

いわゆる“しみ”(肝斑など)の発症機構と その増悪因子に関する研究

秋田大学医学部

秋田大学医学部

秋田大学医学部

富田 靖・前田 憲寿・松永 純

Normal human epidermal melanocytes became swollen and more dendritic with an increase in the amount of tyrosinase activity and immunoreactive tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) when they were cultured for 2 days with each one of [Nle⁴, D-Phe⁷] α melanocyte-stimulating hormone (α MSH), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). Estradiol, estriol, progesterone and ACTH affected the melanocyte morphology and the amount of TRP-1, but did not increase the tyrosinase activity. These data suggest that all of those hormones, especially α MSH, FSH and LH, may be responsible for the induction of facial hyperpigmentation such as chloasma.

1 緒 言

多くの日本人女性は、中年になると顔面の色素沈着、いわゆる“しみ”に悩まされる。この顔面の色素沈着の大部分は、肝斑と呼ばれる、眼周囲や頬部の褐色の色素増加で、早い女性で30歳前後より出現する。この肝斑の発症機序は不明であるが、妊娠時には増悪すること¹⁾、女性により月経時にも濃くなること²⁾、閉経後の女性に肝斑が見られないこと、避妊用のピルにより肝斑が誘発されること³⁾、そして男性には極めてまれであることなどから、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、卵胞ホルモン、黄体ホルモンなどの女性ホルモンが肝斑の発症および増悪に関与していることが推察される。

さてこれらの女性ホルモンが直接に色素細胞に働いて、メラニン色素の増加をもたらすのか否かは、肝斑の発症機序を知る上で重要であるにも関

わらず、ヒト色素細胞を用いてこれらのホルモン種々の女性ホルモンの効果を、細胞形態の変化、メラニン生成に関与する酵素の増加を指標にして調べた。

2 実 験

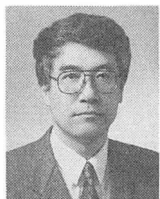
2・1 材料

実験に使用した主な試薬は以下のとおりである。phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), insulin, hydrocortisone, N⁶, O²-dibutryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (dbcAMP), [Nle⁴, D-Phe⁷] α melanocyte-stimulating hormone (以下単に α MSHと略す), follicle-stimulating hormone (FSH) 以上はSigma製。 β melanocyte-stimulating hormone (β MSH) (Bachem Co.), luteinizing hormone (LH) (UCB bioproducts), MCDB153 (極東製薬), epidermal growth factor (EGF) (湧永製薬), bovine pituitary extract (Clonetics Co.), human basic fibroblast growth factor (bFGF) (Amersham社)。

2・2 色素細胞の培養

色素細胞の培養は、以前に我々が開発した吸引水疱を用いた方法によって行った⁴⁾。簡単にその

Effect of pituitary and ovarian hormones on
normal human melanocytes in vitro.



Yasushi Tomita

School of Medicine

Akita University

方法を述べる。健康人男性（年齢20～24才）の前の直接作用を調べた報告はいまだにない。そこで本研究において、培養ヒト正常色素細胞に対する腕をヒビテンで消毒後、抗真菌剤ビフォナゾール含有クリームを滅菌ヘラで塗布する。20mlのディスポザブル注射筒の外筒を4ヶ所または8ヶ所皮膚に密着し、陰圧（300-350mmHg）で、1時間～2時間吸引すると表皮と真皮が遊離し、吸引水疱が形成される。表皮全層よりなる水疱蓋を無菌的に切除し、それを0.25%トリプシンEDTA/PBS液で37℃、30分処理して、表皮細胞をバラバラに分離する。これら表皮細胞の大部分は角化細胞で、色素細胞は数%しか含まれていないが、後述の培地にて培養を続けると、角化細胞は増殖せず分化をとげ死滅し、いずれ色素細胞のみとなる。

2・3 色素細胞の形態とチロシナーゼ活性およびチロシナーゼ関連蛋白量の測定

単離した色素細胞を20ng/mlPMA、ウシ脳下垂体抽出液含、EGF、インシュリンとハイドロコルチゾンを含む10%FCS/MCDB153培地で4日間培養後、10%FCS/MCDB153のみの培地に交換し、さらに3日間培養した。この初代培養ヒト色素細胞に種々のホルモンを添加し、二日間培養した後にメタノール/アセトンで固定した。これを抗チロシナーゼ関連蛋白1抗体（TMH-1）⁶⁾とFITC抗ラットIgG抗体で染色し、個々の細胞の一個あたりの相対蛍光強度を測定して、チロシナーゼ関連蛋白1（tyrosinase-related protein 1, TRP-1）量の相対変化を調べた。また蛍光顕微鏡で写真を撮り、色素細胞の形態変化（樹状突起の数、細胞周囲長、細胞面積）をイメージスキャナーを用い、すでに報告した方法⁶⁾で測定した。またチロシナーゼ活性を前田らの方法⁷⁾で定量した。

2・4 統計的処理

個々の色素細胞30個について蛍光強度、樹枝状突起の数、周囲長、面積のそれぞれの平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはStudent's t-testを用いた。

3 結 果

3・1 下垂体ホルモンのTRP-1への影響

まず下垂体前葉から分泌される性ホルモンである黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)について、同じ下垂体から分泌されるACTHと、 β 色素細胞刺激ホルモン(β MSH)とともに比較検討した。またすでに色素細胞にたいする刺激効果が報告されている α 色素細胞刺激ホルモン(α MSH)^{8, 9)}を、陽性コントロールとして加えて検討した。 β MSH、 α MSH、ACTH、FSH、LHについて、それぞれ終濃度が1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml、1 μ g/mlになるように培地へ加えて培養した後、色素細胞中のTRP-1の相対量を測定し、それぞれの平均値 $\pm$ SDを図1に示した。

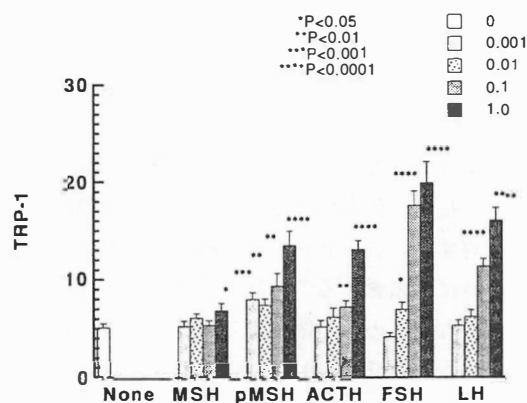


図1. 下垂体ホルモンによる色素細胞内チロシナーゼ関連蛋白1への影響

0.001 μ g/mlから1.0 μ g/mlまでの濃度の種々のホルモンを培地に添加して、色素細胞を2日間培養した後、細胞を固定し、チロシナーゼ関連蛋白1(TRP-1)の相対量(細胞1個当たりの平均値 $\pm$ 標準偏差)を測定した。

MSHは β melanocyte-stimulating hormone色素細胞刺激ホルモンを、pMSHは[Nle⁶, D-Phe⁷] α melanocyte-stimulating hormoneを、ACTHは副腎皮質刺激ホルモンを、FSHはfollicle-stimulating hormone卵胞刺激ホルモンを、LHはluteinizing hormone黄体形成ホルモンを示す。

TRP-1は、メラニン生成の場であるメラノソームに局在し、チロシナーゼとともにメラニン生成に関与している¹⁰⁾。したがって、TRP-1の増加は、メラニン生成機能の亢進を意味している。

α MSH、ACTH、FSH、LHにおいて、 $1\text{ng}/\text{ml}$ から $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で濃度依存的にTRP-1の増加が認められた。特に、 $100\text{ng}/\text{ml}$ と $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のFSHでは著しい増加を認めた。一方、 β MSHは $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を除き、図1中の無添加のNoneとほぼ同じ値を示し、TRP-1量の増加を認めなかった。

3・2 下垂体ホルモンの細胞形態への影響

生体表皮基底層に散在する色素細胞は、紫外線などの刺激により、メラニン生成が亢進し、かつまた周囲の角化細胞へメラニン顆粒を盛んに転送することは周知の事である。その際、色素細胞は樹枝状突起を増加させ、かつそれらを延長させたり、細胞自体が大きくなったりする¹¹⁾。従って細胞形態の変化も色素細胞の活動性の指標になると考え測定した。細胞形態の測定として、細胞1個あたりの樹枝状突起の数、細胞周囲長（複数の樹枝状突起の長さの和を反映するものとして）、細胞面積のそれぞれについて定量した。

LHのみが、細胞周囲長に有意の増加を示さなかったことを除けば、全てのホルモンが多少の違いがあっても、いずれも細胞形態を変化させた（図2-4）。特に β MSHと α MSHは、 0.01 – $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$

において樹枝状突起数、細胞周囲長、細胞面積の全てについて著しい増加を示した。

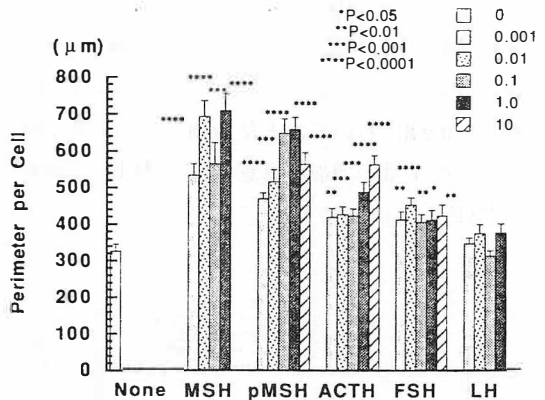


図3. 下垂体ホルモンによる色素細胞の周囲長への影響

実験条件は図1と同様。グラフは細胞1個あたりの平均周囲長+/-標準偏差を示す。

図中のMSHは β melanocyte-stimulating hormone色素細胞刺激ホルモンを、pMSHは $[\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7]\alpha$ melanocyte-stimulating hormoneを、ACTHは副腎皮質刺激ホルモンを、FSHはfollicle-stimulating hormone卵胞刺激ホルモンを、LHはluteinizing hormone黄体形成ホルモンを示す。

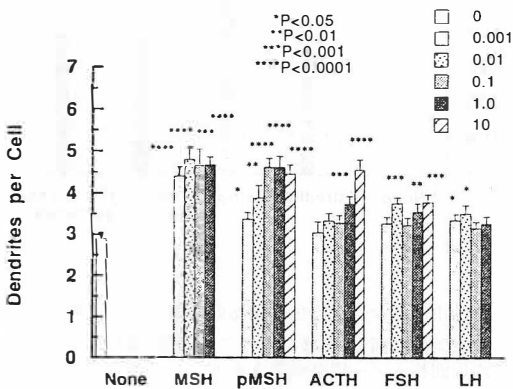


図2. 下垂体ホルモンによる色素細胞の樹枝状突起数への影響

実験条件は図1と同様。グラフは細胞1個あたりの平均突起数+/-標準偏差を示す。図中のMSHは β melanocyte-stimulating hormone色素細胞刺激ホルモンを、pMSHは $[\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7]\alpha$ melanocyte-stimulating hormoneを、ACTHは副腎皮質刺激ホルモンを、FSHはfollicle-stimulating hormone卵胞刺激ホルモンを、LHはluteinizing hormone黄体形成ホルモンを示す。

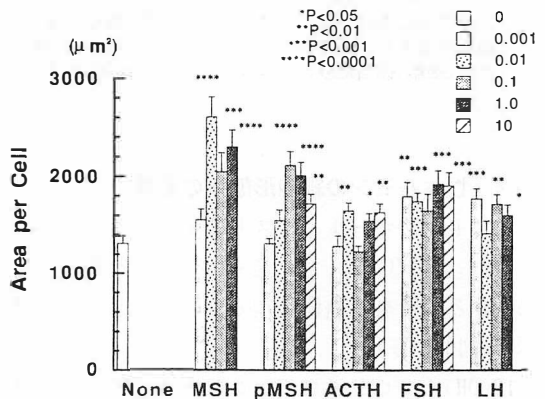


図4. 下垂体ホルモンによる色素細胞の胞体の大きさ（面積）への影響

実験条件は図1と同様。グラフは細胞1個あたりの平均面積+/-標準偏差を示す。図中のMSHは β melanocyte-stimulating hormone色素細胞刺激ホルモンを、pMSHは $[\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7]\alpha$ melanocyte-stimulating hormoneを、ACTHは副腎皮質刺激ホルモンを、FSHはfollicle-stimulating hormone卵胞刺激ホルモンを、LHはluteinizing hormone黄体形成ホルモンを示す。

3・3 性ホルモンのTRP-1 への影響

卵巣から分泌される女性ホルモンとして、エストラジオール、エストリオール、プロジェステロン、17(OH)-プロジェステロンについて検討した。

エストラジオールとエストリオールでは、0.001-1.0 μ Mにおいて、また1 μ Mプロジェステロンに、TRP-1 量の増加が有意 ($p < 0.001$) に認められた(図5)。

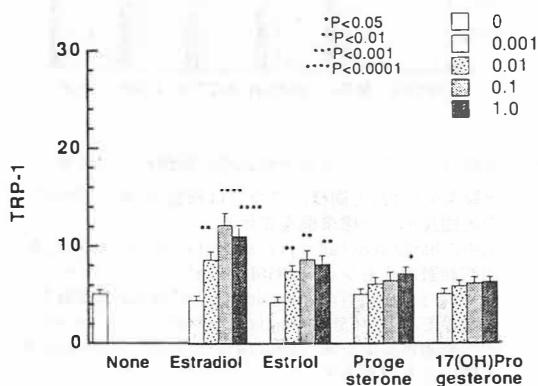


図5. 女性ホルモンによる色素細胞中チロシナーゼ関連蛋白1への影響

0.001 μ Mから1.0 μ Mまでの濃度の図中に示すホルモンを培地に添加して、色素細胞を2日間培養した後、細胞を固定し、チロシナーゼ関連蛋白1(TRP-1)の相対量(細胞1個あたりの平均値+/-標準偏差)を測定した。

3・4 性ホルモンの細胞形態への影響

エストラジオール、エストリオール、プロジェステロン、17(OH)-プロジェステロンの細胞形態に対する影響を下垂体ホルモンの場合と同様に調べた(図6-8)。

17(OH)-プロジェステロンの樹枝状突起数と細胞周囲長に対して有意の影響を示さなかった事を除けば、いずれの性ホルモンも細胞形態へ強い影響を与えていた。エストリオールにおいては、1nMから10 μ Mまで濃度依存性に効果が強まったが、エストラジオールでは0.01と0.1 μ Mで強い効果を示し、それより高濃度の1と10 μ Mでは逆に効果が減少を示している(図6-8)。

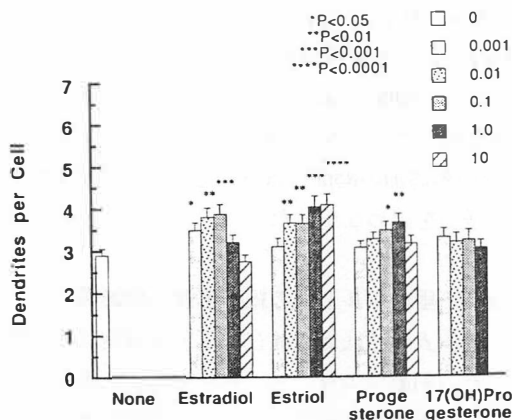


図6. 女性ホルモンによる色素細胞の樹枝状突起数への影響

実験条件は図5と同様。グラフは細胞1個あたりの平均突起数+/-標準偏差を示す。

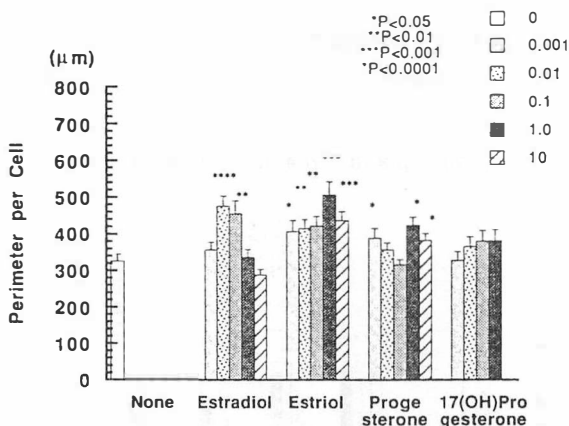


図7. 女性ホルモンによる色素細胞の周囲長への影響

実験条件は図5と同様。グラフは細胞1個あたりの平均周囲長+/-標準偏差を示す。

3・5 ホルモンのチロシナーゼ活性に対する影響

本研究で用いたホルモン全てについて、色素細胞中のチロシナーゼ活性に対する影響を検討した。

4 考 察

日本人をはじめ黄色人種の中年女性に多い肝斑の発症機序は、現在不明である。妊娠時の婦人の皮膚の色素が増加すること¹⁾、月経周期の終り頃に眼周囲の色素が増加すること²⁾が知られている。また皮膚科の日常診療で気付くことであるが、閉経後の女性には肝斑が減少していくことから女性ホルモンと肝斑との関係をうかがわせる。月経時あるいは妊娠時にはMSHのほかにLH(黄体形成ホルモン)、FSH(卵胞刺激ホルモン)、エストロゲン(卵胞ホルモン)、プロゲステロン(黄体ホルモン)などの女性ホルモンの血中濃度が増加することから、これらのホルモンが色素沈着に関与していると考えられる。またアメリカでは避妊用のピルを内服している女性の約29%に肝斑が発症すると報告されていること³⁾などから、ピルに含まれるエストロゲンやプロゲステロンが肝斑の発症に関わっていると推測される。

Snellら¹²⁾の動物実験の結果でも、卵巣を摘除したモルモットにエストロゲンを投与すると、皮膚のメラニンを増加させることが観察されている。その場合、少量のプロゲステロンはややメラニンを増加させるものの、大量のプロゲステロンは逆にメラニンを減少させるという。Snellらの動物実験以来、女性ホルモンの色素生成に対する影響をみた研究の報告は見当たらない。

ところで、魚類、両生類においては、MSHが色素細胞に直接作用して、皮膚色の調節に関与している事は、あまりにも有名である。このMSHが、ヒトの肝斑の発症に関与するのではないのかと考え、肝斑患者の血中MSH量の測定が行われたようであるが、positive dataが得られていない。例えば、ピルにより発症した肝斑患者の血中MSHは決して高くはなかった³⁾。そんな訳で現在ではMSHが肝斑の発症に関係しているとは考えられていない。しかし培養ヒト色素細胞では、MSHによって細胞内のcAMPが増加することが知られており、またチロシナーゼ活性の増加も報告されている¹³⁾。そこで本研究では、このMSHを女

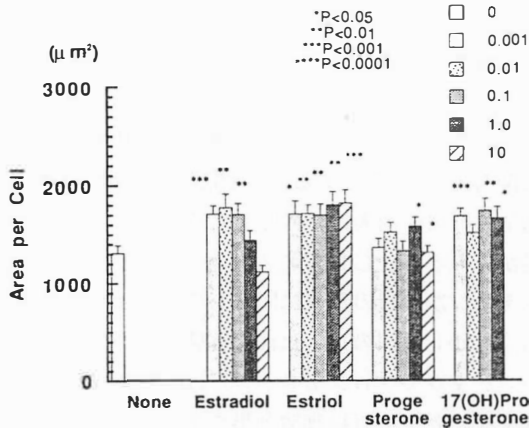


図8. 女性ホルモンによる色素細胞の胞体の大きさ(面積)への影響

実験条件は図5と同様。グラフは細胞1個あたりの平均面積+/-標準偏差を示す。

図9に示すように、高濃度の β MSH、 α MSH、FSH、LH、において、チロシナーゼ活性の増加が認められた。エストラジオール、エストリオール、プロゲステロン、17(OH)-プロゲステロンにおいては、有意の増加が認められなかった。

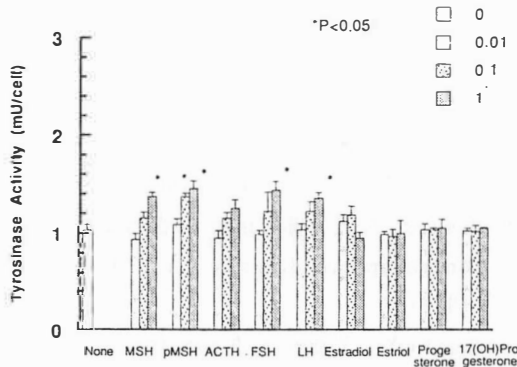


図9. 種々ホルモンによる色素細胞内チロシナーゼ活性量への影響

0.001 μ g/mlから1.0 μ g/mlまでの濃度のMSH(色素細胞刺激ホルモン)、pMSH([Nle⁴, D-Phe⁷] α melanocyte-stimulating hormone)、ACTH(副腎皮質刺激ホルモン)、FSH(卵胞刺激ホルモン)、LH(黄体形成ホルモン)を、また0.001Mから1.0Mまでの濃度の図中の女性ホルモンを培地に添加して、色素細胞を2日間培養した後、細胞を固定し、チロシナーゼ活性を測定した。グラフは細胞1個当たりの活性平均値+/-標準偏差を示す。

性ホルモンの効果を比較する上での、positive controlとして加えた。

本研究において、検討した3つのパラメーター、すなわち細胞形態の変化とTRP-1そしてチロシナーゼは、いずれも表皮での色素増加に関係するパラメーターである。つまり紫外線照射により皮膚のメラニンが増加するが、このとき表皮基底層に散在する色素細胞が大きくなり、そして樹枝状突起が著しく延長し、周囲の角化細胞にメラニン顆粒を盛んに配送することが観察されている¹¹⁾。またチロシナーゼはメラニン生成の律速酵素、つまりメラニン生成で一番重要な酵素であることはあまりにも有名である。TRP-1は褐色のメラニン生成に関与する蛋白として知られていたが、メラニン生成経路の下流で働くdihydroxyindole carboxylic acid oxidase (DHICA oxidase)であることが最近判明した¹⁰⁾。従ってチロシナーゼとTRP-1の増加は、色素細胞内でのメラニン生成の亢進を意味しており、また色素細胞の樹枝状突起の延長は、増加したメラニン顆粒の配達の増加を意味していると考えて良い。

結果に示したように、LHの細胞周囲長とプロジェステロンの細胞面積に対して有意の効果を示さなかった事を除き、今回調べた全てのホルモンが色素細胞に刺激を与え細胞形態の変化を誘導した。TRP-1も β -MSHとプロジェステロンを除き、他のホルモンで大なり小なりの反応を示した。特にFSH、LH、エストラジオールにおいては、著しい増加を示した。しかしチロシナーゼ活性は α および β -MSH、FSH、LHで有意の増加を示したのみであった。細胞形態の変化とTRP-1そしてチロシナーゼの増加の3つのパラメーターは、今回調べたホルモンの刺激にいつも平行して反応する訳ではないので、これらはそれぞれ異なった、レセプターとシグナル伝達系を持っているようである。それでも α -MSH、FSHそしてLHの3者は、細胞形態変化、チロシナーゼ活性、TRP-1量の3つのパラメーターを増加させた事から、生体内の色素細胞に対しても直接に作用する可能性を強く示している。

ところで、前にも述べたように閉経後の女性に

は肝斑が見られなくなる。閉経後のホルモン動態を見ると、エストロジェンが著しく減少するのに対して、そのnegative feedbackとしてFSH、LHが著しく増加する¹⁴⁾。もしFSHとLHが肝斑野出現に関与しているとする、閉経後のFSHとLHの増加と肝斑の消失は矛盾してくる。ホルモンの動態からみると、むしろエストロジェンやプロジェステロンが肝斑の形成に関与しているように見える。しかし今回のin-vitroの実験結果では、エストロジェンやプロジェステロンは、色素細胞の形態変化に対して直接刺激効果をそれなりに示しているが、TRP-1やチロシナーゼに対しては有意な作用を示さず、強力な肝斑を引き起こす犯人とするには、もの足りない。だがエストロジェンあるいはプロジェステロンがある細胞に作用して、その細胞が色素生成促進因子を産生して、その結果肝斑が生ずる可能性がある。今後この点についての検討を進める必要がある。

文 献

- 1) Snell RS., Bischitz PG., "The melanocytes and melanin in human abdominal wall skin a survey made at different ages in both sexes and during pregnancy", *J. Anat.*, 97 361 (1963)
- 2) Snell RS., Turner R., "Skin pigmentation in relation to the menstrual cycle", *J. Invest Dermatol.*, 47 147 (1966)
- 3) Resnick CS., "Melasma induced by oral contraceptive drugs", *J.A.M.A.*, 199 601 (1967)
- 4) Tomita Y., Yamamoto H., Sato C., et al., "Efficient culturing of human melanocytes from suction blisters", *Tohoku J. Exp. Med.*, 147 219 (1985)
- 5) Tomita Y., Shibahara S., Takeda A., et al., "The monoclonal antibodies TMH-1 and TMH-2 specifically bind to a protein encoded at the murine b-locus, not to the authentic tyrosinase encoded at

- c-locus”, *J. Invest Dermatol.*, **96** 500(1991)
- 6) Tomita Y., Iwamoto M., Masuda T., et al
“Stimulatory effect of prostaglandin E2 on configuration of normal human melanocytes in vitro”, *J. Invest. Dermatol.*, **89** 299 (1987)
- 7) Maeda K., Tomita Y., Fukuda M., et al.
“Effects of staurosporine, PMA and A23187 on human melanocyte cultures with dibutyryl cyclic AMP”, *Br. J. Dermatol.*, **126** 118 (1992)
- 8) Lerner AB., McGuire JS., “Effect of α MSH and β MSH on the skin color of man”, *Nature.*, **189** 176 (1961)
- 9) Lee TH., Lee MS., “Studies on MSH induced melanogenesis:effect of longterm administration of MSH on the melanin content and tyrosinase activity”, *Endocrinology.*, **88** 155 (1971)
- 10) Kobayashi T., Urabe K., Winder ., A et al.
“DHICA oxidase activity of TRP1 and interactions with other melanogenic enzymes”, *Pig Cell Res.*, **7** 227 (1994)
- 11) Quevedo WC. Jr, Szabo G., Virks J., et al.
“Melanocyte populations in UV-irradiated human skin”, *J. Invest. Dermatol.*, **45** 295 (1965)
- 12) Snell RS. “Hormonal control of pigmentation in man and other mammals”, In: *Advances in biology of skin*, vol. **VIII**, The pigmentary system, Pergamon Press, Oxford, p447, (1996)
- 13) Pawelek JM., “Factors regulating growth and pigmentation of melanoma cells”, *J. Invest. Dermatol.*, **60** 201 (1976)
- 14) 倉智敬一, “女性内分泌機能の異常と皮膚病変” 現代皮膚科学大系2B. 中山書店 p96, (1981)