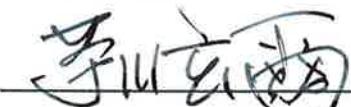


委託研究報告書

テーマ名： アスタキサンチンの色素細胞内メラニン合成シグナルへの影響とヒト色素形成3次元モデルでの色素沈着抑制効果に関する研究

- 委託研究依頼者：
株式会社ルバンシュ 社長 千田和弘
- 報告書作成責任者：
東京工科大学応用生物学部
教授・医学博士・芋川玄爾

平成21年8月25日

印

ルバンシュ社委託研究最終報告書

研究課題

アスタキサンチンの色素細胞内メラニン合成シグナルへの影響とヒト色素形成
3次元モデルでの色素沈着抑制効果に関する研究

東京工科大・応用生物学部
教授・医学博士 芋川玄爾

研究背景

UVB照射による色素沈着や老人性色素斑における色素増強は表皮細胞で発現増強したエンドセリン-1 (ET-1) やシステムセルファクター (SCF) が表皮メラノサイトに働きそれぞれエンドセリンB受容体 (ETBR) や c-KIT 受容体への結合を介した細胞内シグナル伝達経路の活性化により、色素細胞の主要転写因子である *Microphthalmia associated transcription factor*(MITF) のリン酸化や蛋白発現増強が引き起こされ、メラニン合成に関するチロシナーゼ酵素、チロシナーゼ関連蛋白ー1、2、メラノソームマトリックス蛋白の Pmel17 さらには ETBR などの遺伝子・蛋白発現増加を促し、最終的にメラノソームにおけるメラニン合成が促進され、表皮色素沈着の増加を引き起こしていることが明らかとなっている。したがって UVB 誘導色素沈着や老人性色素斑に対する有効な美白剤としては、ET-1 や SCF により引き起こされる細胞内シグナル伝達経路の抑制物質がその有力な候補物質になりえる。このような細胞内シグナル伝達経路の抑制物質が実際の UVB 誘導色素沈着や老人性色素斑に有効であることはすでに我々が報告している。

一方、ET-1 や SCF 刺激による活性化する細胞内情報伝達経路の代表格は MAPkinase 経路で、ERK1/2 のリン酸化すなわち MAPK の活性化によって引き起こされる MITF のリン酸化および RSK(p90 Ribosomal Kinase:MAPK ファミリーの一つ) の活性化や cAMP レベルの上昇を介した PKA の活性化による MITF の遺伝子・蛋白発現増加に結びつく転写因子 cAMP-responsive binding protein(CREB) のリン酸化である。従来これらのシグナル伝達経路の活性化の評価は正常ヒトメラノサイトを用いる研究が主流であったが、我々の研究室でヒト *Acral Lentigo Malignant Melanoma* 由来の細胞株(ALM メラノーマ細胞)が他のヒトメラノーマ細胞に比べて、SCF や ET-1 刺激に対するメラニン合成関連蛋白遺伝子発現の反応様式がヒトメラノサイトにきわめて類似していることを見出し、維持管理やコストの面で問題のあるヒトメラノサイトに変えて ALM メラノーマ細胞が、これらのシグナル抑制剤の評価をする細胞として優れていることが判明している。

近年 ET-1 や SCF のヒトメラノサイトの活性化を引き起こす主な細胞内情報伝達経路である MAPK 系は細胞内のレドックス状態の乱れに感受性が強く、細胞内レドックスバランスは細胞内の酸化状態と還元状態のバランスを反映しており、酸化状態を促進する因子としては活性酸素種があり、還元状態を維持する生体内の因子は還元型のグルタチオンが挙げられる。すなわち抗酸化剤は従来の活性酸素種の除去に加えて、このレドックスバランスを調整し還元状態に誘導することにより MAPK の活性化を抑制する効果が期待できる。

本委託研究では MAPK 系の活性化 Ligand の代表である SCF 刺激で ALM メラノーマ細胞で引き起こされる ERK1/2, MITF 及び CREB のリン酸化へのアスタキサンチンの抑制効果を評価し、美白剤としての可能性を最初に検討した。さらに表皮の色素沈着への効果を実証するため、SCF の添加により表皮の色素沈着促進が確認されている 3 次元ヒト

表皮モデルを用いて、本色素沈着増強へのアスタキサンチンの抑制効果を調べた。

実験方法

1. 細胞培養

A L Mメラノーマ細胞は 10% F C S 含有のイーグルMEM培地を用いてファルコン75 培養フラスコで継代し、必要に応じて細胞を増やし、10cm シャーレを用いてシグナル伝達の試験を行った。

2. Western blotting 法

E T - 1 及び S C F はそれぞれ 10nM 濃度で添加し、生薬エキスは提供サンプルを 1000 倍希釈で E T - 1 / S C F 添加の 3 時間前に添加した。E T - 1 / S C F 添加後 15 分で細胞を採取し、リン酸化 ERK1/2, ERK1/2, リン酸化 CREB, CREB、beta-actin に対する抗体を用いて Western blotting を行った。

使用抗体と希釈倍率は以下のとおりで行った。

・1 次抗体

- ① Phospho-ERK (Cell Signaling Technology) 2000 倍希釈 (Canget Signal1 で希釈)
- ② ERK (Cell Signaling Technology) 5000 倍希釈 (Canget Signal1 で希釈)
- ③ Phospho-CREB (Cell Signaling Technology) 1000 倍希釈 (Canget Signal1 で希釈)
- ④ CREB (Cell Signaling Technology) 1000 倍希釈 (Canget Signal1 で希釈)
- ⑤ β-actin (Sigma) 5000 倍希釈 (Canget Signal1 で希釈)
- ⑥ MITF (Sant Cruz) 100 倍希釈 (Canget Signal1 で希釈)

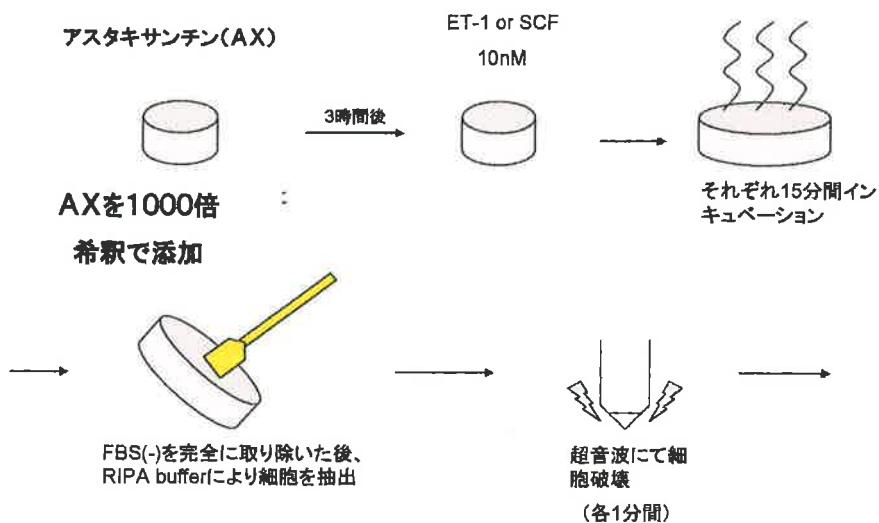
・2 次抗体

- ① ECL Anti-Rabbit IgG (GE ヘルスケア) 100000 倍希釈 (Canget Signal2 で希釈)
- ② ECL Anti-Rabbit IgG (GE ヘルスケア) 10000 倍希釈 (Canget Signal2 で希釈)
- ③ ECL Anti-Rabbit IgG (GE ヘルスケア) 5000 倍希釈 (Canget Signal2 で希釈)
- ④ ECL Anti-Mouse IgG (GE ヘルスケア) 50000 倍希釈 (Canget Signal2 で希釈)
- ⑤ ECL Anti-Mouse IgG (GE ヘルスケア) 20000 倍希釈 (Canget Signal2 で希釈)

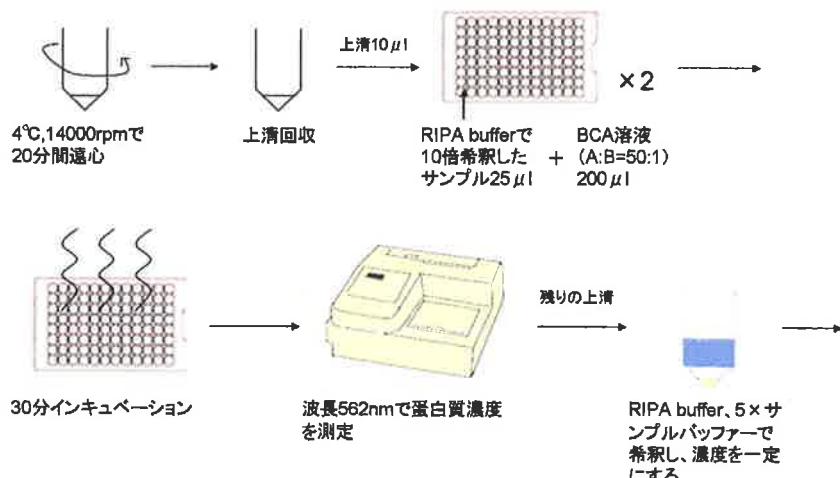
③ECL Anti-Mouse IgG (GE ヘルスケア) 10000倍希釈 (Canget Signal2
で希釈)

また Western Blotting 解析の一連の流れは図一 1 A - D に詳説した。

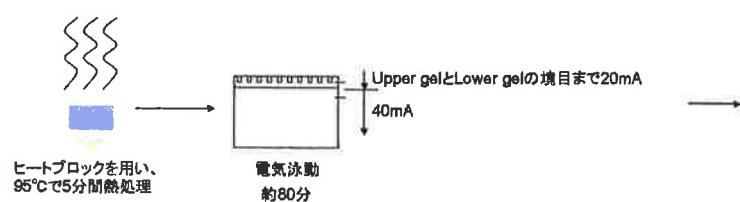
図一 1 A



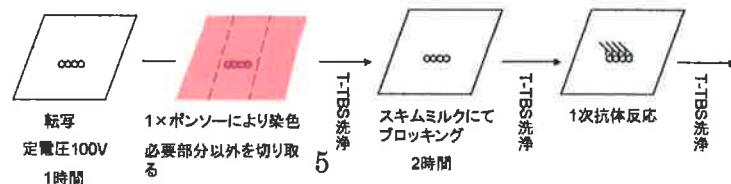
図一 1 B

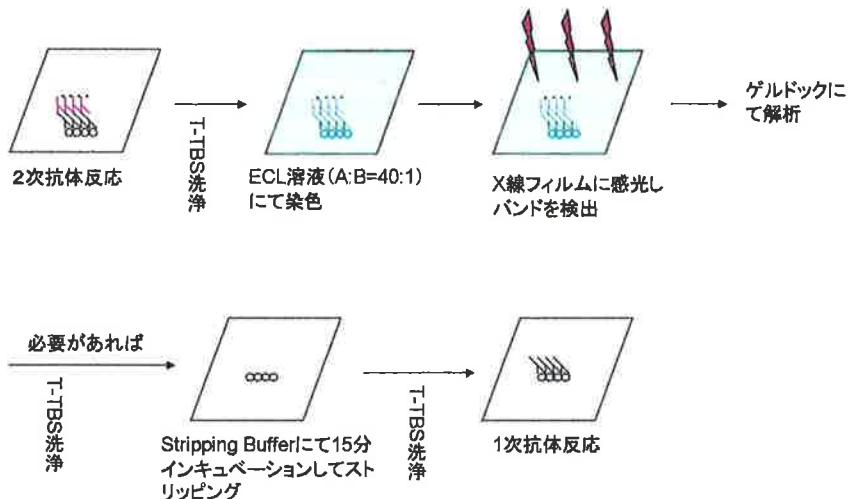


図一 1 C



図一 1 D

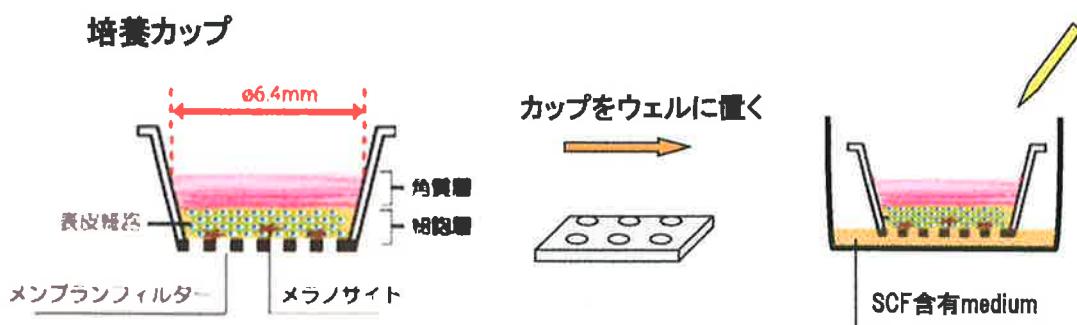




3. 3次元表皮モデル色素沈着実験

3次元ヒト表皮モデルとしては J-TEC 社の LabCyte MELANO-MODEL を用いた。本3次元ヒト表皮モデルは図一2の如く、ヒト正常表皮細胞とヒト正常表皮メラノサイトを共培養し、重層化させたヒト3次元培養表皮モデルである。形態的にヒト皮膚に類似した構造をしており、組織は基底層・有棘層・顆粒層・角質層を有している。

図一2：LabCyte MELANO-MODEL の構造



本実験ではアスタキサンチンの効果を最大限に活かすために最初に Control medium (J-TEC LCMM24-090105-A) とアスタキサンチンを添加した。その日を-1日目とし、翌

日の SCF 含有 medium (特注品) とアスタキサンチンを添加した日からを 0 日目し、14 日間の培養を開始した。Medium 交換は 2 日に 1 度、計 7 回行った。

3. 1 Control medium による培養 (-1 日目)

ウォーターバスで温めた Control medium とアスタキサンチン (DMSO 溶液を 1000 倍希釈) を 12 ウェルアッセイプレートの各ウェルに分注した。寒天培地で固定されている培養カップをピンセットで取り出し、先程の 12 ウェルアッセイプレートの各ウェルに移した。その後、CO₂ インキベーターにて保存した。本実験ではアスタキサンチン濃度に対し 4 ウェル/4 個の培養カップを使用し、それぞれ測定した。

3. 2 SCF 含有 medium による培養 (0 日目)

遠沈管にウォーターバスで温めた SCF 含有 medium とアスタキサンチン (DMSO 溶液を 1000 倍希釈) を入れ調製した。各ウェルに入った Control medium を表皮モデル組織に気を付けながらアスピレーターで取り除き、調製した SCF 含有 medium をウェル上に分注した。

3. 3 写真撮影

Medium 交換を行った後、照明器具 (フジクロームビューアー5000) を用いてデジタルカメラで表皮モデル組織における色素沈着が促進・抑制されているかを撮影した。写真撮影は 1 個の培養カップの上からカメラを固定し撮影した。

3. 4 Medium 交換 (2 日目～14 日目)

2 日に 1 度、上記と同様の操作を行い、Medium 交換をした。14 日目には下記に述べる操作を行った。

3. 5 HE 染色・FM 染色による観察

14 日目にアスタキサンチン 1 濃度に対して 4 個の培養カップのうち 1 個の培養カップから表皮モデル組織とメンブレンをメスで切り抜き、4 % パラホルムアルデヒド溶液 (5. 5 参照) を入れたスピツガラス管に入れて HE 染色・FM 染色を行い顕微鏡にて観察・撮影を行った。

3. 6 ユウメラニン量の定量

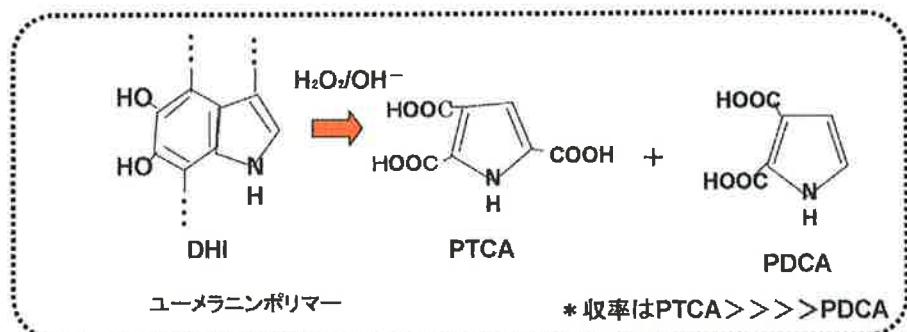
ユウメラニンの定量法の原理を図-3 に示す。

図一3 :

HPLCによるユーメラニンの定量

ユーメラニン

ユーメラニンユニット構成物質であるDHIから過酸化水素酸化反応によって生成されるpyrrole-2,3,5 tricarboxylic acid(PTCA)を定量することにより、ユーメラニン量を知ることができる。



3.6.1. メラニン定量のサンプル作製

14日目にアスタキサンチン濃度に対して4個の培養カップのうち3個の培養カップから表皮モデル組織とメンブレンをマスで切り抜き、Mediumの入っていない12ウェルアッセイプレートにそれぞれ入れた。(メラニン定量を行うまでの間-20°Cで保存可)

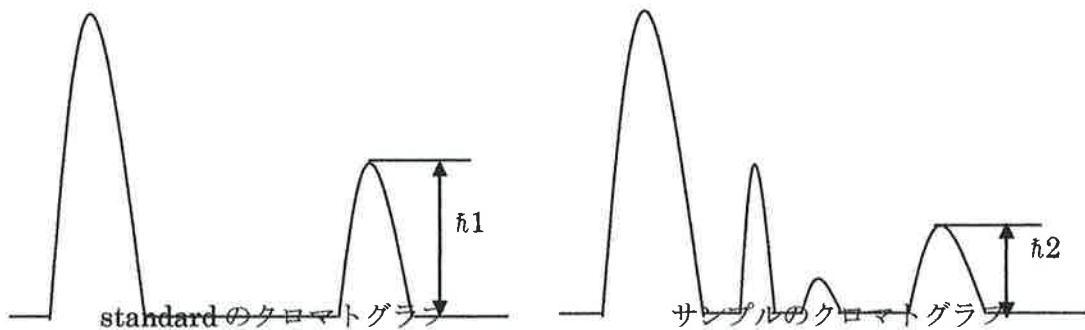
表皮モデル組織を計量し、エッペンチューブに入れた。100mg/mlになるように純水で希釈をし、1分間のホモジネイトを行った。1M-K₂CO₃ (5.5参照) 375μlとH₂O₂ (Wako TSE1733) 25μl加え、室温を25°Cにして20時間激しく攪拌した。その後、10%Na₂SO₃ (5.5参照) 50μlと6M HCl (Wako PEH5839) を加え、10000rpm 1min遠心し、上清を回収した。(-20°Cで保存可) 回収したサンプルをHPLCにて測定を行った。

3.6.2 HPLCによるメラニン定量

HPLC機器の電源を入れ、流路確保のため配線を確認したらメタノール：水=1：1に調製した溶液をセットし、ポンプ内気泡の除去を行った。その後、機器の流路内の置換操作として10分ほど溶液を流してからカラムを装着した。KPBバッファー (5.5参照)：メタノール=99：1に調製した溶液が吸光度269nmで安定するまで流す。安定したらシリジに気泡が入らないようにサンプルを取り、サンプルループに分注し測定した。

3.6.3 PTCA量算出方法

HPLCによって測定したPTCA量は次の式にて算出した。Standardのピークの高さを1とし、サンプルのピークの高さを2とした。あとは下記のように10μgあたりのPTCA量を求めた。



h_1 値 : h_2 値 = standard の ATPC 濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) : サンプル濃度 X ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

4. Real-time RT-PCR 法による遺伝子発現量の解析

図-4にReal-time RT-PCR法の原理を示した。

図-4 : Real-Time RT-PCR 法の原理

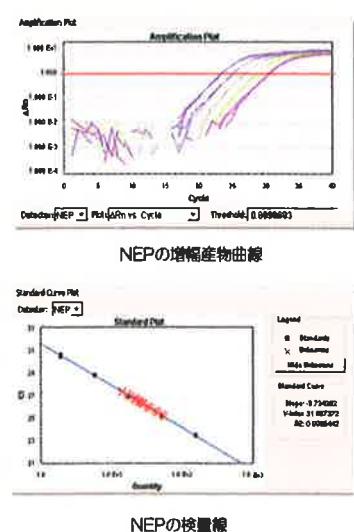
リアルタイムPCR原理

リアルタイムPCR法はPCR法による遺伝子増幅量をリアルタイムでモニターして解析する方法であり、電気泳動が不要で迅速性と定量性に優れた方法

・ SYBR Green(*)による検量線法

濃度の判明しているコントロールサンプルの cDNAを3倍希釈していく、5系列作成します。これを3点づつと濃度不明なサンプルでリアルタイムPCRを行います。スタンダードから検量線を作成し、これに当てはめる事でPCR産物量を相対定量した。これを内在性コントロール GAPDHで割った値を用いてグラフを作成した。

(*)SYBR Greenとは2本鎖DNAに結合することで蛍光を発する 試薬です



NEPの検量線

4-1. mRNA 単離

- シャーレに Buffer RLT を $350\mu l$ 入れ、セルスクレーパーで細胞を残らずかきとり、サンプルを eppendorf Tube に入れ eppendorf Tube に 70%エタノール $350\mu l$ を入れ、ピペッティングをした。さらに一サンプルにつき、20秒間以上ボルテックスしサンプルを 2ml Collection Tube にある RNeasy column に入れ、蓋を静かに閉め、15000rpm で 1min で高速遠心、下にたまつた液を捨て、Column に Buffer RW1 を $700\mu l$ 加え、静かに蓋を閉め、15000rpm で 1min 遠心し、Collection Tube ごと捨てる。新しい 2ml Collection Tube に RNeasy column を移し、Buffer RPE $500\mu l$ を RNeasy column に注入し静かに蓋を閉め 15000rpm で 1min 遠心し、RNeasy column にもう一度 Buffer RPE $500\mu l$ を入れ静かに蓋を閉め、15000rpm で 3min 遠心して、RNeasy silica-gel membrane を乾かし RNeasy column を新しい 1.5ml Collection Tube に移し、RNeasy silica-gel membrane の上に直接 RNase free water を $40\mu l$ 注入し、3 分間待った後、静かに蓋を閉め 15000rpm で 3 分間遠心した。RNA 回収。（-80°C冷凍保存）

4-2. RNA 濃度測定

分光光度計で RNA を定量した。

RNA サンプル $7\mu l$ +蒸留水 $693\mu l$ (100 倍希釈)

石英セルに検体をよくピペッティングして入れた。

● 設定

Pathlength 10nm→Units $\mu g/\mu l$ →320nm Correction Yes→Scan Option Off→Dilution Factor 100

- 測定用セルの外側の汚れをキムワイプで拭き、溶媒（水）を規定量入れ、吸光度の読みをゼロにセットした。セルを取り出し溶媒を捨て水気をよく切り、希釈した RNA 溶液を入れた。飼料に余裕があればセルを少量のサンプルとともに洗いする。毎回水で洗わないほうが良い。水がキュベットに残っているほうが、試料が残っているよりも測定値への影響が大きい。UV280nm で吸光度を測定複数のサンプルがある場合、濃度の見当がついている場合、薄いほうから測定する。溶解性が減少した RNA の OD280 は、1.6 以下なので目安となる。(OD280 はタンパク質の吸収波長)OD の読み×40×100=濃度($\mu g/ml$)である。DNA の場合は×50。OD の読みは 2 以下にした(2 以下だと正確に測れない)。

● 希釈

Concentrations の量の一番少ない株にあわせて、 $8\mu l$ の容量で、同じ RNA 量になるように DEPC 水で希釈した。 $300ng/\mu l$ (または $100ng/\mu l$)になるように DEPC 水で希釈した。

サンプルは使用まで−20°C保存した。

4-3. 逆転写反応

- RNA の変性

- ・ サンプル RNA を 65°Cで 5 分間インキュベートし、氷上で急冷した。

この処理を行うことで、高次構造をとりやすい RNA に対する逆転写効率が向上する場合がある。この処理を行う際は、5x RT Buffer や酵素液は添加しなかった。

- 反応液の調整

Nuclease-free Water	4 μ l
5x RT Buffer	4 μ l
RT Enzyme Mix	1 μ l
Primer Mix	1 μ l
RNA サンプル	10 μ l
	計 20 μ l

- 逆転写反応

37°Cで 15 分インキュベートし、逆転写反応を行い、98°Cで 5 分間インキュベートし、酵素失活反応を行った。反応終了後、4°Cまたは−20°Cで保存した。

- ・ この温度条件はキットの組成に最適化された条件となっており、温度条件の変更は、酵素活性以外にも、プライマーのアニーリング効率や、RNA 除去効率、逆転写反応後の酵素失活効率などに大きく影響を与える。
- ・ 逆転写反応液のリアルタイム PCR 反応液への添加量は、最大で 20%程度とする。多量の添加は PCR の反応効率を低下させ、正確な定量が行えないことがある。
- ・ 遺伝子特異的プライマーを用いる場合、特に同一の配列を持つ逆転写プライマーと PCR プライマーを使用する場合は、逆転写時の非特異的アニーリングが PCR における非特異的増幅産物を生じさせる原因となることがある。その際は逆転写反応温度を高温（42–50°C程度）にすることで改善される。

4-4. Real-Time PCR

Real-Time PCR 溶液

Power SYBR Green PCR Master Mix(ABI)	12.5 μ l
DPEC 水	10 μ l
10 μ M Primer F	0.75 μ l
10 μ M Primer R	0.75 μ l

1.5ml チューブに個数分の PCR 溶液を調整して、8 連チューブに 24 μ l ずつ分注した。これに合成した cDNA を 1 μ l 分注し、Applied Biosystems 7900HT にて Real-Time PCR を

行った。また表一に使用したプライマーのシークエンスを記載した。

表1 使用プライマーリスト

GAPDH	<ul style="list-style-type: none">5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'(Forward)5'-GTCCTTCCACGATACCAAAGTTG-3' (Reverse)
Tyrosinase	<ul style="list-style-type: none">5'-CCTCAAAGCAGCATGCACAAT-3'(Forward)5'-GACGACACAGCAAGCTACAAG-3'(Reverse)
MITF (Microphtalmia associated transcription factor)	<ul style="list-style-type: none">5'-TCCGTCTCTCACTGGATTGGTG-3'(Forward)5'-CGTGAATGTGTGTTCATGCCTGG-3'(Reverse)
TRP-1 (Tyrosinase related protein-1)	<ul style="list-style-type: none">5'-TCATCTATT CCTGAATGGAACAGG-3'(Forward)5'-AATGAGTGCAACCAGTAACAAAGC-3'(Reverse)
ETBR (Endothelin B receptor)	<ul style="list-style-type: none">5'-CGAGCTGTTGCTTCTGGAGTAG-3'(Forward)5'-CATTAAAGCAATCTGCATGCAC-3'(Reverse)
c-KIT	<ul style="list-style-type: none">5'-GCTGAGCTTTCTTACCAAGGTGG-3'(Forward)5'-TATGTCATACATTCAGCAGGTGC-3'(Reverse)
Pmel17	<ul style="list-style-type: none">5'-TCTGGGCTGAGCATTGGG-3'(Forward)5'-AGACAGTCACTCCATGGTGTGTG-3'(Reverse)

● 検量線の作成

RNA 濃度の判明しているコントロールサンプル(今回は、UVB 未照射培地添加 0 時間後)を cDNA に合成し、RNfree 水にて 2 倍希釈していき、5 段階の cDNA を作成した。このサンプルを N=3 でそれぞれの primer を用いて Real-Time PCR を行った。得られた Ct 値より GAPDH・チロシナーゼ・TRP-1・TRP-2・エンドセリン B 受容体 (ETBR)、c -KIT, Pmel17 の計 7 本の検量線を作成した。

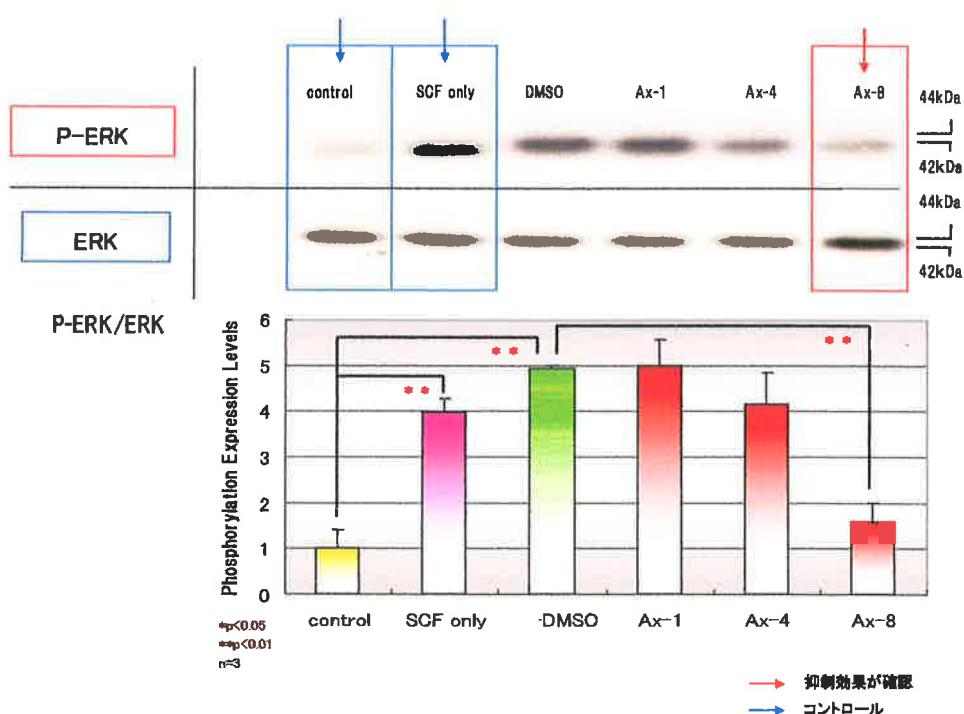
実験結果

1. アスタキサンチンのSCF刺激シグナルへの効果

1-1. SCF刺激ERKリン酸化に対するアスタキサンチンの効果

アスタキサンチン【DMSO液】を1000倍希釀で最終濃度1, 4, 8 μMで前処理し、3時間後にSCF 10nMを添加したのち15min後でのERKリン酸化に対する効果を調べた結果を図-5に示す。アスタキサンチンの8 μM濃度での添加により有意な【1%以下】ERKのリン酸化の抑制効果が認められた。

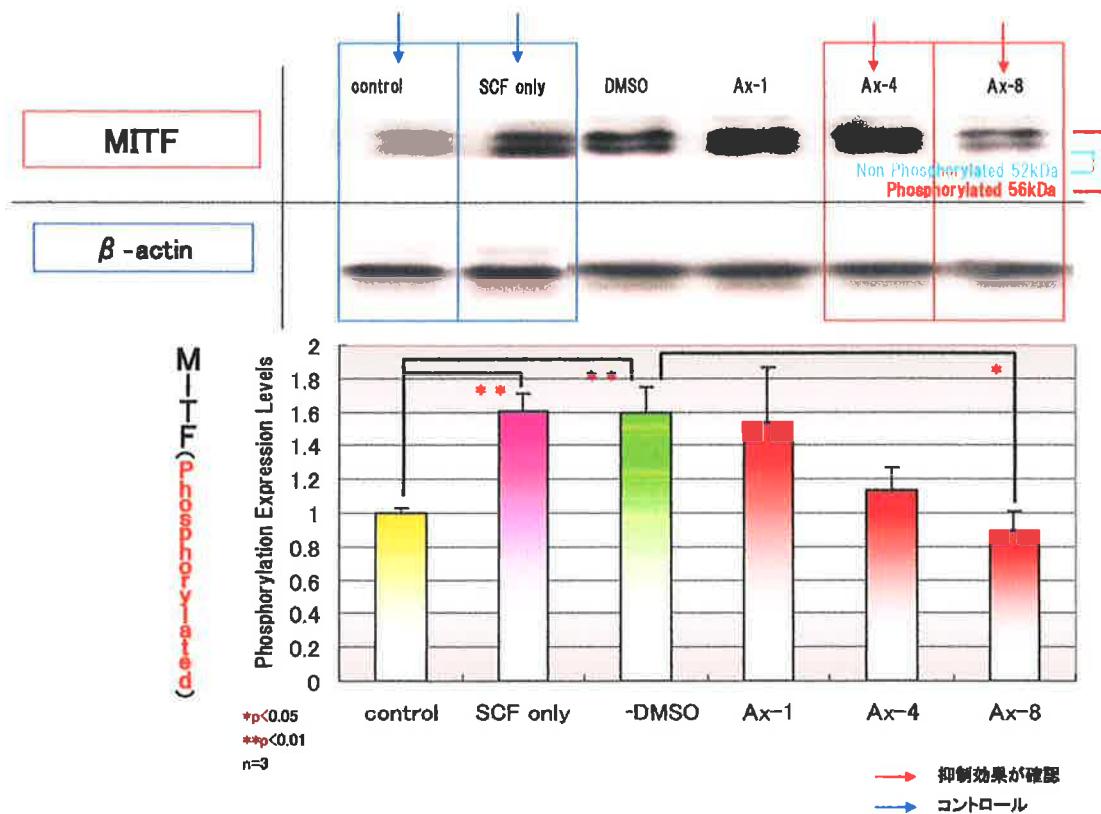
図-5：SCF刺激ERKリン酸化に対するアスタキサンチンの効果



1-2. SCF刺激MITFリン酸化に対するアスタキサンチンの効果

アスタキサンチンを1000倍希釀で最終濃度1, 4, 8 μMで前処理し、3時間後にSCF 10nMを添加したのち15min後でのMITFのリン酸化に対する効果を調べた結果を図-6に示す。アスタキサンチンの8 μM濃度での添加により有意な(5%以下) MITFのリン酸化(56kDaバンド)の抑制効果が認められた。

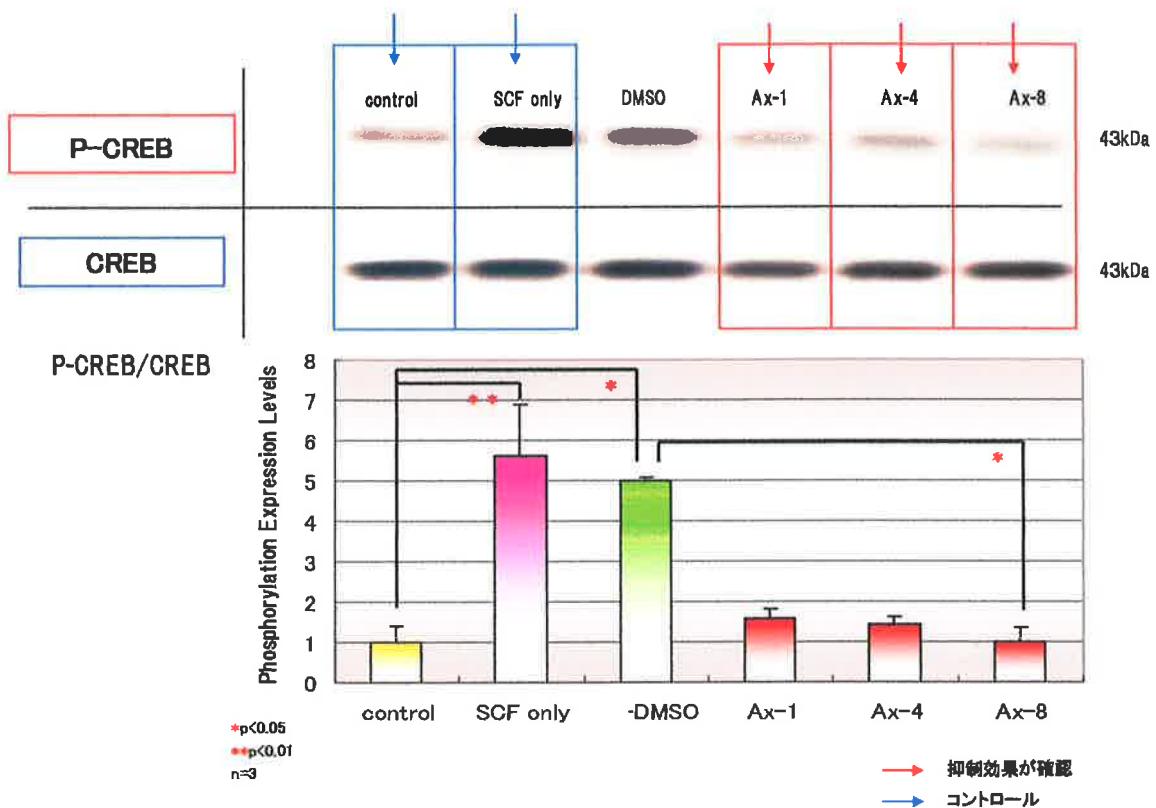
図一6：SCF刺激 MITF リン酸化に対するアスタキサンチンの効果



1-3. SCF刺激CREBリン酸化に対するアスタキサンチンの効果

アスタキサンチンを1000倍希釈で最終濃度1, 4, 8 μM で前処理し、3時間後にSCF 10nMを添加したのち15 min後でのCREBリン酸化に対する効果を調べた結果を図一7に示す。アスタキサンチンの8 μM 濃度での添加により有意な【1%以下】CREBのリン酸化の抑制効果が認められた。

図－7：SCF刺激CREBリン酸化に対するアスタキサンチンの効果

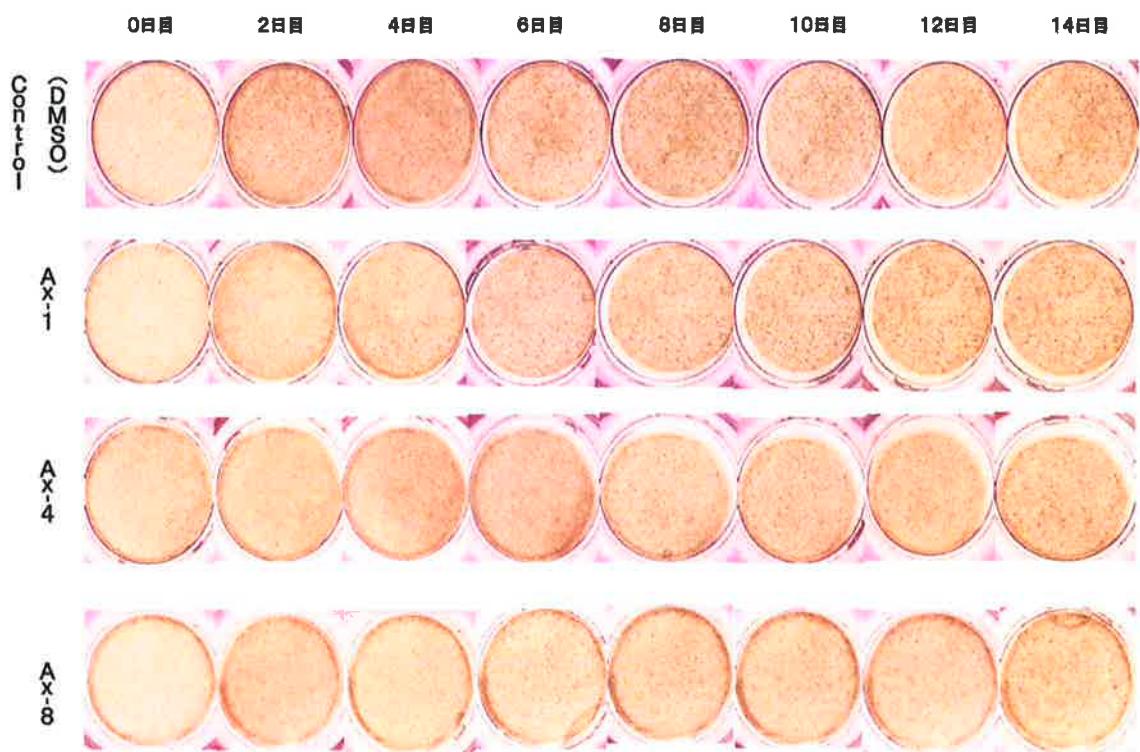


2. 3次元ヒト表皮モデルでのSCF刺激色素沈着に対する効果

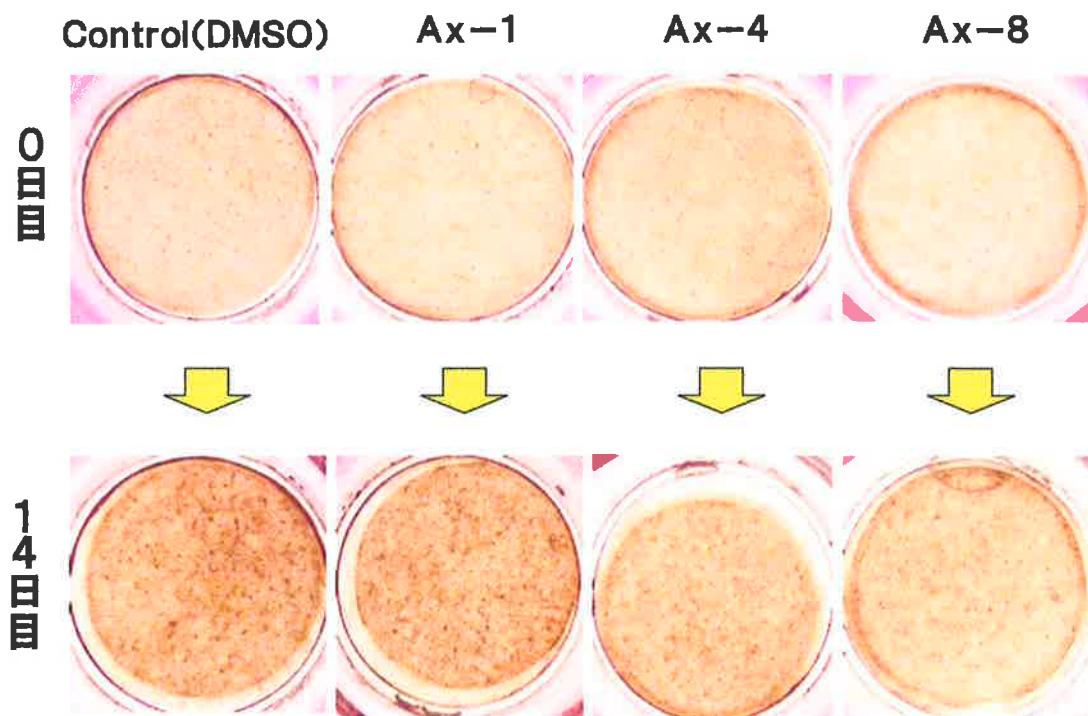
2-1. 色素沈着の観察

Melano-ModelにSCFを10nM濃度で添加し2週間培養し色素沈着の形成を観察した結果を図－8に示す。SCF添加培養開始数日後から色素沈着が生じ、14日目までには明瞭な色素沈着が誘導された。アスタキサンチンを1, 4, 8 uM濃度でSCF添加の24時間前に添加し、14日間培養したMelano-Modelでは1 uM濃度では無添加との差は認められないが、4 uM濃度ではわずかに、8uM濃度では明瞭な色素沈着抑制効果が認められた。図－9は0日と14日目での色素沈着の形成を拡大写真で比較した結果で、アスタキサンチンの4と8 uM濃度添加で無添加コントロールと比べて明瞭な色素沈着の減少効果が示されている。

図一8：SCF 刺激色素沈着に対する効果



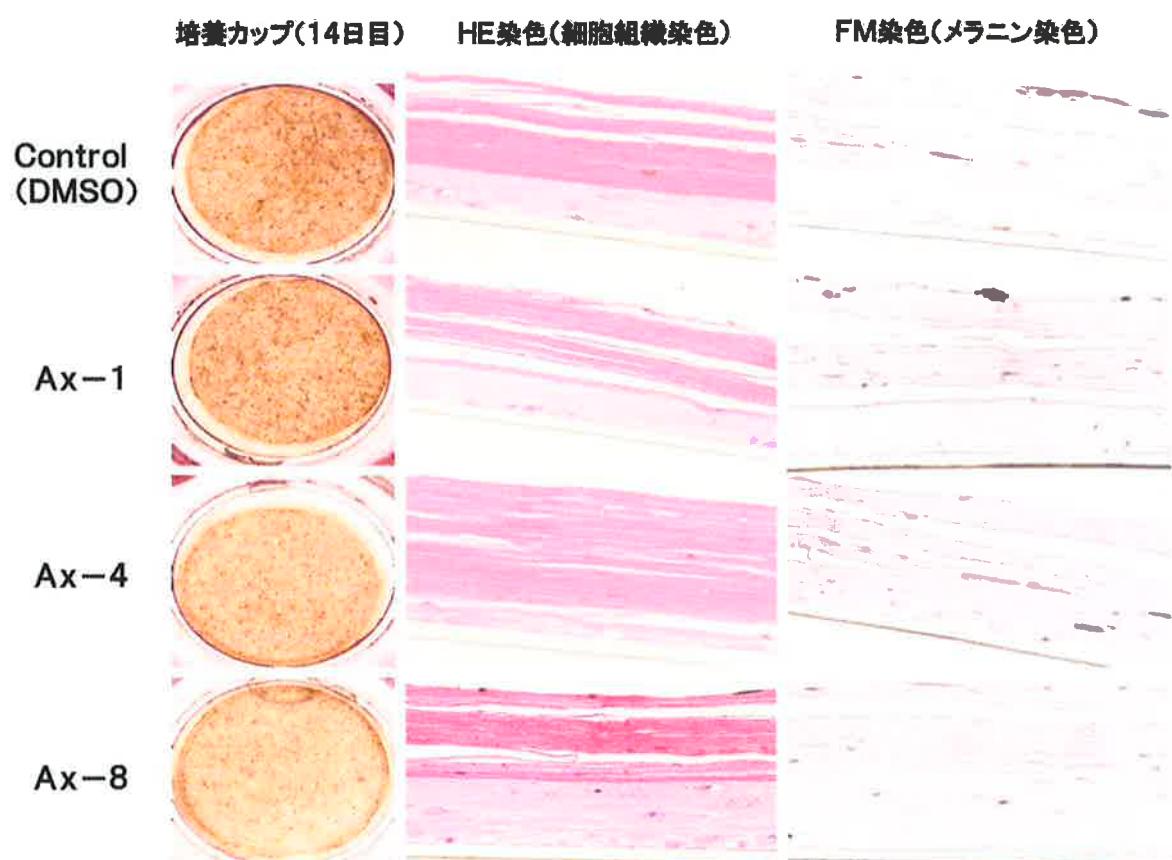
図一9：14日目でのSCF刺激色素沈着に対する効果



2-2. ヘマトキシリン・エオジン及びフォンタナマッソン染色による観察

図一10に培養14日目におけるヘマトキシリン・エオジン及びフォンタナマッソン染色による顕微鏡観察の結果を示した。ヘマトキシリン・エオジン染色像ではアスタキサンチンの添加ではいずれの濃度でも表皮組織の損傷は認められず、アスタキサンチンによる細胞毒性はまったく認められない結果であった。フォンタナマッソン染色像では無添加コントロールでは角層及び表皮でのメラニン顆粒の沈着が明瞭に認められるのに対してアスタキサンチン1uM濃度添加ではコントロールとほとんど変わらない程度のメラニン顆粒の沈着が見られたが、4uMではわずかに少ない、また8uMでは明瞭に少ないメラニン顆粒の沈着が認められた。

図一10：ヘマトキシリン・エオジン及びフォンタナマッソン染色による観察

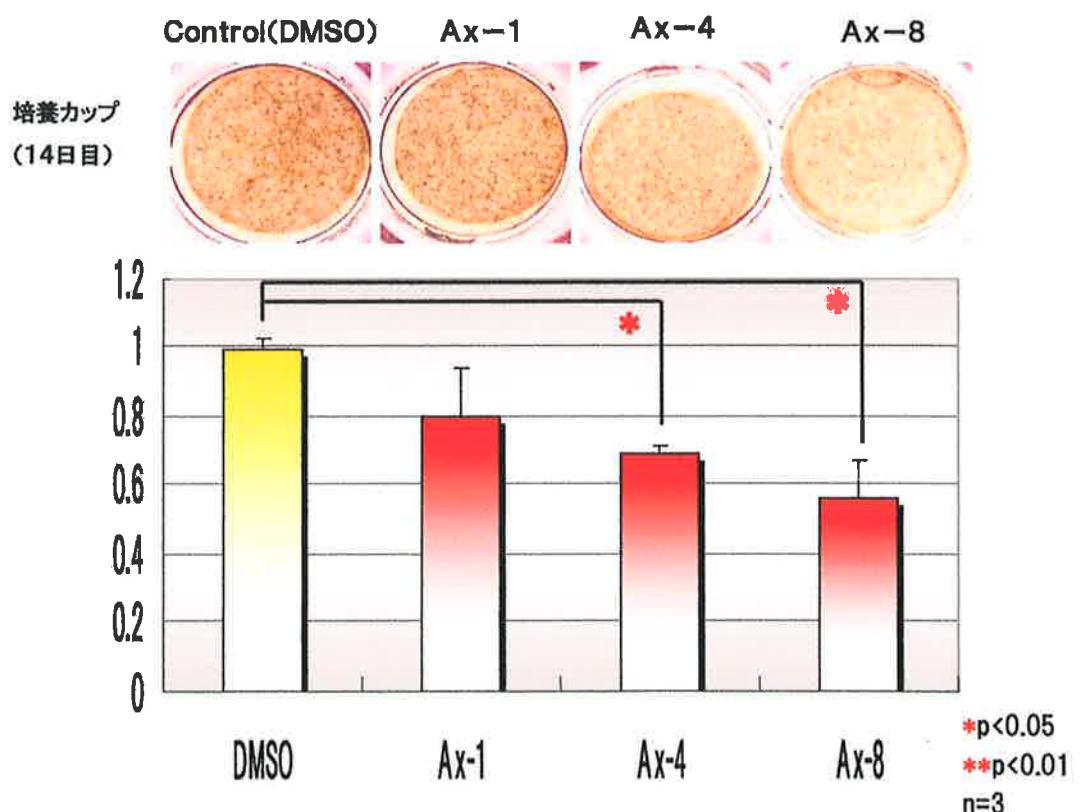


]

2-3. ユウメラニン (PTCA) の定量結果

HPTLCにより表皮組織中のユウメラニン (PTCA) の含有量を測定した結果 (図一11)、組織中の PTCA 量は色素沈着が明瞭に形成されている 14 日目での無添加 Control に比較して AX 添加 4 と 8 uM 濃度での PTCA 量の有意な低下が認められ、AX 4, 8uM 濃度でのメラニン量の有意な低減効果が確認された。

図一11：ユウメラニン（PTCA）の定量結果

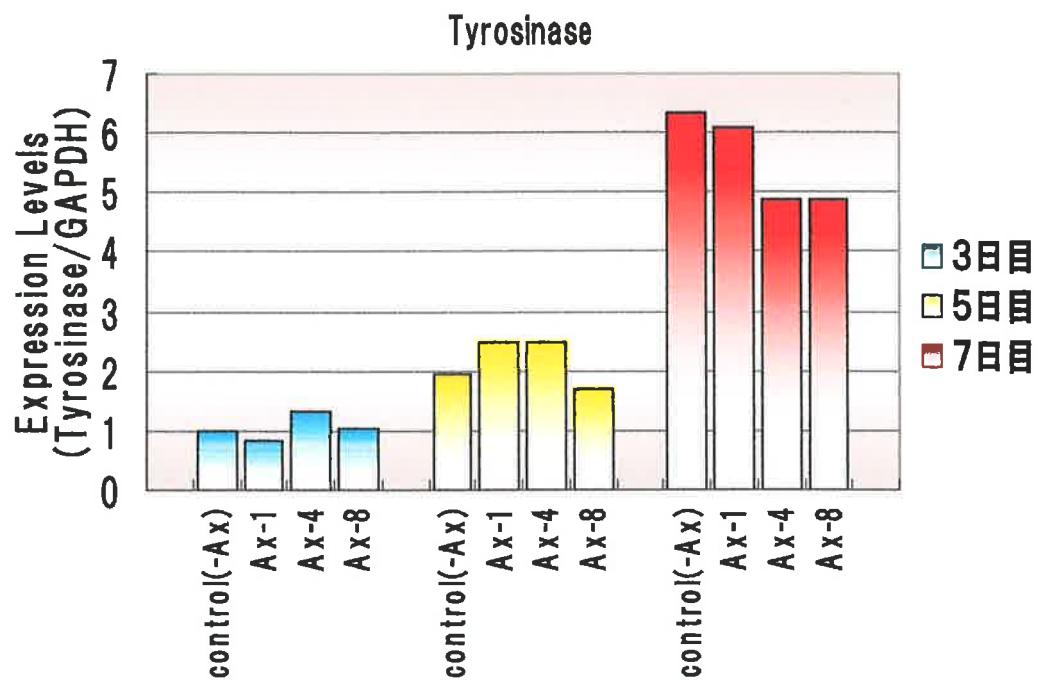


3. Real-time RT-PCRによるメラニン合成関連蛋白遺伝子の解析

3-1. チロシナーゼ遺伝子の解析

コントロール【無添加】でのチロシナーゼの mRNA 発現は培養 3, 5, 7 日と徐々に増加し培養 7 日目において AX 4 と 8 uM 濃度の添加で明瞭な低下傾向を認めた（図一12）。

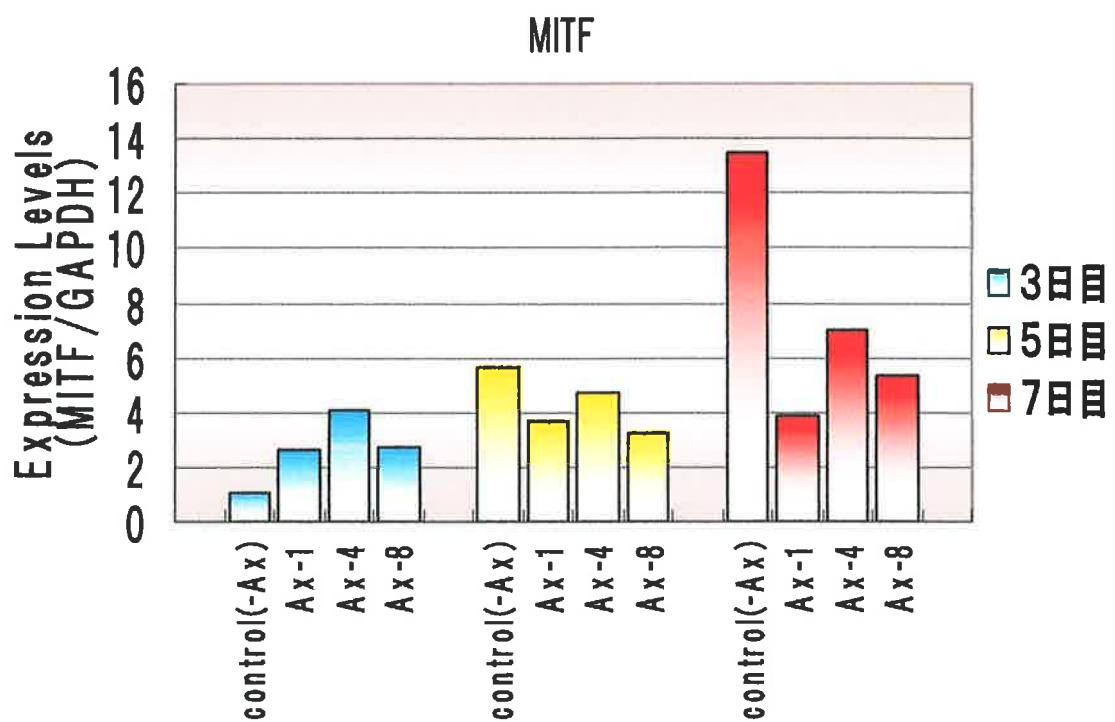
図－1 2 : Real-time RT-PCRによるチロシナーゼ遺伝子の解析



3－2. MITF 遺伝子の解析

コントロール【無添加】でのMITFのmRNA発現は培養3, 5, 7日と徐々に増加し培養7日目においてAX1、4と8 uM濃度の添加で明瞭な低下傾向を認めた(図－1 3)。

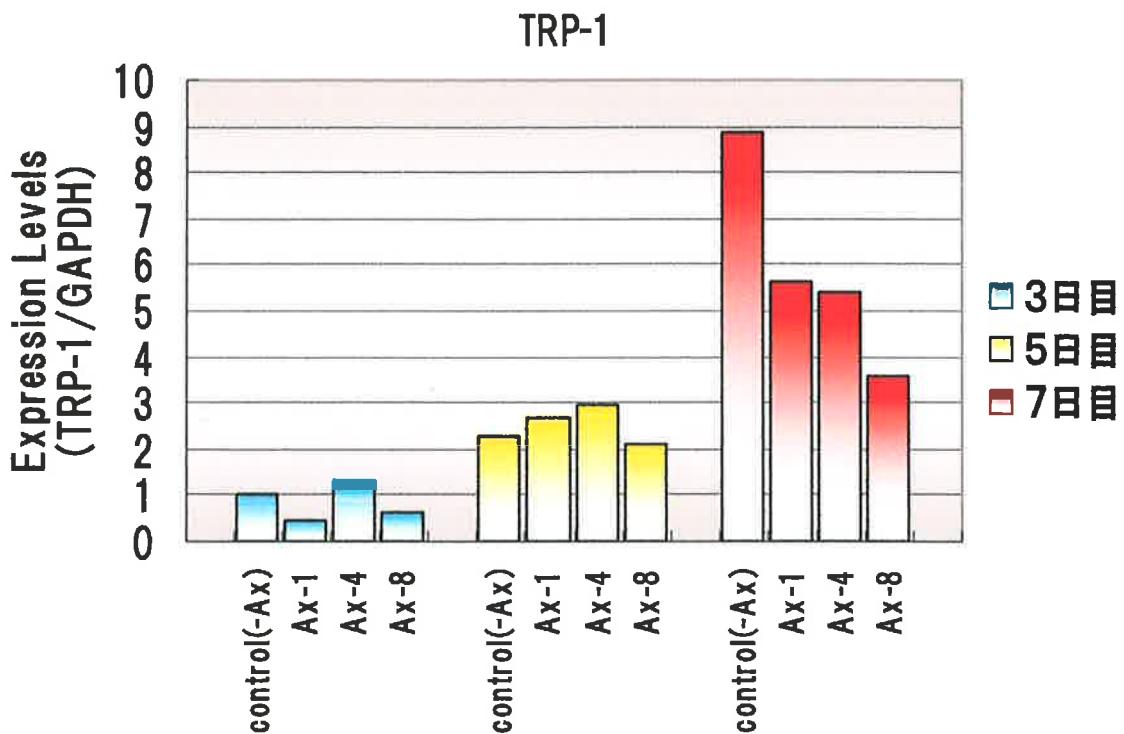
図－1 3 : Real-time RT-PCR による M I T F -M 遺伝子の解析



3-3. TRP-1 遺伝子の解析

コントロール【無添加】でのTRP-1のmRNA発現は培養3, 5, 7日と徐々に増加し培養7日目においてAX1、4と8uM濃度の添加で明瞭な低下傾向を認めた(図-1 4)。

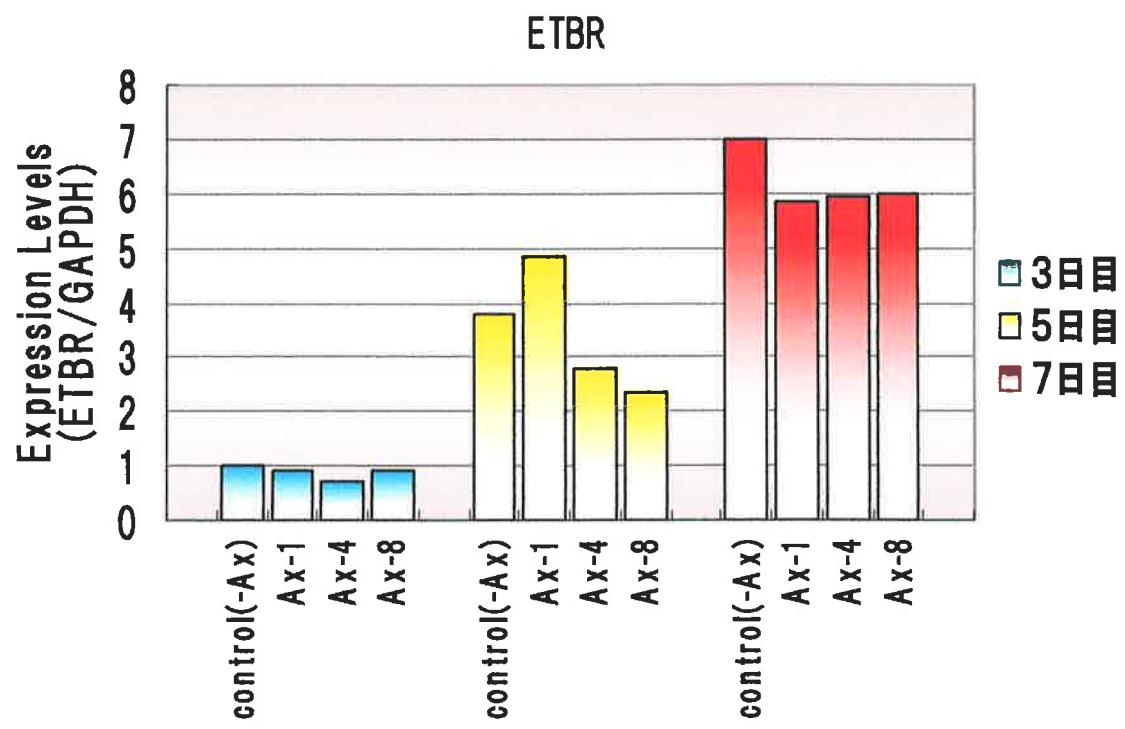
図一14：Real-time RT-PCRによるTRP-1遺伝子の解析



3-4. ETBR遺伝子の解析

コントロール【無添加】でのETBRのmRNA発現は培養3, 5, 7日と徐々に増加し培養5日目においてAX 4と8 uM濃度の添加で明瞭な低下傾向を、また7日目において1、4と8 uM濃度の添加でわずかな低下傾向を認めた（図一15）。

図—15 : Real-time RT-PCRによるETBR遺伝子の解析



考察

ALM メラノーマ細胞のステムセルファクター (SCF) の 10 nM 濃度での刺激により引き起こされる細胞内情報伝達リン酸化酵素 ERK、及び転写因子 MITF 及び CREB のリン酸化反応に対するアスタキサンチンの効果を調べた結果、ERK、CREB および MITF のリン酸化反応に対しては、アスタキサンチン 8uM 濃度で有意なリン酸化抑制反応が観察された。SCF シグナルの経路としては ERK のリン酸化による MAPK の活性化の結果 MITF のリン酸化を引き起こし、また MAPK の活性化に伴う RSK の活性化を介して CREB のリン酸化も生じるので、これらシグナル分子のリン酸化に対するアスタキサンチンの抑制効果は ERK のリン酸化の抑制が MITF 及び CREB 両方のリン酸化の抑制につながっている可能性が高いが、アスタキサンチン以外の物質での同様なリン酸化の抑制効果を調べた結果では ERK と MITF のリン酸化は同様に阻害されるが CREB のリン酸化は阻害されない例も認められるので、それぞれのシグナル分子のリン酸化反応へ直接働いて抑制している可能性も否定できない。またリン酸化分子の減少がかならずしもリン酸化の阻害よりもむしろ、リン酸分解酵素（ fosfotáze ）へのアスタキサンチンの活性化作用による可能性も除外できない。一般にこれらのfosfotáze は活性サイトにシスティンが存在し、酸化状態では活性が低下し、還元状態では活性が亢進する性質を持っているので、アスタキサンチンが fosfotáze の環境を還元状態にすることによる fosfotáze 活性の亢進の可能性は充分に考えられる。

メラニサイト系細胞で SCF の刺激により引き起こされる細胞内情報伝達系の活性化のアスタキサンチン添加による抑制が、実際の色素沈着の場であり、ケラチノサイトとメラノサイトの混成組織である表皮でも、同様に発揮され、これがメラノサイト内のメラニン合成酵素であるチロシナーゼや TRP-1,2、メラノソームマトリックス蛋白である Pmel17 さらにはエンドセリン-1 の受容体であるエンドセリンB受容体などのメラニン合成関連蛋白の遺伝子発現の抑制につながり、最終的には表皮における色素沈着の低減につながるかどうかを検証することは重要な視点である。この視点から今回行った SCF 刺激で生じるヒト表皮 3 次元モデルでの色素沈着形成へのアスタキサンチンの添加で認められた色素沈着の写真観察およびメラニン定量での有意で明瞭な色素沈着形成への抑制効果は、メラノサイト系細胞培養でのアスタキサンチンのメラニン合成系につながるシグナル伝達系の活性化の抑制がこのヒト表皮 3 次元モデルでのメラノサイトにおいても同様に発揮され、最終的な色素沈着形成の減弱に結びついていることを示している。この ALM 細胞培養系での SCF 刺激メラニン合成系シグナルの活性化の抑制効果がヒト表皮 3 次元モデルでの SCF 刺激色素沈着形成の減弱効果

に結びついている証拠としては、メラニン合成系シグナル系の抑制が帰趣するメラニン合成関連蛋白（チロシナーゼ、TRP-1, ETBR, Pmel17）の遺伝子発現増強の抑制効果がヒト表皮3次元モデルでの遺伝子解析で認められていることである。またこれらの遺伝子発現すべてに関与する主要な転写因子である MITF の遺伝子発現も明瞭に抑制されていることから、MITF 蛋白の産生増強が抑制された結果、これらのメラニン合成関連蛋白の遺伝子発現も抑制され、相当するメラニン合成関連蛋白の産生増強も抑制されることから、メラニン合成の促進が阻害され、色素沈着形成の減少につながってきているものと考えられる。唯一メラノーマ細胞培養系とヒト表皮3次元モデルの違いはメラノーマ細胞系でのメラニン合成シグナルのSCFでの活性化の抑制は最終的にはメラニン顆粒の形成及びメラニン顆粒上でのメラニン重合の抑制までは同一線上に存在するが、その成熟メラニン顆粒がメラノサイトの樹枝上突起からケラチノサイトに貪食受容体 PAR-2 を介してメラニン顆粒を取り込む過程の存在である。すなわち SCF はメラノサイトを活性化するのみならずケラチノサイトの貪食受容体 PAR-2 の機能を活性化させる作用も有していることも容易に推察される。

アスタキサンチンはマクロファージ細胞で LPS 刺激により引き起こされる COX-2 の発現や PGE2 の分泌抑制を引き起こし、このメカニズムとして LPS 刺激により生じた活性酸素種が引き金となり NFkB コンプレックスの ikB のリン酸化を促進する結果 NFkB の活性化を引き起こす過程の ikB kinase 活性を抑制することにより、NFkB の活性化を阻害するメカニズムが提唱されている。しかしながらこれらの実験ではアスタキサンチンは LPS 处理前に添加されており、LPS 刺激により生じた活性酸素種に直接働き、これらを消去するより、活性酸素種により引き起こされている NFkB を含むシグナル分子の活性化が阻害されている可能性も充分に考えられる。我々の SCF 添加系では活性酸素種を生じる系ではないこと、また真皮フィbroblast に UVA を照射した系や表皮ケラチノサイトに UVB を照射した系でも照射直後に添加したアスタキサンチンが紫外線照射直後に生じる活性酸素種を引き金としておきるシグナル伝達経路の活性化を阻害して種々の紫外線照射で誘導される遺伝子発現を抑制する事例からも、活性酸素種の直接除去以外にも、シグナル伝達の主要な酵素であるリン酸化酵素の酸化還元バランスを調整することにより、阻害作用が発揮されて可能性が示唆される。

結語

アスタキサンチンはSM2-1細胞のSCF刺激により生じるMAP系シグナル伝達経路を抑制し、その下流のシグナルでありMITFの転写因子でもあるCREBのリン酸化およびチロシナーゼの転写因子でもあるMITFFのリン酸化を8uMの低い濃度で有意に抑制し、またMAP系シグナル伝達系の活性化により引き起こされるMelano-Modelでの色素沈着増強にもメラニン合成関連遺伝子の有意な低下を伴い、明瞭な阻害効果を示したことから、SCFの関与する色素沈着症(UVB色素沈着や老人性色素斑)への色素沈着低減効果を有する可能性が示唆された。

まとめ

【目的】我々はすでに紫外線照射直後のアスタキサンチン(AX)の添加でもヒトフィブロblastのマトリックスプロテアーゼの発現増強を抑制できることから活性酸素種(ROS)の除去作用以外にもAXはROSで活性化された細胞内シグナル伝達経路の途中を阻害している可能性を報告した。また最近MAPキナーゼ系の活性化には細胞内のRedoxバランスが重要であることが報告されていることから、本シグナル系の代表的リガンドであるステムセルファクター(SCF)刺激ヒトメラノーマ細胞でのシグナル伝達(蛋白リン酸化反応)への効果及びSCF刺激により3次元ヒト表皮モデルで誘導される色素沈着への効果を解析し、AXの強力な美白剤の候補物質としての可能性を検証した。

【方法】ALMヒトメラノーマ細胞(SM2-1細胞)にSCF(10nM)を添加し15分後のERK, CREBおよびMITFのリン酸化反応への、AX(1—8uM)のSCF添加前3時間の処理効果をウエスタンプロット法にて定量した。またJ-TEC社製のLabCyte MELANO-MODEL(3次元ヒト表皮培養組織)を用いSCF(10nM)含有培地により14日間で生じる色素沈着増強へのAX(4—8uM)の添加効果を表面色素沈着強度、フォンタナマッソン(FM)染色、HPTLCによるメラニン(PTCA)定量により測定した。また遺伝子発現量はreal-time RT-PCR法を用いて解析した。

【結果】SM2-1細胞のSCF刺激後15分でERK, CREB, MITFのリン酸化反応はほぼピークを示し、SCF刺激前3hrでのAX 4μM添加により阻害効果が観察され、8μMでは有意な抑制効果を示した。SCF刺激Melano-Modelの色素沈着過程へのAXの添加はAX無添加コントロールが明瞭な色素沈着増加を示したのに対しAX 4と8μMでMelano-Model表面色素沈着強度の低下効果が認められ、FM染色像でもメラニン顆粒沈着の明らかな減少、またPTCA量も明瞭な低下を示した。また

Real-time RT-PCR 解析により 1 週間目における tyrosinase, MITF, TRP-1, エンドセリンB受容体の mRNA 発現の明瞭な低下が観察された。

【考察】AX は SM2-1 細胞の SCF 刺激により生じる MAP 系シグナル伝達経路を抑制し、その下流のシグナルであり MITF の転写因子でもある CREB のリン酸化およびチロシナーゼの転写因子でもある MITFF のリン酸化を 8uM の低い濃度で有意に抑制し、また MAP 系シグナル伝達系の活性化により引き起こされる Melano-Model での色素沈着増強にもメラニン合成関連遺伝子の有意な低下を伴い、明瞭な阻害効果を示したことから、SCF の関与する色素沈着症 (UVB 色素沈着や老人性色素斑) への色素沈着低減効果を有する可能性が示唆された。

参考文献

A. 色素沈着メカニズムに関する文献

1. Yada Y., Higuchi K., Imokawa G.: Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 18352-18357, 1991
2. Imokawa G., Yada Y., Miyagishi M.: Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 24675-24680, 1992.
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., Yada Y., Kimura M.: Signaling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem. J.* 314: 305-312, 1996.
5. 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.
6. Imokawa G., Yada Y., Morisaki N., Kimura M.: Biological characterization of human fibroblast-derived mitogenic factors for human melanocytes. *Biochem. J.* 330: 1235-1239, 1998.
7. Imokawa G., Kobayashi T., Miyagishi M.: Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes: cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 33321-33328, 2000.
8. Hachiya A., Kobayashi A., Ohuchi A., Takema Y., Imokawa G.: The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet B-induced pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 116(4): 578-586, 2001
9. Kadono S., Manaka I., Kawashima M., Kobayashi T., Imokawa G.: The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpigmentation mechanism of lentigo senilis. *J. Invest. Dermatol.* 116(4): 571-577 2001
10. Manaka I., Kadono S., Kawashima M., Kobayashi T., Imokawa G.: The mechanism of hyperpigmentation in seborrhoeic keratosis involves the high expression of endothelin-converting enzyme-1 α and TNF α , which stimulate secretion of endothelin-1. *Br J Dermatol.* 145: 895-903, 2001
11. Hachiya A., Kobayashi T., Takema Y., Imokawa G.: Biochemical characterization of endothelin-converting enzyme-1 α in cultured skin-derived cells and its

- postulated role in the stimulation of melanogenesis in human epidermis. *J Biol Chem* 277(7): 5395-5403, 2002
12. Higuchi K, Kawashima M, Ichikawa Y, Imokawa G: Sphingocylphosphorylcholine is a melanogenic stimulator for human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 16: 670-678., 2003
 13. Hattori H, Kawashima M, Ichikawa Y, Imokawa G. The epidermal stem cell factor is over-expressed in lentigo senilis: Implication for the mechanism of hyperpigmentation. *J Invest Dermatol* 122: 1256-1265, 2004
 14. Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y, Kitahara T, Takema Y, Imokawa G: Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am J Pathol.* 2004 Dec;165(6):2099-2109. 2004
 14. Kayo Sato-Jin, Emi K. Nishimura, Eijiro Akasaka, Wade Huber, Hajime Nakano, Arlo Miller, Jinyan Du, Min Wu, Katsumi Hanada, Daisuke Sawamura, David E. Fisher, Genji Imokawa. Epistatic Connections between MITF and Endothelin Signaling in Waardenburg Syndrome and Other Pigmentary Disorders. *FASEB J* 22(4):1155-68. 2008
 15. Junichi Hasegawa, Yasufumi Goto, Hiroshi Murata, Minoru Takata, Toshiaki Saida, Genji Imokawa: Down-regulated melanogenic paracrine cytokine linkages in hypopigmented palmoplantar skin. *Pigment Cell & Melanoma Research* 21(6) 787-699. 2008
 16. Imokawa G: Paracrine interactions of melanocytes in pigmentary disorders. Ed. By James J. Nordlund, Raymond E. Boissy, Vincent J Hearing, Richard A. King, William S. Oetting, Jean-Paul Ortonne. *The Pigmentary System*, Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA.2005, pp421-444
 17. Imokawa G: *Vitiligo Book, Vitiligo and Hypopigmentation, II-2i Cytokines and growth factors-II,* Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA.2008, pp34-40
 18. Imokawa G: Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 17: 96-110, 2004

B. アスタキサンチンのシグナル伝達への効果に関する文献

1. Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1990; 22:27-38.
2. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem* 1991;63:141-6.
3. Palozza P, Krinsky NI. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane mode. *Arch Biochem Biophys* 1992; 297: 291-5.
4. Hussein G, Sankawa N, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod* 2006; 69:443-9.
5. Mortensen A, Skibsted L, Sampson J, Rice-Evance C, Everett SA. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett* 1997;418: 91-7.
6. Lee SJ, Bai SK, Lee KS, Namkoong S, Na HJ, Ha KS, Han JA, Yim SV, Chang K, Kwon YG, Lee SK, Kim YM. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol Cells* 2003; 6:97-105.
7. Santocono M, Zurria M, Berrettini M, Fedeli D, Falcioni G. Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. *J Photochem Photobiol B* 2006; 85:205-15.
8. O'Connor I, O'Brien N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J Dermatol Sci* 1998;16:226-30.
9. Svobodová A, Zdarilová A, Malíková J, Mikulková H, Walterová D, Vostalová J. Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin. *J Dermatol Sci* 2007; 46:21-30.
10. Matsuzawa A, Ichijo H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 1325-36.
11. Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K, Jin XH, Ilieva I, Koyama Y, Yazawa K, Yoshida K, Kase S, Ohno S. Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway. *Exp Eye Res* 2006;82:275-81.
12. Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochanek

- K. UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol* 1993; 2:92-7
13. Wenk J, Schüller J, Hinrichs C, Syrovets T, Azoitei N, Podda M, Wlaschek M, Brenneisen P, Schneider LA, Sabiwalsky A, Peters T, Sulyok S, Dissemond J, Schauen M, Krieg T, Wirth T, Simmet T, Scharffetter-Kochanek K. Overexpression of phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in human dermal fibroblasts abrogates UVA irradiation-induced expression of interstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1 by suppression of phosphatidylcholine hydroperoxide-mediated NFκB activation and interleukin-6 release. *J Biol Chem* 2004;279:45634-42.
 14. Sato-Jin K, Nishimura EK, Akasaka E, Huber W, Nakano H, Miller A, Du J, Wu M, Hanada K, Sawamura D, Fisher DE, Imokawa G. Epistatic connections between MITF and endothelin signaling in Waardenburg Syndrome and other pigmentary disorders. *FASEB J* 2008; 22:1155-68.
 15. Luyendyk JP, Piper JD, Tencati M, Reddy KV, Holscher T, Zhang R, Luchoomun J, Chen X, Min W, Kunsch C, Mackman N. Novel class of antioxidants inhibit LPS induction of tissue factor by selective inhibition of the activation of ASK1 and MAP kinases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1857-63.
 16. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNFα-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005; 120: 649-61.
 17. Pham CG, Bubici C, Zazzeribu F, Papa S, Jones J, Alvarezm K, Jayawardena S, DeSmaele E, Cong R, Beaynib C, Torti FM, Torti SV, Franzoso G. Ferritin heavy chain upregulation by NF-κB inhibits TNFα-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species *Cell* 2004;119:529-42.
 18. Goldman EH, Chen L, Fu H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation. *J Biol Chem* 2004; 279:10442-9.
 19. K. Saeki, N. Kobayashi, Y. Inazawa, H. Zhang, H. Nishitoh, H. Ichijo, K. Saeki, M. Isemura, A. You, (2002) Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis, *Biochem. J.* 368: 705–720.
 20. Lordan S, O'Neill C, O'Brien NM. (2008) Effects of apigenin, lycopene and astaxanthin on 7 beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis and Akt

phosphorylation in U937 cells. Br J Nutr. Aug;100(2):287-96.

21. Manabe E, Handa O, Naito Y, Mizushima K, Akagiri S, Adachi S, Takagi T, Kokura S, Maoka T, Yoshikawa T.(2008) Astaxanthin protects mesangial cells from hyperglycemia-induced oxidative signaling. J Cell Biochem. 103(6):1925-37.
22. Miki W,(1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure Appl. Chem. 63:141-146; Palozza P, Krinsky NI,(1992) Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane mode. Arch Biochem Biophys 297: 291-295