

原著

紫外線防御機構におけるメラノサイト、ケラチノサイトの エンドセリン-1 / 幹細胞因子を介した相互作用

赤坂 英二郎¹⁾ 中野 創¹⁾ 神 可代¹⁾ 木村 一之¹⁾
六戸 大樹¹⁾ 芋川 玄爾^{1,2)} 澤村 大輔¹⁾

抄録 皮膚の紫外線防御において中心的な役割を担っているのはメラニンである。エンドセリン-1(ET-1)、幹細胞因子(SCF)はUVB照射時にケラチノサイトから分泌され、メラニン合成を促進する。本研究では正常ヒトメラノサイト(NHM)においてET-1、SCFによりUVB照射による細胞死が減少することを解明し、そのメカニズムについて検討した。ET-1、SCF添加によりNHMにおいて生体防御因子の一つであるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)発現が誘導された。ET-1/SCFはメラニン産生を介してケラチノサイトを防御し、HO-1を介してメラノサイトの紫外線防御にも関与しており、皮膚紫外線防御機構にはET-1/SCFを介したメラノサイト、ケラチノサイトの相互作用があると考えられた。

弘前医学 62 : 138—143, 2011

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ-1；エンドセリン-1；幹細胞因子；メラノサイト；紫外線防御。

ORIGINAL ARTICLE

THE INTERACTION OF PHOTOPROTECTIVE EFFECTS BETWEEN KERATINOCYTES AND MELANOCYTES VIA ENDOTHELIN-1/STEM CELL FACTOR SIGNALINGS

Eijiro Akasaka¹⁾, Hajime Nakano¹⁾, Kayo Sato-jin¹⁾, Kazuyuki Kimura¹⁾,
Daiki Rokunohe¹⁾, Genji Imokawa^{1,2)} and Daisuke Sawamura¹⁾

Abstract Ultraviolet (UV) radiation is one of the important etiologic factors for skin cancer. Pigmentation of the skin is the major photoprotective mechanism against UV radiation on human skin. Pigmentation depends on the function of melanocytes, which produces melanin and transfers melanosomes to surrounding keratinocytes. Endothelin-1 (ET-1), and stem cell factor (SCF) are cytokines secreted by UVB-exposed keratinocytes, playing pivotal roles in regulating the melanogenesis in normal human melanocytes (NHM). In this study, we demonstrated that treatment with ET-1 and/or SCF not only stimulated melanogenesis but also significantly suppressed the UV-induced cell death in NHM. In addition, we revealed that expression of heme oxygenase-1 (HO-1), an anti-oxidative protein, is up-regulated by ET-1 or SCF in NHM. Taken together, ET-1/SCF, secreted by UV-irradiated keratinocytes, increases HO-1 expression, thereby protecting melanocytes from UV-induced apoptosis, and stimulates melanin synthesis in melanocytes to protect keratinocytes from UV-induced cell damage. It can be regarded as the interaction of photoprotective effect between keratinocyte and melanocyte.

Hirosaki Med. J. 62 : 138—143, 2011

Key words: Heme oxygenase-1; Endothelin-1; Stem cell factor; melanocyte; photoprotection.

¹⁾ 弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座

²⁾ 東京工科大学応用生物学部

別刷請求先：中野 創

平成22年12月8日受付

平成23年1月5日受理

¹⁾ Department of Dermatology, Hirosaki University
Graduate School of Medicine

²⁾ Tokyo University of Technology, School of Bioscience
and Biotechnology

Correspondence: H. Nakano

Received for publication, December 8, 2010

Accepted for publication, January 5, 2011

緒 言

紫外線照射は皮膚悪性腫瘍の発症の重要な危険因子であり、紫外線障害に対する皮膚の防御機構の解明は、皮膚悪性腫瘍の発症を制御するうえで極めて重要である。

皮膚の紫外線防御において中心的役割を果たしているのがメラニンである。メラノサイトで産生されたメラニンはケラチノサイトに転送され、核上方にメラニンキャップを形成し、ケラチノサイトを紫外線照射による DNA 障害から防御している^{1,2)}。

紫外線照射時にケラチノサイトからメラニン産生を促進する様々なサイトカインが分泌される。その中でエンドセリン-1(Endothelin-1, ET-1)、幹細胞因子(Stem cell factor, SCF)、 α -メラノサイト刺激ホルモン(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)はメラニン産生においてきわめて重要な役割をはたしている³⁻⁶⁾。さらに、 α -MSHはメラニン産生を促進するのみならず、メラノサイトに様々な防御因子を誘導し、メラノサイトの紫外線防御機構に関与している⁷⁻⁹⁾。しかし、ET-1 や SCF に関しては、メラノサイトの紫外線防御機構に関与しているか否か、詳細な検討がほとんどなされていない。

本研究でわれわれは ET-1, SCF も何らかの生体防御因子を誘導して紫外線防御に関与している可能性があると考え、種々の検討を行った。

材料および方法

試薬

正常メラノサイト用培地 Medium 254, 増殖因子加培地添加物 HMGS は Kurabo 社より, ET-1 は Sigma Aldrich 社より, リコンビナントヒト SCF は PEPROTECH 社より, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay は Promega 社より, RNeasy Mini Kit は QIAGEN 社より, ReverTra Ace- α , KOD plus polymerase は Toyobo 社より, iQ SYBER Green PCR supermix は Calbiochem 社より, またその他の試薬はすべて Nacalai Tesque 社より購入した。

細胞培養

正常ヒトメラノサイト(Normal Human Melanocyte,

NHM) は 0.2%V/N ウシ下垂体抽出物(BPE), 0.5%V/N ウシ胎仔血清(FBS), 3 ng/ml ヒト線維芽細胞増殖因子-B(hFGF-B), 0.5 mM ヒドロコチゾン, 5 mg/ml インスリン, 5 mg/ml トランスフェリン, 10 ng/ml フォルボール-12-ミリスチン酸-13-アセテート(PMA), および 3 mg/ml ヘパリンを含む HMGS を添加した培地 Medium 254 で培養した。ET-1, SCF を用いた実験では、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄したのち、増殖因子である BPE, FBS, hFGF-B および PMA を除去した Medium254 で 24 時間スターベーションし、その後 ET-1, SCF を添加した。すべての培養は 37°C, 5% CO₂, 95% 空気, 湿潤環境のインキュベーター内で行った。

定量的リアルタイム RT-PCR

RNeasy Mini Kit を用いて、培養細胞より RNA を抽出した。ReverTra Ace をもちいて下記の条件で逆転写し cDNA を精製した(ステージ 1 : 30°C, 10 分, ステージ 2 : 42°C, 20 分, ステージ 3 : 99°C, 5 分, ステージ 4 : 4°C, 5 分)。mRNA 発現量は iQ SYBR Green PCR supremix, Opticon2 をもちいてリアルタイム RT-PCR を行い定量化した。ヘムオキシゲナーゼ-1(Heme oxygenase-1, HO-1) および glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプライマーは下記の通りデザインした。HO-1-forward (5'-GAGACGGCTTCAAGCTG-3'), HO-1-reverse(5'-GTGTGTAGGGGATGACC-3'), GAPDH-forward

(5'-GCCATCAATGACCCCTTCATT-3'),

GAPDH-reverse

(5'-TTGACGGTGCCATGGAATTT-3')。PCR の反応は下記条件で行った(ステージ 1 : 95°C, 3 分, ステージ 2 : 95°C, 15 秒, ステージ 3 : HO-1 60°C および GAPDH 61°C, 30 秒(アニーリング), ステージ 4 : 72°C, 30 秒, ステージ 2-4 は 40 サイクル行い, ステージ 5 : 4°C, 10 分)。

生存細胞数の測定

NHM を 96 ウェルプレートで 20,000 細胞 / ウェルの細胞密度で培養し, 24 時間スターベーションした。その後, ET-1 (10 nM) および SCF (10 nM) を添加して 8 時間培養し, 培地を除去して PBS を加え UVB (30 mJ/cm²) を照射した。UVB 照射後, PBS を除去し, 再び ET-1, SCF を加えた

培地で24時間培養し, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて生存細胞数を計測した.

結 果

ET-1 および SCF は UVB 照射によるメラノサイトの細胞死を抑制する

ET-1 および SCF が UVB 照射によるメラノサイトの細胞障害に対する防御機構に, どのように関与しているか検討するため, NHM を ET-1 (10 nM), SCF (10 nM) で 8 時間前処置したのち, 30 mJ/cm² の UVB を照射し, 24 時間後に生存細胞数を CellTiter-Gro Cell Viability Assay を用いて測定した.

UVB 照射により細胞死が起こり, メラノサイトの生存細胞数は減少したが, ET-1, SCF で前処置したメラノサイトでは UVB 照射による細胞死は有意に抑制され, 生存細胞数が増加していた. また, ET-1 と SCF を同時に添加することにより, ET-1, SCF を単独で添加した場合と比較し

て有意に UVB 照射時の生存細胞数が増加しており, 相加的な細胞死抑制効果が認められた(図 1).

ET-1 および SCF は NHM において HO-1 mRNA 発現を上昇させる

次に, ET-1 および SCF による紫外線照射による細胞死抑制にどのような生体防御因子が関与しているか検討するため, メラノサイトにおいて ET-1, SCF 刺激で発現が上昇する防御因子を検索した.

HO-1 は生体防御タンパク質のひとつでヘム代謝の律速酵素である¹⁰. HO-1 は種々の細胞において, 紫外線照射を含む様々なストレス刺激により誘導されることが知られている¹¹⁻¹⁵. HO-1 発現が ET-1 および SCF 刺激で増加するか否か検討するため, NHM に ET-1 (10 nM), SCF (10 nM) を添加して 2 時間後に細胞を回収して mRNA を抽出し, リアルタイム PCR にて HO-1 の mRNA 発現を定量的に検討した.

ET-1 および SCF 添加により HO-1 mRNA 発現は有意に上昇した. さらに, ET-1 と SCF の同時刺激により, ET-1, SCF 単独で投与した場合

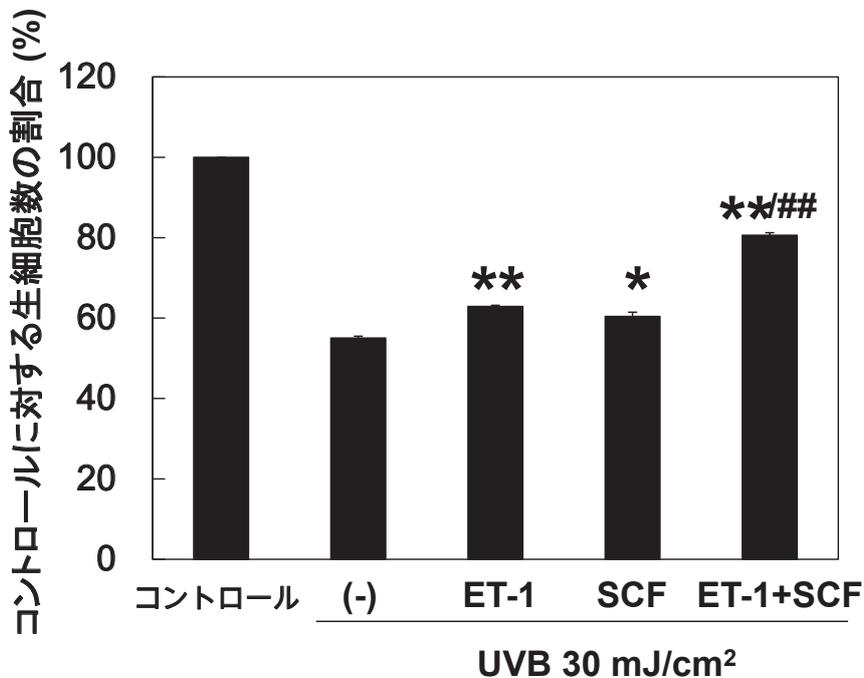


図 1. ET-1 および SCF は紫外線照射による NHM の細胞死を抑制し, 生存数を増加させる. NHM を ET-1 (10 nM), SCF (10 nM) で 8 時間前処置した後, UVB (30 mJ/cm²) を照射し, 24 時間後に生存細胞数を Cell-Titer cell viability assay を用いて測定した. 結果は 3 回行った実験の 1 つである (Student *t* 検定. ***P*<0.01, **P*<0.05 vs. UVB 照射 ET-1/SCF 未処置 NHM. ##*P*<0.01 vs. UVB 照射 ET-1 加 NHM).

と比較して有意に HO-1 の mRNA 発現が上昇しており, 相加的な発現上昇が認められた(図 2)。

考 察

紫外線防御において, ケラチノサイトの観点からすると, 紫外線障害から自己の DNA を防御するためには, まずメラニンを供給するメラノサイトを防御する必要がある。したがってケラチノサイトから分泌されるサイトカインには, メラニン産生を促進する作用のみならず, メラノサイトを紫外線障害から防御する何らかの作用があると考えられる。

本研究の結果より, ET-1 および SCF にも, UVB 照射によるメラノサイトの細胞死を抑制する効果があることが明らかになった(図 1)。ET-1, SCF はメラノサイトの細胞増殖を促進するが⁶⁾, 本研究で使用した濃度(ET-1(10 nM)および SCF(10 nM))ではメラノサイトの有意な細胞増殖起こさないことがわれわれの実験で明らかになっており(未発表データ), この ET-1 や SCF

添加による生存細胞数減少の抑制効果は, 細胞増殖促進効果によるものではなく, ET-1 や SCF が UVB 照射による細胞死を抑制した結果と考えられる。

この ET-1, SCF による紫外線防御作用の詳細なメカニズムは不明であるが, 本研究で ET-1, SCF が生体防御因子のひとつである HO-1 発現を上昇させることが明らかになり(図 2), HO-1 が ET-1, SCF による紫外線防御に関与している可能性が示唆された。しかし, 図 1 に示したように ET-1, SCF 添加による UVB 照射時の細胞死抑制効果は部分的なものであり, メラノサイトの紫外線防御には HO-1 発現上昇以外のメカニズムも存在すると考えられるが, それを詳細に検討するのは今後の研究課題である。

ケラチノサイトとメラノサイトは, メラニンの転送以外にも, お互いの機能, 増殖, 分化などを調整する機構が存在している。本研究の結果より, 紫外線照射時にケラチノサイトから分泌されるサイトカインのうち ET-1 および SCF には, メラニン産生を促進するのみならず, HO-1 発現上昇

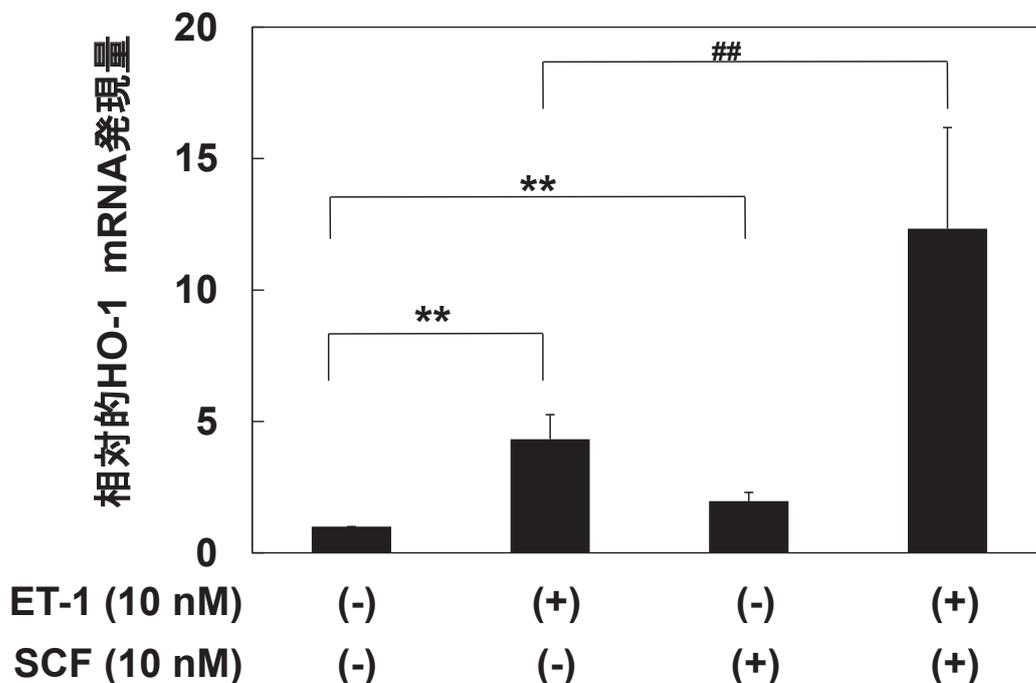


図 2. NHM における HO-1 に対する ET-1 および SCF の相加的効果。NHM は ET-1(10 nM)と SCF(10 nM)の一方, または両方で 2 時間刺激した後, 全 RNA を抽出しリアルタイム RT-PCR を行った。結果は 3 回行った実験の平均値 ± 標準偏差である (**P<0.01 vs. コントロール, ##P<0.01 vs. UVB 照射 ET-1 処置 NHM)。

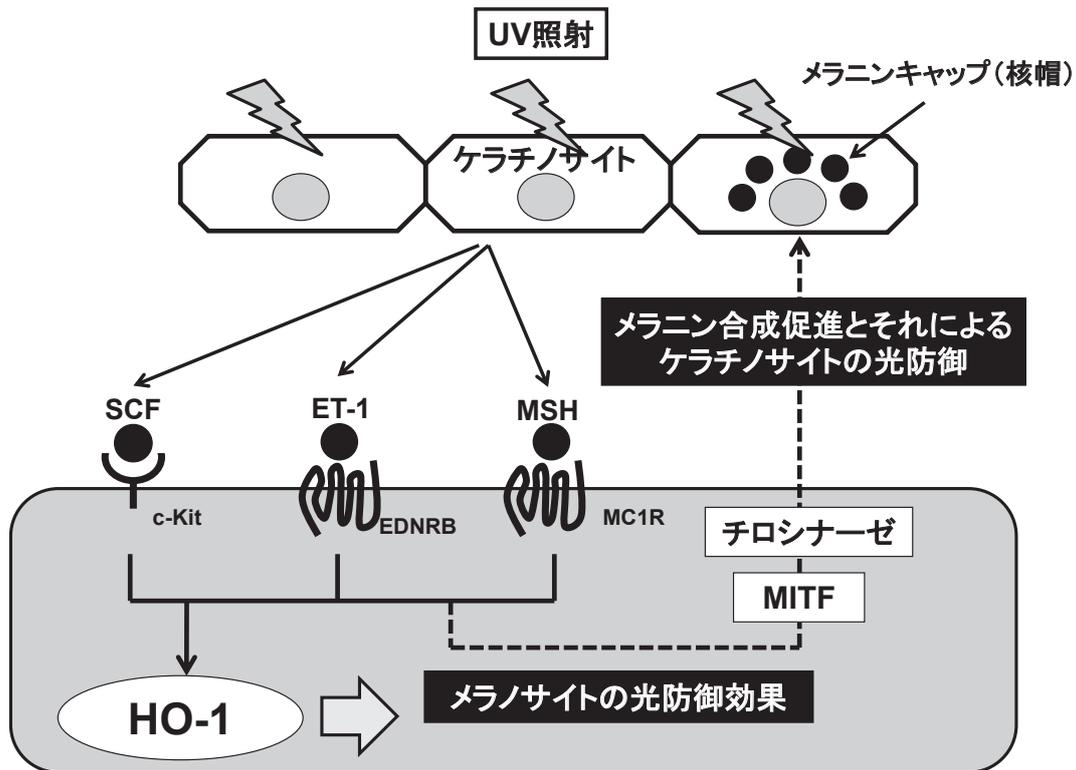


図3. ケラチノサイトおよびメラノサイト間の光防御における相互作用. UVBを照射されたケラチノサイトはET-1, SCFあるいは α -MSHを含むメラニン産生促進因子を生成分泌する. これら促成因子によりメラノサイトはメラニン合成を促進し, 周囲のケラチノサイトにメラノソームを供給する. ケラチノサイトの核上すなわち表皮外層側ではメラニンがメラニンキャップ(核帽)を形成し, UVBによるDNAの損傷を防いでいる. さらに, メラノサイトはET-1, SCFあるいは α -MSHの刺激を受けてHO-1の発現を増やし, UVBによるアポトーシスを防いでいる.

を介してメラノサイトの細胞死を抑制する作用があると考えられた. すなわち, 皮膚紫外線防御において, メラノサイトはメラニン産生によりケラチノサイトを防御し, ケラチノサイトはサイトカイン分泌によりメラノサイトを防御するという相互作用が存在していることが示唆された(図3).

文 献

- 1) Pathak MA, Jimbow K, Fitzpatrick T. Photobiology of pigment cell. In: Seiji M, editor. Phenotypic expression in pigment cells. Tokyo (Japan): University of Tokyo Press; 1980. p.655-70.
- 2) Kobayashi N, Nakagawa A, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, Ishigaki Y, et al. supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1998;110:806-10.
- 3) Tada A, Suzuki I, Im S, Davis MB, Cornelius J, Babcock G, Nordlund JJ, et al. Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Deffe* 1998;9:575-84.
- 4) 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* 1995;105:32-7.
- 5) 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* 2000;275:33321-8.
- 6) Sato-Jin K, Nishimura EK, Akasaka E, Huber W, Nakano H, Miller A, Du J, et al. Epistatic connections between microphthalmia-associated

- transcription factor and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders. *FASEB J* 2008;22:1155-68.
- 7) Bohm M, Wolf I, Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger TA, Schwarz T, et al. α -Melanocyte-stimulating Hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *J Biol Chem* 2005;280:5795-802.
- 8) Kadekaro AL, Kavanagh R, Kanto H, Terzieva S, auser J, Kobayashi N, Schwemberger, et al. α -Melanocortin and Endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer Res* 2005;65:4292-9.
- 9) Busca R, Gaggioli C, Khaled M, Khaled M, Bkllle K, Marchetti B, Thyss R, et al. Hypoxia-induced factor 1a is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J Cell Biol* 2005;170:49-59.
- 10) Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger genes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54.
- 11) Alam J, Shibahara S, Smith A. Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *J Biol Chem* 1989;264:6371-5.
- 12) Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5987-91.
- 13) Stuhlmeier KM. Activation and regulation of Hsp32 and Hsp70. *Eur J Biochem* 2000;267:1161-7.
- 14) Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:H883-H891.
- 15) Jozkowicz A, Huk I, Nigisch A, Weigel G, Weidinger F, Dulak J. Effect of prostaglandin-J(2) on VEGF synthesis depends on the induction of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:577-585.