

# ITOユーザーズミーティング2010 開催決定!!

## 化粧品で担当者の育成、スタッフ教育に!

**日時:** 2010年12月1日(水)、2日(木) 13:00~  
**場所:** 神戸国際ビジネスセンター  
 JR三ノ宮からポートライナーで「先端医療センター前」下車徒歩1分  
 2日とも同内容です。ご都合のよい日をお選びください。 兵庫県神戸市中央区港島南町5-5-2  
**内容:** 化粧品調剤実習、施術(メディカルエステの実演)と化粧品原料の説明



### 2010年学会

開催日	学会・展示会名	場所	地域
11/20(土)~21(日)	第74回日本皮膚科学会東部支部学術大会	江陽グランドホテル	宮城(仙台)

### 2011年学会

開催日	学会・展示会名	場所	地域
2/11(金)~12(土)	第74回日本皮膚科学会東京支部学術大会	ホテルグランパシフィックLE DAIBA	東京
2/25(金)~26(土)	第29回日本臨床皮膚外科学会・第16回日本臨床毛髪学会	万国津梁館	沖縄
4/13(水)~15(金)	第54回日本形成外科学会総会・学術集会	あわぎんホール ホテルクレメント徳島	徳島
4/15(金)~17(日)	第110回日本皮膚科学会総会	パシフィコ横浜	神奈川
4/15(金)~17(日)	第108回日本内科学会総会・講演会	東京国際フォーラム	東京
4/15(金)~17(日)	第63回日本産科婦人科学会学術講演会	大阪国際会議場	大阪
5/25(水)~27(金)	CITE Japan2011・第5回化粧品産業技術展	パシフィコ横浜	神奈川
6/29(水)~7/1(金)	第2回国際化粧品開発展	東京ビッグサイト	東京
9/9(金)~10(土)	第26回日本乾癬学会学術大会	大阪国際会議場	大阪

バックナンバーをご希望の方はお申しつけください



vol.10 特集: シグナルタンパク(2) 2009年12月号  
 vol.11 特集: シグナルタンパク(3) 2010年2月号  
 vol.12 特集: 機能性ペプチド 2010年4月号  
 vol.13 特集: 紫外線とメラニン 2010年6月号  
 vol.14 特集: 紫外線防御剤 2010年8月号

- vol.10 シグナルタンパク  
その美容医療への応用について(2)
- vol.11 シグナルタンパク  
その美容医療への応用について(3)
- vol.12 機能性ペプチドの  
シワに対する臨床評価
- vol.13 紫外線とメラニン
- vol.14 紫外線防御剤と  
日焼け止め化粧品



株式会社 アイ・ティー・オー  
 東京本社: 〒180-0006 東京都武蔵野市中町1-6-7-3F  
 Tel 0422-60-3434 Fax 0422-60-3435  
 神戸支店: 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町5-5-2-352  
 Tel 078-304-7499 Fax 078-304-7599

Tel 0120-31-6588  
 E-mail ito@provitamin.jp

本誌内容の詳細・お問い合わせは上記へ。クリニックで活用されたい場合は追加でお送りいたします。

<http://www.provitamin.jp>

# CLI COS NEWS 2010 10月

Clinic Cosmetic News  
 クリニックのための化粧品原料情報誌  
 『クリ・コス・ニュース』  
 VOLUME 15

## 第40回ヨーロッパ研究皮膚科学会レポート

ヨーロッパ研究皮膚科学会は、1976年に創立され、皮膚癌や感染症等の疾患に多大な貢献をしている学会である。今回我々は、本学会にて還元型グルタチオンのメラニン産生抑制効果に関する研究成果を発表する機会を得た。

2010年フィンランド・ヘルシンキで行われたヨーロッパ研究皮膚科学会のポスター展示会場

### ヨーロッパ研究皮膚科学会

本年度のヨーロッパ研究皮膚科学会(40th Annual ESDR Meeting)は、9月8日~11日にフィンランド・ヘルシンキで開催された。今回、幸いにも東京工科大学応用生物学部(芋川教授)との共同研究として研究成果をポスターにて発表することができた。

本学会で発表されていた演題数は約600にのぼり、とくに臨床関連、免疫、アトピー性皮膚炎に関する研究が充実していた印象を受けた。もちろんその他にもメラニン関連等多数の研究成果が発表されており、化粧品原料としても馴染みのあるビタミンC誘導体やアスタキサンチンに関するものなど、興味深い研究内容が注目された。

### ビタミンC誘導体の細菌性炎症抑制効果

ビタミンC誘導体に関する研究で、細

菌由来ペプチドグリカン刺激によりケラチノサイトから誘発されたサイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-8)を、アスコルビン酸及びアスコルビルリン酸ナトリウム(APS)が抑制するという発表があった。

つまり、APSには細菌により引き起こされた炎症に対する抑制効果が期待される。これまでにビタミンC及びビタミンC誘導体が酸化ストレスにより引き起こされた炎症に対して抑制効果を発揮することは報告されているが、今回のような報告はほとんどなされていないため非常に興味深い内容であった。

### アスタキサンチンの色素沈着抑制効果

アスタキサンチン (AX) による色素沈着抑制効果に関する研究も発表されていた。メラノサイト含有三次

元培養皮膚モデルを用いた色素沈着抑制効果試験で、UVB 曝露ケラチノサイトの細胞膜上に発現するステムセルファクター (SCF) により誘導された色素沈着に対してAX は抑制効果を示しており、AX はSCFにより誘発されるMAP系シグナル伝達系の活性化の抑制、とくにRaf-1のリン酸化の抑制により色素沈着抑制効果を発揮するという。これは全く新しい作用機序で色素沈着抑制効果を発揮するため、今後さらに美白剤としてのAXに対する注目が集まるであろう。

本稿では、今回弊社がESDRにて発表した研究成果、すなわち還元型グルタチオンによるメラニン産生抑制メカニズムについて、詳しく報告していきたいと思う。



## 還元型グルタチオンによるメラニン産生抑制効果は、チロシナーゼ酵素活性阻害によるものではなく、チロシナーゼのメラノソームへのトランスファー阻害による可能性が高い。

### 還元型グルタチオンはメラニン産生抑制効果を示す

還元型グルタチオン(GSH)はグルタミン酸、システイン、グリシンの3つのアミノ酸から成るトリペプチドであり、細胞内抗酸化物質の一つである。

既に芋川らにより、B16メラノーマ細胞を用いた色素回復系試験によるGSHのメラニン産生抑制効果(色素回復抑制効果)が確認されている。この色素回復系試験は、試験サンプルをグルコサミン(Glc)処理白色B16メラノーマ細胞(以下「Glc-B-16」)のGlc洗浄除去後の色素(メラニン)回復過程に添加することにより、メラニン産生抑制効果を目視で確認することができる。Glcは糖合成阻害剤であるため、Glc-B-16ではチロシナーゼ(TYR)の糖鎖が付加されずTYRのメラノソームへの転送が阻害されることによりメラニン産生が停止する。その後糖合成阻害を解除することによりメラニン合成がシンクロナイズ状態で一斉に開始され、本来の黒色B16メラノーマ細胞が生じる。つまり、この系を解析することにより遺伝子レベルからメラノソームまでの

メラニン合成の一連の流れを見ることができ。図1は、この系を用いてGSHのメラニン抑制効果を確認したものである。

芋川らは、同色素回復系試験におけるGSH処理白色B16メラノーマ細胞(以下「GSH-B-16」)において、メラノソーム内の主要なTYRアイソザイムのT3(膜結合型)が完全に消失していること、電子顕微鏡Dopa染色によりゴルジ体トランス領域及び被膜小胞ではTYR陽性を示しているが、メラノソームでは示していないこと、糖合成阻害を引き起こしていないことを確認している。つまり、GSHによるメラニン産生抑制効果は、糖合成阻害に起因しないTYRのメラノソームへの転送阻害によるものであると推察されている。しかしながら、メラニン合成には多々のタンパク質が関与しており、GSH-B-16におけるTyrosinase related protein-1(TRP-1)、Tyrosinase related protein-2(TRP-2)、Pmel17、Rab27A等のメラノソーム関連タンパク質の解析はなされていない。本研究はGSHによるメラニン産生抑制メカニズムをさらに詳しく解明する目的で、GSH-B-16内のメラノソーム関連

タンパク質の細胞内分布をTYR酵素活性測定、Western Blot法、共焦点レーザー顕微鏡観察により解析した。

### チロシナーゼの細胞内分布

図2にメラノソームリッチ分画(melanosome-rich large granule fraction: LGF)におけるTYR酵素活性測定結果を示した。Glc-B-16(図2②)では、Glc処理前の黒色B16メラノーマ細胞(図2①)と比較してTYR酵素活性の減少がみられており、色素回復後の黒色B16メラノーマ細胞(図2③)、以下「Control」ではTYR酵素活性の回復がみられた。一方で、GSH-B-16(図2④)ではControlと同様のTYR酵素活性の回復はみられなかった。また、TYRタンパク量においては、LGFではTYR酵素活性と同様の挙動を示していたが、細胞内全体でみるとGSH-B-16はControlと同様のタンパク発現量を示していた。これらは先に述べた芋川らの報告結果と一致し、すなわちGSH-B-16においてTYRはメラノソームに転送されていないことを裏付けた。

### Pmel17の細胞内分布

では他のメラノソーム関連タンパク質はどうだろうか。

メラノソームの成熟にはStage I～Stage IVの4つの段階が存在し、Stage

IからStage IIの段階でメラノソーム構造蛋白質であるPmel17の特定の分解が生じることにより、メラノソーム内にユーマラニン(黒/茶)合成に専念させる足場として寄与する構造が形成される。

特定の分解が生じた後のPmel17(HMB45)のタンパク量は、細胞内全体でみるとGSH-B-16はControlと同程度のタンパク発現量を示した。HMB45はメラノソームに転送されたPmel17からの産物であることから、GSH-B-16においてPmel17はメラノソームに転送されていると考えられた。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いてTYRとHMB45の細胞内分布の観察を行ったところ、Controlでは両タンパクは同一部位に存在していたが、GSH-B-16では同一部位に存在していなかった(図3:TYRが緑色、HMB45が赤色を呈し、両タンパクが同一部位に存在する場合は黄色を呈する)。これは、GSH-B-16のメラノソームにHMB45は存在しているが、TYRが存在していないためだと考えられる。

### Rab27Aの細胞内分布

Rab27Aは、成熟メラノソーム(Stage IVメラノソーム、メラニン合成が完了したメラノソーム)の細胞膜側への輸送に必要な不可欠な低分子量Gタンパク質である。

GSH-B-16におけるRab27Aタンパク量は、細胞内全体及びLGFいずれにおいてもControlと同様の発現量を示した。ま

た、共焦点レーザー顕微鏡観察においても、ControlではTYRとRab27Aは同一部位に存在しているのに対し、GSH-B-16(前項よりTYRはGSH-B-16のメラノソームに存在していないと示唆された)では同一部位に存在していないことから、GSH-B-16においてRab27Aはメラノソームに存在していると考えられた。

### TRP-1、2の細胞内分布

TRP-1、2は、TYRと同様にメラニン合成、とくにユーマラニン(黒/茶)合成に必須な酵素である(TYRはユーマラニン(黒/茶)及びフェオメラニン(赤/黄)の両メラニン合成に関わっている)。

Glc-B-16では、Glc処理前の黒色B16メラノーマ細胞と比べて、LGFにおけるTRP-1、2タンパク発現量の減少がみられたことから、TYRと同様にTRP-1、2が糖タンパク質であるためメラノソームに両タンパクが転送されていないと考えられた。色素回復後のControlではTRP-1、2両タンパクの回復がみられており、GSH-B-16においてもControlと同様に両タンパクの回復がみられていた。また、細胞内全体においても、GSH-B-16はControlと比較してTRP-1、2タンパク発現量に大きな変動はみられていなかった。共焦点レーザー顕微鏡観察においても、GSH-B-16はControlと同様にTRP-1、2とRab27A(前項よりRab27AはGSH-B-16のメラノソームに存在していると示唆され

た)が同一部位に存在していることから、GSH-B-16においてTRP-1、2はメラノソームに転送されていると考えられた。

### まとめ

本研究は、GSHによるメラニン産生抑制メカニズムを“メラノソーム関連タンパク質のメラノソームへの転送”、つまり“メラノソーム関連タンパク質がメラノソームに存在しているか否か”に関して重点を置いて解析を試みた。その結果、GSH-B-16のメラノソームにはTYRのみが存在しておらず、TRP-1、2、Pmel17、Rab27Aは存在していた。つまり、GSHによるメラニン産生抑制効果はTYRのメラノソームへの転送抑制による可能性が高く、GSH-B-16は眼皮膚白皮症II型のモデルとなりうることを示唆された。

今回解析を試みたタンパク質以外にもメラノソーム関連タンパク質は多々存在しており、おそらく未だに発見されていないメラノソーム関連タンパク質も存在するであろう。残念ながら今回の解析はそこまで至らなかったが、我々は今回の研究成果を通じて“メラノソーム関連タンパク質の転送抑制”という新たな美白剤の作用機序の一端を提供できたと自負している。我々は、引き続き本研究をさらに深く追求していくことはもちろんのこと、新たな美白剤の作用機序の探索を行っていくとともに、今後のさらなる美白剤の発展を切に願っている。

#### [REFERENCES]

- Imokawa, et al. Cancer Res. 42,1994-2002 (1982)
- Imokawa. J Invest Dermatol. 93,100-107 (1989)

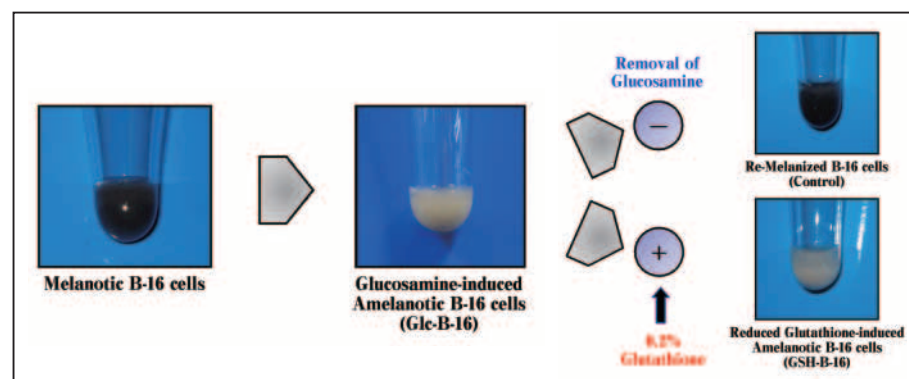


図1:還元型グルタチオンによる色素(メラニン)回復抑制効果

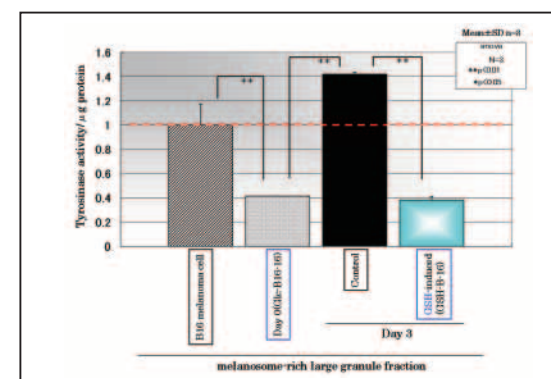


図2:GSH処理白色B16メラノーマ細胞のメラノソームリッチ分画(LGF)におけるTyrosinase酵素活性測定結果

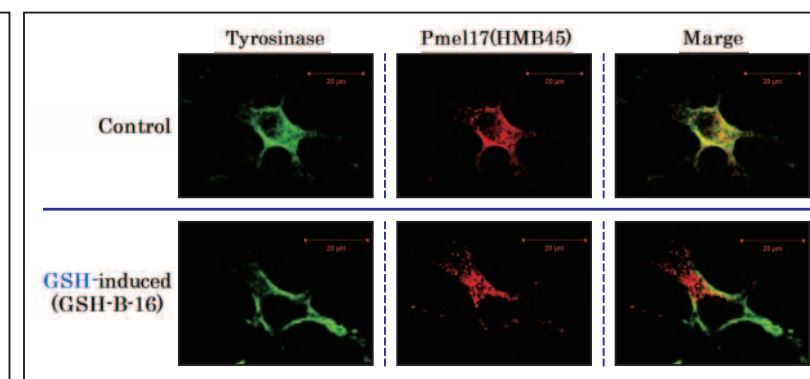


図3:GSH処理白色B16メラノーマ細胞におけるTyrosinase及びHMB45の細胞内分布(共焦点レーザー顕微鏡画像)