

氏名	佐々木 稔
学位(専攻分野の名称)	博士(皮膚科学)
学位記番号	乙第902号
学位授与の日付	平成27年1月20日
学位論文題目	紫外線による一酸化窒素産生とメラニン生成に関する研究
論文審査委員	主査 教授・博士(農学) 大石 祐一 教授・医学博士 田中 越郎 教授・博士(農学) 服部 一夫 博士(薬学) 正木 仁*

論文内容の要旨

はじめに

一酸化窒素(NO)は生体内において血管内皮細胞由来弛緩因子として働くことが発見され、現在に至るまで生体のあらゆる組織において生理学的、病理学的に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。皮膚においてもNOは様々な生理学的機能をもつことが分かっている。紫外線によって誘発される紅斑にもNOが関与することが報告されている。紫外線を皮膚に照射したときに皮膚中にNOが産生されることを示すいくつかの報告がある。紫外線照射で惹起される紅斑がNO合成酵素(NOS)活性阻害剤の投与により低減される報告は皮膚中にNOが産生されていることを示している。また培養ケラチノサイトに紫外線を照射したときにNOが産生されることを示した報告もある。

紫外線が皮膚にあたると、メラノサイト内のチロシナーゼおよびチロシナーゼ関連酵素の働きによりメラニン生成が増加し色素沈着が生じることは良く知られた現象である。紫外線により色素沈着が起こるメカニズムは、紫外線に暴露されたケラチノサイト等の細胞から放出される種々のメラノサイト刺激因子による影響が主要因子であると考えられている。近年、紫外線照射によるメラニン生成にNOが関与していることが報告された。紫外線により皮膚内で産生されたNOがメラノサイトを刺激しメラニン生成が増大することが色素沈着の原因の1つである可能性が示されている。しかしながら詳細なメカニズムについては未だ不明な部分が多く残っている。

メラニン生成を制御することは紫外線で誘導される皮膚色素沈着を抑制する効果的な方法である。メラニンの生成を抑制する方法としては、炎症の抑制やメラノサイトの周りの細胞から放出されるメラノサイト刺激因子の

抑制、メラノサイト刺激因子の各レセプターのブロック、チロシナーゼ活性の阻害等があげられ、これまでこれらの作用を持つ有効物質が皮膚局所に使用されている。

一方、生体には元来紫外線等の害から身を守るための生体防御物質が備わっている。生体内抗酸化物質としては、チオール基を持つアミノ酸を含むペプチドやタンパク質としてグルタチオン、チオレドキシン、メタロチオネインといった物質、また抗酸化酵素としてグルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼといった酵素が良く知られている。その中でもメタロチオネインはラジカルスカベンジ作用が強い物質だといわれている。メタロチオネインはシステイン残基を多く含む、熱安定性の多機能性金属結合タンパク質で、主な生理作用としてはラジカルスカベンジ作用の他に重金属の解毒作用、生体必須微量元素の代謝調節、免疫反応作用等が知られている。ヒトでの存在分布は主に、肝臓、腎臓といった臓器に多く存在することが知られている。また、メタロチオネインにはNOをブロックする作用があることも報告されている。皮膚においては、ケラチノサイト中に誘導したメタロチオネインがサンバーンセル形成を抑制することが報告されている。

本研究の目的は、紫外線により皮膚内で産生されたNOの刺激によるメラニン生成の増大により引き起こされる色素沈着の詳細なメカニズムを明らかにし、さらにその色素沈着を抑制する方法として生体内に存在する抗酸化物質メタロチオネインを利用して抑制することである。

* 東京工科大学応用生物学部 教授

第1章 紫外線による一酸化窒素の産生

ケラチノサイトが紫外線で刺激されることにより NO が産生されることが複数報告されている。しかしそのメカニズムについては異なるアイソフォームの NO 合成酵素が NO 産生に関与するという報告で矛盾している。そこで培養ケラチノサイトを用いて紫外線照射による NO 産生のメカニズムを明らかにするため、どの NOS アイソフォームが関与しているのか UVB 照射後の構成型 bNOS と誘導型 iNOS の発現を検討した。

培養ケラチノサイトに UVB を 2, 5 mJ/cm² 照射し、培養 48 時間後までケラチノサイトが産生する NO 量を測定した。その結果、UVB 照射 6 時間以降 48 時間後まで、未照射のものとは比べ NO 産生量の有意な増加が観察された。また UVB 照射 2, 5 mJ/cm² ではケラチノサイトへのダメージは見られなかった。

次に、bNOS の発現に与える影響を見るために、培養ケラチノサイトに UVB を 2, 5 mJ/cm² 照射し培養 4 時間後の mRNA 発現量をノザンプロット法により調べた。その結果、bNOS の mRNA 量は未照射のものとは比べ UVB 照射 5 mJ/cm² で明らかなシグナルの増加がみられた。内部標準として同時に検出した G3PDH の mRNA シグナルは UVB 照射により変化は見られなかった。またウエスタンブロット法により UVB 照射 12 時間後の bNOS のタンパク質量を調べた。その結果、bNOS のタンパク質量は未照射のものに比べシグナルの増加が観察された。

続いて、iNOS の発現に与える影響を見るために、培養ケラチノサイトに UVB を 5 mJ/cm² 照射し培養 4, 12, 24 時間後の mRNA 発現量を RT-PCR 法により調べた。その結果、未照射のケラチノサイトにおいて PCR 反応を 40 サイクルまで増幅することによりようやく iNOS の mRNA を検出できた。UVB を 5 mJ/cm² 照射したケラチノサイトでは培養 4, 12 時間後では未照射のものとは比べて mRNA のシグナルは抑制されていた。また内部標準として検出した G3PDH のシグナルは UVB 照射により変化は見られなかった。

培養ケラチノサイトを紫外線照射することにより、構成型 bNOS の発現は上昇したが、誘導型 iNOS の発現の上昇は見られなかったことから、紫外線の直接照射によるケラチノサイトの NO 産生の増加は iNOS ではなく bNOS の発現の上昇がかかわっていることを明らかにした。

第2章 一酸化窒素によるメラニン生成の誘導

紫外線照射により皮膚ではメラニンが生成されること

が一般に知られている。近年、培養メラノサイトを NO で連続して刺激することによりチロシナーゼ活性が上昇しメラニン生成が増加する報告がされている。しかしながら、チロシナーゼ発現への関与は報告されていない。そこで培養メラノサイトを NO で単回刺激することによる 24 時間以内でのメラニン生成におけるチロシナーゼ遺伝子の発現について検討した。

NO 供与体 (SNAP) を培養メラノサイトの培地中に添加してチロシナーゼ mRNA をノザンプロット法により検出した。その結果、NO 刺激 2 時間後にチロシナーゼ mRNA 発現の誘導が観察された。そしてその発現誘導は 12 時間後で最大になった。また、NO 刺激後 24 時間までの間、メラノサイトの増殖能や細胞数に変化はなかった。

次にチロシナーゼ活性はドーパオキシダーゼ活性およびチロシンハイドロキシラーゼ活性の 2 つの方法によって測定した。その結果、ドーパオキシダーゼ活性は、NO 刺激 12 時間後から 24 時間後まで時間依存的に上昇し、48 時間後にはコントロールレベルに戻った。チロシンハイドロキシラーゼ活性もコントロールと比較して、24 時間後に 1.5 倍増加していた。一方、チロシナーゼのタンパク質量をウエスタンブロット法を用いて調べた結果、24 時間後で約 1.3 倍増加し、チロシナーゼ活性の増加するレベルと一致していた。

これまでの報告で NO 刺激によるチロシナーゼ活性の上昇が cGMP-dependent protein kinase (PKG) インヒビターにより抑制されることより cGMP/PKG 経路が関与していることが示唆されている。そこで NO 刺激により培養メラノサイト内の cGMP 量が増加するか測定したところ NO 刺激後、直ちに cGMP 量の増加がみられ、4 時間後に最大になることを確認した。そして NO 刺激によるチロシナーゼ mRNA の上昇が PKG インヒビターである KT5823 の添加により抑制された。

メラノサイトにおいて NO 刺激 2 時間後よりチロシナーゼ mRNA 発現が上昇し、チロシナーゼ活性の上昇も 24 時間までの間で時間依存的に認められた。その活性上昇はチロシナーゼタンパク質の増加を伴っていた。また、チロシナーゼ mRNA 発現の上昇は PKG インヒビターによって抑制された。これらの結果から、NO 刺激によるメラニン生成の主要なメカニズムは NO により cGMP 経路を通じたチロシナーゼ遺伝子発現の上昇である可能性が示された。

第3章 生体内抗酸化物質によるメラニン生成の抑制

NO 刺激によるメラニン生成を抑制する方法として、

細胞内に存在する NO をスカベンジすることが報告されている生体内抗酸化物質メタロチオネインをメタロチオネインの量を増やすことにより効果を発揮する可能性があると考え、メラノサイトにおいてメタロチオネインが存在し発現誘導できること、そしてメラノサイトでメタロチオネイン量を増やすことで NO 刺激されたメラニン生成を抑制できるか検討した。

メラノサイトでメタロチオネインが存在することが報告されていないことから、まず培養メラノサイトにおいて、メタロチオネイン遺伝子が発現されているかを調べた。ノザンプロット法による解析ではメタロチオネイン mRNA は、ケラチノサイトと線維芽細胞では検出できたがメラノサイトでは検出できなかった。そこで RT-PCR 法による検出を試みたところ、メラノサイトにおいて mRNA 発現は PCR 反応 30 サイクルの増幅により検出可能になった。次に、メラノサイトのメタロチオネイン発現が上昇するかメタロチオネイン発現を誘導することが知られている塩化亜鉛を添加して調べた。その結果、メラノサイトでメタロチオネイン遺伝子発現の上昇が見られた。またメタロチオネインのタンパク質の増加も塩化亜鉛添加 24 時間後から観察された。別のメタロチオネイン誘導剤であるデキサメタゾンにおいても同様の結果が得られた。

次に NO 供与体である SNAP の添加によるチロシナーゼ活性の上昇がメタロチオネインを誘導することによりその上昇が抑制されるか調べた。NO 刺激の 24 時間前に塩化亜鉛を添加しメタロチオネインを誘導することにより NO 刺激によるチロシナーゼ活性の上昇を塩化亜鉛の添加濃度依存的に抑制された。また別のメタロチオネイン誘導剤であるデキサメタゾンの添加によっても NO 刺激によるチロシナーゼ活性の上昇が抑制された。しかしながら、チロシナーゼ mRNA およびタンパク質の量は塩化亜鉛添加により影響されなかった。

メラノサイトを NO 以外のメラノサイト刺激因子である α -メラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) およびエンドセリン-1 (ET-1) 刺激によるメラニン生成をメタロチオネイン誘導により抑制されるか調べた。その結果、NO 刺激の時と同様チロシナーゼ活性の上昇は抑制されたがチロシナーゼタンパク質量は影響されなかった。また、予め α -MSH 刺激により上昇したチロシナーゼ活性は塩化亜鉛の添加 12 時間後から 72 時間後まで段階的に減少を示し、メタロチオネインタンパク質の増加のタイムコースと一致していた。

当初、メタロチオネインを増加させることによる NO のスカベンジ作用により NO 刺激によるメラニン生成

の上昇を抑制すると考えていた。しかしながら、メタロチオネインの誘導でチロシナーゼの発現には影響を与えず、 α -MSH および ET-1 刺激により上昇するメラニン生成に対しても抑制した。そこで、メタロチオネインによるチロシナーゼ活性の直接阻害の可能性について調べた。種々薬剤を添加して培養したメラノサイトからメラノソーム画分を分画し、分画物のチロシナーゼ活性を測定したところ、 α -MSH 刺激により上昇するチロシナーゼ活性が塩化亜鉛添加したメラノサイトから得られたメラノソーム分画物の活性は抑制されていた。この分画物に抗メタロチオネイン抗体を添加してチロシナーゼ活性を測定したところチロシナーゼ活性の減少が解除された。さらに、精製されたメタロチオネインをメラノソーム分画物に添加したところチロシナーゼ活性が抑制された。

培養メラノサイトに他の細胞でメタロチオネインを増やすことが知られている塩化亜鉛を添加することでメタロチオネインを増やすことをノザンプロット法およびウエスタンブロット法で確認できた。予めメタロチオネインを増やした後に NO 刺激をしてもチロシナーゼ活性の上昇を抑制することができた。しかしチロシナーゼ mRNA およびタンパク質の発現上昇は抑制されなかった。粗精製チロシナーゼに直接メタロチオネインを添加したところチロシナーゼ活性が阻害されたことから、培養系で見られたメタロチオネイン誘導によるメラニン生成の抑制は NO をスカベンジする作用ではなくチロシナーゼ活性を直接阻害するためであると考えられた。

おわりに

本研究は、近年メラノサイトを刺激することが報告された NO によるメラニン生成のメカニズムを明らかにし、さらにメラニン生成を抑制することを目指した。培養細胞を用いた検討により、紫外線刺激によりケラチノサイトで bNOS の発現を上昇させることにより NO を産生させ、その産生された NO はメラノサイトにおいて cGMP 経路を介してチロシナーゼ発現を上昇させメラニン生成を増加させることを明らかにした。また、チロシナーゼ活性はメラノサイト内に生体内抗酸化物質メタロチオネインを誘導することで抑制できることを明らかにした。

本成果により、紫外線により皮膚でおきる色素沈着を効率的に抑制する新たな方法の 1 つを提案することができた。しかし本実験で用いたメタロチオネイン誘導剤である塩化亜鉛は皮膚刺激性が報告されており、メラニン生成を抑制するためにヒトの皮膚に塗布することはでき

ない。今後の課題としては、メタロチオネインを効率的に誘導できる安全で安定な物質を食品や植物素材の中か

ら見出していきたいと考えている。

審査報告概要

紫外線による皮膚メラニン生成について新たなメカニズムを検討し、そのメラニン生成制御の方法を見出すことを目的とした。紫外線照射は表皮細胞の構成型 NO 合成酵素 (NOS) 活性の上昇を惹起し、その活性により生成された NO によって色素細胞のメラニン合成が亢進されることを見出した。ここには cGMP 依存性リニン酸化酵素が関わることも見出した。また、構成型 NOS を阻害することにより、メラニン合成を制御する新たな機構の開発を検討すべく、色素細胞内メタロチオネインに着目した。メタロチオネイン増加によりメラニ

ン合成は制御されたが、その機構は、NOS 制御ではなく、メラニン合成酵素チロシナーゼの阻害によることを明らかにした。メタロチオネインを増加させる物質として亜鉛イオンが有効だった。本研究は、メラニン合成の新たなメカニズムを見出したことに大きな価値がある。このことは、メラニン合成を制御する新規の食品素材、化粧品素材開発にも寄与するものである。

よって、審査員一同は博士 (皮膚科学) の学位を授与する価値があると判断した。