メラニン産生阻害剤と皮膚色素沈着のメカニズムに関する 研究

2016年7月

長谷川 聖高

(千葉大学審査学位論文)

メラニン産生阻害剤と皮膚色素沈着のメカニズムに関する 研究

2016年7月

長谷川 聖高

-	1 1/1
	1 //7
\vdash	コンヘ

1.	序章	4
2.	Elephantopus mollis H.B. and K.の抽出物は、B16 マウスメラノーマ細胞におい	て,
	Microphthalmia-Associated Transcription Factor 発現を抑制することによりメラノ	ジェ
	ネシスを抑制する	8
	要旨	8
	序論	8
	材料と方法	9
	結果	12
	考察	14
	参考文献	15
	図の説明文	18
	図	20
3.	表皮の色素レシピエント細胞が,色素沈着のパターンを決める	24
	要旨	24
	序論	24
	材料と方法	26
	結果	31
	考察	36
	参考文献	38
	図の説明文	42
	図	44
4.	Keratinocyte Growth Factor はヒトの顔面の日光性色素斑と肝斑の両方の色素沈着	が消
	失しにくい原因となっている可能性がある	49
	要旨	49
	序論	49
	材料と方法	5 0
	結果	51
	考察	52
	参考文献	5 3
	図の説明文	54
	図	55
5.	Keratinocyte Growth Factor の培養ヒトメラノサイトの増殖および分化に与える	影響
		57
	要旨	
	序論	57

	材料と方法	59
	結果	62
	考察	64
	参考文献	65
	表	69
	図の説明文	70
	図	72
6.	. 日光性色素斑部位における血流および血管形成の亢進	76
	要旨	76
	序論	76
	材料と方法	77
	結果	78
	考察	79
	参考文献	81
	表	83
	図の説明文	84
	図	85
7.	. 総合考察	91
8.	謝辞	95

1. 序章

動物の体表を覆っている皮膚は体の中で最大の臓器であり、微生物や化学物質などの外的因子の侵入や、紫外線や放射線などから体を守る重要な役割を果たしている。哺乳類の皮膚は体表から順に、表皮、真皮、皮下組織の三層から成る。表皮は主にケラチノサイトとメラノサイト、真皮は主に線維芽細胞・繊維・血管、皮下組織は主に筋肉組織と脂肪組織で構成される「、表皮は上皮の一種であり、その最下層は活発に分裂・増殖するケラチノサイトから成る基底層である。そこからケラチノサイトの分化に伴い体表に向かって有棘層、顆粒層、角質層(角層)、を構成し、最終的には垢として剥離する。この一連の過程は表皮のターンオーバーと呼ばれる「、外界との境界にある皮膚は常に紫外線(UV)や乾燥などの環境ストレスに曝露されている。特に日光を浴びる機会の多い顔面などの皮膚では、そうでない部位の皮膚に比べてシミ、シワ、タルミなどの老徴が促進される。シミは表皮部分にメラニン色素が沈着している色素沈着異常であり、代表的なものとして日光性色素斑と肝斑が知られている。

メラニンは表皮基底層に10細胞に1細胞の割合で存在するメラノサイトにより作られる.メラノサイトは神経冠(堤)由来の細胞である.神経冠細胞が、神経管から背側および側方経路を移動しながらメラノサイトの前駆細胞であるメラノブラストとして皮膚へと移動し、表皮または毛球メラノサイトとして皮膚または毛髪へメラニン色素を供給するようになる².

メラノサイト内でのメラニン産生(メラノジェネシス)はメラノソームという特殊な細胞内小器官で行われる。メラノジェネシスのステップは、メラノソームに取り込まれたアミノ酸チロシンに酵素チロシナーゼ(TYR)が働くことから開始される。メラニンには黒色~黒褐色のユウメラニンと赤褐色~黄色のフェオメラニンがあり、実際には両者がさまざまな割合で混じった混合型メラニンが形成される 3. メラニンの役割は、皮膚色の決定のほかに、温度制御、抗菌作用、毒性の薬剤や化学物質の吸収、フリーラジカルの吸収などがあるが、ヒト皮膚におけるもっとも重要な役割は、表皮細胞を紫外線から保護すること

である.実際メラニン色素の少ない白色人種では皮膚癌の発生率が高いことが知られている.

メラノジェネシスを終えたメラノソームは周囲の30~40個のケラチノサイトに受け渡される。ケラチノサイトのターンオーバーに伴い表皮全体にメラニンが行き渡り、肉眼的に皮膚の色素沈着が確認できるようになる². メラノサイトからケラチノサイトへメラノソームが受け渡されるメカニズムは、従来はメラノソームが樹状突起の先端に集められたあとにケラチノサイトに受け渡されると考えられており、大きく分けて3つの経路(1)メラノソームを含んだメラノサイトの樹状突起の先端がケラチノサイトに貪食される経路、(2)メラノソームがメラノサイトの外に放出されてからケラチノサイトに貪食される経路、(3)メラノサイトとケラチノサイトの膜融合が起こってメラノソームが移行される経路、が提唱されていたが⁴、最近メラノソームは樹状突起の先端に集められる前に樹状突起のさまざまな部位でパッキングされて細胞外に放出されてケラチノサイトに取り込まれるという説も出てきており⁵、メラノソームのケラチノサイトへの受け渡しのメカニズムは未だ完全には解明されていない。

これまで皮膚の色素沈着異常のメカニズムならびに対処方法について,数多くの研究がなされてきた.上述のメラノサイト内でのメラノジェネシスに関する研究はもとより,ケラチノサイトからメラノサイトへの情報伝達も重点的に研究され,Stem Cell Factor(SCF) 6 や Endothelin-1(ET-1) 7 など数多くのケラチノサイト由来のメラノサイト刺激物質が発見されてきた.近年ではDickkopf-Related Protein 1(DKK1) 8 や Neuregulin-1 9 など真皮因子との関係も明らかになってきた.

本研究は、メラニン産生・皮膚色素沈着に関する 5 つの研究より構成される。第 1 の研究 10 ではメラノサイト内でのメラノジェネシスのメカニズムに着目した。 Elephantopus mollis H.B. and K.の抽出物がマウス B16 メラノーマ細胞においてメラノジェネシス抑制効果を示すことを発見し、その作用メカニズムからメラノサイト内でのメラノジェネシスを抑制する有効な対処法の示唆を得た。第 2 の研究 11 ではメラノサイトからケラチノサイトへのメラニンの受け渡しに

着目した.メラニンのレシピエントであるケラチノサイトが転写因子 Foxn1 によりメラノサイトを誘引し、色素沈着パターンを決定している可能性を示した.第3の研究 ¹² は真皮由来因子の色素沈着への影響に着目した.真皮線維芽細胞由来因子である Keratinocyte Growth Factor (KGF) が、日光性色素斑および肝斑の表皮に蓄積していることが、色素沈着異常が消失しない原因になっている可能性を示した.第4の研究 ¹³ は第3の研究で着目した KGF のメラノサイトに対する影響を *in vitro* で検討したものであり、KGF がメラノサイトの増殖や分化に重要な役割を果たしていることを示した.第5の研究 ¹⁴ は真皮の血管系と色素沈着の影響に着目した.日光性色素斑では真皮の血流の増加・血管系の亢進がみられ、また炎症状態であることも明らかになり、これらの色素沈着への関与が示唆された.

本研究の結果から、色素沈着異常のメカニズムの更なる解明、並びに有効な対処法の提供に繋がることが期待される.

- 1. Hirobe T. Pigment Cell Melanoma Res 2011;24:462-478
- Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP. "The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology", ed. Oxford University Press, New York 2006
- d'Ischia M, Wakamatsu K, Napolitano A, Briganti S, Garcia-Borron JC, Kovacs D, Meredith P, Pezzella A, Picardo M, Sarna T, Simon JD, Ito S. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013;26:616-633
- 4. Ando H, Niki Y, Yoshida M, Ito M, Akiyama K, Kim JH, Yoon TJ, Matsui MS, Yarosh DB, Ichihashi M. *Cell Logist* 2011;1:12-20
- 5. Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB, Ichihashi M. *J Invest Dermatol* 2012;132:1222-1229
- 6. Baba H, Uchiwa H, Watanabe S. J Invest Dermatol 2005;124:1075-1077
- 7. Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M. *J Biol Chem* 1992;267:24675-24680
- 8. Yamaguchi Y, Morita A, Maeda A, Hearing VJ. J Investig Dermatol Symp Proc

- 2009;14:73-75
- 9. Choi W, Wolber R, Gerwat W, Mann T, Batzer J, Smuda C, Liu H, Kolbe L, Hearing VJ. *J Cell Sci* 2010;123:3102-3111
- 10. Hasegawa K, Furuya R, Mizuno H, Umishio K, Suetsugu M, Sato K. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010;74:1908-1912
- 11. Weiner L, Han R, Scicchitano BM, Li J, Hasegawa K, Grossi M, Lee D, Brissette JL. *Cell* 2007;130:932-942
- 12. Hasegawa K, Fujiwara R, Sato K, Shin J, Kim SJ, Kim M, Kang HY. *Ann Dermatol* 2015;27:626-629
- 13. Hirobe T, Hasegawa K, Furuya R, Fujiwara R, Sato K. *J Dermatol Sci* 2013;71:45-57
- 14. Hasegawa K, Fujiwara R, Sato K, Park JY, Kim SJ, Kim M, Kang HY. *J Dermatol* (in press)

2. *Elephantopus mollis* H.B. and K.の抽出物は, B16 マウスメラノーマ細胞において, Microphthalmia-Associated Transcription Factor 発現を抑制することによりメラノジェネシスを抑制する

要旨

本研究では、Elephantopus mollis H.B. and K. (E. mollis) 抽出物が B16 メラノーマ細胞におけるメラノジェネシス抑制効果を有することを示し、またその作用機序について検討した。B16 細胞のメラニン量は E. mollis 抽出物添加によって減少していたが、それに伴いチロシナーゼ (Tyr) およびチロシナーゼ関連タンパク 1 (Trp1) のタンパク量が減少していた。さらには、Tyrや Trp1 といったメラノジェネシスに関わる酵素の遺伝子発現を制御する主要な転写因子であるmicrophthalmia-associated transcription factor (Mitf) の発現量の減少が、ウェスタン・ブロッティング並びに定量 RT-PCR により確認された。これらの結果により、E. mollis 抽出物は Mitf の発現を減少させ、その結果として Tyrや Trp1 の発現を減少させることによりメラノジェネシスを抑制していることが示唆された。加えて、Melanocortin-1 受容体(Mc1r)の発現が E. mollis 抽出物により減少していたこともわかった。この事実は E. mollis 抽出物により処理された細胞のα-Melanocyte-Stimulating Hormone (α-MSH) 刺激に対する応答性が減弱していることを示唆している.

序論

メラニンはその光学および化学特性により皮膚を紫外線(UV)による傷害から守り 1 、効率的に活性酸素、毒性のあるフリーラジカルや金属イオンを除去する一方 2 、メラノジェネシスが異常に亢進することにより皮膚への色素沈着が亢進し 3 、しばしば美容上の問題を生じる.従って効果的にメラノジェネシスを抑制することは皮膚の色素沈着を制御する上で重要である $^{4.5}$.

メラノジェネシスは紫外線, X線, α -Melanocyte-Stimulating Hormone $(\alpha$ -MSH) 6 のほか化学物質などの細胞外からの刺激により起こる反応である. Tyr 遺伝子ファミリーである Tyr, Tyr 関連タンパク 1 (Trp1), Tyr 関連タンパク 2 (Trp2) はメラニン産生に必須の酵素である $^{7-11}$.

Tyr は,黒色〜黒褐色のユウメラニン,赤褐色〜黄色のフェオメラニンの両タイプのメラノジェネシスの鍵酵素である 12 . Tyr は,チロシンをヒドロキシル化し 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)を生じる反応,DOPA を酸化し DOPAキノンを生じる反応の,メラノジェネシスの最初の 2 ステップの反応を触媒する.メラノジェネシスのステップはその反応のあと 2 つの経路に分かれ,それぞれユウメラニン・フェオメラニンに至る.Trp2 は DOPA-chrome tautomerase (Dct)としても知られる 13 . Trp1 と Dct はフェオメラニンよりもユウメラニンの生合成に,より関わっている 14,15 .

転写因子 Microphthalmia-associated Transcription Factor (Mitf) はメラノサイトの分化,メラノジェネシス,増殖,生存に関わり 16,17 ,Tyr 遺伝子ファミリーの主要な転写制御因子でもある 11,18 . Tyr,Trp1,Dct 遺伝子のプロモーター領域には E-box と呼ばれるコンセンサス配列が存在する 19,20 . Melanocortin-1 受容体 (Mc1r) に結合する生理的リガンドである α -MSH は,環状アデノシンーリン酸 (cAMP) レベルを上昇させることにより Mitf 発現を上昇させ,その結果 Tyr などのメラノジェネシス関連酵素の発現が亢進し,最終的にはメラニン量が増加する 21 .

キク科植物 *Elephantopus mollis* H.B. and K.は台湾の民話で"peh-teng-khia-u"として知られ薬草療法に用いられてきた 22 . 日本では小笠原や沖縄に見られる 23 . 本研究では *E. mollis* 抽出物の B16 メラノーマ細胞におけるメラノジェネシスに与える影響とそのメカニズムを検討した.

材料と方法

植物素材

インドネシアで認証栽培され、2004 年 10 月に収穫された E. mollis の葉をもとに試験試料を調製した.

試験試料の調製

空気乾燥させた E. mollis の葉(10 g)を粉砕し,室温にて 1,3-ブタンジオール(150 ml)により 1 週間抽出し濾過した.濾液は活性炭(300 mg)とエタノール(100 ml)で室温・2 時間処理し脱色した.活性炭とエタノールの除去後,残液を 5° C で 3 日間静置したのち,再び濾過した.この濾液に 1,3-ブタンジオールを加えることにより 100 g の試験試料を得た.

細胞培養

B16 マウスメラノーマ細胞は、5% CO₂・37°C の条件下、10% ウシ胎児血清 (MP Biomedicals、米国) を加えたイーグル最少必須培地(日水製薬、日本)により単層培養した。

細胞生存試験およびメラニン量測定

B16マウスメラノーマ細胞を100-mmディッシュに1 × 10⁶細胞/ディッシュの密度で播種した.オーバーナイト培養したのち,試験試料を含む培地に交換した.それから3日間培養後,培地を除去し10%のアラマーブルー(Invitrogen,米国)溶液に置換しさらに培養した.30分後,培養上清100μlをとって96穴プレートに移し蛍光を測定した(544 nmにて励起,590 nmを測定).メラニン量の測定のため,ディッシュよりアラマーブルー溶液を除去し,1%のTriton X-100(ナカライテスク,日本)を加えたリン酸緩衝生理食塩水で10分間細胞を溶解した.細胞溶解液を回収し13,000 rpmで10分間遠心した.上清を除去しペレットを空気乾燥した.ペレットに1 M NaOH(和光純薬工業,日本)溶液を加え,475 nmの吸光度を測定した.

抗体

一次抗体として, 抗 Tyr 抗体 (H109; Santa Cruz Biotechnology, 米国), 抗 Trp1 抗体 (PEP1; Dr. Vincent Hearing (NIH, Bethesda, MD) より), 抗 Mitf 抗体 (C5; Thermo Scientific, 米国), および 抗β-actin 抗体 (C4; Millipore, 米国) を用いた. 西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼを結合させた二次抗体は GE Healthcare (米国) より購入した.

ウェスタン・ブロッティング

試験試料を含んだ培地で48時間培養後,細胞に細胞溶解バッファー(50 mM Tris-HCl (pH 7.5) (Sigma, 米国), 150 mm NaCl (和光純薬工業), 1% Triton X-100, 100 μM Na₃VO₄, およびタンパク分解酵素阻害剤カクテル (ナカライテスク)) を加え氷上で 10 分静置し溶解した. 15,000 rpm・4℃ で 10 分間遠心した上清を 細胞抽出液として用いた. タンパク濃度は BCA protein assay kit (Pierce、米国) により求めた. 細胞抽出液に、5%の2-メルカプトエタノール(和光純薬工業) を加えた Laemmli サンプルバッファー (2×; Bio-Rad Laboratories, 米国) を加え, 95°C で 5 分間処理した. 各細胞抽出液から総タンパク量 10 μg を, 7.5%ゲル (Bio-Rad Laboratories) を用い SDS-PAGE にかけ、Immobilon-P メンブレン (Millipore) に転写した. メンブレンはその後 SNAP i.d. Protein Detection System (Millipore) の説明書に従い処理した. 簡単には、SNAP i.d. system にメンブレ ンを挟んだホルダーをセットし、ブロッキングバッファー (20 mm Tris-HCl (pH 7.5), 150 mм NaCl, 0.1% Tween 20 (ナカライテスク), および 0.5%スキムミル ク(和光純薬工業))を加え、直ちに引圧を加えた、ブロッキングバッファー中 に 3:2,000 に希釈した一次抗体をホルダーに加え室温にて 10 分間静置した. 引 圧を加えメンブレンを Tris-buffered saline (20 mm Tris-HCl(pH 7.5), 150 mm NaCl, および 0.1% Tween 20 (TBST)) により 3 回洗浄した. 圧を解いたのち, ブロッ キングバッファー中に3:2,000に希釈した二次抗体をホルダーに加え室温にて10 分間静置した. 引圧を加えメンブレンを TBST により 3 回洗浄した. ホルダー からメンブレンを取出し ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) の説明書に従いインキュベートし化学発光を検出した.

定量RT-PCR

試験試料を含んだ培地で 24 時間培養後, QIAshredder および RNeasy Mini Kit (Qiagen, ドイツ) の説明書に従い RNA を抽出した. 250 ng のトータル RNA を用い SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) の説明書に従い逆転写反応を行った. QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) を用い StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 米国) により定量 RT-PCR を行い, Tyr, Mitf, および Mc1r の遺伝子発現を確認した. 内部標準にはβ-actin を用いた. PCR プログラムは 95°C・10 分ののち, 95°C・15 秒~60°C・1 分を 40 サイクル行った. プログラムの最後に融解曲線解析を行った. プライマーは次の配列のものを各 1.5 μM で用いた. Tyr_F 5′-CCA GAA GCC AAT GCA CCT AT-3′; Tyr_R 5′-ATA ACA GCT CCC ACC AGT GC-3′; Mitf_F 5′-CTA GAG CGC ATG GAC TTT CC-3′; Mitf_R 5′-AAG TTG GAG CCC ATC TTC CT-3′; Mc1r_F 5′-TGA CCT GAT GGT AAG TGT CAG C-3′; Mc1r_R 5′-ATG AGC ACG TCA ATG AGG TTG-3′; β-actin_F 5′-TGT ACC CAG GCA TTG CTG AC-3′; β-actin_R 5′-CTG CTG GAA GGT GGA CAG TG-3′. 遺伝子発現は 2^{-ΔΔCT 24}を計算することにより解析した. 実験は 3 回行った.

統計

平均値の有意差検定は Student の t 検定(両側検定)を行った.

結果

E. mollis 抽出液のB16 マウスメラノーマ細胞のメラノジェネシスに対する効果 まず E. mollis 抽出物のB16 マウスメラノーマ細胞への細胞毒性を確認する ため細胞生存試験を行った. Fig. 1A に示したとおり, E. mollis 抽出物は試験した濃度範囲でB16 マウスメラノーマ細胞に72 時間の培養において毒性を示さなかった. 次に E. mollis 抽出物のB16 マウスメラノーマ細胞のメラノジェネシス

に対する効果を検討した.細胞あたりのメラニン量を定量した結果,E. mollis 抽出物は顕著にB16 マウスメラノーマ細胞のメラニン量を減少させていた (Fig. 1A). 0.3%の E. mollis 抽出物は72 時間の培養後,メラニン量を40%減少させていた。メラニン量の減少は0.05%の E. mollis 抽出物を用いたときにも認められていた.この定量結果はFig. 1B に示す外観とも一致するものであった.これらの結果はE. mollis 抽出物がB16 マウスメラノーマ細胞に対して細胞毒性を示さない濃度範囲でメラニン抑制効果を有することを示している.

E. mollis 抽出液のTyr およびTrp1 発現に対する効果

E. mollis 抽出物を添加した細胞でメラノジェネシスが抑制されるメカニズムを調べるため、メラノジェネシス関連タンパクである Tyr および Trp1 の発現量をウェスタン・ブロッティングにより検討したところ、E. mollis 抽出物の添加により顕著に減少していた(Fig. 2A). なお、Tyr、Trp1 ともにバンドがブロードであるが、これはこれらのタンパクが糖タンパクであり、成熟したタンパクになるまで糖鎖の付加とプロセッシングを受けるため、成熟途上の様々な分子量のタンパクを検出していることによる.

このタンパクの減少が、それぞれの mRNA 量の減少によるものか否かを調べるために、Tyr mRNA 量を定量 RT-PCR により検討したところ、E. mollis 抽出物の添加により Tyr mRNA 量が濃度依存的に減少していることがわかった(Fig. 2B). なお、E. mollis 抽出物無添加のコントロールに対して、0.1%および 0.2%の E. mollis 抽出物はそれぞれ 0.49 倍および 0.71 倍の Tyr mRNA 量を減少させていた.

E. mollis 抽出物のMitf およびMc1r 発現に対する効果

Mitf はメラノジェネシス関連遺伝子である Tyr, Trp1, および Trp2 の転写活性化因子である. Fig. 3A に示すとおり,E. mollis 抽出物は Mitf のタンパク量を減少させていた.これは E. mollis 抽出物添加により Mitf タンパク量が減少し、その結果として Tyr および Trp1 の発現量が減少したことを示唆している. なお,

Mitf はリン酸化を受け活性化するタンパクであり,2本のバンドはそれぞれリン酸化されていないもの(下)とリン酸化されたもの(上)に相当する.

さらに定量 RT-PCR の結果, *Mitf* mRNA 量も減少していることがわかった (Fig. 3B). なお, *E. mollis* 抽出物無添加のコントロールに対して, 0.1%および 0.2%の *E. mollis* 抽出物はそれぞれ 0.12 倍および 0.37 倍の *Mitf* mRNA 量を減少 させていた.

更に Mc1r mRNA 量を定量 RT-PCR により調べたところ, Fig. 3B に示すとおり Mc1r mRNA も E. mollis 抽出物により減少していた. これらの結果により, E. mollis 抽出物は Mitf 発現に影響を及ぼし, その結果として Mc1r 発現も影響を受けていることが示唆される.

考察

本研究により, *E. mollis* 抽出物が B16 メラノーマ細胞においてメラノジェネシス抑制効果を有することが示された. *E. mollis* 抽出物は 0.3%までの濃度で B16マウスメラノーマ細胞に対する細胞毒性を示さず, かつその濃度でメラニン量を 40%減少させた (Fig. 1A). *E. mollis* 抽出物濃度が 0.05%でも有意にメラニン量を減少させていた.

メラノジェネシスの最初の 2 ステップは Tyr 酵素により介在される. Tyr はメラノジェネシスに関わる主要な酵素であり、Tyr 酵素量の減少はメラニン量の減少として反映される ²⁵. E. mollis 抽出物のメラノジェネシス抑制メカニズムを検討するため、Tyr およびその関連遺伝子 Trp1 の遺伝子発現を確認した. Fig. 2に示したとおり、E. mollis 抽出物の抗メラノジェネシス効果は Tyr および Trp1 の遺伝子発現の減少によるものであることが示された. Tyr 発現が抑制されていることは、Tyr 発現を直接制御している転写因子 Mitf の抑制を示唆している. Mitf は basic helix-loop-helix-leucine-zipper (bHLH-LZ) 構造を有する転写因子ファミリーのひとつで、Tyr や Trp1 のプロモーター領域にあるコンセンサス配列M-box や E-box に結合する ^{20,26,27}. Mitf はリン酸化されて活性型になるタンパク

であるが、E. mollis 抽出物は Mitf の発現量そのものを減少させ(Fig. 3)、これによって Mitf の下流に位置する Tyr や Trp1 の発現が抑制されていたものと考えられる. Mitf 発現が抑制されている度合い以上に Tyr 発現が抑制されていたが (Fig. 2 および 3)、これは E. mollis 抽出物が Mitf 発現量の如何に関わらない直接的な Tyr への作用(Tyr タンパク変性や Tyr mRNA の不安定化など)も有している可能性を示している.

加えて、E. mollis 抽出物は α -MSH 受容体である McIr の発現も抑制していた (Fig. 3B). McIr はリガンドである α -MSH が結合することでメラノサイト細胞内での cAMP を上昇させ、その結果としてメラノジェネシスが亢進する 21 . McIr 遺伝子の 5 側上流領域の塩基配列解析の結果、E-box が転写開始位置のすぐ上流に位置していることが明らかになっている 28,29 . E-box の存在は、McIr 遺伝子発現も Tyr や Trp1 と同様 Mitf の制御を受けていることを示唆している 28 . つまり、Mitf はメラノジェネシスに関わる酵素とレセプター、両方の発現を制御している。 E. mollis 抽出物は Mitf 発現を抑制することにより、Tyr 遺伝子ファミリーの発現を抑制するのみならず、 α -MSH 刺激に対する応答性を減弱させることにより、抗メラノジェネシスの正のフィードバックメカニズムを発揮していることが考えられる (Fig. 4).

アジアでは、伝統的な考え方もあり肌を白くするために化粧品を使う習慣が根付いている。アルブチン(hydroquinone-β-D-glucopyranoside)やコウジ酸など数多くのメラノジェネシス抑制剤が開発され化粧品に配合されてきた³⁰⁻³³が、更に効果のある美白剤が求められ続けている。本研究結果により E. mollis 抽出物が少なくとも B16 メラノーマ細胞においては細胞毒性なくメラノジェネシスを抑制する、有用な美白剤候補であることが示された。

参考文献

 Wood JM, Jimbow K, Boissy RE, Slominski A, Plonka PM, Slawinski J, Wortsman J, Tosk J. *Exp Dermatol* 1999;8:153-164

- 2. Rozanowska M, Sarna T, Land EJ, Truscott TG. Free Radic Biol Med 1999;26:518-525
- 3. Stulberg DL, Clark N, Tovey D. Am Fam Physician 2003;68:1955-1960
- 4. King R, Weilbaecher KN, McGill G, Cooley E, Mihm M, Fisher DE. *Am J Pathol* 1999;155:731-738
- 5. Virador VM, Muller J, Wu X, Abdel-Malek ZA, Yu ZX, Ferrans VJ, Kobayashi N, Wakamatsu K, Ito S, Hammer JA, Hearing VJ. *FASEB J* 2002;16:105-107
- 6. Costin GE, Hearing VJ. FASEB J 2007;21:976-994
- 7. Ganss R, Schutz G, Beermann F. *J Biol Chem* 1994;269:29808-29816
- 8. Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jimenez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, Garcia-Borron JC, Hearing VJ. *EMBO J* 1994;13:5818-5825
- 9. Kwon BS. J Invest Dermatol 1993;100:134S-140S
- 10. Winder A, Kobayashi T, Tsukamoto K, Urabe K, Aroca P, Kameyama K, Hearing VJ. *Cell Mol Biol Res* 1994;40:613-626
- 11. Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y, Shibahara S. *J Biol Chem* 1997;272:503-509
- 12. Lamoreux ML, Zhou BK, Rosemblat S, Orlow SJ. *Pigment Cell Res* 1995;8:263-270
- 13. Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. *EMBO J* 1992;11:519-526
- 14. del Marmol V, Beermann F. FEBS Lett 1996;381:165-168
- 15. Ito S, Wakamatsu K. Photochem Photobiol 2008;84:582-592
- 16. Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H. *Cell* 1993;74:395-404
- 17. Steingrimsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, Ferre-D'Amare AR, Burley SK, Zimring DC, Skow LC, Hodgkinson CA, Arnheiter H, Copeland NG, Jenkins NA. *Nat Genet* 1994;8:256-263
- 18. Bentley NJ, Eisen T, Goding CR. Mol Cell Biol 1994;14:7996-8006

- 19. Murisier F, Guichard S, Beermann F. Pigment Cell Res 2007;20:173-184
- 20. Tachibana M. Pigment Cell Res 2000;13:230-240
- 21. Busca R Ballotti R. Pigment Cell Res 2000;13:60-69
- 22. Lee KH, Ibuka T, Furukawa H, Kozuka M, Wu RY, Hall IH, Huang HC. *J Pharm Sci* 1980;69:1050-1056
- 23. Koyama H, Nitta A. "Sekai Yuyo Shokubutsu Jiten" (in Japanese), ed. Hotta M, Heibonsha, Tokyo 1989;p. 411
- 24. Livak KJ, Schmittgen TD. Methods 2001;25:402-408
- 25. Hearing VJ, Ekel TM. J Invest Dermatol 1975;64:80-85
- 26. Aksan I, Goding CR. Mol Cell Biol 1998;18:6930-6938
- 27. Carr CS, Sharp PA. Mol Cell Biol 1990;10:4384-4388
- 28. Aoki H, Moro O. Life Sci 2002;71:2171-2179
- 29. Adachi S, Morii E, Kim D, Ogihara H, Jippo T, Ito A, Lee YM, Kitamura Y. *J Immunol* 2000;164:855-860
- 30. Mishima Y, Hatta S, Ohyama Y, Inazu M. Pigment Cell Res 1988;1:367-374
- 31. Maeda K, Fukuda M. J Pharmacol Exp Ther 1996;276:765-769
- 32. Korner AM, Pawelek J. J Invest Dermatol 1980;75:192-195
- 33. Fujimoto N, Watanabe H, Nakatani T, Roy G, Ito A. Food Chem Toxicol 1998;36:697-703

図の説明文

Figure 1. E. mollis 抽出物の **B16** マウスメラノーマ細胞におけるメラノジェネシス抑制効果

A. B16 細胞に 0.05%, 0.1%, 0.2%, および 0.3%の *E. mollis* 抽出物を添加し 72 時間培養した. 細胞生存率およびメラニン量を「材料と方法」に記載した方法に従い測定した. 棒グラフはメラニン量を,折れ線グラフは細胞生存率を示し,それぞれ 3 回の実験の平均値±標準偏差で示した. コントロールに対して統計的有意差のあるもの(P < 0.05)に*印を付した. **B.** NaOH に溶解したメラニンペレットの外観.

Figure 2. E. mollis 抽出物の B16 マウスメラノーマ細胞における Tyr および Trp1 発現抑制効果

A. B16 細胞に 0.1%および 0.3%の E. mollis 抽出物を添加し 48 時間培養した. タンパク質を抽出したのち,Tyr,Trp1,および β -actin の発現量をウェスタン・ブロッティングにより確認した. **B.** B16 細胞に 0.1%,および 0.2%の E. mollis 抽出物を添加し 24 時間培養したのち,RNA を抽出し定量 RT-PCR を行った. 結果は3 回の独立した実験の平均値±標準偏差で示した. コントロールに対して統計的有意差のあるものに**印(P < 0.01)もしくは***印(P < 0.001)を付した.

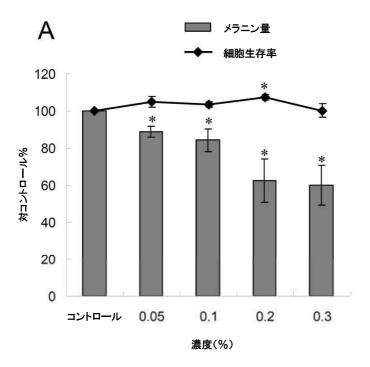
Figure 3. *E. mollis* 抽出物の **B16** マウスメラノーマ細胞における *Mitf* および *Mc1r* 発現抑制効果

A. B16 細胞に 0.1%および 0.3%の *E. mollis* 抽出物を添加し 48 時間培養した. タンパク質を抽出したのち,Mitf および β -actin の発現量をウェスタン・ブロッティングにより確認した. **B.** B16 細胞に 0.1%,および 0.2%の *E. mollis* 抽出物を添加し 24 時間培養したのち,RNA を抽出し定量 RT-PCR を行った. 結果は 3 回 (*Mitf*) もしくは 2 回 (*McIr*) の独立した実験の平均値±標準偏差で示した. コントロールに対して統計的有意差のあるもの (P<0.05) に*印を付した.

Figure 4. E. mollis 抽出物によるメラノジェネシス抑制モデル

E. mollis 抽出物は Mitf を抑制,それが Tyr 発現抑制,メラノジェネシス抑制へと繋がる.それに加えて E. mollis 抽出物は Mc1r 発現を抑制し,それにより α -MSH 刺激に対する応答性を減弱させられ,さらに Mitf 発現が抑制されることへと繋がる.

Fig. 1



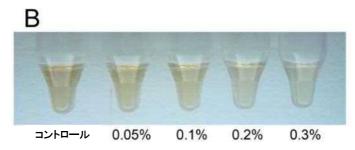


Fig. 2

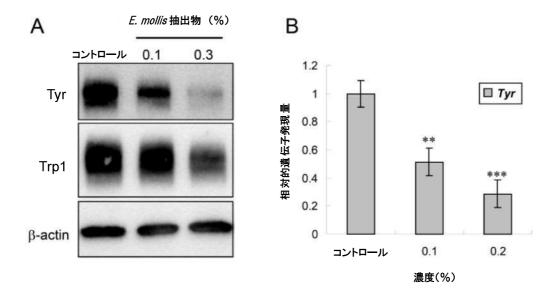
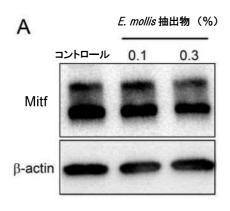


Fig. 3



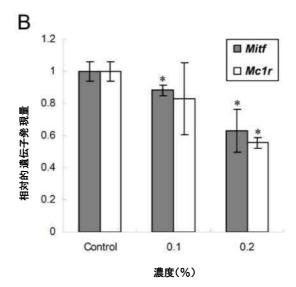
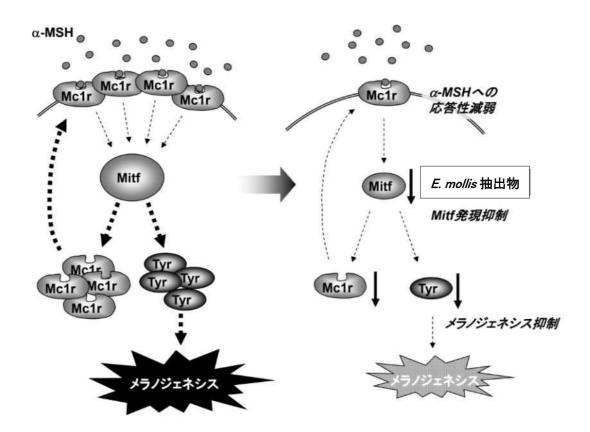


Fig. 4



3. 表皮の色素レシピエント細胞が、色素沈着のパターンを決める

要旨

哺乳類は色素産生細胞により体表の彩色を生み出すが、どのようにして配色のパターンが決まっているのかについてのメカニズムの大部分はわかっていない。本研究では、配色パターンは色素のレシピエント細胞によって決められていることを、マウスをモデルとして用いて示した。これら色素のレシピエントの表皮細胞はメラノサイトを自らの近傍に呼び込み、メラニンの受け渡しを誘導する。本研究では転写因子 Foxn1 をこの「色素のレシピエントの phenotype」活性化因子として、また成長因子かつ Foxn1 のターゲットである塩基性 Fibroblast Growth Factor (bFGF)をレシピエントから放出されるシグナルとして同定した。Foxn1 の(つまりはレシピエント細胞の)皮膚内での分布が変化すると新しい色素沈着パターンが形成された。この結果は、レシピエント細胞が、メラノサイトに対してどこに色素を配置すべきかガイドする皮膚の色素沈着パターンの鋳型か青写真とも言えるものをもっていることを示している.

序論

体表の彩色は、カモフラージュ、光傷害からの防御、体温の制御、交尾の成立のような社会的相互行為など、動物の生存や繁殖に関わることはよく知られている。このような様々な機能に同調するように彩色そのものも様々であり、生物集団の色素生産の量も配色のパターンも多様である。何世紀にも渡りこの多様性は人類の興味を引き続けてきたが、この数十年で色素の産生については多くのことがわかってきた。それにも関わらず色素のパターン、特にどのように組織だって色素パターンが配色されるかについては依然としてよく分かっていない。

哺乳類は、色素のドナーとレシピエント、二種類の細胞から成るシステムに

よりほとんどの体色を作り出している¹. 色素のドナー細胞はメラノサイトであり、メラノソームという特殊な細胞内小器官でメラニンを合成する. 色素のレシピエント細胞は表皮細胞であり、大部分の皮膚のメラニンを受け取り保持する機能を有する. メラノサイトは樹状突起を伸長し、その樹状突起を経てメラノソームが周囲で接触している複数の表皮細胞に移送される. ドナー細胞はレシピエント細胞と直接的に繋がり、メラニンは正確な位置に配置される. ヒトでは色素は表皮と毛にターゲットされるが、マウスでは表皮にはメラノサイトが存在しないためメラニンがなく、体毛に大部分のメラニンがターゲットされる. 表皮細胞に受け渡されたメラニンは部位特異的な生理的役割(ヒト表皮で言えば紫外線防御)を果たす. このように哺乳類の皮膚における色素形成のタスクは、色素を作る細胞と色素を使う細胞に明確に切り分けられている.

メラノサイトはメラノソームと樹状突起により, 色素の産生と供給に高度に 特化した細胞である。では表皮細胞は、つまり色素のレシピエント細胞は、色 素のドナー細胞のカウンターパートとして特化しているのであろうか.皮膚が 彩色パターンを作り上げるにあたり、メラニンを有する表皮細胞とそうでない 表皮細胞が出てくる. 形態的なレベルでは, 表皮細胞に色素沈着を促進したり 抑制したりするような構造的な違いはみられない、機能的なレベルでは、色素 のレシピエントについての情報がほとんどなく, メラニンを受け取っていない 細胞から区別できる特徴は知られていない.従って,表皮細胞がメラノサイト のように色素形成の機能に特化しているのか否かについては未だかつて結論を 見ていない、さらに、表皮細胞の色素形成の際の相互作用における役割につい てはほとんど知られていない.特に、表皮細胞がもともと「reactive」つまりメ ラノサイトにメラニンを渡されることに反応するだけのものなのか、もしくは 「proactive」つまり自らメラノサイトを呼び込み色素の受け渡しを誘導するのか、 についてはこれまでまったく示されていない.皮膚内でどのようにメラノサイ トと表皮細胞が色素形成の単位をつくり、ひいては色素をどこに配置するかの 決定因子は何なのであろうか.

Foxn1 (Whn, Hfh11) はメラノサイトを含むいくつかの表皮組織の発生に必

須なマウスの遺伝子である.その遺伝子産物は転写因子であり,配列特異的な DNA 結合ドメイン 2,3 および負に帯電したトランス活性化ドメイン 3,4,5 を有する. 齧歯類では Foxn1 の機能欠損はヌード表現型である 2,6 . Nude は,体毛が観察されず 7 ,異常な表皮 8,9 ,乳腺の発生障害 10 ,爪の分化異常 11 ,胸腺の欠失 12 ,などを特徴とする phenotype である.ヒトの FOXNI はマウスと 86%の相同性があり 13 ,FOXNI のナンセンス突然変異は免疫不全,先天性脱毛,爪ジストロフィーなどを伴う 14 . つまり FOXN1 活性の欠失は nude phenotype に類似の疾病に繋がっており,Foxn1 が機能的に保存されていることを示している.

本研究では、色彩の創出における Foxn1 と表皮細胞の新規な機能を同定した. 皮内の特定の場所で、表皮細胞が Foxn1 を用い、メラノサイトを呼び込んで自分のためだけに色素を産生させていた. つまり Foxn1 は皮膚内で色素のターゲットを制御する細胞群を特徴づけている因子であると言うことができる.

材料と方法

トランスジェニックマウスと作成コンストラクト

導入遺伝子はコーディング領域の完全長 (塩基 97-2135) 2 を含むマウス Foxn1 cDNA を発現する. Kozak 配列と Flag タグを翻訳開始位置に付加した 15 . コンストラクトは 5 から 3 の向きにヒトケラチン 5 プロモーター (0.9 kb) 16 , ウサギ β -グロビンイントロン (0.75 kb) 17 , Foxn1 cDNA, ヒトケラチン 15 ポリアデニル化部位 (0.5 kb) 18 を有する.

コンストラクトは直線化し、CBRC Transgenic Core Facility において DBA \times C57BL/6 F_1 マウスの受精卵母に注入した.トランスジェニック動物は尾から DNA を採取し、Foxnl cDNA の塩基 774-796 および 1449-1470 に相当するプライマーにより PCR を行い確認した.トランスジェニックラインを確立し、C57BL/6マウスと戻し交配させて維持した.すべての動物実験は IACUC に承認されたプロトコールのもと実施した.

組換えアデノウィルス

Foxn1 を発現するアデノウィルスは AdEasy Vector System (MP Biomedicals, 米国) および AD-293 細胞株 (Stratagene, 米国) を用いて作成した. ウィルスコンストラクト (Ad-Foxn1) は Krt5-Foxn1 導入遺伝子と同様に Flag タグのついた Foxn1 cDNA を発現する. ウィルスは AdEasy の説明書に従って調製した. ウィルスは塩化セシウム濃度勾配で 2 回遠心して純化し, PD-10 カラム (Amersham Biosciences, 英国) を用いて脱塩した.

ケラチノサイトの初代培養と操作

ケラチノサイトは新生マウスから調製し、最少必須培地(50 mm CaCl2、4% chelex 処理ウシ胎児血清、および 2.5 ng/ml 表皮成長因子)中 33.5°C でコンフルエントまで培養した。トランスジェニックラインから培養する場合は、皮膚から細胞を採取する前に遺伝子型を調べ確認した。

組換えアデノウィルスは Swiss Webster 由来のケラチノサイトに対して用いた. 感染は最低限量の無血清ケラチノサイト培地中で約 1000 m.o.i. (multiplicity of infection)で行い, 1 時間後に完全培地を加えた. ウィルスの産生する GFP から出る蛍光を感染効率の指標とし確認したところ,各実験において,95%—100%の細胞が感染していた.

組織解析、蛍光免疫染色、およびTyr アッセイ

メラニンはフォンタナ・マッソン技法により染色した 19 . Nuclear fast red を カウンター染色に用いた.

蛍光免疫染色には、凍結切片をメタノール: アセトン=1:1 (Foxn1 および Tyrp1 染色) もしくは 1%のメタノールフリー緩衝フォルマリン液(bFgf)で固定した 20 . 染色反応にはヤギポリクローナル Foxn1 抗体(WHN G-20; Santa Cruz Biotechnology,米国),ウサギポリクローナル bFgf 抗体(H-131; Santa Cruz Biotechnology),もしくはウサギポリクローナル Tyrp1 抗体(α PEP1,Dr. Vincent Hearing (NIH,Bethesda,MD) より) 21 を用いた.Foxn1 は,ブロッキング溶液

(5%ウシ血清アルブミン (BSA) /リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)) を加える前に切片を 0.1% NP-40/PBS で親水化したことを除いて, Weiner と Green (1998) ²²の方法で染色した.

Tyramide-based Tyr アッセイ (TTA) はホルムアルデヒド固定した凍結切片を 用いて行った²⁰.

バイオプシーはすべて背部有毛部皮膚から採取した.

タンパク量およびRNA 量解析

bFgf タンパクは初代培養ケラチノサイトの培地上清中,固相 ELISA により定量した.培地上清は細胞を無血清ケラチノサイト培地で 1 回洗浄したのち無血清ケラチノサイト培地で 24 時間培養して得た.培地を回収し,細胞の残渣を遠心($200\times g$, 5 分間, 4° C)および濾過($0.45~\mathrm{mm}$ SFCA syringe filter(Corning,Inc.,米国))して除いた.その培地を分子量カットオフ 5 K の Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit(Millipore,米国)で濃縮した.バッファー交換のため,濃縮液をフィルターユニット中 PBS で 2 回洗浄した.サンプルは濃縮・洗浄のステップにおいて 4° C に保持した.最終的な容積は最初の培地容積の $1/50~\mathrm{cm}$ であった.濃縮液は -80° C で保存し,Bradford アッセイによりタンパク量を一定にし,直接 ELISA にかけた.ELISA は Quantikine HS Fgf basic Immunoassay Kit(R&D Systems,米国)を用いた.

bFgf mRNA は定量 RT-PCR により解析した.トータル RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN, ドイツ)を用いて抽出し, oligo-dT プライマーと SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, 米国)を用いて cDNA に逆転写した. 逆転写反応液をエタノール沈殿させたのち 1× PCR Gold Buffer (Applied Biosystems, 米国)に再溶解させた. リアルタイム PCR は iCycler-MyiQ System (Bio-Rad Laboratories, 米国)を用いた. PCR 産物を 6-FAM および BHQ1 で二重標識されたプローブで定量した. 標準化のため bFgf 発現と並んで Hprt 発現を定量した. bFgf の反応液は 0.24-3.8 μg の RNA からの cDNA を含んでいた. 他 方 Hprt の反応液は 30-500 ng の RNA からの cDNA を含んでいた. bFgf プローブ

は 5'-CAC TCC CTT GAT AGA CAC AAC TCC TC-3', プライマーは 5'-GAG AAG AGC GAC CCA CAC GTC-3'および 5'-GCC AGC AGC CGT CCA TCT TCC-3'であった. Hprt プローブは 5'-CTG GCC TGT ATC CAA CAC TTC GAG AG-3', プライマーは 5'-CTT TCC CTG GTT AAG CAG TAC AG-3'および 5'-CAT ATC CAA CAA CAA ACT TGT CTG G-3'であった. PCR 反応は AmpliTaq Gold(Applied Biosystems), $0.6 \,\mu\text{M}$ プライマー, $0.25 \,\mu\text{M}$ プローブを用い, $3 \,\text{ステップのサイク}$ ルプログラム(アニーリング 58°C,伸長 68°C)で行った.両プライマーセットは特異的な cDNA を増幅するようイントロンを挟んで設計した.

皮内bFgf の中和

マウスにウサギポリクローナル抗ウシ bFgf 抗体(R&D Systems),ヤギポリクローナル抗ヒト bFgf 抗体(R&D Systems),正常ウサギ IgG(Upstate Biotechnology,米国),もしくは溶媒コントロールの PBS を,背部皮下に1回あたり抗体1 mg 相当を 0.1 ml の容積で,生誕の日から1日1回,6日連続で注入した(P0-P5).P6 に背部皮膚を採取し 1%メタノールフリーホルムアルデヒド緩衝液で固定した.サンプルは O.C.T.コンパウンドに凍結包埋し,切片を作成し,TTA によりメラノサイトを解析した 20 .

二つの bFgf 抗体ともに 1-2 mg/ml の ND₅₀ を示した.

クロマチン免疫沈降

クロマチンは組換えアデノウィルスを感染させた野生型初代培養ケラチノサイト(\sim 10 7 細胞)から調製した. 感染から 18 時間後,メタノールフリーホルムアルデヒド(Polysciences, Inc.,米国)を,終濃度 1%となるよう直接培地に加えた. 室温で 10 分静置後,125 mm のグリシンで 5 分間処理し,PBS で 2 回洗浄し,液体窒素上で凍らせ, \sim 80°C で保存した. Lahiri と Ge(2000) 23 の方法を改編した方法で核を抽出した. 簡単には,接着している細胞にタンパク分解酵素阻害剤カクテル(Roche Applied Science,ドイツ)を加えたバッファーA(10 mM HEPES pH 7.9,10 mm KCl,0.1 mm EDTA pH 8.0,0.1 mm EGTA pH 8.0,1 mm DTT)

を加え氷上・15 分静置した。NP-40 を、10%から終濃度 0.1%となるよう加えた。 細胞を培養皿から剥がし、核を遠心($18,400\times g$ 、5 分、 4° C)によりペレットにした。上清を除去後、核にタンパク分解酵素阻害剤カクテル(Roche Applied Science)を加えた RIPA バッファー(50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS)を加え静かに攪拌した。 再度懸濁されたクロマチンに Sonifier 250 (Branson、米国)で超音波をかけた。次に溶解液に $CaCl_2$ を 2.5 mM になるよう加え、核酸を micrococcal nuclease(終濃度 100 units/ml; Takara Biomedicals、日本)) および RNase A(終濃度 $300 \mu g/ml$; Fisher Scientific、米国)により断片化した。 室温・15 分後、EGTA を 10 mM になるよう加えた。この消化・超音波の組み合わせにより平均サイズ 500-1000 bp のクロマチン断片が得られた。不溶性のデブリは遠心($840\times g$ 、10 分、 4° C)により除いた。

溶解液を protein G-agarose beads (Roche Applied Science) で前処理した. 使 用前にビーズは RIPA buffer に BSA (200 μg/ml) と細断化された魚精子 DNA (200 μg/ml; Roche Applied Science) 中で 4°C ・0.5-1 時間インキュベートしておく. 次にビーズを溶解液とインキュベート(4° C ・0.5-1 時間)し,遠心($840 \times g$,2 分、 4° C) し除く. 上清を一部(全容量の4-5%) とり DNA 定量に用いた. 残り に抗 Flag M2-アガロースアフィニティゲル (Sigma-Aldrich, Inc., 米国) を加え 4℃ でオーバーナイトインキュベートした. 抗 Flag 樹脂抗体は使用前に BSA と魚 DNA で同様に処理した. 溶解液とインキュベートしたのち, 抗 Flag 樹脂抗体を RIPA で 2 回, 高塩濃度バッファー (100 mm Tris-HCl pH 7.4, 500 mm NaCl) で 2 回, TBS (50 mm Tris-HCl pH 7.4, 150 mm NaCl) で 2 回洗浄した. 20 mm Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS で 2回, クロマチンを樹脂から溶出した. 各溶出は室温で 15 分ずつかけて、静かに揺すりながら行った. 2回の溶出液を合わせ、すべてのク ロマチンサンプルを 1% SDS および 300 mm NaCl に合わせた. タンパクを proteinase K (250 μg/ml) で 37°C で最低 5 時間消化して除いた. 消化液を 65°C でオーバーナイトインキュベートし,クロスリンクを元に戻した.フェノール: クロロフォルムで抽出し、lock gel (Eppendorf AG, ドイツ)を用いて水層を単 離した. グリコーゲンを各サンプルに 50 μ g ずつ加え, DNA をエタノール沈殿 し 1× PCR Gold Buffer に再溶解した.

コントロールとして, 抗 Flag 樹脂抗体の代わりに正常マウス IgG (Upstate Biotechnology) を用いた. 溶解液とオーバーナイトでインキュベートしたのち, IgG を BSA と魚 DNA で処理した protein G-agarose beads で沈殿させた.

ChIP アッセイ産物は定量 PCR で評価した. さまざまなプローブ/プライマ ーセットを用いて, bFgfの cis に位置するさまざまな DNA 断片の量を評価した. 評価した断片は次のカテゴリーに分類された.1)bFgf コアプロモーター近く のもの, 2) ヒト bFGF で保存(少なくとも 100 bp で 70%の相同性) されてい る非コード領域 24 . 保存非コード領域は VISTA により同定した $^{25-27}$. 最終的に bFgf の 37 の異なるクロマソーム領域(コアプロモーター近く2つ, 非コード領 域 35) を確かめた. バックグラウンドは Gapd のコード配列の短い (169 bp) 断 片に相当するプローブ/プライマーセットにより定量した。部位 1 に対するプ ローブは 5'-CTG TCT CCC GCA CCC TAT CCT TAC AC-3', プライマーは 5'-GGC TCT TAC GTG TTG AGG ACT C-3'および 5'-CAG TCC CGT AGA GCA CAA GCT G-3'であった. 部位 2 に対するプローブは 5'-CTG TAG ATA CAA TTA ACA AAC TAT GAC CAA G-3', プライマーは 5'-CAC AAC ATC CAT TAT GTA ACC AGA C-3' および 5'-CAC TGT GAA CGT TCA TTT GCA AGC-3'であった. Gapd 断片のプロ ーブは 5'-CTG TAG CCG TAT TCA TTG TCA TAC CAG-3', プライマーは 5'-CTG CGA CTT CAA CAG CAA CTC C-3'および 5'-CCA GGG TTT CTT ACT CCT TGG AG-3'であった.

結果

マウス皮膚における Foxn1

マウスでは、皮膚をはじめ胸腺、乳腺、眼などさまざまな臓器で *Foxn1* の発現がみられ、皮膚では発現は表皮細胞に限定されている ^{6,9}. 表皮の Foxn1 発現は細胞が分裂能力を失い終末分化をする段階になって誘導される ^{9,15}. 毛包でも

同様に、Foxn1 は細胞が増殖から分化に移行する段階で活性化する 9 . 表皮細胞において、Foxn1 タンパクは転写因子として核に局在している 15 . Foxn1 活性は表皮が成熟する際の組織のダイナミクスを反映していると言える. 表皮の発生とともに多くの細胞が Foxn1 を発現するようになり、出生後組織が薄くなり細胞分裂が減弱しメラノブラストが消失するにつれ減少する 9 . 毛周期においても似たようなことが起こっている 9,28 . Foxn1 発現は成長期にピークに達し、退行期と休止期には減少する.

Fig. 1 に、毛が成熟した毛包から成長している際の Foxn1 免疫蛍光染色像を示した。Foxn1 は主に分裂中の毛皮質(毛幹の主な構造的支持体であり、メラノサイトから色素を受け取る)の前駆体にみられる。この Foxn1 の局在は、Foxn1のプロモーター活性 9 、Foxn1 mRNA 発現 9,28 、毛母における Foxn1 遺伝子座増幅 29 などの過去の研究と一致する。

色素沈着とFoxn1 機能獲得

Foxn1 の表皮形態形成における役割を調べるため,ケラチン 5 (KRT5; Fig. 2A) ¹⁶ プロモーターから完全長 Foxn1 を発現するトランスジェニック動物を作成した. このプロモーターは皮内の増殖能はあるが分化はしていない表皮細胞において活性がある. つまり導入遺伝子は表皮の前駆体集団の中で *Foxn1* を異所的に発現することになる.

一般所見では *Krt5-Foxn1*トランスジェニックは健康的で繁殖能もあったが、まれに発育不良・かさかさの皮膚・まばらな毛の個体が戻し交配から生まれた.たいていのマウスは導入遺伝子によって何ら害は受けているようには見えないものの、足蹠や鼻など毛が全く無いかほとんど無い部位の皮膚が黒く、野生型からは明らかに見分けることができた(Fig. 2B).この色調変化はメラノジェネシスを示唆しているため、フォンタナ・マッソン染色によりメラニンを染色したところ、黒くなった皮膚にはメラニンが存在していた(Fig. 2C-2F).なおほとんどの色素が基底層に局在しており、基底層上のケラチノサイトもメラニンを有していたがそのメラニン量は少なかった.真皮の色には変化はなかった.

このことから、導入遺伝子が特異的に表皮ケラチノサイトのメラニン化を促進し、表皮の色素沈着を促していると言える.

次にメラノサイトとその前駆体を TTA を用いて染色した(Fig. 2G-2H). 野生型の表皮が出生後速やかに色素細胞を消失していくのに対して、トランスジェニックの皮膚が成熟するにつれ、数多くのメラノサイトが毛包表面領域同様表皮に残ったままであった. これらの色素細胞は主に基底層に局在していた. このメラノサイトの分布は独立した 3 つのトランスジェニックラインで観察された. このことは導入遺伝子そのものが phenotype を生み出していることを示している. 更にその phenotype は導入遺伝子の発現パターンと相関していた. 若いトランスジェニックでは,Foxn1 陽性細胞は表皮基底層全体,毛包漏斗,皮脂腺に観察された(Fig. 2J). 皮脂腺が導入遺伝子発現の見られたもっとも深い場所であり,導入遺伝子が特異的に Foxn1 を皮膚表面近くにターゲットしていると言える. 野生型では過去の報告 9.15,30,31 のとおり Foxn1 はあまり発現していなかったが,トランスジェニックでは Foxn1 発現細胞群が広範囲に存在していた(Fig. 2I).

Foxn1 と色素沈着の経時変化

トランスジェニックマウスが成長するにつれ,導入遺伝子を発現する細胞は減り,表皮のFoxn1 (Fig.3,赤色) はまばらになった. Foxn1 の分布が変化すると,メラノサイト (Fig. 3,緑色)の分布も変化していた. メラノサイトはFoxn1 陰性の領域からは消失しており,居残っている Foxn1 陽性の基底細胞近傍に局在していた. 色素は Foxn1 陰性のケラチノサイトよりも導入遺伝子を発現するFoxn1 陽性のケラチノサイトに優先して受け渡されていた (Fig. 3). このように基底層が Foxn1 陽性ケラチノサイトと陰性ケラチノサイトの混成になると,メラノサイトとその産生する色素は Foxn1 陽性細胞にターゲットされるようになる. Foxn1 陰性になった領域は色素のない正常状態に戻り,表皮の色素沈着はまるで導入遺伝子の活性状態をあらわすかのようにスポット状になった.

ヒト皮膚でのFOXN1

ヒトでは色素のレシピエントに大きく分けて4つのクラスが存在する.メラノサイトが密に接する2タイプの表皮細胞(基底層のものと,基底層の一層上のもの³²),および2タイプの毛包細胞(毛皮質と毛髄質の前駆細胞³³)である.ヒト毛母細胞はFOXNIを発現することで知られており¹⁴,FOXNI変異で無毛になることと一致する.表皮のFOXNI活性を調べるため,正常ヒト皮膚でFOXNIの蛍光免疫染色を行った(Fig. 4).FOXNIは多くの基底層の一層上の層は一様に陽性であるなど基底層より上のケラチノサイトに見られたほか,基底層のケラチノサイトの一部にも見られた.このようにヒトでもマウス同様,FOXNIは色素のレシピエント細胞群と関連していた.

Foxn1 & bFgf

表皮の色素沈着を更新させるために Foxn1 は表皮細胞からメラノサイトに 向けて何らかのシグナル因子を放出させていると考えられる. 多くのタンパク の中でも正常のメラノサイトからは産生されないが、メラノサイトの挙動に対 しては影響する塩基性 Fibroblast Growth Factor (bFgf) 34 はひとつの有力な候補 と考えられた. 培養環境中では bFgf は, 実験系によって色素細胞の増殖 35-38, 分化 ³⁹⁻⁴¹, 生存 ^{35,42,43}, メラニン産生活性 ^{44,45}, 遊走 ⁴⁶ など, 多くの「前色素沈 着」的な細胞反応を引き起こす.動物の彩色における役割はあまり知られてい ないが、bFgf は両生類の胚においてメラノブラストの誘引物質として働く 47. このことは bFgf が色素産生システム構築に働いていることを示唆している. 更 に、培養系ではケラチノサイトがメラノサイトに bFgf を介してシグナルを送る こと、そのシグナルがメラノサイトの分裂と生存を促進することが知られてい る 34. 発生中の皮膚では、bFgf は表皮基底層の上の層および毛乳頭直上の分裂 中の毛幹に存在するなど 48, その発現パターンは Foxn1 の発現パターンと重な る. そこで、bFgf が Foxn1 により活性化されるシグナルの一つであるかどうか を調べた. 蛍光免疫染色によって、トランスジェニックの表皮において Foxn1 はbFgfを強く誘導することがわかった (Fig. 5A, 5B). この表皮の bFgf は主に 導入遺伝子が発現している基底層に存在していた。ELISA によって、トランスジェニックのケラチノサイトは野生型のものに比べ 6 倍の bFgf を培地中に放出していることがわかった(Fig. 5C). これは皮膚での bFgf の亢進と一致する結果であった. つまり *Foxnl* の発現は bFgf の量の増加と放出を促していた.

多くの遺伝子が Foxn1 の下流にあることが知られているが 4,15,16,30,31,49,50, 直 接のターゲットはこれまで報告されていない. ターゲット遺伝子は転写因子に 対して短時間で反応するものと考え、Foxn1を発現するアデノウィルスを初代培 養ケラチノサイトに感染させてから早い時間のうちに bFgf を測定した. Fig. 5D に示したとおり、Foxn1 は bFgf mRNA を強く誘導していた。またその誘導は感 染8時間後以降に確認可能であった.このようにFoxn1の増加がbFgf転写産物 の速やかな増加を引き起こしていたことは、直接的な活性化メカニズムを示唆 していた. そこで Foxn1 が bFgf の cis エレメントに結合するかどうかを確認す るため、クロマチン免疫沈降(ChIP)により、bFgf 遺伝子座の Foxn1 結合スク リーニングを行った.このスクリーニングは bFgf 転写産物が発現誘導された条 件と同じ条件でウィルスを感染させたケラチノサイトを用いて実施した. 非コ ード領域で転写開始位置近傍領域もしくは遠隔領域ではあるがヒト bFGF と高 い相動性(100 bp 以上で70%以上)を有する領域,全部で37部位について調べ たところ, 2 部位が Foxn1 タンパクを結合した (Fig. 5E, 5F). 部位 1 はコアプロ モータのすぐ上流,残る 1 部位はヒトでも保存されているイントロン領域にあ った.この結果は bFgf が Foxn1 のターゲット遺伝子であることを示している.

bFgf が Foxn1 の色素沈着に関与しているかを調べるため、*Krt5-Foxn1* マウスにおいて bFgf 機能を抑制した. メラノサイト細胞系譜が表皮を離れ毛包に移行する時期にあたる生誕後 1 週間のうちに bFgf 抗体を皮下に注入した. ともにbFgf 活性を中和することのできる 2 種類の異なる bFgf 抗体を用いたが、2 種類とも同様の結果を得た. bFgf 中和後、トランスジェニックの表皮からは顕著にメラノサイトが減少した(Fig. 5G, 5H). このように bFgf を抑制することによりメラノサイトが表皮から消失し、トランスジェニックの皮膚が野生型の皮膚に近くなるなど、トランスジェニックの phenotype が部分的に元に戻った. この結

果は bFgf が Foxn1 の色素沈着制御のエフェクターとして働いていること, さらには bFgf 量が (少なくとも部分的には) メラノサイト保持を決定していることを示唆している.

考察

色素の生合成について色素のドナー細胞側の研究は多くなされてきたが、本研究は色素のレシピエント細胞の発生を促進するタンパクの最初の報告である.皮膚の特定の場所で、Foxn1 は、Foxn1 を有する細胞のメラニン化を誘導する.Foxn1 が無い場合、これらの細胞はまるで周りのメラノサイトがその存在を無視しているかの如く、色素を受け渡されないままである.これらの結果は色素形成の際の相互作用の形態形成メカニズムを示唆している.また、Foxn1 が表皮細胞に誘導させるシグナルの一つとして bFgf を同定した.これらのシグナルの結果、メラノサイトは Foxn1 陽性細胞をターゲットとして認識し、これらのターゲットに樹状突起を介して接続し、色素を受け渡す.従って、Foxn1 は色素のレシピエントにあり、色素のドナーを引き寄せ、色素形成の単位さらには色素沈着した表皮をつくり上げる.つまり、Foxn1 は細胞に、「色素レシピエントのphenotype」という、細胞が自分自身の色素沈着を制御するという特別な特性を与えると結論付けられる.色素のレシピエントは、ドナーのメラノサイトのカウンターパートとして存在しているのである.

Foxn1 はレシピエントの phenotype の活性化因子として最初に報告されたが、他にもこのような因子があると考えて良いと思われる. 正常状態のマウスとヒトにおいて、Foxn1 は色素を受け取る表皮細胞の約半分に存在する. ヒト表皮では FOXN1 は基底層の上の層のレシピエント細胞には存在するが、(すべてではないが) たいていの基底層のレシピエント細胞には存在しない (Fig. 4). では Foxn1 陰性のレシピエント細胞はどのようにして色素を受け取るのであろうか. ひとつの可能性は、それらの細胞は Kitl (Kit リガンド) を用いているのではないかということである. マウスでは、Kitl の産生はケラチノサイトの色素沈着を

引き起こすことから 51 , Kitl が Foxn1 と協働してもしくは Foxn1 の代わりに色素受け取りの phenotype を活性化している可能性が考えられる. レシピエントの phenotype は, さまざまな環境において動物表皮の色素沈着を促進する Nog, Egfr, F2rl1, および Pomc1 の誘導体の作用を通じても発現し得る $^{52-56}$. Foxn1 陽性細胞が特異的な因子を使ってそれ自身の色素沈着を上げるように, Foxn1 陰性だが色素を受け取る細胞も同じような機構を有している可能性がある.

色素のレシピエント細胞の特性に基づけば、レシピエントの phenotype は色素生成システムの発生において二つの役割を果たしていると推測される.一つは色素形成の際の相互作用に特異性をもたせることである.この phenotype により多くの表皮細胞と接しているメラノサイトがターゲットを間違えることなく色素を受け渡すことができる.もう一つは色素沈着の鋳型となるパターンの形成である.本研究によって色素沈着パターンが Foxn1 分布を反映していることが示された.Foxn1 が不活化されると彩色パターンは単純になり、活性化されるとより複雑になる.メラノサイトは自分自身を、レシピエント細胞群を反映するように配置し、レシピエント細胞群が指示したとおりに色素を送り込む.レシピエント phenotype は皮内でメラノサイトにどこに色素を配置すべきか導くというシンプルな機能を果たしていると言える.

最後に、Foxn1 はいくつもの表皮組織の発生を促進していること、したがって Foxn1-bFgf 経路は別の目的も果たしているかもしれないことに触れておきたい。Foxn1 自体は増殖でなく分化に働くにも関わらず、nude 変異において表皮細胞の増殖と分化が損なわれていることが知られている 4,9,15,19。また、分化している細胞が Foxn1 を過剰発現すると、隣接する細胞が過剰増殖する 15。これらの知見から、Foxn1 は 2 面性の効果をもつと考えられる。つまり表皮細胞の終末分化を促進すると同時に、隣接する細胞の分裂を促進するような成長因子の放出を誘導する。

Foxn1 経路は表皮組織がそれ自身の発達、分化、色素沈着を調製するメカニズムを提供する.この機構は、異なる種類の細胞がどのように協働し複雑なphenotype を作り上げるかを理解するモデルになり得ると考える.

参考文献

- 1. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Physiol Rev 2004;84:1155–1228
- 2. Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T. Nature 1994;372:103–107
- 3. Schlake T, Schorpp M, Nehls M, Boehm T. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3842–3847
- 4. Brissette JL, Li J, Kamimura J, Lee D, Dotto GP Genes Dev 1996;10:2212–2221
- Schüddekopf K, Schorpp M, Boehm T. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:9661– 9664
- 6. Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschutz R, Schüddekopf K, Smith AJ, Boehm T. *Science* 1996;272:886–889
- 7. Flanagan SP. Genet Res 1966;8:295–309
- 8. Kőpf-Maier P, Mboneko VF, Merker HJ. *Acta Anat (Basel)* 1990;139:178–190
- 9. Lee D, Prowse DM, Brissette JL. Dev Biol 1999;208:362–374
- 10. Militzer K, Schwalenstocker H. J Exp Anim Sci 1996;38:1–12
- 11. Mecklenburg L, Paus R, Halata Z, Bechtold LS, Fleckman P, Sundberg JP. *J Invest Dermatol* 2004;123:1001–1011
- 12. Pantelouris EM. Nature 1968;217:370-371
- 13. Schorpp M, Hofmann M, Dear TN, Boehm T. Immunogenetics 1997;46:509–515
- Frank J, Pignata C, Panteleyev AA, Prowse DM, Baden H, Weiner L, Gaetaniello L, Ahmad W, Pozzi N, Cserhalmi-Friedman PB, Aita VM, Uyttendaele H, Gordon D, Ott J, Brissette JL, Christiano AM. Nature 1999;398:473–474
- 15. Prowse DM, Lee D, Weiner L, Jiang N, Magro CM, Baden HP, Brissette JL. *Dev Biol* 1999;212:54–67
- 16. Ohtsuki M, Tomic-Canic M, Freedberg IM, Blumenberg M. *J Invest Dermatol* 1992;99:206–215
- 17. Saitou M, Sugai S, Tanaka T, Shimouchi K, Fuchs E, Narumiya S, Kakizuka A.

- Nature 1995;374:159–162
- 18. Vassar R, Rosenberg M, Ross S, Tyner A, Fuchs E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1563–1567
- 19. Stevens A, Chalk BT. *Theory and Practice of Histological Techniques* (New York: Churchill Livingstone) 1996:pp. 243–267
- 20. Han R, Baden HP, Brissette JL, Weiner L. Pigment Cell Res 2002;15:290-297
- Virador V, Matsunaga N, Matsunaga J, Valencia J, Oldham RJ, Kameyama K, Peck GL, Ferrans VJ, Vieira WD, Abdel-Malek ZA, Hearing VJ. *Pigment Cell Res* 2001;14:289–297
- 22. Weiner L, Green H. Differentiation 1998;63:263–272
- 23. Lahiri DK, Ge Y. *Brain Res Protoc* 2000;5:257-265
- 24. Hardison RC, Oeltjen J, Miller W. Genome Res 1997;7:959-966
- 25. Bray N, Dubchak I, Pachter L. Genome Res 2003;13:97-102
- 26. Dubchak I, Brudno M, Loots GG, Pachter L, Mayor C, Rubin EM, Frazer KA. *Genome Res* 2000;10:1304-1306
- 27. Mayor C, Brudno M, Schwartz JR, Poliakov A, Rubin EM, Frazer KA, Pachter LS, Dubchak I. *Bioinformatics* 2000;16:1046-1047
- 28. Meier N, Dear TN, Boehm T. Mech Dev 1999;89:215–221
- 29. Cunliffe VT, Furley AJ, Keenan D. Mamm Genome 2002;13:245-252
- 30. Baxter RM, Brissette JL. J Invest Dermatol 2002;118:303-309
- 31. Janes SM, Ofstad TA, Campbell DH, Watt FM, Prowse DM. *J Cell Sci* 2004;117:4157–4168
- 32. Holbrook KA. *Pathophysiology of Dermatologic Diseases* (New York: McGraw-Hill, Inc.) 1991:pp. 3–45
- 33. Montagna W, Parakkal PF. *The Structure and Function of Skin* (New York: Academic Press, Inc.) 1974
- 34. Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, Moellmann G, McGuire J. *J Cell Biol* 1988;107:1611–1619

- 35. Halaban R, Ghosh S, Baird A. Dev Biol 1987;23:47-52
- 36. Herlyn M, Mancianti ML, Jambrosic J, Bolen JB, Koprowski H. *Exp Cell Res* 1988;179:322–331
- 37. Hirobe T. Development 1992;114:435–445
- 38. Zhang JM, Hoffmann R, Sieber-Blum M. Dev Dyn 1997;208:375–386
- 39. Pla P, Solov'eva O, Moore R, Alberti C, Kunisada T, Larue L. *Pigment Cell Res* 2004;17:142–149
- 40. Stocker KM, Sherman L, Rees S, Ciment G. Development 1991;111:635–645
- 41. Yamane T, Hayashi S, Mizoguchi M, Yamazaki H, Kunisada T. Dev Dyn 1999;216:450–458
- 42. Alanko T, Rosenberg M, Saksela O. J Invest Dermatol 1999;113:111–116
- 43. Oka M, Kageyama A, Fukunaga M, Bito T, Nagai H, Nishigori C. *J Invest Dermatol* 2004;123:930–936
- 44. Imokawa G, Motegi I. J Invest Dermatol 1993;100:47–54
- 45. Puri N, van der Weel MB, de Wit FS, Asghar SS, Das PK, Ramaiah A, Westerhof W. *Arch Dermatol Res* 1996;288:633–635
- 46. Horikawa T, Norris DA, Yohn JJ, Zekman T, Travers JB, Morelli JG. *J Invest Dermatol* 1995;104:256–259
- 47. Schőfer C, Frei K, Weipoltshammer K, Wachtler F. *Anat Embryol (Berl)* 2001;203:137–146
- 48. Gonzalez AM, Buscaglia M, Ong M, Baird A. J Cell Biol 1990;110:753-765
- 49. Johns SA, Soullier S, Rashbass P, Cunliffe VT. Dev Dyn 2005;232:1062–1068
- 50. Schlake T, Boehm T. Mech Dev 2001;109:419–422
- 51. Kunisada T, Yoshida H, Yamazaki H, Miyamoto A, Hemmi H, Nishimura E, Shultz LD, Nishikawa S, Hayashi S. *Development* 1998;125:2915–2923
- 52. D'Orazio JA, Nobuhisa T, Cui R, Arya M, Spry M, Wakamatsu K, Igras V, Kunisada T, Granter SR, Nishimura EK, Ito S, Fisher DE. *Nature* 2006;443:340–344

- 53. Fitch KR, McGowan KA, van Raamsdonk CD, Fuchs H, Lee D, Puech A, Herault Y, Threadgill DW, Hrabe de Angelis M, Barsh GS. *Genes Dev* 2003;17:214–228
- 54. Levine N, Sheftel SN, Eytan T, Dorr RT, Hadley ME, Weinrach JC, Ertl GA, Toth K, McGee DL, Hruby VJ. *JAMA* 1991;266:2730–2736
- 55. Plikus M, Wang WP, Liu J, Wang X, Jiang TX, Chuong CM. *Am J Pathol* 2004;164:1099–1114
- 56. Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M, Shapiro SS. *Exp Cell Res* 2000;254:25–32

図の説明文

Figure 1. Foxn1 は毛包のメラノサイトのターゲット細胞に発現している 出産後 9 日 (P9) の野生型マウス毛包. Foxn1 (赤) を蛍光免疫染色した. DNA (青) を Hoechst dye 33258 で染色した. PC, 毛皮質の前駆細胞; FP, 毛乳頭細胞. スケールバーは 20 μm を表す.

Figure 2. 表皮での Foxn1 発現により表皮に色素沈着が誘導される

A. *Krt5-Foxn1* 導入遺伝子の構造. **B.** 野生型 (WT) およびトランスジェニック (TG) の P14 の顔と足蹠の皮膚. **C-F**. P10 の野生型 (**C** および **E**) およびトランスジェニック (**D** および **F**) の皮膚のフォンタナ・マッソン染色. メラニンは 黒褐色に染色される. **G** および **H**. P4 の野生型 (**G**) およびトランスジェニック (**H**) の TTA 解析. Tyr 陽性細胞が赤で示される. **I** および **J**. P9 の野生型 (**I**) およびトランスジェニック (**J**) の皮膚の蛍光免疫染色. Foxn1 が赤で示される. **G-J** では DNA が青で染色される. **C-J** の矢頭は真皮ー表皮境界を示す. SC, 角質層; IF, 漏斗部; SG, 皮脂腺; HS, 毛幹. スケールバーは, **C** と **D** では 15 μm, **E** と **F** では 50 μm, **G-J** では 20 μm を表す.

Figure 3. Foxn1 はメラノサイトのターゲット部位となる

2 週齢の *Krt5-Foxn1* マウスの表皮およびその下の組織を示した. すべて同一部位. **A**. 蛍光顕微鏡像. Foxn1 (赤) と Tyrp1 (緑) を蛍光免疫染色し, DNA (青) をカウンター染色した. **B**. 明視野像. メラニン (黒褐色). フォンタナ・マッソン染色はしていない. **C**. **B** の反転イメージ. メラニンが白で表される. **D**. **A** と **C** のマージ像. 矢頭は基底層 Foxn1 陽性領域と陰性領域の境界. スケールバーは 25μm を表す.

Figure 4. FOXNI はヒトのメラノサイトのターゲット細胞で発現している 正常なヒト成人皮膚で FOXN1 (赤)を蛍光免疫染色し、DNA (青)をカウンタ 一染色した. 矢頭は真皮-表皮境界を示す. スケールバーは 25μm を表す.

Figure 5. Foxn1 は bFgf を介してメラノサイトの挙動を制御する

A および B. P4 の野生型 (A) とトランスジェニック (B) の皮膚の免疫蛍光染 色. bFgf が赤で示される. C. ELISA による分泌タンパク量の測定. グラフは野 生型(WT)およびトランスジェニック(Krt5-Foxn1)の初代培養ケラチノサイ ト培地中の bFgf 量. 独立した 4 回の実験からの結果. D. リアルタイム RT-PCR による転写産物量の測定. y 軸は組換えアデノウィルスを感染させたケラチノサ イト中の bFgf mRNA 量. x 軸は感染開始からの経過時間. 独立した 3 回の実験 からの結果. E. Foxn1-DNA 複合体の ChIP 解析. グラフは bFgf 遺伝子座につい ての outcome を示す. 正常 IgG を用いたコントロール実験では定量限界以下の 僅かな量の部位1および2を沈降したのみであった.独立した4回の実験から の結果. F. マウス bFgf. 部位 1 と部位 2 を示した. D と E では Ad は空ウィル スベクター, Ad-Foxn1 は完全長 Foxn1 タンパクを産生する. G および H. bFgf 中和後のメラノサイト局在を TTA で解析. トランスジェニックの表皮およびそ の下の組織を示した. Tyr 陽性細胞を赤で示した. 動物に溶媒のみ(G) または bFgf 抗体 (H) を注入. 正常 IgG を注入した場合も溶媒のみと同じ結果が得ら れた. A, B, G, H では, DNA が青で示され, 矢頭は真皮 - 表皮境界を示す. また C-E では、データは平均値 $\pm SD$ で表される. スケールバーは、 $A \geq B$ で は20 μm, GとHでは25 μm を表す.

Fig. 1

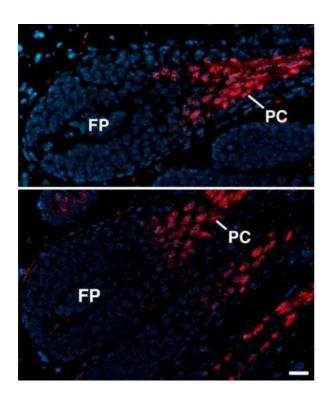


Fig. 2

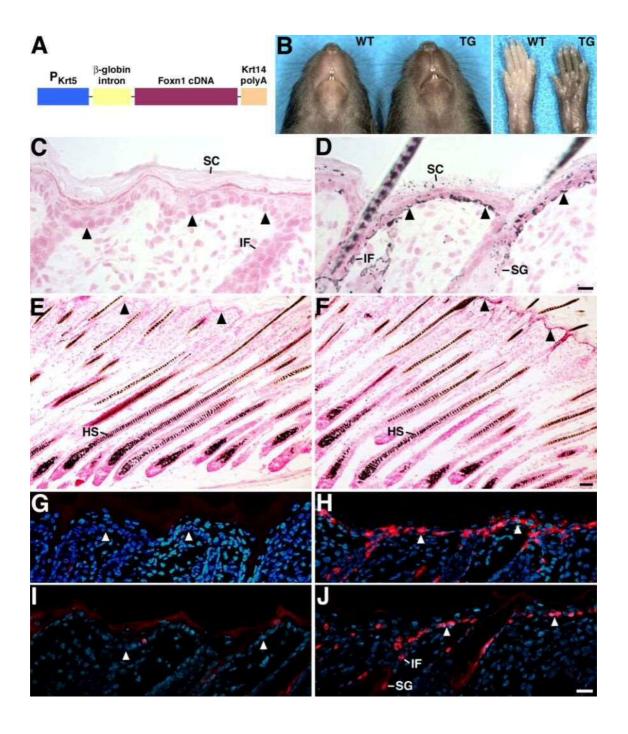


Fig. 3

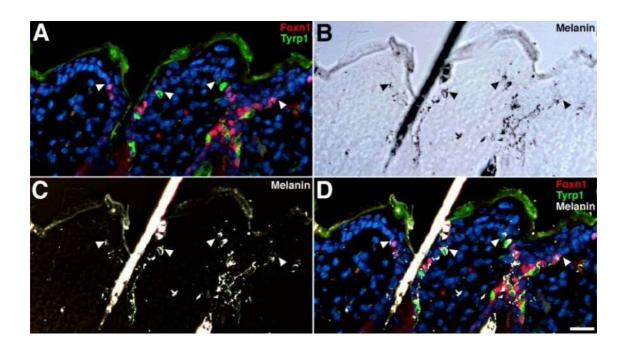


Fig. 4

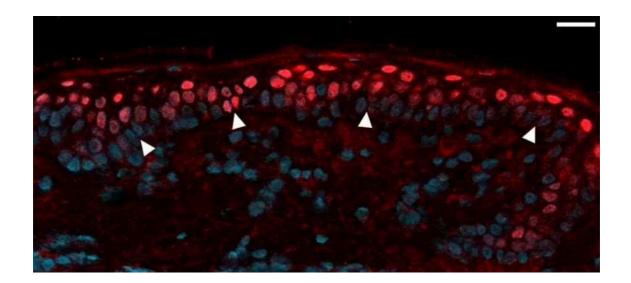
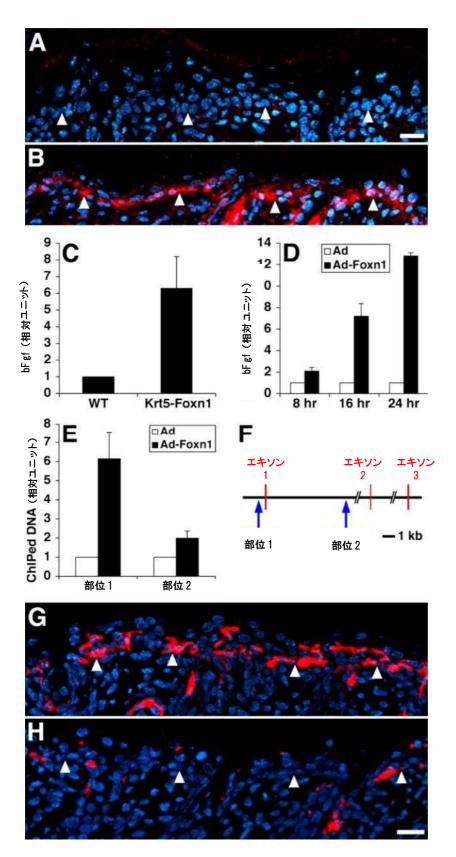


Fig. 5



4. Keratinocyte Growth Factor はヒトの顔面の日光性色素斑と肝斑の両方の色素沈着が消失しにくい原因となっている可能性がある

要旨

紫外線(UV)への曝露による急性の色素沈着のメカニズムはこれまでの研究で多くのことがわかっているが、日光性色素斑や肝斑のような色素沈着異常において色素沈着が消失しにくい原因はよくわかっていない。従ってこのような色素沈着異常に対して化粧品などでどのように対処すれば良いかは依然として大きな課題である。

本研究において、ヒトの顔面の日光性色素斑と肝斑の両方の色素沈着が消失しにくい原因が Keratinocyte Growth Factor (KGF である可能性があることが示された. 顔面の日光性色素斑と肝斑の両方の表皮で顕著に KGF が蓄積されていることが、長さあたり、および面積あたりの二通りの定量評価によって示された. 本結果は真皮由来因子である KGF の表皮での蓄積が、顔面の日光性色素斑と肝斑の両方の色素沈着が消失しにくい原因となっている可能性を示唆している. この結果をもとにこれら色素沈着異常に対する新しい対処方法が見出されることが期待される.

序論

日焼けなどの急性の色素沈着は、UV に曝露されることにより皮膚のメラニン量が増加するためであり、そのメカニズムについてはこれまでの研究で多くのことがわかっている。UV によりケラチノサイト由来の遺伝子産物の発現が亢進し、皮内でメラノジェネシスの亢進およびメラニンのメラノサイトからの移送を活性化するパラクリン因子として働く「. 急性の色素沈着は時間の経過とともに消失するが、そばかす、日光性色素斑(老人性色素斑とも呼ばれる)、肝斑のような色素沈着異常は、化粧品や医薬品の皮膚外用もしくはレーザー治療な

ど、患者が何の対処も行わない限り、なかなか消失しない.

日光性色素斑は、顔面、手の甲、背中上部や肩など、日光に曝露されやすい部位に現れる暗褐色のシミである². 日光性色素斑がたくさん出現するといかにも加齢した印象を与えてしまう. UV 照射履歴の蓄積が日光性色素斑の原因と考えられている. 従って日光性色素斑によるシミは光老化の指標として捉えられる. 肝斑は皮膚の日光露光部に、正中を挟んで左右対称に現れる色素沈着であり、特に東洋人の女性によくみられる³. 主な原因として、遺伝的背景、UV への曝露、性ホルモンなどが挙げられている. しかし、日光性色素斑や肝斑のような色素沈着が消失しにくいメカニズムについては多くはわかっていない.

KGF(もしくは FGF-7 とも)は FGF ファミリーのメンバーである 4 . KGF は,皮膚や消化管由来の間質系の細胞である線維芽細胞の培養液中に分泌され,また $in\ vivo$ では表皮の細胞では発現されないが真皮の細胞で発現することが確認されている 5 . 加えて,このパラクリン的に作用する成長因子はメラノジェネシス 5,6 を亢進することも知られている.過去に日光性色素斑 5 例において KGF 量が高かったという報告があり,KGF が真皮から表皮に浸透し,そのため日光性色素斑が消失しにくくなっているのではないかと考えられている 6 . 本研究では,顔面の日光性色素斑と肝斑,ふたつの主な色素沈着異常について表皮における KGF の蓄積を定量的に解析し,これらの色素沈着異常における統計的有意な KGF の蓄積の増加を見出した.

材料と方法

患者

医師により新たに日光性色素斑と診断された 24 人,および肝斑と診断された 13 人の韓国人女性から検体を提供頂いた. 各患者から,皮膚サンプリングを行う前に書面による承諾を得た. 本研究は Ajou 大学病院倫理委員会の承認を得ている (No. MED-KSP-12-171).

免疫組織学および画像解析

各患者の顔面の病変部位および周辺正常部位の皮膚から局所麻酔下のバイオプシーにより皮膚サンプルを得た.周辺正常部位は病変部位の境界から約1cm離れた部位とした.日光性色素斑24対および肝斑13対の組織を,10%フォルマリンで固定し免疫組織学的解析に供した.メラニン色素はフォンタナ・マッソン染色により可視化した.

病変部位と周辺正常部位の皮膚のパラフィン包埋切片(4 μ m)を抗 KGF モノクローナル抗体(Abcam、米国)(希釈率 1:100)で染色した(48°C, 20 分).病変部位と周辺正常部位について表皮面積に対する染色された面積(SA/EA)および真皮乳頭間隆起長あたりの染色された面積(SA/1R)を算出した.観察は一定の顕微鏡倍率下で行い,画像解析には Image Pro Plus ver. 4.5(Medical Cybertics Inc., 米国)を用いた.グラフは箱ひげ図で表示した.

統計解析

病変部位と周辺正常部位のSA/EA およびSA/1R の比較は対応のあるStudent の t 検定(両側検定)を行った. P 値が 0.05 未満を統計的有意とした.

結果

顔面の日光性色素斑と肝斑における KGF の蓄積

顔面の日光性色素斑および肝斑両方において KGF タンパクの蓄積を調べた. 病変部においては日光性色素斑と肝斑ともに表皮において KGF 染色に対し明らかな免疫陽性反応があったが,周辺正常部位では弱い免疫反応が確認されたのみであった(Fig. 1). 周辺正常部位の SA/EA は日光性色素斑で 0.184 ± 0.139 ,肝斑で 0.134 ± 0.071 ,病変部位では日光性色素斑で 0.237 ± 0.107 ,肝斑で 0.210 ± 0.084 であり,統計的に有意な差があった(日光性色素斑で P=0.014,肝斑で P=0.016)(Fig. 2A). 周辺正常部位の SA/IR は日光性色素斑で 10.216 ± 7.194 ,肝斑で 10.0160(Fig. 2A). 周辺正常部位の SA/IR は日光性色素斑で 10.0161) (Fig. 2A).

4.709 であり、これも統計的に有意な差があった (日光性色素斑でP = 0.000035、 肝斑でP = 0.014) (Fig. 2B).

考察

本研究において、顔面の日光性色素斑と肝斑の両方の表皮において KGF タンパクの蓄積が増加していることが示された。解析には二通りの方法を用いた。一つは KGF の染色面積を表皮面積で標準化する方法、もう一つは KGF の染色面積を、表皮の厚さに依存しない真皮乳頭間隆起長で標準化する方法である。どちらの解析方法においても、顔面の日光性色素斑と肝斑の両方において、周辺正常部位と病変部位の間に統計的に有意な差が見出された。本研究においては患者数の関係上、日光性色素斑や肝斑の、発症からの期間やステージを考慮に入れた解析までは行っていないが、これらの要素も結果を左右する要因であることは考えうる。さまざまなステージや期間の日光性色素斑や肝斑を有する多数の患者を集めた試験を行うことが出来れば、KGF タンパクの蓄積量とそれら指標との相関も明らかにできるのではないかと期待される。

過去の研究により、真皮ー表皮境界領域にあるへパラン硫酸が分解されることにより、表皮と真皮の間で行き来する成長因子を制御する基底層の機能が損なわれることが明らかになっている⁷. さらには、真皮ー表皮境界領域にあるへパラン硫酸がヒト背部の日光性色素斑において減少していること、皮膚再構成培養モデルにおいてへパラン硫酸を分解するとメラノジェネシスが亢進することも明らかにした。加えて最近の肝斑の組織学的解析を行った研究により、肝斑の病変部位において、基底膜の構造が破壊されているような変化がみられることが報告されている^{8,9}. このような日光性色素斑における真皮ー表皮境界領域のヘパラン硫酸の分解や、肝斑における基底膜の喪失は、KGFのような真皮由来の因子の表皮への浸透を促進させる可能性が考えられる。つまり、本研究の結果わかった顔面の日光性色素斑や肝斑などの色素沈着異常において表皮にKGFが蓄積しているという事実から、真皮由来のKGFが、生理機能や物理機能

を喪失した基底膜を通過して表皮に浸透し、そこで蓄積し、その結果としてこれら色素沈着が消失しないという仮説を考えることができる。従って本研究により、化粧品や医薬品の皮膚外用によって真皮由来の KGF そのもの、もしくは KGF の表皮への浸透を高める基底膜の生理的・物理的機能の喪失に対処することが、色素沈着異常に有効である可能性が示唆されたと考えられる。

参考文献

- 1. Gilchrest BA. J Invest Dermatol 2011;131: E14-E17
- 2. Hodgson C. Arch Dermatol 1963;87:197-207
- 3. Kang HY, Ortonne JP. Ann Dermatol 2010;22:373-378
- 4. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Science 1989;245:752-755
- 5. Chen N, Hu Y, Li WH, Eisinger M, Seiberg M, Lin CB. Exp Dermatol 2010;19:865-872
- 6. Lin CB, Hu Y, Rossetti D, Chen N, David C, Slominski A, Seiberg M. *J Dermatol Sci* 2010;59:91-97
- 7. Iriyama S, Ono T, Aoki H, Amano S. J Dermatol Sci 2011;64:223-228
- 8. Lee DJ, Park KC, Ortonne JP, Kang HY. *Br J Dermatol* 2012;166:684-686
- Torres-Álvarez B, Mesa-Garza IG, Castanedo-Cázares JP, Fuentes-Ahumada C,
 Oros-Ovalle C, Navarrete-Solis J, Moncada B. Am J Dermatopathol
 2011;33:291-295

図の説明文

Figure 1. 抗 KGF 抗体による免疫染色像

周辺正常部位に比べ顕著な量の KGF タンパクが、日光性色素斑 (\mathbf{A}) および肝 斑 (\mathbf{B}) の病変部位に蓄積していた. (倍率: $\times 400$)

Figure 2. 免疫染色の定量解析

KGF に対する免疫組織化学解析を、日光性色素斑(A および C)および肝斑(B および D)に対して二通りの方法 SA/EA(A および B)および SA/IR(C および D)で定量化した、病変部位と周辺正常部位に統計的有意差のあるものに*印(P < 0.05)もしくは***印(P < 0.001)を付した.



Fig. 1

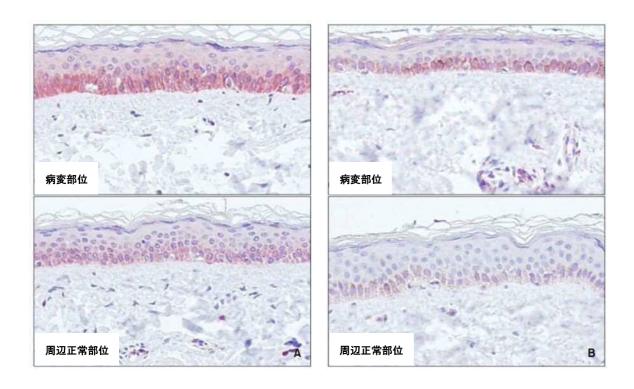
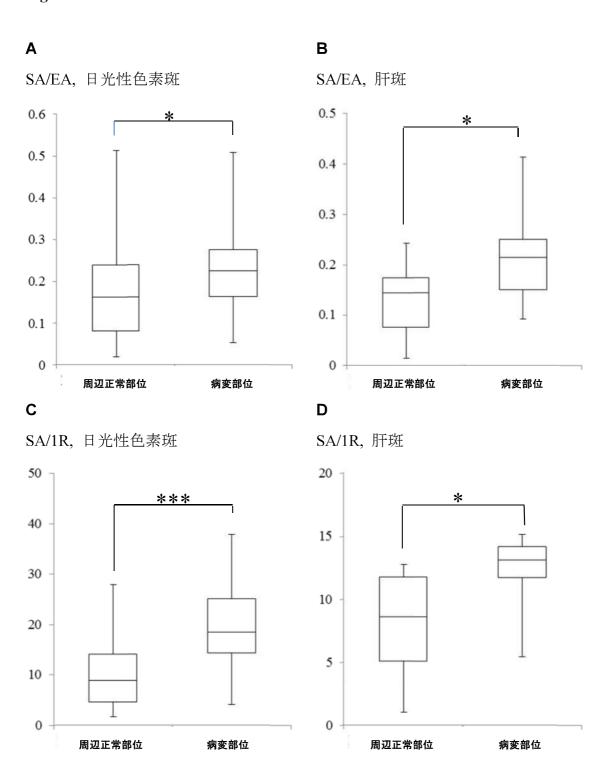


Fig. 2



5. Keratinocyte Growth Factor の培養ヒトメラノサイトの増殖および分化に与える影響

要旨

ケラチノサイト由来因子はヒト表皮メラノサイトの増殖と分化を促進することは知られているが、真皮由来因子の影響についてはあまり多くは知られていない.本研究では真皮由来因子のひとつである Keratinocyte Growth Factor (KGF)がヒトメラノサイトの増殖や分化を制御しているかどうかについて調べた.

ヒト表皮のメラノブラスト・メラノサイトをケラチノサイト共存下/非共存下で、無血清培地に KGF を添加して培養し、増殖や分化に与える KGF の影響を検討した。KGF は Dibutyryl cAMP (DBcAMP)、塩基性 Fibroblast Growth Factor (bFGF)、Transferrin (Tf)、および Endothelin-1 (ET-1)の存在下、メラノブラストの増殖を亢進させた。KGF はケラチノサイトの非共存下でも DBcAMP、Tf、および ET-1 の存在下でメラノサイトの分化、メラノジェネシス、樹状突起伸長を促進させたが、メラノサイトの増殖を促進するにはケラチノサイトとの共存が必要であった。これらの結果は真皮由来の KGF が cAMP、bFGF、Tf、および ET-1 と協働してヒトメラノブラストの増殖を、cAMP、Tf、および ET-1 と協働してメラノサイトの分化を、cAMP、Tf、および未知のケラチノサイト由来因子と協働してメラノサイトの増殖を促進することを示唆している。

序論

哺乳類の色素産生細胞メラノサイトは TYR・TRP1・TRP2 の活性があること, メラノソームという細胞内小器官や樹状突起を有することを特徴とし, 皮膚では表皮, 真皮, 毛球部などに存在する ¹⁻⁶. メラノサイトは神経冠(神経堤)由来で, メラノブラストという前駆体から分化することが知られている ⁷. メラノサイトの発生過程は, 神経冠細胞の誕生, その分化と遊走, 神経冠細胞から

メラノサイト細胞系譜への運命決定、メラノブラストの増殖と遊走、メラノブ ラストからメラノサイトへの分化、メラノサイトの増殖、メラノサイトの成熟 (TYR・TRP1・TRP2 活性の増加およびメラノソームの形成と成熟)、周辺ケラ チノサイトへの成熟したメラノソームの受け渡し、メラノサイト幹細胞の再増 殖と再分化,細胞老化,細胞死,と,多くのステップより成っている^{3-5,7-12}.こ れらのステップを制御するメカニズムは in vivo および in vitro でメラノブラスト やメラノサイト幹細胞が同定され確立されているマウスではある程度知られて いるが ⁸⁻¹⁴, メラノブラストやメラノサイト幹細胞についての知見の少ないヒト ではメラノサイトの増殖や分化のメカニズムはあまり知られていない. ヒトの 皮膚に存在するメラノサイト前駆細胞が非常に少ない、メラノサイトはあまり 活発に分裂する細胞でない 15,遺伝子導入実験が難しい,などの理由から in vivo でヒトのメラノサイト前駆細胞を同定する研究には困難がつきまとう. そこで 多くの細胞を扱うことのできる in vitro 培養系、特に無血清のものが研究方法と して有益である ¹⁶. マウスのメラノブラストおよびメラノサイトを増殖培養する ことのできる無血清培地はすでに開発されている 17. メラノサイト増殖培地 (MDMD) は Ham's F-10 培地に Insulin, Bovine Serum Albumin, Ethanolamine, Phosphoethanolamine, Sodium Selenite, および Dibutyryl Adenosine 30:50-cyclic Monophosphate (DBcAMP) を加えて調製し、マウスメラノサイトの増殖や分化 に使われる ¹⁷. メラノブラスト増殖培地(MDMDF)は MDMD に bFGF を加え て調製し、未分化のメラノブラストの増殖に使われる ¹⁷. 本研究ではマウスメラ ノブラストやメラノサイトの培養に使われる MDMDF や MDMD がヒトのメラ ノブラストやメラノサイトの培養にも使うことができることを明らかにした.

 $In\ vivo\ や\ in\ vitro\ のこれまでの研究結果から、ET-1^{18,19}、SCF^{20-23}$ 、Hepatocyte Growth Factor(HGF) $^{24-26}$ 、Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor(GMCSF) $^{27-29}$ 、および Leukemia Inhibitory Factor(LIF) 30 などのケラチノサイト由来因子が哺乳類の表皮メラノサイトの増殖や分化を促進することが明らかにされてきた.真皮の線維芽細胞もメラノサイトの機能制御に重要であることが知られている.bFGF 31 、酸性 FGF 31 ,Transforming Growth Factor- $\beta 1^{32}$,KGF 32,33 ,

SCF³³,HGF^{33,41},Interleukin(IL)- $1\alpha^{32}$,IL- $1\beta^{32}$,および Platelet-Derived Growth Factor³⁵など,多くのパラクリン因子が同定されている.これらの因子は UV 照射後の皮膚の色素沈着を制御している ^{36,37}.ヒト皮膚で背中側に比べて掌蹠の色素沈着が少ないのは真皮線維芽細胞由来因子 DKK1 による制御のためである ³⁸. 真皮線維芽細胞がヒト表皮の色素沈着を制御していることも報告されている ^{39,40}. 最近の研究で,ヒトの黒い色の皮膚由来の線維芽細胞で高く発現される Neuregulin-1 が,再構成皮膚モデルならびに培養ヒトメラノサイトの色素沈着を 亢進させることが報告された ⁴¹.しかしながら線維芽細胞由来因子が哺乳類の真皮メラノサイトの増殖や分化を制御しているかどうかについてはまだ明らかに なっていない点が多い. また無血清培地で培養されたヒトメラノサイトが線維芽細胞由来のパラクリン因子に反応するかどうかもわかっていない.

KGF (FGF-7) は FGF ファミリーメンバーであり ⁴², 上皮細胞の増殖や分化を促進することが知られている ⁴³. KGF は皮膚および消化管由来の培養間質線維芽細胞から分泌される. *In vivo* では表皮ではなく真皮で発現されている ⁴⁴. このパラクリン的に働く成長因子はメラノジェネシス ^{44,45} およびヒトメラノサイトからケラチノサイトへのメラノソームの受け渡し ⁴⁶ を亢進することも知られている. しかしながら KGF のメラノサイトの増殖と分化における役割は知られていない. 線維芽細胞由来因子 KGF が, MDMDF や MDMD を用いた培養系でヒトメラノサイトの増殖や分化を制御するかどうかを調べることを目的に本研究を行った.

材料と方法

メラノサイトの培養

アフリカンアメリカン新生児包皮由来二次培養由来ヒト正常表皮メラノサイトはクラボウ(日本)より購入した. すべての実験は同一ロットのメラノサイトを用いた. 特記無い限りすべての試薬は Sigma Chemical Co. (米国)より購入した. 分化ヒトメラノサイトは MDMD (10 μg/ml Insulin (ウシ), 0.5 mg/ml

Bovine Serum Albumin (fraction V), 1 μM Ethanolamine, 1 μM Phosphoethanolamine, 10 nM Sodium Selenite, 0.5 mM DBcAMP, 100 U/ml Penicillin G, 100 μg/ml Streptomycin Sulfate, 50 μg/ml Gentamicin Sulfate, および 0.25 μg/ml Amphotericin B を添加した Ham's F-10 medium (Gibco, 米国)) 「で培養した。メラノブラストとごく薄く色素沈着したメラノサイト(分化したてのメラノサイト)は MDMDF(2.5 ng/ml ヒト組換え bFGF(Invitrogen, 米国)を添加した MDMD) 「で培養した。本研究での培地への添加試薬はすべて同一ロットのものを用いた。実験によっては培養の最初から MDMD と MDMDFに Transferrin (Tf), ET-1, ヒト組換え KGF を添加した.

細胞懸濁液をもとに血球計算板で細胞数を計測し、I 型コラーゲン(Becton Dickinson、米国)でコート 17 したディッシュに、2 × 10^4 細胞/ 35 mm ディッシュ(2.08 × 10^3 細胞/ 2 cm²)の密度で播種した。5% CO_2 (pH 7.2)・37°C 環境で培養した。1 週間に 3 回の頻度で培地交換を行った。7 日後、成長因子を添加した MDMDF で培養したサブコンフルエントもしくはコンフルエント状態のメラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトを、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} フリーのリン酸緩衝生理食塩水(CMF-PBS)中の濃度で 0.05%トリプシン($T\phi$; Difco、米国)、および 0.02%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)で 37°C で 10 分処理した。 $T\phi$ 処理したものに 2,000 U/ml の大豆由来 $T\phi$ 阻害剤を加え、細胞懸濁液を 800×gで 5 分遠心した。遠心後細胞ペレットを MDMDF に再懸濁し、コラーゲンコートした 10 mm)がディッシュに接着・伸展した段階で、培地を 10 mm)、ET-1 (10 mm)、および 10 mm)を添加した MDMDF または MDMD に交換しさらに 10 同日培養した。

ケラチノサイトの培養

新生児包皮初代培養由来ヒト正常表皮ケラチノサイトはクラボウより購入した. すべての実験は同一ロットのケラチノサイトを用い, メラノサイトとケラチノサイトは同一ドナー由来のものを用いた. 無血清の HuMedia-KG2 (クラ

ボウ,日本)に10 μ g/ml insulin, 0.1 η ml ν h組換え Epidermal Growth Factor (EGF), 0.5 μ g/ml Hydrocortisone, 0.4%ウシ脳下垂体抽出液, 50 μ g/ml Gentamicin Sulfate, および 50 η ml Amphotericin B を添加した培地で培養した。ケラチノサイトは I 型コラーゲンでコートしたポリスチンレンディッシュ 47 に 2 \times 10 4 細胞/35 η mm の密度で播種し, 5% η CO2・37°C 環境で培養した。7 日培養しサブコンフルエントになった二次培養ケラチノサイトを CMF-PBS 中の濃度で 0.05% η To および 0.02% EDTA で 37°C で 10 分処理した。細胞を回収し遠心したのち,同じ細胞密度で播種した。この操作を繰り返した。

ケラチノサイトとメラノサイトの1:1 共培養

ケラチノサイトを Toではがし、新しいコラーゲンコートディッシュに KG2 培地で 2×10^4 細胞/35 mm の密度で播種した。2 時間後(ほとんどのケラチノサイトがディッシュに接着・伸展した段階)、成長因子を添加した MDMDF で培養したメラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトも同様に Toではがし、培養したケラチノサイトの上から MDMDF で 2×10^4 細胞/35 mm ディッシュの密度で播種した。2 時間後(ほとんどのメラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトがディッシュに接着・伸展した段階)、KG2 とMDMDF の 1:1 混合培地を除去し、成長因子を添加した MDMD または MDMDF でさらに培養した。

メラノブラストおよびメラノサイトの増殖アッセイ

35 mm ディッシュあたりのメラノサイトの細胞数は位相差および明視野顕微鏡による直接計測で決定した ¹⁷. 位相差および明視野顕微鏡を用いた計算は無作為に選んだ 10 視野の平均値に基づく. 位相差顕微鏡観察による二極化, 三極化, 樹状突起, 多角形, 上皮様細胞で, 明視野顕微鏡観察により茶色から黒の色素顆粒を有する細胞を, 分化したメラノサイトと定義した. それらの細胞はDOPA (和光純薬工業, 日本) 反応に陽性であった. それに対して, 位相差顕微鏡観察による二極化, 三極化, 樹状突起, 多角形の細胞で, 色素を有さず DOPA

反応陰性(=TYR 活性がない)の細胞を、メラノブラストと定義した.これらの細胞は DOPA-プレメラニン反応(DOPA-アンモニア性硝酸銀二重染色) ^{17,48} で染色された.この染色によって、TYR を有する分化したメラノサイトに加え、第 I 期および II 期メラノソームを有し TYR 活性のないメラノブラストも計測することができる ^{48,49}. アンモニア硝酸銀染色はメラノサイト内のメラニン化していないメラノソーム同様メラニン化したメラノソームも特異的に染色することができる ^{48,49}. メラノブラストは TRP1 および TRP2 抗体でも染色できた ⁵⁰. メラノブラストは第 I 期および/または II 期メラノソームを有し TYR 活性のない、色素をもたない細胞と定義した.

DOPA 反応

メラノサイトカルチャーを CMF-PBS 中の 5%フォルマリンで 2°C で 30 分固定後,蒸留水で洗浄し,PBS (pH6.8) 中の 0.1% L-DOPA 溶液で 37°C で 1.5 時間インキュベートした。それらを 10%フォルマリンで 25°C で 1 時間固定後,蒸留水で洗浄し,空気乾燥させた。顕微鏡観察または写真撮影の前にディッシュに蒸留水を加えた。

統計

コントロール群と実験群のメラノブラストおよびメラノサイト数の統計的 有意差検定は Student の t 検定(両側検定)を行った.

結果

KGF のメラノサイトの増殖と分化に与える影響

メラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトを MDMD + Tf + ET-1 で培養したときの、メラノサイト増殖に対する影響を調べた. KGF を 0, 1, 10, 100 ng/ml 添加したが、細胞数は増加しなかった(Fig. 1A)が、メラノサイトをケラチノサイトと共培養させた場合は KGF は 1, 10 ng/ml の濃度でメラノ

サイトの増殖を促進することがわかった (Fig. 1B). これらの結果から、 KGF はそれ単独ではメラノサイトの増殖に影響を与えないが、ケラチノサイト由来 の因子と協働的にメラノサイトの増殖を促進することが示唆される.

次に KGF のメラノサイト分化に対する影響を調べた(Table 1). KGF が存在しない場合は7日後のメラノサイトの割合は6割であったが, KGF (10 ng/ml) の添加によりほぼ9割がメラノサイトに分化していた. また細胞の樹状突起の数,長さ,ともに KGF の添加により増加していた. これらの結果は KGF がメラノサイトの分化を促進していることを示唆している. Fig. 2 にケラチノサイトとの共存下での, KGF (10 ng/ml) のメラノサイトの分化への影響を示した. 3日間の培養 (Fig. 2A, B)後, KGF を添加したもの (Fig. 2B) では,無添加のもの (Fig. 2A) に比べて樹状突起が伸長しており,またその樹状突起はケラチノサイトに向かって伸長している様子が観察された. 7日間の培養 (Fig. 2C, D)後には,KGF を添加したもの (Fig. 2D) では,無添加のもの (Fig. 2C) に比べてメラニンを有する分化したメラノサイトの数,細胞あたりのメラニン含有量ともに増加しており,KGF がケラチノサイト共存下でもメラノサイトの分化を促進することが示された.

KGF のメラノブラストの増殖に与える影響

メラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトを MDMDF + Tf + ET-1 で培養したときの、メラノブラスト増殖に対する影響を調べた. Fig. 3 に ケラチノサイトとの共存下で 3 日間の培養したときの、KGF (10 ng/ml) のメラノブラストの増殖への影響を示した. KGF を添加したもの (Fig. 3B) では、無添加のもの (Fig. 3A) に比べてメラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトが増殖している様子が観察された. 一方、分化したメラノサイトはほとんど観察されなかった. Fig. 4 に定量的な結果を示した. KGF (10 ng/ml)によって、メラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトの細胞数がコントロール (KGF 添加無し) に比べて 2 倍以上増加していた. これらの結果より、KGF はメラノサイトのようにケラチノサイトの存在に依存せずメラノ

ブラストの増殖を促進することが示された.

考察

本研究では、線維芽細胞由来因子 KGF が培養系において未分化のヒトメラノブラストまたはごく薄く色素沈着したメラノサイトの増殖を促進することを示した。また KGF は培養系においてヒトメラノサイトの増殖および分化も促進することが示された。これらの結果は KGF がヒトメラノサイトの増殖および分化の制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。なおメラノサイトの増殖促進には KGF に加えてケラチノサイトの存在が必要であったが、メラノブラストは KGF のみで増殖が促進した。メラノサイトの増殖に使用した基本培地 MDMDF では、MDMDF に 2.5 ng/ml の bFGF が添加されている点が異なる。この結果は bFGF がメラノブラストの増殖に重要な役割を担っていることを示していると同時に、MDMDFでの培養では分化したメラノサイトがほとんど観察されないことから(Fig. 3)、メラノサイトの増殖には bFGF 以外のケラチノサイト由来因子が重要や役割を担っていることを示唆している。

KGF はメラノサイトの機能を制御する重要な線維芽細胞由来因子のひとつであると考えられる. 事実, KGF はメラノサイトのメラノジェネシス ^{44,45}, ヒトメラノサイトからケラチノサイトへのメラノソームの受け渡し ⁴⁶ を促進することが報告されている. 本研究ではこれらの報告結果を確認し, さらに KGF がcAMP, bFGF, Tf, および ET-1 の存在下でメラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトの増殖を促進するという新しい知見を加えた. また KGFはcAMP, Tf, および ET-1 の存在下で分化, 樹状突起形成, 細胞体容積の拡張, 樹状突起のケラチノサイトへの伸長, およびメラノソームの受け渡しを促進することも示された. さらに KGF は cAMP, Tf, ET-1, およびケラチノサイト由来因子の存在下, 分化したメラノサイトの増殖を促進することも示された. KGFは MDMD で培養されたマウス表皮メラノサイトの増殖や分化は促進しないこ

とが報告されている⁵¹. 現時点ではなぜ KGF がマウスメラノサイトの増殖や分化を促進しないかについては不明だが、マウスメラノサイトが KGF のレセプターを有していない可能性が考えられる.

KGF およびそのレセプターは UVB 波 (UVB) 曝露後に亢進することが報告されている ^{44,45}. また UVB 曝露後の真皮一表皮境界領域でのヘパラン硫酸の分解が表皮でメラノジェネシスを促進することが報告されている ⁵². 従って, KGF のような線維芽細胞由来因子の表皮への移行が増殖, 分化, 樹状突起形成, メラノソームの受け渡しを促進させている可能性が考えられる. ヘパラナーゼによって引き起こされる真皮一表皮境界領域でのヘパラン硫酸の分解は, 線維芽細胞由来の増殖因子やメラノジェネシス亢進因子などの真皮由来因子の表皮への流入を加速させるのかも知れない ⁵². ヘパラン硫酸は, 正常および UVB に曝露したヒト皮膚において線維芽細胞由来因子の真皮から表皮への流入を制御する重要な因子である可能性がある. Kim らは血管の数や大きさが肝斑では増大していること, またそのような部位では Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の発現が亢進していることを報告した ⁵³. これらの結果は真皮の環境がヒト皮膚の色素沈着制御に重要な役割を担っていることを示唆している.

参考文献

- 1. Silvers WK. *The Coat Colors of Mice*. Berlin, Springer-Verlag Press, 1979
- 2. Hearing VJ, Tsukamoto K. *FASEB J* 1991;5:2902–2909
- 3. Hirobe T. Histol Histopathol 1995;10:223–237
- 4. Lin JY, Fisher DE. *Nature* 2007;445:843–850
- 5. White RM, Zon LI. Cell Stem Cell 2008;3:242–252
- 6. Ito S, Wakamatsu K. Pigment Cell Melanoma Res 2011;24:63–74
- 7. Rawles ME. *Physiol Zool* 1947;20:248–266
- 8. Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S. *Nature* 2002;416:854–860

- 9. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE. Science 2005;307:720–724
- Osawa M, Egawa G, Mak S-S, Moriyama M, Freter R, Yonetani S, Beermann F,
 Nishikawa S. *Development* 2005;132:5589–5599
- 11. Nishikawa-Torikai, S, Osawa M, Nishikawa S. *J Invest Dermatol* 2011;131:2358–2367
- 12. Hirobe T. Pigment Cell Res 1992;5:1–11
- 13. Steel KP, Davidson DR, Jackson IJ. Development 1992;115:1111–1119
- 14. Wilkie AL, Jordan SA, Jackson IJ. Development 2002;129:3349–3357
- 15. Jimbow K, Roth SI, Fitzpatrick TB, Szabo G. J Cell Biol 1975;66:663–671
- 16. Hirobe T, Flynn E, Szabo G, Vrabel M, Garcia RI. *J Cell Physiol* 1988;135:262–268
- 17. Hirobe T. Development 1992;114:435–445
- 18. Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M. *J Biol Chem* 1992;267:24675–24680
- 19. Hirobe T. J Invest Dermatol Symp Proc 2001;6:25–31
- 20. Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, Takema Y, Imokawa G. *J Invest Dermatol* 2001;116:578–586
- 21. Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y, Kitahara T, Takema Y, Imokawa G. *Am J Pathol* 2004;165:2099–2109
- 22. Kunisada T, Yoshida H, Yamazaki H, Miyamoto A, Hemmi H, Nishimura E, Shultz LD, Nishikawa S, Hayashi S. *Development* 1998;125:2915–2923
- 23. Hirobe T, Osawa M, Nishikawa S-I. Pigment Cell Res 2003;16:644–655
- 24. Matsumoto K, Tajima H, Nakamura T. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;176:45–51
- 25. Kunisada T, Yamazaki H, Hirobe T, Kamei S, Omoteno M, Tagaya H, Hemmi H, Koshimizu U, Nakamura T, Hayashi SI. *Mech Dev* 2000;94:67–78
- 26. Hirobe T, Osawa M, Nishikawa S-I. Pigment Cell Res 2004;17:51-61
- 27. Imokawa G, Yada Y, Kimura M, Morisaki N. *Biochem J* 1996;313:625–631
- 28. Hirobe T, Furuya R, Ifuku O, Osawa M, Nishikawa S-I. Exp Cell Res

- 2004;297:593-606
- 29. Hirobe T, Furuya R, Hara E, Horii I, Tsunenaga M, Ifuku O. *Pigment Cell Res* 2004;17:230–240
- 30. Hirobe T. *J Cell Physiol* 2002;192:315–326
- 31. Tamm I, Kikuchi T, Zychlinsky A. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:3372–3376
- 32. Maas-Szabowski N., Shimotoyodome A., Fusenig N. E. *J Cell Sci* 1999;112:1843–1853
- 33. Kovacs D, Cardinali G, Aspite N, Cota C, Luzi F, Bellei B, Briganti S, Amantea A, Torrisi MR, Picardo M. *Br J Dermatol* 2010;163:1020–1027
- 34. Mildner M, Mlitz V, Gruber F, Wojta J, Tschachler E. *J Invest Dermatol* 2007;127:2637–2644
- 35. Li W., Fan J., Chen M., Guan S., Sawcer D., Bokoch G. M., Woodley D. T. *Mol Biol Cell* 2004;15:294–309
- 36. Imokawa G. Pigment Cell Res 2004;17:96–110
- 37. Yamaguchi Y, Brenner T, Hearing VJ. J Biol Chem 2007;282:27557–27561
- 38. Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, Yasumoto K, Abdel-Malek ZA, Kubo T, Rouzaud F, Tanemura A, Yoshikawa K, Hearing VJ. *J Cell Biol* 2004;165:275–285
- 39. Hedley SJ, Layton C, Heaton M, Chakrabarty KH, Dawson RA, Gawkrodger DJ, MacNeil S. *Pigment Cell Res* 2002;15:49–56
- 40. Cario-Andre M, Pain C, Gauthier Y, Casoli V, Taieb A. *Pigment Cell Res* 2006;19:434–442
- 41. Choi W, Wolber R, Gerwat W, Mann T, Batzer J, Smuda C, Liu H, Kolbe L, Hearing VJ. *J Cell Sci* 2010;123:3102–3111
- 42. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Science 1989;245:752-755
- 43. Marchese C, Rubin J, Ron D, Faggioni A, Torrisi MR, Messina A, Frati L, Aaronson SA. *J Cell Physiol* 1990;144:326–332
- 44. Chen N, Hu Y, Li W-H, Eisinger M, Seiberg M, Lin CB. *Exp Dermatol* 2010;19:865–872

- 45. Lin CB, Hu Y, Rossetti D, Chen N, David C, Slominski A, Seiberg M. *J Dermatol Sci* 2010;59:91–97
- 46. Cardinali G, Ceccarelli S, Kovacs D, Aspite N, Lotti LV, Torrisi MR, Picardo M. *J Invest Dermatol* 2005;125:1190–1199
- 47. Hirobe T. Dev Biol 1994;161:59-69
- 48. Mishima Y. J Histochem Cytochem 1964;12:784–790
- 49. Hirobe T. J Exp Zool 1982;224:355–363
- 50. Hirobe T, Wakamatsu K, Ito S, Kawa Y, Soma Y, Mizoguchi M. *Eur J Cell Biol* 2006;85:537–549
- 51. Hirobe T. Pigment Cell Melanoma Res 2011;24:462–478
- 52. Iriyama S, Ono T, Aoki H, Amano S. *J Dermatol Sci* 2011; 64:223–228
- 53. Kim EH, Kim YC, Lee E-S, Kang HY. J Dermatol Sci 2007;46:111-116

表

表 1. KGF の培養メラノサイトの分化と樹状突起形成に対する影響

培地	メラノサイトの	樹状突起の数	総樹状突起長
	割合		(μm)
MDMD+Tf+ET-1	59.92±3.65	2.24±0.05	81.17±2.67
MDMD+Tf+ET-1+KGF	90.25±3.00***	2.79±0.10***	128.62±4.06***

メラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトを MDMD+Tf (100 μ g/ml) +ET-1 (10 nM) +KGF (0,10 ng/ml) で 7 日間培養した.樹状突起が形成されたメラノサイトが分化誘導され,その数は増加した.樹状突起の形成については樹状突起の数および長さ (N = 100) を測定することにより評価した.データは 3 回の実験の平均値±標準誤差で示した.各実験は異なる継代培養にて行った.統計的有意差のあるものに*印 (P<0.05),**印 (P<0.01) もしくは*** 印 (P<0.001) を付した.

図の説明文

Figure 1. KGF のメラノサイトの増殖に与える影響の定量結果

ヒトメラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトを MDMD+Tf $(100 \, \mu \text{g/ml})$ +ET-1 $(10 \, \text{nM})$ +KGF $(0, 1, 10, 100 \, \text{ng/ml})$ で,ケラチノサイト非共存 (\mathbf{A}) もしくは共存 (\mathbf{B}) 下 7 日間培養,細胞数を 1, 4, 7 日目に計測した.結果は 3 回の実験の平均値,バーは標準誤差(各データの印よりも値が大きい場合のみ表示).各実験は異なるサブカルチャーで行った.コントロールに対して統計的有意差のあるものに*印(P < 0.05)を付した.

Figure 2. KGF のメラノサイトの分化に与える影響

ヒトメラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトを MDMD+Tf $(100 \,\mu\text{g/ml})$ +ET-1 $(10 \,\text{nM})$ に、KGF 無添加 (A, C) もしくは KGF $(10 \,\text{ng/ml})$ を添加 (B, D) し、ケラチノサイト非共存下 $3 \,\text{日間}$ (A, B) および $7 \,\text{日間}$ (C, D) 培養した。AB は位相差顕微鏡像、CD は明視野像。スケールバーは $100 \,\mu\text{m}$ を表す。

Figure 3. KGF のメラノブラストの増殖に与える影響

ヒトメラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトを MDMDF+Tf $(100 \, \mu g/ml)$ +ET-1 $(10 \, n M)$ に、KGF 無添加 (\mathbf{A}) もしくは KGF $(10 \, n g/ml)$ を添加 (\mathbf{B}) し、ケラチノサイト非共存下 3 日間培養した.位相差顕微鏡像.スケールバーは $100 \, \mu m$ を表す.

Figure 4. KGF のメラノブラストの増殖に与える影響の定量結果

ヒトメラノブラストおよびごく薄く色素沈着したメラノサイトを MDMDF+Tf $(100 \,\mu\text{g/ml})$ +ET-1 $(10 \,\text{nM})$ +KGF $(0, 1, 10, 100 \,\text{ng/ml})$ で,ケラチノサイト非共存下 7 日間培養,細胞数を 1,4,7 日目に計測した.結果は 3 回の実験の平均値,バーは標準誤差(各データのシンボルよりも値が大きい場合のみ表

示). 各実験は異なるサブカルチャーで行った. コントロールに対して統計的有意差のあるものに*印 (P<0.05), もしくは**印 (P<0.01) を付した.

Fig. 1

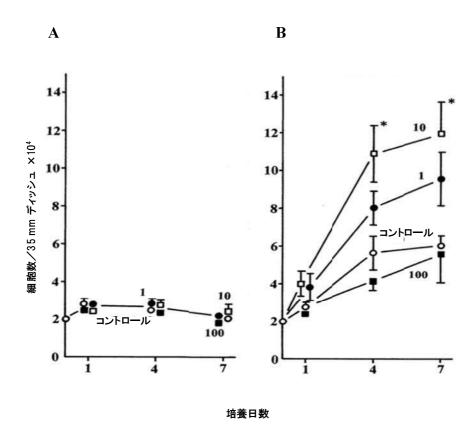


Fig. 2

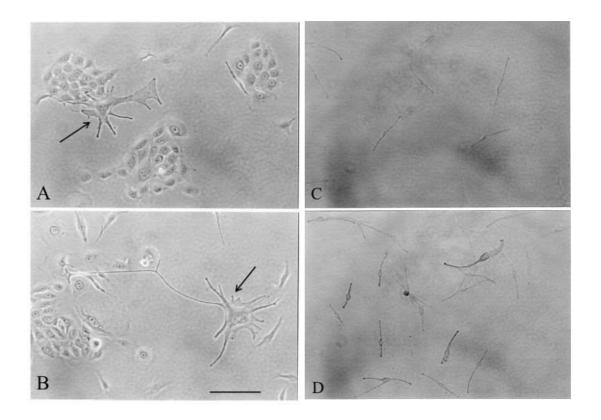


Fig. 3

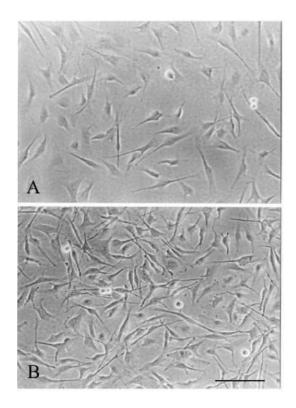
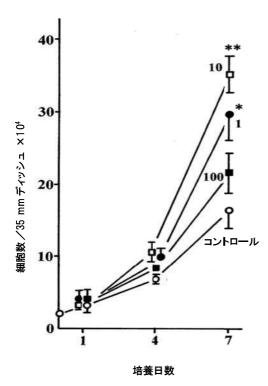


Fig. 4



6. 日光性色素斑部位における血流および血管形成の亢進

要旨

日光性色素斑は紫外線(UV)による光老化の典型的な特徴である. UV による色素沈着に血管系が関与している可能性がさまざまな研究により示されている. 本研究では、日光性色素斑部位の血管系に変化がみられるかどうかを調べた. 顔面に日光性色素斑を有する 25 名の女性に対してその皮膚色測定(測色)および血流測定を実施したところ、日光性色素斑部位では周辺正常部位に比べて赤みが増しており、また血流量が亢進していた. また、顔面に日光性色素斑を有する別の 24 名の女性について免疫組織学的研究を行ったところ、血管密度とともに Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)量が増加していることがわかった. また CD68 の免疫反応が顕著に高かった. このことは日光性色素斑部位にマクロファージが浸潤していることを示唆している. このように日光性色素斑は血流量および血管系の増加を特徴とすることがわかった. これらの結果は日光性色素斑の発生に血管系が関与していることを示唆している.

序論

日光性色素斑は色素沈着異常の中でもっともよく知られたものである. UV への慢性的な曝露による皮膚の光老化は日光性色素斑の発生の主要な病理的原因と考えられている.

紫外線により引き起こされる皮膚の色素沈着はメラノサイトと,周辺のケラチノサイトや線維芽細胞との相互作用により制御されている^{1,2}.日光性色素斑や肝斑のような UV により引き起こされる色素沈着異常の発生に線維芽細胞が重要な役割を果たしていることが示唆されている³⁻⁵.線維芽細胞に加えて,色素沈着への血管系の関与も近年示唆されている⁶⁻⁹.UV への曝露により真皮で血管新生が起こり血管の透過性が高くなる^{6,7}.また UV への曝露によりマクロフ

ァージが皮膚に誘引され、UVにより誘導されるメラノジェネシスに対して決定的な役割を果たしているという報告もある⁸. さらにはつい最近、皮膚の色素沈着に内皮細胞が関与しているという報告もなされた⁹. これらの発見すべてが、UVに関係する色素沈着異常の発生に微小血管系が役割を果たしていることを示唆している. しかしながら血管系が日光性色素斑で亢進しているか否かに関しては詳細には知られていない.

本研究では、日光性色素斑における血流および血管系の変化の有無を調べた. また、マクロファージの浸潤についても調べた.

材料と方法

患者およびバイオプシー

新たに顔面の日光性色素斑と診断された 25 人の日本人女性について,皮膚色測定(測色)ならびに血流測定を実施した. 患者年齢は 39 歳から 58 歳に分布していた. 本研究は資生堂リサーチセンターの倫理委員会の承認を得ている (No. C00705).

また、顔面の日光性色素斑のバイオプシーについての遡及研究を、24 人の女性に対して行った。すべての被験者はフィッツパトリックのスキンタイプ III もしくは IV の韓国人女性で、平均年齢は46.5 歳であった。皮膚バイオプシーは病変部位ならびに周辺正常部位から採取した。本研究はAjou 大学病院倫理委員会の承認を得ている(No. MED-KSP-12-171).

測色

日光性色素斑の測色には、Mexameter-18 (Courage+Khazaka Electronic GmbH, ドイツ) および CM-2600d 分光光度計 (コニカミノルタ, 日本) を使用した. Mexameter ではメラニン指標 (Melanin Index, MI) および紅斑指標 (Erythema Index, EI) を、分光光度計では明るさと赤さの指標として L*値および a*値を得ることができる.また分光光度計での測色結果から、CM-SA ソフトウェア (コニカミ

ノルタ)を用いてヘモグロビン(Hb)指標を算出した.

血流

血流測定にはレーザースペックル血流計(オメガウェーブ,日本)を使用した.本機器は皮膚表面から反射されるレーザー光をリアルタイムで取得する.シグナルの変化は血流容積に比例する.

免疫組織染色

皮膚サンプルは次の抗体で染色した:抗 CD31 (Leica Biosystems,ドイツ),抗 D2-40 (Cell Marque,米国),抗 VEGF-A (Thermo Fisher Scientific,米国),および抗 CD68 (Leica Biosystems). 血管関連の指標として,真皮 1 mm^2 あたりの血管数,平均血管サイズ,および血管の占める相対面積を、CD31 または D2-40染色像(倍率 $200\times$)をもとに算出した。それぞれ真皮一表皮境界領域から 200μm の深さについて評価した。VEGF および CD68 抗体での染色について病変部位と周辺正常部位を比較するため,表皮面積または真皮面積に対する染色された面積 (SA/EA または SA/DA)を算出した。画像解析には Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc.,米国)を使用した。VEGF および CD68 の二重染色細胞の検出には蛍光顕微鏡(Carl Zeiss,ドイツ)を使用した。

統計

病変部位と周辺正常部位の比較は対応のある Student の t 検定(両側検定)を行った. P 値が 0.05 未満を統計的有意とした.

結果

日光性色素斑部位での色の赤みと血流の増加

日光性色素斑部位を測色した結果,周辺正常部位よりも色が黒く,かつ赤みが強かった(Table 1). また分光光度計による測定結果からの計算により得られ

る Hb 指標も病変部位では周辺正常部位に比べて高かった. 日光性色素斑部位における赤みの増加が血流量の増加と相関があるかを調べるため、レーザースペックル血流計で血流量の測定を行ったところ、病変部位では周辺正常部位に比べて血流量が高いことが明らかになった(8.587 \pm 1.824 対 7.923 \pm 1.626, P =0.0001)(Fig. 1).

日光性色素斑部位での血管系とマクロファージ浸潤の増加

日光性色素斑の血管系について、24 例の顔面の日光性色素斑について免疫 組織学的にさらに検討した (Fig. 2A). CD31 の免疫染色により日光性色素斑部 位で血管系が増加していることがわかった. 日光性色素斑では血管の密度およ び血管の占める面積が有意に増加していることがわかった(血管サイズ, 68.13 ± $34.14 \, \mu \text{m}^2$ 対 $80.07 \pm 28.06 \, \mu \text{m}^2$, P = 0.167; 血管密度, $27.30 \pm 17.58 \, \text{mm}^2$ 対 $45.14 \pm 10.00 \, \mu \text{m}^2$ 25.60 mm^2 , P = 0.001; 血管面積, $0.17 \pm 0.18\%$ 対 $0.32 \pm 0.26\%$, P = 0.016) (Fig. 2B). 一方, D2-40 免疫染色により, リンパ管には病変部位と周辺正常部位の差は検出 されなかった (リンパ管面積, $0.003 \pm 0.002\%$ 対 $0.003 \pm 0.001\%$, P = 0.676) (Fig. 2C). 皮膚での主要な血管新生因子である VEGF の発現についても調べた. VEGF 免疫反応は病変部位表皮では周辺正常部位表皮よりも高く (SA/EA, 18.21 ± 14.09 対 5.27 ± 5.09 , P = 0.002), VEGF が日光性色素斑における血管系増加の原 因となっていることが示唆された (Fig. 2D). VEGF 発現の増加は真皮の血管周 辺部位でも認められた. マクロファージの数を調べるため, CD68 免疫染色を行 った. 日光性色素斑の病変部位では周辺正常部位に比べて CD68 陽性マクロファ ージが有意に多く (SA/DA, 0.006 ± 0.002 対 0.005 ± 0.002 , P = 0.037), 日光性色 素斑ではマクロファージが浸潤していることが示唆された (Fig. 2E). VEGF と CD68 の二重免疫蛍光染色によって, 真皮の血管周辺部位に VEGF を発現するマ クロファージが存在することがわかり, マクロファージも日光性色素斑におけ る血管系の増加に寄与していることが示唆された(Fig. 2F).

考察

本研究により、日光性色素斑部位では血管系が増加していることが明らかになった.日光性色素斑を測色すると、EI や a*値が有意に高いことがわかった. 赤みが増していることは血流の増加に相関があり、また CD31 免疫染色により日光性色素斑では血管が増加していることが確認された.日光性色素斑では VEGF 発現が増加していることから、血管系の増加は UV への曝露の結果であることが考えられる.慢性的な日光曝露がケラチノサイトからの VEGF 分泌を促進すること、および VEGF は UV に曝露した皮膚での主要な血管新生因子であることが知られている 7.日光に曝露した真皮では血管新生が起こり、また透過性が亢進している特徴がある 67.

日光性色素斑において血管系が亢進している意義については不明だが、過去の報告により UV に関連する色素沈着異常の病因に血管系が関与していることが示されている。例えば肝斑において血管系の亢進が示され「0,11、肝斑において血管系をターゲットとした対処方法が良好な臨床成績を示している「2,13.トラネキサム酸の経口摂取により表皮の色素沈着が減少し、同時に血管数も減少する「2.血管へのレーザー照射によって色素沈着が改善することも示されている「3.内皮細胞がメラノジェネシスを亢進させるという in vitro の結果 9 から、皮膚の血管形成が色素沈着において役割を果たしていること、ならびに血管系を減少させることでメラノサイトへの刺激も減弱されるであろうことが考えられる。これらの発見は日光性色素斑の発達に血管系の亢進が影響しているであろうことを示唆している。

本研究では、日光性色素斑においてマクロファージが浸潤しているという興味深い事実も発見された.おそらく血管系の亢進によるものと考えられる.血管は急性および慢性の炎症において明確な役割を担っていることが示されている ¹⁴. 炎症した皮膚では、血管の透過性が高くマクロファージなどの炎症性細胞の浸潤が促進されている.また、光老化皮膚ではペリサイトで覆われた血管数が減少し、血管機能が損なわれ、その結果として炎症が起こっているという報告がある ¹⁵. 興味深いことに、マクロファージが UV により引き起こされるメラ

ノサイトの増殖に関与しているという報告もある⁸. また本研究より、VEGF を発現するマクロファージが日光性色素斑での血管系の増加に寄与していると考えられた. 今後さらなる研究により、マクロファージの日光性色素斑の発達における機能とメカニズムが明らかになることが期待される.

本研究においては患者数の関係上、日光性色素斑の、発症からの期間やステージ、患者の年齢、(特にサンスクリーンのような) 化粧品使用履歴の有無などを考慮に入れた解析までは行っていないこと、また、本研究は遡及研究であることを付記しておく.

本研究により、日光性色素斑では血流量および血管系が増加していることが明らかになった. 血管系をターゲットとすることが、日光性色素斑のような色素沈着異常への対処方法として有効であることを示唆している.

参考文献

- 1. Abdel-Malek ZA, Kadekaro AL, Swope VB. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:171-186
- 2. Hirobe T, Hasegawa K, Furuya R, Fujiwara R, Sato K. *J Dermatol Sci* 2013;71:45-57
- 3. Kang HY, Hwang JS, Lee JY, Ahn JH, Kim JY, Lee ES, Kang WH. *Br J Dermatol* 2006;154:1094-1099
- 4. Salducci M, Andre N, Guere C, Martin M, Fitoussi R, Vie K. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014;27:502-504
- 5. Hasegawa K, Fujiwara R, Sato K, Shin J, Kim SJ, Kim M, Kang HY. *Ann Dermatol* 2015;27:626-629
- 6. Chung JH, Yano K, Lee MK, Youn CS, Seo JY, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Detmar M. *Arch Dermatol* 2002;138:1437-1442
- 7. Yano K, Kadoya K, Kajiya K, Hong YK, Detmar M. *Br J Dermatol* 2005;152:115-121

- 8. Zaidi MR, Davis S, Noonan FP, Graff-Cherry C, Hawley TS, Walker RL, Feigenbaum L, Fuchs E, Lyakh L, Young HA, Hornyak TJ, Arnheiter H, Trinchieri G, Meltzer PS, De Fabo EC, Merlino G. *Nature* 2011;469:548-553
- Regazzetti C, De Donatis GM, Ghorbel HH, Cardot-Leccia N, Ambrosetti D, Bahadoran P, Chignon-Sicard B, Lacour JP, Ballotti R, Mahns A, Passeron T. J Invest Dermatol 2015;135:3096-3104
- 10. Kim EH, Kim YC, Lee ES, Kang HY. J Dermatol Sci 2007;46:111-116
- 11. Kang HY, Ortonne JP. Ann Dermatol 2010;22:373-378
- 12. Na JI, Choi SY, Yang SH, Choi HR, Kang HY, Park KC. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27:1035-1039
- 13. Passeron T, Fontas E, Kang HY, Bahadoran P, Lacour JP, Ortonne JP. *Arch Dermatol* 2011;147:1106-1108
- 14. Huggenberger R, Detmar M. J Investig Dermatol Symp Proc 2011;15:24-32
- 15. Kajiya K, Kim YK, Kinemura Y, Kishimoto J, Chung JH. *J Dermatol Sci* 2011;61:206-208

Table 1. 日光性色素斑の病変部位と周辺正常部位の測色

指標	周辺正常部位	病変部位
MI (Melanin index)	131.7 ± 27.0	195.7 ± 48.9***
EI (Erythema index)	210.5 ± 57.2	$276.6 \pm 64.6***$
L^*	61.95 ± 2.50	$59.52 \pm 2.91***$
a*	7.503 ± 1.998	$8.576 \pm 2.164***$
Hb 指標	1.113 ± 0.339	$1.216 \pm 0.371*$

MI および EI は Mexameter にて測定. L*値 (明るさ) および a*値 (赤み) は分光光度計にて測定. Hb 指標は分光光度計の測定結果からコニカミノルタの CM-SA ソフトウェアにより算出. 統計的有意差のあるものに*印 (P<0.05), もしくは***印 (P<0.001) を付した.

図の説明文

Figure 1. 日光性色素斑での血流量の増加

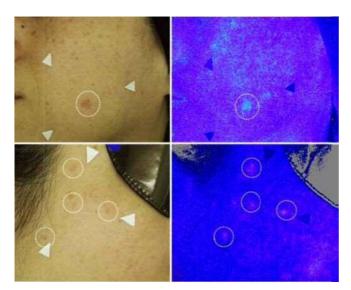
A. レーザースペックル血流系により血流量を測定. 代表的な取得画像として被験者番号 19番 (上のパネル) と 34番 (下のパネル) を示した. 日光性色素斑を丸で囲んだ. 矢頭は, 明視野 (左) と血流画像 (右) の照合のため被験者の顔面に貼付したシール. B. 定量解析.

Figure 2. 日光性色素斑における血管系の亢進とマクロファージの浸潤

A. 被験者番号 2 番の写真. 日光性色素斑の病変部位(L)および周辺正常部位(N)についてバイオプシーをした場所を丸で囲んだ. B. CD31 免疫染色により日光性色素斑の真皮上部で血管系が亢進していることがわかった. コンピューター解析により, 日光性色素斑では血管密度および血管面積が有意に増加していることが示された. C. D2-40 免疫染色では差は検出されなかった. D. 日光性色素斑では VEGF 発現が亢進していた. 画像解析により SA/EA を計測し, 箱ひげグラフで示した. E. CD68 免疫反応は日光性色素斑で有意に高かった. 画像解析により SA/DA を計測し, 箱ひげグラフで示した. F. VEGF と CD68 の二重免疫蛍光染色により, VEGF, CD68 ともに陽性の細胞が血管周囲に存在することがわかった.

Fig. 1

A



В

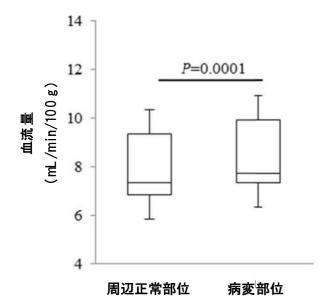
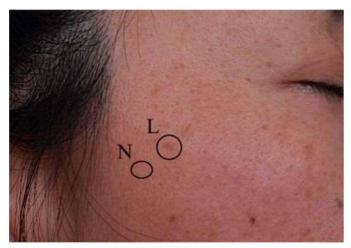
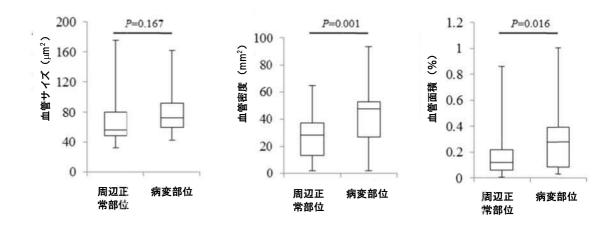


Fig. 2

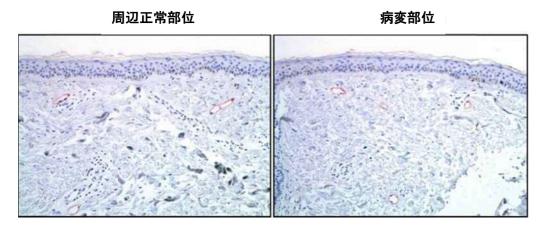
A

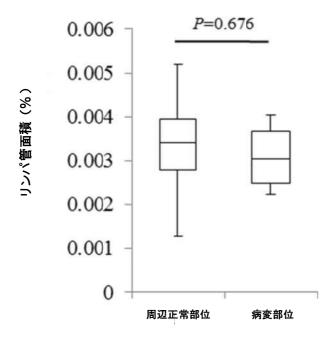


周辺正常部位病変部位

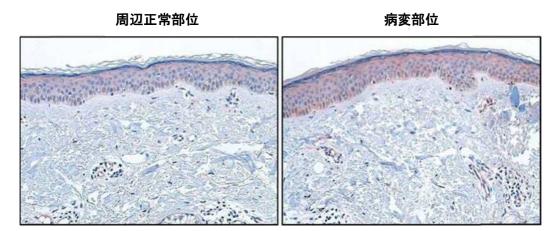


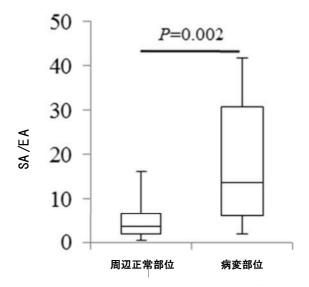
C



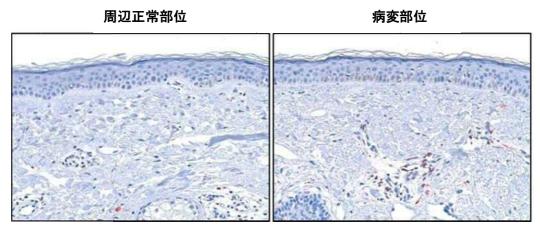


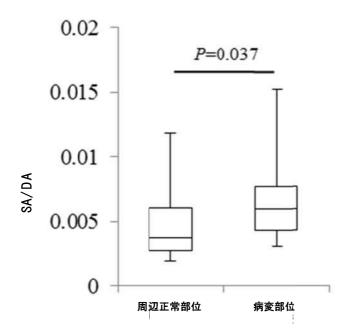
D

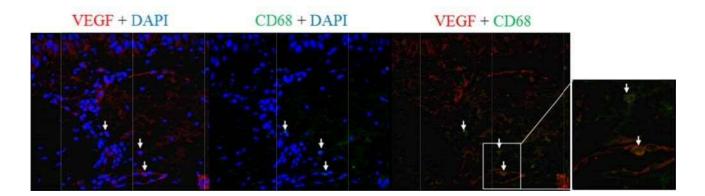




Е







7. 総合考察

ヒトの色素沈着異常の代表として日光性色素斑および肝斑が挙げられる. 日 光性色素斑は、顔面、手の甲、背中上部や肩など、日光に曝露されやすい部位 に現れる暗褐色のシミであり, UV 照射履歴の蓄積が日光性色素斑の原因と考え られている. 従って日光性色素斑によるシミは光老化の指標として捉えられて おり、日光性色素斑が多く出現するといかにも加齢した印象を与えてしまう. 肝斑は皮膚の日光露光部に、正中を挟んで左右対称に現れる色素沈着であり、 特に東洋人の女性によくみられる. 主な原因として, 遺伝的背景, UV への曝露, 性ホルモンなどが挙げられている.しかし、日光性色素斑や肝斑のような色素 沈着が消失しにくいメカニズムについては多くはわかっていない。これまでメ ラノサイト内でのメラノジェネシスのメカニズムやケラチノサイトからの情報 伝達によるメラノジェネシスの亢進メカニズムを中心に、色素沈着異常のメカ ニズム研究がなされてきたが、まだまだ未解明なことが多いのが現状である. また、特にアジアでは伝統的な考え方もあり肌を白くするために化粧品を使う 習慣が根付いており、アルブチンやコウジ酸など数多くのメラノジェネシス抑 制剤が開発され化粧品に配合されてきたが、現状では万人に対して満足のいく 効果を示しているとは言い難く、更に効果のある美白剤が求められ続けている.

本研究は、メラニン色素沈着異常のメカニズム解明ならびに対処方法の示唆 を得る目的で5つの研究を行ったものである.

第 1 の研究ではメラノサイト内でのメラノジェネシスのメカニズムに着目し、 *E. mollis* 抽出物がマウス B16 メラノーマ細胞においてメラノジェネシス抑制効果を示すことを発見し、その作用メカニズムからメラノサイト内でのメラノジェネシスを抑制する有効な対処法の示唆を得た. *E. mollis* 抽出物は 0.3%までの濃度で B16 マウスメラノーマ細胞に対する細胞毒性を示さず、かつその濃度でメラニン量を 40%減少させ、0.05%でも有意にメラニン量を減少させていた.また、 *E. mollis* 抽出物はメラノジェネシスの鍵酵素である *Tyr* の遺伝子発現を減

第 2 の研究ではメラノサイトからケラチノサイトへのメラニンの受け渡し に着目、メラニンのレシピエントであるケラチノサイトが転写因子 Foxn1 によ りメラノサイトを誘引し、色素沈着パターンを決定している可能性を示した. 色素の生合成について色素のドナー細胞側の研究は多くなされてきたが,本研 究は色素のレシピエント細胞の発生を促進するタンパクの最初の報告である. 皮膚の特定の場所で、Foxn1 は、Foxn1 を有する細胞のメラニン化を誘導する. Foxn1 が無い場合、これらの細胞はまるで周りのメラノサイトがその存在を無視 しているかの如く、色素を受け渡されないままである。これらの結果は色素形 成の際の相互作用の形態形成メカニズムを示唆している. また Foxn1 が表皮細 胞に発させるシグナルの一つとして bFgf を同定した. bFgf により, メラノサイ トは Foxn1 陽性細胞をターゲットとして認識し、これらのターゲットに樹状突 起を介して接続し,色素を受け渡す.従って,Foxn1 は色素のレシピエントにあ り,色素のドナーを引き寄せ,色素形成の単位さらには色素沈着した表皮をつ くり上げる. つまり, Foxn1 は細胞に,「色素レシピエントの phenotype」という, 細胞が自分自身の色素沈着を制御するという特別な特性を与えると結論付けら れる.

第3の研究は真皮由来因子の色素沈着への影響に着目,真皮線維芽細胞由来因子である KGF が,日光性色素斑および肝斑の表皮に蓄積していることが,色素沈着異常が消失しない原因になっている可能性を示した.過去の研究より日光性色素斑における真皮ー表皮境界領域のヘパラン硫酸の分解や肝斑における基底膜の喪失が明らかになっている. KGF のような真皮由来の因子がこのよう

な生理機能や物理機能を喪失した基底膜を通過して表皮に浸透し、そこに蓄積 し、その結果としてこれら色素沈着が消失しないという仮説を考えることがで きた.

第4の研究は第3の研究で着目した KGF のメラノサイトに対する影響を in vitro で検討, KGF がメラノサイトの増殖や分化に重要な役割を果たしていることを示した. KGF が培養系において未分化のヒトメラノブラストまたはごく薄く色素沈着したメラノサイトの増殖を促進すること, ヒトメラノサイトの増殖および分化も促進することが示された. 第3の研究で明らかになった, 日光性色素斑や肝斑のような色素沈着異常の表皮に KGF が蓄積していることが, それら色素沈着が消失しない原因になっていることが示唆された.

第5の研究は真皮の血管系と色素沈着の影響に着目,日光性色素斑では真皮の血流の増加・血管系の亢進がみられ,また炎症状態であることも明らかになり,これらの色素沈着への関与が示唆された.本研究および過去の研究から,皮膚の血管形成が色素沈着において役割を果たしていること,ならびに血管系を減少させることでメラノサイトへの刺激も減弱されるであろうことが考えられる.これらの発見は日光性色素斑の発達に血管系の亢進が影響していることを示唆しており,血管系をターゲットとすることが,日光性色素斑のような色素沈着異常への対処方法として有効であることを示唆している.

本研究においては 2 つのメラノサイトへのパラクリン因子, bFGF と KGF について重要な知見が得られた.

bFGF については、第2の研究においてメラノサイトが Foxn1 陽性細胞をターゲットとして認識するために Foxn1 陽性細胞から発せられているシグナル分子が bFgf であること、第4の研究において *in vitro* でヒトメラノブラストの増殖に bFGF が重要な役割を果たしていることが明らかになった. しかしながらヒトの日光性色素斑や肝斑などの色素沈着異常に bFGF が直接関与している可能性は示されていない. 第3の研究の考察において、ヒトの日光性色素斑および肝斑の病変部位表皮への KGF の蓄積は、本来 KGF を結合しているはずの真皮ー

表皮境界領域のヘパラン硫酸が分解したり喪失したりすることにより、真皮由来の KGF が表皮へ浸透しやすくなっているためであるという可能性を述べた. ヘパラン硫酸には bFGF も結合する可能性があるという報告があり、bFGF も KGF と同様に、ヒトの日光性色素斑や肝斑が消失しにくい原因となっている可能性を有していることが考えられる.

KGF については、第3の研究において KGF の表皮での蓄積がヒトの日光性 色素斑および肝斑が消失しにくい原因になっている可能性があること、第4の 研究において in vitro でヒトメラノサイト・メラノブラストの増殖・分化に KGF が重要な役割を果たしていることが明らかになった。第2の研究において、メラノサイトが Foxn1 陽性細胞をターゲットとして認識することを明らかにしたが、本研究は Foxn1 を過剰発現させた実験結果であり、そもそもなぜ Foxn1 陽性細胞が出現するのかについては明らかになっていない. Foxn1 陽性細胞にメラニンが受け渡されることから、ヒトの日光性色素斑や肝斑などの色素沈着異常部位においては Foxn1 陽性細胞が多く存在している可能性が考えられる. ヒトの日光性色素斑と肝斑の表皮で KGF が蓄積していることが Foxn1 陽性細胞の出現に関与している可能性もじゅうぶんに考えられることができ、今後の研究の進展が期待される.

本研究により、色素沈着異常のメカニズムについて、メラノサイト内、メラノサイトを取り囲みメラニンを受け取るケラチノサイトとのメラノサイトの関係、真皮由来因子、真皮の血管系の関与、と言った重要かつ多面的な手掛かりが得られた。本研究結果から、色素沈着異常のメカニズムについて更なる解明が進むこと、並びに有効な対処法の提供に繋がることが期待される。

8. 謝辞

本論文を作成し千葉大学融合科学研究科にて学位審査を受けさせて頂くにあたり、広部知久博士、放射線医学総合研究所人材育成センター 根井充センター長、千葉大学融合科学研究科 松浦彰教授には、丁寧なご指導を賜りました. 心より感謝の意を表します. また 2 報の既公表論文について共同研究を実施し論文作成をご指導下さった韓国 Ajou 大学病院・医学研究科の Hee Young Kang 教授にも心より感謝の意を表します. 研究をサポートして下さった関連研究者の皆様、ならびに日々の生活の支えであった家族にも感謝の意を表します.