Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-07-25

Glucocorticoid stimulates melanogenesis and tyrosinase gene expression in B16 melanoma cells

伊東, 顕

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1992-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1046
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001046

※ 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。

氏名・（本籍）　伊東　顕（いとう　あきら）　（兵庫県）

博士の専攻分野の名称　博　士（医学）

学位記番号　博い第769号

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付　平成4年3月31日

学位論文題目　Glucocorticoid stimulates melanogenesis and tyrosinase gene expression in B16 melanoma cells
（グルココルチコイドはB16黒色腫細胞においてメラニン合成とチロシナーゼ遺伝子発現を刺激する）

審査委員　主査　教授　三嶋　豊
教授　田中千賀子　教授　西塚泰美

論文内容の要旨

【序文】

グルココルチコイドなどのステロイドホルモンは，主として，それ自体が転写調節因子である細胞内のレセプター蛋白を介して遺伝子の転写を制御することにより，多彩な生理作用を示すと考えられている。グルココルチコイドレセプターはいくつかの黒色腫細胞株での発現が固定されており，またコルチコステロンがメラニン合成の中心的な制御因子である tyrosinase の活性を刺激するという報告がみられる。グルココルチコイドの外用は尋常性白斑の治療において有効性が認められている。しかし，グルココルチコイドのメラニン合成への関与についての詳細は不明である。

近年，主要な細胞内情報伝達系であるcAMP－プロテインキナーゼA系，およびプロテインキナーゼC系が tyrosinase 遺伝子の転写に関与していることを示唆する報告がみられる。本研究ではB16マウス黒色腫細胞においてデキサメサゾンのメラニン合成および tyrosinase mRNA レベルへの影響を解析し，メラニン合成におけるグルココルチコイドの関与について考察した。

【方法】

細胞培養：B16／F10黒色腫細胞は10%牛胎児血清を含有する Eagle's minimal essential medium 中で，37℃，5%CO_2通気下で培養した。細胞数は血球計算盤を用いて算定した。

細胞内メラニン含量の定量：細胞の沈渣を1N NaOH，80%DMSOで80℃，2時間処理することにより可溶化した後，OD_{475}を測定し，合成メラニンを用いた標準曲線により定量化した。

Northern blotting：guanidinium isothiocyanate 法により total RNA を分離し，その10μgを

formaldehyde－1％ agarose gel で電気泳動後，ニトロセルロースペーパーに転写した。baking，prehydridization 後，マルチプライム法により^{32}Pラベルしたマウス tyrosinase cDNA clone Tyrs-J およびβ-actin cDNA と hybridize させた。0.1 x SSC，0.5％SDS にて washing 後，乾燥させ，autoradiography を行った。autoradiogram 上のバンドのシグナル強度は densitometer を用いて数値化した。

統計分析：Student の t-test を用いた。

【結果】

種々の濃度のデキサメサゾンの存在下で24時間培養することにより，B16／F10細胞のメラニン含量は濃度依存的に上昇した。10^{-9}Mの濃度で有意な上昇を認め，10^{-6}Mではコントロールの2.4±0.3倍となった。

Northern blotting においては複数の tyrosinase mRNA のバンドが認められ過去の報告と一致した。デキサメサゾン存在下で24時間培養することにより，tyrosinase mRNAレベルは濃度依存的に上昇した。すべてのバンドが同様に変化したので，約2kbの最も主要なバンドのシグナル強度を測定した。10^{-9}Mの濃度で有意な上昇を認め，10^{-6}Mではコントロールの1.8±0.3倍となった。一方コントロールとして測定したβ-actin mRNA レベルには差が認められなかった。10^{-7}Mデキサメサゾンを培養液に添加後，tyrosinase mRNA レベルは2時間後より有意に上昇し，48時間後には1.9±0.3倍となった。

プロテインキナーゼC活性化作用を持つ腫瘍プロモーターの 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate（TPA）（30nM）の存在下で24時間培養することにより tyrosinase mRNAレベルはコントロールの36±10％に減少したが，この変化はデキサメサゾンにより劇的に拮抗された。30nM TPA を含有する培養液に10nMデキサメサゾンを加えると tyrosinase mRNA レベルはコントロール近くにまで戻った。さらにデキサメサゾンの濃度を上げることによりコントロールを越えて上昇し，100nMではコントロールの127±9％となった。

【考察】

デキサメサゾンは，B16／F10細胞においてメラニン含量を増加させ，tyrosinase mRNA レベルを上昇させた。ステロイドホルモンによる転写制御は，リガンドの結合により活性化されたレセプター蛋白が15bpの共通配列 glucocorticoid responsive element（GRE）を認識して結合することによると考えられている。報告されているマウスtyrosinase 遺伝子の5’上流領域にGREと80％の相同性を示す領域が存在する。しかし，tyrosinase mRNA 分子の分解の阻害によっても，Northern blotting において類似した結果が得られるので，より詳細な解析が必要と思われる。

TPAが tyrosinase mRNA レベルを減少させるという報告がみられる。本研究でデキサメサゾンがTPAのこの作用に拮抗することを示した。グルココルチコイドレセプター蛋白が転写因子AP－1に直接結合し，その転写活性を阻害するという報告がなされている。デキサメサゾンはTPAの

tyrosinase mRNA 減少作用に劇的に拮抗したので，プロテインキナーゼC－AP－1系を阻害することにより間接的に tyrosinase mRNA レベルを上昇させている可能性もあると思われる。

フルオシノニドなどのグルココルチコイドの外用が尋常性白斑の治療に用いられ，有効であることが報告されている。その機序についてはグルココルチコイドの免疫抑制作用の関与が考えられるが，本研究から，グルココルチコイドが，病変皮膚において再び増加したメラノサイトのメラニン合成を刺激している可能性が考えられる。

【結語】

グルココルチコイドは，B16／F10細胞において，tyrosinase 遺伝子の転写調節に影響を及ぼすことにより，メラニン合成に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

糖蛋白酵素チロシナーゼは，メラノサイトにおけるメラニン生合成の中心的な制御因子と見なされている。その活性調節機構については不明な点も多いが，近年cDNAクローニング等の手法を用いて遺伝子レベルでの解析が進められている。グルココルチコイドなどのステロイドホルモンは主に遺伝子の転写に影響を与えることにより多彩な生理作用を示すと考えられている。グルココルチコイドがチロシナーゼ活性調節に関与することを示唆した報告が見られるが詳細は不明である。臨床的にはグルココルチコイドの外用が尋常性白斑の治療において有効であることが認められている。

本研究者は，B16マウス黒色腫細胞株を用いてグルココルチコイドのチロシナーゼ発現に対する影響の解析を試みた。デキサメサゾン存在下で72時間培養することにより，B16細胞の細胞内メラニン含量は濃度依存的に有意に上昇した。次にチロシナーゼ mRNA レベルに対するデキサメサゾンの影響をみるために，マウスチロシナーゼcDNAをプローブとして用いたノザンブロッティングを行った。デキサメサゾンで24時間処理した後，チロシナーゼ mRNA レベルは濃度依存的に有意に上昇したが，コントロールとして測定したβ-actin mRNAレベルには顕著な変化は認められなかった。このチロシナーゼ mRNA の上昇は，デキサメサゾン処理後少なくとも2時間後には認められた。腫瘍プロモーターの12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate（TPA）で処理することによりB16細胞のメラニン含量は顕著に減少するが，この時チロシナーゼ mRNA レベルも減少している。この作用は protein kinase C の活性化を介していると思われるがデキサメサゾンはTPAのこの作用に拮抗し，減少した mRNA レベルを劇的に回復させた。デキサメサゾンによるチロシナーゼ mRNA レベル上昇のメカニズムについてはi）glucocorticoid responsive element を介する直接的な転写の促進，ii）チロシナーゼ mRNA 分子の安定化，iii）protein kinase C を介する negative な転写制御の抑制などが考えられる。またグルココルチコイドの尋常性白斑にたいする治療効果も，グルココルチコイドがまず局所の免疫異常を抑制し，さらに，再生したメラノサイトのメラニン合成を刺激する二段階のメカニズムが示唆される。

本研究は，グルココルチコイドのチロシナーゼ発現への影響を解析したもので，従来知られていなかったグルココルチコイドのチロシナーゼ遺伝子転写制御への関与を示唆し，メラニン生合成におけるグルココルチコイドレセプターを介する情報伝達系の意義を論じたもので価値ある業績であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。