

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591659

研究課題名(和文)ユーメラニンおよびフェオメラニンの紫外線による生理的分解過程の解明

研究課題名(英文)Elucidation of ultraviolet radiation-induced physiological degradation pathway of eumelanin and pheomelanin

研究代表者

伊藤 祥輔 (ITO, Shosuke)

藤田保健衛生大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：70121431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：メラニンには黒色のユーメラニン(EM)と赤褐色のフェオメラニン(PM)の2型がある。本研究は、両型のメラニンの紫外線による生理的分解過程の解明を目的とした。ヒト黒色毛と赤毛を用いて、日光紫外線によりEMは分解して遊離のPTCA(ピロール-2,3,5-トリカルボン酸)を生成し、PMはベンゾチアジン体からベンゾチアゾール体に変化することを見出した。つぎに、マウス体毛およびヒト毛髪、合成EMおよびPMにUVAを照射して同様な変化を確認した。ついで、培養メラノサイトおよび網膜色素上皮細胞において、EMがUVAあるいは可視光により架橋構造を形成することを示した。

研究成果の概要(英文)：Melanin is classified into black eumelanin and reddish pheomelanin. Our study aimed at elucidating UV-induced physiological degradation of both melanins. Using human black hair and red hair, we found that eumelanin is degraded to give PTCA (pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid) while pheomelanin is changed from benzothiazine to benzothiazole structure. Next, using mouse hair and human hair and synthetic eumelanin and pheomelanin, we found similar changes in structure of melanin upon UVA irradiation. Finally, using cultured melanocytes and retinal pigment epithelial cells, we showed that eumelanin gives rise to cross-linking structure upon UVA or visible light irradiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：メラニン 紫外線 可視光線 ユーメラニン フェオメラニン UVA UVB

1. 研究開始当初の背景

メラニン色素はメラノサイトにおいて生成され、皮膚や毛の色が決まる。哺乳類のメラニンには黒色のユーメラニン (EM) と赤褐色のフェオメラニン (PM) の 2 型があり、前者は紫外線に対して細胞防御に働くが、後者は光発がんをもたらすと言われている。メラニンは表皮メラノソームにおいて産生され、ケラチノサイトに転送されるが、その後の紫外線によるメラニンの生体内での分解についてはほとんど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、EM、PM 両型のメラニンの紫外線による生理的分解過程の解明を目的とした。

3. 研究の方法

EM、PM として、合成メラニン、毛髪メラニン、網膜色素上皮メラニン、培養メラノサイト、網膜色素上皮組織を用いた。これらのメラニンを H₂O₂ 酸化、HI 水解して生成する分解産物を HPLC を用いて定量することにより、メラニンの分解過程を追跡した。

4. 研究成果

(1) UVA-induced degradation of melanins: Fission of indole moiety in eumelanin and conversion to benzothiazole moiety in pheomelanin (論文 20)

ヒト黒色毛と赤毛を用いて先端から毛根部にかけてメラニンを分析することにより、日光紫外線により酸化的变化が起こり、EM は遊離の PTCA (ピロール-2,3,5-トリカルボン酸) が分解の指標になりうること、PM ではベンゾチアジン体からベンゾチアゾール体に変換することを見出した。つぎに、マウス体毛およびヒト毛髪に UVA を照射しても同様な変化が起ることを示した。さらに、合成 EM および PM についても同様な変化を確認した。これらの結果は、UVA によるメラニンの分解を示し、UVA によるメラニンの黒化は、紫外線防御作用をもたらさないことを示唆した。

(2) Photoaging of human retinal pigment epithelium is accompanied by oxidative modification of its eumelanin (論文 10)

合成および天然メラニンについて、UVA および可視青色光による光分解過程を解析した。その結果、PTeCA (ピロール-2,3,4,5-テトラカルボン酸) が EM の架橋度を示す特異的な指標となることが分かり、これを用いて、培養メラノサイト、単離ウシ網膜色素上皮 (RPE) メラニン、ヒト RPE 細胞において、EM が UVA あるいは可視光による分解過程において架橋構造を形成することを示した。

(3) Difference spectral study of UVA-induced oxidation of 5,6-

dihydroxy-2-carboxylic acid (DHICA) melanin (論文作成中)

DHICA-melanin が可溶性であることを利用して、UVA 照射による UV-VIS スペクトルの微細な変化を差スペクトルとして追跡した。その結果、UVA 照射によりキノン体が生成し、その後、徐々に分解し、活性酸素を生成することを明らかにした。

(4) その他

a) Direct chemical evidence for eumelanin pigment from the Jurassic period. (論文 23)

2 億年前のイカ墨のメラニンが現在の EM と構造的に類似であることを化学的、物理的に証明した。その過程で PTeCA が EM 中の架橋構造の指標になることを初めて示した。その後、関連する論文として、High-performance liquid chromatography estimation of cross-linking of dihydroxyindole moiety in eumelanin. (論文 11) および Impact of diagenesis and maturation on the survival of eumelanin in the fossil record (論文 6) を発表した。

b) Neutral pH and copper ions promote eumelanogenesis after the dopachrome stage (論文 7)

EM 合成のドーパクロム以降の過程に対する pH と銅イオンの影響を調べ、中性 pH と銅イオンが反応を促進し、銅イオンが DHICA/DHI 比を高めることを示した。

c) Age-dependent changes in eumelanin composition in hairs of various origins (論文 24)

白人、アジア人、黒人の黒色系毛髪のメラニンを分析し、DHI/DHICA 比に対する人種および年齢の影響を解析した。その結果、DHI/DHICA 比はアジア人であるが高いが、加齢とともに人種差がなくなることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 33 件)(全て査読有)

- (1) Okuda H, Yoshino K, Wakamatsu K, Ito S, Sota T. Degree of polymerization of 5,6-dihydroxyindole-derived eumelanin from chemical degradation study. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Apr 21. doi: 10.1111/pcmr.12254.
- (2) Yoshizawa J, Abe Y, Oiso N, Fukai K, Hozumi Y, Nakamura T, Narita T, Motokawa T, Wakamatsu K, Ito S, Kawada A, Tamiya G, Suzuki T. Variants in melanogenesis-related

- genes associate with skin cancer risk among Japanese populations. *J Dermatol* 41: 296-302, 2014.
- (3) Takeuchi S, Abe Y, Yamada T, Kawano S, Hozumi Y, Ito S, Suzuki T, Nishigori C. Case of Hermansky-Pudlak syndrome 1 patient with milder symptoms in Japanese. *J Dermatol* 41: 268-270, 2014.
- (4) Mizote Y, Wakamatsu K, Ito S, Uenaka A, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Ito A, Tamura Y, Honda H, Yamashita T, Nohara S, Oka M, Jimbow K, Nakayama E. TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimide-dextran (NPCMD). *J Dermatol Sci* 73: 209-215, 2014.
- (5) Hirobe T, Ito S, Wakamatsu K, Kawa Y, Abe H. The mouse brown (b/Tyrp1b) allele does not affect pheomelanin synthesis in mice. *Zool Sci* 31: 53-63, 2014.
- (6) Glass K, Ito S, Wilby PR, Sota T, Nakamura A, Bowers CR., Miller KE, Dutta S, Summons RE, Briggs DEG, Wakamatsu K, Simon JD. Impact of diagenesis and maturation on the survival of eumelanin in the fossil record. *Organic Geochem* 64: 29-37, 2013.
- (7) Ito S, Suzuki N, Takebayashi S, Commo S, Wakamatsu K. Neutral pH and copper ions promote eumelanogenesis after the dopachrome stage. *Pigment Cell Melanoma Res* 26: 817-825, 2013.
- (8) Hirobe T, Ito S, Wakamatsu K. The mouse ruby-eye 2d (ru2d/Hps5ru2-d) allele inhibits eumelanin but not pheomelanin synthesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 26: 723-726, 2013.
- (9) Singaravelan N, Raz S, Tzu S, Belifante S, Pavlicek, Beiles P, Ito S, Wakamatsu K, Eviatar N. Nevo Adaptation of pelage color and pigment variations in Israeli subterranean blind mole rats. *PLoS One* 8: e69346, 2013.
- (10) Ito S, Pilat A, Gerwat W, Skumatz CMB, Ito M, Kiyono A, Zadlo A, Nakanishi Y, Kolbe L, Burke JM, Sarna T, Wakamatsu K. Photoaging of human retinal pigment epithelium is accompanied by oxidative modification of its eumelanin. *Pigment Cell Melanoma Res* 26: 357-366, 2013.
- (11) Ito S, Wakamatsu K, Glass K, Simon JD. High-performance liquid chromatography estimation of cross-linking of dihydroxyindole moiety in eumelanin. *Anal Biochem* 434: 221-225, 2013.
- (12) Cirillo G, Miraglia del Giudice E, Ito S, Wakamatsu K, Bizzarri C, Romano A, Grandone A, Perrone L, Cappa M, Marini R. Lack of red hair phenotype in a North-African obese child homozygous for a novel POMC-null mutation: hair pigment chemical analysis. *Br J Dermatol* 167: 1393-1395, 2012.
- (13) Engelen M, Vanna R, Bellei C, Zucca FA, Wakamatsu K, Monzani E, Ito S, Casella L, Zecca L. Neuromelanins of human brain have soluble and insoluble components with dolichols attached to the melanic structure. *PLoS One* 7: e48490, 2012 (13 p).
- (14) Wakamatsu K, Murase T, Zucca FA, Zecca L, Ito S. Biosynthetic pathway to neuromelanin and its aging process. *Pigment Cell Melanoma Res* 25: 792-803, 2012.
- (15) Timothy SL, Kevin D, Brent S, Wakamatsu K, Ito S, D'Orazio J. Pigment-independent cAMP-mediated epidermal thickening protects against cutaneous UV injury by keratinocyte proliferation. *Exp Dermatol* 81: 771-777, 2012.
- (16) Hirobe T, Wakamatsu K, Ito S. A new mutation of mouse Ruby-eye 2, ru2d/Hps5ru2-d inhibits eumelanin synthesis but stimulates pheomelanin synthesis in melanocytes. *Zool Sci* 29: 652-661, 2012.
- (17) Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y, Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, Nakayama E, Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K, Kamihira M. T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. *Nanomedicine (London)* 8: 891-902, 2012.
- (18) Ito S, Nishigaki A, Ishii-Osai Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Nakayama E,

- Jimbow K. Mechanism of putative neo-antigen formation from *N*-Propionyl-4-*S*-cysteaminylphenol, a tyrosinase substrate, in melanoma models. *Biochem Pharmacol* 84: 646-653, 2012.
- (19) Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nakayama E, Okura M, Jimbow K. *N*-Propionyl-4-*S*-cysteaminylphenol induces apoptosis in B16F1 cells and mediated tumor-specific T-cell immune responses in a mouse melanoma model. *J Dermatol Sci* 67:51-60, 2012.
- (20) Wakamatsu K, Nakanishi Y, Miyazaki N, Ludger K, Ito S. UVA-induced degradation of melanins: Fission of indole moiety in eumelanin and conversion to benzothiazole moiety in pheomelanin. *Pigment Cell Melanoma Res* 25: 434-445, 2012.
- (21) Chiaverini C, Sillard L, Flori E, Ito S, Wakamatsu K, Briganti S, Fontas E, Bernard E, Cailliez M, Cochat P, Foulard M, Guest G, Niaudet P, Picard M, Bernard FX, Antignac C, Ortonne JP, Ballotti R. Cystinosin is a melanosomal protein that regulates melanin synthesis. *FASEB J* 26: 3779-3789, 2012.
- (22) Glass, K, Ito S, Wilby PR, Sota T, Nakamura A, Bowers CR, Vinther JV, Dutta S, Summons R, Briggs DEG, Wakamatsu K, Simon JD. Direct chemical evidence for eumelanin pigment from the Jurassic period. *Proc Natl Acad Sci*, 109: 10218-10223, 2012.
- (23) Kono M, Kondo T, Ito S, Wakamatsu K, Ito S, Tomita Y. Oculocutaneous albinism 1 minimal pigment type: A case report on the analysis of genotype of an OCA1MP patient. *Br J Dermatol* 166: 896-898, 2012.
- (24) Commo S, Wakamatsu K, Kozano I, Panhard S, Loussouarn G, Bernard BA, Ito S. Age-dependent changes in eumelanin composition in hairs of various origins. *Int J Cosmetic Sci* 34: 102-107, 2012.
- (25) Valenzuela RK, Ito S, Wakamatsu K, Brilliant MH. Prediction model validation: normal human pigmentation variation. *J Forensic Res* 2: 1000139, 2011.
- (26) Hyogo R, Nakamura A, Okuda H, Wakamatsu K, Ito S, Sota T. Mid-infrared vibration spectroscopic characterization of 5,6-dihydroxyindole and eumelanin derived from it. *Chem Phys Lett* 517: 211-216, 2011.
- (27) Hirobe T, Yoshihara C, Takeuchi S, Wakamatsu K, Ito S, Abe H, Kawa Y, Soma Y. A novel deletion mutation of mouse ruby-eye 2 named ru2d/Hps5ru2-d inhibits melanocyte differentiation and its impaired differentiation is rescued by L-tyrosine. *Zool Sci* 28: 790-801, 2011.
- (28) Hirobe T, Yoshihara C, Takeuchi S, Wakamatsu K, Ito S, Abe H, Kawa Y, Soma Y. A novel deletion mutation of mouse ruby-eye 2 named ru2d/Hps5ru2-d inhibits melanocyte differentiation and its impaired differentiation is rescued by L-tyrosine. *Zool Sci* 28: 790-801, 2011.
- (29) Hellström AR, Watt B, Fard SS, Tenza D, Mannström P, Narfström K, Ekesten B, Ito S, Wakamatsu K, Larsson J, Ulfendahl M, Kullander K, Raposo G, Kerje S, Hallböök F, Marks MS, Andersson L. Inactivation of pmel alters melanosome shape but has only a subtle effect on visible pigmentation. *PLoS Genet* 7:e1002285, 2011.
- (30) Panzella L, Wakamatsu K, Monfrecola G, Ito S, Ayala F, Napolitano A. Increased cysteinyl-dopa plasma levels hint to melanocyte as stress sensor in psoriasis. *Exper Dermatol* 20: 288-290, 2011.
- (31) Hirobe T, Ito S, Wakamatsu K. The mouse pink-eyed dilution allele of the P-gene greatly inhibits eumelanin, but not pheomelanin synthesis as studied by chemical analysis. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 241-246, 2011.
- (32) Ito S, Nakanishi Y, Valenzuela RK, Brilliant MH, Kolbe L, Wakamatsu K. Usefulness of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin in various tissue samples: application to chemical analysis of human hair melanins. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 605-613, 2011.

- (33) Niki Y, Yoshida M, Ando H, Wakamatsu K, Ito S, Harada N, Matsui MS, Yarosh DB, Ichihashi M. 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane inhibits melanin synthesis by dual mechanism. J Dermatol Sci 63:115-121, 2011.

〔学会発表〕(計7件)

- (1) Ito S, Evaluation of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin. XXIth International Pigment Cell Conference, September 20, 2011. フランス国ポルドー市。
- (2) Wakamatsu K, Elucidation of biogenic pathway of a dark brown pigment neuromelanin in the substantia nigra of human brain. XXIth International Pigment Cell Conference, September 20, 2011. フランス国ポルドー市。(招待講演)
- (3) Wakamatsu K, Ultraviolet A (UVA)-induced oxidative degradation of melanin. 第24回日本色素細胞学会、2012年11月24日、滋賀県高浜市。
- (4) Ito S. Thermally-induced cross-linking of dihydroxyindole moiety in fossil eumelanin. 第24回日本色素細胞学会、2012年11月24日、滋賀県高浜市。
- (5) Ito S. (Photo)degradation of eumelanin and pheomelanin and its physiological significance. September 10, 2013. ポルトガル国リスボン市。(招待講演)
- (6) Ito S. Neutral pH and copper ions promote eumelanogenesis after the dopachrome stage. 第25回日本色素細胞学会、2013年11月16日、大阪府吹田市。
- (7) Wakamatsu K. Elaboration of chemical degradative approach to characterizing neuromelanins from various brain regions. 第25回日本色素細胞学会、2013年11月16日、大阪府吹田市。

〔図書〕(計1件)

- (1) Ito S, Wakamatsu K, d'Ischia M, et al. Melanins and Melanosomes, 2011 (19頁).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 祥輔 (ITO SHOSUKE)
藤田保健衛生大学・名誉教授
研究者番号：70121431

(2) 研究分担者

若松 一雅 (WAKAMATSU KAZUMASA)
藤田保健衛生大学・医療科学部・教授
研究者番号：80131259