

氏名（本籍）	さよう てつや 佐用 哲也（兵庫県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第323号
学位授与の日付	平成 25 年 7 月 10 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	表皮ヒアルロン酸合成制御機構の解明
論文審査委員（主査）	教授 野水 基義 教授 高木 教夫 教授 馬場 広子 教授 田野中 浩一

論文内容の要旨

ヒアルロン酸(HA)は、N-アセチルグルコサミン(NAG)とグルクロン酸(GlcA)の二糖が交互に結合した高分子多糖で、哺乳動物の結合組織に広く存在するグリコサミノグリカンのひとつである。その分子量は 10^7 Daにも及び、構成単糖のもつ水和能に加え、オーバーラップした三次元ネットワークが水分子を束縛することにより、高い水和体積を獲得する。HAは水和ゲルとして組織の水分保持を担い、また組織に機械的特性を賦与する。皮膚真皮に存在するHAは、細胞外マトリックスを構築する分子として機能する一方で、表皮のHAは重層した表皮細胞の細胞間隙に存在して細胞間スペースを維持し、細胞の増殖や分化に寄与する。皮膚のHAは生体HAの約 50%を占めるが、加齢により減少することが知られている。細胞の増殖・分化といった基本的な細胞機能に関与するHAの減少は、皮膚機能の低下に関わると考えられ、HA代謝制御剤は抗老化機能性素材として有望である。

皮膚HAの半減期は0.5-1.5日と短く、そのターンオーバーを担うHA合成系は、厳密に制御されていると推測される。HA合成酵素(HAS)には3種のアイソザイムが存在することが知られているものの(HAS1, HAS2, HAS3)、ヒト表皮において、いずれのアイソザイムによりHA合成が調節されているかは不明である。

本申請論文では、表皮HAの合成制御機構を明らかにするとともに、抗老化機能性素材につながる化合物を探索することを目的とし、以下の3章において正常ヒト表皮細胞におけるHA合成制御因子の作用機構を詳細に検討した。

第1章 HA合成酵素遺伝子(HAS)発現変動によるHA合成制御

ヒト表皮細胞のHA合成を惹起するサイトカインとしてIFN- γ 、逆に抑制するサイトカインとしてTGF- β を見出した。それぞれのサイトカイン刺激後のHAS遺伝

子の発現について検討したところ、HA合成変動と一致した発現挙動を示したのは、表皮細胞でドミナントに発現する *HAS3* mRNA であった(Fig. 1). 表皮ヒアルロン酸合成を促進させるレチノイン酸の刺激でも *HAS3* 遺伝子の顕著な発現誘導が観察された. これらの結果から表皮 HA の合成は、3 種の *HAS* 遺伝子のうち、主に *HAS3* 遺伝子の発現を介して制御されると考えられた.

ヒト真皮線維芽細胞において HA 合成を調節する合成酵素遺伝子は、主に *HAS2* であることから、表皮と真皮では *HAS* の発現パターンが異なると推測される. 表皮細胞の HA 合成を抑制した TGF- β は、線維芽細胞では主に *HAS2* mRNA 発現誘導を介して HA 合成を促進する. TGF- β が、表皮細胞の増殖を抑制し、逆に線維芽細胞の増殖を促進するサイトカインであることを考えあわせると、TGF- β による HA 合成制御は、細胞増殖時にスペースを確保するという HA の役割を支持する応答であると考えられた.

ヒト表皮細胞により合成される HA 分子量サイズは、サイトカインによる刺激の有無に関わらず、高分子量 ($>1 \times 10^6$ Da) であった. したがって、*HAS3* により合成される HA の分子量サイズは、高分子であると考えられた.

本研究により、表皮細胞における HA の合成制御には、3 種の *HAS* 遺伝子のうち主に *HAS3* 遺伝子の発現が重要な役割を担っていることが明らかになった. 表皮における速い HA のターンオーバーを勘案すると、合成機構だけでなく分解機構の解明も必要である.

第 2 章 レチノイン酸レセプターを介した HA 合成制御

レチノイン酸(RA)はビタミン A の活性本体で、細胞増殖および分化の制御に重要な役割を演ずるが、その前駆体は β -カロテンや β -クリプトキサンチンに代表される食餌性のプロビタミン A カロテノイドである. β -カロテンが RA と同様に、*HAS3* mRNA の発現を誘導すること、加えてその HA 合成誘導がレチノイン酸レセプター(RAR)拮抗薬である LE540 により阻害されたことにより、表皮細胞におけるプロビタミン A から RA に至る代謝経路の存在が示された. 一方、哺乳類ではレチノイドに代謝されないルテイン、ゼアキサンチンおよびアスタキサンチンなどのノンプロビタミン A カロテノイドにも *HAS3* mRNA 発現誘導活性およびその発現

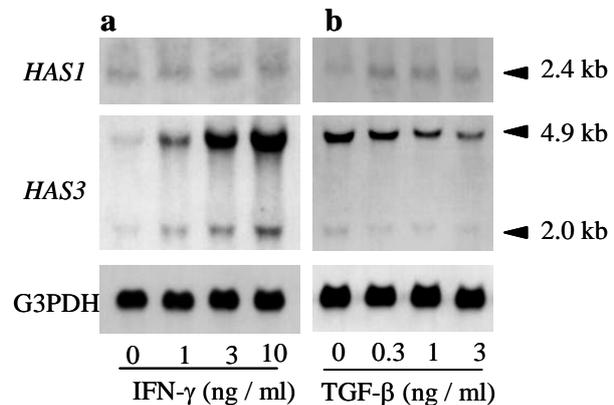


Fig. 1 The *HAS3* transcript level of human keratinocytes was upregulated by IFN- γ but downregulated by TGF- β in a dose-dependent manner. Human keratinocytes were cultured in various concentrations of IFN- γ (a) or TGF- β (b).

挙動と一致する HA 合成の誘導が観察された。HA 合成に及ぼすルテインの効果は β -カロテンと同様、LE540 で抑制された。ルテインによる刺激後に RARE 依存の転写活性が増大したことから (Fig. 2), ルテインの代謝物あるいはルテイン自体が RAR のリガンドとして機能していることが示された。さらに表皮細胞での HA 合成に対するルテインの効果が、レチナル脱水素酵素 (RALDH) の阻害剤であるシトラールにより抑制されたことから、ルテインはプロビタミン A 同様、表皮細胞内でアルデヒド化合物に変換され、続いて酸化反応を受けて RA 類似体に代謝されることで生理活性を発揮させることが示唆された。

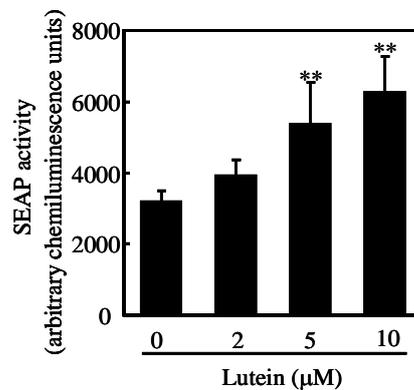


Fig. 2 Effect of lutein on RAR activation.
Significantly different from the control value;
**P < 0.01 (William's test).

第 3 章 細胞内 HA 基質プールの変動による HA 合成制御機構

表皮細胞の HA 合成を高める化合物として、N-アセチルグルコサミン (NAG) を見出した。細胞内には複合糖質のリソソーム分解物として NAG が存在する。この NAG は、NAG キナーゼ (NAGK) により NAG6-リン酸に、最終的には糖供与体である UDP-NAG に変換されることで、糖タンパクや糖脂質の糖付加に再利用される。

表皮細胞で NAGK mRNA の発現を認め、さらに NAG の添加により細胞内 UDP-NAG 量が増加したことから (Fig. 3), NAG の HA 産生促進作用は、細胞内基質の増大によるものであることが示された。加えて、HA 合成過程において基質の合成が律速になっていると考えられた。表皮細胞に RA と NAG を同時に作用させることにより、相乗的な HA 合成促進効果を認めたことから、HA のもう一つの糖供与体である UDP-GlcA の細胞内プールは、HA 合成の律速にはなっていないことが示唆された。

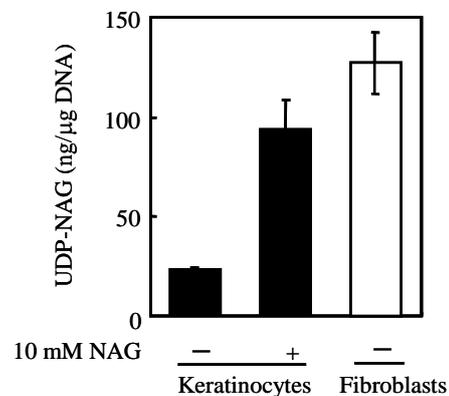


Fig. 3 Effect of NAG on UDP-NAG pools.

次に、NAG の細胞内取り込みについても検討した。NAG の取り込みはグルコーストランスポーター (GLUT) を介するものでなく、単純拡散により取り込まれると予想し、細胞内で NAG へと変換可能な親油性の NAG グリコシド誘導体を合成・評価した。NAG グリコシド誘導体は NAG に比して低濃度域で作用を示した。この結果は、NAG が単純拡散により細胞内に取り込まれることを示唆した。

これらの結果から、HA の合成調節が転写レベルだけでなく、細胞や組織におい

ては細胞内基質レベルにおいても制御されることが示唆された。

以上, Fig. 4 に示すように, 表皮 HA 代謝に関わる新たな知見について記載した。

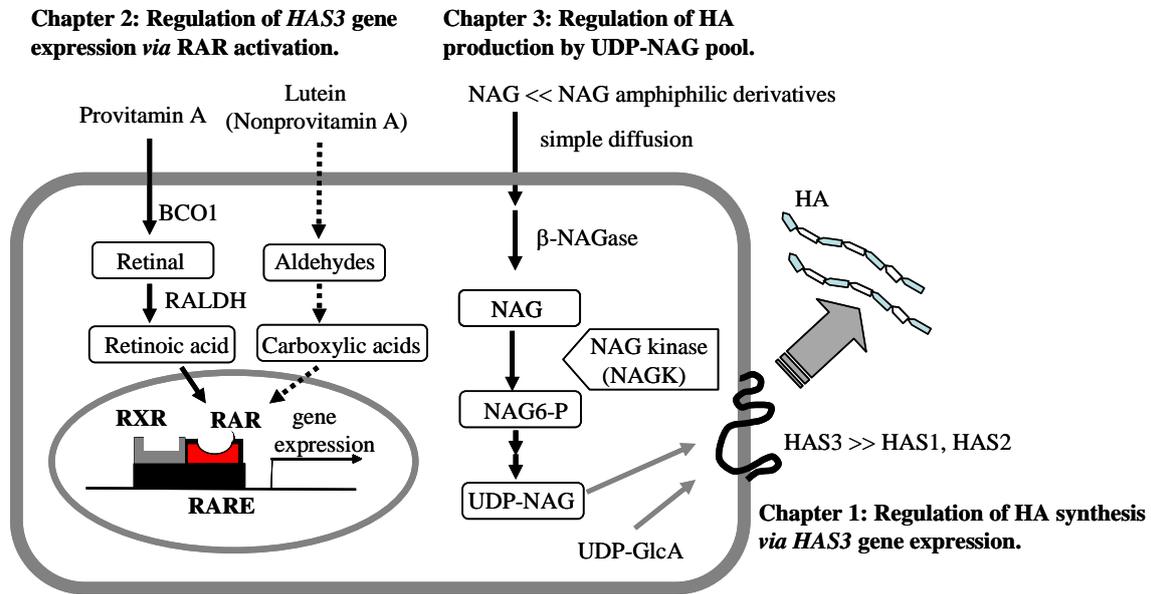


Fig. 4 Regulation of HA synthesis in keratinocyte.

まず, 表皮の転写レベルにおける HA 合成の制御は主に *HAS3* mRNA が担うことを見出した. このことにより, 表皮 HA 合成制御剤開発において, *HAS3* mRNA 発現を指標にした薬剤探索が可能となることが期待される.

次に, RAR 活性化を機序とし, かつ安全性の高い HA 合成制御剤の候補として, プロビタミン A およびシクロヘキセン環とポリエーテル構造を有するノンプロビタミン A カロテノイドを見出した.

最後に, HA 合成促進剤として細胞内基質プールを増大させる NAG を見出し, 転写レベルによる制御だけではなく, 細胞内基質プールへ作用も HA 合成制御剤開発の重要なストラテジーになることを示した. 膜透過を考慮した両親媒性 NAG 誘導体の開発により, 効率的に HA 合成を亢進させることが可能なことも示した.

本研究結果の掲載

- 1) J. Invest. Dermatol., **118**, 43-48 (2002).
- 2) Biosci. Biotechnol. Biochem., **77**, 1282-1286 (2013).
- 3) Skin Pharmacol. Physiol., **17**, 77-83 (2004).

論文審査の結果の要旨

皮膚老化に対してレチノイン酸の外用が有効であることが明らかにされており、その作用機序の一つとして表皮ヒアルロン酸の合成促進作用が示唆されている。皮膚ヒアルロン酸は細胞の増殖・分化に関与し、加齢に伴い減少することが知られており、その代謝制御剤は抗老化機能性素材として有望である。レチノイン酸は欧米で抗老化医薬品として認可されているが、副作用として皮膚刺激、落屑性紅斑および掻痒等を引き起こすため、本邦では外用剤として認可されておらず、より安全性の高い物質が望まれている。本申請論文では、表皮ヒアルロン酸合成に関する 3 種のヒアルロン酸合成酵素遺伝子 (HAS1, 2, 3) 発現の寄与を検討するとともに、レチノイン酸レセプター (RAR) を介した HAS 遺伝子発現調節およびヒアルロン酸合成調節機構について検討を行ったものである。

第 1 章では、表皮細胞のヒアルロン酸合成が 3 種類あるヒアルロン酸合成酵素遺伝子のうち、いずれの発現で制御されるかを検討した。ヒアルロン酸合成を促進するサイトカインとして IFN- γ を抑制するサイトカインとして TGF- β を見出した。両サイトカイン添加によるヒアルロン酸合成変動と一致する発現挙動を示す HAS 遺伝子は、ヒト表皮細胞で恒常的に発現している HAS3 遺伝子であった。表皮ヒアルロン酸の合成を促進させるレチノイン酸も HAS3 遺伝子の発現量を顕著に増加させた。これらのことから、表皮細胞のヒアルロン酸合成調節は、転写レベルでは主に HAS3 mRNA の発現を介していることを示した。

第 2 章では、カロテノイド類に着目し、ヒアルロン酸合成への効果とそのメカニズムを検討した。レチノイン酸へ代謝されるプロビタミン A 類だけでなく、レチノイン酸に変換されないノンプロビタミン A のルテインも、HAS3 mRNA 発現誘導に伴ってヒアルロン酸の産生を亢進させた。ルテインは RAR を活性化させ、さらにルテインによるヒアルロン酸合成促進効果は RAR 拮抗阻害薬およびレチナル脱水素酵素阻害剤の添加で抑制された。これらの結果から、ルテイン自体よりむしろ、その代謝物が、RAR アゴニストとして機能することを示した。

第 3 章では、表皮細胞のヒアルロン酸合成促進物質として N-アセチルグルコサミン (NAG) を見出し、その作用機序について検討した。ヒアルロン酸は UDP-NAG と UDP-GlcA を基質として生合成されるが、NAG は表皮細胞で UDP-NAG へ変換されることでヒアルロン酸合成を亢進させることを明らかにした。さらに、膜透過性を向上させた両親媒性の NAG 誘導体は、NAG 添加有効濃度の約 1 %濃度で HA 合成を促進させ、HA 合成制御剤の可能性を示した。

以上、本研究では、表皮ヒアルロン酸の合成制御機構を解明し、新たな抗老化機能性素材開発への応用の可能性を示したもので、全体的にまとまっており新規性・応用性もあり、博士 (薬学) の申請論文として価値あるものと判断できる。