

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461705

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分解過程の解明とその生理的意義

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

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) 3,700,000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(UV)-A(および可視青色光)による分解過程およびその生理的意義の解明を目的とした。EMのモデルとしてのDHICAメラニンについて、UVAにより酸化されてキノン体となり、さらに酸化されて特異的分解産物を生じるが、これらの過程において、スーパーオキシドラジカルおよび一重項酸素が生じることを示した。さらに、合成EMおよびPMについて、300-550 nmの光照射により前記の活性酸素を生じるが、メラニンにより速やかに捕捉されることを示した。

研究成果の概要(英文)：Melanin is classified into black eumelanin and reddish pheomelanin. Our study aimed at elucidating UVA(and blue light)-induced degradation of both melanins and its physiological significance. Using DHICA-melanin as a model of eumelanin, we showed that it is oxidized by UVA to form a quinone form and further oxidized to form a specific degradation product. We also showed that during these processes, superoxide radical and singlet oxygen are produced. We then showed that upon irradiation of 300-550 nm light, synthetic eumelanin and pheomelanin produce those reactive oxygen species which are rapidly trapped by melanin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：メラニン 紫外線 ユーメラニン フェオメラニン UVA

## 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産生され、皮膚や毛の色を決めている。哺乳類および鳥類のメラニンには、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サイトにおいて産生され、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。

そこで筆者らは、ヒトの黒色毛と赤毛についてメラニン分析を行い、UVA (320-400 nm)により酸化的な変化が起こり、遊離のPTCA (ピロール-2,3,5-トリカルボン酸)が生成すること、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 (Pigment Cell Melanoma Res, 2012)。さらに同様な手法を用いて、UVAおよび可視青色光が網膜色素上皮メラニンを分解することを示した (Pigment Cell Melanoma Res, 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの成果を踏まえ、EMおよびPMのUVA(および可視青色光)による分解過程およびその生理的意義を、合成メラニン、毛髪メラニン、ヒト正常メラノサイト、ヒト皮膚を用いて解明したい。

## 3. 研究の方法

EM、PMとして、合成メラニン、毛髪メラニン、培養メラノサイト、ヒト皮膚を用いた。これらのメラニンを $H_2O_2$ 酸化、HI水解して生成する分解産物をHPLCで定量することにより、メラニンの分解過程を追跡する。また、可溶性の合成メラニンについては、UV-VISスペクトルの変化を追跡することにより、分解過程を追跡する。

## 4. 研究成果

(1) Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio (論文19)

ヒト皮膚メラニンの性状を35検体について分析した。その結果、メラニン含量のいかんを問わずほぼ74%のEMと26%のPMとからなること、メラニン含量は皮膚の色調と相関するが分かった。これらの結果は、淡色の皮膚のヒトにおいて皮膚がんが多発することを説明するものと言える。(フランス国 Del Bino 博士との共同研究)

(2) Mechanism of UVA-induced oxidation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) melanin using a differential spectrophotometric method (論文9)

DHICAメラニンの可溶性を利用して、UVA

照射の影響を調べた。その結果、DHICAメラニンはUVAにより酸化されてキノン体となり、その際、スーパーオキシドラジカルが生成することが分かった。キノン体はUVAによりさらに酸化されて遊離PTCAを生じるが、その際、一重項酸素が発生し、メラニン分解に寄与することが分かった。この結果は、UVAによる皮膚の黒化は、メラニンの増加をもたらさず、むしろメラニンのサンスクリーンとしての効果を損ねることを意味する。(ポーランド国 Sarna 教授との共同研究)

(3) Aerobic photoreactivity of synthetic eumelanins and pheomelanins: generation of singlet oxygen and superoxide anion (論文4)

合成EMおよびPMについて、ESRを用いて光反応性を比較した。その結果、EM、PMともに300-550nmの光照射(特に短波長側において)により一重項酸素およびスーパーオキシドラジカルを産生するが、これらの活性酸素種は速やかにメラニンに捕捉されることが分かった。これらの結果は、メラニンには潜在的に光毒性作用をもつ可能性を示唆している。(ポーランド国 Sarna 教授との共同研究)

## (4) 予備的な研究成果

培養ヒトメラノサイトを用いる研究：培養メラノサイトにUVAあるいはVisible lightを照射して比較すると、メラニン分解過程がやや異なることが分かった。現在、詳細な解析を進めている。(ドイツ国 Kolbe 博士との共同研究)

毛髪メラニンを用いる研究：マウスの黄色毛(PMが豊富)および黒色毛(EMが豊富)にUVAを照射すると、黄色毛においてグルタチオンの酸化および過酸化水素の産生が早いことを見出した。

(5) その他：ロドデンドロール(RD)および関連するフェノール類による脱色素斑形成の生化学的研究(論文2, 3, 11, 14, 15, 20, 23, 25)

RDは美白剤として市販されてきたが、2013年7月、多数の消費者に脱色素斑を惹起することが判明し、市場から回収された。その作用機序について、札幌医大皮膚科山下教授との共同研究により、生化学的な解明を進めた。

主な研究成果として、RDは市販のマッシュルームチロシナーゼの良好な基質となり、毒性代謝物を産生する(論文25)。RDはヒトチロシナーゼについても良好な基質となる(論文23、ドイツ国 Kolbe 博士との共同研究)。RDは培養メラノマ細胞において、チロシナーゼ酸化により生成するキノン体がタンパクのSH基と結合する(論文20)。

RDメラニンは強い酸化促進作用をもち、グルタチオン等を酸化すると同時に活性酸素を産生する(文献3)などである。

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25件)(全て査読有)

- (1) Wakamatsu K, Nagao A, Watanabe M, Nakao K, Ito S. Pheomelanogenesis is promoted at a weakly acidic pH. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30: 372-377, 2017
- (2) Ito S, Hinoshita M, Suzuki E, Ojika M, Wakamatsu K. The Tyrosinase-catalyzed oxidation of the leukoderma-inducing agent Raspberry ketone produces (*E*)-4-(3-oxo-1-butenyl)-1,2-benzoquinone: Implications for melanocyte toxicity. *Chem Res Toxicol* 30:859-868, 2017.
- (3) Ito S, Okura M, Wakamatsu K, Yamashita T. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 30: 63-67, 2017.
- (4) Szewczyk G, Zadlo A, Sarna M, Ito S, Wakamatsu K, Sarna T. Aerobic photoreactivity of synthetic eumelanins and pheomelanins: generation of singlet oxygen and superoxide anion. *Pigment Cell Melanoma Res* 29: 669-678, 2016.
- (5) Williams ST, Ito S, Wakamatsu K, Goral T, Edwards N, Wogelius R, Henkel T, de Oliveira L, Maiai L, Strekopytov S, Jeffries T, Speiser D, Marsden J. Identification of Shell Colour Pigments in Marine Snails *Clanculus pharaonius* and *C. margaritarius* (Trochoidea; Gastropoda). *PLOS One* 11: e156664 (p 25), 2016.
- (6) Edwards NP, van Veelen, Anné AJ, Manning PL, Bergmann U, Sellers WI, Egerton VM, Sokaras D, Alonso-Mori R, Wakamatsu K, Ito S, Wogelius RA. Elemental characterization of melanin in feathers via synchrotron X-ray imaging and absorption spectroscopy. *Sci Rep* 6: 34002 (p. 10), 2016.
- (7) Hasegawa M, Arai E, Ito S, and Wakamatsu K. High brood patch temperature of less-colourful, less-pheomelanin females in the Barn Swallow. *IBIS* 158: 808-820, 2016.
- (8) Ito S, Yamanaka Y, Ojika M, Wakamatsu K. The metabolic fate of *ortho*-quinones derived from catecholamine metabolites. *Int J Mol Sci* 17: E164 (8p), 2016.
- (9) Ito S, Kikuta M, Koike S, Sarna T, Wakamatsu K. Mechanism of UVA-induced oxidation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) melanin using a differential spectrophotometric method. *Pigment Cell Melanoma Res* 29: 340-351, 2016.
- (10) Lasisi T, Ito S, Wakamatsu K, Shaw CN. Quantifying variation in human scalp hair fiber shape and pigmentation. *Am J Physical Anthropol* 160: 341-352, 2016.
- (11) Abe Y, Okamura K, Kawaguchi M, Hozumi Y, Aoki H, TKunisada T, Ito S, Wakamatsu K, Matsunaga K, Suzuki T. Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin. *J Dermatol Sci* 81: 34-43, 2016.
- (12) Hirobe T, Ito S, Wakamatsu K. The *slaty* (*slt/Dctslt*) allele decreases the content of eumelanin, but not pheomelanin in the mouse hair. *Pigment Cell Melanoma Res* 29: 110-112, 2016.
- (13) Wakamatsu K, Tabuchi K, Ojika M, Zucca FA, Zecca L, Ito S. Norepinephrine

- and its metabolites are involved in the synthesis of neuromelanin derived from the locus coeruleus. *J Neurochem*, 135: 768-775, 2015.
- (14) Okura M, Yamashita T, Ishii-Osai Y, Yoshikawa M, Sumikawa W, Wakamatsu K, Ito S. Effects of rhododendrol and its metabolic products on melanocytic cell growth. *J Dermatol Sci* 80: 142-149, 2015.
- (15) Ito S, Wakamatsu K. A convenient screening method to differentiate phenolic skin whitening tyrosinase inhibitors from leukoderma-inducing phenols. *J Dermatol Sci* 80: 18-24, 2015.
- (16) Paterson EK, Fielder TJ, MacGregor GR, Ito S, Wakamatsu K, Gillen DL, et al. (2015). Tyrosinase depletion prevents the maturation of melanosomes in the mouse hair follicle. *PLoS ONE* 10: e0143702 (25p), 2015.
- (17) Dorshorst B, Liao X, Ito S, Wakamatsu K, Stothard P, Von Doormaal B, Plastow G, Leif Andersson L, Dominant Red Coat Color in Holstein Cattle is Associated with a Missense Mutation in the Coatomer Protein Complex, Subunit Alpha (COPA) Gene. *PLoS ONE* 0128969 (18p), 2015.
- (18) Abram PK, Guerra-Grenier E, Jr, Després-Einspenner M-L, Ito S, Wakamatsu K, Boivin G, Brodeur J. An insect with selective control of egg coloration. *Curr Biol* 25: 1-5, 2015.
- (19) Del Bino S, Ito S, Sok J, Nakanishi Y, Bastien P, Wakamatsu K, Bernerd F. Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. *Pigment Cell Res* 28: 707-717, 2015.
- (20) Ito S, Okura M, Nakanishi Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T. Tyrosinase-catalyzed metabolism of rhododendrol (RD) in B16 melanoma cells: production of RD-pheomelanin and covalent binding with thiol proteins. *Pigment Cell Melanoma Res* 28: 296-307, 2015.
- (21) d'Ischia M, Wakamatsu K, Cicoira F, Di Mauro E, Garcia-Borron J, Commo S, Galvan I, Ghanem G, Kenzo K, Meredith P, Pezzella A, Santato C, Sarna T, Simon JD, Zecca L, Zucca FA, Napolitano A, Ito S. Melanins and Melanogenesis: From Pigment Cells to Human Health and Technological Applications. *Pigment Cell Melanoma Res* 28: 520-544, 2015.
- (22) Tanaka G, Parker AR, Hasegawa Y, Siveter DJ, Yamamoto R, Miyashita K, Takahashi Y, Ito S, Wakamatsu K, Mukuda T, Masuura M, Tomikawa K, Furutani K, Maeda H. Mineralized rods and cones suggest colour vision in a 300 Myr-old fossil fish. *Nature Comm* 5: 5920, 2014.
- (23) Ito S, Gerwat W, Kolbe L, Yamashita T, Ojika M, Wakamatsu K. Human tyrosinase is able to oxidize both enantiomers of rhododendrol. *Pigment Cell Melanoma Res* 27:1149-1153, 2014.
- (24) Wakamatsu K, Tanaka H, Tabuchi K, Ojika M, Zucca FA, Zecca L, Ito S. Reduction of the nitro group to amine by hydroiodic acid to synthesize o-aminophenol derivatives as putative degradative markers of neuromelanin. *Molecules* 19:8039-8050, 2014.

- (25) Ito S, Ojika M, Yamashita T, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of rhododendrol produces 2-methylchromane-6,7-dione, the putative ultimate toxic metabolite: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27: 744-753, 2014.

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 伊藤祥輔, 黄倉真恵, 若松一雅, 山下利春. ロドデノールユーメラニンは強い酸化促進作用をもつ。第27回日本色素細胞学会、2016年11月12日、岐阜県岐阜市岐阜大学サテライトキャンパス。
- (2) 後藤典子, 辻本昌理子, 永井宏, 正木太朗, 伊藤祥輔, 若松一雅, 錦織千佳子. N-Acetylcysteine(NAC)は紫外線によるロドデノールの色素細胞障害性増強効果を軽減する。第27回日本色素細胞学会、2016年11月12日、岐阜県岐阜市岐阜大学サテライトキャンパス。
- (3) 若松一雅, 山中佑太, 田中ひとみ, 小鹿一, 伊藤祥輔. カテコールアミン代謝物のオルトキノンの反応性の比較。第27回日本色素細胞学会、2016年11月12日、岐阜県岐阜市岐阜大学サテライトキャンパス。
- (4) Ito S. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. 20<sup>th</sup> European Society of Pigment Cell Research Meeting. September 13, 2016. イタリア国ミラノ市。(招待講演)
- (5) Ito S, Yamanaka Y, Ojika M, Wakamatsu K. The metabolic fate of ortho-quinones derived from catecholamine metabolites. 20<sup>th</sup> European Society of Pigment Cell Research Meeting. September 14, 2016. イタリア国ミラノ市。(招待講演)
- (6) Ito S. Mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Genmedskin* 2016. June 24, 2016. インド国ニューデリー市。(招待講演)
- (7) 伊藤祥輔. メラニン産生細胞におけるロドデノールの代謝。第26回日本色素細胞学会、2016年11月14日、北海道札幌市ホテルロイトン。(招待講演)
- (8) 伊藤祥輔. メラニン産生細胞におけるロドデノールの代謝。第114回日本皮膚科学会総会、2015年11月14日、神奈川県横浜市パシフィコ横浜。(招待講演)
- (9) Ito S, Ojika M, Yamashita K, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of rhododendrol produces a cyclic quinone, the ultimate toxic metabolite: Implication for melanocyte toxicity.

September 6, 2014. シンガポール国シンガポール市。

〔図書〕(計2件)

- (1) 若松一雅, 伊藤祥輔. メラニンの構造とその機能. 色素細胞第2版. 基礎から臨床へ. 伊藤祥輔, 柴原茂樹, 錦織千佳子監修. 慶應義塾大学出版会. pp. 127-145, 2015.
- (2) 塚本克彦, 伊藤祥輔. メラニン合成を規定する鍵酵素チロシナーゼ関連タンパク質. 色素細胞第2版. 基礎から臨床へ. 伊藤祥輔, 柴原茂樹, 錦織千佳子監修. 慶應義塾大学出版会. pp. 59-70, 2015.

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