

真皮線維芽細胞由来エラスターゼの本体の同定と

皮膚老化および毛周期における役割

**Identification of dermal fibroblast-derived elastase and its role
in skin aging and hair cycle**

森崎 尚子

目次

| | |
|---|----|
| 緒言 | 1 |
| 第1章 シワ形成における真皮線維芽細胞由来エラスターゼの役割：選択的阻害剤を用いた検討 | 8 |
| 1. 1 序論 | 8 |
| 1. 2 実験材料と方法 | 9 |
| 1. 2. 1 実験材料 | 9 |
| 1. 2. 2 細胞培養 | 9 |
| 1. 2. 3 エラスターゼ活性の測定 | 9 |
| 1. 2. 4 コラゲナーゼ活性の測定 | 10 |
| 1. 2. 5 エラスターゼ阻害剤の合成 | 10 |
| 1. 2. 6 動物 | 11 |
| 1. 2. 7 紫外線照射 | 11 |
| 1. 2. 8 紫外線吸収 | 11 |
| 1. 2. 9 エラスターゼ阻害剤塗布 | 12 |
| 1. 2. 10 シワの測定 | 12 |
| 1. 2. 11 組織学 | 12 |
| 1. 2. 12 統計解析 | 12 |
| 1. 3 結果 | 15 |
| 1. 3. 1 UVB 照射の効果 | 15 |
| 1. 3. 2 真皮線維芽細胞由来のエラスターゼ様酵素の特徴 | 15 |
| 1. 3. 3 phosphoramidon 誘導体の阻害活性 | 15 |
| 1. 3. 4 NPLT のマウス皮膚エラスターゼに対する阻害活性 | 16 |
| 1. 3. 5 エラスターゼ阻害剤によるシワ形成抑制 | 16 |
| 1. 3. 6 微細弾性線維の変化 | 16 |
| 1. 4 考察 | 26 |

1. 5 まとめ 29

第2章 真皮線維芽細胞エラスターゼの本体 (neprilysin) 同定とその老化および紫外線応答における役割 30

2. 1 序論 30

2. 2 実験材料と方法 31

2. 2. 1 細胞培養 31

2. 2. 2 動物 31

2. 2. 3 酵素抽出 32

2. 2. 4 エラスターゼ活性測定 32

2. 2. 5 NEP 活性測定 32

2. 2. 6 免疫染色 33

2. 2. 7 免疫沈降 33

2. 2. 8 ウェスタンブロッティング 33

2. 2. 9 ヒト NEPcDNA のクローニング 34

2. 2. 10 NEPcDNA 発現ベクターの細胞への導入 34

2. 2. 11 RT-PCR によるヒト NEP 遺伝子発現解析 34

2. 2. 12 UV 照射 35

2. 2. 13 統計解析 35

2. 3 結果 35

2. 3. 1 抗 NEP 抗体を用いた免疫沈降 35

2. 3. 2 HSF の NEP 免疫染色 36

2. 3. 3 ヒト NEP 発現ベクターの導入 36

2. 3. 4 NEP は 72kDa ゼラチナーゼを 66kDa ゼラチナーゼに変換できない 37

2. 3. 5 細胞継代老化時のエラスターゼ/NEP 変動 37

2. 3. 6 マウス皮膚自然老化時のエラスターゼ/NEP 活性変動 38

2. 3. 7 HSF のエラスターゼ/NEP 活性に対する紫外線照射の影響 38

2. 3. 8 UVB 照射ヒトケラチノサイト培養上清の HSF エラスターゼ/NEP 活性に及

| | | |
|----------|------------------------------------|----|
| | ぼす影響 | 38 |
| 2. 3. 9 | HSF のエラスターゼ/NEP 活性に及ぼす種々のサイトカインの影響 | 39 |
| 2. 3. 10 | UVB 照射ヒトケラチノサイトからのサイトカイン分泌 | 39 |
| 2. 3. 11 | HSF からのサイトカイン分泌に対する UVA 照射の影響 | 39 |
| 2. 4 | 考察 | 50 |
| 2. 5 | まとめ | 53 |
| | | |
| 第3章 | 毛周期調節における neprilysin の役割 | 54 |
| 3. 1 | 序論 | 54 |
| 3. 2 | 実験材料と方法 | 55 |
| 3. 2. 1 | 動物 | 55 |
| 3. 2. 2 | 酵素活性の測定 | 55 |
| 3. 2. 3 | NEP タンパク発現 (免疫沈降とウェスタンブロッティング) | 55 |
| 3. 2. 4 | ノーザンブロッティングによる NEP 遺伝子発現解析 | 56 |
| 3. 2. 5 | ラット毛周期における免疫染色 | 56 |
| 3. 2. 6 | ラットとマウスのエラスチン染色 | 56 |
| 3. 2. 7 | マウス毛再生の評価 | 56 |
| 3. 2. 8 | ヒト毛包器官培養 | 57 |
| 3. 2. 9 | 統計解析 | 58 |
| 3. 3 | 結果 | 60 |
| 3. 3. 1 | 細胞外マトリックス分解酵素の毛周期変動 | 60 |
| 3. 3. 2 | NEP 活性、タンパク発現、遺伝子発現の毛周期変動 | 60 |
| 3. 3. 3 | 毛周期の各ステージにおける NEP の局在 | 61 |
| 3. 3. 4 | マウス毛周期調節に及ぼす NEP 阻害剤の効果 | 61 |
| 3. 3. 5 | ヒト頭皮単離毛包器官培養における NEP 阻害剤の効果 | 62 |
| 3. 3. 6 | 毛包周囲の弾性線維分布 | 62 |

| | |
|----------|----|
| 3. 4 考察 | 71 |
| 3. 5 まとめ | 74 |
| 総括 | 75 |
| 要旨 | 80 |
| 謝辞 | 82 |
| 参考文献 | 83 |

略語一覽

ECM: extracellular matrix

MMP: matrix metalloproteinase

NEP: neutral endopeptidase

UV: ultraviolet

NPLT: N-phenethylphosphonyl-L-leucyl-L-tryptophane

STANA: N-succinyl-tri-alanyl-p-nitroaniline

PMSF: phenylmethylsulfonylfluoride

EDTA: ethylenediamine-tetraacetic acid

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

PBS: phosphate buffered saline

SPF: sun protection factor

HE: hematoxylin and eosin

MED: minimal erythema dose

IC₅₀: 50% inhibitory concentration

AP-1: activator protein 1

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

BSA: bovine serum albumin

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

FCS: fetal calf serum

HSF: human skin fibroblast

IL: interleukin

GM-CSF: Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor

ELISA: enzyme-linked immuno sorbent assay

TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase

CALLA: common acute lymphoblastic leukemia antigen

CD: cluster of differentiation

SD: Sprague-Dawley

AUC: area under curve

AA: alopecia areata

QOL: quality of life

学位論文を構成する論文

1. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G, (2001) "The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity.", *Photochem Photobiol*, **74**, 283-290
2. Morisaki N, Moriwaki S, Sugiyama-Nakagiri Y, Haketa K, Takema Y, Imokawa G, (2010) "Neprilysin is identical to skin fibroblast elastase: its role in skin aging and UV responses." *J Biol Chem*, **285**, 39819-39827
3. Morisaki N, Ohuchi A, Moriwaki S, (2013) "The Role of Neprilysin in Regulating the Hair Cycle." *PLoS ONE*, **8**, e55947

緒 言

生体の最外層を覆う皮膚は人体最大の臓器であり、その機能としては外界からの刺激に対するバリア、物質・熱交換の調節、体の強度と柔軟性を維持する、五感のうちの触覚刺激を受け取る、などの重要な働きを担っている。皮膚は表皮・角層、真皮、及び皮下脂肪の三層構造となっており、ヒトではそれぞれの厚みは表皮が 0.1~0.3mm、真皮が 2~3mm、皮下組織が 4~9mm で、体の様々な部位により厚みにバリエーションがある。皮膚中には更に皮脂腺、汗腺、毛髪、爪などの付属器官も存在し、体の部位ごとに様々な生体機能を果たしている（図 1）。このように複雑で、多彩な機能を果たすため、複数の細胞からなる複合組織である皮膚は、その組織形成や機能発現において種々の生体因子による調節を受けていることは疑いが無く、様々な視点からの研究が活発に進められている。真皮線維芽細胞は真皮を構成する主要な細胞であり、皮膚の構造や物性に影響を及ぼす細胞外マトリックス（ECM）の生成、代謝、維持に関与している。真皮の約 70%を占める膠原線維は真皮線維芽細胞が産生する主要な ECM の一つで、真皮の強度・構造維持に重要な役割を果たしている。一方、同じく真皮線維芽細胞によって産生される弾性線維は皮膚の弾力性に影響を与える。実際にこれまで、日本人の女性目尻において加齢に伴いシワの深さが増大すること、それに先立ち加齢に伴い皮膚の弾力性が低下するが、特に露光部でその変化が顕著であることが報告されていた[1, 2]。更に、真皮弾性線維の三次元構造を可視化する方法により、紫外線の連続照射で弾性線維の湾曲化が観察されていた[3, 4]。これらのことから、加齢に伴うシワ形成には紫外線による弾性線維損傷が関与すると考えられた。そこで本研究ではこの弾性線維に着目し、その代謝が皮膚に及ぼす影響について検討することで、加齢や紫外線により形成されるシワなどの皮膚形態の変化や、皮膚付属器官である毛包組織のダイナミックな成長と退縮を繰り返す毛周期における弾性線維の役割を明らかにするとともに、その代謝の主要因である分解酵素エラスターゼの本体の同定を行うことにより、皮

膚や毛包の構造・形態変化における、より詳細な分子機構を解明することを試みた。

本研究のターゲットである弾性線維の主な構成成分はエラスチンであり、前駆体であるトロポエラスチンがマイクロフィブリル上に沈着し、リジルオキシダーゼにより架橋されることにより線維構造が形成される。これら構成成分は、真皮の主要構成細胞である線維芽細胞によって産生される。エラスチンに関しては真皮線維芽細胞や、組織に浸潤してきたリンパ球類の産生する分解酵素によって分解されることが知られていた。エラスチンを分解する酵素はエラスターゼと呼ばれるが、酵素本体は1種類ではなく、何種類かの酵素の総称である。エラスターゼという名前と呼ばれる酵素だけでも、セリンプロテアーゼであるすい臓エラスターゼ(EC: 3.4.21.11) や好中球エラスターゼ(EC: 3.4.21.37)、メタロプロテアーゼであるマクロファージ由来のメタロエラスターゼ(EC: 3.4.24.65)があり、その他にもある種のマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)やゼラチナーゼもエラスチンを分解する活性があることが知られていた。このように、エラスチンを分解する酵素としては、活性中心タイプも基質特異性も様々であるが、これは組織中でのエラスターゼ活性にはいくつかの異なる役割があるためではないかと考えられる。エラスチンが分解される状況としては、炎症やその他病的な状態(Cutis Laxa[5], Mid-dermal elastolysis[6], その他の結合織病[7], およびがん細胞の転移・浸潤[8, 9])において著しいが、正常な状態でも緩やかな代謝回転が行われており、それぞれ関与する細胞や酵素、生体内での役割が異なる可能性がある。病的な状態においては、免疫系の細胞やがん細胞が自らの通り道を作るためにコラーゲン、エラスチン、その他のECMを非特異的に分解する必要があるため、比活性が高く、特異性の低い酵素を発現していると考えられる。一方、正常な状態では、組織構造を保ちつつECM成分を更新するために組織を構成する細胞自身が、限定されたECM分解活性を発現するのではないかと考えられる。皮膚において、例えば強い紫外線を受けたときなどには紅斑が生ずることから、炎症性細胞の浸潤が起こっていることが推察されるが、

日常的に受ける微弱な紫外線では紅斑が生ずることはなく、炎症性細胞の浸潤は起こっていないと考えられる。このような日常生活レベルの紫外線を受け続けているだけでも露光部の皮膚では非露光部皮膚と比べて早くから弾力性が低下し、シワが形成される[1, 2]ことから、皮膚組織自身にエラスチン分解酵素活性があり、これが紫外線の影響を受けて活性化しエラスチンを分解することにより皮膚の弾力性に影響を及ぼすのではないかと考えた。そこで本研究においては真皮線維芽細胞が産生するエラスターゼ様酵素に着目し、その機能、活性本体を阻害剤や抗体、さらには候補酵素の遺伝子導入などの手法を用いて、皮膚での様々な働きについて詳細に検討することにより、酵素本体の同定と、この酵素分子が皮膚や毛包の構造・機能の維持にどのように関わっているかを解明できると考えた。これまで、皮膚でのエラスチン分解を主につかさどる酵素の本体については長く明らかにされてこなかった。血管から浸潤してきた免疫系の細胞由来ではなく、真皮の線維芽細胞自体が、エラスターゼ様活性を持ち、皮膚の老化などに関与することは Szendroi らが報告しており[10]、部分精製まで進んでいたため、その分子量や至適 pH などが解明されていたが、活性本体の特定にまでは至っていなかった。真皮線維芽細胞エラスターゼはメタロプロテアーゼのファミリーに属すると報告されており[10, 11]、全てのタイプの弾性線維を分解できる好中球エラスターゼと異なり、成熟した **elastic fiber** には限られた作用しか示さず、**oxytalan fiber** や **elaunin fiber** に主に作用する[12]。紫外線によるエラスターゼ過剰発現が弾性線維ネットワークの構築・維持に影響すると考えられるが、紫外線誘導シワ形成など皮膚形態に及ぼすエラスターゼの役割はほとんど明らかになっていない。そこで第 1 章では、真皮線維芽細胞エラスターゼが紫外線によって誘導されるシワ形成において重要な役割を果たしているという仮説を検証するために、活性本体未知のままではあるが、真皮線維芽細胞の産生するエラスターゼ様酵素の性質を調べ、阻害剤プロファイルや活性抽出の過程などの検討、さらには紫外線照射によるヘアレスマウスの皮膚シワ形成への典型的なメタロプロテアーゼ阻害剤である **phosphoramidon** 誘導體塗布

による影響を生体皮膚で検討し、真皮線維芽細胞エラスターゼの特徴を明らかにすることを試みた。

第1章の検討から、真皮線維芽細胞由来エラスターゼ活性が、紫外線誘導シワ形成に重要な役割を果たしていると考えられたので、第2章では酵素本体の同定を試みることにした。既文献[10-12]などから得られた分子量や至適pH、活性中心などの類似性から neprilysin (NEP)、及び MMP14 が候補酵素と考えられたため、中和抗体による免疫沈降試験や酵素阻害試験、更に NEP を持たない COS 細胞に NEP 遺伝子を導入し、発現したエラスターゼ活性を解析することにより、真皮線維芽細胞エラスターゼの活性本体の同定を試みた。その結果、真皮線維芽細胞エラスターゼの活性本体は NEP であるとの結論に至ったため、次に皮膚の形態構築における真皮線維芽細胞エラスターゼ/NEP の役割をさらに解明するために、皮膚中でダイナミックに形態変化を繰り返す皮膚付属器官である毛包の毛周期に着目した。毛周期とは毛が成長、退行、休止を経て新しい毛が生え変わる自然なサイクルのことで(図2) [13]、生物種や体の部位でその周期には多様性があり、その調節には多くの生体因子が関わると言われている。毛周期に伴い毛包の形や大きさは劇的に変化するので、毛包を構成する上皮系、間葉系の細胞、毛包を取り囲む ECM も大きく変動することになり、一種の組織再構築の過程と考えられる。そこで、毛周期におけるダイナミックな組織の分解・再生においてもエラスターゼ/NEP が大きな役割を果たしていると考えられるため、第3章ではこの仮説に基づいて、ECM 代謝酵素類の毛周期における変動を調べ、エラスターゼ/NEP の重要性を明らかにすることを試みた。その結果としてエラスターゼ/NEP 活性は初期成長期に活性上昇し、退行期から休止期にかけて活性低下する変動を示し、また毛周期のステージにより、NEP の発現部位も変動することが観察された。さらに、NEP 阻害剤により毛再生の遅延、および退行期の促進が認められ、NEP の抑制により発毛を遅らせ、成長期を短縮することができることを見出した。

本研究により、真皮線維芽細胞が産生するエラスターゼの活性本体は、細

胞膜結合型のメタロプロテアーゼである neprilysin であることが解明された。この酵素の皮膚における機能を明らかにするために、皮膚老化ならびに毛周期における影響を検討したところ、(1)皮膚の紫外線照射により真皮線維芽細胞での発現が誘導され、弾性線維のエラスチンを分解することにより光老化によるシワ形成に関与すること、(2)毛周期のステージに連動して発現量と部位が変動することにより、毛包再生と成長期維持に関与していることが示された。これらの成果は、真皮線維芽細胞由来エラスターゼが皮膚の老化や毛包組織の再構成、機能維持に重要な役割を果たしているという皮膚科学研究の新知見を提供するものであり、紫外線に起因する皮膚傷害の治療や、育毛、体毛のむだ毛処理など美容医療分野への展開が期待される。

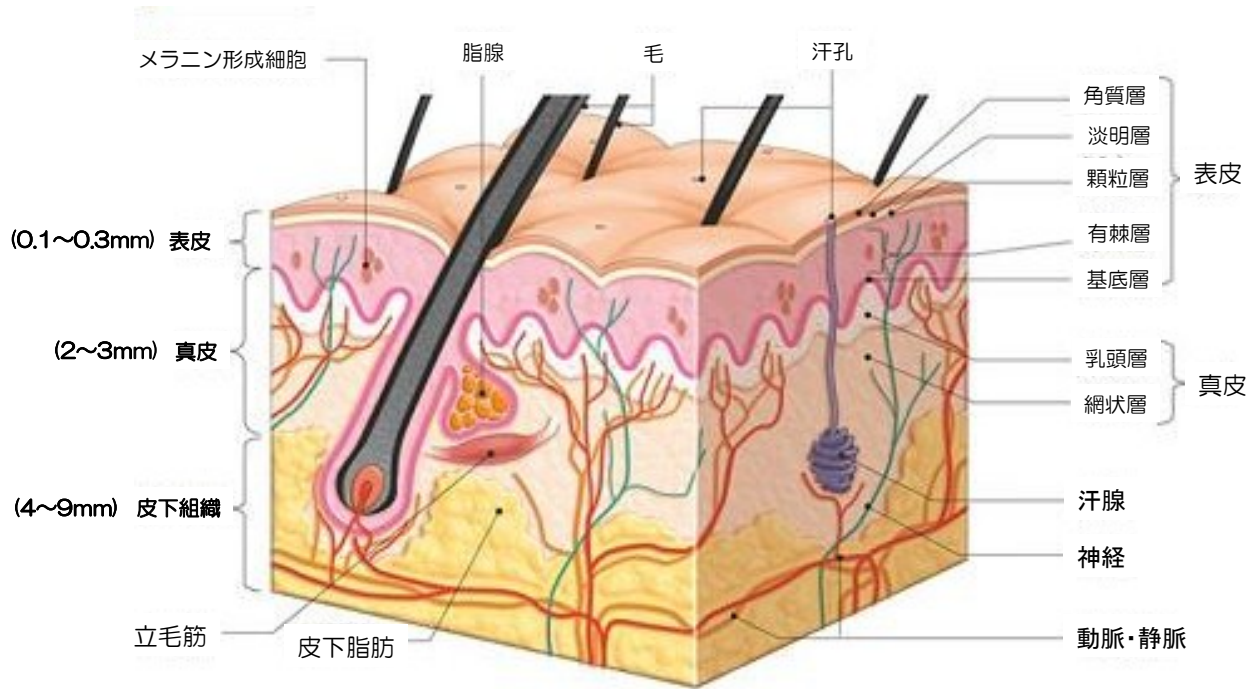


図1 皮膚の構造

六訂版 家庭医学大全科 株式会社法研：2010 を改変

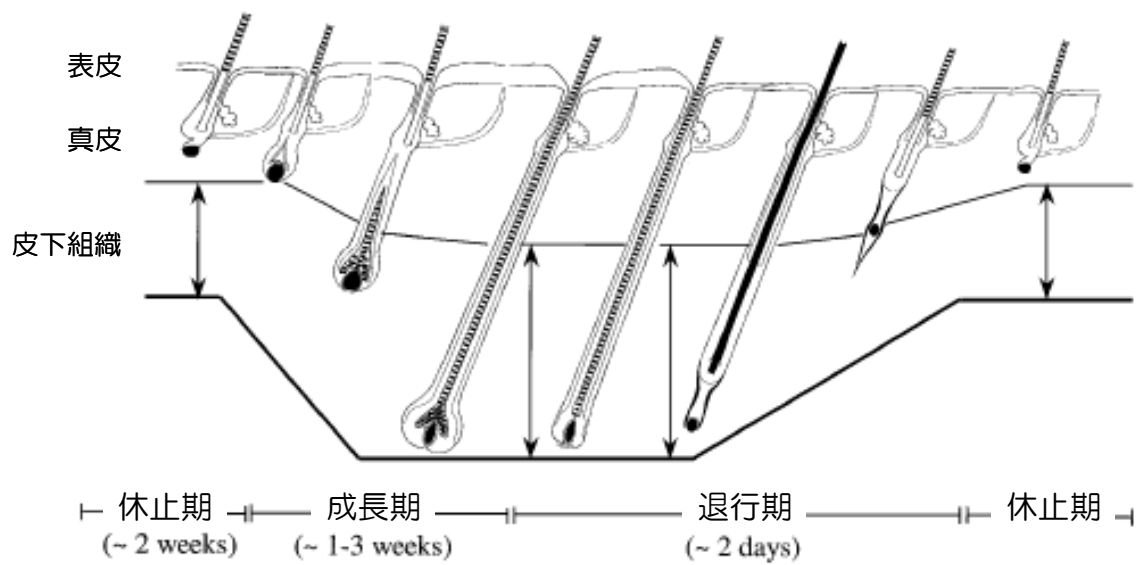


図2 毛周期模式図

J Invest Dermatol 2001, 117(1):3-15 より改変[6]

第 1 章 シワ形成における真皮線維芽細胞由来エラスターゼの役割: 選択的阻害剤を用いた検討

1. 1 序論

継続的な日光や紫外線暴露は皮膚の弾力性減少を伴うシワ形成を引き起こすことはよく認識されている[1, 14, 15]。長期 UV 照射の初期に、皮膚の弾力性を保つ弾性線維の立体構造が変性することによる皮膚弾力性の顕著な減少も観察されていた[4]。皮膚中には少なくとも 2 種類のエラスターゼが存在することが示唆されていた。1 つは好中球エラスターゼであり、もう 1 つは真皮線維芽細胞エラスターゼである[12]。好中球エラスターゼはセリンプロテアーゼである[16]のに対して、真皮線維芽細胞エラスターゼはメタロプロテアーゼのファミリーに属すると報告されていた[10, 11]。これら 2 つの酵素は基質特異性にも違いがあり、好中球エラスターゼは全てのタイプの弾性線維を分解でき、特に *elaunin fiber* と成熟した *elastic fiber* に高い選択性があるが、真皮線維芽細胞エラスターゼは *oxytalan fiber* や *elaunin fiber* に主に作用し、成熟した *elastic fiber* には限られた作用しか示さない[12]。これらエラスターゼは種々の組織で、炎症、病気、老化などにおいて弾性線維の代謝に関与している[16-18]。しかし紫外線によるエラスターゼの過剰発現は弾性線維ネットワークに何らかの影響を及ぼす可能性があると考えられるにも関わらず、紫外線誘導シワ形成時におけるこれらエラスターゼの役割はほとんど知られていない。実際、動物の皮膚に最小紅斑量以下の紫外線を照射した場合、好中球を含む炎症性細胞が浸潤していなくてもシワの形成は認められる[19]ことから、真皮線維芽細胞エラスターゼがシワ形成において主な役割を果たしているのではないかと仮説を立てた。これを証明するために、真皮線維芽細胞エラスターゼの阻害剤を皮膚に塗布して、シワ形成に対する効果を見ることにした。この研究は、紫外線照射により引き起こされる弾性線維の傷害とシワ形成における、真皮線維芽細胞エラスターゼの生化学的メカニ

ズムに関して新たな視点を与えると考えられる。この目的のために、新しく合成した真皮線維芽細胞エラスターゼ阻害剤 N-phenethylphosphonyl-L-leucyl-L-tryptophane (NPLT)を用いて、ヘアレスマウス皮膚への紫外線照射シワ形成試験を行った。

1. 2 実験材料と方法

1. 2. 1 実験材料

エラスターゼの合成基質 N-succinyl-tri-alanyl-p-nitroaniline (STANA)はペプチド研究所(大阪, 日本)から購入した。ヒト好中球エラスターゼは Calbiochem-Novabiochem Corp. (La Jolla, CA, USA)から購入した。ヒト真皮線維芽細胞由来コラゲナーゼ・タイプ I、ヒト線維肉腫由来コラゲナーゼ・タイプ IV およびコラゲナーゼ活性測定キットはヤガイ株式会社(山形, 日本)より入手した。phenylmethyl sulfonylfluoride (PMSF), elastatinal, pepstatin A, 1-10 phenanthroline は和光純薬株式会社(大阪, 日本)より、phosphoramidon は Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)より、leupeptin は Chemicon (Temecula, CA) より、ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA)-4Na は GIBCO BRL (New York, NY) より、octyl methoxycinnamate (Parsol-MCX) は Roche-Vitamines Japan K. K. (東京, 日本) より購入した。他の化合物は試薬等級を用いた。

1. 2. 2 細胞培養

正常ヒト真皮線維芽細胞は大日本製薬(大阪)から購入し、2~5継代の間で使用した。細胞は10%牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 用い、37°C、CO₂濃度5%で培養した。

1. 2. 3 エラスターゼ活性の測定

エラスターゼ活性は合成基質 STANA を用い、中川らの方法[20]を改変して

行った。すなわち、培養ヒト真皮線維芽細胞は PBS で 3 回洗浄後セルスクレイパーでかきとり、マウス皮膚バイオプシーの場合は皮下脂肪を除きホモジナイズし、0.1% Triton-X 100, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer で懸濁し超音波破碎した後、遠心(3000 rpm x 20 min)した上清を粗酵素液とした。活性測定は、100 μ L の粗酵素液を 96 穴プレートに分注し、阻害剤を加えて 37 $^{\circ}$ C, 15 分プレインキュベート後、62.5mM の基質(STANA)溶液を 2 μ L 添加し、37 $^{\circ}$ C, 1 時間インキュベートした。p-nitroaniline の遊離を 410 nm の吸光度で測定し、酵素活性はタンパク質量あたり、もしくは皮膚面積あたりのユニット(1 nmol nitroaniline /1h) で示した。

1. 2. 4 コラゲナーゼ活性の測定

タイプ I とタイプ IV コラゲナーゼ活性はヤガイ株式会社製キットを用いて測定した。

1. 2. 5 エラスターゼ阻害剤の合成

真皮線維芽細胞エラスターゼの阻害剤は典型的なメタロプロテアーゼ阻害剤である phosphoramidon の化学構造を改変して合成した (図 3)。合成手順は以下の通り。

Trp-Obzl-HCl (国産化学、東京) のクロロホルム溶液は 4 $^{\circ}$ C で N,N-dicyclohexylcarbodiimide に添加し 12 時間攪拌した。溶媒を除き、残渣は ethyl acetate に溶解した。更に溶解させるため 4 $^{\circ}$ C で 1,2-Ethanedithiol and 4 N hydrochloric acid-dioxane を添加した。攪拌後溶媒を除き、残渣は diethyl ether から結晶化した。できた生成物は 4 $^{\circ}$ C で chloroform、triethylamine と O-benzyl-P-phenethyl phosphochloridate (dibenzylphenethyl phosphonate と phosphorous pentachloride から得られる[21])に懸濁した。Dichloromethane で反応液を希釈し、水を加えた。生成物は dichloromethane で抽出した後、乾燥し、silica gel column chromatography で精製し ethyl acetate-petroleum ether から再結晶化した。生成物は methanol と 10% palladium-carbon を加え、触媒還元を

行った。触媒を除き濃縮・凍結乾燥し N-phenethylphosphonyl-Leu-Trp (NPLT) を得た。

1. 2. 6 動物

雌性のアルビノ・ヘアレスマウス ICR/HR はヘアレス (HR/HR: 日生研, 東京) と正常毛の HaM/ICR を交配して花王株式会社生物科学研究所で維持した。餌と水は自由摂取とし、温度(23°C±2°C)、湿度(55±10%)、光(12時間明/12時間暗)をコントロールした環境で飼育した。動物は花王株式会社のガイドラインに従って扱い、実験以外では紫外線には曝されなかった。

1. 2. 7 紫外線照射

マウスは Toshiba SE20 lamps (東芝ライテック㈱、東京、日本)の束を UVB 源として照射を行った。照射スペクトル (図 4: 東芝ライテックより供与) からは、UVC は含まれていないことが示された。ランプからマウスの背部までの距離は 35cm とし、UV の強度を段階的に上げながら照射を行った。即ち、1 週目は 65mJ/cm² (ちょうど最小紅斑量以下の強度) からスタートし、4 週目までは毎週 10 mJ/cm² ずつ照射強度を上げて行き、95 mJ/cm² に達して以降はその照射強度を維持した。マウスは 1 日 1 回、週に 5 日間、18 週間に渡って UV 照射を受けた。その間、紅斑は一度も起こらなかったことを確認した。

1. 2. 8 紫外線吸収

NPLT と Parsol-MCX の紫外線に対する吸収は分光光度計 (HITACHI U3410) を用いて計測した。NPLT と、典型的な UV 吸収剤である Parsol-MCX [22] の UV 吸収スペクトルを図 5 に示した。Parsol-MCX が UVB (290-320nm) の波長領域に対して強い吸収を示したのに対して、NPLT は同じ波長領域に対してわずかな吸収しか示さなかった。マウスに塗布した濃度 (1mM: 約 0.05%) での最小紅斑量試験では、NPLT も Parsol-MCX も UVB による紅斑誘導を阻害できなかった。これは、サンスクリーンとして用いるには低すぎる濃度であるためと考えら

れる(データ非掲載)。一般的にParsol-MCXは3%以上の濃度で有効なサンスクリン効果を発揮すると報告されている(3%、5%はそれぞれSPF 3、4.5に相当する)[22]。これらのことから、Parsol-MCXを1mMの濃度で用いることで、NPLTのサンスクリン効果の可能性を否定できると考えた。

1. 2. 9 エラスターゼ阻害剤塗布

ヘアレスマウスの背部皮膚にUVB照射直後、1mMのNPLTかParsol-MCX、もしくは溶媒(80% ethanol)を100 μ L塗布した。塗布は1日2回、6時間の間隔を置いて行った。

1. 2. 10 シワの測定

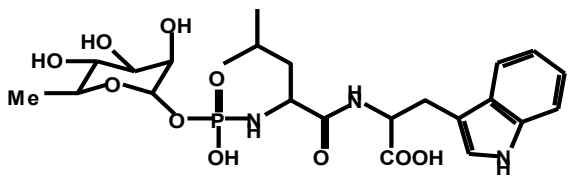
長期的な、最小紅斑量以下のUVB照射により誘導されるシワはBissettらの方法[23]に従い毎週スコア付けした。スコア基準は次の通り。0:シワなし、スコア1:浅いシワ、スコア2:やや深いシワ、3:深いシワ。

1. 2. 11 組織学

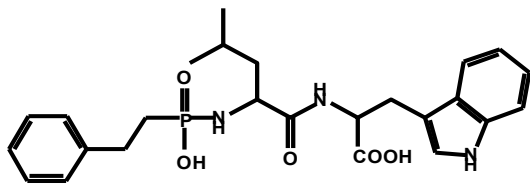
光学顕微鏡観察用には、マウス背部皮膚を8mmパンチバイオプシーで採取し、ホルマリン固定後パラフィン包埋し、切片をヘマトキシリン&エオジン(HE)かオルセイン[24]で染色した。

1. 2. 12 統計解析

統計解析用データは、少なくとも3つの独立した試験から得られた平均値 \pm SDで示した。経時変化の検定にはRepeated Measures ANOVAを、シワスコアの評価にはMann-Whitney's U testを、他の試験解析にはANOVAとStudent's t-testを用いた。



Phosphoramidon



**N-Phenethylphosphonyl
-leucyl-tryptophane
(NPLT)**

図3 Phosphoramidonと新しく合成した誘導体の構造式

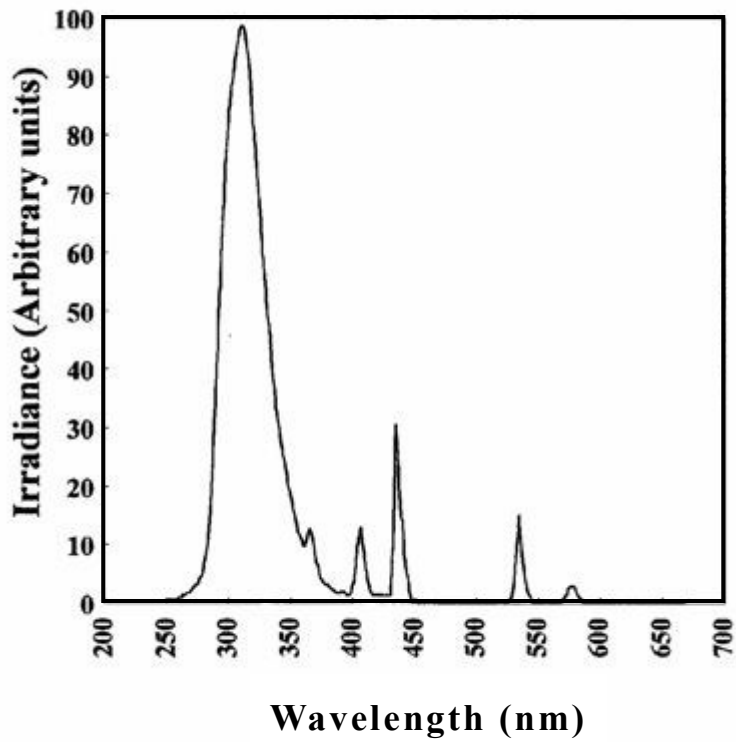


図4 UVB用光源として用いたToshiba SE20ランプの出力波長

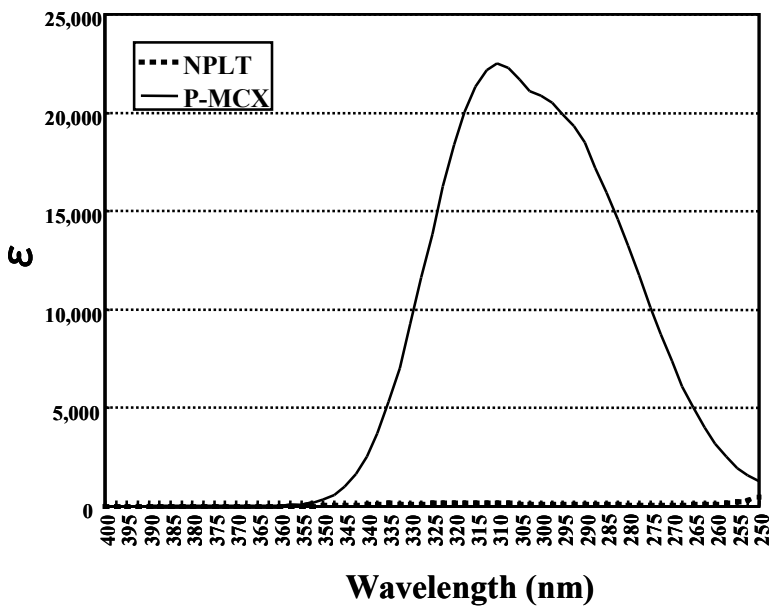


図5 Parsol-MCX(—) と NPLT(·····) の1mMにおける吸収スペクトラム

1. 3 結果

1. 3. 1 UVB照射の効果

UVB 照射により引き起こされるシワ形成におけるエラスターゼの役割を明らかにするために、まず UVB 照射したマウス皮膚においてエラスターゼ活性が上昇するかどうか検証した。最小紅斑量 (MED) 以下の UVB を毎日マウスの皮膚に照射すると、4 週目にはエラスターゼ活性が有意に上昇し、その後も 10 週目まで継続して上昇し続けた (図 6)。照射 6 週後のマウス皮膚の組織化学的所見では、同週齢のコントロールと比較して表皮の肥厚・過形成が認められたが、好中球を含む炎症性細胞の浸潤数には明白な差は認められなかった (図 7)。

1. 3. 2 真皮線維芽細胞由来のエラスターゼ様酵素の特徴

種々のプロテアーゼ阻害剤を用いた阻害剤プロファイルから、好中球エラスターゼは PMSF やエラストチナールといったセリンプロテアーゼ阻害剤のみによって阻害され (図 8A)、真皮線維芽細胞エラスターゼはこれまでの報告通り、金属キレート剤である EDTA や 1,10-phenanthroline、メタロプロテアーゼ阻害剤である phosphoramidon によって阻害され、それ以外の阻害剤では阻害されないことが確認できた (図 8B)。このことは、真皮線維芽細胞由来のエラスターゼは、好中球タイプとは異なり、メタロプロテアーゼファミリーに属することを示している。

1. 3. 3 phosphoramidon 誘導体の阻害活性

phosphoramidon は糖構造を含み、親水性が高いため皮膚への浸透性は低いと考えられたので、親油性を高める誘導体化を行い、N-phenethylphosphonyl-Leu-Trp (NPLT)を得た。この NPLT の、真皮線維芽細胞エラスターゼに対する阻害活性を確認したところ、10 μ M では 90%以上の阻害活性を示し、IC₅₀は 50nMであった(図 9)。これは phosphoramidon と同程

度の阻害活性であった（図 9）。一方、タイプ I、タイプ IV コラゲナーゼや好中球エラスターゼのような他のマトリックス分解プロテアーゼに対しては NPLT は影響を及ぼさず、NPLT は真皮線維芽細胞エラスターゼに選択的な阻害剤であることが示された（図 9）。

1. 3. 4 NPLT のマウス皮膚エラスターゼに対する阻害活性

NPLT がマウス皮膚由来のエラスターゼに対して阻害活性を示すかどうか確認するため、UVB 照射、未照射のマウス皮膚から抽出したエラスターゼ活性を測定した。NPLT は UVB 未照射マウスの皮膚由来エラスターゼ活性を、100 μ M で約 40% 有意に阻害した（図 10）。更に、UV 照射で促進されたエラスターゼ活性は、NPLT の濃度依存的に、未照射マウスと同レベルまで、有意に阻害された（図 10）。このことは、NPLT が UVB で促進されたエラスターゼ活性を阻害できること、UVB によって活性化されたエラスターゼ活性のほとんどは NPLT 感受性のメタロプロテアーゼが関与することを示す。

1. 3. 5 エラスターゼ阻害剤によるシワ形成抑制

UV 照射 6 週目から、ヘアレスマウスの背部皮膚には同週齢の未照射コントロールと比較して明確なシワの兆候が認められ、18 週目にかけてよりはっきりしてくる（図 11A, B）。UVB 照射直後に、1mM 濃度の NPLT をヘアレスマウスの背部皮膚に毎日塗布していると、エタノールを塗布したコントロールと比較してはっきりとシワの形成が抑制された（図 11C）。シワスコアで見ると、UVB 照射後 15~18 週にかけて、エタノール塗布コントロール群と比較して、NPLT 塗布群では有意なシワスコアの低下が認められた（図 12）。一方同じ 1mM 濃度の紫外線吸収剤 Parsol-MCX を塗布してもシワ形成に対する抑制効果は認められず（図 11D, 12）、照射後に塗布したサンスクリーン効果の残存がシワ形成抑制に影響するわけではないことが示された。

1. 3. 6 微細弾性線維の変化

オルセイン染色による組織像は、種々のタイプの弾性線維を含む正常な結合組織の維持が、紫外線照射後のシワ形成抑制に関与することを示している（図 13）。正常な皮膚では真皮上層から中層にかけて、微細な弾性線維網が存在し（図 13A）、18 週間の UVB 照射により明らかに微細弾性線維網が減少していた（図 13B）。一方、UV 照射プラス NPLT 塗布では弾性線維網が未照射のものに近いレベルに保たれていた（図 13C）。

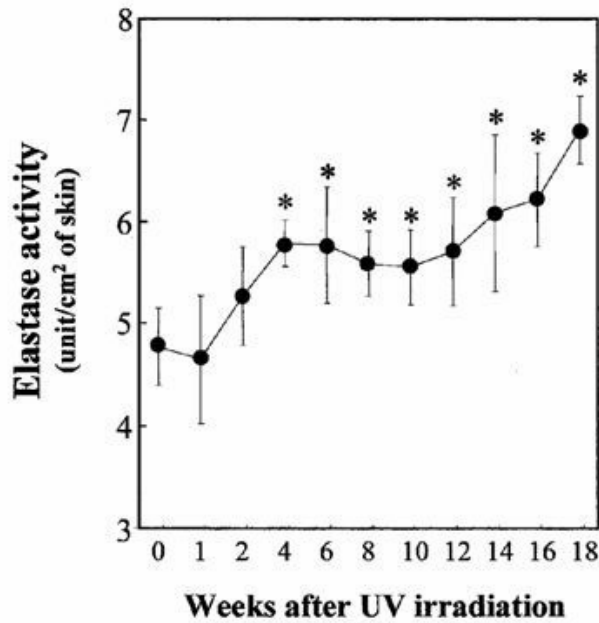


図 6 紫外線照射マウス皮膚中のエラスターゼ活性

STANA を基質として測定した UV 照射皮膚中のエラスターゼ活性。皮下組織を除いた皮膚のホモジネートをエラスターゼ活性の酵素源とした。マウス皮膚は UVB 照射 1 日後に採取しエラスターゼ活性測定に供した。結果は各 5 匹の平均値 ± 標準偏差で表した。統計的な有意差検定は Repeated Measures ANOVA により行った。*は $P < 0.05$ を示す。

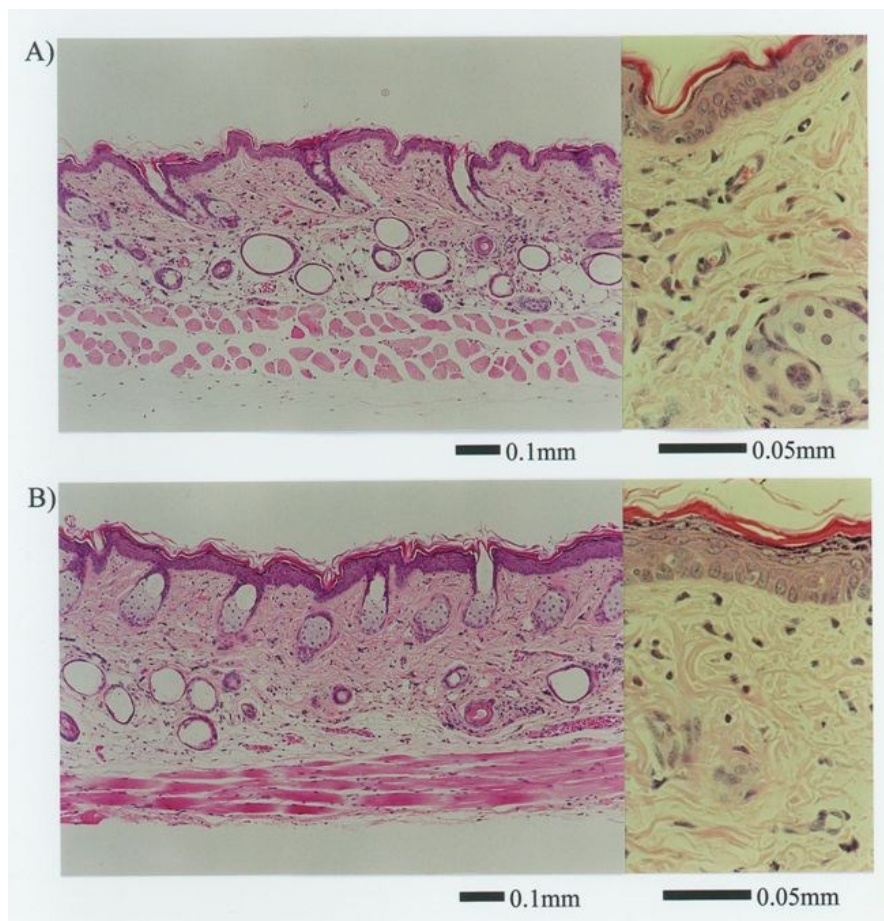


図 7 紫外線照射前後のヘアレスマウス皮膚組織切片

背部皮膚から採取した径 8 mm の皮膚試料はホルマリン固定後パラフィン包埋し、切片は HE 染色した。A は未処理コントロール、B は 6 週間紫外線照射したマウス皮膚を示す。

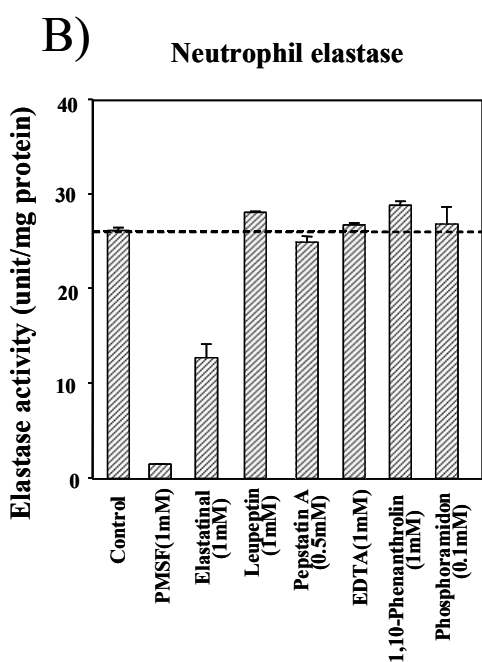
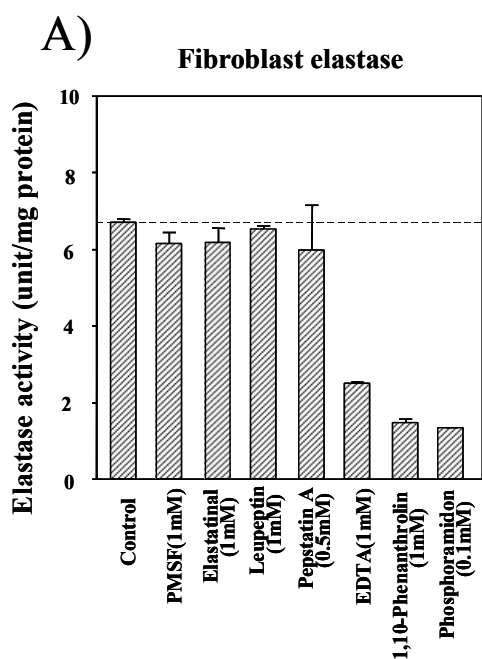


図 8 真皮線維芽細胞エラスターゼ (A) と好中球エラスターゼ (B) の阻害剤プロフィール

真皮線維芽細胞エラスターゼ測定用の酵素はヒト真皮線維芽細胞の溶解液から調整し、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で用いた。エラスターゼ活性は基質として STANA を用い、種々の阻害剤を表記の濃度で共存させて測定を行った。結果は平均値 \pm 標準偏差で表した。

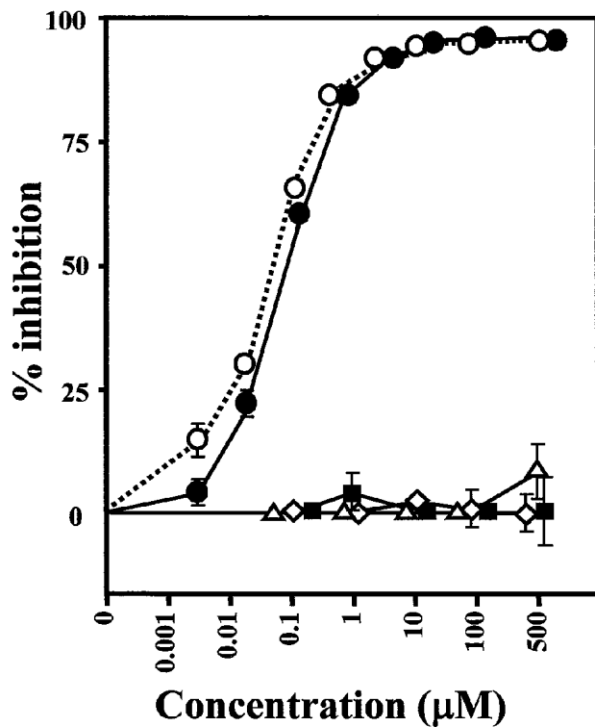


図 9 真皮線維芽細胞エラスターゼに対する N P L T と phosphoramidon の
阻害濃度依存性と、いくつかの酵素に対する N P L T の阻害プロファイル

ヒト真皮線維芽細胞溶解液から抽出した酵素液は 100μg/mL の濃度で用いた。エラスターゼ活性は基質として STANA を用い、NPLT (●) や phosphoramidon (○) 存在下で測定した。好中球エラスターゼ (■)、タイプ I コラゲナーゼ (△)、タイプ IV コラゲナーゼ (◇) は 5μg/mL (それぞれ 0.1 U/mL, 0.5 U/mL, 0.5 U/mL) で、それぞれ推奨の基質を用いて測定した。結果は平均値 ± 標準偏差で表した。

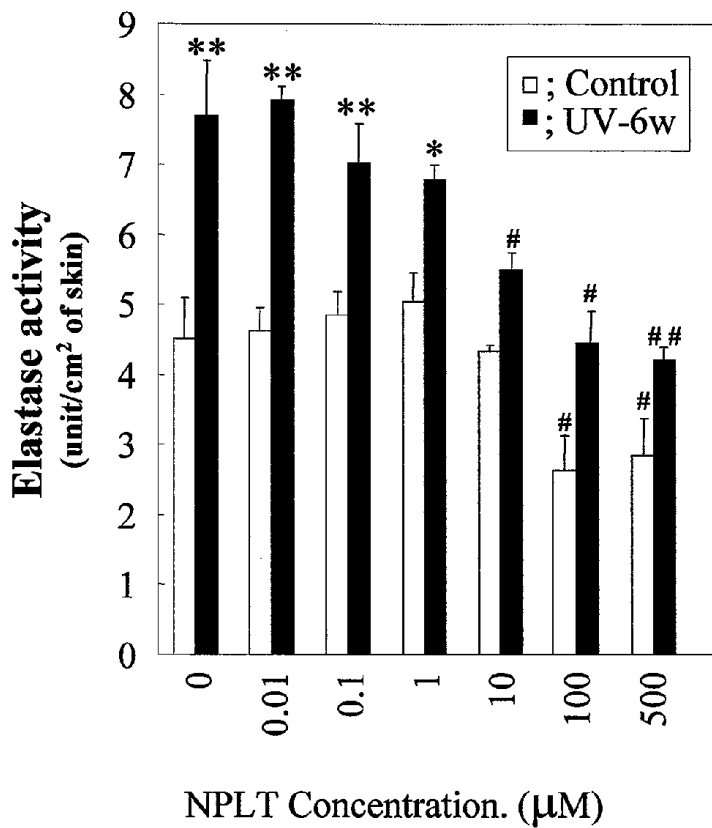


図 10 紫外線照射により促進されたマウス皮膚中のエラスターゼ活性に対する NPLT の阻害効果

マウス皮膚は 6 週間の紫外線照射後 1 日か、週齢一致コントロールから採取し、ホモジナイズ後エラスターゼ活性を測定した。NPLT は表記の濃度で用いた。結果は平均値 ± 標準偏差で表した。統計的有意差は Student's t-test と Bonferroni の多重比較(コントロールと比較)、および One-way ANOVA と Dunnett の多重比較(0µM NPLT と比較)により行った。* は $P < 0.05$ 、** は $P < 0.01$ (コントロールと比較)、# は $P < 0.05$ 、## は $P < 0.01$ (0µM NPLT と比較) を表す。

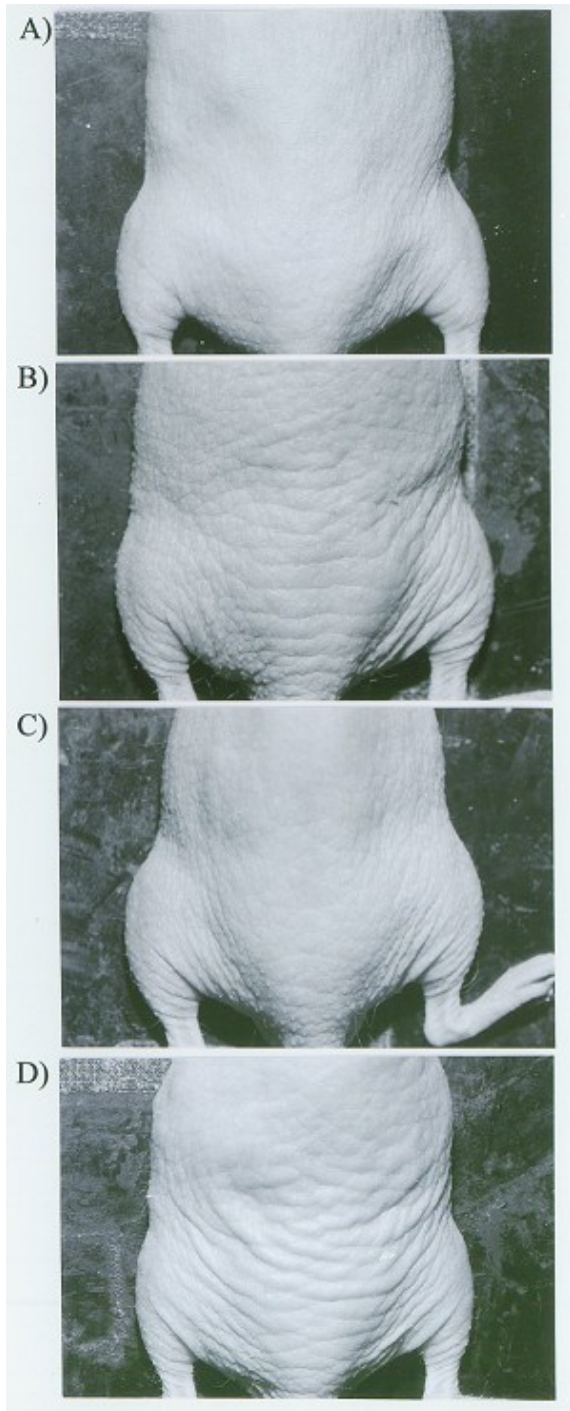


図11 ヘアレスマウス紫外線照射18週目の背部皮膚写真

Aは未照射コントロール、Bは紫外線照射後80% エタノール処理、Cは紫外線照射後NPLT処理、Dは紫外線照射後Parsol-MCX処理マウス皮膚を示す。

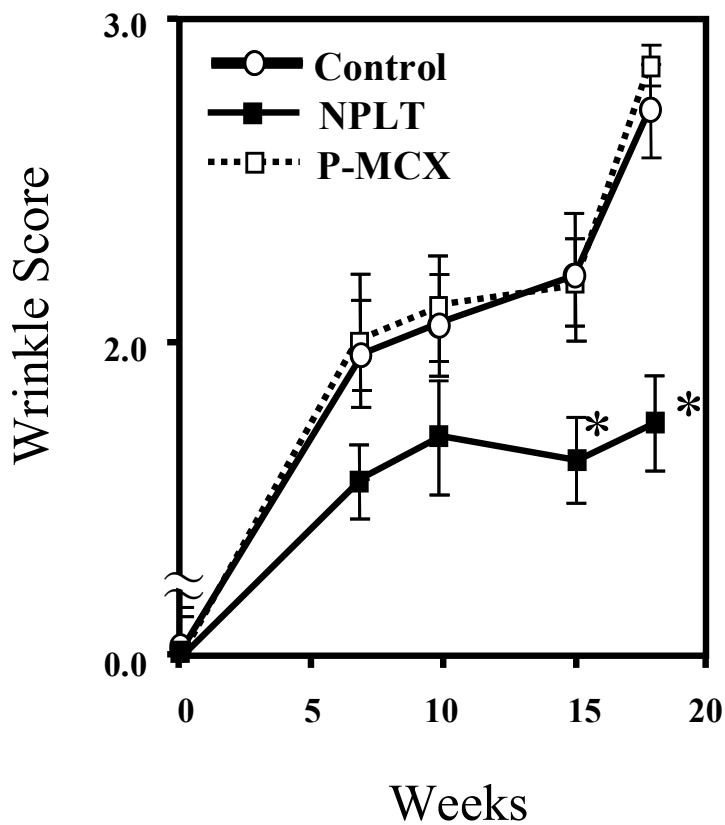


図12 シワスコアで評価したシワ形成に対するNPLTの阻害効果

1mMのNPLTとParsol-MCXの80%エタノール溶液は紫外線照射後に1日2回塗布した。コントロールは80%エタノールとした。結果は各群8匹の平均値 ± 標準誤差で表した。統計的有意差はコントロールとの比較をMann WhitneyのU検定とBonferroniの多重比較により行った。*はP<0.05を示す。

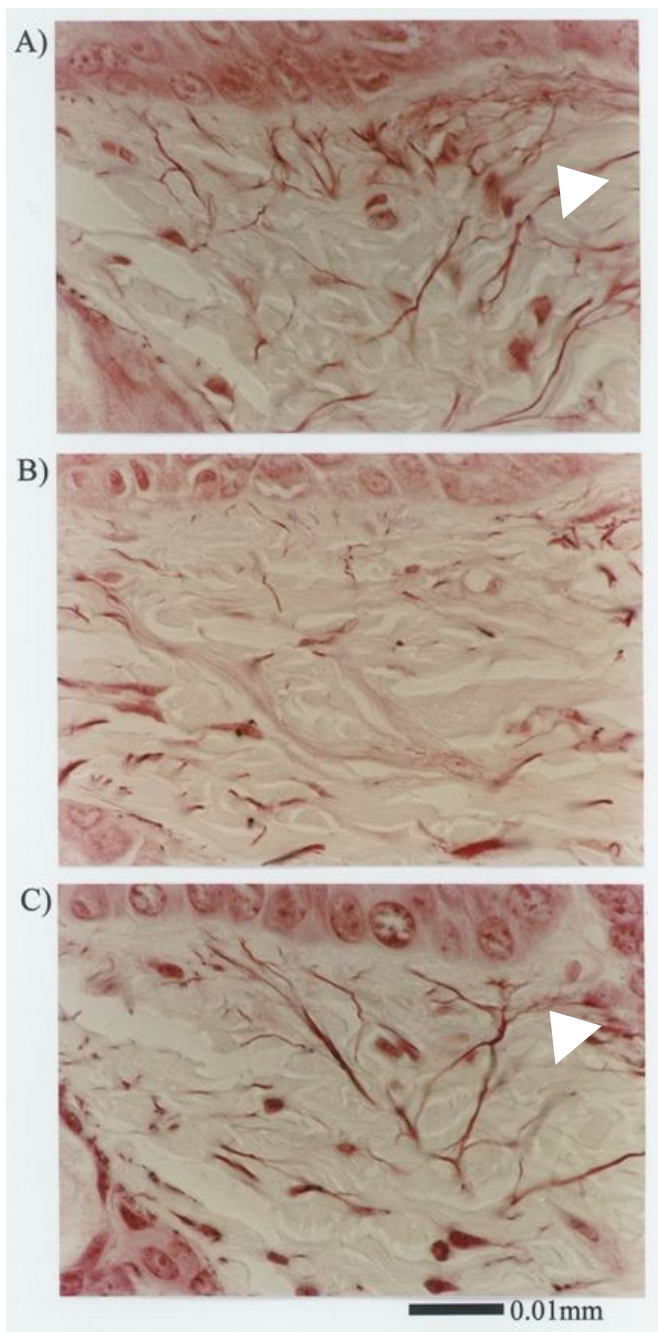


図13 オルセイン染色によるヘアレスマウス皮膚中の弾性線維像

紫外線照射後にNPLT (1mM) か溶媒 (80% エタノール)塗布して18週後のマウス皮膚を採取した。同じ週齢で紫外線照射も塗布も行っていないマウス皮膚も同時に採取した。Aは未照射・未塗布群、Bは紫外線照射・エタノール塗布群、Cは紫外線照射・NPLT塗布群を示す。△は微細弾性線維を示す。

1. 4 考察

日光暴露や紫外線照射後にシワが形成されることは良く知られている。シワの形成と同時に皮膚の弾力性が低下することも報告されている[1, 14, 15]。弾性線維は長期の日光や紫外線暴露により蓄積し(solar-elastosis) [25]、シワ形成はそれに先立つことが報告されている[26]。本研究における組織化学的所見では、UVB 照射 18 週目には弾性線維の蓄積無しにはっきりとしたシワが形成されていた。また、表皮直下(真皮・表皮結合)の微細な弾性線維は、最小紅斑量以下の UVB 照射ですぐ(6 週間以内)に減少することが報告されている[23]。さらに、ラット足底において UV 照射が弾性線維の 3 次元ネットワークの湾曲化を引き起こすことも示されていた[4]。これらの知見は UVB 照射後初期のシワ形成には微細なエラスチン線維の減少や変性が関与する可能性を示唆している。エラスチンを主成分とする弾性線維は構造や局在により 3 つに分類できる。oxytalan fiber は最も細い線維で、真皮乳頭へ向かって垂直に走っている。elaunin fiber はやや太く、真皮・表皮結合の下方に広がっており、しばしば oxytalan fiber と結合している。そして、elastic fiber は最も太く成熟している[27]。自然老化に伴い oxytalan fiber と elaunin fiber は減少し[28]、光老化の後期にはっきりしたシワが完成する頃にはこのプロセスが加速して、真皮下層の elastic fiber は異常に太く、密になっているという[28]。

ヒト皮膚の弾性線維はエラスターゼによって分解され、皮膚には少なくとも 2 つのタイプのエラスターゼが存在すると言われている[12]。ヒト好中球エラスターゼ(EC 3.4.21.37)の炎症反応や種々の病気における役割は確立されている[17]。一方、最小紅斑量の紫外線照射後には、本試験同様炎症性細胞の浸潤は認められないという報告がある[19]。そこで真皮線維芽細胞エラスターゼによる微細な弾性線維の分解とそれに伴う皮膚弾力性の低下が紫外線誘導シワ形成に重要な役割を果たしているものと仮説を立て、その可能性を真皮線維芽細胞エラスターゼの阻害剤を用いて検証した。UVB 照射マウ

ス皮膚を用いた今回の実験では、STANA を基質としたエラスターゼ活性は UVB 照射開始から 2 週間は未照射のコントロールと比較して変化がなかったが、4 週間後には明らかな活性上昇を示した。継続的で顕著なエラスターゼ活性上昇と一致して、組織学的な観察においても、微細な弾性線維が 18 週間の UVB 照射後には明らかに減少していた。他の研究においてヒト真皮線維芽細胞由来エラスターゼが *in vitro* で組織切片の微細弾性線維を完全に分解することが示されている[10]ことから、UVB 照射皮膚中の微細弾性線維分解が主に真皮線維芽細胞エラスターゼ活性の上昇によると考えうる。微細弾性線維の減少が真皮線維芽細胞エラスターゼの活性上昇によるのかどうか、直接解明するために真皮線維芽細胞エラスターゼ阻害剤を用い、シワ形成に対する抑制効果を評価した。

真皮線維芽細胞エラスターゼはメタロプロテアーゼファミリーに属する[10, 12]。phosphoramidon は典型的なメタロプロテアーゼ阻害剤として知られている[21]が、親水性のラムノース基を持つことから皮膚への浸透性は低いと考えられた。皮膚への浸透性を上げるために、親水性のラムノース基をフェネチル基に置き換える誘導化を行った結果、最適な誘導体を見出し、NPLT と名づけた。NPLT は真皮線維芽細胞エラスターゼに対して 50nM の IC₅₀ で有意な阻害活性を示し、10 μ M 以上の濃度で UVB 誘導マウスエラスターゼ活性を抑制できたが、好中球エラスターゼやタイプ I、タイプ IV コラゲナーゼの活性に対しては影響を及ぼさなかった。ヘアレスマウスを用いた今回の実験では、UVB 照射後のシワ形成は 1mM の NPLT 塗布により、有意に抑制された。一方、典型的な紫外線吸収剤である Parsol-MCX を、同様に UVB 照射直後に 1mM (0.05%) 塗布してもシワ形成に対して抑制効果は示さなかった。このことは、UVB 誘導シワ形成に対する NPLT の有意な抑制効果は、皮膚表面に残った剤による紫外線吸収効果によるものではないことを示している。エラスターゼ阻害剤 NPLT によるシワ形成抑制は、皮膚弾力性を減少させる真皮微細弾性線維の分解を顕著に減少させることによると考えられる。これらの結果は真皮線維芽細胞エラスターゼが微細弾性線維を分解し、

それにより皮膚弾力性が減少し、シワ形成の素地を作ることに重要な働きをしていることを示唆する。今回の研究で示した、シワ形成における弾性線維ネットワークの役割に関しては、光老化皮膚において弾性線維ネットワークの鍵となる構造因子、fibrillin-rich microfibrils が顕著に減少するという報告によっても裏付けられる[29]。

低いレベルの UVB (0.1-0.5 MED) にさらされた場合でも、ヒト皮膚においてマトリックス分解メタロプロテアーゼの酵素活性や mRNA、タンパク質発現は高いレベルになることが示されている[30]。このとき同時に、メタロプロテアーゼ遺伝子発現促進因子である転写因子 AP-1 と NF- κ B も増加している。一方、all-trans-retinoic acid は UVB 照射前に塗布することにより AP-1 とメタロプロテアーゼの発現を抑制する。このような短期間の効果がシワの形成や定着を説明するのに十分かどうかはまだ明らかではないが、これらの研究はマトリックス分解メタロプロテアーゼが UVB 誘導シワ形成に重要な役割を果たしていることを示唆する。コラゲナーゼとの強度の違いは明らかではないが、これらの報告は本研究で示したエラスターゼの役割も支持する。

まとめると、エラスターゼ阻害剤（コラゲナーゼは阻害しない）を用いた本研究は紫外線が引き起こすシワ形成に関して、新しい生化学的視点を提供する。エラスターゼ阻害剤塗布のシワ形成に対する有意な抑制効果は、光老化過程における真皮線維芽細胞エラスターゼの明らかな役割を示唆する。

1. 5 まとめ

これまでに弾性線維の湾曲化に伴う皮膚弾力性の低下がシワ形成初期の重要な現象であることは知られていた。シワ形成時の弾性線維変性におけるエラスターゼの役割を検証するために、真皮線維芽細胞エラスターゼの阻害剤、N-phenethylphosphonyl-Leu-Trp (NPLT)の、紫外線照射ヘアレスマウスシワ形成に対する効果を調べた。ヘアレスマウス背部皮膚に最小紅斑量以下 ($65-95\text{mJ}/\text{cm}^2$) の紫外線を18週間毎日照射し、各照射直後に1mM NPLTを100 μL 塗布した。背部皮膚のシワは6週目から18週目まで評価した。最小紅斑量以下の紫外線を毎日照射すると皮膚中のエラスターゼ活性は4週目以降有意に上昇し、上昇した活性はNPLTと共にインキュベートすることで、濃度依存的に未照射と同レベルまで有意に低下した。このことは、NPLTが紫外線で誘導されたエラスターゼ活性を抑制できることを示す。NPLT塗布により15週目以降、溶媒コントロールと比較して有意($P<0.05$)にシワ形成が抑制された。オルセイン染色で見た弾性線維の組織染色からは、紫外線照射した溶媒コントロール塗布皮膚で微細弾性線維が顕著に減少しているのに対して、NPLT塗布皮膚では目立った減少は認められなかった。これらの知見は、真皮線維芽細胞エラスターゼが、弾性線維の変性を介したシワ形成に明白な役割を果たしていることを示唆する。

第2章 真皮線維芽細胞エラスターゼの本体(neprilysin)同定とその老化および紫外線応答における役割

2.1 序論

累積した紫外線暴露がシワ形成を誘導し、これは皮膚の弾力性低下と関連付けられる[1, 14, 15]。前章において、1MED以下の紫外線長期照射によりしわが形成され、これは弾性線維ネットワーク(未成熟な oxytalan fiber、elaunin fiber、成熟した elastic fiber から成る)の分解と関連することを示した。さらにこのシワ形成プロセスにおいて、エラスターゼの活性が、UVB照射ヘアレスマウス皮膚において、シワ形成開始より早い時期に徐々に、顕著に亢進することを示した。このことはエラスターゼが弾性線維ネットワークの傷害に深く関与していることを示している。動物の皮膚に最小紅斑量以下のUVBを照射すると、炎症細胞の浸潤がない[19]にもかかわらず、シワが形成されることから、この条件での弾性線維分解には真皮線維芽細胞エラスターゼが主に関わっていることが推察される。真皮線維芽細胞由来のエラスターゼ様酵素の特性については、すでにメタロプロテアーゼであると報告されているが、実際メタロプロテアーゼの阻害剤のみで顕著に阻害され、他の阻害剤ではされなかったことから確かにメタロプロテアーゼファミリーに属することが示された。シワ形成に関するエラスチン変性に、真皮線維芽細胞エラスターゼが寄与するかどうか確認するため、タイプI、タイプIVコラゲナーゼは阻害しない、合成メタロプロテアーゼ阻害剤を用い、塗布によりシワ形成が抑制されることを確認した。このことは、真皮線維芽細胞エラスターゼが、エラスチン線維の分解を介して、シワ形成に決定的な役割を果たしていることを示している。

真皮線維芽細胞がエラスターゼを生成するという証拠はいくつかあるが、その本体の酵素種についてはいまだ明らかでない。その特徴は94kDaの膜結合型メタロプロテアーゼで、至適pHは中性域である。このエラスターゼは

未成熟な弾性線維である oxytalan fiber, elaunin fiber を良く分解し、成熟した elastic fiber の分解は限定的である[12]。この酵素はまた、cutis laxa や actinic elastosis などの病変[5, 6, 31]や紫外線照射皮膚において活性上昇するが牛靱帯エラスチンは分解できない[31]ことが報告されている。真皮線維芽細胞エラスターゼの候補としていくつかの酵素が報告されている。例えば、92-, 72-kDa タイプ IV コラゲナーゼ (ゼラチナーゼ)[32, 33] , 好中球エラスターゼ[34], メタロエラスターゼ[35], カテプシン G[36], プロテイナーゼ 3[37]などである。これらの候補のうち、92-, 72-kDa タイプ IV コラゲナーゼ とメタロエラスターゼだけが、メタロプロテアーゼであるという条件を満たしているが、これらも分子量や、膜結合型であるという特徴と一致しない。探索した結果、neprilysin (中性エンドペプチダーゼ 24.11 (NEP)) (E.C. 3.4.24.11)が、分子量 (97,000)、膜結合型メタロプロテアーゼであること、阻害剤パターン、細胞の継代を重ねたときの活性変動パターンなどの点で真皮線維芽細胞エラスターゼと類似点があることに着目し、これら 2 つの酵素の同一性について検証することにした。

2. 2 実験材料と方法

2. 2. 1 細胞培養

正常ヒト真皮線維芽細胞 (HSF) (大日本製薬株、大阪)、及びアフリカミドリザル腎由来の株化細胞 COS-1(ATCC, Manassas, VA)は 10%牛胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 用い、コーカシアン新生男児由来ヒト表皮角化細胞 (クラボウ、大阪) は EpiLife KG2 medium (クラボウ)を用い、37°C、CO₂ 濃度 5%で培養した。

2. 2. 2 動物

雌性アルビノ・ヘアレスマウス ICR/HR はヘアレス (HR/HR: 日生研, 東

京) と正常毛の HaM/ICR を交配して花王株式会社生物科学研究所で維持した。餌と水は自由摂取とし、温度($23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$)、湿度($55\pm 10\%$)、光(12 時間明/12 時間暗)をコントロールした環境で飼育した。動物は花王株式会社のガイドラインに従って扱い、定めた週齢に達したら炭酸ガスで安楽死させ、背部皮膚を採取した。皮下脂肪を除去した後、ホモジナイズ、0.1% Triton-X 100, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) で可溶化、超音波破碎後、3,000 回転で遠心し、得た上清を粗酵素として、エラスターゼ活性、及び NEP 活性測定を行った。

2. 2. 3 酵素抽出

HSF はコンフルエントになるまで培養した後、PBS で 3 回洗浄後セルスクレイパーでかきとり、0.1% Triton-X 100, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer で懸濁し超音波破碎した後、遠心(3,000 rpm x 20 min)した上清を粗酵素液とした。

2. 2. 4 エラスターゼ活性測定

合成基質を用いる場合は前章に述べた通りの方法により測定を行った。不溶性のエラスチンを用いる場合は 500 μL のチューブに、400 μL の HSF エラスターゼ溶液と 130 μg の不溶性ヒトエラスチン-RBB を添加し、 37°C 、20 時間、攪拌しながらインキュベートした。その後 15,000rpm、5 分間遠心し、上清の 605nm の吸光度を測定し、エラスターゼ活性とした。

2. 2. 5 NEP 活性測定

NEP 活性は Casey ら[38]の方法に準じて行った。HSF やマウス皮膚から調整した酵素液を MES Buffer (300 mM NaCl, 100 mM 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid(pH 6.5))で 20 倍希釈し 96 穴プレートに 100 μL ずつ分注し、2 μL の基質溶液 (20 mM Glutaryl-Ala-Ala-Phe-4-methoxy-2-naphthylamine / dimethylformamide) を添加し 37°C 、1 時間インキュベートし、Phe-4-methoxy-2-naphthylamine を生成させた。酵素反応は 1 μL の 400 μM phosphoramidon を添加して停止させ、20

mUnit の aminopeptidase M を添加して更に 37 °C、15 分間インキュベートして 4-methoxy-2-naphthylamine を生成させた。生成された 4-methoxy-2-naphthylamine の量は蛍光光度計にて excitation spectrum 340 nm、emission spectrum 425 nm で測定し、NEP 活性とした。

2. 2. 6 免疫染色

HSF はチャンバースライド(ヌンク)上で培養し、冷アセトンで 10 分間固定後風乾した。3 % BSA/PBS で 2 時間、室温でブロッキング、PBS で 5 分間、3 回洗浄後、8 µg/mL の 1 次抗体(anti-human CD 10 antibody; IMO113)か control mouse IgG の PBS 溶液を載せて、4 °C、一晩インキュベートした。5 分間、3 回の洗浄後 2 次抗体で 37°C、30 分間インキュベート、3 回洗浄後 DAB 基質で発色させた。

2. 2. 7 免疫沈降

1 mL の HSF エラスターゼ溶液 (200 µg protein/mL) に 5 µg マウスモノクローナル抗ヒト CD10 抗体 (IMO113 or IMO112)か、ウサギ抗ヒト MT-MMP-1 (MMP-14) 抗体 (RP1-MTM1)、もしくはコントロールマウス IgG を添加して 4 °C、1 時間インキュベートした。その後、100µL の プロテイン A アガロースを加えて 4°C、30 分間インキュベートした。15,000 回転、2 分間遠心後、上清 0.9 mL を新しいチューブに移し、これを 2 回繰り返した。各ステップの免疫沈降物をサンプリングし、酵素活性とウェスタンブロッティングを行った。

2. 2. 8 ウェスタンブロッティング

免疫沈降物とその上清は 10% SDS-PAGE を行い、PVDF メンブラン(Bio-Rad, CA, USA)に転写した。3 % 牛血清アルブミンを含む Tris/HCl (pH 7.5) (100 mM NaCl)でブロッキングした後、メンブランはマウスモノクローナル抗ヒト NEP 抗体(IMO 113) で室温、1 時間処理した。その後 horseradish peroxidase

標識した抗マウス IgG で処理し、Amersham ECL 試薬で発光させ、X 線フィルムに感光させてバンドを検出した。

2. 2. 9 ヒト NEPcDNA のクローニング

ヒト NEP の cDNA 全長クローニングは RT-PCR により行った。Total RNA は培養 HSF より、TRIZol 試薬を用いて抽出した。2 μ g の total RNA は AMV reverse transcriptase と oligo d (T)18 で処理し、1 本鎖 cDNA を得た。NEP cDNA の増幅には下記の primer sets を用いた。

sense primer; 5'-ATGGATATAACTGATATCAACACT-3'(1-24bp),

antisense primer; 5'-AGAAGTGCCGGGTTTGGTGATC-3'(2211-2233bp).

PCR の反応条件は 94 °C /2 分を 1 サイクル、94 °C/30 秒、55 °C/30 秒、72 °C/3 分を 35 サイクル、72 °C/10 分を 1 サイクルとした。PCR 産物は T4 DNA ligase を用いて、pCR3.1 哺乳類細胞発現ベクターに組み込んだ。制限酵素マッピングを用いて、正しい sense が組み込まれた 8 クローンを選抜した。

2. 2. 10 NEPcDNA 発現ベクターの細胞への導入

8 μ L の LipofectAMINE 試薬と 1 μ g の DNA を 200 μ L の OPTI-MEM I medium に添加し、室温、45 分インキュベートした後、800 μ L の OPTI-MEM I medium を加えた。COS-1 細胞は OPTI-MEM I medium で洗浄後、上記 medium mixture を加え、5-12 時間、37 °C、5 % CO₂ 条件で培養した。その後、1 mL の 10% FCS/DMEM を加え 24 時間インキュベート、培地を交換してさらに 48-72 時間インキュベートし、NEP cDNA 導入細胞を得た。

2. 2. 11 RT-PCR によるヒト NEP 遺伝子発現解析

Total RNA は培養 HSF から、TRIZol 試薬を用いて抽出した。1 μ g の total RNA は AMV reverse transcriptase と oligo d (T)18 で処理して、1 本鎖 cDNA を得た。NEP cDNA の増幅には Cohen らの報告した[39]下記 2 つの primer sets を用いた。

NEP1 Sence; 5'-GTCCTGCTCCTCACCATCATAGC-3' (238-260bp),

NEP1 Antisence; 5'-CGATCTTCAGGTTTAGCCGTAGC-3' (991-1013bp),

NEP3 Sence; 5'-GCTACGGCTAAACCTGAAGATCG-3' (991-1013bp),

NEP3 Antisence; 5'-TTCGTGTCCTATGACCATGCC-3' (1870-1890bp)

PCR の反応条件は 94 °C /2 分を 1 サイクル、94 °C/30 秒、67 °C/1 分、72 °C/1 分を 25 サイクル、72 °C/10 分間を 1 サイクルとした。

2. 2. 1 2 UV 照射

UVA、及び UVB の照射はそれぞれ、FL20SBL ランプ(Panasonic Co., Osaka, Japan)、及び GL20SE ランプ(SANKYO DENKI Co. Ltd., Kanagawa, Japan) を用いて行った。

2. 2. 1 3 統計解析

統計解析用データは、少なくとも 3 つの独立した試験から得られた平均 \pm SD で示した。群間の比較には Student's t-test か ANOVA により解析した。P 値は 0.05 以下を統計的に有意とした。

2. 3 結果

2. 3. 1 抗 NEP 抗体を用いた免疫沈降

HSF 由来エラスターゼは酵素特性の類似から、メタロプロテアーゼである NEP か MMP-14 が活性本体の候補となり得ると考えられたので、HSF 抽出粗酵素に対し、抗 NEP 抗体(IMO112, IMO113)、及び抗 MMP-14 抗体を用いた免疫沈降を行い、上清のエラスターゼ活性を、合成基質 STANA を用いて測定した。その結果、2 種類の NEP 抗体はいずれも HSF のエラスターゼ活性を有意に抑制し、MMP-14 抗体ではエラスターゼ活性に影響を及ぼさなかった(図. 14)。同様に NEP 抗体で免疫沈降した上清でのエラスターゼ活性の低下は、

コントロール IgG で免疫沈降した上清に、典型的なメタロプロテアーゼ阻害剤である phosphoramidon や、NEP 特異的阻害剤である thiorphan をそれぞれ 1 μ M 添加した場合と同程度であった(図 15A)。このとき NEP 抗体を用いた免疫沈降物中のエラスターゼ活性はコントロール IgG を用いたときと比較して高くなっており、この免疫沈降物中のエラスターゼ活性は、NEP 特異的阻害剤である thiorphan により、ほぼ完全に阻害された(図 15B)。このことから、HSF 抽出粗酵素液中の NEP が抗体に吸着されると、上清中のエラスターゼ活性は消失し、抗体に吸着していることが示された。同様の実験をエラスターゼ活性測定用の基質に不溶性ヒトエラスチン-RBB ビーズを用いて活性を測定したところ、STANA 分解活性パターンとよく一致した結果が得られた。即ち、HSF をコントロール IgG で免疫沈降した上清中には明らかなエラスターゼ活性が認められたが、NEP 抗体で免疫沈降した上清ではエラスターゼ活性は顕著に低下していた(図 16)。このことは、HSF が確かにエラスチン分解活性を持っており、その活性には NEP 抗体により沈降されるタンパク質が関連していることを示している。コントロール IgG と共に thiorphan もしくは phosphoramidon といった阻害剤で処理した場合、エラスチン分解活性ははっきりとした阻害を示したが、thiorphan の阻害効果は phosphoramidon のそれよりも弱く見えた(図 16)。これは、不溶性のエラスチンを基質とした酵素活性測定は 20 時間もの長時間のインキュベーションを必要とし、thiorphan は phosphoramidon と比べて安定性が劣るため、長時間のインキュベーション中にある程度分解してしまったためかもしれない。

2. 3. 2 HSF の NEP 免疫染色

NEP 抗体を用いた HSF の免疫染色を行ったところ、細胞膜、及び細胞質は陽性であったが、核は陰性であった(図 17)。この結果は Lorkowski らの結果と一致する[40]。

2. 3. 3 ヒト NEP 発現ベクターの導入

ヒト NEP cDNA を組み込んだ発現ベクターを COS-1 細胞に導入した。その後、COS-1 細胞から Total RNA を抽出し、NEP primer set を用いた RT-PCR により NEP の発現を確認した。その結果、元々はほとんど NEP を発現していない COS-1 細胞が、NEP 発現ベクターを組み込むことにより、HSF と同程度の NEP mRNA 発現を示した(データ非掲載)。NEP 発現ベクターを組み込んでいない COS-1 細胞では NEP 活性はきわめて低いが、NEP 発現ベクターを組み込んだ COS-1 細胞では著しく、有意な NEP 活性上昇が認められた(図 18B)。同じ NEP 発現ベクターを組み込んだ COS-1 細胞で、組み込んでいない COS-1 細胞と比較して著しく、有意なエラスターゼ活性の上昇が認められた(図 18A)。

2. 3. 4 NEP は 72kDa ゼラチナーゼを 66kDa ゼラチナーゼに変換できない

Beranger らは真皮線維芽細胞エラスターゼが 72-kDa プロゼラチナーゼ A を活性型の 66-kDa ゼラチナーゼに変換する活性を持つと報告していた[41] ので、NEP がその変換活性を持つかどうか検討した。ゼラチンザイモグラフィで検討した結果、HSF、NEP cDNA 導入 COS-1 細胞の溶解液中には同活性は認められなかった(データ非掲載)。

2. 3. 5 細胞継代老化時のエラスターゼ/NEP 変動

これまでの実験で、HSF のエラスターゼ活性が、NEP で説明できることを示してきたので、自然老化、及び光老化におけるエラスターゼ/NEP 活性の変動を調べた。HSF の継代老化においては、継代数が増えるにつれてエラスターゼ活性、及び NEP 活性は上昇した(図 19A, B)。この継代老化依存の活性上昇は NEP タンパク質発現の上昇を伴うことをウェスタンブロッティングにより示した(図 19C)。しかしこのとき、RT-PCR で見た NEP mRNA 発現は上昇していなかった(図 19D)。

2. 3. 6 マウス皮膚自然老化時のエラスターゼ/NEP 活性変動

自然老化皮膚におけるエラスターゼ/NEP 活性の変動を調べるために、2,4,9,16,21 ヶ月齢のヘアレスマウス背部皮膚を一定面積(0.5cm²)採取しエラスターゼ活性及び NEP 活性を測定した。その結果、エラスターゼ活性も NEP 活性も、マウスの月齢が上がるにつれて上昇する、という同様のプロフィールを示した(図 20)。このことからマウス皮膚においても自然老化に伴い、エラスターゼ/NEP 活性が上昇することが確認できた。

2. 3. 7 HSF のエラスターゼ/NEP 活性に対する紫外線照射の影響

前章においてマウス皮膚中のエラスターゼ活性が紫外線により上昇し、それが紫外線によるシワ形成に関与していることを述べた。そこで、細胞に紫外線照射した場合のエラスターゼ/NEP の変動を調べた。そこで、培養 HSF に UVA(1, 5J/cm²)を照射すると、72 時間後にエラスターゼ活性、及び NEP 活性は照射 Dose 依存的に、有意に上昇した(図 21 A & B)。UVB 照射は 1mJ/cm² では 72 時間後の HSF エラスターゼ/NEP 活性に影響を及ぼさなかったが、5mJ/cm² では両活性の有意な低下が見られた(図 21 A & B)。培養 HSF は 5 J/cm² 以下の UVA、5 mJ/cm² 以下の UVB では、照射後 72 時間において目立ったダメージは認められなかった(データ非掲載)。

2. 3. 8 UVB 照射ヒトケラチノサイト培養上清の HSF エラスターゼ/NEP 活性に及ぼす影響

前章においてヘアレスマウス皮膚に継続的に UVB を照射すると皮膚全体(皮下組織を除く)のエラスターゼ活性が漸進的に上昇することを述べた。UVB は真皮まで届かないので、UVB 照射ケラチノサイト由来の可溶性因子が真皮に浸透して真皮線維芽細胞のエラスターゼ活性を上昇させると考えられた。そこで本章において、UVB 照射ヒトケラチノサイト conditioned medium に、真皮線維芽細胞エラスターゼ/NEP 活性を促進する力があるかどうか確かめることにした。酵素活性測定から、ヒトケラチノサイトに UVB(20

mJ/cm²)を照射して 72 時間後の conditioned medium は HSF に添加して 24 時間培養すると、エラスターゼ/NEP 活性を有意に上昇させることが示された(図 21 C & D)。

2. 3. 9 HSF のエラスターゼ/NEP 活性に及ぼす種々のサイトカインの影響

次に、UVB 照射ケラチノサイトから分泌されることが知られている種々のサイトカインやケモカインの、HSF エラスターゼ/NEP 活性に対する影響を調べた。酵素活性測定から、エラスターゼ/NEP 活性はどちらも、IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF の 24 時間処理により有意に促進されることが示された(図 22)。

2. 3. 10 UVB 照射ヒトケラチノサイトからのサイトカイン分泌

HSF エラスターゼ/NEP 活性を促進する能力があるものとして、5 つのサイトカインが同定されたので、UVB 照射ヒトケラチノサイトでこれらサイトカイン量が増加するかどうか検討した。ELISA で定量したところ、20 mJ/cm² の UVB 照射 72 時間後に IL-8 と GM-CSF 量は有意に増加していたが、IL-1 α , IL-1 β , IL-6 は変化がなかった(図 23A)。

2. 3. 11 HSF からのサイトカイン分泌に対する UVA 照射の影響

UVA によるエラスターゼ/NEP 活性促進における、サイトカイン分泌によるオートクラインメカニズムの関与の可能性を検証するために、エラスターゼ/NEP 活性促進効果のあった 5 つのサイトカインについて、UVA 照射 HSF による分泌量を測定した。ELISA 定量の結果、1.0 J/cm² または 5.0 J/cm² の UVA 照射 72 時間後にいずれのサイトカイン分泌量も有意な増加は認められなかった(図 23B)。

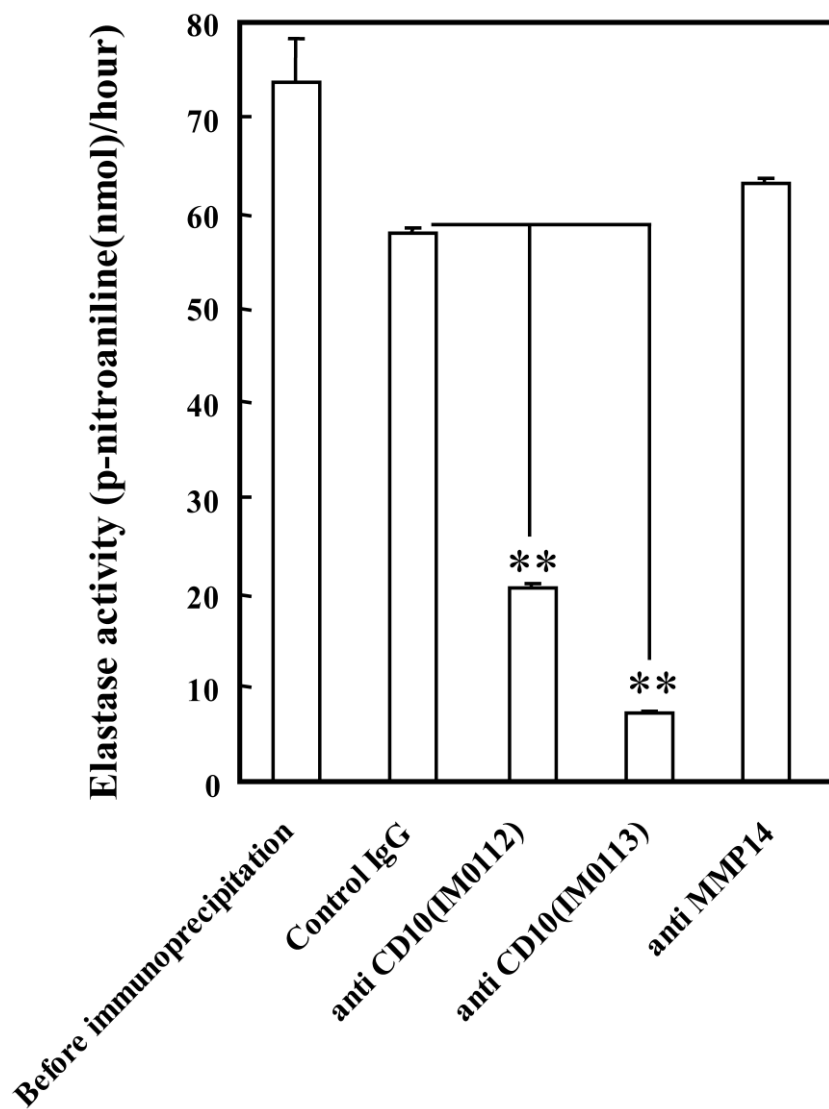


図 14 抗 NEP 抗体と抗 MMP-14 抗体を用いた免疫沈降後上清中のエラスターゼ活性

HSF を抗 NEP 抗体、抗 MMP-14 抗体か、コントロールマウス IgG で免疫沈降した前後の上清中のエラスターゼ活性を、合成基質 STANA を用いて測定した。結果は 1 群 3 ウェルの平均値 ± 標準偏差で表した。統計的な有意差検定は一元配置分散分析と Dunnett の多重比較により行った。**は $P < 0.01$ を示す。

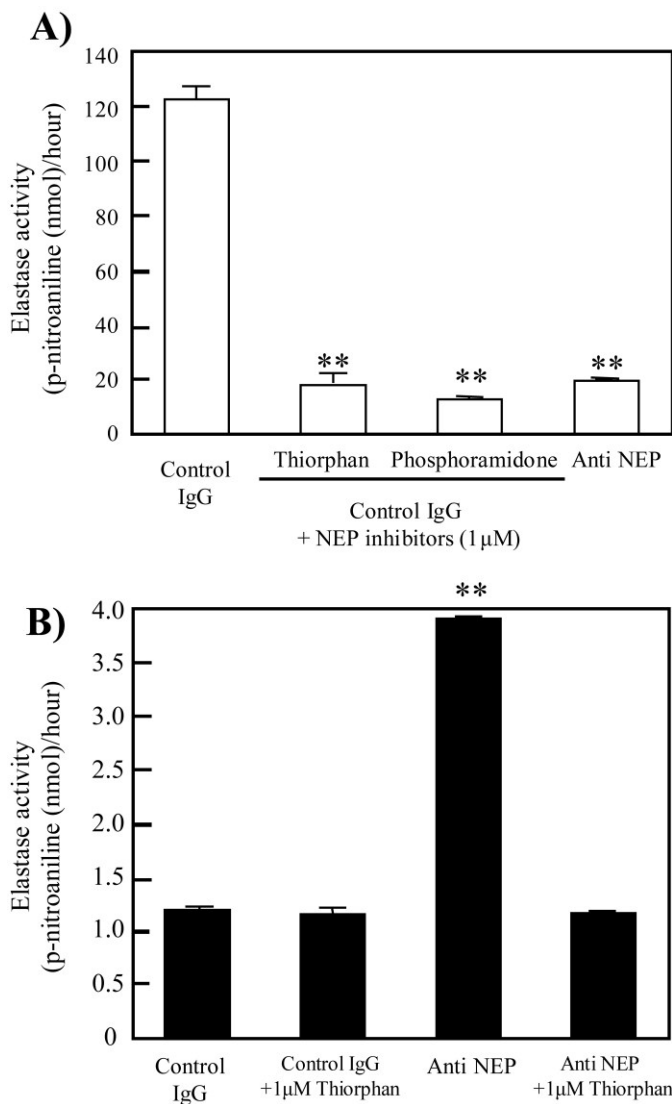


図 15 抗 NEP 抗体で免疫沈降後の上清と沈降物のエラスターゼ活性と **thiorphan** や **phosphoramidon** による阻害効果

HSF 抽出物は抗 NEP 抗体かコントロール IgG で免疫沈降を行い、上清を **thiorphan**(1μM)かメタロプロテアーゼ阻害剤の **phosphoramidon**(1μM)の存在・非存在下にエラスターゼ活性を測定した(A)。抗 NEP 抗体かコントロール IgG による免疫沈降物は **thiorphan**(1μM)の存在・非存在下にエラスターゼ活性を測定した(B)。結果は 1 群 3 ウェルの平均値 ± 標準偏差で表した。統計的な有意差検定は一元配置分散分析と Dunnett の多重比較により行った。**は P<0.01 を示す。

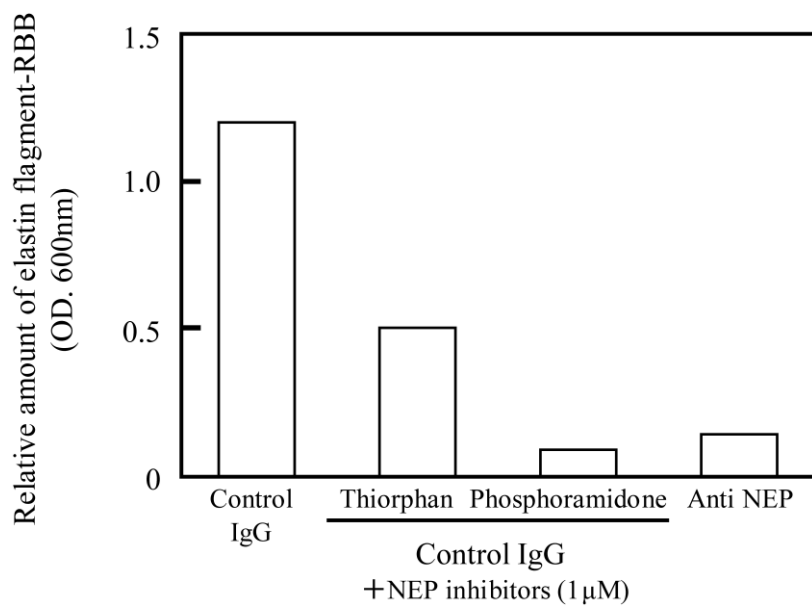


図 16 抗 NEP 抗体による免疫沈降後の上清中のエラスチン分解活性と、**thiorphan**、**phosphoramidon** の阻害活性

HSF 抽出物は抗 NEP 抗体かコントロール IgG で免疫沈降を行い、上清は **thiorphan**(1 μ M)か **phosphoramidon**(1 μ M)の存在・非存在下で、ヒトエラスチン-RBB を基質としてエラスチン分解活性を測定した。結果は 2 回の実験の平均値で示した。

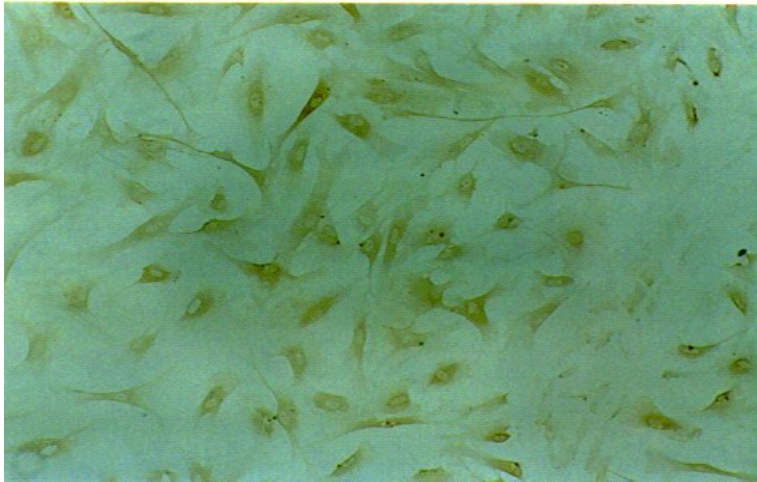
A**B**

図 17 HSF 中の NEP 局在

HSF のコントロール IgG (A) と抗 NEP 抗体 (B) を用いた免疫染色を示す。抗 NEP 抗体では細胞膜は陽性、核は陰性の染色像が認められた。コントロール IgG では特異的な染色像は認められなかった。

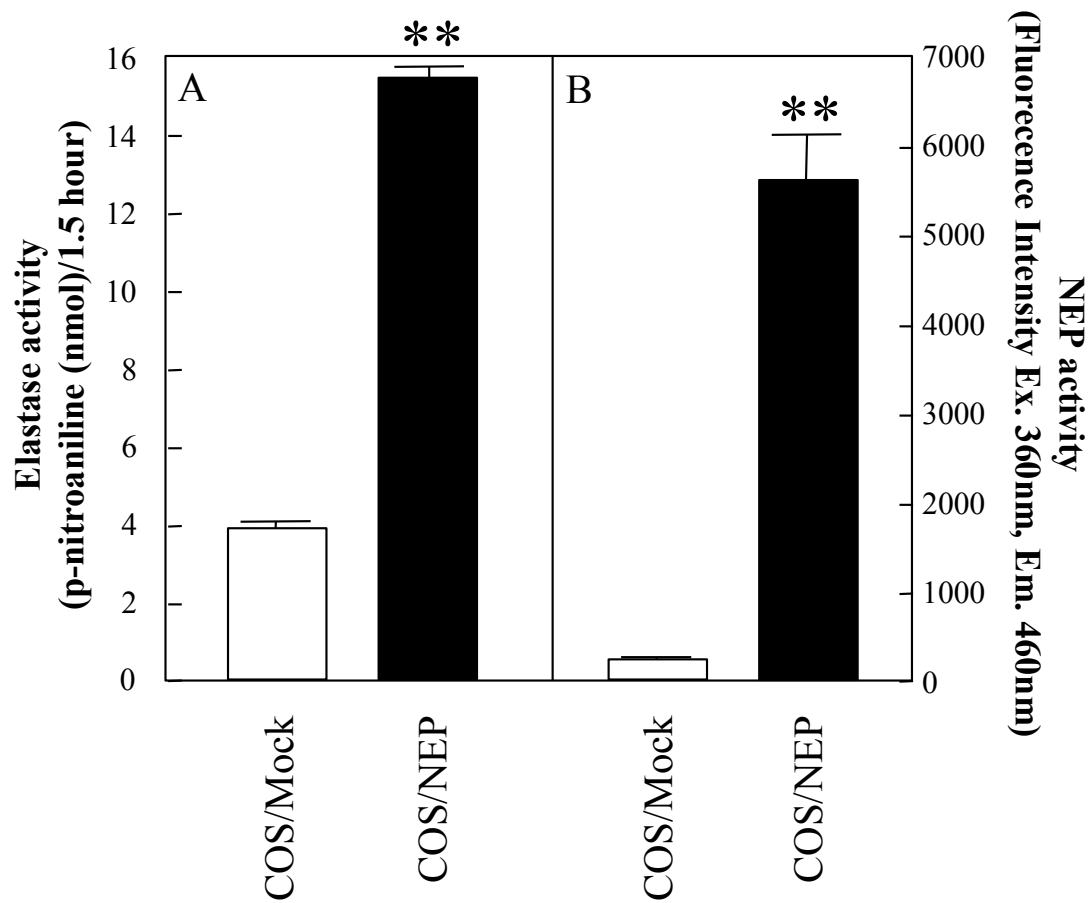
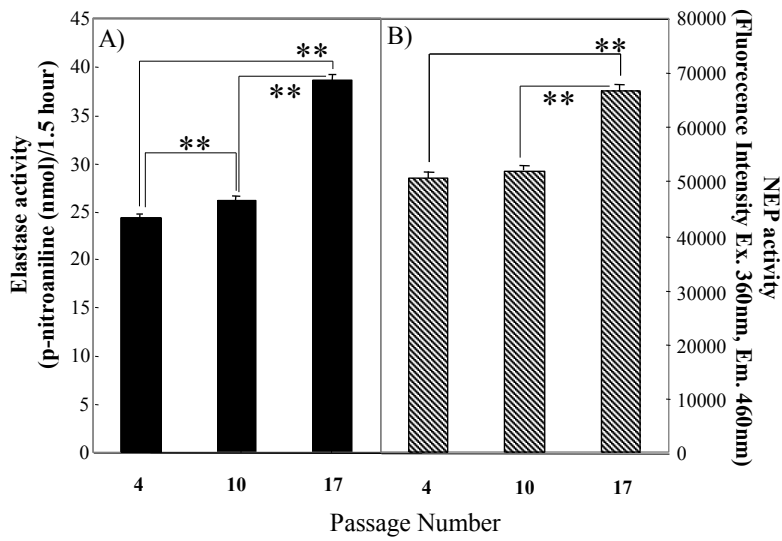
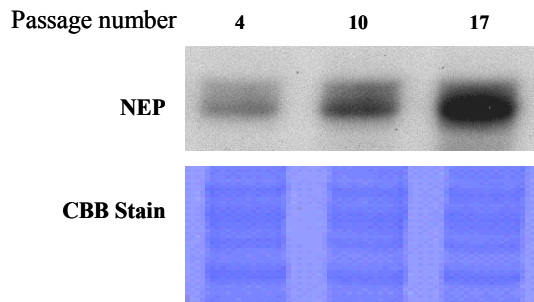


図 18 NEP cDNA を導入した COS-1 細胞のエラスターゼ活性と NEP 活性

エラスターゼ活性 (A) は STANA を基質として測定した。NEP 活性 (B) は glutaryl-Ala-Ala-Phe-4-methoxy-2-naphthyamin を基質として測定した。結果は 3 ウェルの平均 ± 標準偏差で表した。統計的な有意差検定は Student's t-test により行った。**は $P < 0.01$ を示す。



C) Western blotting



D) RT-PCR

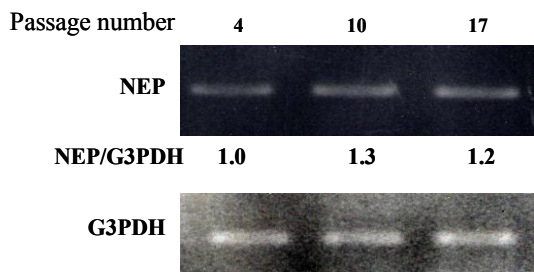


図 19 HSF の継代培養時のエラスターゼ活性、NEP 活性とその遺伝子とタンパク質発現の変化

エラスターゼ活性 (A) と NEP 活性 (B) はそれぞれに対応した合成基質を用いて測定した。結果は 3 ウェルの平均 ± 標準偏差で表した。統計的な有意差検定は一元配置分散分析と Tukey の多重比較により行った。**は $P < 0.01$ を示す。ウェスタンブロットティング (C) と RT-PCR (D) は酵素活性を行ったものと同じサンプルを用いて行った。

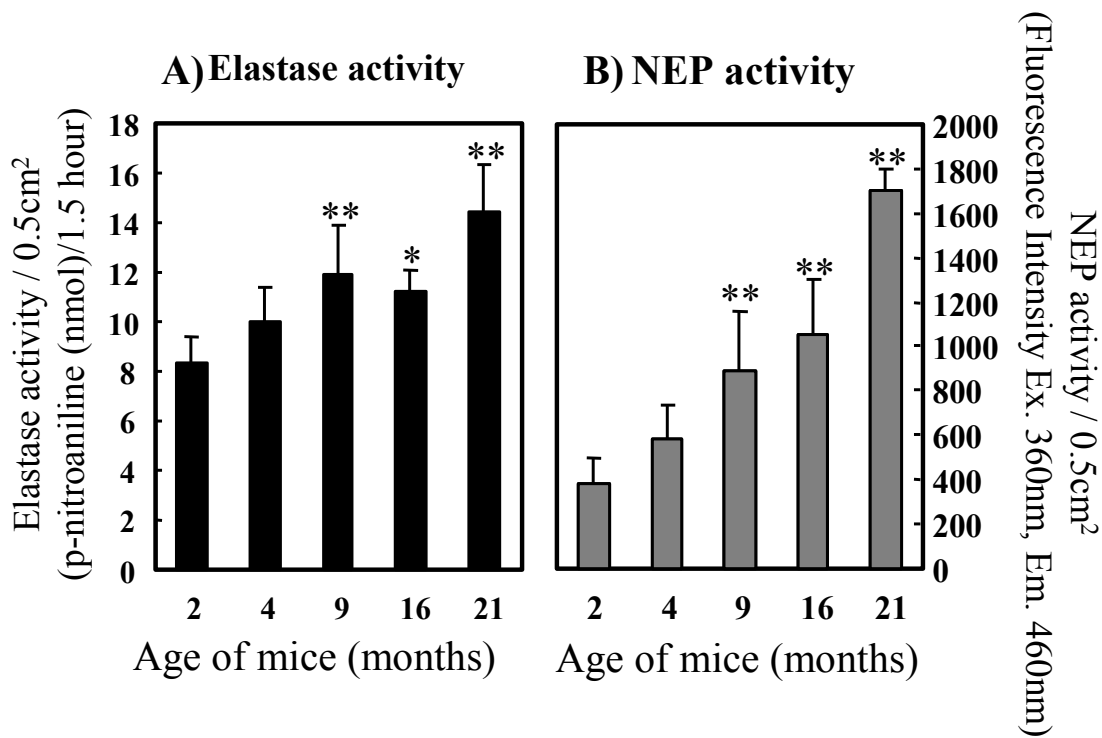


図 20 異なる週齢のマウス背部皮膚中のエラスターゼと NEP 活性

エラスターゼ活性 (A) および NEP 活性 (B) は一定面積の採取皮膚あたりで測定した。結果は 5 匹の平均 ± 標準偏差で表した。2 ヶ月目と比較した統計的な有意差検定は一元配置分散分析と Dunnett の多重比較により行った。**は P<0.01、*は P<0.05 を示す。

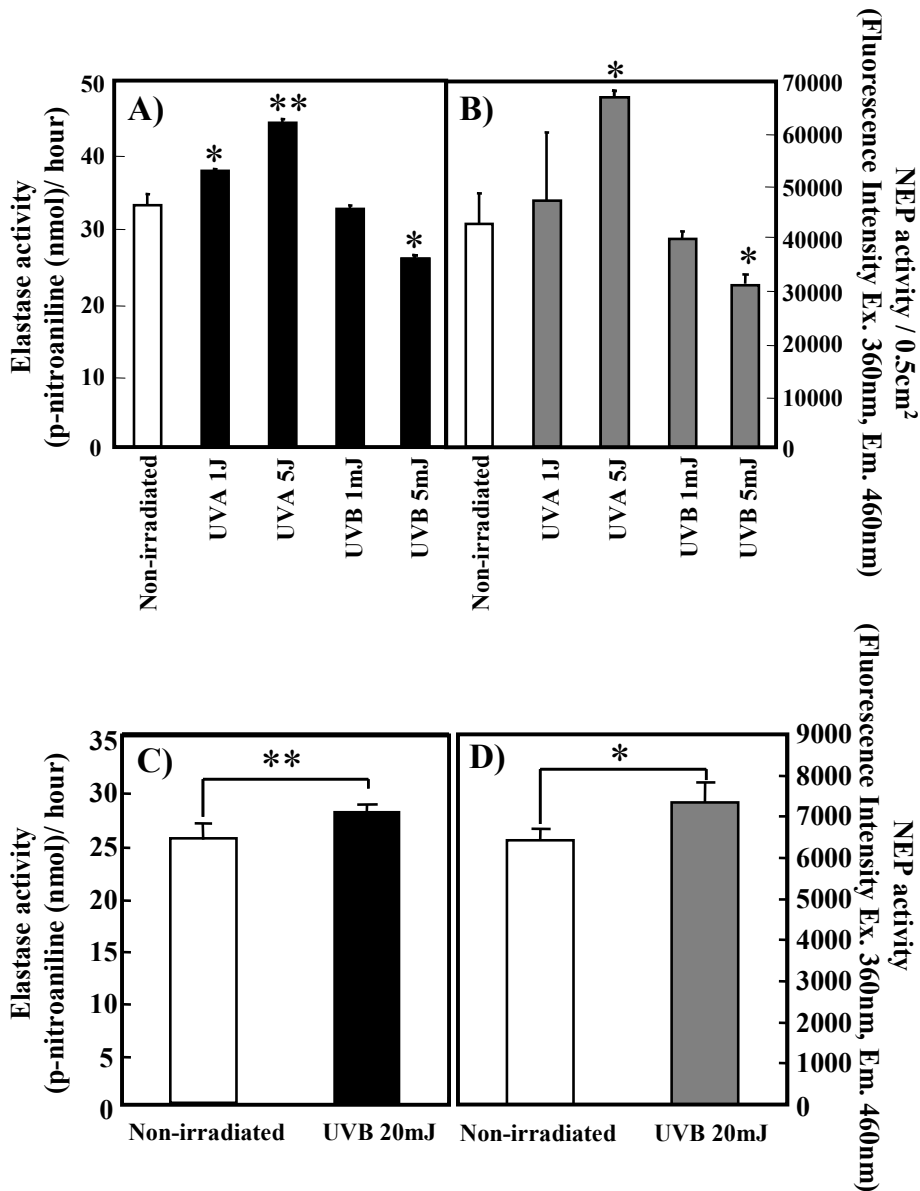


図 21 UVA、UVB 照射 HSF か UVB 照射ヒトケラチノサイト培養上清処理 HSF 中のエラスターゼ、および NEP 活性

エラスターゼ活性 (A)、および NEP 活性 (B) は UVA (1 か 5 J/cm²) または UVB (1 か 5 mJ/cm²) 照射後 72 時間後の HSF 中で測定した。培養ヒトケラチノサイトに UVB 照射して 72 時間後に回収した培養液を添加して 24 時間後の HSF 中のエラスターゼ活性 (C)、および NEP 活性 (D) も測定した。結果は 3 回 (A, B) か、5 回 (C, D) の平均 ± 標準偏差で表した。未照射と比較した統計的な有意差検定は一元配置分散分析と Dunnett の多重比較により行った (A, B)。2 群間の比較は Student's t-test にて行った。**は P<0.01、*は P<0.05 を示す。

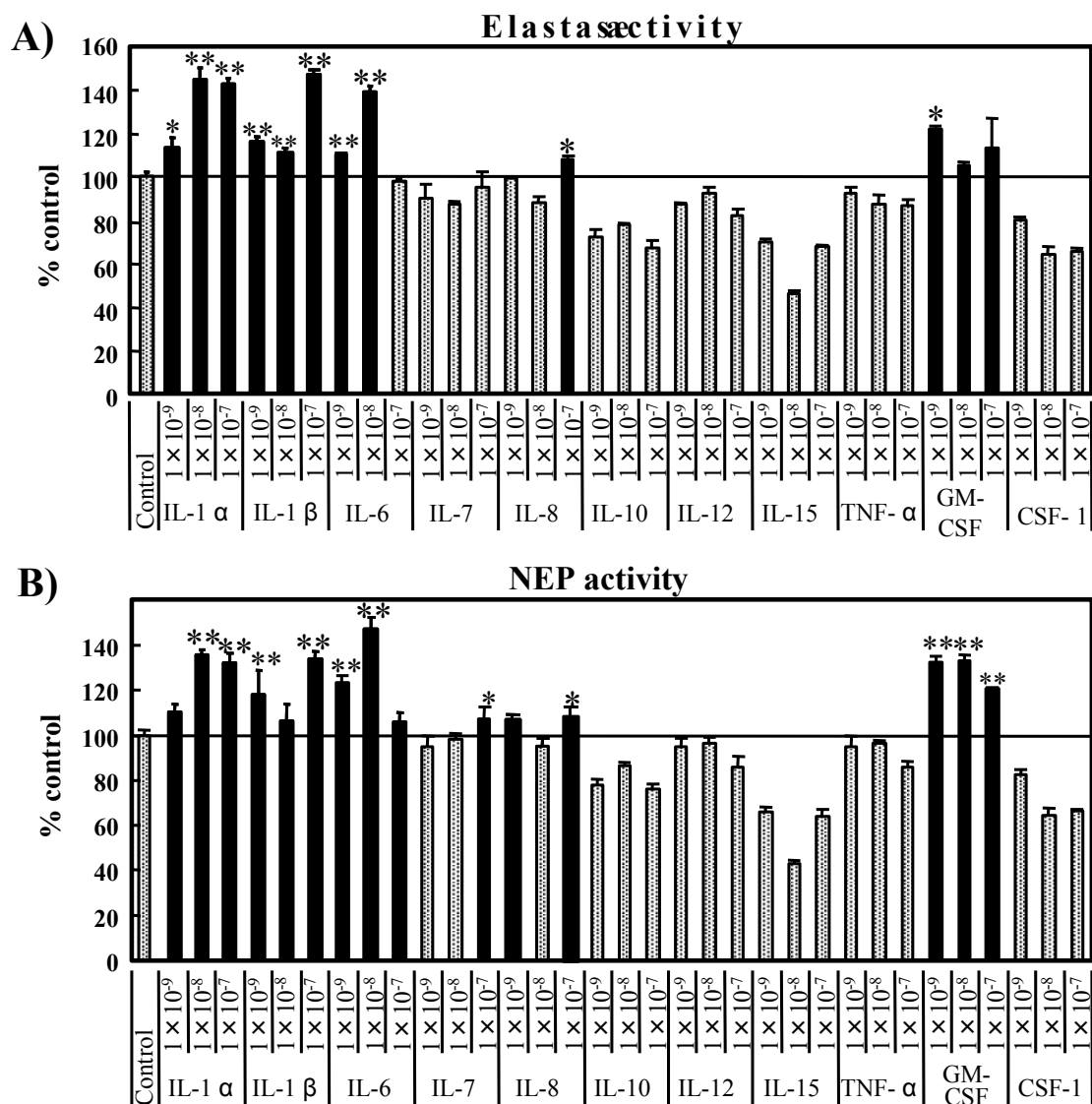


図 22 種々のサイトカインで処理した HSF 中のエラスターゼ、および NEP 活性

エラスターゼ活性 (A)、および NEP 活性 (B) は種々のサイトカインで処理して 48 時間後に測定した。結果は 3 ウェルの平均 \pm 標準偏差で表した。未処理のコントロールと比較した統計的な有意差検定は一元配置分散分析と Dunnett の多重比較により行った。

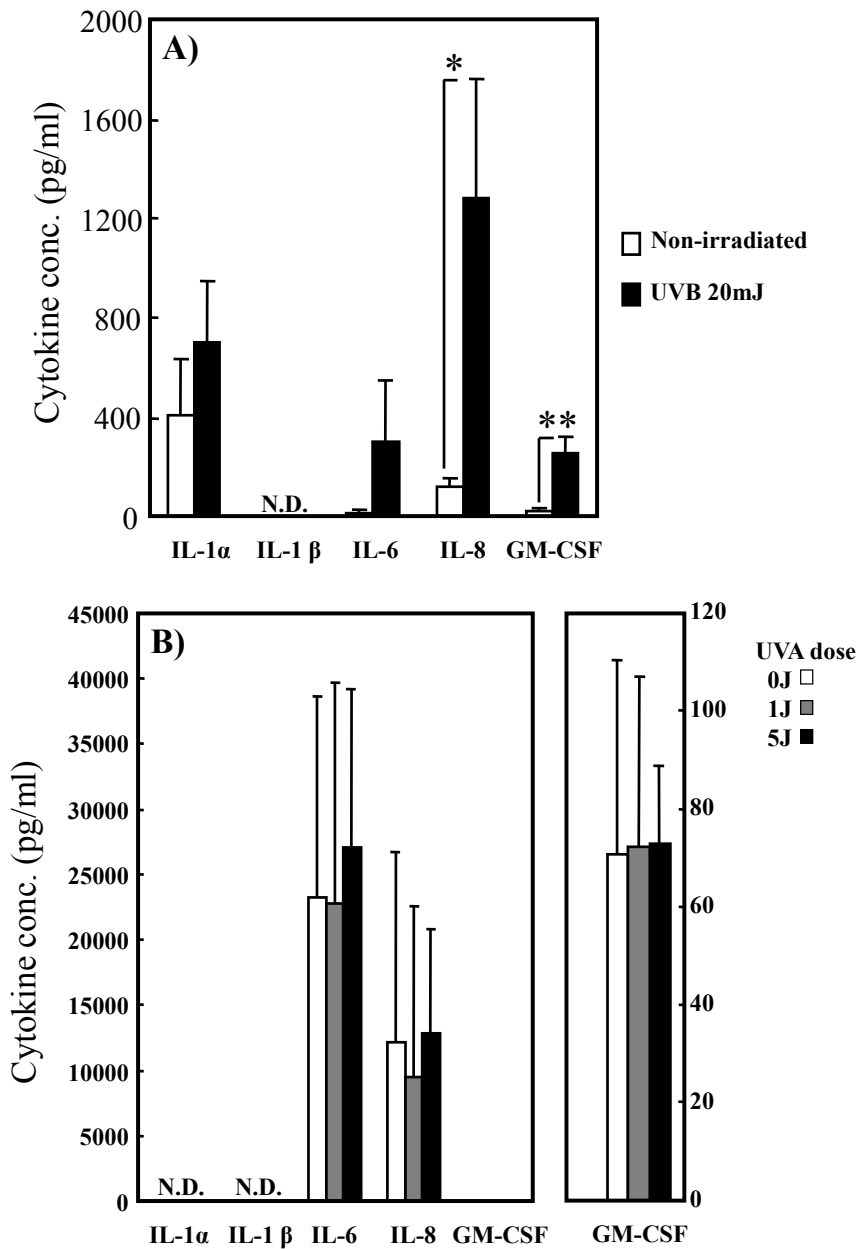


図 23 UVB 照射ヒトケラチノサイト (A) と UVA 照射 HSF (B) の培養上清中へのサイトカイン遊離

ケラチノサイトに UVB (20 mJ/cm² または 0 mJ/cm² (A))照射 72 時間後または、HSF に UVA(1J/cm², 5J/cm², 0J/cm² (B))照射 72 時間後の培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定した。結果は 3 ウェルの平均 ± 標準偏差で表した。統計的な有意差検定は student's-t 検定と Bonferroni の多重比較により行った。

2. 4 考察

NEP は最初、ウサギ腎盂由来で、insulin B 鎖を分解する酵素として 1974 年に報告された[42]。これは、3 番染色体にコードされ、分子量 98,000、至適 pH が中性の膜結合型メタロプロテアーゼであると報告された[35]。エンケファリン[43, 44]、サブスタンス P[45]、ボンベシン様ペプチド[39, 46]、エンドセリン[47, 48]、ブラジキニン[45]、他[49]多くのペプチドが NEP の基質として報告された。NEP の別名、エンケファリナーゼが示すように、NEP はエンケファリンを分解する。そのため、多くの報告が神経に関連するものである[44, 50, 51]。近年、NEP が B 細胞や好中球の分化マーカーである CD10 と同一であることが遺伝子のホモロジーから示された[52]。このため、多くのリンパ関連の報告もある[53, 54]。これまでのところ、NEP が真皮線維芽細胞エラスターゼと同一であるという報告はない。本研究での、抗 NEP 抗体を用いた免疫沈降実験から、HSF 抽出物中のエラスターゼ活性は抗 NEP 抗体と共沈降することが示された。この NEP 抗体で沈降される成分は合成基質と不溶性エラスチンの両基質を分解し、同時に NEP 活性も持っていた。更に、NEP 特異的阻害剤である thiorphan [49, 55]、メタロプロテアーゼ阻害剤である phosphoramidon [56, 57]は細胞抽出液、及び免疫沈降物中のエラスターゼ活性をほぼ完全に抑制した。これらの結果は HSF が NEP と同一であることを強く示唆する。

STANA 分解活性で見た真皮線維芽細胞エラスターゼ活性がエンドペプチダーゼとアミノペプチダーゼの 2 段階反応によって説明できるとした報告はある[11]。即ち、STANA (Suc(Ala)3NA) は最初エンドペプチダーゼにより Suc(Ala)2 と AlaNa に分解され、その後、AlaNA はアミノペプチダーゼによって alanine と paranitroaniline に分解されるというものである。この二段階仮説については、上清の結果のみでは否定できないが、沈殿物のみでエラスターゼ活性を示すことはエラスターゼ活性が、一つの酵素 (NEP) のみで説明できることを強く示唆している。さらに、内因性の NEP をほとんど発現していない COS-1 細胞に NEP 遺伝子を導入すると、エラスターゼ活性が発

現することも確認した。この COS-1 細胞について、AlaNA と LeuNA を基質としたアミノペプチダーゼ活性を測定したところ、COS-1 細胞のアミノペプチダーゼ活性は、最近の報告[58]と一致して、極めて低いことがわかった(データ非掲載)。これらのことから、HSF エラスターゼ活性は主に NEP 活性に帰すると考えられる。

細胞老化の影響に関しては、エラスターゼ活性、NEP 活性共に、HSF の継代数に伴い上昇しており、このとき NEP タンパク質は顕著に(4 継代目と比較して、10-17 継代目でそれぞれ 2.5-11.5 倍)増加したが、NEP mRNA は 1.2-1.3 倍程度しか上昇していなかった。このことは、NEP のタンパク質発現調節にはある程度、mRNA の分解速度などによる安定性の変化や、翻訳段階の調節が寄与していることを示している。翻訳レベルの調節は真核生物の細胞の遺伝子発現において重要な戦略の一つで、対応する mRNA の増加なしにタンパク質発現が促進されるという例はこれまでもがんや先天免疫の研究において報告されており、initiation factor や elongation factor といった、翻訳調節因子による翻訳スピードの促進によると説明されている[59]。

更に本研究において、マウス皮膚の自然老化においても、エラスターゼ活性、NEP 活性共に有意に上昇することを見出した。このことも、HSF エラスターゼと NEP の同一性を支持する。この結果は、真皮線維芽細胞エラスターゼ活性についてもこれまで報告されており[60]、NEP についてもいくつかの組織で aging biomarker とされている報告[61, 62]と一致して加齢依存性を示す。このような HSF エラスターゼ活性の加齢依存的増加は、老化に伴う turnover 調節機能の低下による結果で、自然発生的な皮膚老化兆候、例えば、たるみ[63]などに関連するかもしれない。

前章において 1MED 以下の UVB をヘアレスマウス背部皮膚に連続照射したときに誘導されるシワ形成時に真皮線維芽細胞エラスターゼ活性が有意に上昇し、真皮線維芽細胞エラスターゼの特異的阻害剤の塗布により、シワ形成が有意に抑制できることを述べた。このように、炎症が起こらない強度の UVB 照射によるシワ形成には、HSF エラスターゼ/NEP が中心的な役割を

果たしていると考えられる。本章では、エラスターゼ NEP 活性は HSF に UVA を照射した場合には有意に上昇し、UVB 照射では活性上昇は起こらないことを見出した。UVB 照射ケラチノサイトの conditioned medium は HSF のエラスターゼ/NEP 活性を上昇させ、このことは UVB 照射により表皮で作られた基底膜透過性のサイトカイン（例えば IL-8、及び GM-CSF）が真皮での NEP の発現促進因子となりうることを示している[64-66]。このように、両タイプの紫外線が直接的、又は間接的にエラスターゼ/NEP 活性を促進していることは両酵素の同一性と、太陽光により促進されるエラスターゼ活性が、皮膚の弾力性低下とシワ形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。光老化において誘導される HSF エラスターゼと神経ペプチドを分解できる NEP が同じ酵素であるということは、光老化と神経ペプチドの間にメカニズム的な関連があるのかどうかに興味を持たれる。NEP は神経伝達[40]や皮膚神経免疫システム[67, 68]において重要な役割を果たしていることが知られている。紫外線暴露皮膚では NEP 発現上昇により、炎症反応[69]の調節に関わる種々の神経ペプチドの減少と、光老化を引き起こすエラスチン線維分解が同時に起こっていると考えられる。

2. 5 まとめ

ヒト真皮線維芽細胞 (HSF) エラスターゼは膜結合型のメタロプロテアーゼであると特徴付けられていたが、その構造、アミノ酸配列、コードする遺伝子についてはほとんど知られていなかった。分子量や阻害剤プロファイルの類似性から、HSF エラスターゼと neprilysin (neutral endopeptidase 24.11 (NEP))が同一のものであるという仮説を、免疫沈降やトランスフェクションの技術を用いて検証した。免疫沈降実験からは、培養 HSF の溶解物中のエラスターゼ活性は抗 NEP 抗体により共沈されることを示した。NEP cDNA 発現ベクターを組み込んだ COS-1 細胞では HSF エラスターゼと NEP 活性が誘導された。これらの知見は HSF エラスターゼが、主に神経関連細胞中で神経ペプチド分解に機能している NEP と同一であることを強く示唆する。NEP は培養 HSF の細胞継代老化時にタンパク質、酵素活性レベルで顕著にその発現が促進された。NEP 活性はさらに、マウス皮膚の自然老化時、UVA 照射 HSF、および UVB 照射ヒトケラチノサイトの培養上清で処理した HSF においても、エラスターゼ活性と同様のパターンで顕著に促進された。サイトカインプロファイルの解析により、11 種のサイトカイン中で IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF に、HSF の NEP とエラスターゼ両活性を同等に有意に促進する可能性が示された。このことも、HSF エラスターゼと NEP の同一性を支持する。

第3章 毛周期調節における neprilysin の役割

3.1 序論

毛周期は自発的、周期的な組織再構築システムの1種であるので、その調節メカニズムは組織再成の点から興味深い。毛周期を調節する、または毛周期と連動して変動する生体内因子は数多く報告されている。主なものを分類すると、ホルモン類、成長因子類、酵素類、転写因子などが挙げられる。酵素の例としては urokinase [70], ornithine decarboxylase [71], γ -glutamyl transpeptidase [72], alkaline phosphatase [73], hydroxysteroid dehydrogenase [74], adenylyl-cyclase [75], aryl hydrocarbon hydroxylase [76], aromatase [77], glutathione s-transferase [78], セリンプロテアーゼ阻害剤である nexin 1 [79] などが挙げられる。毛周期の過程は一種の組織再構築過程と考えられるため、細胞外マトリックス(ECM)の調節は毛周期に影響を及ぼす可能性が高いと考えた。ECM に関しては、プロテオグリカンが毛周期との関連がよく研究されている[80-84]。しかし、マトリックス分解酵素に関しては、タイプ IV コラゲナーゼ[85]、マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)-2, TIMP-1[70, 86] などほんの少数が毛周期との関連が報告されているに過ぎない。前章において neprilysin (NEP)を真皮線維芽細胞エラスターゼと同定したので、毛周期調節における NEP の役割に注目した。

NEP は細胞表面メタロプロテアーゼで、中性エンドペプチダーゼ(EC 3.4.24.11), CD10, CALLA, エンケファリナーゼなどとしても知られている。この酵素は中枢、末梢神経系、正常、及びがん化リンパ系細胞、adrenal glands を含む多くの組織で発現している[49]。NEP はまた、エクリン汗腺、皮脂腺のような正常皮膚組織や培養表皮細胞や真皮線維芽細胞[87]、毛包や毛腫瘍[88]においても発現している。NEP は enkephalins [43], bradykinin [45], neurotensin, substance P [45, 89], CGRP [50], natriuretic peptide [48], fMet-Leu-Phe [90], endothelin [47, 48] galanin [91]など幅広い生理活性ペプチ

ドを分解できる。前章では NEP がエラスターゼ活性を持ち、皮膚の自然老化、および光老化において重要な役割を果たすことを示した。ここでは毛周期調節における NEP の役割について報告する。

3. 2 実験材料と方法

3. 2. 1 動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットと雄性 C3H マウスは Charles River Japan Inc. (横浜) から購入した。餌と水は自由摂取とし、室温 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($55 \pm 10\%$)、光 (12 h 明/12 h 暗) をコントロールしたコンベンショナル条件で、飼育した。毛周期の各ステージの皮膚生検サンプリングのためには 3~12 週齢のラット (各周齢 3 匹ずつ) を用いた。各ラットの背部皮膚は全体が同じ毛周期ステージにはないので、一定の毛周期のサンプルを得るために、両肩甲骨を結んだ線の直下の一定の部位から皮膚を切り出した。皮膚組織は皮下組織を除いた後、パンチバイオプシーで一定の面積を採取し、様々な試験 (酵素活性、タンパク質発現、mRNA 発現、免疫組織化学) に供した。酵素活性のためには、皮膚バイオプシーは 0.1% Triton-X 100, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer 中でホモジナイズ、可溶化し、超音波破碎後遠心 ($3000\text{rpm} \times 20\text{ min}$) した上清を酵素液とした。

これら動物実験は花王株式会社のガイドラインに従って行った。

3. 2. 2 酵素活性の測定

エラスターゼ活性、および NEP 活性は前章に述べた通りに測定した。

3. 2. 3 NEP タンパク質発現 (免疫沈降とウェスタンブロッティング)

ラット皮膚は RIPA buffer 中でホモジナイズ、可溶化した。ヤギ・ポリクローナル抗 NEP 抗体で免疫沈降した後、マウス・モノクローナル抗 NEP 抗体で

ウェスタンブロッティングを行った。2次抗体にはビオチン化抗マウスIgGを用いた。その後streptavidin-horseradish peroxidaseで1時間インキュベートした。ECL検出試薬で可視化、chemiluminescenceはMolecular Imager System GS-363 (BIO RAD)を用いて検出した。

3. 2. 4 ノーザンブロッティングによる NEP 遺伝子発現解析

Total RNA はラット皮膚から ISOGEN を用いて抽出し、Oligotex-dT30 (Takara ; 滋賀, 日本)を用いて Poly-A RNA を精製した。ラット NEP 特異的プライマーとしては以下のものを用いた。

Forward, 5'-ATAACAAAATGACATTGGCCAAGC-3'

Reverse, 5'-GTCGTTTTTCGACGAAGGTGTATTT-3'

ラットNEPのcDNA配列とプライマー認識部位は図24に示した。

1 % アガロースゲル電気泳動の後、ノーザンブロッティングを行った。³²P-dCTPでラベルしたラットNEP特異的プローブで68°C、オーバーナイトハイブリダイズし、放射能はBAS2000 bio-image analyzerを用いて定量した。

3. 2. 5 ラット毛周期における免疫染色

ラット皮膚のホルマリン固定パラフィン切片は10%ウマ血清/PBSで2時間ブロッキングした後、マウスモノクローナル抗NEP抗体(Clone 56C6)を載せて4°C、オーバーナイト、インキュベートした。ビオチン化した抗マウスIgGを二次抗体とし、VECTASTAIN ABC kitとDAB基質で発色させ、ヘマトキシリンでカウンター染色した。

3. 2. 6 ラットとマウス皮膚のエラスチン染色

ラットとマウスの皮膚中の弾性線維染色はオルセイン染色[24]により行った。

3. 2. 7 マウス毛再生の評価

毛成長の評価はC3Hマウスを用い、確立された方法[92, 93]に準じて若干の改変を加えて行った。1週間の予備飼育後、C3Hマウスの背部毛は約8cm²の範囲をバリカンで毛刈り後、除毛クリーム(カネボウ；東京，日本)で除毛処理した。0.05% NPLTか溶媒コントロール(80% エタノール) 100μL の塗布は除毛の次の日から週5日、1日2回行った。マウス背部皮膚の写真撮影は28日間の試験期間を通じて、定期的に行い、毛再生は画像解析により下の式に従って評価した。

毛再生%=発毛部位(黒)/除毛部位

HE染色皮膚組織中で、成長している毛包（Anagen IIIからAnagen VI）を、確立されている形態学的ガイドライン[13]に従って分類し、顕微鏡下で計数した。各毛包の長さはImage Jを用いて画像解析した。

3. 2. 8 ヒト毛包器官培養

スキッククリニック（大宮、新宿，日本）にて植毛手術を受けた患者からインフォームドコンセントを受けて入手したヒト後頭部頭皮から、成長期の毛包を単離し、Williams' E 培地(グルタミン、ヒドロコルチゾン、インスリン、抗生物質添加)中で、37°C，95% air, 5% CO₂ 環境下で培養した。単離1日後に成長している毛包を選抜し、0.05 % NPLTか溶媒のみを培地に添加した。培養毛包のデジタル写真は実体顕微鏡を用いて一日おきに撮影し、培地交換は2日おきに行った。毛包長はImage Jを用いて画像解析し、1日あたりの成長速度を計算した。成長期の毛包の形が退行期様（毛乳頭が毛包上皮から離れる）に変化したら、その毛包は毛包長測定からははずし、退行期毛包数にカウントした。

本研究は『ヘルシンキ宣言』に基づく倫理的原則を遵守し、花王株式会社内の倫理委員会の承認を得て行った。研究参加の対象者には説明文書に基づいて研究内容を説明し、研究への参加協力について「自由意思による同意」を得た。

3. 2. 9 統計解析

全ての統計解析は SPSS ソフトウェアを用いて行った。群間の差の検定には一元配置分散分析と Student's t-test か Welch's t-test を用いた。有意水準は $P < 0.05$ 、及び 0.01 とした。

```

1  gccaggagt tctgtttggt gaccgagagc agcgtgcca aattgcaccg gggttcatt
61  gggggctggg aattggccat tccgctgtac agacactgtt tttatttaa aaagcaagat
121 tttaggatgat gggaagatca gaaagtcaga tggatattac tgatatcaat gtcctaaagc
181 cgaagaagaa acagcgaatg actccactgg agatcagcct tctgtgctc gctgtgctc
241 tgactatcat agctgtgaca atgattgctc tctatgcaac ctatgatgat ggtatttga
301 aatcatcaga ctgcataaaa tcagctgctc gactgatcca gaacatggat gcctctgctg
361 agccatgtac ggacttcttc aaatagctt gttggaggctg gttgaaacgc aatgtcatcc
421 ctgagaccag ttcccgtatc agtaattttg acattctaag agatgaacta gaagtcattt
481 tgaagatgt ccttcaagaa cccaaaactg aggacatagt agcagtgcag aaagcaaaaa
541 cttgtacag atcatgtata aatgaatctg ctattgatag cagaggtggg caacctctgc
601 tcacactgtt accagatata tatgggtggc cagtagcctc acaaaactgg gaacaaacat
661 atggacttct ttggacagct gagaaacta ttgcacaact gaattctaaa tatgggaaaa
721 aggtcctcat taatttttt gttggcactg atgataagaa ttctaccag catataattc
781 atttgacca gcctcgactt ggcctccctt ccagagacta ctatgagtgt acaggaatat
841 ataaagaggc ttgcacagca tatgtggatt ttatgattc tgtggccaga ctgattcgtc
901 aggaacaaag attgccctatt gatgaaaacc agctctctt ggaaatgaat aaagttatgg
961 aattggaaaa agaaattgcc aatgccaaa ctaaaccaga agaccgaaat gacccaatgc
1021 tgcttataa caaatgaca ttggccaagc tccaaaataa cttctctctg gagatcaatg
1081 ggaagccatt cagctggta aattcacaa atgaaatcat gtcaactgtg aatattaata
1141 tcaaaaatga ggaagaagt gttgtttatg ctccagaata ttaacaaaa ctaagccta
1201 tctttacca atattctccc agagatctt aaaatttat gtcctggagg ttcataatgg
1261 atcttgaag cagcctcagc cgaaactaca aggagtcag aaatgcttc cgcaagccc
1321 tttacgggac tacatccgaa actgcaacct ggagacgggtg tgccaactac gtcaatggga
1381 acatggagaa tgctgtgggg aggctttatg tggaagcagc ttttgctgga gagagcaagc
1441 acgtgggtga agatttgatt gcacaaatcc gtgaagttt tattcagact ttgatgacc
1501 tctctggat ggatctgag acaaaaaaga aagctgaaga gaaggcctg gcaattaaag
1561 aaaggattgg ctatcctgat gacatcatc ccaatgagaa taaactgaat aatgagtatc
1621 ttgattgaa ctacaaggaa gaggaatact ttgagaacat aattcaaat ttgaaattca
1681 gccaaagcaa gcagctaaag aagctccgag aaaaggtgga caaagatgag tggataagtg
1741 gcgcggcgtt agtcaatgca tttattcct caggcagaaa tcagatcgtc ttcccgcg
1801 gctatttga gcccccattc tttagtctc ggcagtccaa ctcaatgaac tatgggggca
1861 tcggcatggt catcgacat gaaatcacac atggccttga tgacaatggc agaaatttta
1921 acaaaagtgg agacctggt gactgggtgga ctacagcagc tgcaaaataat tcaaaagacc
1981 aatcccagt ttgtgtgac cagtatggaa actttacatg ggacctagca ggtggacagc
2041 atctcaatgg aattaacaca ctaggagaaa atattgctga taatggaggg attggccaag
2101 catacagagc ctatcagaat tatgttaaaa agaattggtga agaaaaatta ctccctggac
2161 ttgacctcaa tcacaaacaa ctattcttct tgaactttgc ccaggtgtgg tgtggaacct
2221 accggccaga gtagtcagc aattccatta aaacagatgt acacagctct ggcaatttca
2281 ggatcattgg cactttgag aactctgctg agtttgcgga tgcctttcat tgccgcaaga
2341 actcatacat gaatccagaa aggaaatgct gggtttggtg atcttcacag gaagtggagc
2401 atccatggca ggactcgcca aagccacaga aacaggaagt cttccctcag agaactggg
2461 ccccggaagt tcttcagct tcttggggga aattcacaga gatgagcag agctaacaaa
2521 aatgaaatta gattattaaa accgctgta atgaaagggg agaaaaccta cgatctagca
2581 aatcaatcac ttcactgtgt aaataattac cttccaacgg taatattacc gttcacttct
2641 gttctcaca cagactgcag ctttcatgct gctctgtagag aacagtgta acacttaag
2701 caggttatga cttctgatca agaggaggaa gacgctgaat acagttggc accaaagtac
2761 agatttgcct ctacagact cactttgctc gcaacattca gctccttcaa aattctcca
2821 aagaaccccc atgcatactg tggccttcag gctcctgcag tgtggaactc atttaccat
2881 gcataaatta ttcattcatt ccacatcatt ttgattgag cactcttga gcttaaaacta
2941 gagagtctga aatggttccg ccatttacc cttgagtgta tgttgagact cttcagcccc
3001 ctacagattt ttgagcaatt tcttgctctc gctgcccctc agacttagtc ttttaagga
3061 tttgtagtaa tgtataaaaa acattctata ttaattatt aactacacat gaccaataa
3121 accattgcta taggtaatca ttgaatattg acattatag gccaagatag atagttaaga
3181 agatctgtaa catgatgtgc agatgaaaat ttgaaacttt ttaagcctgt aatcatatt
3241 gctgaaaatc tcaaacaca aactctgggg tgagcattac cattgaacag ttgtcttgag
3301 atgcataata gttttggtt acaaacagcg ttttgaagat taagtctggc ctacgtggct
3361 aagaaagggc ctaactctta tctgtgttac tccatgcgct cttgttctc aggtttgtca
3421 tccgatggaa atattttgat aataaattga agttatgagt cctaaaaaaa aaaaaaaaaa
3481 aaaaaaaaaa aaa

```

図 24 ラット NEPcDNA 配列とプライマー認識部位

ACCESSION: NM_012608 DEFINITION: Rattus norvegicus membrane metallo-endopeptidase (Mme), mRNA プライマー認識部位は太字と下線で示した。

3. 3 結果

3. 3. 1 細胞外マトリックス分解酵素の毛周期変動

毛包を含む皮膚中で、細胞外マトリックスを分解する酵素が毛周期と連動して変動するかどうか検討するために、代表的な細胞外マトリックス分解酵素としてタイプ I、タイプ IV コラゲナーゼ、及びエラスターゼの活性を測定した。毛周期の各ステージをサンプリングするために、3 週齢から 12 週齢まで 1 週齢ずつ週齢のずれた SD ラットを各週齢 3 匹ずつ用意し、酵素活性測定のためには背部皮膚の特定の部位からサンプリングした。タイプ I コラゲナーゼ活性は毛周期を通じてほぼ一定であった(図 25A)。一方エラスターゼ活性は、毛周期の初期成長期にあたる 5 週齢、10 週齢にピークを持つ大きな変動を示した(図 25A)。タイプ IV コラゲナーゼ活性は毛周期の休止期にピークを持つ変動を示した(図 25A)。同時に、隣接した部位から採取した皮膚組織はホルマリン固定後 HE 染色を行った。典型的な毛周期ステージの組織像として初期成長期(5 週齢)、成長期(6 週齢)、休止期(8 週齢)を図 25B に示した。

3. 3. 2 NEP 活性、タンパク質発現、遺伝子発現の毛周期変動

初期成長期に活性が顕著に増加する酵素は、毛周期の開始調節に関連する可能性があるとして予測されたので、皮膚中のエラスターゼ活性に着目して検討を進めることにした。前章にて真皮線維芽細胞の産生するエラスターゼの活性本体は NEP であることを示したので、毛包を含む皮膚中での NEP 活性の毛周期各ステージにおける活性変動を測定した。その結果、エラスターゼ活性と極めてよく似た変動を示し、初期成長期にピークを持つ消長変化が大きかった(Fig. 26A)。

そこで次に、NEP タンパク質発現が同様の変動を示すかどうか確かめることにした。活性測定に用いたものと同じときに採取した各週齢のラット皮膚を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、単位面積当たりの NEP タンパク質発現は活性変動と同様に、5 週目と 10 週目にピークを持つ消長変

化を示し、エラスターゼ/NEP活性の変動はタンパク質レベルで調節されていると考えられた(図 26B-D)。

更にNEPタンパク質発現の変動が遺伝子発現レベルで調節されているのかどうか検討することにした。活性測定に用いたものと同じときに採取した各週齢のラット皮膚から抽出したRNAサンプルを用いてノーザンブロットティングを行ったところ、G3PDHを基準としたNEPの相対発現量は活性変動、タンパク質発現変動と同様に5週目と10週目にピークを持つ消長変化を示した。このことから、NEPタンパク質の発現は遺伝子発現レベルで調節されていると考えられた(図 26E, F)。

3. 3. 3 毛周期の各ステージにおけるNEPの局在

毛周期の各ステージにおけるNEP発現部位を特定するために、酵素活性測定に用いたものと同じときに採取した各週齢のラット皮膚組織を用いてNEPの免疫染色を行った。初期成長期の毛包においては、毛包上皮でNEPは強発現していた(図 27A)。初期成長期には更に、毛包の貫入方向の真皮にも陽性所見が認められた(図 27B)。成長期には内毛根鞘とbasal plateに(図 27C, D)、退行期には毛乳頭と結合織毛包に陽性所見が(図 27E)、休止期にはクラブヘア周囲の結合織毛包に弱いシグナルが認められた(図 27F)。ノーマルIgGで処理した陰性コントロールは、毛周期のどのステージ、どの部位においても特異的な染色は示さなかった(図 27G)。

3. 3. 4 マウス毛周期調節に及ぼすNEP阻害剤の効果

NEPの発現量と発現部位が毛周期と連動して変動することから、NEPは毛周期調節に何らかの役割を果たしているのではないかと仮説を立てた。そこで、マウス背部皮膚にNEP阻害剤を塗布することにした。NEP阻害剤として、第1章で合成したNPLTを用いた。

毛成長の評価には、有色毛を持ち、評価法も確立している[92, 93]C3Hマウスを用いた。除毛後0, 17, 24日後の典型的なマウス背部写真とHE染色した皮

膚組織像を図 28A-Lに示した。除毛後の毛再生の経時変化を画像解析した結果を図 29Aに示した。除毛後14-24日において、NPLTを毎日塗布したマウスでは、溶媒コントロールマウスと比較して有意な毛再生遅延が認められた(図 29A)。除毛後24日目において、溶媒塗布したマウス背部皮膚では毛はほぼ完全に生えそろうていた。NPLT塗布マウスの毛の完全復元は約1週間遅れた。HE染色皮膚組織上で、成長している毛包数(Anagen III-Anagen VI)を計数した(図 29B)。成長毛包数が最大に達する日は0.05% NPLTの塗布により遅れた。さらに成長毛包数をプロットした曲線下面積 (area under curve (AUC))はNPLT塗布により成長毛包数が有意に減少することを示した(図 29B)。毛包長で見ても、NPLT塗布は毛成長の遅れと退行期誘導の促進が示された(図 29C)。

3. 3. 5 ヒト頭皮単離毛包器官培養におけるNEP阻害剤の効果

単離毛包の組織培養は、皮膚組織内で毛包周囲に存在するエラスチンやコラーゲンといった細胞外マトリックスの影響を除くことができる。単離培養した成長期のヒト毛包は数日間は生体内とほぼ同じ速度で毛幹を生成し、その後自然に退行期に入る。毛包の成長速度は経時的に低下し、初期にはNPLT処理と溶媒コントロールの間に差は認められなかった(図 30A)。退行期毛包率で見ると、NPLT処理毛包で退行期誘導が促進されているように見えた(図 30B)。典型的な培養ヒト毛包の写真を図 30C-Hに示した。ヒト頭皮の抗NEP免疫染色では、ラットと同様の陽性像が認められた(初期成長期には毛包上皮と毛包貫入方向の真皮、結合織毛包(図 30I)、成長期には内毛根鞘と結合織毛包(図 30J))。

3. 3. 6 毛包周囲の弾性線維分布

第1章に示した通り、微細なoxytalan fiberは真皮上層に、真皮乳頭に向かって垂直に分布し、やや太いelaunin fiberは真皮中層に水平に分布していた。毛包周囲では、微細な弾性線維が毛包を取り囲むように、皮膚の他の部位より

密度高く存在していた(図 31A)。弾性線維は更にNEPと同様、初期成長期には毛包貫入方向に(図 31C)、成長期中期にはbasal plateと毛乳頭の狭部に存在していた(図 31B)。同様の観察結果がヒトにおいても報告されている[94, 95]。NPLT処理マウス皮膚(図 31E)においては初期成長期毛根の周囲を取り囲む弾性線維が、溶媒処理マウス(図 31D)と比較して蓄積しているように見えた。

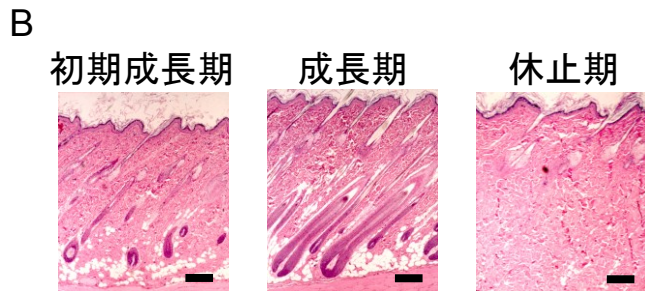
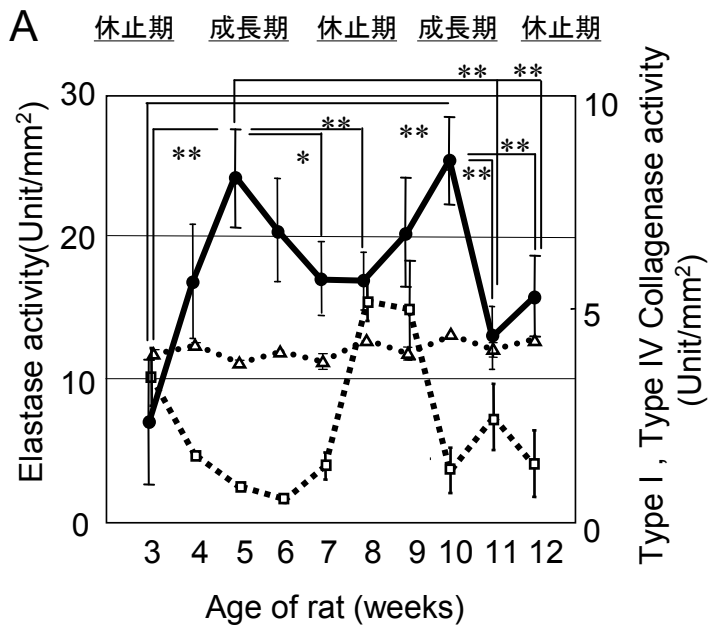


図25 ラット毛周期の各ステージにおけるプロテイナーゼ活性

毛周期の異なるステージにあるSDラット背部皮膚をホモジナイズしタイプ I (Δ)、タイプ IV (\square) コラゲナーゼとエラスターゼ (\bullet) 活性を測定した (A)。結果は5匹の平均 \pm 標準偏差で表した。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ を示す。毛周期の典型的な組織像を B に示した。径 4mm の皮膚試料は酵素活性測定用と同時に採取しホルマリン固定後パラフィン包埋した。切片は HE 染色した。初期成長期 (5 週目)、成長期 (6 週目)、休止期 (8 週目) の像を示す。バーは 0.1mm を示す。

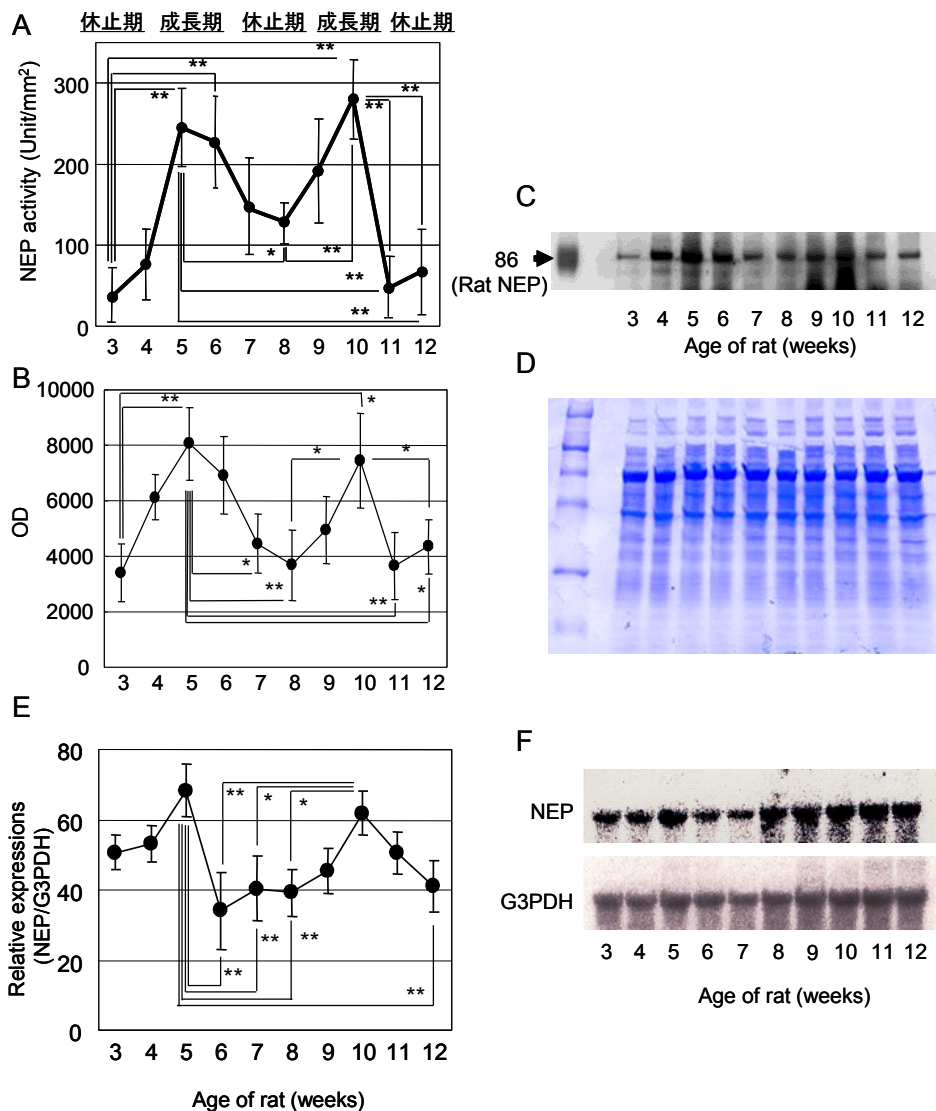


図26 ラット毛周期の各ステージにおけるNEP活性と発現

毛周期の異なるステージにあるSDラット背部皮膚をホモジナイズし、NEP活性を測定した(A)。結果は5匹の平均 ± 標準偏差で表した。同時に採取した皮膚をホモジナイズ後RIPAバッファーで可溶化した。抗NEP抗体で免疫沈降後ウェスタンブロッティングを行い、ECL試薬でバンドを可視化した(C)。化学発光はMolecular Imager Systemで定量化した(B)。ローディングコントロールはCBB染色で示した(D)。ノーザンブロッティングはラットNEP特異的のプロープに³²P-dCTPでラベルし、放射能はBAS2000 bio-image analyzerで計測した(E, F)。*はP<0.05, **はP<0.01を示す。

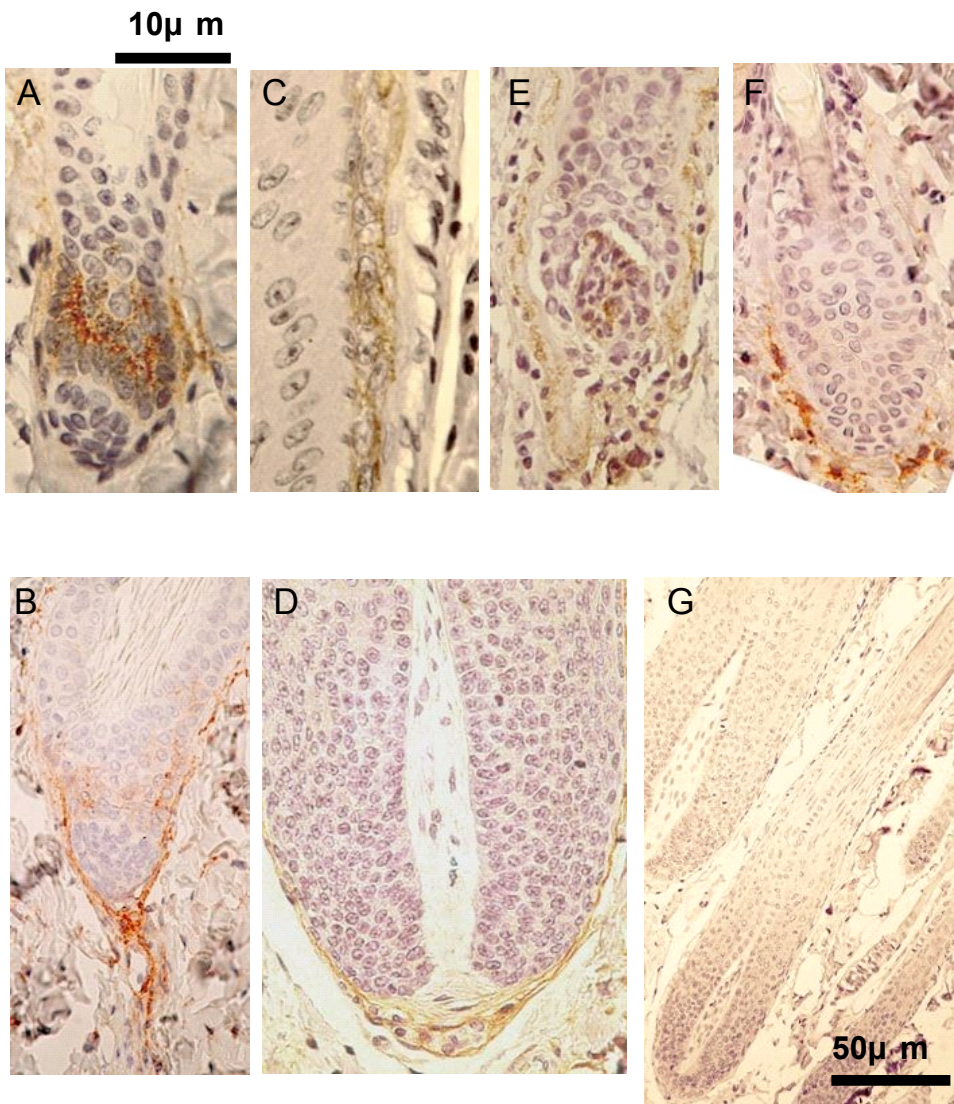


図27 ラット毛周期の各ステージにおけるNEP局在

毛包を含むラット皮膚組織切片は抗NEP抗体を用いて免疫染色を行った。初期成長期毛包では毛包上皮が強いNEP陽性を示した(A)。初期成長期にはさらに真皮の毛包貫入方向にも陽性像が認められた(B)。成長期には内毛根鞘と毛盤にNEP陽性像が現れ(C, D)、退行期には毛乳頭と結合織毛包に(E)、休止期には棍毛を取り囲む結合織毛包に弱い陽性像が認められた(F)。ノーマルIgGで処理したネガティブコントロールは毛周期のいずれのステージ、部位においても特異的な染色は示さなかった(G)。バーは10μm (A-F)、50μm (G)を示す。

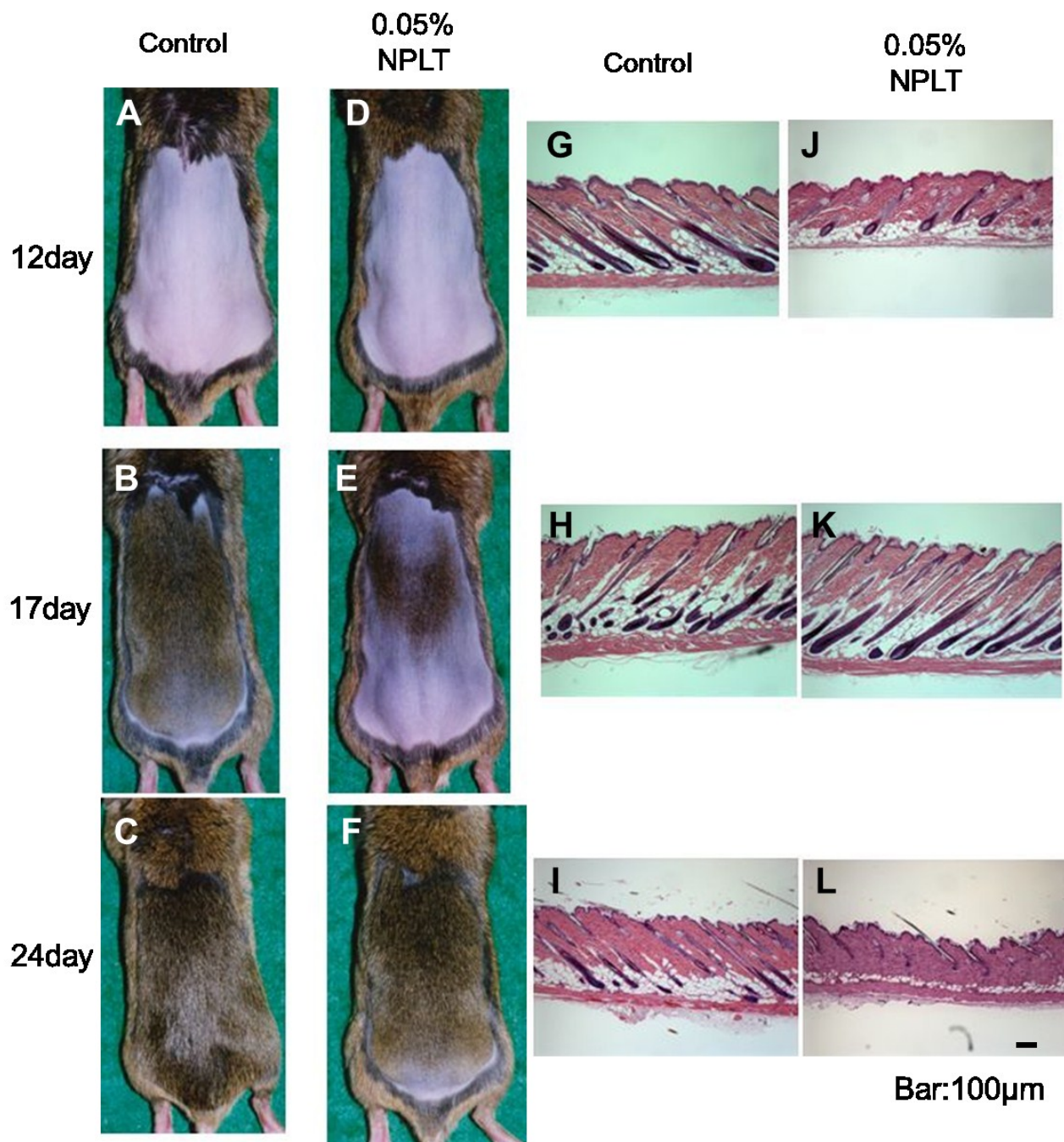


図28 マウス毛再生に対するNEP阻害剤塗布の効果

8週齢のC3Hマウスを除毛後NPLTか溶媒(80%エタノール)を1日2回塗布した。背部皮膚の典型的な写真をA-Fに、HE染色皮膚組織をG-Lに示した。

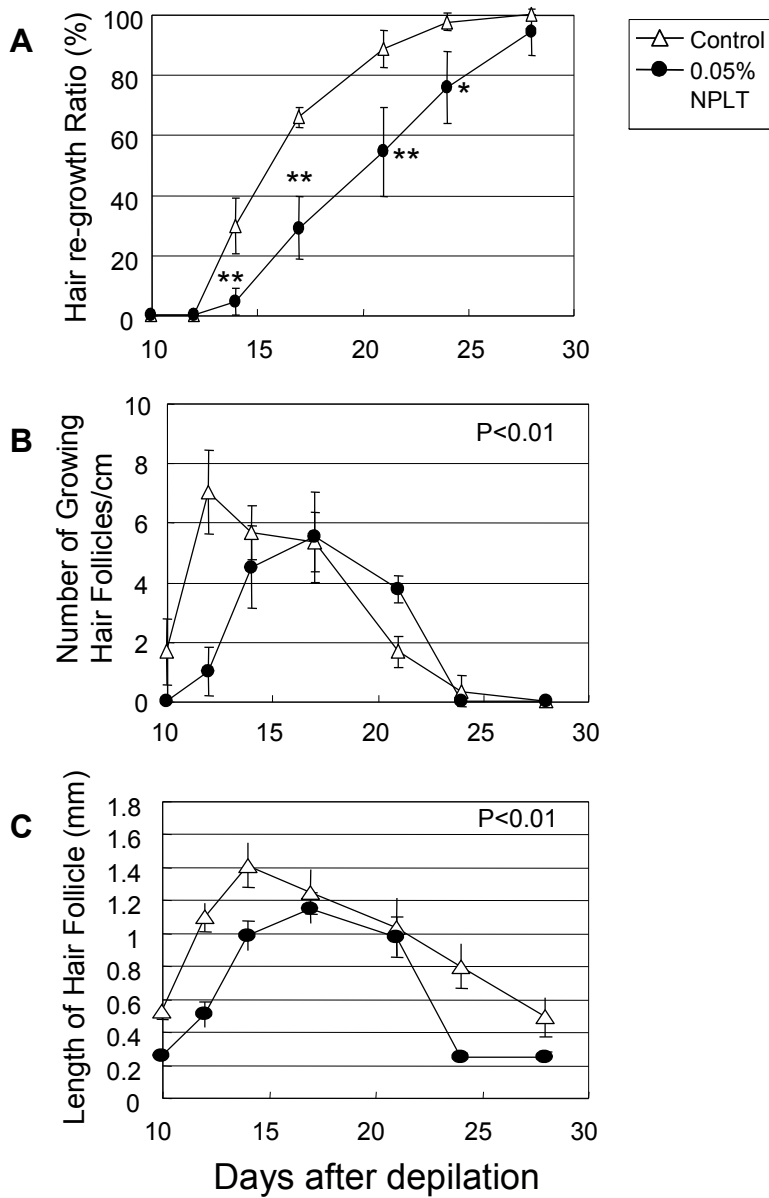


図29 マウス背部毛再生の画像解析

8週齢のC3Hマウスを除毛後NPLTか溶媒(80%エタノール)を1日2回塗布した。毛再生率は除毛後10, 12, 14, 17, 21, 24, 28日後に画像解析により測定した(A)。成長中の毛包(Anagen III-Anagen IV)はHE染色組織上で、形態学的ガイドラインに従って分類し、顕微鏡下で計数した(B)。毛包長はImage Jを用いて画像解析を行った(C)。結果は1群5匹の平均値 ± 標準偏差で表した。統計的な有意差検定はstudent's t-testにより行った。*はP<0.05, **はP<0.01を示す。

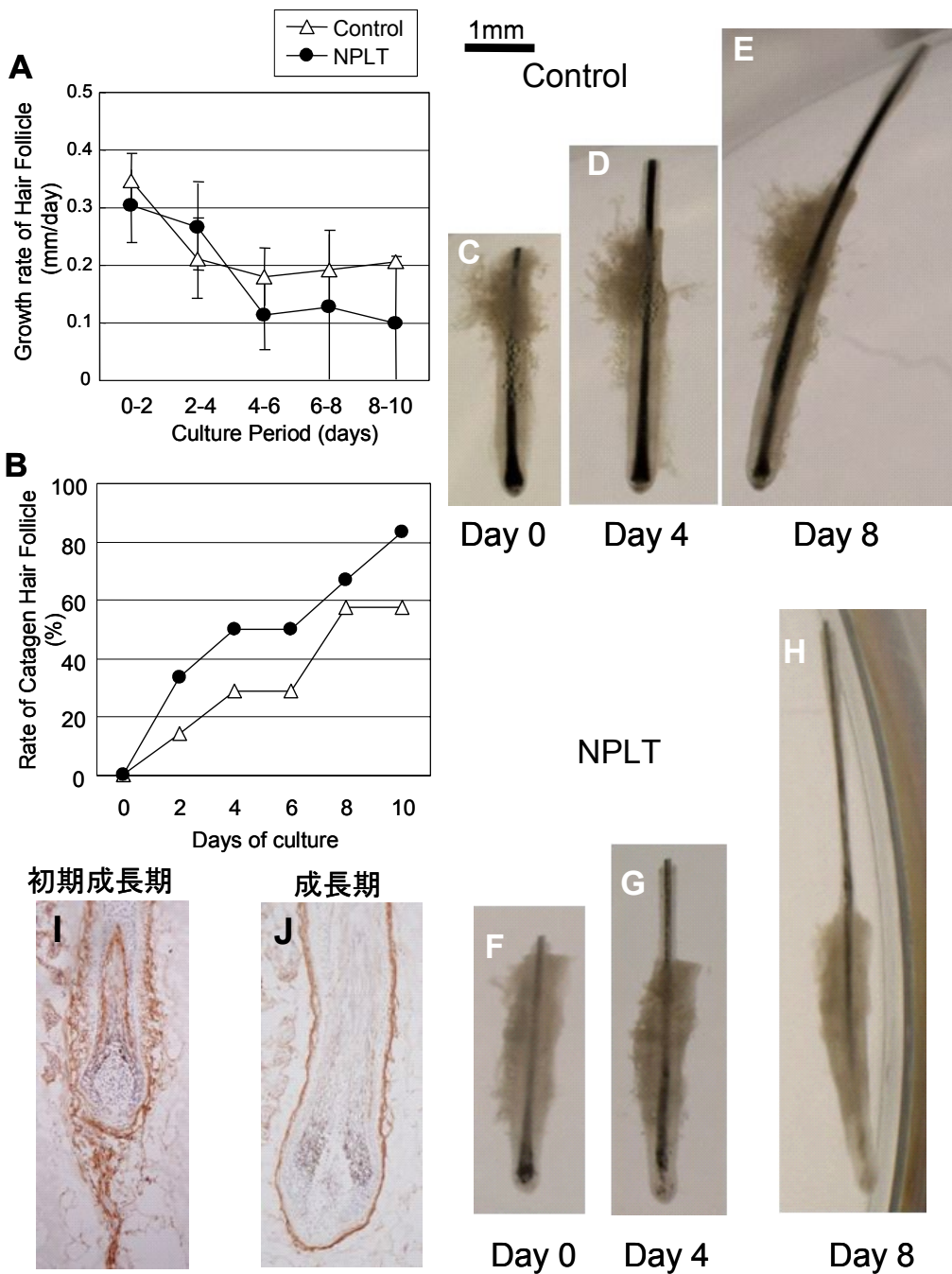


図30 ヒト頭皮毛包器官培養におけるNEP阻害剤の効果

ヒト毛包は後頭部頭皮から単離し、10日間培養した。毛包長はImage Jを用いて画像解析し、1日あたりの成長速度を計算した(A)。結果は6本の平均±SEで示した。成長期の毛包の形が退行期様に変化(毛乳頭が毛包上皮から分離)したらその毛包は毛包長の測定からは除き、退行期毛数として計数した(B)。典型的な培養毛包像をC-Hに示した。抗NEP抗体による免疫染色(I, J)はラットと同様の陽性像を示した。

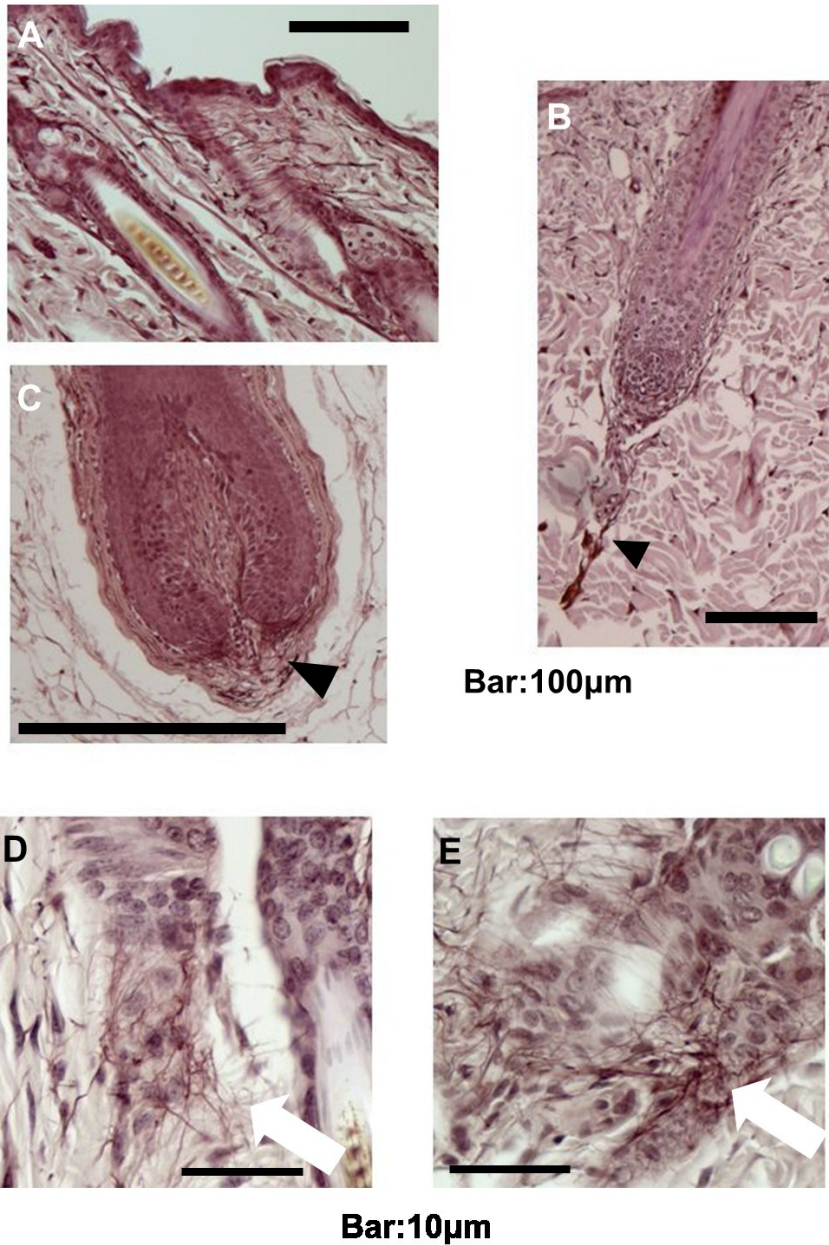


図31 ラットおよびマウス皮膚中の毛包周囲の弾性線維分布

オルセイン染色によりエラスチンは茶褐色に染色される。毛包周囲に微細な弾性線維が、他の部位より密度高く存在する(A)。弾性線維はさらに、初期成長期には毛包伸長方向(B)に、成長期にはbasal plateや毛乳頭狭部(C)にも存在し、ラットのNEP局在部位とも一致する。NPLT塗布マウス(E)皮膚中では、溶媒塗布マウス(D)と比較して、初期成長期毛球周囲を取り囲む弾性線維が蓄積しているように見える。
 Bar: 100µm (A, B, C), 10µm (D, E)

3. 4 考察

毛周期は周期的な組織再構築過程であり、多くの因子、例えば増殖因子、サイトカイン、ホルモン、接着因子[96]、そして関連酵素が関与する複雑な過程であるとみなされる。本研究において、複数の基質を持つ酵素、NEPの発現と活性が毛周期と連動して変動することを示した。更に、NEPの阻害剤が毛周期の開始を遅らせ、成長期の終了を早めることも示した。これらのことから、NEPが毛周期調節において何らかの役割を果たしている可能性が強く示唆された。NEPは多くの神経ペプチドや成長因子など、複数の基質を分解することが知られているので、それらの基質のうちのあるものが毛周期を調節している可能性はある。NEPの基質は毛周期を負に調節するか、成長期の開始スイッチを不活性化すると考えられる。例えば、NEPの基質となる神経ペプチドの一つであるgalaninが毛周期の阻害剤であるという興味深い報告が最近公開された[97]。別の例としては、Toyodaらが、強力な炎症性神経ペプチドであるサブスタンスP(SP)は、頭皮に突発的な脱毛斑をもたらす皮膚病、円形脱毛症(AA)において発現が上昇していること、そしてSPを分解できるNEPもまた、AAの毛包において増加していることを報告した[89]。彼らは、NEPの増加はSP量を減少させ、炎症反応を制限すると仮説を立てている。Arckらはまた、SPはストレスにより誘導される退行期に関与することを示している[98]。これらのデータは、NEPがSPのような退行期を誘導する炎症性の神経ペプチドを分解することにより、退行期誘導を阻害しているという仮説を支持する。

前章ではNEPがエラスチン分解活性を持つことを示した。毛周期は一種の組織再構築の過程であるので、ECMの構成成分の一つであるエラスチンが、毛周期調節に関わっているととしても不思議ではない。実際、組織化学像では毛包周囲には皮膚の他の部位よりも弾性線維が密度高く、毛包を取り囲むように分布していることが示されている[94]。別の研究では“Arao-Perkins body”と呼ばれるエラスチン様構造物が、毛乳頭の狭部に存在し、毛周期のたびに新たに形成され、毛包内に蓄積すると報告されている。男性型脱毛において

はエラスチン様構造物がつぶれた結合織毛包中に蓄積し、毛包内を梯子のように埋めている[95]。これは新しい毛が深く下に向かって伸びるのを妨げ、前の毛より徐々に短くなっていくのかもしれない。このことは、新しい毛が育つスペースを広げるために、エラスチンの分解が必要である可能性を示唆する。

Divano らはコラーゲンとエラスチンのレベルが毛周期と連動して変動することを示している[99]。彼らは、コラーゲンは成長期の間一定レベルを保っているが、エラスチン量は成長期を通じて徐々に増加し、休止期に低下すると報告している。これらのデータは ECM 成分を分解するコラゲナーゼやエラスターゼの活性に関する本研究の発見で説明できるかもしれない。彼らはまた、毛包が下に伸長するとき周囲の ECM を押し広げ、その再調整のためや、毛包伸長を停止させるために ECM 量が増加する可能性を示唆している。本研究では NEP の局在が毛周期のステージによって変わることを見出した。これらの結果は以前の報告とも一致する[87, 88]。NEP の局在が増加することも NEP が毛周期調節に何らかの働きをしている可能性を示唆する。

NEP は CD10, CALLA としても知られ、多くの非血液腫瘍において陽性であるという[100]。NEP は胃がんや大腸腫瘍の肝臓への転移[9]において何らかの役割を果たしていることが報告されている。腫瘍の転移において、ECM の分解が重要なステップであることは良く知られている。腫瘍細胞の標的組織への侵潤と、新生毛包の皮膚中への伸展は組織への貫入のために細胞外マトリックスを分解する必要がある、という点では類似しているのかもしれない。

本研究においては 3 種の動物種を用いている。酵素活性とタンパク質と遺伝子発現にはラットを、阻害剤実験にはマウスを、器官培養にはヒト毛包を用いた。これには 2 つの理由がある。一つ目は利便性である。ラット皮膚は NEP 活性、エラスターゼ活性、タンパク質発現、遺伝子発現を同時に測定するために十分な大きさがある。一方マウスの皮膚は小さいので投与する阻害剤の量が少なくすむし、毛再生を評価するための簡便で確立された方法が

ある。ヒト頭皮からは毛周期の様々なステージの毛包を得ることは難しいが、成長期の毛包を単離して培養しやすい。2 つ目の理由は、毛周期調節における NEP の役割が種特異的な現象ではないことを示すためである。ヒトにおいて以前報告された毛包周囲の NEP やエラスチンの分布は、本報告におけるラットやマウスのデータと類似している。基質であるエラスチンが毛包周囲に豊富に存在することは、初期成長期から成長期にかけて毛包上皮細胞や結合組織毛包で発現が高まっている NEP の基質の一つはエラスチンであることを示唆する。本研究の結果から、NEP が毛周期と連動して変動し、その毛周期調節における役割はエラスチン分解を介し、種を超えて普遍的に起こっていると推察した。退行期に毛乳頭に現れる NEP の役割はいまだ明確ではないが、成長期には上皮細胞に取り囲まれている毛乳頭が退行期には上皮細胞から離れ、毛包外の多くの生理活性因子にさらされることから、NEP の役割の一つの可能性としては、毛乳頭をこのような生理活性因子、例えば SP などから、酵素的分解によって保護している可能性が考えられる。毛周期全体を通しての NEP の役割については更なる研究が必要である。

本研究のデータは、NEP が毛周期の調節に少なからず重要な役割を果たしていることを示唆する。この発見は例えばむだ毛成長に対する処理法を開発する、というような、毛成長コントロール治療法に応用できる可能性があると考えられる。

3. 5 まとめ

ほとんどの哺乳類において、一つ一つの毛包は、毛周期と呼ばれる成長、退縮、休止の周期的なサイクルを営んでいる（それぞれ、成長期、退行期、休止期）。多くの生理活性因子が毛周期と連動、もしくは調節することが報告されている。皮膚組織を構成する主な成分である細胞外マトリックスと関連する因子のうちのあるものも毛周期を調節すると考えられている。本研究においては、皮膚の弾力性に関与するエラスチンを分解する酵素に注目した。前章において真皮線維芽細胞エラスターゼ活性本体を *neprilysin* (NEP) と同定したので、ラット毛周期における NEP 酵素活性やその発現の変動を解析した。皮膚中の NEP 活性は初期成長期に上昇し、退行期、休止期にかけて低下し、活性本体である NEP のタンパク質及び遺伝子の発現も活性と同様の周期的な変動を示した。また、免疫染色で見ると、NEP の発現部位は、初期成長期には毛包上皮、退行期には毛乳頭にという具合に毛周期を通じて変動することが認められた。NEP が毛周期の調節に重要な役割を果たしているかどうか検証するために NEP の特異的阻害剤(NPLT)を用いた。NPLT を除毛した C3H マウス背部皮膚に毎日塗布すると、発毛の遅延と休止期の誘導が観察された。これらのデータは NEP が初期成長期毛包上皮内での発現と活性上昇により毛周期調節に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

総 括

皮膚は個体と外界を隔てる界面を形成しており、形態を保つ強度と共に、自らの動きや外力に対応できるための弾力を兼ね備えている必要がある。真皮の大部分を占める膠原線維が皮膚の構造・強度維持に重要な役割を果たしているのに対して、割合としては数%と非常に少ない弾性線維は微細な線維構造を網目のように張り巡らせることにより、皮膚に弾力性を付与している。これら、細胞外マトリックス（ECM）の代謝には真皮線維芽細胞が重要な働きをしており、合成と分解を調節することにより、皮膚の恒常性を保っている。この調節機能が老化や紫外線によって衰えるに従って、皮膚のシワやたるみ、衝撃抵抗性の低下などが引き起こされ、美容や QOL の面で大きな問題となっている。例えば、老化により恒常性維持機能が低下する例としては、真皮線維芽細胞によるコラーゲンやプロテオグリカンの産生低下が知られており、これらの容積が減ることにより皮膚は薄くなっていく。さらにコラーゲンに関しては、老化に伴い線維間の架橋が進み、不溶化していくことにより古くなっても分解・更新されず、結果として皮膚は柔軟性と膨潤性を失い、固く干からびたようになっていく。エラスチンに関しては、老化により産生が低下することは他の ECM と同様だが、強い紫外線を長期間受けた皮膚では炎症性細胞のエラスターゼにより分解・変性されたエラスチンが蓄積する *Soler elastosis*[101]という現象がある一方、非露光部では老化に伴い、微細弾性線維が分解されてエラスチン量が減少する[28]、といった一見逆に見えるような現象が認められるが、いずれにしても正常な機能を持ったエラスチンは減少するため、皮膚の弾力性は低下し、シワやたるみが形成される。弾性線維の主成分であるエラスチンを分解する酵素はエラスターゼと呼ばれるが、この名称は1種類の酵素本体を指すわけではなく、酵素番号も活性中心の種類も異なる複数の酵素の総称となっている。炎症時などに組織に浸潤してくる免疫系の細胞は目的地に到達するために組織の ECM を分解して通り道を拡げる必要があるため、強力で特異性の低いエラスターゼを持ち組

織へ与える傷害の度合いも大きいと考えられるが、本研究においてはそのような病的な状態とは異なる、平常時におけるエラスチン代謝に着目した。第1章の最初に示したように、動物皮膚に紅斑が出ない程度の低エネルギーの紫外線を照射した場合、好中球などの炎症性細胞が浸潤しなくても、すなわち好中球エラスターゼの発現がなくてもエラスターゼ活性は経時的に上昇しシワは形成されることから、真皮組織自体の中にエラスチン分解活性が存在し、日常生活レベルの紫外線によるシワ形成などの皮膚形態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。真皮線維芽細胞自身もエラスターゼ活性を持つことが報告されていたので、本研究ではこの、「真皮線維芽細胞の持つエラスターゼ様活性」に着目した。

第1章では活性本体未知のまま、真皮線維芽細胞の産生するエラスターゼ様酵素の性質を阻害剤プロファイルや活性抽出の過程から検証し、これまでの報告[10-12]通り、メタロプロテアーゼであることが確認できたため、メタロプロテアーゼ阻害剤である **phosphoramidon** の誘導体をマウスの紫外線誘導シワ形成モデルに塗布したところ、シワの形成と弾性線維の減少が抑制されることを確認した。このときの紫外線エネルギーは皮膚に紅斑が生じない程度、すなわちヒトで言えば日常生活時に、紅斑や日焼けの起こらないレベルの日光を長期間浴び続けてシワができる、という状況を再現していると考えられる。そのような状況下で主に活性が上昇しているのは真皮線維芽細胞の産生するエラスターゼで、その阻害剤は日常生活レベルの紫外線によってできるシワを抑制できることを示している。このように皮膚の光老化に重要な働きをしていることがわかった真皮線維芽細胞エラスターゼについて、活性本体が同定できれば更なる機能解析や、発現レベルでの調節などに結び付けられると考え、第2章ではその活性本体同定を試みた。阻害特性、分子量や阻害剤プロファイルの類似性から、真皮線維芽細胞エラスターゼと **neprilysin (neutral endopeptidase 24.11 (NEP))** が同一のものであるという仮説をたて、免疫沈降や遺伝子導入の技術を用いて検証した。NEP抗体を用いた免疫沈降実験により、真皮線維芽細胞中のエラスターゼ活性が吸収されたこ

とから、NEP が活性本体である可能性が示唆されたが、NEP 単独でエラスターゼ活性を説明するには証拠が十分ではなかった。そこで元々NEP を持たない COS-1 細胞に NEPcDNA 発現ベクターを組み込むことで、エラスターゼ活性が発現することを証明し、NEP が真皮線維芽細胞エラスターゼの本体であると結論付けることができた。活性本体が解明されたことで、皮膚中でのエラスターゼ/NEP の機能をさらに詳細に検討できるようになった。そこでまずはシワ、たるみなどの皮膚形態に大きく関与する老化について幅広く検証した。第 1 章で着目した光老化に関しては細胞レベルで詳細に検討すると、UVA と UVB で作用が異なり、UVA では真皮線維芽細胞への直接作用、UVB では表皮細胞からの液性因子を介した間接作用であることが明らかとなった。また紫外線の関与しない自然老化においても、細胞レベル・生体レベルのいずれのモデルでもエラスターゼ/NEP が関与していることを、タンパク質発現レベル、遺伝子レベルで初めて示した。これまでに、コラーゲンの架橋増大による不溶化、紫外線による弾性線維の架橋断裂[102]、真皮線維芽細胞の老化による ECM 産生能低下などの受動的な要因で主に説明されてきた皮膚老化が、本研究により、エラスチン分解酵素の産生という真皮線維芽細胞の能動的な機能と関わっている、という皮膚科学的に新しい知見を提供することができた。このように炎症の起こらない場合の光老化、および自然老化、という「皮膚老化」の一端が解明されたことは、今後、炎症を伴う光老化、ECM の病的な代謝異常などの更に複雑な現象を解明するための基盤ともなると考える。

皮膚構造・形態構築に関わる ECM の役割についてさらに詳細に解析するために、次に第 3 章においては、皮膚付属器官の一つである毛包の代謝調節におけるエラスターゼ/NEP の役割について検討した。すなわち、皮膚付属器官である毛包が皮膚中で構造を維持するためには ECM を足場として利用する必要があると考えられる一方、後で述べる毛周期においては毛包組織の構造や大きさが劇的に変動するため、周囲の ECM を押し広げて、毛包の伸びるスペースを作る必要もあると考えられたので、毛包組織と ECM 代謝の間

には密接な相互作用が存在するのではないかと考え、これを検証した。ほとんどの哺乳類において、一つ一つの毛包は毛周期と呼ばれる成長、退縮、休止の周期的なサイクルを営んでいる（それぞれ、成長期、退行期、休止期）。多くの生理活性因子が毛周期と連動、もしくは調節することが報告されている。皮膚組織を構成する主な成分である ECM と関連する因子のうちのいくつかも毛周期を調節すると考えられている。そこでそれらのうちから、皮膚の弾力性に関与するエラスチン分解酵素がどのように関与しているかに着目した。第 2 章において真皮線維芽細胞エラスターゼ活性本体を NEP と同定したので、毛周期における NEP 酵素活性やその発現の変動を解析したところ、毛周期のステージにより活性、タンパク質及び遺伝子の発現量と部位が周期的に大きな変動を示した。NEP が毛周期の調節にも重要な役割を果たしているかどうかは第 1 章同様 NEP の特異的阻害剤 NPLT を用いて、発毛の遅延と退行期の誘導が起こることを確認することができた。毛包周辺にはエラスチン線維が密度高く分布していることはこれまでも報告があり [94]、本研究においても確認できたが、これは毛という器官が外部からの衝撃から体を守る機能や、動物種や部位によっては感覚器としての機能（実際毛包周囲には神経線維の分布も高い）などを持つために、足場としては可動性の高さが必要であるためと考えられる。一方、毛周期の開始時には新生毛が真皮深く伸展するために、毛包周囲のエラスチン線維を分解することが成長期を誘導するためには必要な過程であると思われる。

これらの発見により、エラスターゼ/NEP を制御することは皮膚や毛髪機能を制御することにつながる可能性が考えられた。例えば、エラスターゼ/NEP 阻害剤は紫外線による皮膚弾力性の低下とそれに伴うシワ形成を抑制できると考えられる。また、エラスターゼ/NEP 阻害剤は、体毛や髭の伸長を遅らせ、むだ毛処理、髭剃りなどの頻度を減らす技術などに応用できると考えられる。むだ毛処理、髭剃りは少なからず皮膚にダメージをもたらすものであり [103]、その頻度を減らすことは健康な皮膚を保つことにつながると考えられる。さらに、毛周期は一種の組織再構築の過程と考えられ、再生医療

の観点からも興味深い研究対象であり、また最近ECMの分解はがんの浸潤・転移にも重要な役割を果たしているという知見が増えてきており、ECM代謝調節に関する研究成果は医学分野へも生かせる可能性があると考ええる。

学 位 論 文 要 旨

真皮線維芽細胞由来エラスターゼの本体の同定と皮膚老化および
毛周期における役割

Identification of dermal fibroblast-derived elastase and its role in skin aging and
hair cycle

森崎 尚子

(Morisaki Naoko)

皮膚線維芽細胞は真皮を構成する主要な細胞であり、皮膚の構造や物性に影響を及ぼす細胞外マトリックス(ECM)の生成、代謝、維持に関与している。真皮を構成する主な ECM としては、組織の構造維持に重要な役割を果たしている膠原線維や弾力性に影響を与える弾性線維などがあり、紫外線暴露や老化によるその劣化が皮膚の弾力低下やシワの形成につながるということが知られている。弾性線維の主な構成成分はエラスチンであり、これを分解する酵素はエラスターゼと呼ばれるが、酵素本体は1種類ではなく何種類かの酵素の総称である。エラスターゼという名称で呼ばれる酵素だけでも、セリンプロテアーゼであるすい臓エラスターゼや好中球エラスターゼ、メタロプロテアーゼであるマクロファージ由来のメタロエラスターゼがあり、その他にもある種のマトリックス・メタロプロテアーゼやゼラチナーゼもエラスチンを分解する活性があることが知られていた。しかし皮膚でのエラスチン分解を主につかさどる酵素の本体については解明されていなかった。皮膚の線維芽細胞自体がエラスターゼ活性を持つことが報告されていたので、本研究ではその活性本体を明らかにし、皮膚での機能について検証することを目的とした。

はじめに活性本体未知のまま皮膚線維芽細胞の産生するエラスターゼ様酵素の性質を調べた。阻害剤プロファイルからはメタロプロテアーゼであることが、活性抽出の過程からは膜結合型の酵素であることが明らかとなった。ヘアレスマウスの皮膚に紫外線を照射するとヒトの皮膚同様にシワが形成されることが知られているため、このときのエラスターゼ活性の変化を調べたところ、紫外線照射により経時的にシワ形成と連動するように活性が上昇していた。そこで、

この酵素活性を抑制すると紫外線によるシワ形成に影響を及ぼすかどうか検討した。典型的なメタロプロテアーゼ阻害剤である **phosphoramidon** を、皮膚への浸透性を上げるよう誘導体化してマウス皮膚に塗布したところ、紫外線照射によるシワ形成が抑制され、真皮組織内での弾性線維分解も抑制されていることを確認した。

線維芽細胞由来エラスターゼ活性が紫外線誘導シワ形成に重要な役割を果たしていると考えられたので、次に酵素本体の同定を試みた。分子量や至適 pH、活性中心などの類似性から **neprilysin(NEP)** を候補酵素と考え、中和抗体による免疫沈降試験を行った。その結果、抗 NEP 抗体により線維芽細胞のエラスターゼ活性が阻害され、更に NEP を持たない COS-1 細胞に NEP 遺伝子を導入すると NEP 活性と共にエラスターゼ活性が発現することから線維芽細胞由来エラスターゼの活性本体は NEP であると結論付けた。実際に細胞の継代老化、マウスの自然老化、細胞の光老化時にもエラスターゼ/NEP 活性が上昇しており、真皮の自然老化・光老化における弾力性低下に NEP の持つエラスターゼ活性が重要な役割を果たしていると考えられた。

更に毛周期におけるエラスターゼ/NEP の役割についても検討した。毛周期とは、毛が成長、退行、休止を経て新しい毛が生え変わる自然なサイクルのことで、その調節には多くの生体因子が関わると言われている。毛周期に伴い毛包の形や大きさは劇的に変化するので、毛包を構成する上皮系、間葉系の細胞、毛包を取り囲む ECM も大きく変動することになり、一種の組織再構築の過程と考えられる。そこで ECM 代謝酵素類の毛周期における変動を調べたところ、エラスターゼ/NEP 活性は初期成長期に活性上昇し、退行期から休止期にかけて活性低下する変動を示した。NEP タンパク質、遺伝子発現も同様の変動を示し、免疫組織染色からは、毛周期のステージにより、NEP の発現部位も変動することが観察された。これらのことから、NEP が毛周期調節に何らかの役割を果たしている可能性が示唆されたので、NEP 阻害剤を除毛したマウス背部皮膚に塗布したところ、毛再生の遅延、および退行期の促進が認められた。このことから NEP は毛再生と成長期維持に作用しており、その抑制により発毛を遅らせ、成長期を短縮することができることが明らかとなった。

以上本研究により、真皮線維芽細胞が産生するエラスターゼの活性本体は、細胞膜結合型のメタロプロテアーゼである **neprilysin** であることが解明された。この酵素の皮膚における機能を明らかにするために、皮膚老化ならびに毛周期における影響を検討したところ(1)皮膚の紫外線照射により真皮線維芽細胞での発現が誘導され、弾性線維のエラスチンを分解することにより光老化によるシワ形成に関与すること、(2)毛周期のステージに連動して発現量と部位が変動することにより、毛包再生と成長期維持に関与していることが示された。本研究の成果は、真皮線維芽細胞由来エラスターゼが皮膚の老化や毛包組織の再構成、機能維持に重要な役割を果たしているという皮膚科学研究の新知見を提供するものであり、紫外線に起因する皮膚障害の治療や、育毛、体毛のむだ毛処理など美容医療分野への展開が期待される。

謝 辞

本研究を進めるにあたって、終始適切なお指導、ご助言を賜りました東京農工大学農学部・西山敏夫教授に厚く御礼申し上げます。また、本論文の審査員を快く引き受けていただき、有益なるご助言を賜りました茨城大学農学部高原英成教授に深謝申し上げます。

研究基盤を形成する上でお世話になった中部大学芋川玄爾教授、花王株式会社生物科学研究所第2研究室室長森脇繁氏をはじめ花王株式会社研究開発部門研究員の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたって、何年にも渡り励まし続けて下さった、東京農工大学農学部・矢ヶ崎一三教授に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M, Imokawa G, Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin., *Br J Dermatol*, 131, 641-648, 1994
2. Takema Y, Tsukahara K, Fujimura T, Hattori M, Age-related changed in the three-dimensional morphological structure of human facial skin., *Skin Res Technol*, 3, 95-100, 1997
3. Imayama S, Nakamura K, Takeuchi M, Hori Y, Takema Y, Sakaino Y, Imokawa G, Ultraviolet-B irradiation deforms the configuration of elastic fibers during the induction of actinic elastosis in rats., *J Dermatol Sci*, 7, 32-38, 1994
4. Imokawa G, Takema Y, Yorimoto Y, Tsukahara K, Kawai M, Imayama S, Degree of ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent., *J Invest Dermatol*, 105, 254-258, 1995
5. Fornieri C, Quaglino D, Lungarella G, Cavarra E, Tiozzo R, Giro MG, Canciani M, Davidson JM, Ronchetti IP, Elastin production and degradation in cutis laxa acquisita., *J Invest Dermatol*, 103, 583-588, 1994
6. Fimiani M, Mazzatenta C, Alessandrini C, Paola M, Paola C, Andreassi L, Mid-dermal elastolysis: an ultrastructural and biochemical study., *Arch Dermatol Res*, 287, 152-157, 1995
7. Uitto J, Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases., *J Invest Dermatol*, 72, 1-10, 1979
8. Huang WB, Zhou XJ, Chen JY, Zhang LH, Meng K, Ma HH, Lu ZF, CD10-positive stromal cells in gastric carcinoma: correlation with invasion and metastasis., *Jpn J Clin Oncol*, 35, 245-250, 2005
9. Fujita S, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y, Taniguchi H, Shimoda T, Quantification of CD10 mRNA in colorectal cancer and relationship between mRNA expression and liver metastasis., *Anticancer Res*, 27, 3307-3312, 2007

10. Szendroi M, Meimon G, Bakala H, Frances C, Robert L, Godeau G, Hornebeck W, On the presence of a metalloprotease in human skin fibroblasts that degrades the human skin elastic fiber system., *J Invest Dermatol*, 83, 224-229, 1984
11. Homsy R, Pelletier-Lebon P, Tixier JM, Godeau G, Robert L, Hornebeck W, Characterization of human skin fibroblasts elastase activity., *J Invest Dermatol*, 91, 472-477, 1988
12. Godeau G, Hornebeck W, Morphometric analysis of the degradation of human skin elastic fibres by human leukocyte elastase (EC 3-4-21-37) and human skin fibroblast elastase (EC 3-4-24)., *Pathol Biol (Paris)*, 36, 1133-1138, 1988
13. Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus RA, Comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages., *J Invest Dermatol*, 117, 3-15, 2001
14. Takema Y, Imokawa G, The effects of UVA and UVB irradiation on the viscoelastic properties of hairless mouse skin in vivo., *Dermatology*, 196, 397-400, 1998
15. Habig J, Vocks E, Kautzky F, Dahm M, Borelli S, Effect of single UVA and UVB irradiation on the surface composition and viscoelastic properties of skin in vivo., *Hautarzt*, 47, 515-520, 1996
16. Hornebeck W, Soleilhac JM, Tixier JM, Moczar E, Robert L, Inhibition by elastase inhibitors of the formyl Met Leu Phe-induced chemotaxis of rat polymorphonuclear leukocytes., *Cell Biochem Funct*, 5, 113-122, 1987
17. Bonnaure-Mallet M, Godeau G, Tixier JM, Lebon-Pelletier P, Chambon Y, Robert L, Hornebeck W, Elastin derived peptides protect elastic fibres degradation by human neutrophil elastase: in vitro and in vivo studies using a mechanically induced rat gingival inflammatory model., *J Periodontal Res*, 30, 58-65, 1995

18. Wiedow O, Wiese F, Christophers E, Lesional elastase activity in psoriasis. Diagnostic and prognostic significance., *Arch Dermatol Res*, 287, 632-635, 1995
19. Learn DB, Moloney SJ, Numbers of murine dermal mast cells remain unchanged during chronic ultraviolet B irradiation., *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 8, 195-199, 1991
20. Nakagawa K, Tsuji T, Kadoya A, Hamada T, Elastase-like enzyme activity in cultured human fibroblast., *Skin Res*, 29, 793-797, 1987
21. Thorsett ED, Harris EE, Peterson ER, Greenlee WJ, Patchett AA, Ulm EH, Vassil TC, Phosphorus-containing inhibitors of angiotensin-converting enzyme., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 2176-2180, 1982
22. Krien PM, Moyal D, Sunscreens with broad-spectrum absorption decrease the trans to cis photoisomerization of urocanic acid in the human stratum corneum after multiple UV light exposures., *Photochem Photobiol*, 60, 280-287, 1994
23. Bissett DL, Hannon DP, Orr TV, An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin., *Photochem Photobiol*, 46, 367-378, 1987
24. Roman N, Perkins SF, Perkins EM Jr, Dolnick EH, Orcein-hematoxylin in iodized ferric chloride as a stain for elastic fibers, with metanil yellow counterstaining., *Stain Technol*, 42, 199-202, 1967
25. Kligman LH, Sayre RM, An action spectrum for ultraviolet induced elastosis in hairless mice: quantification of elastosis by image analysis., *Photochem Photobiol*, 53, 237-242, 1991
26. Moloney SJ, Edmonds SH, Giddens LD, Learn DB, The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles., *Photochem Photobiol*, 56, 505-511, 1992
27. Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo F, Bittencourt-Sampaio S, Oxytalan, elaunin,

- and elastic fibers in the human skin., *J Invest Dermatol*, 66, 143-148, 1976
28. Bouissou H, Pieraggi MT, Julian M, Savit T, The elastic tissue of the skin. A comparison of spontaneous and actinic (solar) aging., *Int J Dermatol*, 27, 327-335, 1988
 29. Watson RE, Griffiths CE, Craven NM, Shuttleworth CA, Kielty CM, Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction., *J Invest Dermatol*, 112, 782-787, 1999
 30. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism., *Nature*, 379, 335-339, 1996
 31. Schwartz E, Cruickshank FA, Lebowitz MG, Elastase-like protease and elastolytic activities expressed in cultured dermal fibroblasts derived from lesional skin of patients with pseudoxanthoma elasticum, actinic elastosis, and cutis laxa., *Clinica Chimica Acta*, 176, 219-224, 1988
 32. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG, Human 92- and 72-kilodalton Type IV Collagenases Are Elastases., *J Biol Chem*, 266, 7870-7875, 1991
 33. Shipley JM, Doyle GAR, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM, The Structural Basis for the Elastolytic Activity of the 92-kDa and 72-kDa Gelatinases: Role of the Fibronectin Type II -Like Repeats., *J Biol Chem*, 271, 4335-4341, 1996
 34. Campbell EJ, Campbell MA, Pericellular Proteolysis by Neutrophils in the Presence of Proteinase Inhibitors: Effects of Substrate Opsonization., *J Cell Biol*, 106, 667-676, 1988
 35. Shapiro SD, Griffin GL, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Welgus HG, Senior RM, Ley TJ, Molecular cloning, chromosomal localization, and bacterial expression of a murine macrophage metalloelastase., *J Biol Chem*, 267, 4664-4671, 1992

36. Boudier C, Godeau G, Hornebeck W, Robert L, Bieth JG, The Elastolytic Activity of Cathepsin G: An Ex Vivo Study with Dermal Elastin., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 4, 497-503, 1991
37. Kao RC, Wehner NG, Skubiz DM, Gray BH, Hoidal JR, A Distinct Human Polymorphonuclear Leukocyte Proteinase that Produces Emphyema in Hamsters., *J Clin Invest*, 82, 1963-1973, 1988
38. Casey ML, Smith JW, Nagai K, Hersh LB, MacDonald PC, Progesterone-regulated Cyclic Modulation of Membrane Metalloendopeptidase (Enkephalinase) in Human Endometrium., *J Biol Chem*, 266, 23041-23047, 1991
39. Cohen AJ, Bunn PA, Franklin W, Magill-Solc C, Hartmann C, Helfrich B, Gilman L, Folkvord J, Helm K, Miller YE, Neutral Endopeptidase: Variable Expression in Human Lung, Inactivation in Lung Cancer, and Modulation of Peptide-induced Calcium Flux., *Cancer Res*, 56, 831-839, 1996
40. Lorkowski G, Jos E, Zuderhand-Bleekenolen, Erdos EG, Figura KV, Hasilik A, Neutral endopeptidase-24.11(enkephalinase), *Biochem J*, 248, 345-350, 1987
41. Beranger JY, Godeau G, Frances C, Robert L, Hornebeck W, Presence Of Gelatinase A and Metalloelastase Type Protase at the Plasma Membrane of Hman Skin Fibroblasts Influence of Cytokines and Growth Factors on Cell-Associated Metalloendopeptidase Levels., *Cell Biol Int*, 18, 715-722, 1994
42. Keer MA, Kenny AJ, The Purification and Specificity of a Neutral Endopeptidase from Rabbit Kidney Brush Border., *Biochem J*, 137, 477-488, 1974
43. Oka T, Hiranuma T, Liu XF, Ohgiya N, Iwao K, Matsumiya T, [Enkephalin-inactivating enzymes][Article in Japanese.], *Nippon Yakurigaku Zassi*, 101, 197-207, 1993
44. Saria A, Hauser KF, Trauring HH, Turbek CS, Harsh L, Gerard C,

- Opioid-related changes in nociceptive threshold and in tissue levels of enkephalins after target disruption of the gene for neutral endopeptidase(EC 3.4.24.11) in mice., *Neurosci Lett*, 234, 27-30, 1997
45. Solan NJ, Ward PE, Sanders SP, Towns MC, Bathon JM, Soluble recombinant neutral endopeptidase(CD10) as a potential antiinflammatory agent., *Inflammation*, 22, 107-121, 1998
46. Aguayo SAM, Schuyler WE, Murtagh JJJr., Roman J, Regulation of lung branching morphogenesis by bombesin-like peptides and neutral endopeptidase., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10, 635-642, 1994
47. Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moonaw C, Hersh LB, The Hydrolysis of Endothelins by Neutral Endopeptidase 24.11(Enkephalinase)., *J Biol Chem*, 265, 14150-14155, 1990
48. Graf K, Schaper C, Grafe M, Fleck E, Kunkel G, Glucocorticoids and protein kinase C regulate neutral endopeptidase 24.11 in human vascular smooth muscle cells., *Basic Res Cardiol*, 93, 11-17, 1998
49. Roques BP, Nobel F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Beaumont A, Neutral Endopeptidase 24.11: Structure, Inhibition, and Experimental and Clinical Pharmacology., *Pharmacol Rev*, 45, 87-146, 1993
50. Krämer HH, Schmidt K, Leis S, Schmelz M, Sommer C, Birklein F, Inhibition of neutral endopeptidase(NEP) facilitates neurogenic inflammation., *Exp Neurol*, 195, 179-184, 2005
51. Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Soroca E, Lecomte JM, Malfroy B, Llorens C, Schwartz J-C, The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice., *Nature*, 288, 286-288, 1980
52. Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JBL, Onizuka RJ, Quack EJ, Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen is Identical to Neutral Endopeptidase., *J Exp Med*, 198, 1247-1253, 1988
53. Mari B, Guerin S, Maulon L, Belhacene N, Far DF, Imbert V, Rossi B, Peyron

- JF, Auberger P, Endopeptidase 24.11(CD10/NEP) is required for phorbol ester-induced growth arrest in Jurkat T cells., *FASEB J*, 11, 869-879, 1997
54. Stefano GB, Paemen LR, Hughes TK Jr., Autoimmunoregulation: differential modulation of CD10/neutral endopeptidase 24.11 by tumor necrosis factor and neuropeptides., *J Neurochem*, 41, 9-14, 1992
55. De Lombaert S, Erion MD, Tan J, Blanchard L el-Chehabi L, Ghai RD, Sakane Y, Berry C, Trapani AJ, N-Phosphonomethyl dipeptides and their phosphonate prodrugs, a new generation of neutral endopeptidase(NEP, EC 3.4.24.11) inhibitors., *J Med Chem*, 37, 498-511, 1994
56. Suda H, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H, A Thermolysin Inhibitor Produced by Actinomycetes: Phosphoramidon., *J Antibiotics*, 26, 621-623, 1973
57. Oefner C, D'Arcy A, Hennin M, Winkler FK, Dale GE, Structure of Human Neutral Endopeptidase(Neprilysin)Complexed with Phosphoramidon., *J Mol Biol*, 296, 341-349, 2000
58. Constam DB, Togbler AR, Rensing-Ehl A, Kenler I, Hersh LB, Fontana A, Puromycin-sensitive Aminopeptidase: Sequence Analysis, Expression, and Functional Characterization., *J Biol Chem*, 270, 26930-26939, 1995
59. Sonenberg N, eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research., *Biochem Cell Biol*, 86, 178-183, 2008
60. Labat-Robert J, Kern P, Robert L, Biomarkers of Connective Tissue Aging: Biosynthesis of Fibronectin, Collagen Type III, and Elastase., *Ann NY Acad Sci*, 673, 16-22, 1992
61. Kletsas D, Caselgrandi E, Barbieri D, Stathakos D, Franceschi C, Ottaviani E, Neutral endopeptidase-24.11 (NEP) activity in human fibroblasts during development and ageing., *Mech Ageing Dev*, 102, 15-23, 1998
62. Solmi R, Tietz C, Zucchini C, Gualandi G, Pugnali A, Talassi O, Castaldini C, Simonelli L, Biagini G, In vitro study of gingival fibroblasts from normal and inflamed tissue: age-related responsiveness., *Mech Ageing Dev*, 92, 31-41,

1996

63. Bologna JL, Aging skin, *Am J Med*, 98, 99S-103S, 1995
64. McKenzie RC, Park ES, Brown WR, Shivji GS, Sauder DN, Effect of ultraviolet-inducible cytokines on melanoma growth in vivo: stimulation of melanoma growth by interleukin-1 and -6., *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, 10, 74-79, 1994
65. Nozaki S, Abrams JS, Pearce MK, Sauder DN, Augmentation of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression by ultraviolet irradiation is mediated by interleukin 1 in Pam 212 keratinocytes., *J Invest Dermatol*, 97, 10-14, 1991
66. Kondepudi A, Johnson A, Cytokines Increase Neutral Endopeptidase Activity in Lung Fibroblasts., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 8, 43-49, 1993
67. Nadel JA, Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation., *Eur Respir J*, 4, 745-754, 1991
68. Misery L, Neuro-immuno-cutaneous system (NICS), *Pathol Biol*, 44, 867-874, 1996
69. Toyoda M, Nakamura M, Nakada K, Nakagawa H, Morohashi M, Characteristic alterations of cutaneous neurogenic factors in photoaged skin., *Br J Dermatol*, 153, Suppl 2, 13-22, 2005
70. Yamazaki M, Tsuboi R, Lee YR, Ishidoh K, Mitsui S, Ogawa H, Hair cycle-dependent expression of hepatocyte growth factor (HGF) activator, other proteinases, and proteinase inhibitors correlates with the expression of HGF in rat hair follicles. , *J Investig Dermatol Symp Proc*, 4, 312-315, 1999
71. Panteleyev AA, Christiano AM, O'Brien TG, Sundberg JP. Ornithine decarboxylase transgenic mice as a model for human atrichia with papular lesions., *Exp Dermatol*, 9, 146-151, 2000
72. Kawabe TT, Kubicek MF, Johnson GA, Buhl AE, Use of gamma-glutamyl transpeptidase activity as a marker of hair cycle and anagen induction in

- mouse hair follicles., *J Invest Dermatol*, 103, 122-126, 1994
73. Handjiski BK, Eichmüller S, Hofmann U, Czarnetzki BM, Paus R, Alkaline phosphatase activity and localization during the murine hair cycle., *Br J Dermatol*, 131, 303-310, 1994
74. Crovato F, Bertamino R, Moretti G, Cutaneous hydroxysteroid dehydrogenases and rat-hair cycle., *Arch Dermatol Forsch*, 251, 325-328, 1975
75. Cipriani C, Moretti G, Rampini E, Divano C, Adenyl-cyclase activity in rat-hair-cycle., *Arch Dermatol Res*, 256, 319-325, 1976
76. Manil L, Van Cantfort J, Lapière CM, Gielen JE, Significant variation in mouse-skin aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility as a function of the hair growth cycle., *Br J Cancer*, 43, 210-221, 1981
77. Sawaya ME, Penneys NS, Immunohistochemical distribution of aromatase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human hair follicle and sebaceous gland., *J Cutan Pathol*, 19, 309-314, 1992
78. Wollina U, Paus R, Feldrappe S, Sequential expression of glutathione-S-transferase isoenzymes during hair growth phases in mice and their relationship to caldesmon, phosphotyrosinase and VIP receptor protein., *Histol Histopathol*, 10, 39-45, 1995
79. Yu DW, Yang T, Sonoda T, Gaffney K, Jensen PJ, Dooley T, Ledbetter S, Freedberg IM, Lavker R, Sun TT, Message of nexin 1, a serine protease inhibitor, is accumulated in the follicular papilla during anagen of the hair cycle., *J Cell Sci*, 108, 3867-3874, 1995
80. du Cros DL, LeBaron RG, Couchman JR, Association of versican with dermal matrices and its potential role in hair follicle development and cycling., *J Invest Dermatol*, 105, 426-431, 1995
81. Bayer-Garner IB, Sanderson RD, Smoller BR, Syndecan-1 is strongly expressed in the anagen hair follicle outer root sheath and in the dermal

- papilla but expression diminishes with involution of the hair follicle., *Am J Dermatopathol*, 24, 484-489, 2002
82. Couchman JR, King JL, McCarthy KJ, Distribution of two basement membrane proteoglycans through hair follicle development and the hair growth cycle in the rat., *J Invest Dermatol*, 94, 65-70, 1990
83. Taylor M, Ashcroft AT, Westgate GE, Gibson WT, Messenger AG, Glycosaminoglycan synthesis by cultured human hair follicle dermal papilla cells: comparison with non-follicular dermal fibroblasts., *Br J Dermatol*, 126, 479-484, 1992
84. Messenger AG, Extracellular matrix and the hair growth cycle., *J Invest Dermatol*, 96, 75S, 1991
85. Yuspa SH, Wang Q, Weinberg WC, Goodman L, Ledbetter S, Dooley T, Lichti U, Regulation of hair follicle development: an in vitro model for hair follicle invasion of dermis and associated connective tissue remodeling., *J Invest Dermatol*, 101, 27S-32S, 1993
86. Kawabe TT, Rea TJ, Flenniken AM, Williams BR, Groppi VE, Buhl AE, Localization of TIMP in cycling mouse hair., *Development*, 111, 877-879, 1991
87. Olerud JE, Usui ML, Seckin D, Chiu DS, Haycox CL, Song IS, Ansel JC, Bunnett NW, Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds., *J Invest Dermatol*, 112, 873-881, 1999
88. Poblet E, Jiménez F, CD10 and CD34 in fetal and adult human hair follicles: dynamic changes in their immunohistochemical expression during embryogenesis and hair cycling., *Br J Dermatol*, 159, 646-652, 2008
89. Toyoda M, Makino T, Kagoura M, Morohashi M, Expression of neuropeptide-degrading enzymes in alopecia areata: an immunohistochemical study., *Br J Dermatol*, 144, 46-54, 2001
90. Connelly JC, Chambless R, Holiday D, Chittenden K, Johnson AR,

Up-regulation of neutral endopeptidase(CALLA) in human neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor., *J Leukoc Biol*, 53, 685-690, 1993

91. Walther T, Albrecht D, Becker M, Schubert M, Kouznetsova E, Wiesner B, Maul B, Schliebs R, Grecksch G, Furkert J, Sterner-Kock A, Schultheiss HP, Becker A, Siems WE, Improved learning and memory in aged mice deficient in amyloid beta-degrading neutral endopeptidase., *PLoS One*, 4, e4590, 2009
92. Hamada K, Suzuki K, Evaluation of biochemical indices as a hair cycle marker in C3H mice., *Exp Anim*, 45, 251-256, 1996
93. Ogawa H, Hattori M, Regulation mechanisms of hair growth., *Curr Probl Dermatol*, 11, 159-170, 1983
94. Starcher B, Aycock RL, Hill CH, Multiple roles for elastic fibers in the skin., *J Histochem Cytochem*, 53, 431-443, 2005
95. Pinkus H, Differential patterns of elastic fibers in scarring and non-scarring alopecias., *J Cutan Pathol*, 5, 93-104, 1978
96. Paus R, Müller-Röver S, Botchkarev VA, Chronobiology of the hair follicle: hunting the " hair cycle clock"., *J Investig Dermatol Symp Proc*, 4, 338-345, 1999
97. Holub BS, Kloepper JE, Tóth BI, Bíro T, Kofler B, Paus R, The neuropeptide galanin is a novel inhibitor of human hair growth., *Br J Dermatol*, epub doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10890.x., 2012
98. Arck PC, Handjiski B, Peters EM, Peter AS, Hagen E, Fischer A, Klapp BF, Paus R, Stress inhibits hair growth in mice by induction of premature catagen development and deleterious perifollicular inflammatory events via neuropeptide substance P-dependent pathways., *Am J Pathol*, 162, 803-814, 2003
99. Divano C, Cardo P, Cipriani C, Pellerano S, Soluble and insoluble collagen and elastin in the rat hair cycle., *Arch Dermatol Res*, 266, 135-141, 1979

100. Maguer-Satta V, Besançon R, Bachelard-Cascales E, Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer., *Stem Cells*, 29, 389-396, 2011
101. Rijken F, Bruijnzeel PL, The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes., *J Investig Dermatol Symp Proc*, 14, 67-72, 2009
102. Baurain R, Larochelle JF, Lamy F, Photolysis of Desmosine and Isodesmosine by Ultraviolet Light., *Eur J Biochem*, 67, 155-164, 1976
103. Tsuji N, Fukuda Y, Kitahara T, Moriwaki S, Takema Y, Age-Related Changes of Female Leg Skin., *Journal of SCCJ*, 34, 283-290, 2000