

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：31303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655159

研究課題名(和文)メラニン形成によるフリーラジカル生成と発ガン性リスクの検討

研究課題名(英文)Considerations relationship between free radical generation by melanogenic and carcinogenicity risk

研究代表者

多田 美香(Tada, Mika)

東北工業大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：90375189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：黒色メラニンは真皮と表皮の境界に存在するメラノサイトで形成後、メラノソームに蓄積され角化細胞に移動し、メラニンキャップとよばれる構造を作る。これによって角化細胞の核はメラノソームに囲まれ紫外線から保護される。一方、我々は黒色メラニンが活性分子種に直接作用することを報告したが、メラニン形成初期段階のチロシナーゼ反応でヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)の生成を見出した。反応性の高い $\cdot\text{OH}$ は脂質過酸化、DNA損傷、炎症の原因で発ガン性リスクを高める。本研究成果報告書ではレドックス反応をとおしてメラニン形成のバランスの重要性と発ガン性リスクの低減につながる機能性成分の抗酸化能評価法(方法論)を提案する。

研究成果の概要(英文)：Exposure of ultraviolet irradiation to the skin causes detrimental cutaneous damages, which may result in photocarcinogenesis. Eumelanin has been found in almost every type of human skin, and synthesized in melanocytes located in the basal layer and hair bulbs transfers to keratinocytes. Eumelanin in keratinocytes acts as a photoprotector through body coloration and scavenging reactive oxygen species. Therefore, redox-related problems include lipid peroxidation, causing aging, DNA damage, increased inflammation levels, and finally a risk of carcinogenesis. Since tyrosinase is an enzyme which contains dinuclear copper ions at the active site, dicopper-peroxide intermediates formed during the catalytic process of tyrosine to dopaquinone possibly decay to produce $\cdot\text{OH}$ through an internal electron transfer from the ligand. In this study, we reported that importance of melanin-balance and mechanisms for decrease in risk of photocarcinogenesis by using antioxidative regents.

研究分野：生体関連化学

キーワード：free radical 酸化ストレス melanin hydroxyl radical tyrosinase spin trapping ESR 抗酸化

1. 研究開始当初の背景

メラニン、皮膚、眼球、毛髪、脳など、さまざまな臓器や器官に滞留している。特に黒色メラニン (eumelanin) は紫外線を吸収することで DNA 損傷を防ぎ、皮膚ガンを抑制することが知られている。研究代表者らは電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法によって黒色メラニンの新たな抗酸化機構を提案した (M. Tada, et al., (2010) J. Clin Biochem Nutr, 46, 224-228.)。ESR スピントラップ法は皮膚のような水分を多く含む組織に近い条件で、活性酸素・フリーラジカルの発生・消去を捉えることができる唯一の手法である。一方、メラニン形成の初期反応であるチロシン-チロシナーゼ反応において、極めて反応性の高いヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成を見出した (M. Tada, et al., (2010) J. Clin Biochem Nutr, 47, 162-166.)。

このような背景から、たとえ黒色メラニンが抗酸化物質であっても過剰に形成されれば $\cdot\text{OH}$ の生成量も増大し、発ガンの原因である脂質過酸化や DNA 損傷の危険性 (リスク) が高まることを想定させる。つまり、メラニンの役割とその形成機構をより深く把握することは生命活動に不可欠だと考えている。そのためには、活性酸素・フリーラジカルの生成・消去系が存在する酸化還元 (レドックス) 反応場での検討が必要である。しかしながら、死亡率が約 80% の悪性黒色腫 (メラノーマ) や様々な皮膚ガンの疫学的・分子生物学的な研究は進んでいるが、レドックス反応によるフリーラジカル生成と発ガン性についての検討はなされていない。

2. 研究の目的

メラニン形成機構で生成するフリーラジカルを指標とした発ガン性リスク評価の方法論を提案することが目的である。問題点は、メラニンのような黒色素は滞留する臓器や組織や生物種の違いによって役割が異なることから、その形成機構は複雑でありメラニンとフリーラジカル生成との関係には未解明のことが多い。一方、疫学的な手法のみでは、発ガン性リスクとフリーラジカルとの相互関係を把握することが難しい。そこで、化学的分析手法を取り入れた新たな方法論が必要である。

3. 研究の方法

(1) ESR による定量・定性分析

短寿命の活性酸素・フリーラジカルの定量・定性分析には、ESR スピントラップ法が有効である。ESR スピントラップ法は水系で生成する短寿命な酸素ラジカルなどをスピントラップ剤で捕捉し、安定ラジカルのスピンアダクトを検出する方法である。しかしながら、チロシナーゼ反応系での ESR 測定はルーチンには進められない。そこで、常に安定で再現性のよい測定を行うために研究分担者と協力して ESR 測定法の最適化を行った。

酸素ラジカルが検出された場合、酸素消費量と酸素ラジカル生成量との関係性を検討するために、ニトロキシルラジカルの TEMPOL をレドックスおよびオキシメトリーの指標として用いた ESR 測定を行った。

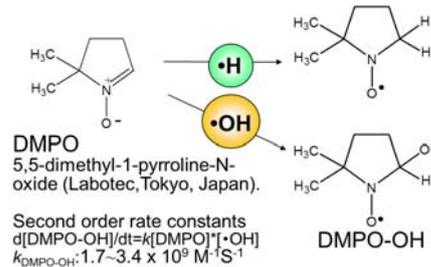


図 1 スピントラップ試薬 (DMPO) と DMPO-OH の構造式

(2) ESR, 発光計測, 質量分析法によるフリーラジカルとメラニンとの相互作用の検討

発ガンの原因である脂質過酸化などの酸化ストレス条件において、メラニンと生成するフリーラジカルの変動を観察した。PerkinElmer Inc. AxION DSA (Direct Sample Analysis) System によって皮膚や細胞膜などの構成成分である脂質を組成分析し、発ガン性リスクが高いと想定される分子種 (または原子種) のスクリーニングを試みた。

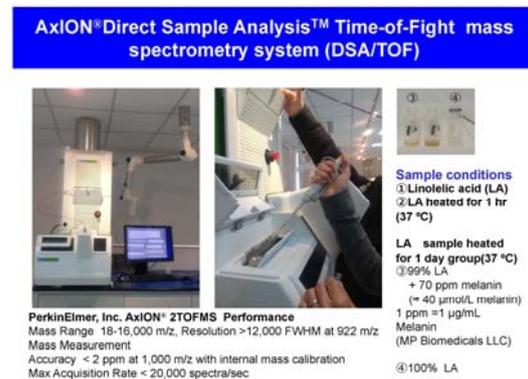


図 2 質量分析法による定性・定量分析

(3) *In situ* でのフリーラジカル生成と光応答

UVA 照射前後のメラノサイトのフリーラジカル生成を観察した。生成したラジカル種と *in vitro* の分析データをもとに発ガン性リスク評価の指標となる分子種を検討した。

4. 研究成果

(1) ESR による定量・定性分析

メラニン形成に至るまでの化学反応に着目し、フリーラジカルの生成・消去系が存在するレドックス反応とメラニン形成機構の関連性を検証した。特に、分子状酸素を用いてチロシンからドーパ (DOPA) への水酸化反応、ドーパキノンへの酸化反応を触媒するチロシナーゼに着目し、ESR スピントラップ法によってフリーラジカルの定性・定量分析を行った。

チロシナーゼ反応 45 秒以内に DMPO-OH

($aN=1.49\text{ mT}$; $aH=1.49\text{ mT}$) が検出され、反応の基質をチロシンから L-DOPA に変えることで DMPO-OH の信号は顕著に増大した (図 3)。DMPO-OH はチロシナーゼ反応時間とともに減少した。次に ESR オキシメトリーによって、チロシンおよび L-DOPA とチロシナーゼの反応 1 分以内での溶存酸素濃度は数十 μM まで減少することが示された (図 4)。基質の違いによる酸素消費の差異は認められなかった。DMPO-OH 生成抑制に対するスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼの影響は、それぞれ 15% 以下 (スピニアダクトの測定誤差 $\pm 5\%$ 程度) であった。

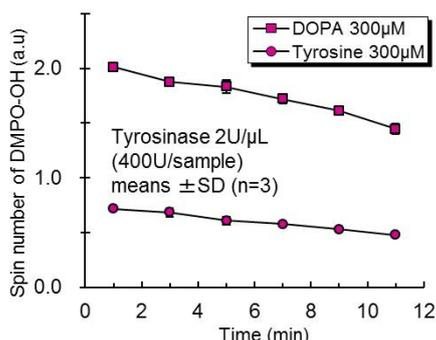


図 3 DMPO-OH の ESR 信号の時間変化

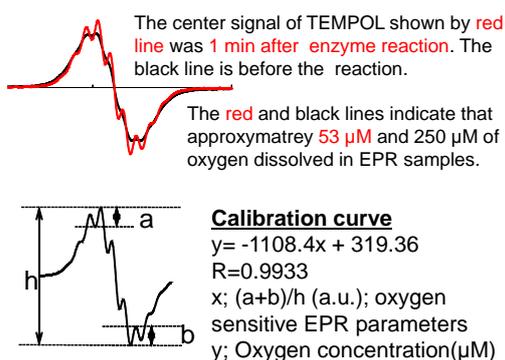


図 4 TEMPOL による ESR オキシメトリー

以上のことから、生理条件下のメラニン形成の律速反応であるチロシナーゼ反応において、発ガン性リスクを高める可能性として $\cdot\text{OH}$ 生成が想定された (他の活性酸素の生成は関与していない)。ただし、今回の反応条件では $\cdot\text{OH}$ の生成量は 1 分以内に $\sim 2\ \mu\text{M}$ 程度であることから、生体内の活性酸素濃度 (μM オーダー) の範囲に留まっている。しかしながら、ガンなどの重篤なレドックス疾病原因の一つである脂質過酸化、DNA 損傷を引き起こすには $\cdot\text{OH}$ とターゲット分子までの距離 (反応場) も Key になる。生体内には、抗酸化酵素群や抗酸化物質が存在し生成した $\cdot\text{OH}$ を速やかに消失することができれば酸化ストレスを予防できる。また、外因性の薬剤や機能性物質によって $\cdot\text{OH}$ 生成量および生成速度をコントロールできれば、発ガン性リスクを低減することができる。このような経緯から、チロシナーゼ反応系での $\cdot\text{OH}$

低減効果の薬剤・機能性物質のスクリーニングを行った。キレート療法薬剤のデフェロキサミン、美白成分のアルブチン、コウジ酸、抗酸化物質のグルタチオン (GSH) においてチロシナーゼ反応系での $\cdot\text{OH}$ 低減効果が認められ、すべての薬剤・機能性物質においてチロシナーゼ反応系での $\cdot\text{OH}$ およびドーパクロム生成を抑制した (data not shown)。また、機能性物質のアルブチン、コウジ酸では生成後の $\cdot\text{OH}$ を消失させる効能も認められた。この成果を The 16th biennial meeting for the Society for Free Radical Research International (London, 6-9th September 2012) にて発表し SFRR Asia 『Young Investigator Award』を受賞した。

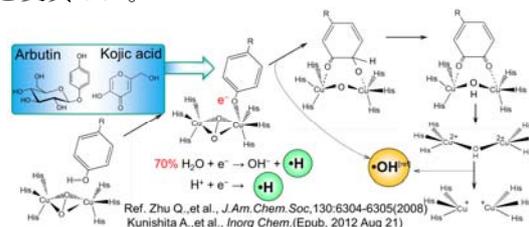


図 5 アルブチンおよびコウジ酸の $\cdot\text{OH}$ 生成抑制機構 (推定)

(2) ESR, 発光計測, 質量分析法によるフリーラジカルとメラニンとの相互作用

一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) 由来の燐光計測, および TPC のラジカル化を指標とした ESR 法 (K. Ishiyama et al., PLoS One. 2012;7(5):e37871, TPC;2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide) ではメラニン形成初期反応での $^1\text{O}_2$ 生成は認められなかった。一方、形成後の黒色メラニンが自動酸化された脂質と反応することで発光値の増加現象を捉えた (data not shown)。なお、正常値の発光レベルと比較のためメラニン色素正常細胞 (メラノサイト) の自家発光を観察した。その結果, 図 6 のように微弱発光レベルであった。

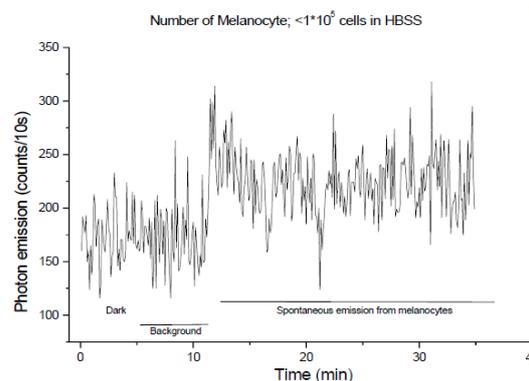


図 6 メラノサイトの自家発光計測データ

次に、自動酸化リノール酸を酸化ストレスモデルとして用い、AxION DSA System による黒色メラニンの脂質過酸化反応に及ぼす影響を定性・定量分析した結果、未酸化のリノール酸由来のマスペクトル (Posi, 281m/z) に対する数十 ppm のメラニン添加の

変動は認められた (data not shown)。一般的な酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒドやノネナール、および発光種に関するジオキセタン構造由来の m/z 値は確認できなかった。

ESR 法・発光計測・質量分析法の統合的な検討によって、メラニンと酸化された脂質の距離が近づくことで直ちに発光種 (活性分子種) が生成することがわかったが、AxION DSA System で酸化ストレスマーカー候補分子を絞り込むことはできなかった。質量分析の成績がわかった要因には酸化ストレスマーカー候補とした発光種は寿命が極めて短い (ピコ~ナノ sec オーダー) ことを推定している。

(3) *In situ* でのフリーラジカル生成と光応答
メラノサイト懸濁液 (約 3×10^5 cells/ml) に UVA (365nm, 300mW/cm² 以下) を照射することで・OH 生成を確認した。・OH 生成量は UVA の照射時間 (1 分~5 分間) に従って増大した。ただし、緩衝液に UVA を 1 分照射すると UVA 照射前 (図 7. UVA 0min) のメラノサイトから生成する DMPO-OH レベルまで増加することから、図 7 の DMPO-OH はメラノサイトと水が起因した・OH の DMPO スピンアダクトである。次に、接着細胞のメラノサイトを伸展させたまま B 励起光を約 2 分照射すると照射直後の細胞の形態変化はなかったが、30 分以内にメラノサイトの一部は剥離した。機序は不明だが、メラノサイトは青色光に応答していることが示唆された。

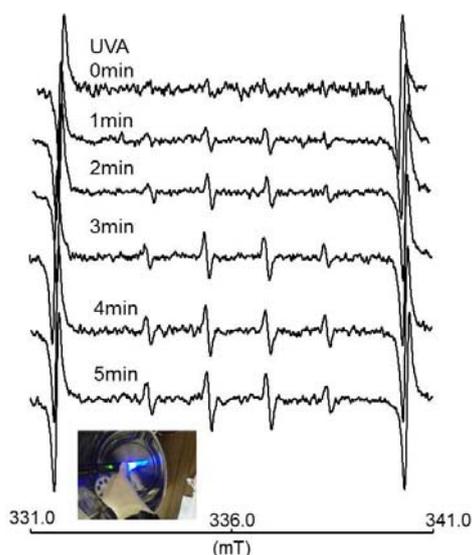


図 7 上段;メラノサイト懸濁液に UVA を照射して生成した DMPO-OH の ESR 信号
下段; B 励起光を照射したメラノサイトの自家蛍光観察 (写真中央) と照射前の明視野観察 (写真右)

(1)~(3)の結果から、紫外線による発ガン性リスクを低減させるための指標として①メラニン形成に関与する・OH、②形成後のメラニンと脂質との反応中間体 (発光種) を提案したい。その理由は、角質細胞間脂質の主成分セラミドの構成成分のリノール酸とメラノサイトで合成されて角質細胞などの表皮を構成する細胞層に移動した黒色メラニンとの相互作用を知ることは生体防御機構を理解するために重要である。レドックス反応をとおしてメラニン形成速度と形成量を相補的に制御することで過剰な・OH 生成を抑制し皮膚の正常化に繋がると考えている。最後に、成果の一部はメラニン初期反応で生成する・OH を指標とした抗酸化能評価の方法論に関する研究論文として発表した (M. Tada, et al., BMC Biochem. 2014; 15:23)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

① M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano: "Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA", BMC Biochem. 2014; 15:23 (2014) <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/15/23> 査読有。

② M. Tada, M. Kobayashi, S. Kasai, M. Kohno, Y. Niwano: "Scavenging and quenching effects of melanin on ROS and other reactive species" Journal of clinical Biochemistry and Nutrition, 54. Supplement, p.39 (2014) 査読無。

③ M. Tada, Y. Niwano, S. Kasai, H. Kodama, H. Noda, T. Ogata, and M. Kohno: "A study on the radical generation through the process of melanin synthesis" Free Radical Biology and Medicine, 53. S142-S143 (2012) 査読有。

〔学会発表〕 (計 12 件)

① M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano: "Arbutin alleviates oxidative stress generated through tyrosinase reaction with" The 3rd International Conference on CESBM: FOCUS ON REDOX REACTION. 2014.06.27, Ferrara, Italy.

② M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano: "Tyrosinase inhibitors alleviate oxidative stress induced by melanin synthesis: tested by an ESR-spin trapping method" Biological and Materials Science Oriented Applications (2nd AWEST 2014). 2014.06.16. 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)

③ M. Tada, M. Kobayashi, S. Kasai, M. Kohno, Y. Niwano: "Scavenging and quenching effects of melanin on ROS and other reactive species" 第 17 回国際フリーラジカル学会 (17th Biennial Meetings of the SFRRI 2014). 2014.03.24. Kyoto International Conference Center (京都府・京都市)

④ 多田美香, 庭野吉己, 葛西重信, 小林正樹, 伊藤智博, 尾形健明, 河野雅弘: "メラニン形

成の初期反応で生成するフリーラジカルの研究" 第 27 回日本酸化ストレス学会関東支部会. 2012.12.15. 東京工業大学大岡山キャンパス蔵前会館 (神奈川県・横浜市)

⑤多田美香, 庭野吉己, 葛西重信, 小林正樹, 伊藤智博, 尾形健明, 河野雅弘: "メラニン形成機構で生成するフリーラジカルの研究" 第 51 回電子スピンスイエンズ学会年会. 2012.11.03. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

⑥M. Tada, Y. Niwano, S. Kasai, H. Kodama, H. Noda, T. Ogata, and M. Kohno: "A study on the radical generation through the process of melanin synthesis" Society for Free Radical Research International 16th Biennial Meeting (SFRRRI 2012) 2012.09.06-09. London, UK.

⑦M. Tada, Y. Niwano, S. Kasai, M. Kobayashi, T. Ito, T. Ogata, and M. Kohno: "A study on free radicals generation through the process of tyrosine-tyrosinase reactions" The 2nd International Symposium on Electron Spin Science. 2012.07.23-25. Hotel Matsushima Taikanso (宮城県・松島町)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ (SFRR Asia 2012 受賞報告 ; http://www.tohtech.ac.jp/news/2012/12/young_investigator_award.html, 等)

6. 研究組織

(1)研究代表者

多田 美香 (TADA MIKA)

東北工業大学・共通教育センター・准教授
研究者番号 : 90375189

(2)研究分担者

伊藤 智博 (ITO TOMOHIRO)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号 : 60361276