

デコイ・メラノソームを用いたメラノサイトから ケラチノサイトへのメラニン移送阻害の研究

名古屋市立大学大学院薬学研究科

平 嶋 尚 英

To inhibit melanin transfer from melanocytes to keratinocytes, we attempted to use nano-particles that mimic melanosomes. We found that negatively charged polystyrene particles are up-taken by melanocytes. To investigate the effects of particles on melanin transfer, we constructed 3D-coculture system of melanocytes and keratinocytes. However, no significant effects of particles on melanin transfer. Further improvements such as higher uptake of particles and surface modification by melanosomal proteins are required.

1. 緒 言

色素細胞であるメラノサイトは、メラニンを産生し、さらにそれを周囲のケラチノサイトへ引き渡し、皮膚の色素沈着をコントロールしている。この色素沈着を抑制することで美白効果をもたらすことができるため、化粧品開発において、メラニンの産生から色素沈着にいたるまでの過程を研究することは極めて重要である。

メラニンは脂質二重膜で囲まれたメラノソームと呼ばれる小胞中で産生され、さらにメラノサイトの突起先端まで輸送され、ケラチノサイトへ移行する。この移行機構については、おおまかに次の4つの仮説がある¹⁾。①メラノソーム内のメラニン顆粒がエクソサイトーシス（開口放出）によって、細胞外に放出され、それをケラチノサイトが貪食する。②メラノサイトの突起先端に集まってきたメラノソームを突起ごとケラチノサイトが貪食する。③メラノサイトからフィロポディア様の突起が伸び、その先端がケラチノサイトの細胞膜と融合し、形成されたチューブ状の構造の中をメラノソームが輸送される。④メラノサイトの細胞膜で囲まれ、内部に数個のメラノソームを含む小胞（エクソソーム）として細胞外に放出され、それがケラチノサイトと膜融合するか、あるいはケラチノサイトによる貪食によって、ケラチノサイトにとりこまれる。いずれにしても、ケラチノサイトへのメラニンの移行過程は色素沈着の上で極めて重要な過程である。

我々は代表的な分泌細胞であるマスト細胞の分泌顆粒の細胞内輸送やエクソサイトーシスについて研究を行ってき

たが、マスト細胞の分泌顆粒はメラノソームと同じくリソゾーム関連顆粒であり、その細胞内輸送やエクソサイトーシスの機構が類似している²⁻⁵⁾。一方で、我々はリポソームやポリ乳酸・グリコール (PLGA) 粒子のようなマイクロ・ナノ粒子を用いた高効率遺伝子導入法の研究を行ってきた⁶⁻⁸⁾。これらの研究の過程で、細胞をマイクロ・ナノ粒子とともに培養すると、これらの粒子が細胞内に取り込まれ、さらに細胞内で分泌顆粒用の挙動をとり、エクソサイトーシスによって放出されることを見出した⁹⁾。取り込まれた粒子がリソゾーム関連の顆粒と同様の挙動をとることは、細胞内に取り込まれたマイクロ・ナノ粒子がメラノソームと同様の挙動を示すことを示唆する。

そこで、本研究では、このメラノソームを模倣したマイクロ粒子を作製、デコイ（おとり）メラノソームとし、それをメラノサイトやケラチノサイトにとりこませ、メラノサイトが本来もつメラノソームの代わりにデコイメラノソームがケラチノサイトに移行することで、美白作用を発揮する可能性を検証する。

2. 実 験

2.1 細胞

2.1.1 マウスメラノサイト株melan-a細胞およびマウスケラチノサイト細胞株SP-1の培養

マウスメラノサイト株であるmelan-aは、Dorothy Bennett博士(St. George's University of London, London, UK)より御提供いただいた。細胞は、10%FBSを含むRPMI-1640培地(WAKO Pure Chemicals, Japan)で、CO₂濃度10%下、37℃にて培養した。また、マウスケラチノサイト細胞株SP-1はStuart H. Yuspa博士(National Cancer Institute, Bethesda, USA)より御提供いただいた。細胞培養は、SMEM培地にL-glutamine (0.29mg/ml)、CaCl₂ (0.05mM)、Penicillin (20U/L)、Streptomycin (20mg/L)を混合し、Chelex-100でキレート処理した8% FBSを添加したものを用い、10% CO₂存在下37℃で培養した。



Inhibition of melanin transfer from melanocyte to keratinocyte by decoy-melanosomes

Naohide Hirashima

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

2.2 RT-PCR

10^7 個の melan-a 細胞から Poly (A)+RNA を得た後、逆転写酵素 SuperScript III RT を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型にして、メラノソームに発現している可能性のある膜蛋白質について、特異的プライマーを用い PCR を行った。得られた PCR 産物は、DNA シークエンサーを用いて配列を決定した。

2.3 メラノソーム精製

メラノソームの精製は Watabe らの方法を参考に行った¹⁰⁾。Melan-a のホモジネートを 1000xg、4℃ で 10 分間遠心後、ペレットを 10mL の Cell homogenization medium に再懸濁させ、細胞を氷上でホモジナイズ後、1000xg、4℃ で 10 分間遠心し、上清をスクロース勾配 (1.0M、1.4M、1.6M、1.8M、2.0M) に重層し、100000xg、4℃ で 1 時間遠心した。1.8M と 2.0M との界面層を回収し、メラノソームを得た。

2.4 Western Blotting

ライセートに 2×sample buffer を加えて SDS-PAGE を行い PVDF 膜 (Bio Rad) に転写した。5% スキムミルクでブロッキング後、一次抗体で 16 時間処理した。さらに horseradish peroxidase 標識した二次抗体で処理後、ECL (Amersham Bioscience) で検出した。

2.5 蛍光顕微鏡観察

蛍光標識したナノ粒子は、直径 200nm の蛍光ポリスチレン粒子 (ex. 505nm/em. 515nm) を Molecular Probes より購入した。蛍光粒子を 2mg/ml になるように PBS で希釈し、使用する前に 30 秒間超音波処理をしてから用いた。蛍光標識ナノ粒子を細胞とともに培養し、8 時間後に細胞と蛍光ナノ粒子を共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Zeiss) を用いて観察した。

2.6 メラノサイトからケラチノサイトへのメラニン移行活性の定量化

2.6.1 メラノサイトとケラチノサイトの共培養系

メラノサイトからケラチノサイトへのメラニン移行活性の定量化には、Kasraee B らの方法に従った¹¹⁾。ポアサイズ 1μm のメンブレンフィルター (Cell culture insert, FALCON、6-well 1.0μm pore size) の片面に、ケラチノサイトを定着させ、1 日後に反対面にメラノサイトを定着させ、メンブレンフィルターの上下それぞれにメラノサイトとケラチノサイトを共培養した。培地は SP-1 培養用の SMEM 培地を用い、10% CO₂ 存在下 37℃ で培養した。

2.6.2 共培養系を用いたケラチノサイトへのメラニン移行の定量化

上述の共培養系を用いて 3 日間共養したメラノサイトとケラチノサイトを別々にトリプシン処理することで、各細胞懸濁液を作成し、試料とした。メラノソームに特異的な抗体を用いて各細胞内のメラニンを定量し、メラノサイトからケラチノサイトへのメラニンの移行率を評価した。

3. 結果

3.1 melan-a 細胞のメラノソーム膜に発現するタンパク質の同定

本研究では、メラノソームを模倣したマイクロ粒子を作製し、デコイ (おとり) メラノソームとし、それをメラノサイトやケラチノサイトにとりこませる。そこで、メラノソーム表面に発現している蛋白質でマイクロ粒子をコートする。そのために、まずメラノソームに発現している蛋白質の同定を試みた。

メラノソームは、マスト細胞の分泌顆粒と同様リソゾーム関連顆粒である。そこで、マスト細胞の分泌顆粒にも発現している膜蛋白質として VAMP (vesicle associated membrane protein) の発現を RT-PCR で調べた。その結果、VAMP-2、VAMP-7、VAMP-8 が発現していることが明らかとなった (図 1 A)。このことは、単離メラノソームのウエスタンブロッティングによっても確認された (図 1 B)。

3.2 melan-a 細胞へのナノ粒子の取り込み

本研究では、マイクロ粒子をデコイメラノソームとしてメラノサイトに取り込ませる。そこで、効率的にメラノサイトにマイクロ粒子をとりにこませるために、マイクロ粒子の物性と取り込み効率について検討を行った。マイクロ粒子としては、将来的にはリポソームやポリ乳酸・グリコール (PLGA) 粒子のような生分解性のものを導入する予定であるが、まずは、ポリスチレン粒子を用いて基本的な検討を行った。

粒子径としては 200nm のもの、表面電荷としては、表面をカルボキシル基で修飾した負電荷をもつ粒子と、アミノ基で修飾した正電荷をもつ粒子について調べた。

正電荷をもつ粒子は、図 2 に示すように、多数の粒子が melan-a 細胞の表面に吸着するのが見られた。しかしながら細胞内に取り込まれる粒子はそれほど多くはなかった。一方、図 3 に示すように、負電荷をもった粒子は、細胞に吸着する数は少ないもの、ある程度は細胞内に取り込まれることが明らかとなった。また、正電荷の粒子と培養した場合は、図 4 に示すように、細胞の形が紡錘形ではなく、丸くなり、正常なメラノサイトとは異なる形状を示すものが多く、正電荷粒子による毒性が現れていることが示唆された。

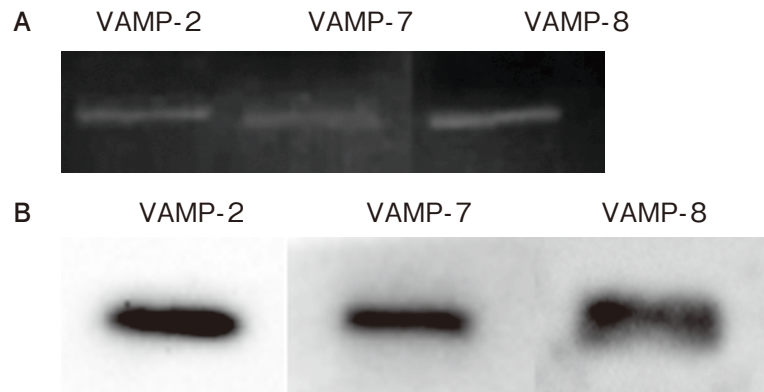


図1 メラノサイトにおける v-SNARE の発現

A RT-PCR に v-SNARE

B 単離メラノソームのウエスタンブロットによる v-SNARE の発現

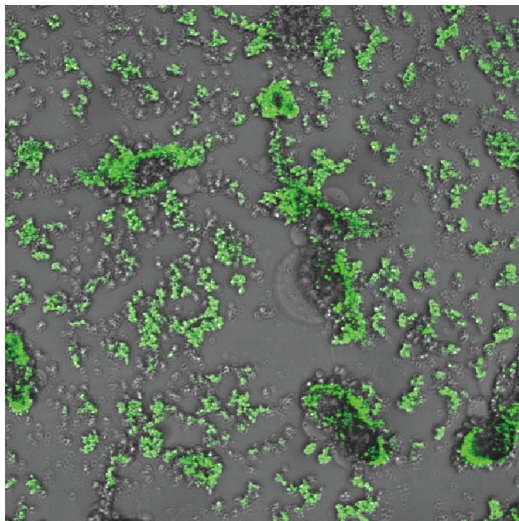


図2 正電荷蛍光粒子とメラノサイトの共培養

正電荷をもつ粒子は洗浄後も多数細胞に吸着したが、細胞内への取込みはさほど多くなかった。

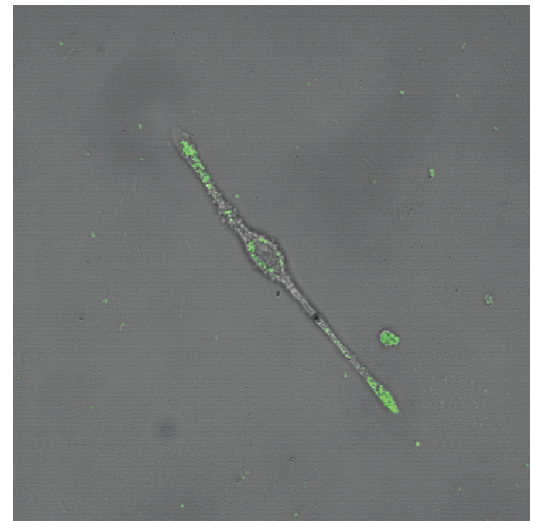


図3 負電荷蛍光粒子とメラノサイトの共培養

負電荷をもつ粒子は、洗浄後細胞への吸着はほとんど見られないが、細胞内への取込みが見られた。

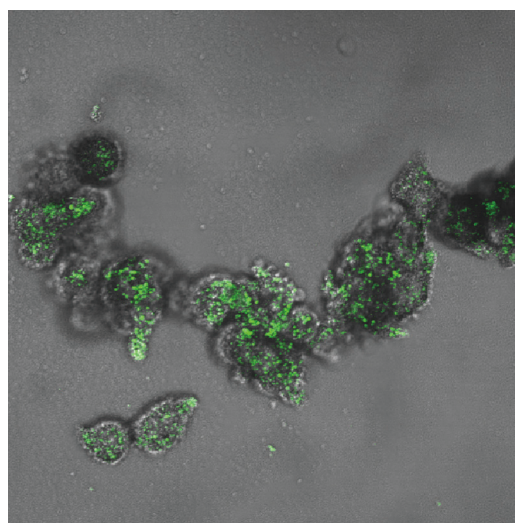


図4 正電荷蛍光粒子の細胞毒性

正電荷をもつ粒子は多数細胞に吸着し、細胞が変形して正常な場合の形態とは異なるものが多かった。

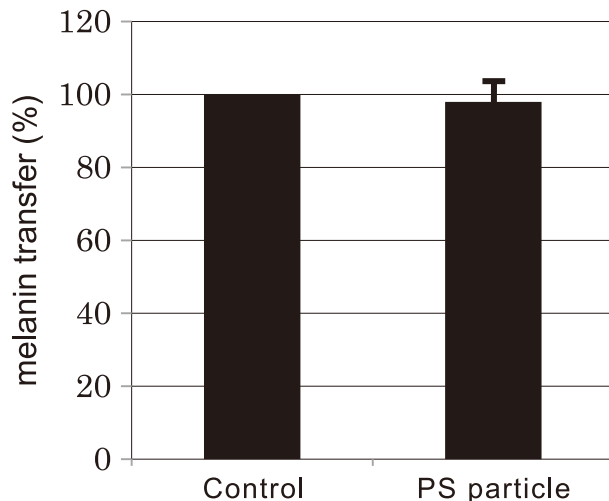


図5 メラニン移行に対する微粒子の影響

メラノサイトからケラチノサイトへのメラニン顆粒の移行は、メラノサイトを負電荷ポリスチレン粒子存在下で培養することによって、有意の影響を受けなかった(mean±SD, n = 4)。

3.3 ケラチノサイトへのメラニン移行に対するナノ粒子の影響

負電荷をもつ粒子が、細胞内への取込みが見られたので、この粒子のケラチノサイトへのメラニン移行に対する影響を調べた。ポアサイズ1μmのメンブレンをもつセルカルチャーインサートの片面にケラチノサイトを培養し、さらに反対面に、メラノサイトを負電荷をもった200nmのポリスチレン粒子とともに培養した。メラノサイトから移行したメラニン顆粒を定量し、ポリスチレン粒子の影響を調べた。その結果、図5のようになり、ポリスチレン粒子の存在により、有意な影響は認められなかった。

4. 考 察

今回の研究によって、メラノサイトには分泌顆粒蛋白質であるVAMPのうち、VAMP-2、VAMP-7、VAMP-8が発現していることが明らかとなった(図1)。したがって、マイクロ粒子の表面をこれらのタンパク質(あるいは、その一部分のペプチド)で修飾することによって、メラノソームを模倣し、かつメラノソームの移行にも関与すると思われるVAMPによって、メラノソームの移行と競合できるような粒子を作成することができる。

一方、作成した粒子をデコイメラノソームとして機能させるためには、なるべくたくさんのマイクロ粒子を細胞内に取り込ませる必要がある。今回の研究によって、負電荷をもつ粒子がメラノサイト内へよく取り込まれた。細胞表面は負に帯電しているので、静電相互作用を考慮すると、正の粒子がよく取り込まれると考えられる。実際、正電荷をもつ粒子が細胞表面に多く結合した(図2)。一方、負

電荷をもつ粒子は細胞表面への吸着は少なかったが、メラノサイト内には負電荷粒子の方がよくとりこまれた(図3)。多数の粒子が吸着しながら、細胞内に取り込まれる粒子が少ない理由はよくわからないが、正電荷の粒子によって細胞の形状が変化したことは(図4)、正電荷粒子の細胞毒性を示唆し、その結果、正電荷粒子の取り込みが阻害されたと考えられる。

そこで、細胞への毒性がなく、細胞内に取り込まれた負電荷粒子について、メラノサイトからケラチノサイトへのメラニンの移行への影響を調べたところ、特に有意な影響は見られなかった(図5)。原因としては、今回用いたポリスチレンビーズは、VAMP等で表面修飾をしていないため、本来メラノサイトがもつメラノソームを模倣するに十分でないことやポリスチレン粒子の取り込みが少ないこと、があげられる。一方、最近、メラニン顆粒のケラチノサイトへの移行が、エクソサイトーシスではなく、メラノサイトの細胞膜で囲まれた数個のメラノソームがエクソソームとして細胞外に放出され、それがケラチノサイトによって貪食されることを示す結果が報告された¹²⁾。このエクソソームによるメラノソームの移行が、全体のメラニン顆粒の移行においてどの程度寄与しているか不明であるが、エクソサイトーシスによる寄与が低いために、微粒子を取り込ませ、それをエクソサイトーシスで放出させても、メラニン顆粒の阻害がみられなかった可能性も考えられる。

我々は予備的な研究で、VAMPがメラニン顆粒の移行に関与していることを示唆する結果を得ており、エクソサイトーシスによる移行以外のメラニン移行の機構にVAMPが関与している可能性がある。もしエクソソームによる機構が主たる移行機構であるとする、エクソソーム内に取り込まれるような修飾を微粒子に施すことによって、デコイメラノソームによるメラニン移行阻害が可能になる可能性があり、メラノソームのエクソソーム内への取り込み機構の解明を進める必要がある。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、コスメトロジー研究振興財団より研究助成をいただきました。ここに感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Van Den Bosche, K., Naeyaert, J.-M., Lambert, J. The quest for the mechanism of melanin transfer Traffic, **7**, 769-778 (2006)
- 2) Hibi, T., Hirashima, N., and Nakanishi, M. Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **271**, 36-41 (2000)
- 3) Tadokoro, S., Mamoru Nakanishi and Naohide

- Hirashima Complexin II facilitates exocytotic release in mast cells by enhancing Ca^{2+} sensitivity of the fusion process *J. Cell Sci.*, **118**, 2239-2246 (2005).
- 4) Tadokoro, S., Kurimoto, T., Nakanishi, M. and Hirashima, N. Munc18-2 regulates exocytotic membrane fusion positively interacting with syntaxin 3 in RBL-2H3 cells *Mol. Immunol.* **44**, 3427-3433 (2007)
- 5) Tadokoro, S., Nakanishi, M., and Hirashima, N. Complexin II regulates degranulation by interacting with SNARE complex containing syntaxin-3 in RBL-2H3 cells *Cell. Immunol.*, **261**, 51-56 (2010)
- 6) Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N. and Kawashima, Y. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells *Int. J. Pharmaceut.*, **382**, 198-204 (2009)
- 7) Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N. and Kawashima, Y. Chitosan modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for improving siRNA delivery and gene silencing effects *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* **74**, 421-426 (2010)
- 8) Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N. and Kawashima, Y. Improvements in transfection efficiency with chitosan modified PLGA nanospheres prepared by the emulsion solvent diffusion method, for gene delivery *Chem. Pharm. Bull.* **59**, 298-301 (2011)
- 9) Tahara, K., Tadokoro, S., T., Yamamoto, H., Kawashima, Y. and Hirashima, N. The suppression of IgE-mediated histamine release from mast cells following exocytic exclusion of biodegradable polymeric nanoparticles *Biomaterials* **33**, 343-351 (2012)
- 10) Watabe, H., Kushimoto, T., Valencia, J.C., Hering, V.J. Isolation of melanosomes *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3:Unit 3.14.(2005)
- 11) Kasraee, B., Pataky, M., Nikolic, D.S., Carraux, P., Piguet, V., Salomon, D., Sorg, O., Saurat, J.H. A new spectrophotometric method for simple quantification of melanosomal transfer from melanocytes to keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **20**, 938-942 (2011)
- 12) Ando H, Niki Y, Yoshida M, Ito M, Akiyama K, Kim JH, Yoon TJ, Matsui MS, Yarosh DB, Ichihashi M. Involvement of pigment globules containing multiple melanosomes in the transfer of melanosomes from melanocytes to keratinocytes. *Cell Logist.* **1**, 12-20 (2011)