

論文提出者氏名	病態制御科学領域内分泌代謝内科学教育研究分野 氏名 綿貫 裕
<p>(論文題目)</p> <p>Involvement of Nurr-1/Nur77 in corticotropin-releasing factor/urocortin1-induced tyrosinase-related protein 1 gene transcription in human melanoma HMV-II cells. (ヒトメラノーマ HMV-II 細胞における CRF 及び urocortin-1 による tyrosinase-related protein 1 遺伝子発現作用)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>1.目的</p> <p>紫外線は、ヒト角化細胞とメラニン細胞において、α-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH) の産生を刺激する^(1,2)。産生された α-MSH は、受容体結合以降、メラニン細胞に特異的な転写因子である microphthalmia-associated transcription factor (MITF) の転写活性を促進させる。更に、MITF により誘導された tyrosinase-related protein 1 (TRP1) は、メラニン合成を刺激する。一方、哺乳類の皮膚において、corticotropin-releasing factor (CRF)、そのファミリーペプチドである urocortin (Ucn) 及び CRF 受容体の発現が確認されている^(3,4)。CRF は、ヒトメラニン細胞において、proopiomelanocortin (POMC) 遺伝子の発現及び POMC 産生を促進させるが、これらホルモンの皮膚における役割とその制御機構については十分に解明されていない⁽⁵⁾。</p> <p>本研究では、ヒトメラノーマ HMV-II 細胞において、CRF 及び Ucn1 による TRP1 遺伝子及び蛋白発現への影響について検討した。更に、CRF/Ucn1、α-MSH や MITF による TRP1 遺伝子の転写活性増加作用において、転写因子 Nurr-1/Nur77 の関与を検討した。</p> <p>2.対象と方法</p> <p>ヒトメラノーマ HMV-II 細胞を DMEM/F-12 培地で継代培養し、CRF、Ucn 及び CRF 受容体の発現について、RT-PCR 法により検討した。</p> <p>TRP1 5'-promotor luciferase を導入した細胞にて、CRF 又は Ucn1 (100 nM) 添加による TRP1 の転写活性を調べ、更に、TRP1 蛋白発現への影響を検討した。続いて、選択的 CRF 受容体阻害剤を前投与して、TRP1 遺伝子転写活性作用における CRF 受容体サブタイプの間について検討した。</p> <p>Real-time PCR 法にて、CRF 又は Ucn (100 nM) の添加による Nurr-1/Nur77 mRNA レベルの変化について検討した。また、Nurr-1/Nur77 は、TRP1 の 5'-promotor 領域にある NGFI-B response elements (NBREs) を介して作用することが知られているが、この NBREs を欠失・変異させた 5'-promotor luciferase を用いて、Nurr-1/Nur77 や CRF/Ucn 1 作用の変化を検討した。更に、Nurr-1/Nur77 と MITF の細胞内導入による TRP1 の転写活性作用についても調べた。</p> <p>統計学的処理は ANOVA を用い、引き続き Fisher's PLSD post-hoc test を行なった。P < 0.05 をもって有意とした。</p> <p>3.結果</p> <p>HMV-II 細胞において、CRF、Ucn1 及び CRF 受容体 1 型 (CRFR₁) mRNA の発現が確認された。また、Ucn2 mRNA の弱い発現を認めた。CRF 又は Ucn1 添加により、HMV II 細胞での TRP-1 転写活性は有意な増加を認めた。TRP1 蛋白レベルも同様に増加した。選択的 CRFR₁ 阻害剤で</p>	

ある antalarmin を前投与すると、CRF/Ucn による TRP1 転写活性の増加は抑制された。一方、CRF 受容体 2 型 (CRFR₂) 阻害剤である antisauvagin-30 の前投与では、同活性の抑制は認めなかった。よって、TRP1 遺伝子の転写活性化には、CRFR₁ の関与が示唆された。CRF/Ucn の添加によって、Nurr-1/Nur77 mRNA はそれぞれ増加した。また、Nurr-1/Nur77 の導入は、どちらも容量依存的に TRP1 転写活性を増加させた。同作用は、NBREs の欠失・変異によって減弱した。CRF 及び Ucn1 による TRP1 活性増加も同様であった。更に、TRP1 転写活性は、MITF 導入により容量依存的に増加し、MITF は Nurr-1/Nur77 どちらとの同時導入によっても、相加的に TRP1 の転写活性を増加させた。

4. 考察

HMV-II 細胞において、CRF、Ucn1、Ucn2 及び CRFR₁ mRNA の発現が確認された。また、CRF/Ucn1 は共に TRP1 遺伝子転写及び蛋白発現の増加に寄与し、CRFR₁ 阻害剤前投与が遺伝子転写活性増加を抑制していることが明らかとなった。以上から、CRF/Ucn が、CRFR₁ を介して同細胞に作用すると考えられた。更に、CRF 及び Ucn1 は、Nurr-1/Nur77 の mRNA レベルを増加させ、これらの因子は、TRP1 遺伝子の転写促進に関わると考えられた⁽⁶⁾。更に、同作用には、TRP1 5'-promotor 領域にある NBREs を介していることが確認された。

HMV II 細胞においては、 α -MSH の前駆体である POMC が発現していない。よって、 α -MSH が TRP1 転写を刺激する系として、 α -MSH が角化細胞から供給される可能性が考えられた。それに対して、メラニン細胞自身で産生された CRF/Ucn1 は、自己分泌によりメラニン細胞に作用することが強く示唆された。この経路は、 α -MSH による刺激経路からは独立した機構で、CRFR₁ を介して、転写因子 Nurr-1/Nur77 を刺激し、これら因子が NBREs に結合して TRP1 遺伝子の発現を促進させると考えられた。

5. 結語

ヒトメラノーマ HMV-II 細胞で CRF、Ucn1、Ucn2 及び CRFR₁ mRNA の発現を認めた。CRF 及び Ucn は、TRP1 の転写活性を刺激した。更に Nurr-1/Nur77 mRNA レベルを増加させ、かつ、Nurr-1/Nur77 と MITF の同時添加により、TRP1 の転写活性は相加的に増加した。

CRF 及び Ucn1 は、ヒトメラノーマ HMV-II 細胞で、 α -MSH の刺激とは非依存的に、転写因子 Nurr-1/Nur77 を介して、TRP1 遺伝子の発現に寄与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Chakraborty AK, et al. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim. Biophys. Acta* 1313: 130-8, 1996.
- 2) Schauer E, et al. Proopiomelanocortin derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 93: 2258-62, 1994.
- 3) Slominski A, et al. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr. Rev.* 21: 457-87, 2000.
- 4) Slominski A, et al. Cutaneous expression of corticotropin releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *FASEB J.* 15: 1678-93, 2001.
- 5) Slominski A, et al. CRH stimulation of corticosteroids production in melanocytes is mediated by ACTH. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288: E701-6, 2005.
- 6) Murphy EP, et al. Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the Nurr-1/Nur77 subfamily of nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 11: 39-47, 1997.

