

1. 研究課題名：ヒト正常メラノサイトの UVA 誘導メラニン産生機構

2. 研究機関：長崎大学アイソトープ総合センター

3. 研究者：松田尚樹

4. 共同研究者：柳瀬 浩（倉敷紡績・技術研究所）

安藤秀哉（サンスター・中央研究所）

堀川美和（長崎大学薬学部・放射線生命科学）

王 立紅（長崎大学薬学部・放射線生命科学）

渡邊正己（長崎大学薬学部・放射線生命科学）

5. 研究期間：平成 9 年～平成 11 年

## 6. 要約

皮膚の黒化 (sun tanning) は、細胞の生理的かつ即時的な UV 応答の一つである。これは表皮のメラノサイト (melanocyte) によるメラニン産生の促進によるもので、UV-melanogenesis と呼ばれているが、その分子機構には不明な点がい。本研究では、ヒト皮膚由来正常メラノサイトに生理的波長域である UV-A を照射し、メラニン産生などの細胞機能の変化、およびそれに関わるシグナル伝達分子について、MAP キナーゼ (MAPKs) に着目して検討した。メラノサイトに UV-A (365nm ; 1000 kJ/m<sup>2</sup>) を照射すると、照射 4 時間後にメラニン生合成に必須の酵素である tyrosinase の mRNA 発現が増加し始め、照射 2 日後には細胞より抽出したメラニン量も増加し、melanization が起こっていることが示された。細胞数には変化が認められなかった。また MAPKs の中では、UVA 照射 15 分後には ERK1/2 が活性化された。この UVA 照射による ERK1/2 活性化は、抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC)、あるいは受容体型チロシンキナーゼ阻害剤である suramine が存在することにより抑制された。以上の結果より、UVA はメラノサイトによるメラニン合成 (UV-melanogenesis) を促進し、そのシグナル伝達機構に、UVA により産生する活性酸素種、および細胞膜の受容体型チロシンキナーゼを介した ERK 経路の活性化が関与していることが示唆された。

## 7. 研究目的

太陽光線中の約 6% を占める紫外線は、その波長によって 3 つの領域に分けられ、それぞれ UVA (320~400nm)、UVB (280~320nm)、UVC (280nm 以下) と呼ばれる。このうち、波長が 290nm 以下の紫外線は上空のオゾン層によって吸収されるので、我々地球上の生物は、UVA 全域と UVB の一部を浴び続けていることになる。UVA は、そのエネルギーの低さから、UVB や UVC と比べて生物作用は小さいと長い間考えられてきたが、最近になり、細胞は UV-A によっても大きなダメージを受けることが明らかになってきた<sup>1,2)</sup>。UVA の代表的な標的組織は皮膚である。皮膚における特徴的な UV 応答として、表皮の基底層に存在するメラノサイト (色素細胞) が UV により活性化され、メラニンを活発に産生して周囲の表皮細胞に分配し (UV-melanogenesis)、皮膚黒化 (sun tanning) を起こすことが知られている。この細胞レベルおよび分子レベルにおける機構については、表皮細胞が UV に対して応答して産生する ET-1 がメラノサイトに作用するという説や<sup>3)</sup>、メラノサ

イトにおける DNA 塩基損傷の結果、切り出された DNA 断片が melanogenesis の引きがねとなる<sup>4)</sup>、などの興味深い考え方が報告されているが、未だに全貌は明らかではない。一方、DNA 損傷には依存しない UV 応答シグナル伝達経路が存在することも明らかになりつつあり、同様の経路がメラノサイトにおいても存在することが予想される。最近、melanogenesis の誘導因子である Steel factor (SF) が、その受容体である c-kit 活性化を起点として、MAPKs のうちの一つである ERK 経路の活性化を介して melanogenesis を誘導することが報告された<sup>5)</sup>。そこで我々は、このシグナル伝達系が UV-melanogenesis においても作動しているのではないかとの仮説を立て、ヒト包皮由来正常メラノサイトの単層培養系に UVA を照射後、melanogenesis およびそれに伴う MAPKs の応答性を調べた。

## 8. 材料と方法

### 8-1. 細胞培養

細胞には白人包皮由来の正常メラノサイト<sup>6)</sup>を用いた。MCDB154 培地 (クラボウ, 大阪) 中で継代培養し、継代数 3 の細胞を実験に供した。

### 8-2. UVA 照射

Semi-confluent に達した細胞を、ウシ脳下垂体抽出物 (BPE)、TPA および FBS を含まない MCDB153 培地で 3 日間培養した後、Vilber Lourmat 社製 UV ランプを用いて 365nm の UV-A を照射した。線量率は 1J/m<sup>2</sup>/sec に設定し、UV-B の混入を防ぐためランプと細胞の間には厚さ 4mm のガラス板を設置した。なお一部の実験では、最終濃度 10 mM の N-acetyl-L-cysteine (NAC, 和光)、あるいは最終濃度 1 mM の suramine (Sigma) を照射 1 時間前に培養液に加えた。

### 8-3. 細胞内メラニンの定量

UV 照射 1、2、3、日後の細胞をトリプシン処理により集め、エタノール-エーテル (1:1) 溶液不溶画分を 10% DMSO-1N NaOH により 80 ° で 15 分加水分解した。得られたメラニンを OD470 で比色定量した<sup>7)</sup>。

### 8-4. tyrosinase mRNA 発現

UV 照射した細胞を 4-48 時間培養した後、常法により total RNA を分離し、さらに Dynabeads Oligo(dT)25 を用いて poly A mRNA を精製した。この mRNA を材料として RT-PCR により tyrosinase mRNA 発現量を調べた。用いたプライマーは、forward 5'-TGC-TCC-TGG-CTG-TTT-TGT-A-3'、reverse 5'-ATG-TGC-AAG-GCA-TTG-TGC-A-3'、標的遺伝子サイズは 1098 bp であった<sup>8)</sup>。

### 8-5. MAPK リン酸化および活性化

MAPK リン酸化は、リン酸化された ERK1/2 あるいは JNK に対する抗体を用いた Western Blot 法により、また活性化は、[<sup>32</sup>P]-ATP (specific activity < 100TBq/mmol,

Amersham Pharmacia Biotech., Tokyo, Japan ) 存在下における、基質のリン酸化反応 (phosphotransfer) により調べた<sup>9)</sup>。

## 9. 結果

### 9-1. UVA 照射後のメラノサイトの細胞数および生存性

TPA および FBS を含まない MCDB153 培地では細胞は増殖を示さず、10~1000 J/m<sup>2</sup> の UVA を照射しても、その細胞数に変化は見られなかった (Fig. 1 左)。また細胞の生存率をトリパンプルー染色により調べたが、UVA 照射による変化は見られなかった (Fig. 1 右)。さらにデータには示さないが、UVA 照射による細胞の形態変化も見られなかった。以上より、10~1000 J/m<sup>2</sup> の UVA は、ヒト正常メラノサイトの増殖性、生存性、および形態には影響をおよぼさないことが示された。

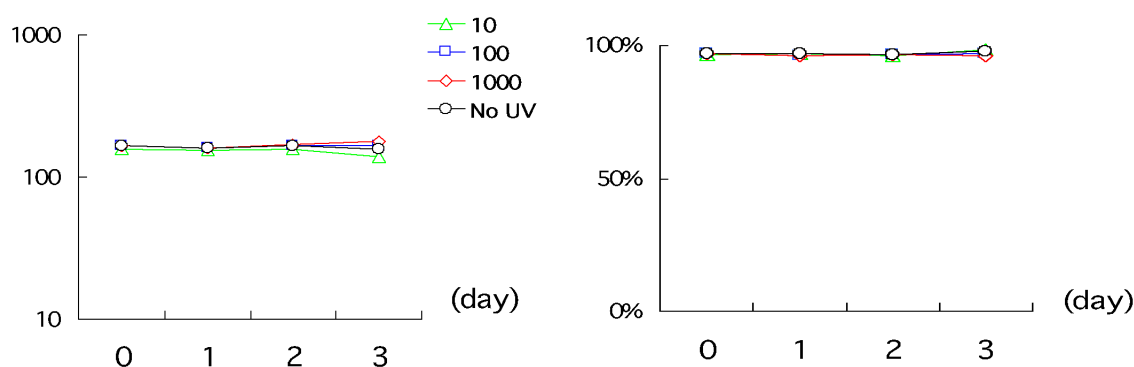


Fig.1 種々の線量の UVA 照射後の細胞数 (左) および生存率 (右)

### 9-2. UVA 照射によるメラニン産生

用いたメラノサイトは BPE、TPA および FBS を含まない MCDB153 培地で自発的にメラニンを産生し、測定開始 2 日後には約 1.5 倍にメラニン量が増加していた。一方、UV-A を照射した細胞では、1000 J/m<sup>2</sup> においても、照射 2 日後にメラニン量の一過性の増加が認められた (Fig. 2)。

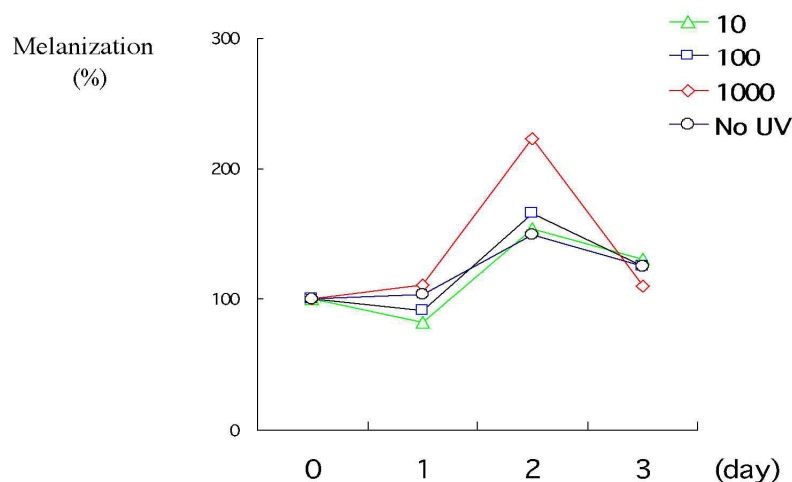


Fig.2 UVA 照射後の細胞内メラニン量の変化

### 9-3 . UVA 照射による tyrosinase mRNA の発現

Tyrosinase はメラニン生合成において必須の酵素である。この tyrosinase の mRNA 発現を RT-PCR で調べた。その結果、tyrosinase mRNA は  $1000 \text{ J/m}^2$  の UVA 照射 4 時間より増加し、それ以後も高いレベルを保った (Fig. 3)。またこの応答は線量依存的であった (Fig. 4)。したがって、UVA は tyrosinase の遺伝子発現レベルで melanogenesis を誘導している可能性が示された。

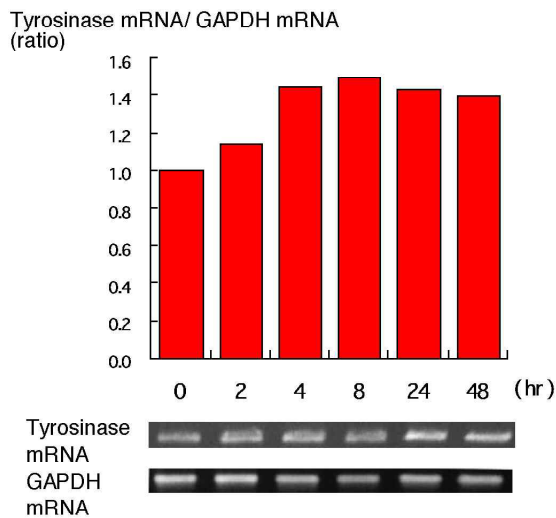


Fig.3 UVA ( $1000 \text{ kJ/m}^2$ )照射後の tyrosinase mRNA 発現

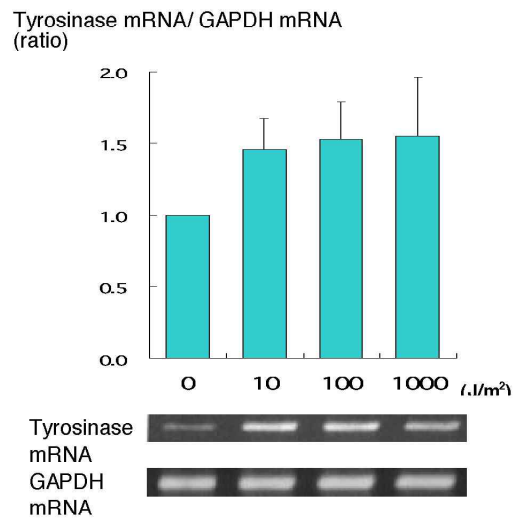


Fig.4 UVA 照射 12 時間後の tyrosinase mRNA 発現

### 9-4 . UVA 照射による MAPKs のリン酸化および活性化

ERK1/2 は UVA 照射 30 分後に活性化した。Fig. 5 に示すように、 $10\text{--}100 \text{ J/m}^2$  においては約 1.5 倍、 $1000 \text{ J/m}^2$  では 3 倍の活性化が見られた。この ERK1/2 活性化は、抗酸化剤である NAC ( $10 \text{ mM}$ )、あるいは受容体型チロシンキナーゼ阻害剤である suramine

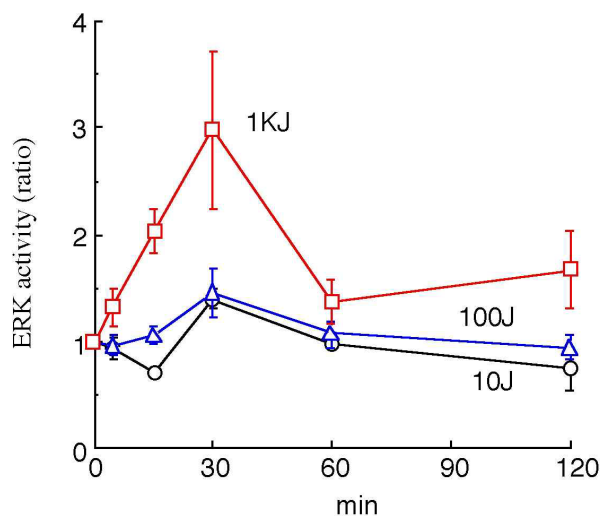


Fig.5 種々の線量の UVA 照射による ERK1/2 の活性変化

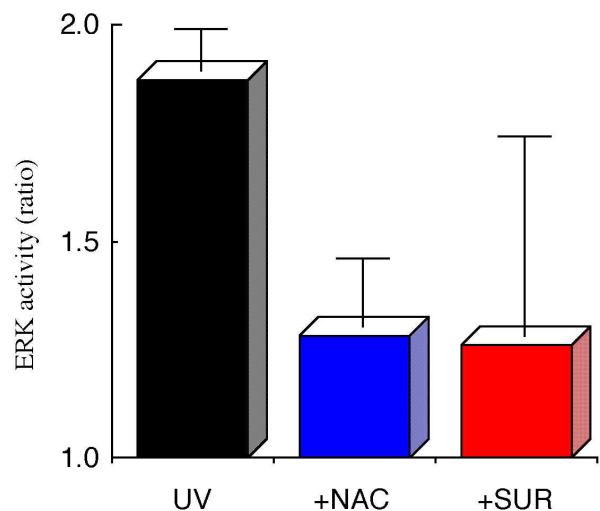


Fig.6 UVA 照射 30 分後における ERK1/2 の活性の NAC および suramine による抑制

(1mM) 存在下では 50%以上の抑制を受けた (Fig. 6)。また、これらの阻害は ERK1/2 のリン酸化のレベルにおいても確認された (Fig. 7)。

なおデータには示さないが、JNK は UVA 照射によって活性化、リン酸化ともに認められなかった。

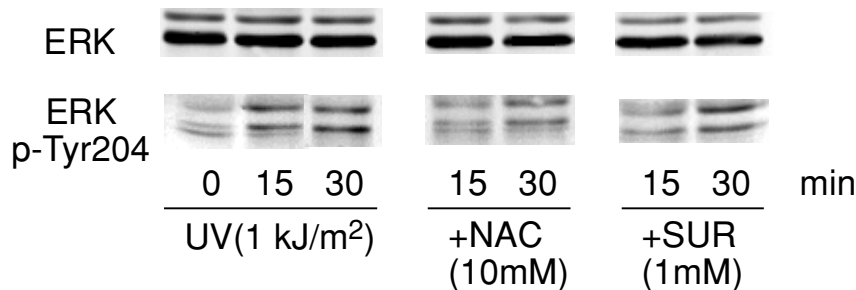


Fig.7 UVA 照射後の ERK1/2 のリン酸化

## 10. 考察

今回の我々の結果は、UVA がヒト正常メラノサイトの melanogenesis を tyrosinase 遺伝子の発現レベルで調節すること、そしてそのシグナル伝達に ERK が関与し、上流には活性酸素種および受容体型チロシンキナーゼが存在する可能性を示唆する。過去にも UVB による melanogenesis に関しては報告があるが<sup>3,10</sup>、UVA に関しては今回の結果が初めてのものである。

Melanogenesis の分子機構については、細胞膜に存在する受容体型チロシンキナーゼの一つである c-Kit の活性化が起点となって ERK 活性化が生じ、次に転写因子 MITF (microphthalmia associated transcription) が ERK によりリン酸化され、co-factor である p300/CBP が特異的に結合した結果、MITF が活性化し tyrosinase 遺伝子発現が起こるといふ系が知られている<sup>5,11</sup>。UV が表皮細胞によるエンドセリン-1 (ET-1) や  $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) などの二次因子産生を介して melanogenesis を促進するという考え方もあるが、その場合にも二次因子によるメラノサイト内のシグナルは、PKC や PKA を介して MITF の遺伝子発現を調節していることが示唆されている<sup>12,13</sup>。したがって、誘導因子に関わらず、最終的には MITF が melanogenesis の最終調節を担っている可能性が高い。今回の結果より、UVA は ERK1/2 の活性化を介して、この MITF による melanogenesis の調節に作用したのではないかと考えられる。

ERK1/2 の上流の分子については、今回は活性酸素種および受容体型チロシンキナーゼの関与を示唆した。この両者は UVB、UVC の場合にも初期の応答分子として知られている。特に活性酸素種に関しては、UVA の場合は特に多く産生され、さらに活性酸素集の中でも一重項酸素が多いことが特徴とされている<sup>1,2</sup>。この一重項酸素が JNK 経路活性化や転写因子 AP-1 活性化に対して寄与していることがヒト皮膚線維芽細胞<sup>14</sup> や表皮細胞<sup>15</sup> において報告されている。我々の結果では JNK 活性化は見られなかったが、用いた抗酸化剤である NAC は、すべての活性酸素種を阻害するため、ERK1/2 活性化がこの一重項抗酸素によるものかど

うかは不明である。一方の受容体型チロシンキナーゼも、増殖因子による ERK 経路活性化の上流に位置するもので、c-Kit もその一種である。UVA が直接 c-Kit を活性化することが証明できれば、MITF につながる以後の経路は、c-Kit リガンドによるものと全く同じということになる。

UVA-melanogenesis の機構、特にメラノサイト内のシグナル伝達機構は、未だ殆ど解明されていない。本研究の結果は、他の細胞種や他のストレスに対しても応答する MAPKs などのシグナル分子が、UVA-melanogenesis においても共通の言語として関与していることを強く示唆する。

## 11. 今後の展開

UV-melanogenesis の分子機構に関しては MITF 活性化の検討が鍵となる。また、より生理的な環境を反映するために、表皮細胞との混合培養系の利用も意味があろう。

UV から我々の身体を守るために、UVA や UVB を化学的に吸収する、もしくは物理的に散乱させることにより紫外線防御作用を持った化粧品、いわゆるサンスクリーン剤がある。これらを「外から守るサンスクリーン」とすると、紫外線を浴びる細胞のストレス応答機構を修飾し、紫外線の有害な作用を低減する、いわば「内から守るサンスクリーン」が、今後必要となってくるものと思われる。UV-melanogenesis に関与する応答分子群および信号伝達経路は、「内から守るサンスクリーン」を見い出す一つの突破口と考えられる。UV 応答機構をターゲットとした評価系の確立によって、紫外線による日焼けや種々のストレスにより生じる色素沈着を効果的に予防、あるいは治療する薬物が見いだされることが期待される。さらに同様な手法により、紫外線による皮膚の炎症や発がん、皮膚の老化を防止するのに有効な薬物の提案が可能となるかもしれない。

## 12. 参考文献

- 1) J. Cadet, M. Berger, T. Douki, B. Morin, S. Raoul, J.-L. Ravanat and S. Spinelli: Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage, *Biol. Chem.*, 378, 1275-1286 (1997)
- 2) S. Grether-Beck, R. Buettner and J. Krutmann: Ultraviolet A radiation-induced expression of human genes: molecular and photobiological mechanisms, *Biol. Chem.*, 378, 1231-1236 (1997)
- 3) G. Imokawa, T. Kobayashi, M. Miyagishi, K. Higashi and Y. Yada: The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis, *Pigment. Cee Res.*, 10, 218-228 (1997)
- 4) M. S. Eller, K. Ostrom and B. A. Gilchrest: DNA damage enhances melanogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 93, 1087-1092 (1996)
- 5) T. J. Hemesath, E. R. Price, C. Takemoto, T. Badalian and D. E. Fisher: MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signaling in melanocytes, *Nature*, 391, 298-301 (1998)

- 6) H. Yanase, H. Torishima and R. Yamamoto: The effects of calcium and magnesium ions on the proliferation of normal human epidermal melanocytes, *Pigment. Cell Res.*, 10, 150-152 (1997)
- 7) H. Ando, A. Itoh, Y. Mishima and M. Ichihashi: Correlation between the number of melanosomes, tyrosinase mRNA levels, and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cells in response to various melanogenesis regulatory agents, *J. Cell. Physiol.*, 163, 608-614 (1995)
- 8) M. Nakajima, I. Shinoda, Y. Fukuwatari and H. Hayasawa: Arbutin increases the pigmentation of cultured human melanocytes through mechanisms other than the induction of tyrosinase activity, *Pigment Cell Res.*, 11, 12-17 (1998)
- 9) N. Matsuda, N. Morita, K. Matsuda and M. Watanabe: Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia, and mechanical stress in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 350-354 (1998)
- 10) S. Im, O. Moro, F. Peng, E. E. Medrano, J. Cornelius, G. Babcock, J. J. Nordlund and Z. A. Abdel-Malek: Activation of the cyclic AMP pathway by  $\alpha$ -melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation, *Cancer Res.*, 58, 47-54 (1998)
- 11) E. R. Price, H.-F. Ding, T. Badalian, S. Bhattacharya, C. Takemoto, T.-P. Yao, T. J. Hemesath and D. E. Fisher: Lineage-specific signaling in melanocytes, *J. Biol. Chem.*, 273, 17983-17986 (1998)
- 12) C. Bertolotto, P. Abbe, T. J. Hemesath, K. Belle, D. E. Fisher, J. P. Ortonne and R. Ballotti: Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes, *J. Mol. Med.*, 74, 589-607 (1996)
- 13) G. Imokawa, Y. Yada and M. Kimura: Signaling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes, *Biochem. J.*, 314, 305-312 (1998)
- 14) L-O. Klotz, K. Briviba and H. Sies: Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts, *FEBS Letters*, 408, 289-291 (1997)
- 15) M. Djavaheri-Mergny, J-L. Mergny, F. Bertrand, R. Santus, C. Maziere, L. Dubertret and J-C. Maziere: Ultraviolet-A induces activation of AP-1 un cultured human keratinocytes, *FEBS letters*, 384, 92-96 (1996)

### 13 . 研究業績

13-1 . 原著論文   なし

### 13-2 . 総説など

- 1) 松田尚樹: 太陽光を浴びて肌が黒くなる機構 — ストレス生物学の観点から, 環境と

健康, 12, 115-122 (1999)

- 2) H. Yanase, H. Ando and N. Matsuda: Melanogenesis mechanism in cultured normal human melanocytes by UVA-irradiation, *Photomed. Photobiol.*, submitted.

#### 13-3 . 国際学会発表

- 1) H. Yanase, H. Ando and N. Matsuda: Possible Involvement of MAPK Activation in the UVA-Induced Melanogenesis in Cultured Normal Human Melanocytes, The 17<sup>th</sup> International Pigment Cell Conference, October 30 – November 3, 1999, Nagoya.

#### 13-4 . 国内学会発表

- 1) 松田尚樹, 柳瀬 浩, 安藤秀哉, 渡邊正己: ヒト正常メラノサイトの UV ストレス応答性, 日本放射線影響学会第 41 回大会, 平成 10 年 12 月 2 日–4 日, 長崎.
- 2) 柳瀬 浩, 安藤秀哉, 松田尚樹: ヒト正常メラノサイトの UV ストレス応答性, 第 13 回日本色素細胞学会年次学術大会, 平成 10 年 12 月 5 日–6 日, 神戸.
- 3) 柳瀬 浩, 安藤秀哉, 松田尚樹: UVA 照射による培養ヒト表皮メラノサイトのメラニン合成機構, 第 21 回日本光医学・光生物学会, 平成 11 年 8 月 6 日–7 日, 金沢.

#### 13-5 . 新聞など なし

#### 13-6 . 特許 なし

#### 14 .

- (1) Melanogenesis mechanism in cultured normal human melanocytes by UVA-irradiation
- (2) Nagasaki University Radioisotope Center
- (3) Naoki Matsuda
- (4) Hiroshi Yanase (Technical Research Laboratory, Kurabo Industries Ltd.)  
Hideya Ando (Central Research Institute, Sunstar Inc.)  
Miwa Horikawa (Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences)  
Li-Hong Wang (Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences)  
Masami Watanabe (Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences)

(5) 1997 – 1999

(6) Abstract

The UV-induced melanogenesis is one of the physiological and essential events in human skin in response to sunlight. However, the cellular and molecular mechanisms involved in UV-melanogenesis in normal melanocytes remain unclear. We report here the responsiveness of normal human epidermal melanocytes (NHEM) derived from neonatal foreskin to the UVA radiation in vitro, in terms of cell proliferation, melanogenesis and activation of mitogen activated protein kinases (MAPKs). The proliferation of NHEM was



not affected by 10 to 1000 J/m<sup>2</sup> of UVA irradiation whereas the melanin contents in the cells was increased. The expression of tyrosinase mRNA was also increased 4 hr after UVA irradiation. Among MAPKs, UVA-induced phosphorylation and activation of extracellular signal-related kinase 1/2 (ERK1/2) was observed in 30 min after UVA irradiation. This ERK1/2 activation was inhibited by the pretreatment of cells with an antioxidant or a receptor tyrosine kinase inhibitor. These findings suggested that melanogenesis, but not proliferation, of NHEM was promoted by UVA irradiation through the mechanisms involving ERK activation. Furthermore, UVA-generated reactive oxygen species and UVA-activated receptor tyrosine kinases may act as upstream molecules of ERK.