

メラノサイト由来リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素が関与する皮膚組織の恒常性維持機構

東北大学大学院医学系研究科細胞生物学講座分子生物学分野

柴原 茂樹

Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) is responsible for differentiation of melanocytes. The Mitf gene contains many promoters that generate multiple Mitf isoforms with distinct amino-termini, such as a melanocyte-specific Mitf-M. We have been interested in a Mitf mutant mouse, *black-eyed white (bw)*, which is characterized by the white coat color and inner ear deafness due to the lack of melanocytes and by normally pigmented eyes. By cDNA microarray analysis between wild type and bw mouse skin, we have identified lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) as a new melanocyte marker. L-PGDS is a unique bifunctional protein; it functions as an enzyme that catalyzes the conversion of prostaglandin H₂ (PGH₂) to prostaglandin D₂ (PGD₂) and as an extra-cellular carrier protein that specifically binds small lipophilic molecules, such as retinoic acid and bilirubin. Mitf appears to be involved in transcription of the L-PGDS gene in melanocytes. Importantly, L-PGDS is expressed in normal human epidermal melanocytes, but not in human melanoma cell lines, as judged by northern blot and RT-PCR analyses. We also showed the inhibitory effect of PGD₂ on the growth of human melanocytes and melanoma cell lines, HMV-II, SK-MEL-28, 624mel, and G361. These results suggest that L-PGDS may modulate the growth potential of melanocytes through PGD₂, thereby maintaining the skin homeostasis.

1. 緒言

小眼球症関連転写因子 (MITF) は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 構造を持つ転写因子であり、神経堤由来のメラノサイトと脳由来の網膜色素上皮細胞 (RPE) の分化制御因子である^{1, 2)}。小眼球症関連転写因子 MITF の変異マウス (*black-eyed white, bw*) は、メラノサイトを欠損するため白毛と難聴を呈するが、正常な網膜を有する (白毛黒眼)³⁾。興味深いことに、*bw* マウスは低酸素あるいは高炭酸ガス吸入刺激に対して過剰な換気応答を呈するため、中枢性の化学受容機構も障害されていると考えられる⁴⁾。我々は *bw* マウス皮膚で欠損する分子を探索した結果、リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) がメラノサイトマーカーであることを発見した⁵⁾。すなわち、L-PGDS はメラノサイトで特異的に発現されている。L-PGDS によって合成されるプロスタグランジン D₂ (PGD₂) は睡眠、痛覚、そして免疫の調節に関わる⁶⁾。また L-PGDS は酵素であると同時に分泌タンパクでもあり、皮膚の再生に重要なレチノイン酸などのレチノイド、抗酸化作用の強いビリルビンの結合タンパクとしても機能する (図1)。このように L-PGDS は多様な機能を担う分子であるが、メラノサイトにおける L-PGDS の役割は不明である。さらに、L-PGDS の発現が

ヒトメラノーマにおいて消失することを発見した⁵⁾。この事実は、L-PGDS がメラノサイトの増殖を負に制御すること、さらに、癌抑制遺伝子として機能する可能性を示唆する。

従来、皮膚組織における PGD₂ の産生は、皮膚に局在する免疫系細胞 (マスト細胞やランゲルハンス細胞) 由来とされてきた⁷⁾。事実、それらの免疫系細胞は、L-PGDS と異なる遺伝子産物である血球型プロスタグランジン D 合成酵素 (H-PGDS) により PGD₂ を産生し、皮膚における炎症反応に関わる (図1)。したがって皮膚の炎症に関わる PGD₂ 研究は、主にマスト細胞やランゲルハンス細胞においてなされてきた。事実、マスト細胞では MITF が H-PGDS 遺伝子の転写を促進することが報告された⁸⁾。

そこで、L-PGDS がメラノサイト、及び皮膚組織の恒常性維持に関わると考え、L-PGDS 及び PGD₂ の未知の生理機能とその発現調節機構の一端を明らかにした。

2. 実験

2・1 正常ヒト表皮メラノサイトおよびメラノーマ細胞における PGD₂ の生理作用の解析

HMV-II、624mel、G361、SK-MEL-28 の4系統のヒトメラノーマ細胞を用いた。PGD₂、及びその代謝産物である PGJ₂ が細胞増殖に及ぼす効果を検討した (各 10 μM、72 時間培養)。なお、PGJ₂ は核内受容体 PPAR-gamma の ligand でもある。さらに、PGD₂ 受容体である DP1 と DP2 のアゴニスト、PPAR-gamma のアンタゴニスト (GW9662) の効果を調べた。

2・2 ヒトメラノーマ細胞における L-PGDS の生理機能の解析

L-PGDS cDNA を恒常的に発現するメラノーマ細胞株を



Melanocyte-derived lipocalin-type prostaglandin D synthase as a regulator for skin homeostasis

Shigeki Shibahara

Department of Molecular Biology and Applied Physiology, Tohoku University School of Medicine

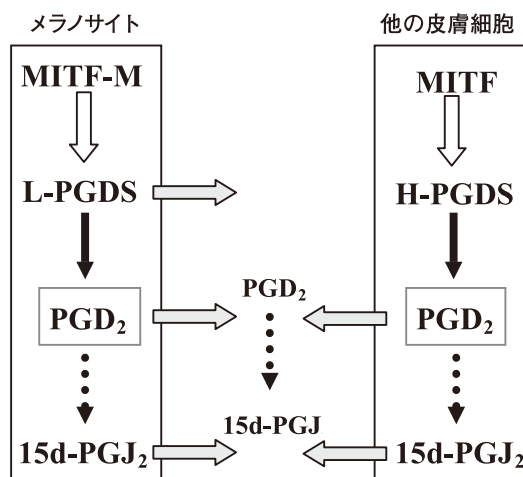


図1 MITF は皮膚における PGD2 産生を制御する
メラノサイトでは、MITF-M が L-PGDS 遺伝子の転写を制御する。一方、マスト細胞では、MITF-E などが H-PGDS 遺伝子の転写を調節する。細胞外へ分泌された L-PGDS は、レチノイン酸、ビリルビンなどの脂溶性分子と結合する。PGD2 の一部は非酵素的に PGJ2 に代謝される。
図は文献 7 から一部改変して使用。

樹立した。

2・3 L-PGDS 遺伝子の発現制御機構の解析

ヒトメラノーマ細胞を低酸素下（1% O₂）で培養し、L-PGDS 遺伝子の発現への影響を検討した。一方、低酸素（10% O₂）曝露マウスを用い、心筋における L-PGDS mRNA の発現変化を解析した。

2・4 ヒト RPE における PGD2 の役割

ヒト RPE 細胞を PGD2 と培養し、ヘムオキシゲナーゼ 1 の発現への影響を調べた。ヘムオキシゲナーゼ 1 はヘム分解系の律速酵素であり、ヘムを酸化的に開裂し、ビリベルジン、鉄、一酸化炭素を生成する。ビリベルジンは直ちにビリルビンに還元される。ヘムオキシゲナーゼ 1 は酸化ストレスに対する防御に重要な酵素として知られる。

3. 結 果

3・1 正常ヒト表皮メラノサイトおよびメラノーマ細胞における PGD2 の生理作用

PGD2（10μM）と 72 時間培養はヒトメラノサイトおよびメラノーマ細胞（4 系統すべて）の増殖を有意に抑制した。特に、メラノサイトに対する抑制効果は DP2 受容体を介する作用であることが示唆された。一方、メラノーマ細胞の増殖抑制作用は、各アゴニスト処理では検出できなかった。事実、RT-PCR 解析では、メラノーマ細胞（4 系統すべて）における DP1 と DP2 受容体 mRNA の発現を検出できなかった。よって、PGD2 によるメラノーマ細胞の増殖抑制作用は未知の作用機序によることが示唆された。

さらに、PGJ2 はヒトメラノサイトおよびメラノーマ細胞の増殖を有意に抑制した。その抑制効果は PPAR-gamma のアンタゴニスト添加により解除された。よって、PGJ2 によるヒトメラノサイトおよびメラノーマ細胞の増殖抑制作用は PPAR-gamma を介すると考えられた。（以上、論文投稿準備中）

3・2 正常ヒトメラノサイトとヒトメラノーマ細胞における L-PGDS の生理機能

L-PGDS cDNA を恒常的に発現するメラノーマ細胞株を樹立した。今後、細胞増殖などに対する影響を検討する。

3・3 L-PGDS 遺伝子の発現制御機構の解析

ヒトメラノーマ細胞を低酸素下（1% O₂）で培養したが、L-PGDS mRNA の発現レベルに有意な変化は見られなかった。一方、低酸素曝露マウスの心臓では、心筋における L-PGDS mRNA の発現誘導を観察した。なお、心筋における Mitf の発現が報告されており、今後、心筋における L-PGDS 遺伝子の転写調節機構を明らかにする。

3・4 RPE における PGD2 の役割

RPE は脱落・生成を繰り返す杆体細胞外節片を絶えず貪食・処理するのみならず、ロドプシンの構成成分である 11-シス-レチナールを再生し視細胞に供給する。このように、RPE は視細胞の機能維持に必須である。また、RPE は体内の最も過酷な環境で機能する細胞でもある。PGD2 との培養により、濃度依存的、時間依存的にヘムオキシゲナーゼ 1 の発現を誘導した⁹⁾。PGD2 がヘム分解に関与することが初めて明らかになった。

4. 考 察

皮膚における L-PGDS 及び PGD2 に着目する本研究は、メラニン産生、メラノサイトの増殖、皮膚の炎症反応など皮膚の恒常性維持機構の解明に貢献する。皮膚の恒常性維持の破綻を如何に防ぐかはコスメトロジーにとっても重要な課題であり、本研究成果は色素沈着（シミ）を予防できるような化粧品・薬剤の開発に寄与する。事実、L-PGDS の産物である PGD2 はメラノサイトの増殖を制御する物質である可能性が高い。よって、今後、増加傾向にあるメラノーマに対する新規治療法の開発への貢献も期待される。

一方、Mitf 変異マウスである bw マウスが低酸素あるいは高炭酸ガス吸入刺激に対して過剰な換気応答を呈することは興味深い⁴⁾。すなわち、メラノサイト、あるいは Mitf の未知の標的遺伝子が中枢性の化学受容機構に関与している可能性が考えられる⁴⁾。よって、本研究はコスメトロジーが支援する「精神、文化に関する分野」とも密接に関連する。睡眠の調節に関与する L-PGDS が、皮膚ではメラノ

サイトに限局して存在する事実は重要である。メラノサイト由来 L-PGDS の未知の生理機能が示唆される。本研究は美肌の維持には良好な睡眠が重要という経験則に科学的な根拠を与えるものである。高齢化が進む我が国においては、快適に眠り、美しく老いるという願望は、すべての国民の願いであり、本研究成果は良好な QOL の達成にも貢献する。

(文 献)

- 1) Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., et al. (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404.
- 2) Hughes, M.J., Lingrel, J.B., Krakowsky, J.M., et al. (1993) A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. *J. Biol. Chem.* 268, 20687-20690.
- 3) Yajima, I., Sato, S., Kimura, T., et al. (1999) An L1 element intronic insertion in the black-eyed white (*Mitf^{mi-bw}*) gene: the loss of a single Mitf isoform responsible for the pigmentary defect and inner ear deafness. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1431-1441.
- 4) Takeda, K., Adachi, T., Han, F., et al. (2007) Augmented chemosensitivity in black-eyed white *Mitf^{mi-bw}* mice, lacking melanocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 327-333.
- 5) Takeda, K., Yokoyama, S., Aburatani, H., et al. (2006) Lipocalin-type prostaglandin D synthase as a melanocyte marker regulated by MITF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 1098-1106.
- 6) Urade, Y., Hayaishi, O. (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1482**, 259-271.
- 7) Takeda, K., Takahashi, N.-H., Shibahara, S. (2007) Neuroendocrine functions of melanocytes: Beyond the skin-deep melanin maker. *Tohoku J. Exp. Med.* 211, 201-221.
- 8) Morii, E., Oboki, K. (2004) MITF is necessary for generation of prostaglandin D2 in mouse mast cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 48923-48929.
- 9) Kuesap J., Li, B., Satarug, S., et al. (2008) Prostaglandin D2 induces heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 413-419.