Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-05-15

The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells

薄木，晶子

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2003-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2694
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002694

※ 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。

【 88 】

氏 名 ・(本 籍)　　薄木 晶子　　(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1483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１５年３月３１日

【 学位論文題目 】

The Inhibitory Effect of Glycolic Acid and Lactic Acid on Melanin Synthesis in Melanoma Cells

（グリコール酸と乳酸のメラニン合成抑制機序）

審 査 委 員

主 査　教 授　市橋　正光

教 授　田原　真也

教 授　久野　高義

〔序文〕α-ヒドロキシ酸(α-hydroxy acid:AHA)は近年、光老化皮膚などの改善に用いられている。AHA 中でもグリコール酸と乳酸は頻用されており、光老化による皮膚のきめの荒さ、色素沈着、中等度のしわを改善することが知られている。臨床的にはグリコール酸は肝斑、日光性黒子、炎症後色素沈着に、乳酸は日光性黒子に対して治療効果があることが報告されている。このような色素斑改善の作用機序は、表皮の再構築と角層剥離の促進のためにメラニンの拡散促進が起こることによると考えられている。しかし AHA の色素細胞に対する作用としては、乳酸がチロシナーゼ遺伝子の発現を抑制するとの報告があるのみで、メラニン生成に対する作用に関しては十分に検討されておらず、またグリコール酸のメラノサイトへの直接作用について明らかにした報告もない。

〔目的〕α-ヒドロキシ酸、特にグリコール酸による色素斑改善の機序を検討するため、グリコール酸及び乳酸の色素細胞のメラニン産生に及ぼす効果について in vitro で検討した。

〔方法〕細胞は HM3KO ヒトメラノーマ細胞と B16 マウスメラノーマ細胞を用いた。10%FCS 添加 E-MEM にて培養し、グリコール酸、乳酸をそれぞれ 300,500μg/ml、隔日に培養液内に添加した。添加５日後に細胞数を計測した。Northern blotting は各細胞 50μg の total RNA を用い、ホルムアルデヒド変性ゲルにて泳動、転写後、マウス及びヒト tyrosinase に対し PCR にて作製した DIG 標識プローブを用いてハイブリダイゼーションし、バンドのシグナルを検出した。Western blotting は各細胞蛋白量 100μg を 7.5%ポリアクリルアミドゲル泳動転写後、抗 tyrosinase ポリクローナル抗体(PEP7)を１次抗体とて使用し、ECL Western blotting 検出システムにてバンドを検出した。tyrosinase、TRP-2（DOPAchrome tautomerase: DT）活性は各細胞より抽出した蛋白 30μg を用い３H 標識 tyrosine の反応産物を定量した。Direct tyrosinase inhibition assay は HM3KO より large granule fraction を得、これを tyrosinase の粗酵素液とし、各 7μg 蛋白量に対し、グリコール酸及び乳酸　100、500、1000、2500μg/ml を直接加え、同様の方法にて tyrosinase 活性を測定した。

〔結果〕

1. 細胞増殖に及ぼす効果を細胞数にて比較した。乳酸 500μg/ml では B16 マウスメラノーマ細胞で 41%、HM3KO ヒトメラノーマ細胞で 27%の抑制効果を認め、グリコール酸 500μg/ml ではマウスメラノーマ細胞で 36%の細胞増殖抑制効果を認めた(Fig.1)。
2. メラニン含有量を示す。グリコール酸、乳酸共に B16 マウスメラノーマ細胞において用量依存性に活性の抑制を認めた（Fig.2)。
3. Northern blotting を示す。グリコール酸、乳酸共にマウス、ヒトメラノーマ細胞において tyrosinase の mRNA の発現の変化を認めなかった（Fig.3)。
4. Western blotting を示す。グリコール酸、乳酸共にマウス、ヒトメラノーマ細胞において tyrosinase、TRP-1、TRP-2(DT)蛋白発現の変化を認めなかった（Fig.4)。
5. tyrosinase 活性を示す。グリコール酸、乳酸共にマウス、ヒトメラノーマ細胞において用量依存性に活性の抑制を認めた（Fig.5)。
6. TRP-2(DT) 活性を示す。グリコール酸、乳酸共にマウス、ヒトメラノーマ細胞において活性の抑制を認めなかった（Fig.6)。
7. 直接的な tyrosinase 酵素への効果を示す。グリコール酸では用量依存性に、乳酸においても明らかに活性の抑制を認めた。高濃度グリコール酸および乳酸添加により溶液が酸性に傾くため、tyrosinase 活性の抑制が pH 低下に伴う変化である可能性を考え、グリコール酸、乳酸 2500μg/ml 添加時と同様の pH5.6 となるように HCl を添加して測定したが、この条件では抑制を認めなかった（Fig.7)。

〔考案〕グリコール酸と乳酸は酵素 tyrosinase を介してメラニン合成を直接抑制することが判明した。その機序として（1）グリコール酸と乳酸はメラニン合成に関与する酵素である tyrosinase と TRP-1,TRP-2 の mRNA と蛋白量には影響を及ぼさない。(2）グリコール酸と乳酸は tyrosinase の酵素活性を抑制するが、TRP-2 活性は抑制しない。(3）tyrosinase 酵素活性の抑制機序として、酵素反応液が酸性に傾くためではなく、非拮抗性に酵素活性を抑制する。

TRP-2（DT）蛋白量及び活性に対してグリコール酸、乳酸は何ら抑制作用を示さなかった。TRP-2 は黒いメラニンである eu-melanin 産生の制御酵素として tyrosinase と共に重要な役割を担うことが知られている。しかしヒトメラノーマ細胞においては、メラニン生成能と TRP-2 活性

との間には相関関係がないことが知られている。Ando らにより乳酸がマウスメラノーマ細胞の tyrosinase の mRNA 発現量を抑制したとの報告がなされており、我々の結果とは異なる。彼らは 40mMという高濃度の乳酸を用いて実験している。我々の実験では 500μg/ml(5.5mM)にて既に細胞増殖がみられ、40mMでは細胞死を起こしてしまった。彼らは酸性でない中和した条件で乳酸を用いており、我々の中和しなかった系とは異なるものの、細胞毒性という点から彼らの結果を追試することは困難であった。

我々はグリコール酸が乳酸と同程度にメラニン合成を抑制することを明らかにした。グリコール酸と乳酸は他の美白剤（ハイドロキノン、コウジ酸、ビタミン C）との併用によりその効果は増強されることが知られている。今後美白剤の作用機序を明らかにすると共に、新しい作用機序を持つ美白剤を開発し、それらのより良いコンビネーションによる効果的な美白治療法を確立できるものと期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1484 号	氏　名	薄　木　晶　子
論文題目	The Inhibitory Effect of Glycolic Acid and Lactic Acid on Melanin Synthesis in Melanoma Cells グリコール酸と乳酸のメラニン合成抑制機序		
審査委員	主　査　市橋正光 副　査　田原真也 副　査　久野高義		
審査終了日	平成 15 年 1 月 28 日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

〔序文〕α-ヒドロキシ酸(α-hydroxy acid:AHA)は近年、光老化皮膚の改善に用いられ、なかでもグリコール酸(GA)と乳酸(LA)は光老化による皮膚のきめの荒さ、色素沈着、中等度のしわを改善するため頻用されている。臨床的にはGAは肝斑、日光性黒子、炎症後色素沈着に、LAは日光性黒子に対して治療効果があるがその作用機序は、表皮の再構築と角層剥離の促進によるメラニンの拡散促進のためと考えられている。しかしAHAの色素細胞に対する作用としては、LAがチロシナーゼ遺伝子の発現を抑制するとの報告があるのみで、メラニン生成に対する作用は十分に検討されていない。

〔目的〕AHA特にGAによる色素斑改善の機序を検討するため、GA及びLAの色素細胞のメラニン産生に及ぼす効果をin vitroで検討した。

〔方法〕HM3KOヒトメラノーマ細胞とB16マウスメラノーマ細胞を10%FCS添加E-MEMにて培養し、GA、LAを300、500μg/ml隔日に培養液内に添加した。添加5日後に細胞数を計測。Northern blottingには各細胞50μgのtotal RNAを用い、マウス及びヒトチロシナーゼに対しPCRにて作製したDIG標識プローブを用いてハイブリダイゼーションで検出。Western blottingは細胞蛋白量100μgを7.5%ポリアクリルアミドゲル泳動転写後、抗チロシナーゼポリクローナル抗体(PEP7)を1次抗体としてバンドを検出した。チロシナーゼ、TRP-2活性は細胞より抽出した蛋白30μgを用い3H標識tyrosineの反応産物を定量した。チロシナーゼに対する直接抑制効果判定にはHM3KOより得たlarge granule fractionを用いた。

〔結果〕

1.細胞増殖効果をみるとLA500μg/mlではB16マウスメラノーマ細胞で41%、HM3KOヒトメラノーマ細胞で27%、GA500μg/mlではマウスメラノーマ細胞で36%の細胞増殖抑制効果を認めた。

2.GA、LA共にB16マウスメラノーマ細胞において用量依存性にメラニン生成の抑制を認めた。

3.GA、LA共にマウス、ヒトメラノーマ細胞においてチロシナーゼのmRNAの発現変化を認めなかった。

4.GA、LA共にマウス、ヒトメラノーマ細胞においてチロシナーゼ、TRP-1、TRP-2蛋白発現の変化を認めなかった。

5.GA、LA共にマウス、ヒトメラノーマ細胞において用量依存性にチロシナーゼ活性の抑制を認めた。

6.GA、LA共にマウス、ヒトメラノーマ細胞においてTRP-2活性の抑制を認めなかった。

7.GAでは用量依存性に、LAにおいても明らかに単離チロシナーゼ活性の抑制を認めた。チロシナーゼ活性の抑制がpH低下に伴う変化であるか否かをみたが、単なる酸性条件下（pH5.6）では抑制を認めなかった。

〔考案〕GAとLAはチロシナーゼを介してメラニン合成を直接抑制することが判明した。その機序として（1）GAとLAはメラニン合成に関与する酵素であるチロシナーゼとTRP-1,TRP-2のmRNAと蛋白量には影響を及ぼさない。（2）GAとLAはチロシナーゼ活性を抑制するが、TRP-2活性は抑制しない。（3）チロシナーゼ活性の抑制は単なる酸性条件のためではなく、非拮抗性に酵素活性を抑制すると考えられた。TRP-2蛋白量及び活性に対してGA、LAは何ら抑制作用を示さなかった。TRP-2は黒いメラニンであるeu-melanin産生の制御酵素としてチロシナーゼと共に重要な役割を担うことが知られている。しかしヒトメラノーマ細胞においては、メラニン生成能とTRP-2活性との間には相関関係がないといわれている。Andoらは40mMの大量のLAがpH調節条件下でマウスメラノーマ細胞のチロシナーゼのmRNA発現量を抑制したと報告しているが、我々の実験条件では5.5mMで既に細胞増殖がみられたが、40mMでは逆に細胞死を起こしたため追試は困難であった。

我々はGAがLAと同程度にメラニン合成を抑制することを明らかにした。GAとLAは他の美白剤（ハイドロキノン、コウジ酸、ビタミンC）との併用によりその効果は増強されることが知られている。今後美白剤の作用機序を明らかにすると共に、新しい作用機序を持つ美白剤を開発し、それらのより良いコンビネーションによる効果的な美白治療法を確立できるものと期待される。

本研究は、α-ヒドロキシ酸(α-hydroxy acid:AHA)の色素細胞のメラニン生成に対する作用を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったグリコール酸の色素細胞の分化形質への直接作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。