

総 説

酸化ストレスと皮膚—光老化から全身性強皮症まで

小川文秀, 佐藤伸一

Roles of oxidative stress in photoaging and the pathogenesis of systemic sclerosis

Fumihide OGAWA and Shinichi SATO

Department of Dermatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

(Received October 23, 2006)

summary

Human skin is exposed to high amount of solar ultraviolet (UV) radiation, as well as to other environmental oxidants. Photoaging refers to the effect of long-term UV exposure and sun damage superimposed on intrinsically aged skin. The clinical photoaging features are dyspigmentation, laxity, wrinkles, and cutaneous malignancies. Most conspicuous photoaging change in dermis, which is caused by elastin materials accumulation, is termed "solar elastosis". Reactive oxygen species are known to be generated by UV radiation, and play an important role of photoaging. Although the pathogenesis of systemic sclerosis (SSc) remains unknown, oxidative stress has been suggested to contribute to clinical manifestations associated with SSc, such as vascular damage including Raynaud's phenomenon. This review focuses on recent data including our data which have demonstrated the critical role of oxidative stress in photoaging and the pathogenesis of SSc.

Key words—Photoaging; Oxidative stress; Systemic sclerosis; methionine sulfoxide reductase (MsrA); 8-isoprostane

抄 録

我々の皮膚は常に外界からの様々な刺激にさらされている。その刺激の代表的なものとして太陽光線中の紫外線があげられる。紫外線は皮膚癌の発生の誘因となる他に、紫外線の曝露により皮膚には光老化と称される変化が生じてくる。光老化の特徴的な変化として皮膚表面のびまん性の色素沈着と深い皺があげられるが、その変化を特徴づけるものとして皮膚真皮における solar elastosis と称される膠原線維・弾性線維の変化がある。この皮膚光老化には紫外線による酸化ストレスが深く関与していると考えられている。一方、酸化ストレスが関与する全身疾患の一つとして全身性強皮症 (systemic sclerosis ; SSc) があげられる。SScは全身の皮膚硬化を主徴とする膠原病であるが、レイノー症状をはじめとする血管障害も病態形成に深く関与していると考えられている。本稿では、酸化ストレスが皮膚に与える影響を光老化と SSc に関して我々の研究結果とこれまでの研究知見を中心に概説する。

I. はじめに

我々の皮膚は常に外界からの様々な刺激に曝されている。物理学的刺激、化学的刺激、温度変化そして紫外線曝露などである。その刺激の一つである紫外線曝露は皮膚癌の発生率を高める誘因として知られているが、同時に、皮膚の形態的变化を引き起こす誘因ともなっている。紫外線曝露によって特徴づけられる皮膚形態の変化を光老化と称する。その変化は真皮における solar elastosis と呼ばれる膠原線維・弾性線維の変化が主体であるが、この solar elastosis の発生に活性酸素・酸化ストレスが重要な

役割を果たしていることが明らかにされてきている。このような酸化ストレスに対して皮膚には抗酸化機構が存在しその影響を最小限に抑える働きをしている。また、酸化ストレスは紫外線曝露のみならず、血管の虚血・再還流によっても発生する。

全身性強皮症 (systemic sclerosis ; SSc) は全身の皮膚硬化を主徴とする膠原病であるが、SScの主要な症状としてレイノー症状をはじめとする血管障害が挙げられる。SScでの血管障害による活性酸素の発生は酸化ストレスとなり SScの臓器病変の出現や、SScの病勢に影響を与えていると考えられている。本総説においては、光老化における酸化ストレスの関与と抗酸化酵素の働き、また、SScにおける酸化ストレスの病勢・病状に対する関与を我々の研

究を中心に現在までの報告を含めて概説したい。

II. 光老化とは

通常われわれの皮膚は加齢に伴い萎縮・菲薄化してくる。一方、農業従事者や戸外労働者など長期間紫外線に曝された皮膚は加齢による皮膚の萎縮性的変化を伴わず、項部菱形皮膚と呼ばれるような深い皺、不規則な色素沈着、弾力性のない皮膚となってくる(図 1A)。この様な長期間紫外線に暴露された皮膚に生じる特徴的な変化は光老化と称される。この状態の皮膚を病理学的に検討すると表皮の肥厚と真皮に好塩基性の均一な色調を持つ物質が認められ、正常な膠原線維・弾性線維の構造が消失しているのが確認できる(図 1B)。この真皮に認められる変化を solar elastosis と呼び、紫外線の影響により変性した弾性線維によるものと考えられている。

加齢による老化皮膚では、表皮の萎縮、真皮の線維芽細胞の減少とそれに伴うコラーゲン産生の減少、真皮のエラスチン量の低下が認められ、弾力のない、菲薄化した皮膚となる。一方、光老化では、老化皮膚と比較すると表皮は肥厚し、真皮の線維芽細胞の増加と炎症細胞浸潤の増加はあるもののコラーゲン量は老化と比較しさらに減少し、真皮のエラスチン量の増加が起こり、最終的には solar elastosis という特徴的な病理所見をとることになると考えられている¹⁾。

この長期間の紫外線曝露による光老化のメカニズムを詳細に検討するためにヘアレスマウス (Skh-1) に UVA を長期間照射した。その結果、照射群ではヒトの光老化と同じように深い皺や色素沈着などが認められた(図 2)。組織学的に検討したところ 6 週齢の比較的若いマウスと比較すると老化したマウ

スでは表皮が萎縮して菲薄化が認められるが(図 3C)、UVA 照射群では非照射群と比較し、有意な表皮の肥厚が認められ、また真皮においては線維芽細胞の増加と炎症細胞の浸潤の増加が確認できた(図 3B)。光老化に特徴的な solar elastosis はマウスでは再現しにくいとの過去の報告と一致して、この研究の際にも明らかな solar elastosis は認められなかった。しかし、照射群では真皮の弾性線維の量が非照射群と比較して増加し、不規則な太さの弾性線維の配列の乱れと弾性線維の形態異常を示す多数の雨粒様の断面が明らかにされている(図 4)。この表皮と真皮の紫外線による変化は以前の報告と一致している^{2~4)}。

このように光老化により真皮の膠原線維と弾性線維の変化が生じるが、膠原線維の成分であるコラーゲン、弾性線維の成分であるエラスチンも共に真皮の線維芽細胞から産生される。また、光老化皮膚に

Skin change of the hairless mouse (12 months)

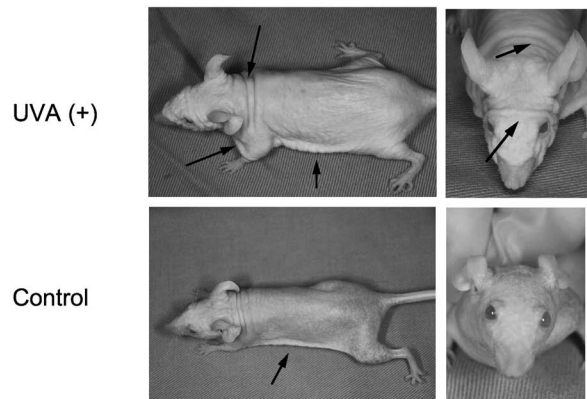


図 2 12 か月間 UVA 照射したヘアレスマウスの皮膚変化
UVA 照射群では著明な皮膚肥厚、色素沈着が認められ、皮膚が全体的に粗造化している。

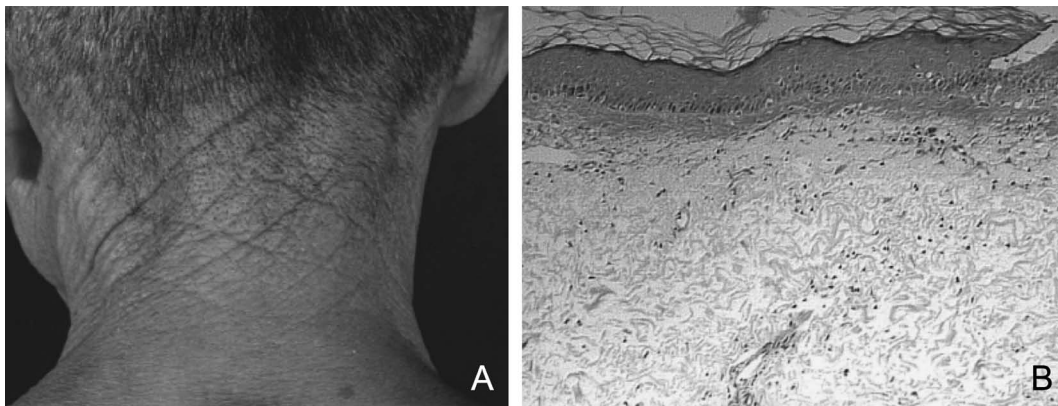


図 1
A: 長期間日光に暴露された後頸部皮膚 (項部菱形皮膚) B: 典型的な紫外線曝露による表皮・真皮の変化 (H & E 染色)

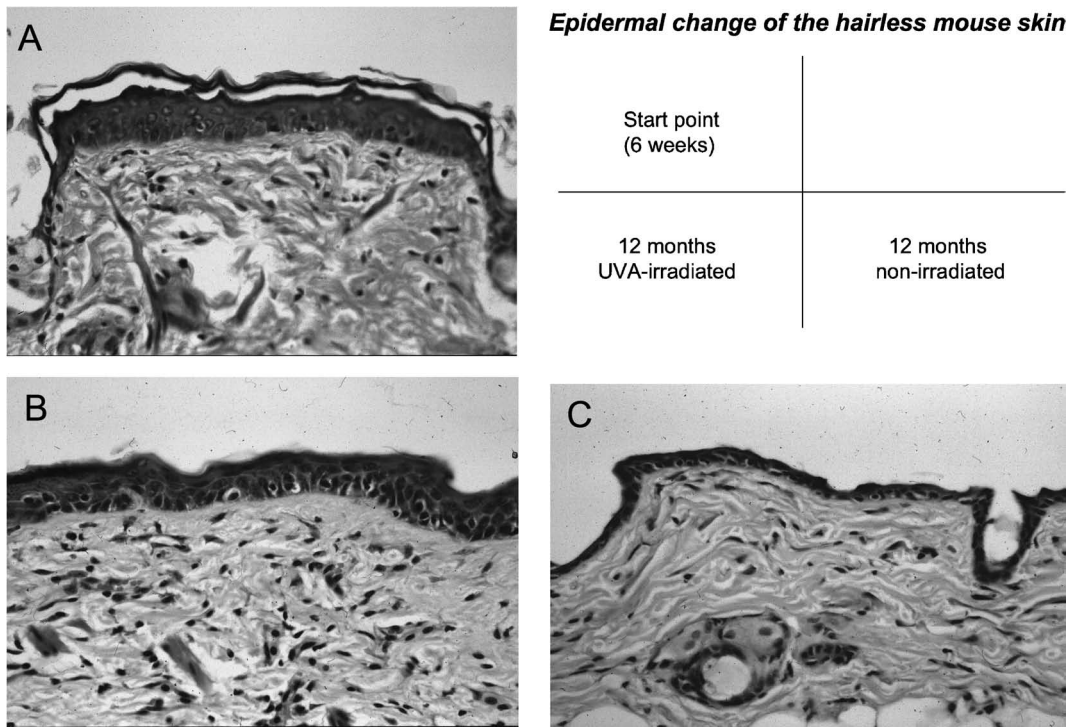


図3 UVA 長期間照射による表皮・真皮の変化 (H & E 染色)

A 紫外線照射開始時の皮膚 (6週齢) : 表皮は厚く, 真皮の線維芽細胞も散見される B UVA12 か月照射後の皮膚 : 表皮は厚く, 真皮の線維芽細胞の増加, 炎症細胞浸潤の増加が認められる C UVA 非照射群の皮膚 : 照射開始時と比較して著明な表皮の萎縮 (菲薄化) が認められ, 真皮の線維芽細胞・炎症細胞浸潤も試験開始時と大きな変化は認めない

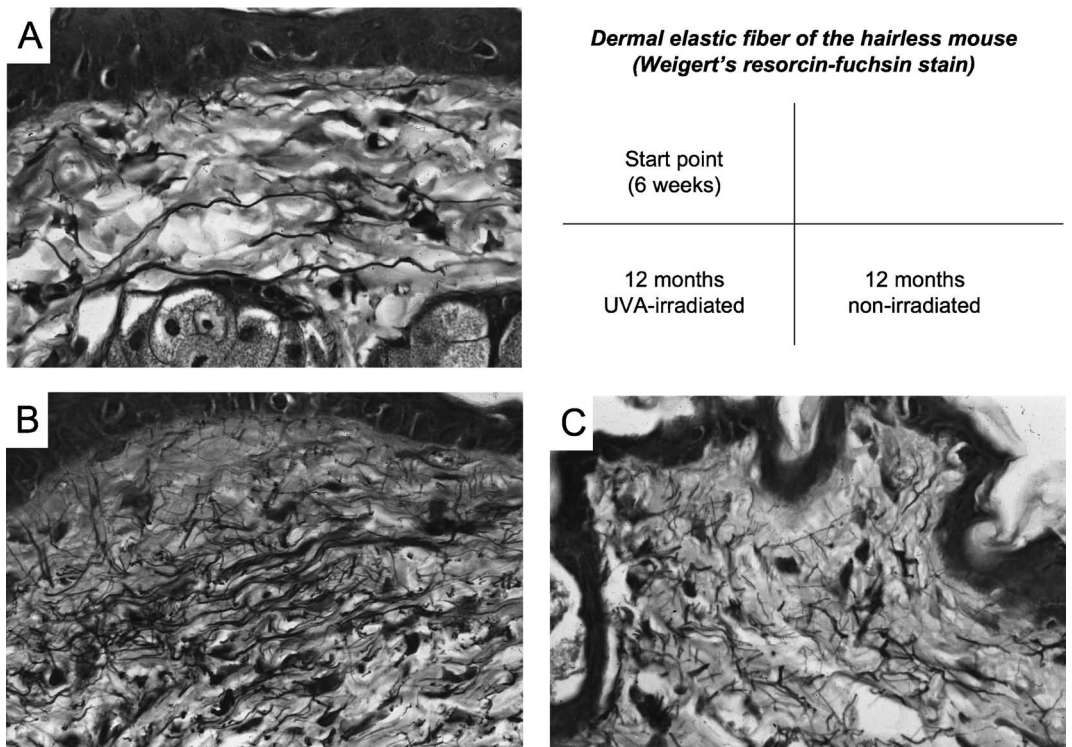


図4 UVA 長期間照射による真皮弾性線維の変化

A 照射開始時 : 弾性線維の走行はなめらかであり, 断裂像や配列の乱れも認めない B UVA12 か月照射後 : 弾性線維は増加し, その走行は乱れ, 雨粒様の弾性線維の断面が多数認められる C UVA 非照射群 : 照射群と比較して弾性線維の配列の乱れは少ない

おいては老化皮膚と比較してさらにコラーゲン量が低下することより、コラーゲンの分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) の検討を行った。過去に type I collagenase である MMP-1 をはじめとする種々の MMP が光老化皮膚に重要な役割を持つことが報告されているが^{5~8)}、エラスチンも分解することのできる type IV collagenase である MMP-2, MMP-9 の検討を行い、また、光老化皮膚では弾性線維が増加していたことより、その構成成分であるエラスチン産生についての検討も行った。

まず、エラスチンの発現を紫外線照射マウス由来皮膚で免疫染色にて検討した結果、紫外線照射マウスでは真皮線維芽細胞にエラスチンの産生の亢進が認められた。また、MMP-2 の発現は変化がなかったものの、MMP-9 の発現がエラスチンと同様に真皮の線維芽細胞で増加していた。さらに UVA 照射群、非照射群のマウスより線維芽細胞を培養し mRNA の発現を比較した。その結果、紫外線照射群マウスから培養した皮膚線維芽細胞においても MMP-9 の発現が非照射群と比較して 4 ヶ月照射後より有意に上昇していた (図 5)。一方、MMP-2 の発現は 12 ヶ月後まで変化を認めなかった。Elastin の産生に関しては elastin の前駆物質である tropoelastin の mRNA の発現を検討したところ、12 ヶ月照射時点で UVA 照射群で tropoelastin の mRNA の発現が非照射群と比較して上昇していた。

このように光老化皮膚ではコラーゲン・エラスチンの分解促進とエラスチンの合成促進が同時に引き

起こされていることが示された。過去の報告でも培養した線維芽細胞への紫外線照射または露光部皮膚などで MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-9 の有意な上昇が認められている^{5~8)}。以上の結果より、紫外線の慢性・反復照射により膠原線維・弾性線維の合成・分解が繰り返され、その結果、修復が不十分な膠原線維・弾性線維が真皮に蓄積し、光老化の特徴的な皮膚を形成する要因の一つとなっていることが考えられる。

紫外線照射により皮膚には酵素の発現を含む多様な変化が生じるが、紫外線による障害の約 50% は紫外線によって生じるフリーラジカルの影響であると考えられている⁹⁾。

III. 紫外線と酸化ストレス

UVA と UVB は hydrogen peroxide, superoxide anion, singlet oxygen などの様々な活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) を細胞内で発生することが知られている^{10,11)}。また、ROS は細胞の DNA のみならず、脂質やタンパクも傷害することが明らかにされている^{12,13)}。紫外線により発生した ROS は細胞のレセプターやそのリガンドに影響を与え^{14,15)}、表皮角化細胞や真皮線維芽細胞からの interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosis factor- α (TNF- α) などのサイトカイン産生を引き起こし¹⁴⁾、さらには転写因子に影響を与え、AP-1 や NF- κ B の活性化を引き起こし前述したような MMP の産生増加を誘導している^{16~19)}。

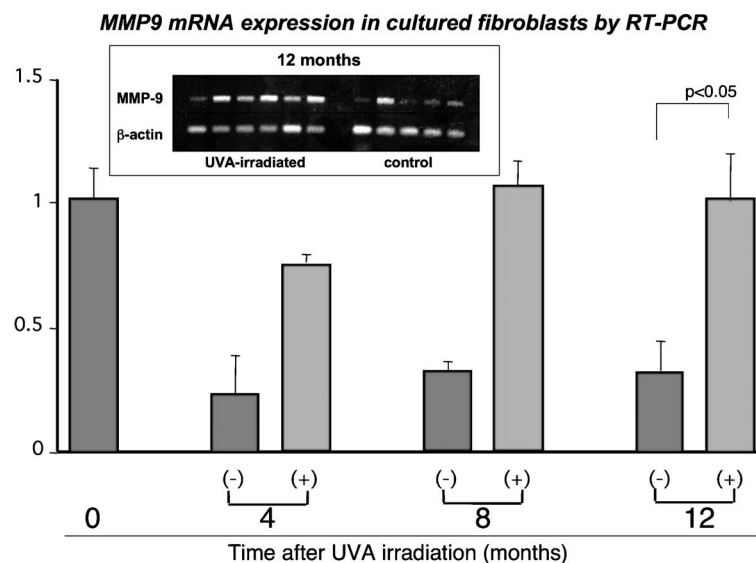


図 5 ヘアレスマウスから培養した皮膚線維芽細胞の MMP-9 mRNA の発現。UVA 照射開始 4 か月後より、MMP-9 mRNA の発現は照射群で増強している。

この紫外線により生じた酸化ストレスの、脂質、タンパク質、DNA への影響を緩和するために皮膚には酵素学的あるいは非酵素学的な抗酸化システムが構築されている²⁰⁾。内因性の抗酸化物質ではビタミン E、コエンザイム Q10、アスコルビン酸、カロチノイドなどが挙げられ²¹⁾、抗酸化酵素としては superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase などがある²²⁾。この抗酸化システムと光老化の関係を酸化タンパク、抗酸化酵素の分布から検討すると、表皮には酸化タンパクは非常に少なく、抗酸化酵素の発現が非常に多いことが明らかになり、それとは対照的に、真皮においては酸化タンパクの発現が非常に多い一方で、抗酸化酵素の発現が非常に低いことが明らかにされた²³⁾。

つまり、UVA や UVB などの紫外線に曝されやすい表皮にはその影響を排除するための抗酸化システムが発達しているが、真皮ではそのシステムが表皮ほど構築されていないため、酸化ストレスの結果としての酸化タンパクの蓄積が solar elastosis を中心とした真皮の変化として表現されていると考えられた。そこで表皮に発達している抗酸化システムには ROS を遮断 (scavenge) する酵素だけでなく、一旦形成された酸化タンパクをもとの状態にまで還元する酵素 (antioxidant repair enzyme) の存在を予想した。

IV. 抗酸化酵素 MsrA と光老化の関係

この様な修復酵素の一つとして注目されている酵素に methionine sulfoxide reductase (Msr) がある。この酵素は光学異性体特異的にメチオニンサルフォキシド (methionine sulfoxide; MetO) をメチオニン (Met) に還元する酵素である²⁴⁾。Methionine sulfoxide A (MsrA) は methionine-S-sulfoxide (MetSO) を、methionine sulfoxide B (MsrB) は methionine-R-sulfoxide (MetRO) をそれぞれ Met に還元する²⁵⁾。

MsrA は最初に *Escherichia coli* から分離され、その後、ヒトの生体内でも種々の組織にいろいろなレベルで発現していることが確認された²⁶⁾。細胞内では MsrA は細胞質とミトコンドリアに分布していることが明らかとなった^{27,28)}。タンパク質中のメチオニン残基の酸化によりタンパク質は不活性化されるが、MsrA はその MetSO を Met に還元し、タンパク質の働きを正常化すると考えられている。MsrA が働くためには他の抗酸化酵素と異なり金属

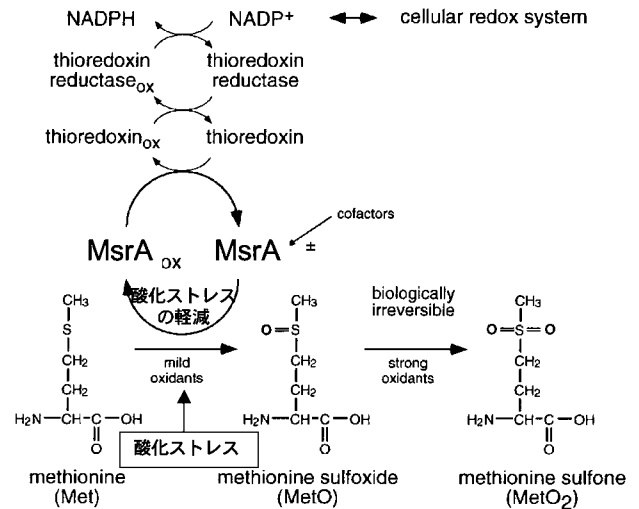


図6 Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) の酸化・還元システム

や補酵素を必要としないが、酸化された MsrA を還元するために thioredoxin や thioredoxin reductase から構成される thioredoxin regenerating system が必要となる (図6)²⁹⁾。この Met から MetO への酸化は翻訳後修飾として働くため、細胞内のシグナル伝達を変化させ³⁰⁾、また、疾患においては肺気腫、白内障の形成、関節リウマチに関係があると考えられている^{31,32)}。また、皮膚においては色素異常の一つである尋常性白斑部でのメチオニン残基の酸化が報告されている³³⁾。さらに、酸化タンパクの集積は細胞の老化を表すと考えられているため¹²⁾、MetO を還元するシステムは ROS 存在下での細胞の生存に不可欠となる³⁴⁾。最近の研究では MsrA のノックアウトマウスでは生存期間が短くなるのに対し³⁵⁾、MsrA を過剰発現したショウジョウバエにおいては生存期間が延長することが報告されている³⁶⁾。そこで、我々はヒト皮膚における MsrA の局在とその誘導について検討を行った。臀部の皮膚に紫外線を反復照射したところ、MsrA の発現は照射群で有意に上昇しており、しかも、MsrA の発現は真皮ではほとんど変化が認められず、表皮で増強していることが確認できた (図7)。また、不死化表皮角化細胞である HaCaT cell を用いて MsrA の誘導を試みたところ、紫外線の中でも波長の短い UVB では MsrA の発現は減弱したものの、波長が長く、皮膚深部までの深達度が高い UVA で MsrA の発現が増強された。また、ROS の代表的な刺激であると考えられる hydrogen oxide の刺激では、低濃度の刺激では MsrA の発現が増強したものの、高濃

Skin MsrA expression following repetitive solar simulated UV exposure

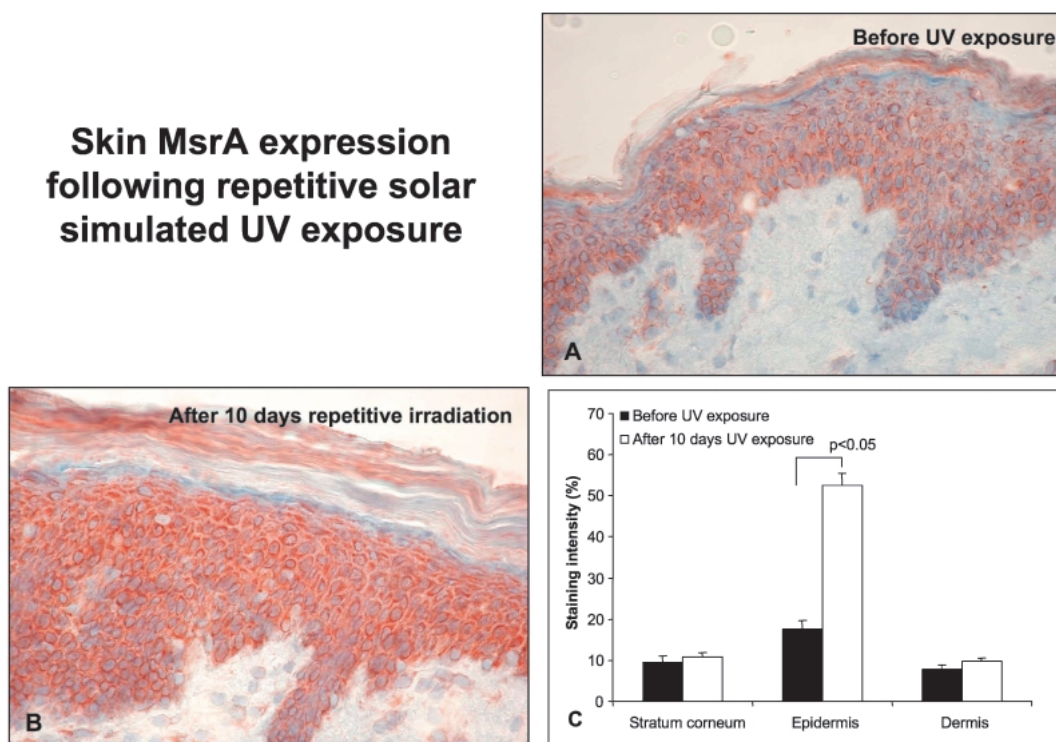


図7 Solar simulator 刺激による MsrA 発現変化
刺激後 MsrA の発現は増加しており、特に表皮における著しい MsrA の発現増加が認められる

度では逆に MsrA の発現が低下することが見いだされた。この実験では前項で述べたように、UVA 照射により発生した ROS が MsrA を誘導したと考えられる。一方、UVB は MsrA を誘導せず、高用量ではむしろ MsrA の発現低下を引き起こしたわけだが、その原因の一つとして UVB によって引き起こされたアポトーシスと UVB により誘導された細胞内の hydrogen oxide の影響が考えられる³⁷⁾。

UVB は DNA に直接障害を与えてアポトーシスを誘導するだけでなく、hydrogen oxide を細胞内で発生させアポトーシスを引き起こすのである。今回 MsrA 発現が増強した hydrogen oxide の濃度はこのアポトーシスが誘導された濃度と比較し 100 分の 1 以下の低濃度であった。表皮はこのようにマイルドな酸化ストレスに対しては MsrA の発現を誘導することによりその影響を最小限に止めようとしていると考えられる。一方、真皮での MsrA の発現は表皮と比較して非常に弱く、ヒト臀部への UV 照射でも変化はほとんど認められなかった (図 7)。以上のことより、真皮においては MsrA の活性が低いために酸化ストレスが蓄積しやすく、それが最終的には solar elastosis として光老化皮膚で表現されている可能性が考えられた³⁸⁾。

V. 全身性強皮症と酸化ストレス

SSc は線維化や血管障害が皮膚のみならず、全身の諸臓器に出現する結合織疾患であり、免疫異常を背景にもつ。これまで述べたように光老化による酸化ストレスは膠原線維の変化を誘導すると同時に、膠原線維に変化をきたす疾患である SSc においても重要な役割を果たしていることが考えられる。酸化ストレスは SSc の血管障害や線維化そして抗核抗体の産生に関与している可能性が示唆されている³⁹⁾。

レイノー症状は血管障害、特に血管内皮の機能不全を臨床的に最も反映する症状であり、血管内皮から産生され血管拡張作用を持つ nitric oxide (NO) の産生低下がレイノー症状出現の原因の一つと考えられている。また、レイノー症状による虚血・再灌流はそれ自体が ROS の産生を引き起こすとされている。そのため多くの SSc における酸化ストレスの役割は nitric oxide (NO) に焦点が置かれ研究されてきた。しかしながら、SSc における NO の役割については相反する報告が多数存在し、一定の見解が得られていない⁴⁰⁾。例えば、血清中の NO が上昇しているという報告と低下しているという報告が存在し、また、NO の病理学的、病因学的役割につ

いても様々な矛盾する報告が存在する。NOは血管拡張作用があるためSScにおける末梢の虚血を改善させるといった報告がある一方で⁴¹⁾、レイノー症状の後の虚血再灌流状態で生成されたNOがヒドロキシラジカルを合成し、組織障害に働くといった研究などが存在する⁴²⁾。

VI. 酸化ストレスマーカー

8-isoprostane とSScの病勢

そこでSScにおける酸化ストレスの関与を検討するためにマーカーとして8-isoprostaneを用いた。8-isoprostaneはエイコサノイドの一種であり、組織内のリン脂質が活性酸素により酸化され生じる物質である⁴³⁾。生化学的に安定した物質であるために酸化ストレスを評価する有用なマーカーであると考えられている。実際に喫煙者⁴⁴⁾、心疾患⁴⁵⁾、呼吸器疾患⁴⁶⁾で正常人と比較して上昇が認められることが報告されている。

そこで、SScにおける血清中8-isoprostane値とその臨床的相関について検討した⁴⁷⁾。まずSScにおける血清中8-isoprostaneを測定した。Diffuse cutaneous SSc (dSSc), limited cutaneous SSc (lSSc)患者における血清中8-isoprostane値は健常人と比較して75倍もの高値で有意に上昇していた(図8)。一方、dSSc患者とlSSc患者の間においては有意な差は認められなかった。驚くべきことに99%のSSc患者の8-isoprostane値は健常人の平均+3SD値よりも高値であった。このように、ほとんどのSSc患者が健常人よりも高値を示したため、8-isoprostane値でSSc患者を健常人と区別することが可能ではないかと思われた。

次にSScにおける血清中8-isoprostane値と臨床所見との相関の検討を行った。初診時における血清

中8-isoprostane値と臨床所見との相関では、%VC ($r=-0.42$, $p<0.01$)、%DLco ($r=-0.0049$, $p<0.01$)のように呼吸機能と負の相関が認められた(図9)。また、腎血管抵抗をカラードップラー法にて評価したpulsatility index (PI)値と血清中8-isoprostane値を比較すると、正の相関が有意に認められた($r=0.53$, $p<0.01$)。このことより、血管病変との相関が示唆された。しかしながら、8-isoprostane値と皮膚潰瘍との相関などは確認できなかった。また、血清中のIgG値($r=0.43$, $p<0.001$)、IgA値($r=0.44$, $p<0.001$)と正の相関を示し、抗ガラクトース欠損IgG抗体(CARF)値とも正の相関を示した($r=0.60$, $p<0.001$)。これは、上昇している8-isoprostane値が何らかの免疫異常に関与している可能性を示唆するものであると考えられた。

この研究において血清中8-isoprostane値は腎血

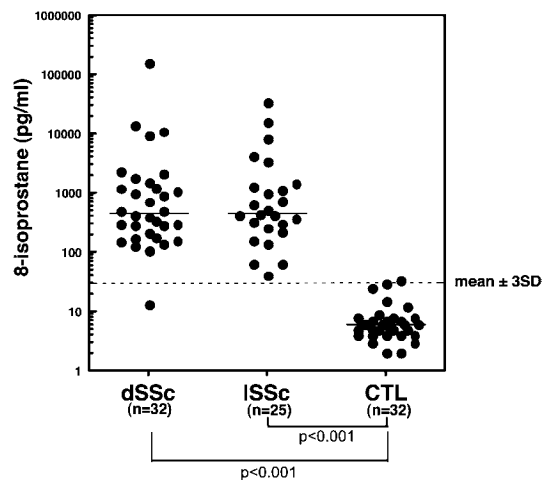


図8 全身性強皮症(SSc)血清中の8-isoprostane値
Diffuse cutaneous systemic sclerosis (dSSc), limited cutaneous systemic sclerosis (lSSc)患者血清中には健常人(CTL)と比較して有意に高値な8-isoprostaneを認める

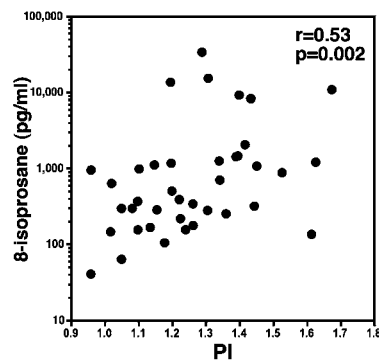
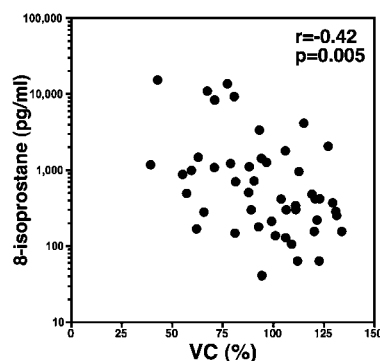


図9 全身性強皮症(SSc)患者血清中8-isoprostane値と臨床検査所見との相関
呼吸機能検査で%VCと負の相関を、腎血管抵抗をpulsatility index (PI)値で評価すると正の相関をいずれも有意に認める

管障害と相関すると示されたが、血管内皮細胞の障害は SSc において中心的な役割を果たすと考えられている。その最も特徴的なものは血管の攣縮によって引き起こされる手指のレイノー症状であるが、レイノー症状は手指のみならず、冠動脈や腎臓においても発生すると報告されている⁴⁸⁾。そしてレイノー症状による虚血再灌流が活性酸素の発生を引き起こし、血管内皮細胞の障害を起こすことが示されている^{42,49)}。また、8-isoprostane 自体が血管収縮作用を持つために、血小板凝集を引き起こし、血管内皮への単球の接着を促し、血管閉塞、炎症、さらに血管の攣縮を引き起こす可能性が指摘されている。このように過剰な酸化ストレスが SSc の血管障害に重要な役割を果たしていることが示唆された。

VII. SSc における抗 MsrA 自己抗体

次に我々は、SSc における過剰な酸化ストレスの原因として前述した抗酸化修復酵素 MsrA に対する自己抗体の存在を考え、SSc 患者血清中の抗 MsrA 抗体の測定を ELISA 法を用いて relative OD での検討で行った (投稿準備中)。SSc 患者血清中 (mean \pm SEM, 0.70 \pm 0.04) には健常人 (0.52 \pm 0.03, $p < 0.01$) と比較して有意に高値の抗 MsrA 抗体が存在した。一方、病型間での比較では、dSSc 患者血清中と ISSc 患者血清中の抗 MsrA 自己抗体に明らかな差は認められなかった。

さらに血清中抗 MsrA 自己抗体と臨床症状・検査所見との相関を検討した。初診時における血清中抗 MsrA 自己抗体と臨床所見との相関では、%VC ($r = -0.38$, $p < 0.01$), %DLco ($r = -0.26$, $p < 0.05$) のように呼吸機能と負の相関が認められた。また、腎血管抵抗を PI 値で評価したところ正の相関が認められた ($r = 0.31$, $p < 0.05$)。以上のことより、SSc 患者血清中の抗 MsrA 自己抗体の存在は、血管病変との相関が示唆された。また、SSc 患者血清中の 8-isoprostane 値とは特に強い正の相関 ($r = 0.52$, $p < 0.001$) が確認できた。

以上のことより、SSc 患者血清中の抗 MsrA 抗体の存在は、8-isoprostane 値と強い相関が認められたことからわかるように、SSc 患者における酸化ストレスの蓄積に重要な役割を果たしていると考えられ、その酸化ストレスは血管病変と特に関係が深いと考えられた。

VIII. おわりに

ここまで述べたように酸化ストレスは紫外線曝露による光老化のみならず、皮膚硬化を主体とし血管障害が疾患の形成に重要な役割を果たしている SSc の病勢・病態にも深く関与していることが明らかとなりつつある。今後、酸化ストレスの研究を進めることにより光老化を軽減する薬剤や SSc の新規治療が確立されることが期待される。

文 献

- 1) Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morrison WL, Sauder DN. : Photoaging : mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* **55** (1) : 1-19, 2006.
- 2) Lavker RM, Zheng PS, Dong G. : Morphology of aged skin. *Clin Geriatr Med* **5** (1) : 53-67, 1989.
- 3) El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. : Intrinsic aging vs. photoaging : a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* **11** (5) : 398-405, 2002.
- 4) Kligman LH. : Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Clin Geriatr Med* **5** (1) : 235-251, 1989.
- 5) Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H, Takahashi M, Ito M, et al. : The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **288** (1) : 39-44, 1996.
- 6) Oh JH, Kim A, Park JM, Kim SH, Chung AS. : Ultraviolet B-induced matrix metalloproteinase-1 and -3 secretions are mediated via PTEN/Akt pathway in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* **209** (3) : 775-785, 2006.
- 7) Onoue S, Kobayashi T, Takemoto Y, Sasaki I, Shinkai H. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci* **33** (2) : 105-111, 2003.
- 8) Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Shao Y, Datta S, Wang ZQ, et al. : Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*

- 117(2) : 219–226, 2001.
- 9) Bernstein EF, Brown DB, Schwartz MD, Kaidbey K, Ksenzenko SM. : The polyhydroxy acid gluconolactone protects against ultraviolet radiation in an in vitro model of cutaneous photoaging. *Dermatol Surg* **30**(2 Pt 1) : 189–195 ; discussion 196, 2004.
 - 10) Kulms D, Zeise E, Poppelmann B, Schwarz T. : DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* **21**(38) : 5844–5851, 2002.
 - 11) Cadet J, Douki T, Pouget JP, Ravanat JL. : Singlet oxygen DNA damage products : formation and measurement. *Methods Enzymol* **319** : 143–153, 2000.
 - 12) Berlett BS, Stadtman ER. : Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**(33) : 20313–203166, 1997.
 - 13) de Gruijl FR. : Photocarcinogenesis : UVA vs UVB. *Methods Enzymol* **319** : 359–366, 2000.
 - 14) Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. : Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* **138**(11) : 1462–1470, 2002.
 - 15) Heck DE, Gerecke DR, Vetrano AM, Laskin JD. : Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**(3) : 288–297, 2004.
 - 16) Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Lin P, McPhillips F, Wang Z, et al. : Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest* **101**(6) : 1432–1440, 1998.
 - 17) Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. : Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* **337**(20) : 1419–1428, 1997.
 - 18) Reelfs O, Tyrrell RM, Pourzand C. : Ultraviolet a radiation-induced immediate iron release is a key modulator of the activation of NF- κ B in human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* **122**(6) : 1440–7, 2004.
 - 19) Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. : Photoaging : pathogenesis, prevention, and treatment. *Clin Geriatr Med* **17**(4) : 643–659, v–vi, 2001.
 - 20) Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L. : The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol* **29** : 26–42, 2001.
 - 21) Hata TR, Scholz TA, Ermakov IV, McClane RW, Khachik F, Gellermann W, et al. : Non-invasive raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin. *J Invest Dermatol* **115**(3) : 441–448, 2000.
 - 22) Leccia MT, Yaar M, Allen N, Gleason M, Gilchrist BA. : Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* **10**(4) : 272–279, 2001.
 - 23) Sander CS, Chang H, Salzmann S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, et al. : Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* **118**(4) : 618–625, 2002.
 - 24) Sharov VS, Schoneich C. : Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free Radic Biol Med* **29**(10) : 986–994, 2000.
 - 25) Weissbach H, Etienne F, Hoshi T, Heinemann SH, Lowther WT, Matthews B, et al. : Peptide methionine sulfoxide reductase : structure, mechanism of action, and biological function. *Arch Biochem Biophys* **397**(2) : 172–178, 2002.
 - 26) Kuschel L, Hansel A, Schonherr R, Weissbach H, Brot N, Hoshi T, et al. : Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). *FEBS Lett* **456**(1) : 17–21, 1999.
 - 27) Vouquier S, Mary J, Friguet B. : Subcellular localization of methionine sulphoxide reductase A (MsrA) : evidence for mitochondrial and cytosolic isoforms in rat liver cells. *Biochem J* **373**(Pt 2) : 531–537, 2003.
 - 28) Hansel A, Kuschel L, Hehl S, Lemke C, Agricola HJ, Hoshi T, et al. Mitochondrial targeting of the human peptide methionine sulfoxide reductase (MSRA), an enzyme involved in the repair of oxidized proteins. *Faseb J* **16**(8) : 911–913, 2002.
 - 29) Hoshi T, Heinemann S. : Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* **531**(Pt 1) : 1–11, 2001.
 - 30) Wizemann TM, Moskovitz J, Pearce BJ, Cundell D, Arvidson CG, So M, et al. Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15) :

- 7985–7990, 1996.
- 31) Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins : tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* **18**(1) : 93–105, 1995.
- 32) Squier TC, Bigelow DJ. Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis. *Front Biosci* **5** : D504–D526, 2000.
- 33) Schallreuter KU, Elwary SM, Gibbons NC, Rokos H, Wood JM. : Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂ : more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun* **315**(2) : 502–508, 2004.
- 34) Moskovitz J, Flescher E, Berlett BS, Azare J, Poston JM, Stadtman ER. : Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24) : 14071–14075, 1998.
- 35) Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, Requena J, Berlett BS, Stadtman ER. : Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23) : 12920–12925, 2001.
- 36) Ruan H, Tang XD, Chen ML, Joiner ML, Sun G, Brot N, et al. : High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5) : 2748–2753, 2002.
- 37) Chang H, Oehrl W, Elsner P, Thiele JJ. : The role of H₂O₂ as a mediator of UVB-induced apoptosis in keratinocytes. *Free Radic Res* **37**(6) : 655–663, 2003.
- 38) Ogawa F, Sander CS, Hansel A, Oehrl W, Kasperczyk H, Elsner P, et al. : The repair enzyme peptide methionine-S-sulfoxide reductase is expressed in human epidermis and upregulated by UVA radiation. *J Invest Dermatol* **126**(5) : 1128–1134, 2006.
- 39) Herrick AL, Rieley F, Schofield D, Hollis S, Braganza JM, Jayson MI. : Micronutrient antioxidant status in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J Rheumatol* **21**(8) : 1477–1483, 1994.
- 40) Matucci Cerinic M, Kahaleh MB. : Beauty and the beast. The nitric oxide paradox in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **41**(8) : 843–847, 2002.
- 41) Ignarro LJ. : Endothelium-derived nitric oxide : actions and properties. *Faseb J* **3**(1) : 31–36, 1989.
- 42) Butler AR, Flitney FW, Williams DL. : NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology : a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* **16**(1) : 18–22, 1995.
- 43) Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* **51**(1) : 1–9, 1996.
- 44) Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. : Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* **332**(18) : 1198–1203, 1995.
- 45) Iuliano L, Pratico D, Greco C, Mangieri E, Scibilia G, FitzGerald GA, et al. Angioplasty increases coronary sinus F₂-isoprostane formation : evidence for in vivo oxidative stress during PTCA. *J Am Coll Cardiol* **37**(1) : 76–80, 2001.
- 46) Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Corradi M, van Rensen L, Geddes DM, et al. : Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* **55**(3) : 205–209, 2000.
- 47) Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Hasegawa M, Takehara K, et al. : Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* **45**(7) : 815–818, 2006.
- 48) Cannon PJ, Hassar M, Case DB, Casarella WJ, Sommers SC, LeRoy EC. : The relationship of hypertension and renal failure in scleroderma (progressive systemic sclerosis) to structural and functional abnormalities of the renal cortical circulation. *Medicine (Baltimore)* **53**(1) : 1–46, 1974.
- 49) Suematsu M, Wakabayashi Y, Ishimura Y. : Gaseous monoxides : a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc Res* **32**(4) : 679–686, 1996.