

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 柴田 貴子

柴田 貴子は、「皮膚の色素沈着形成における真皮血管系の寄与」を論文題目として、以下の研究を行った。

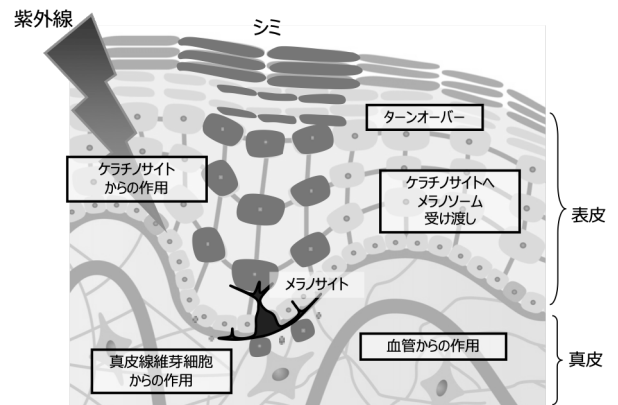
皮膚は、外部環境と内部環境の間の障壁として、身体の恒常性維持における重要な機能をもつ。例えば、メラニン産生細胞はメラニン生成により、紫外線を吸収するといった役割を果たす。しかしメラニン生成が過剰になれば、老人性色素斑や肝斑といった色素異常症を引き起こす

(図 1)。色素異常症の改善のために、古くからメラニン生成の機構解明の研究がなされてきており、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。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は対症療法に過ぎないため、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が重要であった。

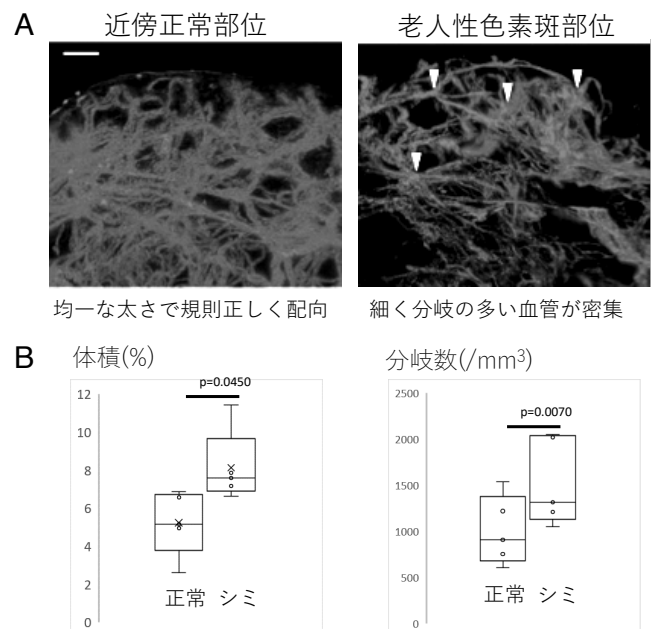
老人性色素斑や肝斑は、慢性的な紫外線曝露による皮膚の光老化が主な原因であり、紫外線照射によって生じる現象に着目した色素沈着部位と非病変部位における差異を見出す研究は盛んに行われてきた。それらの多くは、表皮内の機構に着目したものであったが、近年、真皮からの作用についての報告も増えてきており、特に毛細血管の関与が注目されつつある。そこで、本論文では、皮膚色素沈着形成における血管の関与に着目し、そのメカニズムの解明を行った。

図 1



これまでに、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が報告されている。しかしながら、先行研究では皮膚薄層切片の二次元的な解析が行われており、血管系が増加していることまではわかっていても、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、皮膚組織全体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。具体的には、顔面に老人性色素斑を有する被験者から取得した皮膚組織を血管内皮細胞マーカーにて免疫染色後、透明化処理を行い、ライトシート顕微鏡により画像取得した。

図 2



3D 画像観察の結果、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しており、明らかな形態学的な変化がみられた (図 2A)。定量解析の結果、老人性色素斑部位は血管の占める容積および血管分岐数の有意な増加が示された (図 2B)。

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、マクロファージ数が老人性色素斑において有意に増加することが報告されている。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斑部位に多く存在していることも見出されており、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の程度と血管との関連を見出すため、血管内皮細胞マーカーおよびマクロファージマーカー (CD68) を用いた免疫二重染色を行った。その結果、CD68 陽性マクロファージが複雑に分岐した血管構造領域に密集していることがわかった。つまり、マクロファージの浸潤が老人性色素斑において特徴的な血管構造形成と関連していることが示唆された。

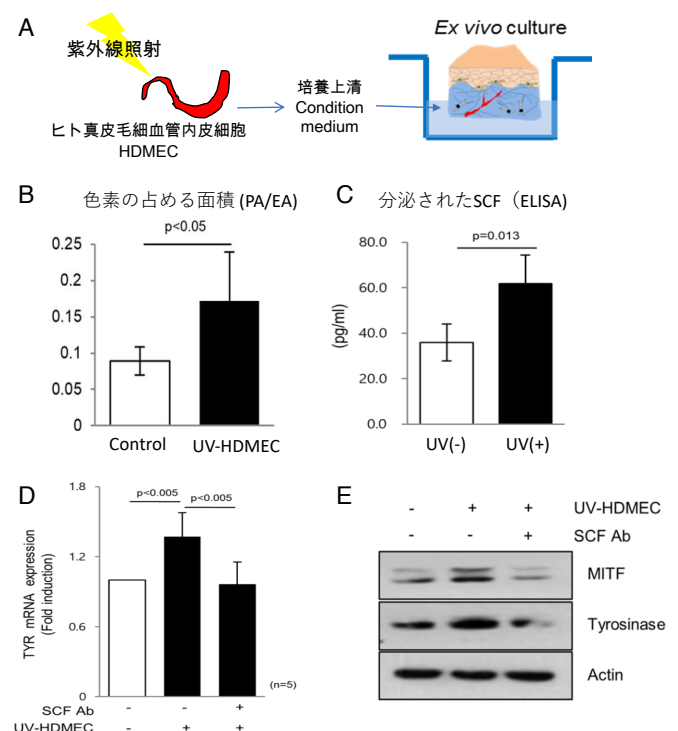
これまでの結果から、老人性色素斑病変部位では、おそらく慢性的な紫外線曝露を経て、マクロファージの血管周辺への誘因、及び血管新生の亢進などを引き起こし、最終的に構造的に異常な血管を形成していることが示唆された。しかしこのような血管構造変化が色素沈着形成のプロセスにおいて何らかの役割を持つのかについては不明であった。そこで、次に血管系の異常と色素沈着形成の関連について解析した。

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細胞からの分泌因子による作用によって引き起こされる。ケラチノサイトでは、メラノサイト刺激ホルモン (α MSH)、エンドセリン 1 (ET1) 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。一方、線維芽細胞は紫外線曝露により細胞老化を引き起こし、幹細胞因子 (SCF) や分泌型 frizzled 関連タンパク質 2 (sFRP2) といった因子が分泌されることが知られている。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知られている。

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、紫外線曝露による色素沈着形成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した。

紫外線照射したヒト真皮毛細血管内皮細胞 (HDMEC) 培養上清存在下で皮膚組織を 3 日間培養し、組織切片の観察を行った結果、メラニン蓄積の有意な亢進が見られた (図 3A, B)。つまり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、血管内皮細胞から分泌されるメラニン生成に関わる因子の同定を試みた。

図3



紫外線照射及び非照射 HDMEC より mRNA を抽出し、HiSeq2500 にてシーケンシングしたのち、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。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 ET1、プロオピオメラノコルチン (POMC)、線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、メラニン生成に抑制的な因子である TGF- β 、IL-6、IFN- γ は発現プロファイルに大きな違いはなかった。一方で、SCF が紫外線照射で有意に増加していることがわかった (図 3C)。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。

そこで次に SCF 受容体 c-Kit の特異的阻害剤、及び SCF 中和抗体を用いて SCF の機能解析を行った。紫外線照射した HDMEC 培養上清をメラノサイトに加え、同時に阻害剤または SCF 中和抗体を添加したところ、いずれの場合も培養上清のメラニン生成亢進作用が抑制されることを見出した (図 3D,E)。つまり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。

さらに肝斑患者より病変部位と非病変部位を採取し、血管内皮細胞由来の SCF の色素異常症における生体での役割を調べた。病変部位では SCF の発現量が増加しており、更に血管内皮細胞マーカーと SCF の共発現している細胞が観察された。このことから、*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。

以上から、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し、これがおそらく慢性的な日光暴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。

以上、本論文では、色素沈着部位において真皮に異常な血管構造が形成されていること、紫外線により活性化された血管内皮細胞から分泌される因子がメラノサイトでのメラニン生成を促進すること、その主要な因子は SCF であることを見出した。色素異常症における異常な血管形成の関与を示唆した本知見は、本質的な色素異常症の治療法の開発への新たな切り口となることが期待される。よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。