顔面シワたるみの改善剤として期待されている

マイコスポリン様アミノ酸のヒアルロン酸分泌亢進効果

とその細胞生物学的メカニズム

芋川玄爾

国立大学法人宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター

特任教授　医学博士

〒321-8505 栃木県宇都宮市峯町 350> Tel : 028-649-5282

e-mail: imokawag@cc.utsunomiya-u.ac.jp/imokawag@dream.ocn.ne.jp

携帯電話：09022092468

芋川研究室 ホームページ <https://www.imokawagenji.com/>

緒言

ヒアルロン酸(HA)は、皮膚の典型的な物理化学的および機械的特性をサポートする細胞外微小環境の重要な構成要素で、高分子のポリマー長とポリアニオン電荷が水を結合させる機構を介して重要な構造機能特徴を有し、これにより体積膨張、濁度および皮膚弾性を保持している(1)。光損傷皮膚では、真皮中の HA の顕著な減少(2,3)に加えて、マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)-1 の発現上昇とその活性化による I 型コラーゲン細線維の断片化および喪失が生じている(4,5)。また、線維芽細胞由来エラスターゼ ネプリライシンの発現上昇によりエラスチン繊維の 3 次元直線性構造が壊れて湾曲化が生じ(6-13)、皮膚弾力性の低下を引き起こしている。これら繊維の形態的変化は、皮膚の弾力性の低下だけでなく、その後の皮膚のしわやたるみの発生に関与している。その関連性は、皮膚弾性特性の有意な減少が皮膚のしわ形成の開始の前提条件であり、形態測定分析によって明らかにされた臨床スコアとしわの深さの両方が皮膚弾性の低下と密接な関係があることを実証した我々の以前の研究と一致している(14-16)。すなわち、ヒト皮膚の観察研究において、顔面シワの形成または改善は、それぞれ皮膚弾性特性の顕著な喪失または回復を伴うことが判明している(14-16)。真皮中の HA 含有量と皮膚光老化症状との関係について、最近、吉田らは(17,18)、日光に頻度高く暴露された顔の皮膚の乳頭真皮に HA の顕著な損傷や減少があることを報告

し，その減少したレベルは、同じ老化した皮膚のしわとたるみの程度と関連付けることができるため、彼らの研究は光暴露皮膚での HA の欠乏が皮膚のしわやたるみの形成に強く寄与することを示唆している。

線維芽細胞による HA 分泌を刺激し得るサイトカインまたはケモカインについては、TGF-β が NHDF における HAS1 および HAS2 遺伝子の両方の mRNA 発現レベルを増加させることが報告されている(19)。また、サイトカイン TGF-β、PDGF、IFN-γ、TNF-α、IL-1 および EGF は、線維芽細胞における HA 合成を促進することが示されている(20-23)。加齢皮膚および光老化皮膚における関連する HA 欠乏症を改善する有望な薬剤として、HA 分泌を促進し得るサイトカインおよび成長因子が利用可能であるが、それらは一般に高い分子量のために真皮まで浸透できないので皮膚の局所塗付には適していない。そのため、NHDF による HA の分泌を促進する可能性のある分子量の小さく経皮的に透過性の天然化合物が存在する場合、光老化した皮膚のしわやたるみの形成の生じる前の予防処理として皮膚弾性特性の低下を改善または防止する良い基材の候補になると考えられる。この期待のもと、NHDF による HA の分泌を促進する天然化合物のスクリーニングを通じて、***ミコスポリン様アミノ酸***（MAAs）は、細胞傷害効果を伴わずに正常なヒト線維芽細胞による HA の分泌を促進する明確な能力を有することが最近判明した。

図 1 に示すように、MAAs は、一般に、その基本構造においてシクロヘキサノンまたはシクロヘキセンシミンを有するアミノ酸と定義される。MAAs は、水生酵母(24)，シアノバクテリア(25)，海洋二量体(26)およびいくつかの南極珪藻(27)に、いずれも通常は日光が豊富な海洋環境に生息する。この種の天然物の中の化合物の数は、現在までに約３０存在する(28,29)。基本的なシクロヘキサノンまたはシクロヘキセンアミン

構造は UV 吸収を担うクロモフォアとして作用するため、MAAs は UV 吸収性化合物としてよく知られており、そのフィルター容量はパーソル®1789(ε molar 40000)およびメキソリル®SX(ε molar 45000)などの合成 UVA サンスクリーン剤と類似している(30)。MAAs は、最近、UV 暴露細胞(31)における酸化グルタチオン(GSSG)に対する還元(GSH)の比率を増加させることによって抗酸化剤として作用することも報告されている(31,32)。また、活性カスパーゼ-3 における UV 誘導性上昇を阻害することによって抗アポトーシス剤として作用する(32)。しかし、培養中のあらゆる種類の哺乳類細胞による HA 分泌に対する MAAs の促進効果を示す報告はなかった。

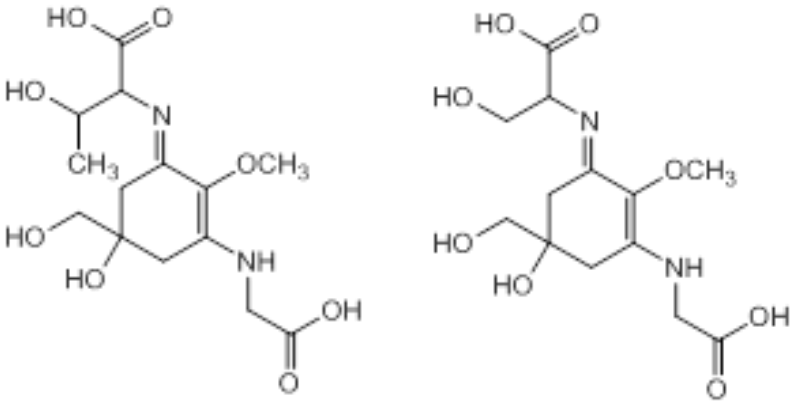
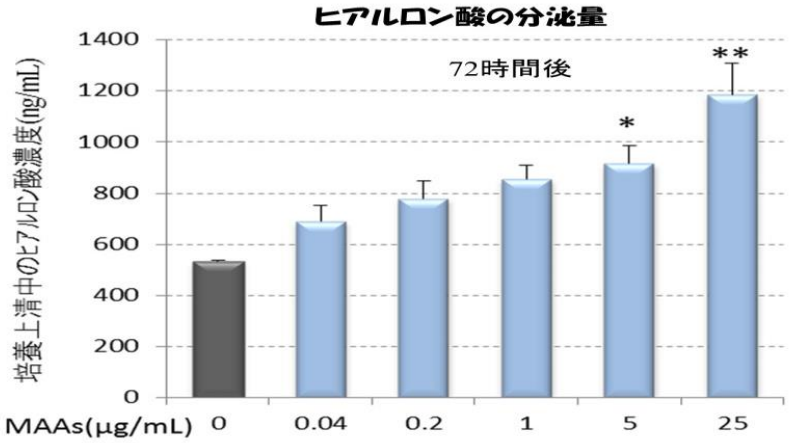


図 1. 我々の研究で使用された MAAs の化学構造。

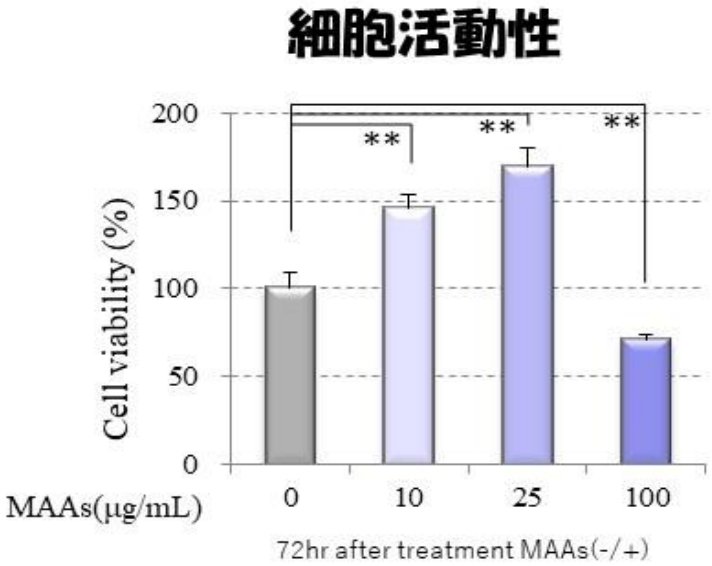
培養中の 1,10,25μg/mL の MAAs の存在下または非存在下で 72 時間培養した場合、未処理の HDF と比較して 10 または 25 μg/ml の MAAs 濃度で、培地中の HA の分泌レベルが有意に増加した(**図 1A)**。MAAs が HDF に対して細胞毒性があるかどうかを判断するために、10 および 25μg/mL の MAAs の存在下または非存在下で 72 時間の HDF を培養し、その生存率を細胞形態および MTT アッセイによって評価した。その結果、10 または 25 μg/mL MAAs で処理された HDF に形態学的変化はなく(データ非表示)、未処理のコントロールと比較して 10 および 25μg/mL MAAs で処理された HDF の細胞生存率が有意に増加した(**図 1B)**。HDF の他の機能的特性、すなわちコラーゲン 1 およびエラスチンの DNA 合成および産生に及ぼす MAA の影響を調べるために、10 または 25μg/mL MAAs の存在下または非存在下で 72 時間の HDF を培養した。その結果、MAAs はエラスチンおよびコラーゲン 1 合成酵素の mRNA レベルを有意に増加させるが（図 1 C、D）、DNA 合成レベルは 10～70μg/mL で刺激しないことが示され(**図 1E)**, 一方、細胞活動性（細胞生存率）は顕著に上昇していた(**図 1B)**。これらの知見から、MAAs が細胞生存率に対する細胞毒性効果を伴わずに細胞活動性を上昇させることにより HDF による HA の分泌を促進し、またエラスチンやコラーゲン 1 合成の促進効果が DNA 合成の促進で示されるような線維芽細胞の増殖を伴わないで生じていることを示している。一般に線維芽細胞の増殖を伴うコラーゲン合成の促進は、コラーゲン線維の顕著な増加を伴うことによる瘢痕形成に結び付きやすく注意が

必要であるが MAAs のコラーゲン合成促進効果は、線維芽細胞の増殖を伴っていないので、適度な合成促進効果と考えることが可能で、紫外線の累積暴露で生じるコラーゲンの減少を補填できるものと考えられる。エラスチン合成の促進効果も紫外線暴露で表皮から分泌されるインターロイキン 1 アルファなどが真皮まで到達し、線維芽細胞に作用して線維芽細胞由来膜結合型エラスターゼであるネプリライシンの発現増強により、エラスチン線維を細胞周辺で切断し、エラスチン線維の三次元直線性構造を歪め、皮膚弾力性を低下させ、シワを発生させるメカニズム[1-5]を、ある程度エラスチン線維の新生を通して防止できる可能性も示唆される。エラスチンやコラーゲン合成酵素の mRNA レベルに対する促進効果の、詳細なメカニズムは不明だが、HA 分泌に対する促進効果と関連している可能性がある。本総説では MAAs のヒアルロン酸分泌促進作用に絞って、その細胞生物学的メカニズムを解明した研究内容を紹介する。

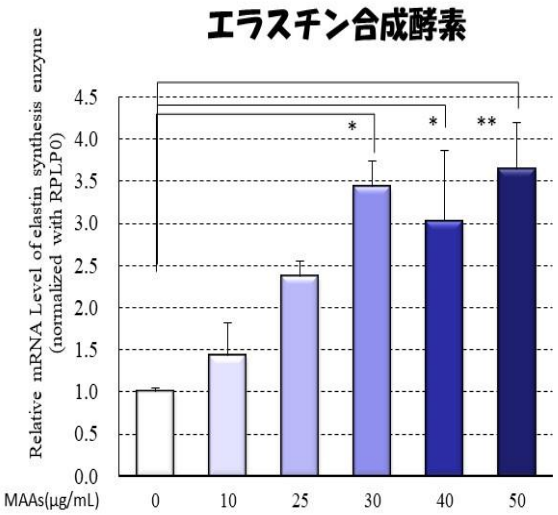
A


ヒアルロン酸の分泌量
72時間後
培養上清中のヒアルロン酸濃度(ng/mL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
*
**
MAAs(μg/mL)
0
0.04
0.2
1
5
25

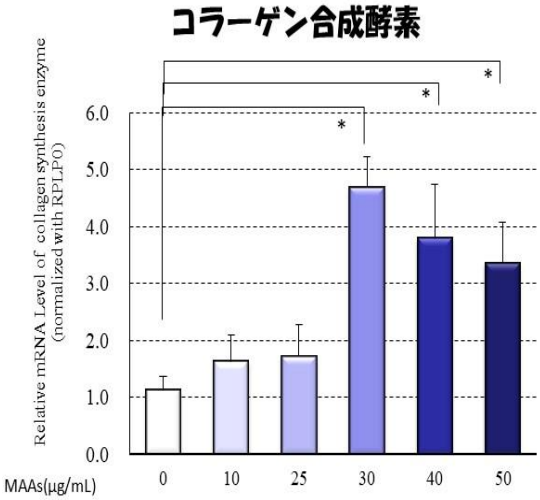
B


細胞活動性
Cell viability (%)
200
150
100
50
0
**
**
**
MAAs(μg/mL)
0
10
25
100
72hr after treatment MAAs(-/+)

C


エラスチン合成酵素
Relative mRNA Level of elastin synthesis enzyme
(normalized with RPLP0)
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
**
MAAs(μg/mL)
0
10
25
30
40
50

D


コラーゲン合成酵素
Relative mRNA Level of collagen synthesis enzyme
(normalized with RPLP0)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
*
*
*
MAAs(μg/mL)
0
10
25
30
40
50

E

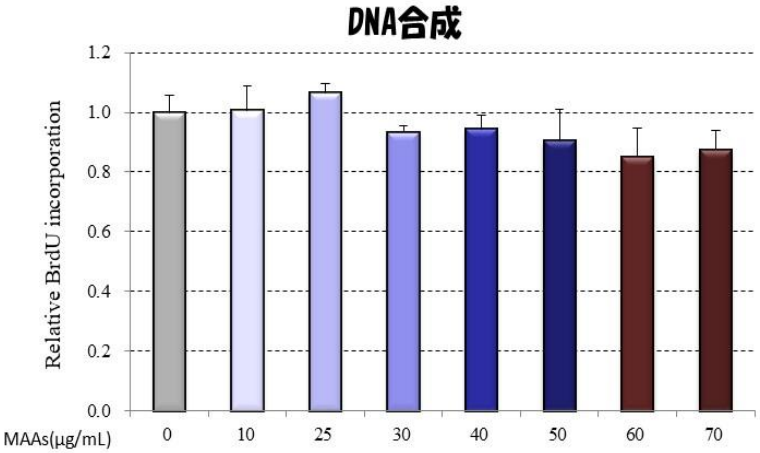


図２． MAAs の NHDF の種々細胞機能への影響。A: 培養中の NHDF による HA の分泌レベルに及ぼす MAAs の影響。0、1、10 または 25μg/mL の MAAs を、記載されているように 72 時間の HDF の培養に添加し、培養上清を ELISA アッセイによって HA レベルを測定した。データは、平均値±SD. n = 4、**: p<0.01 対コントロール（0 μg/mL)を表す。**B:** 培養における HDF の生存可能性に及ぼす MAAs の影響。HDF は示された濃度の MAAs の存在下で 72 時間培養し、その生存率は MTT アッセイを用いて評価した。**: p<0.01 対コントロール（0 μg/ml)。データは n=4 平均値±SD を示す。 **C/D/E:**エラスチン(C)およびコラーゲン 1(D)合成酵素(E)mRNA レベルおよび **DNA** 合成（E）に及ぼす効果。DNA 合成は、細胞増殖 ELISA キットを用いて示された濃度で MAAs とインキュベートした後 48 時間で測定した。コラーゲンおよびエラスチン合成酵素 mRNA レベルは、示された濃度で MAAs とインキュベートした後、3 時間で qRT-PCR 法で測定した。データは n=4 平均値±SD で示した。

4-2-2. NHDF における HAS2、 HAS3 および HYBID の mRNA レベルに及ぼす MAAs の影響(33)

前述したように、NHDF による HA の分泌レベルは、HAS1、HAS2 および HAS3 および HA 分解タンパク質 HYBID (34)のバランスにより調節されているので、HAS1、HAS2 および HAS3 の mRNA 発現レベルおよびタンパク質発現レベルの両方に対する MAAs の影響を調べた。NHDF を 3～12 時間 ***MAAs*** 25μg/mL 添加で培養した場合、HAS2 および HYBID の mRNA 発現レベルは、それぞれ 25～50μg/mL の濃度で用量依存的に有意に増加（３，１２時間）または減少（６，１２時間）したが、HAS3 mRNA レベルには変化はなかった(**図** 2)。抗 HYBID 抗体を用いたウェスタンブロッティング解析では、1,10,25μg/mL の MAAs が処理 6 時間または 24 時間の後で HYBID のタンパク質レベルに影響を与えないことが明らかとなった（**図** 3)。

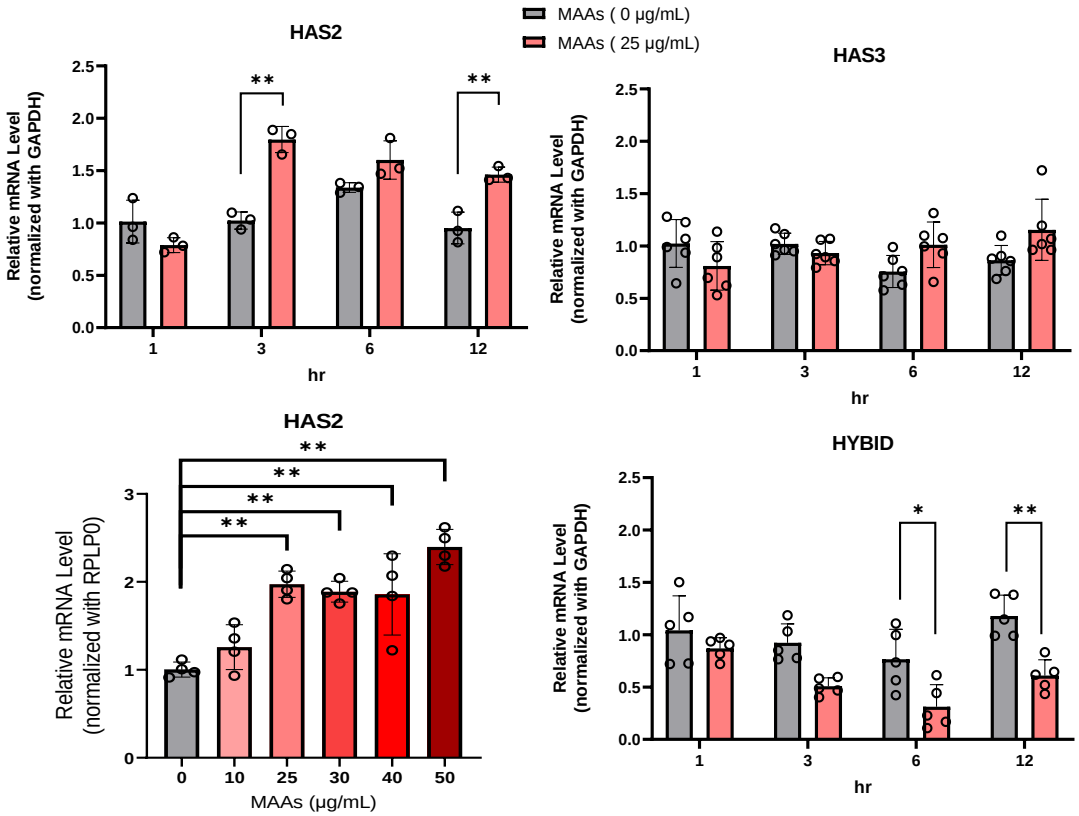


図 2. NHDF における HAS2、HAS3 および HYBID の mRNA レベルに及ぼす MAAs の影響

。 NHDF は、25μg/mL または 0～50μg/mL で示された時間または 3 時間で MAAs の存在または存在下で培養され、その後、HAS2、HAS3 および HYBID mRNA レベルの qRT-PCR 分析を受けたデータは SD を±を示す。n=3～6、*:< p<0.05、**p0.01

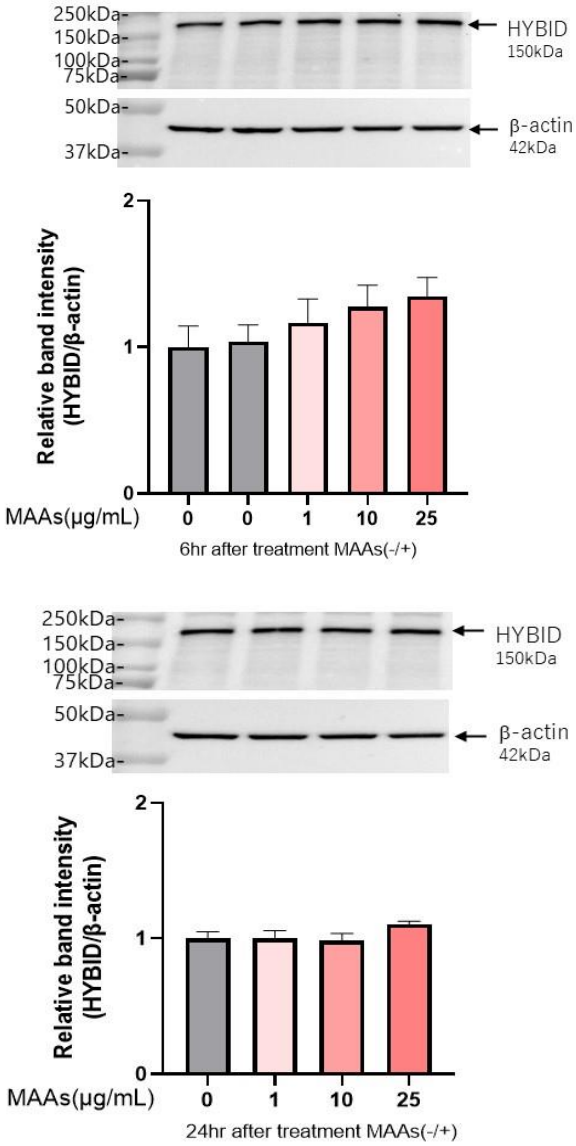


図 3.HDF における HYBID タンパク質のレベルに及ぼす MAAs の影響。示された時間に対して 0～25 μg/mL の MAAs の有無において培養され、HYBID タンパク質レベルをウェスタンブロット法で調べた。3 つの独立した実験からの代表的な免疫ブロットが示されている。データは　平均値±SD を表す。n=3

HAS2 は高分子量(1,000-10,000kDa) の HA を産生し(35)、HYBID は HA を高分子量から>35kDa(9)まで、HA を分解する(34)。我々の研究で使用した ELISA アッセイ法では>35kDa の HA のみが、検出可能であり(36)、また、HYBID タンパク質のレベルは MAAs による処理後に変化しないため、HA の分泌量の増加は主

に HAS2 の発現増加に起因して HA の合成が増加している可能性がある。siRNA トランスフェクションを用いた確認試験では、HAS2 siRNA が MAAs 処理および非処理線維芽細胞の両方で HA の分泌を有意に阻害することを明らかにし(**図 4**)、**MAAs** による HA 分泌促進における HAS2 の主要な関与を示している。次に、MAAs によって HAS2 のアップレギュレーション mRNA 発現レベルを誘導するのにどのような細胞内シグナル伝達カスケードが活性化されているかを解析した。

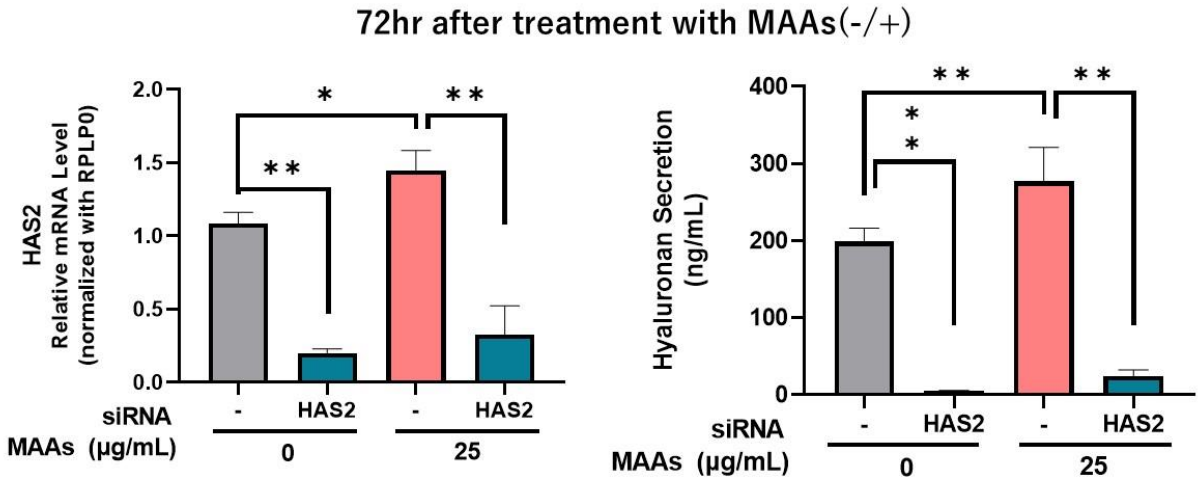


図 4.HDF における HA の MAAs による HA 分泌増加に対する HAS2 siRNA トランスフェクションの効果
A: HAS2 mRNA レベルに及ぼす影響, **B:** HA 分泌レベルに及ぼす影響. HAS2 siRNA のトランスフェクション後、HDF を 25μg/mL で MAAs の存在下または非存在下で培養し、次いで HAS2 の mRNA レベルを qRT-PCR 解析で調べた。この培養上清を、ELISA アッセイにより HA レベルに対する 72 時間の後処理で測定した。データは 平均値±SD で表した。n=4*: $p<0.05$、**: $p<0.01$ 対コントロール (0 μg/mL)。

4-2-3. NHDF における細胞内シグナル伝達に及ぼす MAAs の影響(33)

HA の分泌および合成は、使用される細胞種および化学物質に応じて異なるシグナル伝達経路を介していくつかの化学物質または刺激によって HAS2 の mRNA 発

現レベルの増加を引き起こすことが知られている。20-O-o-β-D-グルコピラノシル-20(S)-プロトパナキサジオールは、Src シグナル伝達の活性化に続いて ERK および Akt シグナル経路の活性化を介してヒトケラチノサイトにおける HAS2 の発現を促進する(37)。ヒト皮膚線維芽細胞における TGF-β1 による HAS2 発現の増強は、MAPK および/または Smad シグナル伝達および PI3K-Akt シグナル伝達経路の活性化によって引き起こされる(38)。また全トランスレチノイン酸は、非古典的なレチノイン酸受容体非依存的なシグナル経路で CREB1 の活性化を介して、正常なヒト気管支上皮細胞における HA 合成を増強する(39)。UTP は、HAS1 または HAS3 ではなく、特に HAS2 mRNA 発現を増強し、この効果は UTP 受容体 P2Y2 を介した p38、ERK、CREB および STAT3 の増加したリン酸化および pCaMKII の誘発核転位を介して媒介され、これらの阻害剤は HAS2 発現増強を部分的に抑制できる(40)。ヒト表皮角化細胞における HAS2 mRNA レベルの UDP グルコースによる発現増加は、JAK2/ERK/STAT3 シグナル伝達経路(42)の活性化を介して媒介される(41)。中性スフィンゴミエリナーゼ阻害剤処理またはマウス線維芽細胞株における中性スフィンゴミエリナーゼの欠乏は、Akt/mTOR 経路を介して HAS2 mRNA 発現量を増加させる(42)。興味深いことに、ラット角化細胞の低用量 UVB 曝露は、p38 シグナル伝達の活性化を介して起こる HAS2 mRNA の発現レベルの増加を伴って HA 分泌を促進する(43)。これに対し、メチル-β-シクロデキストリンは Akt シグナル伝達の抑制効果を通じて HAS2 発現量を低下させることにより HA 合成を減衰させる(44)。一方、主に HAS2 遺伝子を標的とする様々な転写因子には、RAR, (45) STAT3, SP1(46,47), NF-kB(48)、CREB(49)が含まれている。

p38 シグナル伝達系に対する影響については、ウェスタンブロット分析では、25μg/mL の MAAs が NHDF の p38 のリン酸化を添加 15 分および 30 分後で有意

に促進し（図 5A)、ストレス活性化シグナル経路の最前線でMAAs活性化シグナル伝達が UVB 活性化シグナル伝達(43)と同様の様式で起こることを示した。UVB 暴露ヒト，ラット角化細胞(45,50,51)またはヒトメラノサイト(52)で、ストレス活性化シグナル伝達因子の最前線の活性化は p38、 JNK および ERK で起こり、以後は、p38 および ERK の下流の MSK1 (52,53)、p38 の下流の MAPK-APK2 (54) と CK2/i-kB/NFkB (55) さらには ATF2 (56) そして ERK の下流の c-Jun と c-Fos に引き継がれる(57,58)。

これらの下流シグナル系統では、MSK1 の下流の CREB(59)と NFkB(Ser276)(60,61)、CREB の下流の c-Fos(62)が、連続的かつ順次活性化を受ける。UVB 曝露ヒト角化細胞またはヒトメラノサイトにおいて高発現しているいくつかの機能性タンパク質、 COX2、IL-8(50)、トランスグルタミナーゼ（ヒトケラチノサイトで発現)(51)、エンドセリン B 受容体(63,64)および幹細胞因子受容体 c-KIT(ヒトメラノサイトで発現)(64,65)が特異的シグナル伝達系統を利用して、それぞれの mRNA 発現を増加することが知られている。

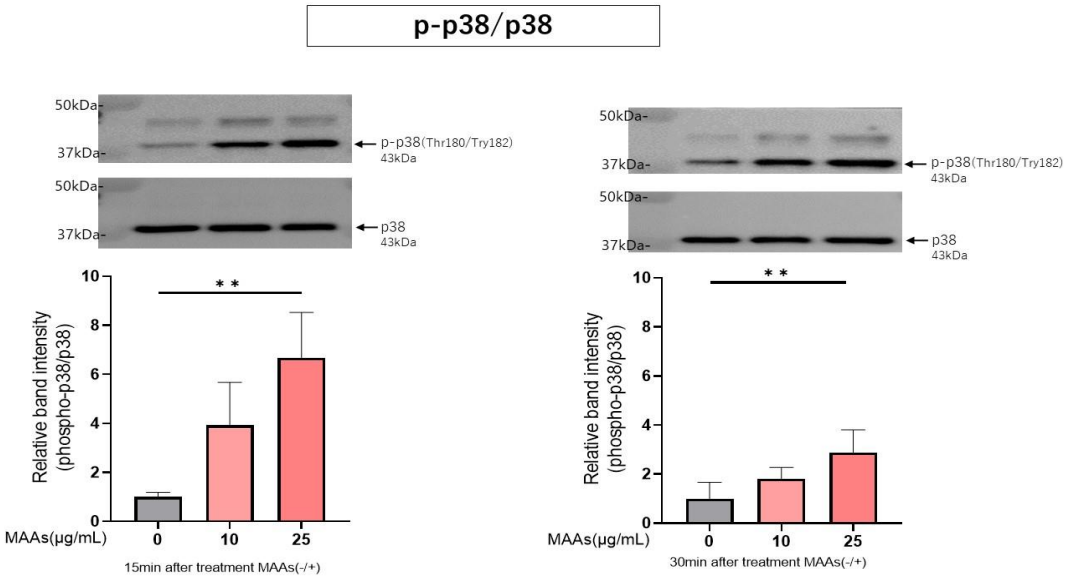
そこで、既知の UVB 活性化細胞内シグナル伝達経路(51,63)を参照にして、ストレス活性化シグナル伝達の最前線におけるシグナル分子のリン酸化に対する MAAs の添加効果を解析した。ERK および JNK のリン酸化のウェスタンブロット分析は、10 および/または 25 μg/mL の MAAs が、NHDF で処理後 15 分または 30 分で ERK のリン酸化を有意に増加させた(図 5B/C)。次に、p38 および ERK の下流シグナル因子の MSK1(Thr 581/Ser360)リン酸化に対する MAAs の促進効果、および p38 の下流の ATF2 へのリン酸化への効果を調べた。リン酸化のウェスタンブロット分析では、10 および/または 25 μg/mL の MAAs が ATF2 および MSK1(Thr581/Ser360/Ser376)（Ser376 は、Thr581/Ser360 での MSK1 リン酸化後の自己リン酸化部位である)のリン酸化に MAAs 処理後 15 分または 30 分に有意

な増強効果を示した（図 5D/E/F/G)。下流シグナリング因子、ERK 下流の c-Jun、MSK1 下流の NFkB(Ser276)、ERK/IKK 下流の NFkB(Ser536)、CK2 または IKK 下流の IκB(Ser32/36)のリン酸化に対する MAAs の添加効果について、ウェスタンブロット分析では、10 および 25μg/mL の MAAs は NHDF での処理後 15 または 30 分で c-Jun または NFkB(Ser276/Ser536)のリン酸化を促進する能力を持たないことが明らかになった(図 5H/I/J)。同様に、IκB(Ser32/36)のリン酸化は、10 μg/mL の MAAs(図 5K)では、増強効果は認められなかった。対象として使用した IL-1α刺激ではリン酸化が増強すると同時に、リン酸化 IκB の急激な分解により、IκB タンパク質が検出不能となった

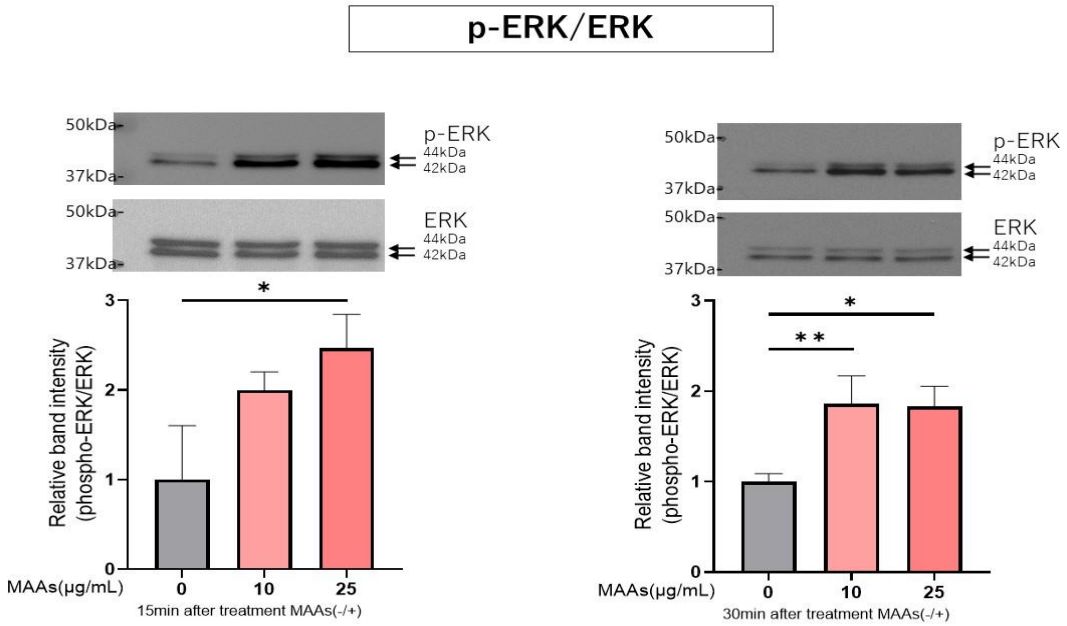
最後に、MSK1 の下流シグナル伝達因子である CREB のリン酸化、および CREB の下流シグナル分子である cFos のタンパク質レベルに対する MAAs の増加促進効果を調べた。リン酸化およびタンパク質レベルのウェスタンブロット分析では、10 および/または 25μg/mL の MAAs が CREB リン-酸化を有意に増加させる能力を有し(図 5L)、12 時間の処理後に cFos タンパク質レベルを有意な増加を誘導した(図 5M)。

このように、さまざまなシグナル伝達分子のリン酸化および蛋白レベルに対する変化を調べ、細胞内活性化シグナル経路の解析により、10 μg/mL の MAAs が、ERK や p38 を含むストレス活性化シグナルカスケードの最前線で活性化を引き起こすことを実証し、その下流シグナル経路である MSK1(Thr581/Ser360/Ser376)の活性化につながっていることが判明した。MAAs 活性化シグナル経路での MSK1 の活性化は、主に CREB の活性化を引き起こすが、一方 MSK1 の下流に位置する NF-kB（Ser276）の活性化は引き起こさない。これらの知見は、MSK1 の下流シグナル系統が UVB 活性化因子とは異なる収束点として生じていると考えることができる。すなわち、活性化 MSK1 は UVB

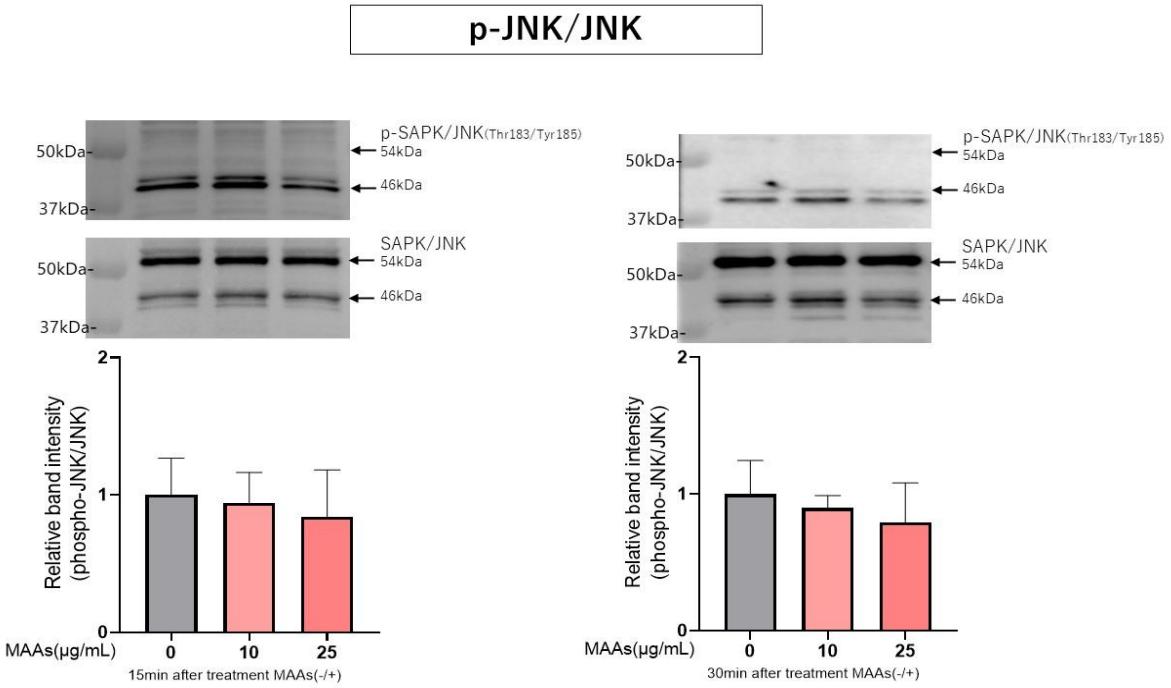
活性化シグナル伝達系(51)では Ser276 での NFkB の活性化を引き起こすが、MAAs 活性シグナル伝達系において起こらない。IKK/Akt の下流で同時に発生する Ser32/36 における I-kBα と Ser 536 NF-kB とリン酸化(51,66)は、細胞質から I-kBα と NF-kB 複合体の分離に本質的に関与し、それぞれその後の分解および転位(66)につながる。Ser536 での NF-kB と Ser32/36 の I-kB のリン酸化は MAAs 処理 NHDF では増加しておらず、MSK1 は核内でのみ機能する核キナーゼとして存在するため(60)、 MAAs 活性化シグナル伝達経路における NF-kB(Ser276)に対する MSK1 の下流系統の活性化系である主に I-kBα リン酸化と、その後の NFkB の細胞質から核への転位を誘導できないものと考えられる。一方、cFos プロモーターの誘導は、UVB 暴露哺乳動物細胞中の CRE および cFos 活性化因子タンパク質に結合する CREB を介して媒介される(62)ので、MAAs 処理された NHDF における cFso の増加したタンパク質レベルは、MSK1 の活性化から直接その下流で起こる CREB 活性化に直接起因すると考えるのが妥当と思われる。以上のことから、NHDF での MAAs 処理が、P38/MSK1/CREB/c-Fos および p38/ATF2 のシグナル伝達系統を明瞭に活性化することを示唆しているが、どのシグナル伝達カスケードが HAS2 の mRNA 発現上昇に寄与するかはまだ明らかになっていない。一方、MAAs は ERK/C-Jun、IKK/I-kB/NF-kB、または MSK1/NF-kB シグナリング・経路の活性化は引き起こさない。


p-p38/p38
50kDa
37kDa
p-p38(Thr180/Try182)
43kDa
p38
43kDa
Relative band intensity
(phospho-p38/p38)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

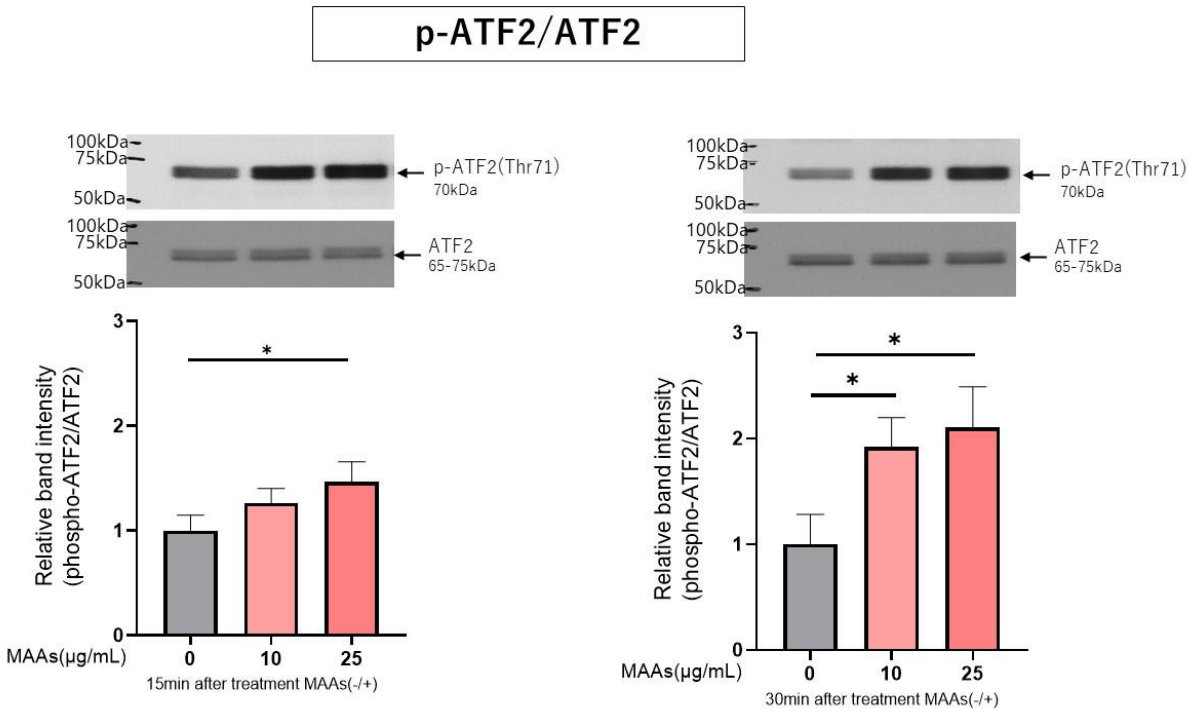
B


p-ERK/ERK
50kDa
37kDa
p-ERK
44kDa
42kDa
ERK
44kDa
42kDa
Relative band intensity
(phospho-ERK/ERK)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

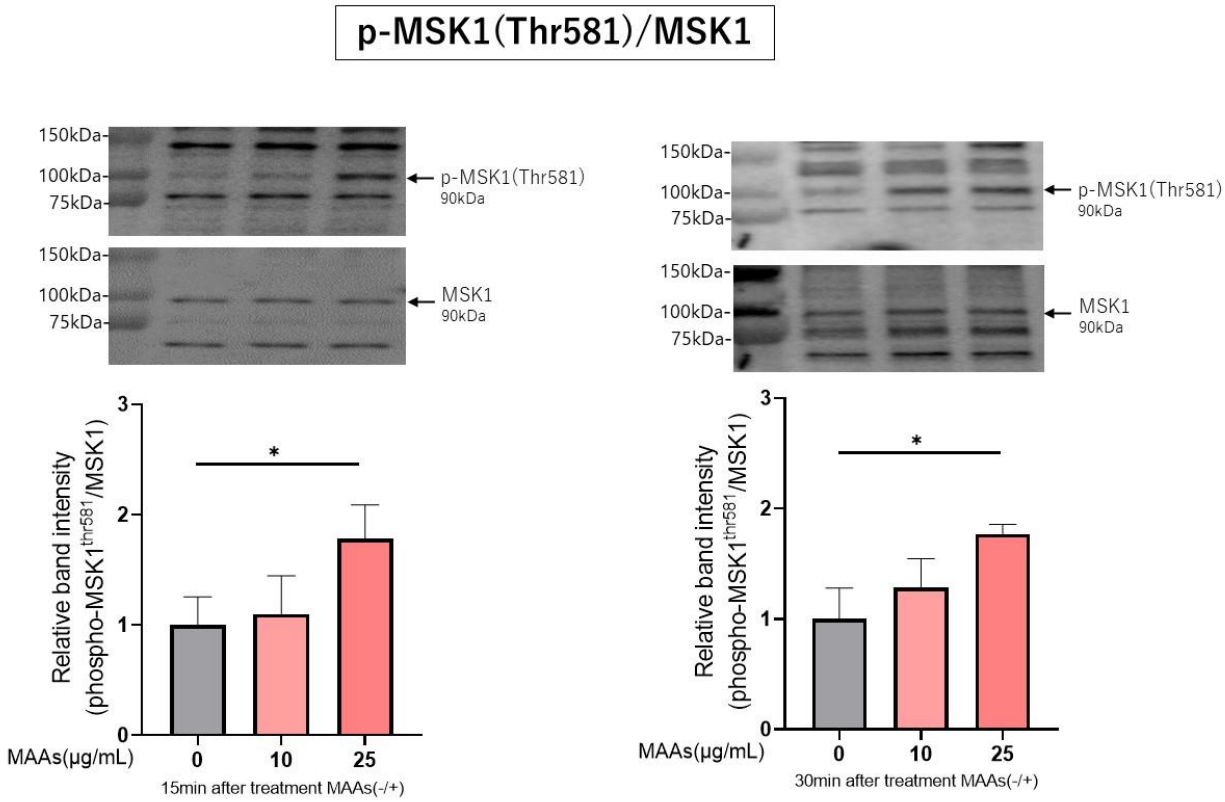
C


p-JNK/JNK
p-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)
54kDa
46kDa
50kDa
37kDa
SAPK/JNK
54kDa
46kDa
50kDa
37kDa
Relative band intensity
(phospho-JNK/JNK)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

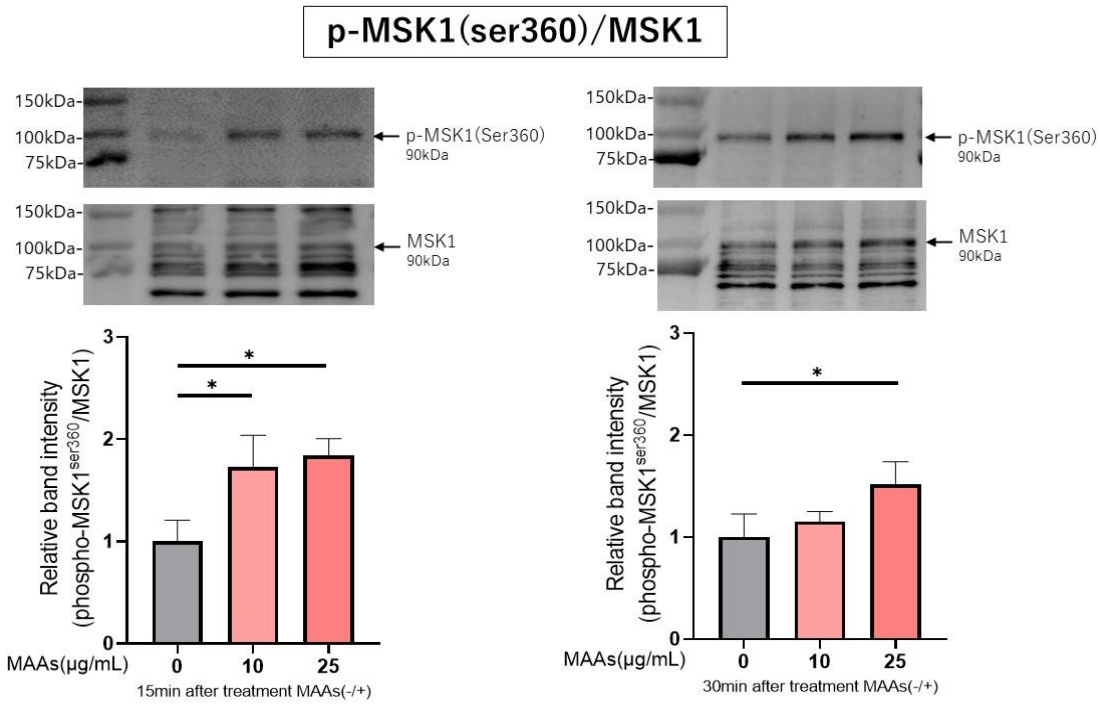
D


p-ATF2/ATF2
100kDa
75kDa
50kDa
p-ATF2(Thr71)
70kDa
ATF2
65-75kDa
Relative band intensity
(phospho-ATF2/ATF2)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

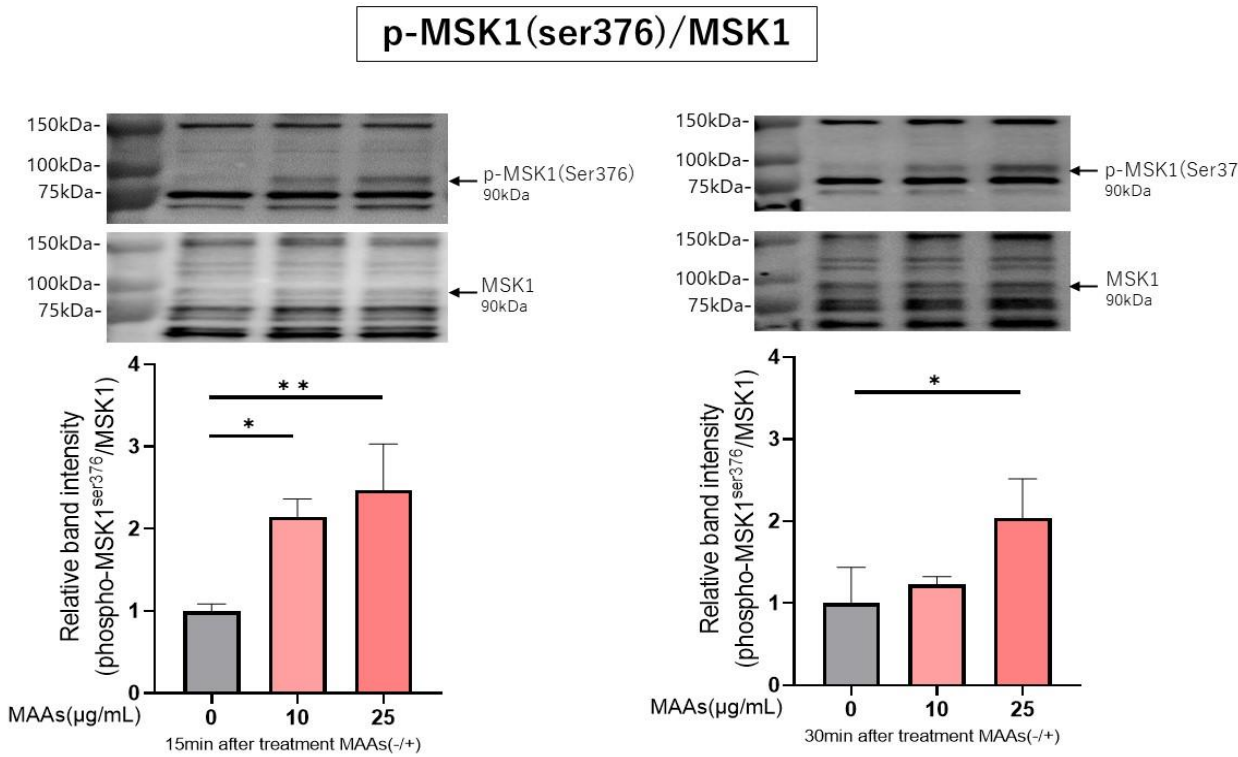
E


p-MSK1(Thr581)/MSK1
150kDa
100kDa
75kDa
p-MSK1(Thr581)
90kDa
MSK1
90kDa
Relative band intensity
(phospho-MSK1thr581/MSK1)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

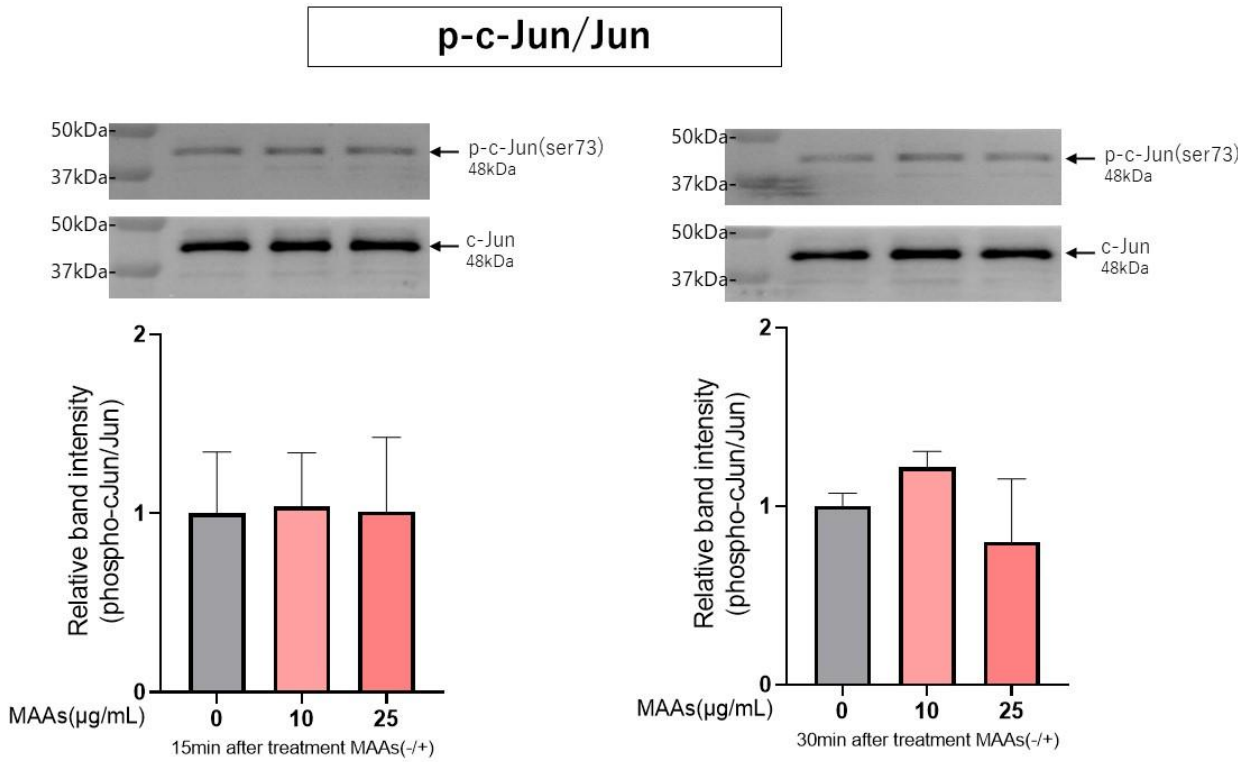
F


p-MSK1(ser360)/MSK1
150kDa
100kDa
75kDa
p-MSK1(Ser360)
90kDa
MSK1
90kDa
Relative band intensity
(phospho-MSK1ser360/MSK1)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

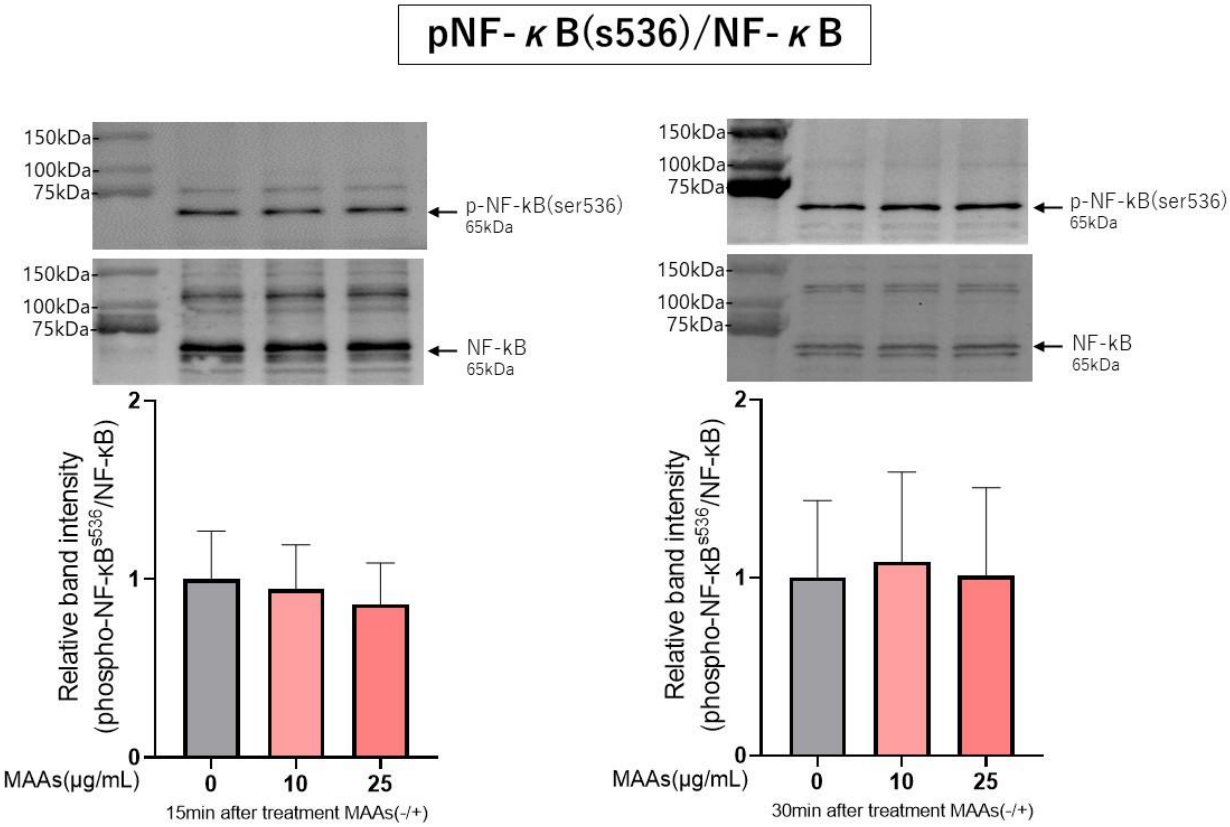
G


p-MSK1(ser376)/MSK1
150kDa-
100kDa-
75kDa-
p-MSK1(Ser376)
90kDa
MSK1
90kDa
Relative band intensity
(phospho-MSK1ser376/MSK1)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

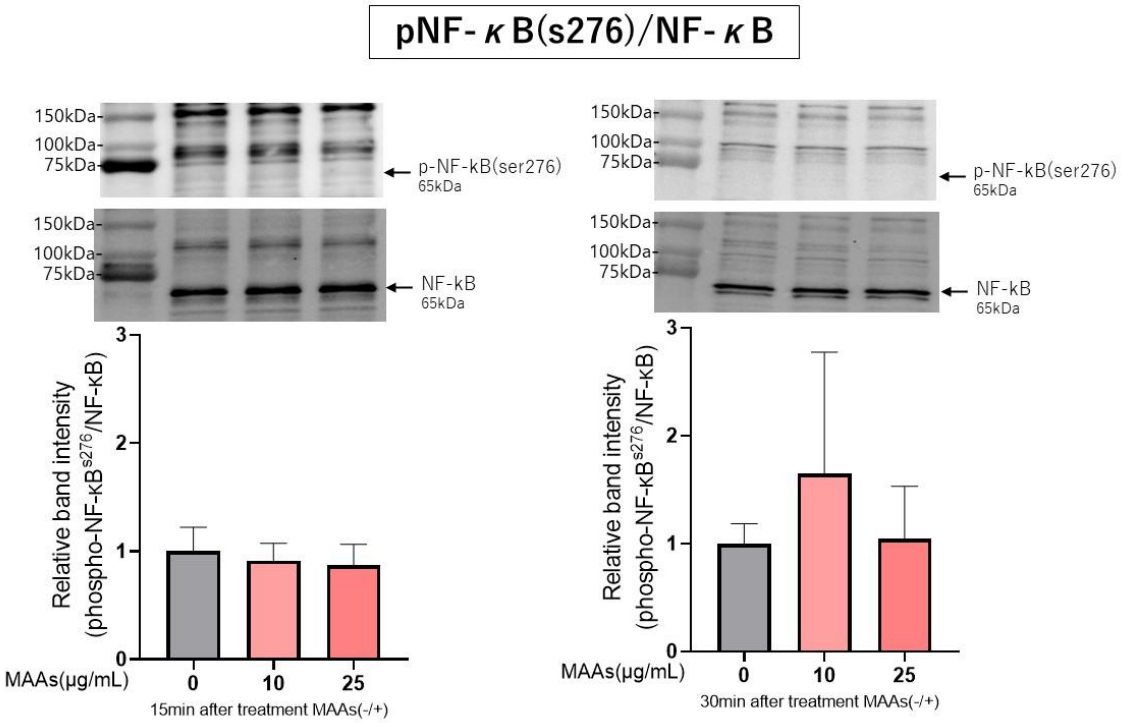
H


p-c-Jun/Jun
50kDa-
37kDa-
p-c-Jun(ser73)
48kDa
c-Jun
48kDa
Relative band intensity
(phospho-cJun/Jun)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

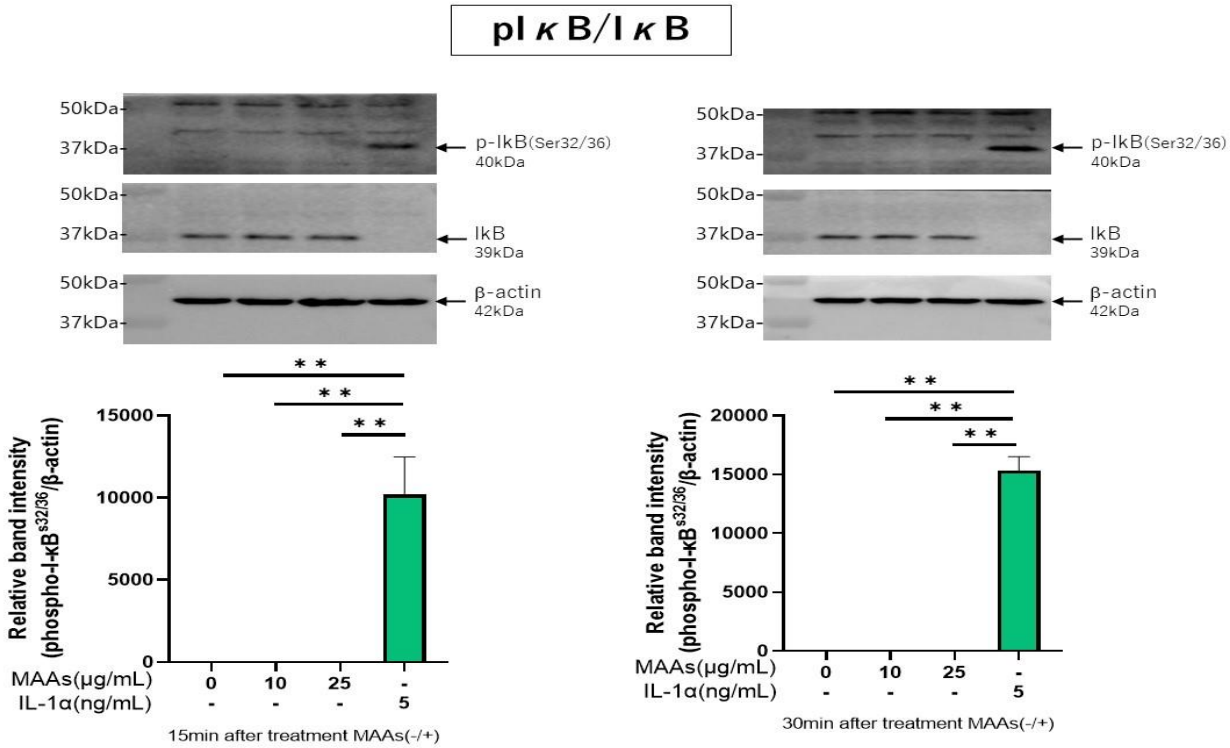
私


pNF-κB(s536)/NF-κB
150kDa
100kDa
75kDa
p-NF-kB(ser536)
65kDa
NF-kB
65kDa
Relative band intensity
(phospho-NF-κB^{s536}/NF-κB)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

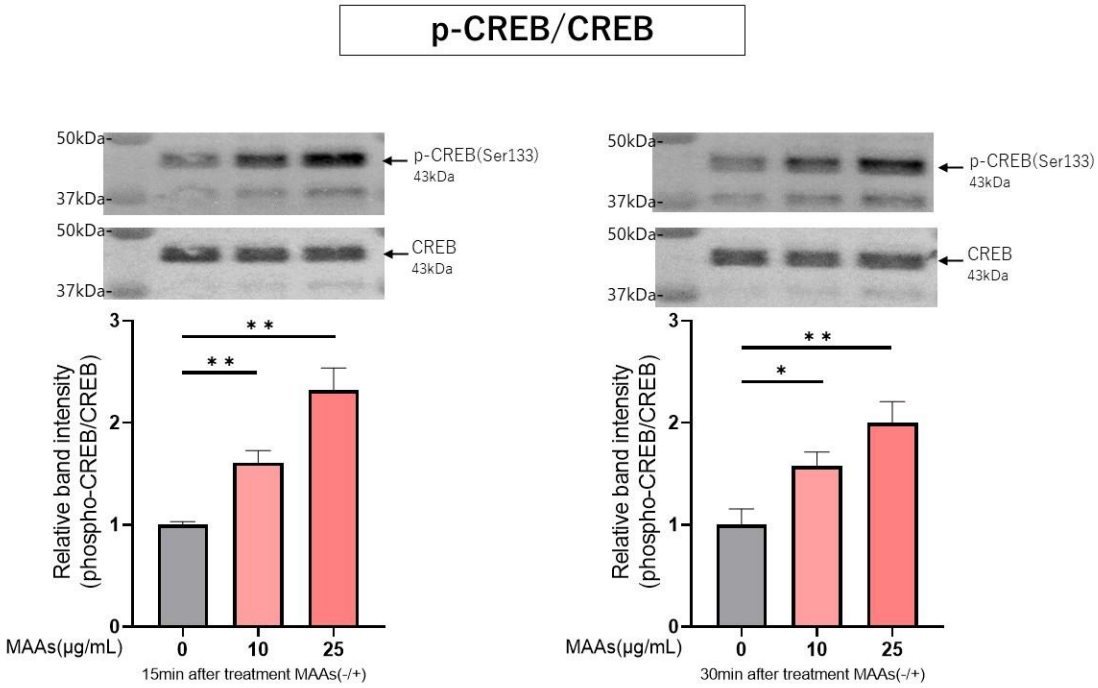
J


pNF-κB(s276)/NF-κB
150kDa
100kDa
75kDa
p-NF-kB(ser276)
65kDa
NF-kB
65kDa
Relative band intensity
(phospho-NF-κB s276/NF-κB)
MAAs(μg/mL)
0
10
25
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

K


pIκB/IκB
50kDa
37kDa
p-IkB(Ser32/36)
40kDa
IkB
39kDa
β-actin
42kDa
Relative band intensity
(phospho-I-κB s32/36/β-actin)
MAAs(μg/mL)
IL-1α(ng/mL)
15min after treatment MAAs(-/+)
30min after treatment MAAs(-/+)

L



M

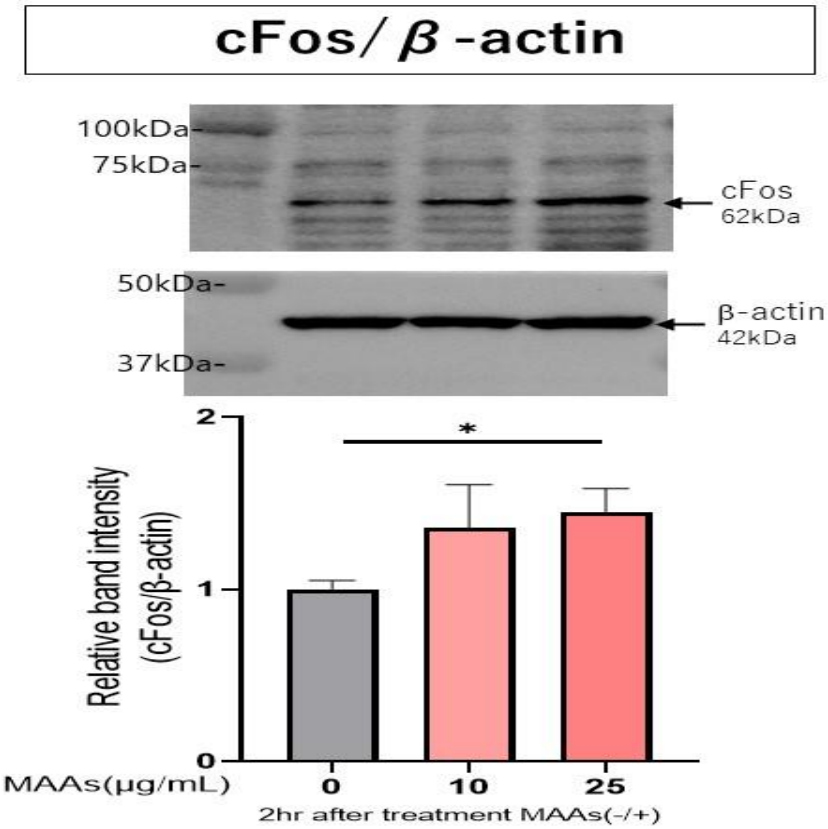


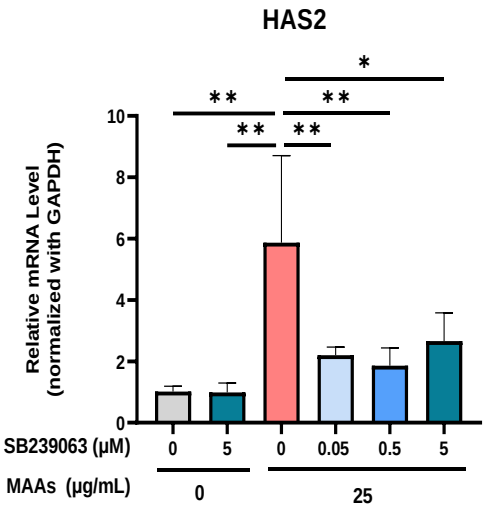
図 5.細胞内シグナル伝達カスケードに及ぼす MAAs の影響 p38 (A), ERK(B), JNK(C), ATF2(D), MSK1 (Thr581/Ser360/Ser376) (E/F/G), ジュン(H), NFkB(Ser536/Ser276)(J/I),

IkB(K), CREB (L) および cFos (M) NHF. NHDF は、MAsA または IL-1α を示された濃度でインキュベートし、15、30 分または 2 時間の後処理で収穫され、その後、β アクチンおよびリン酸化または非リン酸化シグナル伝達因子に対する抗体で免疫ブロットされた。3 つの独立した実験からの代表的な免疫ブロットが示されている n=3、*:p<0.05、**:p<0.01 対コントロール (0 μg/mL)

4-2-4. MAAs による HAS2 の mRNA 発現および HA 分泌増加に及ぼすシグナル伝達阻害剤の影響(33)

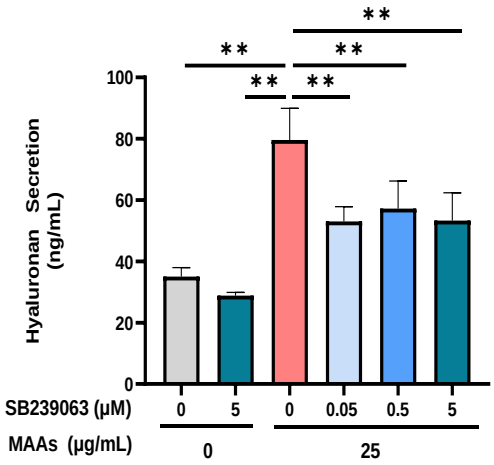
HAS2 の mRNA 発現増強作用を担う活性化シグナル伝達系統を特定するための解析で、p38 阻害剤(SB239063)が HAS2 mRNA の MAAs 処理による増強レベルを有意に阻害し、同時に HA の分泌増加に対する有意な抑制効果を示した（**図 6A/B)。**これに対し、JNK(阻害剤 II)および NFkB(JSH23)の阻害剤は同様な抑制効果を示さず、HAS2 mRNA 発現増強に結び付く細胞内シグナル伝達経路で活性化が生じていない事実と一致する。一方、MEK 阻害剤(U0126)は、MAAs による HAS2 mRNA レベルの増加(**図 6D**)を抑制せず、また c-Jun のリン酸化も増加していないことから、MAAs 活性化シグナル伝達系統における ERK/c-Jun 経路の関与がないことを強く示唆した。したがって、MAAs による HAS2 mRNA の発現増強に寄与する活性化シグナリング系統の詳細な解析により、p38/MSK1/CREB/cFos/AP-1 経路または p38/ATF2 経路のいずれかの経路が関与している可能性が考えられた。

A



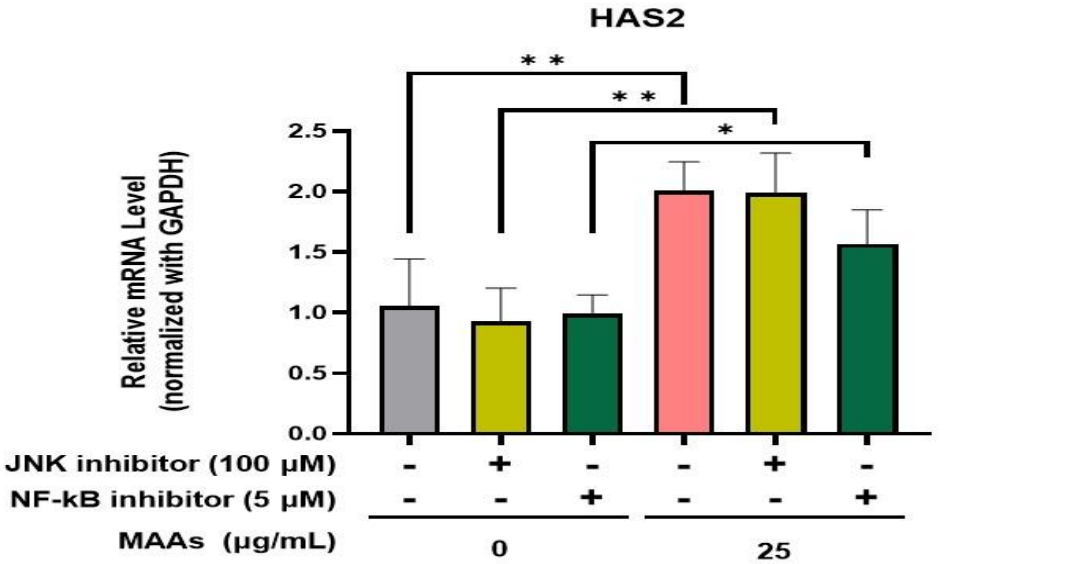
6 hr after treatment with MAAs(-/+) and p38 inhibitor(-/+)

B



72 hr after treatment with MAAs(-/+) and p38 inhibitor(-/+)

C



6 hr after treatment with MAAs(-/+) and JNK/NF-kB inhibitor(-/+)

D

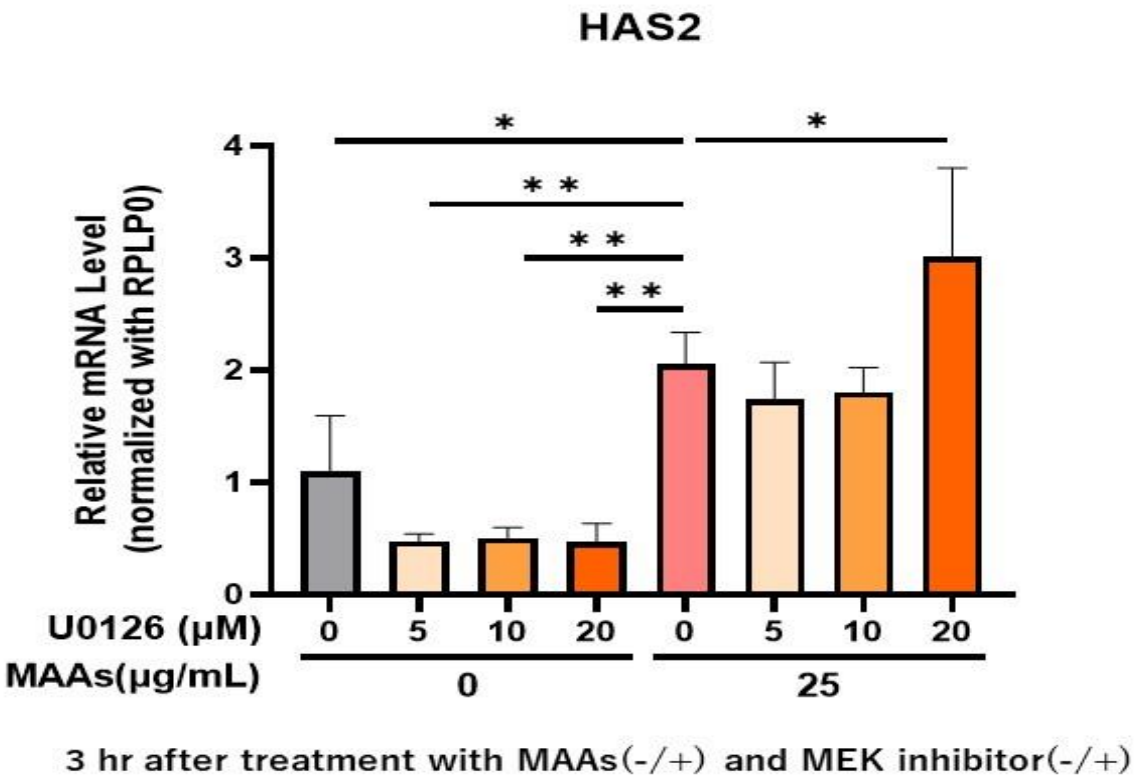


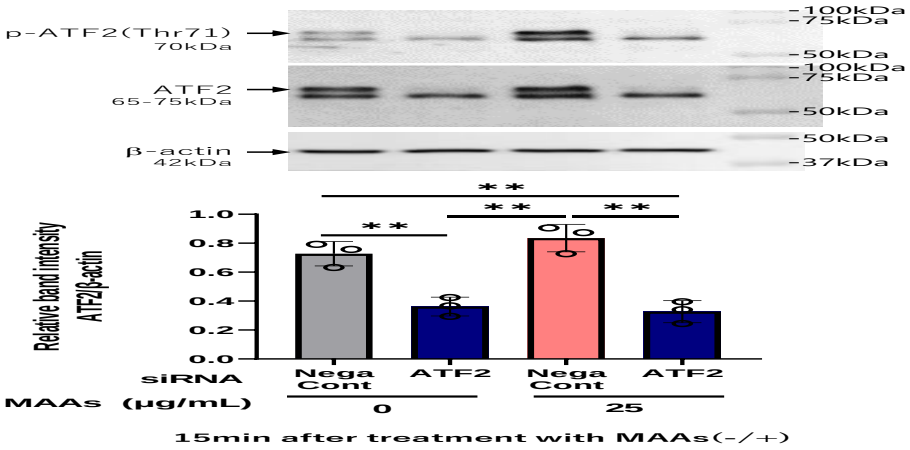
図 6.HDF における HA の HA の MAAs 増加遺伝子発現および MAA 刺激分泌に対する p38、JNK、NFkB および MEK 阻害剤の影響。 A:p38 阻害剤/qRT-PCR、6 h、n=4, *: p<0.05, **: p<0.01 vs MAA（0 または 25μg/mL） **B:** p38 阻害剤/ELISA, 72 h, n=4, **C:NFkB** および JNK 阻害剤/ qRT-PCR, n=4、*: p<0.05、 **: p<0.01 **D:** MEK 阻害剤/qRT-PCR, 3 h, *: p<0.05、 **: p<0.01

4-2-5. ATF2 siRNA または c-Fos siRNA を用いた HAS2 の mRNA レベルの増加への*サイレンス効果(33)*

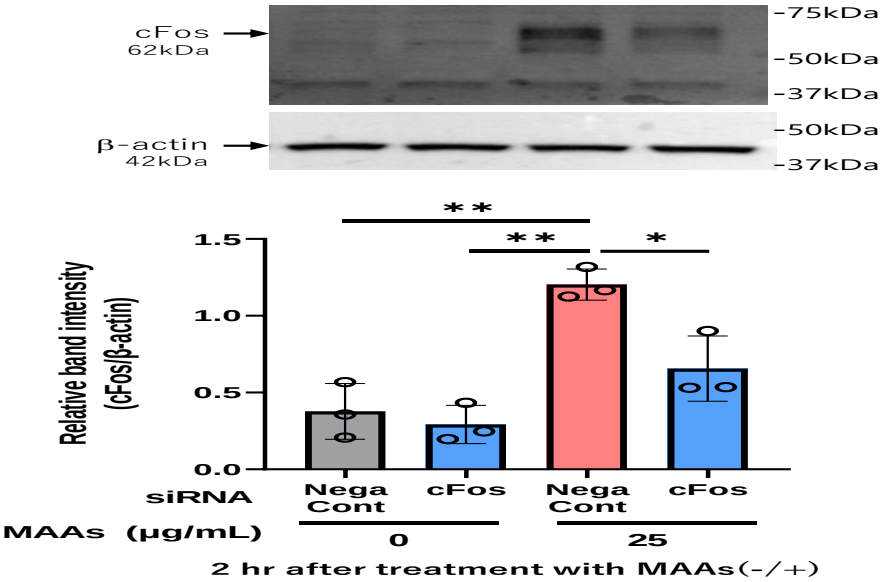
AP-1 または ATF2 は、HAS2 遺伝子発現を調節する転写因子として関与している報告はないが、それぞれの siRNA を使用して、HAS2 の mRNA レベルを増加させる転写過程に寄与する細胞内シグナル伝達経路の終点を解析した。AP-1 または ATF2 どちらの

転写因子が HAS2 の MAAs 刺激 mRNA 発現増強と関連しているのかを調べた結果、ATF2 siRNA のトランスフェクションは ATF2 タンパク質のレベルを有意に減少させ、サイレン効果を発揮しているにもかかわらず、MAAs による HAS2 mRNA の発現レベルの増加を抑制することができなかった。一方、cFos siRNA のトランスフェクションは MAA s により増加する cFos 蛋白レベルを低下させ、また MAAs による HAS2 mRNA の発現量の増加を有意に抑制した(**図 7**)。

A


p-ATF2(Thr71)
70kDa
ATF2
65-75kDa
β-actin
42kDa
-100kDa
-75kDa
-50kDa
-100kDa
-75kDa
-50kDa
-50kDa
-37kDa
Relative band intensity
ATF2/β-actin
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
siRNA
Nega Cont
ATF2
Nega Cont
ATF2
MAAs (μg/mL)
0
25
15min after treatment with MAAs(-/+)

B


cFos
62kDa
β-actin
42kDa
-75kDa
-50kDa
-37kDa
-50kDa
-37kDa
Relative band intensity
(cFos/β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
siRNA
Nega Cont
cFos
Nega Cont
cFos
MAAs (μg/mL)
0
25
2 hr after treatment with MAAs(-/+)

C

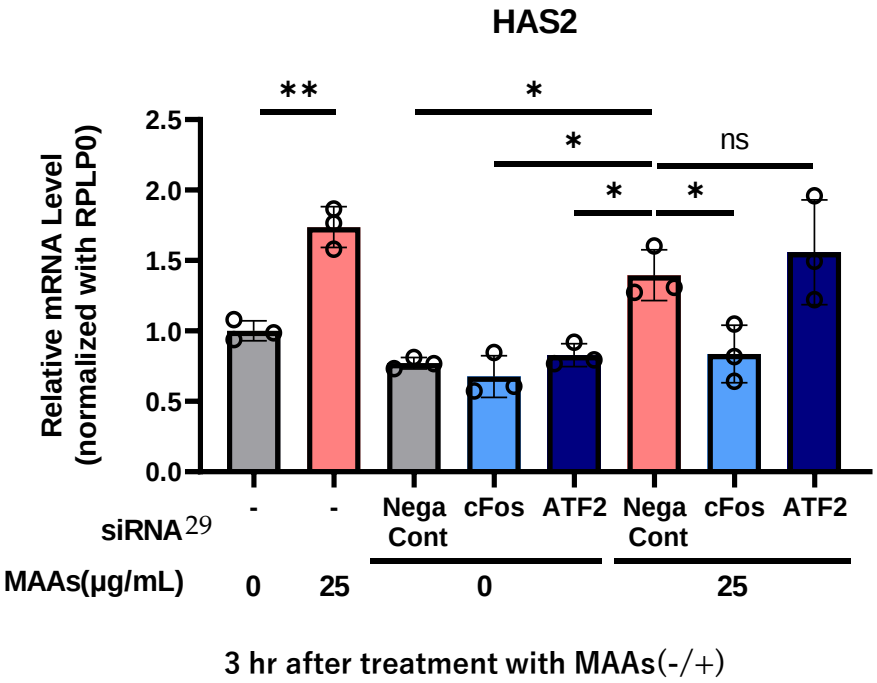

HAS2
Relative mRNA Level
(normalized with RPLP0)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
siRNA
-
-
Nega Cont
cFos
ATF2
Nega Cont
cFos
ATF2
MAAs(μg/mL)
0
25
0
25
3 hr after treatment with MAAs(-/+)

図 7. ***ATF2 siRNA または c-Fos siRNA を用いた*** HAS2 の mRNA レベルの増加への***サイレンス効果.***

A: ATF2 siRNA の ATF2 タンパク質の発現およびそのリン酸化に対するトランスフェクト効果。**B**:c-Fos タンパク質の MAAs 刺激発現に対する c-Fos siRNA のトランスフェクション効果。**C**: NHDF における HAS2 の MAAs 増加 mRNA 発現に対する ATF2 siRNA または c-Fos siRNA のトランスフェクション効果。n=3、*: $p<0.05$、**: $p<0.01$

結論として、**図 8** に概略的に示したごとく、MAA は p38/MSK1/CREB/cFos/AP-1 系からなる細胞内シグナル伝達系統を活性化することによって HAS2 の mRNA 発現レベルを増強して、HA の産生および分泌の増加を引き起こしているメカニズムを強く示唆しており、これらの知見は、MAAs が光老化または加齢により老化した皮膚における HA 欠乏症を改善する明らかに有望な薬剤である可能性を示している。

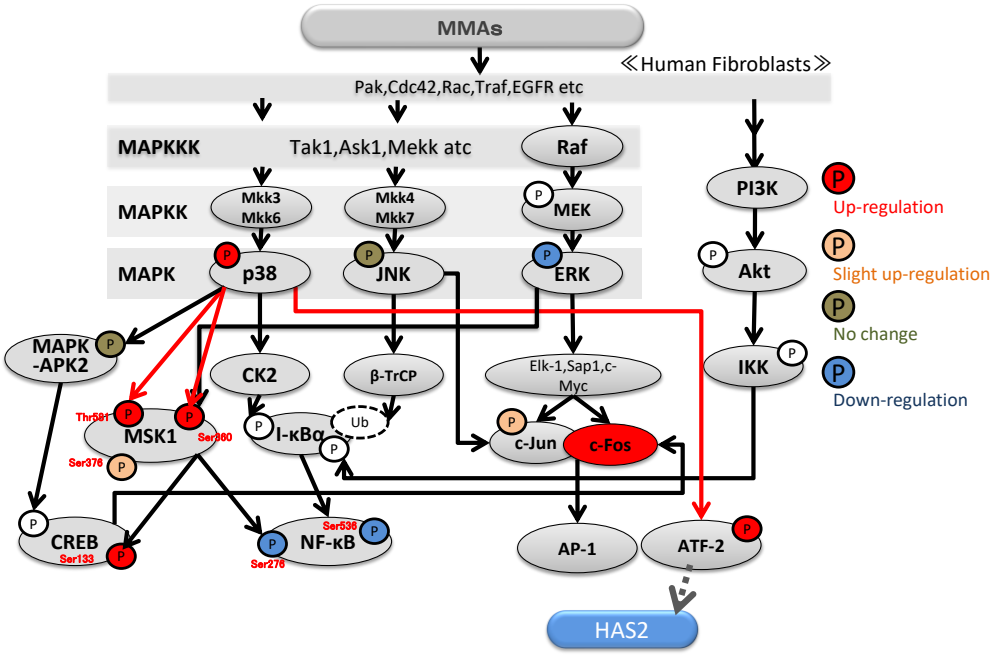


図 8. NHDF による HA の MAA 刺激分泌に関与するシグナリング機構。

4.3. UVA 照射で抑制された HA 分泌に対する MAA の改善効果

NHDF における MAAs の HA 分泌促進効果が UVA による HA 分泌阻害効果をキャンセルできるかどうかを次に解析した。培養 NHDF を UVA 照射直後に 25 μ g/mL 濃度の MAAs で処理し、72 時間まで培養すると、UVA による有意に抑制された HA 分泌が著しく回復した(図 9)。この改善効果に関与するシグナル伝達機構は不明であるが、これらの結果は MAAs が光老化肌における HA の欠乏を防ぎ、また加齢および光老化皮膚の両方で HA レベルを修復回復させる可能性のある将来の薬剤として役立つことを強く示唆している。

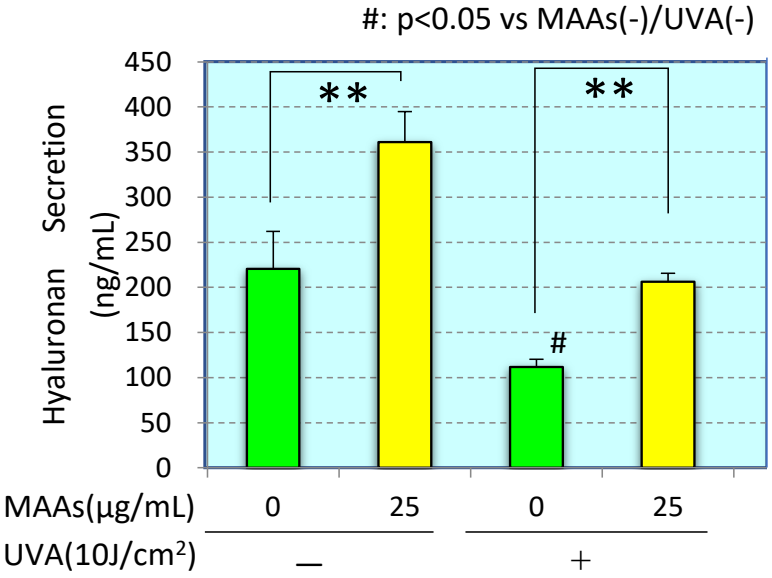


図 9. HA の UVA 抑制分泌に対する MAA の改善効果。25 μg/mL の MAAs は、示された用量での UVA 照射直後に NHDF の培養物に添加され、条件培地中の HA レベルは ELISA アッセイによって照射後 72 時間で測定した。データは 平均値±SD. n=3、**:p<0.01 vs コントロール(0 μg/mL), #: p<0.05 対 MAAs(-)/UVA(-)

結論として、真皮中の HA 含有量の増加につながる UVA 非および/または暴露皮膚における HA の分泌に対する MAAs の刺激および改善効果は、望ましい抗老化剤として大きな相乗効果をもたらすと考えられる。したがって、MAAs の繰り返し局所適用は、加齢または光老化した真皮においても HA 含有量を増加させるのに有効である可能性がある。

5. 総合まとめ

この皮膚真皮における NHDF の HA 代謝への加齢及びUVA 照射の影響とそれに関連する細胞内シグナル伝達機構は、構成組織レベルおよび HA の断片化が皮膚形態および機能の重要な老化マーカーである光老化のメカニズムを理解するための大きな情報を提供した。特に、NHDF による HAS2 の発現量は真皮における HA の生理機能を介して皮膚の弾性特性を維持する上で重要な役割を果たし、その欠乏または断片化は、皮膚のしわやたるみの発症の原因や要因となる。MAAs は、細胞内シグナル伝達系統に対する有意な効果を介して HAS2 の発現レベルを改善することによって HA の欠損または断片化を修復し、また光老化皮膚で減少しているコラーゲンやエラスチンの新たな合成の促進効果も併せて有する特性から、皮膚透過性を可能とする低分子量の MAAs の使用が加齢または光老化した皮膚における局所的な皮膚アンチエイジング効果を有効ならしめる一つの有望な方法であることを示唆している。

参考文献

1. Manuskiatti, W., and Maibach, H. I. (1996) Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging. *Int J Dermatol* **35**, 539-544
2. Margelin, D., Medaisko, C., Lombard, D., Picard, J., Fourtanier, A. (1996) Hyaluronic acid and dermatan sulfate are selectively stimulated by retinoic acid in irradiated and nonirradiated hairless mouse skin. . *J Invest Dermatol* **106**, 505-509
3. Takahashi, Y., Ishikawa, O., Okada, K., Ohnishi, K., and Miyachi, Y. (1995) Disaccharide analysis of the skin glycosaminoglycans in chronically ultraviolet light-irradiated hairless mice. *J Dermatol Sci* **10**, 139-144
4. Fisher, G. J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S., Voorhees,J.J. . (1996) Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* **379**, 335-339
5. Fisher, G. J., Quan, T., Purohit, T., Shao, Y., Cho, M.K., He, T., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J.J. . (2009) Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am J Pathol* **174**, 101–114

6. Tsukahara, K., Takema, Y., Moriwaki, S., Fujimura, T., Imayama, S., and Imokawa, G. (2001) Carbon dioxide laser treatment promotes repair of the three-dimensional network of elastic fibres in rat skin. *Br J Dermatol* **144**, 452-458
7. Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takema, Y., and Imokawa, G. (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem Photobiol* **74**, 283-290
8. Tsukahara, K., Nakagawa, H., Moriwaki, S., Kakuo, S., Ohuchi, A., Takema, Y., and Imokawa, G. (2004) Ovariectomy is sufficient to accelerate spontaneous skin ageing and to stimulate ultraviolet irradiation-induced photoageing of murine skin. *Br J Dermatol* **151**, 984-994
9. Morisaki, N., Moriwaki, S., Sugiyama-Nakagiri, Y., Haketa, K., Takema, Y., and Imokawa, G. (2010) Neprilysin is identical to skin fibroblast elastase: its role in skin aging and UV responses. *J Biol Chem* **285**, 39819-39827
10. Nakajima, H., Ezaki, Y., Nagai, T., Yoshioka, R., and Imokawa, G. (2012) Epithelial-mesenchymal interaction during UVB-induced up-regulation of neutral endopeptidase. *Biochem J* **443**, 297-305
11. Imokawa, G., and Ishida, K. (2015) Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging I: reduced skin elasticity, highly associated with enhanced dermal elastase activity, triggers wrinkling and sagging. *Int J Mol Sci* **16**, 7753-7775
12. Imokawa, G., Nakajima, H., and Ishida, K. (2015) Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging II: over-expression of neprilysin plays an essential role. *Int J Mol Sci* **16**, 7776-7795
13. Imokawa, G. (2016) Epithelial-mesenchymal interaction mechanisms leading to the over-expression of neprilysin are involved in the UVB-induced formation of wrinkles in the skin. *Exp Dermatol* **25 Suppl 3**, 2-13
14. Akazaki, S., and Imokawa, G. (2001) Mechanical methods for evaluating skin surface architecture in relation to wrinkling. *J Dermatol Sci* **27 Suppl 1**, S5-10
15. Akazaki, S., Nakagawa, H., Kazama, H., Osanai, O., Kawai, M., Takema, Y., and Imokawa, G. (2002) Age-related changes in skin wrinkles assessed by a novel three-dimensional morphometric analysis. *Br J Dermatol* **147**, 689-695
16. Takema, Y., Yorimoto, Y., and Kawai, M. . (1995) The relationship between age-related changes in the physical properties and development of wrinkles in human facial skin. *J. Soc. Cosmet. Chem* **46**, 163-173
17. Yoshida, H., Komiya, A., Ohtsuki, R., Kusaka-Kikushima, A., Sakai, S., Kawabata, K., Kobayashi, M., Nakamura, S., Nagaoka, A., Sayo, T., Okada, Y., and Takahashi, Y. (2018)

Relationship of hyaluronan and HYBID (KIAA1199) expression with roughness parameters of photoaged skin in Caucasian women. *Skin Res Technol* **24**, 562-569

18. Yoshida, H., Nagaoka, A., Komiya, A., Aoki, M., Nakamura, S., Morikawa, T., Ohtsuki, R., Sayo, T., Okada, Y., and Takahashi, Y. (2018) Reduction of hyaluronan and increased expression of HYBID (alias CEMIP and KIAA1199) correlate with clinical symptoms in photoaged skin. *Br J Dermatol* **179**, 136-144
19. Sugiyama, Y., Shimada, A., Sayo, T., Sakai, S., and Inoue, S. (1998) Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF-beta upregulates their expression in cultured human skin cells. *J Invest Dermatol* **110**, 116-121
20. Heldin, P., Laurent, T. C., and Heldin, C. H. (1989) Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J* **258**, 919-922
21. Suzuki, M., Asplund, T., Yamashita, H., Heldin, C. H., and Heldin, P. (1995) Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 involves activation of protein kinase C. *Biochem J* **307 (Pt 3)**, 817-821
22. Elias, J. A., Krol, R. C., Freundlich, B., and Sampson, P. M. (1988) Regulation of human lung fibroblast glycosaminoglycan production by recombinant interferons, tumor necrosis factor, and lymphotoxin. *J Clin Invest* **81**, 325-333
23. Postlethwaite, A. E., Smith, G. N., Jr., Lachman, L. B., Endres, R. O., Poppleton, H. M., Hasty, K. A., Seyer, J. M., and Kang, A. H. (1989) Stimulation of glycosaminoglycan synthesis in cultured human dermal fibroblasts by interleukin 1. Induction of hyaluronic acid synthesis by natural and recombinant interleukin 1s and synthetic interleukin 1 beta peptide 163-171. *J Clin Invest* **83**, 629-636
24. Libkind, D., Pérez, P., Sommaruga, R., Diéguez Mdel, C., Ferraro, M., Brizzio, S., Zagarese, H., and van Broock, M. (2004) Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 281-286
25. Portwich, A., and Garcia-Pichel, F. (1999) Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium chlorogloeopsis PCC 6912. *Arch Microbiol* **172**, 187-192
26. Neale, P. J., Banaszak, A. T., and Jarriel, C. R. (1998) Ultraviolet sunscreens in Gymnodinium sanguineum (Dinophyceae): mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *J Phycol* **34**, 928–938
27. Oren, A., and Gunde-Cimerman, N. (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol Lett* **269**, 1-10

28. Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., and Pinto, E. (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **146**, 60-78
29. Wada, N., Sakamoto, T., and Matsugo, S. (2015) Mycosporine-Like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants. *Antioxidants (Basel)* **4**, 603-646
30. Schmid, D., Schürch, C., Zülli, F., Nissen, H. P., and Prieur, H. (2003) Mycosporine-like amino acids: natural UV-screening compounds from red algae to protect the skin against photoaging. *SÖFW J* **129**

1-5

31. Kim, S., You, D. H., Han, T., and Choi, E. M. (2014) Modulation of viability and apoptosis of UVB-exposed human keratinocyte HaCaT cells by aqueous methanol extract of laver (Porphyra yezoensis). *J Photochem Photobiol B* **141**, 301-307
32. Suh, S. S., Oh, S. K., Lee, S. G., Kim, I. C., and Kim, S. (2017) Porphyra-334, a mycosporine-like amino acid, attenuates UV-induced apoptosis in HaCaT cells. *Acta Pharm* **67**, 257-264
33. Terazawa, S., Nakano, M., Yamamoto, A., and Imokawa, G. (2020) Mycosporine-like amino acids stimulate hyaluronan secretion by up-regulating hyaluronan synthase 2 via activation of the p38/MSK1/CREB/c-Fos/AP-1 axis. *J Biol Chem* **295**, 7274-7288
34. Yoshida, H., Nagaoka, A., Kusaka-Kikushima, A., Tobiishi, M., Kawabata, K., Sayo, T., Sakai, S., Sugiyama, Y., Enomoto, H., Okada, Y., and Inoue, S. (2013) KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5612-5617
35. Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A., and Kimata, K. (1999) Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* **274**, 25085-25092
36. Kondo, T., Chichibu, K., Usuki, H., Matsuura, T., Shichijo, S., and Yokoyama, M. M. (1991) Rapid assay of hyaluronic acid in serum]. *Rinsho Byori* **39**, 536-540
37. Lim, T. G., Jeon, A. J., Yoon, J. H., Song, D., Kim, J. E., Kwon, J. Y., Kim, J. R., Kang, N. J., Park, J. S., Yeom, M. H., Oh, D. K., Lim, Y., Lee, C. C., Lee, C. Y., and Lee, K. W. (2015) 20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol, a metabolite of ginsenoside Rb1, enhances the production of hyaluronic acid through the activation of ERK and Akt mediated by Src tyrosin kinase in human keratinocytes. *Int J Mol Med* **35**, 1388-1394
38. Nagaoka, A., Yoshida, H., Nakamura, S., Morikawa, T., Kawabata, K., Kobayashi, M., Sakai, S., Takahashi, Y., Okada, Y., and Inoue, S. (2015) Regulation of Hyaluronan (HA)

Metabolism Mediated by HYBID (Hyaluronan-binding Protein Involved in HA Depolymerization, KIAA1199) and HA Synthases in Growth Factor-stimulated Fibroblasts. *J Biol Chem* **290**, 30910-30923

39. Aggarwal, S., Kim, S. W., Cheon, K., Tabassam, F. H., Yoon, J. H., and Koo, J. S. (2006) Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element-binding protein in normal human bronchial epithelial cells. *Mol Biol Cell* **17**, 566-575
40. Rauhala, L., Jokela, T., Kärnä, R., Bart, G., Takabe, P., Oikari, S., Tammi, M. I., Pasonen-Seppänen, S., and Tammi, R. H. (2018) Extracellular ATP activates hyaluronan synthase 2 (HAS2) in epidermal keratinocytes via P2Y(2), Ca(2+) signaling, and MAPK pathways. *Biochem J* **475**, 1755-1772
41. Jokela, T. A., Karna, R., Makkonen, K. M., Laitinen, J. T., Tammi, R. H., and Tammi, M. I. (2014) Extracellular UDP-glucose activates P2Y14 Receptor and Induces Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Tyr705 phosphorylation and binding to hyaluronan synthase 2 (HAS2) promoter, stimulating hyaluronan synthesis of keratinocytes. *J Biol Chem* **289**, 18569-18581
42. Qin, J., Berdyshev, E., Poirer, C., Schwartz, N. B., and Dawson, G. (2012) Neutral sphingomyelinase 2 deficiency increases hyaluronan synthesis by up-regulation of Hyaluronan synthase 2 through decreased ceramide production and activation of Akt. *J Biol Chem* **287**, 13620-13632
43. Rauhala, L., Hämäläinen, L., Salonen, P., Bart, G., Tammi, M., Pasonen-Seppänen, S., and Tammi, R. (2013) Low dose ultraviolet B irradiation increases hyaluronan synthesis in epidermal keratinocytes via sequential induction of hyaluronan synthases Has1-3 mediated by p38 and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) signaling. *J Biol Chem* **288**, 17999-18012
44. Kultti, A., Kärnä, R., Rilla, K., Nurminen, P., Koli, E., Makkonen, K. M., Si, J., Tammi, M. I., and Tammi, R. H. (2010) Methyl-beta-cyclodextrin suppresses hyaluronan synthesis by down-regulation of hyaluronan synthase 2 through inhibition of Akt. *J Biol Chem* **285**, 22901-22910
45. Saavalainen, K., Pasonen-Seppanen, S., Dunlop, T. W., Tammi, R., Tammi, M. I., and Carlberg, C. (2005) The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary retinoic acid and epidermal growth factor responding gene. *J Biol Chem* **280**, 14636-14644
46. Monslow, J., Williams, J. D., Guy, C. A., Price, I. K., Craig, K. J., Williams, H. J., Williams, N. M., Martin, J., Coleman, S. L., Topley, N., Spicer, A. P., Buckland, P. R., Davies, M., and Bowen, T. (2004) Identification and analysis of the promoter region of the human hyaluronan synthase 2 gene. *J Biol Chem* **279**, 20576-20581

47. Monslow, J., Williams, J. D., Fraser, D. J., Michael, D. R., Foka, P., Kift-Morgan, A. P., Luo, D. D., Fielding, C. A., Craig, K. J., Topley, N., Jones, S. A., Ramji, D. P., and Bowen, T. (2006) Sp1 and Sp3 mediate constitutive transcription of the human hyaluronan synthase 2 gene. *J Biol Chem* **281**, 18043-18050

48. Saavalainen, K., Tammi, M. I., Bowen, T., Schmitz, M. L., and Carlberg, C. (2007) Integration of the activation of the human hyaluronan synthase 2 gene promoter by common cofactors of the transcription factors retinoic acid receptor and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* **282**, 11530-11539

49. Makkonen, K. M., Pasonen-Seppanen, S., Torronen, K., Tammi, M. I., and Carlberg, C. (2009) Regulation of the hyaluronan synthase 2 gene by convergence in cyclic AMP response element-binding protein and retinoid acid receptor signaling. *J Biol Chem* **284**, 18270-18281

50. Terazawa, S., Nakajima, H., Shingo, M., Niwano, T., and Imokawa, G. (2012) Astaxanthin attenuates the UVB-induced secretion of prostaglandin E2 and interleukin-8 in human keratinocytes by interrupting MSK1 phosphorylation in a ROS depletion-independent manner. *Exp Dermatol* **21 Suppl 1**, 11-17

51. Terazawa, S., Mori, S., Nakajima, H., Yasuda, M., and Imokawa, G. (2015) The UVB-Stimulated Expression of Transglutaminase 1 Is Mediated Predominantly via the NFkappaB Signaling Pathway: New Evidence of Its Significant Attenuation through the Specific Interruption of the p38/MSK1/NFkappaBp65 Ser276 Axis. *PLoS One* **10**, e0136311

52. Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M., and Alessi, D. R. (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo j* **17**, 4426-4441

53. McCoy, C. E., Campbell, D. G., Deak, M., Bloomberg, G. B., and Arthur, J. S. (2005) MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochem J* **387**, 507-517

54. Terazawa, S., Nakajima, H., Fukasawa, K., and Imokawa, G. (2015) Withaferin A abolishes the stem cell factor-stimulated pigmentation of human epidermal equivalents by interrupting the auto-phosphorylation of c-KIT in human melanocytes. *Arch Dermatol Res* **307**, 73-88

55. Kato, T., Jr., Delhase, M., Hoffmann, A., and Karin, M. (2003) CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. *Mol Cell* **12**, 829-839

56. Gupta, S., Campbell, D., Dérijard, B., and Davis, R. J. (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**, 389-393

57. Wisdom, R., Johnson, R. S., and Moore, C. (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *Embo j* **18**, 188-197

58. Lopez-Bergami, P., Huang, C., Goydos, J. S., Yip, D., Bar-Eli, M., Herlyn, M., Smalley, K. S., Mahale, A., Eroshkin, A., Aaronson, S., and Ronai, Z. (2007) Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell* **11**, 447-460

59. Niwano, T., Terazawa, S., Nakajima, H., and Imokawa, G. (2018) The stem cell factor-stimulated melanogenesis in human melanocytes can be abrogated by interrupting the phosphorylation of MSK1: evidence for involvement of the p38/MSK1/CREB/MITF axis. *Arch Dermatol Res* **310**, 187-196

60. Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo j* **22**, 1313-1324

61. Reber, L., Vermeulen, L., Haegeman, G., and Frossard, N. (2009) Ser276 phosphorylation of NF-kB p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PLoS One* **4**, e4393

62. Gonzales, M., and Bowden, G. T. (2002) Ultraviolet B (UVB) induction of the c-fos promoter is mediated by phospho-cAMP response element binding protein (CREB) binding to CRE and c-fos activator protein 1 site (FAP1) cis elements. *Gene* **293**, 169-179

63. Tagashira, H., Miyamoto, A., Kitamura, S., Tsubata, M., Yamaguchi, K., Takagaki, K., and Imokawa, G. (2015) UVB Stimulates the Expression of Endothelin B Receptor in Human Melanocytes via a Sequential Activation of the p38/MSK1/CREB/MITF Pathway Which Can Be Interrupted by a French Maritime Pine Bark Extract through a Direct Inactivation of MSK1. *PLoS One* **10**, e0128678

64. Terazawa, S., and Imokawa, G. (2018) Signaling Cascades Activated by UVB in Human Melanocytes Lead to the Increased Expression of Melanocyte Receptors, Endothelin B Receptor and c-KIT. *Photochem Photobiol* **94**, 421-431

65. Mizutani, Y., Hayashi, N., Kawashima, M., and Imokawa, G. (2010) A single UVB exposure increases the expression of functional KIT in human melanocytes by up-regulating MITF expression through the phosphorylation of p38/CREB. *Arch Dermatol Res* **302**, 283-294

66. Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., and Toriumi, W. (1999) IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* **274**, 30353-30356