Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Melanocyte growth factor in normal human skin

堀川, 達弥

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1991-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1006
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001006

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

〔 100 〕

氏名・（本籍）	堀川達弥（ほりかわたつや）　（和歌山県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第743号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	平成3年3月31日
学位論文題目	Melanocyte Growth Factor in Normal Human Skin （正常ヒト皮膚におけるメラノサイト増殖因子）
審査委員	主査　教授　三島　豊 教授　田中千賀子　教授　徳久剛史

論文内容の要旨

【序文】

表皮基底層に存在するメラノサイトは紫外線照射により数が増加することが1967年 Mishima と Widlan により報告されており，in vivo に於てメラノサイト増殖の調節機構が存在することが強く疑われる。近年 Halaban らは dibutyl cyclic adenosine monophosphate (dbc AMP) の存在下で塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) がメラノサイトの増殖を促進させることを見いだした。さらに培養ケラチノサイトと培養線維芽細胞はメラノサイト増殖因子 (melanocyte growth factor : MeGF) を産生し，この MeGF は免疫学的に bFGF と同一であるとの報告を行い，同時にメラノサイト自身は MeGF を産生しないことを示した。bFGF は培養血管内皮細胞によっても産生される。

他のメラノサイト増殖刺激物質としては以下のようなものが報告されている。(1) 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), (2) Kaposi 肉腫由来 bFGF 様因子 (hst／K-FGF), (3) dbcAMP, (4) ケラチノサイト培養上清, (5) 脳抽出液, (6) メラノーマ抽出液。

表皮基底層に一定の割合で存在しているメラノサイトは，これらの増殖因子によって維持されていると考えられるが，正常ヒト皮膚における MeGF の局在についての報告は未だない。我々は正常ヒト皮膚の MeGF の性質と局在について培養メラノサイトを用いて解析・研究を行った。

【材料・方法】

1．培養メラノサイト

Halaban らの方法に従って培養した。割礼手術により得られた新生児包皮の脂肪組織を機械的に除去し，0.25%トリプシン加イーグル MEMS（Ca，Mg 不含）培地に浮遊し，室温で一夜静置。機械的に表皮と真皮に分け，振とう後，細胞浮遊液を得メラノサイト増殖培地（TIP 培地：Ham F-10 培地，8％ウシ新生仔血清，85nM-TPA，0.1mM isobutyl methylxanthine，ウシ下垂体抽出液）により培養した。線維芽細胞が混じて増殖してくれば，geneticin 処理により選択的にメラノサイトのみを増殖させた。

2．正常ヒト皮膚

包茎手術時の正常成人包皮を用いた。MEM培地にて4℃で保存し，24時間以内に以下の処理を行った。メスを用いて皮膚を剥切し，表皮部分と真皮部分に分け，両者は0.1%CHAPS加PBS中，4℃で1分間超音波処理。12000g×10分遠心後，上清を0.02μm ミリポアフィルターで濾過した。

3．メラノサイト増殖活性の検出

培養メラノサイトによる^{3}H－チミジン取り込み試験を行った。培地は血清不含のPC-1培地を使用した。96wellF プレートを用い4×10^4個のメラノサイトを100μl の培地にて1mM adcAMP の存在下に24時間培養，最終の3時間^{3}H－チミジンを加えた。トリプシン処理後セミオートマチックセルハーベスターにてフィルター上に移し，液体シンチレーションカウンターにて放射生活性を測定した。

4．ヘパリン・セファロース粒子による吸着

bFGF にはヘパリン親和生があることが知られている。皮膚から作製した抽出液500μl を30mg／mlの heparin-Sepharose DL-6B 粒子溶液500μl とともに氷中で15分静置した後，遠沈（12000g，10分）し上清を得た。沈澱物はPBSにて2回洗浄した後2.5M NaCl 溶液を加え，10分静置後遠沈し上清を集めた。

5．bFGF に対する抗体

皮膚抽出液と bFGF（1－24）合成ペプチドに対するウサギ抗血清あるいは対照の非免疫ウサギ血清とともに培養しメラノサイト増殖活性を測定した。

6．培養ケラチノサイト抽出液

正常ヒト包皮の表皮細胞をKGM培地（改変 MCDB153 培地，EGF，ウシ下垂体抽出液含有）にて培養した。3継代後，PBSにて3回洗浄し，ケラチノサイトを回収，氷にて1分間超音波処理した。12000g，10分間遠沈後，上清を取りだし，ミリポアフィルターにて濾過しアッセイに用いた。

【結果】

1．メラノサイト増殖活性の検出

1mM dbcAMP の存在下でリコンビナント bFGF およびTPAは濃度依存性にメラノサイトの増殖を促進した。bFGF と dbcAMP の存在なしにはメラノサイトは増殖できなっかた。

2．皮膚抽出液の MeGF 活性

正常ヒト皮膚の表皮部分および真皮部分の双方の抽出液に MeGF 活性が存在することを3名の健

常人全例に於いて見い出した。

3．皮膚 MeGF のヘパリン親和性

皮膚 MeGF のヘパリン親和性を調べるために各抽出液500 μl をヘパリンセファロース粒子と反応させた。各 MeGF 活性はヘパリンセファロース粒子に吸着され，2.5M NaCl によって一部は溶出した。

4．抗 bFGF 血清による blocking

表皮部分および真皮部分の皮膚抽出液中の MeGF 活性は抗 bFGF 血清によって中和されたが，対照の非免疫ウサギ血清では中和されなかった。

5．培養ケラチノサイト抽出液中の MeGF

培養ケラチノサイトの抽出液は MeGF 活性を有していた。

【考察】

ヒト表皮に於ては遺伝的に決定された一定数のメラノサイトを保持しているが，in vivo でのその制御機構については未だに解明されていない。近年 Halaban らは in vitro での培養系を用い，bFGFが生体に存在するメラノサイト増殖因子であり，また培養ケラチノサイトと線維芽細胞はbFGFを産生することを見出した。それゆえ，表皮基底層に存在するメラノサイトは周囲の細胞環境により維持されていると推論される。我々は，本研究において，正常ヒト皮膚内の bFGF 様 MeGF の存在ならびにその活性測定結果を報告した。さらに表皮部分だけでなく真皮部分にも MeGF 活性を見いだした。この MeGF はヘパリン親和性があり，抗 bFGF 抗体によって完全に抑制された。Shipley と Pittelkow は bFGF の mRNA は線維芽細胞には発現されているがメラノサイトやケラチノサイトにはないとの報告をしている。しかし我々の結果は培養ケラチノサイトのみならず in vivo ヒト表皮内にも MeGF が産生されている可能性を提示した。

bFGF はケラチノサイトや線維芽細胞などの培養細胞で生成されるが培養液中への放出は認められていない。bFGF はヘパリン親和性を有し，細胞外基質の構成成分であるヘパラン硫酸に結合する。我々の見い出した真皮に存在する bFGF 様 MeGF はヘパラン硫酸と関連して細胞外基質に存在していると推論される。

bFGF は dbcAMP を accessory signal としてメラノサイトの増殖を刺激する。このように MeGF は in vivo で細胞内 cyclic AMP濃度を上げるような因子とともに働いていると考えられる。紫外線（UV）照射は in vivo でメラノサイトの増加を促進するが，UVB は MeGF の産生促進および細胞膜の損傷に続いて細胞内 cyclic AMP 濃度を上昇させる可能性がある。実際，培養ケラチノサイトにUVB照射を行うと MeGF の増加が見られることが報告されている。

以上の知見から我々は正常ヒト皮膚内の bFGF 様 MeGF が，表皮－真皮境界部に存在するメラノサイトの増殖を誘導し，遺伝的制御のもとに一定のメラノサイト数を維持していく上で重要な役割を担い，また紫外線照射後のメラノサイトの増加機序にも関与しているであろうことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒト表皮基底細胞層内には人種差なく1㎟当たり平均2000個メラノサイトが全身に分布し，遺伝的に規定されたメラノサイト量を維持している。此等表皮メラノサイトの減少をきたす白斑の新治療法を開発するためにもメラノサイトの増殖がどのうよな制御機構のもとに調節されているかを究明してゆくことが必要である。

In vivo に於いて紫外線照射後，メラノサイトの分布密度が著明に増加することは，既に1967年より我々らによって明らかにされていたが，その機序については不明であった。一方，近年 in vivo 培養細胞系に於いて dbcAMP の存在下に basic FGF がメラノサイトの増殖を促進させることが明らかとなってきたが，in vivo に於けるメラノサイト増殖促進物質の存在ならびにその局在についての報告は未だなさていない。

本研究に於いて，我々は血清非含有培地を用いた bioassay により，正常ヒト皮膚抽出液中にメラノサイト増殖因子（MeGF）が存在することを見出した。さらにこの MeGF は表皮部分抽出液のみならず真皮部分抽出液にも存在していることを明らかにした。

次いで，この正常ヒト皮膚に存在する MeGF の特徴明確にするため，つぎのような検討を行った。まず既知のメラノサイト増殖因子である bFGF が有するヘパリン親和生の有無について，ヘパリンセファロース粒子による吸着実験を行い，皮膚抽出液中の MeGF は完全に吸着され，しかる後2.5 molar NaCl 溶液にて，溶出されることを確認した。次に，抗 bFGF 抗体を作用させると皮膚抽出液中の MeGF のメラノサイト増殖促進作用が完全に抑制されることを見出した。即ち正常ヒト皮膚に存在する MeGF は極めて高い可能性で免疫学的に fibroblast 等の産生する bFGF と同一であることが推論された。

正常メラノサイト自身は MeGF を産生しないが，隣接するケラチノサイトが MeGF を産生するかどうかは異論のあるところであったが，我々は正常ヒト表皮より分離し得た培養ケラチノサイト抽出液中にも MeGF を認めることが出来た。

以上により，我々は培養ケラチノサイトならびに in vivo でヒト表皮内でも MeGF が産生され，しかも活性化された状態で存在し，一方，真皮にも同様の MeGF が存在することを提示した。即ち，我々は MeGF が表皮・真皮境界部に存在するメラノサイトの増殖を誘導し，遺伝的制御のもとに一定のメラニン量を生成・維持してゆく上で重要な役割を担っている可能性が大であると結論するものである。

本研究は，in vivo に於けるヒト表皮内メラノサイトについて，その増殖調節機構を研究したものであるが，従来ほとんど解明されていなかった正常ヒト皮膚に於けるメラノサイト増殖因子（MeGF）の局在を表皮，真皮の両者に見出すとともに，それらの活性の定量的解明という重要な知見を得たものとして，価値ある業績あると認める。

よって，本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。