

トコフェリルリン酸ナトリウムの
抗炎症効果と皮膚水分保持能改善効果
及びその機構に関する研究

2012

加藤 詠子

目次

論文リスト

略号リスト

第 1 章	緒論	1
第 2 章	TPNa の抗炎症効果の検討	5
第 1 節	TPNa のヒト 3 次元培養モデル皮膚への浸透とトコフェロールへの 変換	7
第 2 節	TPNa の紫外線 B 波による損傷からの防護効果	9
第 3 節	紫外線 B 波による PGE ₂ 産生に対する抑制効果	11
第 4 節	各種トリガーによる PGE ₂ 産生に対する抑制効果	13
第 5 節	Cox-2 遺伝子の発現抑制効果	15
第 6 節	p38 MAPK 活性化に対する抑制効果	17
第 7 節	UVB 照射による PGE ₂ 産生に対する TPNa とビタミン C 誘導体の 相乗的阻害効果	22
第 8 節	本章のまとめ・考察	24
第 3 章	TPNa の皮膚水分保持機能改善効果の検討	28
第 1 節	ヘアレスマウスにおける皮膚水分保持機能改善効果	29
第 2 節	ヘアレスマウスにおける皮膚角層セラミド増加効果	31
第 3 節	皮膚表皮角化細胞におけるセラミド産生促進作用	33
第 4 節	皮膚表皮角化細胞におけるセラミド合成関連酵素の発現促進作用	35
第 5 節	皮膚表皮角化細胞における分化関連因子の発現促進作用	37
第 6 節	皮膚表皮角化細胞における細胞内カルシウム濃度増加作用	39
第 7 節	表皮角化細胞への取り込みと変換	41
第 8 節	本章のまとめ・考察	42
第 4 章	総括	47
第 5 章	実験の部	49
第 6 章	謝辞	59
REFERENCES		60

論文リスト

1. 第2章 TPNa の抗炎症効果の検討

Sodium dl- α -tocopheryl-6-O-phosphate inhibits PGE₂ production in keratinocytes induced by UVB, IL-1 β and peroxidants.: Kato E., Sasaki Y. and Takahashi N., Bioorg. Med. Chem., 19 (21), 6348-55 (2011).

2. 第3章 TPNa の皮膚水分保持機能改善効果の検討

Improvement by sodium dl- α -tocopheryl-6-O-phosphate treatment of moisture-retaining ability in stratum corneum through increased ceramide levels. Kato E., and Takahashi N., Bioorg. Med. Chem., 20 (12), 3837-42 (2012).

略号リスト

本論文中に使用した略語は以下の通りである。

AsA	ascorbic acid	: アスコルビン酸
ACER1	alkaline ceramidase 1	: アルカリセラミダーゼ 1
APM	L-ascorbyl-2-phosphate magnesium	: リン酸アスコルビルマグネシウム
ASAH1	<i>N</i> -acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	: <i>N</i> -アシルスフィンゴシン・アミドヒドロラーゼ (酸性セラミダーゼ) 1
Cox-2	cyclooxygenase-2	: シクロオキシゲナーゼ-2
DMEM-low glucose	Dulbecco's modified eagle's medium – low glucose	: ダルベッコ改変イーグル培地 - 低グルコース
D-PBS(-)	Dulbecco's phosphate buffered saline	: ダルベッコリン酸緩衝液
ERK	extracellular signal-regulated kinase	: 細胞外シグナル調節キナーゼ
FLG	filaggrin	: フィラグリン
G2K	dipotassium glycyrrhizate	: グリチルリチン酸二カリウム
IL-1 β	interleukin 1beta	: インターロイキン-1 β
IVL	involucrin	: インボルクリン
KRT1	keratin 1	: ケラチン 1
KRT10	keratin 10	: ケラチン 10
LOR	loricrin	: ロリクリン
MAPK	mitogen-activated protein kinase	: MAP キナーゼ
NHEK (F)	normal human epidermal keratinocyte (foreskin)	: 正常ヒト新生児表皮角化細胞

NMF	natural moisturizing factor	: 天然保湿因子
O/W	oil in water	: 水中油型
PGE ₂	prostaglandin E ₂	: プロスタグランジン E ₂
SPTLC	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit	
	: セリンパルミトイルトランスフェラーゼ	
SVHK	SV40-transformed human keratinocyte	: ヒト株化ケラチノサイト
TA	α -tocopheryl acetate	: 酢酸トコフェロール
TBS-T	Tris-buffered saline - Tween-20	
	: トリス緩衝食塩水/Tween-20	
TGM1	transglutaminase 1	
	: トランスグルタミナーゼ 1	
TP	α -tocopheryl phosphate	: トコフェリルリン酸
TPNa	sodium <i>dl</i> - α -tocopheryl-6- <i>O</i> -phosphate	
	: トコフェリルリン酸ナトリウム	
UVB	ultraviolet-B	: 紫外線 B 波
tBHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide	
	: <i>tert</i> -ブチルヒドロペルオキシド	
α -Toc	<i>dl</i> - α -tocopherol	: <i>dl</i> - α -トコフェロール

第1章 緒論

トコフェリルリン酸ナトリウム (TPNa) は α -トコフェロール (α -Toc) のクロマン環の水酸基をリン酸エステル化した化合物であり (Fig. 1)、1940 年に Karrer らによって合成された¹⁾。親化合物の α -Toc は脂溶性ビタミンに属し、淡黄色で粘稠性の油状物質で、生体内において抗酸化作用を示す。 α -Toc は有機溶媒によく溶けるが水に溶けないこと、及び酸化剤によって容易に酸化され不安定であることから、取り扱いが難しい化合物であった。そこで、 α -Toc をリン酸エステル化することで安定化し、Na 塩にすることで水溶性にして TPNa が開発された。TPNa は、わが国では 2004 年に医薬部外品主剤 (肌あれ予防)、その後医薬部外品添加剤 (酸化防止剤) として厚生労働省から認可を受け、機能性化粧品原料として使用されている。

Gianello らは 2005 年に、微量の α -トコフェリルリン酸 (TP) (Fig. 1) が生体内で生成し、肝臓や皮下脂肪組織に存在することを確認した²⁾。それと前後して同じ研究グループにより、ヒト単球性白血病細胞におけるスカベンジャー受容体 CD36 の発現抑制作用³⁾や動脈硬化巣の減少効果が見出され⁴⁾、TP の細胞情報伝達系に関与する可能性が報告された⁵⁾。しかし、その作用メカニズムの詳細は解明途上にある。一方、親化合物である α -Toc の生理作用も注目され、1990 年頃から、既知の活性酸素・ラジカルを消去するというメカニズムのほか、細胞内シグナル伝達や遺伝子発現調節への作用が報告されるようになった。例えば、5-リポキシゲナーゼの活性の阻害、リン酸化タンパク質脱リン酸酵素及びジアシルグリセロールキナーゼの活性化、スカベンジャー受容体発現の抑制など多種多様明らかにされているが⁶⁾、現在も作用メカニズムの解明が続けられている。

皮膚は生体の最外層に位置する組織で、表層から順に、角層、表皮層、真皮層の順に 3 層構造をとっている。これによって皮膚は、傷害や乾燥から生体を守り、刺激に対して体温及び水分調節などの機能を担っている。角層は、約 10～15 層の層状に積重なった角質細胞と、その細胞間の間隙を埋めるように存在する細胞間脂質とから構成されており、外界環境に対するバリアとして機能しているほか、水分を保持し皮膚に柔軟性や潤いを与えている。これらの機能に

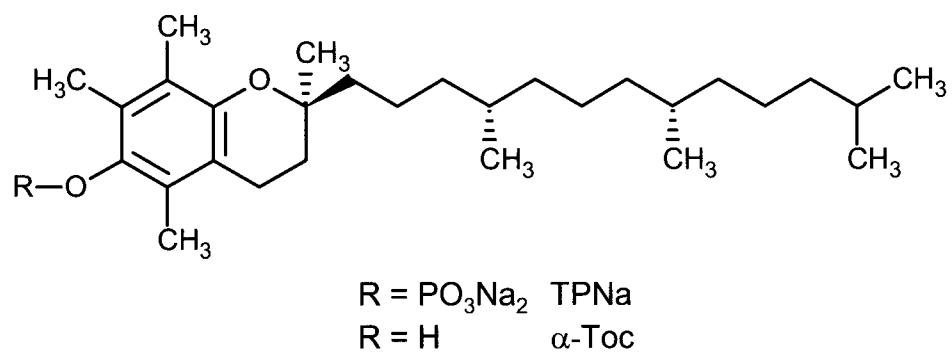


Fig. 1 Chemical structures of TPNa and α -Toc.

寄与しているのは天然保湿因子 (NMF, natural moisturizing factor) のアミノ酸類、尿素、乳酸などと、細胞間脂質のセラミド、コレステロール類、遊離脂肪酸などである。表皮層は、表皮最下層の基底膜の部分で分裂して生じる表皮角化細胞から主に成っている。表皮角化細胞は有棘細胞・顆粒細胞と分化・成熟しながら表層へ移動して角質細胞となり、その過程で角層の主成分となるケラチン線維、天然保湿因子、細胞間脂質などを産生する。また、外因性、内因性の様々な刺激により各種サイトカインを産生する。真皮層は、基底膜の下部に存在する組織で、線維性組織を形成する間質成分と、その産生細胞などからなる細胞成分により構成されている⁷⁾。

このような構造の皮膚を健やかとするには、表皮層の恒常性を保ち、正常な機能を有する角層を形成し、維持することが重要であると考えられている。近年、地球環境と生活環境の変化や人口構造の高齢化により、紫外線、ストレス、乾燥などによる皮膚のトラブル、即ち角層や表皮層の恒常性の乱れが増加している。それらを予防・改善する機能が医薬部外品や化粧品に求められ、機能性原料開発の主要な課題として認識されている。

トコフェロール類の抗炎症作用に関して、Lee らはヒト肺がん細胞を用い、コハク酸トコフェロールのプロスタグランジン E_2 (PGE_2) 産生阻害作用を明らかにした⁸⁾。O'Leary らはヒト大腸がん細胞を用い、 α -Toc とその同属体の γ -トコフェロール (γ -Toc) が、炎症メディエーターのひとつである PGE_2 の合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2 (Cox-2) の活性を阻害することを示した⁹⁾。また、Maalouf らは、酢酸トコフェロールによって紫外線照射によるマウス表皮角化細胞のアポトーシス及び NF- κ B の誘導が抑制されることを明らかにした¹⁰⁾。さらに、Yoshida らのマウス皮膚を用いた検討では、 γ -Toc ジメチルグリシン誘導体による PGE_2 の産生抑制作用及び Cox-2 の発現抑制作用が明らかとなった¹¹⁾。

トコフェロール類の保湿作用に関して、Gehring らはヒトに酢酸トコフェロールを配合したエマルジョンを塗布し保湿性が向上すること¹²⁾、Tambric らは α -Toc の長期間投与による保湿性改善を明らかとした¹³⁾。しかしながら、いずれの研究においても保湿性改善のメカニズムについては全く言及していない。

TPNa の生理作用に関して、Nakayama らはマウス皮膚への紫外線照射による

過酸化脂質の生成や Sunburn cell の形成を抑制することを報告した¹⁴⁾。また Tanaka らはヒト脳毛細血管内皮細胞におけるテロメアの短縮予防効果¹⁵⁾、Rezk らは骨肉種細胞の増殖抑制とアポトーシス誘導作用を明らかにした^{16,17)}。Negis らはウサギを用い、抗アテローム性動脈硬化の予防作用とスカベンジャー受容体 CD36 の発現抑制作用を報告した⁴⁾。Ohmori らは TPNa の NF- κ B を介した炎症の抑制作用¹⁸⁾、表皮顆粒層における細胞結合のタイトジャンクションの機能維持¹⁸⁾を、Nakama らは活性窒素種の生成抑制¹⁹⁾などを提唱したが、それらに関する詳細な報告はない。

本研究では、抗酸化作用以外の機能が期待される TPNa に着目し、皮膚の抗炎症作用とそのメカニズムの解明、及び、皮膚水分保持機能改善作用とそのメカニズムの解明を目的とした。そこでまず、TPNa の抗炎症作用を PGE₂ 産生抑制と Cox-2 発現抑制を指標として汎用の医薬部外品主剤と比較し、これらの作用メカニズムについて検討した。次に、TPNa による *in vivo* での皮膚水分保持機能の改善と角層セラミドの増加を確認し、*in vitro* でセラミド合成酵素の発現解析と、その作用メカニズムの解明を行った。

第2章 TPNa の抗炎症効果の検討

TPNa は皮膚トラブルの一種である肌荒れを予防する医薬部外品主剤である。肌荒れは紫外線の照射や乾燥などが原因となって起り、皮膚の乾燥や、きめの乱れ、発赤などが具体的症状である。発赤は、表皮における炎症反応が原因で発症するとされ TPNa にはその予防効果が認められているが¹⁸⁾、作用メカニズムに関する詳細な報告は無い。

そこで、本章では、TPNa の抗炎症効果とその作用メカニズムについて検討した。比較対照化合物としては、肌荒れ予防効果を示す医薬部外品主剤で、化粧品に汎用されている酢酸トコフェロール (TA) とグリチルリチン酸二カリウム (G2K) を用いた (Fig. 2-1)。

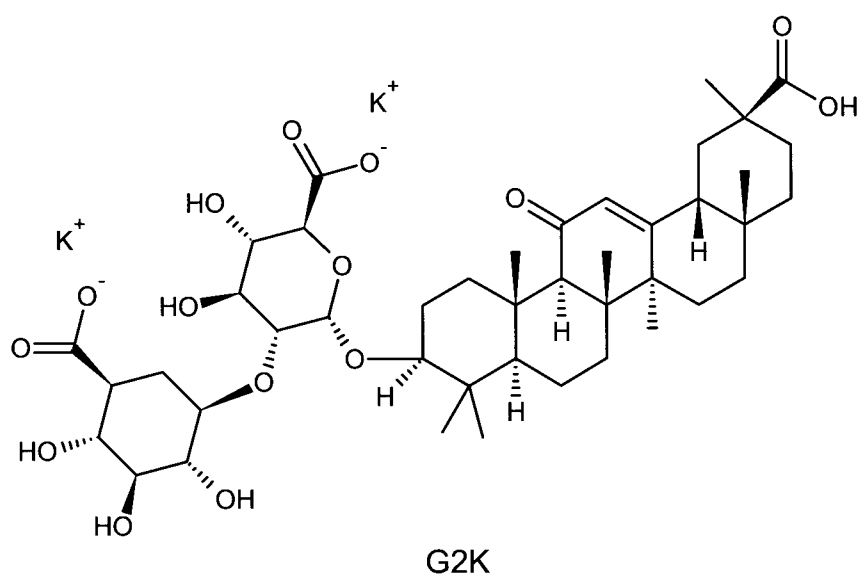
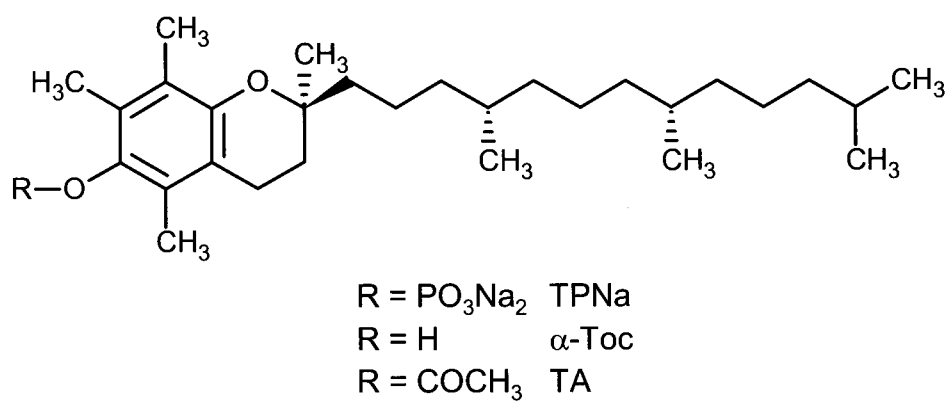


Fig. 2-1 Chemical structures of TPNa, α -Toc, TA and G2K.

第 1 節 TPNa のヒト 3 次元培養モデル皮膚への浸透と α -Toc への変換

TPNa の 3 次元培養モデル皮膚への浸透と α -Toc への変換について調べるために、汎用のトコフェロール誘導体である TA (Fig. 2-1) と比較して検討した。TPNa または TA の 2% 溶液 100 μ l をモデル皮膚表面に添加し、37 °C で 4, 16, 24 時間培養した後、モデル皮膚内で変換されて生じた α -Toc の量をそれぞれ測定した。

Fig. 2-2 に示すように、TPNa を添加した場合、培養 4 時間目以降に TPNa から変換により生じた α -Toc が検出され、その濃度は経時的に増加し、培養 24 時間後には 4 時間後の約 4.5 倍となった。各時間の α -Toc の量は浸透した TPNa の約 2%であった。一方、TA の添加 4 時間後の α -Toc 量は TPNa の約 5 分の 2 であり、その後の経時的な増加は認められなかった。

この結果から、TPNa のほうが TA よりも α -Toc への変換速度が速いことが明らかとなった。

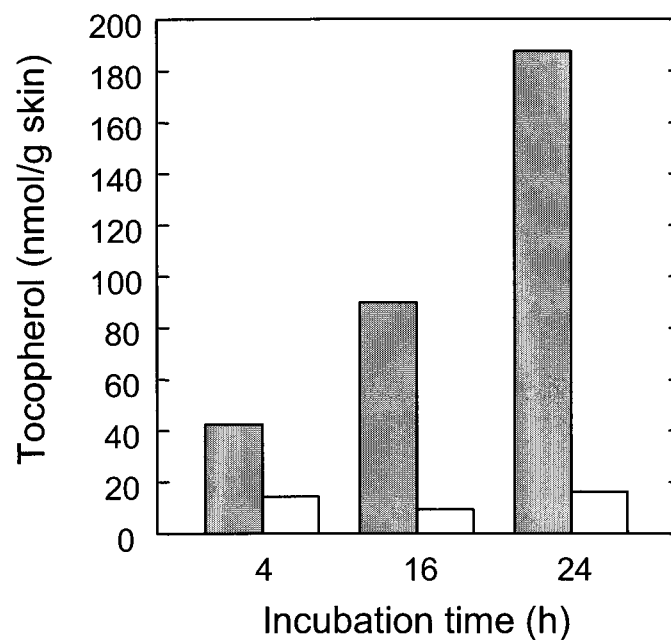


Fig. 2-2 Permeation of TPNa and TA and conversion to α -Toc.

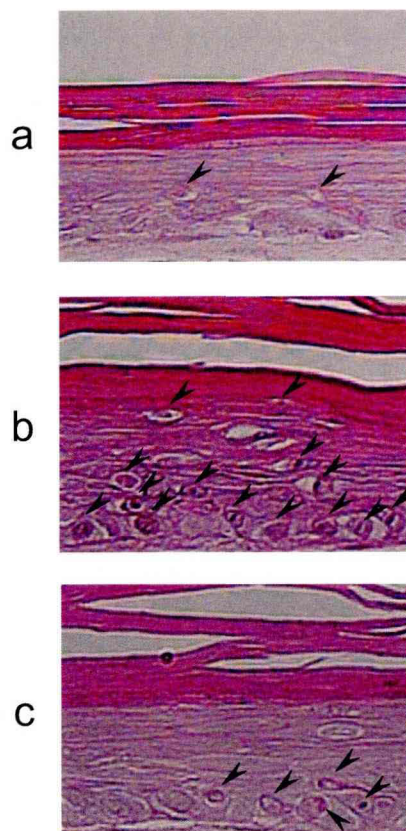
Permeation of TPNa and TA and conversion to α -Toc were determined. Solutions of TPNa (■) or TA (□) (2%, 100 μ l) were applied onto the skinsurface in the 3D-model. The skin was incubated at 37 °C for 4, 16, and 24 h and then homogenized. Intradermal concentrations of released Toc were determined by HPLC. Each bar represents the mean of at least three measurements.

第 2 節 TPNa の紫外線 B 波による損傷からの防護効果

次に 3 次元培養モデル皮膚への紫外線 B 波 (UVB) 照射に対する TPNa の防護効果を検討した。モデル皮膚表面に UVB (80 mJ/cm^2) を照射した後に 2% TPNa を 2 時間処理し、さらに 22 時間培養後、組織を固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って組織標本を作成した。そして顕微鏡下で細胞観察を行い、UVB 損傷細胞の数を計測した。

Fig. 2-3 に示すように、UVB を照射しなかった場合では (Fig. 2-3a)、核の部分が濃く染色された損傷細胞がほとんど認められないが、UVB を照射した場合には (Fig. 2-3b)、損傷細胞が UVB を照射しなかった場合に比べて約 4 倍多く認められた。UVB 照射後直ちに TPNa 処理を行った場合には (Fig. 2-2c)、損傷細胞の数が有意に減少していた。

この結果から、TPNa は UVB による細胞の損傷を防護，減少させることが明らかとなった。



Treatments	Damaged cells / epidermis (0.5 mm)
a None	$6.8 \pm 2.7^{**}$
b UVB	25.9 ± 7.5
c UVB + TPNa	$15.9 \pm 2.8^{**}$

Fig. 2-3. Protective effects of TPNa against UVB irradiation.

Protective effects of TPNa against UVB irradiation were examined. Specimens of the model skin irradiated by UVB (80 mJ/cm^2) without or with post-treatment using 2 % of TPNa were fixed and stained with 1% hematoxylin and eosin, and then UVB-damaged cells were counted under a microscope. Arrows indicate UVB-damaged cells. Values represent the mean of \pm SD of each group. $^{**}p < 0.01$ versus UVB compared by Student's *t*-test.

第3節 紫外線 B 波による PGE₂ 産生に対する抑制効果

前節の結果より、TPNa は UVB による細胞の損傷を防護することが明らかとなった。そこで次に、3 次元培養モデル皮膚に UVB 照射した際の TPNa の抑制効果を、炎症メディエーター物質である PGE₂ の産生を測定することにより検討した。UVB (80 mJ/cm²) を照射した後に 2% TPNa を 2 時間処理し、さらに 22 時間培養した後、培地中の PGE₂ を定量した。

Fig. 2-4 に示すように、UVB を照射すると、未照射のときと比較して約 5 倍の PGE₂ が産生されたが、照射後に TPNa 処理することで PGE₂ の産生量が約 40% 抑制された。また、UVB 未照射時に TPNa を処理するだけでも、UVB 未照射時に比べて生成 PGE₂ 量は約 4 分の 1 に減少した (Fig. 2-4, 右端)。

この結果から、TPNa は UVB 照射による PGE₂ 産生を抑制することにより UVB 照射による炎症反応から皮膚を防御する可能性が示唆された。

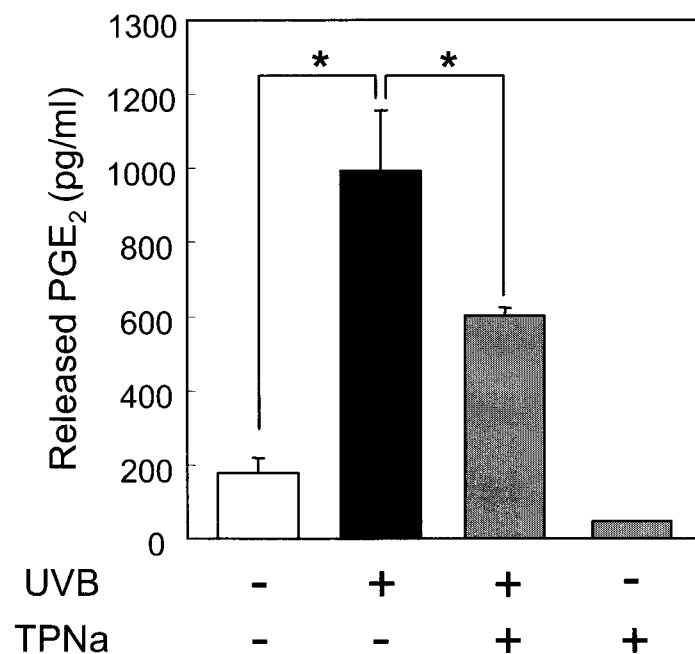


Fig. 2-4 Suppressive effects of TPNa on PGE₂ generation in model skin.

Suppressive effects of TPNa on PGE₂ generation in skin are shown. Model skins were irradiated with UVB (80 mJ/cm²) and then incubated without or with 2% TPNa. The amounts of PGE₂ in the medium were determined as described in the “Materials & Methods”. Each bar represents the mean \pm SD. * p <0.05 versus UVB irradiation in the absence of TPNa compared by Student’s t -test.

第4節 各種トリガーによる PGE₂ 産生に対する抑制効果

前節の3次元培養モデル皮膚を用いた研究の結果より、TPNaはUVB照射によるPGE₂産生を抑制し、それにより炎症反応から皮膚を防御する可能性が明らかとなった。そこで、正常ヒト表皮角化細胞を用い、UVB照射、炎症トリガーのインターロイキン-1 β (IL-1 β) 及び過酸化物の *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (tBHP) と過酸化水素 (H₂O₂) によるPGE₂産生に対するTPNaの抑制効果を検討した。この際、抗炎症物質であるTAとG2Kを比較対象として用いた。

まず、正常ヒト新生児表皮角化細胞 (NHEK(F)) を各被験物質 (TPNa, TA, G2K) の0~2 μ Mで処理し、24時間培養した後、UVB (60 mJ/cm²) 照射 (A), IL-1 β (10 ng/ml) 処理 (B), 0.5 mM tBHP 処理 (C), 1 mM H₂O₂ 処理 (D) をそれぞれ行った。各24時間培養後、培地中のPGE₂量を定量した (Fig. 2-5)。

Fig. 2-5A に示すように、UVB照射によりPGE₂産生量は未照射の約10倍に増加したが、TPNa処理によりその増加が濃度依存的に有意に抑制された。TAにもPGE₂産生抑制効果が認められたが、TPNaより弱かった。これに対しG2Kではほとんど効果は認められなかった。Fig. 2-5B に表すように、IL-1 β 刺激によりPGE₂産生量は未処理の約5倍に増加したが、TPNa, TA, G2K添加により濃度依存的に増加が抑制された。TPNaとTAの効果はほぼ同等であったが、G2Kの効果はそれらに比較して低かった。Fig. 2-5C に示すように、tBHP処理によりPGE₂産生量は未処理の約10倍に増加したが、その増加がTPNa添加により濃度依存的に顕著に抑制された。TAには2 μ M添加のときのみ有意な抑制効果が認められたが、G2Kには2 μ M添加でもほとんど効果がなかった。Fig. 2-5D に表すように、H₂O₂処理によるPGE₂産生増加は、0.1~2 μ M TPNaによって約50%, 2 μ M TAによって約25%, 0.5~2 μ M G2Kによって約40%抑制された。

これらの結果より、TPNaはUVB照射、IL-1 β 及び過酸化物の刺激によるPGE₂産生増加に対して、TAやG2Kよりも強力に阻害することから、これらの薬剤よりも効果的に、炎症反応を抑え皮膚を防御することが示唆された。

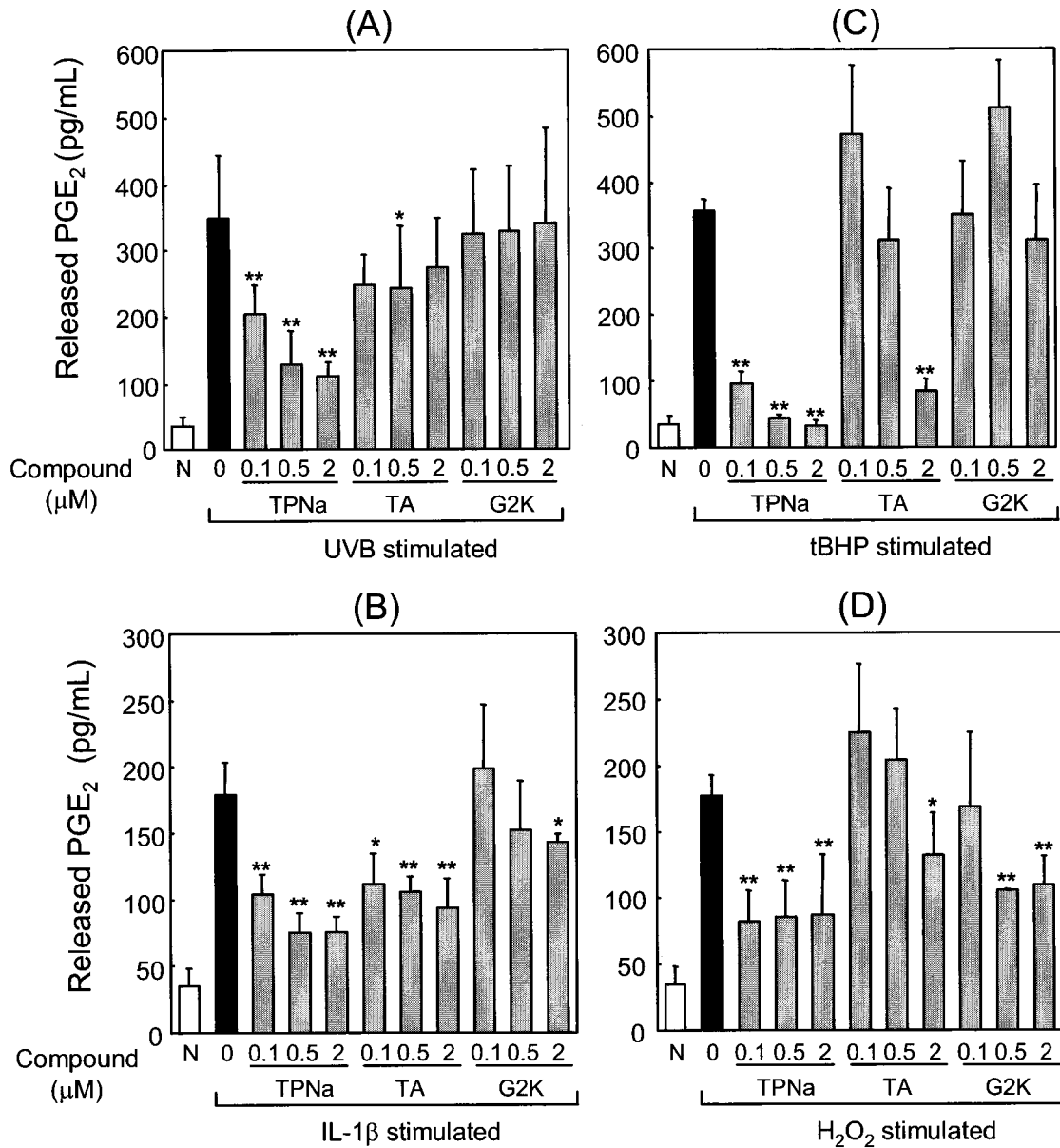


Fig. 2-5 Effects of TPNa on PGE₂ levels in NHEK(F).

NHEK(F) (10^5 cells/ml) were incubated with TPNa, TA and G2K at concentrations from 0 to 2 μ M for 24 h. (1) Cells were irradiated with UVB (60 mJ/cm²) (A) or stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) (B) and then post-cultivated for 24 h as described in the “Materials & Methods”. (2) After replacing the medium, cells were treated with 0.5 mM tBHP (C) or 1 mM H₂O₂ (D) for 0.5 h, transferred to fresh medium, and incubated for 24 h. The amounts of PGE₂ in the medium were determined as described in the “Materials & Methods”. Each bar represents the mean \pm SD. ** p <0.01 and * p <0.05 versus each stimulant in the absence of compounds compared by Student’s t -test.

第 5 節 Cox-2 遺伝子の発現抑制効果

Cox-2 は PGE₂ の合成に関わり炎症反応を促進する酵素である。そこで、正常ヒト表皮角化細胞を用い、UVB 照射、炎症トリガーの IL-1 β 及び過酸化物の tBHP と H₂O₂ による Cox-2 遺伝子発現に対する TPNa の効果を検討した。NHEK(F) に 0~0.5 μ M TPNa を 24 時間添加培養した後、UVB (60 mJ/cm²) 照射 (A)、IL-1 β (10 ng/ml) 処理 (B)、0.5 mM tBHP 処理 (C)、1 mM H₂O₂ 処理 (D) をそれぞれ行い、3 時間培養後、細胞を回収した。各細胞から total RNA を抽出し、Cox-2 遺伝子の発現を Real-time PCR 法で測定した。

Fig. 2-6 に示すように、Cox-2 遺伝子の発現レベルは未処理と比較して、UVB 照射で約 1.6 倍、IL-1 β 処理で約 1.2 倍、tBHP 処理で約 4.7 倍、H₂O₂ 処理で約 3.3 倍となったが、0.5 μ M TPNa 処理により、H₂O₂ 以外の 3 種のトリガー (UVB 照射, IL-1 β , tBHP) による増加は有意に抑制された。

この結果は、TPNa による炎症防護効果の一因が Cox-2 遺伝子発現の抑制に伴う PGE₂ の産生抑制によるものであることを示唆した。

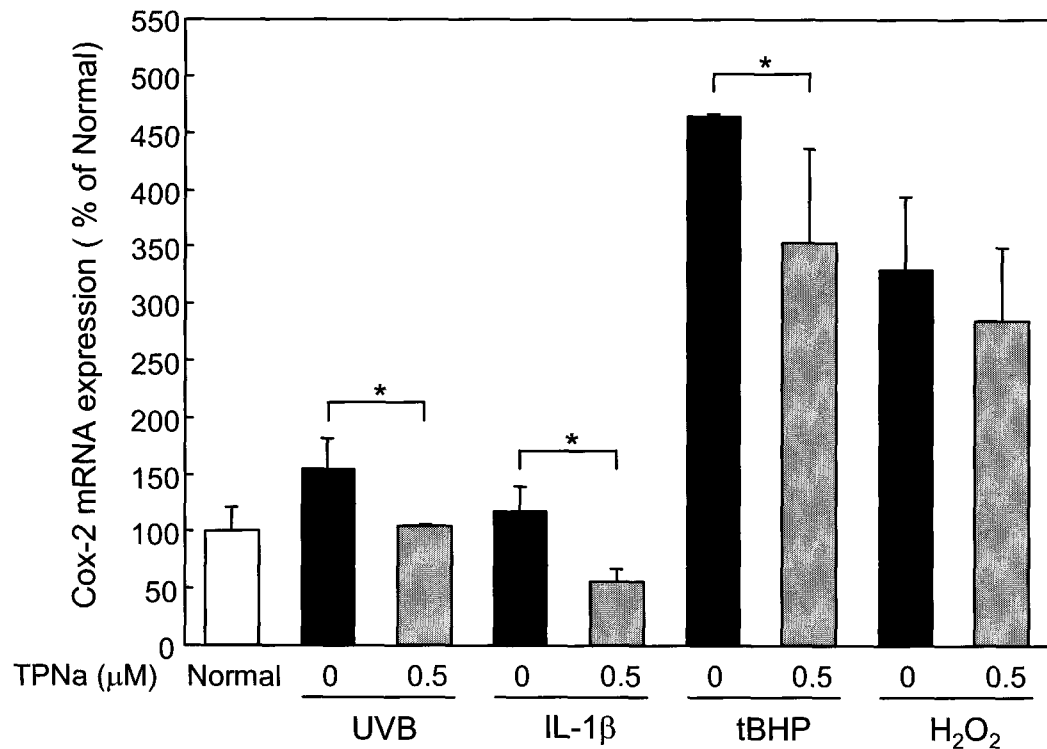


Fig. 2-6 Suppressive effects of TPNa on Cox-2 mRNA expression in NHEK(F) caused by UVB irradiation, IL-1 β and peroxides.

NHEK(F) (10^5 cells/ml) were incubated with TPNa at concentrations of 0 and 0.5 μ M for 24 h. After replacing with D-PBS(-) medium lacking TPNa, cells were irradiated with UVB (60 mJ/cm²) or treated with 10 ng/ml IL-1 β for 3 h, or 0.5 mM tBHP for 0.5 h or 1 mM H₂O₂ for 0.5 h, respectively. After stimulation, cells were post-cultivated for 3 h and collected. Cox-2 mRNA expression was determined by Real-time PCR methods as described in the “Materials & Methods”. Each bar represents the mean \pm SD. * p <0.05 versus each stimulant in the absence of TPNa compared by Student’s t-test.

第 6 節 p38 MAPK 活性化に対する抑制効果

MAP キナーゼ (MAPK) ファミリーの分子は外界刺激を伝達するシグナルとして働く。その中の c-Jun N-terminal kinase (JNK) と p38 は、ストレス応答性の分子で、いずれもリン酸化されることによって活性化される²⁰⁾。MAPK は Cox-2 遺伝子発現を誘導して化学発癌に関与することが知られている^{21, 22)}。また、UVB 照射によりヒト表皮角化細胞の p38 と細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK, extracellular signal-regulated kinase) の活性が顕著に増加することや^{23, 24)}、ヒト表皮角化細胞への UVB 照射により誘導される Cox-2 遺伝子発現のシグナル伝達経路において、p38 は重要な役割を果たしているという報告がある²⁵⁾。一方、炎症性サイトカインや物理化学的ストレスにより活性化される分子及び、Cox-2 遺伝子の発現を促進する転写因子として NF- κ B も知られている^{26, 27)}。そこで、UVB 照射により NHEK(F) を刺激したときの PGE₂ 産生増加に、MAPK 或いは NF- κ B のいずれのシグナル伝達経路が関与しているかを検討するため MAPK と NF- κ B の阻害剤 (Bay 11-7082, NF- κ B; SB203580, p38; SP600125, JNK) を用いて確認した。

NHEK(F) に 2 μ M の Bay 11-7082, SB203580 または SP600125 を前処理した後、UVB を照射して培養し、24 時間後の培地中の PGE₂ を定量した (A)。同様に 0~0.5 μ M TPNa を前処理した後、UVB を照射を行い、24 時間後の培地中の PGE₂ を定量した (B)。

Fig. 2-7A に示すように、UVB 照射により PGE₂ 量は未照射の約 2.7 倍に増加した。阻害剤の前処理により、Bay 11-7082 で約 9%、SB203580 で約 73%、SP600125 で約 33%の PGE₂ 産生抑制が認められた。特に p38 の阻害剤である SB203580 の効果が他の阻害剤に比べて顕著であった。同時に TPNa の効果を検討したところ、添加濃度に依存した PGE₂ 産生抑制効果が認められた (Fig. 2-7B)。

これらの結果は、NHEK に対する UVB 照射による PGE₂ 産生増加が、主に p38 MAPK を介して発現していることを示唆していた。また、TPNa が SB203580 と同様の抑制効果を示していたことより、TPNa が p38 MAPK を阻害する可能性が示唆された。

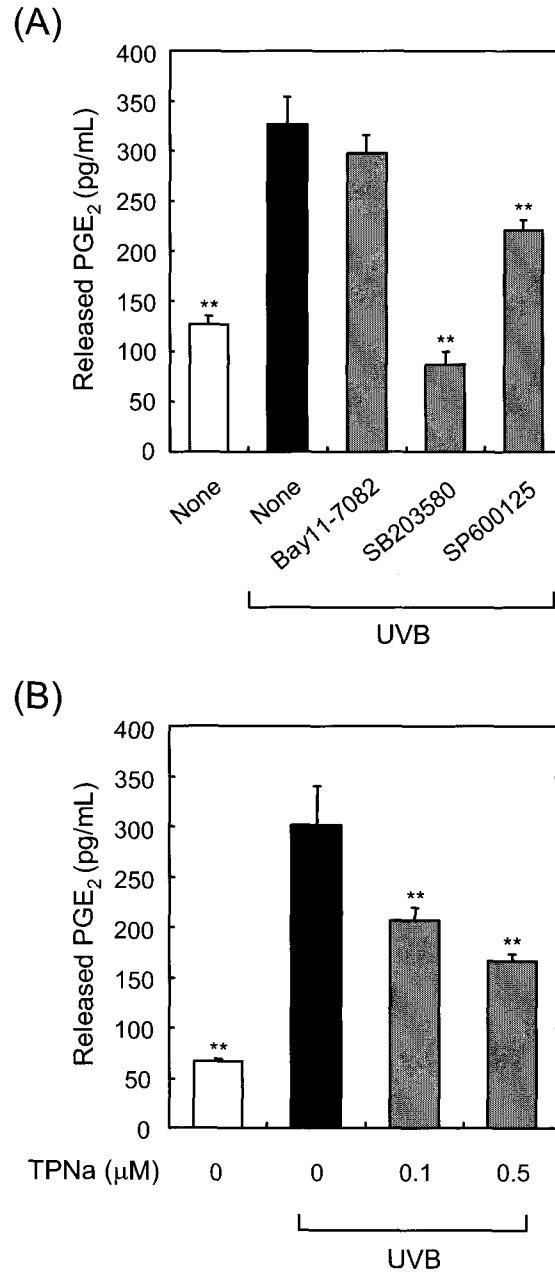


Fig. 2-7 Effects of inhibitor of MAPK and TPNa on PGE₂ levels in NHEK(F).

(A) NHEK(F) (10^5 cells/ml) were incubated with Bay 11-7082, SB203580, or SP600125 at 2 μ M concentration, and then irradiated with UVB (60 mJ/cm²) as described in the “Materials & Methods”. (B) NHEK(F) (10^5 cells/ml) were incubated with TPNa at the indicated concentrations, and then irradiated with UVB as described in the “Materials & Methods”. The amounts of PGE₂ in the medium were measured. Each bar represents the mean \pm SD. ** p <0.01 versus UVB irradiation in the absence of compounds compared by Student’s t -test.

続いて、NHEK(F) に 0.5 μ M TPNa、あるいは 2 μ M SB203580 の処理を行い、UVB 照射した後 0.5 時間培養した細胞から抽出したタンパク質に対し、イムノブロッティング法を行うことで、p38 MAPK の発現解析を行った (Fig. 2-8)。即ち、抗リン酸化 p38 抗体と抗 p38 抗体を用いて、UVB 照射した細胞の p38 タンパク質のリン酸化レベルを調べ、TPNa の p38 リン酸化への影響を確認した。その結果 Fig. 2-8 に示すように、2 μ M SB203580 及び 0.5 μ M TPNa で処理するとリン酸化 p38 の発現が、UVB 照射した対照と比べて明らかに減少していた。

この結果は、TPNa による PGE₂ 産生抑制効果が、p38 のリン酸化の阻害により仲介されている可能性を示した。

さらに、NHEK(F) に 0.5 μ M TPNa を添加したときの細胞内 TPNa と Toc の存在量を調べた。Fig. 2-9 に示すように、24 時間処理した後の TPNa と Toc の量は順に 1.05 nmol/mg protein、0.38 nmol/mg protein であった。

この結果は、TPNa による作用は、TPNa 及び/或いは α -Toc によることを示していた。

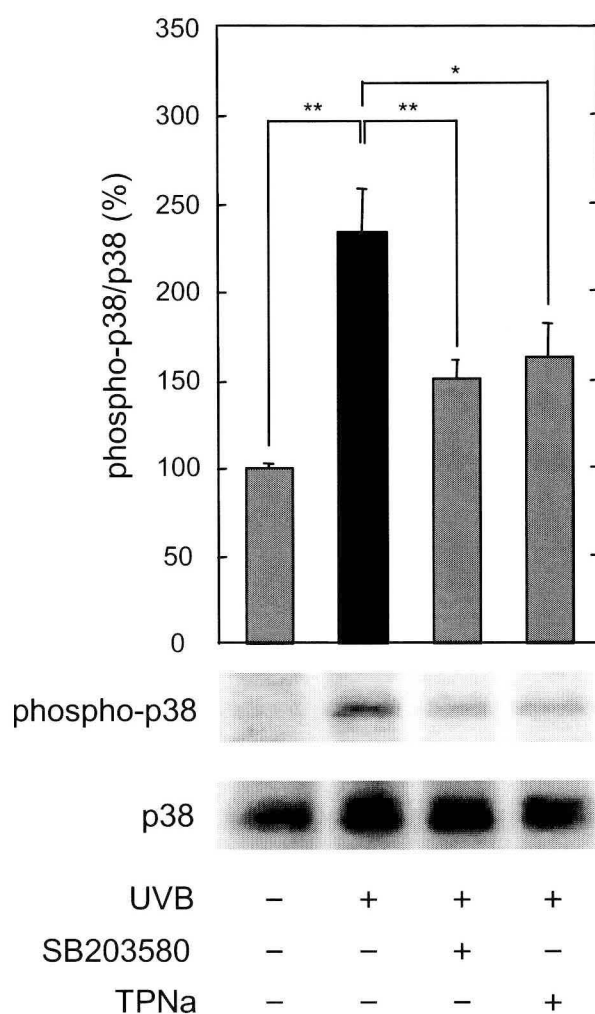


Fig. 2-8 Suppression of p38 phosphorylation by pre-treatment with TPNa.

NHEK(F) (10^5 cells/ml) were incubated without/with 0.5 μ M TPNa, or treated without/with 2 μ M SB203580. Cells were irradiated with UVB and post-cultivated for 0.5 h. Cellular proteins were prepared and analyzed by immunoblotting as described in the “Materials & Methods”. Each bar represents the mean \pm SD. ** p <0.01 and * p <0.05 versus UVB irradiation in the absence of compounds compared by Student’s t -test.

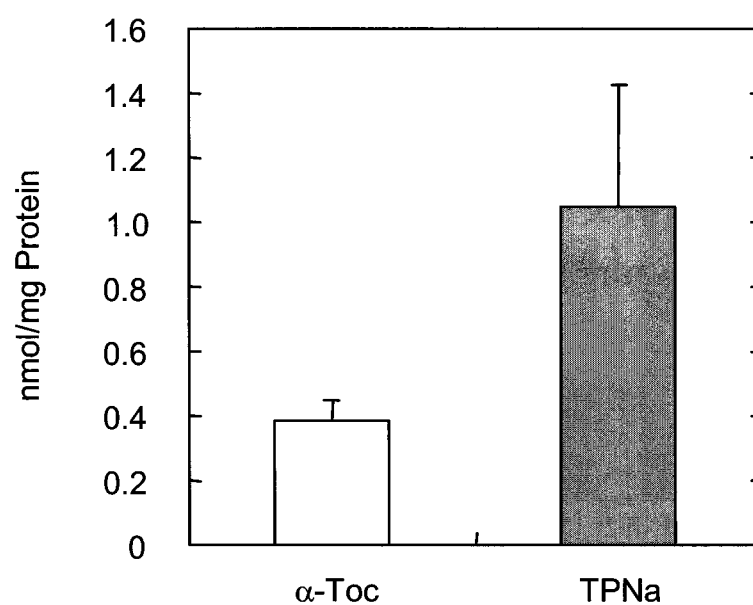


Fig. 2-9. The amounts of TPNa and α -Toc in NHEK(F).

NHEK(F) (10^5 cells/ml) were incubated with $0.5 \mu\text{M}$ of TPNa, and the amounts of TPNa and α -Toc were analyzed by HPLC as described in the “Materials & Methods”. Each bar represents the mean \pm SD.

第7節 UVB 照射による PGE₂ 産生に対する TPNa とビタミン C 誘導体の相乗的抑制効果

アスコルビン酸 (AsA, ビタミン C) は水溶性の抗酸化物質として知られ、 α -Toc を破壊するフリーラジカルの捕捉や、 α -トコフェリルラジカルを α -Toc に再生する作用を持つ^{28, 29)}。よって、 α -Toc の作用に AsA が影響を及ぼす可能性がある。そこで、TPNa と AsA が UVB 照射によるヒト株化ケラチノサイト (SVHK) の PGE₂ 産生抑制に対し、相乗効果を示すかを検討した。このとき AsA の供給源として、化学的に安定で培地の pH に対する影響が少ないリン酸アスコルビルマグネシウム (APM) を用いた。SVHK に 0~10 μ M の TPNa を 24 時間処理した。培地を D-PBS (-) に置換して UVB (30 mJ/cm²) を照射した後、0 或いは 30 μ M の APM を含む培地で 24 時間培養し、培地中の PGE₂ を定量した。

Fig. 2-10 に示すように、UVB 照射により PGE₂ は未照射の場合に比べ約 2 倍に増加した。これに対し、30 μ M APM 処理単独では PGE₂ 産生抑制効果は認められなかったが、5 μ M または 10 μ M TPNa と 30 μ M APM を併用した場合には、TPNa 処理単独の時と比べて、それぞれ約 70% の PGE₂ レベルにまで抑制された。併用して 10 μ M TPNa と 30 μ M APM を添加した場合 (Fig. 2-10, 右端) では、UVB 未照射とほぼ同等の PGE₂ レベルとなっていた。

TPNa を前処理し APM を後処理すると PGE₂ 産生抑制効果が相乗的に増強されたことから、APM は UVB 照射による PGE₂ 産生を直接抑制するのではなく、TPNa の抗炎症作用促進に効果を及ぼすことが示唆された。

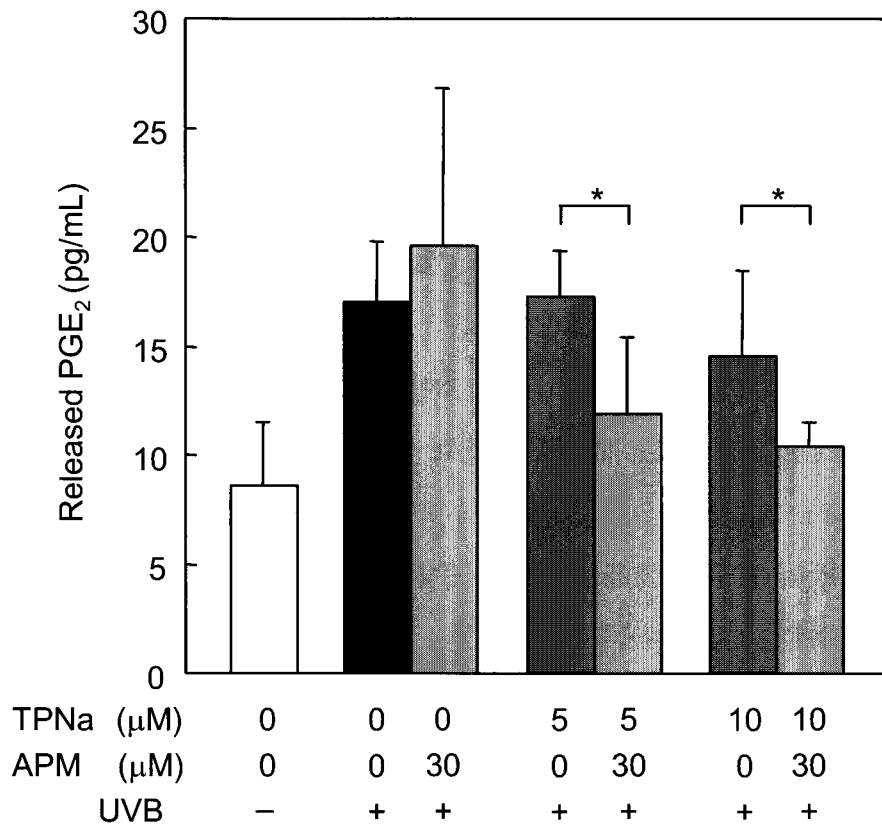


Fig. 2-10. Synergistic effects of TPNa in combination with APM on PGE₂ synthesis in human keratinocytes.

Synergistic effects of TPNa in combination with APM on PGE₂ synthesis in human keratinocytes caused by UVB irradiation. Human keratinocytes (SVHK, 5×10^4 cells/ml) were incubated with TPNa at concentrations of 0~10 μ M for 24 h. After replacing to D-PBS(-), cells were irradiated with UVB (30 mJ/cm²). Cells were post-cultivated for 24 h in medium with or without 30 μ M APM, and the amounts of PGE₂ secreted into the medium were determined by ELISA methods as described in the "Materials & Methods". Each bar represents the mean \pm SD. * p <0.05 versus UVB irradiation done in the absence of APM with TPNa treatment compared by Student's t -test.

第 8 節 本章のまとめ・考察

本章では TPNa の PGE₂ 産生抑制を指標とした抗炎症効果について検討した。

TPNa をヒト 3 次元培養モデル皮膚に経皮投与すると、TPNa は浸透して皮膚内で α -Toc に変換されることを確認した (Fig. 2-2)。また、UVB 照射による損傷細胞の形成を抑制し (Fig. 2-3)、同時に炎症性物質である PGE₂ の産生を抑制することを確認した (Fig. 2-4)。

次に、TPNa の PGE₂ 産生抑制効果を、ヒト表皮角化細胞である NHEK(F) を用いて、抗炎症物質として知られている TA 及び G2K と比較して検討した。炎症誘発因子として UVB 照射、IL-1 β , tBHP 及び H₂O₂ を用いた場合、全てにおいて TPNa は PGE₂ の産生を抑制し、その効果は TA や G2K よりも顕著で大きかった (Fig. 2-5)。

以上より、TPNa は様々な炎症誘発因子により誘導される PGE₂ 産生に関わる炎症反応を抑制することを明らかとした。

次に、PGE₂ 産生酵素である Cox-2 の mRNA 発現への TPNa の前処理による影響を NHEK(F) を用いて検討したところ、TPNa は Cox-2 mRNA 発現も抑制した (Fig. 2-6)。また、NHEK(F) に UVB 照射した際の PGE₂ 産生は p38 MAPK 経路を介していることを見出し、Cox2 mRNA の発現制御に関わる p38 MAPK のリン酸化を TPNa が抑制していることを明らかとした (Fig. 2-7)。これらの結果は TPNa による PGE₂ 産生抑制の結果とよく相関していた。

さらに、TPNa の PGE₂ 産生抑制効果が AsA 誘導体である APM と併用すると増強することを確認した (Fig. 2-8)。

これらの結果は、TPNa が試験した抗炎症物質のうち最も PGE₂ 産生抑制効果に優れることと、p38 MAPK リン酸化に関連するさまざまな炎症反応を抑制することを示唆した。

TPNa が UVB 照射による損傷細胞の形成や DNA 劣化及び脂質過酸化を抑制する効果を持つことは、ヘアレスマウス皮膚器官培養を用いて示した報告がある¹⁴⁾。しかしながら、TPNa の炎症反応の抑制メカニズムや他の抗炎症物質との比較については、示されていない。

TA については、ヘアレスマウスの皮膚に UVB 照射前に TA を塗布すると、

PGE₂ 産生及び Cox-2 遺伝子発現を抑制するが、照射後添加では抑制効果が得られないとの報告¹¹⁾がある。本研究において、TA を前投与した後 UVB 照射した NHEK(F) の PGE₂ 産生を顕著に抑制することを示した (Fig. 2-5)。よってマウス皮膚を用いた *in vivo* 試験と NHEK(F) を用いた *in vitro* 試験という点が異なっているが、TA の結果はほぼ一致している。しかし、TA の効果は TPNa の効果に比べて非常に弱かった。本研究は TPNa のほうが TA よりも優れた抗炎症物質であることを示した。

G2K は抗炎症剤として有用な漢方薬の主成分^{29, 30)}で、抗脂質異常、抗酸化³¹⁾、抗ウイルス³²⁾やインターフェロン誘導³³⁾の効果など、さまざまな生理活性がヒトで確認されている。しかし G2K の生化学的機能は依然として不明である³⁴⁻³⁷⁾。ラット腹腔活性化マクロファージにおける PGE₂ 産生を、10 µg/mL (12.1 µM) より高い濃度の G2K で容量依存的に阻害するという報告がある³⁶⁾。本研究は、ヒト皮膚細胞を UVB 照射、IL-1β, tBHP 及び H₂O₂ で刺激した際に産生する PGE₂ への G2K の効果を初めて示した。G2K (2 µM) は NHEK(F) において、UVB 照射と tBHP で誘導される PGE₂ は抑制しなかったが、IL-1β と H₂O₂ により誘導される PGE₂ を抑制した (Fig. 2-5)。しかしながら、その G2K の効果は TPNa より弱いことが明らかとなった。

TPNa による PGE₂ 産生抑制効果のメカニズムを解明するために、TPNa 処理によって PGE₂ 生成酵素である Cox-2 の mRNA 発現量が変動するかを調べた。その結果 NHEK(F) への TPNa の前処理によって、H₂O₂ 以外のさまざまな (UVB 照射, IL-1β, tBHP) トリガーによる Cox-2 mRNA 発現増加が抑制された (Fig. 2-5)。さらに、TPNa は全てのトリガー (UVB 照射, IL-1β, tBHP, H₂O₂) 処理による NHEK(F) の PGE₂ 産生の増加を阻害した (Fig. 2-5)。これらの結果は、Cox-2 mRNA 発現の抑制が PGE₂ 合成抑制と関連していることを示唆している。一方、以前の研究において、大腸ガン Caco2 細胞を 10 µM の α-Toc と TA で処理しても Cox-2 の mRNA 発現に対する抑制効果は無いが、α-Toc には Cox-2 の活性を阻害するという報告がある⁹⁾。ガン細胞への TPNa の効果を確認したことはないが、Cox-2 の発現抑制効果を含めた TPNa のガン細胞への薬理作用を評価することはとても興味深いので、今後の検討課題としたい。

MAP kinase はセリン/スレオニンキナーゼのファミリーに属し、ガン遺伝子の

発現誘導シグナル伝達経路の制御に重要な役割を果たす酵素である³⁸⁻⁴⁰⁾。UVB 照射は培養ヒト表皮角化細胞において p38 と ERK を活性化すると報告されている^{23, 24)}。一方で、ヒト表皮角化細胞で、p38 は UVB 照射で誘導される Cox-2 遺伝子発現において重要な役割を持つが、ERK はこの過程には関与していないという報告がある²⁵⁾。これらの報告より、紫外線による発ガンにおいて Cox-2 発現は重要な役割を担うことが示され、p38 は皮膚ガンの化学的予防の分子ターゲットとなる可能性が大いに考えられる。ビタミン E 類縁体のトコトリエノール、その中でも特に γ -T3 は、表皮角化細胞において PGE₂ 産生、炎症因子の遺伝子発現及び UVB で誘導される Cox-2 タンパクの発現と p38 のリン酸化を抑制することが知られている⁴¹⁾。本研究で、TPNa は PGE₂ 産生抑制において最も効果が高く、Cox-2 発現と p38 リン酸化の抑制にも働いていることを明らかにした (Fig. 2-8)。これらの結果は、p38 のリン酸化を介して Cox-2 遺伝子発現を抑制して PGE₂ 産生を阻害する γ -T3 や TPNa が、抗炎症物質、さらにはガンに対する予防物質として有効である可能性を示唆している。

細胞膜の脂質過酸化抑制作用は α -Toc の主要な機能である。一方、細胞質において AsA は α -Toc を分解するようなフリーラジカル種を直接スカベンジするか、もしくは、 α -トコフェリルラジカルを α -Toc に再生する働きを持つ^{28, 42)}。肝細胞のプライマリーカルチャーや^{43, 44)}皮膚線維芽細胞において⁴⁵⁾、 α -Toc と AsA の濃度は時間経過と共に減少するが、この減少の原因は酸化ストレスに起因することが報告されている⁴⁴⁾。H4IIE ラット肝細胞の培養において、AsA の添加は α -Toc 濃度を維持し、AsA と α -Toc 両方の添加により細胞膜の脂質過酸化が減少することが報告されている⁴⁶⁾。これらの結果は、AsA の添加によって細胞のトコフェロールが再生され、酸化ストレスによる脂質過酸化的損傷が予防されることを示している。本研究において、APM は相乗的に、TPNa による PGE₂ 産生の阻害効果を促進した (Fig. 2-10)。この結果は、APM から生じた AsA が TPNa から生じた α -Toc の再生に作用したことによると言える。

以上まとめると、本研究の結果は、TPNa が医薬部外品や化粧品で汎用される TA や G2K のような既知の抗炎症物質よりも優れた抗炎症物質である可能性を示している。また、TPNa は UVB 照射及び過酸化物質といった外因性刺激や炎症性サイトカインといった内因性刺激による炎症反応を予防し、皮膚組織を健

やかに保つ物質であることを示唆している。その作用メカニズムは、TPNa が p38 のリン酸化を抑制することにより Cox-2 遺伝子発現を抑制して PGE₂ 産生を抑制するというものである。TPNa は化学的に安定なトコフェロール誘導体として、他に比べ優れた作用を現して皮膚を保護し、皮膚ガンをも予防する可能性をもつことから、極めて有用な物質と考えられる。

第3章 TPNa の皮膚水分保持機能改善効果の検討

前章において、TPNa の抗炎症効果とその作用メカニズムについて明らかにした。

TPNa は皮膚トラブルの一種である肌荒れを予防する医薬部外品主剤で、皮膚の乾燥やきめの乱れを防ぐ効果を有しており、角層の保湿機能とバリア機能の低下を予防・改善している可能性が示唆されるが、その詳細と作用メカニズムに関する報告は無い。

そこで、本章では、角層の保湿機能に着目し、TPNa の皮膚水分保持機能改善効果とその作用メカニズムについて検討した。

第 1 節 ヘアレスマウスにおける皮膚水分保持機能改善効果

TPNa の皮膚水分保持機能改善効果を検討するため、ヘアレスマウスを用いて試験した。

まず、1 % 及び 2 % TPNa を含む水中油型 (O/W) 乳液と TPNa を含まないプラセボ乳液を、週 5 日、4 週間経皮投与し、角層の水分保持能が向上するかを水負荷試験により調べた。

測定部位の角層水分量は、皮膚表面の電気伝導度を測定して定量した。水負荷処理前の測定値を初期値、処理 30 秒後の測定値より吸水能を、続けて 30 秒ごとに処理 120 秒後まで測定を繰り返して水分保持能を、計測した。測定結果は、初期値に対する相対値で経時的に示した。

Fig. 3-1A に示すように、水負荷処理 30 秒後に角層の水分量が増加し、その後経時的に角層の水分が消失していく様子を確認した。

Fig. 3-1B 左側のグラフに示すように、皮膚吸水能の指標となる水負荷処理 30 秒後の角層水分量は、無塗布及びプラセボ塗布群では水負荷前の約 4 倍となった。これに対し、1 % 及び 2 % TPNa を塗布した群では約 6 倍となった。

Fig. 3-1B 右側のグラフに示すように、水分保持能の指標となる水負荷 60 秒後の角層水分量は、1% 及び 2% TPNa を塗布した群では、無塗布、プラセボ塗布群と比べて約 1.5 倍高くなり、水負荷 90 秒後も同様の傾向を示した。

これらの結果は、TPNa を含む乳液を連続で皮膚に塗布すると、皮膚角層の吸水能と保水能が向上することを示した。

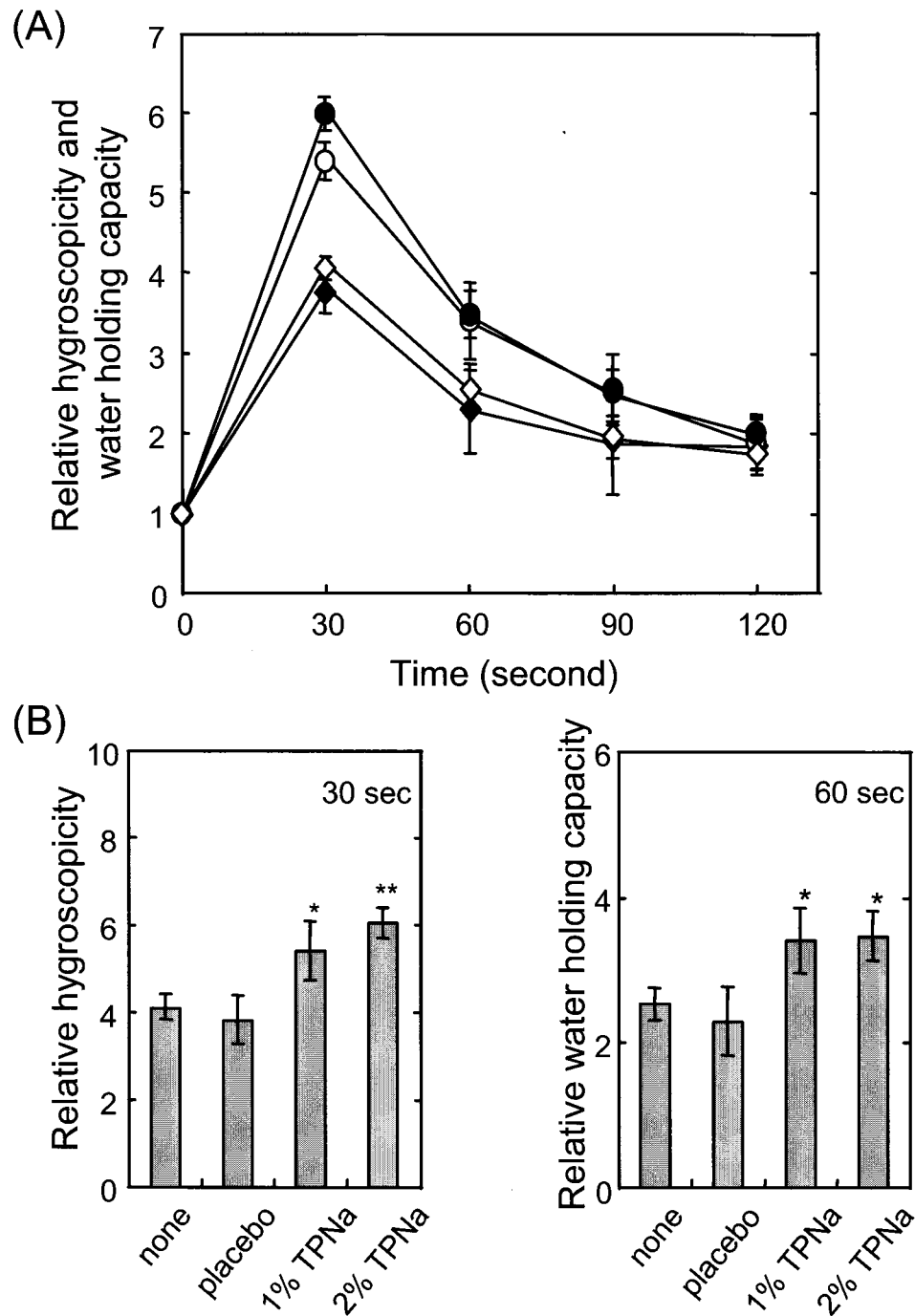


Fig. 3-1 Effects of TPNa on hygroscopicity and water holding capacity in mouse SC. Mouse skin was treated without or with TPNa topically once daily, 5 times a week. After 4 weeks, water sorption-desorption tests were performed as described in the “Materials & Methods”. (A) Overall view of the water sorption-desorption test, (B) Skin surface hydration as hygroscopicity at a time point of 30 seconds (left panel) or water holding capacity at a time point of 60 seconds (right panel) after loading water onto skin. Each bar represents the mean \pm SE. * p <0.05 and ** p <0.01 versus placebo compared by Student’s t -test. None (◇), placebo (◆), 1% TPNa (○), 2% TPNa (●).

第2節 ヘアレスマウスにおける皮膚角層セラミド増加効果

前節の結果より、ヘアレスマウスの背部皮膚に TPNa を含む乳液を連続で 4 週間塗布すると角層の吸水能と保水能が向上することが明らかとなった。角層は、角化した表皮細胞とそれを取り囲む細胞間脂質により層構造を形成している⁴⁷⁾。細胞間脂質は角層重量の 10% 程度であるが水分保持能には必須であり、その半分近くを占めるのがセラミドである^{48,49)}。そこで、ヘアレスマウスの背部皮膚に、TPNa を含む乳液を連続で 4 週間塗布した際の、角層のセラミド量の変化を調べた。

水負荷試験終了時の皮膚をテープストリッピングで採取し、脂質を抽出して塩酸加水分解した後、セラミド由来のスフィンゴ脂質を fluorescamine で蛍光誘導体化し、セラミドを定量した。

Fig. 3-2 に示すように、無塗布、プラセボ群と比較して 1% 及び 2% TPNa 塗布群ではセラミドが約 1.7 倍に増加していた。しかしながら、この条件では 1% TPNa 塗布群と 2% TPNa 塗布群とでセラミド量に差はなく、濃度依存的な差は認められなかった。

この結果から、TPNa の経皮投与により角層セラミド量が増加することが確認された。

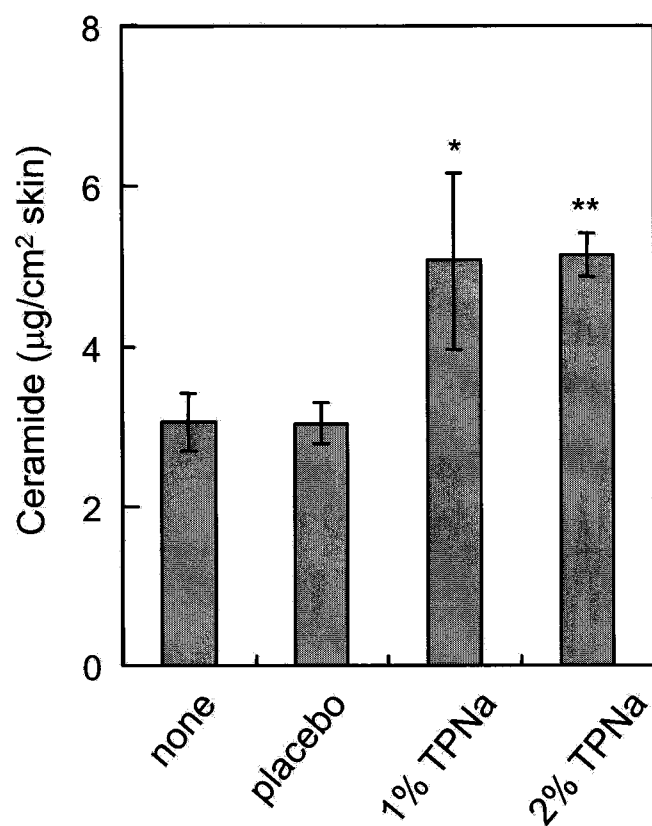


Fig. 3-2 Effects of TPNa on the amount of ceramide in mouse SC.

The SC of mouse skin treated without or with TPNa topically for 4 weeks was stripped using adhesive tapes. Lipids on the adhesive tapes were extracted and ceramide was determined as described in the "Materials & Methods". Each bar represents the mean \pm SE. * p <0.05 and ** p <0.01 versus placebo compared by Student's t -test.

第3節 皮膚表皮角化細胞におけるセラミド産生促進作用

前節の結果より、ヘアレスマウス皮膚に TPNa を含む乳液を塗布すると角層セラミド量が増加し、角層の吸水量、保水量が向上する可能性が明らかとなった。そこで、この TPNa によるヘアレスマウス皮膚におけるセラミド量の増加が、セラミド産生促進によるものかを検討するため、まず NHEK(F) においても TPNa を投与することによりセラミド量が増加するかを調べた。

NHEK(F) を 0, 10, 50 μM TPNa で処理し、24 時間培養した後、回収した細胞から抽出した脂質を塩酸加水分解し、セラミド由来のスフィンゴ脂質を蛍光誘導体化し、セラミドを定量した。

Fig. 3-3 に示すように、10 μM 、50 μM TPNa を処理した細胞のセラミド量は、未処理に比べそれぞれ約 1.5 倍、1.8 倍と、投与濃度依存性的に増加した。

この結果から、TPNa 処理により表皮角化細胞のセラミド量が増加することが明らかとなった。

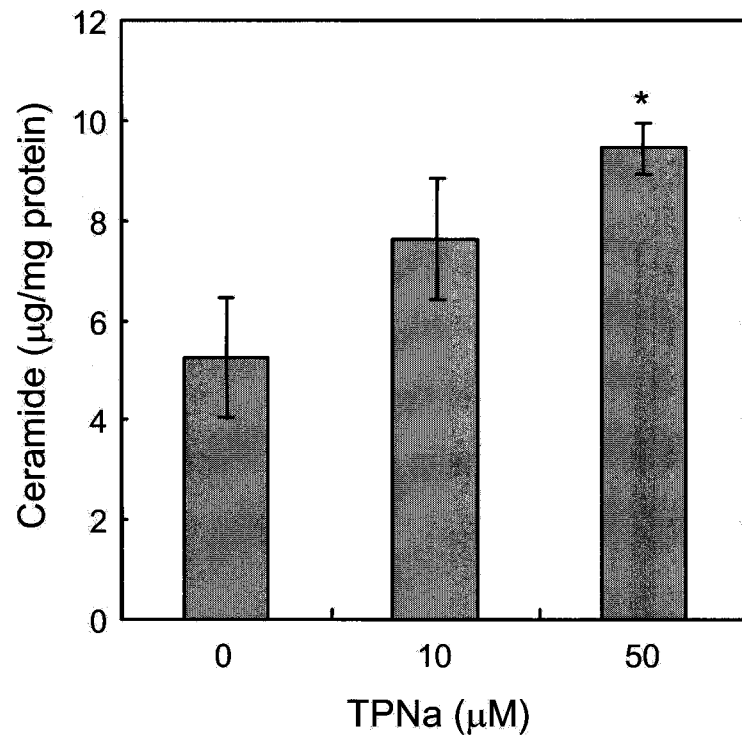


Fig. 3-3 Effects of TPNa on ceramide levels in NHEK(F).

NHEK(F) (10^5 cells/ml) cultured to semiconfluent (80%) were incubated without (control) and with TPNa at concentrations of 10 μ M or 50 μ M for 24 h. Cells were harvested, and the amount of ceramide was determined as described in the "Materials & Methods". Each bar represents the mean \pm SE. * p <0.05 and ** p <0.01 versus control compared by Student's *t*-test.

第4節 皮膚表皮角化細胞におけるセラミド合成関連酵素の発現促進作用

前節の結果より、TPNa が NHEK(F) のセラミド量を増加させることが明らかとなった。そこで、TPNa がセラミド合成関連酵素の遺伝子発現を促進するかどうかを検討した。また、同時にセラミド分解酵素の遺伝子発現についても検討した。

NHEK(F) に 0, 10, 50 μ M TPNa を処理し、24 時間培養した後、回収した細胞から total RNA を抽出して、各種遺伝子の発現を Real-time PCR 法で測定した。

Fig. 3-4 に示すように、50 μ M TPNa を投与した細胞では、セラミド合成関連酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPTLC1, SPTLC2) の遺伝子発現量は未処理細胞に比べ、それぞれ約 1.3 倍、約 2.2 倍高くなった。一方、TPNa はセラミド分解酵素である酸性セラミダーゼ (ASAH1), アルカリセラミダーゼ (ACER1) の発現量には影響しなかった。

この結果から、表皮角化細胞における TPNa によるセラミド量の増加は、TPNa のセラミド合成関連酵素の発現促進によるものであることが明らかとなった。またこのときセラミド分解酵素の発現には影響していないことから、TPNa によるセラミド量の増加は分解阻害による増加ではないことも明らかとなった。よって、TPNa はセラミド合成関連酵素の発現を促すことによりセラミド産生を促進し、細胞内セラミド濃度を高くしていることが判った。

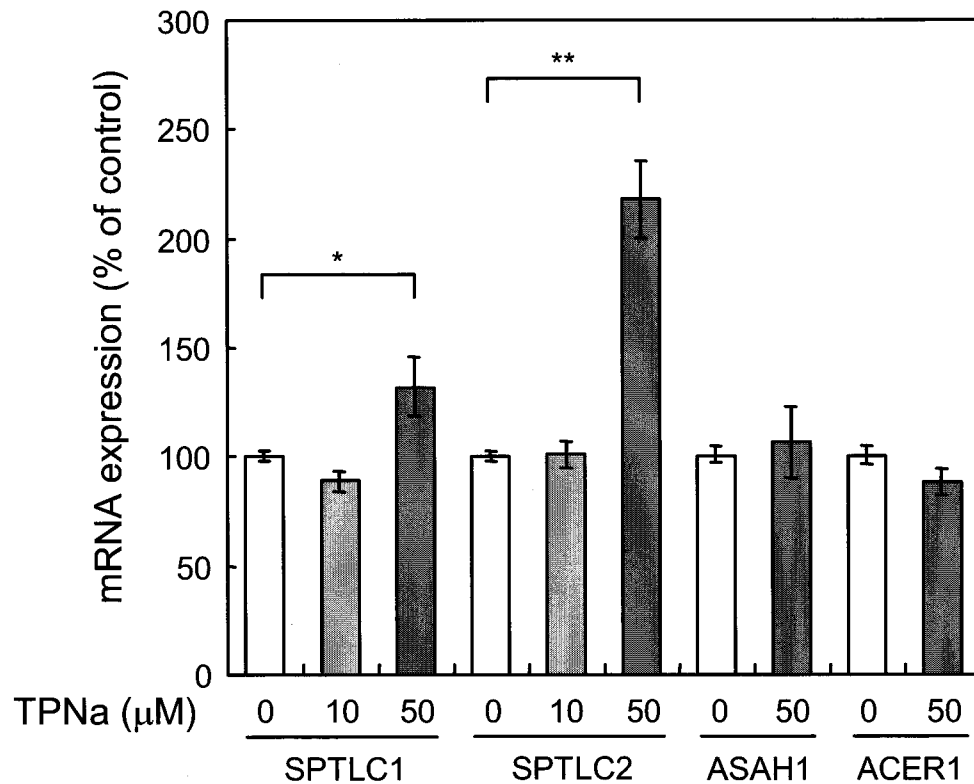


Fig. 3-4 Effects of TPNa on mRNA expression of serine palmitoyltransferase (SPTLC1, SPTLC2) and ceramidase (ASAH1, ACER1) in NHEK(F).

NHEK(F) (10^5 cells/ml) cultured to semiconfluent (80%) were incubated without (control) and with TPNa at concentrations of 10 μ M or 50 μ M for 24 h. Total RNA was isolated from cells and mRNA expression levels of SPTLC1, SPTLC2, ASAH1 or ACER1 were determined by real-time PCR analysis as described in the “Materials & Methods”. Each bar represents the mean \pm SE. * p <0.05 and ** p <0.01 versus control compared by Student’s t -test.

第 5 節 皮膚表皮角化細胞における分化関連因子の発現促進作用

前節の結果より、表皮角化細胞に TPNa を投与すると、セラミド合成関連酵素の発現が増えることでセラミドの産生を促し、セラミド量が増加することが明らかとなった。セラミドは表皮角化細胞の角化、即ち分化の過程で表皮の有棘層や顆粒層に存在する種々の酵素によって生成される。そこで、TPNa 処理によって、表皮角化細胞の分化の過程で発現促進することが報告されている酵素や構造タンパクの遺伝子の発現・挙動が変化するか否かを検討した。

NHEK(F) に 0、50 μ M TPNa を処理し、24 時間培養した後、回収した細胞から total RNA を抽出して、各遺伝子の発現を Real-time PCR 法で測定した。

Fig. 3-5 に示すように、50 μ M TPNa 投与により、トランスグルタミナーゼ 1 (TGM1) で約 2.5 倍、ケラチン 10 (KRT10) で約 2.2 倍、インボルクリン (IVL) で約 3.3 倍、ロリクリン (LOR) で約 2.5 倍の発現促進が認められた。これに対し、ケラチン 1 (KRT1) とフィラグリン (FLG) の発現には、有意な変化は認められなかった。

この結果から、未分化状態の表皮角化細胞への TPNa の投与は、分化を促進する可能性が示唆された。

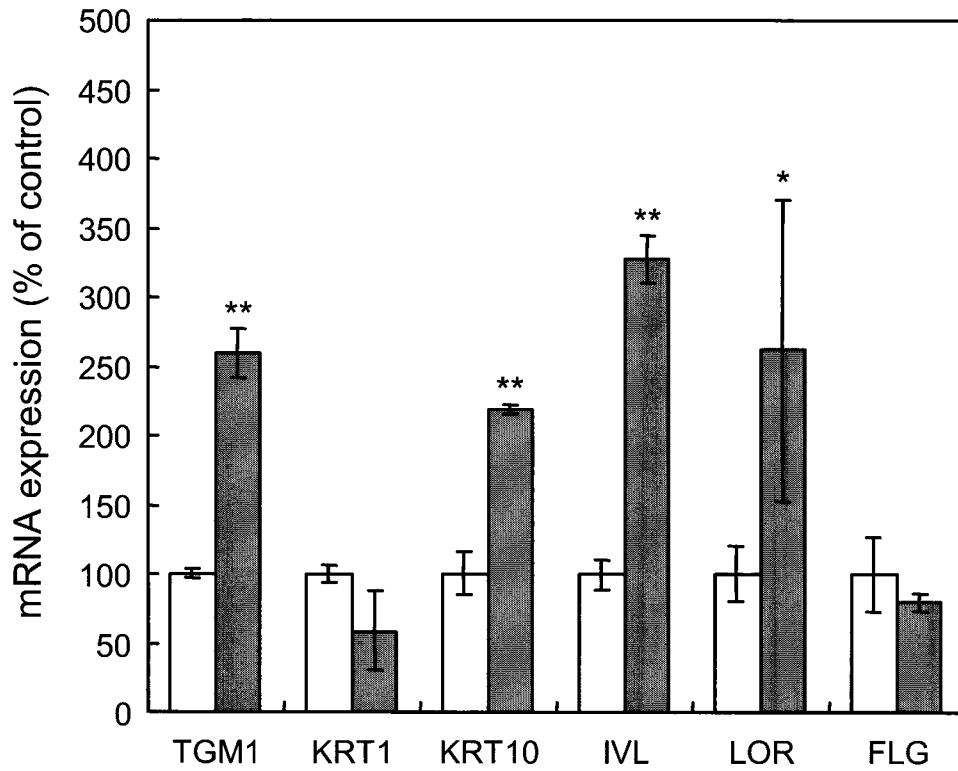


Fig. 3-5 Effects of TPNa on mRNA expression of differentiation markers in NHEK(F). NHEK(F) (10^5 cells/ml) cultured to semiconfluent (80%) were incubated without (control, \square) and with 50 μ M TPNa (\blacksquare) for 24 h. Total RNA was isolated from the cells and mRNA expression levels of TGM1, KRT1, KRT10, IVL, LOR or FLG were determined by real-time PCR analysis as described in the “Materials & Methods”. Each bar represents the mean \pm SE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus control compared by Student’s *t*-test.

第 6 節 皮膚表皮角化細胞における細胞内カルシウム濃度増加作用

前節の結果より、表皮角化細胞に TPNa を投与すると表皮角化細胞の分化の過程で発現が高くなる酵素や構造タンパク質の遺伝子の発現量が増加することが分った。即ち、TPNa には表皮角化細胞の分化誘導促進効果があることが示唆された。そこで、表皮角化細胞の分化誘導因子の一つであるカルシウムイオンの細胞内濃度が TPNa の投与により変動するか否か、その挙動を調べた。

NHEK(F) を (1) 0.05 mM カルシウムイオンと 0, 25, 50, 75 μ M TPNa を含む緩衝液で 1 時間、(2) 1.15mM カルシウムイオンと 0, 10, 50 μ M TPNa を含む培地で 24 時間処理した後、細胞に取り込まれたカルシウムイオンと特異的に結合して蛍光を呈する Fura 2 を用いて、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定した。

Fig. 3-6A に示すように、TPNa 投与 1 時間後の、細胞内カルシウムイオン濃度は、TPNa 濃度依存的に増加することが明らかとなった。また Fig. 3-6B に示すように TPNa 処理 24 時間後の細胞内カルシウムイオン濃度も持続して増加していることが明らかとなった。

この結果から、TPNa は表皮角化細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させる作用により、分化誘導を促進していることが示唆された。

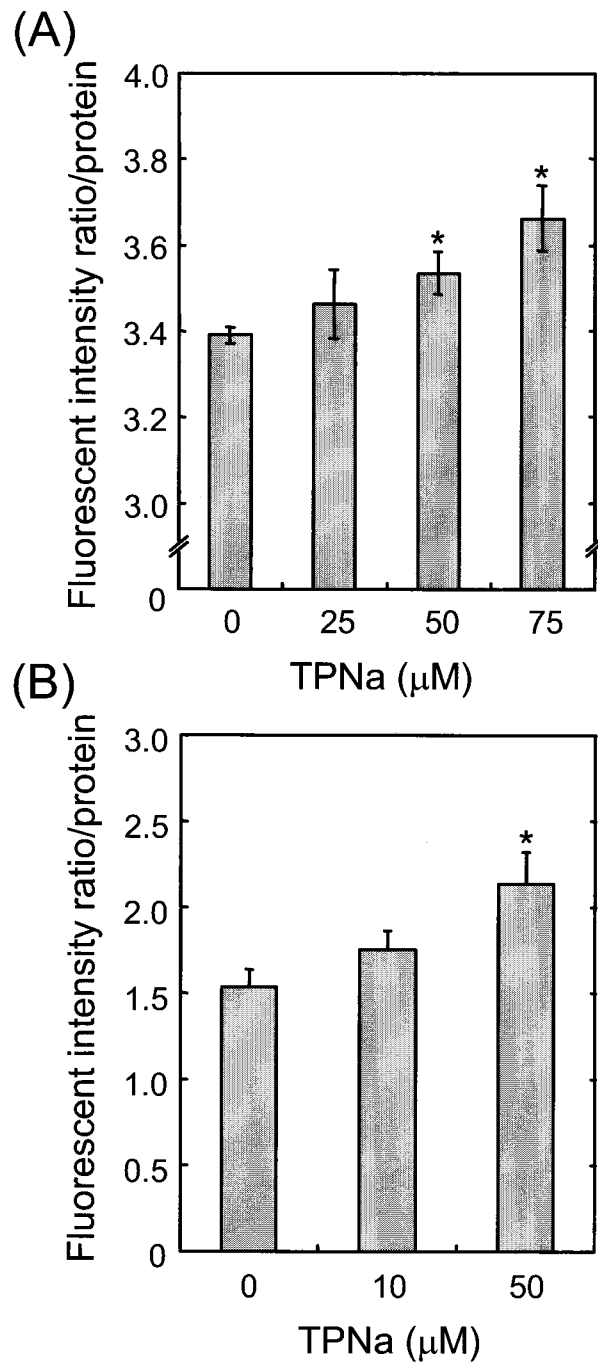


Fig. 3-6 Effect of TPNa on Ca^{2+} levels in NHEK(F).

NHEK(F) (10^5 cells/ml) cultured to semiconfluent (80%) were incubated without (control) and with various concentrations of TPNa for 1 h (A) or 24 h (B), and then with Fura 2-AM for 1 h. Intracellular Ca^{2+} levels were determined as described in the "Materials & Methods". Each bar represents the mean \pm SE. * $p < 0.05$ versus control compared by Student's *t*-test.

第 7 節 表皮角化細胞への取り込みと変換

前節の結果より、TPNa は表皮角化細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させることで表皮角化細胞の分化の過程で発現が促進する酵素や構造タンパクの遺伝子の発現を促進することが分った。即ち TPNa には表皮角化細胞の分化誘導促進効果があることが示唆された。そこで、NHEK(F) を TPNa で処理した際の細胞への取り込みと、 α -Toc への変換率を調べた。

Table 3-1 に示すように、10, 50 μ M の TPNa を含む培地で 24 時間培養した後の TPNa の細胞内濃度は α -Toc 濃度の約 20 倍、約 31 倍であり、95%以上は TPNa のままであった。

この結果から、TPNa から α -Toc への変換はゆっくりとした反応であることが確認された。

Table 3-1 Concentration of α -Toc and TPNa in NHEK(F) after 24h administration^a

Dose (μ M)	α -Toc	TPNa
0	ND	ND
10	1.7 \pm 0.4 (4.8%)	34.0 \pm 7.4 (95.2%)
50	4.7 \pm 0.3 (3.1%)	147.8 \pm 0.8 (96.9%)

^a Concentrations are given in nmol/mg protein

第 8 節 本章のまとめ・考察

本章では、TPNa の皮膚水分保持機能改善効果について検討した。

TPNa を皮膚に投与すると、皮膚角層の水分保持能が増強する (Fig. 3-1A)。水負荷試験によって、皮膚吸水能 (Fig. 3-1B, 左側のグラフ) と保水能 (Fig. 3-1B, 右側のグラフ) が向上することがわかった。この試験の際に採取した皮膚角層を調べたところ、セラミド含量が増加していた (Fig. 3-2)。また、表皮角化細胞に TPNa を投与した際にもセラミド量が増加した (Fig. 3-3)。このとき、セラミド分解酵素の遺伝子発現には変化が無いが、セラミド合成関連酵素の遺伝子の発現が亢進していることを確認した (Fig. 3-4)。同時に、表皮角化細胞の分化マーカー酵素及びタンパク質の遺伝子発現について調べたところ、TGM1, KRT10, IVL で発現の亢進を認めた (Fig. 3-5)。また、TPNa を処理すると、細胞内カルシウムイオン濃度が増加した (Fig. 3-6)。

これらの結果は、TPNa が、セラミド合成関連酵素の発現を促し、角層のセラミドを増加させた結果、皮膚水分保持能を改善させることを示唆していた。また同時に、TPNa が表皮角化細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させ、分化誘導することにも起因している可能性を示した。

局所適用による角層のセラミド量の増加に関しては、Sake concentrate, Ethyl α -D-glucoside⁵⁰⁾, Nicotiamide⁵¹⁾, Lactic acid⁵²⁾, ユーカリエキス⁵³⁾, Musk-T⁵⁴⁾, Ursolic acid⁵⁵⁾などの報告がある。それぞれの物質を局所適用した際の角層のセラミド量は、以下の通りである。ヘアレスマウスの皮膚に Sake concentrate (10%)、 α -EG (1% v/v) を 4 週間、Musk-T (1% w/v) を 30 時間投与したところ、基剤投与と比較してそれぞれのセラミド量は約 1.6 倍、約 1.1 倍、約 1.3 倍になった。また、ヒトボランティアに Nicotinamide (2%), Lactic acid (4%) を 4 週間投与したところ、基剤投与と比較してそれぞれ約 1.4 倍になった。ユーカリエキス (1%) を 4 日間、Ursolic acid (0.3%, 1%) を 11 日間それぞれ投与したところ、基剤投与と比較してそれぞれ約 1.8 倍、約 1.3 倍になった。これらの報告には、皮膚バリア機能を亢進するとの記載はあるが、皮膚水分保持能に関しては記載されていない。今回の研究により、1% 及び 2% TPNa の局所適用は、角層セラミドの量を約 2 倍に増やすことを確認し (Fig. 3-2)、同様に角層の吸水性と保水

性が向上していることが明らかとなった (Fig. 3-1)。

一方、*in vitro* 試験では、表皮角化細胞を、Nicotiamide (1~30 μ M), Lactic acid (20 mM), ユーカリエキス (0.0001, 0.0005, 0.001%), Ursolic acid (1%) で処理すると、それぞれのセラミド量はコントロールと比べて、順に 6 日間で約 4.1~5.5 倍、24 時間で約 4.3 倍、3 日間で約 1.2 倍、6 日間で約 2.2~3 倍となった。これに対し、10 μ M, 50 μ M TPNa では、24 時間処理で、セラミド量はそれぞれ約 1.5, 1.8 倍になっていた (Fig. 3-3)。トコフェロール類及びトコフェロール誘導体については以前に報告が無く、本研究で初めて、TPNa がセラミド合成増強作用(*in vivo, in vitro*) と皮膚水分保持機能改善効果を有することを示した。

セラミドは角層の細胞間脂質の約 30~40%を占めるスフィンゴ脂質で、皮膚の水分保持やバリア機能に關与する⁴⁷⁾。表皮角化細胞の角化 (分化) の過程で、セラミドは、3 つのサブユニット (LC1, LC2, LC3) を有する Serine palmitoyltransferase (SPT) により合成されるケトスフィンガニンを前駆体として、種々酵素によって生成される。その後グルコシルセラミドやスフィンゴミエリンに変換されて顆粒細胞に蓄積した後、加水分解されて再びセラミドとなって角層に配し、セラミダーゼ (酸性もしくはアルカリ性) で加水分解を受けてスフィンゴシンとなる⁵⁶⁾。角層及び表皮角化細胞のセラミド量を増加させる物質の、セラミド代謝酵素の遺伝子発現への影響に関しては、Nicotiamide⁵¹⁾ 及びユーカリエキスの活性本体である Macrocarpal A⁵³⁾の報告がある。Nicotiamide (10 μ M, 4 日間) では、Human SPT (LCB1 と LCB2) の発現量が約 1.8 倍に増加していた。また、Macrocarpal A (10 nM, 2 日間) では、SPTLC1 の発現量が約 1.08 倍なのに対し、分解酵素の遺伝子発現への影響は認められなかった。

本研究で、TPNa (50 μ M, 24 時間) は SPTLC1 と SPTLC2 の発現量をそれぞれ約 1.2 倍、約 2.2 倍に増加させ、分解酵素に対しては全く影響しないことを見出した (Fig. 3-4)。これは、TPNa が Macrocarpal A の報告前例と同様の効果を持つことを示している。

セラミドの合成は、表皮角化細胞の分化と関係が深い。セラミドは、表皮角化細胞が基底層から有棘層、顆粒層を経て角層に分化していく過程で合成、変換、再合成され細胞間脂質の主たる構成成分となる。セラミドはインボルクリンを構成要素とするコーニファイドエンベロープのタンパクと共有結合して角

質層の骨格を形成し、また角質層の細胞間脂質の主要構成成分として、角層細胞と共にレンガモルタル構造を作り、水分保持とバリア機能を司る。

皮膚セラミドの合成に関する上記の知見、及び TPNa の投与でセラミド合成関連酵素遺伝子の発現が促進しセラミド量が増加した本研究の結果から、TPNa には表皮角化細胞の分化を促進する働きがあると推測した。

一方、カルシウムイオンが表皮角化細胞の分化誘導因子であることはよく知られている^{57, 58)}。表皮角化細胞を高カルシウムイオン濃度で培養すると分化し、その際にさまざまな分化マーカー (TGM1, KRT1, KRT10, IVL, LOR, FLG) の発現が促進するとの報告がある^{59, 60)}。

TPNa により角層セラミド、セラミド合成酵素の遺伝子発現、表皮角化細胞分化マーカータンパク質の発現及び細胞内カルシウムイオン濃度がそれぞれ増加したという本研究の知見は、トコフェロール誘導體では初めての報告である。NHEK(F) における、TGM1, KRT10, IVL と LOR の遺伝子発現、及び細胞内カルシウムイオン濃度の増加は、TPNa (50 μ M, 24 時間) 処理により、それぞれ約 2.6 倍, 約 2.2 倍, 約 3.3 倍, 約 2.7 倍、及び約 1.4 倍となった (Fig. 3-5)。TPNa と同様の効果を持つものとして、Lysophospholipids 類の Lysophosphatidic acid (LPA) の報告がある⁶¹⁾。本研究とは実験条件が異なるため、結果の直接比較は困難であるが、TPNa と LPA は分化の誘導によりセラミド合成を促進して、保湿とバリア機能向上に寄与するという見解では一致している。

細胞内にカルシウムイオンを供与するカルシウムイオノフォアとしては、イオノマイシン⁶²⁾や A23187⁶³⁾ が知られている。これらは 2 価カチオンと安定な複合体を形成してイオンキャリアーとして作用し、細胞膜を通した 2 価カチオンの輸送を増加させる。表皮角化細胞のカルシウムイオン濃度を増加させる点で (Fig. 3-6)、TPNa はカルシウムイオノフォアと類似の作用を示すと考えられる。しかし、細胞毒性や刺激性が高い抗生物質であるイオノマイシンや A23187 とは異なり、TPNa は作用が緩和で安全性が高い薬剤である。

TPNa による細胞内カルシウムイオン濃度の増加作用については、Fig. 3-7 のような機構を推定している。皮膚浸透した TPNa の一部は、Na が表皮角化細胞外に存在する Ca イオンと交換した TPCa の形となって存在し、これが細胞に取り込まれることで細胞内 Ca イオン濃度が上昇する。取り込まれた TPCa はフォ

スファターゼによって加水分解され Toc に変換され TPNa と同様の代謝過程を経るというものである。

つまり、TPNa のセラミドの増加による皮膚水分保持機能改善効果は、TPNa が皮膚浸透し表皮角化細胞に取り込まれて Toc に代謝される一連の現象のなかで、一部が一時的に Ca イオンキャリアーとして作用していることにより発現するものである推定している (Fig. 3-7)。

以上まとめると、TPNa は、表皮角化細胞へのカルシウムイオンの供給を促進し分化を誘導した結果、セラミド合成関連酵素の発現を促し、表皮角化細胞のセラミド量を増加させた。そして、これらメカニズムによって皮膚角層のセラミドを増加させ、角層の吸水能、保水能を向上するという作用機構が解明された。

TPNa は化学的に非常に安定で、肌荒れ予防、抗酸化、抗炎症などの作用だけでなく、皮膚自らの水分保持能を改善する効果を持ち、保湿剤として有用な化合物であることが明らかとなった。

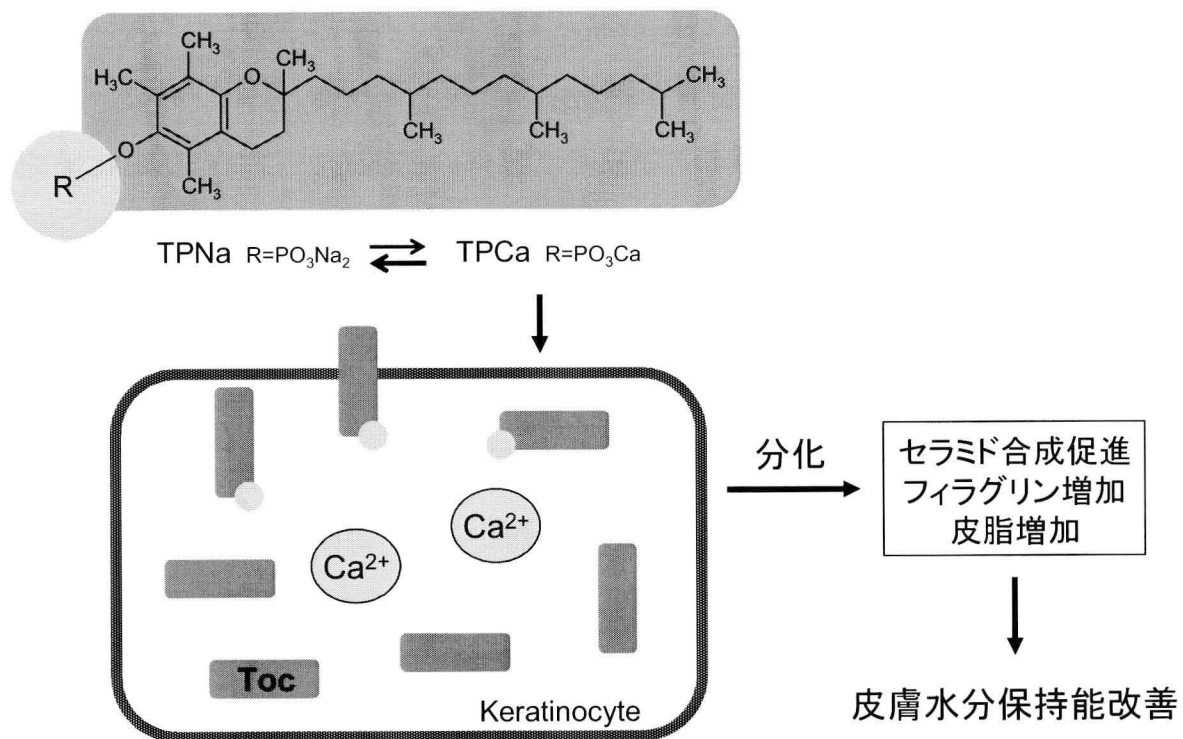


Fig. 3-7 Mechanism of TPNa on differentiation and skin moisture.

第4章 総括

本研究にて得られた成果は次の通りである。

1. 表皮角化細胞において TPNa は、紫外線照射、炎症性サイトカイン (IL-1 β) 過酸化物質 (tBHP, H₂O₂) をトリガーとする炎症のメディエーターである PGE₂ の産生を抑制した。その効果は、既存の抗炎症物質として知られている TA や G2K よりも優れていることを確認した。
2. TPNa は、PGE₂ の生合成に関与する酵素である Cox-2 の発現を抑制した。
3. TPNa は、Cox-2 の発現に関わるシグナル伝達系のうち、主に p38 MAPK のリン酸化を阻害した。
4. TPNa の PGE₂ 産生の阻害効果は、APM によって相乗的に増強された。

以上の結果から、TPNa は p38 MAPK を阻害することで Cox-2 の発現を抑制し、炎症性メディエーター PGE₂ の産生を減少させることによって、炎症反応を抑えることが明らかとなった。TPNa は既知の化合物に比べてより優れた抗炎症物質であり、UVB 照射や過酸化物質といった外因性刺激からヒト皮膚組織を守る有用な物質であることが分った。

加えて、

5. TPNa は経皮投与することにより、皮膚角層の吸水能及び保水能を向上させ、投与部位の角層セラミド含量を増加させた。
6. TPNa は、表皮角化細胞に対し、セラミド分解酵素の阻害ではなく、セラミド合成関連酵素の発現を促進することにより、セラミド量を増加させた。
7. TPNa は、表皮角化細胞において、分化に際して発現する酵素及びタンパクの発現を促進した。
8. TPNa は、表皮角化細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させた。

以上の結果から、TPNa は表皮角化細胞へのカルシウムイオンの供給を促進することにより分化を誘導し、セラミド合成関連酵素の発現を促し、表皮角化

細胞のセラミド量を増加させて、皮膚水分保持能を向上させることが明らかとなった。

TPNa は水溶性の化学的に安定な化合物であることから α -Toc に比べ取り扱いが容易である。また、肌荒れ予防や抗酸化だけでなく抗炎症剤として有効で、他のトコフェロール誘導体に比べ優れている。さらに、皮膚自らの水分保持能を改善する効果を持ち、保湿剤としても有用な成分である。以上の事から、TPNa は健康な皮膚の維持において優れた化合物であり、皮膚の予防薬、医薬部外品主剤としての利用が大いに期待される。

第5章 実験の部

(1) TPNa の抗炎症効果の検討 (第2章)

1. ヒト皮膚3次元モデルの培養と UVB 照射

ヒト皮膚3次元モデルは、東洋紡績株式会社 (Osaka, Japan) の TESTSKIN™ LSE-high を用いた。培地は LSE アッセイ培地 (東洋紡績株式会社) を用い、製品取扱説明書に従って 5% CO₂ 存在下 37 °C で培養した。ヒト皮膚3次元モデルの表皮側に、UV クロスリンカー (CL-1000M, 302 nm, UVP LLC, Upland, CA, USA) を用いて 80 mJ/cm² の UVB を照射した。その後、2% の TPNa 水溶液を表皮側に添加し、5% CO₂ 存在下 37 °C で 2 時間培養した。TPNa を含む水溶液を除去し、皮膚モデルを 5% CO₂ 存在下 37 °C で 22 時間培養した。

2. UVB 照射による損傷細胞の組織化学的検出

顕微鏡観察用切片を作成するため、ヒト3次元モデル皮膚を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、エタノールで脱水してパラフィンに包埋した。薄切した切片を、ヘマトキシリン液とエオシン Y 液で染色して標本とした。顕微鏡下で標本を観察して写真を撮影し、周辺の細胞よりも濃く染色されている細胞及び核の凝縮が認められた細胞を UVB 損傷細胞と判定した。表皮 0.5 mm 範囲を 1 視野として、8 または 12 視野分を観察して、UVB 損傷細胞を計測した。

3. 細胞培養

a) 正常ヒト表皮角化細胞

正常ヒト表皮角化細胞は倉敷紡績株式会社 (Osaka, Japan) の正常ヒト新生児包皮表皮角化細胞 (NHEK(F)) を購入した。培地は正常ヒト表皮角化細胞増殖用培地である HuMedia-KG2 (倉敷紡績株式会社) を用い、5% CO₂ 存在下 37 °C で培養、継代した。

b) SV40 transformed human keratinocyte

SV40 transformed human keratinocyte (SVHK) は、多島信吾教授 (防衛医科大学) より譲受した。培地は 10% FBS 添加ダルベッコ改変イーグル培地-低グ

ルコース (DMEM-low glucose) を用い、5% CO₂ 存在下 37 °C で培養、継代した。

4. UVB の照射、IL-1 β または過酸化物による細胞処理

HuMedia KG-2 を用いて希釈して細胞初期濃度を 10⁵ cells/ml とした NHEK(F) を細胞培養マルチウェルプレートに分注し、セミコンフルエントとなるまで 5% CO₂ 存在下 37 °C で培養した。その後、0, 0.1, 0.5, 2 μ M の TPNa, TA, G2K を含む新鮮な培地に交換し、5% CO₂ 存在下 37 °C で 24 時間培養した。

a) UVB 照射

培地を除去し、細胞を D-PBS (-) で洗浄した後、D-PBS (-) 存在下、UV クロスリンカー (CL-1000M, 302nm, UVP LLC, Upland, CA, USA) を用いて 60 mJ/cm² の UVB を照射した。その後、新鮮な培地に置き換えて 5% CO₂ 存在下 37 °C で 24 時間培養し、培養上清を PGE₂ 測定に用いた。

b) IL-1 β 処理

培地を除去し、細胞を D-PBS (-) で洗浄した後、10 ng/ml の IL-1 β を含む新鮮な培地に置き換えて 5% CO₂ 存在下 37 °C で 24 時間培養し、培養上清を PGE₂ 測定に用いた。

c) 過酸化物

培地を除去し、細胞を D-PBS (-) で洗浄した後、0.5 mM tBHP または 1 mM H₂O₂ を含む新鮮な培地に置き換えて 5% CO₂ 存在下 37 °C で 0.5 時間培養した。その後、培地を除去し D-PBS (-) で洗浄し、新鮮な培地に置き換えて 5% CO₂ 存在下 37 °C で 24 時間培養し、培養上清を PGE₂ 測定に用いた。

5. PGE₂ の測定

培地中の PGE₂ 量は、エンザイムイムノアッセイ法により測定し、PGE₂ EIA キット (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) を使用した。

6. α -Toc 濃度の測定

ヒト皮膚 3 次元モデルまたは NHEK(F) (10⁶ cells) に 50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.2) を 0.5 ml 加え、超音波破碎機 (US-10K, 株式会社エスエヌディ, Nagano,

Japan) を用いてホモジネートを作成した。ホモジネート (1.5 mg/ml) の 0.4 ml をガラスねじ口試験管に入れ、10 nmol/ml δ -Toc-エタノール溶液 (0.1 ml)、5% ピロガロール-エタノール溶液 (0.5 ml)、濃塩酸 (0.05 ml) を加えてよく攪拌した。 n -ヘキサン/酢酸エチル (9 : 1) (2.5 ml) を加えてよく攪拌し、720 x g (2,000 rpm) で 5 分間遠心を行って分離して抽出した。上層を回収し、遠心濃縮機で乾固後、残渣に HPLC 移動相 (200 μ l) を加えて溶解し、フィルターろ過した。これを試料とし、HPLC カラムに 10 μ l 注入して、定量解析を行った。

トコフェロール及び TPNa の分析には、昭和電工株式会社 (Tokyo, Japan) の逆相クロマトグラフィー用カラム (Shodex C18M 4E) と、島津製作所 (Kyoto, Japan) の HPLC システム (Prominence 20) を使用した。移動相は 0.03 M 酢酸と 0.03 M 酢酸ナトリウムを含むメタノール/アセトニトリル (7 : 3, v/v)、流速は 1.0 ml/min、カラム温度は 40 °C、検出は蛍光検出器を用い、検出波長は励波長 290 nm、蛍光波長 325 nm とした。この条件での保持時間は、TPNa では約 7 分、 α -Toc では約 13 分であった。

7. Real-time PCR による遺伝子発現量の測定

4-a) に示した方法で UVB 照射処理し、5% CO₂ 存在下 37 °C で 3 時間培養した NHEK(F)、4-c) に示した方法で過酸化処理し、5% CO₂ 存在下 37 °C で 3 時間培養した NHEK(F) 及び 4-b) に示した方法で IL-1 β 処理をした後 3 時間培養した NHEK(F) を total RNA 回収のための試料とした。細胞は、RNAprotect Cell reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA) で回収して凍結保存した。total RNA は RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、逆転写反応による cDNA 合成には PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time, タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan) を用いた。Real-time PCR 反応は Roche Light Cycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて行い、検出には SYBR Premix Ex Taq キット (Perfect Real Time, タカラバイオ株式会社) を用いた。プライマーは、タカラバイオ株式会社の Cox-2 遺伝子用 (HA033050)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 用 (HA031578) をそれぞれ用いた。増幅産物は蛍光波長 530 nm で検出し、解析には LightCycler の付属解析ソフトウェアを使用した。PCR による発現量の結果は GAPDH の発現量でノーマライ

ズして示した。

8. Western blotting

HuMedia KG-2 を用いて希釈して細胞初期濃度 10^5 cells/ml とした NHEK(F) を細胞培養マルチウェルプレートに分注し、セミコンフルエントとなるまで 5% CO_2 存在下 37°C で培養した。培地を除去し、0, 0.5 μM TPNa を含む新鮮な培地に交換して 5% CO_2 存在下 37°C で 24 時間培養した後、D-PBS (-) で洗浄した。その後、3 種類の阻害剤 (Bay11-7082 [NF- κB 阻害剤]、SB203580 [p38 MAPK 阻害剤]、SP600125 [JNK MAPK 阻害剤]) をそれぞれ含む培地に置き換えて、5% CO_2 存在下 37°C で 1 時間培養した。阻害剤は、細胞の生存率に影響を与えない 2 μM の濃度で使用した。培地を除去し細胞を D-PBS (-) で洗浄した後、D-PBS (-) 存在下、60 mJ/cm^2 の UVB を照射した。その後、新鮮な培地に置き換えて 5% CO_2 存在下 37°C で 0.5 時間培養し、培地を除去後 D-PBS (-) で洗浄して細胞を回収した。細胞は、Buffer A (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, ホスファターゼ阻害剤カクテル, プロテアーゼ阻害剤カクテル) で溶解し、13,000 $\times g$, 20 分間遠心した。得られた上清中のタンパク質を、10% SDS-PAGE により分離後、ゲル中のタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写溶液 (25 mM Tris, 192 mM グリシン, 10% メタノール) を用い、セミドライトランスファー装置 (MODEL BE-300, 株式会社バイオクラフト, Tokyo, Japan) で、50 mA、14 時間転写した。転写後の PVDF 膜をブロックエース (DS ファーマメディカル株式会社, Osaka, Japan) 2 ml 中、室温で 2 時間インキュベーションしてブロッキングした。次に、この PVDF 膜を TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で希釈した抗 p38 MAPK 又は抗リン酸化 p38 MAPK の抗体 (Cell Signaling Technology, Inc., Denvers, MA, USA) 溶液中、室温で 2 時間放置した。この膜を TBS-T で洗浄後、HRP 標識 anti-rabbit IgG (Southern Biotech Associates Inc., New Orleans, LA, USA) と室温で 1 時間インキュベーションした。膜を TBS-T で洗浄後、ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare UK Ltd, Bucks, UK) を説明書に従い使用し、可視化した。

9. TPNa と APM の相乗効果の確認

NHEK(F) を 10% FBS 含有 DMEM-low glucose を用いて希釈して細胞初期濃度を 5×10^4 cells/ml とした。この NHEK(F) を細胞培養マルチウェルプレートに分注し、セミコンフルエントとなるまで 5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。その後、TPNa を 0, 5, 10 μ M 含む新鮮な培地に交換し、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養した。培地を除去し細胞を D-PBS (-) で洗浄した後、D-PBS (-) 存在下、UV クロスリンカー (CL-1000M, 302 nm, UVP LLC, Upland, CA, USA) を用いて 30 mJ/cm² の UVB を照射した。その後、APM を 0, 30 μ M 含む新鮮な培地に交換して 5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養し、培養上清を PGE₂ 測定に用いた。

10. 試薬及び機器

TPNa は、昭和電工株式会社 (Tokyo, Japan) のものを使用した。TPNa の純度は 98% 以上で、トコフェロール及びトコフェロール誘導体は 2% 以下であった。tBHP、H₂O₂、TA、G2K、SB203580、SP600125、ダルベッコリン酸緩衝液 Ca, Mg 不含 (D-PBS(-)) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) のものを使用した。DMEM-low glucose は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)、Bay-11-7082 は、Calbiochem Inc (San Diego, CA, USA) のものを使用した。抗 p38 MAPK と抗リン酸化 p38 MAPK の抗体は Cell Signaling Technology, Inc (Denver, MA, USA) のものを用いた。HPLC 移動相に用いたメタノール、アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用 (純正化学工業株式会社, Tokyo, Japan) を使用した。上記以外の試薬は、市販の特級品を使用した。

細胞培養用フラスコ、マルチウェルプレートは、BD Falcon Co. (Franklin Lakes, NJ, USA) のものを使用した。光学顕微鏡 ECLIPSE 80i は Nikon (Tokyo, Japan)、マイクロプレートリーダー Infinite M200 は Tecan (Mannedorf, Switzerland) のものを用いた。

11. 統計学的解析

試験区ごとに平均値と標準偏差を求め、等分散性の検定 (F 検定) を行った。等分散の場合は Student の *t* 検定、等分散性が認められなかった場合は Aspin-Welch の検定を用いて対照群と各被験物質投与群との間で平均値の差の

検定を行った。危険率 5% 未満を有意差ありとした。

(2) TPNa の皮膚水分保持機能改善効果の検討 (第 3 章)

1. 動物

ヘアレスマウス (Hos: HR-1, 7 週令) は株式会社星野試験動物飼育所 (Ibaragi, Japan) から購入し、管理環境下 (周辺温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 $50 \pm 20\%$, 明期 12 時間/暗期 12 時間の周期) で飼育した。マウス (メス, 8.5 週令) には市販飼料 (Lab Diet #5002, PMI Nutrition International, Brentwood, MO, USA) と水を継続して与えた。動物の取り扱いは、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(2006 年 6 月 1 日, 日本学術会議) に基づいて行った。

2. TPNa 製剤とその局所投与

TPNa の皮膚投与濃度は 1%または 2% (w/w) で、水、多価アルコール、シリコンオイル、増粘剤、高分子乳化剤を含む水中油型 (O/W) 乳液に配合した。プラセボは乳液のみとした。TPNa を含む或いは含まない乳液 50 μl をヘアレスマウス背部腰部皮膚 ($2 \times 3 \text{ cm}^2$) に 1 日 1 回、週 5 回、4 週間投与した。

3. 水負荷試験

水負荷試験は田上らの方法⁶⁴⁾に従って行った。角層の水分量は、皮表水分量測定装置 (Skicon-200, アイ・ビー・エス株式会社, Shizuoka, Japan) で高周波正弦電流を皮膚に流し、電気伝導度を測定することで定量した。

まず、測定部位の電気伝導度を測定し水負荷前の初期値 (prehydration state) とした。次に、精製水 500 μl を滴下した不織布 (BEMCOT M-3, 旭化成せんい株式会社, Osaka, Japan) を腰部皮膚に 10 秒間置き、それを除いた後、皮膚上に残った水滴をスポンジで吸い取った。水負荷処理の 30 秒後の電気伝導度を測定して吸水能 (hygroscopicity) とし、この値が高い場合は吸水能が高いと判断した。続けて、2 分後まで 30 秒ごとに測定を繰り返し、初期値への戻りを確認し、水分保持能 (water holding capacity) とした。水分保持能は初期値への戻りが遅いほど高いと判断した。得られた結果は、初期値に対する相対値で示した。

相対吸水能 (relative hygroscopicity) は、マウス個体ごとの水負荷処理 30 秒後の測定値を個体ごとの初期値で除した値とした。相対水分保持能 (relative water holding capacity) はマウス個体ごとの水負荷処理後 60, 90, 120 秒後の測定値を個体ごとの初期値で除した値とした。個体ごとに得られたデータは、統計解析を行った。

4. 細胞培養

正常ヒト表皮角化細胞は倉敷紡績株式会社 (Osaka, Japan) の正常ヒト新生児包皮表皮角化細胞 (NHEK(F)) を購入した。培地は正常ヒト表皮角化細胞増殖用培地 ; HuMedia-KG2 (倉敷紡績株式会社, Osaka, Japan) を用い、5% CO₂ 存在下 37 °C で培養、継代した。

5. セラミド定量

TPNa を含む又は含まない乳液を 4 週間背部腰部皮膚に投与したマウスの角層を、粘着テープ (PPS テープ, ニチバン株式会社, Tokyo, Japan) でストリッピングして採取した。角層の付着したテープは分析まで -20 °C で保存した。粘着テープ上の脂質の抽出は Bligh - Dyer 法⁶⁵⁾で行った。

HuMedia KG-2 を用いて希釈して細胞初期濃度を 10⁵ cells/ml とした NHEK(F) を細胞培養ディッシュに分注し、セミコンフルエントとなるまで 5% CO₂ 存在下 37 °C で培養した。その後、0, 50 μM の TPNa を含む新鮮な培地に交換後、5% CO₂ 存在下 37 °C で 24 時間培養した。培地を除去し D-PBS (-) で洗浄後、スクレーパーを用いて細胞を回収した。細胞 (10⁶ cells) は超音波破碎器 (US-10K, 株式会社エスエヌディ, Nagano, Japan) を用いてホモジナイズし、脂質の抽出を Bligh - Dyer 法で行った⁶⁵⁾。

セラミドの検出は Kistic らの方法で行った⁶⁶⁾。抽出した脂質サンプルは 3N 塩酸 (0.05 ml) 中で、100 °C で 2 時間加水分解し、その後遠心濃縮器 (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) で塩酸を除去した。残渣に対し、酢酸エチル (0.6 ml)、0.1M 酢酸緩衝液 (pH3.7, 0.75 ml) を加えて混合し、さらに fluorescamine 溶液 (7 mg/25 ml アセトン, 0.15 ml) を加えて振とう混合し、2,000 x g で 3 分間遠心した。酢酸エチル層の fluorescamine の蛍光強度を測定

することによりセラミドを定量した。検出波長は励起波長 410 nm, 蛍光波長 490 nm とした。

6. Real-time PCR

HuMedia KG-2 を用いて希釈して細胞初期濃度を 10^5 cells/ml とした NHEK(F) を細胞培養ディッシュに分注し、セミコンフルエントとなるまで 5% CO_2 存在下 37 °C で培養した。その後、0, 50 μM の TPNa を含む新鮮な培地に交換し、5% CO_2 存在下 37 °C で 24 時間培養した NHEK(F) を、RNAprotect Cell reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA) で回収し、凍結保存した。total RNA は RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、逆転写反応による cDNA 合成には PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time, タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan) を用いた。Real-time PCR 反応は Roche LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて行い、検出には SYBR Premix Ex Taq キット (Perfect Real Time, タカラバイオ株式会社) を用いた。プライマーはタカラバイオ株式会社の、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) 遺伝子 (SPTLC1, HA042580、SPTLC2, HA121961)、酸性セラミダーゼ (ASAHI) 遺伝子 (HA127474)、アルカリセラミダーゼ (ACER1) 遺伝子 (HA057790)、トランスグルタミナーゼ 1 (TGM1) 遺伝子 (HA032140)、ケラチン 1 (KRT1) 遺伝子 (HA042147)、ケラチン 10 (KRT10) 遺伝子 (HA093630)、インボルクリン (IVL) 遺伝子 (HA103446)、ロリクリン (LOR) 遺伝子 (HA098302)、フィラグリン (FLG) 遺伝子 (HA127774)、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子 (HA031578) をそれぞれ用いた。増幅産物は蛍光波長 530 nm で検出し、解析には LightCycler の付属解析ソフトウェアを使用した。PCR による発現量の結果は GAPDH の発現量でノーマライズして示した。

7. 細胞内カルシウムイオン濃度変化の測定

a) HuMedia KG-2 を用いて希釈して細胞初期濃度 10^5 cells/ml とした NHEK(F) を細胞培養ディッシュに分注し、セミコンフルエントとなるまで 5% CO_2 存在下 37 °C で培養した。その後、Buffer B (10 mM HEPES pH 7.4, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 and 10 mM glucose) で洗浄し、0.05 mM Ca^{2+} と 0, 25,

50, 75 μM の TPNa を含む Buffer A に交換し、5% CO_2 存在下 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間培養した。

b) HuMedia KG-2 を用いて希釈して細胞初期濃度 10^5 cells/ml とした NHEK(F) を細胞培養ディッシュに分注し、セミコンフルエントとなるまで 5% CO_2 存在下 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。その後、0, 10, 50 μM の TPNa を含む新鮮な HuMedia KG-2 に交換し、5% CO_2 存在下 37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養した。

a) b) それぞれの処理・培養を行った細胞を Buffer B で洗浄し、3 μM Fura 2-acetoxymethyl ester (Fura 2-AM, 株式会社同仁化学研究所, Kumamoto, Japan) を含む Buffer B に交換し、5% CO_2 存在下 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間培養した。Fura 2-AM を含む Buffer B を除去し、Buffer B で洗浄した細胞を 0.5% TritonX-100-PC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む Buffer B で溶解し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を Fura-2 の蛍光強度を測定することで測定した。検出波長は励起波長, 340 nm、380 nm, 蛍光波長, 510 nm とし、測定はマイクロプレートリーダー (Infinite M200, Tecan, Mannedorf, Switzerland) を用いた。得られた結果は、340 nm の測定値と 380 nm の測定値の比を取り、細胞溶解液のタンパク量で除して示した。タンパク量は、DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて定量した。

8. 試薬及び機器

TPNa は、昭和電工株式会社 (Tokyo, Japan) のものを使用した。TPNa の純度は 98% 以上で、トコフェロール及びトコフェロール誘導体の含有量は 2% 以下であった。上記以外の試薬は、市販の特級品を用いた。

細胞培養用フラスコ、マルチウェルプレート、ディッシュは、BD Falcon Co. (Franklin Lakes, NJ, USA) のものを使った。マイクロプレートリーダー Infinite M200 は、Tecan (Mannedorf, Switzerland) のものを使用した。

9. 統計学的手法

試験区ごとに平均値と標準偏差を求め、等分散性の検定 (F 検定) を行い、等分散の場合は Student の t 検定、等分散性が認められなかった場合は Aspin-Welch の検定を用いて対照群と各被験物質投与群との間で平均値の差の

検定を行った。危険率 5%未満を有意差ありとした。

第 6 章 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました星薬科大学 病態機能制御学研究室 高橋 典子 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご協力を賜りました星薬科大学 病態機能制御学研究室 修士課程 2 年生 佐々木 裕一氏に深く感謝申し上げます。

本研究の推進するにあたり、終始暖かく見守って下さいました星薬科大学 病態機能制御学研究室 高橋 勝彦 准教授、今井 正彦 助教に深くお礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、ご助言をいただきました星薬科大学 衛生化学教室 福井 哲也 教授、微生物学教室 辻 勉 教授に心より御礼申し上げます。

さらに数々のご協力をいただきました星薬科大学 病態機能制御学研究室 研究室員の皆様に心より御礼申し上げます。

なお本研究の機会を与えていただきました昭和電工株式会社 中条 哲夫 事業開発センター長、蒲池 晴美博士に心より御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kerrer, P., and Bussmann, G. (1940) dl-alfa-Tocopherol phosphoric ester. *Helvetica Chimica. Acta*, 23, 1137-38.
- 2) Gianello, R., Libinaki, R., Azzi, A., Gavin, P. D., Negis, Y., Zingg, J. M., Holt, P., Keah, H. H., Griffey, A., Smallridge, A., West, S. M., and Ogru, E. (2005) Alpha-tocopheryl phosphate: a novel, natural form of vitamin E. *Free Radic. Biol. Med.*, 39, 970-6.
- 3) Munteanu, A., Zingg, J. M., Ogru, E., Libinaki, R., Gianello, R., West, S., Negis, Y., and Azzi, A. (2004) Modulation of cell proliferation and gene expression by alpha-tocopheryl phosphates: relevance to atherosclerosis and inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 318, 311-6.
- 4) Negis, Y., Aytan, N., Ozer, N., Ogru, E., Libinaki, R., Gianello, R., Azzi, A., and Zingg, J. M. (2006) The effect of tocopheryl phosphates on atherosclerosis progression in rabbits fed with a high cholesterol diet. *Arch. Biochem. Biophys.*, 450, 63-6.
- 5) Zingg, J. M., Meydani, M., and Azzi, A. (2010) alpha-Tocopheryl phosphate-an active lipid mediator? *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, 679-92.
- 6) Zingg, J. M., and Azzi, A. (2004) Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1113-33.
- 7) 清水宏. (2005) あたらしい皮膚科学 第1版. 中山書店.
- 8) Lee, H., Choi, M. K., Lee, Y. J., Ku, J. L., Kim, K. H., Choi, J. S., and Lim, S. J. (2006) Alpha-tocopheryl succinate, in contrast to alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate, inhibits prostaglandin E2 production in human lung epithelial cells. *Carcinogenesis*, 27, 2308-15.
- 9) O'Leary, K. A., de Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'Brien, N. M., and Williamson, G. (2004) Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.*, 551, 245-54.
- 10) Maalouf, S., El-Sabban, M., Darwiche, N., and Gali-Muhtasib, H. (2002) Protective effect of vitamin E on ultraviolet B light-induced damage in

- keratinocytes. *Mol. Carcinog.*, 34, 121-30.
- 11) Yoshida, E., Watanabe, T., Takata, J., Yamazaki, A., Karube, Y., and Kobayashi, S. (2006) Topical application of a novel, hydrophilic gamma-tocopherol derivative reduces photo-inflammation in mice skin. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1633-40.
 - 12) Gehring, W., Fluhr, J., and Gloor, M. (1998) Influence of vitamin E acetate on stratum corneum hydration. *Arzneimittelforschung*, 48, 772-5.
 - 13) Tamburic, S., Abamba, G., and Ryan, J. (1999) Moisturizing potential of d- α -tocopherol. *Cosmetics & Toiletries*, 114, 73-82.
 - 14) Nakayama, S., Katoh, E. M., Tsuzuki, T., and Kobayashi, S. (2003) Protective effect of α -tocopherol-6-O-phosphate against ultraviolet B-induced damage in cultured mouse skin. *J. Invest. Dermatol.*, 121, 406-11.
 - 15) Tanaka, Y., Moritoh, Y., and Miwa, N. (2007) Age-dependent telomere-shortening is repressed by phosphorylated α -tocopherol together with cellular longevity and intracellular oxidative-stress reduction in human brain microvascular endotheliocytes. *J. Cell Biochem.*, 102, 689-703.
 - 16) Rezk, B. M., Haenen, G. R., Van Der Vijgh, W. J., and Bast, A. (2004) The extraordinary antioxidant activity of vitamin E phosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, 1683, 16-21.
 - 17) Rezk, B. M., van der Vijgh, W. J., Bast, A., and Haenen, G. R. (2007) α -tocopheryl phosphate is a novel apoptotic agent. *Front Biosci.*, 12, 2013-9.
 - 18) Ohmori, Y. (2006) dl- α -トコフェリルリン酸ナトリウムの紫外線皮膚障害防御作用. *Nippon Koshohin Gakkaishi*, 30, 18-22.
 - 19) Nakama, M. (2009) dl- α -トコフェリルリン酸ナトリウムは紫外線による活性窒素種の生成を抑制する. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, 43, 19-25.
 - 20) 今堀和友, 山川民夫. (1998) 生化学辞典 第3版, 東京化学同人.
 - 21) Yang, T., Huang, Y., Heasley, L. E., Berl, T., Schnermann, J. B., and Briggs, J. P. (2000) MAPK mediation of hypertonicity-stimulated cyclooxygenase-2 expression in renal medullary collecting duct cells. *J. Biol. Chem.*, 275,

23281-6.

- 22) Arbabi, S., Rosengart, M. R., Garcia, I., and Maier, R. V. (2000) Hypertonic saline solution induces prostacyclin production by increasing cyclooxygenase-2 expression. *Surgery*, 128, 198-205.
- 23) Chen, W., Dong, Z., Valcic, S., Timmermann, B. N., and Bowden, G. T. (1999) Inhibition of ultraviolet B--induced c-fos gene expression and p38 mitogen-activated protein kinase activation by (-)-epigallocatechin gallate in a human keratinocyte cell line. *Mol. Carcinog.*, 24, 79-84.
- 24) Chen, W., and Bowden, G. T. (1999) Activation of p38 MAP kinase and ERK are required for ultraviolet-B induced c-fos gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*, 18, 7469-76.
- 25) Chen, W., Tang, Q., Gonzales, M. S., and Bowden, G. T. (2001) Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*, 20, 3921-6.
- 26) Gilmore, T. D. (1999) The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*, 18.
- 27) Panwalkar, A., Verstevsek, S., and Giles, F. (2004) Nuclear factor-kappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. *Cancer*, 100, 1578-89.
- 28) Bisby, R. H., and Parker, A. W. (1995) Reaction of ascorbate with the alpha-tocopheroxyl radical in micellar and bilayer membrane systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, 317, 170-8.
- 29) Finney, R. S., and Somers, G. F. (1958) The antiinflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.*, 10, 613-20.
- 30) Dargan, D. J., and Subak-Sharpe, J. H. (1985) The effect of triterpenoid compounds on uninfected and herpes simplex virus-infected cells in culture. I. Effect on cell growth, virus particles and virus replication. *J. Gen. Virol.*, 66, 1771-84.
- 31) Ohminami, H., Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S., Yoshikawa, M., and Kitagawa, I. (1984) Effects of soyasaponins on liver injury induced by highly

- peroxidized fat in rats. *Planta. Med.*, 50, 440-1.
- 32) Pompei, R., Flore, O., Marccialis, M. A., Pani, A., and Loddo, B. (1979) Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature*, 281, 689-90.
 - 33) Abe, N., Ebina, T., and Ishida, N. (1982) Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetinic acid in mice. *Microbiol. Immunol.*, 26, 535-9.
 - 34) Ohuchi, K., Kamada, Y., Levine, L., and Tsurufuji, S. (1981) Glycyrrhizin inhibits prostaglandin E2 production by activated peritoneal macrophages from rats. *Prostaglandins Med.*, 7, 457-63.
 - 35) Ohtsuki, K., Abe, Y., Shimoyama, Y., Furuya, T., Munakata, H., and Takasaki, C. (1998) Separation of phospholipase A2 in Habu snake venom by glycyrrhizin (GL)-affinity column chromatography and identification of a GL-sensitive enzyme. *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 574-8.
 - 36) Shimoyama, Y., Ohtaka, H., Nagata, N., Munakata, H., Hayashi, N., and Ohtsuki, K. (1996) Physiological correlation between glycyrrhizin, glycyrrhizin-binding lipxygenase and casein kinase II. *FEBS Lett.*, 391, 238-42.
 - 37) Rackova, L., Jancinova, V., Petrikova, M., Drabikova, K., Nosal, R., Stefek, M., Kostalova, D., Pronayova, N., and Kovacova, M. (2007) Mechanism of anti-inflammatory action of liquorice extract and glycyrrhizin. *Nat. Prod. Res.*, 21, 1234-41.
 - 38) Pages, G., Milanini, J., Richard, D. E., Berra, E., Gothie, E., Vinals, F., and Pouyssegur, J. (2000) Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 902, 187-200.
 - 39) Thomson, S., Mahadevan, L. C., and Clayton, A. L. (1999) MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 10, 205-14.
 - 40) Cobb, M. H. (1999) MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 71, 479-500.
 - 41) Shibata, A., Nakagawa, K., Kawakami, Y., Tsuzuki, T., and Miyazawa, T.

- (2010) Suppression of gamma-tocotrienol on UVB induced inflammation in HaCaT keratinocytes and HR-1 hairless mice via inflammatory mediators multiple signaling. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 7013-20.
- 42) Niki, E. (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, 44, 227-53.
 - 43) Halpner, A. D., Handelman, G. J., Harris, J. M., Belmont, C. A., and Blumberg, J. B. (1998) Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 359, 305-9.
 - 44) Glascott, P. A., Jr., Tsyganskaya, M., Gilfor, E., Zern, M. A., and Farber, J. L. (1996) The antioxidant function of the physiological content of vitamin C. *Mol Pharmacol.*, 50, 994-9.
 - 45) Chepda, T., Cadau, M., Lassabliere, F., Reynaud, E., Perier, C., Frey, J., and Chamson, A. (2001) Synergy between ascorbate and alpha-tocopherol on fibroblasts in culture. *Life Sci.*, 69, 1587-96.
 - 46) Huang, J., and May, J. M. (2003) Ascorbic acid spares alpha-tocopherol and prevents lipid peroxidation in cultured H4IIE liver cells. *Mol. Cell Biochem.*, 247, 171-6.
 - 47) Elias, P. M. (1983) Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.*, 80, 44s-9s.
 - 48) Imokawa, G., Akasaki, S., Hattori, M., and Yoshizuka, N. (1986) Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.*, 87, 758-61.
 - 49) Matoltsy, A. G., Downes, A. M., and Sweeney, T. M. (1968) Studies of the epidermal water barrier. II. Investigation of the chemical nature of the water barrier. *J. Invest. Dermatol.*, 50, 19-26.
 - 50) Nakahara, M., Mishima, T., and Hayakawa, T. (2007) Effect of a sake concentrate on the epidermis of aged mice and confirmation of ethyl alpha-D-glucoside as its active component. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 427-34.
 - 51) Tanno, O., Ota, Y., Kitamura, N., Katsube, T., and Inoue, S. (2000)

- Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier. *Br. J. Dermatol.*, 143, 524-31.
- 52) Rawlings, A. V., Davies, A., Carlomusto, M., Pillai, S., Zhang, K., Kosturko, R., Verdejo, P., Feinberg, C., Nguyen, L., and Chandar, P. (1996) Effect of lactic acid isomers on keratinocyte ceramide synthesis, stratum corneum lipid levels and stratum corneum barrier function. *Arch. Dermatol. Res.*, 288, 383-90.
 - 53) Ishikawa, J., Shimotoyodome, Y., Chen, S., Ohkubo, K., Takagi, Y., Fujimura, T., Kitahara, T., and Takema, Y. (2012) Eucalyptus increases ceramide levels in keratinocytes and improves stratum corneum function. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 34, 17-22.
 - 54) Kim, S. H., Nam, G. W., Lee, H. K., Moon, S. J., and Chang, I. S. (2006) The effects of Musk T on peroxisome proliferator-activated receptor [PPAR]-alpha activation, epidermal skin homeostasis and dermal hyaluronic acid synthesis. *Arch. Dermatol. Res.*, 298, 273-82.
 - 55) Both, D. M., Goodtzova, K., Yarosh, D. B., and Brown, D. A. (2002) Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells. *Arch. Dermatol. Res.*, 293, 569-75.
 - 56) Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2009) Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie.*, 91, 784-90.
 - 57) Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S. H. (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 19, 245-54.
 - 58) Fuchs, E. (1990) Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.*, 111, 2807-14.
 - 59) Watt, F. M. (1989) Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1, 1107-15.
 - 60) Eckert, R. L., Crish, J. F., Efimova, T., Dashti, S. R., Deucher, A., Bone, F.,

- Adhikary, G., Huang, G., Gopalakrishnan, R., and Balasubramanian, S. (2004) Regulation of involucrin gene expression. *J. Invest. Dermatol.*, 123, 13-22.
- 61) Yahagi, S., Koike, M., Okano, Y., and Masaki, H. (2011) Lysophospholipids improve skin moisturization by modulating of calcium-dependent cell differentiation pathway. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 33, 251-6.
 - 62) Liu, C., and Hermann, T. E. (1978) Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J. Biol. Chem.*, 253, 5892-4.
 - 63) Reed, P. W., and Lardy, H. A. (1972) A23187: a divalent cation ionophore. *J. Biol. Chem.*, 247, 6970-7.
 - 64) Tagami, H., Kanamaru, Y., Inoue, K., Suehisa, S., Inoue, F., Iwatsuki, K., Yoshikuni, K., and Yamada, M. (1982) Water sorption-desorption test of the skin in vivo for functional assessment of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, 78, 425-8.
 - 65) Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-7.
 - 66) Kiscic, A., and Rapport, M. M. (1974) Determination of long-chain base in glycosphingolipids with fluorescamine. *J. Lipid Res.*, 15, 179-80.