

博士論文

皮膚の色素沈着形成における
真皮血管系の寄与

柴田 貴子

目次

1. 序章.....	2
2. 本論.....	6
2-1 3次元血管構造解析により、老人性色素斑には不規則に分岐した血管が存在することを解明	6
2-2 紫外線照射した血管内皮細胞は幹細胞因子（stem cell factor：SCF）を分泌し、表皮における色素沈着を引き起こす	14
2-3 経皮投与のトラネキサム酸による色素沈着改善効果と作用機序の解明	37
3. 総括.....	43
4. 謝辞.....	45

1. 序章

ヒトの体で最も大きな臓器と言われている皮膚は、表皮、真皮、皮下組織から成り立つ。表皮は主に表皮角化細胞（ケラチノサイト）と色素産生細胞（メラノサイト）、真皮は主に線維芽細胞（ファibroブラスト）・コラーゲン等の繊維・血管、皮下組織は主に筋肉組織と脂肪組織で構成される。表皮の最下層には、活発に分裂・増殖するケラチノサイトから成る基底層が存在し、ケラチノサイトの分化に伴い有棘層、顆粒層、そして最外層には角質層（角層）が存在し、最終的には垢として剥がれ落ちる。この一連のステップを表皮のターンオーバーと呼ぶ。また、メラノサイトは神経冠由来の細胞で、表皮基底層に存在する。

皮膚は外部環境と内部環境の間の障壁として、身体の恒常性の維持における重要な機能をもつ¹。例えば、メラノサイトはメラニン色素を合成することにより、紫外線を吸収するといった役割を果たし、いわば天然の日焼け止めとなる²。しかしメラニン生成が過剰になれば、老人性色素斑や肝斑といった色素異常症を引き起こす。これらのいわゆるシミと言われる顔面の色素沈着は、日本人をはじめとした多くの女性にとって大きな肌悩みの一つであり、化粧品会社は長年この悩みに対応する美白化粧品の開発に力を注いできた³。

シミについて議論する前に、メラニンの生成から皮膚での蓄積までの機構について紹介する。メラノサイト内におけるメラニン産生（メラノジェネシス）は、メラノソームという脂質二重膜で覆われた細胞内小器官内でのみ行われる⁴。メラノジェネシスはメラノソーム内に取り込まれたチロシンが酵素チロシナーゼにより酸化されるステップから始まる⁵。メラノジェネシスを終えたメラノソームは周囲のケラチノサイトに受け渡される。その後、ケラチノサイトのターンオーバーに伴い、表皮全体にメラニンが行き渡り、肉眼的に皮膚の色素沈着が確認できるようになる。

ヒトにおけるメラニンには2種類存在し、チロシナーゼによる酸化ステップを経て産生される黒色のユウメラニンと、システイン存在下で中間生成物と反応することで生じる赤褐から黄色のフェオメラニンである。ヒトの皮膚や毛髪に存在するメラニンはこれらのメ

ラニンの複合体であり、人種や個体差によりさまざまな割合で混合したメラニンが形成され、それが皮膚や毛髪の色に違いが生じる要因である⁶。メラニンの役割は、皮膚色の決定の他に、温度制御、抗菌作用、有害な活性酸素の吸収、毒性物質の吸収などがあるが、ヒト皮膚におけるもっとも重要な役割は、皮膚を紫外線から防御することである。実際、メラニン色素の多い肌の黒い人種では紫外線による皮膚癌の発生は少ない。

これまで皮膚の色素沈着異常のメカニズムならびに対処方法について、数多くの研究がなされてきた。古くはメラニン生合成の機構解明が中心であり、メラニン生成の律速酵素であるチロシナーゼの活性を制御することがもっとも有効な手段であると考えられていた。更に、紫外線照射後にメラニン生成が活性化する機構に着目し、紫外線照射により誘導されるケラチノサイト由来のメラニン生成を亢進する種々の情報伝達物質の探索や周辺細胞との相互作用に関する研究が行われてきた⁷。しかし、チロシナーゼ活性や紫外線照射によるメラニン生成亢進機序をターゲットとした治療法では、対症療法に過ぎないため、シミといった色素異常症を本質的に改善するためには、色素沈着異常を引き起こしている要因を突き止めること重要であった。

色素異常症の一種である老人性色素斑や肝斑は、慢性的な紫外線曝露による皮膚の光老化が主な原因と考えられている。老人性色素斑の特徴は、褐色から黒色の色素斑であり、主に日光を浴びることの多い顔面や手背等に発生する。大きさもまちまちで形状も非対称である。一方、肝斑は紫外線以外にも女性ホルモンの影響で発生することが知られており、主に頬や目の下、額などに左右対称に生じる。

これまで、紫外線照射によって生じる現象に着目しながら、これらの疾患における色素沈着部位と非病変部位における差異を見出す研究が盛んに行われており、単回の紫外線曝露だけでは見られない皮膚構造上の変化や細胞内の複数のシグナル伝達系におけるさまざまな変化が生じていることが知られている。それらは古くは表皮内の機構に着目したものが多かったが、近年、真皮からの作用についての報告も増えてきており^{8,9,10,11}、特に真皮に存在する毛細血管の関与が注目されつつある。色素異常症と血管の関係についてはかねてから示唆されており、メラノサイトが血管新生に関与する因子の受容体を発現している

こと¹²や、血液中に存在するプラスミンの阻害作用をもつトラネキサム酸が、皮膚では色素沈着異常に効果的であること¹³などが知られている。肝斑においては、血管指標が有意に増加していることが、Kang らにより報告されている^{14,15}。一方我々は、老人性色素斑に着目し、血管の関与について研究を進めてきた¹⁶。これまでの研究において、色素沈着部位と非病変部位の大きな違いとして色素沈着部位は慢性的な炎症状態にあることを見出し¹⁷、炎症を引き起こす要因のひとつとして、色素沈着部位における血管系の異常について深掘りすることが大きなヒントになると考えていた。そこで私は皮膚色素沈着形成における血管の関与に着目し、そのメカニズム解明にむけた研究を行うことにした。

本論は、皮膚色素沈着に関する 3 つの研究より構成される。第 1 の研究では、紫外線による色素沈着の代表例である老人性色素斑における血管の関与を決定付けるため、これまで立体構造が不明であったことに着目し、老人性色素斑部位の血管 3 次元構造解析を行った。第 2 の研究では、血管内皮細胞を用いて、血管の異常によるメラノジェネシス亢進のメカニズムの一端を解明した。第 3 の研究では、第 1、第 2 の知見をもとにした美白化粧品の開発の一步として、経皮におけるトラネキサム酸の色素沈着改善効果検証とその作用メカニズムにおける血管系の関与を検証した（本内容は参考論文とする）。以下、3 つの研究を紹介するとともに、これらの知見から推測される今後の研究展望について最後に述べたいと思う。

参考文献

- 1) Slominski, A. T. et al. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 212, 1–115 (2012).
- 2) Slominski, A. T. et al. *Physiol Rev* 84(4), 1155–1228 (2004).
- 3) 2017 年 美白スキンケアの市場分析調査. 株式会社総合企画センター大阪.
- 4) Seiji, M, et al. *J Invest Dermatol.* 36, 243 (1961)
- 5) Kendric CS. *Photochemical and Photobiological Reviews*, 3, 11 (1978)
- 6) d'Ischia M, et al. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013; 26:616-633
- 7) Imokawa G, et al. *J Biol Chem.* 267, 24675-24680 (1992)
- 8) Kang HY, et al. *Br J Dermatol.* 154, 1094–1099 (2006)
- 9) Salducci M, et al. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 502–504 (2014)
- 10) Hesegawa K, et al. *Ann Dermatol.* 27, 626–629 (2015)
- 11) Hirobe T, et al. *J Dermatol Sci.* 71(1), 45–57 (2013)
- 12) Kim EJ, et al. *Exp Dermatol.* 154, 625–33 (2005)
- 13) Maeda K et al. *J Photochem Photobiol B.* 47(2–3), 136–41 (1998)
- 14) Kim EH et al. *J Dermatol Sci.* 46, 111–116 (2007)
- 15) Kang HY, Ortonne JP. *Ann Dermatol.* 22, 373–378 (2010)
- 16) Hesegawa K, et al. *J Dermatol.* Oct 43(10), 1209-1213 (2016)
- 17) Aoki H, et al. *Br J Dermatol.* 156(6), 1214–23 (2007)

2. 本論

2-1 3次元血管構造解析により、老人性色素斑には不規則に分岐した血管が存在することを解明

序論

老人性色素斑や肝斑といった色素異常症は、表皮における過剰なメラニンの蓄積を特徴とする。メラニン生成の増加はメラニン生成細胞であるメラノサイトと近傍に存在する細胞（例えば、ケラチノサイトやファイibroblast）との相互作用の変化によって引き起こされることが一般的に知られている。近年の研究では、色素過剰症におけるメラニン生成増加には真皮に存在する毛細血管の変化が関連することを示唆するものが増えつつある^{1, 2, 3}。

皮膚色素沈着形成における血管の関与メカニズム解明のために、まずは色素沈着部位における血管の状態を把握することが必要であると考え、これまでに我々は、老人性色素斑において、真皮上層での毛細血管の占める面積が、周辺の正常部位に比べ増加していることを報告している⁴。しかしながら、既存の研究は皮膚薄層切片の二次元的な解析であり、血管系が増加していることまではわかるものの、血管拡張を起こしているのか、それとも構造自体が異常に変形しているのかといった血管の立体構造については解明できていなかった。

そこで本研究では、皮膚切片全体を免疫組織化学的に染色したのち透明化する技術を用いて、規模の大きい皮膚組織を観察することにより、病変部位の血管構造を三次元で捉えることを試みた。

材料と方法

倫理審議

本研究は、Ajou 大学病院（韓国）（IRB 番号：AJIRB-BMR-SMP-16-420）及び資生堂グローバルイノベーションセンター（日本）（IRB 番号：A00338）の両倫理審議会における承認後、すべての被験者から事前にインフォームドコンセントを得て実施した。

皮膚組織の採取

顔面に老人性色素斑を有すると新規に診断された 5 名（56～65 歳）の女性から、試験医師の指定した被験部位と近傍の正常部位それぞれ 2 mm パンチにて採取した。採取した皮膚は凍結組織切片作成用包埋剤 O.C.T. Compound（サクラファインテックジャパン、日本）に浸漬し液体窒素にて凍結した。

免疫組織染色

O.C.T. Compound 内で凍結した皮膚組織を解凍し、ディスパーゼ I（Roche、米国）に表皮側を 2 時間室温にて浸漬し、表皮のみを剥離した。表皮を剥離した真皮のみの組織を 4 % パラホルムアルデヒド溶液に 4℃で一晩浸漬し固定した。さらに 5 % Triton X-100/2.5 % Tween20/ PBS 溶液に室温で一晩浸漬し、浸透処理を行った。染色反応には、1 次抗体として、抗 CD31 抗体（AF806；R&D systems, 米国）、及び抗 CD68 抗体（PM-1K; TransGenic, 日本）を用いた。透明化処理には iDISCO 法⁵を一部改変した方法を用いた。具体的には、50%メタノール水溶液で浸漬したのち、70%メタノール水溶液、100%メタノール溶液に置換し疎水性を高めたのちに、ジクロロメタン（DCM）で透明化し、ジブチルエーテルに置換した。

画像解析

皮膚画像はライトシート蛍光顕微鏡 Z.1（Carl Zeiss、ドイツ）により取得した。最大値強度投影法（maximum intensity projection; MIP）による画像処理は Zen ソフトウェア（Carl Zeiss、ドイツ）を用いた。血管構造指標である血管体積と血管分岐数の定量化に

は、ライトシート蛍光顕微鏡で取得した 3 次元画像を 500μ 立方メートルに切り出し、画像解析ソフトウェア Imaris (Bitplane、米国) を用いた。

統計解析

病変部位と周辺正常部位における血管密度、及び血管分岐数の比較には、統計解析ソフトウェア JMP (SAS、米国) を用いて、対応のある t 検定を行った。P 値が 0.05 未満を統計的有意とした。

結果

ライトシート蛍光顕微鏡は、共焦点顕微鏡や二光子顕微鏡と同様、3 次元の蛍光像を得られる顕微鏡であるが、透明化した巨大なサンプルの観察に優れるため、色素沈着部位全体の血管構造を 3 次元的に観察するという今回の目的に合致したものであった。今回、本顕微鏡を用いて、血管内皮細胞マーカーである抗 CD31 抗体によって免疫染色した皮膚組織を観察した結果、正常部位では毛細血管は比較的均一な太さで規則正しく配向していたが、病変部位では細く分岐の多い血管が密集している部位が存在する点で明らかな形態学的な変化を示していた (図 1 A-C)。

定量解析では、老人性色素斑部位では正常部位と比較して、血管の占める容積 (血管密度) および血管分岐数が有意に増加していることが示された (図 1D)。

血管の占める容積

近傍の正常部位 $5.23 \pm 1.51\%$ 対 病変部位 $8.14 \pm 1.70\%$

単位面積(1mm^3)あたりの血管分岐数

近傍の正常部位 1001.6 ± 336.1 対 病変部位 1526.4 ± 421.4

血管は、マクロファージのような炎症細胞の浸潤を促進し、皮膚の炎症において重要な役割を果たす。実際、我々は過去に、マクロファージ数が老人性色素斑で有意に増加していることを報告している⁴。また、血管内皮増殖因子 VEGF-A を発現したマクロファージ

が老人性色素部位に多く存在していることも見出しているため^{4,6}、色素沈着部位における血管系増加とマクロファージの関連も示唆されている。そこで次に老人性色素斑におけるマクロファージ浸潤と血管との関連を見出すため、抗 CD31 抗体およびマクロファージマーカーのひとつである抗 CD68 抗体を用いた二重免疫蛍光解析を行った。

その結果、老人性色素斑において CD68 陽性マクロファージが複雑に分岐した血管構造を有する領域に密集していることが観察できた（図2）。つまり、マクロファージの浸潤が老人性色素斑で特徴的な血管構造形成と関連している可能性が示唆された。以上から、老人性色素斑において以下のようなプロセスにて血管新生が生じることが考えられた。

- i) マクロファージが血管内皮細胞由来の因子により、血管付近へ引き寄せられる。
- ii) マクロファージは種々の血管新生を引き起こす因子（VEGF-A など）を発現し、血管新生を引き起こす。

考察

本研究により、老人性色素斑病変部位では、有意な毛細血管の構造的異常、つまり不規則に配向した分岐の多い血管が存在していることを見出した。また、その分岐の多い異常な血管の周辺にはマクロファージの浸潤が見られることが観察された。このことから、おそらく慢性的な紫外線曝露を経て、マクロファージの血管周辺への誘因、及び血管新生の亢進などを引き起こし、最終的に構造的に異常な血管構造を形成していることが示唆された。老人性色素斑において異常な血管構造を生じている意義は完全には明らかではないが、過去の知見を参考にすると、おそらく血管内皮細胞や周辺で生じている炎症がメラニン生成のプロセスに何からの影響を及ぼしていることが予想される²。さらに、分岐した血管が増えていることが老人性色素斑の炎症という病態的側面を促進していることが考えられる⁷。例えば、アトピー性皮膚炎のような慢性炎症を伴う皮膚疾患で血管構造変化が関与している可能性も報告されている⁸。以上からも、老人性色素斑における血管構造変化が色素沈着形成のプロセスにおいて何らかの役割を持つのかについて解明することは、今後の老人性色素斑の治療法開発における重要な手がかりとなることが考えられる。

参考文献

- 1) Kim, E. H., Kim, Y. C., Lee, E. S. & Kang, H. Y. The vascular characteristics of melasma. *J Dermatol Sci* 46(2), 111–116 (2007).
- 2) Regazzetti, C. et al. Endothelial Cells Promote Pigmentation through Endothelin Receptor B Activation. *J Invest Dermatol* 135(12), 3096–3104 (2015).
- 3) Adini, I. et al. Melanocyte-secreted fibromodulin promotes an angiogenic microenvironment. *J Clin Invest* 124(1), 425–436 (2014).
- 4) Hasegawa, K. et al. Increased blood flow and vasculature in solar lentigo. *J Dermatol* 43(10), 1209–1213 (2016).
- 5) Renier, N., Wu, Z., Simon, D. J., Yang, J., Ariel, P., & Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 159, 896–910.
- 6) Unver, N., Freyschmidt-Paul, P., Horster, S., Wenck, H., Stab, F., Blatt, T. & Elsasser, H. P. (2006). Alterations in the epidermal-dermal melanin axis and factor XIIIa melanophages in senile lentigo and ageing skin. *The British Journal of Dermatology*, 155, 119–128.
- 7) Aoki, H., Moro, O., Tagami, H., & Kishimoto, J. (2007). Gene expression profiling analysis of solar lentigo in relation to immunohistochemical characteristics. *The British Journal of Dermatology*, 156, 1214–1223.
- 8) Tsutsumi, M., Fukuda, M., Kumamoto, J., Goto, M., Denda, S., Yamasaki, K., Denda, M. (2016). Abnormal morphology of blood vessels in erythematous skin from atopic dermatitis patients. *The American Journal of Dermatopathology*, 38, 363–364.

図の説明文

図 1. 老人性色素斑 (SL) における毛細血管の構造的な変化

- (A) 臨床写真 老人性色素斑部位 (黒い矢印)、近傍正常部位 (白い矢印)
- (B) 近傍正常部位における毛細血管の代表的な MIP 画像。血管内皮細胞マーカー (CD31、赤) による皮膚組織全体の免疫染色解析により、規則的に配向した毛細血管像が示された。Scale bars = 100 μ m.
- (C) 病変部位における毛細血管の代表的な MIP 画像。不規則に配向した毛細血管が観察された (矢印)。Scale bars = 100 μ m.
- (D) 血管体積 (左) と分岐数 (右) の定量解析 (N = 5)

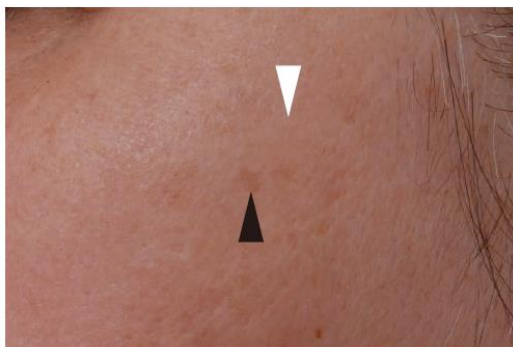
図 2. 老人性色素斑における異常な毛細血管の周辺のマクロファージ集積

- 代表的な毛細血管 (CD31、赤) とマクロファージ (CD68、緑) の画像
- 二重免疫染色解析により、老人性色素斑において多くのマクロファージが不規則な血管の周辺に多く示された。Scale bars = 100 μ m
- (A) 近傍の正常部位
 - (B) 病変部位

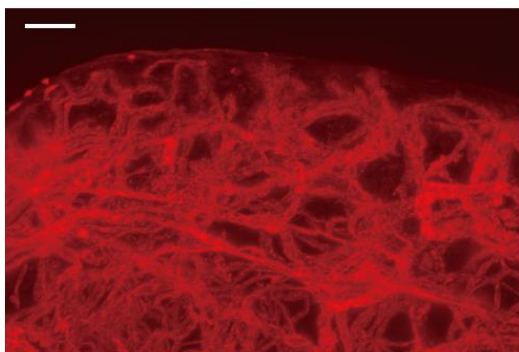
図

図 1

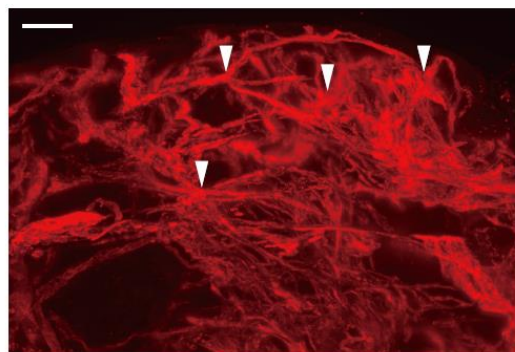
(A)



(B)



(C)



(D)

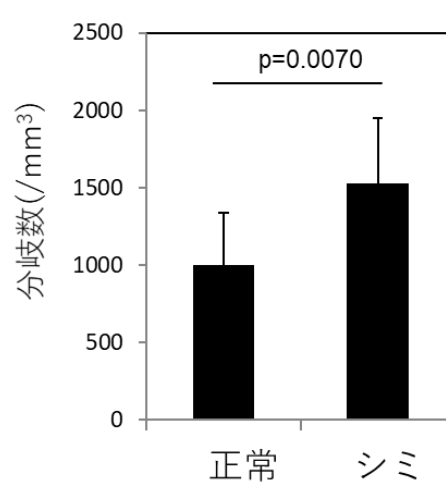
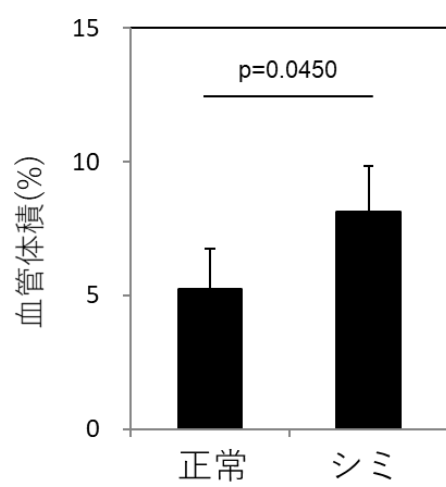
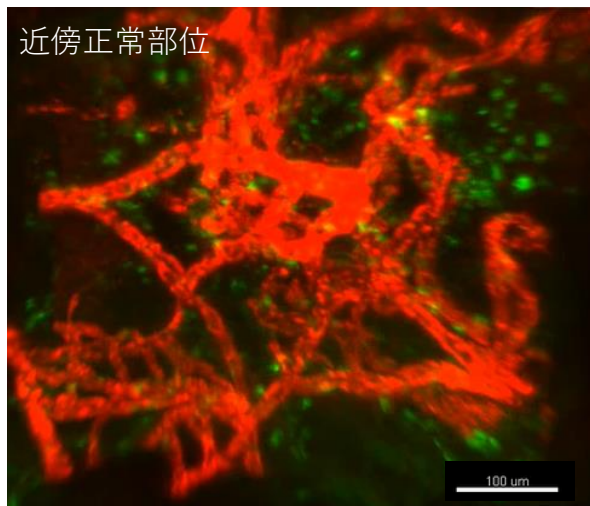
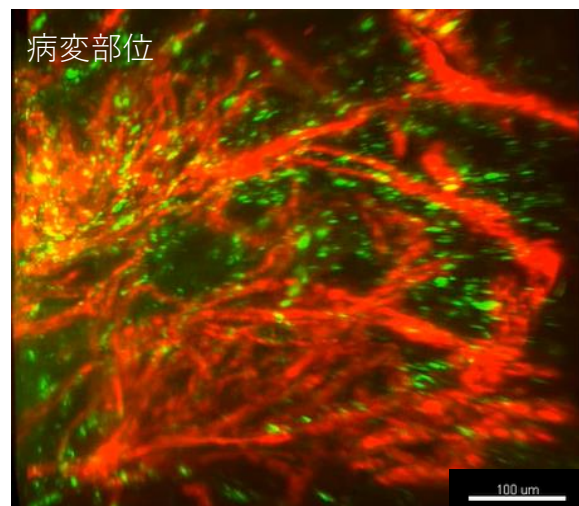


図 2

(A)



(B)



2-2 紫外線照射した血管内皮細胞は幹細胞因子 (stem cell factor : SCF) を分泌し、表皮における色素沈着を引き起こす

序論

一般的に、紫外線曝露による皮膚の色素沈着形成には、メラノサイトの周辺に存在する細胞から分泌されるケモカインやサイトカイン等の因子によって引き起こされる。ケラチノサイトでは α MSH、エンドセリン 1 などがメラニン生成における主要な因子として知られている¹。一方、紫外線曝露を受けた真皮線維芽細胞の皮膚色素沈着における役割についても多く研究されている^{2,3,4,5}。真皮線維芽細胞は紫外線曝露により細胞老化を引き起こし、複数の皮膚老化関連分泌タンパク質 (SAASP) を産生する。SAASP には、メラニン形成を制御する因子も含まれており、幹細胞因子 (SCF) や分泌型 frizzled 関連タンパク質-2 (sFRP2) といったメラニン生成に関わる因子が分泌されることが知られている^{6,7,8}。これらの因子は紫外線により一過的にその分泌を増加させるだけでなく、老人性色素斑や肝斑においては慢性的に発現が亢進していることも報告されている。

ケラチノサイトおよび線維芽細胞だけでなく、血管内皮細胞も皮膚色素沈着の制御において生物学的役割を担っていることが最近の研究で示唆されている^{9,10,11}。また、前述のとおり私は、老人性色素斑では構造的に異常な血管構造を形成していることを見出している。

これらの血管系の変化は紫外線曝露の結果であると考えられている。というのも、色素沈着過剰な状態の皮膚では、顕著なソーラーエラストーシスを示しており、また血管新生因子である血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) の発現が増加していることがこれまでの研究で示されている。これらの知見は、慢性的な日光曝露から生じる血管内皮細胞の変化が、メラノサイトにおけるメラニン生成を過剰にしている原因となり得ることを示唆している。

そこで、血管内皮細胞もケラチノサイトや線維芽細胞と同様に、紫外線曝露により色素沈着を形成する機構における役割を担っているのではないかと考え、紫外線刺激を加えた血管内皮細胞のメラニン生成における作用を検討することとした。

材料と方法

細胞培養と処理

正常ヒトメラノサイトは過去に報告された方法を修正した方法により割礼手術による 10 名の包皮（平均年齢 10.8 歳）より単離した。本研究は、Ajou 大学病院（韓国）（IRB 番号：AJIRB-GEN-GEN-12-107）倫理審議会における承認後、すべての被験者から事前にインフォームドコンセントを得て実施した。

これらの細胞は、F12 培地に 10%FBS, 24 μ g/mL 3-isobutyl-1-methylxanthine, 80nM 12-O-tetradecanoyl phorbol 13 acetate (TPA), 1.2ng//mL bFGF, 0.1 μ g/mL cholera toxin を添加したものをを用いて培養した。すべての試験で用いた細胞は継代数 2 から 7 までのものとした。ヒト真皮毛細血管内皮細胞（HDMECs）（Lonza, スイス）は内皮増殖培地（EGM-2-MV BulletKit）（Lonza, スイス）を用いて培養した。

阻害実験では、KIT 特異阻害剤（ISCK03）または中和抗 SCF 抗体（R&D systems, 米国）を用いた。

紫外線照射と HDMECs 由来コンディショニング培地の調製

LZC-1 photoreactor system (Luzchem Research Inc. カナダ) を用いて、20J/cm² UVA（波長 320~400nm、最高ピーク 350nm）を、または TL20W/12RS UV ランプ（Philips、オランダ）を用いて 50mJ/cm² UVB（波長 290~320nm、最高ピーク 311nm）を HDMECs に照射した。非照射細胞においても、紫外線照射以外の処理は照射細胞と同様に行った。紫外線照射後、EGM 培地にて 24 時間培養し、その培養上清を回収、0.2 μ m フィルター（Millipore、米国）を用いて細胞構成成分や残さを除去した。培養上清はさらにポアサイズが 3kDa の protein concentrator（Thermo、米国）にて 60 倍に濃縮し、コン

ディンシヨソ培地とした。1.5mL の培地中に、50 μ L の濃縮したコンディンシヨソ培地を加えて使用した。

メラニン量とチロシナーゼ活性の解析

1% Triton X-100 とプロテアーゼ阻害カクテル (Roche、スイス) を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて細胞を可溶化した。上清のタンパク質濃度は Lowry 法にて測定した。沈殿物は 1 規定水酸化ナトリウム水溶液にて溶解し、490nm 波長の吸光度測定によりメラニン量を定量した。メラニン量は合成メラニン (Sigma) を用いた検量線から計算した。

チロシナーゼ活性測定には、各サンプルを 2mM L-DOPA(Sigma) を 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて 37°C で 90 分インキュベーションしたのち、490nm 波長の吸光度を測定した。

Ex vivo 皮膚培養と色素沈着測定

手術から生じた 5 名の余剰皮膚 (平均年齢 20 歳) を入手した。本研究は、Ajou 大学病院 (韓国) (IRB 番号 : AJIRB-GEN-GEN-12-107) 倫理審議会における承認後、すべての被験者から事前にインフォームドコンセントを得て実施した。

皮膚組織の培養方法を以下に示す。まず滅菌したステンレス製 steel grid を、4%FBS を含む DMEM 培地を入れた培養皿に設置し、その上に皮膚組織を置いて、5%二酸化炭素、37°C 条件下で培養した。3 日後、皮膚組織を 10%ホルマリンにて固定し、パラフィン切片を作製した。メラニン色素はフォンタナマッソソ染色法にて可視化した。画像解析は、Image Pro Plus Version 4.5 software (Media Cybernetics Co.、米国) を用いて行い、表皮面積に対する色素面積 (pigmented are relative to the epidermal area ; PA/EA) を測定した。免疫組織染色は Tyrosinase 抗体 (Invitrogen、米国) と GP100 抗体 (Monosan、米国) を用いて常法にて行った。画像解析は、表皮面積に対する染色された面積 (stained area are relative to the epidermal area ; SA/EA) を測定した。

免疫細胞染色と免疫組織染色

免疫細胞染色では、まず細胞を 4%パラホルムアルデヒドで室温 10 分浸漬し固定した。次に、0.2% Triton X-100 にて浸透処理を行ったのちに、1%BSA にて 1 時間ブロッキングを行った。染色反応には、1 次抗体として、抗 SCF 抗体 (Abcam、米国)を用いた。

免疫組織染色では、まず皮膚組織を 4%パラホルムアルデヒドに浸漬し固定し、パラフィン切片を作製した。染色反応には、1 次抗体として抗 CD31 抗体 (Novocastra、英国) 及び抗 SCF 抗体 (Abcam、米国) を用いた。

肝斑患者由来の皮膚組織は、3 名の患者 (平均年齢 43.3 歳) から採取した。本研究は、Ajou 大学病院 (韓国) (IRB 番号: AJIRB-DEV-DE3-15-491) 倫理審議会における承認後、すべての被験者から事前にインフォームドコンセントを得て実施した。

RNA シークエンス解析

細胞由来の total RNA は RNeasy Mini Kits (Qiagen)を用いて、抽出した。RNA の質は nonophotometer (Implen GmbH、ドイツ)にて、また RNA 量はアガロース電気泳動にて測定した。Total RNA は polyA により mRNA に精製した。

標準 Illumina プロトコル (Illumina、米国) により、2×100bp のペアエンドリードライブラリを作製し、Illumina HiSeq2500 にてシークセンスをを行った。発現の差を同定するために R package DESeq を用いて解析し¹²、p 値<0.05 で有意であると見なした。

リアルタイム PCR

細胞由来の total RNA は RNeasy Mini Kits (Qiagen)を用いて抽出し、cDNA は Super Script III 逆転写酵素 kit (Invitrogen) を用いて作製した。用いたプライマー配列は以下の通りである。

ヒト MITF sense, 5' -AGAACAGCAACGCGCAAAGAAC-3'

ヒト MITF antisense, 5' -TGATGATCCGATTCACCAAATCTG-3'

ヒト tyrosinase sense, 5' -CACCACTTGGGCCTCAATTTC-3'

ヒト tyrosinase antisense, 5' -AAAGCCAAACTTGCAGTTTCCAC-3'

ヒト SCF sense, 5' -AATCCTCTCGTCAAAACTGAAGG-3'

ヒト SCF antisense, 5' -CCATCTCGCTTATCCAACAATGA-3'

ヒト EDN1 sense, 5' -GACATCATTTGGGTCAACAC-3'

ヒト EDN1antisense, 5' -GGCATCTATTTTCACGGTCT3'

ヒト TGF β 1 sense, 5' -GGCGATACCTCAGCAACCG-3'

ヒト TGF β 1 antisense, 5' -CTAAGGCGAAAGCCCTCAAT-3'

ヒト 18S sense, 5' -CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'

ヒト 18S antisense, 5' -GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

ウエスタンブロット解析

細胞は RIPA 緩衝液 (1% NP-40、150mM NaCl、10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA) にプロテアーゼ阻害剤 (Sigma) を加えた溶液で可溶化した。タンパク質は SDS-PAGE にて分離し、PVDF 膜に転写した。1 次抗体としては、抗 MITF 抗体 (Abcam、米国)、抗 Tyrosinase 抗体 (Santa Cruz Biotechnology、米国)、p-Erk1/2 及び Erk1/2 抗体 (Cell Signalling Technology、米国) 抗 β アクチン抗体 (Santa Cruz Biotechnology、米国)、抗 GAPDH 抗体 (Santa Cruz Biotechnology、米国) を用いた。

ELISA

HDMECs は 20J/cm² UVA または 50mJ/cm² UVB を照射し、EGM 培地で培養した。24 時間後、コンディショニング培地を回収し、分泌された SCF 量は SCF ELISA kits (R&D Systems) を用いて測定した。

統計解析

統計的有意差は Mann-Whitney U test (SPSS 22.0、IBM、米国) にて解析した。P 値が 0.05 未満を統計的有意とした。

結果

紫外線照射した血管内皮細胞はメラノサイトのメラニン生成を引き起こす

まず初めに、細胞へ照射する紫外線量を検討した。文献によると^{13,14}、HDMECs は 10～20 J/cm² の UVA が照射されていた。そこで、10～20 J/cm² の間での照射による細胞の形態、及び細胞数の検討を行った。その結果、20 J/cm² でも細胞毒性を生じないエネルギー量であることが判明した (図 1 (A))。そこで、以後の UVA 照射実験には 20 J/cm² の強度を採用することとした。

次にメラノサイトと HDMECs の相互作用の有無を検討するため、ヒト正常ヒトメラノサイトに紫外線照射した HDMECs (UV-HDMECs) から得たコンディション培地 (UV-HDMECs) を処理し、色素形成の評価を行った。この時、紫外線照射をしない HDMECs からのコンディション培地も同時に調製し、コントロールとして用いた。

UV-HDMECs からのコンディション培地を処理したメラノサイトでは、メラニン生成酵素チロシナーゼの酵素活性が有意に増加し、メラニン量の増加傾向が見られた (図 1 (B))。さらに、チロシナーゼ、及びチロシナーゼの転写調節因子である MITF の mRNA とタンパク質の発現が有意に増加した (図 1 (C))。

同様に、UVB を用いて検討を行った。というのも、生理的条件下では UVB は真皮上層に存在する血管内皮細胞に届く可能性が知られているためである¹⁵。細胞毒性を生じないエネルギー量であることを確認した 50mJ/cm² の UVB 照射により、UVA 照射時と同様に、HDMECs 由来のコンディション培地によりメラノサイト内での色素沈着形成が増加することが示された (図 1 (D))。

皮膚の色素沈着形成は紫外線照射された血管内皮細胞により促進された

次に、紫外線照射された血管内皮細胞由来のコンディション培地は、摘出した皮膚組織に対しても同様に色素沈着形成を促進するかどうか検討した。紫外線照射したヒト HDMECs 培養上清を濃縮した後、その培養上清の存在下で摘出した皮膚組織を 3 日間培養し、免疫染色した組織切片の観察を行った。

その結果、表皮基底層付近におけるメラニン蓄積の亢進が染色像から確認できた（図 2）。画像解析によると、表皮面積に対する色素面積（pigmented area relative to the epidermal area ; PA/EA）が有意に増加していた。

コントロール 0.084 ± 0.021 対 UV-HDMECs 0.156 ± 0.066 , $n = 4$, $p < 0.05$

またこの時、チロシナーゼ及びメラノソーム構造タンパク質 gp100 の発現を確認したところ、どちらの因子も発現が増加していることを染色像から見られた。画像解析によると、表皮面積に対する染色された面積（stained area are relative to the epidermal area ; SA/EA）が有意に増加していた。

チロシナーゼ発現量 $n = 4$, $p < 0.05$

コントロール 0.0030 ± 0.0006 対 UV-HDMECs 0.0018 ± 0.0002

gp100 発現量 $n = 4$, $p < 0.05$

コントロール 0.006 ± 0.003 対 UV-HDMECs 0.014 ± 0.005

以上のデータより、紫外線照射された血管内皮細胞は *in vivo* においても、色素沈着を促進することが示唆された。

血管内皮細胞は紫外線照射により SCF を分泌する

ここまでの結果から、紫外線照射を受けた血管内皮細胞からは、メラニン生成を促進する因子が分泌されている、または抑制作用を持つ因子の分泌量が低下している可能性が考えられた。そこで次に、RNA シークエンス解析により、血管内皮細胞から分泌されるメラニン生成亢進に関わる因子の同定を試みた。

因子同定のため、紫外線照射及び非照射 HDMEC より mRNA を抽出し、HiSeq2500 にてシークエンシングしたのち、遺伝子発現プロファイルを比較した。統計解析の結果、28 の紫外線照射により発現亢進を示す遺伝子、103 の発現低下を示す遺伝子を見出した。そ

のうち、メラノジェネシスに関与することが知られている様々な因子について、その発現量を確認し、その結果を表にまとめた (図 3 (A))。

一般的にメラニン生成亢進に関与することが知られているエンドセリン 1 (EDN1)、プロオピオメラノコルチン (POMC)、ベーシック線維芽細胞増殖因子 (bFGF) や、メラニン生成に抑制的な因子である TGF- β 、インターロイキン (IL) -6、インターフェロン (IFN) - γ は発現プロファイルに大きな違いはなかった^{16, 17, 18, 19, 20}。また、内皮は一酸化窒素 (NO) の産生のものであり、NO は色素沈着形成を促進することが知られているが²¹、NO 生成酵素 (NOS) の発現には差がなかった。

一方で、SCF の mRNA 量は有意に増加していることが確認できた。リアルタイム PCR 法での解析でも、遺伝子発現プロファイル解析結果同様に、SCF の遺伝子発現量が UV-HDMECs において有意に増加していることがわかった (図 3 (B))。更に免疫細胞染色により細胞中のタンパク質発現 (図 3 (C)) としても、また ELISA 法により分泌量 (図 3 (D)) としても増加していることを確認した。

これまで SCF は老化した線維芽細胞から分泌されメラニン生成を亢進することが報告されていたが、本結果から、紫外線により活性化した血管内皮細胞からも分泌されメラニン生成を促進することが示唆された。

血管内皮細胞由来の SCF は皮膚色素沈着形成を担う

SCF はメラノサイトにおいて、SCF/c-kit シグナリングを介してメラニン生成を促進することが知られている²³。そこで、次に血管内皮細胞から分泌される SCF の機能を明らかにするため、SCF 受容体 c-Kit の特異的阻害剤 (ISCK03) を用いた解析を行った。

まず初めに、最適な阻害剤濃度を見出すために、SCF/c-kit シグナリングの下流に存在する Erk1/2 のリン酸化を阻害する濃度をメラノサイトにおいてにて検討した²⁴。その結果、5 μ g/mL ISCK03 が最適な阻害濃度であり、メラニン生成には影響を及ぼさないことが確認できた (補足図 1、補足図 2)。

紫外線照射した HDMEC 培養上清をメラノサイトに加え、同時に 5 μ g/mL ISCK03 を添加したところ、培養上清により亢進したメラニン生成関連因子（tyrosinase 及び MITF 発現量）が、遺伝子発現とタンパク質発現レベルともに ISCK03 により抑制されることが見出された（図 4 (A)）。

次に直接的な SCF の作用についても検証するため、SCF 中和抗体を用いて同様の検討を行った。この場合も同様に、紫外線照射 HDMEC の培養上清により増加したメラニン生成関連因子の発現が中和抗体を添加することにより有意に抑制された（図 4 (B)）。

以上の結果から紫外線照射された血管内皮細胞から分泌する因子のうち、SCF はメラニン生成を促進する主要な因子であることが示唆された。

次に生体における血管内皮細胞由来の SCF の色素異常症における役割を調べるため、肝斑患者 3 名における病変部位と非病変部位を採取し発現比較を行ったところ、病変部位では SCF の発現量が増加していることが確認できた（図 4 (C)）。さらに血管内皮細胞マーカー（CD31）と SCF の共発現している細胞が存在していることが観察された。つまり、*in vivo* においても血管由来の SCF が存在しており、シミ形成における関与が示唆された。

考察

本研究により、血管内皮細胞が紫外線暴露により活性化されると主に SCF などのメラニン生成促進因子が分泌される機構が存在することが示された。UV-HDMECs は色素沈着において促進的な役割を果たしており、メラニン生成の制御因子である MITF やチロシナーゼの発現を高めることが示された。また、UV-HDMECs の中でも特に SCF がメラノサイトに対するパラクライン的な促進作用を担う主要な因子であることがわかった。これらの知見を合わせて考えると、日光曝露による血管内皮細胞とメラノサイトのクロストークが存在し、それがメラニン産生に重要な作用を及ぼし、結果として紫外線照射による皮膚の色素沈着形成を引き起こしている可能性が考えられた。

また、SCF はこれまでの研究で、メラニン産生を促進することで皮膚の色素沈着を引き起こす主要な因子であることが数多く報告されてきた^{1, 3, 17}。肝斑においては真皮の SCF

発現量が亢進していることが報告されている³。また注入された SCF がメラニン生成を促進することも報告されており²⁵、これらのことから色素沈着した皮膚の真皮において分泌された SCF が増えており、真皮線維芽細胞が分泌する主要な細胞であると考えられている。それに加え今回の研究により、血管内皮細胞からの SCF もメラニン生成に重要な役割を果たすことが示された。

本研究からは SCF が見出されたが、機能が未知である他因子についても今後解明されることが望まれる。

参考文献

- 1) Rees, J. L. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* 75(5), 739–751 (2004).
- 2) Kovacs, D. et al. Role of fibroblast-derived growth factors in regulating hyperpigmentation of solar lentigo. *Br J Dermatol* 163(5), 1020–1027 (2010).
- 3) Salducci, M. et al. Factors secreted by irradiated aged fibroblasts induce solar lentigo in pigmented reconstructed epidermis. *Pigment Cell Melanoma Res* 27(3), 502–504 (2014).
- 4) Kang, H. Y. et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol* 154(6), 1094–1099 (2006).
- 5) Byun, J. W., Park, I. S., Choi, G. S. & Shin, J. Role of fibroblast-derived factors in the pathogenesis of melasma. *Clin Exp Dermatol* 41(6), 601–609 (2016).
- 6) Shin, J., Kim, J. H. & Kim, E. K. Repeated exposure of human fibroblasts to UVR induces secretion of stem cell factor and senescence. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26(12), 1577–1580 (2012).
- 7) Cario-André, M., Pain, C., Gauthier, Y., Casoli, V. & Taieb, A. In vivo and in vitro evidence of dermal fibroblasts influence on human epidermal pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 19(5), 434–442 (2006).
- 8) Kim, M., Han, J. H., Kim, J. H., Park, T. J. & Kang, H. Y. Secreted Frizzled-Related Protein 2 (sFRP2) Functions as a Melanogenic Stimulator; the Role of sFRP2 in UV-Induced Hyperpigmentary Disorders. *J Invest Dermatol* 136(1), 236–44 (2016).
- 9) Kim, E. H., Kim, Y. C., Lee, E. S. & Kang, H. Y. The vascular characteristics of melasma. *J Dermatol Sci* 46(2), 111–116 (2007).
- 10) Kang, H. Y. et al. In vivo reflectance confocal microscopy detects pigmentary changes in melasma at a cellular level resolution. *Exp Dermatol* 19(8), e228–233 (2010).

- 11) Hasegawa, K. et al. Increased blood flow and vasculature in solar lentigo. *J Dermatol* 43(10), 1209–1213 (2016).
- 12) Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11(10), R106 (2010).
- 13) Heckmann, M., Eberlein-König, B., Wollenberg, A., Przybilla, B. & Plewig, G. Ultraviolet-A radiation induces adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Br J Dermatol* 131(3), 311–318 (1994).
- 14) Cauchard, J. H. et al. UVA-mediated down-regulation of MMP-2 and MT1-MMP coincides with impaired angiogenic phenotype of human dermal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345(2), 681–687 (2006).
- 15) Chung, K. Y., Chang, N. S., Park, Y. K. & Lee, K. H. Effect of ultraviolet light on the expression of adhesion molecules and T lymphocyte adhesion to human dermal microvascular endothelial cells. *Yonsei Med J* 43(2), 165–174 (2002).
- 16) Slominski, A. T. et al. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 212, 1–115 (2012).
- 17) Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. & Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84(4), 1155–1228 (2004).
- 18) Slominski, A. T. et al. Key role of CRF in the skin stress response system. *Endocr Rev* 34(6), 827–884 (2013).
- 19) Skobowiat, C., Dowdy, J. C., Sayre, R. M., Tuckey, R. C. & Slominski, A. Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: regulation by ultraviolet radiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(3), E484–493 (2011).
- 20) Yamaguchi, Y. & Hearing, V. J. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 35(2), 193–199 (2009).

- 21) Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N. & Stefanadis, C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 10(1), 193–199 (2009).
- 22) Lassalle, M. W. et al. Effects of melanogenesis-inducing nitric oxide and histamine on the production of eumelanin and pheomelanin in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res* 16(1), 81–84 (2003).
- 23) Hachiya, A., Kobayashi, A., Ohuchi, A., Takema, Y. & Imokawa, G. The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol* 116(4), 578–586 (2001).
- 24) Na, Y. J. et al. [4-t-butylphenyl]-N-(4-imidazol-1-yl phenyl) sulfonamide (ISCK03) inhibits SCF/c-kit signaling in 501mel human melanoma cells and abolishes melanin production in mice and brownish guinea pigs. *Biochem Pharmacol* 74(5), 780–786 (2007).
- 25) Grichnik, J. M., Burch, J. A., Burchette, J. & Shea, C. R. The SCF/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. *J Invest Dermatol* 111(2), 233–238 (1998).

図の説明文

図 1. 紫外線照射された血管内皮細胞のメラノサイトでの色素産生への影響

- (A) ヒト血管内皮細胞 (HDMECs) は $10\sim 20\text{J}/\text{cm}^2$ の UVA を照射された。24 時間後、細胞の形態を観察、細胞増殖性は細胞数のカウントにより解析した。
- (B) 正常なヒトメラノサイトに $20\text{J}/\text{cm}^2$ の UVA を照射した HDMECs (UV-HDMECs) から得たコンディショニング培地を処理した。非照射 HDMECs 由来のコンディショニング培地はコントロールとして用いた。3 日後、メラニン量とチロシナーゼ活性を測定した。
- (C) MITF およびチロシナーゼの mRNA (左) とタンパク質 (右) の発現量をリアルタイム PCR とウエスタンブロッティングを用いて評価した。
- (D) 正常なヒトメラノサイトに $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ の UVB を照射した HDMECs (UV-HDMECs) から得たコンディショニング培地を処理した。MITF およびチロシナーゼの mRNA (左) とタンパク質 (右) の発現量を解析した。
- すべての値は独立した試験の平均値 \pm 標準偏差を示す。

図 2. 紫外線照射された血管内皮細胞の ex vivo ヒト皮膚での色素産生への影響

ex vivo ヒト皮膚は UV-HDMEC 由来のコンディショニング培地にて 3 日間培養した。色素沈着面積と表皮面積の比率 (PA/EA) はフォンタナマッソン染色の後、画像解析により測定した。gp100 とチロシナーゼの発現は免疫組織化学染色により検出し、染色された面積と表皮面積の比率 (SA/EA) を測定した。スケールバーは $500\mu\text{m}$ を示す。すべての値は独立した試験の平均値 \pm 標準偏差を示す。

図 3. 血管内皮細胞は紫外線照射により SCF を分泌する

- (A) RNA シークエンシング解析による HDMECs と UV-HDMECs の差分遺伝子発現プロファイリング。N.D.=none detected.

- (B) SCF、EDN1、TGF β 1 の mRNA の発現量をリアルタイム PCR によって解析した。
- (C) UV-HDMECs における SCF のタンパク質発現量を免疫細胞化学染色により検出した。スケールバーは 100 μ m を示す。
- (D) 培養液中に分泌された SCF 量を ELISA により測定した。

略語：

TGF, transforming growth factor;

IL, interleukin;

IFN, interferon;

TNF, tumor necrosis factor;

SCF, stem cell factor;

EDN, endothelin;

FGF, fibroblast growth factor;

POMC, proopiomelanocortin;

NOS, nitric oxide synthase;

KGF, keratinocyte growth factor

図 4. 血管内皮細胞由来 SCF は皮膚の色素沈着に対する役割を担う

- (A) c-Kit 阻害剤である 5 μ g/mL ISCK03 を UV-HDMECs からのコンディショニング培地とともにメラノサイトに添加し 3 日間培養した。MITF およびチロシナーゼの mRNA (左) とタンパク質 (右) の発現量をリアルタイム PCR とウエスタンブロッティングを用いて評価した。
- (B) SCF 中和抗体(2 μ g/mL)を、UV-HDMECs からのコンディショニング培地中で内在性 SCF の挙動を阻害するために用いた。

(C) SCF(赤)と CD31(緑)の二重免疫染色した血管内皮細胞を 3 名の肝斑患者から採取した皮膚中の色素沈着部位と正常部位の真皮で検出した。すべての値は独立した試験の平均値±標準偏差を示す。スケールバーは 200 μ m を示す。

補足図 1 ISCK03 のメラノサイトで効果を発揮する濃度

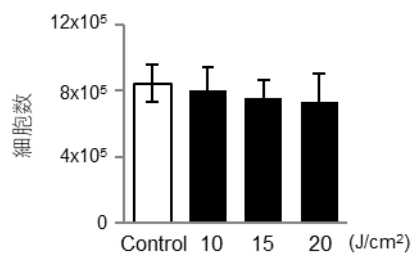
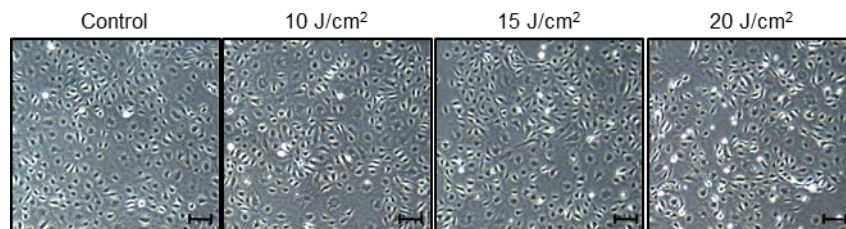
KIT 特異的阻害剤 (ISCK03) を UV-HDMECs 由来のコンディショニング培地とともにメラノサイトに添加した。Extracellular-signal-regulated kinase(Erk)1/2 のリン酸化はウエスタンブロッティングにより解析した。5 μ g/mL ISCK03 が Erk1/2 リン酸化、つまり SCF/c-KIT の下流のシグナル伝達を活性化する最適な濃度であった。

補足図 2 ISCK03 処理による c-kit 受容体の阻害はメラノサイトのメラノジェネシスには影響を与えない

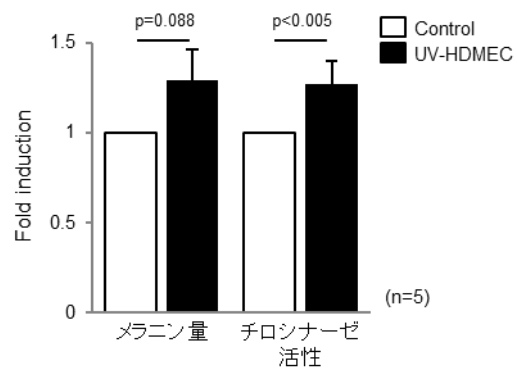
☒

☒ 1

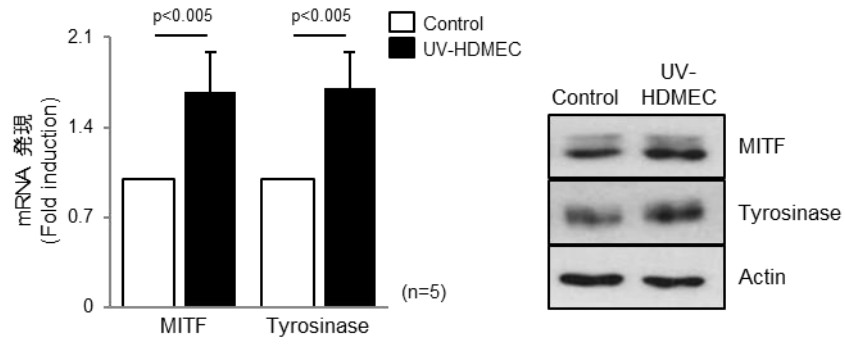
(A)



(B)



(C)



(D)

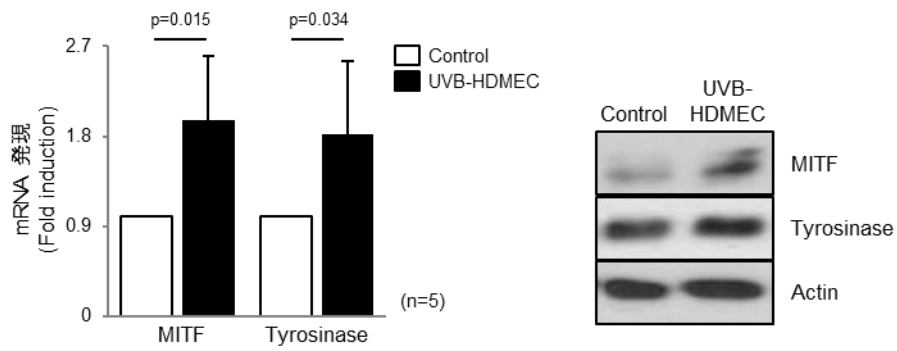


図 2

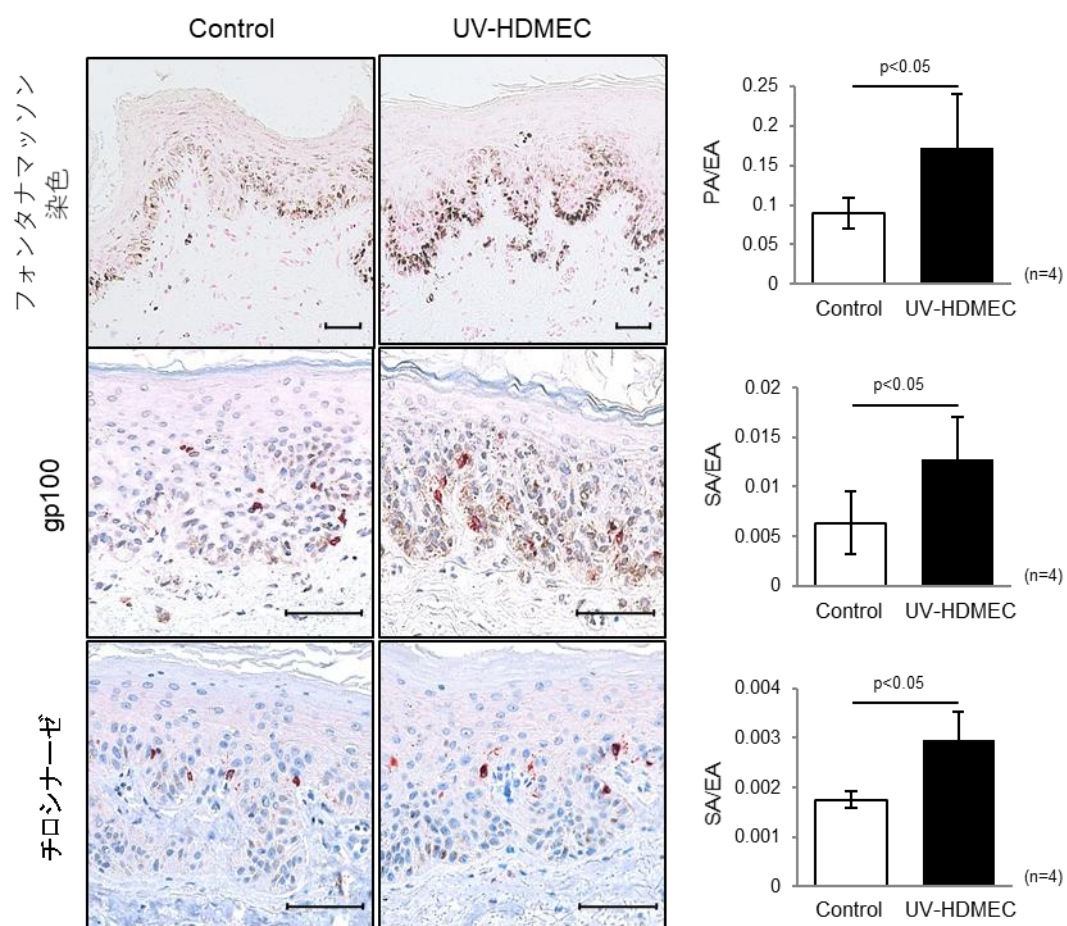


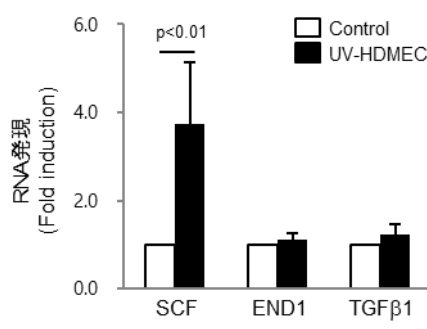
図 3

(A)

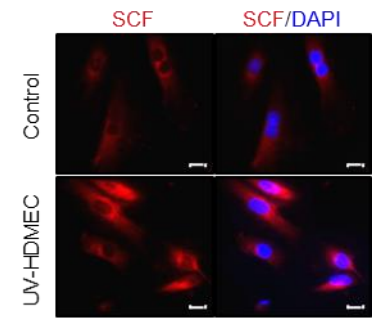
メラノジェネシス 抑制遺伝子		
	Fold change (vs. Cont.)	p- value
TGFβ1	0.841	0.37
IL-6	1.099	0.73
IFN-γ	1.000	1.00

メラノジェネシス 促進遺伝子		
	Fold change (vs. Cont.)	p- value
SCF	1.691	0.01
EDN1	0.993	0.97
FGF2 (bFGF)	0.973	0.89
POMC	0.806	1.00
NOS3	0.945	0.78
KGF	N.D	-

(B)



(C)



(D)

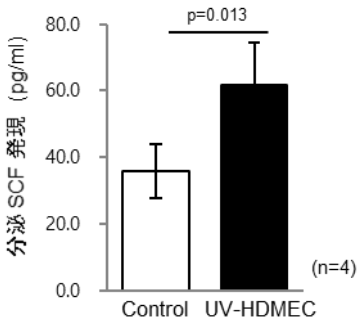
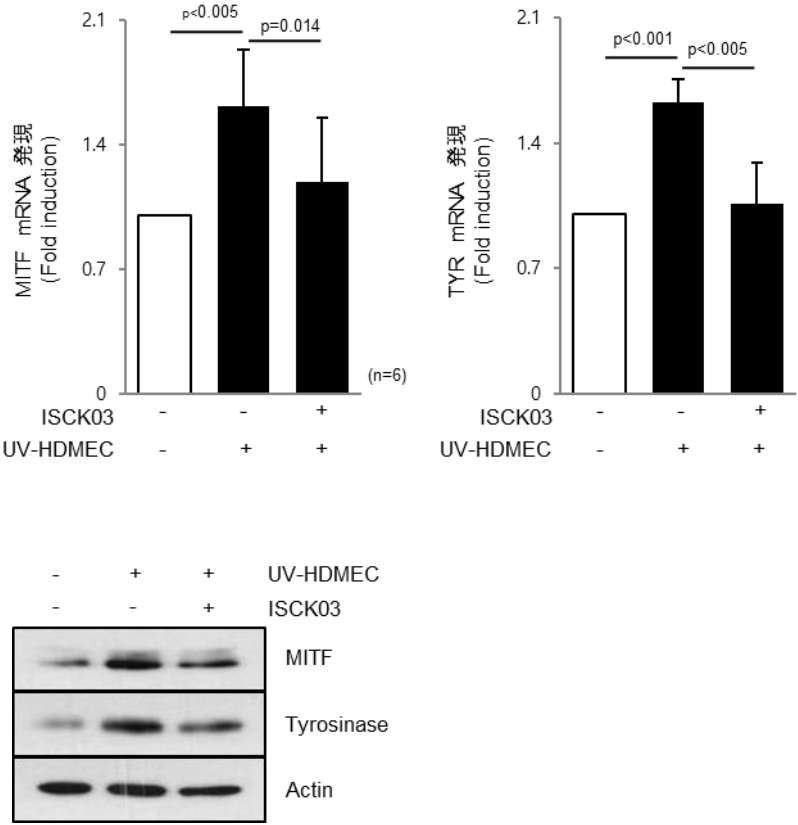
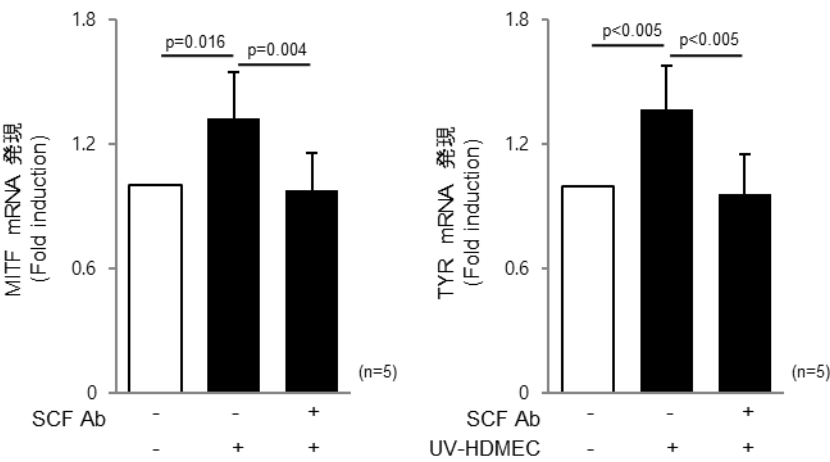


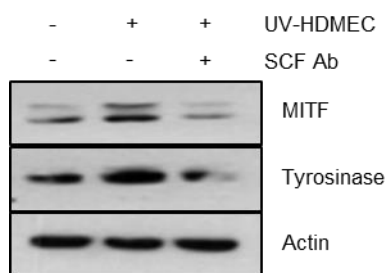
図 4

(A)

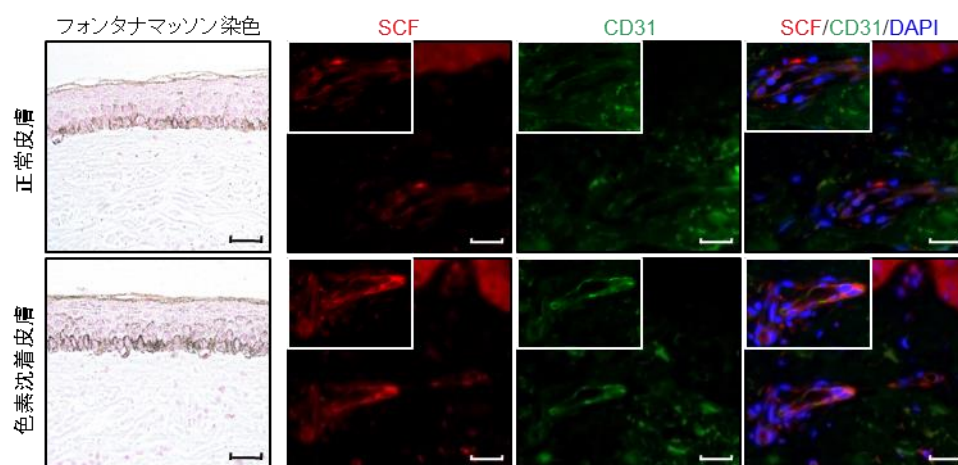


(B)

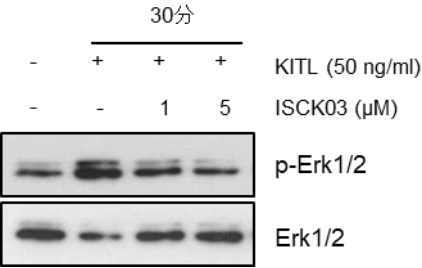




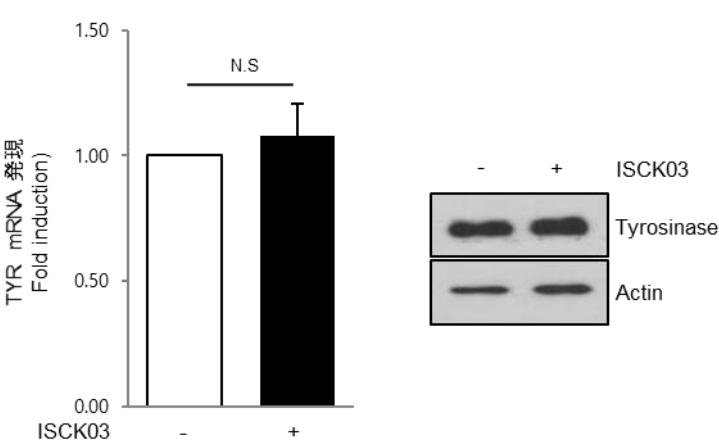
(C)



補足図 1



補足図 2



2-3 経皮投与のトラネキサム酸による色素沈着改善効果と作用機序の解明

序論

止血剤・抗炎症剤として知られているトラネキサム酸（図1）は、古くから内服での肝斑への効能が確認されており、臨床で使用されてきた医薬品である。肝斑改善における作用機序はメラノサイトを活性化するプラスミンの作用を抑えることが知られていたが、それだけでは説明がつかず、近年複数の検討が行われてきた^{1,2,3}。最近ではトラネキサム酸（内服）により真皮の血管数の減少が報告されている⁴。

色素沈着形成における異常な血管の関与は、シミ形成機序解明に新しい視点を提供するものであり、これらの知見をもとにした新たな美白化粧品の開発が期待される。そこで我々は化粧品の投与経路である経皮におけるトラネキサム酸の色素沈着改善効果検証とその作用メカニズム解明のため、肝斑患者を対象とした連用試験を実施した。試験では、連用前後の皮膚を採取し、色素沈着形成、血管関連因子の発現、及びメラニン生成にパラクライン作用を及ぼす代表的な因子への作用の有無を検証することとした。

なお、本項は本博士論文における参考論文としての位置づけであり、内容は以下文献からの引用である。

Efficacy and possible mechanisms of topical tranexamic acid in melasma.

S. J. Kim, J. Y. Park, T. Shibata, R. Fujiwara, H. Y. Kang. Clinical and Experimental Dermatology. Jul;41(5):480-485,2016

方法

試験デザイン

23名の肝斑患者（34-60歳）を対象とし、2%トラネキサム酸を配合した乳液及び、2%トラネキサム酸を配合した化粧水を含浸したマスクを12週間連用した。

評価方法

Modified Melasma Area and Severity Index (mMASI)⁵は2名の皮膚科専門医により判定した。被験部位の画像は、デジタルカメラ（D-200、ニコン、日本）で撮影した。

皮膚色素沈着と紅斑は分光測色計（CR-300、ミノルタ、日本）により測定した。皮膚の明度値と紅斑値はそれぞれL*とa*によって規定した。

23名の被験者のうち10名の事前に同意を得られたものからは、連用前と12週連用後に肝斑病変部位とその近傍の正常部位から2mmパンチにて皮膚生検標本を採取した。

メラニン色素沈着の程度を測定するために、フォンタナマッソン染色を行った。血管の可視化のために、抗CD31抗体（Novocastra、英国）を用いた免疫染色を行った。種々のパラクリン因子の発現レベルを解析するために、抗ET-1抗体（Sigma-Aldrich、米国）、抗SCF抗体（Abcam、米国）、抗VEGF-A抗体（Thermo Fisher Scientific、米国）、抗prostaglandin E2 受容体（EP2）抗体（Abcam、米国）を用いた。画像のシグナル強度はImage Pro Plus Version4.5（Media Cybernetics Co., 米国）を用いて評価した。色素沈着量はフォンタナマッソン染色した組織標本の画像から、色素沈着した面積と表皮面積の割合（pigmented area to the measured epidermal area; PA/EA）から判定した。各因子の発現レベルは、染色された面積と表皮面積または真皮面積の比（stained area to the epidermal area ; SA/EA 、または stained area to dermal area; SA/DA）を用いて解析した。統計的有意差は対応のあるt-test (SPSS 22.0、IBM、米国)にて解析した。P値が0.05未満を統計的有意とした。

結果

連用前と比較して、色素沈着の程度、紅斑の程度は12週連用後には23名中22名で改善が見られた。皮膚科専門医の判定による肝斑スコア（mMASI）において有意に改善効果が見られた。分光測色計による明度指数L*は病変部位、近傍正常部位ともに有意に増加（改善）した。また、紅斑指数a* においても改善が見られた。

事前に同意を得た10名の被験者からは、試験開始前と12週連用後に被験部位の皮膚組織を採取し、免疫組織染色により作用メカニズム解析を行った。血管への作用を解析する目

的で血管内皮細胞マーカー（CD31）、血管内皮増殖因子VEGF-Aを、また種々のメラニン生成に関わる因子も併せて検討した。

フォンタナマッソン染色（FM）により、明らかな色素沈着の減少が確認できた。血管指標であるCD31陽性血管内皮細胞においては減少傾向が見られた。表皮に発現しているVEGF-Aについても減少はしていたものの、統計的有意差は見られなかった。一方、色素沈着部位で高発現することが知られている表皮におけるエンドセリン1やSCFに関しても有意に減少することを見出した。SCFについては真皮における発現も確認しており、減少はしていたものの、統計的有意差は見られなかった。 α MSH及びEP2については有意な差は見られなかった。

考察

本試験の結果は経皮適用での2%トラネキサム酸製剤は肝斑の治療として有効であることが示された。mMASIスコアの減少、L*の増加、及び組織化学染色解析により、その改善効果が認められた。これらの知見は、経口及び経皮でのトラネキサム酸の適用での肝斑改善効果は連用後1ヶ月ごろから見え始める点で、過去の報告とも一致している^{1,4,6}。また過去の報告では、トラネキサム酸は肝斑における紅斑も減少させることを示唆しており¹、このことは、真皮の血管が減少していることとも関連していると考えられる。実際に、トラネキサム酸の血管新生を抑える効果や炎症を抑える効果はこれまでも報告されている⁷。本試験では、トラネキサム酸の経皮適用において、CD31陽性血管内皮細胞数が減少傾向にあり、紅斑値を示すa*値が継続的に減少していることが測色計により計測された。しかしながら、この減少は非常に小さく有意な変化ではなかった。本試験は、トラネキサム酸の経皮適用であり、基本的に有害事象が生じない用量用法の範囲内での試験であったため、表皮への作用は確認できたが、真皮への浸透は弱かったため、より深部の真皮への作用は限定的であったことが予想される。

これまでもトラネキサム酸の肝斑における色素沈着改善メカニズムを検討した試験はいくつか報告がある^{8,9}。トラネキサム酸は紫外線によりケラチノサイトでのプラスミン活

性が高まり、その結果、プロスタグランジンのようなメラノジェネシスを亢進する因子が分泌されることが示唆されていた。本試験では、プロスタグランジンE2受容体、ET-1、 α -MSH、SCFについての発現量を検討した。これらの因子は、過去に肝斑で増加していることが示されているものである^{10, 11}。本試験では、トラネキサム酸の作用として、ET-1やSCFの表皮での発現量減少が見られた。ET-1、SCFはともにケラチノサイトから分泌されるよく知られたメラノジェネシス亢進因子である^{12, 13}。したがって、本試験から、トラネキサム酸の作用には、ET-1やSCFの表皮での発現抑制が含まれることが示唆された。

以上より、本試験により、トラネキサム酸の経皮適用においても血管系への作用のポテンシャルを確認することができ、今後より深部へ到達させることにより、血管系への作用をはっきりと見出せる可能性が示唆された。また今回の試験では陰性対照としてプラセボ製剤投与群を設定していなかったため、今後はより規模の大きい二重遮蔽での試験での検証も必要であると考えられる。

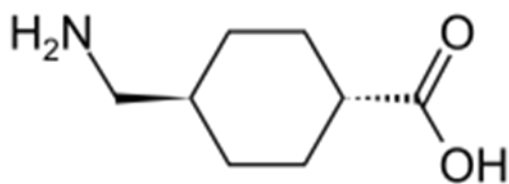
参考文献

- 1) Kanechorn Na Ayuthaya P, Niumphradit N, Manosroi A, Nakakes A. Topical 5% tranexamic acid for the treatment of melasma in Asians: a double-blind randomized controlled clinical trial. *J Cosmet Laser Ther* 2012; 14: 150–4.
- 2) Budamakuntla L, Loganathan E, Suresh DH, et al. A randomised, open-label, comparative study of tranexamic acid microinjections and tranexamic acid with microneedling in patients with melasma. *J Cutan Aesthet Surg* 2013; 6: 139–43.
- 3) Lee JH, Park JG, Lim SH, et al. Localized intradermal microinjection of tranexamic acid for treatment of melasma in Asian patients: a preliminary clinical trial. *Dermatol Surg* 2006; 32: 626–31.
- 4) Na JI, Choi SY, Yang SH, et al. Effect of tranexamic acid on melasma: a clinical trial with histological evaluation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27: 1035–9.
- 5) Pandya AG, Hynan LS, Bhore R, et al. Reliability assessment and validation of the Melasma Area and Severity Index (MASI) and a new modified MASI scoring method. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64: 78–83.
- 6) Wu S, Shi H, Wu H, et al. Treatment of melasma with oral administration of tranexamic acid. *Aesthetic Plast Surg* 2012; 36: 964–70.
- 7) Kal HB, Struikmans H, Gebbink MF, Voest EE. Response of rat prostate and lung tumors to ionizing radiation combined with the angiogenesis inhibitor AMCA. *Strahlenther Onkol* 2004; 180: 798–804.
- 8) Tse TW, Hui E. Tranexamic acid: an important adjuvant in the treatment of melasma. *J Cosmet Dermatol* 2013; 12: 57–66.
- 9) Maeda K, Naganuma M. Topical trans-4 aminomethylcyclohexanecarboxylic acid prevents ultraviolet radiation-induced pigmentation. *J Photochem Photobiol, B* 1998; 47: 136–41.

- 10) Kang HY, Hwang JS, Lee JY, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. Br J Dermatol 2006; 154: 1094–9.
- 11) Im S, Kim J, On WY, Kang WH. Increased expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. Br J Dermatol 2002; 146:165–7.
- 12) Imokawa G, Miyagishi M, Yada Y. Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. J Invest Dermatol 1995; 105: 32–7.
- 13) Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, et al. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. Pigment Cell Res 1997; 10: 218–28

☒

図1 トラネキサム酸の分子式



3. 総括

私はこれまでに述べた通り、皮膚の色素沈着形成における真皮血管系の寄与を考察するため3つの研究を行った。

第1の研究では、老人性色素斑における血管の関与を決定付けるため、老人性色素斑部位の血管3次元構造解析を行い、シミ部位では真皮において異常な血管構造を形成していること、また異常構造の周辺にはマクロファージが集積していることを見出した。本研究により、老人性色素斑の病変部位では、おそらく慢性的な紫外線曝露を経て、マクロファージの血管周辺への誘因、及び血管新生の亢進などを引き起こし、最終的に構造的に異常な血管構造を形成していることが示唆された。しかし、老人性色素斑におけるこのような血管構造変化が色素沈着形成のプロセスにおいてどのような役割を持つのかについては不明であった。そこで次に、血管系の異常と色素沈着形成の関連について解明するため、血管内皮細胞を用いた解析を行うこととした。

第2の研究では、血管内皮細胞を用いて、異常な血管形成によってメラノジェネシスが活性化するメカニズムの一端を解明した。本研究により、血管内皮細胞が紫外線曝露により活性化されると主に SCF などのメラニン生成促進因子が分泌される機構が存在し、これがおそらく慢性的な日光曝露によって形成される色素沈着の一因となっていることが示唆された。本研究では SCF にフォーカスしたものであったが、他にも網羅的解析により候補にあがっている機能が未知の因子についても、今後解明されることが望まれる。

第3の研究では、第1、第2の研究に得られた知見をもとにした治療法開発の一步として、経皮におけるトラネキサム酸の色素沈着改善効果検証とその作用メカニズムにおける血管系の関与を検証した。経皮でのトラネキサム酸投与により、CD31 陽性血管内皮細胞の減少及び表皮に発現している血管内皮増殖因子 VEGF についても発現が減少した。また、分光測色計による計測結果からは紅斑を示す a^* 値の減少が見られた。しかし、血管内皮細胞数や VEGF 発現を低下させる作用の程度は弱く、統計的有意差は見られなかった。一方、色素沈着部位で高発現することが知られている ET-1、SCF に関して、表皮において有意に減少することを見出した。今回の検証では、トラネキサム酸による有害事象が基

本的に生じない用量用法の範囲内での経皮適用での試験であった。そのため、表皮への作用は確認できたが、より深部の真皮への作用は限定的であったことが予想される。しかしながら本試験により、トラネキサム酸の経皮適用での血管系への作用のポテンシャルを確認することができたと言える。今後、より深部へ到達させる技術の開発により、真皮における血管系へ変化をもたらす可能性が示唆された。

上記知見は、本質的なシミ改善に向けた治療法の開発につながることを期待され、そのためにも今後も継続して血管構造異常によりシミ形成が促進される意義についての研究が求められると考える。

4. 謝辞

東京大学薬学系研究科にて学位審査を受けさせて頂くにあたり、指導教官の新井洋由教授、及び河野望准教授には多大なご指導を賜り、厚く感謝いたします。また、共同研究を実施し論文作成の際にご指導下さった韓国 Ajou 大学病院・医学研究科の Hee Young Kang 教授にも心より感謝いたします。また、本論 2-1 の研究は、内閣府が主導する革新的研究開発推進プログラム(ImPACT)の研究開発プログラム 「イノベーティブな可視化技術による新成長産業の創出」(八木PM)との連携により実施できたことに感謝いたします。研究をサポートして下さいました資生堂、及び Ajou 大学の関連研究者の方々にも感謝いたします。

2019 年 6 月 5 日