

哺乳類の皮膚恒常性維持機構に関わる  
細胞及び分子動態の研究

飛石 恵

# 主 論 文

# 目次

要旨	1
第一章 序論	4
第二章 UVB 照射による表皮ヒアルロン酸 (HA) 代謝変化	
序論	6
材料と方法	8
結果	11
考察	17
第三章 加齢及び UVB 照射による色素沈着変化	
序論	20
材料と方法	21
結果	
1. A1 モルモットにおける自然加齢による色素沈着変化	24
2. 加齢による UVB 照射後の A1 モルモットの皮膚変化	28
考察	34
謝辞	37
参考文献	38

## 要旨

外界と身体の内部を隔てる組織である皮膚は、様々な外部刺激から人体を守っている。皮膚は表皮、真皮から構成されている。表皮は外界に接するため、生体防御に重要な働きを担っている。

表皮は主に表皮角化細胞（ケラチノサイト）と色素細胞（メラノサイト）より構成される。ケラチノサイトは層構造を成しており、最も深層の基底層で増殖し、次第に浅層へと押し出され、それにつれて有棘細胞、顆粒細胞と形態を変えながら分化する。最外層でケラチノサイトは脱核し、バリア機能を有する角層を形成する。そして、最終的に皮膚から剥離する。表皮は、基底層で分裂した細胞から新たな細胞が供給され、古くなった細胞が剥離するという細胞の更新（ターンオーバー）により、恒常性が維持されている。

我々が浴びている太陽光には、表皮内にまで到達する紫外線（UV）が含まれている。皮膚が UV に曝露されると DNA の損傷や炎症等が惹起されるが、これに対する生体防御反応として、ケラチノサイトは一過的に増殖を促進させ、自身のターンオーバー速度を速めダメージを受けた細胞を早急に体外へと排出する。またケラチノサイトの間にある一定の割合で存在するメラノサイトは、紫外線を吸収する色素であるメラニンを過剰に合成し、周囲のケラチノサイトへ受け渡して UV が皮膚深部へ到達するのを防ぐ。その後これらの反応は収束し、皮膚は UV 曝露前の定常状態に戻る。この様にダメージを受けた皮膚は、ダメージから回復し元の状態に戻る恒常性の維持機能を備えている。従って、UV に対する表皮の反応やその後の回復を調べることは、皮膚恒常性の維持機能を知る上で重要な手がかりになると考えられる。

UV の波長によって分類される UVA (400-315 nm)、UVB (315-280 nm)、UVC (280 nm 未満)のうち、UVB は表皮深部にまで到達し、生体に強いダメージを与える。今回、UVB に対する表皮の反応を調べるために、ケラチノサイトが産生し、皮膚に豊富に存在する高分子多糖類であるヒアルロン酸（HA）に着目した。そして、UVB 照射によりケラチノサイトが過増殖しその後回復する過程における HA の代謝変化を調べた。また、メラノサイトについては、加齢による色素沈着変化を調べた。

HA は細胞外マトリックスに存在し、構造物としての役割に加え、皮膚以外では異なる分子量の HA が異なる生理活性を持つことが知られている。皮膚においては、HA は増殖や分化に関与することが知られているが、HA の分子量の違いによる生理活性の違いについては解明されていない。それどころか、皮膚において HA の分子量が変化するのかに関する報告もなかった。そこで、UVB 照射によるケラチノサイトの増殖により表皮が肥厚し、その後回復する過程において、HA 分子量の変化を検討した。UVB をマウスに照射し、5 日目までの表皮の HA の量、局在、分子量、及び HA 合成酵素遺伝子群 (*Has*) mRNA と HA 分解酵素遺伝子群 (*Hyal*) mRNA の蓄積レベルを調べ

た。その結果、増殖細胞が最も多く認められる UVB 照射後 2 日目において、HA 量と *Has3* mRNA の蓄積レベルが最大となった。2 日目までは HA 平均分子量は 1000 kDa と大きく、未照射の HA 平均分子量と同じであったが、3 日目に HA 平均分子量は 100 kDa へと劇的に低分子化した。このとき *Hya1* mRNA 蓄積レベルの増加は僅かであり、また HA 量は増加したままであった。細胞の増殖速度がもとに戻る照射後 4, 5 日目では HA 量は減少したが、HA の平均分子量は低分子化したままであった。また、*Has3* のタンパク質発現量や HA 合成活性については未確認であるものの、その mRNA の蓄積パターンの変動より UVB 照射後の細胞増殖には、*Has3* により合成される HA が関与する可能性が考えられる。UVB 照射 3 日目以降の表皮肥厚が元に戻る過程において、HA の低分子化が認められたことより、HA の分解機構や低分子 HA の生理活性が UV 障害からの回復に関与すると考えられる。従って HA の分解機構や低分子 HA の生理活性を研究することで、皮膚恒常性の維持機能がさらに解明できると考えられる。

一方、通常 UVB に曝露されるとメラニンの増加により皮膚全体に色素沈着がおこるが、その後この色素沈着は回復する。UVB に晒され続けた皮膚に多く認められる局所的な色素沈着は、加齢により数が増加し、色が濃くなることが知られている。このことから、色素沈着の形成には UVB に加えて、加齢が深く関与していると考えられる。しかしながら、適切なモデル動物がないため、UVB 曝露を伴わない自然加齢においてどのように色素沈着が形成されるかに関してはほとんど報告例がなかった。さらに、UVB 照射後の色素沈着の形成及び回復に、加齢変化が及ぼす影響についてもほとんど研究されていなかった。A1 モルモットはヒトと同程度に表皮にメラノサイトをもつ実験動物である。そこで、まず加齢による色素沈着形成について調べるために若齢から老齢までの A1 モルモットにおける、皮膚色、メラニン分布、メラノサイトの数及び分布について検討を行った。また、UVB 照射後の色素沈着の形成及び回復の加齢変化についても検討を行った。

まず、加齢に伴う色素沈着形成を確認した。その結果、皮膚を測色すると明度を示す L\*値が減少し、組織学的観察からメラニン量およびメラノサイト数の増加が認められた。メラノサイトは若齢では均一に分布していたが、加齢に伴い線状、帯状に分布し凝集した。A1 モルモットは加齢による色素沈着モデルとして有用であると考えられた。

次に若齢及び老齢モルモットを用いて、UVB 照射後の反応における加齢の影響を解析した。UVB 照射後、色素沈着に先立ち皮膚色が赤みを示す紅斑反応が生じるが、この反応は加齢に伴い鈍くなった。UVB 照射後の色素沈着形成について検討した結果、老若ともに UVB 照射後の L\*値から未照射の L\*値を引いた L\*値は同等に低下し、メラニン量およびメラノサイト数の増加が認められた。一方、色素沈着の回復においては加齢により変化が認められた。若齢モルモットでは UVB 照射後 21 日目以降、徐々に L\*値が回復、増加したメラニンおよびメラノサイト数も未照射と同程度に戻った。

しかし、老齡モルモットでは色素沈着の回復が認められず、21 日目以降  $L^*$ 値はほとんど変化せず、メラニン量およびメラノサイト数も増加したままであった。以上の様に本研究は老若間で UVB 照射後の色素沈着の回復が異なることを初めて見出した。今後は、色素沈着が残存するメカニズムを解明することで、皮膚恒常性の維持機能について、更なる知見が得られると考えられる。

## 第一章 序論

皮膚は身体全体の表面を覆っており、外界と身体の内部を隔てる組織である。皮膚は表皮、真皮から形成されるが（図 1）、特に表皮は外界に接するため、様々な刺激から人体を守っている。表皮の重要な機能は、皮膚の弾力性や水分を保持することに加え、外部刺激に対して、生体内部の環境を保護し恒常的に維持することである。

代表的な外部刺激に紫外線（UV）が挙げられる。我々が日ごろ浴びている太陽光は波長によって分類され、UVA（400-315 nm）、UVB（315-280 nm）、UVC（280 nm 未満）と呼ばれる紫外線が含まれている。特に UVB は表皮深部に到達し、DNA の損傷や炎症等を惹起する主要な紫外線として知られている（Tamaki et al. 2002）。

ヒトの表皮は分化度の異なる表皮角化細胞（ケラチノサイト）で構成され、内側から基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞が存在し、皮膚の最も外側には角層がある（図 1）。ケラチノサイトは基底層で増殖し、有棘層、顆粒層へと押し出され、表層に向かうにつれて分化し、最外層で脱核した扁平細胞となりバリア機能を有する角層を形成するが、この角層は最終的に皮膚から剥離する。すなわち、基底層で分裂した細胞から新たな細胞が供給され、古くなった細胞が角層から剥離されるまでのケラチノサイトのターンオーバーが繰り返されている（Houben et al. 2007）。

皮膚では恒常的に体内から角層を通して微量の水分が体外に放出されるが、これを経皮水分蒸散量（Transepidermal water loss : TEWL）と呼び、皮膚のバリア機能を反映する指標として一般に用いられる。UVB に晒されると、TEWL が増加する（Haratake et al. 1997）。これは、皮膚ダメージに伴い皮膚のバリア機能が低下し、体外への水分放出が高まったことによる（Haratake et al. 1997）。さらには DNA 損傷や炎症によりダメージを受けた細胞を早急に体外へと排出するためにケラチノサイトの過増殖が惹起され、一過的にターンオーバーが促進される（Haratake et al. 1997）。

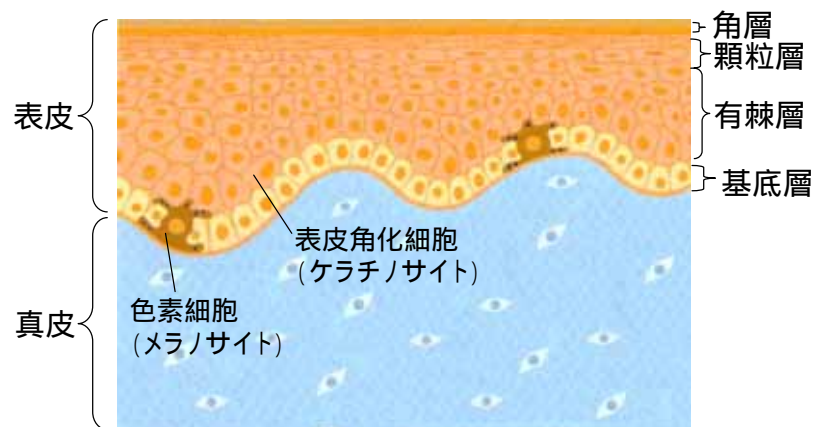


図1. 皮膚の構造

皮膚は外側より、表皮、真皮から形成される。表皮は主に表皮角化細胞（ケラチノサイト）より形成され、内側から基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞が層構造を作り、最外層に角層が存在する。また、基底層には色素細胞（メラノサイト）が存在する。

表皮の細胞外マトリックスにはケラチノサイト自身が産生するヒアルロン酸 (HA) が豊富に存在する (Tammi et al. 1988)。HA は細胞間の空間の維持に加え、高い水分保持能をもつことから、皮膚の重要な機能である保水や弾力性に関与すると考えられている (Verdier et al. 2007)。HA は組織の構造体として重要であることに加えて、皮膚以外では分子量変化により異なる生理活性を示すことが知られている。しかし、皮膚における HA の生理活性についてはほとんど研究がされていない。

一方、ヒト表皮の基底層にはケラチノサイト約 10 個に 1 個の割合で色素細胞 (メラノサイト) が存在する。メラノサイトは膜小器官であるメラノソームを保持し、そこで UVB を吸収する色素であるメラニンが合成される (Gilchrist et al. 1996)。メラノサイトは UVB に晒されると一過的に活発にメラニンを合成し周囲のケラチノサイトへメラニンを受け渡して表皮全体に色素沈着を形成し、皮膚深部への更なる UVB の侵入を防ぐ。その後メラニン合成は定常状態に戻り、ケラチノサイトに転送されたメラニンがケラチノサイトのターンオーバーに伴い排出されることで、色素沈着は回復する (Gilchrist et al. 1996)。

ケラチノサイトでは通常は外部刺激により、種々のサイトカインの産生、分泌が高まることが知られている (Tamaki et al. 2004)。UVB に晒されると、ケラチノサイトからは interleukin (IL)-6、IL-8、interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) などの産生、分泌が増加するが、これらのサイトカインは炎症の発生に関与する (Morelli et al. 1993)。UVB に晒されたケラチノサイトによる keratinocyte growth factor (KGF) (Kakizaki et al. 2008) や transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) (James et al. 1991) 等の産生、分泌増加も知られているが、これらのサイトカインは主にケラチノサイトの増殖に関与する (Rubin et al. 1995, Krueger et al. 1990)。さらに、UVB に晒されたケラチノサイトから  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone (MSH)、endothelin-1 (ET-1)、stem cell factor (SCF)、basic fibroblast growth factor (bFGF) が産生、分泌され、メラノサイトに作用して細胞増殖とメラニン合成を亢進させる (Morelli et al. 1993)。

以上の如く表皮は UVB に晒されると、一過的に生体防御反応を示し、その後 UVB 曝露前の定常状態に戻る。この様にダメージを受けた皮膚は、ダメージから回復し元の状態に戻る恒常性の維持機能を備えている。従って、UVB に対するケラチノサイトおよびメラノサイトの反応やその後の回復過程を調べることは、皮膚恒常性の維持機能を知る上で重要な手がかりになると考えられる。

今回、UVB による表皮の反応を調べるため、ケラチノサイトについては HA に着目し、UVB 照射によりケラチノサイトが過増殖しその後回復する過程における HA 代謝変化を調べた。メラノサイトについては、UVB による色素沈着における加齢変化を調べた。



## 第二章 UVB 照射による表皮ヒアルロン酸 (HA) 代謝変化

### 序論

HA は、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルコサミンからなるグリコサミノグリカンで細胞外マトリックスとして存在し、細胞の増殖、分化、移動に関与することが知られている (Laurent et al. 1992)。HA 合成を担うと考えられている HA 合成酵素遺伝子群 (Hyaluronan synthase genes; *Has*) をコードする遺伝子として *Has1,2,3* が同定されているが (Itano et al 1996, Watanabe et al. 1996, Spicer et al. 1996)、何れの *Has* タンパク質も生体内における働きについての詳細は不明である。*Has1,2,3* にコードされるタンパク質は、いずれも膜貫通型の構造をもつと推測され、さらに細胞内ドメインに触媒部位を持ち、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルコサミンを交互に付加する活性をもつと考えられている (Yoshida et al. 2000)。皮膚においては、サイトカインによる *Has* mRNA の蓄積レベルの変動が報告されており、ヒトのケラチノサイトでは IFN- $\gamma$  により *Has3* mRNA の蓄積レベルが増加し (Sayo et al. 2002)、ラットのケラチノサイトでは KGF による *Has2* 及び *Has3* mRNA の蓄積レベルの増加が確認されている (Karvinen et al. 2003)。HA 分解を担うと考えられている HA 分解酵素遺伝子群 (Hyaluronidase genes; *Hyal*) としては *Hyal1, Hyal2, Hyal3, Hyal4, Hyal5, PHyal1* が同定されているが (Csoka et al. 2001, Zhang H et al. 2005)、*Has* 同様に何れの *Hyal* タンパク質も生体内における働きは不明である。ヒト皮膚において、UVB 照射後に *Hyal1* 及び *Hyal3* の mRNA の蓄積レベルが増加すると報告されている (Averbeck et al. 2007)。HA 分解活性については、組換えタンパク質を用いた検討がされており、*Hyal1* (Frost et al. 1997) 及び *Hyal2* (Lepperdinger et al. 1998) については分解活性を示す報告があるが、*Hyal3* の HA 分解活性については不明な点が多い (Lokeshwar et al. 2002, Atmuri et al. 2008)。*Hyal4* については 遺伝子が同定されているものの (Csoka et al. 2001)、HA 分解活性を示した報告はない。*Hyal5* については、最近遺伝子が同定されたばかりで (Zhang H et al. 2005)、知見が少ない。*PHyal1* は偽遺伝子でヒトでは翻訳されていない。

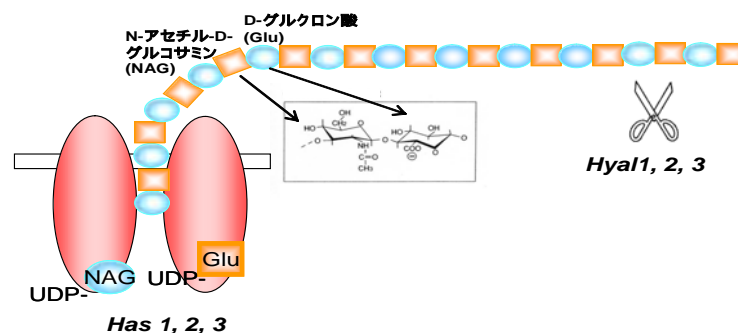


図2. HA 合成及び分解の模式図  
HAはN-アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸が交互に並ぶグリコサミノグリカンであり、合成酵素 Hyaluronan synthases に対して *Has1,2,3* の遺伝子が同定されている。*Has* は分子内に異なる2つの単糖に対する活性部位を持つことから、N-アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸を交互に付加すると考えられている。HA 分解は *Hyal* (Hyaluronidase) が担っており、代表的な遺伝子に *Hyal1,2,3*がある。

HA は脳や関節に多いことが知られているが、皮膚にも豊富に存在する。皮膚において、HA は細胞間空間の維持、皮膚の水分保持や弾力性に関与し、構造体として重要な役割を果たすと考えられている。一方、皮膚以外では HA は分子量サイズの違いに応じて様々な生理活性を示すことが報告されている。例えば高分子 HA は血管新生を抑制し抗炎症作用を示すが (Bollyky et al. 2007, Tempel et al. 2000)、低分子 HA は血管新生を促進し、炎症を促進することが報告されている (West et al. 1985, Nobel et al. 1996, McKee et al. 1996)。皮膚において、HA は創傷時の細胞の移動、増殖、分化 (Rilla et al. 2002, Karvinen et al. 2003, Seppanen et al. 2003, Rilla et al. 2004) に関与することが報告されているが、分子量による生理活性の違いについては解明されていない。そもそも、表皮において HA の分子量が変化するのかについてさえ知られていない。

UVB に晒されるとケラチノサイトの増殖が促進され、これに伴い表皮全体の厚みが増す表皮肥厚が認められる。さらに過増殖によるケラチノサイトの分化異常がおり、バリア機能が壊れて経皮水分蒸散量 (TEWL) が増加する。これらの反応は一過的でその後回復する (Haratake et al. 1997)。今回、この過程における表皮 HA の代謝変化 (分子量サイズの変化等) について調べるため、マウスに UVB を照射し、表皮 HA の量、分子量、局在、および HA 合成酵素遺伝子群 *Has* と HA 分解酵素遺伝子群 *Hyal* の mRNA の蓄積レベルについて検討を行った。

## 材料と方法

### 動物

ヘアレスマウス (Hos-HR1) の6週齢の雄を日本 SLC より購入し、環境温度  $22\pm 1$  °C、相対湿度  $55\pm 10\%$ 、12 時間照明 (午前 8 時点灯、午後 8 時消灯) 環境下の飼育室で飼育し 10 週齢で供試した。餌はマウス飼育用固形飼料 (CE-2 日本クレア製) を充分量与え、水は水道水を自動給水で自由飲水とした。動物管理は実験動物ガイドラインを遵守して行った。

### UVB 照射

医療用紫外線照射装置デルマレイ (M-DER-320 形、クリニカルサプライ製) に中波長領域紫外線 (UVB) ランプ (FL32SE30 ランプ、東芝医療機器製) を装着し、 $150 \text{ mJ/cm}^2$  の UVB を照射した。

### 経皮水分蒸散量 (Transepidermal water loss: TEWL) 測定

UVB 照射後 1、2、3、4、5 日目に、ヘアレスマウス背部の TEWL を Electrolytic water analyzer (ミーコ製) を用いて測定した。値は  $\text{mg/cm}^2/\text{minute}$  で示した。

### 表皮厚測定

パラフィン包埋した皮膚を  $5 \mu\text{m}$  に薄切し、切片をスライドガラスに貼り付けた後、ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色を施した。H&E 染色像をコンピュータに取り込み、Microanalyzer (Nihon Poladigital 製) を用いて表皮厚を測定した。

### HA 抽出

表皮サンプルを得るために、 $1000 \text{ U/ml dispase}$ /リン酸緩衝液 (PBS) を浸したろ紙の上に皮膚をおき、 $37^\circ\text{C}$ 、2 時間インキュベートして真皮を取り除き、表皮のみを凍結乾燥した後、 $0.2 \text{ mg/ml proteinase K}$ /lysis バッファー ( $50 \text{ mM Tris}$ ,  $0.5\% \text{ SDS}$ ,  $100 \text{ mM EDTA}$ ) で  $55^\circ\text{C}$ 、2 時間反応させ、フェノール・クロロホルム処理にて HA を抽出後、 $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

### HA 定量

HA 結合タンパク質 (Hyaluronan binding protein: HABP) サンドイッチアッセイを用いて HA 定量を行った。96 ウェルプレートを HABP (生化学工業製) でプレコートし、 $0.05\% \text{ Tween/PBS}$  で洗浄後、 $5\% \text{ BSA}$  で室温 2 時間ブロッキングし、再度  $0.05\% \text{ Tween/PBS}$  で洗浄して、HABP プレートを作製した。表皮サンプルもしくは標準 HA 標品を室温で、2-48 時間反応させ、 $0.05\% \text{ Tween}/1.5\text{M NaCl}$  で洗浄した。ペルオキシダーゼ標識された HABP で室温 30 分間反応させた後、TMB 溶液 (Moss Inc 製) を用

いて発色し、0.18M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で発色を止め 450nmの吸光度を測定した。

HA 分子量測定では、表皮より抽出した HA 1 μg を Sephacryl S-1000 column (1.1 cm × 95cm) (Amersham Bioscience 製) にアプライし、0.5M NaCl で溶出した。フラクションを回収後、HA 量を HABP サンドイッチアッセイ にて定量した。フードケミファ社より入手した平均分子量 1200 kDa 及び 100 kDa HA をスタンダードとして使用した。

#### HA/CD44 染色

皮膚組織を Tissue-Tek (Sakura Finetechnical 製) を用いて凍結包埋した。クリオスタットを用いて 7 μm に薄切し、切片を APS (アミノシラン) コートスライドガラス (マツナミ製) に貼りつけた後、乾燥させた。PBS で洗浄後、4% パラフォルムアルデヒドで室温 10 分間固定した。ビオチン化 HABP (b-HABP) (5 μg/ml; 生化学工業製) とラット抗マウス CD44 抗体 (2.5 μg/ml; PharMingen 製) で 4 一晩反応させた後、PBS で洗浄した。b-HABP はストレプトアビジン FITC (1:200 BIOSOURCE 製) で、CD44 は Cy3 標識抗ラット IgG (1:200 Jackson Immuno Research Laboratory 製) で各々検出し、ベクタシールド (Vector Laboratory 製) で封入した。

#### RNA 抽出及び定量的 RT-PCR

TRIzol (Invitrogen 製) で total RNA を抽出し、RNeasy Kit (Qiagen 製) を用いて精製した。cDNA を High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem 製) を使用して合成した。定量的 RT-PCR は Applied Biosystems TaqMan PCR reagent と TaqMan Gene Expression Assay プローブ (*HAS1* Mm00468496\_m1, *HAS2* Mm00515089\_m1, *HAS3* Mm00515091\_m1, *HYAL1* Mm00476206\_m1, *HYAL2* Mm00477731\_m1, *HYAL3* Mm00662097\_m1, *b-actin* Mm00607939\_s1) を使用して行い、ABI Prism 700 SDS Real-Time PCR system (Applied Biosystem 製) を用いて解析を行った。

#### *Has3* mRNA *in situ* hybridization

皮膚組織をパラフィン包埋し、ミクロトームを用いて 5 μm に薄切し、切片を MAS コートスライドガラス (マツナミ製) に貼りつけた後、脱パラフィンして 0.2N HCl で 20 分間前処理後、5 μg/ml proteinase K で 37 10 分間反応させた。4% PFA で 20 分間前固定し、2mg/ml glycine/PBS で 15 分間、2 回処理した後、0.25% acetic anhydride/triethanolamine バッファーで 10 分間反応させた。DIG ラベルした *Has3* anti-sense RNA プロブ (Sayo et al. 2002) を使用した。50% formamide/4 ×

sodium citrate/chloride buffer (SSC) でプレハイブリダイゼーションし、RNA プローブ (0.25 ng/ $\mu$ l)/ハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide, 4 $\times$  SSC, 10 mM Tris-HCl バッファー, 1 $\times$  Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 250  $\mu$ g/ml yeast tRNA, 500  $\mu$ g/ml heated denatured salmon sperm DNA, 0.2% lauroylsarcosine) を湿潤チャンバー内で 60 16 時間反応させた。60 に加温した 50% formamide/2 $\times$  SSC で 30 分間、2 $\times$  SSC で 20 分間、0.2 $\times$  SSC で 20 分間洗浄後、アルカリフォスファターゼラベルした DIG 抗体 (Roche 製) を反応させ、NBT/BCIP (Roche 製) で発色した。

#### Ki67 染色

脱パラフィンした切片を 1000 倍希釈した抗 Ki67 抗体 (Novocastra 製) 溶液で 4 一晩反応させた。添付プロトコルに従い染色を行い、Vectastain Elite ABC キット (Vector Laboratories 製) を用いて発色させた。

#### 統計解析

統計解析は Dunnett 多重比較を用いた。

## 結果

### [UVB 照射後の表皮変化]

UVB 照射後の表皮変化を経日的に調べるために、150 mJ/cm<sup>2</sup>の UVB をマウス背部に単回照射後 1、2、3、4、5 日目について検討を行った。バリア機能の指標である経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定し、細胞増殖の指標とするために表皮厚を計測した。また、増殖細胞を検出するために抗 Ki67 抗体染色を施した。TEWL は 3 日目で未照射の 10 倍増加し、その後徐々に減少した (図 3a)。UVB により顕著な表皮バリア崩壊が認められたが、その後回復したことを表している。表皮厚は 2 日目で未照射の 2 倍増加し 3 日目で最大値をとった後、徐々に減少した (図 3b)。また、Ki67 陽性 (+) 細胞は 2 日目の基底層で多く観察された (図 4)。基底層のケラチノサイトで細胞増殖が惹起され、それに伴い表皮が肥厚するが、その後回復することが確認できた。

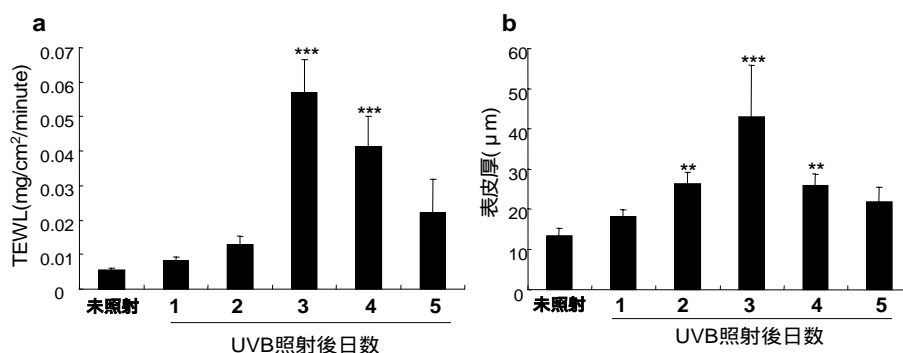


図3. UVB 照射後の TEWL 及び表皮厚変化  
ヘアレスマウスの背部に UVB (150 mJ/cm<sup>2</sup>) を単回照射した。(a) 未照射及び UVB 照射後のマウス背部の TEWL を測定した。(b) UVB 照射後、皮膚を固定し Hematoxylin Eosin (H&E) 染色を施し、表皮厚を測定した。グラフは平均 ± 標準偏差を表す (n=6)。統計解析は Dunnett 多重比較 (vs. 未照射) を行った。\*\*はp<0.01, \*\*\*はp<0.001を示す。

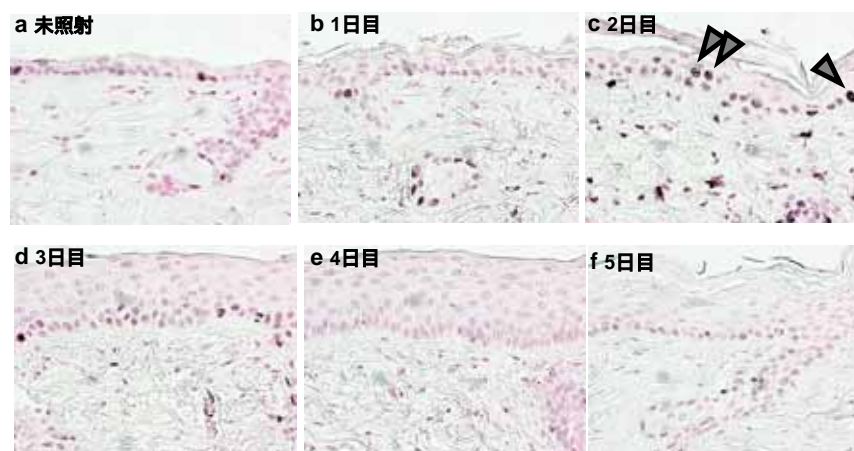


図4. UVB 照射後の Ki67 陽性細胞の局在  
未照射 (a) 及び UVB 照射後1日目 (b)、2日目 (c)、3日目 (d)、4日目 (e)、5日目 (f) の染色像を示す。矢尻は Ki67 抗体で強く染色されている細胞を示す。

### [UVB 照射後の表皮 HA 合成]

HABP サンドイッチアッセイを用いて UVB 照射後の HA 量を定量した。表皮肥厚や Ki67+ 細胞の増加が認められる前の照射後 1 日目で、すでに HA 量は有意に増加した。Ki67+ 細胞が多く観察された 2 日目 (図 4c) で HA 量は未照射の 5 倍増加し最大となった後、徐々に減少した (図 5a)。HA 量と細胞増殖の経日変化から、HA は細胞増殖に関与している可能性が示唆された。そこで、さらに詳細に解析するために、組織学的手法により HA の局在を観察した。未照射において HA は基底層に認められたが (図 5b 白矢印)、1 日目では基底層及び有棘層に HA の強いシグナルが観察された (図 5b 白矢印)。2 日目で、HA は基底層から角層直下の表皮全体に認められ (図 5b)、3 日目では顆粒層から減衰した (図 5b 矢印)。その後 4、5 日目で有棘層から徐々に減衰した (図 5b 白矢印)。HA の主なレセプターである CD44 の局在を観察した結果、未照射及び UVB 照射後いずれも HA 局在変化と同調していた (図 5b)。HA は基底層から増加することが分かった。また、表皮肥厚が回復するにつれ HA も減衰した。HA は Ki67+ 細胞が認められた基底層から増加し始めたことから、UVB 照射により基底層で惹起される細胞増殖に関与している可能性が考えられた。

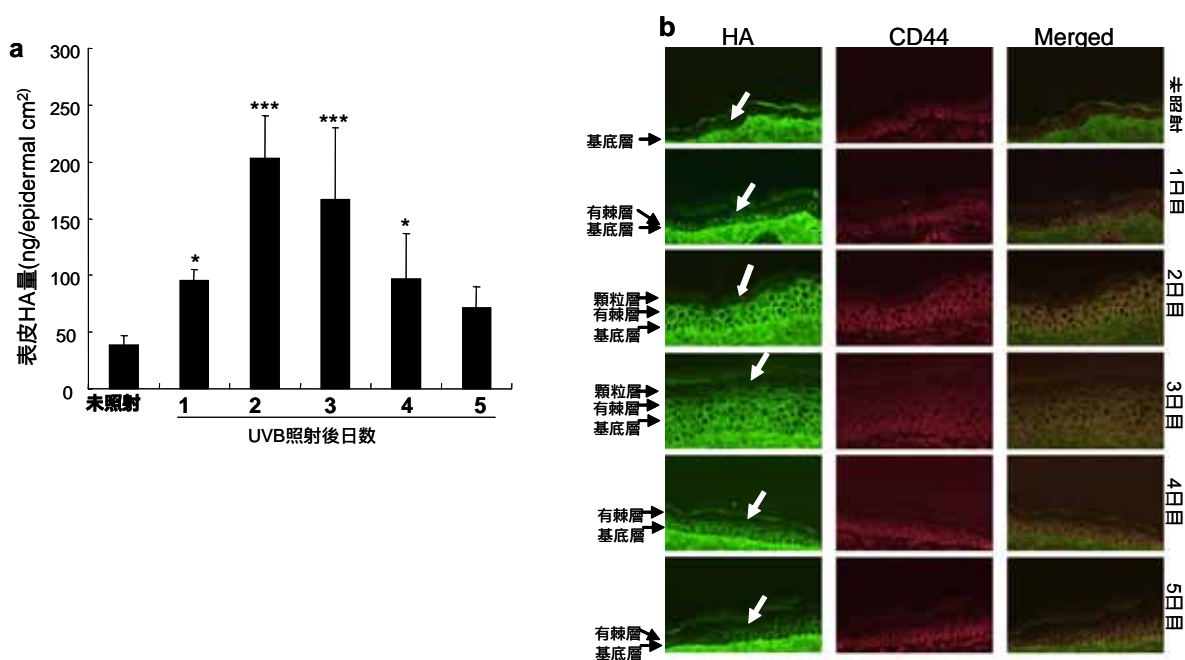


図5. UVB 照射後のマウス表皮における HA 量及び HA と CD44 の局在変化  
 (a) マウス皮膚から真皮を剥離し表皮のみ採取し、HABP サンドイッチアッセイを用いて HA 量を定量した。グラフは平均 ± 標準偏差を示す (n=6)。統計解析は Dunnett 多重比較を行った (vs 未照射)。\*は $p<0.05$ 、\*\*\*は $p<0.001$ を示す。  
 (b) 皮膚切片をビオチン化 HABP (b-HABP) 及び抗 CD44 抗体で反応させ、b-HABP はストレプトアビジン FITC (緑) で、抗 CD44 は Cy3 標識した 2 次抗体 (赤) で検出した。白矢印は b-HABP で染色される最上層のシグナルを示す。

UVB による HA の合成メカニズムを検討するために HA 合成酵素 *Has* mRNA の蓄積レベルを調べた。表皮より total RNA を抽出し、HA 合成酵素 *Has1*, *Has2*, *Has3* の mRNA の蓄積レベルを 定量的 RT-PCR にて定量した。各々の mRNA の蓄積レベルは  $\beta$ -actin mRNA の蓄積レベルで補正した (図 6)。*Has1* mRNA の蓄積レベルは UVB 照射してもほとんど変化が認められなかった (図 6a)。*Has2* mRNA の蓄積レベルは 1 日目で 1.4 倍に増加した後、徐々に減少した (図 6b)。*Has3* mRNA の蓄積レベルは 1 日目で 2.4 倍に増加した後、2 日目で 4.5 倍に増加し最大となり、その後徐々に減少した (図 6c)。UVB 照射後の *Has3* mRNA の蓄積レベルの変化は HA 量の変化 (図 5a) と正に相関していた。UVB による HA 量の増加には *Has3* が関与している可能性が考えられたため、*Has3* mRNA の局在を *in situ* hybridization 法を用いて観察した (図 7)。未照射において *Has3* mRNA のシグナルはほとんど検出されなかったが (図 7a)、1 日目で基底層に強いシグナルが認められた (図 7b 矢印)。2 日目には基底層と有棘層に強いシグナルが観察され (図 7c)、3 日目では基底層で見られた強いシグナルは減衰し、基底層から顆粒層まで弱いシグナルが認められた (図 7d)。4, 5 日目ではシグナルは消失した (図 7e, f)。*Has3* mRNA シグナルも HA と同様に基底層から増加し始めたことから、*Has3* のタンパク質の発現や局在、及び活性については調べていないものの、UVB による HA 合成には基底層で増加する *Has3* が関与していることが強く示唆された。

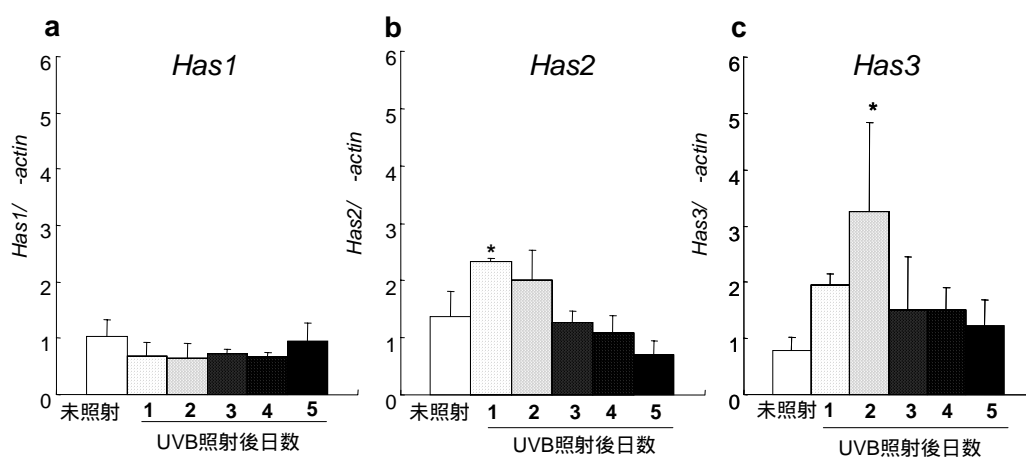


図6. UVB 照射後の *Has* 遺伝子群発現変化  
表皮より全 RNA を抽出し cDNA を合成後、定量的 RT-PCR を行った。*Has1* (a)、*Has2* (b)、*Has3* (c) の各々の mRNA 発現は  $\beta$ -actin で補正した。グラフは平均  $\pm$  標準偏差を示す (n=3)。統計解析は Dunnett 多重比較を行った (vs 未照射)。\*は  $p < 0.05$  を示す。



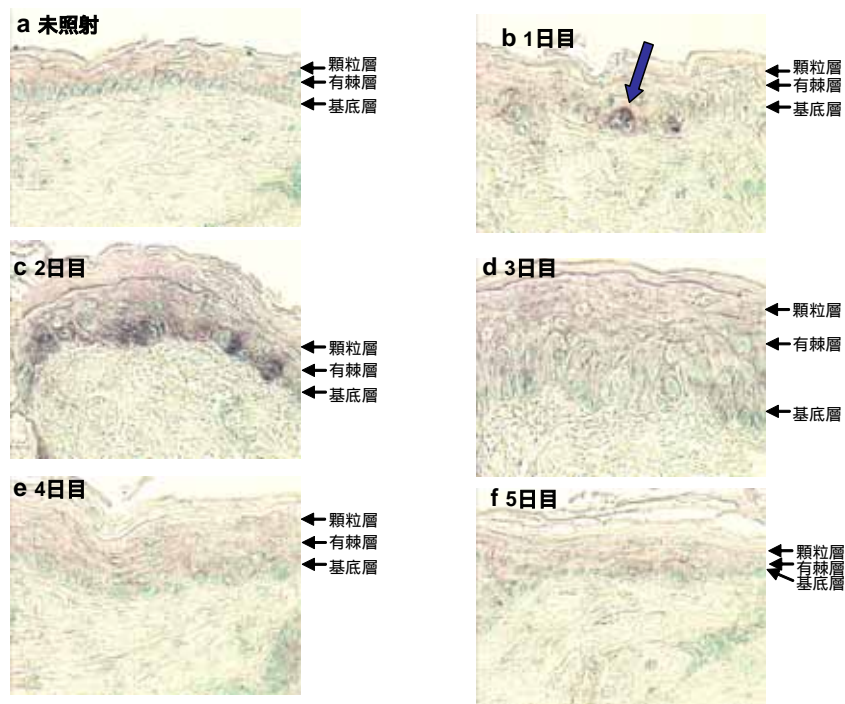


図7. UVB 照射後の *Has3* mRNA の局在  
*Has3* mRNA の *in situ* hybridization を行い、局在を観察した。未照射 (a) 及び UVB 照射後1日目 (b)、2日目 (c)、3日目 (d)、4日目 (e)、5日目 (f) の染色像を示す。矢印は基底層における *Has3* mRNA のシグナルを示す。

#### [UVB 照射後の表皮 HA 分子量変化]

UVB 照射後のケラチノサイトの増殖及び回復における HA 分子量を測定するために Sephacryl S-1000 クロマトグラフィーを行った。未照射における HA の平均分子量は約 1000 kDa で、分子量分布は広範囲に及んでいた (図 8a)。UVB 照射後 1、2 日目で HA 量は増加するが (図 5a)、HA の平均分子量及び分子量分布はほとんど変化しなかった (図 8a,b)。3 日目では HA 量は増加したままであるが (図 5a)、分子量には大きな変化が認められた。平均分子量が約 100 kDa に低分子化し、分子量分布は狭くなった (図 8c)。4 日目で HA 量が減少するとき (図 5a)、HA の分子量は広範囲の分布パターンに戻ったが、平均分子量は約 100 kDa で低分子化したままであった (図 8d)。5 日目では分子量分布のピークがわずかに高分子域側にシフトしただけで、平均分子量は低分子化したままであった (図 8e)。以上より表皮において、UVB により HA の分子量が変化することを見出した。増殖細胞が多く認められる 2 日目では、HA の平均分子量は 1000 kDa で高分子であった。その後、HA は 100 kDa に低分子化した。細胞増殖がもとに戻る過程では HA の分子量は低分子化したままであった。

HA 分子量変化のメカニズムを調べるために、HA 分解酵素 *Hyal1*, *Hyal2*, *Hyal3* の mRNA の蓄積レベルを調べた (図 9)。 *Hyal1* mRNA の蓄積レベルは UVB 照射後 3 日目において最大の 2 倍に増加し、その後減少した (図 9a)。 *Hyal2* mRNA の蓄積レベルは 2 日目に僅かに増加した (図 9b)。 *Hyal3* mRNA の蓄積レベルは UVB 照射後 5 日目において 4 倍に増加し最大となった (図 9c)。 HA 分子量が低分子化するとき、各 *Hyal* mRNA の蓄積レベルの変化は僅かであり、また HA 量が減少するとき *Hyal3* mRNA の蓄積レベルだけが増加した。

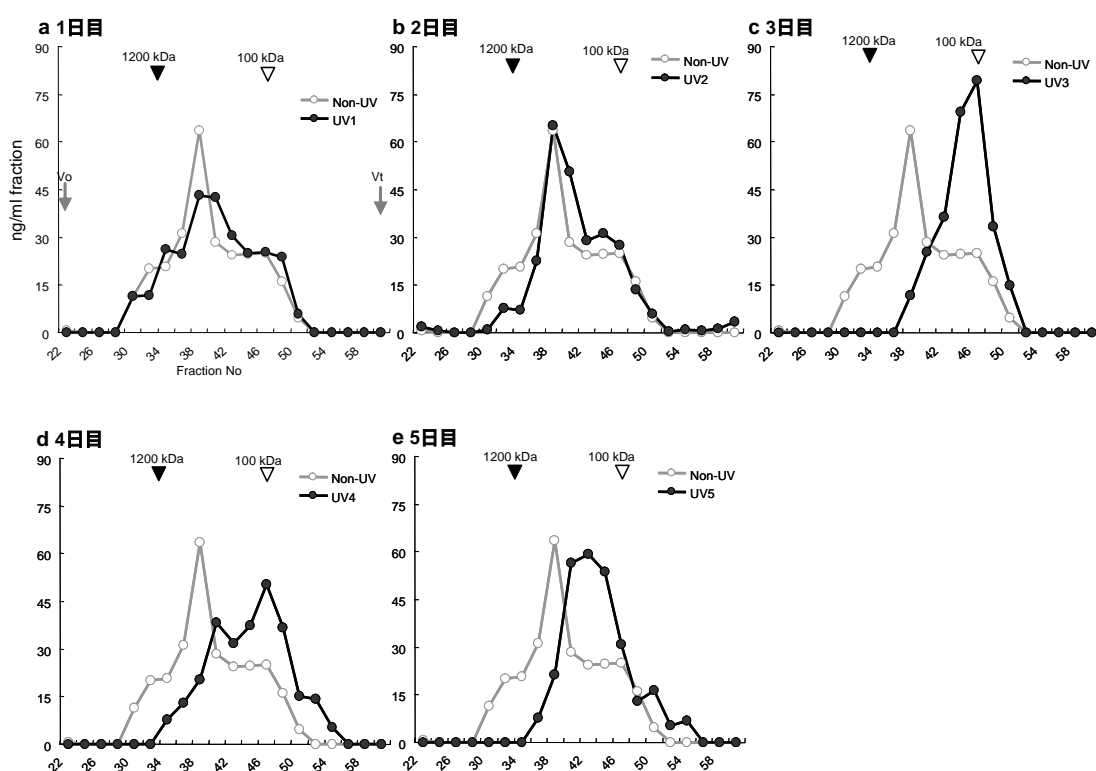


図8. UVB 照射後の HA 分子量変化

未照射及び UVB 照射の表皮より HA を抽出し、Sephacryl S-1000 カラムで分画後 HABP サンドイッチアッセイを用いて HA 濃度を定量した。各々のグラフは未照射 (白丸) の分子量分布と UVB 照射後 (黒丸) 1日目 (a)、2日目 (b)、3日目 (c)、4日目 (d)、5日目 (e) の分子量分布の比較を示す。Vo はカラムの空隙容積を、Vt は全容積を示す。 ▾ は、平均分子量 1200 kDa、 ▽ は、平均分子量 100 kDa の HA スタンダードの溶出位置を示す。

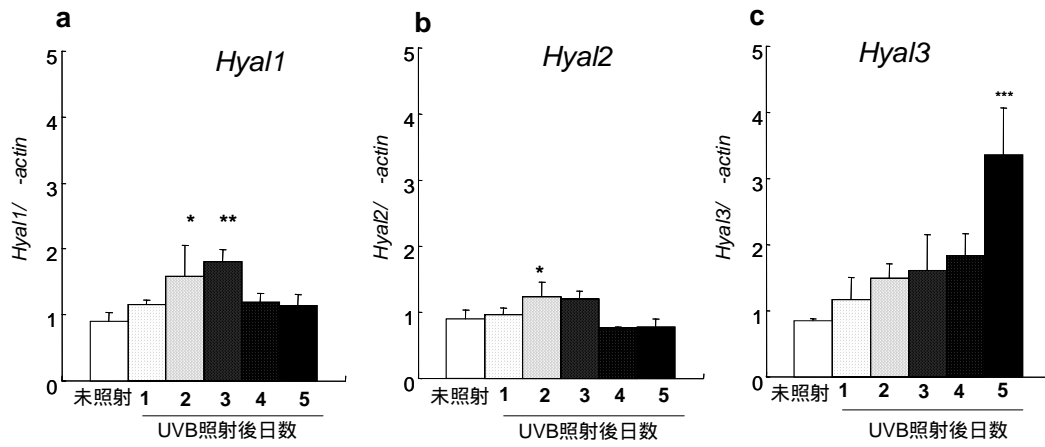


図9. UVB 照射後の *Hyal* 遺伝子群発現変化  
 表皮より全 RNA を抽出し cDNA を合成後、定量的 RT-PCR を行った。*Hyal1* (a)、*Hyal2* (b)、*Hyal3* (c) の各々の mRNA 発現は  $\beta$ -actin で補正した。グラフは平均  $\pm$  標準偏差を示す (n=3)。統計解析は Dunnett 多重比較を行った (vs 未照射)。\*は $p<0.05$ 、\*\*は $p<0.01$ 、\*\*\*は $p<0.001$ を示す。

## 考察

本研究は UVB 照射後ケラチノサイトの過増殖により表皮が肥厚しその後回復する過程において、表皮 HA の量、局在、分子量及び *Has* と *Hyal* の mRNA の蓄積レベルについて初めて検討を行い、HA の分子量が 1000 kDa から 100 kDa に劇的に低分子化することを見出した。

UVB 照射後 HA の量が増加しその後回復した (図 5a)。HA 合成酵素である *Has* はファミリーを形成し、*Has1,2,3* が知られているが (Itano et al. 1996, Watanabe et al. 1996, Spicer et al. 1996, 1997)、これら個々の遺伝子による HA 合成メカニズムについては不明な点が多い。マウス表皮においては *Has2* 及び *Has3* の mRNA の蓄積レベルの増加と HA 合成との間に関連があるという報告がある (Tammi et al. 2005, Kaya et al. 2005)。また、ヒトケラチノサイトにおいては *Has3* mRNA 発現と HA 合成との間に強い関連性がある (Sayo et al. 2002, 2004)。今回、UVB 照射後の *Has1,2,3* について mRNA の蓄積レベルを調べた結果、*Has3* mRNA の蓄積レベルの変動 (図 6c) が HA の量変化 (図 5a) と同じプロファイルであった。さらに、HA 量が増加する 1 日目 (図 5a) で *Has3* mRNA のシグナルが基底層で観察された (図 7c)。*Has3* のタンパク質の発現や局在、及び活性については未確認であるものの、私のデータから UVB 照射後のマウス表皮の HA 合成には *Has3* が大きく寄与していると考えられる。

*Has* mRNA の発現はサイトカインや成長因子により制御されているが (Karvinen et al. 2003, Seppanen et al. 2003, Ohtani et al. 2009)、UVB 照射後は種々のサイトカインの放出が亢進する。*in vitro* において IFN- $\gamma$  や KGF が *Has3* mRNA の蓄積レベルを増加させ (Sayo et al. 2002, Karvinen et al. 2003)、また UVB 照射により IFN- $\gamma$  や KGF の mRNA の蓄積レベルの増加が *in vitro* で報告されている (Yoshizumi et al. 2008, Kakizaki et al. 2008)。従って、今回私が調べたマウス表皮においても UVB 照射後 IFN- $\gamma$  や KGF の発現が増加し、*Has3* mRNA の蓄積レベルの増加が誘導された可能性が考えられる。

UVB 照射後、HA 量は、表皮肥厚や Ki67+ 細胞の増加に先立って有意に増加した (図 5a)。また、HA の量及び *Has3* mRNA の蓄積レベル (図 6c) が最大となった 2 日目に、Ki67+ 細胞も最も多く観察された (図 4c)。すなわち HA 合成と細胞分裂の増加が最大となるタイミングが同じであることがわかった。HA レセプターである CD44 のノックアウトマウスでは表皮 HA 量が減少し、表皮厚の低下及び増殖細胞である PCNA+ 細胞数の減少が認められている (Bourguignon et al. 2006)。今回のデータ及び Bourguignon らの研究から、HA はケラチノサイトの増殖に深く関与している可能性が考えられる。さらに、私の研究では Ki67+ 細胞が認められたとき HA の分子量は 1000 kDa であったことから (図 8b)、高分子の HA がケラチノサイトの増殖に関与していることが強く示唆された。

HA と CD44 の相互作用はケラチノサイトの分化や脂質合成に関与する。*in vitro* において、HA は分化マーカーの発現を増加させ、コレステロール合成を促進するが、この効果は CD44 のノックダウンにより抑制される (Bourguignon et al. 2004, 2006)。今回、3 日目で TEWL が増加したが (図 3a)、これは皮膚バリア機能が崩壊したことを意味する。このとき HA 平均分子量は 1000 kDa から 100 kDa にシフトし、低分子化した (図 8c)。ケラチノサイトの分化や脂質合成はバリア機能崩壊後に認められるため (Feingold. 1991, Ajani et al. 2007)、私は、低分子 HA と CD44 の相互作用が UVB 照射後のバリア機能回復に関与している可能性を考えている。ただし、低分子 HA の生理学的な役割を解明するには、UVB 照射後の表皮各々の層における HA の分子量分布を調べる等、更なる研究が必要である。

3 日目で HA 平均分子量は 1000 kDa から 100 kDa にシフトしたが (図 8c)、このとき *Has* 遺伝子群の mRNA 蓄積レベルは未照射と同程度であった (図 6)。これらのデータから、100 kDa の低分子 HA は *de novo* 合成によるものではなく、分解により形成されたものと考えられる。Hyal は HA の分解を担うが、Hyal1 は HA を 4 糖にまで分解し、Hyal2 は 20 kDa に分解すると報告されている (Lepperdinger et al. 1998) ことから、今回の低分子 HA とは分子量が一致しない。低分子 HA 量が低下した 4、5 日目では (図 5a, 図 8d,e) *Hyal3* mRNA の蓄積レベルのみが増加したが (図 9c)、Hyal3 の HA 分解活性については不明な点が多い。例えば無細胞系で転写、翻訳された Hyal3 において HA 分解活性が確認されている一方で (Lokeshwar et al. 2002)、human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に Hyal3 を強制発現させても HA 分解活性が認められないという報告がある (Harada et al. 2007)。Hyal2 は CD44 と結合することで HA 分解活性を持つが、Hyal3 は CD44 と結合しても分解活性を持たないため (Harada et al. 2007)、Harada らは、Hyal3 は未知の分子と結合して HA 分解活性を持つ可能性を考察している。以上の事および本研究において 3 日目に HA が低分化したとき (図 8c)、*Hyal3* mRNA 蓄積レベルは増加しなかった事より (図 9c)、Hyal3 の活性が未知の分子により転写後段階で制御されて、皮膚の HA 分解に関わっている可能性もあると私は考えている。いずれにしろ、UVB 照射後の HA 分解における *Hyal* 遺伝子群の関与については更なる研究が必要である。

ところで、活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) 存在下では HA は分解されることが報告されており (Greenwald et al. 1980, Andley et al. 1983)、ヒト表皮 HA も ROS により分解されることが皮膚器官培養系を用いた実験により示唆されている (Agren et al. 1997)。マウス皮膚においても、UVB 照射後 ROS の一種であるスーパーオキシドアニオンが誘導される (Maglio et al. 2005)。従って、私は、今回認められた UVB 照射後の HA 分子量変化に ROS が関与している可能性も考えているが、この点については今後の検証が必要である。

マウスの角層には低分子 HA が存在することが知られている (Sakai et al. 2000)。

HA の局在を示すシグナルは 3 日目以降顆粒層から順に徐々に減衰したことから (図 5b)、UVB 照射後 100 kDa の HA はさらに分解されてケラチノサイトのターンオーバーに伴って角層から排除される可能性もあると私は考えている。

以上、本研究より UVB 照射後の内在性 HA の分子量が劇的に変化することを初めて見出した。HA の量的、質的な変化が UVB 照射後の細胞増殖や分化に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。今後は HA の分解機構や低分子化した HA の機能を調べることで皮膚恒常性の維持機能について更なる知見が得られると考えられる。

### 第三章 加齢及び UVB 照射による色素沈着変化

#### 序論

UVB に晒されると、通常は皮膚全体に色素沈着が形成されるが、その後回復する。一方、手の甲や顔などの UVB に晒され続けている皮膚に認められる局所的な色素沈着 (Haddad et al. 1998) は基本的に回復が見られず、また、加齢によりその数は多く、色は濃くなることが知られている (Wulf et al. 2004)。このことから、色素沈着の形成に UVB はもちろん、加齢も深く関与していると考えられる。

色素沈着の組織学的観察は多数報告があるが (Holzle, 1992, Ortonne et al. 1979, Rahman et al. 1996)、UVB 曝露を伴わない自然加齢においてどのように色素沈着が形成されるかはほとんどわかっていない。この理由として、加齢により色素沈着が形成されるモデル動物がないことが挙げられる。さらに、UVB 曝露後の色素沈着の形成及び回復に、加齢変化が及ぼす影響についてもほとんど研究されていない。

A1 モルモットはヒトと同程度に表皮にメラノサイトを有し、メラノサイトではメラニンが合成されており、UVB 照射により色素沈着を生じる数少ない実験動物である (Imokawa et al. 1986)。そのため UVB による色素沈着の研究において頻用されている (Yoshida et al. 2002, Shimizu et al. 2002, Horikoshi et al. 2000)。我々は偶然、UVB を照射していない 5 年齢モルモットに色素沈着を見つけた。モルモットの平均年齢は 4 - 7 年であるため (Koyama et al. 1967)、この現象が確かであれば A1 モルモットは加齢に伴う色素沈着形成モデルとして非常に有用であると考えられた。そこで、若齢から老齢までの A1 モルモットを準備し、皮膚色、メラニン分布、メラノサイト数及び分布について検討を行った。またこれらの A1 モルモットを用いて UVB 照射後の色素沈着の形成及び回復に、加齢変化が及ぼす影響についても検討を行った。

## 材料と方法

### 動物

有色茶系モルモット (A1 モルモット) の 5 週齢の雌を東京実験動物より購入し、環境温度  $22\pm 1$ 、相対湿度  $55\pm 10\%$ 、12 時間照明 (午前 8 時点灯、午後 8 時消灯) の環境下の飼育室で飼育し、14、20 週齢および 1、2、3、5 年齢で供試した。餌はウサギ・モルモット飼育用固形飼料 (RC-4、オリエンタル酵母製) を充分量与え、水は水道水を自動給水で自由飲水とした。動物管理は実験動物ガイドラインを遵守して行った。

### 紫外線(UV)照射

紫外線照射は、医療用紫外線照射装置デルマレイ (M-DER-320 形、クリニカルサプライ製) に中波長領域紫外線 (UVB) ランプ (FL32SE30 ランプ、東芝医療機器製) を装着した。モルモット背部の長毛をバリカンを用いて剃毛し、さらにシェイバーを用いて皮膚より毛を除いた後、 $500 \text{ mJ/cm}^2$  の UVB を照射した。

20 週齢、1、3、5 年齢モルモットは UVB 照射後 1、3、14 日目に皮膚サンプルを回収し、14 週齢、3 年齢モルモットは UVB 照射後 14、84 日目に皮膚サンプルを回収した。

### 測色及び $L^*$ 値の算出

バリカンとシェイバーを用いてモルモット背部より毛を除いた後、色彩色差計 Color Reader CR-11 Munsell (Minolta 製) を用いて、 $2 \times 2 \text{ cm}^2$  の測定部位につき 10 ヶ所の測色を行い、 $L^*$  値 (明度)、 $a^*$  値 (赤み)、 $b^*$  値 (黄み) を測定し、 $a^*$  値及び  $b^*$  値から  $C^*$  値 (彩度) を算出した。

UVB 照射後 1、3、14 日目もしくは、UVB 照射後 84 日目までの  $L^*$  値から未照射の  $L^*$  値を引き、 $L^*$  値を算出した。

### UVB 照射後の紅斑及び最小紅斑量 (Minimal erythema dose: MED) 測定

A1 モルモットの背部を剃毛し、未照射の  $a^*$  値、及び UVB 照射 24 時間後の  $a^*$  値を測色し、UVB 照射後の  $a^*$  値から未照射の  $a^*$  値を引いて  $a^*$  値を算出した。

MED については、背部を剃毛し、 $1 \times 1 \text{ cm}^2$  の照射部位を設けて、各々の部位に 100、200、300、400、500、600、700、800  $\text{mJ/cm}^2$  の UVB を照射した。UVB 照射 24 時間後に目視で紅斑反応を認めた最小照射量を 1MED とした。

### フォンタナ-マッソン染色

背部もしくは頸部より採取した皮膚組織を TissueMount (Sakura Finetechnical 製) を用いて凍結包埋した。クリオスタットを用いて  $5 \mu\text{m}$  に薄切し、切片をスライドガラスに貼りつけた後、乾燥させた。フォンタナ・マッソン溶液中で 4–6 時間反応させた後水洗し、ケルネヒトレート液につけた後脱水して、マリノール (武藤純薬) で封入した。



### 表皮シート作成

皮膚組織を  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  に採取後、両面テープ (3M製) を貼ったスライドガラスに貼付した。2N-NaBr で 37 °C 3 時間反応後、真皮を剥離し表皮シートを作成した。

### DOPA 染色

表皮シートを PBS で洗浄後、予め 37 °C に加温した 0.1% L-DOPA/PBS 溶液を非特異的の反応防止のため 1.5 時間ごとに交換しながら 6 時間酵素反応させた。純水で洗浄して反応を停止させた後、脱水して除毛処理を行い、マリノールを用いて封入した。

### 抗体染色

**KIT 抗体染色：**表皮シートを作成し PBS で洗浄後、冷アセトンで 15 分間固定し、再度 PBS で洗浄後 -80 °C で保存した。PBS で解凍洗浄し、正常ヤギ血清 (Kirkegaard&Perry Laboratories 製) を用いて 20 分間ブロッキングした。抗マウス c-Kit (ACK45) ラットモノクローナル抗体 (BD Bioscience 製) を 100 倍希釈し室温 90 分間反応させた後、PBS で洗浄した。二次抗体として Alkaline Phosphatase 標識された抗ラット IgG+IgM (Southern Biotechnology Associates, Inc. 製) を 100 倍希釈し 1 時間反応させた後、PBS で洗浄した。非特異的発色を抑制するためにレバミゾール (Vector Laboratories 製) を添加したニューフクシン (Dako 製) で 45 分間発色させ、純水で洗浄した後、除毛して Glycerogel (Dako 製) で封入した。

**gp100 抗体染色：**冷アセトンで固定し -80 °C で保存した表皮シートを PBS で解凍洗浄し、3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  / PBS 溶液を用いて 10 分間ブロッキングした。100 倍希釈した抗ヒトメラノーマ (gp100) マウスモノクローナル抗体 (DAKO製) 溶液で 4 晩反応させた後、PBS で洗浄した。二次抗体としてビオチン化標識抗マウスIgG (DAKO製) を 10 分間反応させた後、PBS で洗浄し、HRP 標識ストレプトアビジン (DAKO製) を 10 分反応させ、PBS で洗浄した。3-amino-9-ethylcarbazole (DAKO製) で 50 分間発色させた後、純水で洗浄し、除毛して Glycerogel (Dako製) で封入した。

**S-100 抗体染色：**4% パラフォルムアルデヒド (PFA) で 20 分間固定し、-80 °C で保存した表皮シートを PBS で解凍洗浄した。PBS で洗浄後、3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  / PBS 溶液を用いて 10 分間ブロッキングし、1000 倍希釈した S-100 ラビットポリクローナル抗体 (Affiniti Research Products Limited製) 溶液で 4 晩反応させた後、PBS で洗浄した。その後 gp100 抗体染色と同様の方法で二次抗体、三次抗体反応をさせ、発色後封入した。

**陽性メラノサイト数の算出：**各標本を光学顕微鏡下で観察するとともに、200 倍の視野に存在するメラノサイト数を数え、表皮  $1 \text{ mm}^2$  あたりの陽性メラノサイト数を算出した。

#### 統計処理

Kruskal-Wallis 検定と Dunnett 多重比較、Dunnett 多重比較、Student's t 検定 を 適宜用いた。

## 結果

### 1.A1 モルモットにおける自然加齢による色素沈着変化

UVBによらない自然加齢による色素沈着変化をみるために、各年齢の A1 モルモットを剃毛し、背部及び頸部皮膚について肉眼観察した (図 10)。背部については、20 週齢の若齢モルモットでは色素沈着は観察されなかった (図 10a)。3 年齢では点状の色素沈着が認められ (図 10b)、5 年齢では線状の色素沈着が認められた (図 10c)。加齢に伴い色素沈着が形成された。頸部においては、20 週齢では色素沈着が認められなかったが (図 10d)、3 年齢で線状の色素沈着が認められ (図 10e)、5 年齢では色素沈着が亢進していた (図 10f)。加齢による色素沈着は背部よりも頸部の方が顕著であった。

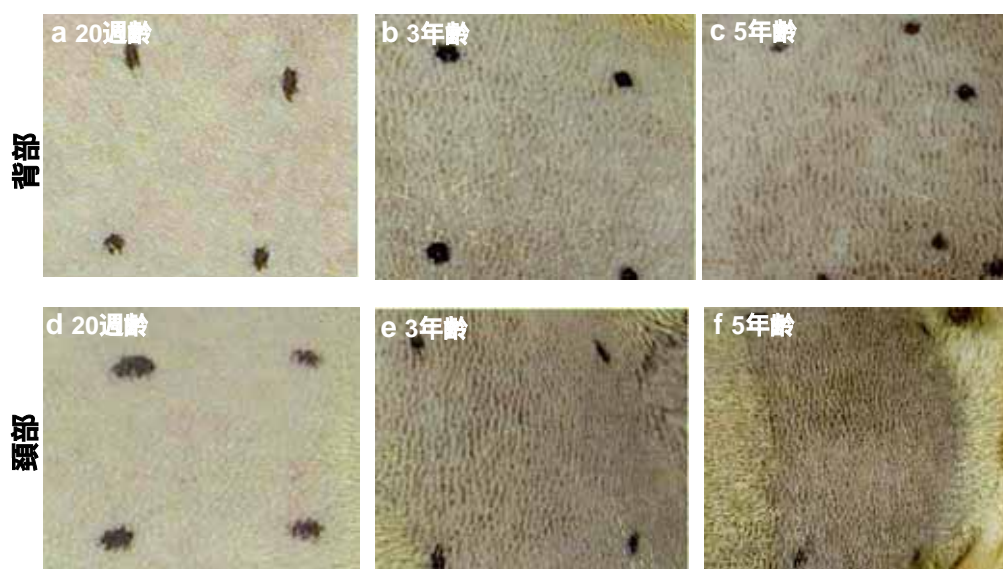


図10. 加齢に伴う色素沈着

モルモットを剃毛し、背部 (a-c) 及び頸部 (d-f) の色素沈着を観察した。(a,d) は20週齢、(b,e) は3年齢、(c,f) は5年齢を示す。観察部位を決めるために、黒点で4ヶ所マーキングした。

皮膚色を定量値化するために、色彩色差計を用いて測色した (図 11)。背部、頸部ともに明度を示す  $L^*$  値は加齢に伴い有意に減少した (図 11a, b)。各年齢とも、背部 (図 11a) よりも頸部 (図 11b) の方が  $L^*$  値が低かった。赤み ( $a^*$  値)、黄み ( $b^*$  値)、彩度 ( $C^*$  値) は加齢による変化は認められなかった (図 11c, d)。

皮膚内部を観察するために凍結切片を作製してフォンタナ・マッソン染色を施し、メラニン分布を観察した (図 12)。背部、頸部ともに 20 週齢では、メラニンはほとんど認められなかったが (図 12a, d)、3 年齢 (図 12 b, e)、5 年齢 (図 12c, f) では表皮全体にメラニンが認められた。また、加齢に伴い、表皮厚が薄くなっていた。

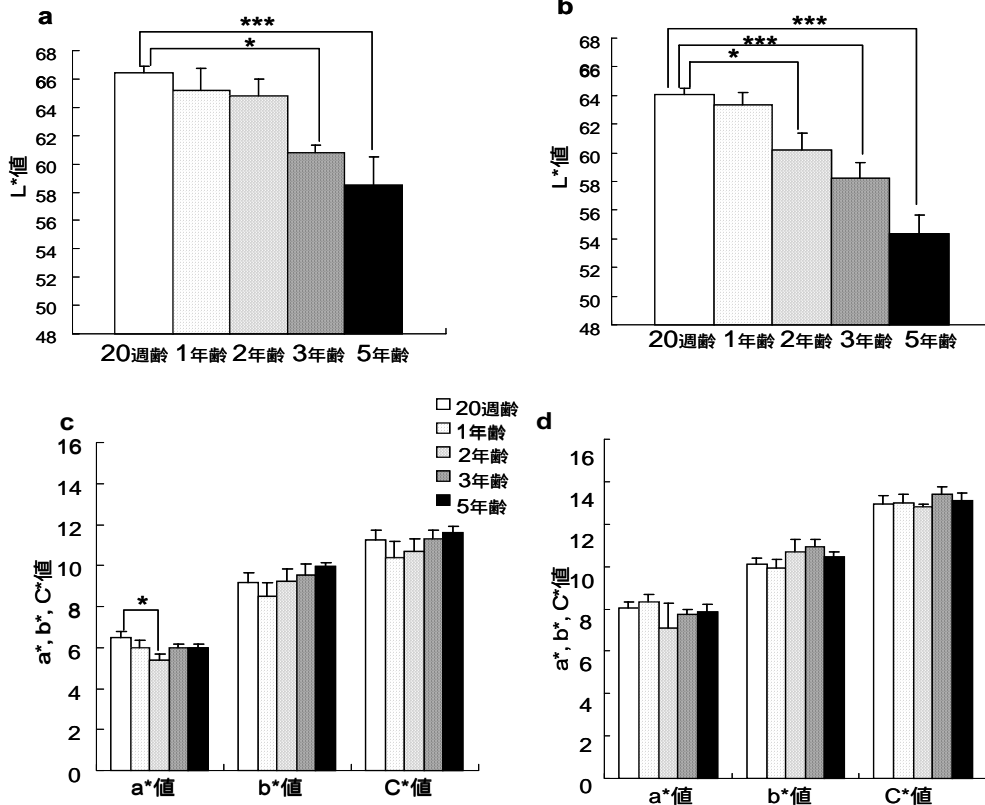


図11.加齢に伴う皮膚色の変化

L\*値は明度を表し、値が大きいと白色に近く、値が小さいと黒色に近いことを示す。  
 (a) 背部及び (b) 頸部のL\*値を示す。a\*値は赤みを表し、値が大きいと赤色に、値が小さいと緑色に近いことを示す。b\*値は黄みを表し、値が大きいと黄色に、値が小さいと青色に近いことを示す。C\*値は彩度を表す。値が大きいと鮮やかで、値が小さいと無彩色に近いことを示す。C\*値は $C^*=[(a^*)^2+(b^*)^2]^{1/2}$ で算出される。(c) は背部、(d) は頸部のa\*値、b\*値、C\*値を示す。

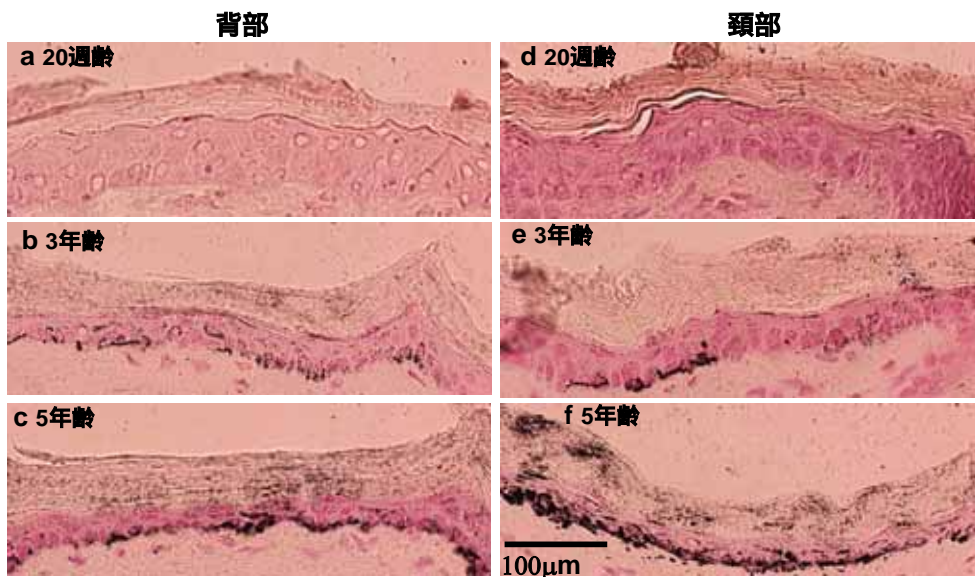


図12. 加齢に伴うメラニン分布の変化

20週齢 (a,d)、3年齢 (b,e)、5年齢 (c,f) の皮膚を用いて、フィンタナ・マッソン染色を施した。背部 (a-c) 及び頸部 (d-f) について検討した。20週齢についてはメラニンはほとんど観察されなかったが、加齢に伴い、表皮全体にメラニンが分布していた。

次に、色素合成に関わるメラノサイトの表皮組織内の分布パターンを観察し、数を測定するために、複数のメラノサイトマーカーを用いて染色を行った。メラノソームはその成熟過程により1 - 4期に区分される。小胞体から分離したばかりのメラノソームが第1期で、ここではメラニン合成は行われない。次にゴルジから分泌されたチロシナーゼなどの酵素を含む小胞と融合して第2期メラノソームとなり、ここで、メラニン合成が開始され、第3期、第4期とすすむにつれてメラニン合成が活発になる。本研究においては、未成熟なメラノサイト（ステージ1もしくは2のメラノソームを保持するメラノサイトに相当）に発現するKIT、ステージ3以降のメラノソームに発現するタンパクgp100、メラノサイトの総数マーカーといわれているS-100をそれぞれ抗体を用いて染色した。ステージ2以降のメラノソームに認められるチロシナーゼは、基質となるDOPAを用いて染色を行った。

メラノサイトの分布を観察した結果（図13）、背部において20週齢（図13a）及び1年齢（図13b）ではメラノサイトは均一に分布していたが、2年齢では毛穴（図13c 黒矢印）に平行に線状の分布が認められた（図13c 白矢印）。3年齢でメラノサイトの分布は太い線状になり（図13d 白矢印）、5年齢では帯状の凝集が認められた（図13e 白矢印）。頸部においては1年齢で、すでに線状の分布が認められ（図13g 白矢印）、3、5年齢で帯状に凝集していた（図13i, j 白矢印）。加齢に伴うメラノサイトの分布（図13 白矢印）は、毛穴（図13 黒矢印）に平行であった。

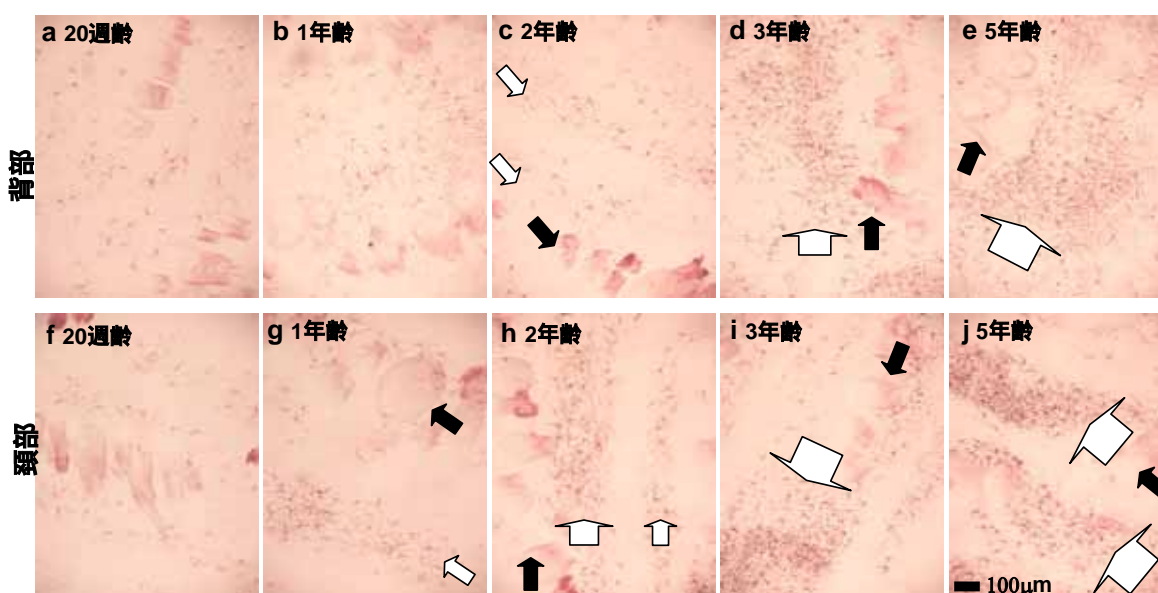


図13. 加齢によるメラノサイトの凝集  
20週齢 (a, f)、1年齢 (b, g)、2年齢 (c, h)、3年齢 (d, i)、5年齢 (e, j) のA1モルモットの背部 (a-e) 及び頸部 (f-j) を用いて表皮シートを作製し、抗gp100抗体染色を施した。黒矢印は毛穴が並んでいる位置を示し、白矢印はメラノサイトが分布している位置を示す。

メラノサイト数については、背部において DOPA+、gp100+、S-100+ メラノサイト数は加齢により増加する一方で、KIT+ メラノサイト数は変化しなかった (図 14a)。頸部においては、DOPA+、gp100+、S-100+ メラノサイト数は背部同様に加齢により増加する一方で、KIT+ メラノサイト数は減少した (図 14b)。

以上、加齢により色素沈着が形成され、色素沈着部位ではメラノサイト数とメラニン量の増加が認められ、さらにメラノサイトが凝集していることを見出した。

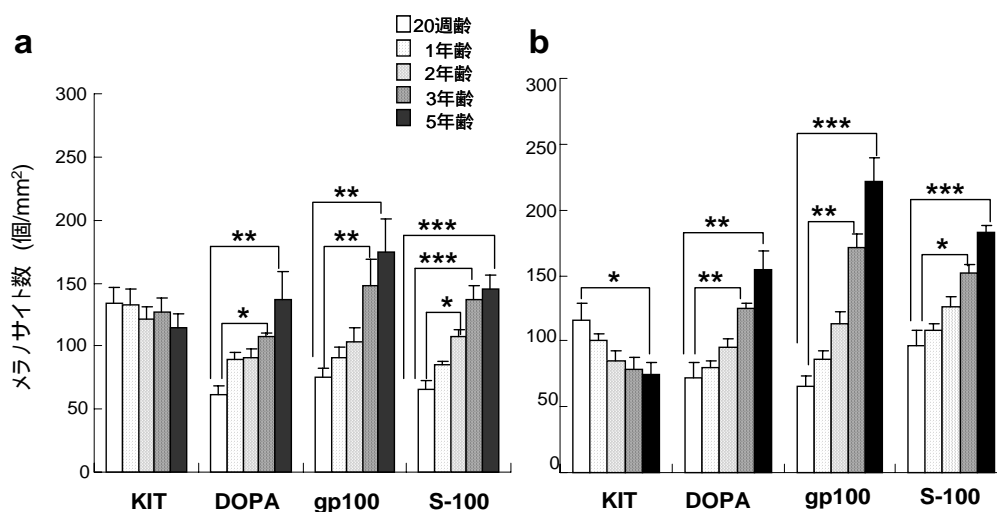


図14. 加齢に伴うメラノサイト数の増加

背部 (a) 及び頸部 (b) のメラノサイト数をカウントし、mm<sup>2</sup>あたりのメラノサイト数を算出した。頸部については、DOPA+、gp100+、S-100+ メラノサイト数は加齢に伴い増加する一方で、KIT+ メラノサイト数は加齢に伴い減少した。グラフは平均 ± 標準偏差を示す (20週齢、2年齢 n=6、1年齢 n=7、3、5年齢 n=5)。統計解析は Kruskal-Wallis 検定と Dunnett 多重比較 (vs 20週齢) を行った。\*はp<0.05、\*\*はp<0.01、\*\*\*はp<0.001を示す。

## 2.加齢による UVB 照射後の A1 モルモットの皮膚変化

### [加齢による紅斑及び最少紅斑量の変化]

UVB を照射すると照射後約 6 時間から 48 時間にかけて皮膚が赤みをおびるが、これは紅斑反応とよばれる。また、紅斑が起こる最少の紫外線照射量を最少紅斑量 (MED) といい、UVB に対する皮膚の応答性の指標として頻用されている。紅斑反応は、色素沈着に先立っておこるが、紅斑反応と色素沈着の関係については不明な点が多く、また、加齢と紅斑反応についてもあまり報告がない。今回、UVB 照射後の紅斑反応における加齢変化を調べるために、未照射及び UVB 照射 24 時間後の  $a^*$  値を測色し  $a^*$  値を算出し(図 15a)、MED を測定した (図 15b)。その結果、加齢に伴い  $a^*$  値は減少傾向を示した。また MED は 3 年齢及び 5 年齢で有意に増加した。加齢に伴い紅斑反応は鈍くなっていた。

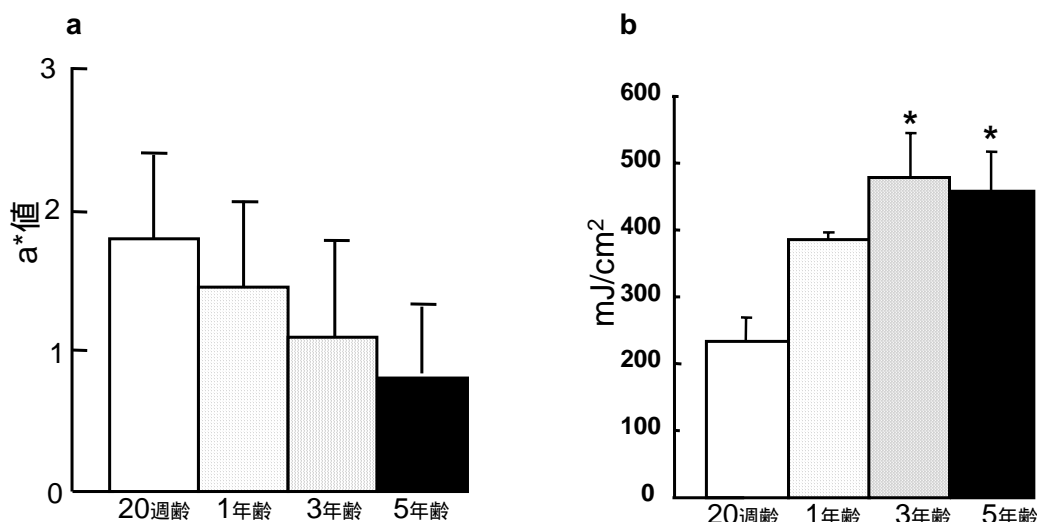


図15. UVB 照射後の加齢に伴う紅斑及び MED 変化

(a) UVB による紅斑反応をみるために、UVB 照射後の  $a^*$  値から未照射の  $a^*$  値を引き、 $a^*$  値を算出した。(b) 100-800  $mJ/cm^2$  の UVB を照射24時間後に目視判定を行い MED を決定した。グラフは平均  $\pm$  標準偏差を示す (20週齢  $n=6$ 、1年齢  $n=7$ 、3年齢、5年齢  $n=5$ )。統計解析は Dunnett 多重比較を行った (vs 20週齢)。\*は  $p < 0.05$  を示す。

### [加齢による UVB 照射後の色素沈着変化]

UVB 照射後、色素沈着の形成過程における加齢変化を調べるために、未照射及び 500  $mJ/cm^2$  の UVB を単回照射後 1、3、14 日目の  $L^*$  値を測色し、 $L^*$  値を算出した。その結果、 $L^*$  値は加齢に関係なく同等に低下した (図 16)。

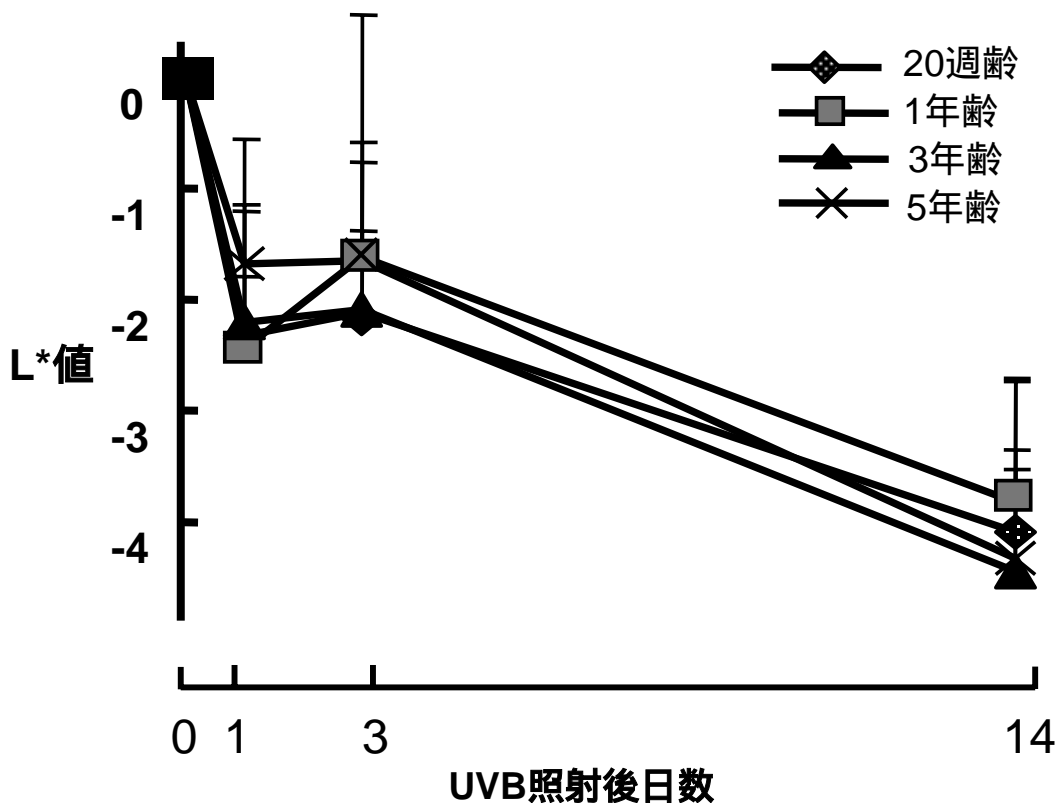


図16. UVB 照射後の加齢に伴う皮膚色変化  
 UVB 照射後の皮膚色の黒化をみるために、UVB 照射後1、3、14日目のL\*値から未照射のL\*値を引き、 $L^*$ 値を算出した。グラフは平均 $\pm$ 標準偏差を示す (20週齢 n=6、1年齢 n=7、3、5年齢 n=5)。

フォンタナ-マッソン染色にてメラニン分布を観察した (図 17)。20 週齢の若齢モルモットにおいて、未照射では基底層にのみメラニンが観察されたが、UVB 照射後は表皮全体にメラニンが観察された (図 17a-d)。5 年齢の老齢においても UVB 照射後メラニンの顕著な増加が観察された (図 17e-h)。若齢及び老齢ともに UVB 照射後メラニンは増加した。

メラノソームの発達段階におけるメラノサイト数について調べるために、DOPA+、gp100+、S-100+、KIT+ メラノサイト数をカウントした (図 18)。UVB 照射後、DOPA+、gp100+、S-100+ メラノサイト数は各年齢ともに増加した (図 18a,b,c)。KIT+ メラノサイトにおいては、各年齢ともに UVB 照射後 1 日目で減少傾向を示した後、3 日目で未照射と同程度に回復した。その後 20 週齢及び 1 年齢では 14 日目で数が増加したが、3 年齢及び 5 年齢では変化しなかった (図 18d)。



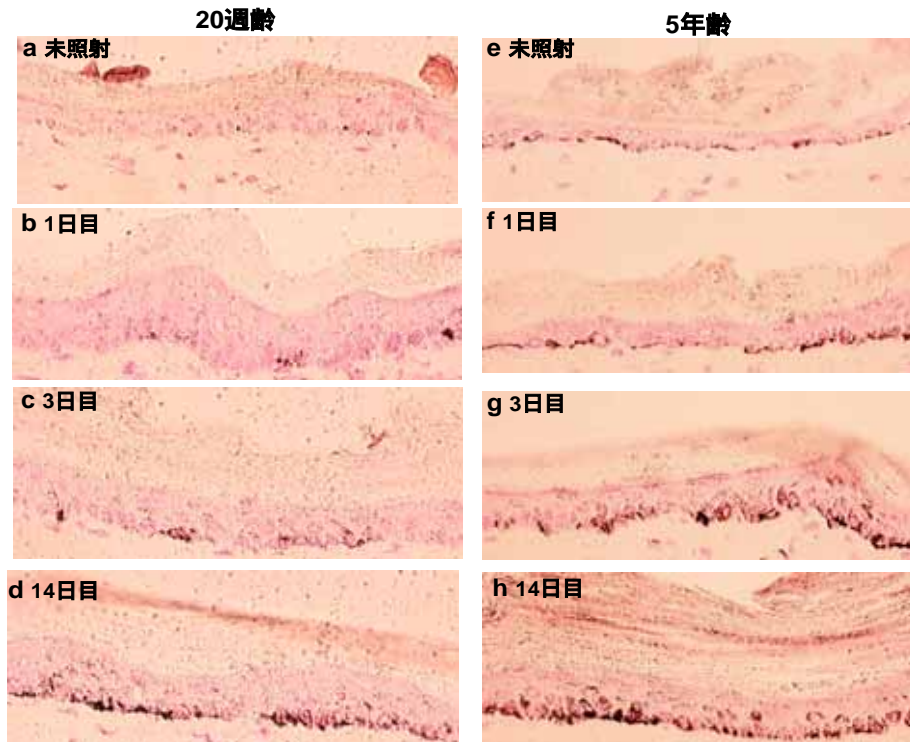


図17. UVB 照射後の加齢に伴うメラニン分布  
20週齢 (a-d) 及び5年齢 (e-h) の皮膚を用いてフォンタナ・マッソン染色を行った。(a,e) 未照射、(b,f) UVB照射後1日目、(c,g) 3日目、(d,h) 14日目の染色像を示す。

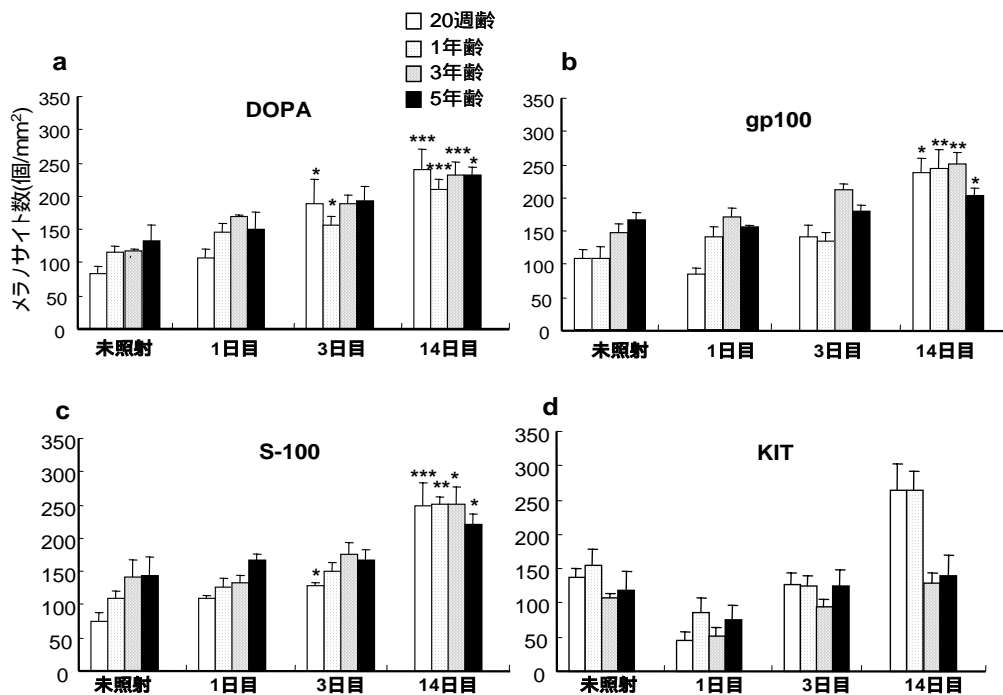


図18. UVB 照射後のメラノサイト数増加  
未照射及び UVB 照射後1日目、3日目、14日目の皮膚より表皮シートを作製し、各年齢のメラノサイト数をカウントし、mm<sup>2</sup>当たりのメラノサイト数を算出した。(a) DOPA+, (b) gp100+, (c) S-100+, (d) KIT+メラノサイト数の変化を示す。グラフは平均 ± 標準偏差 (20週齢 n=6、1年齢 n=7、3年齢、5年齢 n=5)。統計解析は Kruskal-Wallis 検定と Dunnett 多重比較を行った。\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$ 、\*\*\*は  $p < 0.001$ を示す。

[加齢による UVB 照射後の色素沈着回復における変化]

UVB 照射後の色素沈着回復過程における加齢変化を調べるために、14 週齢の若齢モルモットと 3 年齢の老齢モルモットを用いて、500 mJ/cm<sup>2</sup>の UVB を単回照射後 84 日目まで観察した (図 19)。その結果、14 週齢、3 年齢ともに 21 日目までは色素沈着が認められた (図 19b, e)。その後 14 週齢では色素沈着は回復したが (図 19c)、3 年齢では 84 日目まで色素沈着が認められた (図 19f)。L\*値を算出した結果、UVB 照射後 21 日目までは 14 週齢、3 年齢ともに同等に L\*値の低下が認められた。14 週齢では、その後徐々に回復するが、3 年齢では回復は認められなかった (図 19g)。

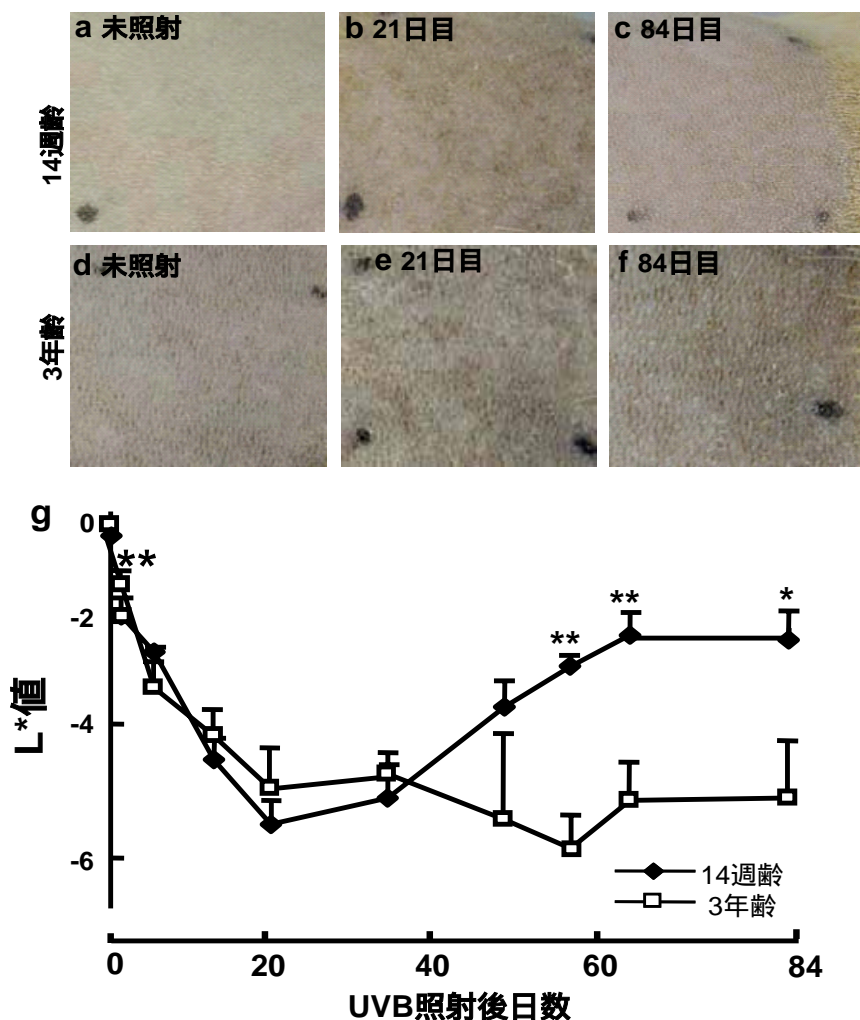


図19. UVB 照射後の加齢に伴う色素沈着変化  
14週齢 (a-c) 及び3年齢 (d-f) の背部に UVB を照射し、未照射 (a,d)、UVB 照射後21日目 (b,e)、84日目 (c,f) の皮膚を観察した。(g) UVB 照射後84日目までの L\*値の変化を14週齢と3年齢で比較した。

UVB 照射後 14 日目及び 84 日目のメラニン分布をフォンタナ・マッソン染色を用いて、観察した結果(図 20)、14 週齢では、14 日目で増加したメラニンは 84 日目では減少し未照射と同程度に回復したが (図 20a-c)、3 年齢では 14 日目で増加したメラニンは 84 日目でも増加したままであった (図 20d-f)。

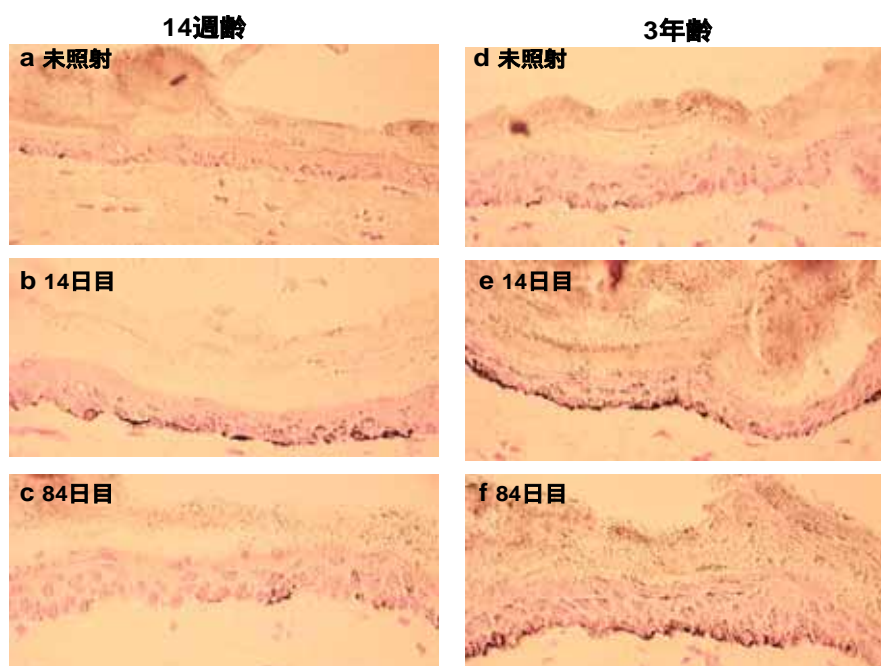


図20. UVB 照射後の加齢に伴うメラニン分布の変化  
14週齢 (a-c) 及び3年齢 (d-f) の皮膚を用いてフォンタ・マッソン染色を行った。未照射 (a,d)、UVB 照射後14日目 (b,e)、84日目 (c,f) の染色像を示す。

メラノサイト分布を観察した結果 (図 21)、UVB 照射後メラノサイトは均一に分布した。14 週齢においては 84 日目で未照射と同程度に回復したが (図 21a-c)、3 年齢では 84 日目でも 14 日目の分布パターンと同様であった (図 21d-f)。

メラノサイトの状態を定量化するために、DOPA+、gp100+、S-100+、KIT+ メラノサイト数をカウントした (図 22)。DOPA+、gp100+、S-100+ メラノサイトは 14 日目は 14 週齢、3 年齢ともに増加した (図 22a-c)。84 日目で、14 週齢のメラノサイト数は減少し、未照射とほぼ同程度に回復したが、3 年齢のメラノサイト数は増加したままであった (図 22a-c)。KIT+ メラノサイトについては、14 週齢では他のメラノサイト同様に 14 日目で増加し、その後未照射と同程度に回復するが、3 年齢においては、変化しなかった (図 22d)。

UVB 照射後の色素沈着は老若に関わらず形成された。その後、若齢では色素沈着が回復するが、老齢では沈着の回復は認められず、加齢により色素沈着回復過程が異なることを見出した。

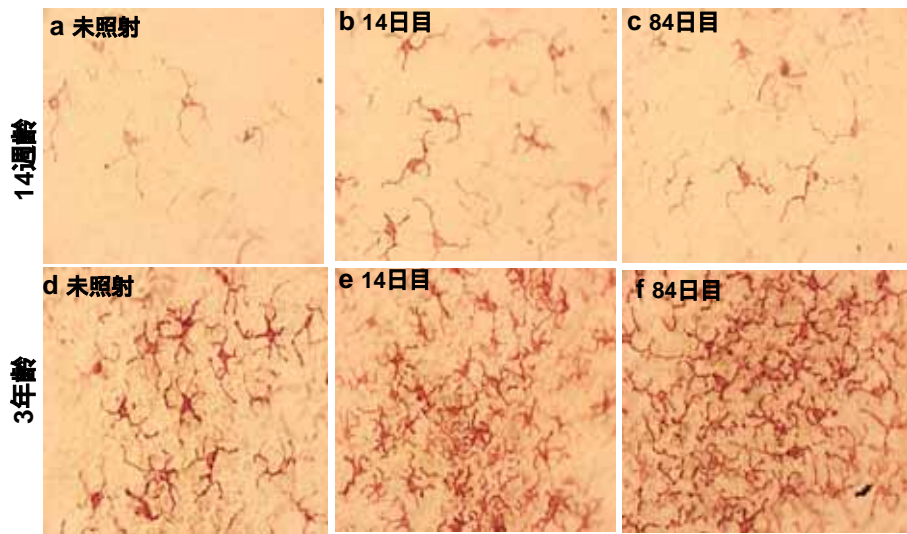


図21. UVB 照射後のメラノサイト分布の比較  
14週齢 (a-c) 及び3年齢 (d-f) の背部より表皮シートを作製し、抗 gp100抗体染色を施した。未照射 (a,d)、UVB照射後14日目 (b,e)、84日目 (c,f) のメラノサイト分布を示す。

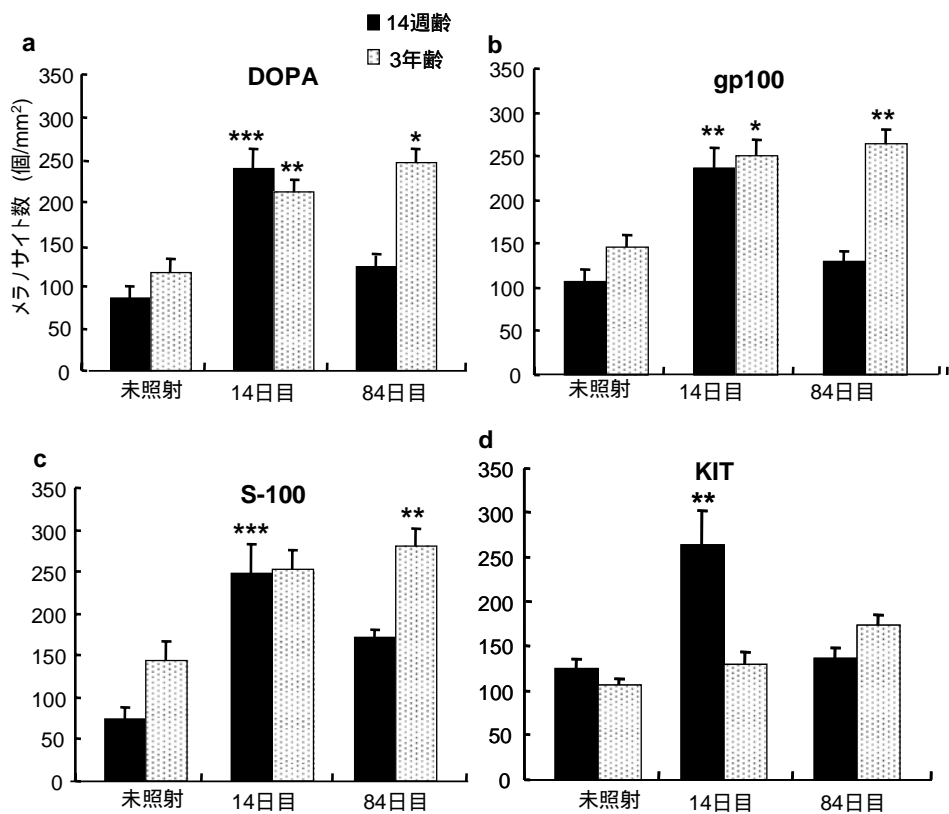


図22. UVB 照射後のメラノサイト数変化  
未照射、UVB 照射後14日目、84日目の DOPA+ (a)、gp100+ (b)、S-100+ (c)、KIT+ (d)メラノサイト数をカウントし、mm<sup>2</sup>あたりのメラノサイト数を算出した。グラフは平均 ± 標準偏差 (14週齢、3年齢 n=6)。統計解析は Kruskal-Wallis 検定と Dunnett 多重比較を行った。\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$ 、\*\*\*は  $p < 0.001$  を示す。

## 考察

A1 モルモットでは自然加齢により色素沈着が形成されることを初めて見出した (図 10)。加齢による色素沈着部位では表皮におけるメラニンの増加(図 12)、メラノサイトの凝集及び数の増加が確認された(図 13, 14)。さらに、UVB 照射後の色素沈着における加齢変化を調べた結果、老若ともに色素沈着は同等に形成された(図 16)。その後若齢ではメラノサイト数が減少し色素沈着は回復したが、老齢ではメラノサイト数は増加したままで色素沈着は残存した(図 22)。老若間で UVB 照射後の色素沈着反応が異なることを見出した。

加齢による色素沈着部位では、メラノサイトの凝集が観察された (図 13)。メラノサイトは毛包と毛包の間に帯状に観察され、この帯状の沈着は毛包の並びと平行であった。未成熟なメラノサイトは真皮に存在する外毛根鞘や毛包バルジ領域に存在し (Starico, 1960, Tobin, et al. 1996)、脱色素異常症である白斑において再沈着が起るときは外毛根鞘にそってメラノサイトが移動する (Cui et al.1991, Ortonne et al. 1979)。従って、私はモルモットにおいても毛包から未成熟なメラノサイトが移動し表皮で分化したことで、凝集が形成された可能性があると考えている。マウスにおいては、真皮にある KIT+ の未成熟なメラノサイトが表皮に遊走するときに、stem cell factor (SCF) が必要であることが報告されており (Nishikawa et al. 1991)、さらに、*in vitro*において、endothelin は SCF と協調して、メラノサイトの分化を誘導することが知られている (Ono et al. 1998)。モルモットの真皮にある KIT+メラノサイトの局在や表皮の SCF 及び endothelin の発現を調べることで、今回の結果から推察された可能性が検証できると私は考えている。

UVB が照射されると、色素沈着が形成される前に紅斑反応が認められることは一般に知られている。紅斑反応は血管拡張に起因するが、色素沈着と紅斑反応の因果関係は明らかではない。今回、加齢に伴い MED が増加し  $a^*$ 値が減少したが (図 15)、色素沈着は同等に形成された (図 16)。このことから私は、モルモットにおいては UVB 照射後の色素沈着は血管拡張以外の因子に寄与する可能性があると考えている。

メラニン合成が活発なメラノサイトに認められる DOPA+ もしくは gp100+ メラノサイト数や、総数マーカーである S-100+ メラノサイト数が加齢により増加していた (図 14)。*in vitro* では、ヒトのメラノサイト増殖因子として basic fibroblast growth factor (bFGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、SCF、endothelin、 $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) 等が報告されている (Halaban, 2000)。私はモルモットの表皮においても、加齢に伴いこれらの増殖因子の発現が増加した可能性が高いと考えており、増殖因子の発現を老若で比較することで可能性が検証できると考えている。

DOPA+、gp100+、S100+ メラノサイトは、加齢及び UVB による色素沈着形成や回復に伴い数が増減した (図 14, 18)。一方、メラニン合成が活発でない KIT+ メラノ

サイトの数の変化は、これらメラニン合成能が高いメラノサイト数の変化とは異なっていた。KIT+ メラノサイト数は、加齢による色素沈着に伴い減少し (図 14)、UVB 照射による色素沈着形成及び回復においては、若齢では増加した後減少したが、老齢では増加しなかった(図 18)。このことから、未成熟なメラノソームを保持するメラノサイトの一過的な増殖が、色素沈着の回復に重要であると考えている。

UVB 照射による色素沈着の形成過程で、各年齢ともに DOPA+、gp100+、S-100+ メラノサイト数は経日的に増加した(図 18a-c)。一方で、KIT+ メラノサイト数は UVB 照射後 1 日目で各年齢ともに減少傾向を示し、3 日目で未照射と同定度に回復した (図 18d)。ヒトでは UVB 照射後に KIT のリガンドである SCF が増加することが知られている (Hachiya et al. 2001)。マウスでも UVB 照射後に SCF mRNA の発現が増加し、さらに KIT+ メラノサイトが減少することが報告されている (Kawaguchi et al. 2001)。また、*in vitro* において、SCF 添加により KIT が細胞内に取り込まれ、分解される報告がある (Shimizu et al. 1996)。以上のことから、私の結果において、UVB 照射後 1 日目で KIT+ メラノサイト数が減少したことは SCF の増加が関与していると考えている。すなわち、モルモットでも、UVB 照射による色素沈着において SCF/KIT の関与が推察される。

UVB 照射後の色素沈着回復過程において、DOPA+、gp100+、S-100+ メラノサイト数は若齢では経日的に減少したが老齢では増加したままであった (図 22a-c)。KIT+ メラノサイト数は若齢では経日的に減少したが、老齢で数の変化は認められなかった (図 22d)。ヒトでは UVB 照射後に増加した SCF が減衰する (Hachiya et al. 2001)。また、*in vitro* において、SCF を添加した後に除去すると apoptosis が誘導される (Ito et al. 1999)。このことから、モルモットにおいて、若齢では UVB 照射後に SCF が増加し、メラノサイトの増加に伴い色素沈着が生じるが、その後 SCF が減衰し、増加したメラノサイトが apoptosis をおこして減少することで、色素沈着が回復するのではないかと私は考えている。一方老齢においては、UVB 照射後に SCF が増加するが、その後減衰しないため、メラノサイトが apoptosis をおこさず増加した状態を保ち、色素沈着が回復されないと推測される。Hattori らは、加齢に伴うヒトの局所的な色素沈着で SCF の発現が増加していると報告しており (Hattori et al. 2004)、私の結果も、この報告にあるような可能性で説明されるが、今後、UVB 照射後のモルモット表皮における SCF の局在や発現量変化を抗体染色法やウエスタンブロット法を用いて解析し、また、TUNEL 染色法とメラノサイトマーカーの抗体染色法を用いて二重染色を行い、メラノサイトの apoptosis を調べるなどの検証が重要であると考えられる。

ヒトでは加齢により表皮にて増殖能を有する細胞が減少し表皮厚が薄くなる、いわゆるケラチノサイトのターンオーバーの低下が報告されている (Cerimele et al. 1990, Engelke et al. 1997, Gilhar et al. 2004)。本研究においてモルモットでも加齢により表

皮厚は薄くなっており、上述の知見と一致する(図 12)。また、加齢に伴い表皮でメラニンの増加が観察された(図 12)。ターンオーバーの遅延により、メラニンがケラチノサイトに受け渡された後、排出されずに表皮に滞留し色素沈着を残存させている可能性があるとは私は考えている。

また、今回認められた色素沈着回復の変化にも加齢によるケラチノサイトのターンオーバーの低下が関与しているのではないかと私は考えている。老齢では UVB 照射後、表皮全体にメラニンは分布し、回復することはなかった(図 17e-h)。このことから、私は若齢ではターンオーバーに伴い、メラニンが排出されるが、老齢ではターンオーバーが遅延しているためメラニンの排出も遅れ色素沈着が回復しない可能性を考えている。

今回の研究より、A1 モルモットではメラノサイトの増加及び凝集を伴う色素沈着が自然加齢により形成されることを確認した。A1 モルモットは自然加齢による色素沈着モデルとして有用であると考えられる。さらに、このモデルを用いて UVB 照射により形成された色素沈着は、老齢モルモットで残存することを見出した。UVB の他に加齢も色素沈着形成に深く関与していることが示唆された。今後、色素沈着が残存するメカニズムを解明することで、皮膚恒常性の維持機能について、更なる知見が得られると考えられる。

## 謝辞

本申請論文の作成ならびに学位申請にあたり、終始ご懇篤なるご指導ご鞭撻を賜りました名古屋大学大学院理学研究科・町田 泰則教授に深く感謝し厚く御礼申し上げます。

名古屋大学大学院理学研究科・尾張部 克志教授、黒岩 厚教授、松本 邦弘教授、高木 新准教授には論文作成及び発表準備に際して格別のご指導を賜り深く感謝致します。

名古屋大学大学院理学研究科・大隈 圭太教授、澤田 均教授、日比 正彦教授、溝口 明准教授、吉岡 泰准教授には論文作成に格別のご指導を賜り深く感謝致します。

A1 モルモットを用いた色素沈着解析に際してご指導、ご鞭撻を賜りました聖アンナ医科大学 溝口 昌子名誉教授、河 陽子先生に深く感謝致します。またマウスを用いた HA 代謝解析に際してご指導、ご鞭撻を賜りました群馬大学大学院医学系研究科 石川 治教授に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、ご親切にご指導して頂きましたカネボウ化粧品価値創成研究所 打和 秀世所長、花王ビューティーケアセンター研究所 井上 紳太郎副所長（元カネボウ化粧品価値創成研究所長）に心から感謝の意を表します。さらに、実験の遂行に当たり、ご親切なご助言を頂きましたカネボウ化粧品価値創成研究所皮膚科学研究グループの方々に深く感謝致します。



## 参考文献

Agren UM, Tammi RH, Tammi MI (1997) Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radic Biol Med* 23: 996-1001.

Ajani G, Sato N, Mack, Maytin EV (2007) Cellular responses to disruption of the permeability barrier in a 3-dimensional organotypic epidermal model. *Exp Cell Res* 313: 3005-15.

Andley UP, Chakrabarti B (1983) Role of singlet oxygen in the degradation of hyaluronic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 115: 894-901.

Atmuri V, Martin DC, Hemming R, Gutsol A, Byers S, Sahebjam S, Thliveris JA, Mort JS, Carmona E, Anderson JE, Dakshinamurti S, Raine BT (2008) Hyaluronidase 3 knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation. *Matrix Biol* 27: 653-60.

Averbeck M, Gedharde CA, Voigt S, Beilharz S, Anderegg U, Termeer CC, Sleeman JP, Simon JC (2007) Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 127: 687-97.

Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA, Evanko SP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT (2007) High molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 179: 744-7.

Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F (2004) Hyaluronana-CD44 interaction with Rac1 -dependent protein kinaseN-γ promotes phospholipase Cy1 activation, Ca<sup>2+</sup> signaling, and cortactin-cytoskeleton function leading to keratinocyte adhesion and differentiation. *J Biol Chem* 279: 29654-69.

Bourguignon LY, Ramez M, Gilad E, Singleton PA, Man MQ, Crumrine DA, Elias PM, Feingold KR (2006) Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier

homeostasis. *J Invest Dermatol* 126: 1356-65.

Cerimele D, Celleno L, Serri F (1990) Physiological changes in aging skin. *Br J Dermatol*. 122: Supplement 35, 13-20.

Cui J, Shen LY, Wang GC (1991) Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. *J Invest Dermatol* 97: 410-16.

Csola AB, Forst GI, Stern R (2001) The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* 20: 4499-508.

Engelke M, Jensen JM, Ekanayake MS, Proksch E (1997) Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. *Br J Dermatol*. 137: 219-25.

Feingold KR (1991) The regulation of epidermal lipid synthesis by permeability barrier requirements. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 8: 193-210.

Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B (1998) Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 824-9

Gilchrist BA, Park HY, Eller MS, Yaar M (1996) Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem and Photobiol* 63: 1-10

Gilhar A, Ullmann Y, Karry R, Shalaginov R, Assy B, Serafimovich S, Kalish RS (2004) Aging of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and telomerase. *Br J Dermatol*. 150: 56-63.

Greenwald RA, Moy WW (1980) Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum* 23: 455-63.

Grichnik JM, Crawford J, Jimenez F, Kurtzberg J, Buchanan M, Blackwell S, Clark RE, Hitchcock MG (1995) Human recombinant stem-cell factor induces melanocytic hyperplasia in susceptible patients. *J Am Acad Dermatol* 33: 577-83.

Hachiya A, Kobayoshi A, Ohuchi A, Takema Y, Imokawa G (2001) The paracrine role of

stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol* 116: 578-86.

Haddad MM, Xu Weidong, Medrano EE (1998) Aging in Epidermal Melanocytes: Cell Cycle Genes and Melanins Review. *J Invest Dermatol Symp Proc* 3: 36-40.

Halaban R (2000) The Regulation of Normal Melanocyte Proliferation. Invited Review *Pigment Cell Res* 13: 4-14.

Harada H, Takahashi M (2007) CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem* 282: 5597-607.

Haratake A, Uchida Y, Schmuth M, Tanno O, Yasuda R, Epstein JH, Elias PM, Horren WM (1997) UVB-induced alteration in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response. *J Invest Dermatol* 108: 769-75

Hattori H, Kawashima M, Ichikawa Y, Imokawa G (2004) The epidermal stem cell factor is over-expressed in lentigo senilis: Implication for the mechanism of hyperpigmentation. *J Invest Dermatol* 122: 1256-65.

Holzle E (1992) Pigmented lesion as a sign of photodamage. *Br J Dermatol*. 127: Supplement 41, 48-50.

Horikoshi T, Nakahara M, Kaminaga H, Sasaki M, Uchiwa H, Niyachi Y (2000) Involvement of nitric oxide in UVB-induced pigmentation in guinea pig skin. *Pigment Cell Res* 13: 358-36.

Houben E, Paept KD, Rogiers V (2007) A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol Physiol* 20: 122-32

Imokawa G, Kawai M, Mishima Y, Motegi I (1986) Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVB, PUVA, and allergic contact dermatitis using a brownish guinea pig. *Arch Dermatol Res* 278: 352-62.

Itano N, Kimata K (1996) Molecular cloning of human hyaluronan synthase. *Biochem*

Biophys Res Commun 222: 816-20.

Ito M, Kawa Y, Ono H, Okura M, Baba T, Kubota Y, Nishikawa S, Mizoguchi M (1999) Removal of stem cell factor or addition of monoclonal anti-c-KIT antibody induces apoptosis in murine melanocyte precursors. *J Invest Dermatol.* 112: 796-801.

James LC, Moore AM, Wheeler LA, Murphy GM, Dowd PM, Greaves MW (1991) Transforming growth factor alpha: in vivo release by normal human skin following UV irradiation and abrasion. *Skin Pharmacol* 4: 61-4

Kakizaki I, Itano N, Kimata K, Hanada K, Kon A, Yamaguchi M, Takahashi T, Takagaki K (2008) Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *Arch Biochem Biophys* 471: 85-93.

Karvinen S, Seppanen SP, Hyttinen JM, Pienimaki JP, Torronen K, Jokela TA, Tammi MI, Tammi R (2003) Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *J Biol Chem* 278: 49495-504.

Kawaguchi Y, Mori N., and Nakayama A (2001) Kit+ melanocytes seem to contribute to melanocyte proliferation after UV exposure as precursor cells. *J Invest Dermatol.* 116: 920-5.

Kaya G, Grand D, Hotz R, Augsburger E, Carraux P, Didierjean L, Saurat JH (2005) Upregulation of CD44 and hyaluronate synthases by topical retinoids in mouse skin. *J Invest Dermatol* 124: 284-7.

Krueger JG, Krane JF, Carter DM, Gottlieb AB (1990) Role of growth factors, cytokines, and their receptors in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 94: 135S-40S.

Koyama Y, Hujii H (1967) *Doubutujiltukennshugi.* Kyoudouisho 4:351.

Laurent TC, Fraser JR (1992) Hyaluronan. *FASEB J* 6: 2397-2404.

Lepperdinger G, Strobl B, Kreil G (1998) *HYAL2*, a human gene expressed in many

cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem* 273: 22466-70.

Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, Soloway MS, Iida N (2002) Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* 277: 33654-63.

Maglio DH, Paz ML, Ferrari A, Weill FS, Czerniczyniec A, Leoni J, Bustamante J (2005) Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 26: 311-7.

McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Nobel PW (1996) Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest* 98:2403-13.

Morelli JG, Norris DA (1993) Influence of inflammatory mediators and cytokines on human melanocyte function. *J Invest Dermatol* 100: 191S-196S.

Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Era T, Sakakura T, Nishikawa S (1991) In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J*. 10: 2111-8

Nobel PW, McKee CM, Cowman M, Shin HS (1996) Hyaluronan fragments activate an NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B $\alpha$  autoregulatory loop in murine macrophages. *J Exp Med* 183: 2373-8.

Ohtani T, Memezawa A, Okuyama R, Sayo T, Sugiyama Y, Inoue S, Aiba S (2009) Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. *J Invest Dermatol* 129: 1412-20.

Okura M., Maeda H., Nishikawa S., and Mizoguchi M (1995) Effect of monoclonal anti-c-Kit antibody (ACK2) on melanocytes in newborn mice. *J Invest Dermatol*. 105: 322-8.

Ono H, Kawa Y, Asano M, Ito M, Takano A, Kuboto Y, Mtsumoto J, Mizoguchi M (1998) Development of melanocyte progenitors in murine Steel mutant neural crest explants cultured with stem cell factor, endothelin-3 or TPA. *Pigment Cell Res* 11: 291-8.

Ortonne JP, MacDonald DM, Micoud A, Thivolet J (1979) PUVA-induced repigmentation of vitiligo: a histochemical (split-DOPA) and ultrastructural study. *Br J Dermatol* 101: 1-12.

Rahman S.B., and Bhawan J (1996) Lentigo. Review. *Int J Dermatol.* 35: 229-39.

Rilla K, Lammi MJ, Sironen R, Torronen K, Luukkonen M, Hascall VC, Midura RJ, Hyttinen M, Pelkonen J, Tammi M, Tammi R (2002) Changed lamellipodial extension, adhesion plaques and migration in epidermal keratinocytes containing constitutively expressed sense and antisense *hyaluronan synthase 2 (Has2)* genes. *J Cell Sci* 115: 3633-43.

Rilla K, Seppanen SP, Rieppo J, Tammi M, Tammi R (2004) The hyaluronan synthesis inhibitor 4-Methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor. *J Invest Dermatol* 123: 708-14.

Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, Cheon G, Taylor WG, Fortney E, Sakata H, Finch PW (1995) Keratinocyte growth factor. *Cell Biol Int* 19: 399-411.

Sakai S, Yasuda R, Sayo T, Ishikawa O, Inoue S (2000) Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *J Invest Dermatol* 114: 1184-7.

Sayo T, Sugiyama Y, Takahashi Y, Ozawa N, Sakai S, Ishikawa O, Tamaru M, Inoue S (2002) Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 118: 43-8.

Sayo T, Sakai S, Inoue S (2004) Synergistic effect of N-acetylglucosamine and retinoids on hyaluronan production in human keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol* 17: 77-83.

Seppanen SP, Karvinen S, Torronen K, Hyttinen JM, Jokela T, Lammi MJ, Tammi MI, Tammi R (2003) EGF upregulates, whereas TGF- $\beta$  downregulates, the hyaluronan

synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 120: 1038-44.

Shimizu Y, Ashman LK, Du Z, Schwartz LB (1996) Internalization of Kit together with stem cell factor on human fetal liver-derived mast cell. *J Immunol* 156: 3443-9.

Shimizu K, Kondo R, Sakai K, Takeda N, Nagahata T (2002) The Skin-Lighening Effects of Artocarpin on UVB-Induced Pigmentation. *Letter. Planta Med* 68:76-9.

Spicer AP, Augustine ML, McDonald JA (1996) Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 271: 23400-06.

Spicer AP, Olson JS, McDonald JA (1997) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 272: 8957-61.

Starico R (1960) The melanocytes and the hair follicle. *J Invest Dermatol* 35: 185-94.

Tamaki K et al (2002) *Comprehensive handbook of clinical dermatology.* Nakayamashoten 19: 91-97

Tamaki K et al (2004) *Comprehensive handbook of clinical dermatology.* Nakayamashoten 19: 37-64

Tammi R, Ripellino JA, Marqolis RU, Tammi M (1988) Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J Invest Dermatol* 90: 412-4

Tammi R, Seppanen SP, Kolehmainen E, Tammi M (2005) Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury. *J Invest Dermatol* 124: 898-905.

Tempel C, Gilead A, Neeman M (2000) Hyaluronic acid as anti-angiogenic shield in the preovulatory rat follicle. *Biol Reprod* 63: 134-40.

Tobin DJ, Bystryn JC (1996) Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis. *Pigment Cell Res* 9: 304-10.

Yoshida M, Hirotsu S, Nakahara M, Uchiwa H, Tomita Y (2002) Histamine is involved in Ultraviolet B-Induced Pigmentation of Guinea Pig Skin. *J Invest Dermatol* 118: 255-60.

Yoshizumi M, Nakamura T, Kato M, Ishioka T, Kozawa K, Wakamatsu K, Kimura H (2008) Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol Int* 32: 1405-11.

Verdier SB, Bonte F (2007) Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol* 6: 75-82.

Watanabe K, Yamaguchi Y (1996) Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 271: 22945-48.

West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S (1985) Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228: 1324-6.

Wulf HC, Moller JS, Kobayashi T, Gniadecki R (2004) Skin aging and natural photoprotection. *Micron* 35: 185-191.

Zhang H, Shertok S, Miller K, Taylor L, Deleon PA (2005) Sperm dysfunction in the Rb(6.16)-and Rb(6.15)- bearing mice revisited: involvement of Hyalp1 and Hyal5. *Mol Reprod Dev* 72: 404-10.