

表皮性色素異常症におけるパラクリンサイトカイン相互作用メカニズム

1 章：表皮細胞由来のサイトカインが原因する表皮性色素沈着の発症メカニズム

—UVB/UVA 色素沈着・老人性色素斑・老人性疣贅—

要約

表皮細胞由来のサイトカインが原因する表皮性色素沈着症には紫外線 UVB/UVA 色素沈着, 老人性色素斑, 老人性疣贅(脂漏性角化症)などがある。紫外線 UVB 色素沈着では UVB に暴露されたヒトケラチノサイトより Interleukin(IL)-1 のオートクリン作用で産生される Endothelin(ET or EDN)-1 や Stem Cell Factor (SCF)がそれぞれ重要な原因パラクリンメラノサイト活性化因子であり、またメラノサイト膜上の EDN 受容体や SCF の受容体である c-Kit の発現の増加も色素沈着の形成に寄与している。一方紫外線 UVA 色素沈着では EDN は全く関与せず、表皮ケラチノサイトより産生分泌される Granulocyte Macrophage Colony Stimulatory Factor (GM-CSF)が原因パラクリンサイトカインである。紫外線暴露皮膚部位(顔面)に頻度高く生じる老人性色素斑では紫外線暴露とは直接関係なくヒトケラチノサイトより突如として産生される腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor : TNF) α のオートクリン作用で産生される EDN1 や SCF がそれぞれ重要な原因パラクリンメラノサイト活性化因子である。老人性色素斑から生じる可能性も指摘されている老人性疣贅では老人性色素斑と同様に紫外線暴露とは直接関係なく basaloid cells(腫瘍化ケラチノサイト)より分泌される TNF α のオートクリン作用で産生される EDN1 が原因パラクリンメラノサイト活性化因子で、一方表皮腫瘍部での SCF の産生亢進は認められず、培養分離老人性疣贅細胞による解析の結果、TNF α 刺激による SCF 産生促進作用が正常ヒトケラチノサイトに比べて弱い異常が認められた。

キーワード: 表皮性色素沈着症、表皮ケラチノサイト、パラクリンメラノサイト活性化因子、エンドセリン、ステムセelfクター

緒言

ほとんどの表皮性色素沈着発症の細胞生物学的メカニズムはこれまでにかなりの部分が解明されつつある。解明された表皮色素異常症発症メカニズムに關与するパラクリンサイトカイン相互作用をまとめてみると、尋常性白斑以外の表皮性色素異常症の原因はメラノサイト側ではなく表皮ケラチノサイトもしくは真皮フィブロブラスト（線維芽細胞）における外的及び内的刺激によるサイトカイン分泌異常に基づく。これらの解明の緒になったのは UVB 色素沈着のメカニズムがかなり詳細に解明され、その中で皮膚表皮のケラチノサイト（表皮角化細胞）が産生分泌する種々サイトカインのメラノサイトへの活性化作用の有無が詳しく解析され、ケラチノサイトとメラノサイト間に存在するメラニン合成促進性パラクリンサイトカイン相互作用の詳細が培養細胞を用いて明らかとなって来たことが大きな要因である。本稿ではこれらのメラニン合成促進性パラクリンサイトカイン相互作用の解明の過程をなるべく詳しく述べ、この相互作用仮説に基づいて UVB/UVA 色素沈着・老人性色素斑・老人性疣贅における、表皮細胞由来のサイトカインが原因しこれら色素異常症における色素増強に關与する細胞外シグナルメカニズムを解説する。

UVB 紫外線色素沈着におけるメラノサイト活性化メカニズム

従来の UVB 紫外線色素沈着メカニズム解析の流れ

紫外線 UVB の暴露によって人皮膚に照射後 24 時間までに生じる紅斑とその後数日で生じる色素沈着(図-1)はよく知られた事実であり、この色素沈着の主要な作用波長は紫外線の

図-1：最小紅斑量(Minimam Erythematous Dose : MED)の 2 倍のエネルギーの UVB をヒト前腕皮膚に照射した一日後に生じた紅斑と 5 日目に認められた色素沈着



290-320nm の UVB 領域にある。この紫外線による皮膚の色素沈着のメカニズムについては、紫外線色素沈着部の表皮基底層にチロシナーゼ陽性メラノサイト数の著明な増加と表皮におけるメラニン量の増加が認められることから¹⁾、紫外線特に UVB の暴露により表皮メラノサイトの分裂が亢進し、さらにメラノサイト内のチロシナーゼ酵素の

増加によりメラニン合成能が高まり、作られたメラニン顆粒がメラノサイトからケラチノサイトに大量に転送された結果であると考えられてきた。しかしながら紫外線の皮膚への照射がいかなるメカニズムでメラノサイトの分裂とメラニン合成の促進を引き起こすかについては、紫外線による色素沈着が紫外線に暴露された皮膚領域に明確に限定して生じる事実から以下の 2 種類の考え方が存在したが、十分な証拠が乏しく、広く受け入れられるまでにいたっていなかった。すなわち、第一の説は、紫外線が直接メラノサイトを活性化し、メラニンの合成を促進するもので、培養ヒトメラノサイトに紫外線を照射した際に、チロシナーゼ活性やメラニン合成が増加する事実を根拠にしている²⁾。しかしながら同じ実験系でメラノサイトの増殖は紫外線照射でむしろ抑制される²⁾ので、紫外線色素沈着皮膚で生じているメラノサイト数の増加を説明できない。第二の説は紫外線に暴露された表皮細胞から種々のケモカインもしくはサイトカインが分泌され、このうちのいくつかのものがメラノサイトの増殖及びメラニン合成を促進させるメカニズムで、代表的な因子は prostaglandin(PG)と塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)であった。しかしながら関連のもっとも強い PG 中の PGE₂はメラノサイトのメラニン合成の促進作用を示す報告はあるが細胞分裂にはほとんど影響しないことが確認されており²⁾、これも紫外線色素沈着皮膚表皮でおきているメラノサイト数の増加を説明できない。bFGF は Halaban らが当時、既知のサイトカインの中でヒトメラノサイトの増殖を唯一促進できる増殖因子として見いだしたもので、cAMP や cAMP を上昇させる剤とともに添加することによりヒトメラノサイトの増殖を高める作用がある³⁾。Halaban らは紫外線照射ヒトケラチノサイトの細胞溶解物中に培養ヒトメラノサイトの増殖を促進する因子を見だし、この因子が bFGF であることを、これらの抗体によりこの促進作用が中和されることなどより結論づけた³⁾。しかしながら紫外線照射ヒトケラチノサイトは細胞内では bFGF の生合成は促進されるが、培養上清中にはほとんど分泌が増加しないことや、本増殖因子は培養ヒトメラノサイトに対し増殖促進作用を示すがメラニン合成促進効果はあまり認められないこと、また bFGF によるヒトメラノサイトの増殖促進作用は細胞内の cAMP 濃度を上昇させるコファクターが必要なことから³⁾、紫外線色素沈着に関連した本質的な原因因子はほかに存在することが推察されていた。また bFGF が皮膚の色素沈着を促進する能力がほとんどないことは当時褥瘡の治療に bFGF が使われていたが、治療の際に皮膚に塗布しても褥瘡は改善するが、色素沈着の増加は認められないことからも予想されていた。

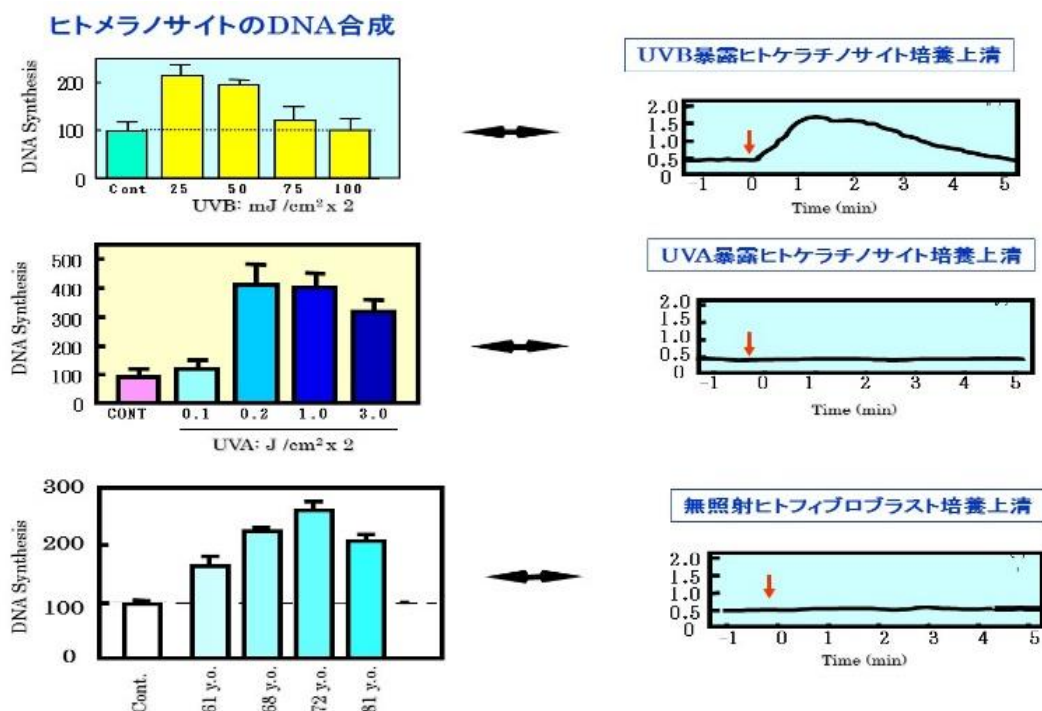
これらの表皮ケラチノサイトが分泌するメラノサイト活性化因子に関連して Gilchrest らのグループはヒトケラチノサイト培養上清に培養ヒトメラノサイトの増殖とメラニン合成の両方を促進する物質を見だし、部分精製を試みた結果、それは 2 種類の因子からなり、一つは分子量 500Da 以下の物質であり、PGE₂ ではないことが確認された⁴⁾。もう一つは分子量 10000Da 以上の物質で、これらは TGF α , IL-1 及び Nerve growth factor(NGF)以外の物質であった。さらにヒトケラチノサイト培養液中

のメラノサイト活性化因子は新たに添加した **bFGF** の増殖促進因子作用と相加的に働き、また **bFGF** のときへパリン結合性がないことより、**bFGF** とは異なる因子と推定された⁴⁾。すなわちヒトケラチノサイトから分泌されたサイトカインがメラノサイトの活性化をパラクリン的に引き起こす機構は、もしメラノサイトのメラニン合成能と増殖能の両方を促進する因子が同定されれば、UVB 紫外線色素沈着メカニズムを最も明快に説明しえるメカニズムであった。

ケラチノサイト由来メラノサイト活性化因子の同定

われわれは紫外線(UVB)に暴露したヒトケラチノサイトの培養液中にヒトメラノサイトの増殖およびメラニン合成を促進する因子が放出され、紫外線の照射エネルギーに依存して、その活性が増加および減弱することを見いだした⁵⁾ ことから、この UVB 照射ヒトケラチノサイト培養上清中に含まれるヒトメラノサイト活性化因子の同定にとりかかった。また紫外線(UVA)に暴露したヒトケラチノサイトや紫外線に暴露しないで培養しただけのヒトフィブробラストの培養上清にもヒトメラノサイトの増殖を促進する因子の存在を見出している⁶⁻⁸⁾。これらの因子が仮になんらかの増殖因子としてヒトメラノサイトに作用しているとすれば、ヒトメラノサイトの増殖及びメラニン合成の促進作用は特異な細胞膜表面受容体とそれに続く細胞内の情報伝達系を介して起きている可能性が高いので、細胞情報伝達系の動きを、一つの指標として **protein kinase C(PKC)**情報伝達系と関わりの深い細胞内カルシウムの動員作用の有無によりはじめに検証した。ヒトケラチノサイトを紫外線(UVB)照射し4日間培養した後の培養上清を培養ヒトメラノサイトに加えると、増殖促進作用が発現するはるか以前の数分間にヒトメラノサイト細胞内のカルシウム濃度が一過性に上昇することが、蛍光色素である **Fura-2/AM** でヒトメラノサイトをプレラベルした実験により見いだされた⁵⁾。この作用は細胞外のカルシウムを除去しても起きることから、細胞外からのカルシウムの流入ではなく、細胞内の粗面小胞体からの放出であることが確認された。一方、紫外線(UVA)暴露のヒトケラチノサイトやヒトフィブробラストの培養上清液はヒトメラノサイトのDNA合成を促進させる効果を有しているが、ヒトメラノサイトの細胞内カルシウムの動員作用は認められなかった(図-2)⁶⁻⁸⁾。これらの事実から紫外線(UVB)暴露ヒトケラチノサイト培養上清に存在したヒトメラノサイト活性化因子はメラノサイト細胞膜上のなんらかの特別な受容体を介して **PKC** が関与する細胞内情報伝達系を動かし、カルシウムの細胞内動員を引き起こしている物質である可能性が示唆された。

図-2 : UVB, UVA 暴露培養ヒトケラチノサイト及び無照射ヒトフィブробラスト培養上清のヒトメラノサイトへの添加による細胞内カルシウム動員作用と DNA 合成促進作用(文献 6,7,8 からの転載)



細胞内カルシウム動員を引き起こすサイトカインの探索

培養ヒトメラノサイトに対し、カルシウムの細胞内動員をおこすことのできるヒトケラチノサイト由来のサイトカインがパラクリンのメラノサイト活性化因子である可能性が強まったことから、まず既知のサイトカインの中から培養ヒトメラノサイトに対しカルシウムの動員を引き起こし、同時にDNA合成を促進するサイトカイン等の物質があるかどうかを数十種類評価した⁹⁾。その結果、ヒトメラノサイトに対し細胞内のカルシウム動員を引き起こすサイトカインはほとんどなく、メラノサイトの細胞増殖を引き起こすbFGFや、その当時ヒトメラノサイトにもメラニン合成促進作用が報告されているalpha melanocyte stimulating hormone (αMSH)¹⁰⁾、さらには種々のILにもカルシウムの動員作用は認められなかった。唯一ヒトメラノサイトで細胞内カルシウムの動員作用を伴ったDNA合成促進作用が認められたサイトカインは、1988年に強力な血管収縮物質として血管内皮細胞の培養上清より発見¹¹⁾されていたEDN誘導体であった(表-1)。

表-1: 種々サイトカインの培養ヒトメラノサイトへのDNA合成促進作用と細胞内カルシウム動員作用(calcium mobilization) (文献9からの転載)

Factor	Molecular Weight	Ca ²⁺ Mobilization	DNA synthesis
Angiotensin I	1,297	→	→
Angiotensin II	1,046	→	→
Angiotensin III	931	→	→
ANP	3,080	→	→
Bombesin	1,620	→	→
Bradykinin	1,060	→	→
α-Endorphin	1,746	→	→
γ-Endorphin	1,859	→	→
Endothelin-1	2,492	↑	↑
Endothelin-2	2,547	↑	↑
EGF	6,200	→	→
aFGF	15,500	→	→
bFGF	18,000	→	→
GM-CSF	14,500	→	→
HGF	103,000	→	→
IFN-γ	17,100	→	→
IGF-1	7,500	→	→
IL-1 α	17,500	→	→
IL-1 β	17,500	→	→
IL-6	21,000	→	→
Insulin	5,700	→	→
KGF	28,000	→	→
α-MSH	1,665	→	→
Neurotensin	1,673	→	→
NGF	25,000	→	→
PDGF	13,00-16,000	→	→
SCF	18,500	→	→
Somatostatin	1,638	→	→
TGF-α	5,500	→	→
Vasopressin	1,084	→	→

EDN 誘導体のヒトメラノサイトに対する DNA 合成促進作用

EDN が紫外線暴露ヒトケラチノサイトの培養上清中に存在するメラノサイトの活性化因子である可能性が出てきたので、EDN 誘導体のヒトメラノサイトに対する増殖促進作用を詳細に調べた。EDN 誘導体中、EDN-1 と EDN-2 が 0.1-100nM 濃度で培養ヒトメラノサイトの DNA 合成を 200-300%増強させ、ヒトメラノサイトの強力な増殖促進因子であることが判明した¹²⁾。一方、EDN-3 は nM 濃度で 130%と弱い促進作用であり、EDN の前駆体であるビッグエンドセリン(big-EDN)は全く作用しなかった。DNA 合成の強力な促進作用と一致して EDN-1 および-2 は 10nM 濃度で細胞数の増加を顕著に引き起こした¹²⁾。

EDN 誘導体のヒトメラノサイトに対するメラニン合成促進作用

EDN はヒトメラノサイトに対し増殖促進作用のみならずメラニン合成に対する促進作用を有することが判明した。すなわち 10nM 濃度の EDN-1 を培養ヒトメラノサイトに添加し、3 時間後より ³H-チロシンを加え、及川らの方法¹³⁾にしたがってメラノサイト内でチロシナーゼの働きでその後 21 時間の間の ³H-チロシンから dihydroxyphenylalanin (DOPA)への変換により生じる ³H₂O を定量し、ヒトメラノサイ

ト細胞内で実際に働いているチロシナーゼ酵素反応を測定した結果、チロシナーゼ活性は EDN-1 の添加により約 2 倍に上昇した^{12,14)}。またメラニン合成過程に特異的に取り込まれる ¹⁴C-thiouracil の取り込みを測定した結果でも EDN-1 の 10nM の添加によりメラニン合成も有意に促進されていることが判明した¹⁴⁾。EDN-1 添加後にヒトメラノサイトの細胞数が 2 倍になる期間は約 4 日間であるので、約 24 時間では細胞数の増加はほとんどないことから、細胞 1 個当りのチロシナーゼ活性が 2 倍に上昇していることになる。この実験と平行して Northern Blot によりメラノサイト内のチロシナーゼの mRNA 量を定量した結果、EDN-1 添加後一日で約 170% 増加しており¹⁴⁾、チロシナーゼ活性の上昇はチロシナーゼ mRNA の増加にともなうチロシナーゼ酵素蛋白量の増加の結果と考えられた。以上の如く EDN-1 のヒトメラノサイトに対する DNA 合成及びメラニン合成促進作用は種々の点で紫外線(UVB)暴露ヒトケラチノサイト培養上清に認められたヒトメラノサイトに対する作用とよく一致した。

EDN 受容体の検証

EDN はヒトメラノサイトのイノシトール回路の活性化を介して DNA 合成促進作用を引き起こしているので、ヒトメラノサイト膜上には EDN に対する特異な受容体の存在が予測され、この受容体の存在を検証した。¹²⁵I- EDN-1 を用いた結合実験を培養ヒトメラノサイトで行った結果、ヒトメラノサイト膜上には親和性の高い受容体の存在が証明され、Scatchard Plot によりメラノサイト細胞当たり約 7-8 万個の解離定数 (Kd) 1.81 nM を有する特異な受容体が分布していることを始めて明らかにした¹²⁾。また Photoaffinity Labelling 法により SDS-PAGE 上での EDN 受容体の分離を試みた結果、分子量 53kDa の受容体の分離にも成功した¹⁵⁾。

ヒトケラチノサイトによる EDN の分泌

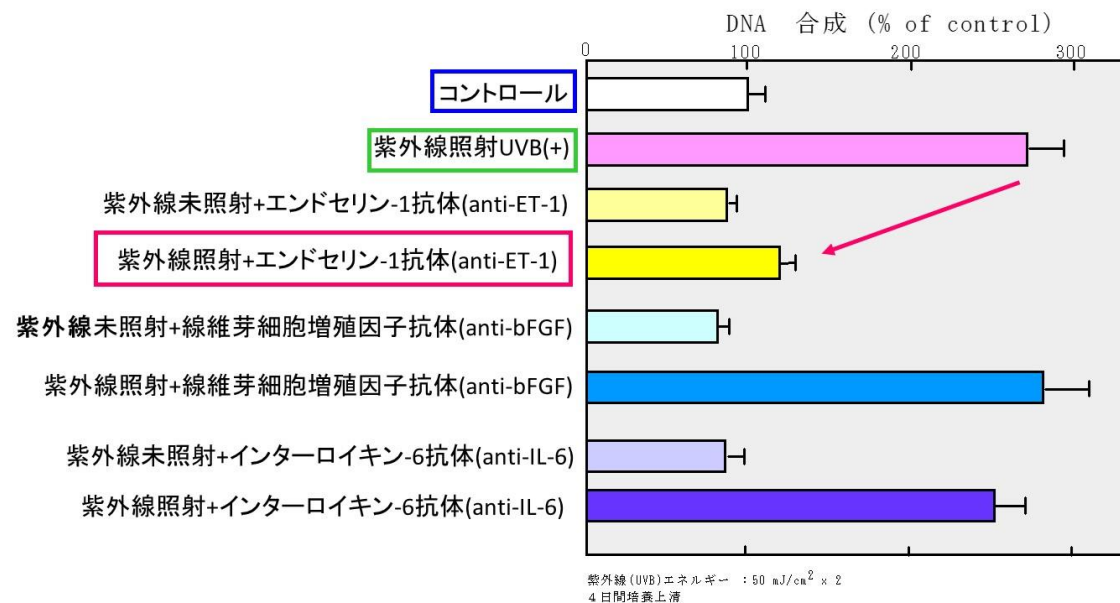
EDN は主に血管内皮細胞が産生分泌する血管収縮性ペプチドとして見いだされたものであり、ヒトケラチノサイトが産生分泌している報告はそれまで皆無であったので、紫外線暴露によりヒトケラチノサイトからの EDN の産生分泌が実際におきるかどうかを検討した。約 20-50mJ/cm² のエネルギーの紫外線(UVB)を 2 回間隔で照射し、全体で 4 日間培養した培養液中には大量の EDN-1 の分泌が認められ、また EDN の前駆体である BigEDN-1(EDN converting enzyme α により EDN となる)の分泌も認められた⁵⁾。非照射での条件ではヒトケラチノサイトからの EDN の分泌はほとんど認められないが、50mJ/cm² エネルギーの照射ではその分泌量はピークに達し、それ以上のエネルギーでは細胞の紫外線照射による傷害により分泌の増加率は減少した。同時にヒトケラチノサイトの RNA を抽出し RT-PCR 法により prepro-EDN の mRNA の発現を解析したところ、ヒトケラチノサイトは prepro-EDN の mRNA を正常な培養状態で発現しており、この発現量は UVB 照射により顕著に増加することも、Northern Blot 解析によ

り明らかとなり⁵⁾、ヒトケラチノサイトが確かに EDN を産生しかつ分泌しており、紫外線 (UVB) 照射は EDN の合成を著しく促進する事が明らかとなった。EDN のヒトケラチノサイト培養液中への分泌の時間経過を観察すると、紫外線 (UVB) 照射後 3 日目より分泌が促進され、分泌までに比較的時間がかかっている事が明らかとなり、これは紫外線による遅延黒化の過程と時間経過が似ている。EDN の分泌を促進する種々のサイトカインを調べたところ、IL-1 α 及び IL-1 β の添加のみが EDN-1 および BigEDN-1 の分泌を顕著に増加させるサイトカインであることが示され、また IL-1 α の添加により EDN-1 の mRNA の発現も著明に増加する事が、Northern Blot 解析より示された。われわれの実験において紫外線 (UVB) に暴露されたヒトケラチノサイト培養液中には IL-1 α IL-1 α も多量に分泌されている事から⁵⁾、紫外線照射後に起きてくる EDN-1 の分泌は、さきに分泌された IL-1 α がオートクリンのようにヒトケラチノサイトに働いた後に、引き起こされる可能性を考え、紫外線 (UVB) 照射直後にヒトケラチノサイトの培養液に IL-1 α の抗体を添加し、分泌される IL-1 α を中和してみると、EDN-1 及び BigEDN-1 の分泌が完全に抑制された事から、紫外線 (UVB) 照射により引き起こされる EDN-1 の分泌は、さきに分泌された IL-1 α がオートクリンのようにヒトケラチノサイトに働き、生じている事が明らかになった⁵⁾。

EDN がヒトケラチノサイト由来のヒトメラノサイト活性化因子であることの直接的証明

紫外線暴露ヒトケラチノサイト培養中に分泌されているヒトメラノサイトの増殖促進及びメラニン合成促進因子が EDN-1 そのものである事を最終的に証明するため、紫外線(UVB)照射ヒトケラチノサイトの培養液中に EDN-1 の抗体を加え、分泌されている EDN-1 を中和した後、ヒトメラノサイトに対する活性化効果を測定すると、培養液上清中に存在した増殖及びメラニン合成促進作用はほとんど完全に消失し、一方 bFGF や IL-6 の抗体の添加ではまったく抑制効果は認められず (図-3)^{5,8,12)} 紫外線 (UVB) 照射後にヒトケラチノサイト培養上清中に認められたヒトメラノサイト活性化因子の大部分は EDN-1 そのものであることが確認された。

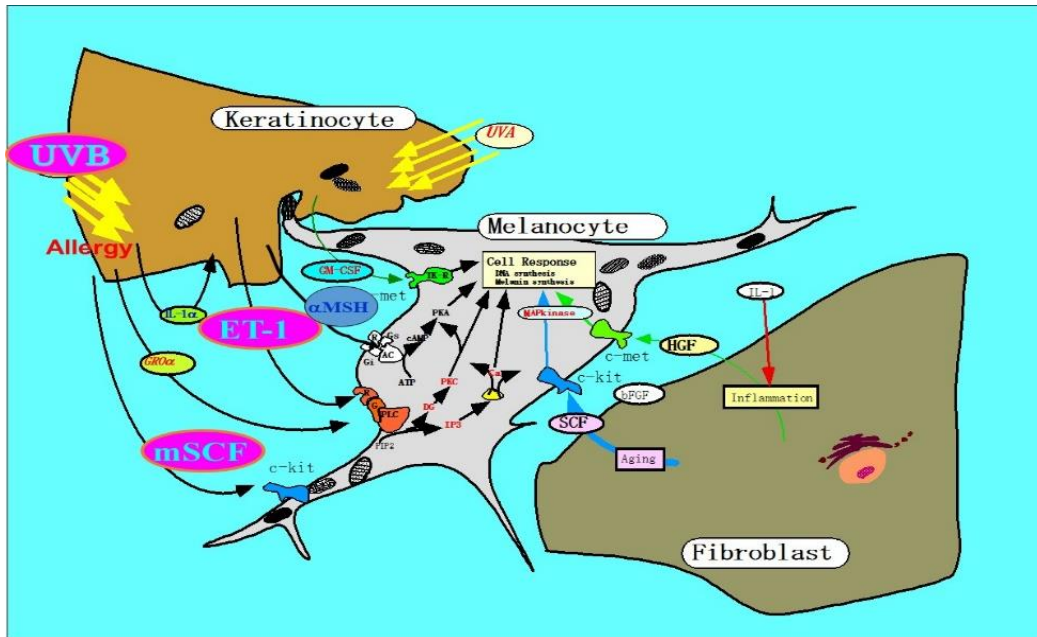
図-3 : UVB 照射ヒトケラチノサイト培養上清をヒトメラノサイトに添加した際に生じる DNA 合成促進作用に対する各種サイトカイン抗体の添加効果 (文献 8 からの転載)



紫外線 (UVB) 色素沈着メカニズムでの EDN 関与のヒト皮膚での証明

EDN-1 が本当に *in vivo* での紫外線 (UVB) 色素沈着に関与するサイトカインであることを確認する目的で、ヒト背部に最小紅斑量の2倍のエネルギーの UVB を照射し、2日及び5日後に皮膚をパンチバイオプシにより採取し、熱処理により表皮を分離し、表皮中に発現されている各種サイトカインの mRNA レベルを RT-PCR 解析で半定量した結果、5日後に prepro-EDN-1 の mRNA の発現が未照射部位に比べて明らかに増加しており、また同時に IL-1 α 及びチロシナーゼの mRNA の発現も平行して増加していた事より、*in vivo* においても、紫外線 (UVB) 照射後表皮ケラチノサイトからの EDN-1 の合成分泌促進を介して色素沈着が生じている事が示唆された¹⁴⁾。以上の実験事実より、紫外線 (UVB) による色素沈着機構に関与すると、図-4 のごとき表皮内ケラチノサイトとメラノサイトの EDN-1 を介したパラクリンのメラノサイト活性化メカニズムが明らかとなった。

図-4: ヒトケラチノサイト及びヒトフィブロブラストとヒトメラノサイト間におけるメラノサイト活性化パラクリンサイトカインネットワーク



SCF の UVB 誘導色素沈着メカニズムへの関与

当時 SCF/受容体 c-Kit カスケードがマスト細胞などの多くの細胞で細胞機能の発揮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ことより、UVB 紫外線誘導色素沈着メカニズムにもこのカスケードが関与する可能性を検証した。培養ヒトケラチノサイトの UVB 照射後の培養上清のヒトメラノサイト活性化因子は大部分が EDN-1 であり、ここでは SCF は関与していなかったが、表皮ケラチノサイトが生成する SCF はほとんどが膜結合型であり、細胞外には分泌されていないので、EDN を同定した実験系では、SCF の関与の有無を検出することは不可能であった。

紫外線 (UVB) 照射培養ケラチノサイト/メラノサイトでの SCF/c-Kit の発現¹⁶⁾

その当時までにヒトケラチノサイトでの SCF 発現は調べられたことはなく、紫外線 (UVB) 照射により培養液中には SCF は分泌されていないことは確認されていた。我々は培養ヒトケラチノサイト用いて UVB 照射を $10\text{-}80\text{ mJ/cm}^2 \times 2$ で行ったところ、SCF の mRNA の発現が顕著に増加することを半定量的 RT-PCR 解析より証明した。紫外線未照射においても SCF の遺伝子の発現が認められることから、ヒトケラチノサイトは正常レベルにおいても SCF を産生していることが確認された。蛋白レベルでの SCF の発現を確認するため、UVB $10\text{-}80\text{ mJ/cm}^2 \times 2$ 照射した培養ヒトケラチノサイトを溶解し、ELISA にて細胞内に産生された SCF 量を定量した。その結果 SCF 蛋白は UVB $10\text{-}20\text{ mJ/cm}^2 \times 2$ 照射により、その産生が増加することが確認された。この際、培養液中には SCF は正常、紫外線 (UVB) 照射いずれの場合も分泌されていなかった。また UVB 照射後のケラチノサイトの溶解物を Western blotting により解析した

結果でも SCF タンパクの増加が観察された。さらに培養ヒトメラノサイトへの紫外線照射による SCF の受容体である c-Kit の発現を半定量的 RT-PCR 解析で測定したところ、UVB 10-40 mJ/cm² x 2 照射により c-Kit mRNA の発現が増加した。c-Kit の遺伝子の発現と一致して、c-Kit の蛋白発現も UVB 10-40 mJ/cm² x 2 照射で有意に上昇することが Western blotting により確認された。以上ヒトケラチノサイトとヒトメラノサイトとでの紫外線照射による SCF 及び c-KIT のそれぞれの発現上昇は、紫外線 (UVB) 照射が SCF/c-Kit カスケードを亢進し(図-4)、最終的にメラノサイトの活性化を誘導し、紫外線 (UVB) 誘導色素沈着に関与している可能性が予測された。

紫外線 (UVB) 照射ヒト表皮における SCF の発現¹⁶⁾

ヒト皮膚に紫外線(UVB)を照射し、照射部位をサクシオンブリスター法により表皮を採取し、表皮における SCF の mRNA の発現を半定量的 RT-PCR で解析した。その結果 UVB 2MED 照射表皮では、照射後 3 日目で SCF 遺伝子の顕著な発現増強が確認された。一方紫外線未照射表皮では今回の実験条件では SCF 遺伝子の発現は検出できなかった。さらに紫外線 (UVB) 照射表皮から蛋白を抽出し Western blotting にて SCF 蛋白の発現を測定したところ、膜結合型 SCF の分子量 31 kD に一致する SCF 抗体陽性バンドの出現を認め、膜結合型 SCF の紫外線 (UVB) 照射による産生増加が確認された。一方可溶性 SCF の蛋白発現は認められなかった。次に紫外線 (UVB) 照射表皮の免疫組織染色を SCF 抗体を用いて行ったところ、紫外線 (UVB) 照射により表皮上層から中層にかけて、強い染色像をみとめ、表皮での SCF 蛋白の発現増強が確認された。

紫外線 (UVB) 誘導色素沈着の c-kit 抗体皮下注射による抑制¹⁶⁾

最終的に SCF/ c-Kit カスケードの亢進が UVB 誘導色素沈着メカニズムに関与していることを確認する目的で、ヒト皮膚と同様に表皮にメラノサイトが存在し色素形成を行っている唯一の動物である褐色モルモット¹⁾の皮膚に UVB 照射により生じる色素沈着過程への c-Kit 抗体の皮内注射による、色素形成抑制実験をおこなった。もちいた c-Kit 抗体はマウスに対する抗体であるので、この抗体がモルモット c-Kit に交互出来るかどうかを、モルモット骨髓由来細胞を用いて確認した。すなわちモルモット骨髓由来細胞はヒト SCF に反応して増殖を引き起こすのに対して、c-Kit 抗体を加えることによりこの増殖反応は完全に抑制されることから、今回用いた c-Kit 抗体はモルモット c-Kit にも交互することが確認された。そこでこの抗体を褐色モルモット皮膚に紫外線 UVB 照射直後に皮内注射した結果、コントロールの非特異的 IgG の皮内注射では、色素形成は正常に生じるのに対し、c-Kit 皮内注射部位では、色素形成がほぼ完全に抑制された(図-5A)。色差計による色素沈着の強さを測定した結果においても、照射後 6 日ではほぼ完全に色素沈着の形成が抑制されたおり、10 日後では、非特異的 IgG の皮内注射部に比べまだ有意に色素形成は抑制されているものの、弱い色素沈着増強が認められた。

紫外線照射部の皮膚を採取し、表皮を剥離した後 dopa 反応によりメラノサイトを染色し、メラノサイトの数を測定したところ、色素沈着結果とほぼ一致して、照射後 6 日で c-Kit 抗体処理部位ではメラノサイトの非特異的 IgG 処理部位に比べての数の増加は認められず、10 日後ではわずかな増加が観察された(図-5B)。ここで照射後 6 日では dopa 陽性メラノサイト数の完全な増加抑制と完全な色素沈着の抑制が認められるのに対し、照射 10 日後ではメラノサイト数及び色素沈着強度の部分的な抑制にとどまっている原因は後に述べる ET-1 と SCF の発現の時間差に起因していることが判明している。以上の実験結果より、UVB 誘導色素沈着メカニズムに SCF/c-Kit カスケード (図-4) の亢進が深く関与していることが in vivo で確認された。

図-5A : 褐色モルモット皮膚に UVB を照射し 2 日後に ACK2 抗体 (c-Kit 抗体) 皮下注射で生じる色素沈着増強の抑制効果の色素沈着像(文献 16 からの転載)

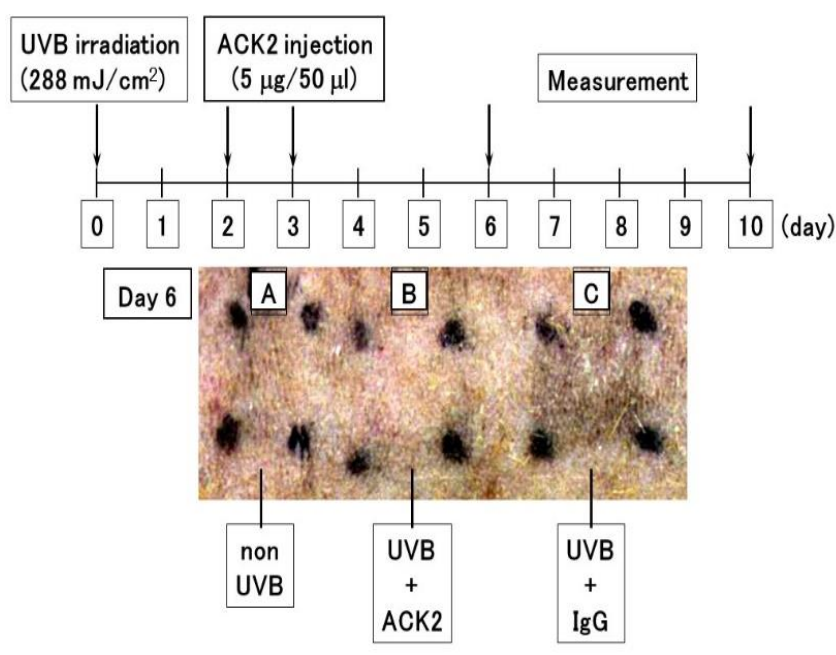
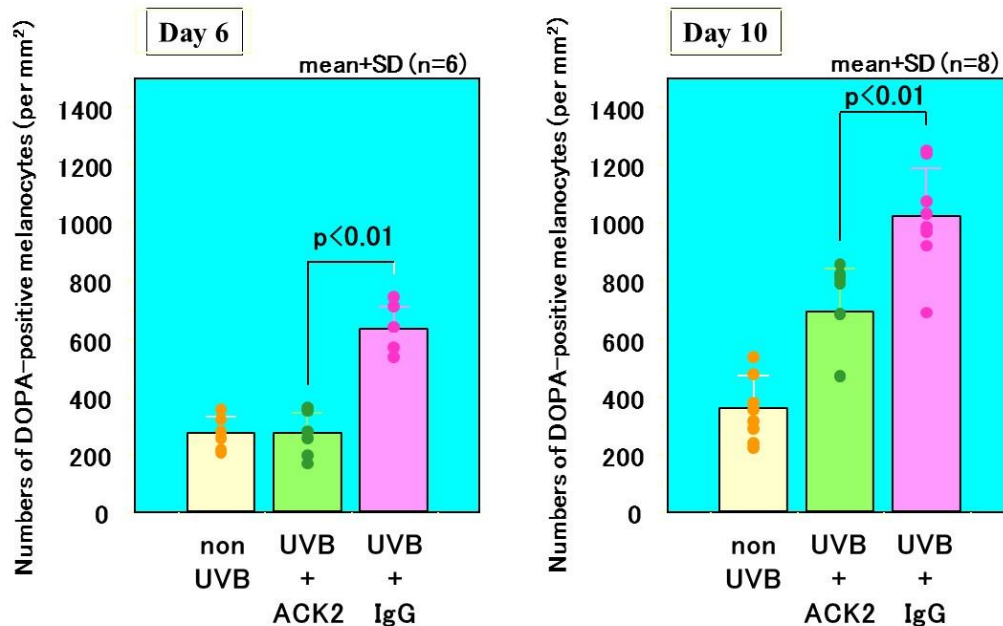


図-5B : 褐色モルモット皮膚に UVB を照射し 2 日後に ACK2 抗体皮下注射で 6, 10 日後の表皮 dopa 染色陽性メラノサイト数の変化(文献 16 からの転載)



紫外線 (UVB) 色素沈着メカニズムにおける EDN と SCF の役割分担

いままでに UVB 紫外線色素沈着メカニズムに関与するサイトカインカスケードとして EDN /EDNB 受容体と SCF/c-kit カスケードの 2 経路の亢進(図-4)の関与が明らかとなった。この 2 経路は色素沈着過程での発現亢進の時間的経過が異なり、定量的な RT-PCR 解析による SCF と prepro-EDN の mRNA の発現を UVB 照射後サクシジョンブリスター法で採取したヒト表皮で行ったところ、SCF/c-Kit カスケードは初期の 1 - 2 日後に、EDN /EDNB 受容体カスケードは中期の 4-10 日後にその発現がピークに達し、紫外線 UVB 照射後 25 日においてもそれらの発現強度は高いレベルを持続しており、紫外線照射前のレベルまでには戻っていないことが明らかとなった(図-6)¹⁷⁾。さらに両カスケードの下流に属する細胞内情報伝達経路での相乗作用メカニズム¹⁸⁾を通じ、両サイトカインカスケードは巧みな連携でメラノサイトの活性化に働いていることが明らかとなった。この EDN と SCF 刺激による細胞内情報伝達経路での相乗作用は、EDN 経路で活性化される PKC により、SCF 経路で活性化される c-Kit の自己リン酸化が相乗的に促進されることによることが判明している¹⁸⁾。UVB 暴露表皮で遺伝子発現が上昇するメラニン合成促進パラクリンサイトカインには bFGF, EDN, SCF の他にも alpha melanocyte stimulating hormone (αMSH)があり、αMSH の UVB 色素沈着への重要な役割は種々論文で指摘されている¹⁰⁾。我々はこれら 4 つのサイトカインのうち、UVB 色素沈着に本質的に関与するサイトカインをより正しく検証するため、表-2 の如く、「そのサイトカインが紫外線による色素沈着の原因と断定するための 5 つの条件」

を設定して、確認を行った^{19,20)}。 α MSH はヒト皮膚の UVB 暴露で表皮での産生分泌が亢進し、またヒトメラノサイトを生理学的濃度としては少し高い濃度(>100nM)で活性化することはよく知られているが^{10,21)}、表—2 に示す如き原因サイトカインとしての本質性条件の解析結果から、UVB 色素沈着症の原因サイトカインとして断定するには証明が充分でないと結論付けた。この解析と一致して、この後に述べる EDN や SCF 等の種々色素異常症への本質的な原因パラクリンサイトカインとしての重要な役割と異なり、 α MSH の分泌亢進が原因となるヒトの表皮性色素沈着症は知られていない。すなわち表—2 において原因サイトカインとしての重要性の確認実験のうち、in vivo での抑制実験が成立するかどうか最も重要な検証点で、EDN は特異的 EDN1 シグナルブロッキング物質が^{22,23)} また SCF は前述の如く受容体 c-KIT への結合ブロック物質 ACK2 monoclonal antibody¹⁶⁾ が UVB 誘導色素沈着や老人性色素斑を動物やヒト皮膚でブロックできることが既に証明されている。一方 α MSH は以下の如き実験も含めてその UVB 誘導色素沈着の原因サイトカインとしてはその重要性は低いと考えられる。すなわち C57BL/6J - aa/ee, Recessive yellow は melanocortin 1 receptor (MC1R), melanocyte-stimulating hormone receptor (MSHR) の mutation による機能異常があるが、その尾皮膚に UVB を照射しても、他の AA/EE (Black), AA/eE (Black), Aye/EE (lethal yellow)と同様にメラノサイトの細胞数の増加を伴う色素沈着が生じること²⁴⁾ さらに UVB 照射ヒトケラチノサイト培養上清のヒトメラノサイト活性化作用を α MSH の中和抗体でブロックできないこと²⁵⁾ またこの際、培養上清中にメラノサイトを活性化できる生理学的濃度以上には分泌されていないこと²⁵⁾ などから、 α MSH は bFGF と同様に UVB 照射表皮での産生亢進は生じるが、色素増強には直接関与していない可能性が示唆されている。私のこのような論述に対して、反論もあるのでここで紹介しておきたい。

“この引用文献 (24) には、重大な問題点がある。マウスの尾や耳は特殊な皮膚で、成体でも表皮にメラノサイトが存在しており、また、recessive yellow (e/e)の尾や耳は黄色毛もあるが、黒色毛の方が圧倒的に多く MC1R の異常がどれほど発現されているのか不明である。したがって、MC1R が異常な e/e の尾の皮膚で、black (E/E)と同じだけ細胞数が増えたからといって α MSH が重要ではないと結論づけることは出来ないと考えられる。もう一点は、 α MSH の中和抗体でケラチノサイト培養上清のメラノサイト活性化作用がブロックできないからといって α MSH は重要ではないという議論も正しくない。なぜならケラチノサイトの培養上清には EDN を始めとして SCF, HGF, GM-CSF, LIF, bFGF 等多くの増殖因子、サイトカインが存在していると考えられ、 α MSH 抗体でたたいても他の因子が多く存在している以上、 α MSH の中和抗体でケラチノサイト培養上清のメラノサイト活性化作用がブロックできなくても全くおかしくない。しかも、 α MSH は主に分化、メラニン生成を促進するので、細胞数等の増加が中和抗体でブロックされなくても不思議ではない。”前半の反論” MC1R の異常がどれほど発現されているのか不明なので α MSH が重要では

ないと結論づけることは出来ないと考えられる“に対しては、これも相対的な重要度は低いということは可能と考えられる。後半の反論に対しては、この反論者は実際に中和実験をやったことがない研究者と思われ、我々は種々のサイトカインが混在している培養上清でも関与があるサイトカインの中和抗体では中和実験が成立し、かつ2つ以上のサイトカインが関与している場合は、2つの中和抗体で中和作用の相加効果が得られることを数多く証明している^{6,7)}。一般的にある活性物質の *in vivo* におけるある現象への関与のないことを完全に証明することは不可能で、だからこそ表-2 の如く、「そのサイトカインが紫外線による色素沈着の原因と断定するための5つの条件」を設定して、4つのサイトカインの比較と確認を行っており、従って相対的な概念で α MSH の UVB 色素沈着への関与は EDN1 や SCF に比べるとあってもはるかに低いレベルであり、実質的に関与がないと考えるのが妥当である。

以上より UVB 色素沈着症は図-7 のごとくパラクリンサイトカインメカニズムで生じていることが証明された。すなわち UVB 色素沈着は UVB 紫外線照射により表皮細胞から分泌される EDN1、及び産生ケラチノサイト細胞膜結合型 mSCF などが、表皮メラノサイトのそれぞれの受容体に結合し、それぞれに特異的な細胞内情報伝達経路を活性化し、最終的にメラノサイトに特異的な転写因子 Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) の産生を促進した結果、MITF の標的遺伝子であるメラノサイト特異的蛋白のチロシナーゼ, tyrosinase-related protein-1 (TYRP-1), dopachrome tautomerase (DCT), メラノソーム蛋白 PMEL17 などの遺伝子・蛋白発現を増強し、メラノソーム内でのメラニン合成が促進され、表皮細胞への増量したメラニン顆粒の転送の結果、色素形成が促進される。さらに UVB に暴露されたヒトメラノサイトは SCF の受容体 c-Kit や EDNB 受容体の発現を増加させ、EDN や SCF に対する反応性を上昇させる効果も持っている^{26,27)}。

図-6：ヒト皮膚の UVB 暴露後の表皮組織における SCF, c-Kit, EDN1 (ET-1), EDNB 受容体 (ET_BR), tyrosinase(チロシナーゼ)の遺伝子発現の経過

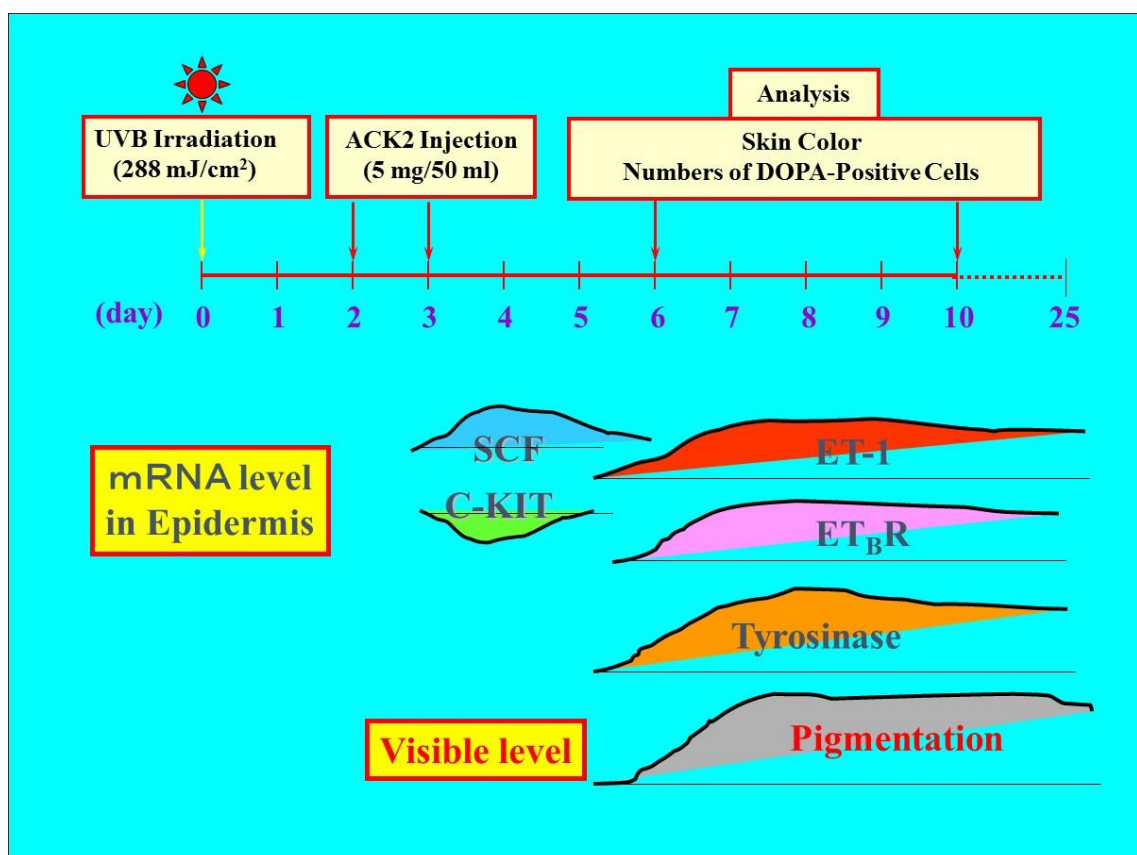
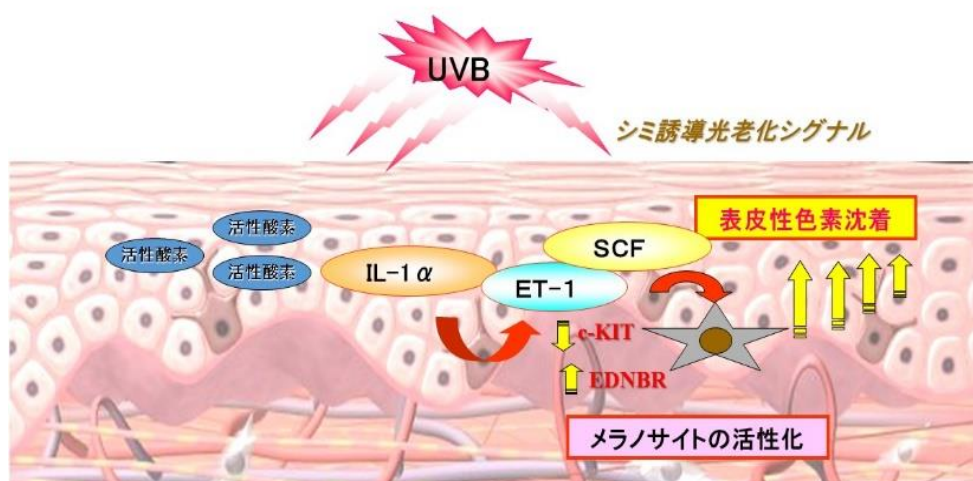


表-2 : ET-1(EDN-1),Membrane bound-SCF(mSCF), αMSH, bFGF の原因サイトカインとして必要な5つの条件に関する検証結果のまとめ(文献 20 からの転載)

そのサイトカインが紫外線による色素沈着の原因と断定するための5つの条件	ET-1	mSCF	α MSH	bFGF
	ET _B R	c-KIT	MC1R	c-Met
1. そのサイトカインは生理的な濃度で培養ヒトメラノサイトを活性化する能力をもっている。	◎	◎	△	△
2. そのサイトカインは紫外線に曝露した培養ヒトメラノサイトの培養上清にヒトメラノサイトを活性化させるのに十分な濃度で分泌されている	◎		◎	×
3. その培養上清を培養ヒトメラノサイトに添加するとヒトメラノサイトが活性化し、この活性化はそのサイトカインの中和抗体でブロックできる。	◎		×	×
4. そのサイトカインは紫外線曝露の表皮中に増加して存在する。	◎	◎	◎	◎
5. 紫外線による皮膚で生じた色素沈着の増強はそのサイトカインのメラノサイトへの作用ブロック物質で抑制できる。	◎	◎	×	×

図-7：紫外線(UVB)色素沈着のパラクリンサイトカインメカニズム



UVA 紫外線誘導色素沈着メカニズム

UVA 紫外線の暴露によっても、UVB 紫外線によるものより、その程度は弱いながら、明瞭な遅延型の色素沈着が生じること（図-8）は良く知られている。この色素沈着は UVB 紫外線の場合と同様に表皮メラノサイトの数の増加とメラニン合成能の亢進が認められている。UVA 紫外線による色素沈着の細胞生物学的メカニズムについては、UVB 紫外線の場合と異なりほとんど解析されていなかった。

図-8： Toshiba BLB lamp での UVA 累積照射(総照射エネルギー：～2 J/cm²)によりヒト前腕皮膚に生じた色素沈着の亢進



UVA 暴露ケラチノサイト由来メラノサイト活性化因子の同定

われわれは UVA 紫外線に暴露したヒトケラチノサイトの培養液中にもヒトメラノサイトの増殖およびメラニン合成を促進する因子が放出され、紫外線の照射エネルギーに依存して、その活性が増加および減弱することを見いだした⁶⁾。このヒトメラノサイト活性化因子は、UVB 紫外線照射によりヒトケラチノサイトから放出される因子とは異なり、メラノサイト細胞内のカルシウムの動員を引き起こすことなく、メラノサイトの増殖を促すことの出来る因子である(図-2)ことが判明した⁶⁾。実際に UVA 紫外線照射したヒトケラチノサイトの培養液に放出される種々因子を測定したところ、少なくとも UVB 紫外線照射でヒトケラチノサイトから分泌される IL-1 α や ET-1 は UVA 紫外線照射のいかなるエネルギーでも全く増加してこないことが確認され、UVA 紫外線照射により放出されるヒトメラノサイト活性化因子は、細胞内情報伝達系で PKC 経路以外の伝達系によりメラノサイトの増殖とメラニン合成を促進する物質であると予測された。UVA 紫外線照射によりヒトケラチノサイトから放出される因子を解析すると、IL-8, GM-SCF, IL-6, PGE₂等の因子の培養液中での増加が確認された⁶⁾。培養液中に増加している因子および未同定因子のなかで、なにがメラノサイトの活性化を誘導しているのかを解析するため、UVA 紫外線照射ヒトケラチノサイトの培養上清液をゲルクロマトグラフィー解析にかけ、各フラクションを培養ヒトメラノサイトに添加し、ヒトメラノサイトの増殖およびメラニン合成への促進効果を測定した。その結果、メラノサイトの増殖およびメラニン合成を促進する分画として P-1 と P-2 分画が得られ

た。この両分画の増殖及びメラニン合成を全体として測定した結果、P-2 が増殖およびメラニン合成を促進する能力が高いことが判明した。そこで紫外線(UVA)照射ヒトケラチノサイト培養上清液を再度ゲルクロマトグラフィーにかけ、増殖およびメラニン合成を測定すると同時に、各フラクションに含まれる種々サイトカインを ELISA 法にて測定し、活性分画の同定を試みた。その結果、P-2 分画に含まれる増殖及びメラニン合成活性化を引き起こす分画は、種々試験したサイトカインの中で GM-CSF を含む分画とほぼ完全に一致し、一方 IL-8 を含む分画には増殖及びメラニン合成を促進する活性は認められなかったことから、活性成分は GM-CSF である可能性が高まった(図-9A)^{6,8)}。最終的に P-2 分画に含まれるメラノサイト活性化因子は GM-CSF であることを確認するため、培養ヒトメラノサイトでの P-2 分画によるメラノサイト増殖促進活性が GM-CSF の抗体により中和出来るかどうかを検討したところ、P-2 分画によるメラノサイトの増殖促進作用は GM-CSF 抗体により完全に中和され、一方 bFGF や SCF 抗体では全く影響を受けなかったことから(図-9B)⁶⁾、その活性化の本体は GM-CSF であることと結論できた。また UVA 暴露ヒトケラチノサイトの培養上清に分泌されているサイトカインのレベルを解析した結果、IL-1 α や IL-6, IL-8, ET-1 の分泌増加は認められず、GM-CSF のみに有意な分泌の増加が認められ(図-9C)、UVA 暴露ヒトケラチノサイトに分泌されるメラニン合成促進性サイトカインの分離同定結果と一致した。そこで GM-CSF がメラノサイトの増殖およびメラニン合成の促進作用を有するかどうかをリコンビナント GM-CSF 添加によるメラノサイト活性化作用を調べたところ、GM-CSF はヒトメラノサイトの増殖とメラニン合成促進作用を示すことが判明し、平行した実験でもヒトメラノサイト細胞膜上に GM-CSF に対する受容体の存在が binding assay 及び scartchered plot より確認された⁶⁾。すなわち UVA 紫外線による色素沈着メカニズムにも表皮内ケラチノサイトとメラノサイトの GM-CSF を介したパラクリンの色素形成メカニズム (図-10) が明らかとなった。

図-9A : UVA (Toshiba BLB lamp)照射(1.0 J/cm²)培養ヒトケラチノサイト培養上清中のメラノサイト活性化因子のクロマトグラフィーによる分離同定 (文献 6 からの転載)

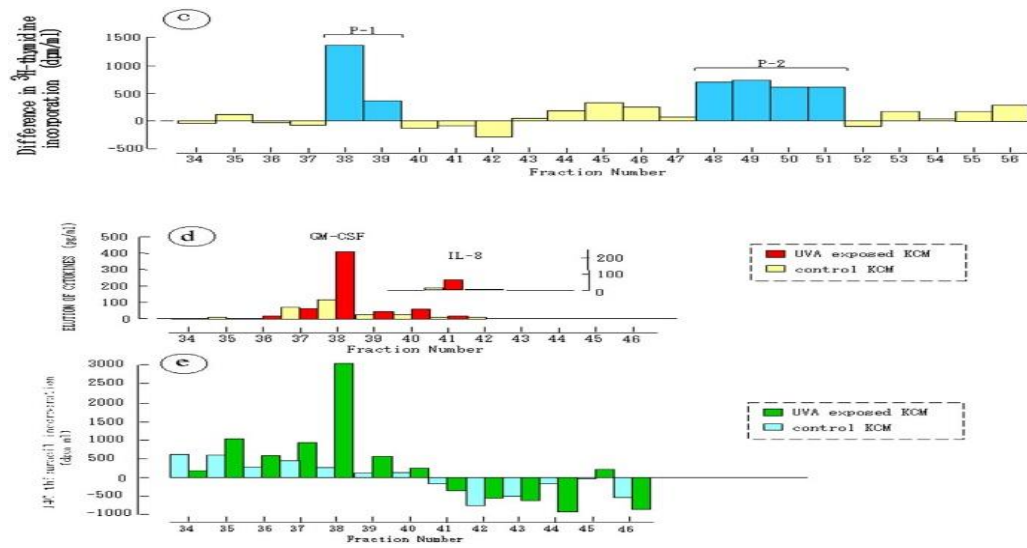


図-9B : 分離された活性フラクション添加によるヒトメラノサイト DNA 合成促進効果の GM-CSF 抗体による中和作用(文献 6 からの転載)

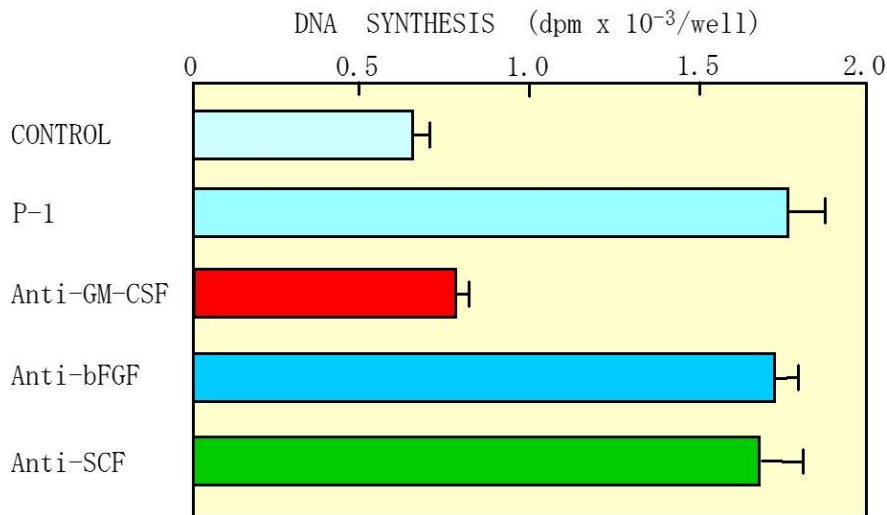


図-9C : UVA 照射(1.0 J/cm²)ヒトケラチノサイトにより分泌されるサイトカイン量(文献 6 からの転載)

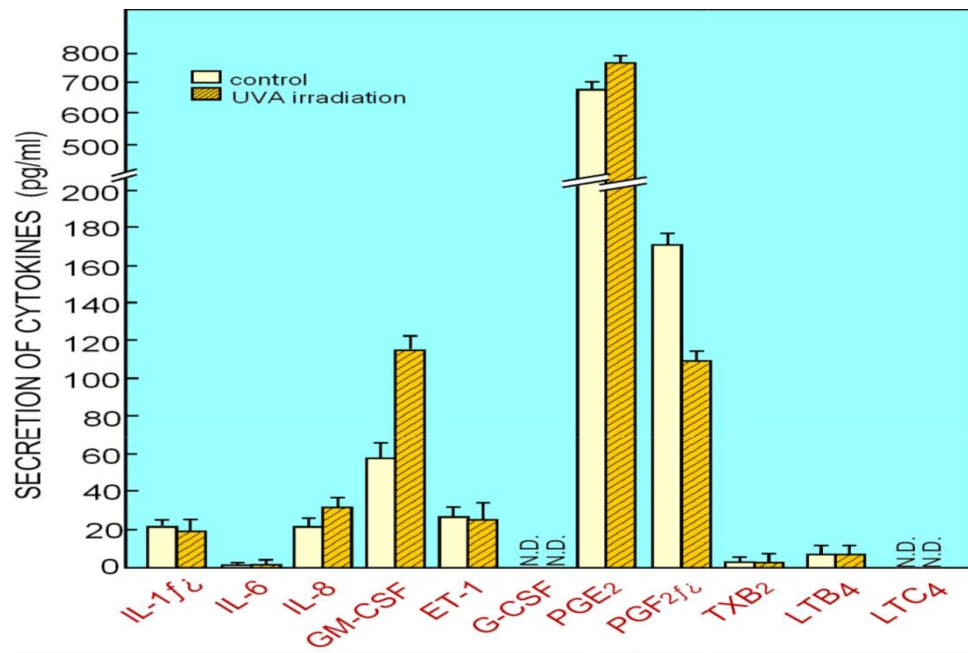
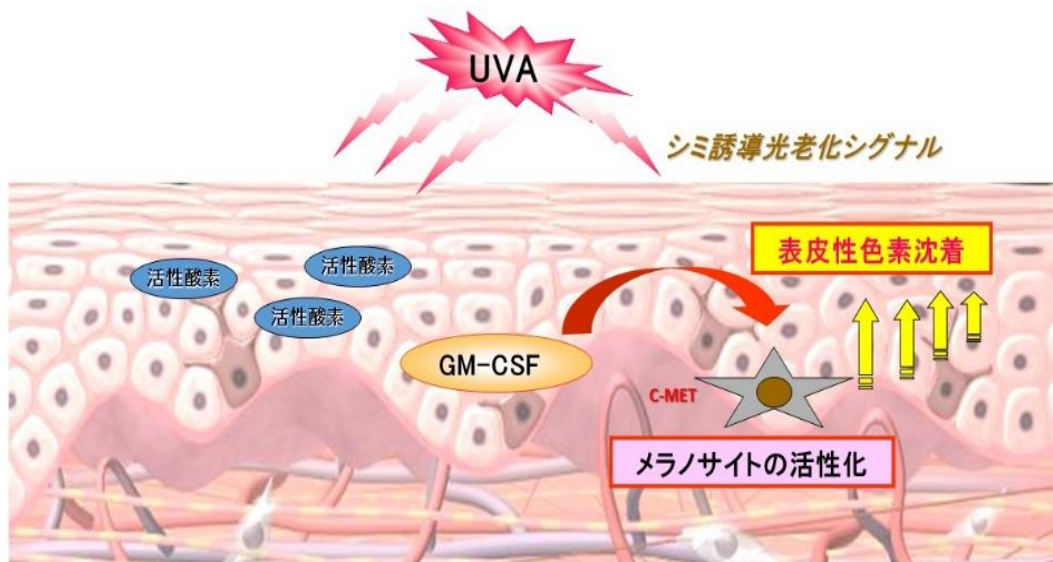


図-10：UVA 照射による色素沈着増強のパラクリンサイトカインメカニズム



老人性色素斑における色素沈着メカニズム

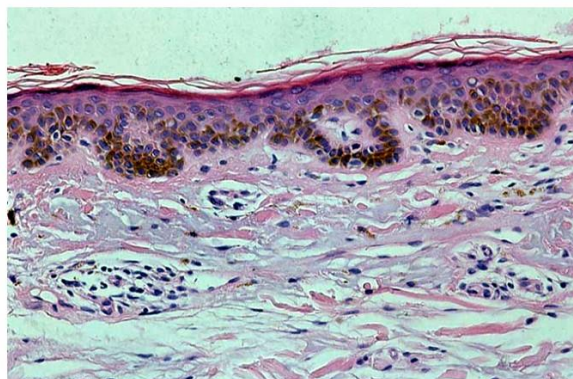
老人性色素斑は加齢にともない特に顔面に多く発症する表皮性の色素沈着症であり(図-11、どちらかといえば日光暴露部位に多く生じる傾向が認められる。顔面に生じる表皮性の色素沈着症として肝斑とともに代表的なものであるが、本症の色素沈着メカニズムを解析した報告は全く無く、ほとんど不明であった。

図-11：老人性色素斑の臨床像と組織像(文献 28 からの転載)

臨床像



組織像(H&E染色)



我々は本色素沈着症における原因パラクリンサイトカインの解析を、表皮組織における EDN、EDN 変換酵素、EDNB 受容体の免疫組織染色及びそれら遺伝子の半定量的 RT-PCR を行った結果²⁸⁾、EDN 変換酵素の産生は、正常部表皮と比べ変化は見られなかったが、EDN と EDNB 受容体の抗体による免疫染色は正常皮膚表皮に比べより強い染色を示し、さらにそれらの mRNA の発現もそれぞれ 8 例と 6 例の平均で 3.2 倍と 6.8 倍と顕著に亢進していたことから²⁸⁾、老人性色素斑における色素沈着メカニズムにも表皮ケラチノサイトから産生分泌される EDN-1 の亢進と、さらにメラノサイト膜上の EDNB 受容体の発現の上昇の両方により、色素沈着の亢進が誘導されている可能性が示された。EDN-1 の産生は炎症性のプライマリーサイトカインである IL-1 α と TNF α により促進されることが分かっているので、老人性色素斑表皮での EDN-1 の産生亢進の原因を探るため、これらのサイトカインの遺伝子発現を半定量的 RT-PCR にて解析したところ、IL-1 α の遺伝子発現はむしろ色素沈着表皮で正常部に比べむしろ減少しているのに対し、TNF α は色素沈着表皮で顕著な発現の増強が認められた²⁸⁾。この RT-PCR 解析結果と一致して、それぞれの抗体を用いた免疫組織染色では、IL-1 α は色素沈着部で染色強度の正常部に比べての低下を示したのに対し、TNF α は強く増加しており(図-12)²⁸⁾、EDN-1 の産生増加は TNF α の発現の増加による結果であると考えられた。さらにその後、UVB 紫外線誘導色素沈着メカニズムに SCF/c-Kit カスケードの亢進が関与していることから、紫外線色素沈着と形態が類似している老人性色素斑の色素増強メカニズムに、EDN-1 に加えて、SCF/ c-Kit カスケードの亢進も関与している可能性を検証した結果、老人性色素斑の表皮では SCF mRNA の発現が正常部に比べ 3.9 倍(6 例の平均)²⁹⁾ また c-Kit mRNA の発現は約 2.0 倍(2 例の平均)増加しており、SCF や c-Kit 抗体を用いた免疫組織染色でも正常部に比べ、表皮細胞内やメラノサイト膜上にそれぞれ強い染色像を認めた(図-12)²⁹⁾。また SCF 蛋白発現の増加は Western blotting 解析によってもかめられ、老人性色素斑の表皮では SCF 蛋白量は正常部表皮に比べて

1.6 倍上昇していた。すなわち老人性色素斑の色素沈着部表皮では UVB 誘導の色素沈着メカニズムとよく似て、EDN/EDN 受容体カスケードに加えて SCF/c-Kit カスケードの発現も同時に亢進し (図-13)、両経路のシナジー効果¹⁸⁾により色素増強がより強く発現している可能性が判明した。

図-12：老人性色素斑皮膚表皮におけるチロシナーゼ抗体陽性メラノサイト数の変化と SCF, ET-1, IL-1 α , TNF α の免疫染色像(文献 28,29 からの転載)

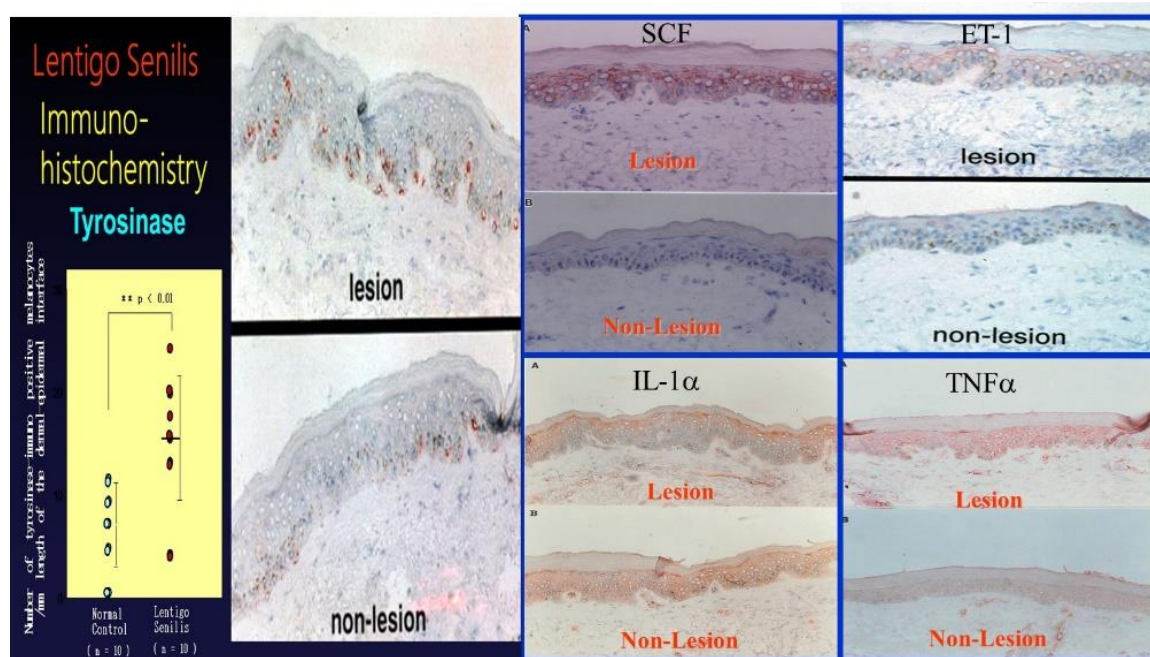
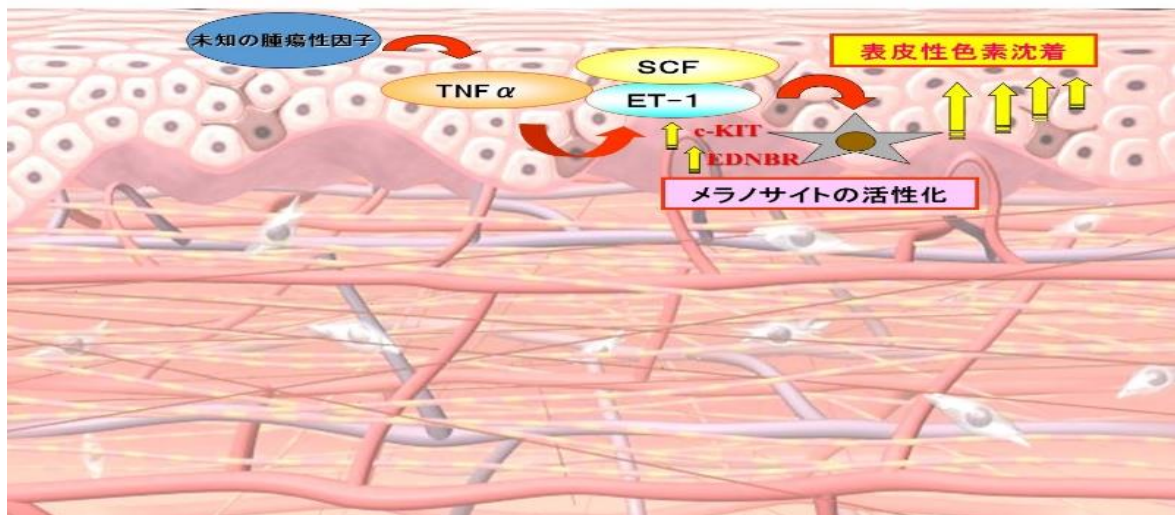


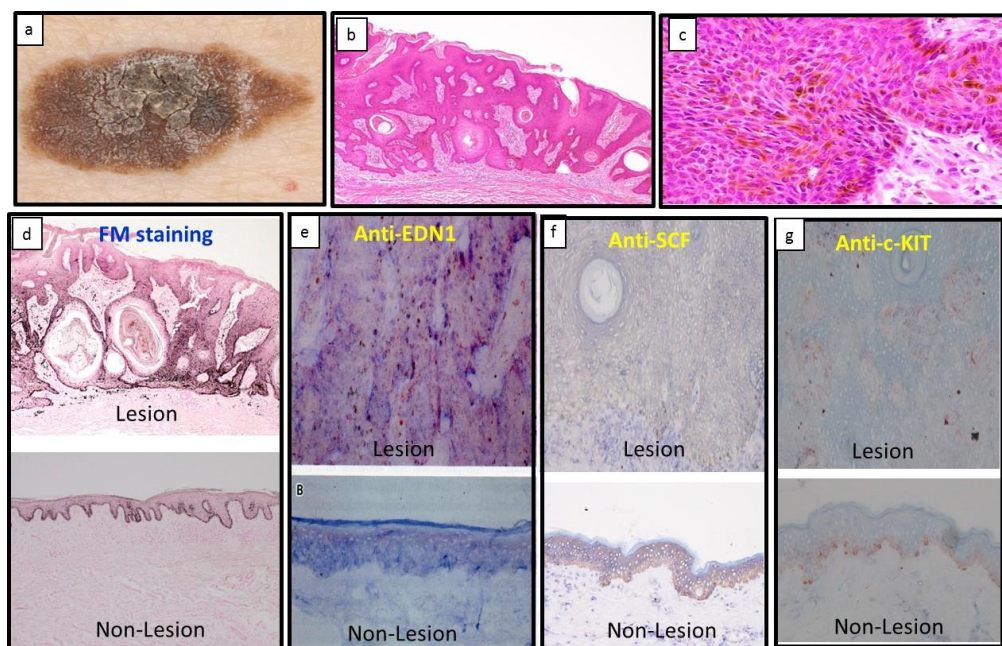
図-13：老人性色素斑における色素沈着増強のパラクリンサイトカインメカニズム



老人性疣贅

老人性疣贅は組織表面の表皮の色素沈着増強を伴う表皮細胞の良性腫瘍で、老人性色素斑から生じると考えている研究者もいる(図-14)。腫瘍領域ではチロシナーゼ酵素の遺伝子発現の増強を伴って、dopa 反応陽性のメラノサイト数の増加が認められている。

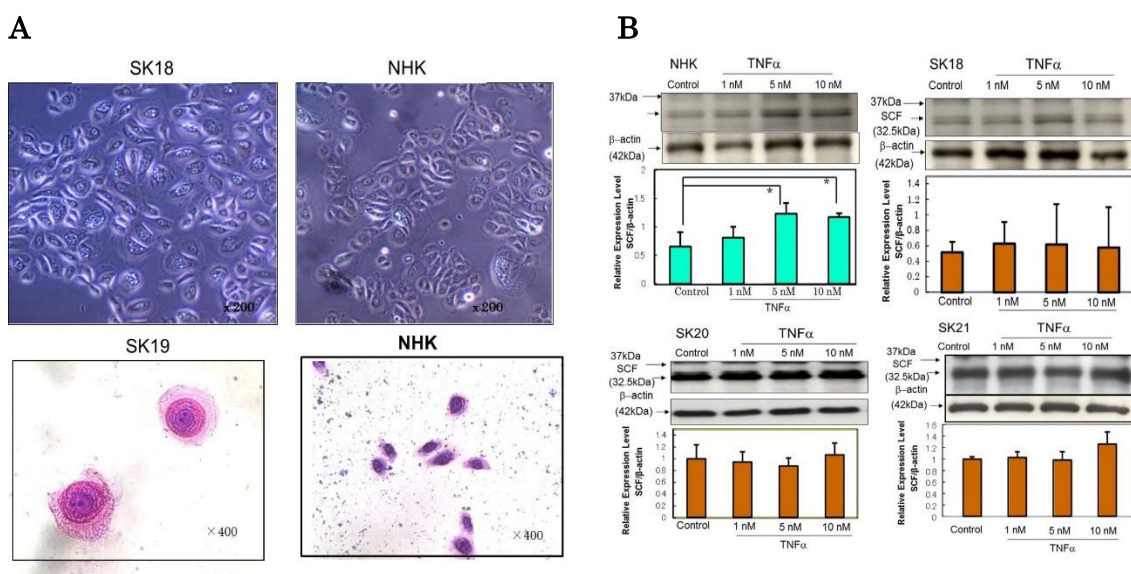
図-14：老人性疣贅の組織 a)老人性疣贅臨床像、b,c) 組織像,d)メラニン(Fontana Masson)染色像と各種サイトカインの免疫組織染色像 e) ET-1 抗体、f) SCF 抗体、g) c-Kit 抗体(文献 30, 31,32 からの転載)



メラニン合成を促進し、その数を増しているメラノサイトが腫瘍性増殖を行っているケラチノサイト(basaloid cells)に近傍に位置していることから、増殖性のケラチノサイトからメラノサイトを活性化するサイトカインが過剰に分泌されている可能性を考え、代用的なメラノジェニックサイトカインである EDN-1 の遺伝子発現を解析した結果、老人性疣贅皮膚表皮では EDN-1 の明瞭な発現上昇（平均 1.7 倍, $P < 0.01$, $n = 5$ ）が健常部位に比べて認められた。またこの発現上昇と付随してチロシナーゼ遺伝子の発現の上昇（平均 1.7 倍, $p < 0.01$, $n = 5$ ）も認められた^{30,31)}。また免疫組織学により全ての basaloid cells に一致して EDN-1 の明瞭な免疫染色強度の増加が周辺無疹部皮膚に比べて示された(図—14)。紫外線(UVB)色素沈着においては UVB 暴露により表皮ケラチノサイトから遊離する IL-1 α がオートクリン作用でケラチノサイトの受容体に結合し、EDN-1 の産生分泌促進を引き起こすこと、また TNF α は老人性色素斑での EDN-1 の産生分泌促進に関与していること、さらに EDN 変換酵素 α も関与が判明しているので、老人性疣贅皮膚表皮で EDN-1 分泌亢進の原因としてこれらの発現強度を調べた結果、TNF α (平均 2.6 倍, $n = 5$)及び EDN 変換酵素 α (平均 15.2 倍, $n = 3$)の遺伝子発現及び免疫染色による蛋白発現の増加が認められたことより、TNF α / EDN 変換酵素 α / EDN-1 の経路の活性化により EDN-1 の分泌亢進が生じていることが判明した。一方 IL-1 α (平均 0.43 倍, $n = 6$)は遺伝子及び免疫染色法での蛋白発現量はむしろ減少しており、UVB 色素沈着とは異なる EDN-1 分泌亢進メカニズムによって老人性疣贅皮膚の色素沈着増強は生じていることが明らかとなった。一方 UVB 色素沈着や老人性色素斑ではそれらの色素増強メカニズムに EDN-1 と SCF の関与が明らかとなっている。従って老人性疣贅における色

色素増強にも EDN-1 とともに SCF も同時に関与していることが容易に予想された。そこで SCF とその受容体 c-Kit の遺伝子発現及び蛋白発現さらには免疫組織染色を行った結果、いずれの発現も非腫瘍部に比べて明瞭な変化はなく、メラノサイトのメラニン合成促進に SCF/c-Kit 系は関与していないことが明らかとなった。

図-15：分離 SK 細胞の形態(A)と $\text{TNF}\alpha$ 刺激による SCF 蛋白発現の異常(B)の正常ヒトケラチノサイトとの比較(文献 32 からの転載)



この原因を調べるために老人性疣贅細胞を分離培養し、SCF や EDN-1 の産生もしくは分泌促進が $\text{IL-1}\alpha$ や $\text{TNF}\alpha$ で正常に生じるかを調べた結果、 $\text{IL-1}\alpha$ や $\text{TNF}\alpha$ の添加は SCF の産生を促進せず、一方 EDN-1 の分泌促進は明瞭に認められた(図-15) 32)。第3のメラノジェニックサイトカインである $\alpha\text{-MSH}$ のレベルは老人性疣贅表皮で健常皮膚と比較して変化がないので、老人性疣贅表皮では EDN/EDNB 受容体系のみがその色素増強シグナルに関与していることが明らかとなった。

紫外線(UVB)色素沈着、老人性色素斑及び老人性疣贅でのサイトカイン、活性化酵素のプロファイル比較

表-3 に紫外線(UVB)色素沈着、老人性色素斑及び老人性疣贅でのサイトカイン、活性化酵素のプロファイル比較した結果を示した。メラニン合成促進性サイトカインの分泌亢進を引き起こしている一次性サイトカインは紫外線(UVB)色素沈着ではIL-1 α なのに対して老人性色素斑及び老人性疣贅ではTNF α でIL-1 α はむしろ低下している。

表-3：紫外線(UVB)色素沈着、老人性色素斑及び老人性疣贅でのサイトカイン、活性化酵素のプロファイル比較

サイトカイン /活性化酵素	老人性疣贅/老人性色素斑		紫外線(UVB)色素沈着	
	腫瘍部周辺の正常皮膚との比較		非照射部皮膚との比較	
	m RNA発現量	蛋白発現量	m RNA発現量	蛋白発現量
TNF α	↑ / ↑	↑ / ↑	→	→
IL-1 α	↓ / ↓	↓ / ↓	↑	↑
ECE-1 α	↑ / ?	↑ / ?	→ 培養表皮細胞	?
ET-1	↑ / ↑	↑ / ↑	↑	↑
SCF/c-KIT	→ / ↑	→ / ↑	↑	↑

結語

第一章では表皮性色素沈着症の原因サイトカインが表皮ケラチノサイト由来のものを中心に述べたが、次の第2章では原因サイトカインが真皮線維芽細胞由来のものを、さらに第3章では外来性ケミカルおよび内来性脂質やストレスが原因となる尋常性白斑も含めた表皮性色素異常症について論述する予定である。

参考文献

- 1) Imokawa G, Kawai M, Motegi I, et al.: Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVB PUVA and allergic contact dermatitis using brownish guinea pig model. *Arch Dermatol Res*, **278** : 352-362, 1986.
- 2) Yaar M, Gilchrist BA: Human melanocyte growth and differentiation: A decade of new data. *J Invest Dermatol*, **97** : 611-617, 1991.
- 3) Halaban R, Langdon R, Birchall N, et al.: Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol*, **107** : 1611-1619, 1988.
- 4) Gordon PR, Mansur CP, Gilchrist BA: Regulation of human melanocyte growth, density, and melanization by keratinocyte derived factors. *J Invest Dermatol*. **92** : 565-572, 1989.
- 5) Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M: Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem*, **267** : 24675-24680, 1992.
- 6) Imokawa G, Yada Y, Morisaki N, et al.: Granulocyte/macrophage-colony-stimulatory factor is an intrinsic keratinocyte-derived growth factor for human melanocytes in UVA-induced melanosis. *Biochem J*, **313** : 625-631, 1996.
- 7) Imokawa G, Yada Y, Morisaki N, et al.: Biological characterization of human fibroblast-derived mitogenic factors for human melanocytes. *Biochem J*, **330** : 1235-1239, 1998.
- 8) Imokawa G : Characterization of keratinocyte and fibroblast-derived mitogens for human melanocyte- their roles in stimulated cutaneous pigmentation. ed. by Y. Hori, V. J. Hearing and J. Nakayama, *Melanogenesis and Malignant Melanoma*, Elsevier Science B. V. 1996 : 35-48
- 9) 芋川玄爾: 紫外線色素沈着に本質的に関与するヒトメラノサイト増殖因子. *日本皮膚科学会誌*, **104** : 1625-1628, 1994.
- 10) Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, et al., Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 1789-1793, 1995.
- 11) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332** : 411-415, 1988.
- 12) Yada Y, Higuchi K, Imokawa G.: Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J Biol Chem*, **266** : 18352-18357, 1991.
- 13) Oikawa A, Nakayasu M, Nohara M, et al.: Fate of L-[3,5-³H] tyrosine in

cell-free extracts and tissue cultures of melanoma cells: a new assay method for tyrosinase in living cells. *Arch Biochem Biophys*, **148**: 548-557, 1972.

14) 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.

15) Imokawa G, Yada Y, Kimura M : Signaling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem J*, **314** : 305-312, 1996.

16) Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, et al. : 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** : 578-586, 2001

17) Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y, et al.: Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am J Pathol*, **65** : 2099-2109. 2004.

18) 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.

19) Imokawa G, Ishida K : Inhibitors of Intracellular Signaling Pathways that Lead to Stimulated Epidermal Pigmentation: Perspective of Anti-Pigmenting Agents. *Int J Mol Sci*, **15** : 8293-8315, 2014.

20) 芋川玄爾: メラニンからみた美容皮膚科学 –美白剤の展望– 美容皮膚科学会誌, **24** : 17-34, 2014.

21) Suzuki I, Cone RD, Im S, et al. : Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology*, **137** : 1627-1633, 1996.

22) Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, et al.: The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res*, **10** : 218-228, 1997.

23) 川島眞、芋川玄爾 : 紫外線色素沈着と老人性色素斑における:色素増強メカニズムとカモミラ E T の抗シミ効果。Monthly Book Derma デルマ (MB Derma)、全日本病院出版会, **98** : 43-61, 2005.

24) Kobayashi T, Imokawa G, Hearing VJ : Differentiation of epidermal melanocytes by UVB irradiation in tail skin of mouse (C57BL/6J mice-aa/ee, recessive yellow) with mutation of melanocortin receptor. *Jpn J Dermatol*, **106** : 716. 1996,

- 25) Niwano T, Terazawa S, Nakajima H, et al. : Astaxanthin and withaferin A block paracrine cytokine interactions between UVB-exposed human keratinocytes and human melanocytes via the attenuation of endothelin-1 secretion and its downstream intracellular signaling. *Cytokine*, **73** : 184-197, 2015.
- 26) Mizutani Y, Hayashi N, Kawashima M, et al.: A single UVB exposure increases the expression of functional KIT in human melanocytes by up-regulating MITF expression through the phosphorylation of p38/CREB. *Arch Dermatol Res*, **302** : 283-294, 2010.
- 27) Tagashira H, Miyamoto A, Kitamura S, et al.: UVB stimulates the expression of endothelin B receptor in human melanocytes via a sequential activation of the p38/MSK1/CREB/MITF pathway which can be interrupted by a French maritime pine bark extract through a direct inactivation of MSK1. *PLOS One* 2015.
- 28) Kadono S, Manaka I, Kawashima M, et al.: The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpigmentation mechanism of lentigo senilis. *J Invest Dermatol*, **116** : 571-577, 2001.
- 29) Hattori H, Kawashima M, Ichikawa Y, et al.: The epidermal stem cell factor is over-expressed in lentigo senilis: Implication for the mechanism of hyperpigmentation. *J Invest Dermatol*, **122** : 1256-1265, 2004.
- 30) Teraki E, Tajima S, Manaka I, et al.: Role of endothelin-1 in hyperpigmentation in seborrhoeic keratosis. *Brit. J. Dermatol*, **135**: 918-923, 1996.
- 31) Manaka I, Kadono S, Kawashima M, et al.: The mechanism of hyperpigmentation in seborrhoeic keratosis involves the high expression of endothelin-converting enzyme-1 and TNF α , which stimulate secretion of endothelin-1. *Br J Dermatol*, **145** : 895-903, 2001.
- 32) Takenaka Y, Hoshino Y, Nakajima H, et al.: Paracrine cytokine mechanisms underlying the hyperpigmentation of seborrheic keratosis in covered skin areas. *J Dermatol*, **40** : 533-542, 2013.

Paracrine cytokine interaction mechanisms in epidermal hyperpigmentary disorders
Part I: Hyperpigmentation mechanisms intrinsically involved in epidermis-derived
cytokines-UVB/UVA melanosis/lentigo senilis/seborrheic keratosis-

Genji Imokawa

Research Institute for Biological Functions, Chubu University

Summary

UVB/UVA melanosis, solar lentigo (LS) and seborrheic keratosis (SK) belong to epidermal hyperpigmentary disorders for which keratinocyte-derived melanogenic paracrine cytokines are mechanistically responsible. In UVB melanosis, both endothelin (EDN)1 and membrane-bound stem cell factor (mSCF) are up-regulated at the production and/or secretion levels in an autocrine fashion by primary inflammatory cytokine interleukin (IL) 1 in UVB-exposed epidermis and serve as a stimulator for melanogenesis in epidermal melanocytes. Up-regulated expression of corresponding receptors, endothelin B receptor and SCF receptor, c-Kit is also involved in the hyperpigmentation mechanisms. On the other hand, in UVA melanosis, granulocyte macrophage colony stimulatory factor (GM-CSF) is an intrinsic melanogenic cytokine secreted by UVA-exposed keratinocytes. In LS, eventually up-regulated secretion of tumor necrosis factor (TNF) α in the lesional epidermis triggers keratinocytes in an autocrine fashion to stimulate the production and secretion of EDN1 and SCF which result in the activation of melanocytes in a fashion similar to UVB-melanosis. In SK, SCF expression is not stimulated in spite of the high secretion level of EDN1 in the SK lesional pigmented epidermis compared to non-lesional epidermis. Comparison of cytokine responses between SK cells and human primary keratinocytes revealed that SK basaloid cell lines have a poor ability to respond to IL-1 β or TNF α in stimulating the production of SCF but not the secretion of EDN1, which results in the diminished levels of SCF expression in the SK lesional epidermis. Despite the SCF deficiency, the markedly upregulated levels of TNF α secretion as well as a large number of SK basaloid cells mainly contribute to the stimulation of EDN1 secretion because there is no abnormality in the EDN1 stimulation machinery, which in turn leads to the hyperpigmented state in the SK skin.

Key words: epidermal hyperpigmentary disorders, epidermal keratinocytes, paracrine melanogenic factors, endothelin, stem cell factor.

図表の説明

図-1：最小紅斑量(Minimam Erythematous Dose：MED)の2倍のエネルギーのUVBをヒト前腕皮膚に照射した一日後に生じた紅斑と5日目に認められた色素沈着

図-2：UVB, UVA 暴露培養ヒトケラチノサイト及び無照射ヒトフィブробラスト培養上清のヒトメラノサイトへの添加による細胞内カルシウム動員作用とDNA合成促進作用

図-3：UVB照射ヒトケラチノサイト培養上清をヒトメラノサイトに添加した際に生じるDNA合成促進作用に対する各種サイトカイン抗体の添加効果図-4

図-4：ヒトケラチノサイト及びヒトフィブробラストとヒトメラノサイト間におけるメラノサイト活性化パラクリンサイトカインネットワーク

図-5A：褐色モルモット皮膚にUVBを照射し2日後にACK2抗体(c-Kit抗体)皮下注射で生じる色素沈着増強の抑制効果の色素沈着像

図-5B：褐色モルモット皮膚にUVBを照射し2日後にACK2抗体皮下注射で6, 10日後の表皮dopa染色陽性メラノサイト数の変化

図-6：ヒト皮膚のUVB暴露後の表皮組織におけるSCF, c-Kit, EDN1 (ET-1), EDNB受容体(ET_BR), tyrosinase(チロシナーゼ)の遺伝子発現の経過

図-7：紫外線(UVB)色素沈着のパラクリンサイトカインメカニズム

図-8：Toshiba BLB lampでのUVA累積照射(総照射エネルギー：～2 J/cm²)によりヒト前腕皮膚に生じた色素沈着の亢進

図-9A：UVA (Toshiba BLB lamp)照射(1.0 J/cm²)培養ヒトケラチノサイト培養上清中のメラノサイト活性化因子のクロマトグラフィーによる分離同定

図-9B：分離された活性フラクシオン添加によるヒトメラノサイトDNA合成促進効果のGM-CSF抗体による中和作用

図-9C：UVA照射(1.0 J/cm²)ヒトケラチノサイトにより分泌されるサイトカイン量

図-10：UVA照射による色素沈着増強のパラクリンサイトカインメカニズム

図-11：老人性色素斑の臨床像と組織像

図-12：老人性色素斑皮膚表皮におけるチロシナーゼ抗体陽性メラノサイト数の変化とSCF, ET-1, IL-1 α , TNF α の免疫染色像

図-13：老人性色素斑における色素沈着増強のパラクリンサイトカインメカニズム

図-14：老人性疣贅の組織 a)老人性疣贅臨床像、b,c)組織像、d)メラニン(Fontana Masson)染色像と各種サイトカインの免疫組織染色像 e) ET-1抗体、f) SCF抗体、g) c-Kit抗体

図-15：分離SK細胞の形態(A)とTNF α 刺激によるSCF蛋白発現の異常(B)の正常ヒトケラチノサイトとの比較

表-1：種々サイトカインの培養ヒトメラノサイトへのDNA合成促進作用と細胞内カル

シウム動員作用(Calcium mobilization)

表-2 : ET-1(EDN-1),Membrane bound-SCF(mSCF), α MSH, bFGF の原因サイトカインとして必要な5つの条件に関する検証結果のまとめ

表-3 : 紫外線(UVB)色素沈着、老人性色素斑及び老人性疣贅でのサイトカイン、活性化酵素のプロファイル比較