



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

イザヨイバラ由来エラジタンニンによるpoly(I:C)刺激ヒト表皮細胞からのIL-8産生抑制作用に関する研究

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者:<br>公開日: 2022-05-24<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 高山, 悟<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/87499">http://hdl.handle.net/20.500.12099/87499</a>        |

イザヨイバラ由来エラジタンニンによる poly(I:C)刺激ヒト  
表皮細胞からの IL-8 産生抑制作用に関する研究

Investigation of the suppression of IL-8 production by  
Ellagitannins from *Rosa roxburghii* in poly(I:C)-stimulated  
human keratinocytes

2021 年

高山 悟

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 1. 序論 .....  | 1  |
| 2. 実験材料および方法 .....   | 1  |
| 2.1. 使用試薬 .....  | 11 |
| 2.2. 抽出エキス作製法およびエキスに含まれる化合物の分画、単離および<br>同定.....                  | 11 |
| 2.3. 細胞及び培養方法.....   | 15 |
| 2.4. 抽出エキス及び分画物の添加 .....   | 15 |
| 2.5. RNA 抽出及び逆転写反応.....  | 16 |
| 2.6. リアルタイム定量 PCR 評価.....  | 16 |
| 2.7. ELISA 評価 .....  | 16 |
| 2.8. 統計学的解析 .....  | 16 |
| 3. 結果 .....  | 19 |
| 3.1. Poly (I:C)刺激による表皮細胞の IL-8 mRNA 発現増強に対する RRFE<br>の抑制効果 ..... | 19 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2. IL-8 遺伝子発現抑制活性を指標にした RRFE の精製および化合物の<br>単離.....   | 21 |
| 3.3. Poly (I:C)刺激による NHEKs の IL-8 遺伝子発現および IL-8 タンパク<br>産生に対する strictinin および casuarictin の効果 .....        | 23 |
| 3.4. Strictinin と casuarictin の併用による poly (I:C)刺激 NHEKs の IL-8<br>遺伝子発現および IL-8 タンパク産生の相乗的抑制効果の可能性の検討..... | 27 |
| 4. 考察 .....  | 29 |
| 5. 総括 .....  | 33 |
| 謝辞.....  | 35 |
| 参考文献 .....   | 36 |
| 略語一覧 .....   | 41 |

## 1. 序論

皮膚は人体における最大の臓器であり、外界と直に接し、水分の蒸発や異物の侵入および紫外線などの外的刺激から人体を防御するバリアとしての機能を有する(Fig. 1)。そのバリア機能を主に担っているのが皮膚の最外層にある角質層である。

外来性の刺激物質が皮膚に触れ、角質層を透過し体内に侵入することによりひき起こされる接触皮膚炎は「かぶれ」とも呼ばれ、原因物質が触れた部分における痒みや痛みを伴う湿疹、赤み、水ぶくれや腫れなどを症状とする疾患である。接触皮膚炎は刺激性(非免疫性)とアレルギー性(免疫性)に大別され、さらに紫外線を含む光線が関与するタイプを加えて、刺激性接触皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、光接触皮膚炎(光毒性接触皮膚炎, 光アレルギー性接触皮膚炎)に分けられる。刺激性接触皮膚炎では主に痛みが、またアレルギー性接触皮膚炎では通常重度の痒みが生じ、患者の仕事や学習の作業効率の低下、睡眠障害など生活の質(quality of life: QOL)の低下を招いている。

2007年5月、8月、11月、および2008年2月の4時節に日本皮膚科学会学術委員会が施行した「本邦における皮膚科受診患者の多施設横断四季別全国調査」<sup>(1,2)</sup>によると、この調査で最も多い疾患群は湿疹群 38.85%で、うち接触皮膚炎患者の割合は総患者数の 3.92 % (67,448 例中 2,643 例) を占めていた(Fig. 2)。症例数は全年齢に分布しているが、特に皮膚バリア機能が未熟な 0-5 歳代および 21-80 歳代が多い。

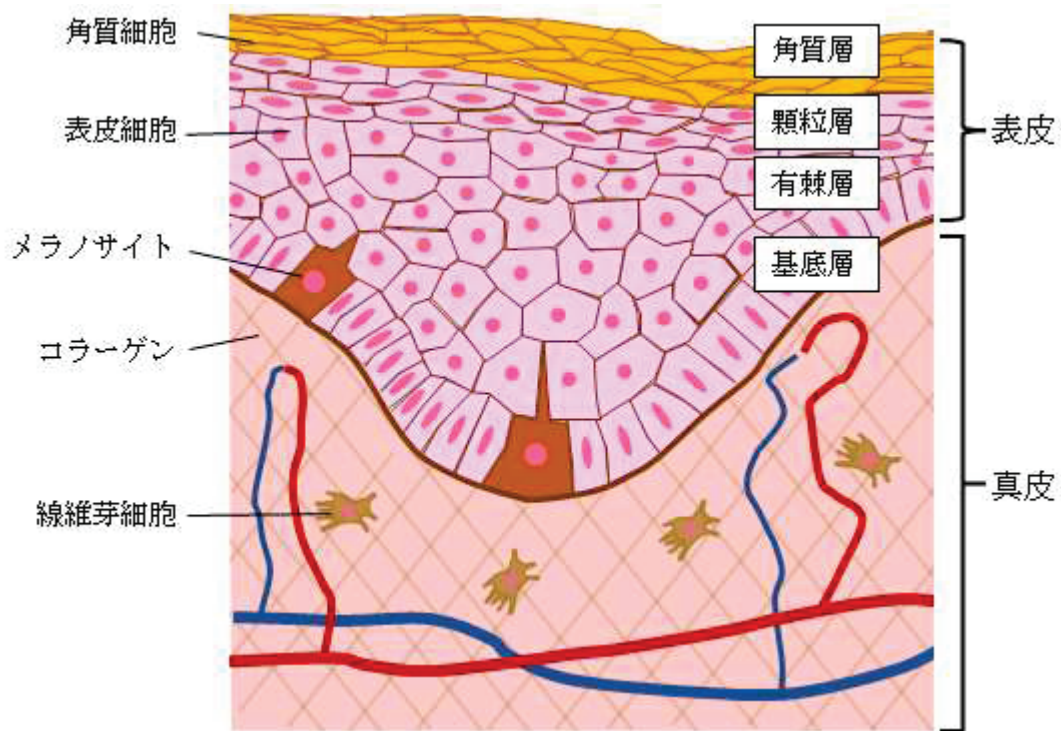


Fig. 1: 皮膚の構造

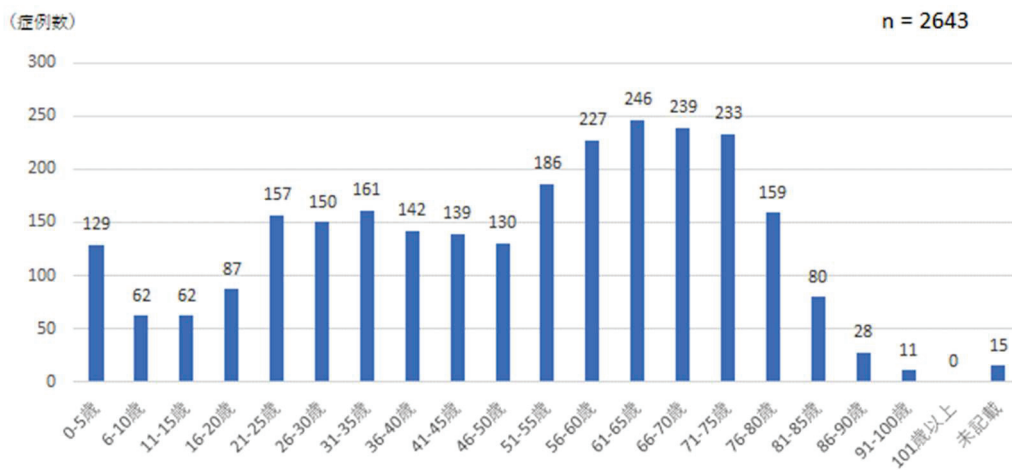


Fig. 2: 接触皮膚炎症例数の年齢分布

出典：接触皮膚炎診療ガイドライン 2020<sup>(3)</sup>の図を改訂

2016年4月から2017年3月にかけて一般社団法人皮膚安全性症例情報ネット(Skin Safety Case Information Network: SSCI-Net)<sup>(4)</sup>により実施されたアレルギー性接触皮膚炎の原因製品全国調査によると、化粧品・薬用化粧品が接触皮膚炎の原因として最多であった(Table 1)。

Table 1: アレルギー性皮膚障害事例 製品区分別割合

| 主たる診断     | 割合   |
|-----------|------|
| 化粧品・薬用化粧品 | 54%  |
| 医薬品       | 25%  |
| 装身具・装飾品   | 9%   |
| 医療機器等     | 6%   |
| 家庭用洗剤     | 1%   |
| その他(生活用品) | 5%   |
| 総計        | 100% |

登録製品数：423 件

出典：接触皮膚炎診療ガイドライン 2020<sup>(3)</sup>を改訂

また、化粧品の原因製品種別件数では、染毛剤、シャンプー、化粧下地、化粧水などが原因製品として報告されている(Table 2)。

Table 2: アレルギー性皮膚障害事例 化粧品・薬用化粧品の原因製品件数内訳

| 製品名      | 割合   |
|----------|------|
| 染毛剤      | 13%  |
| シャンプー    | 12%  |
| 化粧下地     | 8%   |
| 化粧水      | 8%   |
| 美容液      | 6%   |
| フェイスクリーム | 6%   |
| ファンデーション | 5%   |
| 乳液       | 5%   |
| 洗顔料      | 4%   |
| クレンジング   | 3%   |
| ボディークリーム | 3%   |
| ジェルネイル   | 3%   |
| パーマ液     | 2%   |
| 日焼け止め    | 2%   |
| 美白剤      | 2%   |
| その他      | 17%  |
| 総計       | 100% |

登録製品数：228 件

出典：接触皮膚炎診療ガイドライン 2020<sup>(3)</sup>を改訂



本調査では、アレルギー性接触皮膚炎患者の大多数が 20 代から 70 代の女性であったこと<sup>(5)</sup>、ほぼ全世代で 80%以上の女性が 20 歳までにスキンケアおよびメイクを開始しているとのアンケート調査結果<sup>(6)</sup>を考慮すると、接触皮膚炎患者数が 20 歳を境に急増する要因として女性の化粧行動が関与することが推察される。また、女性は 40 代後半から、男性でも 60 代後半で皮脂の分泌量が低下する<sup>(7)</sup>、皮膚の保湿およびバリア機能維持と密接に関与する角層中の天然保湿因子(natural moisturizing factor: NMF)産生に関わるブレオマイシン水解酵素の活性が 50 歳代で 30 歳代の半分まで低下する<sup>(8)</sup>、角層の細胞間に存在する細胞間脂質、特にセラミド量が加齢により減少し、50 歳代で 20 歳代の約半分になる<sup>(9)</sup>など、男女とも 50 歳前後で皮膚バリア機能の低下が顕在化する(Fig. 3)。そのため角層の透過性が亢進し、今まで何事もなく使用していた染毛剤やシャンプー、化粧水に含まれる成分に対し突然刺激性接触皮膚炎もしくはアレルギー性接触皮膚炎皮膚を起こすようになることが、50 歳以降接触皮膚炎症例数の更なる増加に反映されていると推察される。

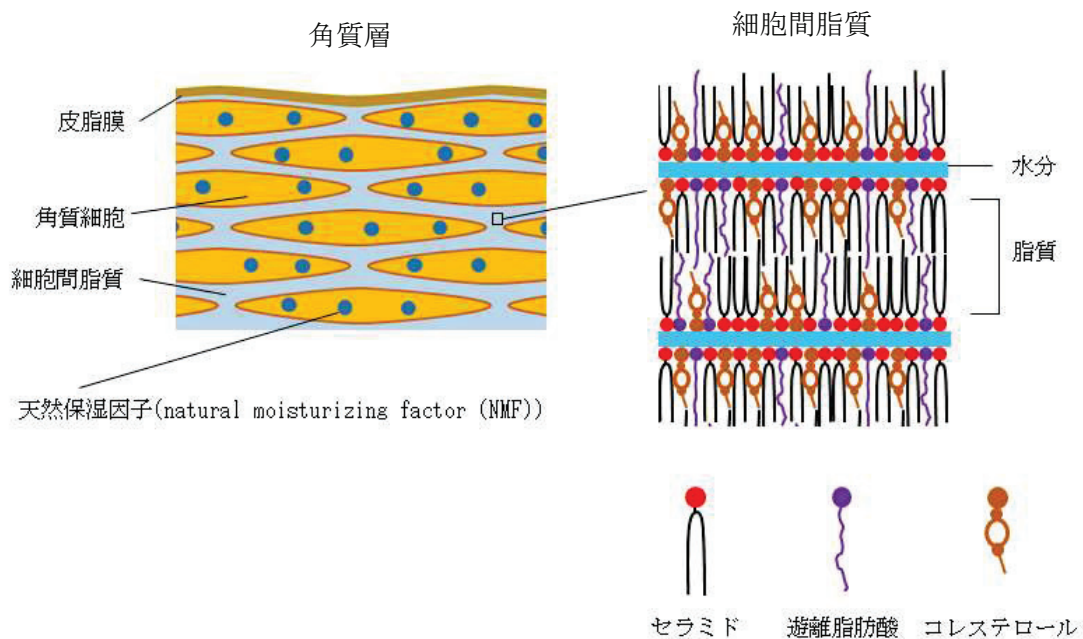


Fig. 3: 角質層および細胞間脂質の構造

接触皮膚炎を発症した人や、敏感肌もしくはアトピー性皮膚炎等の皮膚疾患を有している人以外に皮膚バリア機能が意識されたり、関心を持たれることは少ないが、近年、ピーナッツや小麦アレルギー発症には、口からではなく、皮膚からの原因物質の侵入の影響が大きいことなどが報告され<sup>(10,11)</sup>、皮膚のバリア機能の重要性が認識され始めている。

加齢以外にも、洗浄力の高い界面活性剤を含む洗浄料を使用した皮膚の過度な洗浄、精神的ストレスや睡眠不足によるホルモンバランスの不調、紫外線や空気の乾燥等が皮膚バリア機能の低下をもたらす。バリア機能の低下によりハプテン（化学物質）、花粉、polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)、黄砂やPM2.5を含む大気粉塵等の刺激物質が表皮層へ侵入し、表皮細胞を刺激して炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導し（炎症の惹起）、表皮細胞から産生されたサイトカイン、ケモカインが好中球やマクロファージの局所への浸潤を引き起こし炎症が増悪化すると考えられている<sup>(12)</sup>。近年、病原体もしくは病原体由来物質ではない上記刺激物質が炎症を惹起する機序として、外来物質の刺激やそれらによる傷害により、表皮細胞内に隔離されていた免疫原性物質、damage-associated molecular patterns (DAMPs)と呼ばれる分子が細胞外へ放出され、近傍の表皮細胞や免疫系細胞の細胞膜または細胞内に存在するパターン認識受容体、pattern recognition receptors (PRRs)に結合することによって炎症が開始されることが明らかにされている。DAMPsには細胞内在性物質の他にも、組織が傷害を受けた際、細胞外マトリクスから遊離する構成成分ヒアルロン酸やヘパラン硫酸なども含まれる。DAMPsを認識するPRRsには、toll-like receptors (TLRs)、receptor for advanced glycation (RAGE)、nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3)などがあり、DAMPsとの対応をTable 3に示す。

Table 3: DAMPs と対応する受容体およびその由来

| DAMPs                             | 対応する受容体                              | 関連する病態    |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------|
| <b>細胞内在性物質</b>                    |                                      |           |
| HMGB1                             | TLR-2, TLR-4, TLR-9, RAGE, CD24      | 細胞傷害および壊死 |
| HSPs                              | TLR-2, TLR-4, CD91, CD24, CD14, CD40 | 細胞傷害および壊死 |
| S100 proteins                     | RAGE                                 | 細胞傷害および壊死 |
| RNA                               | TLR-3                                | 細胞傷害および壊死 |
| DNA                               | TLR-9, AIM2                          | 細胞傷害および壊死 |
| Uric acid                         | NLRP3                                | 痛風        |
| ATP                               | NLRP3                                | 細胞傷害および壊死 |
| Formylpeptides<br>(mitochondrial) | FPR1                                 | 細胞傷害および壊死 |
| DNA<br>(mitochondrial)            | TLR-9                                | 細胞傷害および壊死 |
| <b>細胞外マトリクス</b>                   |                                      |           |
| Hyaluronan                        | TLR-2, TLR-4, CD44                   | 細胞傷害および壊死 |
| Biglycan                          | TLR-2, TLR-4                         | 細胞傷害および壊死 |
| Versican                          | TLR-2                                | 細胞傷害および壊死 |
| Heparan sulphate                  | TLR-4                                | 細胞傷害および壊死 |

HMGB1, high mobility group box 1; TLR, toll-like receptor; RAGE, receptor for advanced glycation end products; HSP, heat shock protein; AIM2, absent in melanoma 2; NLRP3, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing 3; FPR1, formyl peptide receptor 1.

出典：(2010) *Nat Rev Immunol* **10**, 826-837<sup>(13)</sup>を改訂

炎症、免疫疾患ほか様々な急性および慢性疾患と病態との関連で、DAMPs の制御に関する研究が進められている。例えば、敗血症時の多臓器不全の病態形成に DAMPs が寄与することが明らかになってきた<sup>(14,15)</sup>。特に high mobility group box 1 (HMGB1)はその受容体である RAGE に作用し、nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)の活性化を介して炎症増悪化や臓器障害を引き起こす。実際に、敗血症生存症例と死亡例を比較した場合に血中の HMGB1 濃度が死亡症例で有意に高い値で持続していたことが報告されている<sup>(16)</sup>。

炎症反応自体は、生体防御において極めて重要な生理機能であるが、病態の重症化につながる過度の炎症反応や持続的・慢性的な炎症反応に対しては DAMPs-PRRs 間のシグナル反応系を遮断し炎症反応を弱める処置が必要であると考えられる。

皮膚バリア能を低下させる要因のうち、紫外線、特に ultraviolet B (UVB) (波長 290 ~ 320nm) は許容量以上皮膚に暴露されると、急性期には紅斑 (サンバーン) や浮腫を伴う強い炎症を引き起こす<sup>(17)</sup>。加えて、バリア機能が低下した皮膚では、比較的少ない紫外線照射量で肌に炎症が起こることが報告されている<sup>(18)</sup>。長期にわたる UVB 暴露は皮膚炎を慢性化させ、肌荒れ、シミ、乾燥、肌弾力の低下、シワや末梢血管拡張等の皮膚の老化 (機能低下) や、皮膚癌である基底細胞癌や有棘層癌の発症リスクを引き上げることから<sup>(19)</sup>、紫外線暴露により生じる炎症を制御する方法を優先的に見出すことが望ましい。

紫外線暴露は、表皮細胞に interleukin-1 (IL-1)<sup>(20,21)</sup>、interleukin-6 (IL-6)<sup>(22)</sup>、tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )<sup>(23,24)</sup>、interleukin-8 (IL-8)<sup>(25)</sup>を含む炎症性サイトカインの大量産生を促す。これらのサイトカインは、真皮での血管拡張<sup>(26)</sup>、血管透過性の亢進および照射部への好中球の浸潤を引き起こす<sup>(27,28)</sup>。一方、紫外線照射による表皮細胞のサイトカイン産生機序については長い間不明であった。

Bernard らは紅斑発生につながる炎症性サイトカインの産生源が紫外線暴露によりダメージを受けた表皮細胞が放出する DAMPs の 1 種、double-stranded domain を有する U1-RNA 等の noncoding RNA であり、この自己由来 RNA が TLR-3 を介して紫外線暴露でダ

メージを受けていない表皮細胞からの炎症性サイトカインの産生を誘導することを見出した<sup>(29)</sup>。このことは、TLR-3<sup>-/-</sup>マウスでは耳皮内に U1-RNA を注入しても耳に紅斑および浮腫は生じず、また耳皮内で TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA の発現上昇が起こらなかった彼らの実験結果により示されている。

ヒト表皮細胞で発現が報告されている TLR-3 はその大多数が細胞質内に発現しているため<sup>(30)</sup>、エンドサイトーシスによる表皮細胞の DAMPs として作用する自己由来 RNA の取り込みを阻害すること、RNA と TLR-3 との結合を阻害すること、もしくは RNA の TLR-3 結合後下流シグナル伝達を阻害することは、連鎖的なサイトカイン産生を断ち切ることにより炎症反応の拡大を抑え、結果として紫外線暴露に端を発した皮膚炎の発症低減、予防に有効であると考えられる。

従来から外用剤には肌荒れ防止、すなわち炎症や乾燥などの状態を改善し、角層本来の働きを取り戻させるために、抗炎症作用を有するグリチルリチン酸 2 カリウム (dipotassium glycyrrhizate: GK2)<sup>(31)</sup> や allantoin<sup>(32)</sup> が使用されてきた。GK2 の作用として炎症発生時細胞が放出する DAMPs の 1 種、HMGB1 に直接結合し、その受容体である TLR-2, 4, RAGE との結合を阻害することで NF- $\kappa$ B シグナルを阻害し炎症反応を抑制することが報告されている<sup>(33)</sup>。また、allantoin はカラギーナン誘導足蹠浮腫を抑制する作用が報告されていることから<sup>(34)</sup>、カラギーナンが TLR-4 を介して誘導する炎症反応を阻害する可能性が示唆される<sup>(35,36)</sup>。しかしながら、いずれの化合物も TLR-3 を介して誘導される炎症反応に及ぼす影響について報告されていない。

接触皮膚炎や日光皮膚炎等の治療に用いられるステロイド剤は炎症を鎮静化する作用が強力であるが、長期外用により皮膚萎縮などの副反応が生じたり、またステロイド剤使用で皮膚炎が起こることもあり、使用には十分な注意を要する。皮膚炎の発症低減の観点から、ステロイド剤を肌荒れ防止剤として日常の皮膚の手入れに使用することは好ましくないと考えられる。

植物は生物学的な有効性を示す化合物の豊富な供給源であり、植物由来製品は健康増進、健康維持のため生薬、外用剤および健康食品等として広く世界中で使用されてきた。中でもエラジタンニンを含むポリフェノールは抗酸化作用<sup>(37)</sup>、血管弛緩作用<sup>(38)</sup>、抗炎症作用<sup>(38,39)</sup>、抗高脂血症作用<sup>(40)</sup>および抗糖尿病作用<sup>(41)</sup>など多様な生物学的活性を持つため関心が高まっている。

エラジタンニンは、strawberry (イチゴ)、raspberry (ラズベリー)、pomegranate (ザクロ)、muscadine grape (野ブドウ) など数種の果物で見出されており<sup>(42)</sup>、Fumagalli らはイチゴ由来のエラジタンニン、casuarictin と agrimoniin が *pylori* (*H. pylori*) 感染による胃炎発症 *in vitro* モデルである TNF- $\alpha$  で刺激したヒト胃腺癌細胞 (human gastric adenocarcinoma: AGS) の IL-8 産生を抑制することを示した<sup>(43)</sup>。

イザヨイバラ果実はタンニンを豊富に含むため収斂作用を持ち、止血、鎮痛、防腐などの効果が認められることから<sup>(44)</sup>、民間薬や化粧品として使用されてきた。今回、我々はイザヨイバラ果実が alnusiin、casuarictin、tellimagrandin II など多種類のエラジタンニンを含有することに注目し<sup>(45)</sup>、イザヨイバラ果実を素材として作製した抽出液が紫外線暴露による皮膚の炎症を軽減する効果を有するか検討を行った。

本研究では、1) イザヨイバラ果実抽出液 (*Rosa roxburghii* Tratt fruit extract: RRFE) が、紫外線照射により著しくダメージを受けた表皮細胞から放出される自己 RNA による炎症を緩和する作用を有することを実証するために、TLR-3 のリガンドである polyinosinic-polycytidylic acid sodium (poly(I:C)) で刺激した正常ヒト表皮角化細胞 (normal human epidermal keratinocytes: NHEKs) を用い<sup>(46)</sup>、RRFE の IL-8 の遺伝子発現抑制効果を評価した。また GK2 と allantoin に同様の効果が認められるか検討を行った。2) RRFE に含まれるエラジタンニンの同定を行うこと、およびこれらが RRFE 中の有効成分であることを示すために、IL-8 遺伝子発現抑制効果および IL-8 タンパク産生抑制効果を評価した。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1. 使用試薬

Poly(I:C)はSigma-Aldrich (USA) から購入した。GK2 および allantoin は Fujifilm Wako Pure Chemical (Japan) から購入した。

### 2.2. 抽出エキス作製法およびエキスに含まれる化合物の分画、単離および同定

*In vitro* 試験に使う RRFE は *Rosa roxburghii* Tratt 果実から以下の通り作製した。果実を果実重量の 30 倍量の 50 %濃エタノールで室温抽出した。得られた抽出液を濾過しエバポレーターを用いて濃縮した。濃縮物を 50 %濃エタノールで固形分含量を 11.6 mg/mL に調製した溶液を RRFE とした。

活性成分の単離、同定は以下のように行った。*Rosa roxburghii* Tratt 果実を果実重量の 10 倍量のメタノールで抽出した。得られたメタノール抽出物 16.9 g を sephadex LH-20 ゲルカラムクロマトグラフィー (80 mm × 450 mm)を用いて、メタノール：水 (9 : 1 (v/v))で溶出し、8 個の画分(Fr. 1~8)を得た(Fig. 4)。



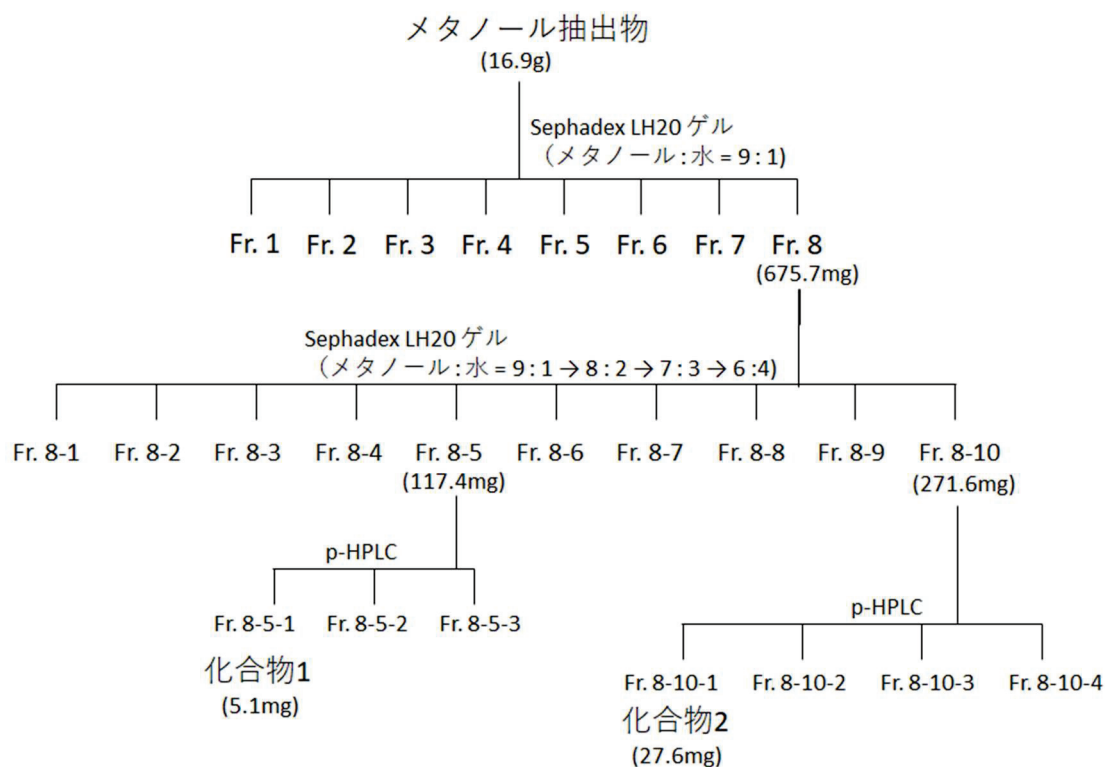


Fig. 4: イザヨイバラ果実メタノール抽出物分画スキーム

次に、Fr. 8 (675.7 mg)を sephadex LH-20 ゲルカラムクロマトグラフィー (35 mm × 450 mm)を用いてメタノール：水 (9 : 1 (v/v) - 6 : 4 (v/v))の勾配溶出を行い、10 個の画分(Fr. 8-1 ~ 8-10)を得た。その後 Fr. 8-5 および Fr. 8-10 を inertsil ODS-3 分取 HPLC (p-HPLC) (4.6 mm × 250 mm) を用いて、メタノール：0.05 % トリフルオロ酢酸 (TFA)水 (5 % : 95 % - 50 % : 50 % (40 分)) の勾配溶出を行い、化合物 1 (5.1 mg) および化合物 2 (27.6 mg) をそれぞれの画分から単離した。

単離された化合物は  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 、HMQC、HMBC (Jeol ECA 600 NMR spectrometer) および MALDI-TOF-MS (Shimadzu Biotech Axima Resonance 2.9.1.20100121)を用いて化学構造を解析し、化合物 1 を strictinin (CID 73330) および化合物 2 を casuarictin (CID 73644)と同一した。



strictinin (1-*O*-galloyl-4,6-*O*-hexahydroxydiphenoyl- $\beta$ -D-glucopyranose)

$\lambda$  max 208, 269nm; The molecular weight was determined by MALDI-TOF-MS as 657.0975  $m/z$   $[M+Na]^+$  (Shimadzu Biotech Axima Resonance: Mode positive, Low 100+, power:120).  $^1H$  NMR (Methanol-*d*<sub>4</sub>, JEOL ECA-600, 600 MHz):  $\delta$  ppm Glc, 3.59 (1H, t,  $J=8.28$ , H-2), 3.70 (1H, t,  $J=9.66$ , H-3), 3.80 (1H, d,  $J=12.4$ , H-3), 4.02 (1H, dd,  $J=5.52$ , 8.94, H-5), 4.77 (1H, t,  $J=15.5$ , H-4), 5.21 (1H, dd,  $J=6.9, 13.7$ , H-6 $\alpha$ ), 5.65 (1H, d,  $J=8.22$ , H-1); 4,6-HHDP, 6.53 (1H, s, H-3'''), 6.67 (1H, s, H-3''); galloyl, 7.12 (2H, s, H-2',6')  $^{13}C$  NMR ((Methanol-*d*<sub>4</sub>, JEOL ECA-600, 150 MHz):  $\delta$  ppm Glc, 62.9 (C-6 $\alpha$ ), 71.9 (C-4), 72.3 (C-5), 73.4 (C-2), 74.7 (C-3), 94.9 (C-1); galloyl, 109.2 (C-2', 6'), 119.2 (C-1'), 139.1 (C-4'), 145.2 (C-3, 5), 165.5 (C-7'); 4,6-HHDP, 106.9 (C-3'''), 107.3 (C-3''), 115.3(C-1'''), 115.5 (C-1''), 125.0, 125.2 (C-2'' or 2'''), 136.0 (C-5'''), 136.3 (C-5''), 143.4, 143.5 (C-4'' or 4'''), 144.5, 144.6 (C-6'' or 6'''), 168.3 (C-7''), 168.5 (C-7''')

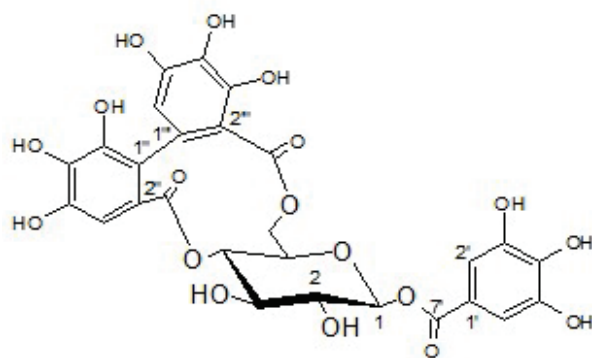


Fig. 5: strictinin の構造

casuarictin (1-*O*-galloyl-2,3-4,6-bis-*O*-hexahydroxydiphenoyl- $\beta$ -D-Glucopyranose)

$\lambda$  max 216, 399, 481nm; The molecular weight was determined by MALDI-TOF-MS as 959.3599  $m/z$   $[M+Na]^+$  (Shimadzu Biotech Axima Resonance: Mode positive, Low 100+, power:120).  $^1H$  NMR (Acetone- $d_6$ , JEOL ECA-600, 600 MHz):  $\delta$  ppm Glc, 3.85 (1H, d,  $J=13.1$ , H-6), 4.48 (1H, dd,  $J=6.2, 9.7$ , H-5), 5.15 (m, H-4), 5.16 (1H, m, H-2), 5.35 (1H, dd,  $J=6.9, 13.1$ , H-6), 5.39 (1H, t,  $J=9.7$ , H-3), 6.19 (1H, d,  $J=8.9$ , H-1); galloyl, 7.15 (2H, s, H-2, 6); 2, 3-HHDP, 6.34 (1H, s, H-3'), 6.43 (1H, s, H-3); 4,6-HHDP, 6.52 (1H, s, H-3), 6.65 (1H, s, H-3');  $^{13}C$  NMR (Acetone- $d_6$ , JEOL ECA-600, 150 MHz):  $\delta$  ppm Glc, 62.2 (C-6), 68.4 (C-4), 72.7 (C-5), 75.1 (C-2), 76.4 (C-3), 91.4 (C-1); galloyl, 109.5 (C-2,6), 119.1 (C-1), 139.1 (C-4), 145.5 (C-3, 5), 164.2 (C-7); 2, 3-HHDP, 106.5 (C-3'', 3'''), 167.7 (C-7''), 168.4 (C-7'''); 4, 6-HHDP, 106.8 (C-3'''), 107.5 (C-3''''), 167.0 (C-7'''), 167.2 (C-7'''''); HHDP, 113.3-115.2 (C-1'', 1''', 1''', 1''''), 125.1-125.7 (C-2'', 2''', 2''', 2''''), 135.4-135.8 (C-5'', 5''', 5''', 5''''), 143.7-143.8 (C-6'', 6''', 6''', 6''''), 144.3-144.5 (C-4'', 4''', 4''', 4''''')

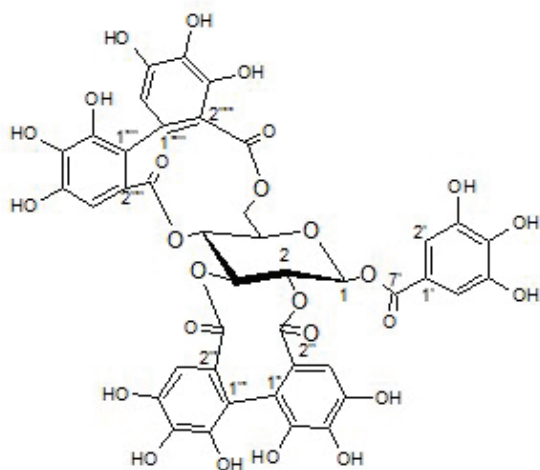


Fig. 6: casuarictin の構造

RRFE および Fr. 8 に含まれる strictinin および casuarictin 量を Table 4 に示す。

Table 4: RRFE および Fr. 8 固形分 1 mg 中に含まれる strictinin および casuarictin 量

|       | strictinin   | casuarictin   |
|-------|--------------|---------------|
| RRFE  | 4.92 $\mu$ g | 4.26 $\mu$ g  |
| Fr. 8 | 7.55 $\mu$ g | 40.85 $\mu$ g |

### 2.3. 細胞及び培養方法

NHEKs は Kurabo (Japan) から購入した。表皮細胞の培養培地はカルシウム濃度を 0.06 mM に調整し、ウシ脳下垂体抽出物、ヒトリコンビナント EGF、インスリン、トランスフェリン、ヒドロコチゾン、エピネフリンおよびゲンタマイシン／アンフォテリシンを添加した KBM-2 培地 (Lonza, USA) を使用し、5 % CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下培養した。培地交換は毎日行い、細胞培養面積が 70~90 % コンフルエントまで達した時点で、トリプシン／EDTA 溶液を用いて剥がし継代した。試験には 3~6 回継代した細胞を使用した。

### 2.4. 抽出エキス及び分画物の添加

NHEKs の培養面積が 80 % コンフルエントに達した時点で培地をヒドロコチゾンとエピネフリンを抜いた KBM-2 培地 (KGM HC (-)、Epf (-)) に交換した。更に 24 時間培養後、細胞に各試験で表示した濃度の RRFE、GK2、allantoin および単離化合物で 1 時間処理した後、Poly poly (I:C) (1  $\mu$ g/ml) を添加した。遺伝子発現解析では 4 時間、タンパク発現解析では 24 時間処理した。

## 2.5. RNA 抽出及び逆転写反応

トータル RNA は RNeasy kit (Qiagen、Germany)を用いて調製した。調製された RNA は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific、USA)を用いて定量した。cDNA は Prime Script RT reagent Kit (Takara Bio、Japan)を使用し、トータル RNA 50 ng から RT-PCR にて調製した。

## 2.6. リアルタイム定量 PCR 評価

リアルタイム PCR は特異的プライマーと SYBR Premix EX Taq II (Takara Bio)を用いて行った。IL-8 (フォワードプライマー配列 5'-CCACACTGCGCCAACA-3、リバースプライマー配列 5'-GCATCTTCACTGATTCTTGGAT-3) および内部標準：RPS18 (フォワードプライマー配列 5'-TTTGCGAGTACTCAACACCAACATC-3、リバースプライマー配列 5'-GAGCATATCTTC GGCCCACAC-3) は Hokkaido System Science, Japan から購入した。この試験において RPS18 の発現安定性はいかなる条件下の細胞においても変わりなかった。リアルタイム PCR における蛍光検出は Thermal Cycler Dice Real Time System Single (Takara Bio)を用いて行った。PCR 反応は 95 °C、30 秒間熱処理後、熱変性を 95 °Cで 5 秒間、アニーリングを 54–60 °Cで 30 秒間の条件で 40 サイクル行った。

## 2.7. ELISA 評価

処理後回収し、測定を行うまで-80 °Cで保存した培養上清中の IL-8 量測定には ELISA キット (R&D Systems、USA)を用いた。メーカーのプロトコールに従い使用した。

## 2.8. 統計学的解析

すべての定量データは平均 ± 標準偏差で表記した。各実験群の測定値データが正規標準分布に従ったため一元配置分散分析(ANOVA)を行った。多重比較検定には Dunnett 法

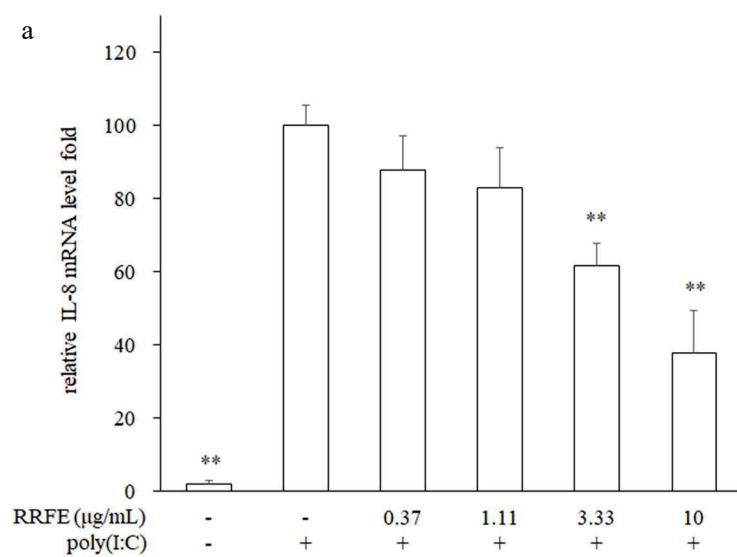
を用いた。 $p$  値が 0.05 を下回った場合、統計学的に有意であると判定した。統計解析はソフトウェア SPSS 22.0(IBM, USA)を用いて行った。



### 3. 結果

#### 3.1. Poly (I:C)刺激による表皮細胞の IL-8 mRNA 発現増強に対する RRFE の抑制効果

まず、RRFE が poly (I:C)処理された NHEKs の IL-8 遺伝子発現に影響を及ぼすかを検討した。NHEKs に poly (I:C)を作用させると IL-8 遺伝子の発現が有意に上昇するが、RRFE は用量依存的かつ有意に IL-8 遺伝子の発現を抑制した(Fig. 7a)。一方、抗炎症作用成分として外用剤に頻用される GK2 および allantoin には IL-8 遺伝子発現抑制作用が認められなかった(Fig. 7b and c)。



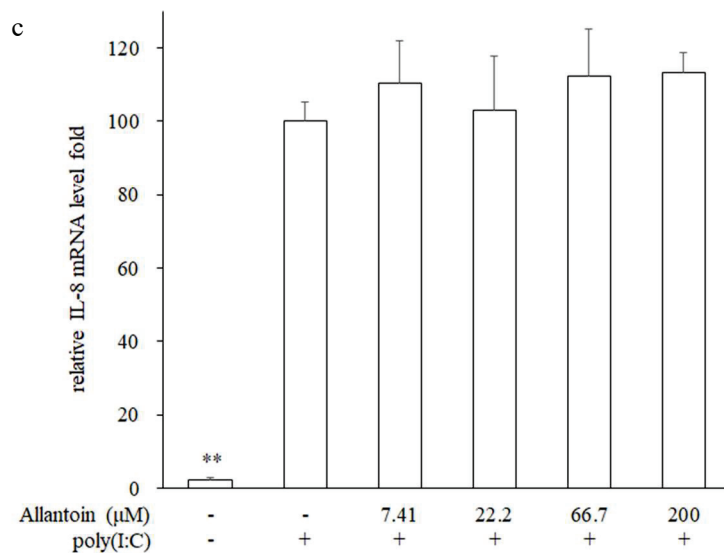
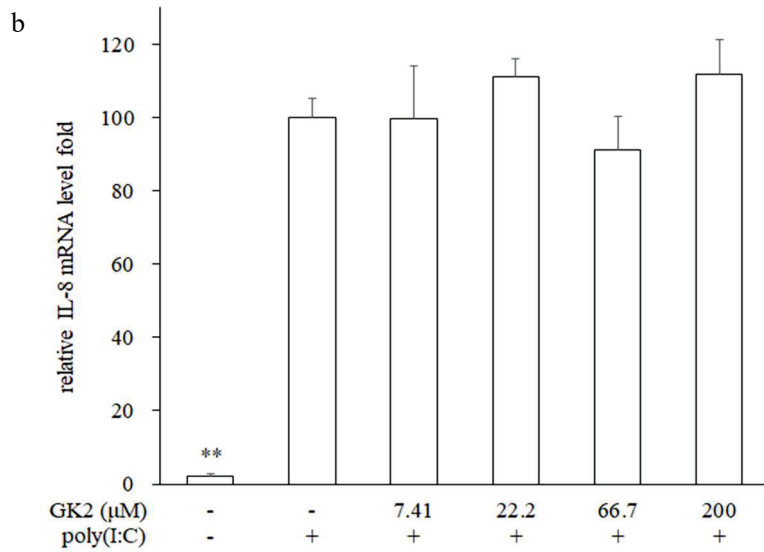


Fig. 7: Poly (I:C)処理 NHEKs の IL-8 遺伝子発現における RRFE, GK2 and allantoin の効果

NHEKs を a) RRFE (0.37-10 μg/mL)、b) GK2 (7.41-200 μM)もしくは c) allantoin (7.41-200 μM) で 1 時間処理した後、poly(I:C) (1 μg/ml) で 4 時間刺激し、IL-8 遺伝子発現量を定量的リアルタイム PCR 法で解析した。Poly(I:C)処理した NHEKs における IL-8 の相対発現量はハウスキーピング遺伝子、RPS18 で正規化した。データは平均 ± 標準偏差で表記した (n = 4)。 \*\*  $p < 0.01$  versus poly (I:C) alone, Dunnett's test



### 3.2. IL-8 遺伝子発現抑制活性を指標にした RRFE の精製および化合物の単離

Fig. 7a より RRFE に IL-8 遺伝子発現抑制活性が認められたため、活性を示す化合物の単離を行うために分画を行った。イザヨイバラ果実メタノール抽出液を sephadex LH-20 ゲルカラムクロマトグラフィーに供し 8 つのフラクションを得た (Fig. 4)。得られたフラクションを用いて、再度、poly(I:C) 刺激による IL-8 遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、Fr. 5 - 8 に抑制活性が認められた (Fig. 8)。そこで、最も強い活性が認められた Fr. 8 を更に分画・精製し、主成分である加水分解型タンニン (エラジタンニン) : strictinin および casuarictin を単離・同定した (Fig. 5, 6)。

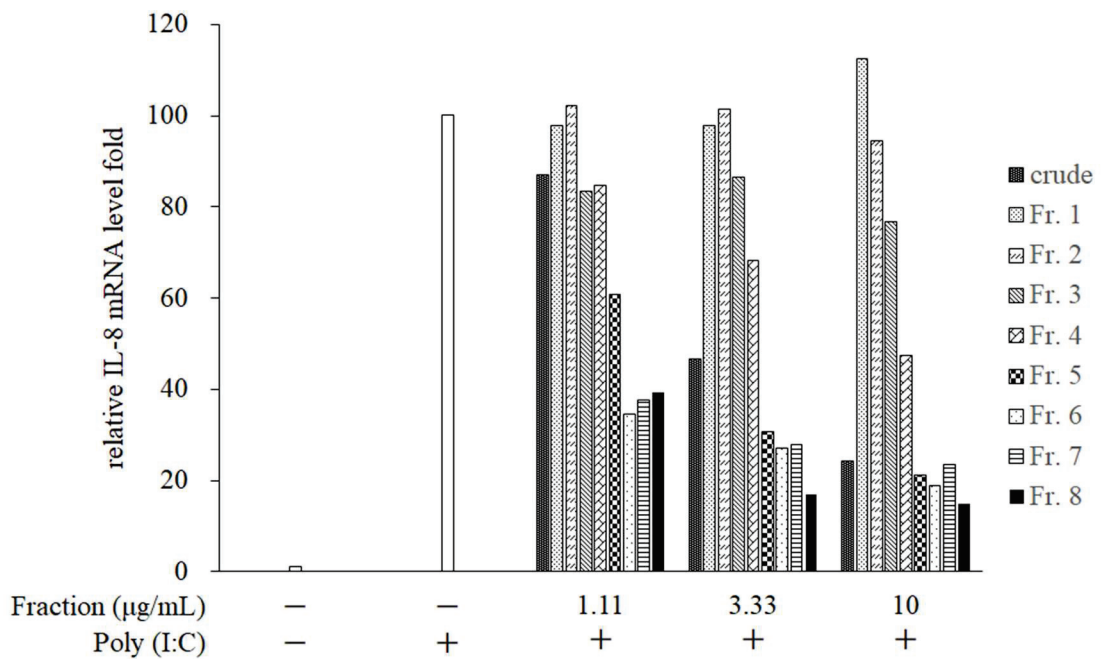
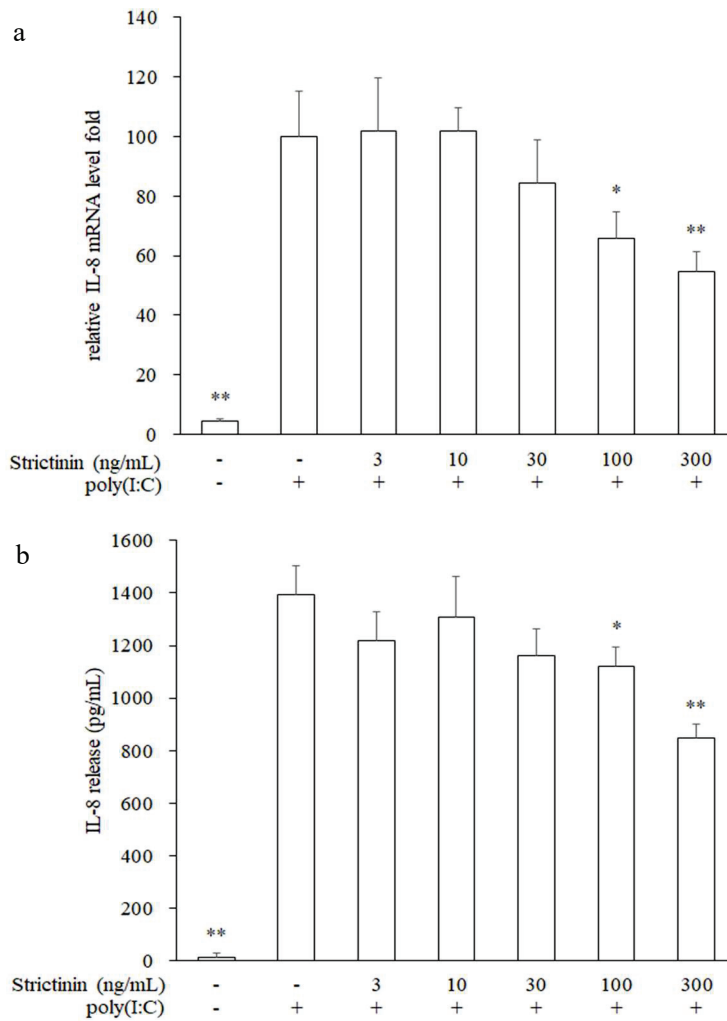


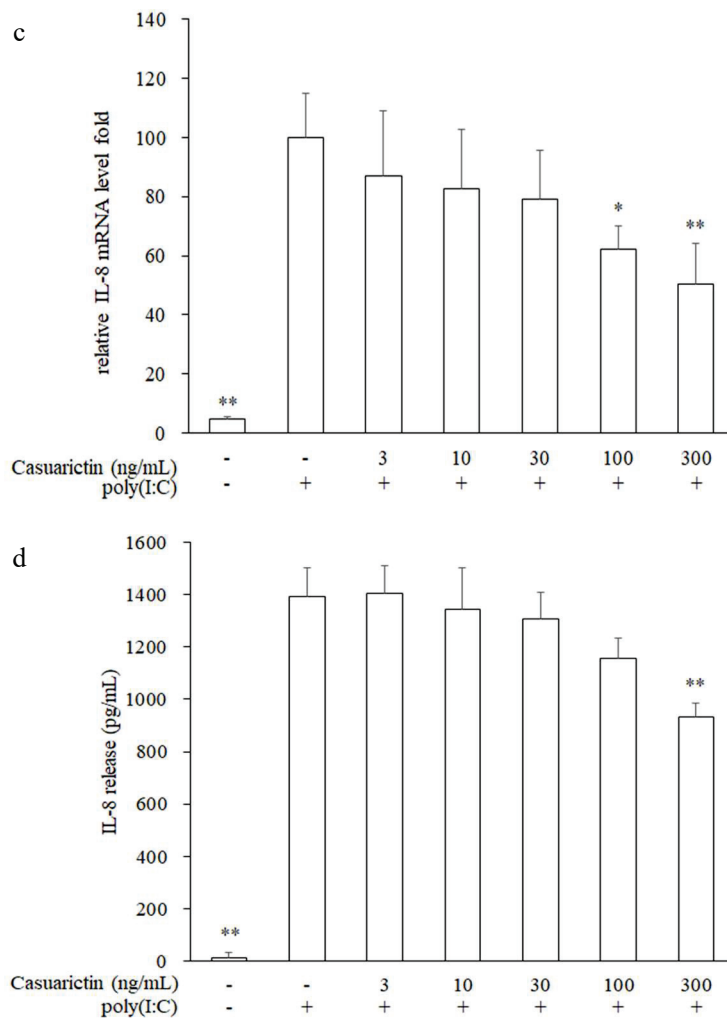
Fig. 8: RRFE 分画フラクションが示す IL-8 遺伝子発現抑制活性

NHEKs をメタノール抽出物 (crude) もしくはフラクション ( $1.11 \cdot 10^{-10}$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で 1 時間処理した後、poly(I:C) ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で 4 時間刺激し、IL-8 遺伝子発現量を定量的リアルタイム PCR 法で解析した。データは各フラクション 1 濃度につき 1 点で行った試験結果を示す ( $n = 1$ )。

### 3.3. Poly (I:C)刺激による NHEKs の IL-8 遺伝子発現および IL-8 タンパク産生における strictinin および casuarictin の効果

Strictinin および casuarictin は 100 ng/mL 以上の濃度において poly(I:C)処理 NHEKs における IL-8 遺伝子発現を有意に抑制した。また IL-8 タンパク産生抑制に関しても同様の傾向が認められた(Fig. 9)。





**Fig. 9:** Poly(I:C)刺激 NHEKs における strictinin ならびに casuarictin が IL-8 遺伝子発現および IL-8 タンパク産生に及ぼす影響

NHEKs を strictinin もしくは casuarictin で 1 時間処理した後、a, c) poly(I:C) (1  $\mu$ g/ml) で 4 時間処理し IL-8 遺伝子発現量を定量的リアルタイム PCR 法で定量した。b, d) poly(I:C) (1  $\mu$ g/ml) で 24 時間処理し培養上清中の IL-8 産生量を ELISA 法で定量した。データは平均  $\pm$  標準偏差で表記した (n = 4)。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus poly(I:C) alone, Dunnett's test.

RRFE および Fr. 8 が poly(I:C)処理 NHEKs における IL-8 遺伝子発現を有意に抑制する用量に含まれる strictinin および casuarictin 量は、単独で strictinin もしくは casuarictin を使用した場合が効果を示す用量より少ない(Table 5, 6)。

Table 5: Fig. 7a で使用した RRFE に含まれる strictinin および casuarictin 量

|                                    |             |             |               |             |
|------------------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| <b>RRFE (<math>\mu</math>g/mL)</b> | <b>0.37</b> | <b>1.11</b> | <b>3.33**</b> | <b>10**</b> |
| strictinin (ng/mL)                 | 1.83        | 5.47        | 16.4          | 49.2        |
| casuarictin (ng/mL)                | 1.58        | 4.73        | 14.2          | 42.6        |

\*\*は有意に IL-8 遺伝子発現を抑制した RRFE の濃度を示す

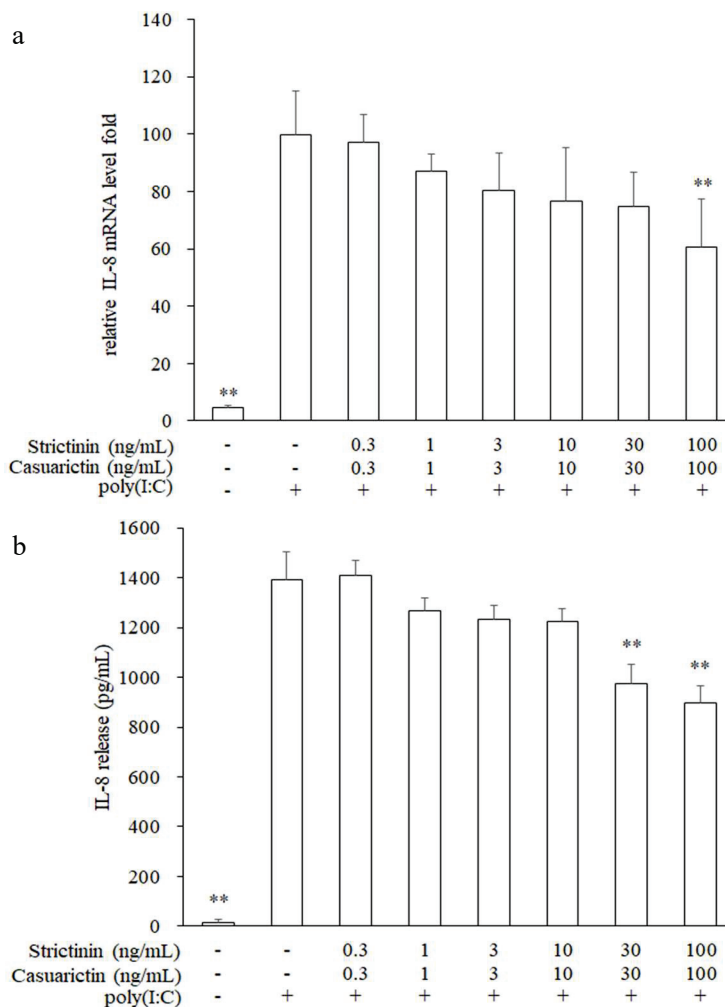
Table 6: Fig. 8 で使用した Fr. 8 に含まれる strictinin および casuarictin 量

|                                     |             |             |           |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-----------|
| <b>Fr. 8 (<math>\mu</math>g/mL)</b> | <b>1.11</b> | <b>3.33</b> | <b>10</b> |
| strictinin (ng/mL)                  | 8.4         | 25.2        | 75.5      |
| casuarictin (ng/mL)                 | 45.4        | 136.2       | 408.5     |



### 3.4. Strictinin と casuarictin の併用による poly (I:C)刺激 NHEKs の IL-8 遺伝子発現および IL-8 タンパク産生の相乗的抑制効果の可能性の検討

Strictinin と casuarictin の含有比を RRFE 中の比 1 : 1 に設定した場合、両化合物の濃度が 100 ng/mL で有意な IL-8 遺伝子発現抑制効果と IL-8 タンパク産生抑制効果が認められたが、IL-8 遺伝子発現を有意に抑制する RRFE に含まれる低濃度域の strictinin および casuarictin 併用(それぞれ 30 ng/mL)では IL-8 遺伝子発現に関しては相加的で有意な抑制効果は認められなかった(Fig. 10a, b)。一方、Sstrictinin と casuarictin の含有比を Fr. 8 中の比 1 : 5 に設定した場合、低濃度域の strictinin (10 ng/mL)と casuarictin (50 ng/mL) の併用まで、相加的で有意な IL-8 遺伝子発現抑制効果と IL-8 タンパク産生抑制効果が認められた(Fig. 10c, d)



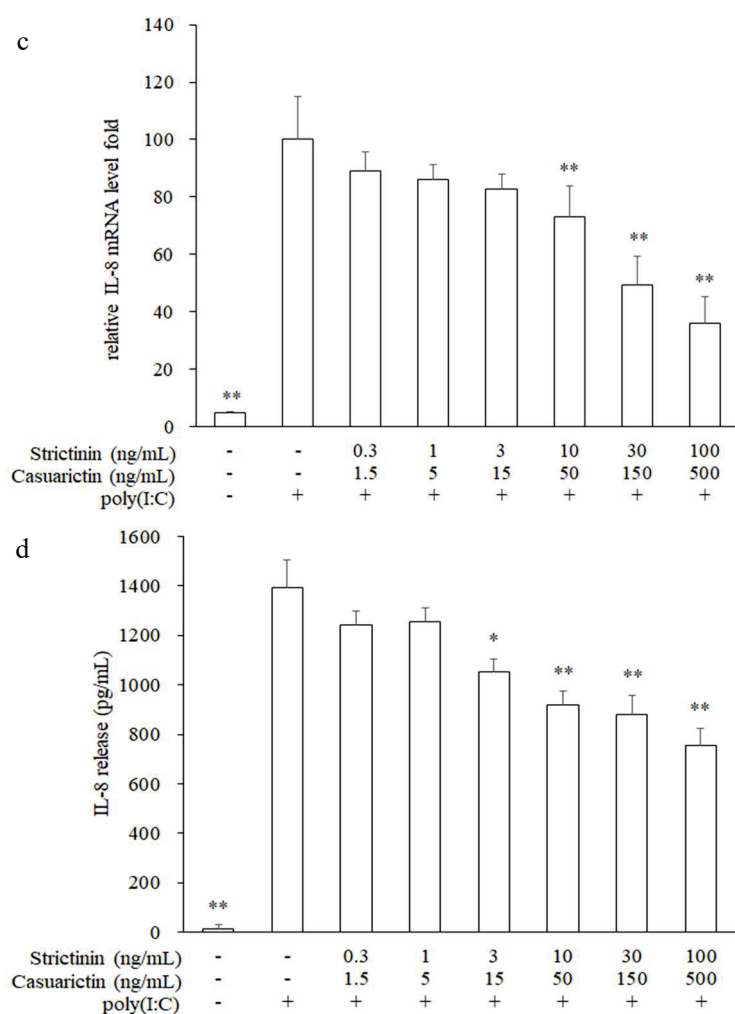


Fig. 10: Strictinin と casuarictin の併用による poly(I:C)処理 NHEKs における IL-8 遺伝子発現ならびに IL-8 タンパク産生に及ぼす影響

Strictinin と casuarictin を a, b) 量比(1 : 1)、c, d) 量比(1 : 5) の併用で NHEKs に 1 時間作用させた後、a, c) poly(I:C) (1  $\mu$ g/ml) で 4 時間処理し IL-8 遺伝子発現量を定量的リアルタイム PCR 法で定量した。b, d) poly(I:C) (1  $\mu$ g/ml) で 24 時間処理し培養上清中の IL-8 産生量を ELISA 法で定量した。データは平均  $\pm$  標準偏差で表記した (n = 4)。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  versus poly(I:C) alone, Dunnett's test



#### 4. 考察

本研究において、我々は RRFE を poly(I:C)刺激前の NHEKs に作用させることにより、炎症性サイトカイン IL-8 遺伝子発現を有意に抑制することを示した(Fig. 7a)。一般的にケモカインは紫外線誘導炎症反応の重要なメディエーターと考えられている<sup>(47)</sup>。UVB 照射後の表皮細胞において IL-8 の産生上昇が *in vitro* 試験<sup>(25,48)</sup>および *in vivo* 試験<sup>(49)</sup>で報告されている。IL-8 は効果的に好中球を活性化し炎症部位へ遊走させ、サイトカインストームを発生させることで炎症を増悪化させる。また IL-8 には、表皮細胞に作用すると細胞老化を誘導し、皮膚のバリア機能を低下させる作用が報告されている<sup>(50)</sup>。我々の研究結果は、RRFE をあらかじめ皮膚に塗布することにより、紫外線暴露によりダメージを受けた表皮部位での IL-8 産生を抑制することで連鎖的なサイトカイン産生を断ち切り、過剰な皮膚炎の発症を抑制できる可能性を示唆している。

エラジタンニンならびに casuarictin は、TNF- $\alpha$  で刺激した AGS の NF- $\kappa$ B パスウェイを阻害することで IL-8 産生を抑制することが報告されているが<sup>(43)</sup>、我々は RRFE に含まれる casuarictin と strictinin が TLR-3 のリガンド、poly(I:C)刺激による NHEKs において IL-8 遺伝子発現を抑制することを示した(Fig. 9)。これまでにイザヨイバラの根に含まれる strictinin 誘導体が抗菌作用を示すことは報告されているが<sup>(51)</sup>、今回の知見は strictinin の抗炎症作用を初めて示したものである。

TNF- $\alpha$  誘導 IL-8 遺伝子発現試験系において casuarictin は NF- $\kappa$ B パスウェイを強く阻害することで IL-8 発現を抑制するが、AP-1 パスウェイには影響しないことが報告されている<sup>(43)</sup>。一方、poly(I:C)刺激による NHEK の IL-8 遺伝子発現量が 4 時間以内に高値を示すことから、poly(I:C)誘導 IL-8 遺伝子発現誘導には NF- $\kappa$ B パスウェイよりむしろ AP-1 パスウェイが大きく寄与している可能性がある<sup>(25)</sup>。AP-1 は紫外線照射後 30 分以内に産生され<sup>(52)</sup>、1 時間以内に IL-8 遺伝子発現が始まることから<sup>(25)</sup>、紫外線照射後の炎症増悪化

を予防するためには AP-1 の制御が必須であると考えられる。casuarictin と strictinin による AP-1 の発現制御が今後の課題である。

イザヨイバラ果実抽出液から単離・同定された strictinin および casuarictin は、高濃度域 (100ng/mL 以上) では単独で (Fig. 9)、低濃度域では併用により (Fig. 10c, d)、poly(I:C) 刺激 NHEKs の IL-8 遺伝子発現抑制作用および IL-8 タンパク産生抑制作用を示すことから、いずれもイザヨイバラ果実抽出液の活性成分の 1 つであると考えられる。

一方、IL-8 遺伝子発現抑制活性を示す濃度において、strictinin と casuarictin との併用試験を行った場合、十分な活性が認められなかった (Fig. 10a, b)。原因は不明だが、RRFE に strictinin と casuarictin の作用を増強する因子が含まれる可能性が考えられる。このような因子の探索に関しては今後の検討課題である。

今回の試験では GK2 および allantoin はいずれも poly(I:C) を用いた TLR-3 を介する IL-8 発現抑制作用が認められなかった (Fig. 7b, c)。本結果は、GK2 および allantoin は特定の DAMPs と TLR-4 の組み合わせで生じる炎症を抑制することは可能であるが、自己由来 RNA と TLR-3 との組み合わせによる炎症抑制には影響を及ぼさないことを示している。従って、紫外線以外の皮膚バリア機能低下要因、例えば乾燥や大気汚染物質による炎症を抑制する製剤には、個々の刺激に応じて細胞や組織から放出される DAMPs に対応した機能が求められるものと考えられる。

NHEKs を poly(I:C) で刺激した場合、ステロイドの 1 種である dexamethasone は NHEKs を poly(I:C) で刺激した場合、TLR-3 – TRIF シグナル伝達経路を介した IL-8 発現を強力に抑制するだけでなく<sup>(53)</sup>、他の IL-8 産生経路、例えば TLR-3 を介した caspase-4 活性化により NHEKs から放出される IL-1 $\beta$  を介した二次的な IL-8 産生を抑制する等<sup>(54,55)</sup>、多面的に IL-8 の産生を抑制することが可能である。一方、strictinin と casuarictin は抑制しうる IL-8 産生抑制経路が IL-8 転写抑制活性に限定的であるため、2 次的に産生された IL-8 タンパクの増量が生じた分、見かけ上、タンパク産生の抑制作用が減弱したの

ではないかと推測される。それ故、poly(I:C)刺激 4 時間後の IL-8 mRNA 発現 (Fig. 9a, c)、(Fig. 10a, c)の方が刺激 24 時間後の IL-8 (タンパク) 産生(Fig. 9b, d)、(Fig. 10b, d)よりも強力に抑制されていたのではないかと考えられる。

Strictinin および casuarictin が poly(I:C)のインヒビターとしての機能を有しているのか、エンドサイトーシスを抑制する作用を有しているのか、あるいは TLR-3 のシグナル伝達系を阻害するのか、その作用点は現時点では不明だが、紫外線暴露により傷害を受けた細胞から放出される DAMPs のうち、以前から外用剤に配合されてきた抗炎症剤、GK2 や allantoin では制御できない DAMPs、自己由来 RNA を起炎物質とする炎症を抑制する点で新しい抗炎症機能を有する化合物であると考えられる。



## 5. 総括

接触皮膚炎は、細菌、化学物質、花粉、黄砂や PM2.5 を含む大気粉塵等の刺激物質が触れた部分における痒みや痛みを伴う湿疹や赤み、水ぶくれや腫れなどを症状とする疾患である。50 歳以降の人および染毛剤や界面活性剤、化粧品を日常的に使用する女性で発症頻度が高いが、いずれも皮膚バリア機能が低下している可能性が考えられる。重篤な皮膚炎の発症を予防するためには、日常的に皮膚バリア機能の低下を加速させる過度の炎症の発生を抑え、皮膚バリア機能の恒常性を維持する必要がある。これらの背景を踏まえ、本研究では紫外線照射により傷害を受けた細胞から放出される DAMPs の 1 種、TLR-3 に作用する RNA を使って表皮細胞を刺激する皮膚炎誘導モデルを使用し、予防的（刺激前）処理により炎症抑制可能な抗炎症原料の探索を行った。その結果、RRFE およびその単離成分である strictinin および casuarictin が紫外線照射による細胞傷害のバイオマーカー、TLR-3 リガンドにより誘導される炎症性サイトカイン、IL-8 の発現を抑制する作用を初めて見いだした。これらの成分は皮膚のバリア機能維持にとって有用であり、加えて新規外用抗炎症剤の原材料になり得る可能性も期待できる。



## 謝辞

稿を終わるに臨み、本研究の遂行に際して、終始御指導と御鞭撻を賜りました、岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科医療情報学専攻生体制御研究領域 兼任 岐阜薬科大学生体機能解析学大講座免疫生物学教室 田中 宏幸 准教授に深甚なる謝意を表します。

本論文作成に際し、有益な御助言および御校閲を賜りました、岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 檜井 栄一 教授、上田 浩 教授、寺田 知新 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、共同研究を御快諾いただき、御懇篤なるご指導を賜りました岐阜大学応用生物科学部天然物利用化学研究室 光永 徹 教授に深謝いたします。また、研究の遂行にあたり、貴重な御協力を賜りました天然物利用化学研究室 山内 恒生 助教、川西 美帆 氏ならびに岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学教室 徳光 大樹 氏に心から感謝いたします。

最後に、本論文作成の際、多大な御協力をいただきました、一丸ファルコス株式会社 アルナシリ イダマルゴダ 開発部長、梶谷 晃明 開発部開発 2 課長ならびに研究遂行にあたり、日頃より有益な御討論とご助言を賜りました開発部諸氏に心より感謝いたします。

令和 3 年 11 月

高山 悟

## 参考文献

1. 古江増隆, 山崎雙次, 神保孝一, 土田哲也, 天谷雅行, 田中俊宏, 松永佳世子, 武藤正彦, 森田栄伸, 秋山真志, 相馬良直, 照井正, 真鍋求. (2009) 本邦における皮膚科受診患者の多施設横断四季別全国調査. *日本皮膚科学会雑誌* **119**, 1795-1809
2. Furue, M., Yamasaki, S., Jimbow, K., Tsuchida, T., Amagai, M., Tanaka, T., Matsunaga, K., Muto, M., Morita, E., Akiyama, M., Soma, Y., Terui, T., and Manabe, M. (2011) Prevalence of dermatologic disorders in Japan. *The Journal of Dermatology* **38**, 310-320
3. 高山かおる, 横関博雄, 松永佳世子, 片山一朗, 相場節也, 伊藤正俊, 池澤善郎, 足立厚子, 戸倉新樹, 夏秋優, 古川福実, 矢上晶子, 幸野健, 乾重樹, 池澤優子, 相原道子. (2020) 接触皮膚炎診療ガイドライン 2020. *日本皮膚科学会雑誌* **130**, 523-567
4. 松永佳世子. (2017) SSCI-N でつなぐ皮膚の安全. *皮膚病診療* **39**, 696-705
5. Yokoi, A., Suzuki, K., Takahashi, M., Yagami, A., and Matsunaga, K. (2017) Case of allergic contact dermatitis caused by sorbitan derivatives included in an over-the-counter topical medicament. *J Dermatol* **44**, e113-e114
6. ポーラ文化研究所. (2019) 平成から令和へ スキンケア・メイクの行動と意識のうつりかわり <<https://www.cosmetic-culture.po-holdings.co.jp/report/pdf/201130heiseireiwa.pdf>>.
7. Nazzaro-Porro, M., Passi, S., Boniforti, L., and Belsito, F. (1979) Effects of aging on fatty acids in skin surface lipids. *J Invest Dermatol* **73**, 112-117
8. Kamata, Y., Yamamoto, M., Kawakami, F., Tsuboi, R., Takeda, A., Ishihara, K., and Hibino, T. (2011) Bleomycin hydrolase is regulated biphasically in a differentiation- and cytokine-dependent manner: relevance to atopic dermatitis. *J Biol Chem* **286**, 8204-8212
9. Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M., and Hidano, A. (1991) Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin. *J Invest Dermatol* **96**, 523-526
10. Brown, S. J., Asai, Y., Cordell, H. J., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Northstone, K., Henderson, J., Alizadehfar, R., Ben-Shoshan, M., Morgan, K., Roberts, G., Masthoff, L. J., Pasmans, S. G., van den Akker, P. C., Wijmenga, C., Hourihane, J. O., Palmer, C. N., Lack, G., Clarke, A., Hull, P. R., Irvine, A. D., and McLean, W. H. (2011) Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* **127**, 661-667
11. Yagami, A., Aihara, M., Ikezawa, Z., Hide, M., Kishikawa, R., Morita, E., Chinuki, Y., Fukutomi, Y., Urisu, A., Fukushima, A., Itagaki, Y., Sugiura, S. I., Tanaka, H., Teshima, R., Kato, Z., Noguchi, E., Nakamura, M., Saito, H., and Matsunaga, K. (2017) Outbreak



- of immediate-type hydrolyzed wheat protein allergy due to a facial soap in Japan. *J Allergy Clin Immunol* **140**, 879-881 e877
12. Barker, J. N., Mitra, R. S., Griffiths, C. E., Dixit, V. M., and Nickoloff, B. J. (1991) Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* **337**, 211-214
  13. Chen, G. Y., and Nunez, G. (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* **10**, 826-837
  14. Bianchi, M. E. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**, 1-5
  15. Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., and Lotze, M. T. (2012) PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* **249**, 158-175
  16. Hatada, T., Wada, H., Nobori, T., Okabayashi, K., Maruyama, K., Abe, Y., Uemoto, S., Yamada, S., and Maruyama, I. (2005) Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* **94**, 975-979
  17. McGregor, J. M., and Hawk, J. L. M. (1999) *Acute effects of ultraviolet radiation on the skin.*, 5 ed., McGraw-Hill, New York
  18. Takagi, Y., Mori, K., Taguchi, H., Nishizaka, T., and Takema, Y. (2019) UVB sensitivity correlates with cutaneous barrier function in the skin of Japanese females. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **35**, 284-285
  19. Gilchrist, B. A. (1989) Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol* **21**, 610-613
  20. Ansel, J. C., Luger, T. A., and Green, I. (1983) The effect of in vitro and in vivo UV irradiation on the production of ETAF activity by human and murine keratinocytes. *J Invest Dermatol* **81**, 519-523
  21. Luger, T. A., Szein, M. B., Schmidt, J. A., Murphy, P., Grabner, G., and Oppenheim, J. J. (1983) Properties of murine and human epidermal cell-derived thymocyte-activating factor. *Fed Proc* **42**, 2772-2776
  22. Urbanski, A., Schwarz, T., Neuner, P., Krutmann, J., Kirnbauer, R., Köck, A., and Luger, T. A. (1990) Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J Invest Dermatol* **94**, 808-811
  23. Oxholm, A., Oxholm, P., Staberg, B., and Bendtzen, K. (1988) Immunohistological detection of interleukin I-like molecules and tumour necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo. *Br J Dermatol* **118**, 369-376
  24. Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C., and Luger, T. A. (1990) Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* **172**,

1609-1614

25. Kondo, S., Kono, T., Sauder, D. N., and McKenzie, R. C. (1993) IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *J Invest Dermatol* **101**, 690-694
26. Clydesdale, G. J., Dandie, G. W., and Muller, H. K. (2001) Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* **79**, 547-568
27. Cooper, K. D., Duraiswamy, N., Hammerberg, C., Allen, E., Kimbrough-Green, C., Dillon, W., and Thomas, D. (1993) Neutrophils, differentiated macrophages, and monocyte/macrophage antigen presenting cells infiltrate murine epidermis after UV injury. *J Invest Dermatol* **101**, 155-163
28. Ouhtit, A., Muller, H. K., Davis, D. W., Ullrich, S. E., McConkey, D., and Ananthaswamy, H. N. (2000) Temporal Events in Skin Injury and the Early Adaptive Responses in Ultraviolet-Irradiated Mouse Skin. *The American Journal of Pathology* **156**, 201-207
29. Bernard, J. J., Cowing-Zitron, C., Nakatsuji, T., Muehleisen, B., Muto, J., Borkowski, A. W., Martinez, L., Greidinger, E. L., Yu, B. D., and Gallo, R. L. (2012) Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nature medicine* **18**, 1286-1290
30. Vu, A. T., Chen, X., Xie, Y., Kamijo, S., Ushio, H., Kawasaki, J., Hara, M., Ikeda, S., Okumura, K., Ogawa, H., and Takai, T. (2011) Extracellular double-stranded RNA induces TSLP via an endosomal acidification- and NF-kappaB-dependent pathway in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **131**, 2205-2212
31. Puglia, C., Rizza, L., Offerta, A., Gasparri, F., Giannini, V., and Bonina, F. (2013) Formulation strategies to modulate the topical delivery of anti-inflammatory compounds. *J Cosmet Sci* **64**, 341-353
32. Draelos, Z. D. (2016) A pilot study investigating the efficacy of botanical anti-inflammatory agents in an OTC eczema therapy. *J Cosmet Dermatol* **15**, 117-119
33. Mollica, L., De Marchis, F., Spitaleri, A., Dallacosta, C., Pennacchini, D., Zamai, M., Agresti, A., Trisciuglio, L., Musco, G., and Bianchi, M. E. (2007) Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol* **14**, 431-441
34. Florentino, I. F., Silva, D. P. B., Galdino, P. M., Lino, R. C., Martins, J. L. R., Silva, D. M., de Paula, J. R., Tresvenzol, L. M. F., and Costa, E. A. (2016) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice. *J Ethnopharmacol* **186**, 298-304
35. Bhattacharyya, S., Gill, R., Chen, M. L., Zhang, F., Linhardt, R. J., Dudeja, P. K., and Tobacman, J. K. (2008) Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NFkappaB-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. *J*

- Biol Chem* **283**, 10550-10558
36. Tsuji, R. F., Hoshino, K., Noro, Y., Tsuji, N. M., Kurokawa, T., Masuda, T., Akira, S., and Nowak, B. (2003) Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. *Clin Exp Allergy* **33**, 249-258
  37. Alvarez-Suarez, J. M., Dekanski, D., Ristic, S., Radonjic, N. V., Petronijevic, N. D., Giampieri, F., Astolfi, P., Gonzalez-Paramas, A. M., Santos-Buelga, C., Tulipani, S., Quiles, J. L., Mezzetti, B., and Battino, M. (2011) Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. *PLoS One* **6**, e25878
  38. Edirisinghe, I., Banaszewski, K., Cappozzo, J., Sandhya, K., Ellis, C. L., Tadapaneni, R., Kappagoda, C. T., and Burton-Freeman, B. M. (2011) Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. *Br J Nutr* **106**, 913-922
  39. Joseph, S. V., Edirisinghe, I., and Burton-Freeman, B. M. (2014) Berries: anti-inflammatory effects in humans. *J Agric Food Chem* **62**, 3886-3903
  40. Zunino, S. J., Parelman, M. A., Freytag, T. L., Stephensen, C. B., Kelley, D. S., Mackey, B. E., Woodhouse, L. R., and Bonnel, E. L. (2012) Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and inflammatory markers in obese human subjects. *Br J Nutr* **108**, 900-909
  41. Parelman, M. A., Storms, D. H., Kirschke, C. P., Huang, L., and Zunino, S. J. (2012) Dietary strawberry powder reduces blood glucose concentrations in obese and lean C57BL/6 mice, and selectively lowers plasma C-reactive protein in lean mice. *Br J Nutr* **108**, 1789-1799
  42. Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., and Torronen, A. R. (2007) Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem* **55**, 1612-1619
  43. Fumagalli, M., Sangiovanni, E., Vrhovsek, U., Piazza, S., Colombo, E., Gasperotti, M., Mattivi, F., De Fabiani, E., and Dell'Agli, M. (2016) Strawberry tannins inhibit IL-8 secretion in a cell model of gastric inflammation. *Pharmacol Res* **111**, 703-712
  44. Duke, J. A., and Ayensu, E. S. (1985) *Medicinal Plants of China*, Reference Publications
  45. Yoshida, T., Chen, X. M., Hatano, T., Fukushima, M., and Okuda, T. (1987) Tannins and related polyphenols of Rosaceous medicinal plants. IV. Roxbins A and B from *Rosa roxburghii* fruits. *Chem Pharm Bull* **35**, 1817-1822
  46. Borkowski, A. W., Park, K., Uchida, Y., and Gallo, R. L. (2013) Activation of TLR3 in keratinocytes increases expression of genes involved in formation of the epidermis, lipid accumulation, and epidermal organelles. *J Invest Dermatol* **133**, 2031-2040

47. Borkowski, A. W., and Gallo, R. L. (2014) UVB radiation illuminates the role of TLR3 in the epidermis. *J Invest Dermatol* **134**, 2315-2320
48. Norris, D. A., Lyons, M. B., Middleton, M. H., Yohn, J. J., and Kashihara-Sawami, M. (1990) Ultraviolet radiation can either suppress or induce expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the surface of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **95**, 132-138
49. Strickland, I., Rhodes, L. E., Flanagan, B. F., and Friedmann, P. S. (1997) TNF-alpha and IL-8 are upregulated in the epidermis of normal human skin after UVB exposure: correlation with neutrophil accumulation and E-selectin expression. *J Invest Dermatol* **108**, 763-768
50. Higuchi, Y., and Iriyama, S. (2020) Influence of inflammatory factors on epidermal stem cells/progenitor cells due to age-related lymphatic dysfunction. Poster presented at: The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology December 11-13, Nagoya, Japan
51. Ma, Y., Wang, Y., Zhang, H., Sun, W., Li, Z., Zhang, F., Zhang, H., Chen, F., Zhang, H., An, J., and He, C. (2020) Antimicrobial mechanism of strictinin isomers extracted from the root of *Rosa roxburghii* Tratt (Ci Li Gen). *J Ethnopharmacol* **250**, 112498
52. Shah, G., Ghosh, R., Amstad, P. A., and Cerutti, P. A. (1993) Mechanism of induction of c-fos by ultraviolet B (290-320 nm) in mouse JB6 epidermal cells. *Cancer Res* **53**, 38-45
53. Aries, M. F., Hernandez-Pigeon, H., Vaissiere, C., Delga, H., Caruana, A., Leveque, M., Bourrain, M., Ravard Helffer, K., Chol, B., Nguyen, T., Bessou-Touya, S., and Castex-Rizzi, N. (2016) Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Aquaphilus dolomiae* extract on in vitro models. *Clin Cosmet Investig Dermatol* **9**, 421-434
54. Grimstad, O., Husebye, H., and Espevik, T. (2013) TLR3 mediates release of IL-1beta and cell death in keratinocytes in a caspase-4 dependent manner. *J Dermatol Sci* **72**, 45-53
55. Bian, Z. M., Elnér, S. G., and Elnér, V. M. (2009) Dual involvement of caspase-4 in inflammatory and ER stress-induced apoptotic responses in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 6006-6014

## 略語一覽

|                |  |
|----------------|--|
| AGS            | : human gastric adenocarcinoma   |
| DAMPs          | : damage-associated molecular patterns   |
| ELISA          | : enzyme-linked immuno sorbent assay   |
| GK2            | : dipotassium glycyrrhizate  |
| HMGB1          | : high mobility group box 1  |
| IL-1           | : interleukin-1  |
| IL-6           | : interleukin-6  |
| IL-8           | : interleukin-8  |
| NF- $\kappa$ B | : nuclear factor-kappa B   |
| NHEKs          | : normal human epidermal keratinocytes   |
| NLRP3          | : nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 |
| NMF            | : natural moisturizing factor  |
| PCR            | : polymerase chain reaction  |
| Poly(I:C)      | : polyinosinic-polycytidylic acid sodium   |
| PRRs           | : pattern recognition receptors  |
| QOL            | : quality of life  |
| RAGE           | : receptor for advanced glycation  |
| RRFE           | : <i>Rosa roxburghii</i> Tratt fruit extract   |
| TLRs           | : toll-like receptors  |
| TNF- $\alpha$  | : tumor necrosis factor-alpha  |
| UVB            | : ultraviolet B  |