活のために 95 °C で 5 分間反応させた。得られた cDNA を鋳型として、TaqMan® Fast Univ. Gene Expression Master Mix および TaqMan® Gene Expression Assays を用いプロトコールに従って各遺伝子に対する定量 PCR を実施した (StepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific))。4 μ L の cDNA に対し、16 μ L の PCR Cocktail を加えボルテックス混合した後、StepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、95 °C で 20 秒、95 °C で 1 秒、62 °C で 20 秒とし、40 サイクルの条件で定量 PCR を実施した。解析対象の各遺伝子は TaqMan® Gene Expression Assays の KRT10 (Hs00166289_m1), FLG (Hs00856927_g1), SPTLC (Hs00272311_m1), IVN (Hs00902520_m1), CDSN (Hs00169911_m1), LOR (Hs01894962_s1) を用い、コントロールのハウスキーピング遺

伝子は TaqMan® Endogeneous Controls (Applied Biosystems) の Cyclophilin A (PPIA, Hs04194521_s1) を用いた。解析は $\Delta \Delta$ CT 法を用いて実施し、未処理細胞の値を 1 とした相対値で表した。

統計解析

すべてのデータは平均±標準誤差で表した。データ解析には、GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., CA, USA) を用いた。統計解析は、2 群間比較ではスチューデント t 検定を実施し、3 群以上の比較では一元配置分散分析に続いてターキーの多重比較検定を実施し、 $p < 0.05$ を統計的有意とした。

第三節 結果

表皮細胞特異的分化マーカー発現に対する PN の作用

NHEKs に対し 200 μM PN を 24 時間処理した結果、プロフィラグリン mRNA の発現量は未処理と比較して 1.24 倍に有意に増加した。一方、SPTLC、K10、INV、CDSN および LOR mRNA の発現量は PN によって変化しなかった (図 1)。

PN の NHEKs 分化に対する作用

PN は NHEKs においてプロフィラグリン mRNA のみを有意に増加させ、その他の分化マーカー mRNA の発現量を変化させなかったため (図 1)、PN は表皮分化の進行に影響を与えていないことが示唆された。カルシウムイオンにより表皮分化が開始され、分化が進行すると表皮細胞の増殖活性が失われ、細胞形態が変化することが報告されている[35]。そこで、PN の表皮分化に対する影響を調べるために、NHEKs 細胞内カルシウムイオン流入に対する PN の影響と細胞増殖と形態に対する PN の作用を検討した。

NHEKs にカルシウムイオノフォアである A23187 を処理したところ、細胞内カルシウム流入量は 125.5 % となり、有意に増加していた。一方、NHEKs での PN によるカルシウムイオンの流入を検討した結果、50 μM 、100 μM および 200 μM の PN は細胞内カルシウム流入量を変化させなかった (図 2)。

PN による細胞増殖への効果を検討した結果、未処理条件では細胞播種時の細胞数が 72 時間で 4.2 倍に、200 μM PN 処理の 72 時間後では 3.9 倍に増加した。塩化カルシウム処理では 72 時間後の細胞数は 3.2 倍に増加したが、未処理及び PN 処理と比較して塩化カルシウム処理では有意に細胞数は少なかった (図 3A)。光学顕微鏡による観察では、塩化カルシウム処理により細胞形態の平坦化が見られたが、PN 処理の細胞は平坦化しておらず、未処理条件と同様の細胞形態であった (図 3B)。

プロフィラグリン mRNA 発現に対する PN 処理時間の検討

プロフィラグリン mRNA 発現に対する PN 処理時間の影響を定量 PCR により評価した。その結果、PN で 24 時間処理すると、プロフィラグリン mRNA 発現量を有意に増加させた。その他の処理時間 (6 時間、12 時間、48 時間) ではプロフィラグリン mRNA 発現量に変化は見られなかった (図 4)。

フィラグリンタンパク質産生に対する PN の作用

NHEKs に対する PN のフィラグリンタンパク質産生に対する作用をドットプロットにより評価した。その結果、50 μM ではフィラグリンタンパク質量の変化は見られなかったが、100 μM PN 処理ではフィラグリンタンパク質産生量は未処理と比較し 1.31 倍に有意に増加した。(図 5)。

フィラグリンタンパク質産生に対する P2X 受容体アンタゴニストの作用

P2X 受容体アンタゴニストである PPADS を NHEKs に処理した結果、40 μM と 80 μM の PPADS 処理ではフィラグリンタンパク質産生量に変化が見られなかったが、160 μM PPADS 処理で 1.27 倍の有意なフィラグリンタンパク質産生増加を示した (図 6A)。また、別の P2X 受容体アンタゴニストである TNP-ATP を処理した結果、3 μM と 6 μM の TNP-ATP 処理でフィラグリンタンパク質産生量に変化は見られなかったが、12 μM TNP-ATP 処理で 1.24 倍の有意なフィラグリンタンパク質産生を増加させた (図 6B)

PN 誘導性プロフィラグリン mRNA 増加に対する ATP の作用

PN によって増加したプロフィラグリン mRNA に対する ATP の作用を定量 PCR によって評価した。200 μM PN は、ATP 非存在下においてプロフィラグリン mRNA を

未処理と比較して 2.0 倍に有意に増加させた。一方、200 μM PN 処理後に 100 μM ATP を添加すると、200 μM PN によって増加したプロフィラグリン mRNA は 100 μM ATP により有意に抑制された (図 7)。

フィラグリンタンパク質産生に対する ATP の作用

200 μM PN は、ATP 非存在下と 25 μM ATP 存在下においてフィラグリンタンパク質を未処理と比較して有意に増加させた。一方、100 μM ATP 処理は、200 μM PN によって増加したフィラグリンタンパク質量を 200 μM PN + 0 μM ATP 条件と比較して 86.0 %に減少させた ($p=0.042$) (図 8A)。

また、PN を処理せずに NHEKs に対し ATP を処理したところ、フィラグリンタンパク質産生量は変化しなかった (図 8B)。

第四節 考察

PNのNHEKsに対する作用について

PNの表皮機能に対する作用を明らかにするために、はじめに、NHEKsにおけるPNの表皮マーカーmRNA発現に対する作用を調べた。先行研究では、プロフィラグリンmRNAは、皮膚組織においてプロフィラグリン以外の表皮分化マーカーと連動して発現することが報告されている[36][37]。また、*in vitro*のカルシウムイオン分化誘導刺激によって、分化に関連する複数の分化マーカーの遺伝子発現およびタンパク質産生が促進される[38]。本研究では、NHEKsにおいてPNが特異的にプロフィラグリンmRNAを増加させた一方、PNはプロフィラグリン以外の分化マーカーであるSPTLC、K10、INV、CDSNおよびLOR mRNAを増加させなかった。またPNはNHEKs細胞内カルシウムイオン流入を促進させなかった。加えて、PNのNHEKs増殖の程度や分化に関する影響を細胞数計測および細胞形態観察により検討した結果、PN処理したNHEKsが未処理と同程度の増殖活性を有しており、PN処理は表皮分化に特徴的な細胞形態に変化させなかった。以上の結果は、PNが表皮分化ではなくフィラグリン遺伝子転写活性を上げた可能性を支持している。

フィラグリンタンパク質産生の調節の意義

2006年にColin N A Palmerらは、フィラグリン遺伝子における二つの独立した機能喪失型遺伝子変異(R510Aと2282del14)が非常に強いアトピー性皮膚炎素因であることを報告した[29]。さらに、中程度から重症度のアトピー性皮膚炎のほとんどすべての症例でフィラグリンタンパク質産生量が減少していることが認められている[39]。これらの知見は、フィラグリンをアトピー性皮膚炎創薬ターゲットにすることが治療や予防に対して有効な戦略になる可能性を示しており、フィラグリンを標的にアトピー性皮膚炎に対する薬剤が開発されている。Th2型サイトカインであ

る IL-4 および IL-13 による JAK-STAT3 経路の活性化は表皮分化を阻害し、JAK 阻害剤によるこの経路の抑制がプロフィラグリン mRNA 発現およびフィラグリンタンパク質産生を増加させることで皮膚バリア機能を改善することから [40]、JAK 阻害剤がアトピー性皮膚炎の治療に用いられている [41, 42]。また JAK-STAT3 シグナル伝達経路は、IL-31 によるかゆみの誘発 [43] や IL-5 による好酸球の分化の誘導 [44]、IL-22 による表皮細胞の増殖 [45] など、アトピー性皮膚炎の病態形成に関わる複数のサイトカインのシグナル伝達において重要な役割を担っていることから、JAK 阻害剤はフィラグリン発現/産生増加以外の作用点も有し、オルミエント錠、コレクチム軟膏などの薬剤は中等症から重症のアトピー性皮膚炎患者を対象に有効性が確認されている。一方、リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid、以下 LPA と略す) と LPA 受容体 (LPAR1 と LPAR5) の選択的アゴニストが LPA 受容体を介し表皮分化を促進させ、プロフィラグリン mRNA 発現とフィラグリンタンパク質産生を増加させたことが示され、乾燥肌やアトピー性皮膚炎のバリア機能を改善する治療薬として期待されている [46]。また大塚らは、NHEKs のプロフィラグリン mRNA 発現促進作用を有する JTC801 (ノシセプチン受容体に対する選択的アンタゴニスト) が、表皮細胞分化を進行させることなくプロフィラグリン mRNA とフィラグリンタンパク質産生を増加させ、NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎様の皮膚炎発症を抑制したことを報告しており、JTC801 はアトピー性皮膚炎治療の薬剤候補となっている [47]。

以上をまとめると、フィラグリン増加をターゲットとしたアトピー性皮膚炎の改善には、(1) JAK 阻害剤によるアトピー性皮膚炎の病態形成に関わる様々なサイトカインシグナル伝達を抑制して改善するもの、(2) プロフィラグリン mRNA およびフィラグリンタンパク質産生を増加させてアトピー性皮膚炎を改善するもの、という先行報告がある。前述したように、(1) で示されている JAK 阻害剤は、アトピー性皮膚炎の病態形成に関わる様々なサイトカインシグナル伝達を抑制する薬剤で、中

等症から重症のアトピー性皮膚炎患者で効果が確認されているものである。一方、本研究の結果より、PNがプロフィラグリン mRNA 発現とタンパク質産生を増加させることが示され、PNによる表皮バリア機能の改善と角層保湿作用の向上が見込める。PNはJAK阻害剤と異なり、アトピー性皮膚炎において不足しているフィラグリンタンパク質のみを特異的に増加させるため、PNがアトピー性皮膚炎の軽微ないし軽度な状態を維持する目的で行われるスキンケアに用いることとのできる有望な化合物であることが示唆された。

フィラグリンタンパク質産生増加に対する P2X 受容体の機能

P2 受容体は、イオンゲートチャネルである P2X 受容体と G タンパク共役型受容体の P2Y 受容体に分類され、P2X 受容体は 7 つのサブタイプが [48]、P2Y 受容体は 8 つのサブタイプが [49, 50] 同定されている。P2X 受容体および P2Y 受容体のリガンドは ATP であるが、細胞内で産生された ATP は Pannexin-1 [51] や Connexin32, 43 [52] などを通じて細胞外に放出されオートクライン、パラクライン的に作用する。ATP は、ウサギ大動脈内皮細胞、ウサギ気道上皮細胞、ウサギ膀胱上皮細胞など多種の細胞から放出される [53-55]。一方、神経細胞から放出される ATP は、神経細胞の興奮やシナプス伝達を調節することが示されている [56, 57]。皮膚では P2X2, P2X3, P2X5, P2X7 が表皮分化に [58, 59]、P2Y1, P2Y2 は細胞増殖に関連していることが報告されている [49, 50]。本研究では、NHEKs に対する P2X 受容体アンタゴニストのフィラグリンタンパク質産生に対する作用を検討し、PN と同様に P2X 受容体アンタゴニストはフィラグリンタンパク質産生量を増加させること、また PN が誘導したフィラグリンタンパク質産生量は ATP により抑制されることを明らかにした。P2X 受容体として PPADS と TNP-ATP を用い検討を行った結果、フィラグリンタンパク質産生量を増加させた濃度はそれぞれ、160 μ M と 12 μ M であったことから、TNP-ATP の方がフィラグリンタン

パク質量を増加させる作用が強いことが示唆された。NHEKs での PPADS と TNP-ATP の IC50 を検討した報告はないが、皮膚組織における PPADS と TNP-ATP の作用強度の差については、テープストリッピングで破壊した皮膚組織に PPADS と TNP-ATP を適用し、バリア回復をみた先行研究では、PPADS および TNP-ATP の有効濃度はそれぞれ 1mM と 100 nM であり [60]、本研究で示唆された、NHEKs の P2X 受容体に対するアンタゴニストの作用強度が PPADS よりも TNP-ATP の方が高いことをサポートしている。

先行研究では、100 μ M の ATP は NHEKs の IL-6、IL-20、CXCL1 mRNA 発現およびそれらのタンパク質産生を増加させ、CXCL1 を介した好中球の遊走と STAT3 シグナル経路の活性化を伴う炎症応答を惹起することが示されている [61]。これは、ATP が NHEKs からサイトカインやケモカインを放出し、アトピー性皮膚炎の要因の一つである JAK-STAT3 経路を活性化することを示唆している。一方、NHEKs からは低濃度の ATP (17 nM) が恒常的に細胞外に放出されている [50]。この濃度は、ATP が実験的にカルシウムイオンを細胞内に導入する有効濃度である 10 μ M と比べ低いため生理学的な炎症と定義することは議論の余地があるが、培養表皮細胞からは一定量の低濃度 ATP が放出され、P2X 受容体が活性化されサイトカインやケモカインが産生、放出されている可能性がある。NHEKs で産生、放出されたサイトカインやケモカインの自己分泌により STAT3 経路が活性化されプロフィラグリン mRNA 発現およびタンパク質産生が抑制されている可能性が考えられる。したがって、P2X 受容体アンタゴニストはサイトカインやケモカインの産生および放出を減少させ、STAT3 経路を抑制することでフィラグリンタンパク質産生増加を誘導したのではないかと考えられる。

P2X 受容体による ATP 認識の分子機構は、P2X 受容体が ATP のアデニン塩基内に存在するアミジン (1 つの炭素に二重結合で窒素原子が 1 つ、単結合で窒素原子が 1 つ付いている構造) を特異的に認識し、受容体の Trh189 アミノ酸残基のカルボニル酸

素とアデニン塩基の窒素原子との間に水素結合を形成し結合している [62]。この水素結合の存在は、リガンドと P2X 受容体との結合力と相関があることも示されている [62]。本研究で用いた P2X 受容体アンタゴニストである PPADS および TNP-ATP はその分子内にアミジンを含む [63]。一方、分子内にアミジン構造を有していないピリドキサル 5 リン酸が、ラット迷走神経や輸精管において P2X 受容体のアンタゴニストとして機能することが報告されている [64]。PN の窒素原子付近の分子構造はピリドキサル 5 リン酸と類似していることから、PN がフィラグリンタンパク質産生を増加させたのは、P2X 受容体アンタゴニストと同様の機序であることが考えられる。しかしながら、PN のフィラグリンタンパク質産生増加に対する P2X 受容体の関与を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。たとえば、NHEKs において P2X 受容体を活性化あるいは不活性化することにより誘導されるサイトカインやケモカインの産生評価やその下流のシグナル伝達系の評価、フィラグリン発現抑制に寄与する P2X 受容体のサブタイプの解明が必要である。

第一章では、PN が NHEKs に対し、表皮分化を促進せずにプロフィラグリン mRNA 発現およびタンパク質産生量を増加させることを示した。また、フィラグリンタンパク質産生量を増加させる作用は P2X 受容体のアンタゴニストにも確認された。NHEKs から恒常的に放出される低濃度 ATP により活性化された P2X 受容体シグナル経路が P2X 受容体アンタゴニストで阻害されることにより、ATP に誘導されたサイトカインやケモカインの産生と放出が抑制され、それにより STAT3 経路が抑制され、フィラグリンタンパク質産生が増加したと考えられる。PN は、P2X 受容体に認識される部位であるアミジンに類似した構造を有していることから、PN は P2X 受容体に対し拮抗的に作用することでフィラグリンタンパク質産生を増加する作用を示した可能性が示唆される。

第二章 HaCaT 細胞における PN の作用検討

第一節 緒言

HaCaT 細胞は、1988 年に Boukamp らによって樹立された成人男性皮膚由来の不死化角化細胞株である [65]。HaCaT 細胞以前に樹立されていたヒト角化細胞は SV40 感染や DNA トランスフェクションによって得られたものであり、分裂活性を有するものの、通常の角化 (分化) 能が低下した細胞であった [66-68]。これに対し、HaCaT 細胞は、培養温度と Ca^{2+} 濃度を調節することにより自然発生的に不死化を誘導することで樹立され (140 以上の継代)、ヌードマウスに移植すると分化能を発揮したことが確認されている [65]。HaCaT 細胞は分裂活性と分化能を有し、コンタクトインヒビション [69] や培養液中の Ca^{2+} 濃度を上昇させること [65] により分化が進行することが報告されており、皮膚研究のモデル細胞として広く用いられている。さらに NHEKs と同様に外部応答刺激に対して応答することから、紫外線照射応答 [70, 71] やサイトカイン刺激による応答性 [72] が評価されている。

UVB 照射や Epidermal Growth Factor (EGF) 刺激による c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) 活性を検討した実験では、NHEKs と HaCaT 細胞では JNK1 を最大に活性化する UVB 照射後の培養時間や EGF 処理時間が異なることに加えて、同一照射条件、処理条件でも JNK1 活性増加倍率が異なることが示されており、UVB や EGF に対する NHEKs と HaCaT 細胞の感受性の違いが考察されている [70]。また、HaCaT 細胞はプロフィラグリン mRNA 発現促進作用を有する薬剤スクリーニングに利用され、NHEKs で効果の再検証をした結果、HaCaT 細胞でプロフィラグリン mRNA 発現を増加させた 7 薬剤の中で NHEKs に対してもプロフィラグリン mRNA 発現増加作用を示した薬剤は 2 薬剤のみ (Scriptaid; Histone deacetylase inhibitor, JTC801; ORL1 antagonist) であった [47]。このように同じ薬剤処理や外部刺激であっても、細胞種が異なると応答性が異なることが複数示されている。

NHEKsは、皮膚組織内での細胞の性質が比較的良好に保たれていることが長所となるが、培養や維持が難しくロット間で性質の変動もある。一方、HaCaT細胞は細胞株であるためこれらの問題点が克服されていることから、PNによるフィラグリン増加作用機序解明のための安定的な研究モデル細胞としてHaCaT細胞を利用することを考え、第二章では、HaCaT細胞に対するPNのフィラグリン増加作用について検証した。

第二節 材料と方法

細胞培養

HaCaT 細胞は Professor Kuroki T. , Showa University より供与を受けた。

MCDB153-modified specific medium HuMedia KG-2 (KG2) はクラボウから購入した。

HaCaT 細胞は、KG2 を用い、37 °C、5% CO₂ 環境下で培養した。HaCaT 細胞に処理した試薬 (PN, ATP) は、ウシ下垂体抽出物 (bovine pituitary extract, BPE) を含有しない KG2 (以下、KG2(-BPE)と表記する) に溶解し孔径 0.22 μm の PVDF メンブレン (マイクロレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを HaCaT 細胞に処理した。

試薬

ピリドキシン塩酸塩 (PN, P9755)、アデノシン 5'-三リン酸二ナトリウム水和物 (ATP, A2383)、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF, P7626) は Sigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。Triton X-100 (A16046) は、和光純薬 (東京、日本) から購入した。TaqMan™ Gene Expression Cells-to-CT™ Kit (AM1728) , TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (4352042), TaqMan® Gene Expression Assay, TaqMan® Endogeneous Controls および Pierce™ BCA Protein Assay kit (23227) は、サーモフィッシャー (神奈川、日本) から購入した。抗ヒトフィラグリン抗体 (Anti-filaggrin antibody (sc-80609, Lot. C2817)) は、サンタクルーズバイオテクノロジー (Dallas, TX, USA) から、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗マウス Ig-G (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO(M), 424131) は、ニチレイバイオサイエンス (東京、日本) から、電気化学発光試薬 (Lumi-Light Western blotting substrate, 12015200001) は Roche Diagnostics (Indianapolis, IA, USA) から購入した。

プロフィラグリン mRNA 発現に対する PN の作用

HaCaT 細胞は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.5×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。KG2(-BPE) に所定濃度の PN を溶解し孔径 0.22 μ m の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し 24 時間培養した。24 時間培養後、定量 PCR の項に示した手順でプロフィラグリン (FLG) mRNA 発現に対する定量 PCR を実施した。

フィラグリンタンパク質産生に対する PN の作用

HaCaT 細胞は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.0×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。KG2(-BPE) に所定濃度の PN を溶解し孔径 0.22 μ m の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し 72 時間培養した。細胞を 1 well あたり 200 μ L の PBS(-) にて洗浄したのち、Triton X-100 を 0.5 % と PMSF を 2 mM となるように PBS に溶解したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加しプローブ式ソニケーション (ULTRASONIC HOMOGENIZER, SMT company) を用い 1 well あたり 10 秒間細胞破碎処理し細胞溶解液を得た。その後ドットブロットの項に示した手順でフィラグリンタンパク質産生に対するドットブロットを実施した。

PN によって増加したプロフィラグリン mRNA に対する ATP の作用

HaCaT 細胞は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.5×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。KG2(-BPE) に PN を 1000 μ M となるように溶解し孔径 0.22 μ m の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し 24 時間培養した。24 時間培養後、KG2(-BPE) に ATP を 100 μ M となるように溶解しフィルター滅菌したもので培地交換し (1 well あたり 100

μL) さらに 6 時間培養した。その後定量 PCR の項に示した手順でプロフィラグリン (FLG) mRNA 発現に対する定量 PCR を実施した。

ドットプロット

細胞を 1 well あたり 200 μL の PBS(-)にて洗浄したのち、Triton X-100 を 0.5 % と PMSF を 2 mM となるように PBS(-)に溶解したものを 1 well あたり 100 μL ずつ添加しプローブ式ソニケーション (ULTRASONIC HOMOGENIZER, SMT company) を用い 1 well あたり 10 秒間細胞破碎処理し細胞溶解液を得た。細胞溶解液を孔径 0.45 μm のニトロセルロースメンブレン (BIO-RAD, 162-0145) に 2 μL ずつ直接ブロットし、室温で一晩乾燥させた。細胞溶解液がブロットされたメンブレンをブロッキング溶液 (1% ウシ血清アルブミン含有 PBS) に浸漬し室温で振とうしながら 1 時間ブロッキングした。その後メンブレンを 0.1 % Triton X-100 を含む PBS(-)で室温 10 分間洗浄し、PBS(-)で 4000 倍希釈した抗ヒトフィラグリン抗体を室温で 1 時間反応させた。メンブレンを 0.1 % Triton X-100 を含む PBS(-)で室温 10 分間 2 回洗浄し、PBS(-)で 100 倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗マウス Ig-G を室温で 1 時間反応させた。メンブレンを 0.1 % Triton X-100 を含む PBS(-)で室温 10 分間 2 回洗浄し、電気化学発光試薬をインストラクションに従って調整しメンブレン上に滴下し室温で 5 分反応させた。試薬反応後のメンブレンはライトキャプチャー (CoolSaver AE-955, ATTO) を用いて発光輝度を検出した。また、細胞破碎液のタンパク質量を Pierce™ BCA Protein Assay kit を用いて定量した。具体的な手順は以下の通りである。細胞破碎液および BSA 標準溶液それぞれ 100 μL に対し、Pierce™ BCA Protein Assay kit のインストラクションに従って調整した BCA Reagent を 100 μL ずつ添加し混合した後、37 °C で 30 分間反応させ、混合液の 550 nm 吸光度をマイクロプレートリーダー (EnSpire 2300, パーキンエルマー) で測定した。フィラグリンタンパク質量は、単位タ

ンパク量当たりの化学発光強度に換算し未処理細胞の値を 100 とした相対値 (インデックス) で表した。

定量 PCR

細胞は 1 well あたり 200 μL の PBS(-) にて洗浄したのち、TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit のプロトコールに従い cDNA を作成した。具体的な手順は以下の通りである。1 well あたり 30 μL の DNase 1 を含む Lysis solution を加えプレートシェーカーにて室温 1 分溶解処理を行い、さらに室温で 4 分間静置した。1 well あたり 3 μL の stop solution を加えタッピング混和し室温にて 2 分間静置したものを細胞溶解液とした。10 μL の細胞溶解液に対し 40 μL の RT Master Mix solution を加えボルテックス混合後、サーマルサイクラー (T3 Thermocycler, Biometra) を用いて RT 反応を行い cDNA を得た。RT 反応は 37 °C で 60 分間行い、その後酵素活性失活のために 95 °C で 5 分間反応させた。得られた cDNA を鋳型として、TaqMan® Fast Univ. Gene Expression Master Mix および TaqMan® Gene Expression Assays を用いプロトコールに従って各遺伝子に対する定量 PCR を実施した (StepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific))。4 μL の cDNA に対し、16 μL の PCR Cocktail を加えボルテックス混合した後、StepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、95 °C で 20 秒、95 °C で 1 秒、62 °C で 20 秒とし、40 サイクルの条件で定量 PCR を実施した。解析対象の各遺伝子は TaqMan® Gene Expression Assays の FLG (Hs00856927_g1) を用い、コントロールのハウスキーピング遺伝子は TaqMan® Endogenous Controls (Applied Biosystems) の Cyclophilin A (PPIA, Hs04194521_s1) を用いた。解析は $\Delta\Delta\text{CT}$ 法を用いて実施し、未処理細胞の値を 1 とした相対値で表した。

統計解析

すべてのデータは平均±標準誤差で表す。データ解析には、GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., CA, USA) が用いられた。統計解析は、2群間比較ではスチューデント t 検定を実施し、3群以上の比較では一元配置分散分析に続いてターキーの多重比較検定を実施し、 $p < 0.05$ を統計的有意とみなした。

第三節 結果

プロフィラグリン mRNA 発現に対する PN の作用

定量 PCR を実施するために、 1.5×10^4 cells/well の播種密度で播種した HaCaT 細胞に対し細胞内タンパク質量を指標とした細胞毒性試験を行った結果、24 時間処理で細胞毒性を示さない PN 濃度は $1000 \mu\text{M}$ であった (播種密度と処理時間は NHEKs の実験条件と同様)。従って HaCaT 細胞におけるプロフィラグリン mRNA 発現に対する定量 PCR は、 $1000 \mu\text{M}$ を最大処理濃度として検討を行った。その結果、 $1000 \mu\text{M}$ の PN24 時間処理により、プロフィラグリン mRNA 発現量の増加が認められ、未処理と比較して 1.8 倍の有意な増加が認められた。一方、 $500 \mu\text{M}$ の PN は、プロフィラグリン mRNA 発現量を変化させなかった(図 9)。

フィラグリンタンパク質産生に対する PN の作用

ドットブロットを実施するために、 1.0×10^4 cells/well の播種密度で播種した HaCaT 細胞に対し細胞内タンパク質量を指標とした細胞毒性試験を行った結果、72 時間処理で細胞毒性を示さない PN 濃度は $250 \mu\text{M}$ であった (播種密度と処理時間は NHEKs の実験条件と同様)。従って HaCaT 細胞におけるフィラグリンタンパク質産生量に対するドットブロットは、 $250 \mu\text{M}$ を最大処理濃度として検討を行った。その結果、 $250 \mu\text{M}$ の PN はフィラグリンタンパク質産生量を未処理と比較し変化させなかった (図 10)。

PN によって増加したプロフィラグリン mRNA に対する ATP の作用

HaCaT 細胞に $1000 \mu\text{M}$ PN を 24 時間処理したところ、ATP 非存在下において有意にプロフィラグリン mRNA を増加させた。一方、 $1000 \mu\text{M}$ の PN で 24 時間処理した後に $100 \mu\text{M}$ の ATP を 6 時間処理した結果、 $1000 \mu\text{M}$ の PN によって増加したプロフィラグリン mRNA 発現量に ATP は影響を与えなかった(図 11)。

第四節 考察

細胞毒性を示さない最大処理濃度が NHEKs と HaCaT 細胞と異なったことについて

細胞内タンパク質量を指標とした細胞毒性試験を実施し、毒性を示さない PN 最大処理濃度を NHEKs と HaCaT 細胞で比較した結果、処理時間が 24 時間 (定量 PCR での処理時間) の場合、NHEKs に対する細胞毒性を示さない PN の最大処理濃度は 200 μM であった一方、HaCaT 細胞に対する PN 最大濃度は 1000 μM であった。また、処理時間が 72 時間 (ドットブロットでの処理時間) の場合、NHEKs に対する細胞毒性を示さない PN の最大処理濃度は 100 μM であった一方、HaCaT 細胞に対する PN 最大濃度は 250 μM であった。以上の結果は、PN の HaCaT 細胞に対する毒性を示さない PN 濃度は、NHEKs より高くなることを示している。NHEKs と HaCaT 細胞との間での有効な薬剤濃度の違いに関する先行研究では、細胞増殖を停止させるタンパク質である p21 を HaCaT 細胞で誘導するには 5-10mM の細胞外カルシウムが必要 [73]であった一方、NHEKs の場合は、1.5 mM であり、HaCaT 細胞の方が高ったことから、HaCaT 細胞が細胞株化を通じて細胞外カルシウム濃度に対する感度が低くなったと考察されている [74]。このことから、PN の毒性を示さない濃度が NHEKs よりも HaCaT 細胞で高くなった理由は、HaCaT 細胞が細胞株化を通じて PN に対しても感度が低くなったためであると考えられる。

HaCaT 細胞のフィラグリンタンパク質量に対する PN 作用が NHEKs と異なったことについて

PN により HaCaT 細胞内のフィラグリンタンパク質産生量に変化しなかったことは、フィラグリンタンパク質の翻訳調節と異化作用のバランスが NHEKs と HaCaT 細胞でそれぞれ異なることが原因の一つと考えられる。フィラグリンタンパク質は表皮細胞の最終分化の過程でポリペプチドを経てアミノ酸まで分解される。アミノ酸は

天然保湿因子として角質細胞内で水分維持に寄与する。この異化作用の主要なステップとして peptidylarginine deiminase (PAD) による脱イミノ化がある。フィラグリンタンパク質は脱イミノ化されると等電点が塩基性から中性あるいは酸性にシフトし、タンパク質の折り畳みやイオン相互作用が変化し、ケラチンなど中間径フィラメントを凝集していたフィラグリンモノマーがフィラメントから離脱しさらなる酵素分解を受ける [75]。フィラグリンの脱イミノ化反応を触媒する PAD 活性や発現量が HaCaT 細胞と NHEKs で異なっている直接の報告は存在しないが、大腸上皮組織においては PAD 発現量の違いとその生理学的意義が考察されている。PAD は正常な大腸上皮組織で高発現する一方、がん組織と大腸がん由来の細胞株では PAD2 mRNA、タンパク質量ともに発現及び産生量が低下していたことが報告されており、この報告では PAD2 による脱イミノ化タンパク質が大腸上皮細胞の増殖を抑制していることを考察している [76]。今回の結果は、PN 刺激により HaCaT 細胞でフィラグリンタンパク質量が変化しなかったことを示したが、これは、PN が HaCaT 細胞でフィラグリンタンパク質の異化作用を促進させた可能性を示唆している。一方、PN は HaCaT 細胞のプロフィラグリン mRNA を増加させ、フィラグリン遺伝子転写に関する応答は NHEKs と一致したことから、PN のフィラグリン転写活性促進の作用機序解析に HaCaT 細胞を使用できる可能性が示唆される。今後は HaCaT 細胞における PAD の活性や発現量に対する検討を行いその生理学的意義を明らかにすることが必要である。

第三章 PN 誘導体の正常表皮細胞からヒト皮膚への作用検討

第一節 緒言

皮膚中のフィラグリントンパク質量の低下が原因で引き起こされる皮膚疾患として、表皮剥離性角質増殖症 (epidermolytic hyperkeratosis)、葉状魚鱗癬 (lamellar ichthyosis)、アトピー性皮膚炎などがある。表皮剥離性角質増殖症や葉状魚鱗癬の病変部位ではプロフィラグリンがフィラグリンに分解されずに皮膚中に蓄積していることが報告されている [27]。また、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では病変部位、非病変部位に関わらずフィラグリントンパク質産生量の低下が認められている [28]。

アトピー性皮膚炎の薬物療法では個々の皮疹重症度に応じてステロイド外用薬が選択され、部位により異なる剤型が使い分けられる [77]。ステロイド外用薬の吸収率には部位差が存在し、前腕伸側の吸収率を 1 とした場合に頬は 13.0、頭部は 3.5、頸部は 6.0、陰囊 42 となっており [78]、高い薬剤吸収率を持つ部位ではステロイド外用薬による局所副作用が懸念されるため、長期間の連用を避けるべきとされている。そのためアトピー性皮膚炎の治療は、症状をなくすあるいは軽微な状態に達するまで薬物療法を継続し、その後は軽度な状態を維持することを目標に行われている [77]。

アトピー性皮膚炎では、皮膚バリア機能と保湿因子が低下していることから、角層内の水分含有量が低下することでアトピー性皮膚炎に特徴的なドライスキンとなる。ドライスキンが要因となり、刺激による皮膚のかゆみが生じやすく、種々のアレルギーの侵入が容易になり皮膚炎を惹起しやすいと考えられている [77]。そこで、アトピー性皮膚炎で低下している角質層の水分含有量を改善し、皮膚バリア機能を回復・維持することを目的として保湿外用剤 (保湿剤・保護剤) が使用され、これによりアレルギーの侵入予防、皮膚炎の再燃予防、及びかゆみの抑制が報告がされている [79] [77]。保湿剤には、皮膚表面の保湿性を補うために親水性軟膏 (例としてヘパリン類似物質含有親水性軟膏など) が、保護剤としては皮膚に対して保護作用がある油脂性軟膏 (例として白色ワセリンなど) が選択される。以上のように、アトピー性皮膚炎の

軽微ないし軽度な状態を維持するために行われるスキンケアは、皮膚の保湿と保護を目的としたものである。一方、アトピー性皮膚炎の原因の一つがフィラグリンタンパク質量低下であること、また第一章で述べたとおり、PNがNHEKsのフィラグリンを遺伝子レベルおよびタンパク質量レベルで増加させたことから、PN配合製剤が不足したフィラグリンを増加させ、既存のスキンケア製剤と異なった作用機序で軽微ないし軽度な状態を保つことができるのではないかと考えた。しかしながら、経皮投与で薬剤の効果を発揮させるためには、脂溶性の高い角質層へ成分を移行させる必要があるため、一般的に水溶性成分の皮膚透過性は著しく低く、経皮投与で十分な効果が発揮されにくいと考えられている [80]。第三章では、PNの油溶性誘導体を用い、効果的に経皮投与で使用するこ目的として油溶性のPN誘導体のフィラグリン増加作用について、NHEKs、3D Skinおよびヒトを対象として検討を行った。

第二節 材料と方法

細胞培養

正常ヒト新生児表皮角化細胞 (NHEKs) および MCDB153-modified specific medium HuMedia KG-2 (以下、KG2 と表記する) はラボウから購入した。NHEKs は、KG2 を用い、37 °C、5 % CO₂ 環境下で培養した。NHEKs に処理した試薬 (PN, VB6-IP) は、ウシ下垂体抽出物 (bovine pituitary extract, BPE) を含有しない KG2 (以下、KG2(-BPE) と表記する) に溶解し、孔径 0.22 μm の PVDF メンブレン (マイクレス, SLGV33RS) を用いて滅菌したものを NHEKs に処理した。再構築表皮モデル (以下、3D Skin と表記する) は、テストスキン™ を東洋紡から購入した。3D Skin は、キットに添付されたアッセイ培地を用い、37 °C、5 % CO₂ 環境下で培養した。

試薬

ピリドキシン塩酸塩 (PN, P9755)、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF, P178) は Sigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。トリスヘキシルデカン酸ピリドキシン (PN 誘導体) (VB6-IP, 050928) は日光ケミカルズ株式会社 (東京、日本) から供与を受けた。Triton X-100 (A16046) は、和光純薬 (東京、日本) から購入した。TaqMan™ Gene Expression Cells-to-CT™ Kit (AM1728), TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (4352042), TaqMan® Gene Expression Assay, TaqMan® Endogeneous Controls, Pierce™ BCA Protein Assay kit (23227) および FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, FITC, 31561) は、サーモフィッシャー (神奈川、日本) から購入した。抗ヒトフィラグリン抗体 (Anti-filaggrin antibody (sc-80609, Lot. C2817)) は、サンタクルーズバイオテクノロジー (Dallas, TX, USA) から、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗マウス Ig-G (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO(M), 424131) は、ニチレイバイオサイエンス (東京、日本) から、電気化学発光試薬

(Lumi-Light Western blotting substrate, 12015200001) は Roche Diagnostics (Indianapolis, IA, USA)から購入した。O.C.T compound は、SAKURA Fine technical (東京、日本)から購入した。マリノール (マリノール 750cps, 20091) は、武藤化学株式会社 (東京、日本)から購入した。

プロフィラグリン mRNA 発現に対する VB6-IP の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.5×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。100 % エタノールに VB6-IP を 20 mM となるように溶解し VB6-IP のストック溶液とした。VB6-IP ストック溶液を KG2(-BPE) で 100 倍希加したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加した。24 時間培養した後、定量 PCR の項に示した手順でプロフィラグリン mRNA 発現に対する定量 PCR を実施した。

フィラグリンタンパク質産生に対する VB6-IP の作用

NHEKs は、KG2 を用いて 96 穴マイクロプレートに 1.0×10^4 cells/well の細胞密度で播種した (100 μ L / well)。100 % エタノールに VB6-IP を 20 mM となるように溶解し VB6-IP のストック溶液とした。VB6-IP ストック溶液を KG2(-BPE) で 100 倍希釈したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加し 72 時間培養した。細胞を 1 well あたり 200 μ L の PBS(-) にて洗浄した後、Triton X-100 を 0.5 % と PMSF を 2 mM となるように PBS に溶解したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加しプローブ式ソニケーション (ULTRASONIC HOMOGENIZER, SMT company) を用い 1 well あたり 10 秒間細胞破碎処理し細胞溶解液を得た。その後ドットブロットの項に示した手順でフィラグリンタンパク質に対するドットブロットを実施した。

3D Skin におけるフィラグリントンパク質産生に対する作用

東洋紡から購入した 3D Skin キットには、カルチャーインサートの中で表皮細胞が 3 次元に再構築された皮膚膜が 12 個と、アッセイプレート (12 穴プレート) とアッセイ培地が含まれていた。添付されたアッセイプレートの 1 well あたりに、アッセイ培地を 0.6 mL ずつ分注し、輸送用培地から取り出したカルチャーインサートをアッセイ培地が分注されたアッセイプレートの 1 穴あたりに 1 個ずつ移し、一晩馴化培養した。馴化培養後、PBS(-) に PN を 1.5 mM となるように溶解したものおよびトリ (カプリル・カプリン酸) グリセリルに VB6-IP を 1.5 mM となるように溶解したものを角層側から、カルチャーインサート 1 個当たり 50 μ L 適用し、3 日おきに試料交換をしながら 7 日間培養した。今回使用した PBS(-) およびトリ (カプリル・カプリン酸) グリセリルは、3D Skin 細胞生存率を変化させないことを事前に確認した。7 日間培養後、適用した試験試料をマイクロピペッターを用いて除去し、3D Skin の角層表面を 5 mL マイクロピペッターを用い PBS(-) で十分に洗浄した。3D Skin の皮膚膜をメスを用いてカルチャーインサートから取り外し、未固定の状態で O.C.T compound に浸漬した後液体窒素で凍結包埋し凍結ブロックを作成した。得られた凍結ブロックはクリオスタット (サーモサイエンティフィック) を用いて 5 μ m 厚に薄切し得られた組織切片はシランコーティングされたスライドガラスに貼付し免疫組織化学までマイナス 20 $^{\circ}$ C で保存した。

ドットプロット

NHEKs を 1 well あたり 200 μ L の PBS(-) にて洗浄したのち、Triton X-100 を 0.5 % と PMSF を 2 mM となるように PBS(-) に溶解したものを 1 well あたり 100 μ L ずつ添加しプローブ式ソニケーション (ULTRASONIC HOMOGENIZER, SMT company) を用いて 1 well あたり 10 秒間細胞破碎処理し細胞溶解液を得た。細胞溶解液を孔径 0.45 μ m のニトロセルロースメンブレン (BIO-RAD, 162-0145) に 2 μ L ずつ直接プロットし、

室温で一晩乾燥させた。細胞溶解液がブロットされたメンブレンをブロッキング溶液 (1% ウシ血清アルブミン含有 PBS) に浸漬し、室温で振とうしながら 1 時間ブロッキングした。その後、メンブレンを 0.1 % Triton X-100 を含む PBS(-) で室温 10 分間洗浄し、PBS(-) で 4000 倍希釈した抗ヒトフィラグリン抗体を室温で 1 時間反応させた。メンブレンを 0.1 % Triton X-100 を含む PBS(-) で室温で 10 分間 2 回洗浄し、PBS(-) で 100 倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗マウス Ig-G を室温で 1 時間反応させた。メンブレンを 0.1 % Triton X-100 を含む PBS(-) で室温で 10 分間 2 回洗浄し、電気化学発光試薬をメンブレン上に滴下し室温で 5 分反応させた。試薬反応後のメンブレンはライトキャプチャー (CoolSaver AE-955, ATTO) を用いて発光輝度を検出した。また、細胞破碎液のタンパク量を Pierce™ BCA Protein Assay kit を用いて定量した。細胞破碎液および BSA 標準溶液それぞれ 100 μ L に対し、Pierce™ BCA Protein Assay kit のインストラクションに従って調整した BCA Reagent を 100 μ L ずつ添加し混合した後、37 °C で 30 分間インキュベートし、混合液の 550 nm 吸光度をマイクロプレートリーダー (EnSpire 2300, パーキンエルマー) で測定した。フィラグリンタンパクレベルは、単位タンパク量当たりの化学発光強度に換算し未処理細胞の値を 100 とした相対値 (インデックス) で表した。

定量 PCR

細胞は 1 well あたり 200 μ L の PBS(-) にて洗浄したのち、TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit のプロトコールに従い cDNA を作成した。具体的な手順は以下の通りである。1 well あたり 30 μ L の DNase 1 を含む Lysis solution を加えプレートシェーカーにて室温 1 分溶解処理を行い、さらに室温で 4 分間静置した。1 well あたり 3 μ L の stop solution を加えタッピング混和し室温にて 2 分間静置したものを細胞溶解液とした。10 μ L の細胞溶解液に対し 40 μ L の RT Master Mix solution を加えボルテッ

クス混合後、サーマルサイクラー (T3 Thermocycler, Biometra) を用いて cDNA を得た。RT 反応は 37 °C で 60 分間行い、その後酵素活性失活のために 95 °C で 5 分間反応させた。得られた cDNA を鋳型として、TaqMan® Fast Univ. Gene Expression Master Mix および TaqMan® Gene Expression Assays を用いプロトコールに従って各遺伝子に対する定量 PCR を実施した (StepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific))。4 μ L の cDNA に対し、16 μ L の PCR Cocktail を加えボルテックス混合した後、StepOnePlus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、95 °C で 20 秒、95 °C で 1 秒、62 °C で 20 秒とし、40 サイクルの条件で定量 PCR を実施した。解析対象の各遺伝子は TaqMan® Gene Expression Assays の FLG (Hs00856927_g1) を用い、コントロールのハウスキーピング遺伝子は TaqMan® Endogeneous Controls (Applied Biosystems) の Cyclophilin A (PPIA, Hs04194521_s1) を用いた。解析は $\Delta \Delta$ CT 法を用いて実施し、未処理細胞の値を 1 とした相対値で表した。

ヘマトキシリン・エオジン染色

凍結切片を室温に戻し、アセトンに 2 分間浸漬しその後約 5 分間風乾させ組織を固定した。風乾後ヘマトキシリン液に 10 分間浸漬し流水洗浄を 30 分間行った。その後、エオジン液に 10 分間浸漬し、DW にて 10 秒間洗浄後に 15 分間風乾させた。その後、マリノールで封入を行い、光学顕微鏡 (Axiovert S100、ZEISS) にて観察を行い、デジタルカメラ (DS-Ri1、Nikon) で写真撮影を行った。

免疫組織化学染色

凍結切片を室温に戻し、アセトンに 2 分間浸漬しその後約 5 分間風乾させ組織を固定した。組織切片に対し 1% BSA を含有する PBS(-)によるブロッキングを室温で 1 時間行った後、PBS(-)洗浄を 5 分間 1 回行った。抗ヒトフィラグリン抗体を PBS(-)に 50 倍希釈して溶解したものを一次抗体液とし、1 組織切片当たり 50~100 μ L 滴下し室

温で湿潤な環境で1時間反応させた。PBS(-)洗浄を5分間3回行ったあと、1% BSAを含有するPBS(-)にFITC標識抗マウスIgG抗体を20倍希釈して溶解したものを二次抗体液とし、1組織切片当たり50~100 µL滴下し室温で湿潤な環境で1時間反応させた。PBS(-)洗浄を5分間3回行った後、DW洗浄を5分行い、グリセリンを用いて封入を行い、蛍光顕微鏡(Axiovert S100、ZEISS)にて観察を行いおよびデジタルカメラ(DS-R11、Nikon)で写真撮影を行った。

臨床試験

平均年齢35.8歳の健常男性10名を被検者とし、ランダム化二重盲検法で実施された。被験部位である顔面に対し、指定された側に指定された製剤(3% VB6-IP配合製剤あるいはプラセボ製剤)を4週間連続使用した。塗布時間と頻度は朝晩の洗顔後に1日2回とした。皮膚表面水分量はSKICON-200EX(株式会社ヤヨイ)を用い測定し、測定回数は5回(開始時、1週間後、2週間後、3週間後および4週間後)とした。皮膚表面水分量測定値は、初期値を100%とした相対値(インデックス)で表した。

測定方法詳細は以下の通りである。被検者は指定洗浄料にて顔面を洗浄した後タオルにて水分を払拭し、恒温恒湿室(温度22°C、相対湿度50%)に入室した。15分間恒温恒湿室環境下で馴化した後、顔面の皮膚表面水分量をSkicon 200 EXを用い測定した。

臨床試験の実施に際しては、ヘルシンキ宣言に基づき、㈱コスモステクニカルセンター社内倫理委員会の承認を経て、被検者のインフォームドコンセントを得た後、実施した。

統計解析

すべてのデータは平均±標準誤差で表した。データ解析には、GraphPad Prism 5 software(GraphPad Software Inc., CA, USA)を用いた。統計解析は、2群間比較ではスチ

ューデント t 検定を実施し、3 群以上の比較では一元配置分散分析に続いてターキーの多重比較検定を実施した。臨床試験のデータ解析は、二元分散分析に続いてボンフェローニ補正 (Bonferroni post-test) を実施した。 $p < 0.05$ を統計的有意とした。

第三節 結果

NHEKsにおけるプロフィラグリン mRNA 発現に対する VB6-IP の作用

200 μM の VB6-IP の 24 時間処理は、プロフィラグリン mRNA 発現量を有意に増加させ、コントロールと比較して 1.8 倍であった。100 μM の VB6-IP 処理は、プロフィラグリン mRNA 発現量に変化を与えなかった (図 12)。

NHEKsにおけるフィラグリンタンパク質産生に対する VB6-IP の作用

100 μM の VB6-IP の 72 時間処理により NHEKs で産生されたフィラグリンタンパク質産生量は有意に増加し、未処理コントロールと比較して 1.9 倍であった。50 μM の VB6-IP 処理は、フィラグリンタンパク質産生量に変化を与えなかった (図 13)。

3D Skin におけるフィラグリンタンパク質産生に対する作用

VB6-IP のフィラグリンタンパク質産生量増加作用が角層を有する 3D Skin においても認められるかを確認するために、3D Skin でのフィラグリンタンパク質産生を、免疫組織化学法を用いて評価した。1.5 mM の VB6-IP を角層側から 7 日間処理した結果、3D Skin の顆粒層上層全体および角層の一部に、フィラグリンタンパク質陽性シグナルの増加が認められた。特に、顆粒層上層においてフィラグリンタンパク質陽性シグナル蛍光強度が強く検出された。同濃度の PN を角層側から 7 日間処理した結果、顆粒層の一部に弱い蛍光が検出された。VB6-IP 処理により増加したフィラグリンタンパク質陽性シグナル強度は、PN 処理により増加したシグナルより染色された領域が広く、また顕著に強いシグナルを示した(図 14)。

ヒト皮膚に対する VB6-IP 配合製剤の保湿作用

VB6-IP を 3%含有する製剤を顔面に 4 週間連測使用し、経時的に被験部位の皮膚表面水分量を測定した。塗布 4 週間後の皮膚表面水分量相対値について、3% VB6-

IP 配合製剤は塗布開始前に比べて皮膚表面水分量が 3.0 倍増加し、プラセボ製剤は塗布開始前に比べて、皮膚表面水分量が 1.7 倍に増加した。塗布 4 週間後の 3 % VB6-IP 配合製剤塗布部位とプラセボ製剤塗布部位を比較すると、3 % VB6-IP 配合製剤塗布部位でプラセボ製剤塗布部位と比較した有意な皮膚表面水分量相対値の増加が見られた。(図 15)。

第四節 考察

VB6-IP の NHEKs でのフィラグリン増加作用

VB6-IP は、水溶性である PN を脂溶性の高い角層に移行させるために PN の 3 個の水酸基にイソパルミチン酸をエステル結合させて得られた脂溶性化合物である。PN は水に対して可溶であるが、VB6-IP は水に対して不溶であり油剤に対して可溶である。従来の油溶性ビタミン B (ジカプリル酸ピリドキシン、ジパルミチン酸ピリドキシン) は室温で結晶であり、製剤化後にビタミン B 誘導体が結晶化して析出するため製剤安定化の課題があったが、VB6-IP は室温で無色透明の液状の物性を有しているため、製剤調整後に VB6-IP が結晶析出する懸念がなく、製剤安定化の面で改良されている。

本検討の結果、VB6-IP は PN と同様に NHEKs のプロフィラグリン mRNA 発現およびタンパク質産生の増加作用を示した。これらの結果から、角層移行性を高める設計で合成された VB6-IP にも PN が有していたフィラグリン増加作用は維持されており、経皮塗布で十分な効果が発揮されることが期待された。NHEKs でのプロフィラグリン mRNA およびタンパク質増加の作用機序は、VB6-IP が PN や P2X 受容体アンタゴニストと同様に、P2X 受容体の細胞外ドメイン (ATP 結合能を有するドメイン) [81] に結合し P2X 受容体をアンタゴナイズすることによりフィラグリン増加作用を発揮したと考えられる。しかしながら、P2X 受容体の ATP 結合ドメインに PN や VB6-IP が結合するかについてはさらなる検討が必要である。

VB6-IP の 3D Skin でのフィラグリン増加作用

角層は角質細胞とその間隙に角質細胞間脂質が充填された構造をとっており脂溶性が高い [10]。角層に塗布された薬剤が血中に吸収されるためには、皮膚内での拡散性の観点から分子量が 500 ダルトン以下であること [82] [83]、脂溶性の高い角層への

移行と脂溶性の低い表皮真皮層での拡散の観点から適度に脂溶性が高い(油水分配係数が1から4)物質であることが条件とされている[84-86]。したがって分子量が500ダルトン以上の高分子薬剤は経皮吸収されず生きた表皮細胞層には到達しないことが通説であるが、分子量914.17の薬剤が角層を通過し、角層下皮膚に到達して表皮細胞に作用する例としてシロリムスの *in vitro* でのヒト皮膚透過性試験の報告がある。この報告ではフランチ型水平セルの透過セルにヒト皮膚を装着し、シロリムスゲル 0.0025g/cm² を適用したときのシロリムス皮膚透過量および皮膚中存在量を測定した。その結果、適用後24時間までレセプター液にシロリムスは検出されず、シロリムスの経皮吸収性は低いことが示された。また、角層には適用量の2.80%、角層下皮膚には適用量の0.42%が検出され、シロリムスは角層バリアを透過することが示された。VB6-IPの分子量は884.4であることから、3D Skinの角層側に適用したVB6-IPは皮膚膜を透過せずに(角層から生きた表皮層を透過して培地へ移行せずに)角層に高濃度に貯留していることが考えられる。角層と直下の表皮層のVB6-IP濃度勾配が高まるほど表皮層にVB6-IPが拡散し表皮細胞に到達し、フィラグリントタンパク質増加の効果を発揮したと考えられる。また、PNの3D Skinでのフィラグリントタンパク質増加作用が、VB6-IPよりも小さかった理由については、PNは分子量が178で500ダルトン以下であるが、水溶性成分であり角層移行性がVB6-IPよりも低いため、VB6-IPと比較すると表皮細胞に到達した物質量が少なく、フィラグリントタンパク質増加作用がVB6-IPよりも小さかったと考察される。

VB6-IPのヒト皮膚に対する保湿作用

VB6-IPを3%配合した製剤を顔面に4週間連用使用した結果、塗布4週後の被験部位の皮膚表面水分量はプラセボ製剤塗布部位よりも有意に上昇した。本研究において、VB6-IPがNHEKsに対しプロフィラグリン mRNA 発現量およびフィラグリント

ンパク質産生量を増加させたこと、また角層を有する 3D Skin でも VB6-IP によるフィラグリンタンパク質産生量増加が認められたことから、VB6-IP 配合製剤の連続使用によるヒト皮膚表面水分量増加は、VB6-IP がヒト皮膚表皮細胞に作用し、フィラグリンタンパク質量を増加させたことによると考えられる。また、VB6-IP により顆粒層で増加したフィラグリンタンパク質が角層への分化過程でアミノ酸にまで分解され、角質細胞に含まれるアミノ酸量の増加を伴ったヒト皮膚表面水分量が有意に増加するのに 4 週間要することが示唆される。

VB6-IP がフィラグリン低下症に対する新しい作用機序のスキンケアになる可能性について

第三章の結果から、VB6-IP 配合製剤はアトピー性皮膚炎などフィラグリン低下症に対し、不足しているフィラグリンタンパク質量を増加させ、角層の保湿力を改善できることが期待される。アトピー性皮膚炎の薬物療法は、症状をなくすあるいはあっても軽微な状態に達するまで薬物療法を継続し、その後は急な悪化を起こさず軽微ないし軽度な状態を維持することを目標に行われ、薬物治療後に行われるスキンケアは親水性軟膏による保湿と油脂性軟膏による保護である[77]。いずれも製剤中の保湿剤による保水作用や、油脂膜による保護作用によるものである一方、VB6-IP 配合製剤はヒト皮膚表皮細胞に作用しフィラグリンタンパク質量を増加させる作用を有しており、既存のスキンケアとは機序が異なる。現存する軟膏は、皮膚上に存在することで物理的に保湿力やバリア機能を強化し、アトピー性皮膚炎の悪化を引き起こさないものであるが、VB6-IP はアトピー性皮膚炎で低下しているフィラグリンを増加させる作用を有し、既存の軟膏よりも機能的である一方、使い続けてもステロイド製剤のような副作用の懸念は少なく安全である。このことは、VB6-IP 配合製剤が従来のスキンケア

アでは対応できなかった保湿効果の持続性や皮膚状態の改善を促すことを示唆しており、アトピー性皮膚炎のスキンケアの新しい提案につながる可能性を示している。

総括

PN (PN) は、ビタミン B6 様活性を有する物質で、補酵素としてアミノ酸代謝、脂質代謝、糖新生などの反応を仲介する。皮膚科学分野では、PN が不足すると脂漏性皮膚炎や口内炎が誘発されることが報告されており、PN がニキビや肌荒れの治療に用いられているが、表皮・角層の機能に対する PN の作用機序の詳細については未だ明らかになっていない。そこで本研究では、表皮細胞内で発現しケラチン繊維を凝集した後アミノ酸に代謝され、角質細胞内で保湿因子として機能するフィラグリンに着目し、NHEKs と HaCaT 細胞において PN 処理によりフィラグリンがどのように変化するかの検討を行った。また、PN は水溶性であるために、脂溶性の高い角層への移行性は低く、経皮塗布で十分な効果が発揮されないことが考えられたため、油溶性 PN 誘導体である VB6-IP の作用について、3D Skin およびヒト皮膚に対する作用を検討した。

第一章では、PN の NHEKs の表皮分化マーカー mRNA 発現に対する作用を検討した。その結果、PN はプロフィラグリン mRNA 発現のみを増加させ、その他の表皮分化マーカー mRNA 発現を増加させないことを明らかにした。さらに PN は、NHEKs へのカルシウムイオン流入を促進させず、NHEKs の細胞増殖や細胞形態に対して無影響であったことから、PN は表皮分化を進行させずにフィラグリン遺伝子転写のみを活性化させている可能性が示された。また PN は、NHEKs のフィラグリンタンパク質産生量を増加させ、この作用は P2X 受容体アンタゴニストである PPADS および TNA-ATP にも認められ、さらに、PN が誘導したフィラグリンタンパク質産生量は ATP により抑制されることを明らかにした。

第二章では、PN によるフィラグリン増加作用機序解明のための安定的な研究モデル細胞として、成人男性皮膚由来の不死化角化細胞株である HaCaT 細胞を利用することを考え、HaCaT 細胞に対する PN のフィラグリン増加作用について検証した。そ

の結果、PNはHaCaT細胞のプロフィラグリン mRNA 発現量を増加させ、フィラグリンタンパク質産生量は変化させなかった。PNのフィラグリン遺伝子転写に関する作用はNHEKsとHaCaT細胞とで一致したことから、PNのフィラグリン遺伝子転写活性促進作用機序解析にHaCaT細胞を用いることができる可能性が示唆された。

第三章では、PNのフィラグリンタンパク質産生量増加作用を、経皮投与で応用するために、脂溶性を向上させたPN誘導体であるVB6-IPのフィラグリン増加作用について、NHEKs、3D Skinおよびヒトを対象として検討を行った。その結果、VB6-IPはNHEKsのプロフィラグリン mRNA 発現量とフィラグリンタンパク質産生量を増加させ、NHEKsに対しPNと同様の作用を有していることを確認した。さらに、VB6-IPを3D Skinの角層側から添加し、3D Skin内で発現しているフィラグリンタンパク質量を免疫染色で検出した結果、同濃度のPNと比較しVB6-IP処理により3D Skinの顆粒層に強いフィラグリンタンパク陽性シグナルが検出されたことを明らかにした。また、VB6-IPを3%含有する製剤とプラセボ製剤を顔面に4週間連続使用し、皮膚表面水分量を比較した結果、4週間後のVB6-IP製剤塗布部位の皮膚表面水分量は、同じ時期のプラセボよりも有意に高いことが示された。

本研究では、PNがNHEKsでプロフィラグリン mRNA 発現のみを増加させ、フィラグリンタンパク質量も増加させること、VB6-IPを3D Skinの角層側から添加してフィラグリンタンパク質量を増加させ、実際にヒトに使用すると皮膚表面水分量が増加することが明らかになった。皮膚中でフィラグリンタンパク質量が減少するフィラグリン低下症に対するスキンケアや治療の開発に対し、本研究で明らかになったPNおよびVB6-IPのフィラグリン増加作用に関わる知見が貢献すると考えている。

謝辞

本研究を遂行し、学位論文を執筆するにあたり、多くの方からご支援とご指導を頂戴しました。心から感謝を申し上げます。埼玉大学の坂井貴文学長には、入学前より学位取得のきっかけを与えていただき、2017年の入学から2019年3月まで実験ディスカッションを中心に研究の遂行に関して多くのご指導を頂きました。また同大学工学部理工学研究科の坂田一郎教授には、入学から卒業までの4年半にわたり、一貫して研究指導および執筆指導をいただきました。同じく竹見祥大助教には、論文投稿や諸手続きに関わる様々のご支援をいただきました。この4年半の間、3人の先生方のご指導、ご支援があったからこそ、成し遂げられたと考えています。ここに深く感謝し、重ねてお礼申し上げます。同大学大学院理工学研究科の小林哲也教授、塚原伸治教授、鈴木美穂准教授には、お忙しい中、博士論文審査の折に的確なご助言とご指導を頂戴しました。深く感謝いたします。上に挙げた方々以外にも、研究活動および執筆活動を行うにあたり、埼玉大学大学院理工学研究科細胞制御学研究室メンバーの皆様および秘書の方々のサポートのおかげで論文を書き上げることができました。お礼申し上げます。

ニッコールグループ株式会社コスモステクニカルセンターには、このような基礎研究の機会を与えてくださり、仕事と学業の両立を暖かく見守ってくださったことに心より感謝いたします。最後に、社会人ドクターとして仕事をしながら博士課程に進むことに理解を示し、支えてくれた夫、息子、両親に感謝します。

引用文献

1. Rosenberg, I.H., *A history of the isolation and identification of vitamin B(6)*. Ann Nutr Metab, 2012. **61**(3): p. 236-8.
2. Schereiner, A.W., et al., *Seborrheic dermatitis; a local metabolic defect involving pyridoxine*. J Lab Clin Med, 1952. **40**(1): p. 121-30.
3. Lakshmi, A.V. and B.A. Ramalakshmi, *Effect of pyridoxine or riboflavin supplementation on plasma homocysteine levels in women with oral lesions*. Natl Med J India, 1998. **11**(4): p. 171-2.
4. Takagi, C., *ビタミンB6軟膏による2〜3の皮膚疾患の治療*. 東京女子医科大学雑誌, 1957. **27**(12): p. 779-782.
5. Hu, F. and R.R. Cardell, Jr., *Observations on the ultrastructure of human skin*. Henry Ford Hosp Med Bull, 1962. **10**: p. 63-87.
6. Elias, P.M. and D.S. Friend, *The permeability barrier in mammalian epidermis*. J Cell Biol, 1975. **65**(1): p. 180-91.
7. Fleckman, P., B.A. Dale, and K.A. Holbrook, *Profilaggrin, a high-molecular-weight precursor of filaggrin in human epidermis and cultured keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1985. **85**(6): p. 507-12.
8. Mehrel, T., et al., *Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin*. Cell, 1990. **61**(6): p. 1103-12.
9. Rice, R.H. and H. Green, *Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions*. Cell, 1979. **18**(3): p. 681-94.
10. Elias, P.M., *Stratum corneum defensive functions: an integrated view*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(2): p. 183-200.
11. Ishitsuka, Y. and D.R. Roop, *Loricrin: Past, Present, and Future*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(7).
12. Kitajima, Y., *皮膚バリア機能とその制御*. Drug Delivery System, 2007. **22**(4): p. 424-432.
13. Rawlings, A.V. and C.R. Harding, *Moisturization and skin barrier function*. Dermatol Ther, 2004. **17 Suppl 1**: p. 43-8.
14. McLoone, P., et al., *An action spectrum for the production of cis-urocanic acid in human skin in vivo*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(5): p. 1071-4.
15. Miajlovic, H., et al., *Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by Staphylococcus aureus*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(6): p. 1184-90 e3.
16. Fluhr, J.W., et al., *Is the filaggrin-histidine-urocanic acid pathway essential for stratum corneum acidification?* J Invest Dermatol, 2010. **130**(8): p. 2141-4.

17. Goleva, E., E. Berdyshev, and D.Y. Leung, *Epithelial barrier repair and prevention of allergy*. J Clin Invest, 2019. **129**(4): p. 1463-1474.
18. Sakamoto, K., *角層細胞間脂質のバリア機能*. オレオサイエンス, 2017. **17**(11): p. 539-548.
19. Effersoe, H., *The effect of topical application of pyridoxine ointment on the rate of sebaceous secretion in patients with seborrheic dermatitis*. Acta Derm Venereol, 1954. **34**(3): p. 272-8.
20. Dale, B.A., K.A. Holbrook, and P.M. Steinert, *Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in macrofibrils*. Nature, 1978. **276**(5689): p. 729-31.
21. Scott, I.R. and C.R. Harding, *Studies on the synthesis and degradation of a high molecular weight, histidine-rich phosphoprotein from mammalian epidermis*. Biochim Biophys Acta, 1981. **669**(1): p. 65-78.
22. Resing, K.A., K.A. Walsh, and B.A. Dale, *Identification of two intermediates during processing of profilaggrin to filaggrin in neonatal mouse epidermis*. J Cell Biol, 1984. **99**(4 Pt 1): p. 1372-8.
23. Resing, K.A., B.A. Dale, and K.A. Walsh, *Multiple copies of phosphorylated filaggrin in epidermal profilaggrin demonstrated by analysis of tryptic peptides*. Biochemistry, 1985. **24**(15): p. 4167-75.
24. Lonsdale-Eccles, J.D., et al., *High-molecular-weight precursor of epidermal filaggrin and hypothesis for its tandem repeating structure*. Biochemistry, 1984. **23**(6): p. 1239-45.
25. Denecker, G., et al., *Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 666-74.
26. Kamata, Y., et al., *Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids*. J Biol Chem, 2009. **284**(19): p. 12829-36.
27. Steinert, P.M. and D.R. Roop, *Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments*. Annual Review of Biochemistry, 1988. **57**: p. 593-625.
28. Seguchi, T., et al., *Decreased expression of filaggrin in atopic skin*. Arch Dermatol Res, 1996. **288**(8): p. 442-6.
29. Palmer, C.N., et al., *Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 441-6.
30. Freinkel, R.K. and T.N. Traczyk, *Acid hydrolases of the epidermis: subcellular localization and relationship to cornification*. J Invest Dermatol, 1983. **80**(5): p. 441-6.
31. Thacher, S.M. and R.H. Rice, *Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation*. Cell, 1985. **40**(3): p. 685-95.
32. Mills, A.A., et al., *p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 708-13.
33. Blanpain, C., et al., *Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 3022-35.

34. Okuyama, R., et al., *High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 551-62.
35. Hennings, H., et al., *Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture*. Cell, 1980. **19**(1): p. 245-54.
36. Dale, B.A., et al., *Expression of epidermal keratins and filaggrin during human fetal skin development*. J Cell Biol, 1985. **101**(4): p. 1257-69.
37. Steven, A.C., et al., *Biosynthetic pathways of filaggrin and lorricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes*. J Struct Biol, 1990. **104**(1-3): p. 150-62.
38. Yuspa, S.H., et al., *Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro*. J Cell Biol, 1989. **109**(3): p. 1207-17.
39. Howell, M.D., et al., *Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(3 Suppl 2): p. R7-R12.
40. Amano, W., et al., *The Janus kinase inhibitor JTE-052 improves skin barrier function through suppressing signal transducer and activator of transcription 3 signaling*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(3): p. 667-677 e7.
41. Damsky, W. and B.A. King, *JAK inhibitors in dermatology: The promise of a new drug class*. J Am Acad Dermatol, 2017. **76**(4): p. 736-744.
42. Kostovic, K., et al., *Tofacitinib, an Oral Janus Kinase Inhibitor: Perspectives in Dermatology*. Curr Med Chem, 2017. **24**(11): p. 1158-1167.
43. Dillon, S.R., et al., *Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 752-60.
44. Grewe, M., et al., *A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis*. Immunol Today, 1998. **19**(8): p. 359-61.
45. Fujita, H., *The role of IL-22 in the pathogenesis of skin diseases*. Japanese journal of clinical immunology, 2012. **35**(3): p. 168-175.
46. Sumitomo, A., et al., *LPA Induces Keratinocyte Differentiation and Promotes Skin Barrier Function through the LPAR1/LPAR5-RHO-ROCK-SRF Axis*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(5): p. 1010-1022.
47. Otsuka, A., et al., *Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(1): p. 139-46 e1-10.
48. Khakh, B.S., et al., *International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(1): p. 107-18.
49. Burrell, H.E., et al., *Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: evidence for functional P2Y1, P2Y2, and P2Y4 receptors*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(3): p. 440-7.

50. Dixon, C.J., et al., *Regulation of epidermal homeostasis through P2Y2 receptors*. Br J Pharmacol, 1999. **127**(7): p. 1680-6.
51. Bao, L., S. Locovei, and G. Dahl, *Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP*. FEBS Lett, 2004. **572**(1-3): p. 65-8.
52. Harris, A.L., *Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules*. Prog Biophys Mol Biol, 2007. **94**(1-2): p. 120-43.
53. Milner, P., et al., *Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **170**(2): p. 649-56.
54. Hansen, M., et al., *Intercellular calcium signaling induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate and mechanical stimulation in airway epithelial cells*. J Cell Sci, 1993. **106** (Pt 4): p. 995-1004.
55. Ferguson, D.R., I. Kennedy, and T.J. Burton, *ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism?* J Physiol, 1997. **505** (Pt 2): p. 503-11.
56. Burnstock, G., *Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 659-797.
57. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
58. Greig, A.V., et al., *Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(6): p. 1007-15.
59. Inoue, K., et al., *Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(4): p. 756-63.
60. Denda, M., et al., *P2X purinergic receptor antagonist accelerates skin barrier repair and prevents epidermal hyperplasia induced by skin barrier disruption*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(5): p. 1034-40.
61. Ohara, H., et al., *Gene expression profiling defines the role of ATP-exposed keratinocytes in skin inflammation*. J Dermatol Sci, 2010. **58**(2): p. 143-51.
62. Bell, R.J., et al., *Breast reconstruction following mastectomy for invasive breast cancer is strongly influenced by demographic factors in women in Victoria, Australia*. Breast, 2012. **21**(3): p. 394-400.
63. North, R.A. and M.F. Jarvis, *P2X receptors as drug targets*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(4): p. 759-69.
64. Trezise, D.J., et al., *P2 purinoceptor antagonist properties of pyridoxal-5-phosphate*. Eur J Pharmacol, 1994. **259**(3): p. 295-300.
65. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. J Cell Biol, 1988. **106**(3): p. 761-71.

66. Banks-Schlegel, S.P. and P.M. Howley, *Differentiation of human epidermal cells transformed by SV40*. J Cell Biol, 1983. **96**(2): p. 330-7.
67. Bernard, B.A., et al., *Reexpression of fetal characters in simian virus 40-transformed human keratinocytes*. Cancer Res, 1985. **45**(4): p. 1707-16.
68. Steinberg, M.L. and V. Defendi, *Transformation and immortalization of human keratinocytes by SV40*. J Invest Dermatol, 1983. **81**(1 Suppl): p. 131s-6s.
69. Haase, I., et al., *Phospholipase C-mediated signaling is altered during HaCaT cell proliferation and differentiation*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(5): p. 748-52.
70. Assefa, Z., et al., *Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(6): p. 886-91.
71. Im, A.R., et al., *Protective effect of fermented Cyclopia intermedia against UVB-induced damage in HaCaT human keratinocytes*. BMC Complement Altern Med, 2016. **16**: p. 261.
72. Kim, H.J., et al., *Optimization of Cytokine Milieu to Reproduce Atopic Dermatitis-related Gene Expression in HaCaT Keratinocyte Cell Line*. Immune Netw, 2018. **18**(2): p. e9.
73. Sakaguchi, M., et al., *SI00C/A11 is a key mediator of Ca(2+)-induced growth inhibition of human epidermal keratinocytes*. J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 825-35.
74. Micalef, L., et al., *Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes*. Exp Dermatol, 2009. **18**(2): p. 143-51.
75. Mechin, M.C., et al., *The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(17): p. 1984-95.
76. Funayama, R., *PAD12 suppresses proliferation of colon cancer cells through protein citrullination*. 科学研究費助成事業 研究成果報告書, 2019.
77. 公益社団法人日本皮膚科学会、一般社団法人日本アレルギー学会、アトピー性皮膚炎診療ガイドライン作成委員会, *アトピー性皮膚炎診療ガイドライン2018*. 日皮会誌, 2018. **128**(12): p. 2431-2502.
78. Hajar, T., et al., *A systematic review of topical corticosteroid withdrawal ("steroid addiction") in patients with atopic dermatitis and other dermatoses*. J Am Acad Dermatol, 2015. **72**(3): p. 541-549 e2.
79. Loden, M., et al., *A double-blind study comparing the effect of glycerin and urea on dry, eczematous skin in atopic patients*. Acta Derm Venereol, 2002. **82**(1): p. 45-7.
80. Hiroaki Todo, K.S., *化学的および物理的吸収促進法を用いた難吸収性薬物の経皮デリバリー*. Drug Delivery System, 2012. **27**(3): p. 156-163.

81. Hattori, M. and E. Gouaux, *Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 207-12.
82. Bos, J.D. and M.M. Meinardi, *The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs*. Exp Dermatol, 2000. **9**(3): p. 165-9.
83. Bronaugh, R.L., *Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology-Drug Delivery (Dermatology)*. Marcel Dekker Inc, 1989.
84. Flynn, G.L. and S.H. Yalkowsky, *Correlation and prediction of mass transport across membranes. I. Influence of alkyl chain length on flux-determining properties of barrier and diffusant*. J Pharm Sci, 1972. **61**(6): p. 838-52.
85. Yano, T., et al., *Skin permeability of various non-steroidal anti-inflammatory drugs in man*. Life Sci, 1986. **39**(12): p. 1043-50.
86. Scheuplein, R.J., et al., *Percutaneous absorption of steroids*. J Invest Dermatol, 1969. **52**(1): p. 63-70.

図

- 図 1. NHEKs における表皮細胞特異的分化マーカー mRNA 発現に対する PN の作用
- 図 2. PN の NHEKs 内へのカルシウムイオン流入に対する作用
- 図 3. PN の NHEKs 増殖および形態に対する作用 (A) (B)
- 図 4. NHEKs におけるプロフィラグリン mRNA 発現に対する PN 処理時間の検討
- 図 5. NHEKs におけるフィラグリンタンパク質産生に対する PN の作用
- 図 6. NHEKs におけるフィラグリンタンパク質産生に対する P2X 受容体アンタゴニストの作用 (A) (B)
- 図 7. PN によって増加したプロフィラグリン mRNA 発現に対する ATP の作用
- 図 8A. フィラグリンタンパク質産生に対する ATP の作用
- 図 8B. フィラグリンタンパク質産生に対する ATP の作用
- 図 9. HaCaT 細胞におけるプロフィラグリン mRNA 発現に対する PN の作用
- 図 10. HaCaT 細胞におけるフィラグリンタンパク質産生に対する PN の作用
- 図 11. PN によって増加したプロフィラグリン mRNA 発現に対する ATP の作用 (HaCaT 細胞)
- 図 12. NHEKs におけるプロフィラグリン mRNA 発現に対する VB6-IP の作用
- 図 13. NHEKs におけるフィラグリンタンパク質産生に対する VB6-IP の作用
- 図 14. 3D Skin におけるフィラグリンタンパク質産生に対する VB6-IP の作用
- 図 15. ヒト皮膚に対する VB6-IP 配合製剤の保湿作用

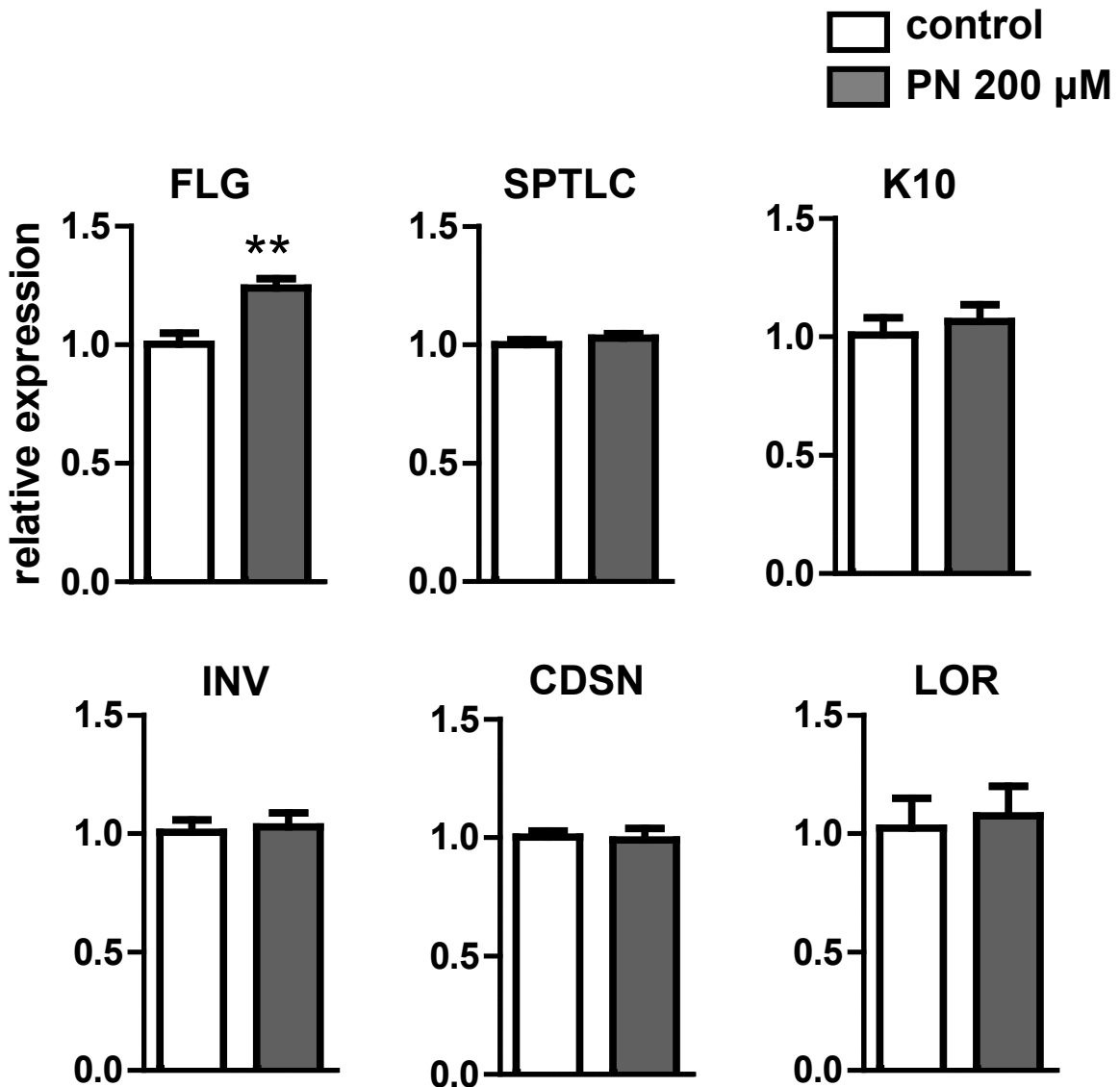


図1. NHEKsにおける表皮細胞特異的分化マーカーmRNA発現に対するPNの作用

200 μM PNを24時間処理をした結果、FLG mRNA発現のみが増加した。200 μMのPNは、その他の遺伝子発現に変化を与えなかった。

n=4; **p<0.01 vs. control

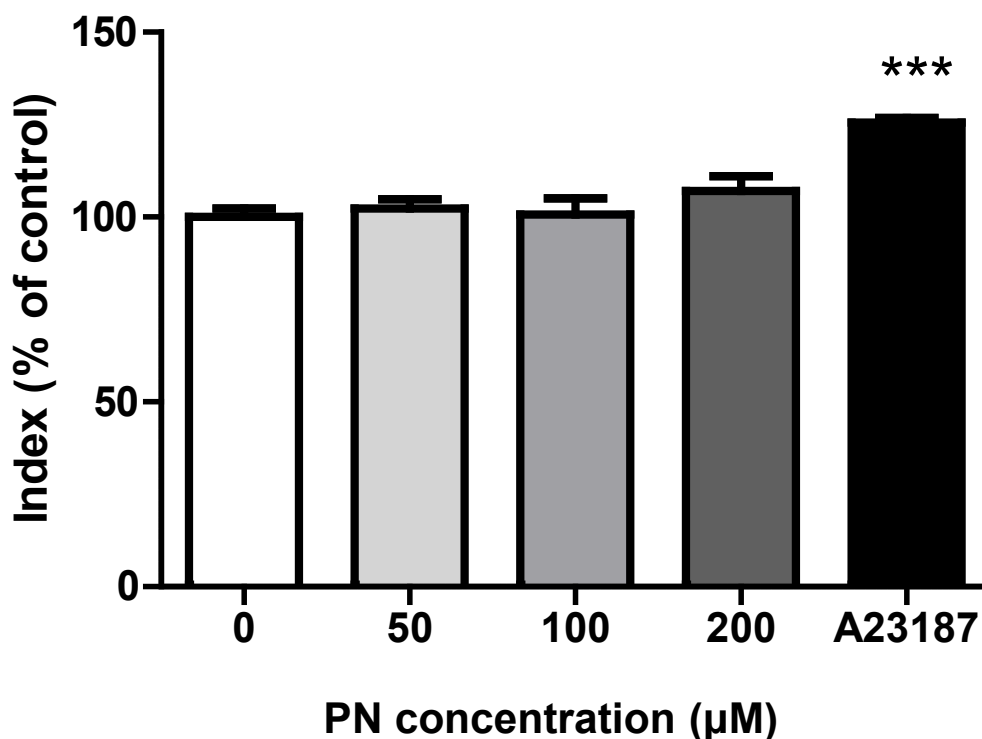


図2. PNのNHEKs内へのカルシウムイオン流入に対する作用

50 μM, 100 μM, 200 μMのPNは、NHEKs内へのカルシウムイオン流入量を変化させなかった。陽性対照のカルシウムイオノフォアA23187は、カルシウムイオン流入を有意に促進した。

n=6; ***p<0.001 vs. control

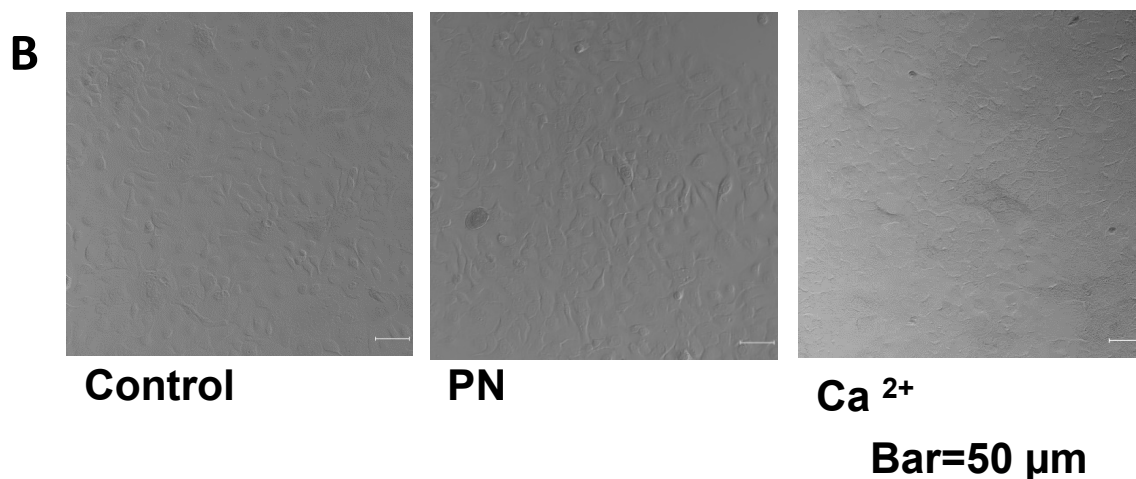
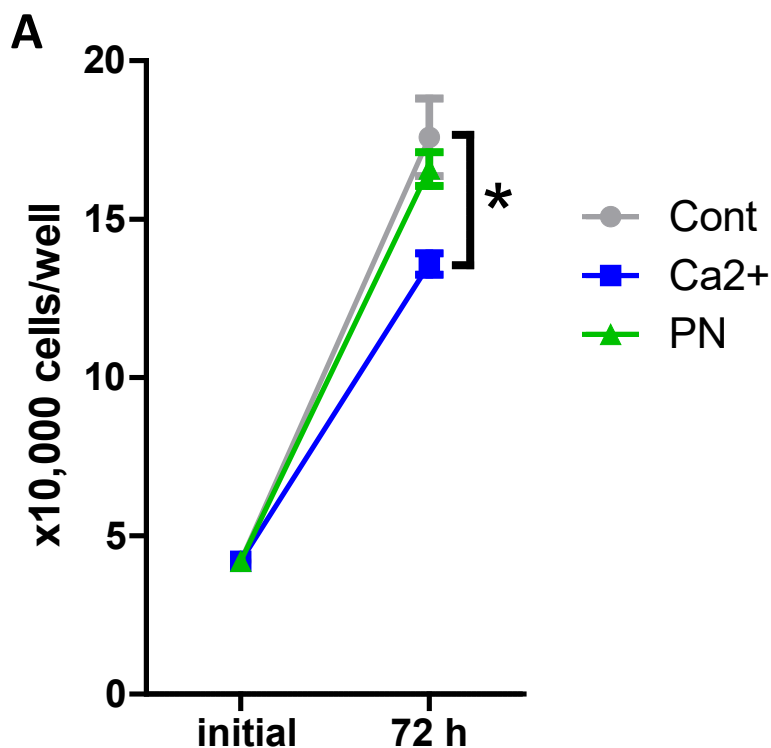


図3. PNのNHEKs増殖および形態に対する作用

200 μM PNを72時間処理した後の細胞数は、未処理群と同水準であった。一方、1.8 mM塩化カルシウムを72時間処理した結果、未処理と比較して有意な細胞数の減少が認められた。

* $p < 0.05$ vs. control (A)。

72時間後の細胞形態を比較した結果、塩化カルシウム処理により細胞の平坦化が見られた一方、PN処理条件では平坦化は観察されず、未処理群と同様の形態が観察された (B)。

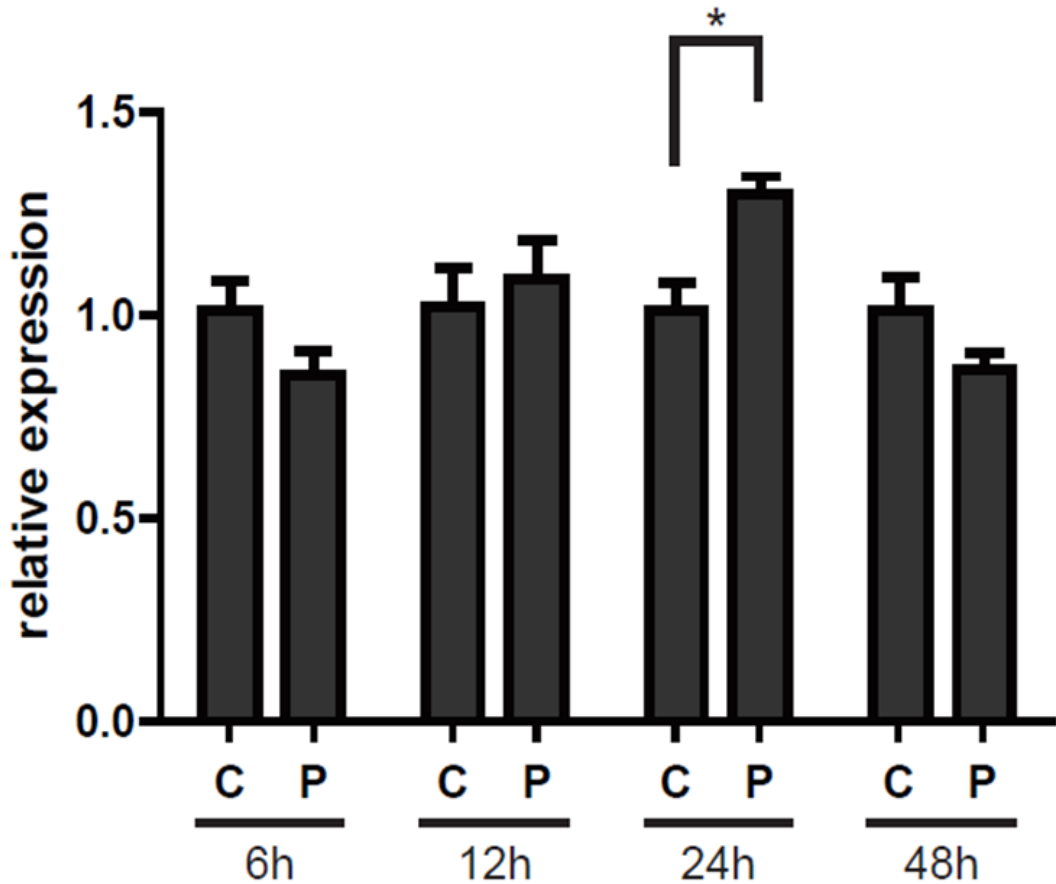


図4. NHEKsにおけるプロフィラグリンmRNA発現に対するPN処理時間の検討

6時間、12時間、48時間の処理時間ではプロフィラグリン遺伝子発現の変化は認められなかった。一方、24時間のPN処理はプロフィラグリンmRNA発現を有意に増加させた。n=6; *p<0.05 vs. control

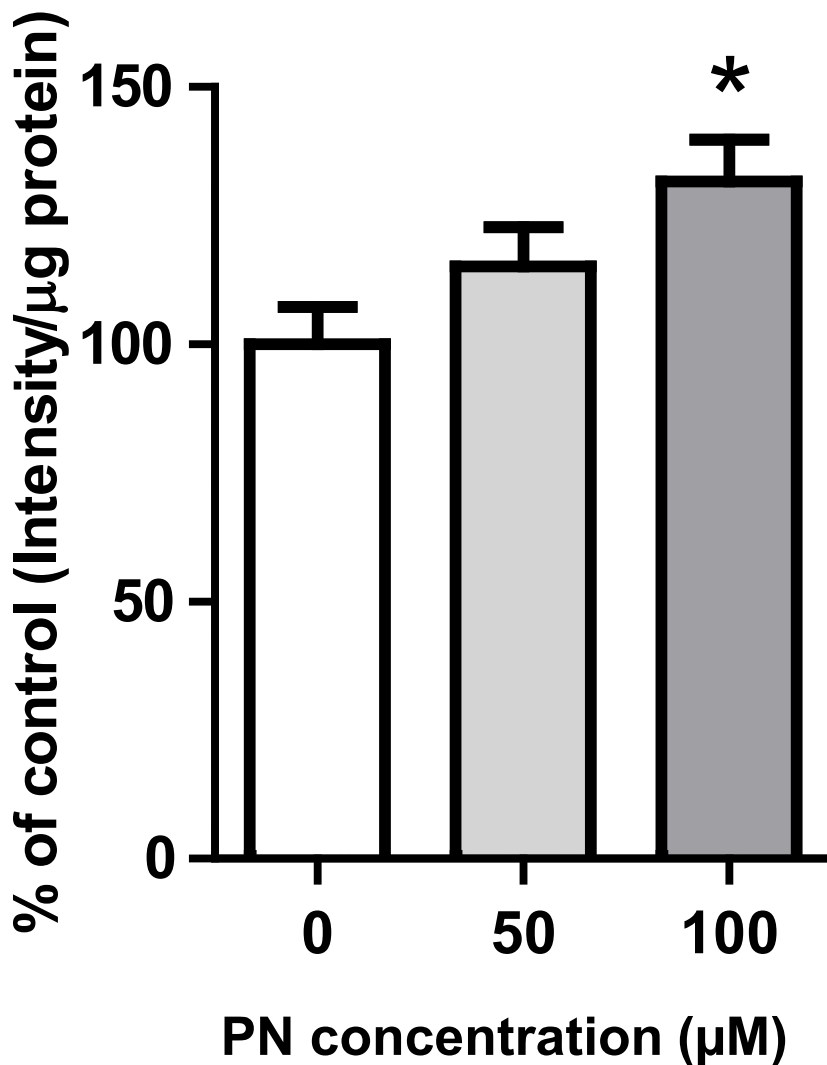


図5. NHEKsにおけるフィラグリンタンパク質産生に対するPNの作用

50 μM PN処理では、フィラグリンタンパク質産生量に変化はなかった。100 μMのPNを72時間処理した結果、フィラグリンタンパク質産生量が有意に増加した。n=10; *p<0.05 vs. 0 μM PN

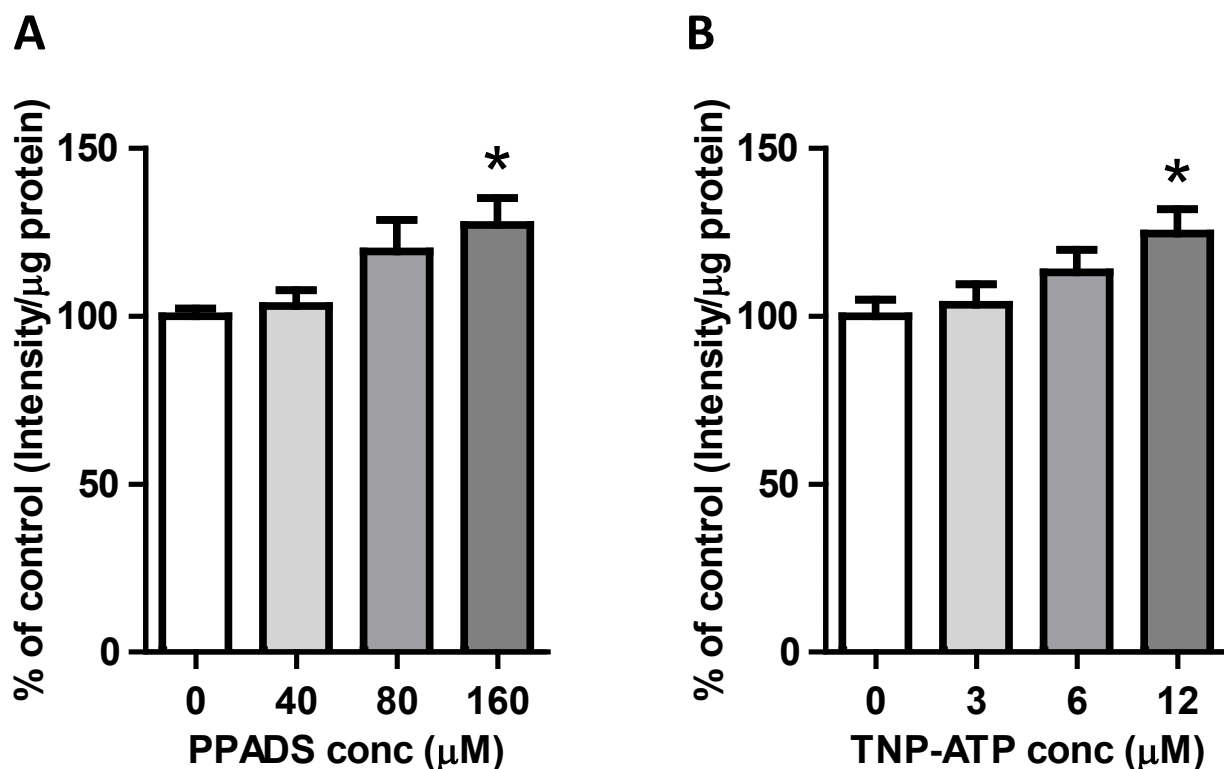


図6. NHEKsにおけるフィラグリンタンパク質産生に対するP2X受容体アンタゴニストの作用

40 μMと80 μMのPPADSではフィラグリンタンパク質産生量に変化は認められなかった。160 μMのPPADSを72時間処理した結果、フィラグリンタンパク質産生量は有意に増加した (A)。

3 μMと6 μMではフィラグリンタンパク質産生量に変化は認められなかった。12 μMのTNP-ATPを72時間処理した結果、フィラグリンタンパク質産生量は有意に増加した (B)。

n=5-10; *p<0.05 vs. 0 μM

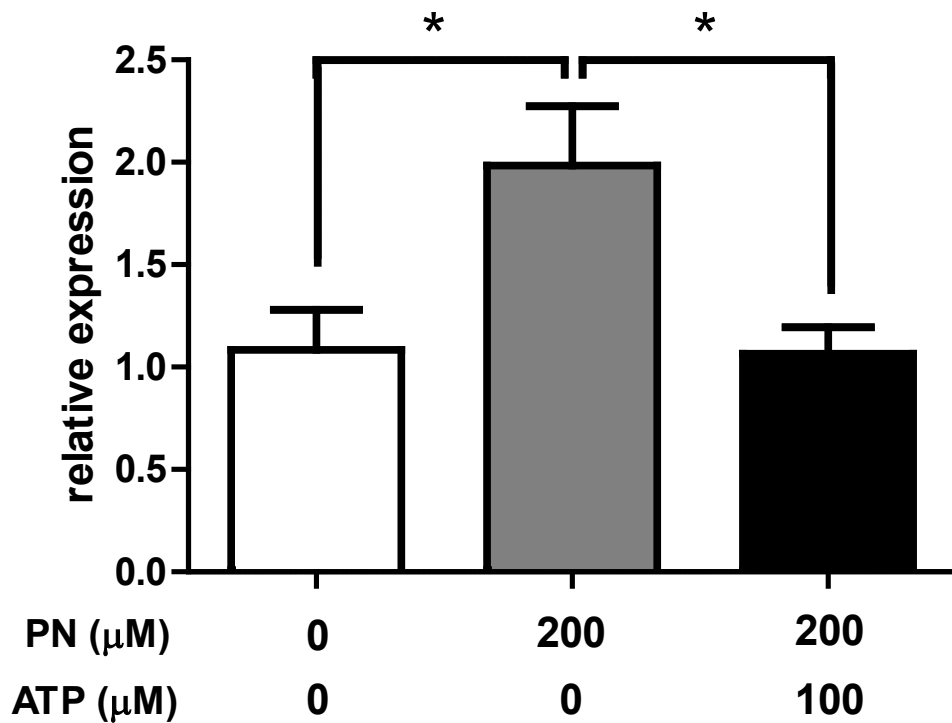


図7. PNによって増加したプロフィラグリンmRNA発現に対するATPの作用

200 μM PNは、ATP非存在下でプロフィラグリンmRNA発現量を有意に増加させた。100μM ATP処理は、200 μM PNによって増加したプロフィラグリンmRNA発現量を有意に抑制した。

n=6; *p<0.05

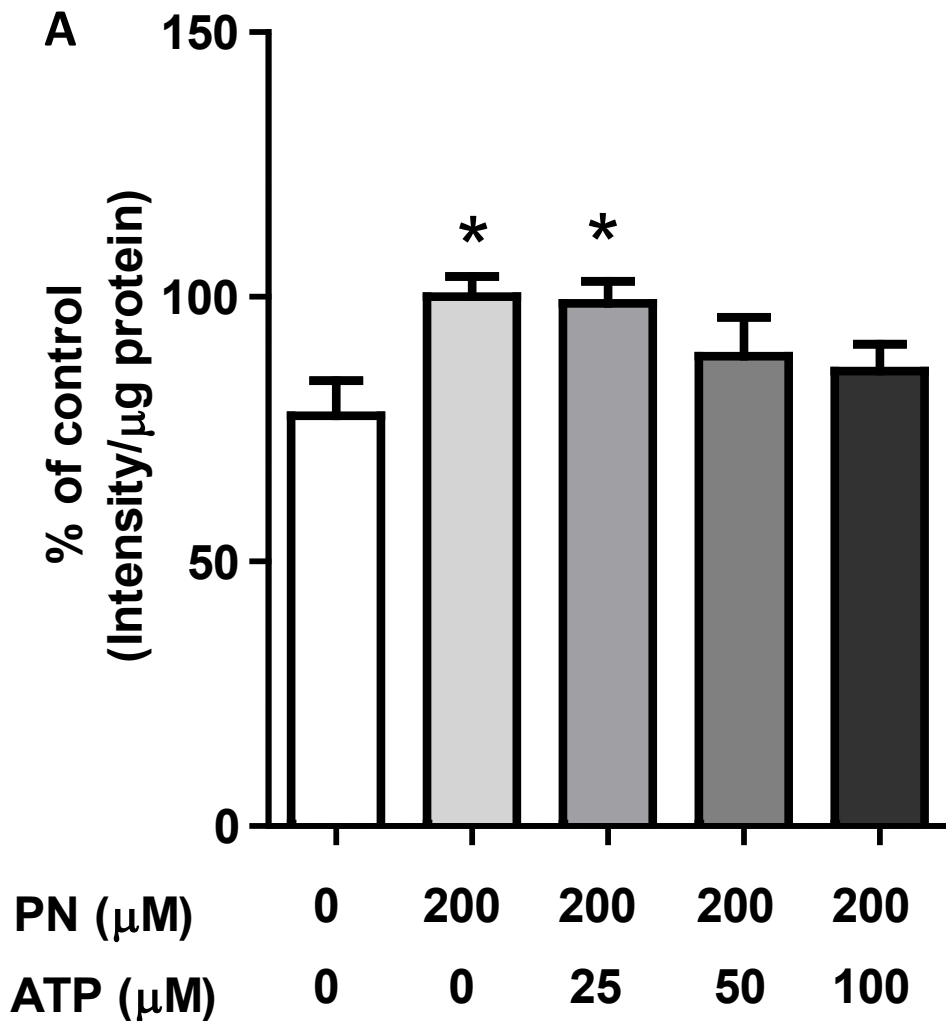


図8A. フィラグリンタンパク質産生に対するATPの作用

200 μM PNは、ATP非存在下と25 μM ATP存在下において有意にフィラグリンタンパク質産生量を増加させた。一方、100 μM ATP処理は、200 μM PN + 0 μM ATP条件と比較してフィラグリンタンパク質産生量の抑制傾向を示した ($p=0.042$)。

$n=10$; * $p<0.05$ vs. PN 0 μM and ATP 0 μM

B

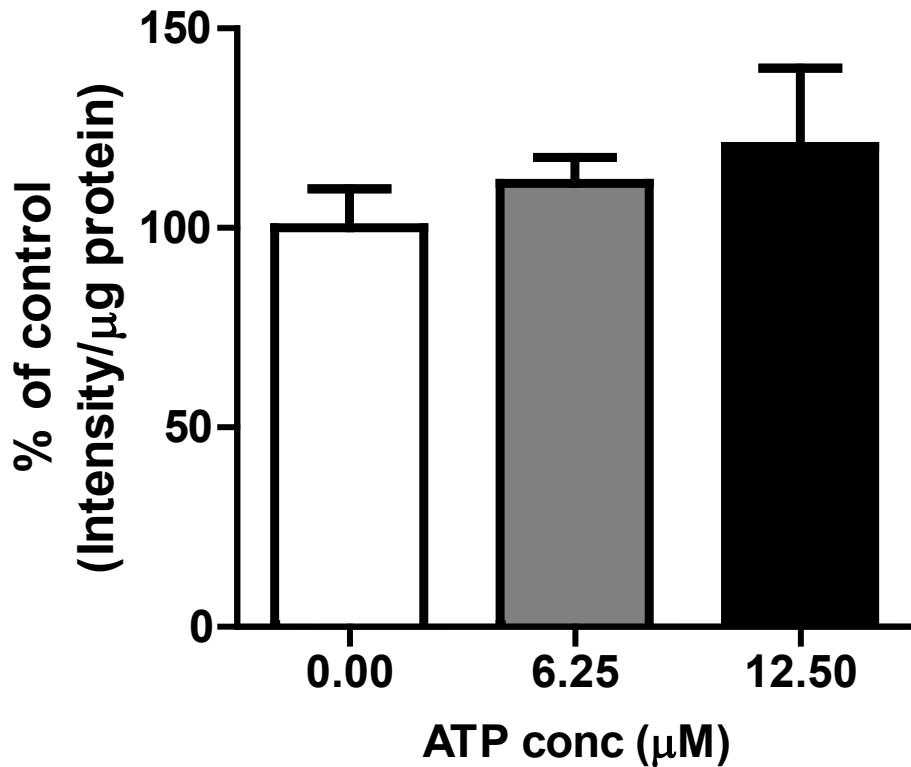


図8B. フィラグリンタンパク質産生に対するATPの作用

6.25 μM と12.5 μM のATPを処理した結果、フィラグリンタンパク質産生量は変化しなかった。

n=5

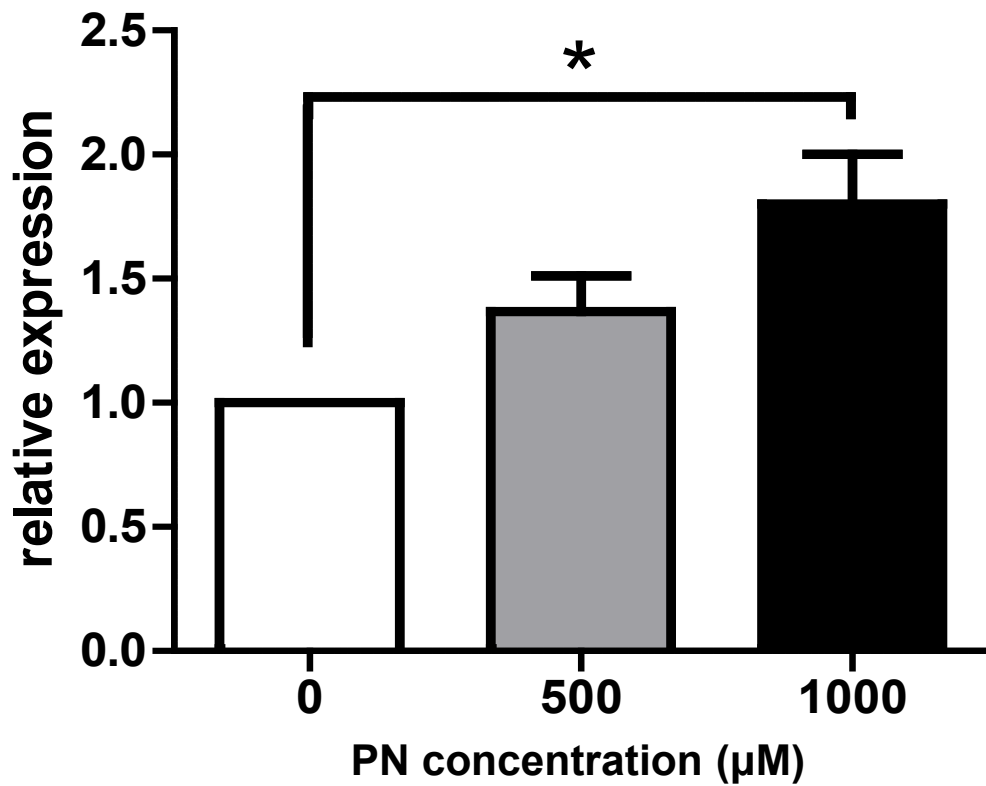


図9. HaCaT細胞におけるプロフィラグリンmRNA発現に対するPNの作用

HaCaT細胞にPNを24時間処理すると、濃度依存的にプロフィラグリンmRNA発現量を増加させた。

n=3; *p<0.05 vs. 0 μM

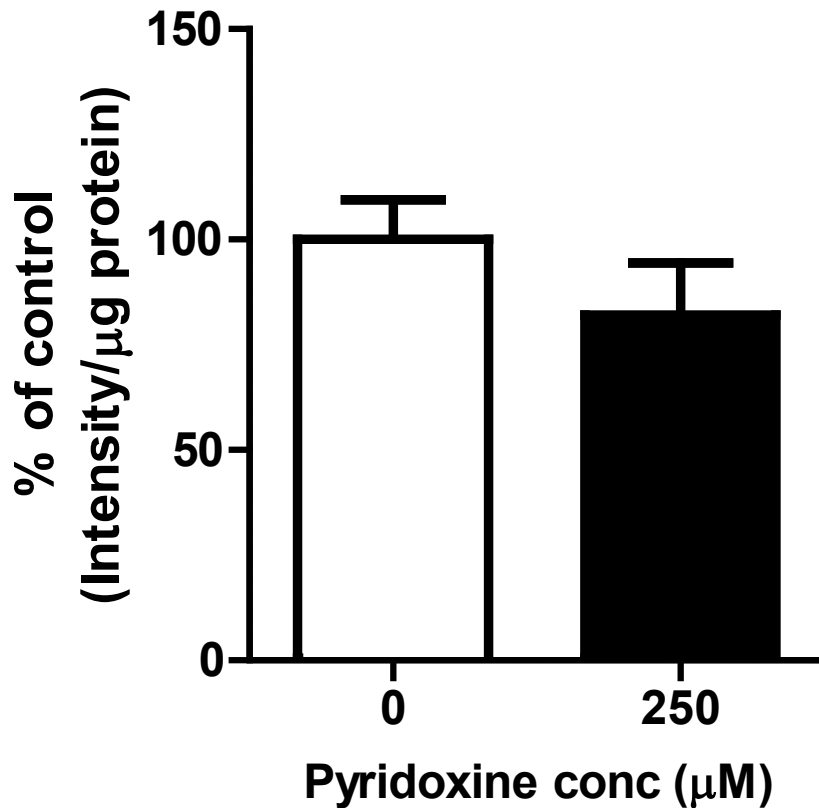


図10. HaCaT細胞におけるフィラグリンタンパク質産生に対するPNの作用

250 μM PNを72時間処理した結果、HaCaT細胞のフィラグリンタンパク質産生量は変化しなかった。

n=6;

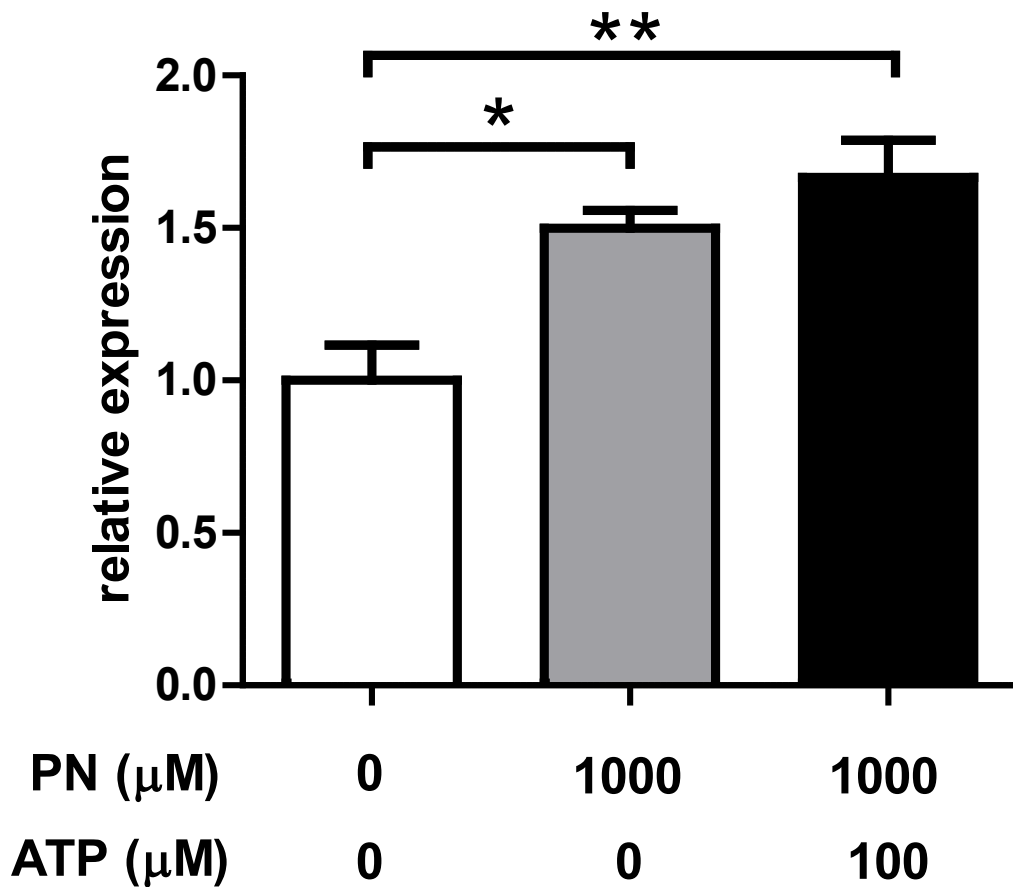


図11. PNによって増加したプロフィラグリンmRNA発現に対するATPの作用 (HaCaT細胞)

1000 μMのPNは、ATP非存在下でプロフィラグリンmRNA有意にを増加させた。一方、100μMのATP処理は、1000 μM PNによって増加したプロフィラグリンmRNA発現量を変化させなかった。

n=3; *p<0.05 vs. PN 0 μM and ATP 0μM, **p<0.01 vs. PN 0 μM and ATP 0μM

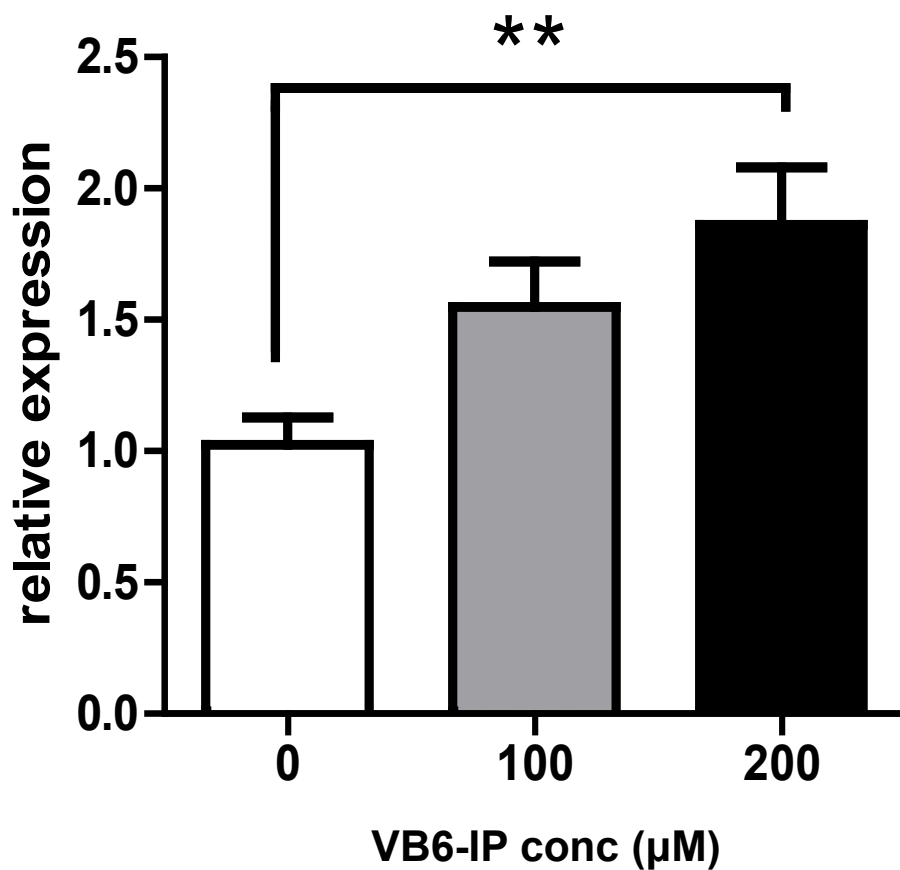


図12. NHEKsにおけるプロフィラグリンmRNA発現に対するVB6-IPの作用

VB6-IPはNHEKsのプロフィラグリンmRNA発現量を濃度依存的に増加させた。

n=8; **p<0.01 vs. 0 μM

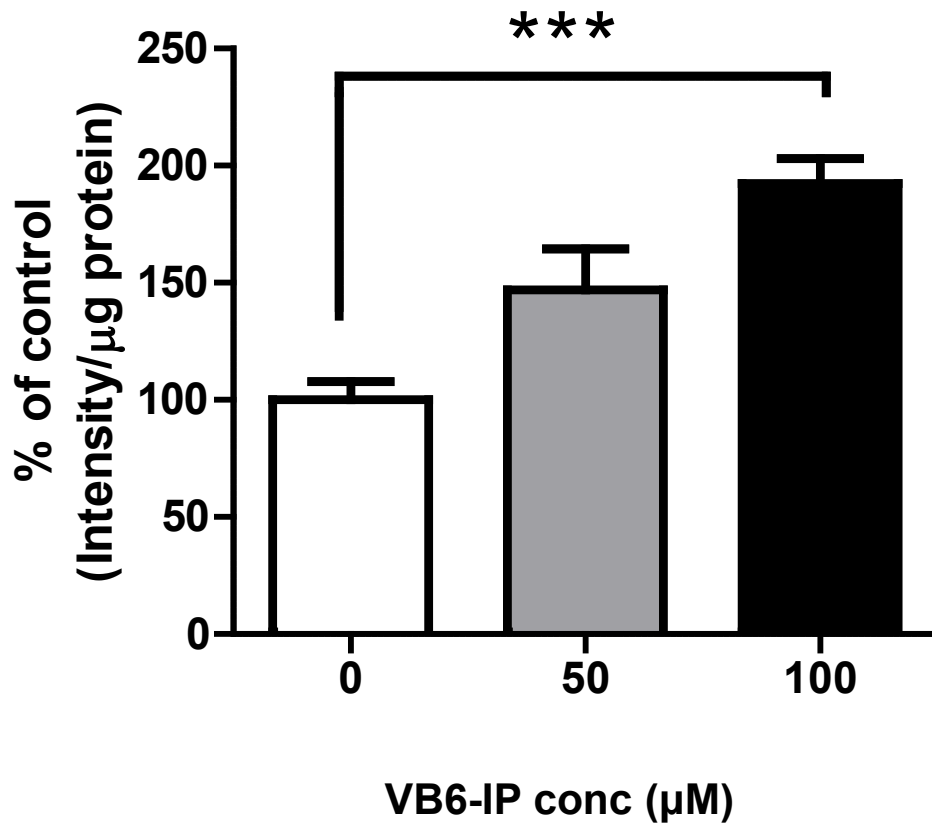
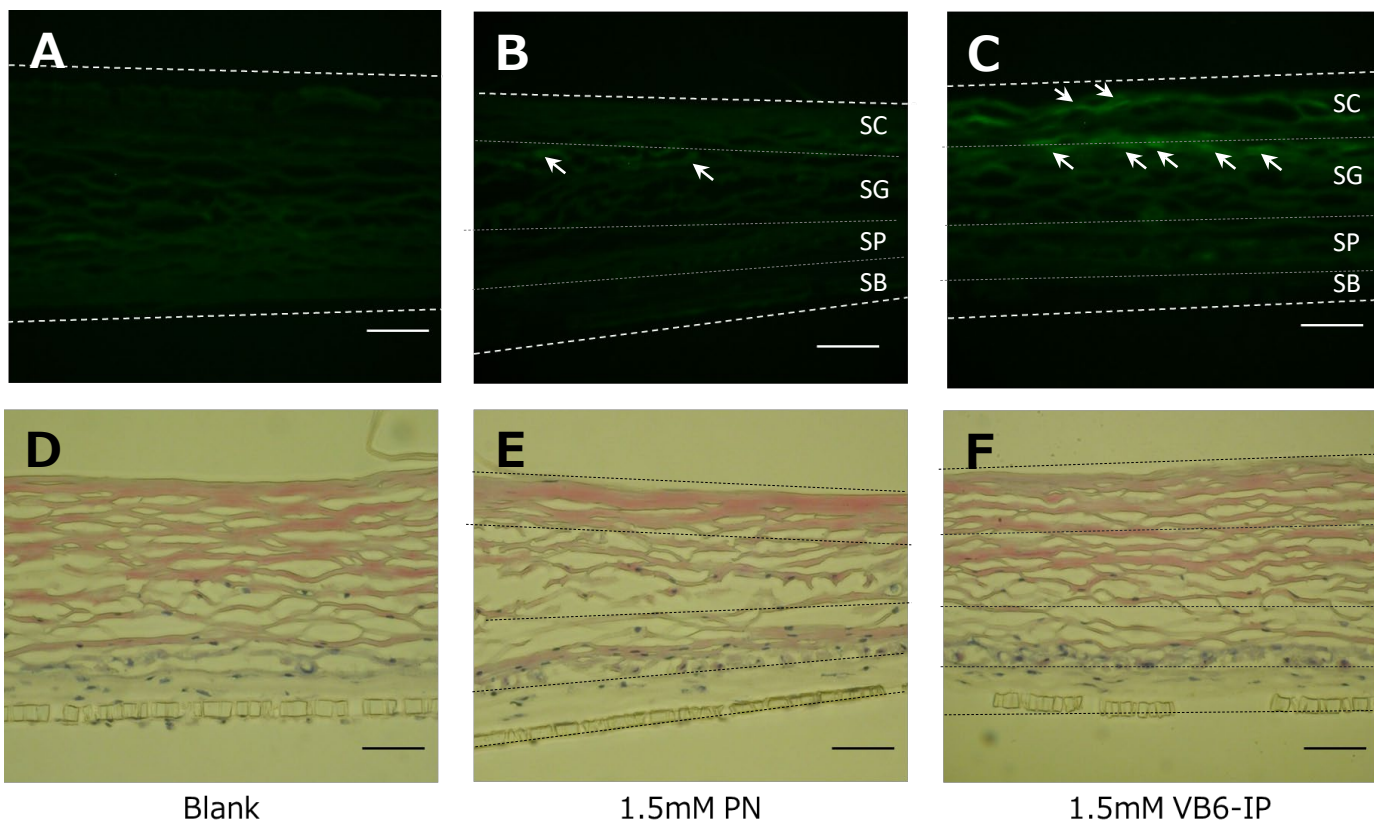


図13. NHEKsにおけるフィラグリンタンパク質産生に対するVB6-IPの作用

VB6-IPは、NHEKsにおいてフィラグリンタンパク質産生量を増加させた。n=5; ***p<0.001 vs. 0 μM



Blank

1.5mM PN

1.5mM VB6-IP

Bar=25 μ m

図14. 3D Skinにおけるフィラグリンタンパク質産生に対するVB6-IPの作用

1.5 mMのVB6-IPを角層側から7日間処理した結果、3D Skinの顆粒層上層においてフィラグリンタンパク質陽性シグナル蛍光強度が特に強く検出された。同濃度のPNを角層側から7日間処理した結果、顆粒層の一部に弱い蛍光が検出された。

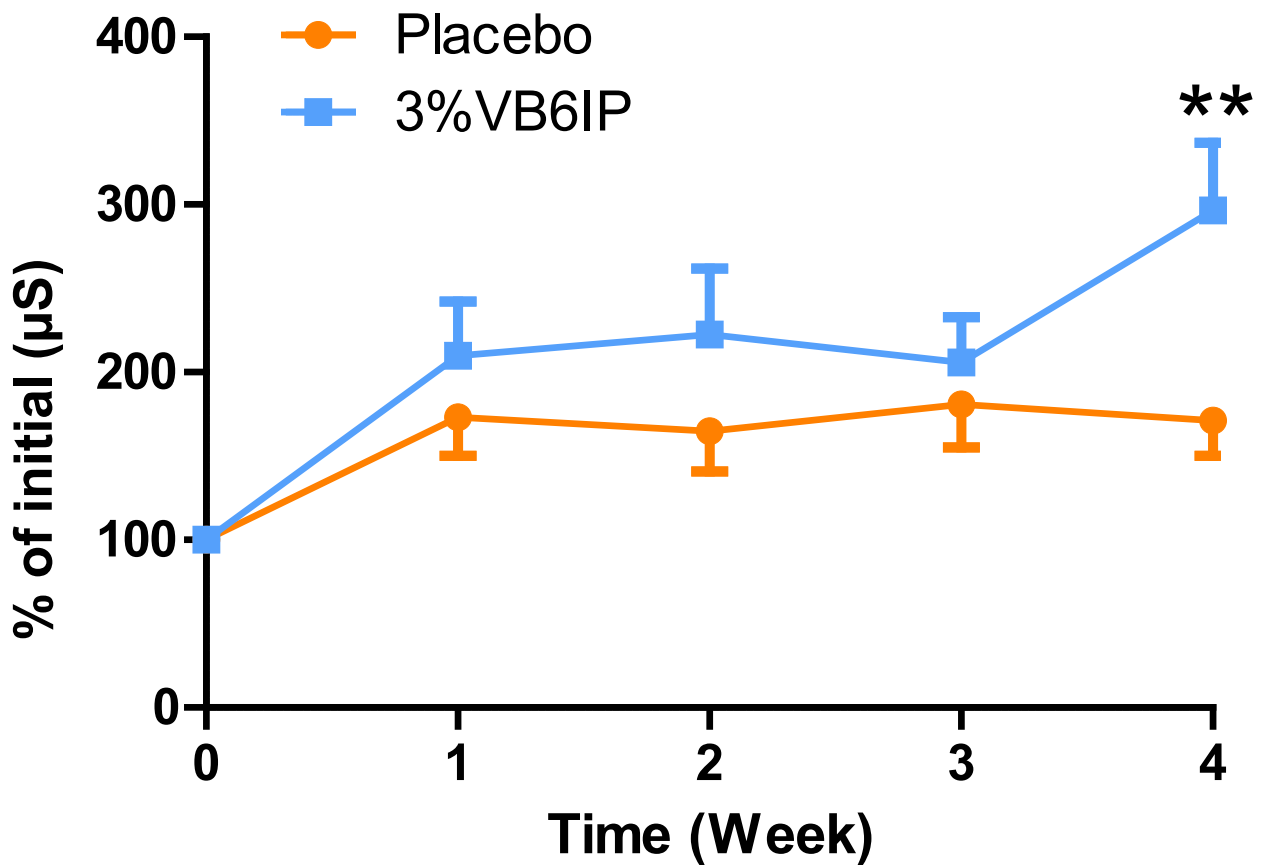


図15. ヒト皮膚に対するVB6-IP配合製剤の保湿作用

連用4週間後において、3% VB6-IP配合製剤塗布部位は、プラセボ製剤塗布部位と比較し有意に皮膚表面水分量の増加が認められた。

n=10; **p<0.01 vs. Placebo