

レニン - アンジオテンシン系阻害薬および α - リノレン酸の
光老化皮膚改善作用に関する研究

Studies on improving effects of renin-angiotensin system inhibitors
and α -linoleic acid on skin photoaging

松浦 有宇子

目次

緒言	1
ヘアレスマウスを用いた実験について	7
第1章 光老化モデルマウスにおけるアンジオテンシン関連因子の発現変化	8
1.1 序論	8
1.2 材料と方法	9
1.2.1. 実験動物	9
1.2.2. ACE 阻害薬と AT1 レセプター拮抗薬	9
1.2.3. UVB 照射と ACE 阻害薬の塗布	10
1.2.4. マウス背部皮膚のシワグレード判定	11
1.2.5. 皮膚生理機能の測定	12
1.2.6. 組織染色・免疫組織染色	12
1.3 結果	14
1.3.1. ACE、AT1・AT2 レセプターの発現に対する紫外線照射の影響	14
1.3.2. ACE 阻害薬によるシワと皮膚生理機能の改善効果	15
1.3.3. AT1 レセプター拮抗薬によるシワと皮膚生理機能の改善効果	16
1.4 考察	22
1.5 まとめ	25
第2章 マレイン酸エナラプリルによるシワ改善過程の解析	26
2.1. 序論	26
2.2. 材料と方法	27
2.2.1. マレイン酸エナラプリル塗布 SKH-1 マウスの皮膚サンプル作製	27
2.2.2. DNA マイクロアレイ	27
2.2.3. マイクロアレイデータの解析	28
2.2.4. 免疫蛍光組織染色	28
2.3. 結果	30
2.3.1. マレイン酸エナラプリル塗布による遺伝子発現変化の解析	30

2.3.2.	マレイン酸エナラプリルによる細胞外マトリクス成分の回復	55
2.3.3.	紫外線照射とマレイン酸エナラプリル塗布による ADAMTS2 と MMP-14 の分布変化	58
2.3.4.	紫外線照射とマレイン酸エナラプリル塗布による表皮分化マーカーの分布変化	61
2.4.	考察	62
2.5.	まとめ	66
第3章	光老化モデルマウスにおける α - リノレン酸のシワ改善効果	68
3.1.	序論	68
3.2.	材料と方法	69
3.2.1.	ヘアレスマウスへの UVB 照射と α - リノレン酸の塗布	69
3.2.2.	マウス背部皮膚のシワグレード判定	69
3.2.3.	皮膚生理機能の測定	69
3.3.	結果	70
3.3.1.	α - リノレン酸塗布によるシワ改善促進効果	70
3.3.2.	皮膚生理機能への α - リノレン酸の影響	71
3.4.	考察	73
3.5.	まとめ	75
総括		76
謝辞		81
引用文献		82

略語一覽

ACE: angiotensin-converting enzyme

ADAMTS2: a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2

α -MSH: alpha-melanocyte-stimulating hormone

AP-1: activator protein-1

AT1: angiotensin II receptor type 1

AT2: angiotensin II receptor type 2

bFGF: basic fibroblast growth factor

BSA: bovine serum albumin

CE: cornified envelope

COX-2: cyclooxygenase-2

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine

DHA: docosahexaenoic acid

EGF: epithelial growth factor

EPA: eicosapentaenoic acid

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GO: gene ontology

HRP: horseradish peroxidase

IL: interleukin

LOX: lipoxygenase

MMP: matrix metalloproteinase

NF κ B : nuclear factor kappa B

NMF: natural moisturizing factor

PBS: phosphate buffered salts

PG: prostaglandin E2

ROS: reactive oxygen species

RAR: retinoic acid receptor

RXR: retinoid X receptor

SOD: superoxide dismutase

TEWL: transepidermal water loss

TGF- β : Transforming growth factor β

TNF α : tumor necrosis factor α

UV: ultraviolet

VGEF: vascular endothelial growth factor

WAD: weighted average difference

緒言

皮膚は生体の最も外側を覆う器官で、体内からの水分の蒸散を防ぎ、体外からの異物や微生物などの侵入を防ぐ機能を持っている。皮膚は大きく角質層を含む表皮、真皮、その下部の脂肪層、そして毛包や汗腺、血管、リンパ管などの付属器官からなる。これらの組織は常にターンオーバーを繰り返し、また創傷を受ければ創傷治癒過程を経て自己再生を繰り返して正常な構造を維持している [1]。表皮層では表皮角化細胞により重層化した構造が形成され、その層の中に免疫を担当するランゲルハンス細胞とメラニンを産生するメラノサイトが点在している。表皮角化細胞は基底膜に接着している基底細胞のみが増殖性を持ち、基底細胞が分化し増殖性を失い重層化して有棘層、顆粒層、最外部には扁平で脱核した細胞で形成される角質層が存在する。顆粒層ではタイトジャンクションが形成され、生体内の水分放出や生体外からの異物侵入を防ぐ一役を担っている。角質層では、成熟したケラチン線維と細胞膜の裏打ちタンパク質が架橋され不溶性のコーニファイドエンベロップ (cornified envelope; CE) が形成され、その間に細胞間脂質が配向し、より強固なバリア機能を獲得する。また、表皮角化細胞で作られるフィラグリンが分解されて産生するアミノ酸などが天然保湿因子 (natural moisturizing factor; NMF) として角質層中に存在し、皮膚の保湿機能に寄与している [2]。また、メラノサイトが産生したメラニンは表皮角化細胞に輸送され、核を守るメラニンキャップを形成することで紫外線によるダメージを防ぐ役割を果たしている。表皮と真皮の間にはシート状の細胞外マトリクスからなる基底膜が存在し、表皮と真皮を強固に結合するだけでなく、表皮細胞の接着や液性因子の拡散を介して表皮細胞の増殖や分化、遊走などの細胞機能の制御にも関与している [3, 4]。真皮は線維芽細胞などの細胞群、毛包、血管、神経などの組織、それらを取り囲む細胞外マトリクスから成る。真皮における主な細胞外マトリクスは、線維性コラーゲン (I 型、III 型、V 型) とエラスチンなどからなる弾性線維、ヒアルロン酸やその他の多糖類、グリコサミノグリカンとコアタンパク質から成るプロテオグリカンなどである。これらの細胞外マトリクスに

よって皮膚に張力や弾力といった機械的強度が与えられる。線維芽細胞はこれらの細胞外マトリクスの合成・分泌、分解に関与しており、真皮構造の形成や維持だけでなく、創傷治癒過程でも重要な役割を果たしている[5]。このように生体の最外層に位置する皮膚は加齢のみならず外部刺激の影響を受け、機能の低下や外観的变化、つまり皮膚の老化が生じる。老化により機能的な不都合が生じるだけでなく、シワや過剰な色素沈着といった外観の変化は美容的な観点から Quality of life (QOL) に大きく影響する。

生理的な加齢による「自然老化」では、表皮細胞層が減少し表皮が薄くなり、真皮-表皮境界部が扁平になるとともに VII 型コラーゲンなどの基底膜成分が減少していることが知られている[6]。また、真皮ではコラーゲン線維やグリコサミノグリカンの減少、皮下脂肪組織の減少によりシワが生じる[6]。また、基底膜から垂直に真皮側に向けて主にフィブリリンで構成されるオキシタラン線維が存在するが、加齢とともに減少、または消失する[6-8]。このような表皮、真皮における変化が皮膚の弾力性の低下やシワなどの外観的变化をもたらす。また、皮膚は加齢による老化だけでなく、紫外線や乾燥、摩擦などの機械的刺激といった外部からの影響を強く受けている。特に紫外線による影響は大きく、「自然老化」に対して紫外線によって生じる変化を「光老化」と呼ぶ。地表に到達している紫外線 (UV) は UVA (波長 315~400 nm) と UVB (波長 280~315 nm) に大別される。UVB は表皮層まで、UVA は真皮層まで到達し、細胞や細胞外マトリクスにダメージを与え、表皮肥厚、紅斑、色素沈着、血管やリンパ管の透過性亢進、浮腫等が生じる[9-12]。繰り返し紫外線に曝露される顔面や首、手の甲などの皮膚においては、シワやシミなどの外観的变化を生じる[13]。光老化した皮膚では、表皮肥厚とともに表皮の分化状態に異常を生じ、表皮分化過程で合成され天然保湿因子の原料となるフィラグリンが減少することが知られている[13-16]。また、表皮-真皮結合部は扁平化し、IV 型コラーゲンや VII 型コラーゲンなどの基底膜成分が減少する[6, 8]。真皮層ではコラーゲン線維の減少・変性、エラスチン線維の変性・蓄積、オキシタラン線維の減少や消失が生じており、シワの形成に関与している。真皮の細胞外マトリクスの変化には、マトリクスメ

タロプロテアーゼ (MMP) やエラスターゼなどの細胞外マトリクスを分解する酵素の活性亢進が関与している[13, 16, 17]。

このような皮膚の光老化過程では、紫外線によって細胞の DNA ダメージとともに、活性酸素種 (ROS) の発生や表皮角化細胞から分泌される interleukin (IL) -1 や tumor necrosis factor (TNF) α といった炎症メディエーターが発現する。インターロイキン類の他に granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)、epithelial growth factor (EGF) といった成長因子の発現が紫外線刺激によって生じる[18-21]。また、炎症メディエーターであるプロスタグランジンやトロンボスポンジンの合成に関わる cyclooxygenase-2 (COX-2) や lipoxygenase (LOX) が発現することも知られている[21-24]。これら炎症性メディエーターによるシグナル伝達により、炎症性細胞の浸潤、血管新生、メラノサイトによるメラニンの過剰生成、MMP による細胞外マトリクスの分解が生じる[18-21]。紫外線による炎症過程において皮膚中に浸潤した好中球やマクロファージは ROS を産生し、その ROS が DNA、脂質、タンパク質にダメージを与え細胞傷害を生じさせるだけでなく、nuclear factor kappa B (NF κ B) や activator protein-1 (AP-1) といった転写因子を活性化する。NF κ B は炎症や免疫システムに関与するサイトカイン、成長因子、MMP、細胞の分化やアポトーシスを制御する遺伝子の発現を制御しており、シワの形成過程においては NF κ B や AP-1 による制御を介して不活性型の前駆体として産生された MMP が細胞外でプラスミンやトリプシンなどのタンパク質分解酵素によって切断され活性型となり、コラーゲンなどの細胞外マトリクスを分解する[21]。紫外線によるシワの予防や改善には、このような一連の反応を抑制するために、紫外線防御剤により紫外線曝露を防ぐこと、抗酸化物質による ROS の発生抑制や捕捉、抗炎症物質による炎症抑制、MMP 阻害剤などによる細胞外マトリクス分解の抑制が有効であると考えられる。抗酸化作用については、皮膚中にはアスコルビン酸やトコフェロール、グルタチオンといった抗酸化物質や活性酸素を分解する superoxide dismutase

(SOD) や catalase といった酵素が内在し、活性酸素を捕捉または消去している [25-27]。しかし、年齢や紫外線の影響を受けこれらは減少するため、抗酸化物質の投与は光老化を防ぐ効果が期待でき、実際に様々な抗酸化物質の光老化抑制作用が報告されている [21, 28]。また、抗炎症物質も光老化を防ぐために有効である。ステロイドまたは非ステロイド性の抗炎症物質はプロスタグランジンやロイコトリエン、炎症性サイトカインといった炎症性メディエーターの産生を抑制し、紫外線による炎症を抑える。レチノイドの光老化改善効果はすでに知られており、レチノイン酸受容体 (RAR) やレチノイド X 受容体 (RXR) に結合し、これらがリガンド誘導性転写因子として転写活性を制御することにより、AP-1 の情報伝達を妨げることが明らかになっている [29-31]。また、ステロイドや非ステロイド性の抗炎症成分による治療も報告されており、炎症性の皮膚疾患に有効な成分は紫外線による皮膚障害にも効果が期待される [21]。

このような紫外線による皮膚ダメージ、光老化のメカニズムの研究には、ヒトの光老化皮膚を模した実験動物モデルとして背部皮膚に UVB を長期間にわたり繰り返し照射したヘアレスマウス (光老化モデルマウス) が用いられてきた [16, 30, 32, 33]。光老化モデルマウスの背部皮膚には紫外線の照射によりヒトの光老化皮膚に類似したシワの形成や表皮肥厚が観察される。IV 型コラーゲンの減少や基底膜の分解、コラーゲンやフィブロネクチンなどの真皮マトリクスの変化も観察されており、その際に皮膚中の MMP やカテプシン G などのタンパク質分解酵素が活性化していることがこの実験動物モデルを用いて明らかになった [16, 17, 33, 34]。また、この光老化モデルマウスを用いて、紫外線照射前や照射期間中に抗酸化物質や抗炎症物質を塗布することでその光老化の予防効果を解析することができ、MMP 阻害剤やカテプシン G などのタンパク質分解酵素の阻害剤や、植物由来の物質やビタミン C、ビタミン E などの抗酸化物質のシワ予防効果が報告されている [16, 34-37]。さらに、紫外線照射によりシワを形成した後に、薬剤を塗布することで、その薬剤のシワ改善効果の解析が可能である。ヒトの光老化皮膚においてもシワの改善効果が知られているレチノイドについても、その作用メカニズムについて光老化モデルマウスを用いた研究がおこなわれている

[30, 31, 33]。本研究では、この光老化モデルマウスを用いて、皮膚炎症の抑制効果が期待できる物質について文献的な検索を行い、可能性の高い物質について、紫外線による皮膚障害やシワの改善への効果を検討した。

皮膚の創傷治癒過程や肥厚性瘢痕、線維症など炎症が含まれる皮膚病理において、レニン-アンジオテンシンシステムの関与が報告されており、これらの疾患の治療への応用が期待されている[38-43]。レニン-アンジオテンシン系は血圧の制御に関わるホルモンシステムとしてよく知られている[44-46]。肝臓や脂肪細胞から分泌されるアンジオテンシノーゲンを腎臓で作られるレニンが分解してアンジオテンシン I を生成する。アンジオテンシン I はアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) によって活性型のアンジオテンシン II に変換され、アンジオテンシン II レセプターに結合して作用を示す。アンジオテンシン II の受容体はアンジオテンシン II タイプ 1 (AT1) レセプターとアンジオテンシン II タイプ 2 (AT2) レセプターが存在し、それぞれ異なる機能を持っているといわれている。アンジオテンシン II は血管を収縮させるとともに、副腎皮質からのアルドステロンの分泌を促進し、腎臓でのナトリウムイオンと水分の取込に影響を与え、血圧上昇をもたらす[47, 48]。そのため、ACE 阻害薬や AT1 レセプター拮抗薬は血圧降下剤として高血圧の治療に利用されている[49, 50]。さらに、レニン-アンジオテンシン系を構成する因子は血管系だけでなく心臓、腎臓、膵臓、脳、リンパ、生殖器、脂肪、皮膚などの組織においても発現しており、末梢組織においても局所的に機能していることが知られている[48, 50-52]。いくつかの研究ではアンジオテンシン II の炎症惹起、細胞増殖誘導、線維症誘導などの作用に注目しており、これまでにアンジオテンシン II が ROS の生成、細胞の増殖、分化、遊走、アポトーシスを促し、組織の損傷に関与しているということが報告されている[44, 51, 53-55]。皮膚においても、創傷治癒や線維症、肥厚性瘢痕の形成において、ACE や AT1、AT2 レセプターが発現しており、活性酸素種の発生や細胞外マトリクス成分の産生・分解の異常にアンジオテンシン II が関与していることが報告されている[38-43]。創傷治癒過程においては、アンジオテンシン II によるシグナル伝達が ROS の発生、EGF レセプターの発現を介して表皮の再上

皮化に関与し、線維症の皮膚ではアンジオテンシン II によるシグナル伝達が真皮の Transforming growth factor β (TGF- β)の活性化を介して細胞外マトリクス成分の合成を制御しているとの報告がある[56, 57]。皮膚の光老化においても紫外線による直接的・間接的なダメージにより ROS が発生し炎症反応が起こることが知られているが、光老化皮膚におけるレニン-アンジオテンシン系の関与についての報告はない[58-60]。そこで、本研究では光老化モデルマウスを用いて UVB による皮膚ダメージやシワの形成へのアンジオテンシン II の関与、アンジオテンシン II によるシグナル伝達の制御による紫外線皮膚ダメージの改善効果を解析した。

また、炎症抑制効果のある生理物質として α -リノレン酸の効果についても同様の光老化モデルマウスを用いて紫外線によるシワや皮膚障害に対する影響を解析した。 α -リノレン酸は植物に高濃度含まれる高度不飽和脂肪酸である。哺乳類は生合成することができないため、食物から摂取する必要がある必須脂肪酸である。 α -リノレン酸はエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などとともに ω 3 系脂肪酸に分類される。 ω 3 系脂肪酸の経口摂取による効果は糖尿病やメタボリックシンドロームだけでなく、皮膚に対する効果も報告されている[61-64]。また、皮膚の光老化に対して EPA を塗布することで改善効果があることも報告されている[65]。EPA は細胞膜リン脂質への取り込みにおいてアラキドン酸と拮抗するため、COX-2 によるプロスタグランジン合成増加の抑制を介して炎症を抑制する機能を持つ。 α -リノレン酸はこの EPA の原料となるだけでなく、リノール酸の代謝を抑制することから、アラキドン酸カスケードによる生理活性物質の合成を抑制することができる。皮膚の自然老化、光老化によって皮膚中の COX-2 の発現は増加し、顔面皮膚における真皮線維芽細胞の COX-2 の発現も臀部皮膚と比較して著しく増加していることから、アラキドン酸カスケードの代謝産物として作られるプロスタグランジン(PG) E2 や PGI2 が紫外線による炎症にも関与していると考えられる[22, 66]。このことから、COX-2 による PGE2 や PGI2 の合成を抑制する作用をもつ α -リノレン酸は紫外線による皮膚の炎症を抑制し、皮膚障害やシワを改善する効果が期待できる。

第 1 章では、断続的な紫外線照射による影響を模したモデルとして UVB を長期間繰り返し照射したヘアレスマウスの皮膚を用いて、紫外線によってレニン-アンジオテンシン関連因子の発現が増加することを明らかにし、さらに、この光老化モデルマウスを用いて ACE 阻害薬と AT1 レセプター拮抗薬がこの動物モデルにおいて形成されたシワや皮膚バリア機能の低下などの異常の改善を促進することを見出した。第 2 章では、第 1 章で見出した ACE 阻害薬によるシワの改善過程における皮膚内部の変化を明らかとするため、DNA マイクロアレイ解析を用いて皮膚細胞の遺伝子発現の変化を解析し、細胞外マトリクス成分の増加がシワ改善過程に関与していること認めた。第 3 章では抗炎症効果をもつ α -リノレン酸の光老化皮膚に対する効果について、光老化モデルマウスを用いて解析し、炎症性メディエーター産生抑制作用のある α -リノレン酸が抗シワ作用を持つ可能性が示唆された。

ヘアレスマウスを用いた実験について

本研究において、ヘアレスマウスを用いた全ての実験は国立大学法人東京農工大学研究倫理委員会の承認を受け実施した（受理 No.24-82）。

第 1 章 光老化モデルマウスにおけるアンジオテンシン関連因子の発現変化

1.1. 序論

皮膚の光老化を模した動物実験系として、ヘアレスマウスの背部に UVB を長期間にわたり繰り返し照射する実験系（光老化モデルマウス）が、紫外線によるシワの形成過程や紫外線により生じたシワの改善過程の研究に用いられてきた [16, 30, 32]。たとえば紫外線照射により皮膚中のマトリクスメタロプロテアーゼ（MMP）の発現が亢進し、シワの形成を促進すること、そして MMP 阻害剤が紫外線によるシワの形成を抑制することがこのモデル動物を用いて明らかとなっている [16]。一方で、一度できたシワの改善については報告が少ないが、レチノイドがシワの改善効果を持つことはよく知られている。レチノイドのシワ改善効果やそのメカニズムについても紫外線照射したヘアレスマウスを用いて研究されている。レチノイドによるシワ改善過程においてはコラーゲンの産生やフィブリリン、エラスチンなどの弾性線維が増加するが、同時に、レチノイドは炎症反応を惹起すること、表皮を肥厚させることも報告されている [30, 32]。

この光老化モデルマウスを用いた皮膚光老化についての研究でレニン-アンジオテンシン系との関連性に注目した報告は見当たらない。しかし、創傷治癒過程や線維症などの皮膚の炎症過程においてアンジオテンシン II によるシグナル伝達が活性化していることが報告されており [39, 42, 43, 67, 68]、紫外線による炎症、光老化過程においてもアンジオテンシン II によるシグナル伝達が活性化している可能性が考えられる。そこで、光老化過程においてアンジオテンシン II の活性が関与している可能性を検証するため、光老化モデルマウスの皮膚を採取し、紫外線照射前後の皮膚中の ACE やアンジオテンシン II レセプターの発現を組織学的に解析した。その結果、繰り返し UVB 照射後の皮膚中において ACE、アンジオテンシン II レセプターの発現が亢進していたことから、シワの形成にアンジオテンシン II の活性が関与していると考え、レニン-アンジオテンシン系を抑えるために ACE 阻害薬、AT1 レセプター拮抗薬がシワなどの光老化による皮膚異常へ与える効果を解析した。

1.2. 材料と方法

1.2.1. 実験動物

Charles River Laboratories Japanより雄のヘアレスマウスSKH-1を購入し、6週令から実験に使用した。マウスにはCRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd, Co., Ltd, Tokyo, Japan) と水を自由に摂取させた。

1.2.2. ACE 阻害薬と AT1 レセプター拮抗薬

ACE 阻害薬としてマレイン酸エナラプリル (和光純正試薬、東京、日本)、AT1 レセプター拮抗薬としてバルサルタン、ロサルタンカリウム (シグマアルドリッチジャパン、東京、日本) を用いた。使用した薬剤の構造式を図 1 に示す。

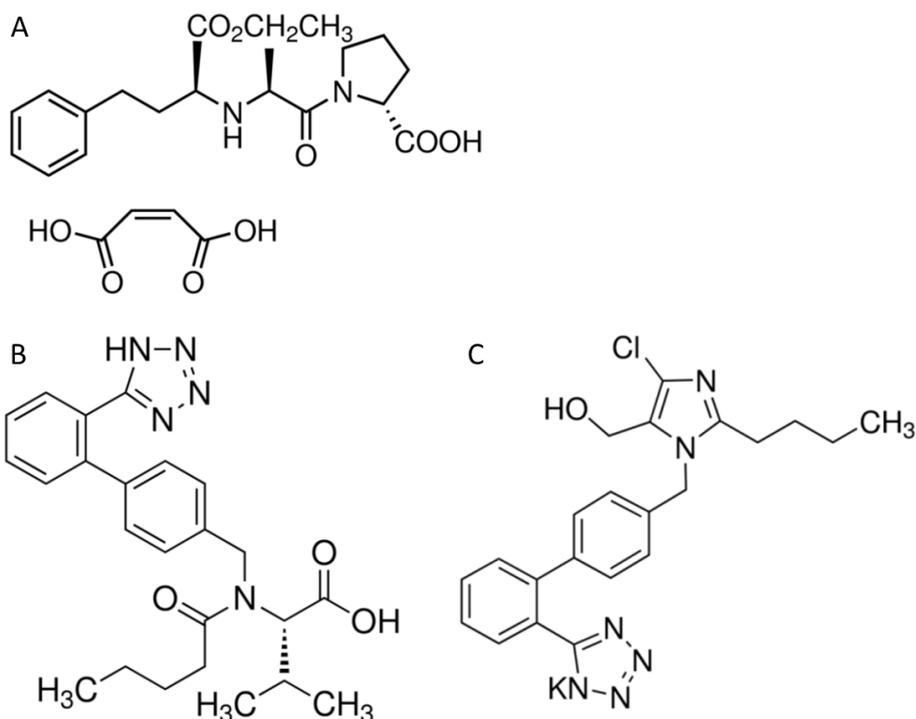


図 1 使用した薬剤の構造式

マレイン酸エナラプリル (A) は分子量 492.52 の ACE 阻害薬、バルサルタン (B)、ロサルタンカリウム (C) はそれぞれ分子量が 435.52、461 の AT1 レセプター拮抗薬である。

1.2.3. UVB 照射と ACE 阻害薬の塗布

紫外線 B 照射源として東芝 FL-20-SE 蛍光灯（東芝電気、東京、日本）を用いた。このランプは主波長が 280 nm～340 nm、強度のピークを 305 nm に持つ。UV ラジオメーター（SVR-305/365D II, Topcon, Tokyo, Japan）を用いて UV 強度を 0.3 mW/cm^2 とし、照射時間を調整してマウス背部にあたえられる UVB エネルギー量を制御した。

Schwartz らの方法をもとに、浮腫や皮膚がんの発生を避けるために一部方法を修正して以下の方法で UVB 照射によるシワをマウス背部皮膚に作製した。週に 3 回のペースで UVB 照射を行い、照射量は 1 週目は 36 cm/cm^2 、その後、1 週ごとに 54、72、108、144、162、180、198 mJ/cm^2 と増やし、9 週目と 10 週目は 216 mJ/cm^2 とした [69]。合計の照射量は 8 週目で 2.8 J/cm^2 、10 週目で 4.6 J/cm^2 となった。外観観察において 5 週目ごろからシワの形成が観察され、8 週から 10 週目では深いシワが形成されていた。ACE 阻害薬の皮膚改善効果の検討には、10 週間の UVB 照射と 1 週間の間隔期間の後、各群の平均シワスコアが同等になるように 5 匹または 6 匹に群分けし、コントロール群には 30% エタノールを、ACE 阻害薬塗布群には 1%(w/v) マレイン酸エナラプリル - 30 vol% エタノール溶液を、それぞれのマウスの背部に週 5 回、6 週間塗布した。また、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬の皮膚改善効果の検討には、同様に 10 週間の UVB 照射後 1 週間の間隔をあけて、0.1%(w/v) バルサルタン - 30 vol% エタノール溶液、0.1%(w/v) ロサルタン 30 vol% エタノール溶液、コントロール群として 30 vol% エタノール溶液をマウス背部に週 5 回、6 週間塗布した。

マウス皮膚サンプルはイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させたのちに採取した。組織解析用には UVB 照射前（0 週）、8 週間後、10 週間後、さらに薬剤塗布 2 週間後、6 週間後の皮膚を採取し、冷アセトンに浸漬して回収し Acetone-Methylbenzoate-Xylene (AMeX) 法により固定した [70]。マイクロアレイ解析用には薬剤塗布 2 週間後に 1 cm^2 の皮膚サンプルをバイオプシーパンチを用いて切り取り、2 mL サンプリングチューブに回収し、ただちに液体窒素を用いて凍結し -80°C で保存した。実験スケジュールを図 2 に示す。

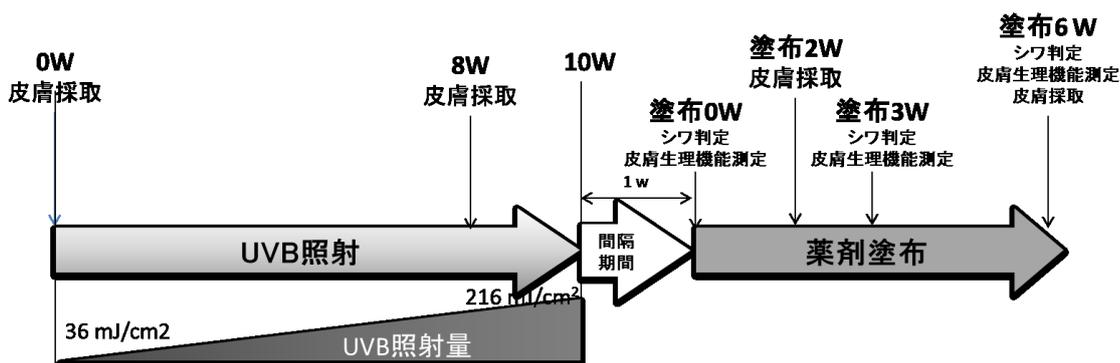


図 2 ヘアレスマウスへの UVB 照射と薬剤塗布のスケジュール

1.2.4. マウス背部皮膚のシワグレード判定

ACE 阻害薬の皮膚改善効果検討において、薬剤塗布 3 週間後と 6 週間後のシワグレードの判定を Bissett らの方法に従って行った [71]。それぞれのヘアレスマウスに麻酔処理を行い、背部皮膚の写真デジタルカメラで撮影し、その写真のマウスに施した処理を隠した上で 3 人の判定者が表 1 のシワグレードにしたがって判定を行った。3 人の判定者の判定の平均値を個々のマウスのシワグレードとし、各群間の差はマン - ホイットニーの U テストにて統計的に解析した。判定基準と判定例を表 1、図 3 に示す。

表 1 シワグレード判定基準

シワグレード	判定基準
0	シワは見られない
2	わずかに浅いシワがある
4	全体に浅いシワが途切れてある
6	繋がったシワが比較的浅く、頭部よりの領域では途中途切れたシワがある
8	繋がった深いシワが全体にあり、シワ間隔が比較的広い

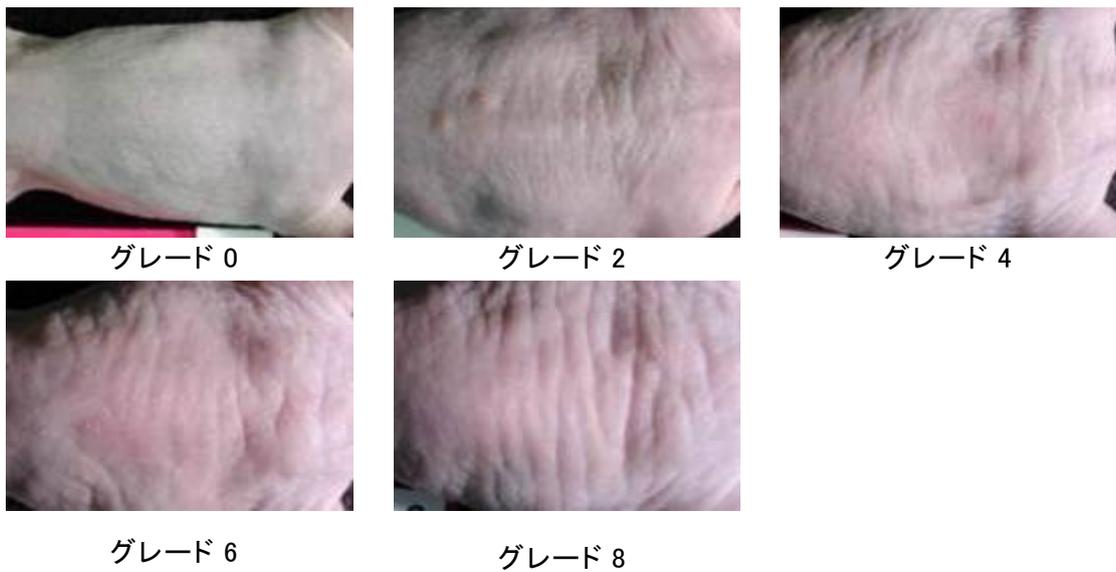


図 3 シワグレード判定の例

1.2.5.皮膚生理機能の測定

皮膚の厚さはダイヤルシクネスゲージ（尾崎製作所、東京、日本）を用いて測定し、3回の測定値の平均値を皮膚厚とした。経表皮水分蒸散量（TEWL）はバポメーター（Delfine Technologies, フィンランド）を用いて3回測定し、平均値を求めた。各群間の統計的な有意差の有無はステューデントの T 検定またはテューキー・クレーマー法を用いて解析した。

1.2.6.組織染色・免疫組織染色

ヘアレスマウスの背部皮膚は4℃の冷アセトンに浸漬し、AMeX法で固定した[70]。アセトン固定したサンプルを安息香酸メチル、キシレンに順に浸漬してパラフィンブロックに包埋した。ミクロトームで厚さ3 μmに薄切した切片を染色に用いた。組織学的解析のためにヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。ヘマトキシリン・エオジン染色像においてランダムに設定した4点の角質層を除く表皮細胞層を測定し、その平均値を表皮厚とした。各群間の統計的有意差はステューデントの T 検定を用いて解析した。

免疫組織染色は Envision+ System HRP-labeled polymer、

3,3'-Diaminobenzidine (DAB)基質クロモゲン (DAKO) を用いて行った。組織切片はキシレンとエタノールを用いて水和後、3% H₂O₂-PBS (Phosphate Buffered Salts)を用いて内因性のペルオキシダーゼ活性を排除し、10%正常ヤギ血清 (ニチレイ、東京、日本) を用いてブロッキングを行った。一次抗体にはラビットポリクローナル抗アンジオテンシン II (Abbotec, San Diego, USA)、抗 ACE (ab28311, abcam)、抗 AT1 レセプター(sc-1173, Santa Cruz)、抗 AT2 レセプター (sc-9040, Santa Cruz Biotechnology, Inc、U.S.A) 抗体し、ヘマトキシリンで核を染色した。切片は脱水後に封入し、光学顕微鏡下で観察した。

1.3. 結果

1.3.1. ACE、AT1・AT2 レセプターの発現に対する紫外線照射の影響

UVB 照射前のヘアレスマウスの皮膚においては、アンジオテンシン II の染色は血管で観察されたが、真皮線維芽細胞と表皮細胞にはほとんど染色されなかった (図 4A)。ACE は表皮細胞、真皮線維芽細胞で染色が観察された (図 4B)。AT1 レセプターは表皮基底細胞の一部細胞膜と真皮線維芽細胞に染色された (図 4C)。AT2 レセプターは真皮中の細胞にわずかに染色された (図 4D)。一方、8 週間の UVB 照射後のヘアレスマウスの皮膚においては、アンジオテンシン II の染色が真皮線維芽細胞と表皮層に観察された (図 4E)。ACE は表皮層、真皮線維芽細胞ともに強い染色が観察された (図 4F)。AT1 レセプターの真皮細胞における染色に大きな変化は観察されなかったが、表皮基底層の細胞では UVB 照射前のマウスと対照的にほとんどの基底細胞で細胞膜が強く染色された (図 4G)。AT2 レセプターは真皮の上層 (表皮直下) の線維芽細胞に濃く染色された (図 4H)。これらの結果は UVB 照射により ACE の発現が上昇し、アンジオテンシン II が産生されるとともに、AT1、AT2 レセプターの発現も増加してアンジオテンシン II によるシグナル伝達が増加していることを示唆している。

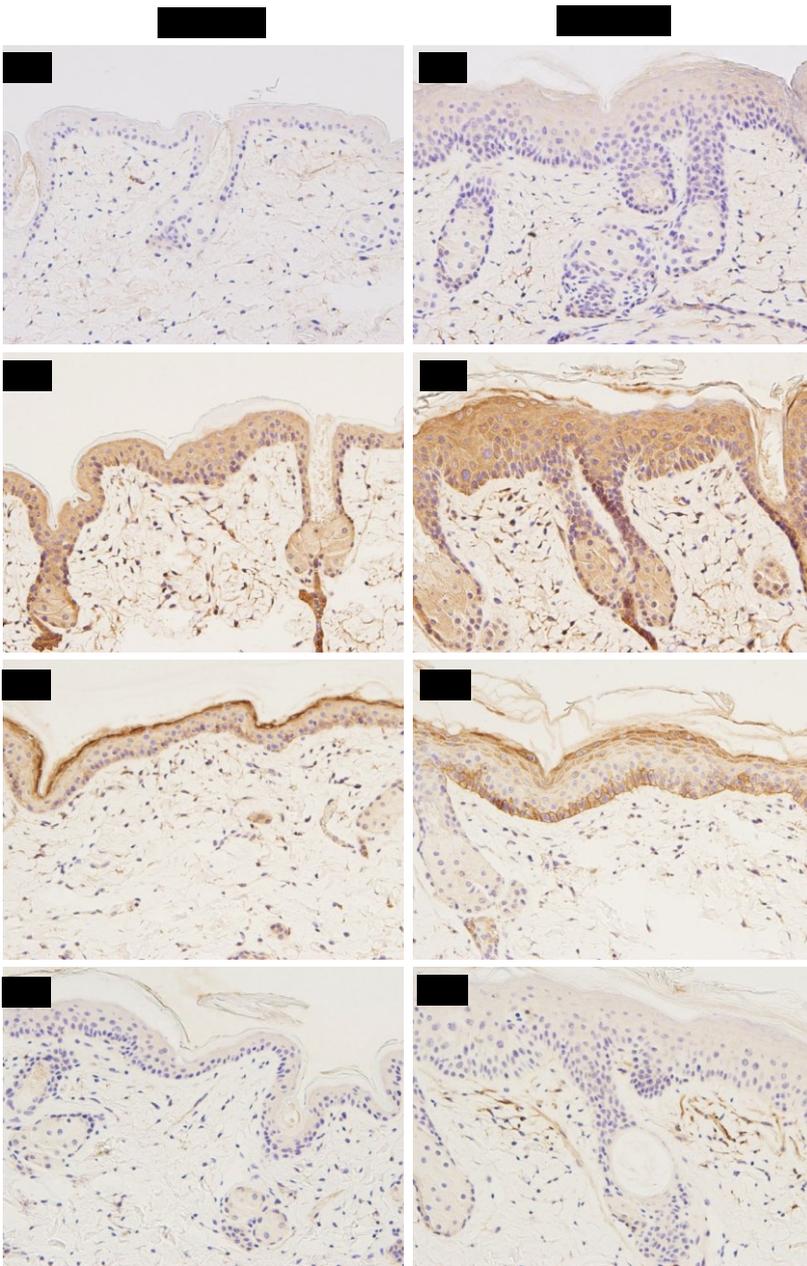


図4 UVB照射前後のヘアレスマウス皮膚におけるアンジオテンシンII関連因子免疫染色像

UVB照射前 (UVB(-):A-D)、8週間照射後 (UVB(+):E-H) のヘアレスマウス皮膚の免疫組織染色像を行った。抗 Angiotensin II 抗体 (A、E)、抗 ACE 抗体 (B、F)、抗 AT1 レセプター抗体 (C、G)、抗 AT2 レセプター抗体 (D、H) を用いて染色した (茶色)。青色は細胞核を表す。

1.3.2.ACE 阻害薬によるシワと皮膚生理機能の改善効果

10 週間の UVB 照射によりヘアレスマウスの背部の皮膚には深いシワが形成された。これらのマウスについて視感判定により各群のシワグレード平均が 7.2 から 7.5 となるようにコントロール群は 6 匹、マレイン酸エナラプリル塗布群は 5 匹に群分けした。10 週間の UVB 照射終了 1 週間後から、マウス背部皮膚に 1%(w/v)マレイン酸エナラプリル - 30 vol%エタノール溶液、またはコントロール群として 30 vol%エタノールを 6 週間塗布した。6 週間後、コントロール群の背部皮膚のシワはわずかに回復したが、平均シワグレードの減少は 1 未満であった (図 5)。塗布開始 3 週間後、6 週間後の皮膚厚に変化はなく (図 6)、6 週間後の HE 染色像では表皮肥厚が観察された (図 7A)。一方、マレイン酸エナラプリル塗布群においてはシワが速やかに回復し、塗布 3 週間で平均シワグレード 5.4、6 週間後には 4.8 にまで減少した (図 5)。マレイン酸エナラプリル塗布群では皮膚厚は 3 週後、6 週後ともにコントロール群と比較して有意に減少しており (図 6)、6 週後の皮膚の HE 染色では表皮肥厚も改善し、コントロール群と比較して有意に表皮厚が減少していた (図 7B, 7E)。経表皮水分蒸散量 (TEWL) はコントロール群では塗布 6 週間後においても塗布開始時と変わらなかったが、マレイン酸エナラプリル塗布群においては塗布 3 週で塗布開始時の 50%以下にまで低下し、6 週後においても低値を維持していた (図 8)。これは、マレイン酸エナラプリル塗布により皮膚バリア機能が改善したことを示している。

さらに、塗布 6 週後の皮膚を抗アンジオテンシン II 抗体で免疫組織染色したところ、コントロール群ではアンジオテンシン II が染色されたが、マレイン酸エナラプリル塗布群では染色性が低下していた (図 6C, 6D)。

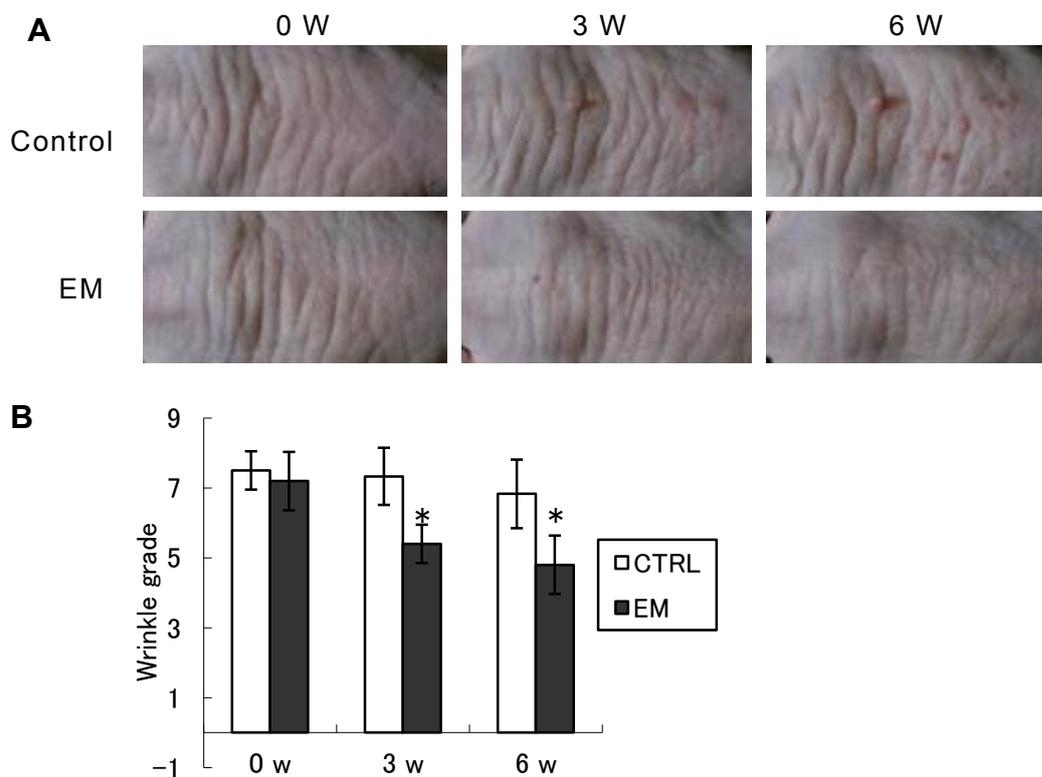


図 5 マレイン酸エナラプリル塗布によるヘアレスマウス背部皮膚のシワの改善

10 週間の UVB 照射と 1 週間の間隔期間後、コントロール群 (CTRL) には 30% エタノール溶液、マレイン酸エナラプリル塗布群 (EM) には 1% マレイン酸エナラプリル 30% エタノール溶液を 6 週間塗布した。塗布開始前 (0W)、塗布 3 週間後 (3W)、6 週間後 (6W) の背部皮膚の外観写真を撮影した (A)。コントロール群は 6 匹、マレイン酸エナラプリルは 5 匹のヘアレスマウスの写真からシワグレードを判定し平均のシワグレードを求めた (B)。値は平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ 、ステューデントの T 検定。

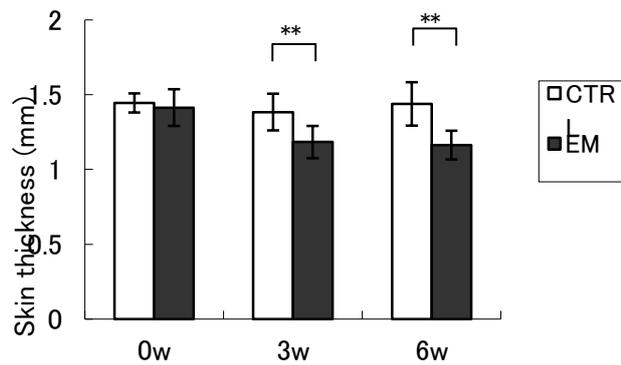


図 6 マレイン酸エナラプリル塗布による皮膚厚の減少

コントロール群 (CTRL) とマレイン酸エナラプリル塗布群 (EM) の塗布前 (0W)、塗布 3 週間後 (3W)、6 週間後 (6W) の皮膚厚をダイヤルシクネスゲージにて測定した。コントロール群は 6 匹、マレイン酸エナラプリルは 5 匹のヘアレスマウスの測定値から平均の皮膚厚を求めた。値は平均値±標準偏差を表す。** $p < 0.01$ 、ステューデントの T 検定。

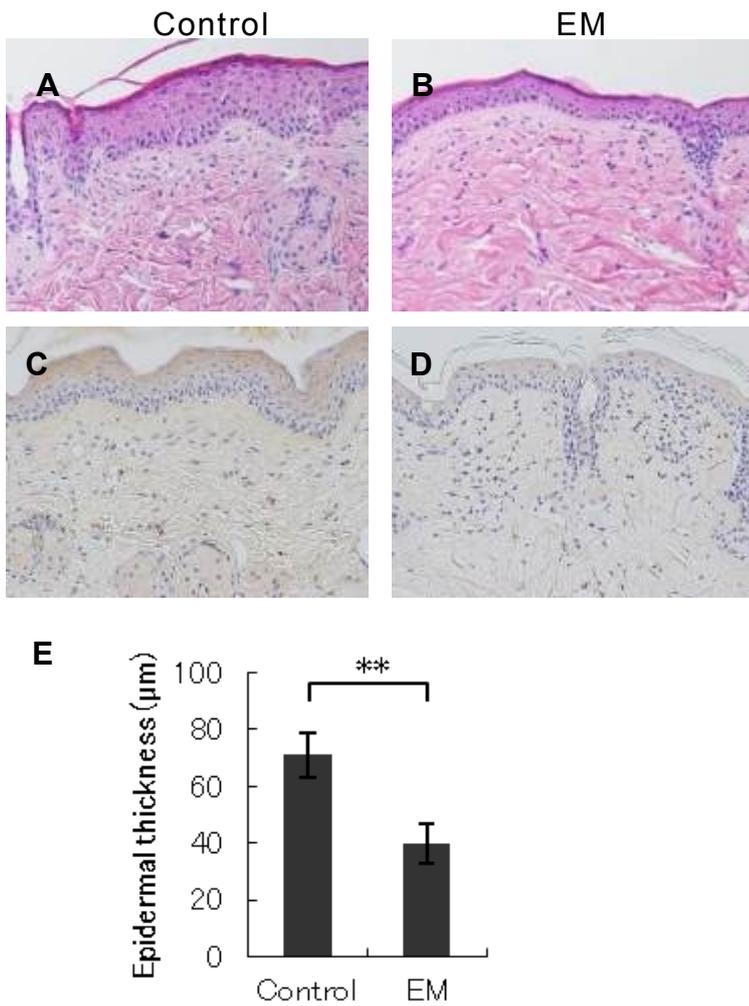


図7 マレイン酸エナラプリル塗布による表皮厚の減少と組織中のアンジオテンシン II レベルの低下

コントロール群 (A、C) とマレイン酸エナラプリル塗布群 (B、D) の塗布 6 週間後の皮膚のヘマトキシリン-エオジン染色像 (A、B) とアンジオテンシン II 免疫染色像 (C、D)。免疫染色では茶色がアンジオテンシン II を、青色が細胞核を表す (D)。コントロール群は 6 匹、マレイン酸エナラプリルは 5 匹のヘアレスマウスの組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色像から表皮の厚さを測定し平均値を求めた。値は平均値±標準偏差を表す。** $p < 0.01$ 、ステューデントの T 検定 (E)。

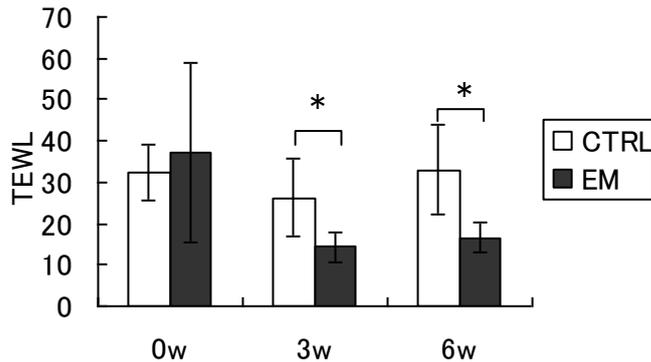


図 8 マレイン酸エナラプリル塗布による UVB 照射ヘアレスマウス背部皮膚の TEWL の低下

コントロール群 (CTRL)、マレイン酸エナラプリル塗布群 (EM) の塗布開始前 (0w)、塗布 3 週間 (3w)、6 週間後 (6w) の TEWL をバポメーターにて測定した。コントロール群は 6 匹、マレイン酸エナラプリルは 5 匹のヘアレスマウスの測定値から平均値を求めた。値は平均値 ± 標準偏差を表す。* $p < 0.05$ 、ステューデントの T 検定。

1.3.3. AT1 レセプター拮抗薬によるシワと皮膚生理機能の改善効果

UVB を 10 週間照射したヘアレスマウスの皮膚には深いシワが形成された。これらのマウスについて各群のシワグレードの平均が 7.8 となるように各群 5 匹に群分けし、1 週間の間隔期間を設けたのちに、0.1% バルサルタン溶液、0.1% ロサルタン溶液、もしくはコントロール群として 30% エタノールを 6 週間塗布した。コントロール群のシワグレードは塗布開始 3 週間後で平均 6.6、6 週間後には平均 6.2 に回復した。バルサルタン、ロサルタン塗布群のシワグレードはそれぞれ 3 週間後には 4.8、5.2 となりコントロール群に対して有意に減少していた。6 週間後にはどちらも平均シワグレード 5.2 となり、コントロール群との有意な差は認められなかった (図 9A)。TEWL は塗布開始時、3 週間後ではコントロール群、バルサルタン塗布群、ロサルタン塗布群において有意な差は観察されなかったが、6 週間後ではコントロール群に対してバルサルタン、ロサルタン塗布群で有意に減少していた (図 9B)。

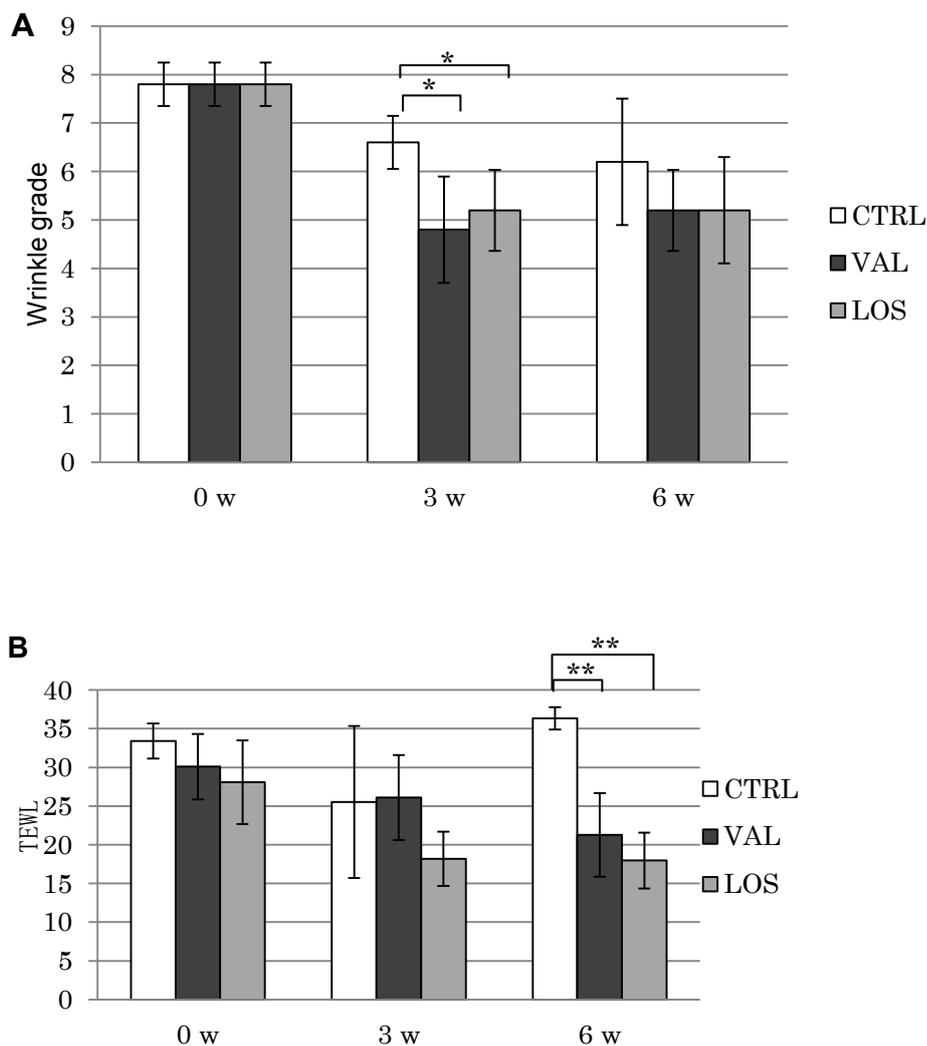


図9 アンジオテンシン II 受容体拮抗薬によるシワの減少と TEWL の低下

10 週間の UVB 照射と 1 週間の間隔期間後、コントロール群 (CTRL) には 30% エタノール溶液、バルサルタン塗布群 (VAL) には 0.1% バルサルタン 30% エタノール溶液、ロサルタン塗布群 (LOS) には 0.1% ロサルタン 30% エタノール溶液を 6 週間塗布した。塗布開始前 (0W)、塗布 3 週間後 (3W)、6 週間後 (6W) の背部皮膚の外観写真を撮影し、各群 5 匹のシワグレードを判定し平均値を求めた (A)。また、バポメーターを用いて TEWL を計測し、各群 5 匹の測定値から平均値を求めた (B)。値は平均値 ± 標準偏差を表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、テューキー・クレーマー法。

1.4. 考察

皮膚の創傷治癒過程においては ACE、AT1 レセプター、AT2 レセプターの発現が増加しており、アンジオテンシン II によるシグナル伝達の活性化が再表皮化に必要な反応であることが示唆される [39, 40, 43]。しかし、一方で ACE の過剰発現、過剰なアンジオテンシン II の活性は炎症反応を引き起こし、瘢痕形成や線維症などを引き起こすことも知られている [38, 41, 42, 67]。皮膚の炎症反応は紫外線によっても引き起こされる [16, 72, 73]。UVB は表皮肥厚や基底膜の分解・機能不全、真皮の細胞外マトリクスの分解などを引き起こし、これらはシワの形成に関与していると考えられる [16]。本研究では、UVB により ACE、AT1 レセプター、AT2 レセプターの発現が亢進し、アンジオテンシン II によるシグナル伝達が増加していることが明らかとなった。このことから、創傷治癒過程や瘢痕形成だけでなく、紫外線による炎症反応や皮膚の障害、シワの形成にアンジオテンシン II の活性が関与することが示唆された。さらに、ACE 阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬を塗布することで、これらの皮膚障害が改善することも示された。

ACE 阻害薬であるマレイン酸エナラプリルやアンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるバルサルタン、ロサルタンは高血圧の治療薬として長年にわたり利用されてきただけでなく、ACE 阻害薬の投与により心筋線維症、肺線維症、腎臓疾患などを防ぐという臓器保護効果についても報告されている [74-76]。ACE の基質にはアンジオテンシン I だけでなく、ブラジキニンやサブスタンス P も含まれる [46]。循環器系において ACE は血圧上昇作用を持つアンジオテンシン II を産生するだけでなく、血圧降下作用を持つブラジキニンを分解し、血圧上昇を引き起こす。また、ブラジキニンとサブスタンス P は発痛物質でもあり、痛みをもたらすとともに炎症性細胞を誘引する作用を持っている。ACE 阻害薬の内服投与の副作用としてブラジキニンとサブスタンス P の分解が抑制され蓄積することで空咳や血管性浮腫の発生が報告されている [77]。本研究における ACE 阻害薬によるシワ改善効果に、ブラジキニンやサブスタンス P の蓄積が関与しているかは明らかではない。しかし、UVB によってアンジオテンシン II や AT1、AT2

レセプターの発現が増加したことや、AT1 レセプター拮抗薬も ACE 阻害薬と同様に皮膚改善作用を示したことから、アンジオテンシン II によるシグナル伝達が UVB によるシワの形成に大きく関与していると考えられる。また、UVB 照射後のマウス皮膚の真皮中には AT1 レセプターと AT2 レセプターの両方が染色されており、AT1、AT2 どちらのレセプターも UVB 照射による炎症反応、シワの形成に関与している可能性があるが、AT1 レセプター拮抗薬によってシワの改善作用があり、その効果は ACE 阻害薬による効果と大きく差はなかったことから、真皮中の炎症反応には AT1 レセプターが重要な役割を果たしていると考えられる。AT1 レセプターは真皮中では UVB 照射による発現変化は少ないものの、産生されるアンジオテンシン II が増加していれば AT1 レセプターを介したシグナル伝達も増加していると考えられる。また、表皮基底細胞の AT1 レセプターが増加していることから、表皮細胞は AT1 レセプターを介してアンジオテンシン II に反応し、自らの過増殖だけでなく、炎症性因子の放出と、それにより引き起こされる真皮-表皮間の相互作用を介して真皮のマトリクスの分解などシワの形成につながる反応を引き起こしている可能性も考えられる。

創傷治癒過程においてアンジオテンシン II は AT1 レセプターを介して表皮細胞の遊走や再上皮化に関与することが報告されている [39, 40]。また、アンジオテンシン II は AT1 レセプターを介して上皮成長因子 (EGF) レセプターの発現、ADAM7 によるヘパリン結合型 EGF の放出を誘導することが報告されている [44]。さらに、HaCaT 細胞を用いた実験ではアンジオテンシン II によって活性酸素種 (ROS) の発生が促進され、これが EGF レセプターの発現を亢進しているといわれている [56]。ROS の発生や EGF などの成長因子を介した表皮細胞の増殖性亢進は紫外線刺激を受けた皮膚や表皮細胞でも起こる [78-81]。本研究でも UVB を断続的に照射したヘアレスマウスの背部皮膚で表皮肥厚が観察され、さらに、表皮基底細胞の AT1 レセプターの発現増加が観察された。このことから、AT1 レセプターを介したアンジオテンシン II のシグナル伝達が UVB による表皮肥厚に関与していると考えられる。さらに、紫外線 B 照射終了後 7 週間経過した皮膚においてもアンジオテンシン II は引き続き染色された。このこと

から、ACE 阻害薬の塗布によって表皮肥厚が改善し、TEWL も減少していることから、AT1 レセプターを介したアンジオテンシン II が表皮細胞の過増殖や皮膚バリア機能不全に関与しているといえる。

アンジオテンシン II は肥厚性瘢痕部や創傷治癒時の真皮層においても機能している。肥厚性瘢痕部の線維芽細胞は EGF レセプターの発現を介して、PI3 キナーゼ/Akt カスケードを活性化することが報告されている [67]。アンジオテンシン II により EGF レセプターのリン酸化を介して表皮角化細胞や線維芽細胞の遊走性が増加することも報告されている [40]。またアンジオテンシン II の刺激により TGF β によるシグナル伝達を介してコラーゲンの合成・分解のバランスが変化することが報告されている [42, 68]。マウスを用いた *in vivo* の実験においても、皮膚にアンジオテンシン II を注入することで皮膚の肥厚が起こり、皮膚中には炎症性の細胞や筋線維芽細胞が増加するなど線維症の特徴を示すことが報告されている [42]。創傷治癒過程においても創傷部の皮膚辺縁部において AT2 レセプターが発現しており、真皮の再構成に AT2 レセプターを介したシグナル伝達に関与している可能性が示唆されている [38]。一方で、肥厚性瘢痕や全身性硬化症患者の皮膚ではアンジオテンシン II が高レベルで検出され、アンジオテンシン II が細胞外マトリクスの産生や蓄積に異常をもたらすこと、免疫システムを活性化することが知られている [43, 67]。皮膚における AT1 レセプターと AT2 レセプターの機能については明確ではなく、議論の余地があるが、AT1 レセプター、AT2 レセプターを介したシグナル伝達が真皮中の炎症反応を引き起こしていると考えられている [41, 82]。紫外線刺激により発現する重要な炎症性因子として IL-1 がある [83, 84]。紫外線刺激により表皮角化細胞が IL-1 α 、IL-1 β を分泌し、オートクライン、パラクラインにより表皮・真皮の細胞に作用し、炎症反応を引き起こす。真皮線維芽細胞は表皮角化細胞由来の IL-1 α の刺激を受け IL-1 β 、IL-6、IL-8、FGF7、CSF-2 などの炎症性サイトカイン、成長因子を分泌する [85, 86]。一方で歯肉線維芽細胞や血管外皮細胞、心線維芽細胞では、IL-1 による刺激が AT1 レセプターや ACE の発現を誘導することが報告されている [87-89]。紫外線による皮膚の炎症過程においても、紫外線刺激によ

って表皮角化細胞が分泌する IL-1 のシグナル伝達が、真皮線維芽細胞のアンジオテンシン II 関連因子発現を誘導している可能性が考えられる。紫外線刺激が AT1 レセプターや ACE 等の発現誘導を引き起こす分子メカニズムや紫外線による皮膚ダメージやシワの形成へのアンジオテンシン II の作用メカニズムについてはさらなる解析が必要である。

1.5. まとめ

本章では、皮膚の光老化のモデル動物として UVB 紫外線を長期間照射したヘアレスマウスの皮膚において、ACE の発現、アンジオテンシン II の産生、アンジオテンシン II レセプターが増加していることから、UVB によりアンジオテンシン II の活性が亢進することが示された。これは創傷治癒過程や病理的癒痕に類似した事象であり、UVB による炎症の惹起にアンジオテンシン II が関与していると考えられる。さらに、ACE 阻害薬であるマレイン酸エナラプリル、AT1 レセプター拮抗薬であるバルサルタン、ロサルタンが UVB 照射によって引き起こされた表皮肥厚や表皮バリア機能の異常やシワを改善する効果を持つことが示された。レニン-アンジオテンシン系を抑制することにより皮膚の光老化を改善する可能性が示唆された。

第 2 章 マレイン酸エナラプリルによるシワ改善過程の解析

2.1. 序論

第 1 章で、光老化モデルマウスにおいてアンジオテンシン II の活性が亢進していること、また ACE 阻害薬、AT1 レセプター拮抗薬が紫外線によって形成したシワの改善を促進することを示した。このモデル動物は紫外線による皮膚ダメージやシワの形成過程、改善過程の研究に以前より使われてきた [16]。シワの形成過程ではコラゲナーゼやエラスターゼなどのタンパク質分解酵素が増加し、細胞外マトリクスの分解が亢進することが報告されている [16, 90, 91]。一方で、シワの改善過程の分子機構を解析したものは少ない。それは、シワの形成を予防する物質は多くあるが、一度できてしまったシワを改善する効果を持つ物質が少ないことによる。その中で、レチノイドがシワの改善効果を持つことはよく知られている [30, 92]。レチノイドによるシワ改善過程においてはコラーゲンの産生やフィブリリン、エラスチンなどの弾性線維が増加する [31, 33, 93]。同時に、レチノイドは炎症反応を惹起すること、表皮を肥厚させることも報告されている。第 1 章では光老化モデルマウスに ACE 阻害薬を塗布することでシワが改善され、皮膚厚、表皮厚の減少、TEWL の低下が見られた。ACE 阻害薬にシワ改善効果があることが発見されたが、その過程において皮膚中でどのような分子的な変化が起きているのかを明らかにするため、DNA マイクロアレイの手法を用いて ACE 阻害薬であるマレイン酸エナラプリル塗布による紫外線シワ改善過程における遺伝子発現変化を解析した。その結果として多数の細胞外マトリクス関連因子の発現変化をとらえ、皮膚組織中でのこれらの因子の変化を免疫蛍光染色法により解析した。

2.2. 材料と方法

2.2.1. マレイン酸エナラプリル塗布 SKH-1 マウスの皮膚サンプル作製

第 1 章と同様の手法で SKH-1 マウスに UVB を 10 週間照射し、1 週間の間隔期間の後に 1% マレイン酸エナラプリル-30% エタノール溶液、または 30% エタノール溶液（コントロール）を、SKH-1 マウスの背部に週 5 回塗布した。2 週間塗布したマウスをイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、1 cm² の皮膚サンプルをバイオプシーパンチで切り取り、2 mL サンプリングチューブに回収してただちに液体窒素を用いて凍結し、-80°C で保存した。免疫蛍光組織染色法のためには UVB 照射前後、マレイン酸エナラプリル塗布 2 週間および 6 週間後の皮膚サンプルを冷アセトンに浸漬して回収し、AmeX 法にて固定、パラフィンブロックに包埋した。

2.2.2. DNA マイクロアレイ

Isogen reagent (NIPPON GENE CO., LTD., Tokyo, Japan) を用いて皮膚サンプルの総 RNA を抽出し、RNeasy mini kit (QIAGEN, California, USA) を用いて精製した。総 RNA の濃度と純度は Nano Drop spectrophotometer (Nano Drop Technologies Inc. Delaware, USA) を用いて確認した。RNA の質を RNA Nano Lab chip と 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., California, USA) を用いて確認した後、Quick Amp Labeling kit を用いて Cy3 ラベル化 cRNA を作製した。ラベル化 cRNA は Agilent 4x44K Whole Mouse Genome Microarray と反応させ、Dual-Laser microarray Scanner G3565AA (Agilent Technologies Inc.) を用いて画像を読み込んだ。マイクロアレイの画像データは Feature Extraction Software 9.1 (Agilent technologies Inc.) を用いて解析し、外れ値または背景と等しいシグナルを排除し、コントロール群に対するマレイン酸エナラプリル塗布群の各遺伝子の発現変化率をシグナル強度の比率として計算した。

2.2.3. マイクロアレイデータの解析

マイクロアレイデータはフリー解析ソフトウェア R (R Development Core Team (2008) R: A Language and environment for statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて weighted average difference (WAD) 法により解析した[94]。WAD rank と WAD 統計値を求め、発現増加、減少した遺伝子において WAD rank が各 500 位以内の遺伝子をリストアップした。この 500 遺伝子について、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)を用いて gene ontology (GO)カテゴリーを取得した。

2.2.4. 免疫蛍光組織染色

一次抗体には表 2 に示すウサギポリクローナル抗体を使用した。厚さ 3 μm に薄切した組織切片を脱パラフィン、水和したのち、12%ウシ血清アルブミン (BSA) - PBS で希釈した一次抗体をのせて 4°Cで一晩インキュベーションした。PBS で洗浄後、Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Life Technologies Japan Inc., Tokyo, Japan)を 12%BSA-PBS で希釈して適用し、室温で 1 時間インキュベーションした。PBS で洗浄後、Vectashield mounting medium with DAPI (H-1200, Vestor Laboratories, Inc., California, USA)を用いて封入し、蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus Corporation, Tokyo Japan) を用いて観察した。

表 2 免疫蛍光染色に使用した一次抗体

抗体	メーカー	型番
Type I collagen	Abcam plc, Cambridge, USA	ab34710
Fibrillin 1	Acris Antibodies Inc., California, USA	AP06122PU-N
Elastin	Acris Antibodies Inc., California, USA	BP8022
Dystroglycan 1	Proteintech Group Inc., Illinois, USA	11017-1-AP
ADAMTS2	Abcamm plc, Cambridge, USA	ab125226
MMP-14	Millipore, Darmstadt, Germany	AB6004
Involucrin	Acris Antibodies Inc., California, USA	AP15608PU-S

2.3. 結果

2.3.1. マレイン酸エナラプリル塗布による遺伝子発現変化の解析

コントロール群に対してマレイン酸エナラプリル塗布群で有意に発現が上昇した遺伝子は 1150 遺伝子、低下した遺伝子は 612 遺伝子抽出された (p 値<0.05, Benjamini-Hochberg 検定法による)。WAD 統計法にて最も WAD 統計値が高い遺伝子を発現上昇群 500 遺伝子、発現低下群 500 遺伝子を抽出し、それを用いて、DAVID にて GO 解析を行った。発現上昇群では細胞外マトリクスに関連したターム、表皮の形成に関連するタームが抽出された (表 3)。発現低下群ではミトコンドリアや呼吸鎖に関連するタームが多く含まれていた。

発現上昇群で最も上位に抽出された GO タームの“Connective tissue constituents”には線維性コラーゲン構成成分 (*Colla1*, *Colla2*, *Col27a1*)、弾性線維構成成分 (*Eln*, *Fbn1*, *Fbn2*, *Col6a1*)、基底膜構成成分 (*Lama2*, *Dag1*) が含まれていた。また、構成成分以外に細胞外マトリクスの構造形成や分解に関与する酵素 (*Adamts2*, *Mmp14*) も含まれていた (表 4)。また、表皮の形成に関与する Epidermis development 表皮分化に関与する *Involucrin* が含まれていた (表 5)。GO 解析に用いた WAD で発現上昇の上位 500 位までの遺伝子を表 6 に示す。

表 3 発現上昇遺伝子群を用いた GO 解析

Term	Category	Count	%	<i>P</i> -value	Benjamini
Extracellular matrix	CC	20	7.6046	1.63E-08	1.91E-06
Extracellular matrix part	CC	12	4.5627	2.51E-08	1.95E-06
Proteinaceous extracellular matrix	CC	20	7.6046	8.58E-09	2.01E-06
Extracellular region part	CC	28	10.6464	1.89E-06	1.11E-04
Extracellular region	CC	44	16.7300	5.11E-06	2.39E-04
Epidermis development	BP	11	4.1825	7.86E-06	0.006147
Morphogenesis of an epithelium	BP	12	4.5627	2.46E-05	0.006407
Epithelium development	BP	16	6.0837	4.48E-06	0.006998
Ectoderm development	BP	11	4.1825	1.36E-05	0.007094
Tissue morphogenesis	BP	14	5.3232	2.28E-05	0.007111
Gland morphogenesis	BP	9	3.4221	1.83E-05	0.007148
Basement membrane	CC	7	2.6616	3.47E-04	0.013435
Extracellular matrix structural constituent	MF	6	2.2814	5.46E-05	0.017861
Vesicular fraction	CC	10	3.8023	5.76E-04	0.019087
Biological adhesion	BP	20	7.6046	2.40E-04	0.046040

マレイン酸エナラプリル塗布群において発現上昇し WAD 統計値が高い 500 遺伝子を用いて GO 解析を行った。500 遺伝子から DAVID に 263 遺伝子がアサインされ、そこから Biological process (BP)、cellular component (CC)、molecular function (MF) のカテゴリーに属する GO タームが抽出された。Benjamini-Hochberg FDR-FDR collected EASE のスコアが 0.05 未満のものを表に示した。Count: タームに該当する遺伝子数、Category: GO タームのカテゴリー、% : タームに該当する遺伝子数のアサインされた遺伝子数に対する割合、p-value : フィッシャーによる直接確率検定における EASE score、Benjamini: Benjamini-Hochberg FDR-corrected EASE score を示す。

表 4 マレイン酸エナラプリル塗布により発現上昇した細胞外マトリクス関連遺伝子

Gene symbol	Gene name	WAD statistic	Fold change
<i>Dag1</i>	dystroglycan 1	0.403717	2.62
<i>Colla1</i>	collagen, type I, alpha 1	0.402896	1.86
<i>Fbn1</i>	fibrillin 1	0.329296	2.14
<i>Ch11</i>	cell adhesion molecule with homology to L1CAM a disintegrin-like and metallopeptidase	0.255440	5.43
<i>Adamts2</i>	(reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	0.254100	2.44
<i>Mmp14</i>	matrix metallopeptidase 14	0.247086	1.81
<i>Fn1</i>	fibronectin 1	0.223204	1.85
<i>Spon2</i>	spondin 2, extracellular matrix protein	0.216120	1.72
<i>Fbn2</i>	fibrillin 2	0.216081	2.03
<i>Col27a1</i>	collagen, type XXVII, alpha 1	0.204232	3.39
<i>Eln</i>	elastin	0.200950	1.73
<i>Wnt1</i>	wingless-related MMTV integration site 1	0.190974	1.13
<i>Bgn</i>	biglycan	0.187014	1.65
<i>Smoc2</i>	SPARC related modular calcium binding 2	0.181531	1.63
<i>Coll5a1</i>	collagen, type XV, alpha 1	0.176043	2.06
<i>Col6a1</i>	collagen, type VI, alpha 1	0.175368	1.56
<i>Tnc</i>	tenascin C	0.174481	1.63
<i>Ntn1</i>	netrin 1	0.170001	1.82
<i>Lama2</i>	laminin, alpha 2	0.169368	1.68
<i>Colla2</i>	collagen, type I, alpha 2	0.161055	2.00

GO 解析で Extracellular matrix のタームに含まれる遺伝子を表に示した。

表 5 マレイン酸エナラプリル塗布により発現上昇した表皮形成に関わる遺伝子

Gene symbol	Gene name	WAD stastic
<i>Krt6B</i>	keratin 6B	0.414270
<i>Col1a1</i>	collagen, type I, alpha 1	0.402896
<i>Sox9</i>	SRY (sex determining region Y)-box 9	0.366153
<i>Fst</i>	follistatin	0.280352
<i>Ivl</i>	involucrin	0.269139
<i>Foxq1</i>	forkhead box Q1	0.260900
<i>Adamts2</i>	a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2	0.254100
<i>Krt6a</i>	keratin 6A	0.249452
<i>Bcl2</i>	B cell leukemia/lymphoma 2	0.190977
<i>Casp3</i>	caspase 3	0.166425
<i>Sprr4</i>	small proline-rich protein 4	0.160794

発現上昇遺伝子を用いた GO 解析で Epidermal development のタームに含まれる遺伝子を表に示した。

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (1/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P313382	Tcfap2e	1.900314	1
A_52_P442031	Klf2	1.304934	2
A_52_P336748	NAP050809-1	1.030744	3
A_52_P548790	Rpl7a	0.907518	4
A_52_P567281	LOC666606	0.897526	5
A_52_P481319	NAP027922-1	0.890214	6
A_51_P387913	Cox17	0.759947	7
A_52_P69325	Tfb2m	0.751783	8
A_51_P413359	Slfn5	0.708381	9
A_52_P427607	Pglyrp3	0.672229	10
A_52_P497388	ENSMUST00000079662	0.632578	11
A_52_P671812	LOC641192	0.624855	12
A_52_P62986	Synpo	0.614736	13
A_51_P153265	Gla	0.559158	14
A_51_P335104	1110030E23Rik	0.538067	15
A_52_P236160	Rusc1	0.535171	16
A_51_P129229	Ifi47	0.496637	17
A_52_P538490	Klk7	0.463598	18
A_52_P176983	9530080O11Rik	0.460607	19
A_52_P546610	Pam	0.436827	20
A_52_P14506	NAP001160-001	0.427191	21
A_51_P412508	Irx4	0.424889	22
A_52_P267651	Arntl	0.423988	23
A_51_P467448	AI449441	0.41937	24

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 2/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P119055	Ssb	0.4172	25
A_51_P126275	Krt6b	0.41427	26
A_52_P561394	BC005537	0.405197	27
A_52_P419118	Dag1	0.403717	28
A_51_P377094	Colla1	0.402896	29
A_51_P182631	Mug1	0.400931	30
A_51_P291247	Mug2	0.393421	31
A_52_P654965	Eif3s1	0.390446	32
A_52_P181128	Mrps2	0.387182	33
A_52_P503208	NAP092699-001	0.377192	34
A_51_P167292	Chi3l3	0.373217	35
A_52_P361391	Olfr1153	0.370331	36
A_51_P395098	Hspa5	0.368281	37
A_51_P451606	Sox9	0.366153	38
A_51_P173692	Lrrn6d	0.356848	39
A_52_P714817	AK034929	0.35072	40
A_52_P258757	NAP102683-1	0.348092	41
A_51_P336056	ENSMUST00000073890	0.342153	42
A_51_P448236	Ctsk	0.341439	43
A_52_P893105	A_52_P893105	0.333148	44
A_52_P827934	AK084349	0.332594	45
A_52_P24690	A630005I04Rik	0.330469	46
A_52_P553859	TC1539197	0.329581	47
A_52_P224801	Fbn1	0.329296	48

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 3/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P353452	AK037592	0.317715	49
A_52_P962431	Fbxw11	0.313484	50
A_52_P30877	LOC382421	0.310061	51
A_51_P330388	Slc6a17	0.309504	52
A_51_P419613	Pkd2	0.308415	53
A_51_P208490	Peli1	0.307396	54
A_52_P851171	AK036477	0.305063	55
A_52_P428599	Chi3l4	0.304111	56
A_52_P441168	ENSMUST00000036010	0.303017	57
A_52_P619388	Kcnq1ot1	0.301769	58
A_52_P66561	Mlstd1	0.300516	59
A_51_P451374	Drbp1	0.298267	60
A_52_P803354	AK031920	0.29758	61
A_52_P963570	AK044852	0.296482	62
A_52_P136741	LOC675694	0.295913	63
A_52_P522864	BC023805	0.294445	64
A_51_P473000	NAP057029-1	0.293216	65
A_52_P747646	AK086193	0.291922	66
A_52_P439509	Xlr5d	0.289676	67
A_51_P218091	Lgr5	0.287545	68
A_52_P502102	2310001H17Rik	0.284008	69
A_52_P393589	9030425E11Rik	0.283634	70
A_51_P176156	Sirpb1	0.283537	71
A_51_P190499	LOC56628	0.282844	72

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子(続き続き 4/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P148675	Dag1	0.282533	73
A_51_P467224	Fbn1	0.281934	74
A_51_P464958	BC028454	0.281748	75
A_51_P148512	ErbB2ip	0.28126	76
A_52_P58281	Chd4	0.281024	77
A_51_P381821	Fst	0.280352	78
A_52_P221776	Kif12	0.279932	79
A_52_P500711	TC1520423	0.27817	80
A_52_P241129	Pcbp1	0.278001	81
A_52_P514850	5930436O19Rik	0.277279	82
A_51_P135654	Eif4ebp2	0.276298	83
A_51_P387108	4930535E02Rik	0.275932	84
A_51_P237040	Nog	0.275761	85
A_52_P740123	TC1521782	0.275145	86
A_52_P641629	Gsk3b	0.273678	87
A_52_P925246	AW913259	0.272389	88
A_52_P422976	Ap2m1	0.271231	89
A_51_P314363	AK084643	0.270851	90
A_52_P394448	2900016B01Rik	0.269287	91
A_51_P475748	Ivl	0.269139	92
A_52_P634329	LOC640530	0.268827	93
A_52_P266312	8030498J20Rik	0.268051	94
A_52_P352701	Trpc4ap	0.267146	95
A_51_P435858	TC1533197	0.267113	96

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 5/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P307964	Krt13	0.266288	97
A_52_P859798	AK045817	0.265481	98
A_51_P480709	Ywhaz	0.265087	99
A_52_P547273	Dock4	0.264586	100
A_51_P331044	Il20	0.264289	101
A_52_P796271	TC1419971	0.264074	102
A_51_P139620	AK031434	0.263782	103
A_51_P481261	Foxq1	0.2609	104
A_51_P108923	AK035046	0.260198	105
A_52_P206322	U76382	0.259865	106
A_52_P217100	NAP113293-1	0.259332	107
A_51_P519385	Sacm1l	0.258373	108
A_52_P194326	NAP027004-1	0.258349	109
A_52_P452787	Pded6ip	0.256635	110
A_51_P516219	AK036773	0.255862	111
A_52_P624155	TC1515419	0.255824	112
A_52_P80548	5730406M06Rik	0.255598	113
A_52_P593805	Ch11	0.25544	114
A_52_P337821	LOC544881	0.25535	115
A_52_P304056	Jakmip2	0.255313	116
A_52_P568955	6230426I18Rik	0.255119	117
A_51_P152946	Yap1	0.255044	118
A_52_P1165644	AI838057	0.254793	119
A_52_P170685	NAP102507-1	0.254491	120

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 6/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P153294	AK084469	0.254389	121
A_52_P184042	Adamts2	0.2541	122
A_52_P891818	AK047526	0.253486	123
A_52_P1021744	J00623	0.252891	124
A_52_P336159	2010106G01Rik	0.252097	125
A_51_P483511	Dock8	0.251676	126
A_51_P448044	AK079181	0.250444	127
A_51_P398868	Has3	0.249622	128
A_52_P104658	Krt6a	0.249452	129
A_52_P630774	5930436O19Rik	0.249162	130
A_52_P1196354	AK051089	0.249129	131
A_52_P275894	X78107	0.249092	132
A_51_P145480	Zic4	0.248599	133
A_52_P630828	Iqgap1	0.248389	134
A_52_P279759	Glg1	0.247746	135
A_52_P232346	TC1479950	0.247557	136
A_52_P900176	AK085158	0.247319	137
A_52_P304128	Mmp14	0.247086	138
A_51_P137336	Cdh1	0.24708	139
A_52_P129428	Fzd2	0.246862	140
A_52_P1116481	Eya3	0.246002	141
A_51_P453810	Phr1	0.243881	142
A_52_P1083556	AK032841	0.243351	143
A_51_P244950	Dpys	0.243273	144

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 7/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P231820	C130026I21Rik	0.24315	145
A_52_P189038	Rbms1	0.241546	146
A_52_P85372	Chrm1	0.241224	147
A_52_P381262	6720473M08Rik	0.241102	148
A_52_P1076696	AK087311	0.240373	149
A_51_P487108	Rangap1	0.240142	150
A_51_P182975	Tmprss11e	0.239348	151
A_52_P558411	Msn	0.238824	152
A_52_P360330	BC045135	0.23841	153
A_51_P432484	Gnai2	0.238256	154
A_52_P624107	MGC107533	0.23782	155
A_52_P150396	Orc3l	0.237363	156
A_52_P52803	Hspa1a	0.237224	157
A_51_P208152	3930402G23Rik	0.237132	158
A_51_P304561	2900042K05Rik	0.236947	159
A_52_P772918	Larp1	0.236894	160
A_52_P224413	LOC673378	0.236106	161
A_52_P278035	ENSMUST00000070019	0.235409	162
A_52_P582601	Gatad2b	0.235015	163
A_52_P528041	AB056117	0.23457	164
A_51_P255456	Cyp1b1	0.233776	165
A_51_P127592	AI987944	0.233634	166
A_51_P408595	Ccl20	0.233499	167
A_52_P352099	E130307A14Rik	0.232881	168

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 8/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P52128	Leo1	0.232611	169
A_52_P510592	Adamts2	0.231954	170
A_51_P401828	Mug2	0.231838	171
A_51_P306067	Lpp	0.231546	172
A_51_P148037	G431001E03Rik	0.231414	173
A_52_P220176	Dkk3	0.230971	174
A_52_P371541	TC1451388	0.230885	175
A_52_P304902	Hspa1a	0.230639	176
A_52_P86165	9430040K09Rik	0.230168	177
A_52_P381430	Tbc1d4	0.229337	178
A_51_P243418	Clec2g	0.228867	179
A_51_P390785	AK033340	0.22857	180
A_52_P425092	ENSMUST00000077110	0.226978	181
A_52_P276848	AK035801	0.226583	182
A_52_P513099	Ppp3ca	0.226137	183
A_52_P243090	Zc3h11a	0.224683	184
A_52_P722921	AK037648	0.224173	185
A_52_P220190	Sf3b1	0.223874	186
A_52_P11817	Fn1	0.223204	187
A_52_P258959	Rpl21	0.222965	188
A_51_P518747	Pip5k2a	0.221937	189
A_52_P517447	AK149472	0.221392	190
A_52_P172441	D930001I22Rik	0.220712	191
A_52_P30406	Rad23b	0.220709	192

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 9/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P386811	C530014P21Rik	0.22061	193
A_52_P1069274	TC1434196	0.220569	194
A_52_P802967	AK035497	0.219493	195
A_52_P268852	Helt	0.218918	196
A_52_P640840	CJ288729	0.218657	197
A_51_P471058	Mrc2	0.217947	198
A_52_P244736	Cxadr	0.217869	199
A_52_P593611	2310047O13Rik	0.216416	200
A_52_P381484	Spon2	0.21612	201
A_51_P103850	Fbn2	0.216081	202
A_51_P148838	Ugcg11	0.215264	203
A_52_P900433	AK085234	0.214458	204
A_52_P1171934	A430106J12Rik	0.21366	205
A_52_P515168	4930535B03Rik	0.213611	206
A_52_P341320	AK046811	0.21357	207
A_51_P489367	Cyp3a25	0.213422	208
A_52_P413530	Zcchc7	0.21303	209
A_52_P987411	AK032717	0.212926	210
A_51_P517120	LOC676917	0.212404	211
A_52_P380314	Cyp3a25	0.211704	212
A_51_P493700	Cep350	0.211106	213
A_51_P428730	AK085206	0.210498	214
A_52_P475886	Rc3h1	0.209289	215
A_52_P859123	AK049577	0.208964	216

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 10/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P282279	Mthfd1	0.207969	217
A_52_P247537	AK053080	0.207949	218
A_52_P1004080	AK051046	0.207924	219
A_51_P137336	Cdh1	0.207841	220
A_52_P763295	A630081D01Rik	0.207083	224
A_51_P151722	BC053994	0.206966	225
A_52_P103319	3222402P14Rik	0.206311	226
A_52_P971616	Air	0.206243	227
A_51_P353118	AK014334	0.205931	228
A_51_P295355	Creb3l1	0.205346	229
A_52_P1037106	A_52_P1037106	0.205011	230
A_52_P715191	AK037579	0.205002	231
A_52_P67794	Itsn2	0.204931	232
A_52_P665675	Abca1	0.204793	233
A_52_P628870	Col27a1	0.204232	234
A_51_P403234	Hdac7a	0.203772	235
A_51_P491777	Olfir59	0.203333	236
A_52_P569001	Atp2a2	0.203109	237
A_52_P1107697	Nfe2l2	0.202731	238
A_52_P771436	AK052900	0.202331	239
A_52_P200686	Gpr114	0.202313	240
A_51_P368123	Nkx2-3	0.20226	241
A_52_P12481	Smc1a	0.202215	242
A_52_P1043739	AK036971	0.202041	243

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 11/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P251245	Pkp4	0.201992	244
A_51_P496031	Ar	0.201655	245
A_52_P677092	Phip	0.201431	246
A_52_P609972	Eln	0.20095	247
A_51_P159453	Serpina3n	0.200535	248
A_51_P496031	Ar	0.19989	249
A_52_P477720	Cfl1	0.199843	250
A_52_P325678	9430010O03Rik	0.199815	251
A_51_P168662	Prpf8	0.19927	252
A_52_P630098	NAP025379-001	0.198803	253
A_52_P441874	Olfr319	0.198667	254
A_51_P464394	Klb	0.198435	255
A_51_P150996	6720422M22Rik	0.198019	256
A_52_P416240	Mms19l	0.197742	257
A_52_P68175	C77080	0.197532	258
A_51_P407323	F5	0.197392	259
A_52_P612440	AK033032	0.197281	260
A_51_P457980	NAP108447-1	0.197093	261
A_51_P159367	C230040D10Rik	0.196985	262
A_52_P282494	Nfib	0.196706	263
A_52_P583728	Sfrs8	0.195663	264
A_51_P407515	6330407A03Rik	0.195601	265
A_52_P602180	LOC632964	0.195137	266
A_52_P566653	Wnk1	0.195037	267

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 12/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P279693	Cyp1a1	0.194822	268
A_52_P568200	BC021831	0.194809	269
A_52_P259779	ENSMUST00000084862	0.194629	270
A_52_P474528	NAP066348-1	0.194462	273
A_52_P145059	5830410F13Rik	0.194423	274
A_51_P241068	Dkk2	0.19399	275
A_52_P608444	Nfat5	0.193647	276
A_52_P58059	Usp34	0.193628	277
A_52_P1044190	AK051819	0.193048	278
A_52_P159256	Lpp	0.192991	279
A_51_P442765	2310061N02Rik	0.192594	280
A_52_P648146	LOC628368	0.192538	281
A_51_P434017	Spon2	0.192373	282
A_52_P499523	ENSMUST00000085415	0.19222	283
A_52_P795912	AK078412	0.191829	284
A_51_P137336	Cdh1	0.191802	285
A_52_P672212	Calr	0.19135	286
A_52_P438280	Bcl2	0.190977	287
A_51_P366435	Wnt1	0.190974	288
A_51_P137336	Cdh1	0.1909	289
A_51_P189631	2310067E19Rik	0.190869	290
A_52_P1197466	A_52_P1197466	0.190711	291
A_52_P51411	C430014K11Rik	0.190476	292
A_51_P341130	Iqgap1	0.190282	293

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 13/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P457358	Thrap2	0.190237	294
A_51_P137336	Cdh1	0.190075	295
A_51_P107066	Josd1	0.189107	298
A_52_P802856	A1300008O04Rik	0.188811	299
A_51_P479590	Wwc1	0.188728	300
A_52_P318040	Acaca	0.188174	301
A_52_P795553	AK083849	0.188153	302
A_52_P88878	Nope	0.187966	303
A_52_P416684	C230075M21Rik	0.187723	304
A_52_P54106	Ghr	0.187684	305
A_52_P357682	Dync2h1	0.187412	306
A_52_P162486	Bgn	0.187014	307
A_52_P232859	Clec2g	0.186905	308
A_52_P110541	E030018N11Rik	0.186655	309
A_52_P456458	AK030475	0.186072	310
A_52_P465386	TC1489649	0.186009	311
A_52_P190059	NAP026555-1	0.185927	312
A_52_P387884	LOC436089	0.185753	313
A_52_P54261	Tmem56	0.185605	314
A_51_P192964	4933425B16Rik	0.18554	315
A_52_P1171983	AK036024	0.185351	316
A_51_P496031	Ar	0.185295	317
A_52_P419059	ENSMUST00000076648	0.185275	318
A_52_P209852	Itch	0.185065	319

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 14/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P1028125	AK037378	0.184977	320
A_52_P574378	AK088293	0.18495	321
A_51_P288370	AK046961	0.184506	322
A_52_P690871	AK047616	0.1845	323
A_51_P358906	U2af2	0.184401	324
A_52_P54486	Nfat5	0.184076	325
A_51_P201390	Tbc1d4	0.183786	326
A_52_P827154	AK045221	0.183741	327
A_52_P87997	AI987692	0.183708	328
A_52_P907763	AK036634	0.183704	329
A_51_P322933	AK084126	0.183444	330
A_52_P146504	NAP101960-1	0.183354	331
A_52_P615051	1200016E24Rik	0.183348	332
A_52_P24696	Mgat5	0.18314	333
A_52_P663027	Stat5b	0.182933	334
A_51_P109469	Fgfr1	0.1824	335
A_52_P489385	LOC621431	0.182261	336
A_51_P496031	Ar	0.182113	337
A_51_P354094	Dock7	0.181983	338
A_51_P267804	AK089714	0.181903	339
A_52_P590318	Cwf19l2	0.181858	340
A_52_P669212	NAP026415-1	0.181831	341
A_51_P486190	Pabpc2	0.181698	342
A_52_P87987	F830004M19Rik	0.181593	343

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 15/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P1012653	AK087200	0.181552	344
A_51_P213045	Smoc2	0.181531	345
A_52_P276302	Tshz1	0.179755	348
A_51_P315785	Tnfaip6	0.179677	349
A_52_P834965	AK037460	0.179648	350
A_51_P352981	5230400M03Rik	0.179635	351
A_52_P75568	Hspa4l	0.179545	352
A_51_P493364	Eif4a1	0.179493	353
A_52_P1108539	AK086969	0.179251	354
A_52_P502351	D930050A07Rik	0.179217	355
A_52_P419879	NAP038076-1	0.178923	356
A_52_P263800	Ifi203	0.178762	357
A_51_P112661	AK029296	0.178404	358
A_51_P197146	5830400J07Rik	0.178384	359
A_51_P431121	AK052831	0.178211	360
A_51_P447785	Cyp2c55	0.177713	361
A_52_P448972	Sbno1	0.177687	362
A_51_P326229	Ddx25	0.177458	363
A_52_P625296	Vav2	0.177333	364
A_52_P81533	F730002C09Rik	0.177322	365
A_52_P569906	Ttn	0.17726	366
A_51_P496031	Ar	0.17708	367
A_51_P275427	BC016608	0.177057	368
A_51_P477692	Fa2h	0.176617	369

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 16/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P666615	TC1530636	0.176377	370
A_51_P498640	Pdxk	0.176304	371
A_52_P170882	Col15a1	0.176043	372
A_51_P216990	Olfr665	0.175995	373
A_51_P109469	Fgfr1	0.175844	374
A_52_P427640	LOC667984	0.175651	375
A_52_P355480	TC1435352	0.175595	376
A_51_P164251	AK079917	0.175483	377
A_51_P474496	Col6a1	0.175368	378
A_52_P637034	9130229H14Rik	0.175261	379
A_52_P78684	D330040H18Rik	0.175217	380
A_52_P107681	Ylpm1	0.175185	381
A_52_P1124470	AK087429	0.175159	382
A_51_P137336	Cdh1	0.175106	383
A_52_P482063	1500010G04Rik	0.175074	384
A_52_P552647	5830407P18Rik	0.175006	385
A_52_P403020	Xrn1	0.174996	386
A_52_P448994	AK086129	0.174927	387
A_52_P175073	AK037317	0.174684	388
A_51_P199382	Elmo2	0.174633	389
A_52_P359965	Cpd	0.174563	390
A_51_P291438	Tnc	0.174481	391
A_52_P260592	Tbl1x	0.174171	392
A_52_P10017	Tmem64	0.174124	393

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 17/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P544878	Nedd4l	0.17375	394
A_52_P232508	Mup3	0.173497	395
A_51_P511612	AK038533	0.173319	396
A_51_P206585	Runx1	0.173069	397
A_52_P188026	Ccar1	0.172999	398
A_51_P249024	Hk1	0.172973	399
A_51_P496031	Ar	0.172854	400
A_51_P516268	Kctd4	0.172606	401
A_52_P859368	AA516935	0.172588	402
A_52_P408826	9530083O12Rik	0.172025	403
A_52_P215093	Pigt	0.172002	404
A_51_P175681	LOC668139	0.171995	405
A_51_P133310	AK034975	0.171863	406
A_51_P466478	Ptprf	0.171728	407
A_51_P172412	Cic	0.171618	408
A_52_P152412	2600001A11Rik	0.171559	409
A_52_P1067534	AK088332	0.171465	410
A_51_P109469	Fgfr1	0.171214	411
A_52_P117221	C230094A16Rik	0.171009	412
A_51_P274189	BC106180	0.170836	413
A_51_P496031	Ar	0.170763	414
A_51_P507307	Chd7	0.170728	415
A_52_P1180253	AK054054	0.170472	416
A_52_P995717	AK045222	0.170449	417

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 18/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_51_P109469	Fgfr1	0.170334	418
A_52_P401473	Ntn1	0.170001	419
A_52_P1109289	TC1435238	0.169894	420
A_51_P195862	6030487A22Rik	0.169715	421
A_52_P601643	Dock1	0.169614	422
A_52_P392112	Ylpm1	0.169466	423
A_52_P652859	Lama2	0.169368	424
A_52_P290544	Ccn11	0.169064	425
A_51_P478895	Saps1	0.169036	426
A_52_P459552	C130022K22Rik	0.16878	427
A_51_P137336	Cdh1	0.168744	428
A_52_P20048	Tcf12	0.168036	429
A_52_P200599	3110001I20Rik	0.168013	430
A_52_P283724	Wfikkn2	0.168013	431
A_51_P137336	Cdh1	0.167889	432
A_52_P168028	Lss	0.167597	433
A_51_P109469	Fgfr1	0.167113	434
A_51_P241653	4831440D22Rik	0.167012	435
A_52_P481988	Ddr2	0.166537	436
A_51_P382618	Casp3	0.166425	437
A_51_P303095	Ttc28	0.166023	438
A_52_P57805	Nup214	0.166016	439
A_52_P50376	Tln1	0.165864	440
A_52_P590546	Hsp90b1	0.165674	441

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 19/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P674712	CB590298	0.165328	442
A_51_P236775	Ugcgl1	0.16526	443
A_52_P319326	Svep1	0.165206	444
A_51_P124313	Olfr414	0.165136	445
A_52_P201359	Cep350	0.165003	446
A_52_P899685	AK037956	0.164996	447
A_52_P328440	ENSMUST00000098050	0.164843	448
A_52_P233294	BC022771	0.164796	449
A_51_P420236	Ars2	0.164708	450
A_52_P357745	Ypel2	0.164656	451
A_52_P112791	Mlstd2	0.164388	452
A_52_P631153	C530043K16Rik	0.164239	453
A_51_P309874	AK086934	0.164172	454
A_52_P197722	Hmgcl1	0.164069	455
A_52_P665393	2610030P05Rik	0.163947	456
A_52_P298112	Neb1	0.163852	457
A_51_P427768	Diap1	0.163763	458
A_52_P587928	Zfhx1b	0.163571	459
A_52_P617552	Huwe1	0.163453	460
A_52_P398925	Stfa2l1	0.163321	461
A_52_P1068216	AK051522	0.163306	462
A_51_P335014	Arx	0.162756	463
A_52_P197498	Prked	0.162721	464
A_52_P509188	Fto	0.162373	465

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 20/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P385409	Flnb	0.161513	466
A_51_P491853	Trip12	0.161512	467
A_51_P419078	BC006684	0.161211	468
A_51_P311105	Scn10a	0.161163	469
A_52_P424253	Colla2	0.161055	470
A_52_P1019844	AK036140	0.161003	471
A_52_P1132414	AK082550	0.160985	472
A_52_P554845	Hipk2	0.160814	473
A_51_P225903	Sprr4	0.160794	474
A_51_P364592	Zic2	0.160626	475
A_52_P266562	Camk2d	0.160515	476
A_52_P360529	Frmd4a	0.160471	477
A_52_P401059	TC1487745	0.1604	478
A_51_P358908	U2af2	0.16038	479
A_51_P130497	Cnbp2	0.160258	480
A_52_P1069484	TC1530331	0.160087	481
A_52_P367583	Prkar2a	0.159953	482
A_51_P340668	Bcl9l	0.159872	483
A_52_P138002	Smc3	0.159865	484
A_51_P318497	BC002199	0.15972	485
A_51_P452172	Rlf	0.159694	486
A_52_P434293	LOC383196	0.159534	487
A_52_P52635	Nrg1	0.159172	488
A_51_P444740	Smad4	0.159152	489

表 6 WAD 法により抽出された発現上昇した上位 500 位までの遺伝子 (続き 21/21)

Probe Name	Gene symbol	WAD statistic	WAD rank (UP)
A_52_P803414	AK048115	0.159127	490
A_52_P562911	M19902	0.158719	491
A_51_P516033	A_51_P516033	0.158578	492
A_51_P339987	Tmem16f	0.158508	493
A_52_P851407	AK033152	0.158451	494
A_52_P1180575	D130095D21Rik	0.158383	495
A_52_P543660	D14Erttd581e	0.15818	496
A_51_P463562	Mpa2	0.15802	497
A_52_P1163677	AK037099	0.157682	498
A_51_P109469	Fgfr1	0.157674	499
A_51_P358700	Olfir1221	0.157068	500

マレイン酸エナラプリル塗布群において発現上昇し WAD 統計値が高い 500 遺伝子を抽出した。Probe Name:Agilent のマイクロアレイプローブ ID。Stat WAD:WAD 統計値は 2 群間の平均値の差 (average difference : AD) とシグシグナル強度のログ値を weight (W) として換算した値を剰して求めた。WAD rank (UP) : 発現上昇した遺伝子の中で WAD 統計値が高いものから 500 位までを順位付けした。

2.3.2. マレイン酸エナラプリルによる細胞外マトリクス成分の回復

マイクロアレイ解析で発現上昇遺伝子として抽出された細胞外マトリクス成分と UVB によるシワの形成と改善の関連を調べるため、UVB 照射前後と、UVB 照射後マレイン酸エナラプリル塗布による変化を免疫蛍光染色にて解析した。まず、紫外線照射前後の比較では、I 型コラーゲンは UVB 未照射の皮膚では真皮層に密に染色されたが、10 週間の UVB 照射後の皮膚ではわずかに染色性が低下した (図 10a, 10b)。エラスチンとフィブリリン 1 は UVB 照射前の皮膚では真皮の上部層に分布していたが、10 週間の UVB 照射後では染色性が低下していた (図 10c, 10d, 10e, 10f)。ディストログリカン 1 は真皮-表皮境界部に染色されたが、10 週間の UVB 照射後ではほとんど染色されなかった (図 10g, 10h)。これらの細胞外マトリクス成分の分布は UVB 照射後の 7 週間の期間でコントロール群でもマレイン酸エナラプリル塗布群でも回復している傾向があり、特にマレイン酸エナラプリル塗布群においてより強く染色され、回復していた (図 11)。これらの結果から、UVB 照射によりダメージを受けたコラーゲン線維、弾性線維、基底膜の再構築がマレイン酸エナラプリル塗布により促進される可能性が示された。

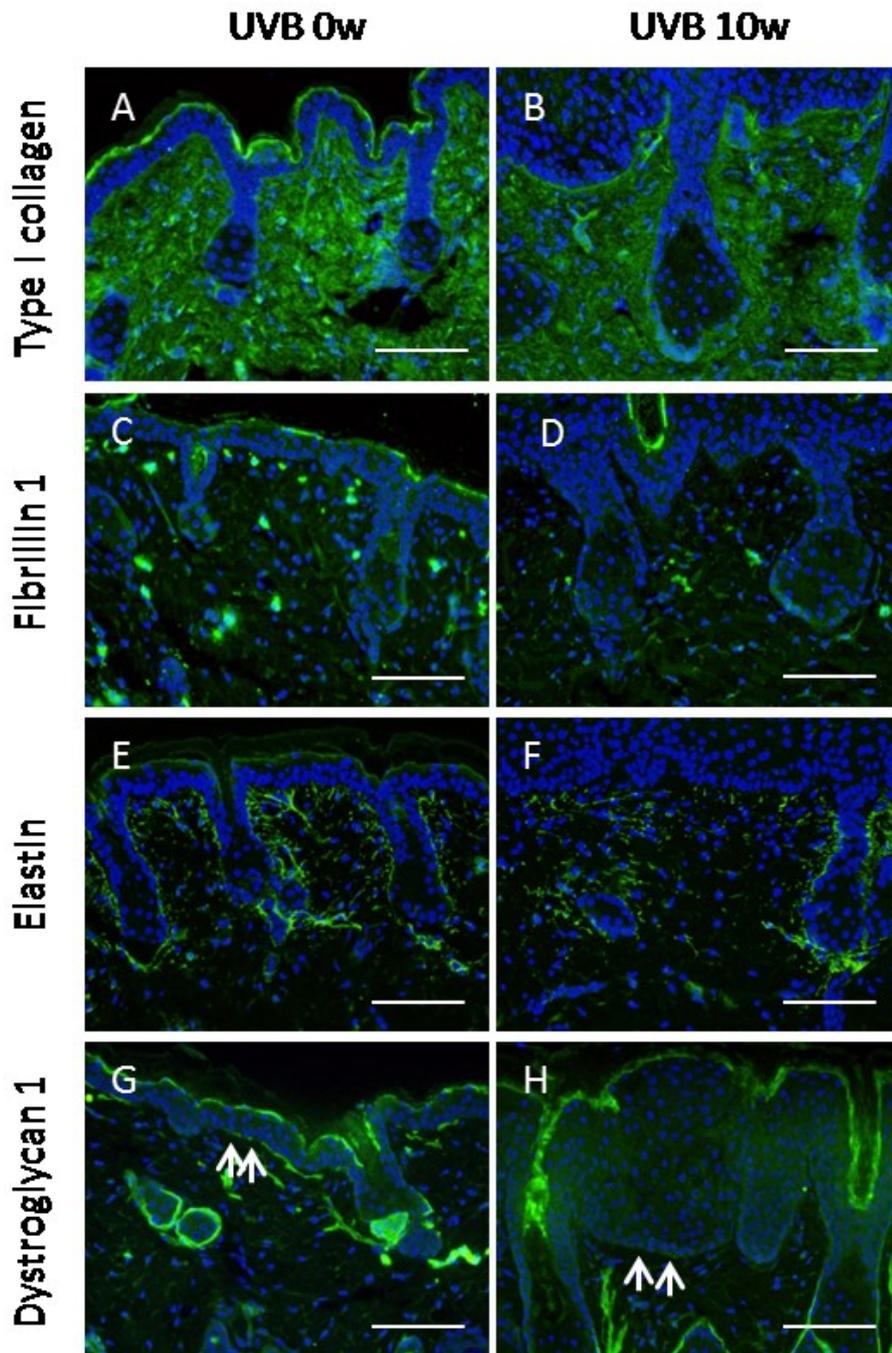


図 10 紫外線照射前後における細胞外マトリクス成分の分布変化

紫外線照射前（0W、A、C、E、G）、10 週間照射後（10W、B、D、F、H）のヘアレスマウス背部皮膚を用いて、I 型コラーゲン（A、B）、フィブリリン 1（C、D）、エラスチン（E、F）、ディストログリカン 1（G、H）の免疫蛍光染色を行った（緑色）。青色は細胞核を表す。バーは 100 μm を示す。

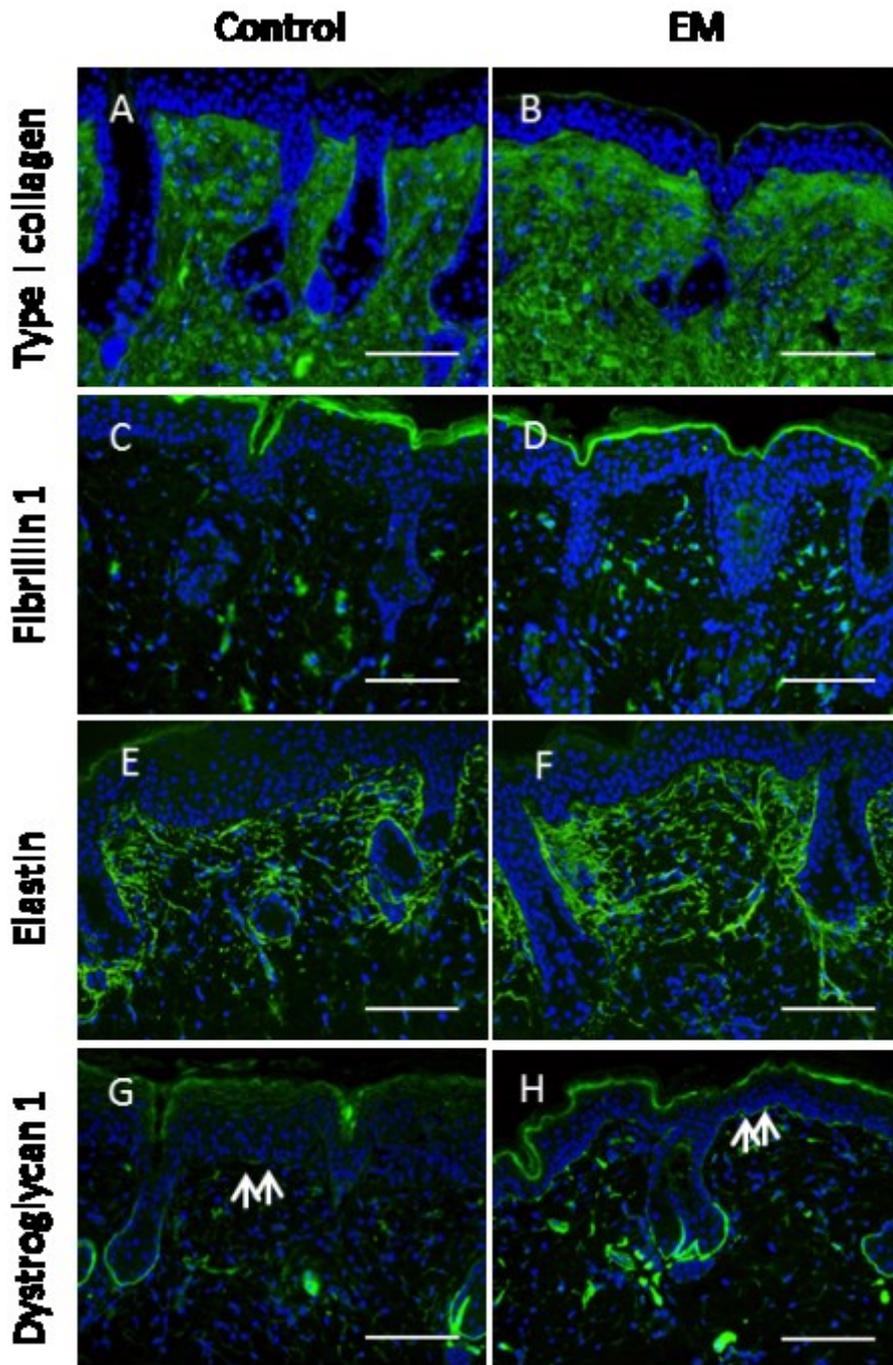


図 11 マレイン酸エナラプリル塗布による細胞外マトリクス成分の分布変化

10 週間の紫外線照射終了 1 週間後から、6 週間後のコントロール群 (A、C、E、G) とマレイン酸エナラプリル塗布群 (B、D、E、H) の皮膚を用いて、I 型コラーゲン (A、B)、フィブリリン 1 (C、D)、エラスチン (E、F)、ディストログリカン 1 (G、H) の免疫蛍光染色を行った (緑色)。青色は細胞核を表す。バーは 100 μm を示す。

2.3.3.紫外線照射とマレイン酸エナラプリル塗布による ADAMTS2 と MMP-14 の分布変化

マイクロアレイ解析では細胞外マトリクスの構成成分に加え、マレイン酸エナラプリル塗布群において Adamts2、mmp14 の発現上昇が検出された。UVB 照射前後とマレイン酸エナラプリル塗布によるこれらの因子の組織中の分布変化を免疫蛍光染色で解析した。UVB 照射前のヘアレスマウス皮膚において、ADAMTS2 (a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2) は表皮基底細胞の細胞膜上と真皮上部層の一部の細胞が染色されたが、10 週間の UVB 照射後の皮膚では染色が観察されなかった(図 12A, 12C)。コントロール群では処理 2 週間後では真皮細胞の染色は見られるものの、表皮基底細胞は染色されず、処理 6 週間後では表皮基底細胞の細胞膜上にも染色が観察された(図 13A, 13E)。マレイン酸エナラプリル塗布群では処理 2 週間後において、ADAMTS2 の染色は真皮細胞だけでなく表皮基底細胞の細胞膜上にも観察され、6 週間後では表皮基底細胞の細胞膜上にコントロールより強い染色が観察された(図 13C, 13G)。MMP-14 は UVB 照射前の皮膚では表皮層の細胞に染色され、10 週間の UVB 照射後でも染色性は変化していなかった(図 12B, 12D)。しかし、コントロール群では処理 2 週間後の皮膚においてほとんど染色が観察されなかった(図 13B)。一方でマレイン酸エナラプリル塗布群では処理 2 週間後の皮膚において表皮層がに染色されていた(図 13D)。処理 6 週間後ではコントロール群に比較してマレイン酸エナラプリル塗布群において表皮層により強い染色が観察された(図 13F, 13H)。

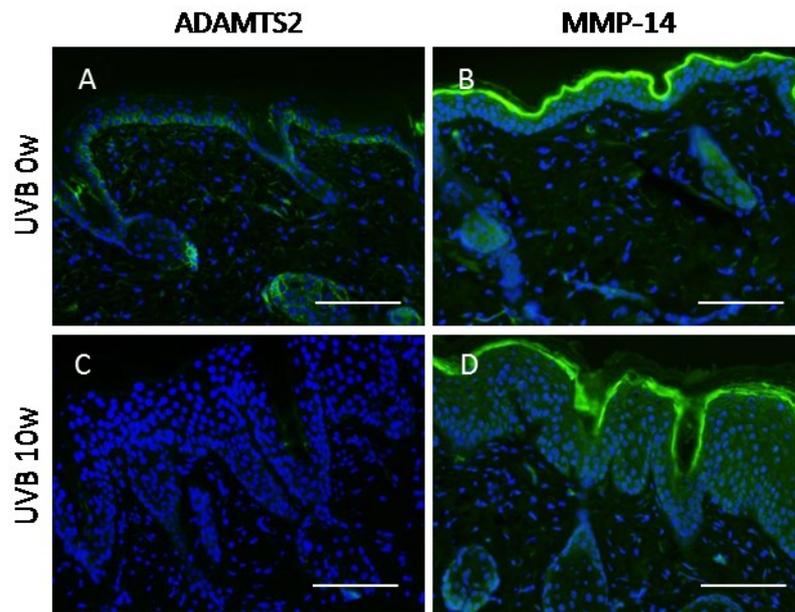


図 12 紫外線照射による ADAMTS2、MMP-14 の分布変化

紫外線照射前 (A、B)、10 週間の紫外線照射後 (C、D) のヘアレスマウスの皮膚を用いて免疫蛍光染色を行った。一次抗体には抗 ADAMTS2 抗体 (A、C: 緑色)、抗 MMP14 抗体 (B、D: 緑色) を用いた。青は細胞核を表す。スケールバーは 100 μm を示す。

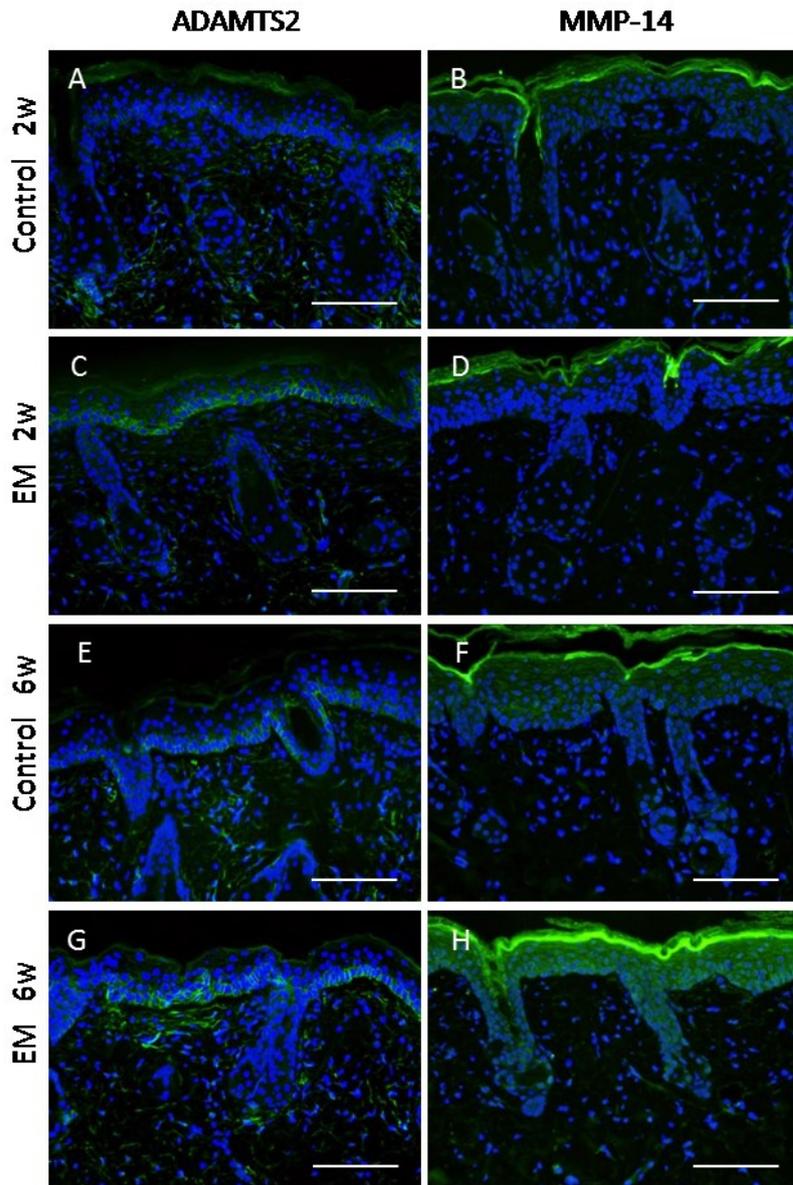


図 13 紫外線照射後のマレイン酸エナラプリル塗布による **ADAMTS2**、**MMP-14** の分布変化

紫外線照射 10 週間と 1 週間の間隔期間の後に薬剤塗布を開始し、2 週間後 (A-D) および 6 週間後 (E-H) のコントロール群 (A、B、E、F)、マレイン酸エナラプリル塗布群 (C、D、G、H) のヘアレスマウスの皮膚を用いて免疫蛍光染色を行った。一次抗体には抗 ADAMTS2 抗体 (A、C、E、G: 緑色)、抗 MMP14 抗体 (B、D、F、H: 緑色) を用いた。青色は細胞核を表す。スケールバーは 100 μm を示す。

2.3.4. 紫外線照射とマレイン酸エナラプリル塗布による表皮分化マーカーの分布変化

マイクロアレイ解析において表皮形成にかかわる GO タームが抽出され、そこには表皮の分化に関与する *involucrin* 遺伝子が含まれていた。*involucrin* のタンパク質の皮膚における分布の変化を免疫蛍光染色にて解析したところ、UVB 照射前のヘアレスマウス皮膚では表皮顆粒層の最外一層が連続的に染色されたが (図 14A)、10 週間の UVB 照射後の皮膚においては染色が抄出していた (図 14B)。10 週間の UVB 照射後、Control 群の 6 週間後の皮膚では表皮の最外一層が弱く断続的に染色されたが (図 14C)、マレイン酸エナラプリル塗布群の皮膚では UVB 照射前と同様に表皮の最外一層が連続的に染色された (図 14D)。

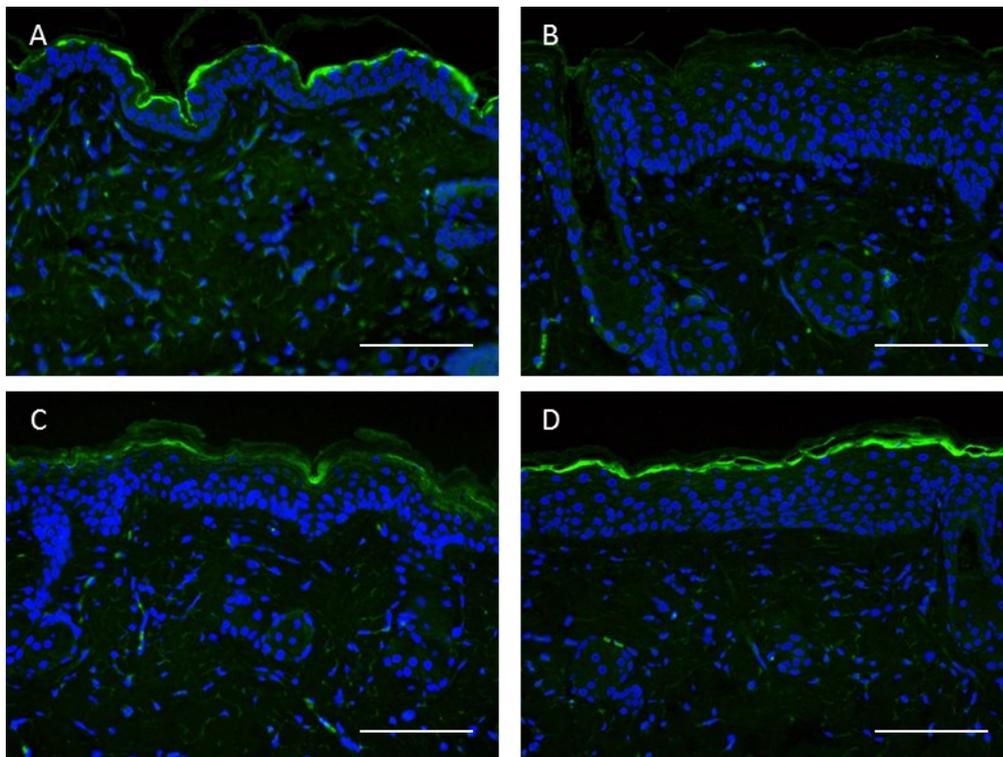


図 14 紫外線照射とマレイン酸エナラプリル塗布によるインボルクリンの分布変化

紫外線照射前 (a)、10 週間の紫外線照射後 (b)、6 週間薬剤塗布を行ったコントロール群 (c) とマレイン酸エナラプリル塗布群 (d) のヘアレスマウス皮膚を用いてインボルクリン (緑色) の免疫蛍光染色を行った。青色は細胞核を表す。スケールバーは 100 μm を示す。

2.4. 考察

第 1 章で示した通り、長期にわたって断続的に UVB 照射を行ったヘアレスマウスの皮膚では ACE やアンジオテンシン II の発現が上昇し、ACE 阻害薬であるマレイン酸エナラプリルを塗布することで UVB による皮膚ダメージやシワの改善が促進される。本章では、このマレイン酸エナラプリルによるシワ改善過程における遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析し、細胞外マトリクス成分の増加、表皮分化に関わる遺伝子の増加を検出した。マイクロアレイデータの解析に WAD 法を用いたが、WAD 法はアレイのシグナル強度をもとに遺伝子の順位付けを行うためにデザインされた方法で、各群のシグナル強度の平均値の差 (Average difference; AD) と相対的なシグナル強度のログ値 (Weight; w) を掛け合わせた値を WAD 統計量として算出する方法である [94]。発現の変化率だけをもとに発現変化を検出すると、発現量が小さいものをより変化した遺伝子として検出しやすく、再現性がとれない危険性があるが、WAD 法では WAD 統計値にシグナル強度の大きさが反映されるため、より発現が大きく変化しているものを上位に捉えることが可能である [94]。この方法により、細胞外マトリクス関連遺伝子の変化をとらえた。

細胞外マトリクスとシワの形成や改善の関係についてはこれまでも報告されている。UVB 刺激は MMP やエラスターゼなどの皮膚中のプロテアーゼを活性化し、細胞外マトリクス成分を壊してシワの形成に関与する [16, 90, 91]。一方でレチノイドはヒトやマウスの皮膚においてシワを改善する効果が知られているが、その過程において、コラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリクス成分が増加することも知られている [31, 33, 93]。この点において、UVB 照射マウスにおけるマレイン酸エナラプリルの効果はレチノイドの効果と類似している。本研究では、ヘアレスマウス皮膚中で UVB 照射により減少した I 型コラーゲンがマレイン酸エナラプリル塗布により増加することが示された。I 型コラーゲンは皮膚中の主要な線維性コラーゲンである。UVB 照射により MMP が活性化されコラーゲンなどの細胞外マトリクス成分が分解され減少したと考えられる。マイクロアレイ解析では UVB 照射後から 3 週間後 (塗布 2 週間後) のコントロー

ル群とマレイン酸エナラプリル塗布群の MMP の遺伝子発現変化は検出されなかった。UVB 照射終了後、MMP の活性が継続しているか徐々に沈静化しているかは今回の検討では特定できない。しかし、マレイン酸エナラプリル塗布群では *Col1a1* 遺伝子が増加し、免疫蛍光染色でも I 型コラーゲンの染色がより密に染色されたことから、コラーゲンの分解系よりもむしろ産生を促進することでコラーゲン線維の再構築に寄与していると考えられる。

マイクロアレイ解析では *Col1a1* のほかに、*Col6a1*、*Col15a1*、*Col27a1* の発現増加が検出された。VI 型コラーゲンは分岐鎖構造を持ち、真皮中ではコラーゲン線維束や基底膜に結合している。VI 型コラーゲンは細線維を構成し、真皮中のコラーゲン線維束の間に分布している [95, 96]。XV 型コラーゲン、XXVII 型コラーゲンは線維性のコラーゲンで真皮中に分布していることが報告されている。これらのコラーゲンの真皮中での機能は明らかになっていないが、紫外線によるシワ形成過程では I 型コラーゲンだけでなくこれらのコラーゲンも分解され、マレイン産エナラプリルの塗布によってこれらのコラーゲンも増加したと考えられる。

弾性線維を形成するエラスチンやフィブリリン 1 は UVB 照射によって顕著に減少していた。表皮直下に存在するフィブリリン線維が豊富なオキシタラン線維はエラスチンとフィブリリンが豊富な弾性線維につながっている [8]。本研究で用いたヘアレスマウスの皮膚においては、エラスチン線維は表皮-真皮境界部から真皮層へ向けて線維が密集して存在している様子が免疫蛍光染色で観察されたが、UVB 照射後に減少していた。フィブリリン 1 線維は UVB 照射前の皮膚では表皮直下に塊状に点在していたが、UVB 照射後の皮膚では減少していた。エラスチン、フィブリリン 1 はマレイン酸エナラプリルの塗布によって増加し UVB 照射前の状態に近い染色像が見られた。光老化したヒトの皮膚での研究において、all-トランスレチノイン酸を塗布することでフィブリリン 1 の遺伝子、タンパク質の発現量が増加することが報告されている [31]。本研究ではヘアレスマウスの皮膚においてこれらの弾性線維構成成分は UVB 照射により減少し、そしてその後のマレイン酸エナラプリル塗布によって回復していた。これは all-

トランスレチノイン酸による光老化皮膚の改善過程と同様の現象である。

さらに発現に変化が見られた細胞外マトリクス構成成分にディストログリカン1がある。ディストログリカン1は翻訳後修飾によって細胞表面の α -ディストログリカンと膜貫通型の β -ディストログリカンに分かれて複合体を形成し、細胞-細胞外マトリクス間の結合に関与している。皮膚では表皮基底細胞の基底膜側に存在し、ラミニンの会合、基底膜の形成に必要な成分であることが報告されている[97, 98]。さらに、IL-1 β 刺激によってケラチノサイトが分泌するプロテアーゼによって膜貫通型の β -ディストログリカンがシェディングをうけ、細胞表面の α -ディストログリカンが放出されることが報告されている[97]。IL-1 β はUVB刺激に応じてケラチノサイトが分泌することから、UVB刺激を受けた表皮において、IL-1 β の分泌を介してディストログリカン1のシェディングが生じていると考えられる。その結果UVB照射後のヘアレスマウスの皮膚においては表皮-真皮間のディストログリカン1が消失していた可能性がある。また、マレイン酸エナラプリルの塗布によって基底膜構造の再構築に先立ち、あるいは同時に表皮-真皮境界部のディストログリカン1が発現、分布した可能性が考えられる。

本実験の結果では、細胞外マトリクス構成成分だけでなく、細胞外マトリクスの構造形成や分解に関与する酵素である *Mmp14* と *Adamts2* がマレイン酸エナラプリル塗布を行ったヘアレスマウスの皮膚で増加していた。ADAMTS2は分泌性の procollagen N-proteinase で線維性のI型、II型、III型コラーゲンのプロセッシングに関与している[99, 100]。これは長さや引っ張り強度をもった成熟したコラーゲン線維を形成するために必要な工程である[101]。UVB照射したヘアレスマウス皮膚の回復過程において、マレイン酸エナラプリル塗布によってI型コラーゲンの産生が増加するとともにADAMTS2が増加したことによって、コラーゲン線維の再構築が促進されたと考えられる。MMP-14はI型・II型・III型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、フィブリン、アグリカンなどの多彩な細胞外マトリクスを基質にもち、細胞表面の細胞外マトリクスや成長因子などを分解・放出させることによって細胞機能の制御に関与して

いる[102]。細胞遊走にける膜状仮足、浸潤性細胞の浸潤突起の細胞膜に MMP-14 が発現し、周辺の細胞外マトリクスを分解することで細胞遊走、浸潤のための空間を作り出す働きをしている[102]。さらに、MMP-14 は直接的に細胞外マトリクスを分解するだけでなく、pro-MMP-2、pro-MMP-13 を活性化することで間接的に細胞外マトリクスの分解を促進する機能を持つ[103]。マレイン酸エナラプリル塗布群では MMP-14 の発現が増加しており、シワの改善過程では細胞外マトリクスの合成と同時に分解も行われることで、細胞外マトリクスの再構成が促進されている可能性が示唆される。また、皮膚において、MMP-14 は創傷治癒過程の表皮で発現が亢進すること、また、血管新生を制御しているということが報告されており、表皮の MMP-14 の活性は表皮—真皮間の相互作用を介して血管新生を制御している可能性が示唆されている[104]。さらに Quan らは、ヒトの非露光部皮膚では発現している MMP14 の mRNA が UVB 刺激によって減少すると報告している[105]。UVB 照射による MMP-14 の減少が表皮—真皮間の相互作用を破綻させ、シワの形成やシワの改善の阻害に関与している可能性が考えられるが、皮膚における MMP-14 の機能については明らかになっていないことが多く、さらなる研究が待たれる。

マイクロアレイ解析では細胞外マトリクスに関連する因子だけでなく、表皮の形成に関連する遺伝子群が増加していた。免疫蛍光染色では表皮分化マーカーであるインボルクリンの UVB 照射による減少とマレイン酸エナラプリル塗布による回復が捉えられた。インボルクリンはコーニファイドエンベロープ (CE) の構成成分であり、表皮の分化過程においてインボルクリンやロリクリンがトランスグルタミナーゼによって架橋されることで角質細胞の細胞膜を裏打ちする強靱な構造物を形成する。CE の成熟は表皮バリア機能と深く関連しており、CE が未成熟になることで TEWL が増加することが報告されている[106, 107]。第 1 章においてマレイン酸エナラプリル塗布を行ったヘアレスマウスで表皮肥厚の改善や TEWL の低下が促進されていた。これは、UVB 照射によりインボルクリンが減少し CE が未成熟な状態になっていたものが、マレイン酸エナラプリル塗布によってインボルクリンが増加し、表皮バリア機能の回復が促進されたためと

考えられる。

本章においては、DNA マイクロアレイと免疫蛍光染色の手法を用いて UVB 照射マウスのマレイン酸エナラプリル塗布によるシワ改善過程における細胞外マトリクス成分の変化や表皮分化状態の変化をとらえた。しかし、マレイン酸エナラプリルがこれらの変化にどのように関与しているかは明らかではない。シワの改善効果が知られているレチノイドは炎症性の因子や表皮増殖性に関与する因子の発現を亢進することが知られているが、マレイン酸エナラプリル塗布によるこれらの因子の発現変化は見られなかった。また、第 1 章においても紫外線による表皮肥厚の改善が見られており、表皮肥厚をもたらすレチノイドとは異なる作用が明らかとなった。アンジオテンシン II は IL-1 β による炎症性因子の発現を増加させることや、EGF によるシグナル伝達を介して創傷治癒過程における表皮の遊走や再上皮化に関与していることが報告されている [89, 108]。そのため、マレイン酸エナラプリルは ACE を阻害することでアンジオテンシン II の産生量を減少させ、炎症性因子や表皮増殖性因子の発現を減少させていると考えられる。細胞外マトリクスを増加させるという点においてレチノイドとマレイン酸エナラプリルは共通しているが、炎症性因子や表皮増殖因子の発現の点においては二つの物質の作用は真逆であるといえる。マレイン酸エナラプリルによってアンジオテンシン II による炎症反応が抑制され、細胞外マトリクス成分の発現増加をもたらしたのではないかと考えられる。

2.5. まとめ

UVB 照射後にマレイン酸エナラプリルを塗布したヘアレスマウスの皮膚において細胞外マトリクスの構成成分や関連する酵素の発現が増加し、UVB 照射によって分解された細胞外マトリクスの再構成が促進されていったことが明らかとなった。また、表皮形成に関連する因子も発現が増加しており、表皮バリア機能の回復に寄与していると考えられる。マレイン酸エナラプリルによるこれらの因子の増加の分子メカニズムは明らかとはなっていないが、細胞外マトリクス成分の中でコラーゲンやフィブリリン、エラスチンなどの成分の増加はレチノイド

によるシワの回復過程と共通しており、これらの細胞外マトリクス成分の増加や再構成はシワの回復に必須の過程であると考えられる。

第3章 光老化モデルマウスにおける α -リノレン酸のシワ改善効果

3.1. 序論

第1章、第2章では紫外線による皮膚の炎症惹起にアンジオテンシン II が関与していることが明らかとなった。ACE 阻害薬や AT1 レセプター拮抗薬は紫外線による炎症反応を抑えることによりシワ改善効果をもたらした可能性が示唆されることから、抗炎症作用を持つ物質は紫外線による皮膚ダメージの改善に効果が期待できる。 ω 3 脂肪酸の一種である α -リノレン酸も抗炎症作用を持つことが知られており、紫外線により生じたシワの改善効果が期待できる。 α -リノレン酸はエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸の合成に必要な脂肪酸で、植物油に高濃度に存在することが知られている。哺乳類は生合成することができないことから、食物から摂取する必要がある必須脂肪酸である。 α -リノレン酸はエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などとともに ω 3 系脂肪酸に分類される。EPA は細胞膜リン脂質への取り込みにおいてアラキドン酸と拮抗するため、COX-2 によるプロスタグランジン合成を抑制し、抗炎症作用を示す。 α -リノレン酸はこの EPA の原料となるだけでなく、リノール酸の代謝を抑制することから、アラキドン酸カスケードによる生理活性物質の合成を抑制する[109]。

ω 3 系脂肪酸の経口摂取による効果は糖尿病やメタボリックシンドロームについて報告されている[61-63]。皮膚に対する効果も報告されており、 ω 3 脂肪酸の経口摂取が紫外線による皮膚ダメージや皮膚がんの予防につながることが知られている[64, 110, 111]。また、 ω 3 脂肪酸の外用による効果については、ヒトの皮膚において EPA を塗布することで紫外線による皮膚ダメージを予防する効果が報告されている[65]。このことから、EPA だけでなく、 α -リノレン酸にも紫外線による皮膚ダメージの回復効果が期待できる。

本章では光老化皮膚への α -リノレン酸の効果を検証するため、光老化モデルマウスを用いてシワ改善や皮膚機能への影響を解析した。

3.2. 材料と方法

3.2.1. ヘアレスマウスへの UVB 照射と α - リノレン酸の塗布

第1章の手順と同様にヘアレスマウスの背部皮膚にUVBを10週間照射して、UVBによるシワを形成させた。平均シワグレードが等しくなるようにコントロール群6匹、 α - リノレン酸塗布群5匹に群分けをし、紫外線照射終了1週間後から薬剤塗布を開始した。0.2% (W/V) α - リノレン酸95%エタノール溶液、または95%エタノール溶液(コントロール群)をヘアレスマウスの背部皮膚に週5回、6週間塗布した。

3.2.2. マウス背部皮膚のシワグレード判定

第1章と同様に、塗布開始3週間後と6週間後のシワグレードの判定を Bissett らの方法に従って行った[71]。それぞれのヘアレスマウスに麻酔処理を行い、背部皮膚の写真をデジタルカメラで撮影し、その写真のマウスに施した処置を隠した上で3人の判定者が表1のシワグレードにしたがって判定を行った。3人の判定者の判定の平均値を個々のマウスのシワグレードとし、各群間の差はマン - ホイットニーの U テストにて統計的に解析した。

3.2.3. 皮膚生理機能の測定

皮膚の厚さはダイアルシクネスゲージ(尾崎製作所、東京、日本)を用いて測定し、3回の測定値の平均値を皮膚厚とした。経表皮水分蒸散量(TEWL)はバポメーター(Delfine Technologies, フィンランド)を用いて3回測定し、平均値を求めた。各群間の統計的な差はスチューデントの T テストを用いて解析した。

3.3. 結果

3.3.1. α - リノレン酸塗布によるシワ改善促進効果

紫外線照射終了 1 週間後から 0.2% α - リノレン酸を塗布し、3 週間後、6 週間後の背部皮膚のシワグレードを判定した。塗布開始前のシワグレードはコントロール群、 α - リノレン酸塗布群ともに 7.8 であったが、3 週間後ではコントロール群は 6.0 であるのに対し、 α - リノレン酸塗布群では 4.0 となり、コントロール群に対して有意にシワグレードが減少していた。6 週間後ではコントロール群が 4.0、 α - リノレン酸塗布群は 3.0 にシワグレードが減少していたが、有意な差は見られなかった（図 15）。

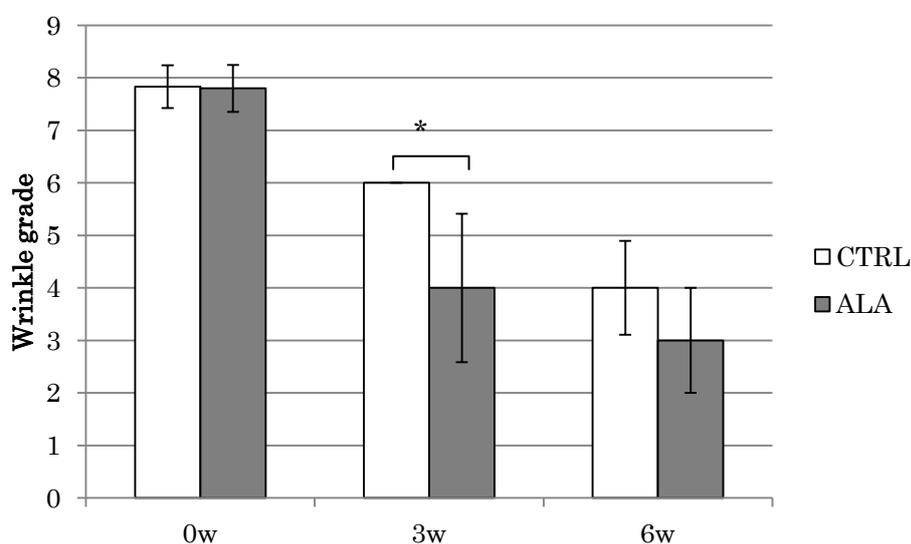


図 15 α - リノレン酸塗布によるヘアレスマウス背部皮膚のシワの改善

10 週間の UVB 照射と 1 週間の間隔期間後、コントロール群（CTRL）には 95%エタノール溶液、 α - リノレン酸塗布群（ALA）には 0.2% α - リノレン酸 95%エタノール溶液を 6 週間塗布した。塗布開始前（0W）、塗布 3 週間後（3W）、6 週間後（6W）シワグレードを判定し平均のシワグレードを求めた。値はコントロール群 6 匹、 α - リノレン酸塗布群 5 匹の平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ 、ステューデントの T 検定。

3.3.2.皮膚生理機能への α -リノレン酸の影響

TEWLの平均値は、3週間後コントロール群は23.0、 α -リノレン酸塗布群では21.1と有意な差はなく、6週間後でもコントロール群22.0、 α -リノレン酸塗布群19.0となり有意な差はなかった(図16)。皮膚の厚さはコントロール群、 α -リノレン酸塗布群共に、塗布開始前と塗布開始3週間後は減少していたが、3週間後から6週間後にかけては変化していなかった。また、実験期間を通じてコントロール群と α -リノレン酸塗布群間に有意な差は見られなかった(図17A)。塗布開始前に対する塗布3週間後、6週間後の皮膚厚の変化量においても、コントロール群、 α -リノレン酸塗布群間に有意な差はなかった(図17B)。 α -リノレン酸は紫外線によるシワの改善を促進する効果を示したが、皮膚厚や表皮バリア機能の改善を促進する効果は見られなかった。

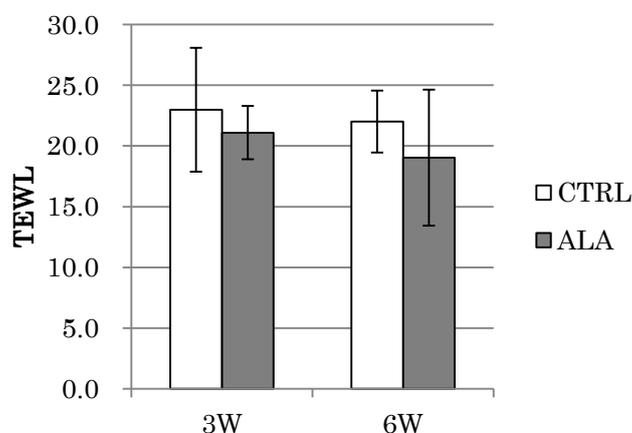


図16 ヘアレスマウス背部皮膚のTEWLの変化

コントロール群(CTRL)、 α -リノレン酸塗布群(ALA)の塗布3週間(3W)、6週間後(6w)のTEWLをバポメーターを用いて測定した。値はコントロール群6匹、 α -リノレン酸塗布群5匹の平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ 、ステューデントのT検定。

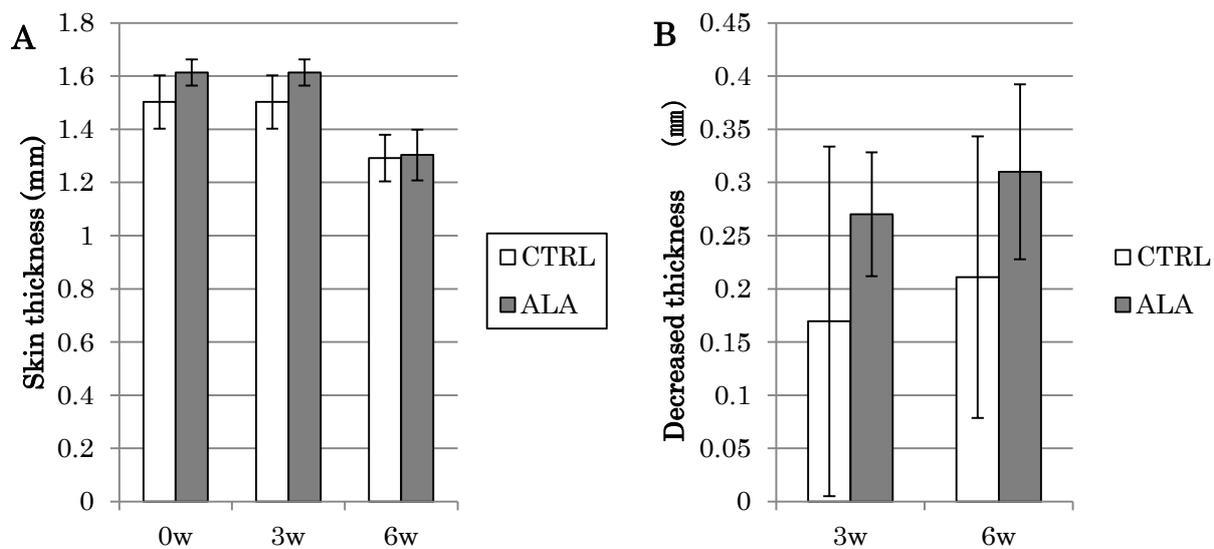


図 17 ヘアレスマウス皮膚の皮膚厚変化

コントロール群 (CTRL) と α -リノレン酸塗布群 (ALA) の塗布開始前 (0W)、塗布 3 週間後 (3W)、6 週間後 (6W) の皮膚厚をダイヤルシックネスゲージにて測定した (A)。塗布開始前から塗布 3 週間後 (3W)、6 週間後 (6W) の皮膚厚の減少量を B に示す。値はコントロール群 6 匹、 α -リノレン酸塗布群 5 匹の平均値 \pm 標準偏差を表す。

3.4. 考察

本章では、紫外線を繰り返し照射したヘアレスマウスを用いて α -リノレン酸の効果解析し、紫外線により形成されたシワの回復を促進する効果を見出した。塗布3週間後ではコントロール群に対して有意にシワが減少していたが、6週間後ではコントロール群においてもシワグレードが平均4.0まで減少しており、そのためコントロール群と α -リノレン酸塗布群で有意な差は認められなかった。TEWLと皮膚厚の計測値においても、塗布3週間後、6週間後とおもにコントロール群と α -リノレン酸塗布群間に有意な差は観察されなかった。皮膚厚は塗布開始前の測定値がコントロール群に対して α -リノレン酸塗布群において厚い傾向があったため、皮膚厚の変化量の比較も行ったが、コントロール群と α -リノレン酸塗布群に差は認められなかった。第1章において、マレイン酸エナラプリル塗布によりシワの改善と同時に皮膚バリア機能の改善や皮膚厚の減少が認められたが、 α -リノレン酸によっては皮膚バリア機能や皮膚の厚さには影響が認められず、シワの改善過程と表皮バリア機能の改善や皮膚厚の減少は必ずしも同時に起こっていない。マレイン酸エナラプリルの皮膚改善作用と比較して、 α -リノレン酸の効果は小さく、このような差が表れた可能性も考えられるが、作用機序が異なることも考えられる。 α -リノレン酸の塗布量による効果の変化の解析や詳細な作用機序の解析が必要である。

α -リノレン酸はEPAやDHAの原料となる ω 3脂肪酸である。不飽和脂肪酸の代謝物であるエイコサノイドは皮膚の創傷やアレルギーなどによる炎症過程に関与している。アラキドン酸リン酸エステル、 γ -リノレン酸、EPAを前駆体としてシクロオキシゲナーゼ(COX)、プロスタノイド合成酵素(PGS)、リポキシゲナーゼ(LOX)シトクロムP450(CYP)などの酵素により合成されたエイコサノイドが様々な生理作用を示す。同じく必須脂肪酸である ω 6脂肪酸由来のプロスタグランジン(PG)類PGD₂、PGE₂、PGI₂などは強い生理活性を持っている。PGE₂は表皮ケラチノサイトの増殖を促進することで、創傷治癒過程を促進すること、PGI₂は血管の透過性を亢進させることが知られている[86, 112]。COXには定常的に発現しているCOX-1と炎症時に発現が誘導される

COX-2 があるが、COX-2 は皮膚の自然老化、光老化とも関連しており、真皮線維芽細胞の COX-2 の発現は臀部の皮膚と比べて顔面部の皮膚で著しく増加していることや、ヒトの皮膚において COX-2 の遺伝子発現は紫外線照射によって誘導され、PGE2 分泌も増加することが報告されている [22, 66]。真皮線維芽細胞の COX-2 の発現は IL-1 刺激によって誘導され、PGE2 は表皮ケラチノサイトの増殖を促進することで、創傷治癒過程においては再上皮化を促進する機能を持つ [86]。このように、皮膚の光老化や紫外線による炎症反応において、 ω 6 脂肪酸由来のエイコサノイドが炎症メディエーターとして機能している。一方で、 ω 3 脂肪酸は抗酸化、抗炎症効果が知られている。これは、COX や LOX などの ω 6 脂肪酸の代謝を行う酵素が ω 3 脂肪酸の代謝にも使われることで競合するためである。EPA の代謝物である PGE3 やヒドロキシエイコサペンタエン酸 (HEPE) は生理活性が低いため、PGE2 などの炎症活性の高いアラキドン酸代謝物の産生を減らす働きをする [112]。この ω 3 脂肪酸の抗炎症作用がシワの改善促進に寄与したと考えられる。

ω 3 脂肪酸の皮膚への作用については、経口摂取による効果が多く報告されているが [64]、Kim らがヒトの皮膚において EPA 塗布による紫外線皮膚ダメージの予防効果を報告されている [65]。Kim らは紫外線照射前に EPA を塗布していることで、紫外線による表皮肥厚やコラーゲン合成の低下、MMP、COX-2 の発現誘導が抑制したことから光老化に対する EPA の効果を示した [65]。また、自然老化した皮膚において、EPA 塗布により TGF- β が活性化し、コラーゲン、エラスチン、フィブリリン-1 の発現を増加させる効果も示している [65]。このように、EPA が紫外線による皮膚ダメージの予防だけでなく、細胞外マトリクスの合成を促進して皮膚老化に対する効果を示すことが報告されている。EPA は生体内で α -リノレン酸から合成されるため、 α -リノレン酸塗布におけるシワ改善効果は EPA へ代謝されることで生じた可能性も考えられる。しかし、 α -リノレン酸から EPA に代謝される量は 10%程度であるといわれており、 α -リノレン酸自体がシワ改善促進の効果を持つ可能性、DHA などの代謝物が作用した可能性も考えられる。シワ改善促進への活性本体については、本研究で用いたものと

同様のヘアレスマウスの実験系を用いて、 α -リノレン酸とその代謝物である EPA や DHA の効果を比較するなどの解析が必要である。

3.5. まとめ

本章では、皮膚の光老化のモデル動物として紫外線を長期間照射したヘアレスマウスの皮膚において、 α -リノレン酸がシワ改善を促進する効果を明らかにした。 α -リノレン酸は ω 6 脂肪酸の代謝を拮抗的に抑制し PGE2 などの炎症メディエーターの産生を抑制する効果があることから、この抗炎症効果がシワの改善をもたらした可能性が考えられる。

総括

レニン - アンジオテンシンシステムは血圧制御を行う重要なホルモンシステムである一方で、最近では末梢組織での局所的な作用についても注目されている [48, 50-52]。皮膚においてもレニン - アンジオテンシンシステムが機能しており、創傷治癒過程や肥厚性瘢痕、線維症など炎症を伴う皮膚生理、病理においてアンジオテンシン II が関与していると考えられる [38-43, 56, 57]。紫外線照射による炎症反応や紫外線への長期間にわたる曝露による慢性的な炎症反応により光老化が誘導されることがよく知られているが、これらの紫外線による皮膚の炎症反応とアンジオテンシン II との関連については明らかとなっていなかった [58-60]。そこで、本研究においては皮膚の光老化過程におけるアンジオテンシン II の関与を明らかにするため、光老化モデルマウスにおけるアンジオテンシン II 関連因子の発現変化と紫外線によるシワへの ACE 阻害薬、AT1 レセプター拮抗薬の効果を解析するとともに、その過程における皮膚中の細胞外マトリクスの発現、分布の変化を解析した。さらに、ヒトの光老化や自然老化におけるアンジオテンシン II の関与を明らかとするとともに、アンジオテンシン II の皮膚への作用メカニズムについても解析を試みた。

第 1 章では長期間にわたり紫外線を浴びることによって生じる皮膚障害やシワの形成へのアンジオテンシン II の関与を検討するため、ヒトの光老化と類似した特徴を示す光老化モデルマウスを用いて、紫外線照射前後のアンジオテンシン II 関連因子の発現変化を解析した。UVB に繰り返し曝露されたヘアレスマウスの背部皮膚にはヒトの光老化に類似したシワが形成され、表皮肥厚が観察される。8 週間の紫外線照射後の皮膚においてはアンジオテンシン II や ACE が紫外線照射前と比較してやや強く染色された。さらに、AT1 レセプターは紫外線照射前のヘアレスマウス皮膚においては真皮細胞に染色が見られ表皮細胞にはほとんど染色が認められなかったが、紫外線照射後においては真皮細胞に加え、表皮基底細胞の細胞膜に強い染色が観察された。また、AT2 レセプターは紫外線照射前には真皮中にも表皮中にもほとんど染色されなかったが、紫外線照射後は

真皮中の表皮に近い部分に AT2 レセプター陽性の細胞が多く存在する様子が観察された。このことから、長期間にわたる紫外線照射によって AT1、AT2 レセプターの発現が真皮、表皮で増加し、アンジオテンシン II が活性化していることが示唆された。

長期間にわたり紫外線を浴びることによって生じた皮膚ダメージやシワは、紫外線終了後 7 週間後においても継続していた。しかし、ACE 阻害薬であるマレイン酸エナラプリルを塗布することで、これらの皮膚障害の改善が促進されることが明らかとなった。シワの改善に伴い、皮膚厚、表皮厚が減少し表皮肥厚が改善した。さらに、TEWL も減少していたことから、表皮バリア機能が改善されたことが示された。EGF レセプターの発現・活性化に AT1 レセプターを介したシグナル伝達に関与しており、紫外線照射後の表皮基底細胞に AT1 レセプターの発現が見られたことから、紫外線刺激による過剰な表皮増殖に AT1 レセプターを介したシグナル伝達に関与していると考えられる。ACE 阻害薬によってアンジオテンシン II の産生が抑制されたことで、AT1 レセプターを介した表皮増殖性亢進が抑制され、表皮の増殖と分化のバランスが正常化し表皮バリア機能が改善されたと考えられる。真皮層においても AT1、AT2 レセプターが発現しており、紫外線照射による炎症反応、シワの形成に関与している可能性が示された。紫外線照射後、AT2 レセプターを発現している細胞が表皮直下に増加しており、この細胞が炎症反応と真皮の異常に関与している可能性がある。その一方で、AT1 レセプターの真皮層での発現は紫外線照射前後で大きく変化していなかったが、AT1 レセプター拮抗薬であるバルサルタン、ロサルタンの塗布によっても ACE 阻害薬と同様のシワ改善効果が確認されたことから、AT1 レセプターを介したシグナル伝達も真皮中の炎症反応において重要な役割を果たしていると考えられる。

第 2 章ではマレイン酸エナラプリル塗布によるシワ改善過程における遺伝子発現変化について DNA マイクロアレイを用いて解析し、細胞外マトリクスに関連する遺伝子群、表皮形成に関連する遺伝子群の発現変化を捉えた。I 型コラーゲン、エラスチン、フィブリリン 1 などは、紫外線による皮膚老化、シワの形成

や改善との関連が報告されているが[16, 31, 90, 91]、マレイン酸エナラプリル塗布においても紫外線により減少したこれらの因子が増加することが確認された。また、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現解析をしたことにより、*Col15a1*、*Col27a1*などのマイナーなコラーゲン鎖やディストログリカン1など皮膚老化との関連について明らかとなっていない分子の遺伝子発現の増加を検出した。ディストログリカン1の免疫蛍光染色では、真皮-表皮境界部に存在するディストログリカン1が紫外線照射により減少し、マレイン酸エナラプリル塗布により回復する様子も観察された。ディストログリカン1はラミニンの会合に関与し基底膜の形成に必要とされていることから、紫外線照射による基底膜の分解と再構築をマレイン酸エナラプリルが促進していると考えられる[97, 98]。また、マレイン酸エナラプリルによるシワの改善過程においてはコラーゲンのプロセッシングに関与するADAMTS2の発現が増加しており、I型コラーゲン線維の成熟を促していたと考えられる。またMMP-14の発現も増加していたが、シワの形成や改善におけるMMP-14の機能についてはさらなる研究が必要である。紫外線を照射した皮膚ではMMPなどのタンパク質分解酵素が活性化し、真皮の細胞外マトリクスが分解されて、真皮構造が変化し、「シワ」という外観的变化をもたらしている。紫外線ダメージを受けた真皮構造を再構成するためには、皮膚中の細胞による細胞外マトリクスの産生が亢進するとともに、細胞外マトリクスの構造的な成熟が必要であると考えられる。マレイン酸エナラプリルは細胞外マトリクスの遺伝子発現を増加させるとともに、ADAMTS2やMMP14などの細胞外マトリクスの分解や構造の成熟に必要な因子の発現も増加させ、細胞外マトリクスの再構成が促進されることで、表現型としてシワの改善を促進していることが示唆された。また、表皮形成に関連する遺伝子群の中で、インボルクリンの発現変化を免疫蛍光染色でとらえた。インボルクリンは角質細胞の細胞膜を裏打ちする強靱な構造体であるCEの構成成分である[106, 107]。紫外線照射前では表皮顆粒層に染色されていたインボルクリンが、紫外線照射後ではほとんど染色されず、第1章で観察されたように紫外線照射により表皮肥厚が観察されたことから、紫外線照射により表皮の増殖性が亢進する一方で分化過程に異常が生じ、

CE が未成熟な状態になったと考えられる。マレイン酸エナラプリル塗布によってインボルクリンの分布は紫外線照射前と同様の状態に回復しており、第 1 章で示された TEWL の低下とともに表皮バリア機能の回復を誘導したと考えられる。

このように第 1 章、第 2 章ではヘアレスマウスに紫外線を長期間照射した光老化モデル動物を用いて、紫外線による皮膚ダメージとシワの形成過程におけるアンジオテンシン II の関与を示すとともに、ACE 阻害薬や AT1 レセプター拮抗薬によりアンジオテンシン II の活性を阻害することで、細胞外マトリクスの再構築の促進や表皮バリア機能の回復が促されることを示し、これらの薬剤が皮膚光老化の改善に有用である可能性が示唆された。この皮膚の改善過程はアンジオテンシン II の活性を阻害することによる炎症反応の抑制によるものであることが示唆される。

第 3 章では、同じく紫外線を長期間照射した光老化モデルマウスを用いて、抗炎症作用を持つことが知られている α - リノレン酸について、皮膚ダメージやシワの改善に対する効果を解析し、 α - リノレン酸の塗布によりシワの改善が促進されることが明らかとなった。 α - リノレン酸は ω 3 脂肪酸の一種で、生体内で一部は EPA や DHA に代謝される。これらの ω 3 脂肪酸は ω 6 脂肪酸の代謝によって作られる PGE2 などの強い炎症メディエーターの産生を抑制することにより、抗炎症作用を示す[109]。この効果から経口摂取により糖尿病やメタボリックシンドロームへの効果が期待される一方、皮膚においても EPA の塗布による皮膚の紫外線ダメージ予防効果が報告されている[61-65]。今回のヘアレスマウスを用いた検討において、塗布した α - リノレン酸が生体内で EPA に代謝され紫外線ダメージの改善に寄与した可能性や、 α - リノレン酸自体や DHA など他の代謝産物が作用本体である可能性が考えられる。 α - リノレン酸をはじめとする ω 3 脂肪酸はその抗炎症効果から皮膚の光老化の改善への効果が期待される。

本研究では紫外線を長期間照射することで、ヒトの光老化皮膚と類似したシワや表皮肥厚などの形質変化を示す光老化モデルマウスを用いて、第 1 章・第 2 章ではアンジオテンシン II の皮膚光老化への関与と ACE 阻害薬・AT1 レセプター拮抗薬による皮膚ダメージの改善効果、第 3 章では α - リノレン酸のシワ改善

効果を明らかにした。同様の実験系においてレチノイドがシワの改善効果を示すことが知られており、また、レチノイドはヒトの皮膚においてもシワの改善効果を示す[29-31]。レチノイドはその作用機序において AP-1 の情報伝達を抑制することが示されているが、表皮肥厚や紅斑などの炎症反応を伴うことも報告されている[29, 113]。しかし、ACE 阻害薬・AT1 レセプター拮抗薬と α -リノレン酸による作用は、共通して炎症を抑制することにある。これらの薬剤を塗布した皮膚では紫外線による炎症が抑制されることで、表皮ではターンオーバーが正常化して皮膚バリア機能が回復し、真皮では真皮細胞による細胞外マトリクス構造の再構築が促進されたと考えられる。これらの結果から、紫外線により形成したシワや皮膚障害を改善するためには、炎症を制御することが有効であることが示唆される。本研究において、ヘアレスマウスで効果が示されたレニン-アンジオテンシン系の抑制や ω 3 脂肪酸などによる抗炎症作用は紫外線による皮膚の光老化改善への効果が期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたっては、東京農工大学農学部・新井浩司准教授、西山敏夫教授に終始適切なお指導、ご助言を賜りました。先生方には大学学部時代からご指導とご支援、そして温かい激励を賜り、私の研究者として基盤を形成してくださいました。また、宇都宮大学農学部・蕪山由己人教授には副指導教官として、東京農工大学・三浦豊教授、茨城大学・米倉政実教授には副査として、貴重なご助言を賜りました。先生方のご指導に厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科・阿部啓子特任教授、弘前大学食料科学研究所・中井雄治教授には、バイオインフォマティクスの技術を用いて機能性食品の研究に取り組まれてこられたご経験から、本研究の目的に最適なマイクロアレイデータ解析の手法の選択、実際の解析をご指導いただきました。マイクロアレイデータの取り扱いが初めてである私に丁寧にご指導くださいました先生方に深く感謝いたします。

本研究では東京農工大学農学部細胞組織生化学研究室・小関理恵子氏、菊田彩子氏、笠原薫氏、山口翔子氏、行方優子氏、田村裕美子氏、有賀美沙樹氏、片山友晶氏に実験のサポートをいただきました。また、大学院への入学、学位論文の作成にあたっては、資生堂リサーチセンター・常長誠氏、入山俊介氏をはじめ職場の皆様のご理解とサポートをいただきました。皆様のご理解とご協力がなければ、在職中に研究を進めることは不可能でした。皆様のご温かいご支援に深く感謝申し上げます。

最後に、入学を後押ししてくれた両親、生活面、精神面でのサポートをしてくれた夫に感謝したいと思います。

本研究を進め博士論文を作成するにあたって、お世話になったすべての方々に改めて厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al., *Molecular Biology of the Cell, 4th edition.* 2002.
2. Holbrook, A.K., *皮膚の微細構造と機能*, in *皮膚の健康科学*, Ishibashi, Y. and Parrish, J.A., Editors. 1994, 南山堂.145-172.
3. Nishiyama, T., Amano, S., Tsunenaga, M., et al., *The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane.* J Dermatol Sci, 2000. **24 Suppl 1**: S51-59.
4. Tsuruta, D., Hashimoto, T., Hamill, K.J., et al., *Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing.* J Dermatol Sci, 2011. **62**(1): 1-7.
5. Koide, A. Hayashi, T., *Clinical and basic - extracellular matrix* 2000: 1-51,188-206, 231-270.
6. Contet-Audonneau, J.L., Jeanmaire, C. and Pauly, G., *A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas.* Br J Dermatol, 1999. **140**(6): 1038-1047.
7. Matsuura-Hachiya, Y., Arai, K.Y., Adachi, E., et al., *Enhancement of epidermal basement membrane formation by synthetic inhibitors of extracellular matrix-degrading enzymes.* Curr Tissue Eng, 2015. **in press**.
8. Matsuura-Hachiya, Y., Arai, K.Y. and Nishiyama, T., *Extracellular matrix in epidermal basement membrane zone and its changes with aging and photoaging.* Aesthetic Dermatology, 2015. **25**(1): 22-32.
9. Battie, C. Verschoore, M., *Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage.* Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2012. **78 Suppl 1**: S9-s14.
10. Gilchrest, B.A., *Photoaging.* J Invest Dermatol, 2013. **133**(E1): E2-6.
11. Soter, N.A., *Acute effects of ultraviolet radiation on the skin.* Semin Dermatol, 1990. **9**(1): 11-15.
12. Cox, N.H., Diffey, B.L. and Farr, P.M., *The relationship between chronological age and the erythematous response to ultraviolet B radiation.* Br J Dermatol, 1992. **126**(4):

- 315-319.
13. Kohl, E., Steinbauer, J., Landthaler, M., et al., *Skin ageing*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011. **25**(8): 873-884.
 14. Harding, C.R., Aho, S. and Bosko, C.A., *Filaggrin - revisited*. Int J Cosmet Sci, 2013. **35**(5): 412-423.
 15. Rawlings, A.V.Harding, C.R., *Moisturization and skin barrier function*. Dermatol Ther, 2004. **17 Suppl 1**: 43-48.
 16. Inomata, S., Matsunaga, Y., Amano, S., et al., *Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(1): 128-134.
 17. Kambayashi, H., Yamashita, M., Odake, Y., et al., *Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse*. J Dermatol Sci, 2001. **27 Suppl 1**: S19-25.
 18. Wan, Y.S., Wang, Z.Q., Shao, Y., et al., *Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo*. Int J Oncol, 2001. **18**(3): 461-466.
 19. Li, Y., Bi, Z., Yan, B., et al., *UVB radiation induces expression of HIF-1alpha and VEGF through the EGFR/PI3K/DEC1 pathway*. Int J Mol Med, 2006. **18**(4): 713-719.
 20. Paz, M.L., Ferrari, A., Weill, F.S., et al., *Time-course evaluation and treatment of skin inflammatory immune response after ultraviolet B irradiation*. Cytokine, 2008. **44**(1): 70-77.
 21. Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J., *Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review*. Int J Cosmet Sci, 2005. **27**(1): 17-34.
 22. Surowiak, P., Gansukh, T., Donizy, P., et al., *Increase in cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in keratinocytes and dermal fibroblasts in photoaged skin*. J Cosmet Dermatol, 2014. **13**(3): 195-201.

23. Lee, M.E., Kim, S.R., Lee, S., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibitors modulate skin aging in a catalytic activity-independent manner*. Exp Mol Med, 2012. **44**(9): 536-544.
24. Seo, S.J., Choi, H.G., Chung, H.J., et al., *Time course of expression of mRNA of inducible nitric oxide synthase and generation of nitric oxide by ultraviolet B in keratinocyte cell lines*. Br J Dermatol, 2002. **147**(4): 655-662.
25. Sander, C.S., Chang, H., Salzman, S., et al., *Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(4): 618-625.
26. Weber, S.U., Thiele, J.J., Cross, C.E., et al., *Vitamin C, uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(6): 1128-1132.
27. Hellemans, L., Corstjens, H., Neven, A., et al., *Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(3): 434-439.
28. Dreher, F., Maibach, H.I., *Protective effects of topical antioxidants in humans*. Curr Probl Dermatol, 2001. **29**: 157-164.
29. Fisher, G.J., Voorhees, J.J., *Molecular mechanisms of retinoid actions in skin*. Faseb j, 1996. **10**(9): 1002-1013.
30. Chen, S., Kiss, I. and Tramposch, K.M., *Effects of all-trans retinoic acid on UVB-irradiated and non-irradiated hairless mouse skin*. J Invest Dermatol, 1992. **98**(2): 248-254.
31. Watson, R.E., Craven, N.M., Kang, S., et al., *A short-term screening protocol, using fibrillin-1 as a reporter molecule, for photoaging repair agents*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(5): 672-678.
32. Calikoglu, E., Sorg, O., Tran, C., et al., *UVA and UVB decrease the expression of CD44 and hyaluronate in mouse epidermis, which is counteracted by topical retinoids*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(5): 1342-1347.
33. Schwartz, E., Kligman, L.H., *Topical tretinoin increases the tropoelastin and*

- fibronectin content of photoaged hairless mouse skin.* J Invest Dermatol, 1995. **104**(4): 518-522.
34. Son, E.D., Shim, J.H., Choi, H., et al., *Cathepsin G inhibitor prevents ultraviolet B-induced photoaging in hairless mice via inhibition of fibronectin fragmentation.* Dermatology, 2012. **224**(4): 352-360.
35. Cho, H.S., Lee, M.H., Lee, J.W., et al., *Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation.* Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2007. **23**(5): 155-162.
36. Lee, K.O., Kim, S.N. and Kim, Y.C., *Anti-wrinkle Effects of Water Extracts of Teas in Hairless Mouse.* Toxicol Res, 2014. **30**(4): 283-289.
37. Hwang, E., Park, S.Y., Lee, H.J., et al., *Vigna angularis water extracts protect against ultraviolet b-exposed skin aging in vitro and in vivo.* J Med Food, 2014. **17**(12): 1339-1349.
38. Steckelings, U.M., Henz, B.M., Wiehstutz, S., et al., *Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing.* Br J Dermatol, 2005. **153**(5): 887-893.
39. Takeda, H., Katagata, Y., Hozumi, Y., et al., *Effects of angiotensin II receptor signaling during skin wound healing.* Am J Pathol, 2004. **165**(5): 1653-1662.
40. Yahata, Y., Shirakata, Y., Tokumaru, S., et al., *A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation.* J Biol Chem, 2006. **281**(19): 13209-13216.
41. Morihara, K., Takai, S., Takenaka, H., et al., *Cutaneous tissue angiotensin-converting enzyme may participate in pathologic scar formation in human skin.* J Am Acad Dermatol, 2006. **54**(2): 251-257.
42. Stawski, L., Han, R., Bujor, A.M., et al., *Angiotensin II induces skin fibrosis: a*

- novel mouse model of dermal fibrosis*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(4): R194.
43. Steckelings, U.M., Wollschlager, T., Peters, J., et al., *Human skin: source of and target organ for angiotensin II*. Exp Dermatol, 2004. **13**(3): 148-154.
44. Higuchi, S., Ohtsu, H., Suzuki, H., et al., *Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology*. Clin Sci (Lond), 2007. **112**(8): 417-428.
45. Mehta, P.K.Griendling, K.K., *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): C82-97.
46. Costerousse, O., Jaspard, E., Allegrini, J., et al., [*Angiotensin converting enzyme (kininase II). Molecular and physiological aspects*]. C R Seances Soc Biol Fil, 1992. **186**(6): 586-598.
47. Vaidya, A., Brown, J.M. and Williams, J.S., *The renin-angiotensin-aldosterone system and calcium-regulatory hormones*. J Hum Hypertens, 2015.
48. Zhuo, J.L., Ferrao, F.M., Zheng, Y., et al., *New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: 166.
49. Meyers, R.S.Siu, A., *Pharmacotherapy review of chronic pediatric hypertension*. Clin Ther, 2011. **33**(10): 1331-1356.
50. Morimoto, S., Yano, Y., Maki, K., et al., *Renal and vascular protective effects of telmisartan in patients with essential hypertension*. Hypertens Res, 2006. **29**(8): 567-572.
51. Das, U.N., *Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule?* Med Sci Monit, 2005. **11**(5): Ra155-162.
52. Geisterfer, A.A., Peach, M.J. and Owens, G.K., *Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells*. Circ Res, 1988. **62**(4): 749-756.
53. Amano, S., Ogura, Y., Akutsu, N., et al., *Protective effect of matrix*

- metalloproteinase inhibitors against epidermal basement membrane damage: skin equivalents partially mimic photoageing process.* Br J Dermatol, 2005. **153 Suppl 2**: 37-46.
54. Benigni, A., Cassis, P. and Remuzzi, G., *Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging.* EMBO Mol Med, 2010. **2(7)**: 247-257.
55. Griending, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells.* Circ Res, 1994. **74(6)**: 1141-1148.
56. Nakai, K., Yoneda, K., Igarashi, J., et al., *Angiotensin II enhances EGF receptor expression levels via ROS formation in HaCaT cells.* J Dermatol Sci, 2008. **51(3)**: 181-189.
57. Tang, H.T., Cheng, D.S., Jia, Y.T., et al., *Angiotensin II induces type I collagen gene expression in human dermal fibroblasts through an AP-1/TGF-beta1-dependent pathway.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **385(3)**: 418-423.
58. Matsumura, Y., Ananthaswamy, H.N., *Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin.* Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **195(3)**: 298-308.
59. Schwarz, T., Schwarz, A., *DNA repair and cytokine responses.* J Investig Dermatol Symp Proc, 2009. **14(1)**: 63-66.
60. Ali, F., Sultana, S., *Repeated short-term stress synergizes the ROS signalling through up regulation of NFkB and iNOS expression induced due to combined exposure of trichloroethylene and UVB rays.* Mol Cell Biochem, 2012. **360(1-2)**: 133-145.
61. Billman, G.E., *The effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac rhythm: a critical reassessment.* Pharmacol Ther, 2013. **140(1)**: 53-80.
62. Russo, G.L., *Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention.* Biochem Pharmacol, 2009. **77(6)**: 937-946.
63. Wu, J.H., Micha, R., Imamura, F., et al., *Omega-3 fatty acids and incident type 2*

- diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Br J Nutr, 2012. **107 Suppl 2**: S214-227.
64. Latreille, J., Kesse-Guyot, E., Malvy, D., et al., *Association between dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids and severity of skin photoaging in a middle-aged Caucasian population*. J Dermatol Sci, 2013. **72**(3): 233-239.
65. Kim, H.H., Cho, S., Lee, S., et al., *Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo*. J Lipid Res, 2006. **47**(5): 921-930.
66. Seo, J.Y., Kim, E.K., Lee, S.H., et al., *Enhanced expression of cyclooxygenase-2 by UV in aged human skin in vivo*. Mech Ageing Dev, 2003. **124**(8-9): 903-910.
67. Liu, H.W., Cheng, B., Yu, W.L., et al., *Angiotensin II regulates phosphoinositide 3 kinase/Akt cascade via a negative crosstalk between AT1 and AT2 receptors in skin fibroblasts of human hypertrophic scars*. Life Sci, 2006. **79**(5): 475-483.
68. Ren, M., Hao, S., Yang, C., et al., *Angiotensin II regulates collagen metabolism through modulating tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in diabetic skin tissues*. Diab Vasc Dis Res, 2013. **10**(5): 426-435.
69. Schwartz, E., Sapadin, A.N. and Kligman, L.H., *Ultraviolet B radiation increases steady-state mRNA levels for cytokines and integrins in hairless mouse skin: modulation by topical tretinoin*. Arch Dermatol Res, 1998. **290**(3): 137-144.
70. Sato, Y., Mukai, K., Watanabe, S., et al., *The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining*. Am J Pathol, 1986. **125**(3): 431-435.
71. Bissett, D.L., Hannon, D.P. and Orr, T.V., *An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin*. Photochem Photobiol, 1987. **46**(3): 367-378.
72. Ishitsuka, Y., Maniwa, F., Koide, C., et al., *Detection of modified tyrosines as an inflammation marker in a photo-aged skin model*. Photochem Photobiol, 2007. **83**(3): 698-705.
73. Bennett, M.F., Robinson, M.K., Baron, E.D., et al., *Skin immune systems and*

- inflammation: protector of the skin or promoter of aging?* J Invest Dermatol Symp Proc, 2008. **13**(1): 15-19.
74. Ong, H.T., *Are angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers especially useful for cardiovascular protection?* J Am Board Fam Med, 2009. **22**(6): 686-697.
75. Molteni, A., Wolfe, L.F., Ward, W.F., et al., *Effect of an angiotensin II receptor blocker and two angiotensin converting enzyme inhibitors on transforming growth factor-beta (TGF-beta) and alpha-actomyosin (alpha SMA), important mediators of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis.* Curr Pharm Des, 2007. **13**(13): 1307-1316.
76. Zafar, I., Tao, Y., Falk, S., et al., *Effect of statin and angiotensin-converting enzyme inhibition on structural and hemodynamic alterations in autosomal dominant polycystic kidney disease model.* Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(3): F854-859.
77. Mahmoudpour, S.H., Leusink, M., van der Putten, L., et al., *Pharmacogenetics of ACE inhibitor-induced angioedema and cough: a systematic review and meta-analysis.* Pharmacogenomics, 2013. **14**(3): 249-260.
78. Saeed, A.K., Salmo, N., *Epidermal growth factor receptor expression in mice skin upon ultraviolet B exposure - Seborrheic Keratosis as a coincidental and unique finding.* Adv Biomed Res, 2012. **1**: 59.
79. Lewis, D.A., Yi, Q., Travers, J.B., et al., *UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(4): 1346-1353.
80. Lewis, D.A., Spandau, D.F., *UVB-induced activation of NF-kappaB is regulated by the IGF-1R and dependent on p38 MAPK.* J Invest Dermatol, 2008. **128**(4): 1022-1029.
81. Yao, Y., Wolverson, J.E., Zhang, Q., et al., *Ultraviolet B radiation generated platelet-activating factor receptor agonist formation involves EGF-R-mediated*

- reactive oxygen species*. J Immunol, 2009. **182**(5): 2842-2848.
82. Nakajima, M., Hutchinson, H.G., Fujinaga, M., et al., *The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): 10663-10667.
83. An, L., Dong, G.Q., Gao, Q., et al., *Effects of UVA on TNF-alpha, IL-1beta, and IL-10 expression levels in human keratinocytes and intervention studies with an antioxidant and a JNK inhibitor*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2010. **26**(1): 28-35.
84. Nasti, T.H.Timares, L., *Inflammasome activation of IL-1 family mediators in response to cutaneous photodamage*. Photochem Photobiol, 2012. **88**(5): 1111-1125.
85. Boxman, I.L., Ruwhof, C., Boerman, O.C., et al., *Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1*. Arch Dermatol Res, 1996. **288**(7): 391-398.
86. Arai, K.Y., Fujioka, A., Okamura, R., et al., *Stimulatory effect of fibroblast-derived prostaglandin E2 on keratinocyte stratification in the skin equivalent*. Wound Repair Regen, 2014. **22**(6): 701-711.
87. Nakamura, T., Hasegawa-Nakamura, K., Sakoda, K., et al., *Involvement of angiotensin II type 1 receptors in interleukin-1beta-induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts*. Eur J Oral Sci, 2011. **119**(5): 345-351.
88. Galan, M., Miguel, M., Beltran, A.E., et al., *Angiotensin II differentially modulates cyclooxygenase-2, microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and prostaglandin I2 synthase expression in adventitial fibroblasts exposed to inflammatory stimuli*. J Hypertens, 2011. **29**(3): 529-536.
89. Okada, M., Yamawaki, H. and Hara, Y., *Angiotensin II enhances interleukin-1 beta-induced MMP-9 secretion in adult rat cardiac fibroblasts*. J Vet Med Sci, 2010. **72**(6): 735-739.
90. Imokawa, G., *Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of fibroblast-derived elastase*. Arch Dermatol

Res, 2008. **300 Suppl 1**: S7-20.

91. Imokawa, G., *Mechanism of UVB-induced wrinkling of the skin: paracrine cytokine linkage between keratinocytes and fibroblasts leading to the stimulation of elastase.* J Invest Dermatol Symp Proc, 2009. **14**(1): 36-43.
92. Gilchrest, B.A., *Treatment of photodamage with topical tretinoin: an overview.* J Am Acad Dermatol, 1997. **36**(3 Pt 2): S27-36.
93. Lateef, H., Stevens, M.J. and Varani, J., *All-trans-retinoic acid suppresses matrix metalloproteinase activity and increases collagen synthesis in diabetic human skin in organ culture.* Am J Pathol, 2004. **165**(1): 167-174.
94. Kadota, K., Nakai, Y. and Shimizu, K., *A weighted average difference method for detecting differentially expressed genes from microarray data.* Algorithms Mol Biol, 2008. **3**: 8.
95. Kielty, C.M. Shuttleworth, C.A., *Microfibrillar elements of the dermal matrix.* Microsc Res Tech, 1997. **38**(4): 413-427.
96. Sabatelli, P., Gara, S.K., Grumati, P., et al., *Expression of the collagen VI alpha5 and alpha6 chains in normal human skin and in skin of patients with collagen VI-related myopathies.* J Invest Dermatol, 2011. **131**(1): 99-107.
97. Herzog, C., Has, C., Franzke, C.W., et al., *Dystroglycan in skin and cutaneous cells: beta-subunit is shed from the cell surface.* J Invest Dermatol, 2004. **122**(6): 1372-1380.
98. Sirour, C., Hidalgo, M., Bello, V., et al., *Dystroglycan is involved in skin morphogenesis downstream of the Notch signaling pathway.* Mol Biol Cell, 2011. **22**(16): 2957-2969.
99. Le Goff, C., Somerville, R.P., Kesteloot, F., et al., *Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis.* Development, 2006. **133**(8): 1587-1596.
100. Wang, W.M., Lee, S., Steiglit, B.M., et al., *Transforming growth factor-beta*

- induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase.* J Biol Chem, 2003. **278**(21): 19549-19557.
101. Colige, A., Nuytinck, L., Hausser, I., et al., *Novel types of mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIC) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene.* J Invest Dermatol, 2004. **123**(4): 656-663.
102. Itoh, Y., *MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue.* IUBMB Life, 2006. **58**(10): 589-596.
103. Knauper, V., Will, H., Lopez-Otin, C., et al., *Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme.* J Biol Chem, 1996. **271**(29): 17124-17131.
104. Zigrino, P., Ayachi, O., Schild, A., et al., *Loss of epidermal MMP-14 expression interferes with angiogenesis but not with re-epithelialization.* Eur J Cell Biol, 2012. **91**(10): 748-756.
105. Quan, T., Qin, Z., Xia, W., et al., *Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging.* J Investig Dermatol Symp Proc, 2009. **14**(1): 20-24.
106. Kikuchi, K., Kobayashi, H., Hirao, T., et al., *Improvement of mild inflammatory changes of the facial skin induced by winter environment with daily applications of a moisturizing cream. A half-side test of biophysical skin parameters, cytokine expression pattern and the formation of cornified envelope.* Dermatology, 2003. **207**(3): 269-275.
107. Kunii, T., Hirao, T., Kikuchi, K., et al., *Stratum corneum lipid profile and maturation pattern of corneocytes in the outermost layer of fresh scars: the presence of immature corneocytes plays a much more important role in the barrier dysfunction than do changes in intercellular lipids.* Br J Dermatol, 2003. **149**(4): 749-756.
108. Sauter, N.S., Thienel, C., Plutino, Y., et al., *Angiotensin II Induces IL-1beta-mediated Islet Inflammation and beta-cell Dysfunction Independently of*

Vasoconstrictory Effects. Diabetes, 2014.

109. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.T., et al., *Harper's Illustrated Biochemistry.* 2003.
110. Rhodes, L.E., O'Farrell, S., Jackson, M.J., et al., *Dietary fish-oil supplementation in humans reduces UVB-erythema sensitivity but increases epidermal lipid peroxidation.* J Invest Dermatol, 1994. **103**(2): 151-154.
111. Orengo, I.F., Black, H.S. and Wolf, J.E., Jr., *Influence of fish oil supplementation on the minimal erythema dose in humans.* Arch Dermatol Res, 1992. **284**(4): 219-221.
112. Nicolaou, A., *Eicosanoids in skin inflammation.* Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 2013. **88**(1): 131-138.
113. Varani, J., Fligiel, H., Zhang, J., et al., *Separation of retinoid-induced epidermal and dermal thickening from skin irritation.* Arch Dermatol Res, 2003. **295**(6): 255-262.