

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

2015年

佐々木 稔

目次

I . 序論	1
1. 背景	1
2. 目的	3
3. 論文の構成	3
参考文献	4
II . 本論	11
第 1 章 紫外線による一酸化窒素の産生	11
1.1 緒言	11
1.2 実験方法	12
1.2.1 細胞培養	
1.2.2 UVB 照射方法	
1.2.3 NO 産生量測定方法	
1.2.4 ノザンブロットイング解析	
1.2.5 ウェスタンブロット解析	
1.2.6 RT-PCR 解析	
1.3 結果	15
1.3.1 培養ケラチノサイトにおける UVB による NO 産生	
1.3.2 UVB 照射による bNOS の発現に与える影響	
1.3.3 UVB 照射による iNOS の発現に与える影響	
1.4 考察	16
1.5 結語	19
1.6 図	20

参考文献	24
第2章 一酸化窒素によるメラニン生成の誘導	30
2.1 緒言	30
2.2 実験方法	31
2.2.1 細胞培養	
2.2.2 チロシナーゼ活性測定方法	
2.2.3 ノザンブロットティング解析	
2.2.4 ウエスタンブロットティング解析	
2.2.5 cGMP量測定方法	
2.2.6 統計処理	
2.3 結果	33
2.3.1 NOによるチロシナーゼ遺伝子発現に与える影響	
2.3.2 チロシナーゼ活性およびタンパク質量に与える影響	
2.3.3 チロシナーゼ遺伝子発現へのcGMPシグナル経路の関与	
2.4 考察	34
2.5 結語	37
2.6 図	38
参考文献	43
第3章 生体内抗酸化物質によるメラニン生成の抑制	47
3.1 緒言	47
3.2 実験方法	48
3.2.1 細胞培養	
3.2.2 ノザンブロットティング解析	

3.2.3	RT-PCR 解析	
3.2.4	ウエスタンブロットイング解析	
3.2.5	チロシナーゼ活性測定方法	
3.2.6	メラノソーム画分調整方法	
3.2.7	統計処理	
3.3	結果	51
3.3.1	メラノサイトにおけるメタロチオネイン遺伝子発現と誘導	
3.3.2	NO 刺激によるメラニン生成へのメタロチオネイン誘導の 効果	
3.3.3	種々メラノサイト刺激因子によるメラニン生成へのメタ ロチオネイン誘導の効果	
3.3.4	メタロチオネイン誘導によるチロシナーゼ活性抑制のメ カニズム	
3.4	考察	54
3.5	結語	56
3.6	図	57
	参考文献	63
III.	結論	68
	謝辞	71
	Summary	72

I. 序論

1. 背景

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 (endothelium-derived relaxing factor) として働く極めてライフサイクルの短いガス状メディエーターであることが発見された^{1),2)}。現在に至るまで、慢性関節リウマチ、気管支喘息、クローン病やインスリン依存性糖尿病等、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³⁾。皮膚においても NO は重要な役割を担っていることが分かっている。乾癬^{4),5)}、アトピー性皮膚炎等の皮膚疾患^{6),7)}、紫外線によって誘発される紅斑^{8),9)}、免疫反応等のホメオスタシスの過程に関与することが報告されている。さらに、血管内皮増殖因子やコラーゲン合成を促進することが報告され¹⁰⁾、血管新生や創傷治癒においても NO の働きが重要であることが明らかになってきた。NO は NO 合成酵素 (NOS) により L-アルギニンから産生される。NOS は少なくとも 3 つのアイソフォームが存在することが知られている^{11),12)}。内皮型 NOS (eNOS) と脳型 NOS (bNOS) は構成的に発現しており、その活性は Ca^{2+} -カルモジュリンに依存している。一方、誘導型 NOS (iNOS) は Ca^{2+} 非依存的で interferon- γ 、tumor necrosis factor- α 、lipopolysaccharide のような炎症性サイトカインにより発現が誘導される¹³⁾⁻¹⁶⁾。

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 NOS 活性阻害剤の投与により低減された報告は皮膚中に NO が産生されていることを示している^{17), 18)}。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^{19),20)}。一方、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きるメカニズムは、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ことが主要因であると考えられている²¹⁾。これらのメラノサイト刺激因子としては、副腎皮質刺激ホルモン、 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)^{22), 23)}、endothelin-1 (ET-1)^{24), 25)}、プロスタグランジン²⁶⁾、チミジン・ジヌクレオチド²⁷⁾、ヒスタミン²⁸⁾などが知られている。これらはチロシナーゼ遺伝子の発現を上昇させることが報告されている。例えば、 α -MSHはcyclic adenosine monophosphate (cAMP) シグナル経路²⁹⁾、ET-1はprotein kinase C (PKC) シグナル経路²⁵⁾とそれぞれ異なる経路を通してチロシナーゼ遺伝子発現に働いている。

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³⁰⁾。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の色素沈着を抑制する効果的な方法である。メラニン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があげられ³¹⁾、これまでそれらの作用を持つ有効物質が皮膚の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、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分子量約 7kDa のシステイン残基を多く含む、熱安定性をもつ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³²⁾⁻⁴⁰⁾。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⁴¹⁾。皮膚においては、ケラチノサイト中に誘導され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⁴²⁾。

2. 目的

本研究の目的は、紫外線により皮膚内で産生された NO 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することである。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を試みた。

3. 論文の構成

本目的を達成するために、第 1 章では紫外線照射による 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、培養ケラチノサイトを用いて UVB 照射後の bNOS と iNOS の発現を検討した。

第 2 章では培養メラノサイトで NO 刺激することにより上昇するメラニン生成にチロシナーゼ遺伝子の発現が関与するか検討した。

第 3 章では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を確認し、メラノサイトでメタロチオネイン量を増やすことで NO 刺激で上昇したメラニン生成を抑制できるか検討した。

参考文献

1. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. **327**:524-526 (1987).
2. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. **333**:664-666 (1988).
3. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol*. **113**:147-156 (1998).
4. Kolb-Bachofen V, Fehsel K, Michel G, Ruzicka T. Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris. *Lancet*. **344**:139 (1994).

5. Bruch-Gerharz D, Fehsel K, Suschek C, Michel G, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med.* **184**:2007-2012 (1996).
6. Rowe A, Farrell AM, Bunker CB. Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol.* **136**:18-23 (1997).
7. Ross R, Gillitzer C, Kleinz R, Schwing J, Kleinert H, Förstermann U, Reske-Kunz AB. Involvement of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunol.* **10**:61-69 (1998).
8. Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Inhibition of ultraviolet B-induced skin erythema by N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine. *J Dermatol Sci.* **15**:23-35 (1997).
9. Warren JB. Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light. *FASEB J.* **8**:247-251 (1994).
10. Frank S, Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J.* **13**:2002-2014 (1999).
11. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* **268**:12231-12234 (1993).

12. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. **78**:915-918 (1994).
13. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*. **42**:1849-1857 (1991).
14. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. **6**:3051-3064 (1992).
15. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. **65**:287-346 (1992).
16. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med*. **176**:599-604 (1992).
17. Warren JB, Loi RK, Coughlan ML. Involvement of nitric oxide synthase in the delayed vasodilator response to ultraviolet light irradiation of rat skin in vivo. *Br J Pharmacol*. **109**:802-806 (1993).
18. Goldsmith PC, Leslie TA, Hayes NA, Levell NJ, Dowd PM, Foreman JC. Inhibitors of nitric oxide synthase in human skin. *J Invest Dermatol*. **106**:113-118 (1996).
19. Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek C, Kröncke KD, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J Invest Dermatol*. **111**:286-291 (1998).

20. Roméro-Graillet C, Aberdam E, Clément M, Ortonne JP, Ballotti R. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest.* **99**: 635-642 (1997).
21. Kuhn A, Fehsel K, Lehmann P, Krutmann J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol.* **111**:149-153 (1998).
22. Schauer E, Trautinger F, Köck A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest.* **93**:2258-2262 (1994).
23. Thody AJ, Graham A. Does α -MSH have a role in regulating skin pigmentation in human? *Pigment Cell Res.* **11**:265-274 (1998).
24. Imokawa G, Miyagishi M, Yada Y. Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J Invest Dermatol.* **105**:32-37 (1995).
25. Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, Higashi K, Yada Y. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res.* **10**:218-228 (1997).
26. Nordlund JJ, Collins CE, Rheins LA. Prostaglandin E2 and

- D2 but not MSH stimulate the proliferation of pigment cells in the pinnal epidermis of the DBA/2 mouse. *J Invest Dermatol.* **86**:433-437 (1986).
27. Eller MS, Yaar M, Gilchrest BA. DNA damage and melanogenesis. *Nature.* **372**:413-414(1994).
 28. Yoshida M, Takahashi Y, Inoue S. Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H₂ receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol.* **114**:334-342 (2000).
 29. Durkacz BW, Lunec J, Grindley H, Griffin S, Horner O, Simm A. Murine melanoma cell differentiation and melanogenesis induced by poly(ADP-ribose). *Exp Cell Res.* **202**:287-291 (1992).
 30. Roméro-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem.* **271**: 28052-28056 (1996).
 31. Briganti S, Camera E, Picardo M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**: 101-110 (2003).
 32. Thornalley PJ, Vasák M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta.* **827**:36-44 (1985).

33. Hamer DH. Metallothionein. *Annu Rev Biochem.* **55**:913-951 (1986).
34. Bremner I. Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *J Nutr.* **117**:19-29 (1987).
35. Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ. Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med.* **185**:107-119 (1987).
36. Webb M. Toxicological significance of metallothionein. *Experientia Suppl.* **52**:109-134 (1987).
37. Richards MP. Recent developments in trace element metabolism and function: role of Metallothionein in copper and zinc metabolism. *J Nutr.* **119**:1062-1070 (1989).
38. Bremner I, Beattie JH. Metallothionein and the trace minerals. *Annu Rev Nutr.* **10**:63-83 (1990).
39. Waalkes MP, Goering PL. Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. *Chem Res Toxicol.* **3**:281-288 (1990).
40. Hanada K, Baba T, Hashimoto I, Fukui R, Watanabe S. Possible role of cutaneous metallothionein in protection against photo-oxidative stress-epidermal localization and scavenging activity for superoxide and hydroxyl radicals. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* **9**:209-213 (1992/1993).
41. Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JR Jr, Pitt BR. Metallothionein protects against the cytotoxic

and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**:4452-4456 (1995).

42. Hanada K, Sawamura D, Tamai K, Baba T, Hashimoto I, Muramatsu T, Miura N, Naganuma A. Novel function of metallothionein in photoprotection: metallothionein-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet B injury in the skin. *J Invest.Dermatol*. **111**:582-585 (1998).

II. 本論

第 1 章 紫外線による一酸化窒素の産生

1.1 緒言

一酸化窒素(NO)は血管内皮細胞由来弛緩因子として認識されており^{1),2)}、さまざまな生理学的活性を持つことが示されている³⁾⁻¹⁰⁾。NOはNO合成酵素(NOS)によりL-アルギニンから産生される。NOSは少なくとも3つのアイソフォームが存在することが知られている^{11),12)}。内皮型NOS(eNOS)と脳型NOS(bNOS)は構成的に発現しており、その活性はCa²⁺-カルモジュリンに依存している。一方、誘導型NOS(iNOS)はCa²⁺非依存的でinterferon- γ 、tumor necrosis factor- α 、lipopolysaccharideのような炎症性サイトカインにより発現が誘導される¹³⁾⁻¹⁶⁾。

NOは乾癬、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎といった皮膚病に重要な役割をしている可能性あることが複数報告されている^{17),18)}。紫外線B波(UVB)により誘導される紅斑にはNO産生の増加が関与していると考えられている^{19),20)}。培養ケラチノサイトや培養メラノサイトの増殖や分化はNOにより調節されていることが報告されている^{21),22)}。また、紫外線により皮膚においてNOが産生されることが報告されている。このような紫外線による表皮の肥厚や色素沈着はNOの産生により調節されているのかもしれない。皮膚においてNOSの発現はUVBの影響によることが報告されている。誘導型NOS(iNOS)は健全な皮膚にUVB照射24時間から48時間後まで誘導が確認されている²³⁾。UVBによるNOS発現への影響について培養ケラチノサイトを用いて調べられている。Roméro-GrailletらはUVBにより脳型NOS(bNOS)もiNOSも発現が上昇しないことを報告した²⁴⁾。一方、

Kang-Rotondo らは bNOS の発現が上昇することを示した²⁵⁾。NO による様々な現象は NOS の発現により説明することが可能であることから、本報告では、培養ケラチノサイトに UVB 照射することで NOS の発現に影響するのか、また影響する場合にはいずれのアイソフォームが関与するのかを明らかにするため UVB 照射後の bNOS と iNOS の発現について検討した。

1.2 実験方法

1.2.1 細胞培養

Yuspa らにより確立されたマウス由来ケラチノサイト細胞系 (Pam212) は²⁶⁾、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% fetal bovine serum (FBS) および 100 U/ml ペニシリン、100 γ /ml ストレプトマイシンを含む培地を用い 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養した。生細胞数の測定は MTT 法を用いて評価した²⁷⁾。

1.2.2 UVB 照射方法

UVB 照射のため細胞を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、PBS の存在下で fluorescent sun lamp FL20SE (Toshiba) を用いて UVB 照射した。UVB の照度は UV-RADIOMETER UVR-305/365D(II) (TOPCON) で測定した。UVB 照射後は FBS およびフェノールレッド不含の DMEM 培地を用いて培養した。

1.2.3 NO 産生量測定方法

NO 産生量の測定は NO の安定代謝物である亜硝酸塩の量を測定することにより評価した。UVB 照射したケラチノサイトを 6、12、24、

48 時間培養後、培地中の亜硝酸塩の濃度を fluorometric nitrate/nitrite assay kit (Cayman)を用いて測定した。

1.2.4 ノザンブロットイング解析

Poly(A)⁺RNA の抽出は OligotexTM-dT <Super> mRNA Purification Kit (Takara)を用いて行なった。Poly(A)⁺RNA (0.5 μ g)を 1%アガロース (含 0.4M ホルムアルデヒド)ゲル電気泳動により展開し、ナイロンメンブレンに RNA を転写した。メンブレンを 80 $^{\circ}$ C、2 時間インキュベートした後、ジゴキシゲニン標識 RNA プローブを添加したハイブリダイゼーション buffer [7% sodium dodecyl sulfate (SDS)、50%ホルムアミド(関東化学)、5 \times saline sodium citrate buffer (5 \times SSC、pH7.0)、2% blocking reagent (Roche)、50mM phosphate buffer(pH7.0)、0.1% *N*-lauroyl sarcosine、50 μ g/ml yeast total RNA(Roche)]中で少なくとも 68 $^{\circ}$ C、24 時間以上インキュベートした。RNA プローブは DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche)を用い cDNA を *in vitro* 転写することにより合成した。bNOS および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) RNA プローブはそれぞれマウスの bNOS および G3PDH とクロスハイブリダイズすることが報告されているヒトの bNOS cDNA (position 3901-4312)²⁸⁾および G3PDH cDNA (Clontech)より作製した RNA プローブを用いた。ハイブリダイゼーション後メンブレンを 2 \times SSC、0.1%SDS 溶液で室温、15 分間洗浄後、0.1 \times SSC、0.1%SDS 溶液で 68 $^{\circ}$ C、15 分間洗浄した。その後、DIG wash buffer [0.1% blocking reagent、0.1M マレイン酸、3M 塩化ナトリウム溶液(pH8.0)]で洗浄後、alkaline phosphate conjugated 抗ジゴキシゲニン抗体(Roche)を添加した DIG wash buffer で 30 分間インキュベートした。DIG wash buffer で

洗浄後、基質に CDP-Star (Roche)を用いて alkaline phosphate 活性を可視化して検出した。

1.2.5 ウェスタンブロット解析

ケラチノサイトをセルスクレーパーで集め PBS 中でソニケーション後、遠心上清をタンパク質抽出液とした。タンパク質 (30 μ g)を 2-メルカプトエタノールで処理後 7.5%SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)により展開し²⁹⁾、polyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング溶液[5%スキムミルク、0.1%Tween20 を含む PBS]で 1 時間洗浄後、抗 bNOS 抗体 (Transduction Lab.)を添加したブロッキング溶液中で、室温 1 時間インキュベートした。尚、使用した抗 bNOS 抗体は eNOS および iNOS には反応しないことは確かめられている。0.1%Tween20 を含む PBS(PBS-T)で洗浄後、horseradish peroxidase conjugated 抗マウス IgG 抗体(DAKO)を添加したブロッキング溶液中で、室温 1 時間インキュベートした。再び PBS-T で洗浄後、peroxidase 活性を基質として Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (PIERCE)を用いて可視化して検出した。

1.2.6 RT-PCR 解析

Total RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen 製)を用いて行なった。RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)解析は RNA PCR Kit (AMV) ver.2.1 (Takara)を用いて行なった。First strand cDNA は Total RNA (1 μ g)から AMV reverse transcriptase XL と oligo-dT を用い合成した。cDNA の増幅は Taq polymerase を用い PCR 反応を 1 サイ

クル 94°C:1 分間、62°C:2 分間、72°C:2 分間を 40 サイクル行なった。
PCR 反応に用いたプライマーを以下記載する。

iNOS (sense) 5'-GGACGAACTCAGTGG GCAGG-3'、

(antisense) 5'-GGA GGG GTC GTA ATG TCC AG-3' ; 537bp)^{30),31)}、

G3PDH (sense:) 5'-CCA AGG TCA TCC ATG ACA AC-3'、

(antisense) 5'-TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT-3' ; 527bp)^{32),33)}

1.2.7 統計処理

各々の実験は n=3 で行なった。統計解析は分散分析後 Dunnet's 検定を行なった。有意差は *p<0.05, **p<0.01 で示した。

1.3 結果

1.3.1 培養ケラチノサイトにおける UVB による NO 産生

培養ケラチノサイトに未照射および 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。その結果を Fig. 1 に示した。UVB 照射 6 時間以降、未照射のものとは比べ NO 産生量が有意に増加しており、その増加は 48 時間後まで続いた。NO 産生の増加量は UVB 照射量に依存していた。また細胞数の測定より、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ず、20 mJ/cm² 以上の照射で細胞ダメージが観察された。

1.3.2 UVB 照射による bNOS の発現に与える影響

UVB 照射による 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未照射および UVB を 2, 5 mJ/cm² 照射し培養 4 時間後の mRNA 発現量をノザンブロット法により調べた。その結果を Fig. 2 に

示した。bNOS の mRNA 量は未照射のものに比べ UVB 照射 5 mJ/cm² で明らかなシグナルの増加がみられた。ま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。その結果を Fig. 3 に示した。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。また、SDS-PAGE により各サンプルのタンパク質量が同じであることを確かめた。

1.3.3 UVB 照射による iNOS の発現に与える影響

UVB 照射による iNOS の発現はノザンブロット法では検出ができなかったため、培養ケラチノサイトに未照射および UVB を 5 mJ/cm² 照射し培養 4、12、24 時間後の mRNA 発現量は RT-PCR 法により調べた。その結果を Fig. 4 に示した。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 iNOS の mRNA を検出できた。しかしながら 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に比べて mRNA のシグナルは抑制されていた。PCR 産物は DNA 配列解析をすることにより iNOS のものであることを確認した。ケラチノサイトにおいて interferon- γ の刺激により iNOS の発現が誘導されることが報告されており³⁴⁾、本実験系においても発現の誘導が確認できた。ま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。

1.4 考察

UVB 照射により正常な皮膚や培養ケラチノサイトでは NOS 活性が

制御され NO が産生されることが報告されている³⁵⁾。UVB 照射により影響される NOS は 3 つのアイソフォームのうちいずれであるか、いくつかの報告がされているが矛盾した結果である。Weller らは³⁶⁾、正常なヒトの皮膚において UVB 照射 24 時間後に iNOS の発現が上昇することを RT-PCR 法で確認した²³⁾。これに対し、Kang-Rotondo らは培養ヒトケラチノサイトにおいて UVB 照射後 bNOS タンパク質が誘導されることをウエスタンブロット法で示した²⁵⁾。さらに、Roméro-Graillet らは培養ケラチノサイトの NO 産生量の増加は iNOS の発現誘導によるものではないことを示した²⁴⁾。

本研究では、培養マウスケラチノサイト株(Pam212)を用い UVB 照射による bNOS および iNOS の発現への直接的な影響を調べた。培養ケラチノサイトを UVB 照射することにより 6 時間後にはすでに NO は産生されていることが観察できた(Fig.1)。一般的に bNOS の発現は構成的であるといわれているが、培養ケラチノサイトに UVB 照射することにより bNOS の mRNA およびタンパク質の量がともに増加することを確かめた(Fig.2、3)。これらの結果は UVB 照射による NO 産生量の増加の要因として bNOS の発現誘導がかかわっているかもしれないことを示している。その他の要因として bNOS の酵素活性の上昇によることも考慮に入れる必要がある。この点に関して、Roméro-Graillet らはケラチノサイトへの UVB 照射により bNOS の酵素反応のコファクター、例えばカルシウム、NADPH、tetrahydrobiopterin (6-BH₄) がケラチノサイトで bNOS の酵素活性を制御しているためではないかと考察している²⁴⁾。通常 UVB によって誘発される紅斑は、UVB 照射の 3 時間後には認識できる²⁰⁾。しかし、bNOS の mRNA とタンパク質量の増加には数時間以上の時間を必要とする。このように、bNOS の

酵素活性の上昇が早い段階で形成される紅斑に重要であるのかもしれない。

iNOS 発現への影響を調べるためにノザンおよびウエスタンプロット法を試みたが検出できなかったことから、RT-PCR 法での検出を試みた。RT-PCR 法により UVB 未照射のケラチノサイトで iNOS の発現を検出することができた。しかしながら、UVB 照射したケラチノサイトでは予想に反し、むしろ逆に iNOS の発現は抑制されていた (Fig.4)。細胞を用いて UVB 照射により iNOS の発現を示す研究と正常ヒト皮膚において UVB 照射 24 時間後に iNOS の発現を示す研究が報告されている^{23),36)}。また、これらの報告は本研究の培養マウスケラチノサイトを用いた実験結果と矛盾する結果である。この矛盾の説明としては、用いたケラチノサイトの細胞種の違いによるものかもしれない。別の説明として、UVB 照射後に生体内で観察される iNOS の発現上昇は、ケラチノサイトの周りにある他の細胞から放出される各種の炎症性サイトカインによって制御されているのかもしれない。いくつかの炎症性疾患で、interferon- γ 、tumor necrosis factor- α のようなサイトカインが放出されて、iNOS の発現を上昇することが報告されている^{37),38)}。また、interferon- γ 、tumor necrosis factor- α により iNOS 発現が上昇した培養ケラチノサイトに UVB 照射することにより iNOS 発現が抑制されることが報告されている³⁹⁾。以上、これらの結果から判断して、正常なヒトの皮膚において観察される UVB 照射により誘導される iNOS 発現は皮膚中で放出されるサイトカインによって間接的にもたらされる可能性が考えられる。

1.5 結語

本研究において、我々はマウスケラチノサイトを用いて UVB 照射により NO 産生を増加させることを確かめた。そして bNOS の mRNA およびタンパク質の発現が上昇し、そして iNOS mRNA の発現は直接的には若干抑制することを示した。これらの結果は、培養ケラチノサイトに UVB 照射した後に見られる NO 産生の増加は bNOS の発現の上昇がかかわっていることで説明できるかもしれないことを示している。

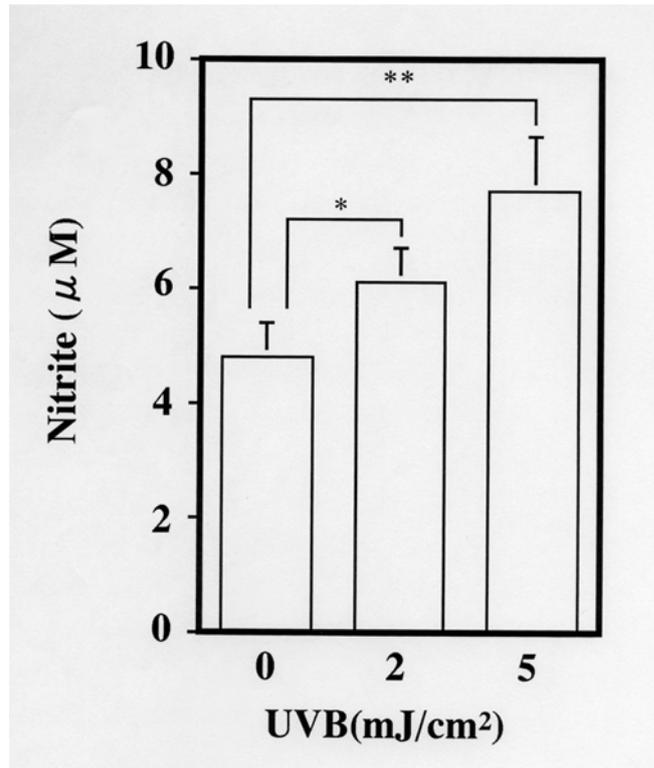


Fig.1 Effect of UVB irradiation on NO production by keratinocytes. Keratinocytes were seeded at a density of 8×10^5 cells/4 ml medium in each 60 mm dish. The cells were exposed to UVB (0, 2, or 5 mJ/cm²), and then incubated in serum-free, phenol red-free DMEM. The amount of nitrite was measured at 6, 12, 24, and 48 h. Each point represents the mean of three samples \pm SD. ** indicates a significant difference; ** $p < 0.01$.

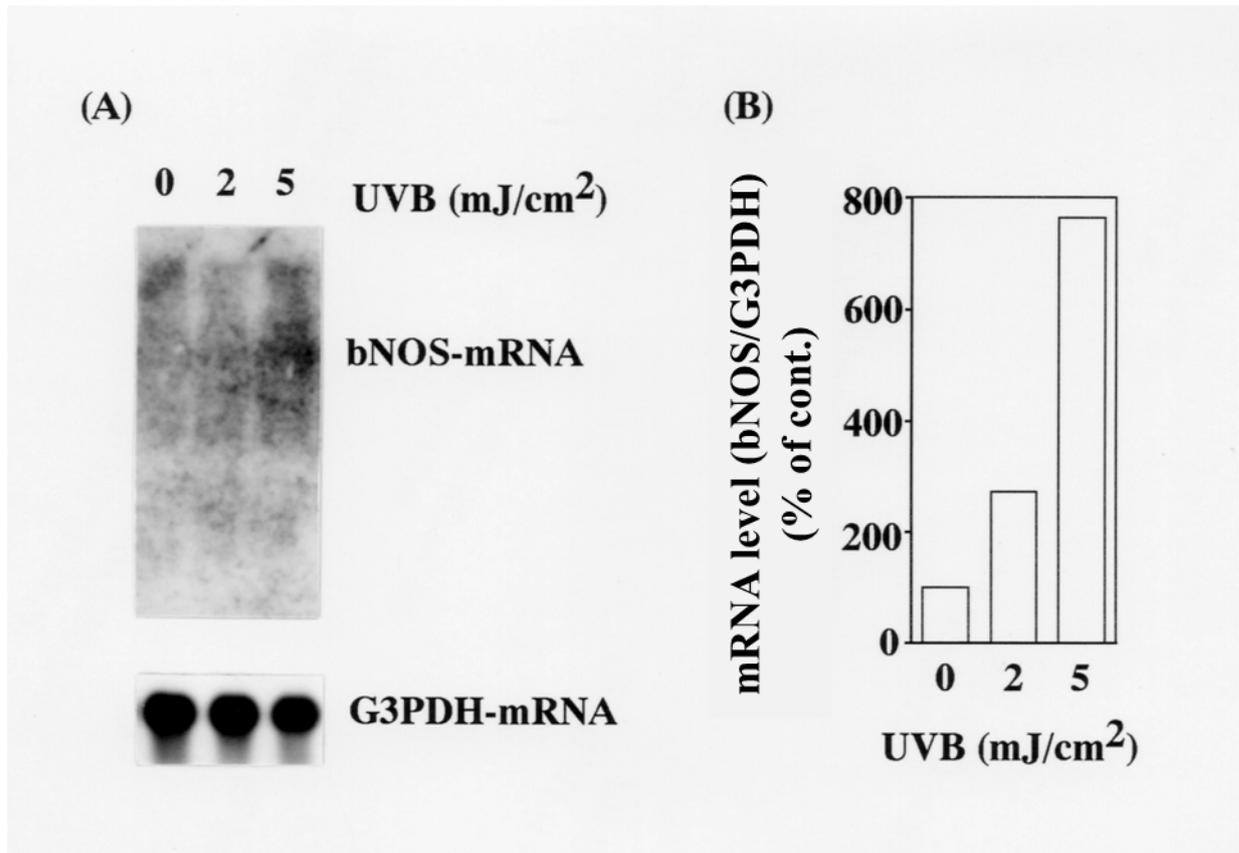


Fig.2 Effect of UVB irradiation on expression of bNOS mRNA by keratinocytes. Keratinocytes were exposed to UVB (0, 2, or 5 mJ/cm²) and then incubated in serum-free, phenol red-free DMEM. RNA was extracted from keratinocytes 4 h after UVB irradiation. (A) Northern blotting analysis was carried out to detect mRNA for bNOS and G3PDH. (B) Quantitative analysis of the results of Northern blotting. The bands were quantified using a dual-wavelength flying spot scanning densitometer, model CS-9300PC (Shimadzu, Kyoto, Japan).

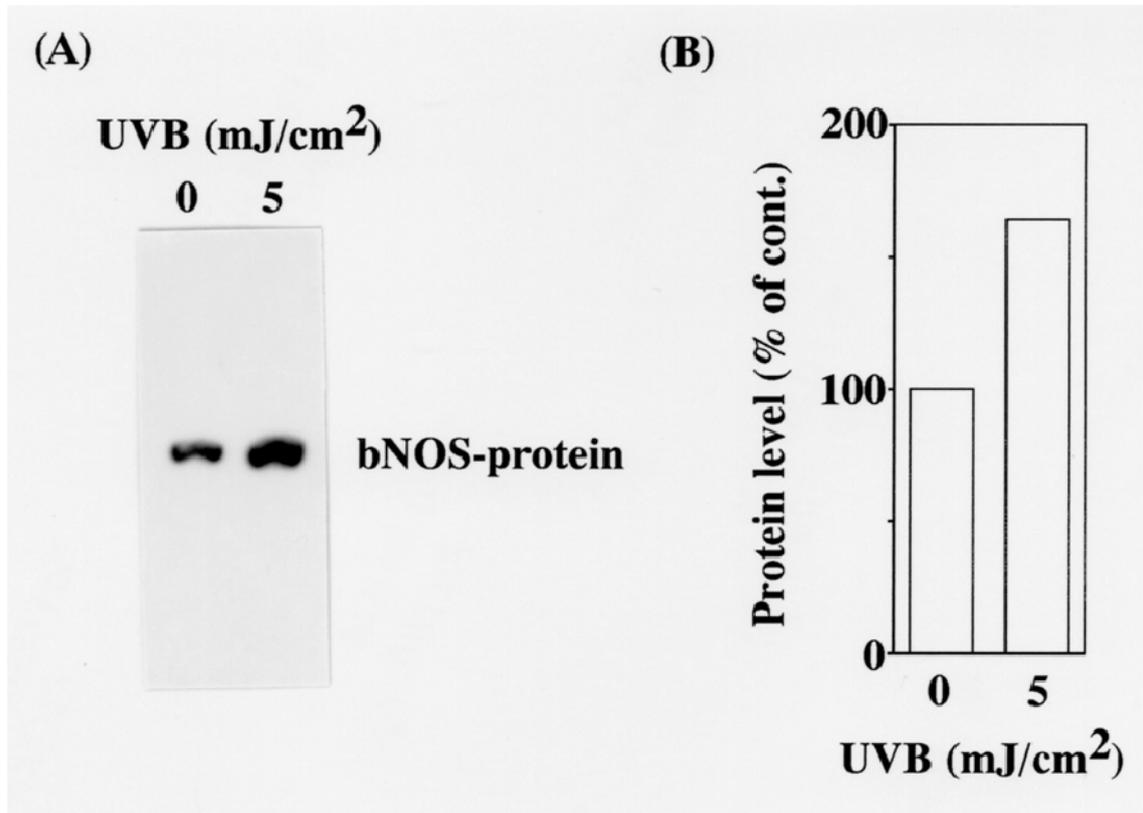


Fig.3 Effect of UVB irradiation on expression of bNOS protein by keratinocytes. Keratinocytes were exposed to UVB (0 or 5 mJ/cm²) and then incubated in serum-free, phenol red-free DMEM. Proteins were extracted from keratinocytes 12 h after UVB irradiation. (A) Western blotting analysis was used to detect bNOS protein. SDS-PAGE analysis of cell extract protein was also carried out. (B) Quantification was done as described in Fig.2.

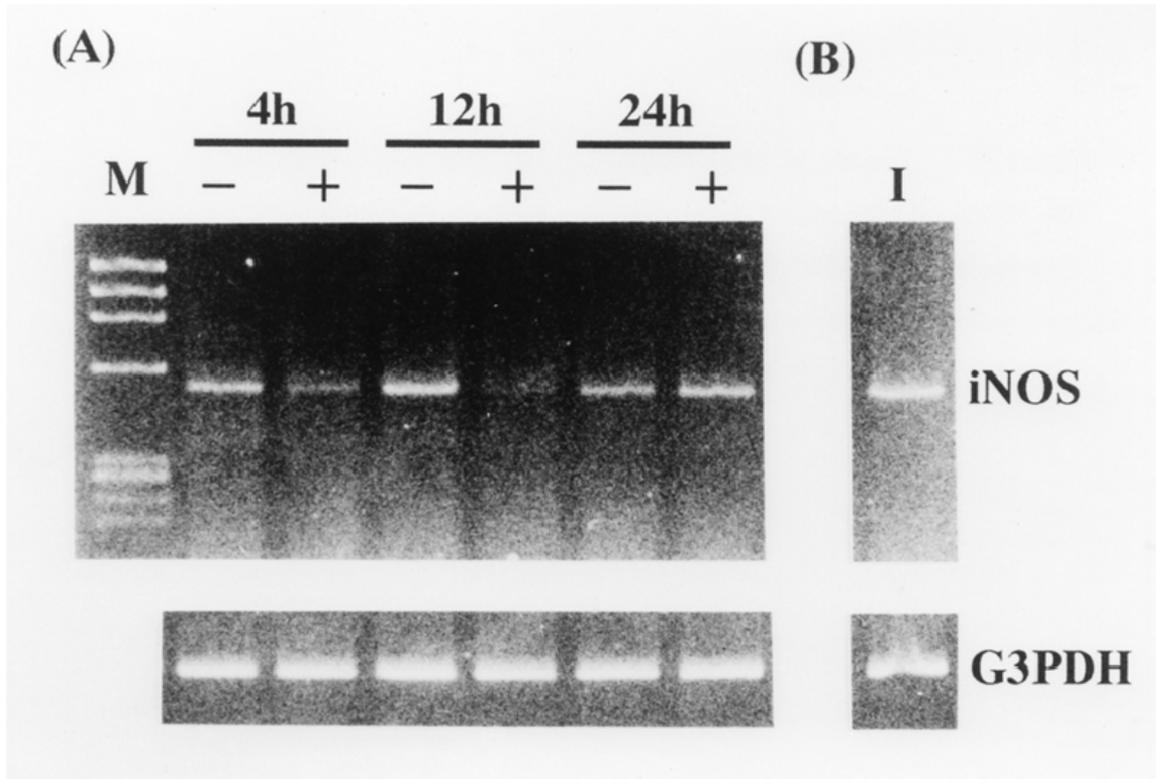


Fig.4 Effect of UVB irradiation on expression of iNOS mRNA by keratinocytes. Keratinocytes were exposed to UVB (0 or 5 mJ/cm²) and then incubated in serum-free, phenol red-free DMEM. RNA was extracted from keratinocytes 4, 12, and 24 h after UVB irradiation. RT-PCR of 40 cycle-amplification was employed to detect mRNA for iNOS and G3PDH. Lane M: Φ X-174-HaeII digest DNA, -: non-irradiated, +: UVB-irradiation.

参考文献

1. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. **327**:524-526 (1987).
2. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. **333**:664-666 (1988).
3. Humphries RG, Carr RD, Nicol AK, Tomlinson W, O'Connor SE. Coronary vasoconstriction in the conscious rabbit following intravenous infusion of L-N^G-nitro-arginine. *Br J Pharmacol*. **102**:565-566 (1991).
4. Benyó Z, Kiss G, Szabó C, Csáki C, Kovách AG. Importance of basal nitric oxide synthesis in regulation of myocardial blood flow. *Cardiovasc Res*. **25**:700-703 (1991).
5. Kovách AG, Szabó C, Benyó Z, Csáki C, Greenberg JH, Reivich M. Effects of N^G-nitro-L-arginine and L-arginine on regional cerebral blood flow in the cat. *J Physiol*. **449**:183-196 (1992).
6. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. **157**:87-94 (1988).
7. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*. **169**:1543-1555 (1989).
8. Schneemann M, Schoedon G, Frei K, Schaffner A. Immunovascular communication: activation and deactivation

- of murine endothelial cell nitric oxide synthase by cytokines. *Immunol Lett.* **35**:159-162 (1993).
9. Green SJ, Nacy CA. Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. *Current Opin Infect Dis.* **6**:384-396 (1993).
 10. Snyder S, Brecht DS. Biological roles nitric oxide. *Sci Am.* **166**:28-35 (1992).
 11. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* **268**:12231-12234 (1993).
 12. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* **78**:915-918 (1994).
 13. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* **42**:1849-1857 (1991).
 14. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**:3051-3064 (1992).
 15. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* **65**:287-346 (1992).
 16. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med.* **176**:599-604 (1992).
 17. Sirsjö A, Karlsson M, Gidlöf A, Rollman O, Törmä H. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in

- psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes. *Br J Dermatol.* **134**:643-648 (1996).
18. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol.* **113**:147-156 (1998).
 19. Warren JB, Loi RK, Coughlan ML. Involvement of nitric oxide synthase in the delayed vasodilator response to ultraviolet light irradiation of rat skin in vivo. *Br J Pharmacol.* **109**:802-806 (1993).
 20. Goldsmith PC, Leslie TA, Hayes NA, Levell NJ, Dowd PM, Foreman JC. Inhibitors of nitric oxide synthase in human skin. *J Invest Dermatol.* **106**:113-118 (1996).
 21. Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek C, Kröncke KD, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J Invest Dermatol.* **111**:286-291 (1998).
 22. Roméro-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem.* **271**: 28052-28056 (1996).
 23. Kuhn A, Fehsel K, Lehmann P, Krutmann J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol.*

- 111:149-153 (1998).
24. Roméro-Graillet C, Aberdam E, Clément M, Ortonne JP, Ballotti R. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest.* **99**: 635-642 (1997).
 25. Kang-Rotondo CH, Major S, Chiang TM, Myers LK, Kang ES. Upregulation of nitric oxide synthase in cultured human keratinocytes after ultraviolet B and bradykinin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* **12**:57-65 (1996).
 26. Yuspa SH, Hawley-Nelson P, Koehler B, Stanley JR. A survey of transformation markers in differentiating epidermal cell lines in culture. *Cancer Res.* **40**:4694-4703 (1980).
 27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **65**:55-63 (1983).
 28. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Förstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **316**:175-180 (1993).
 29. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685 (1970).
 30. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem.* **267**:6370-6374 (1992).
 31. Fujisawa H, Ogura T, Hokari A, Weisz A, Yamashita J, Esumi

- H. Inducible nitric oxide synthase in a human glioblastoma cell line. *J Neurochem.* **64**:85-91 (1995).
32. Sabath DE, Broome HE, Prystowsky MB. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte. *Gene.* **91**:185-191 (1990).
33. Andoh T, Tohda C, Kuraishi Y. Analysis of dissociated single neurons by simple and semi-quantitative RT-PCR (reverse transcription and polymerase chain reaction). *Jpn J Pharmacol.* **74**:121-123 (1997).
34. Yamaoka J, Kume T, Akaike A, Miyachi Y. Suppressive effect of zinc ion on iNOS expression induced by interferon- γ or tumor necrosis factor- α in murine keratinocytes. *J Dermatol Sci.* **23**:27-35 (2000).
35. Major S, Kang-Rotondo C, Kang ES. Effects of ultraviolet B (UVB) irradiation on the activity of nitric oxide synthase (NOS) in the rat skin and cultured human keratinocytes (KC). *Clin Res.* **41**:776A (1993).
36. Weller R. Nitric oxide — a newly discovered chemical transmitter in human skin. *Br J Dermatol.* **137**:665-672 (1997).
37. Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest.* **96**:2357-2363 (1995).

38. Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease – a review. *Arch Dermatol Res.* **290**:643-651 (1998).
39. J Yamaoka, M Sasaki, Y Miyachi. Ultraviolet B radiation downregulates inducible nitric oxide synthase expression induced by interferon- γ or tumor necrosis factor- α in murine keratinocyte Pam 212 cells. *Arch Dermatol Res.* **292**:312-319 (2000).

第2章 一酸化窒素によるメラニン生成の誘導

2.1 緒言

皮膚は紫外線照射することによりメラニンの生成が起こり色素沈着を生じる。メラニンはメラノサイトで発現している特異的な酵素チロシナーゼおよびチロシナーゼ関連酵素によって生成される。皮膚に紫外線照射した後、メラノサイトの周りにはケラチノサイトやその他の細胞からいくつかのメラノサイト刺激因子が放出されることが報告されている。これらのメラノサイト刺激因子としては、副腎皮質刺激ホルモン、 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)^{1),2)}、endothelin-1 (ET-1)^{3),4)}、プロスタグランジン⁵⁾、チミジン・ジヌクレオチド⁶⁾、ヒスタミン⁷⁾などが知られている。これらはチロシナーゼ遺伝子の発現を上昇させることが報告されている。例えば、 α -MSHは cyclic adenosine monophosphate (cAMP)シグナル経路⁸⁾、ET-1は protein kinase C(PKC)シグナル経路⁴⁾とそれぞれ異なる経路を通してチロシナーゼ遺伝子発現に働いている。

近年、紫外線照射によるメラニン生成に一酸化窒素(NO)が関与していることが報告されている。紫外線照射は正常な皮膚や培養ケラチノサイトの NO 合成酵素(NOS)を制御することが報告されている⁹⁾⁻¹²⁾。また NO はメラノサイトとケラチノサイトの共培養系を用いた実験でメラニン生成を増大させることが示された¹²⁾。Brown らは bicyclic monoterpene diols が NO 生成を誘導することで色素沈着を起こすことを示した¹³⁾。また、*in vivo* 実験系において紫外線照射による色素沈着が NOS 阻害剤の塗布により低減される報告もされている¹⁴⁾。このように、NO は紫外線照射によって誘発される過剰な色素沈着に重要な役割をしていることが示唆されている。

NO により誘導されるメラニン生成に関して、培養メラノサイトを NO 供与体で毎日 4 日間刺激することでチロシナーゼの活性とタンパク質量の両方が増加することが報告された^{12),15)}。NO によるメラニン生成は cyclic guanosine monophosphate (cGMP)シグナル経路を通ることが示唆されている。しかし、NO によるチロシナーゼ遺伝子の発現への関与はまだ明らかになっていない。一方、PC12 のような他の細胞において、NO はメラノサイトのチロシナーゼと同じチロシンからドーパへの反応を触媒する酵素チロシンヒドロキシラーゼを活性化することが示されている^{16),17)}。本報告では NO による単回刺激による 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の誘導について調べた。

2.2 実験方法

2.2.1 細胞培養

正常ヒトメラノサイト(クラボウ)は MCDB153 に 1%human melanocyte growth supplement (HMGS)を含む培地を用い 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養した。評価実験時には MCDB153 に 10%fetal bovine serum (FBS)および 30μg/ml bovine pituitary extract (BPE)を含む培地に置き換えて培養した。NO 刺激は NO 供与体である *S*-nitroso-*N*-acetylpenicilamine (SNAP: 半減期 4.6 時間) (Research Biochemicals International)をジメチルスルホキシドに溶解したものを培地に添加した。

2.2.2 チロシナーゼ活性測定方法

細胞抽出物のドーパオキシダーゼ活性は Maeda らの方法に従って

行なった¹⁸⁾。メラノサイトを 24well プレートに 10^5 cells/ml で播種し種々試薬を添加して培養した細胞を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、1% TritonX-100 を含む PBS 中でソニケーションして細胞抽出物を得た。細胞抽出液(180 μ l)を 96well プレート入れ、そこに 10mM L-DOPA を 20 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C、60 分間インキュベートし、メラニンの吸収を示す 475nm の吸光度を測定した。

生細胞中のチロシンヒドロキシラーゼ活性は Imokawa らの方法に従って行なった³⁾。メラノサイトを 24well プレートに 10^5 cells/ml で播種し種々試薬および 1.0 μ Ci/ml [³H] tyrosine を添加し、培地中に放出されるトリチウム水の量を測定した。500 μ l の培地に 20%活性炭を含む 10%トリクロロ酢酸溶液(活性炭溶液)を 500 μ l 加え混合し、10,000g、10 分間遠心した。遠心上清 750 μ l に再び活性炭溶液を 500 μ l 加え混合し、10,000g、10 分間遠心した。培養上清 1ml の放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

2.2.3 ノザンブロットティング解析

ノザンブロットティング解析は第 1 章 1.2.4 と同様に行なった。

チロシナーゼ RNA プローブはヒトのチロシナーゼ cDNA (position 217-564)¹⁹⁾を *in vitro* 転写により合成した。

2.2.4 ウェスタンブロットティング解析

ウェスタンブロットティング解析は第 1 章 1.2.5 と同様に行なった。

抗チロシナーゼ抗体は Madac 社より購入したものをを用いた。

2.2.5 cGMP 量測定方法

氷冷した 65%エタノールを用いてメラノサイトを処理後、抽出液を乾燥し細胞内の cGMP 量を cGMP enzyme-immunoassay (EIA) system (Amersham)を用いて測定した。

2.2.6 統計処理

各々の実験は n=3 で行なった。統計解析は分散分析後 Dunnet's 検定または Tukey's 検定を行なった。有意差は *p<0.05, **p<0.01 で示した。

2.3 結果

2.3.1 NO によるチロシナーゼ遺伝子発現に与える影響

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 をノザンブロットィング法により検出した。その結果を Fig.1 に示す。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。一方、溶媒だけを加えたコントロールのメラノサイトでは変化はなかった。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。

2.3.2 チロシナーゼ活性およびタンパク質量に与える影響

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ヒドロキシラーゼ活性の 2 つの方法によって測定した。その結果を Fig.2 に示す。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た。NO 刺激後 24 時間後での活性の比率は

コントロールと比較して 1.3 倍とわずかな増加を観察した。活性の上昇は繰り返し行った 3 回の実験で同様に観察された。NO 刺激後のチロシンヒドロキシラーゼ活性はコントロールと比較して、24 時間後に 1.5 倍に増加していた。チロシナーゼのタンパク質量は、ウエスタンブロットィング法により調べた。その結果を Fig.3 に示す。チロシナーゼタンパク質量は 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。

2.3.3 チロシナーゼ遺伝子発現への cGMP シグナル経路の関与

Roméro-Graillet らは、NO 刺激によるチロシナーゼ活性の上昇は cGMP-dependent protein kinase (PKG) に制御されていることを報告した¹⁴⁾。NO 刺激により培養メラノサイト内の cGMP 量の変化を測定した。その結果を Fig.4 に示す。NO 刺激後に直ちに cGMP 量が上昇し、4 時間後に最大になることを確認した。Fig.1 に示すように NO 刺激によるチロシナーゼ mRNA が上昇することに cGMP/PKG 経路が関与しているかを確認するため、PKG インヒビターによる影響を調べた。Fig.5 に示すように、チロシナーゼ遺伝子の発現の上昇は PKG インヒビターである KT5823 の添加により抑制された。また、以前に Roméro-Graillet らによって報告されたように¹⁴⁾、KT5823 によりチロシナーゼ活性が抑制されることも確認できた。

2.4 考察

NO 刺激によるメラニン生成の上昇はチロシナーゼの活性とタンパク質量の増加によるもので、その増加に cGMP/PKG シグナル経路が関与していることが報告されている^{12),15)}。この報告はメラノサイトを

毎日 4 日間連続して NO 刺激してメラニン生成がおきる実験系を使用した結果である^{12),15)}。しかし、チロシナーゼの遺伝子発現に関しては調べられていなかった。

本研究では、メラノサイトを NO 供与体で単回刺激し、刺激直後から 24 時間後までのチロシナーゼ遺伝子の発現について調べた。チロシナーゼ mRNA 発現の上昇は NO 刺激の 2 時間後から見られ、12 時間後に最大になった (Fig.1)。このチロシナーゼ遺伝子発現の上昇に従い、ドーパオキシダーゼ活性の増加が時間依存的に 24 時間後まで観察された (Fig.2A)。24 時間刺激後のドーパオキシダーゼとチロシンヒドロキシラーゼ活性の増加の割合は無刺激の細胞と比べそれぞれ 1.3 倍、1.5 倍であり (Fig.2)、チロシナーゼタンパク質量の増加の割合 (1.3 倍; Fig.3) と一致していた。観察された増加は明確ではなかったが有意差は認められた。さらに、メラノサイトを毎日 4 日間連続して NO 刺激した時、チロシンヒドロキシラーゼ活性は約 2 倍の上昇が見られ、Roméro-Graille らの報告^{12),15)}と一致した結果になることを確認した。NO 刺激によるチロシナーゼ活性、タンパク質量の増加と一致してチロシナーゼ mRNA 量の上昇が見られた本実験結果は、NO 刺激によるメラニン生成の誘導がチロシナーゼ遺伝子発現の上昇を通しておきることを示唆している。

メラノサイトの適切な NO 刺激方法の実験条件を決定するためにいくつか試みを行った。利用することのできる NO 供与体はいくつかあり、それぞれ半減期は異なった試薬である。瞬時に NO を放出する NO 供与体である SNP (sodium nitroprusside) による刺激により、チロシンヒドロキシラーゼの酵素活性は有意に増加した。しかし、同じ NO 供与体である SNAP (半減期:4.6 時間) の刺激により得られる活性の上

昇に比べ低かった。また、DEA/NO (1,1-diethyl-2-hydroxy-2-nitrosohydrazine sodium salt:半減期 2分)による刺激ではチロシンハイドロキシラーゼ活性の有意な上昇は観察できなかった。これらの結果はおそらく SNP と DEA/NO の非常に短い寿命により長時間刺激が細胞に伝わらなかったためと考えている。SNP と DEA/NO の寿命が非常に短く、取り扱いも困難なことから、実験に用いる NO 供与体は SNAP を使用することとした。SNAP 刺激によるメラニン生成を上昇させる濃度においてメラノサイトの増殖能や細胞数に影響しなかった。このチロシンハイドロキシラーゼ活性の上昇が SNAP の不活性副産物によるものではないことは、SNAP を添加して 24 時間経過して NO の発生が終わった培地でメラノサイトのチロシンハイドロキシラーゼ活性が上昇しないことで確認している。

いくつかのメラノサイト刺激因子について、そのシグナル経路はすでに報告されている。たとえば α -MSH は cAMP 経路⁸⁾、ET-1 は PKC 経路⁴⁾を通してチロシナーゼ遺伝子発現を上昇することが報告されている。一般に、NO はグアニル酸シクラーゼの活性化そして細胞内 cGMP 量の増加を通してその効果を引き出す²⁰⁾。本研究においてもメラノサイト内の cGMP 量が NO 供与体による刺激の直後に上がりその増加が少なくとも 4 時間後まで続くことを確認した。さらに Roméro-Graillet らによって報告されたように¹⁵⁾、PKG インヒビター (KT5823)によりチロシナーゼ活性の上昇の抑制が観察された。

また、NO 刺激によるチロシナーゼ遺伝子発現の誘導が PKG インヒビターの添加により抑制されることを示した。これらの結果は、NO 刺激により誘導されるメラニン生成には、cGMP 経路を通じたチロシナーゼ mRNA 発現の上昇が主要なメカニズムである可能性を示して

いる。PKG を通したチロシナーゼ遺伝子発現の上昇はこれまで報告がなく、そして詳細なメカニズムは未だ解明されていない。PKG を通したメカニズムについて、他の細胞での興味深い報告がある。ラット胎仔線維芽細胞と脈管平滑筋細胞では、PKG が転写因子 AP-1(activator protein 1)を活性化させることが報告されている^{21),22)}。さらに、マウスメラノーマ細胞では、cAMP により誘導されるメラニン生成の際に AP-1 が活性化されている²³⁾。これらの報告から、NO は PKG による AP-1 の活性化を通してメラノサイトのチロシナーゼ遺伝子発現を誘導することが考えられる。このメカニズムへの更なる研究は必要である。

2.5 結語

本研究において、メラノサイトにおいて NO 刺激後 24 時間以内でのチロシナーゼ遺伝子発現を調べた。チロシナーゼ mRNA 発現の上昇は NO 供与体添加 2 時間後に確認された。チロシナーゼ活性の上昇は 24 時間までの間で時間依存的に認められた。そしてその活性上昇は、チロシナーゼタンパク質の増加を伴っていた。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。これらの結果は、cGMP 経路を通したチロシナーゼ遺伝子発現の上昇が NO により誘導されるメラニン生成の主要なメカニズムである可能性を示唆している。

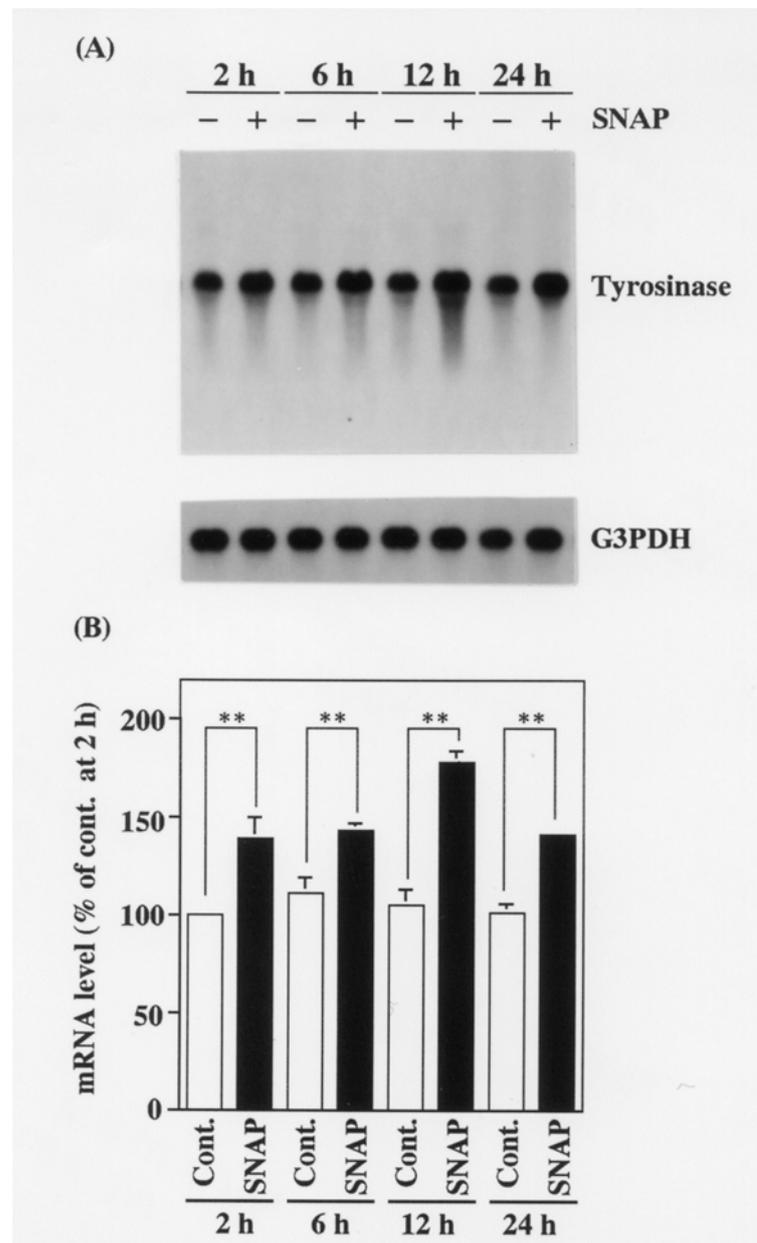


Fig.1 Effect of NO donor on expression of tyrosinase mRNA by melanocytes. Melanocytes were incubated in the presence of 200 μ M *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP). RNA was extracted from melanocytes at 2, 6, 12 and 24 h after the addition of SNAP. (A) Northern blotting analysis was carried out to detect tyrosinase and G3PDH mRNA. (B) Quantitative analysis of northern blotting. The bands were quantified using a dual-wavelength flying spot scanning densitometer, model CS-9300PC (Shimadzu, Kyoto, Japan). Experiments were performed in triplicate and data are expressed as the mean \pm SD; ** p <0.01.

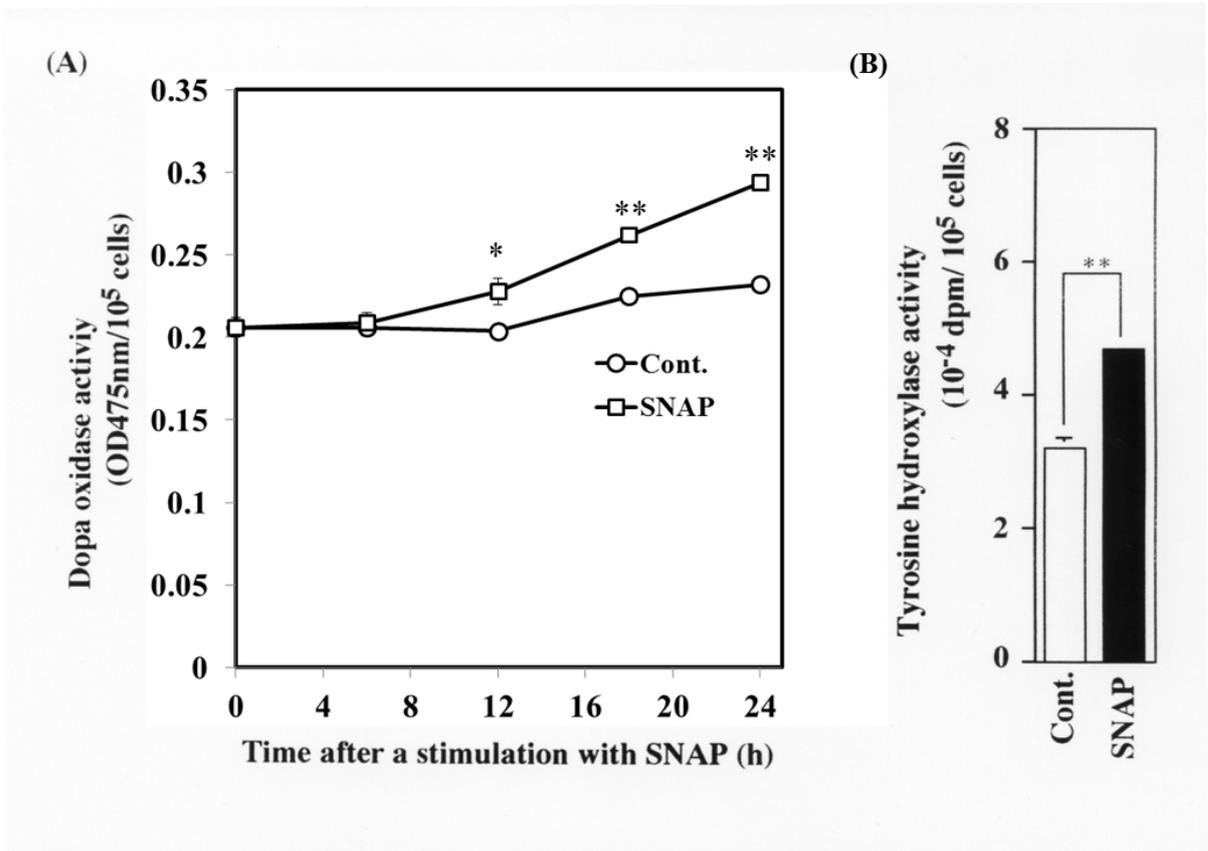


Fig.2 Effect of NO donor on tyrosinase activity in melanocytes. Dopa oxidase activity (A) and tyrosine hydroxylase activity (B) were measured in triplicate. Data are expressed as the mean \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

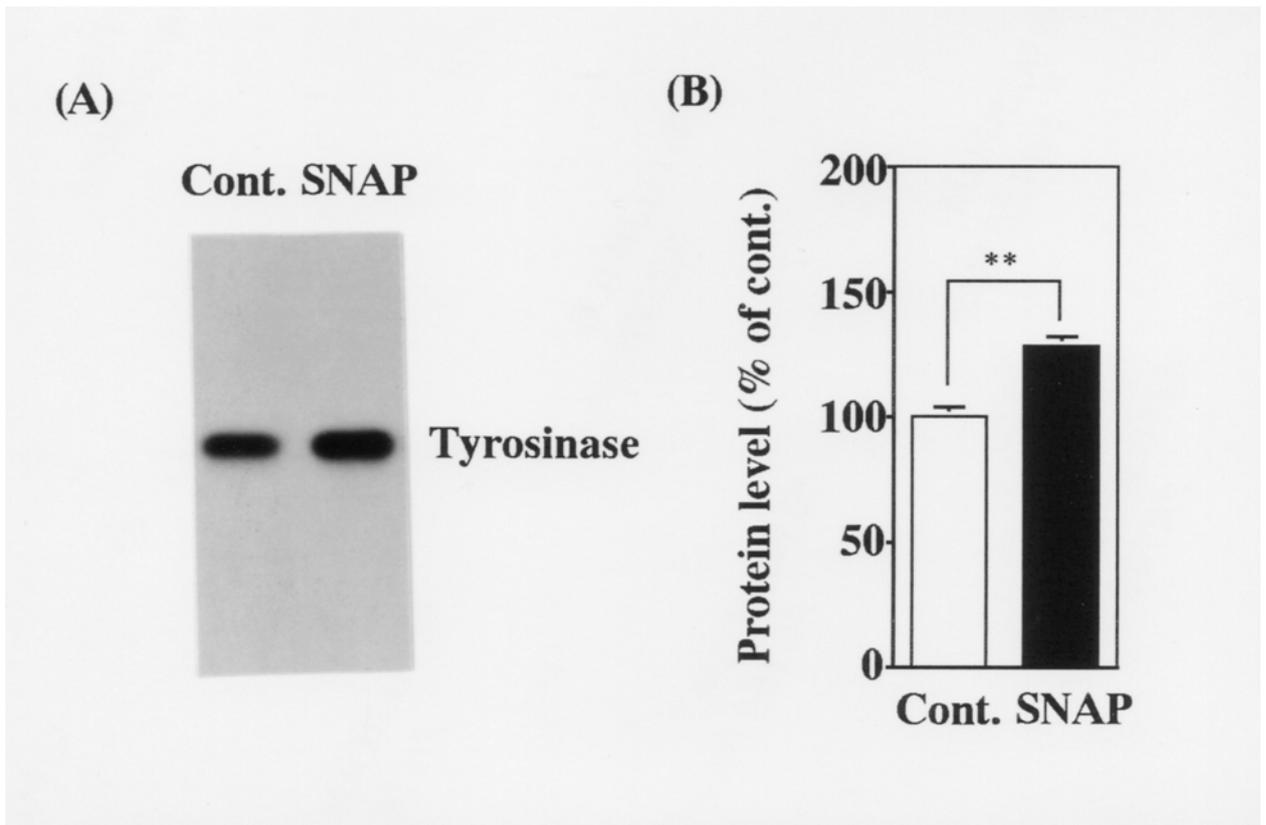


Fig.3 Effect of NO donor on the expression of tyrosinase protein by melanocytes. Proteins were extracted from melanocytes 24 h after the addition of SNAP. (A) Western blotting analysis used to detect tyrosinase protein. (B) Quantitative analysis of western blotting. Quantification was performed as described in Fig. 1. Data are expressed as the mean \pm SD (in triplicate); *** p <0.01.

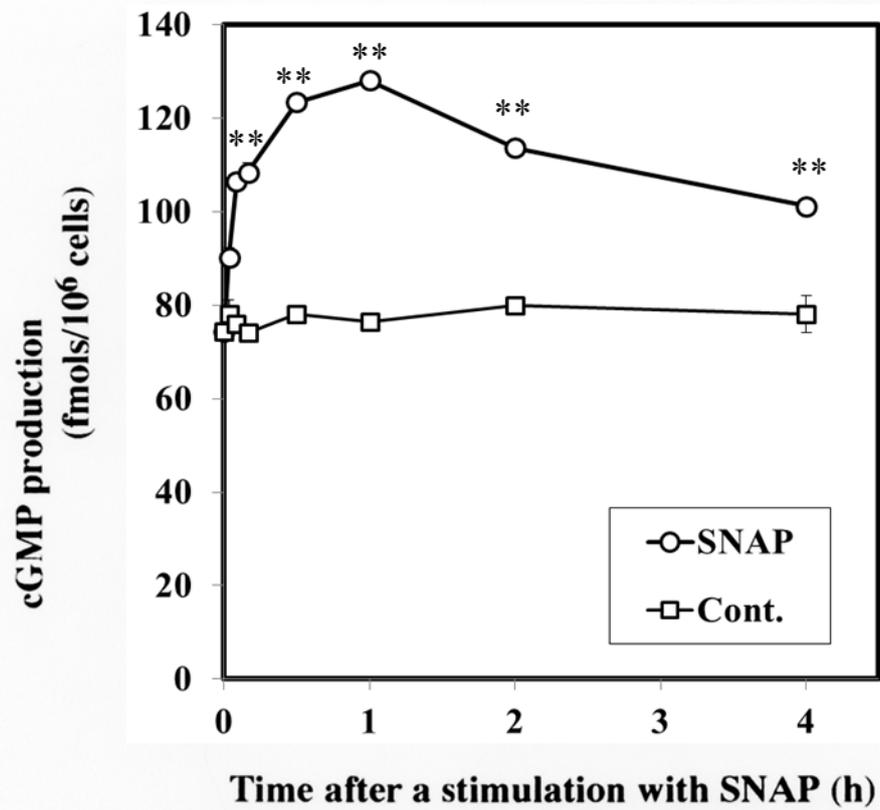


Fig.4 Production of cGMP in melanocytes in response to NO donor, Cyclic GMP was extracted from melanocytes for 4 h after the addition of SNAP and then measured. Data are expressed as the mean \pm SD (in triplicate); ** $p < 0.01$.

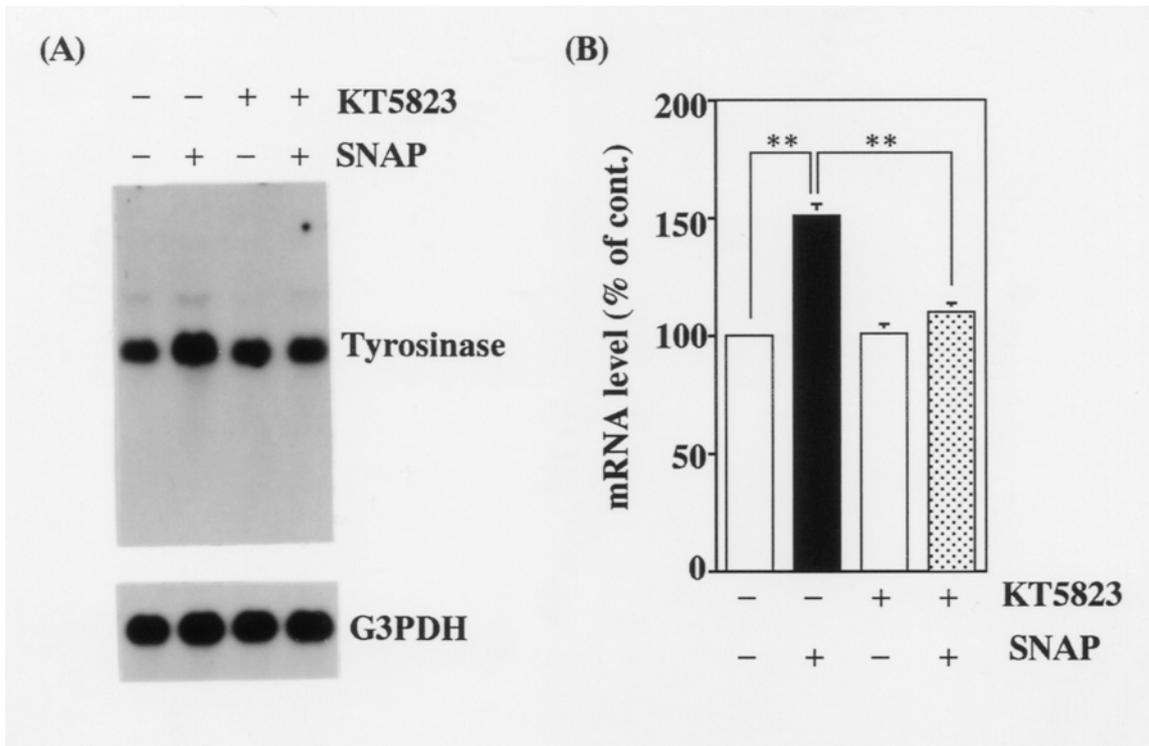


Fig.5 Effect of PKG inhibitor on tyrosinase expression stimulated by NO. When indicated, cells were preincubated for 1 h with 1 μ M KT5823 before the addition of SNAP. RNA was extracted from melanocytes 12 h after the addition of SNAP. (A) Northern blotting analysis was carried out to detect mRNA for tyrosinase and G3PDH mRNA. (B) Quantitative analysis of northern blotting. Quantification was performed as described in Fig. 1. Data are expressed as the mean \pm SD (in triplicate); ** p <0.01.

参考文献

1. Schauer E, Trautinger F, Köck A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest.* **93**:2258-2262 (1994).
2. Thody AJ, Graham A. Does α -MSH have a role in regulating skin pigmentation in human? *Pigment Cell Res.* **11**:265-274 (1998).
3. Imokawa G, Miyagishi M, Yada Y. Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J Invest Dermatol.* **105**:32-37 (1995).
4. Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, Higashi K, Yada Y. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res.* **10**:218-228 (1997).
5. Nordlund JJ, Collins CE, Rheins LA. Prostaglandin E2 and D2 but not MSH stimulate the proliferation of pigment cells in the pinna epidermis of the DBA/2 mouse. *J Invest Dermatol.* **86**:433-437 (1986).
6. Eller MS, Yaar M, Gilchrist BA. DNA damage and melanogenesis. *Nature.* **372**:413-414(1994).
7. Yoshida M, Takahashi Y, Inoue S. Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H₂ receptors in human normal melanocytes. *J*

- Invest Dermatol. **114**:334-342 (2000).
8. Durkacz BW, Lunec J, Grindley H, Griffin S, Horner O, Simm A. Murine melanoma cell differentiation and melanogenesis induced by poly(ADP-ribose). *Exp Cell Res.* **202**:287-291 (1992).
 9. Kuhn A, Fehsel K, Lehmann P, Krutmann J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol.* **111**:149-153 (1998).
 10. Deliconstantinos G, Villiotou V, Stravrides JC. Release by ultraviolet B (u.v.B) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production. *Br J Pharmacol.* **114**:1257-1265 (1995).
 11. Kang-Rotondo CH, Major S, Chiang TM, Myers LK, Kang ES. Upregulation of nitric oxide synthase in cultured human keratinocytes after ultraviolet B and bradykinin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* **12**:57-65 (1996).
 12. Roméro-Graillet C, Aberdam E, Clément M, Ortonne JP, Ballotti R. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest.* **99**: 635-642 (1997).
 13. Brown DA, Lesiak K, Ren WY, Strzelecki KL, Khorlin AA. Bicycle monoterpene diols induce differentiation of S91 melanoma and PC12 pheochromocytoma cells by a cyclic guanosine-monophosphate-dependent pathway. *Pigment Cell*

Res. **12**:36-47(1999).

14. T Horikoshi, M Nakahara, H Kaminaga, M Sasaki, H Uchiwa, Y Miyachi. Involvement of nitric oxide in UVB-induced pigmentation in guinea pig skin. *Pigment Cell Res.* **13**:358-363 (2000).
15. Roméro-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem.* **271**: 28052-28056 (1996).
16. Roskoski R Jr, Roskoski LM. Activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells by the cyclic GMP and cyclic AMP second messenger systems. *J Neurochem.* **48**:236-242(1987).
17. Roskoski R Jr, Vulliet PR, Glass DB. Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Neurochem.* **48**:840-845 (1987).
18. Maeda K, Fukuda M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharmacol Exp Ther.* **276**:765-769 (1996).
19. Bouchard B Fuller BB, Vijayasaradhi S, Houghton AN. Induction of pigmentation in mouse fibroblasts by expression of human tyrosinase cDNA. *J Exp Med.* **169**:2029-2042 (1989).
20. Murad F, Forstermann U, Nakae M, Pollock J, Tracey R, Matsumoto T, Buechler W. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and

- intercellular communication. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* **28**:101-109 (1993).
21. Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, Boss GR. Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cell. *FASEB J.* **9**:552-558 (1995).
22. Komalavilas P, Shah PK, Jo H, Lincoln TM. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth cells. *J Biol Chem.* **274**:34301-34309 (1999).
23. Englaro W, Rezzonico R, Durand-Clément M, Lallemand D, Ortonne JP, Ballotti R. Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem.* **270**:24315-24320 (1995).

第3章 生体内抗酸化物質によるメラニン生成の抑制

3.1 緒言

紫外線照射により表皮ケラチノサイトで NO が産生されること、そして NO の刺激によりメラノサイトのメラニン生成が増加することおよびそのメラニン生成はメラノサイト内でグアニル酸シクラーゼの活性化から cGMP/protein kinaseG(PKG)シグナル経路を通して起きることを第1、2章で明らかにしてきた¹⁾⁻⁴⁾。

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の色素沈着を抑制する効果的な方法である。メラニン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があげられ⁵⁾、これまでそれらの作用を持つ有効物質が皮膚の局所に使用されている。一方、NO は活性酸素種の一つであり、またメラニンの生成には酸化反応が関与していることから、メラニン生成を抑制するために細胞の生体内抗酸化物質を利用するという考えが可能であると思われるが、これまでにそのような報告はない。生体内抗酸化物質は生体内で様々な要因により発生する活性酸素種を制御することが知られている。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誘導型生体内抗酸化物質で NO をスカベンジすることも報告されている。

メタロチオネインは低分子量(約 7kDa)の金属結合能をもった高システインタンパク質で、肝臓や腎臓など多くの組織において存在が知られている細胞内で誘導される生体内抗酸化剤である。また、メタロチオネインは有害な金属を解毒する役割を持ち、金属のホメオスタシスに関与することも知られている⁶⁾⁻¹⁴⁾。皮膚組織においてもその発現

はケラチノサイトと線維芽細胞で観察されている。皮膚を細胞傷害から守るためにメタロチオネインを利用するいくつかの試みが報告されている。Hanadaらはメタロチオネインが表皮において紫外線照射によるサンバーンセルの生成を妨げることを示した¹⁵⁾。SchwanzらはメタロチオネインがNOをスカベンジすることにより、NO刺激により起きる細胞毒性やDNAダメージを保護することを見出している¹⁶⁾。メラノサイトではメタロチオネインの存在およびその機能の報告はない。これらの報告よりNOによって誘導されたメラニン生成を抑制するためにメタロチオネインの量を増やすことで効果を発揮する可能性があると考えた。

本報告では、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を誘導することでNO刺激で上昇するメラニン生成が抑制されるかを調べた。またこの抑制効果が他のメラノサイト刺激因子によるメラニン生成にも影響するかを調べた。

3.2 実験方法

3.2.1 細胞培養

正常ヒトケラチノサイト(クラボウ)は MCDB153 に 0.1ng/ml epidermal growth factor、5 μ g/ml insulin、0.5 μ M hydrocortisone、0.2mM ethanolamine、0.1mM phosphatidylethanolamine、50 μ g/ml bovine pituitary extractを含む培地を用い 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 雰囲気下で培養した。ヒト線維芽細胞(Detroit551, ATCC CCL110)は Eagle's minimum medium に 10%fetal bovine serum (FBS)を含む培地を用い 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 雰囲気下で培養した。

HeLa 細胞は Eagle's minimum medium に 10%FBS を含む培地を用い 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養した。

正常ヒトメラノサイト(クラボウ)は MCDB153 に 1%human melanocyte growth supplement (HMGS)を含む培地を用い 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養した。メラノサイトの評価実験時には MCDB153 に 5µg/ml insulin、0.5µM hydrocortisone、3ng/ml basic fibroblast growth factor を含む培地に置き換えて培養した。

3.2.2 ノザンブロットティング解析

ノザンブロットティング解析は第 1 章 1.2.4 と同様に行なった。

3.2.3 RT-PCR 解析

Total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen 製)を用いて抽出後 DNase I 処理を行ない RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)解析に使用した。First strand cDNA は Total RNA (1µg)から SuperScriptII (Invitrogen)と oligo-dT を用い合成した。cDNA の増幅は AmpliTaq DNA polymerase (Roche)を用い、PCR 反応は 1 サイクル 94°C:30 秒、55°C:30 秒、72°C:90 秒を 15 または 30 サイクル行なった。PCR 反応に用いたプライマーを以下記載する。

MT-IA, (sense) 5'-(16) TGCGCCTTATAGCCTCTCAA (35) -3',

(antisense) 5'-(350) ATACAGTAAATGGGTCAGGG (331)-3'

MT-IB, (sense) 5'-(16) TGCCCTGACTTCTCATATCT (35)-3',

(antisense) 5'-(340) GTAGCAAACCGGTCAGGTAG (321)-3'

MT-IE, (sense) 5'-(11) CCAACTGCCTGACTGCTTGT (30)-3',

(antisense) 5'-(350) GAAATG CAGCAAATGGCTCA (331)-3'

MT-IF, (sense) 5'-(21) CACTGCTTCTTCGCTTCTCT (40)-3',
(antisense) 5'-(360) CACAGGAAAAGGAATGTAGC (341)-3'
MT-IG, (sense) 5'-(31) TTCCCTTCTCGCTTGGGAAC (50)-3',
(antisense) 5'-(350) GTAGCAAAGGGGTCAAGATT (331)-3'
MT-II, (sense) 5'-(31) GTGTACAACCTGTCCCGA CT (50)-3',
(antisense) 5'-(340) ACGTCAGGGTCAGGGTTGTA (321)-3';
MT-III, (sense) 5'-(11) GCGTCCAGTTGCTTGGAGGA (30)-3',
(antisense) 5'-(350) CACTTCCACCACAGGCATA (331)-3';
MT-IV, (sense) 5'-(35) TTTCGGAC ACCTGGACCATG (54)-3',
(antisense) 5'-(380) GAATGTGACCAACACCACAT (361)-3'

3.2.4 ウェスタンブロッティング解析

ウェスタンブロッティング解析は第1章 1.2.5と同様に行なった。

抗メタロチオネインポリクローナル抗体は horse kidney 由来メタロチオネイン (Sigma) をウサギに免疫しアフィニティークロマトグラフィーすることで作製した¹⁷⁾。抗チロシナーゼ抗体は Madac 社より購入したものを用いた。

3.2.5 チロシナーゼ活性測定方法

生細胞中のチロシンヒドロキシラーゼ活性は第2章の 2.2.2と同様に行なった。

細胞抽出物のチロシンヒドロキシラーゼ活性は Imokawa ら⁷⁾および Fuller ら¹⁸⁾の方法を改良して行なった。メラノソーム分画物を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、1% TritonX-100 を含む PBS 中でソニケーションして抽出物を得た。抽出液に 0.1mM L-tyrosine、

10mM L-DOPA、2.0 μ Ci/ml [3 H] tyrosine を添加した PBS 反応液(500 μ l) を 37 $^{\circ}$ C、2 時間インキュベートし、放出されるトリチウム水の放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

3.2.6 メラノソーム画分調製方法

メラノソーム画分の調製は Potterf らの方法に従って行なった¹⁹⁾。培養メラノサイトをトリプシンで回収し氷冷した 0.25M sucrose を含む 10mM Hepes buffer (pH7.0)で洗浄後、4 $^{\circ}$ C、10 分間、700g で遠心した。沈殿物を 0.25M sucrose を含む 10mM Hepes buffer (pH7.0)に懸濁後ホモゲナイズし、4 $^{\circ}$ C、10 分間、700g で遠心した。遠心上清を 4 $^{\circ}$ C、30 分間、17,000g で遠心し沈殿物をメラノソーム分画物とした。

3.2.7 統計処理

各々の実験は n=3 で行なった。統計解析は分散分析後 Dunnet's 検定あるいは Tukey's 検定を行なった。有意差は**p<0.01 で示した。

3.3 結果

3.3.1 メラノサイトにおけるメタロチオネイン遺伝子発現と誘導

皮膚由来培養ケラチノサイト、メラノサイトと線維芽細胞において、メタロチオネイン遺伝子発現を調べた。ノザンブロット法による解析ではメタロチオネイン(MT-II) 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明確に検出されなかった(Fig.1A)。そこで RT-PCR 法による検出を試みたところ、メラノサイトにおける 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(Fig.1B)。次に、メラノサイトのメタロチオネイン発現が上

昇するかメラロチオネインの誘導剤であることが知られている塩化亜鉛を添加して、mRNA とタンパク質の量を調べた。その結果、メラノサイトのメラロチオネイン遺伝子の発現は塩化亜鉛添加 6 時間後に添加濃度依存的な上昇が見られた(Fig.2A)。また、G3PDH mRNA の変化は観察されなかった。メラロチオネインのタンパク質の誘導は塩化亜鉛添加 24 時間後から増加が観察された(Fig.2B)。これは遺伝子発現が誘導された後にタンパク質が合成されていることを示している。また、別のメラロチオネイン誘導剤であるデキサメタゾン添加した際にも同様の結果が得られた。メラノサイトで発現されるメラロチオネインのアイソタイプを調べるために、RT-PCR 解析を行ったところ、MT-IA、-IE、-IF、-IG、そして、-II は 15 サイクルの PCR 増幅後、そして MT-IB、-III は 30 のサイクルの PCR 増幅後、発現が確認された。しかし、MT-IV 発現はどちらの条件でも検出されなかった(Fig.1C)。

3.3.2 NO 刺激によるメラニン生成へのメラロチオネイン誘導の効果

NO 供与体である *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) の添加によりチロシナーゼ活性の上昇が観察された。SNAP 添加の 24 時間前に塩化亜鉛を添加しメラ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ることが観察された(Fig.3A)。また別のメラ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(Fig.3B)。メラノサイトが NO に刺激されていないときは、塩化亜鉛およびデキサメタゾンの添加によりチロシナーゼ活性には影響を及ぼさなかった(Fig.3A、3B)。さらに、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減少しなかった

(Fig.3C、3D)。これは NO 刺激によるチロシナーゼ発現上昇がメタロチオネインによって抑制されないことを示している。

3.3.3 種々メラノサイト刺激因子によるメラニン生成へのメタロチオネイン誘導の効果

メラノサイトを NO とは別のシグナル経路でチロシナーゼ発現を誘導するメラノサイト刺激因子である α -MSH および ET-1 刺激により上昇したメラニン生成はメタロチオネイン誘導により抑制された (Fig.4A)。また、 α -MSH および ET-1 刺激時においてチロシナーゼ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。(Fig.4B)。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た (Fig.5)。これは Fig.2B で示した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る。

3.3.4 メタロチオネイン誘導によるチロシナーゼ活性抑制のメカニズム

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はチロシナーゼの発現には影響を与えず (Fig.3)、 α -MSH および ET-1 刺激により上昇するメラニン生成も抑制した (Fig.4)。それゆえ、メタロチオネインによるチロシナーゼ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 刺激した分画物ではチロシナー

ゼ活性は上昇したが、塩化亜鉛添加後 α -MSH刺激した分画物では活性が抑制された。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。非特異的抗体の添加ではチロシナーゼ活性の減少の解除は見られなかった(Fig.6A)。さらに、精製されたメタロチオネインを0.02%および生体内抗酸化物質グルタチオン1%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。メラノサイト特異的タンパク質S-100 β (Affinity Research Products社)(約10kDa)の添加では活性は抑制されなかった(Fig.6B)。

3.4 考察

本研究において、メラノサイトで生体内抗酸化物質メタロチオネインの存在と誘導、そしてメタロチオネインがNO刺激によるメラニン生成を抑制することを調べた。その結果、メラノサイトでもメタロチオネインが存在しており、メタロチオネイン誘導剤である塩化亜鉛により誘導されることを示した(Fig.1、2)。加えて、NO刺激によるメラニン生成は予めメタロチオネインを誘導しておくことにより抑制された(Fig.3A、3B)。この抑制メカニズムは予想していたメタロチオネインによるNOのスカベンジ作用よりもむしろメタロチオネイン誘導によるメラノソーム内での直接的なチロシナーゼ活性阻害であると考えられた(Fig.6)。それは、NO刺激によるメラニン生成時にみられるチロシナーゼ mRNA およびタンパク質の発現上昇がメタロチオネインの誘導により阻害されず(Fig.3C、3D)、またメタロチオネイン誘導により他のメラノサイト刺激因子により上昇するメラニン生成も抑制したことから説明できる(Fig.4)。メタロチオネインは *in vitro*

系でチロシナーゼ活性阻害する報告があり^{20),21)}、本研究でも確認した(Fig.6B)。紫外線照射したケラチノサイトでメタロチオネインは細胞質から核へ移行することが報告されている²²⁾。これらのことから、メタロチオネインが細胞内でメラノソームへ移動する可能性を本研究結果は示していることは重要なことである。更なる検討により、メタロチオネインの局在の詳細なメカニズム確かめる必要がある。

α -MSH や ET-1 のような他のメラノサイト刺激因子によるメラニン生成もまた塩化亜鉛の添加により抑制された。メタロチオネイン誘導時に NO 刺激によるメラニン生成は抑制されたが、チロシナーゼタンパク質の増加は抑制されなかった(Fig.4)。また、塩化亜鉛と α -MSH は不溶性複合体を形成することが知られているため、 α -MSH 刺激によるメラニン生成において、培地に塩化亜鉛を添加することで α -MSH と不溶性複合体を形成し沈降することでメラニン生成を抑制するかもしれない。しかしながらその可能性は低く、 α -MSH 刺激メラニン生成時の細胞内 cAMP 量は塩化亜鉛の有無で変化はなく、塩化亜鉛と α -MSH を含む培地を遠心分離さらにフィルターろ過し不溶性物を除いた培地でチロシナーゼタンパク質の増加も見られなかった。一方、*in vivo* 実験では皮膚にメタロチオネインを誘導することで紫外線照射によるサンバーンセルの形成が抑制されたことが報告されている¹⁵⁾。メタロチオネインはまた、細胞内でラジカルスカベンジ作用をもつことが報告されている⁶⁾⁻¹⁴⁾。本研究の結果は、メタロチオネインの誘導により NO だけでなく α -MSH や ET-1 刺激によって起こるメラニン生成を抑制することを示した。メタロチオネインは正常な皮膚ではわずかに検出されるが、メタロチオネイン誘導剤で処理して誘導することは紫外線照射による細胞ダメージや色素沈着など皮膚に対し、新しい生理

学的な利点を提供するかもしれない。

RT-PCR 法を使用して、メラノサイトでメタロチオネインが発現していることを示したが、ケラチノサイトや線維芽細胞ではノザンブロット法で検出できることを考えると、メラノサイトでのメタロチオネイン発現は他の細胞に比べ弱いと思われる (Fig.1A、1B)。メタロチオネインのアイソタイプは 4 つの属と 16 のアイソタイプに分類される。他の細胞ではアイソタイプ MT-IA、-IB、-IE、-IF、-IG、-II の発現が報告されており²³⁾⁻²⁷⁾、本研究においても塩化亜鉛処理でメラノサイトでも発現が確認できた (Fig.1C)。MT-III はメラノサイトと同様に神経冠から派生分化した脳細胞で特異的に発現しているが^{28),29)}、メラノサイトにおいても発現が確認された (Fig.1C)。MT-IV は上皮の分化の際に亜鉛代謝の制御に関係していることが報告されている³⁰⁾。今回の実験では、メラノサイトで検出されなかった (Fig.1C)。

3.5 結語

本研究において、メラノサイトでメタロチオネインが発現しており、メタロチオネイン誘導剤である塩化亜鉛により誘導されることを示した。そして、メタロチオネインの誘導は NO だけでなく α -MSH や ET-1 刺激により起きるメラニン生成の上昇を抑制する効果的な方法であることを初めて示した。これらの抑制効果は、NO をスカベンジするよりもメラノソーム内でチロシナーゼ活性を直接阻害しているためであると示唆された。

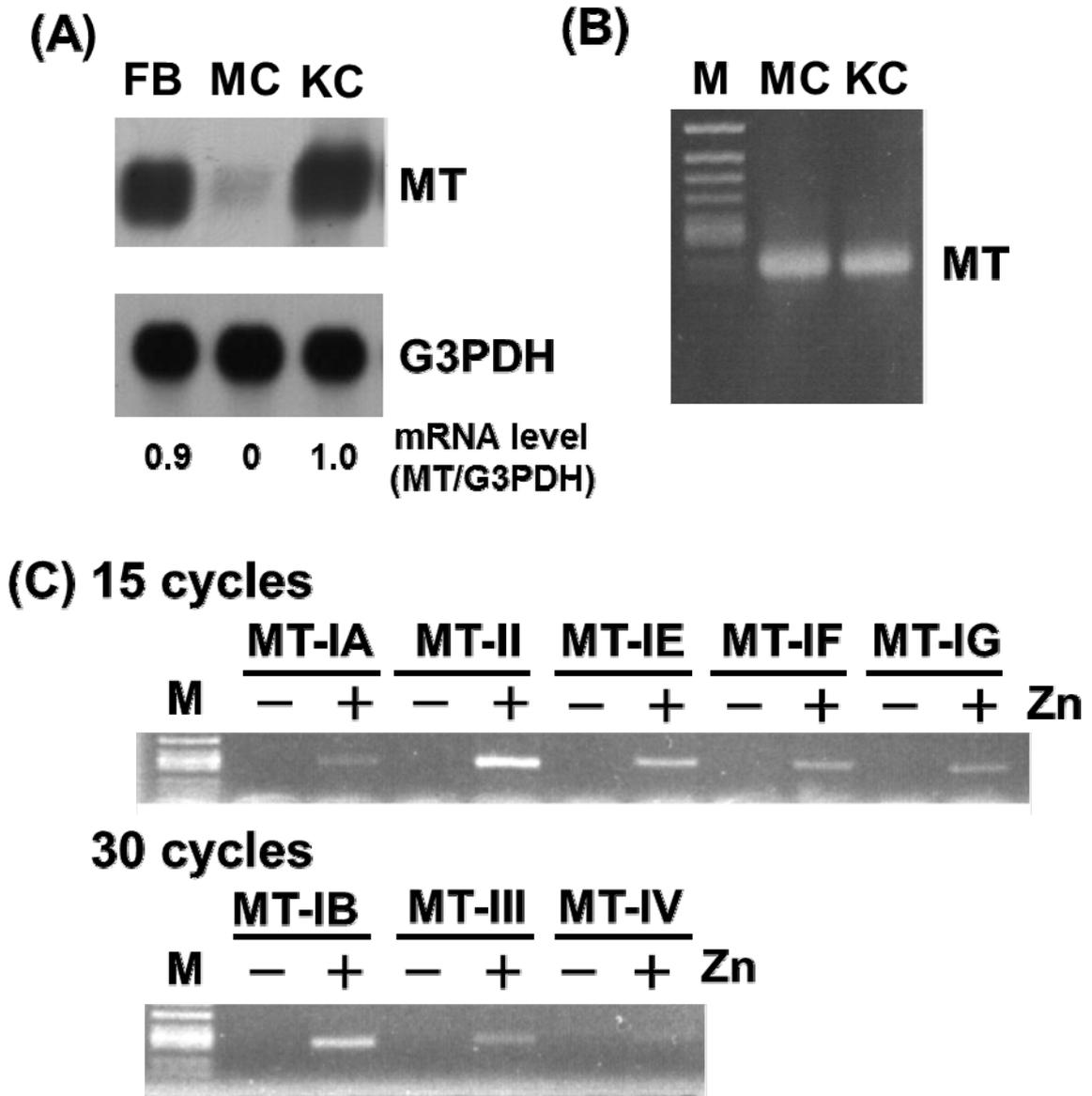


Fig.1 Metallothionein (MT) mRNA expression in melanocytes. Total RNA was extracted from keratinocytes (KC), fibroblast-like cells (FB) and Melanocytes (MC). (A) Northern blotting analysis to detect MT and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) mRNA. The relative mRNA levels are presented. Data shown are from one of three independent experiments. (B) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect MT mRNA. (C) RT-PCR analysis to detect mRNA for MT isotypes in melanocytes, from which total RNA was extracted 6 h after the addition of 100 μ M zinc (Zn) chloride. M: Φ X-174-*Hinc*II.

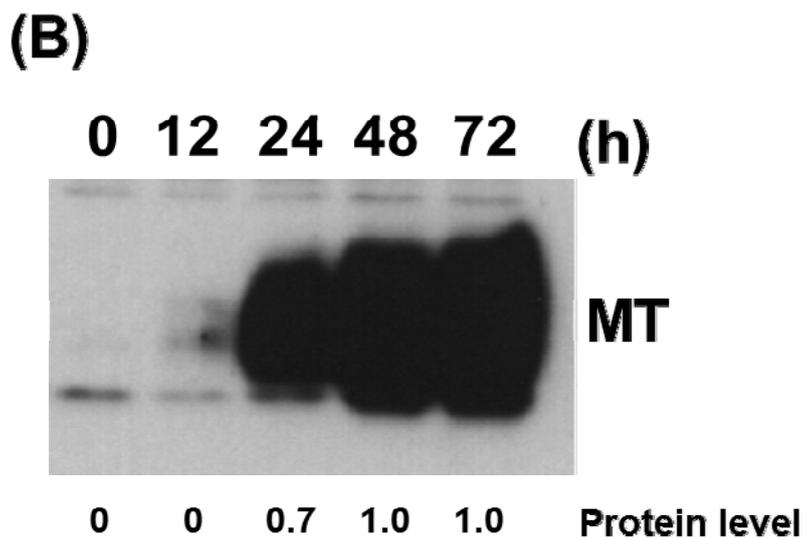
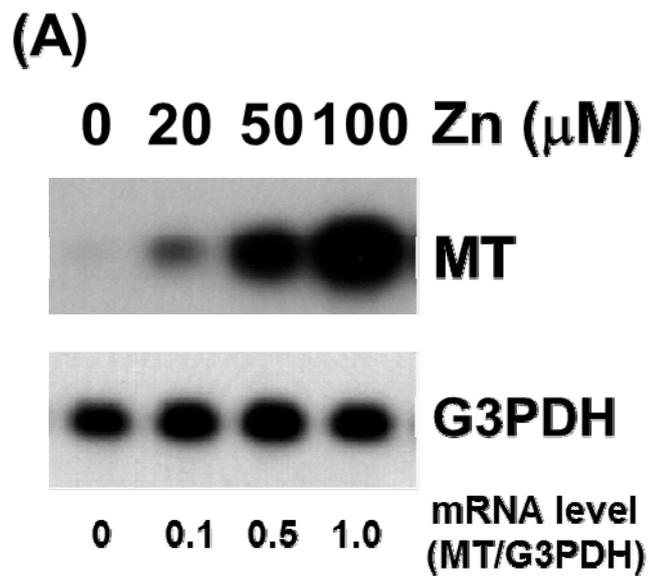


Fig.2 Effect of zinc (Zn) chloride on Metallothionein (MT) mRNA and protein expression in melanocytes. (A) Total RNA was extracted from melanocytes 6 h after the addition of Zn chloride; then northern blotting analysis was performed to detect MT and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) mRNA. The relative mRNA levels are presents. Data shown are from one of three independent experiments. (B) Protein was extracted from melanocytes at 0, 12, 24, 48, and 72 h after the addition of 100 μ M Zn chloride and western blotting analysis was used to detect MT protein. The relative protein levels are presented. Data shown are from one of three independent experiments.

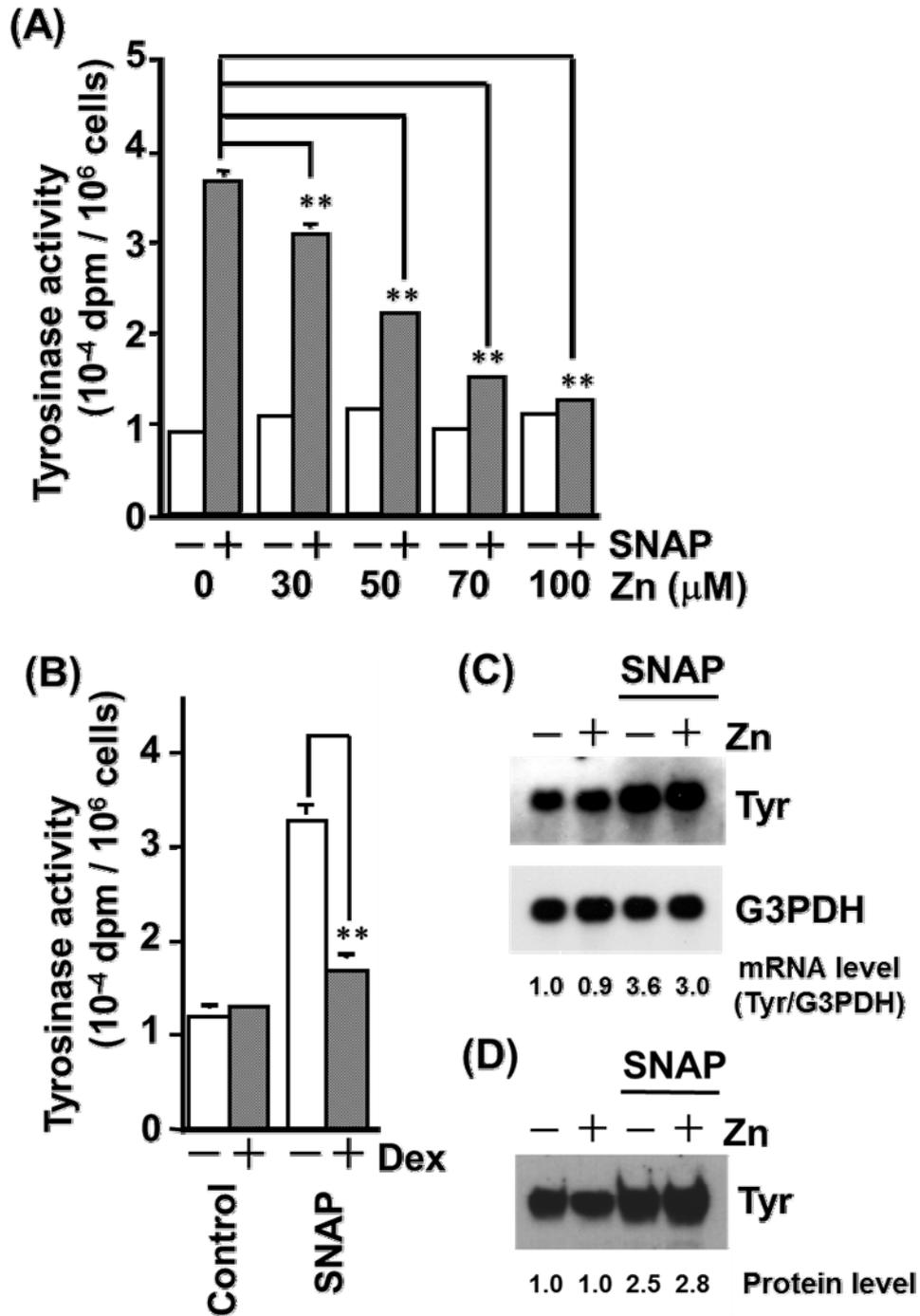


Fig.3 Inhibitory effect of zinc (Zn) chloride or dexamethasone (Dex) on nitric oxide (NO)-induced melanogenesis in melanocytes. Melanocytes were treated with 100 μ M of Zn chloride (A) or 100 μ M of Dex (B), and then cultured in the presence of 200 μ M of *S*-nitroso-*N*-acetyl-L-arginine (SNAP) for 72 h, after which tyrosinase activity in living cells was measured. Data are expressed as the mean \pm SD (in triplicate); ** p <0.01. (C) Total RNA was extracted from melanocytes 24 h after the addition of SNAP. Northern blotting analysis was carried out to detect tyrosinase (Tyr) and G3PDH mRNA. The relative mRNA levels are presented. Data shown are from one of three independent experiments. (D) Protein was extracted from melanocytes 48 h after the addition of SNAP and western blotting analysis was used to detect tyrosinase protein (Tyr). The relative protein levels are presented. Data shown are from one of three independent experiments.

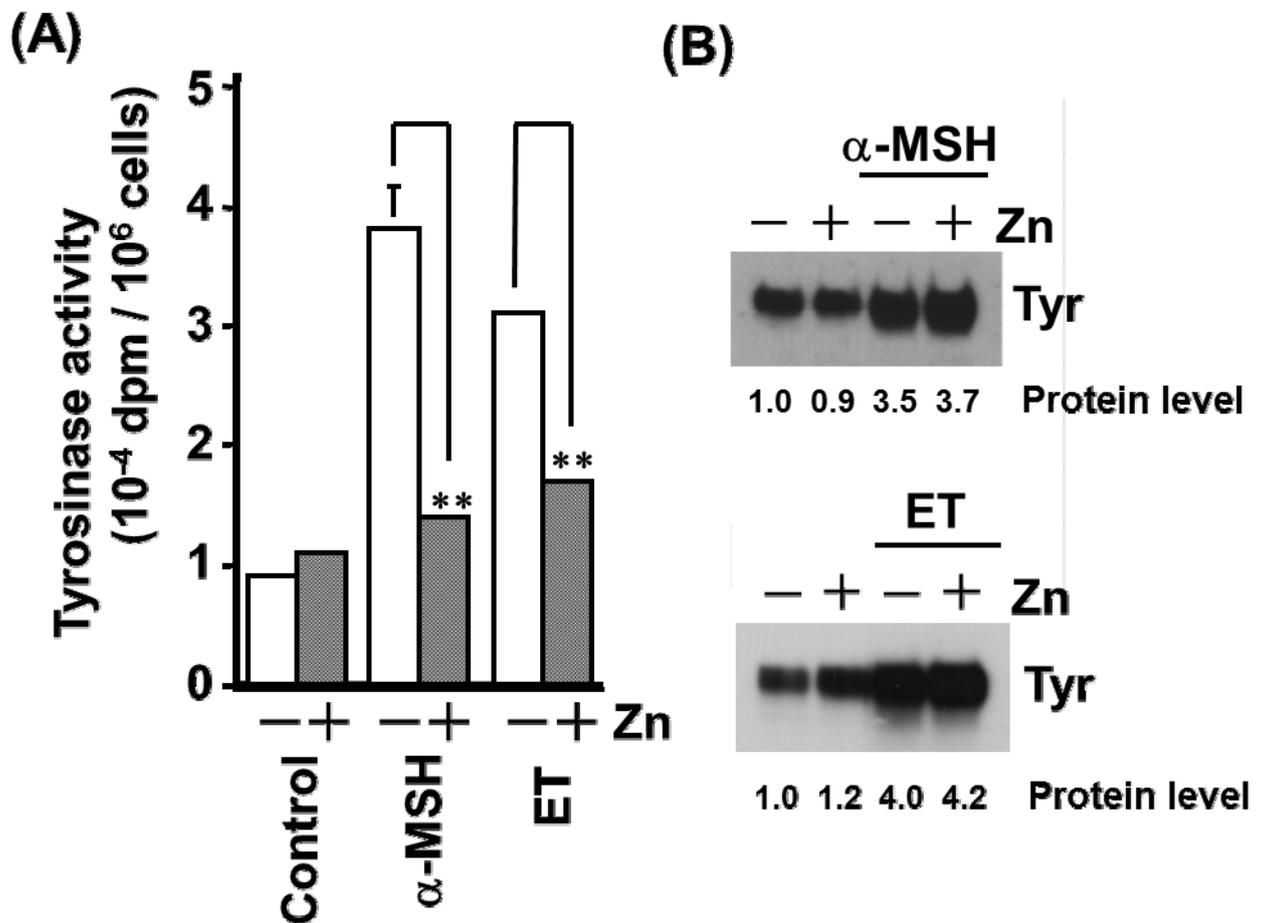


Fig.4 Inhibitory effect of zinc chloride on α -MSH or endothelin-1-induced melanogenesis in melanocytes. (a) Melanocytes were treated with 100 μ M of zinc chloride (Zn) and then cultured in the presence of 0.3 μ M of α -MSH or 10 nM of endothelin-1 for 72 h, after which tyrosinase activity in living cells was measured. Data are expressed as the mean \pm SD (in triplicate); ** p <0.01. (B) Protein was extracted from melanocytes 48 h after the addition of α -MSH or endothelin-1, and western blotting analysis was used to detect tyrosinase protein (Tyr). The relative protein levels are presented. Data shown are from one of three independent experiments.

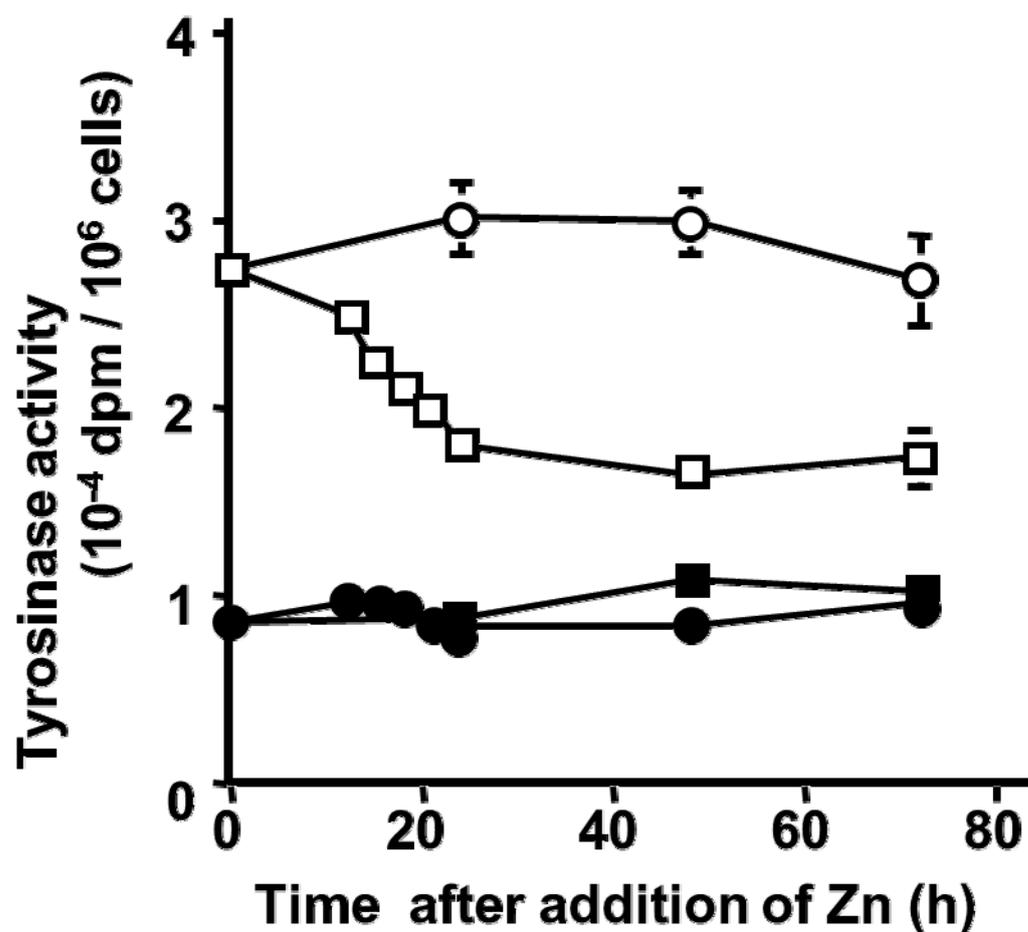


Fig.5 Time course of tyrosinase activity after addition of zinc chloride to melanocytes. Melanocytes were stimulated with 0.3 μ M of α -MSH for 72 h, after which 100 μ M of zinc chloride (Zn) was added to the culture medium. Tyrosinase activity in living cells was measured at various times after the addition of zinc chloride. Data are expressed as the mean \pm SD (in triplicate). ●: Control; ■: Zn; ○: α -MSH; □: Zn plus α -MSH.

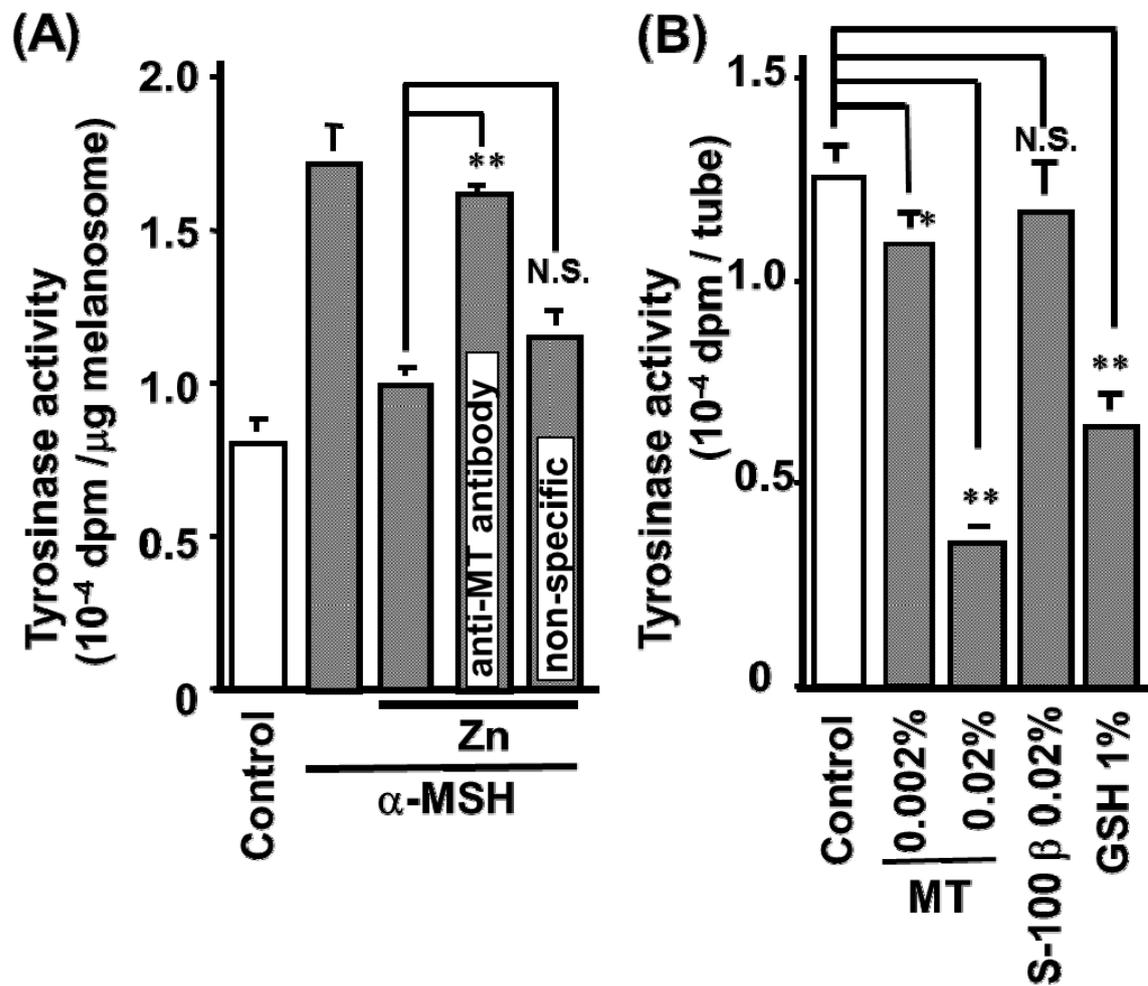


Fig.6 Inhibitory effect of MT on tyrosinase activity. (A) Melanocytes were treated with 100 μ M of zinc chloride (Zn) and then cultured in the presence of 0.3 μ M of α -MSH for 72 h, after which melanosome-rich fractions were extracted from the melanocytes. Tyrosinase activity in the fractions was measured in the presence of 20 μ l/ml anti-MT antibody. (B) Melanosome extracts were incubated with purified MT, S-100 β , or glutathione (GSH), after which tyrosinase activity was measured. As a control, melanosome extract alone was also tested. Data are expressed as the mean \pm SD (in triplicate); ** p <0.01, * p <0.05.

参考文献

1. Roméro-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem.* **271**: 28052-28056 (1996).
2. Roméro-Graillet C, Aberdam E, Clément M, Ortonne JP, Ballotti R. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest.* **99**: 635-642 (1997).
3. Sasaki M, Horikoshi T, Uchiwa H, Miyachi Y. Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **13**: 248-252 (2000).
4. Horikoshi T, Nakahara M, Kaminaga H, Sasaki M, Uchiwa H, Miyachi Y. Involvement of nitric oxide in UVB-induced pigmentation in guinea pig skin. *Pigment Cell Res.* **13**: 358-363 (2000).
5. Briganti S, Camera E, Picardo M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**: 101-110 (2003).
6. Thornalley PJ, Vasák M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxy radicals. *Biochim Biophys Acta.* **827**: 36-44 (1985).
7. Hamer DH. Metallothionein. *Annu Rev Biochem.* **55**: 913-951

- (1986).
8. Bremner I. Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *J Nutr.* **117**: 19-29 (1987).
 9. Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ. Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med.* **185**: 107-119 (1987).
 10. Webb M. Toxicological significance of metallothionein. *Experientia Suppl.* **52**: 109-134 (1987).
 11. Richards MP. Recent developments in trace element metabolism and function: role of Metallothionein in copper and zinc metabolism. *J Nutr.* **119**: 1062-1070 (1989).
 12. Bremner I, Beattie JH. Metallothionein and the trace minerals. *Annu Rev Nutr.* **10**: 63-83 (1990).
 13. Waalkes MP, Goering PL. Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. *Chem Res Toxicol.* **3**: 281-288 (1990).
 14. Hanada K, Baba T, Hashimoto I, Fukui R, Watanabe S. Possible role of cutaneous metallothionein in protection against photo-oxidative stress-epidermal localization and scavenging activity for superoxide and hydroxyl radicals. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* **9**: 209-213 (1992/1993).
 15. Hanada K, Sawamura D, Tamai K, Baba T, Hashimoto I, Muramatsu T, Miura N, Naganuma A. Novel function of metallothionein in photoprotection: metallothionein-null

- mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet B injury in the skin. *J Invest Dermatol.* **111**: 582-585 (1998).
16. Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JR Jr, Pitt BR. Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**:4452-4456 (1995).
 17. Goetghebeur M, Kermasha S, Kensley J, Metche M. Purification and characterization of copper-metallothionein from *Aspergillus niger* by affinity chromatography. *Biotechnol Appl Biochem.* **22**: 315-325 (1995).
 18. Fuller BB, Drake MA, Spaulding DT, Chaudhry F. Downregulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell cultures by yohimbine. *J Invest Dermatol.* **114**: 268-276 (2000).
 19. Potterf SB, Virador V, Wakamatsu K, Furumura M, Santis C, Ito S, Hearing VJ. Cysteine transport in melanosomes from murine melanocytes. *Pigment Cell Res.* **12**: 4-12 (1999).
 20. Goetghebeur M, Kermasha S: Inhibition of polyphenol oxidase by copper-metallothionein from *Aspergillus niger*. *Phytochemistry.* **42**: 935-940 (1996).
 21. Lerch K. Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. *Nature.* **284**: 368-370 (1980).
 22. Hanada K, Tamai K, Sawamura D, Hashimoto I, Muramatsu T. Dynamic changes in intracellular location of metallothionein

- in rat keratinocytes after ultraviolet-B irradiation. *J Invest Dermatol.* **110**: 98-100 (1998).
23. Durnam DM, Palmiter RD. Transcription regulation of the mouse metallothionein-1 gene by heavy metals. *J Biol Chem.* **256**: 5712-5716 (1981).
24. Rechards RI, Heguy A, Karin M. Structural and functional analysis of the human metallothionein-1A gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell.* **37**: 263-272 (1984).
25. Varshney U, Jahroudi N, Foster R, Gedamu L. Structure, organization, and regulation of human metallothionein 1F gene: differential and cell-type-specific expression in response to heavy metals and glucocorticoids. *Mol Cell Biol.* **6**: 26-37 (1986).
26. Sadhu C, Gedamu L. Regulation of human metallothionein (MT) genes. differential expression of MT1-F, MT1-G, MT2-A genes in the hepatoblastoma cell line (HepG2). *J Biol Chem.* **263**: 2679-2684 (1988).
27. Choudhuri S, McKim JM Jr, Klaassen CD. Differential expression of the metallothionein gene in liver and brain of mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* **119**: 1-10 (1993).
28. Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron.* **7**: 337-347 (1991).

29. Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. **89**: 6333-6337 (1992).
30. Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*. **33**: 7250-7259 (1994).

III. 結論

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 NO が関与することが報告されている。また、紫外線により皮膚内で放出されるメラノサイト刺激因子がメラノサイトを刺激することによって皮膚に色素沈着を起こすことは良く知られた現象であり、培養メラノサイトで NO によりメラニン生成が誘導されることが報告された。しかしながら、紫外線による皮膚内での NO 産生のメカニズムに関しては様々な報告があり、未だ正しいメカニズムは不明のままである。また NO によるメラニン生成に関しても、メラノサイトの刺激因子として働いている十分な報告はされていない。

本報告では、培養ケラチノサイトを用いて紫外線照射による NO 産生にかかわる NO 合成酵素(NOS)のアイソフォームの発現を検討した結果、ケラチノサイトに紫外線照射したときみられる NO 産生の増加は誘導型の iNOS の発現ではなく構成的に発現している bNOS の発現の上昇がかかわっていることを示した。また、培養メラノサイトを用いて NO 刺激によるチロシナーゼの発現を調べた結果、cGMP シグナル経路を通じたチロシナーゼ mRNA およびタンパク質の発現上昇を伴ってチロシナーゼ活性を増加させることを示した。

NO は生理学的、病理学的に重要な役割を果たしている一方、活性酸素の一種としても知られており、脂質の過酸化作用のほか、タンパク質の変性や DNA の障害も引き起こすことが知られているラジカル

でもある。NO を消去することができれば NO によるメラニン生成をはじめとする様々な作用を制御できると考えられる。野菜などの食品はビタミン C やポリフェノール類、フラボノイド類などの活性酸素を消去する能力を持つ物質を持っている。NO を消去する方法としてこのような物質を利用することが考えられる。

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。生体内抗酸化物質は生体内で様々な要因により発生する活性酸素種を制御することが知られている。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誘導型生体内抗酸化物質で NO をスカベンジすることも報告されている。メラノサイトではメタロチオネインの存在およびその機能の報告はないが、メラノサイトのメタロチオネインの量を増やすことができれば、NO 刺激によるメラニン生成を抑制することができる可能性があると考えた。

本報告では、培養メラノサイトでメタロチオネインの発現と誘導、そして NO 刺激によるメラニン生成の抑制効果について調べた。その結果、メラノサイトでメタロチオネインを増やすことができ、NO 刺激によるメラニン生成の抑制効果を発揮することを示した。しかしながら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メラノソーム内でチロシナーゼ活性を直接阻害するためであることが分かった。

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をメカニズムから明らかにし、さらにメラニン生成を

抑制することを目指した。培養細胞を用いた実験により、紫外線により NO が産生され、その NO によりメラニン生成が上昇するメカニズムを推測し、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、NO をはじめとする様々な刺激によるチロシナーゼ活性の上昇を抑制できることを明らかにした。本研究成果により、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しい方法の 1 つを提案することができた。

謝辞

終わりに本論文の作成に際し、終始懇切丁寧なご指導とご教授を賜りました、京都大学 宮地良樹名誉教授、カネボウ化粧品 打和秀世博士に心から深謝申し上げます。

本論文を完成させるに当たり、多大なご助言を賜りました東京農業大学応用生物科学部 大石祐一教授、服部一夫教授、田中越郎教授、東京工科大学応用生物学部 正木 仁教授に心から御礼申し上げます。

また本研究を進めるにあたり、ご指導、ご助言をいただきました、元京都大学大学院医学研究科 山岡淳一博士、元カネボウ化粧品 堀越俊雄博士に心から感謝いたします。

最後に本研究を通じてご意見、ご助力頂いたすべての皆様方に御礼申し上げます。

Summary

Nitric oxide (NO), originally identified as an endothelium-derived relaxing factor, has been shown to have a variety of physiological activities, including an important role in skin diseases. Erythema induced by ultraviolet B (UVB) is considered to be mediated in part by increased NO generation. Furthermore, NO, a melanogen, has been reported to be involved in UV-induced melanogenesis. These findings imply the involvement of NO production in skin induced by UVB radiation and in UVB-induced pigmentation. However, no study has been presented showing the process of increased NO production nor has it been determined whether NO is an important factor in pigmentation.

The present study demonstrated that UVB radiation increases NO production, and up-regulates brain NO synthase (bNOS) expression at both the mRNA and protein levels, while it directly suppresses the expression of inducible NO synthase (iNOS) mRNA in keratinocytes to some degree. Furthermore, our results suggest that enhancement of tyrosinase gene expression via the cGMP pathway is a primary mechanism for NO-induced melanogenesis in melanocytes.

On the other hand, because NO is a type of reactive oxygen species, an alternate concept is possible, in which an increase in endogenous antioxidants suppresses NO-induced melanogenesis, though there are no known reports. Metallothionein (MT)

functions as an inducible intracellular antioxidant and has been reported to scavenge NO. Although there are no studies showing the existence of MT in or its function with melanocytes, the above findings led us to examine the effects of MT induction to suppress NO-induced melanogenesis.

Our results demonstrated that MT is expressed in melanocytes, and that its induction may be effective to suppress melanogenesis stimulated by NO as well as other melanogens. These suppressive effects may be due to direct inhibition of tyrosinase activity in melanosomes, rather than a scavenging effect of NO.

We also sought to clarify the mechanism and suppression of NO-induced melanogenesis. UVB radiation increased NO production in cultured keratinocytes, suggesting a mechanism for NO-induced melanogenesis in melanocytes. In addition, it was demonstrated that MT induction suppresses melanogenesis stimulated by NO as well as other melanogens. Together, our results suggest a novel method to effectively suppress UV-induced pigmentation in skin.