

革新的なシミ予防・治療法の開発

名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学

飯田 真智子

Hyperpigmentation (e.g., melasma, freckles, senile pigment freckles, and post-inflammatory pigmentation) is a common skin disorder that progress with exposure to sunlight and is generally intractable. Hydroquinone, tranexamic acid, corticosteroids and kojic acid are well-established agents for treating hyperpigmentation. However, problems of limited efficacy, recurrence and side effects such as hypopigmentation remain. Model mice would be important for the development of effective drugs. However, unlike human skin, the amount of melanin and the number of melanocytes are very limited in the epidermis of wild-type haired mice and hairless mice. Therefore, model mice having pigmented skin would be a useful tool for studying the mechanisms of hyperpigmentation and for developing effective drugs. Recently, an original mouse with pigmented skin was developed in our laboratory. In this study, we examined whether hyperpigmentation is induced by UVB radiation in the skin from our original mouse.

1. 緒言

一般的にシミと呼ばれる肝斑・雀卵斑・老人性色素斑・炎症後色素沈着等は、難治性の色素沈着症(疾患)であると同時に、美容の観点から心理的負担も大きい¹⁾。治療法としては、トラネキサム酸、ステロイド等の薬剤を組み合わせる方法、あるいは、narrow-band UVBを用いた治療が一般的である²⁾。一方、色素沈着等の副作用や再発の問題、あるいは、長い治療期間を要する等の問題がある¹⁾。より画期的な予防・治療法の開発には、ヒトあるいはヒト類似の疾患動物モデルを用いた色素沈着症の病態解明、および、その科学的エビデンスに基づいた動物代替法による薬剤評価システムの確立が重要である。

野生型の有毛マウス皮膚では、メラノサイトおよびメラニン毛根内に存在し、表皮にはほとんど存在しない³⁾。一方、無毛のヘアレスマウスの表皮には、メラニン・メラノサイトが分布する⁴⁾。しかしながら、その量・数は僅かであり、肉眼的に皮膚メラニンの変化を観察・評価することは難しい。従って、紫外線等による色素沈着の再現、機序解明、予防・治療剤の評価を行うには感度が十分とは言えない。

近年、当研究室において、肉眼的に皮膚メラニンを観察可能な無毛でかつ有色皮膚を持つマウス(Hairless mice with hyper-pigmented skin; HL-HPSマウス)が開発された。この皮膚メラニン保有マウスを用いれば、より鋭敏に

色素沈着を再現することが可能になるのではないかと着想した。もし、ヒト類似の色素沈着症が再現されれば、その分子基盤に基づいた薬剤選別のための動物代替法開発への発展も可能である。本研究では、まず、本モデルマウスがヒト色素沈着症のモデルとしての有効性を検証する第一歩として、本モデルマウスに紫外線を照射し、色素沈着症が高感度に再現可能かどうかを検討した。

2. 方法

2.1. マウス

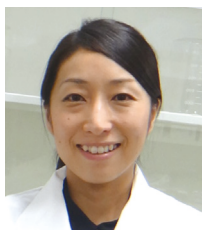
野生型 Hairless マウス(HL-マウス)⁵⁾、および、オリジナルに開発した皮膚にメラニンを保有するオリジナルマウス(Hairless mice with hyper-pigmented skin; HL-HPSマウス)の5-10週齢の雄マウスを用いた。動物実験は、名古屋大学動物実験委員会における厳正な審査を経て行った(承認番号: no. 29031)。

2.2. 皮膚色の測定

皮膚の黒さは、色彩色差計(CR-400; Konica Minolta, Inc.)を用いて非侵襲的に測定した。皮膚の明るさの指標であるL*にて評価した⁵⁾。L*値が低いほど、皮膚が黒いことを示し、L*値が高いほど、肌が明るい(肌が白い)ことを示す。L*値は、当該皮膚領域をランダムに3回測定し、その平均値を使用した。

2.3. 組織学的解析

サンプリングした皮膚は、10%中性緩衝ホルマリン(v/v)にて4℃で一晩固定し、パラフィン包埋を行った。パラフィン切片(4μm)を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。フォンタナー・マッソン(FM)染色は、同様に脱パラフィンを行った後、アンモニア銀液(40592; Muto Pure Chemicals Co., Ltd.)に浸漬(暗所1



Development of model mice for skin hyperpigmentation

Machiko Iida

Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine

晩)、その後、0.25% チオ硫酸ナトリウム水溶液(7772-98-7; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) に浸漬した(室温1分)。マウントクイック(DM-01; Daido Sangyo Co. Ltd)にて封入した後、フォンタナマッソン染色によって検出した表皮メラニン密度は、画像解析ソフト WinROOF (Mitani cooperation) により数値化した。WinROOFに取り込んだ画像について、フォンタナマッソンで染色されたメラニン顆粒だけが選択されるようカットオフ値(2値化)を設定し、同じ試験内の評価はすべて同じカットオフ値にて評価した。

2. 4. 紫外線照射

紫外線照射ランプは、FL20S.E-30/DMR; spectral irradiance, 290-330 nm; peak wave, 305 nm; Toshiba Medical Supply Co. Ltd.) を用いた⁵⁾。麻酔下にて紫外線照射を行った。また紫外線照射領域以外の皮膚はアルミ箔で覆った。

3. 結果

3. 1. オリジナルモデルマウス(HL-HPSマウス)の皮膚メラニン

HL-HPSマウスの皮膚色は、HLマウスの皮膚色と比べ肉眼的に明らかに黒く(図1)、皮膚色を色彩色差計で測定した結果、HL-HPSマウスのL*値の平均は62.0、HLマウスのL*の平均は54.0であった。また、両者は、統計学的に有意であった($p < 0.01$)。ヘマトキシリン・エオシン染色では、HLマウスでは、ほとんど表皮メラニンが観察されなかった。一方、HL-HPSマウスの表皮では、基底層・有棘層にメラニンが観察された。さらに、メラニンを強調するために、フォンタナマッソン染色を行ったところ、HL-マウスにおいても表皮基底層におけるメラニン分布が確認された。HL-HPSマウスの表皮では、さらに広範囲(基底層、有棘層、顆粒層、角化層)に顕著なメラニンの分布が確認された。HL-HPSマウスでは、特に表皮細胞のapical側に、メラニンキャップと呼ばれる形態をとってメラニンが分布することが確認された。WinROOF画像解析ソフトを用いて、フォンタナマッソン染色にて染色されたメラニン密度を解析したところ、HL-HPSマウスの表皮メラニン密度は、HL-マウスのそれと比べ約26倍高く、また統計学的にも有意であった($p < 0.01$)。

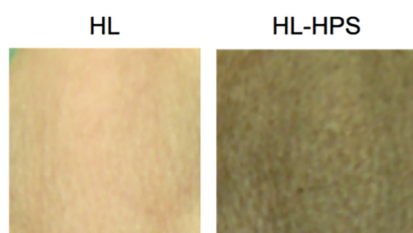


図1 オリジナルモデルマウスの皮膚メラニン
6週齢のHL-マウス(HL)およびHL-HPSマウス(HL-HPS)の背部皮膚の肉眼所見。

3. 2. 紫外線によるサンタンの誘導

HL-HRPマウスにおいて、紫外線による色素沈着症が高感度に再現可能かどうかを検証するため、HLマウスおよびHL-HRPマウスの右背部皮膚にUVBを単回照射した。左背部皮膚は、UVBが照射されないようアルミ箔で覆った。UVB照射から5日後、HLマウスのUVB照射部と非照射部の皮膚色には肉眼的な変化はみられなかった(図2)。一方、HL-HPSマウスのUVB照射部では、非照射部と比べ、肉眼的にも皮膚の黒さの亢進(サンタン)しているのが確認された(図2)。皮膚色を色彩色差計で測定した結果、HLマウスの皮膚では、非照射部の皮膚のL*値と比べ、照射部のL*が有意($p < 0.01$)に減少していた。次に、UVB照射後5日目の皮膚を採取し、パラフィン切片を作製し、フォンタナマッソン染色を行った。HLマウスでは、UVB照射部と非照射部でもメラニン産生の亢進はみられなかったのに対し、HL-HPSマウスでは、非照射部と比べ、照射部の基底層、有棘層、顆粒層、角化層において顕著なメラニン産生の亢進が観察された。また、画像解析ソフト(WinROOF)によりメラニン密度を定量したところ、HLマウスでは、非照射部と比べ、照射部における有意なメラニン密度の亢進はみられなかったが、HL-HPSマウスでは非照射部と比べ、UVB照射部において有意($p < 0.01$)なメラニン密度の増加が確認された。

3. 3. UVB照射によるサンタンの回復

HL-HPSマウスに生じたサンタンの経日変化をL*値により評価した。UVB照射部のL*値は、UVB照射から5日目で非照射部と比べて有意に低くなり、UVB照射から1週間後、L*値は最も低値を示した(最も黒くなった)。その後、皮膚のL*は緩やかに上昇し(明るさが回復し)、UVB照射から約1ヶ月で、UVB非照射部の皮膚と同等のL*まで回復した。UVB照射後5日目から40日目までのHL-HPSマウスの皮膚のL*値の変化は、非照射のL*値と比べ統計学的に有意($p < 0.05$)であった。一方、HLマウスでは、約1ヶ月

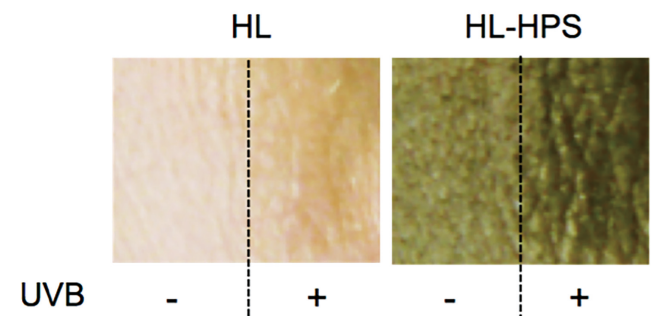


図2 UVB照射によるサンタンの発症

UVB照射から5日後のHL-マウス(HL)およびHL-HPSマウス(HL-HPS)の背部皮膚の肉眼所見。点線の左側はUVB非照射領域(UVB-)、右側はUVB照射領域(UVB+)。

月追跡しても顕著な皮膚色の変化は観察されず、有意なL*値の変化もみられなかった。

3. 4. 遅延性色素沈着の出現

興味深いことに、UVB単回照射から約4ヶ月後、HL-HPSマウスでは、一度は回復した色素沈着部において、再び色素沈着が発症した。一方、HLマウスの皮膚では、このような遅延性の色素沈着はみられなかった。フォントナマッソン染色により、メラニンを検出したところ、HL-HPSマウスの遅延性色素沈着領域では、基底層、有棘層、顆粒層、角化層にメラニンが観察され、主に基底層に顕著なメラニン沈着が確認された。また、WinROOF画像解析ソフトを用いたメラニン密度の定量解析からも、HL-HPSマウスで誘導された遅延性色素沈着領域のメラニン密度は、HLマウスと比べ有意(p<0.01)に亢進していた。さらに、サンタンとは異なり、HL-HPSマウスの遅延性色素沈着は、生涯消失することはなかった。

4. 考 察

表皮に顕著なメラニンを保有するHL-HPSマウスに紫外線を単回照射することで、一時的なメラニン産生亢進(サンタン)、および、サンタン回復後に遅延性に発症する自然回復しない色素沈着症(シミ)を再現することに成功した。一方、HLマウスでは、サンタンも遅延性色素沈着症も発症しなかった。

一般に、ヒトでは、紫外線に曝露されると数時間後から翌日にかけてサンバーン(日光皮膚炎)が生じ、その数日後にサンタンと呼ばれるメラニン産生の亢進による皮膚の黒化がみられる。紫外線によって産生されたメラニンは、表皮細胞核apical側に分布し、メラニンキャップ(supranuclear melanin cap)と呼ばれる分布様式をとることが知られる⁶⁾。このsupranuclear melanin capは、核内DNAを紫外線から守るための防御システムと考えられている^{6,7)}。ヒト正常表皮のターンオーバーは、個人差や年齢の違いはあるものの、28-56日で完結すると報告されている^{8,9)}。紫外線によって一時的に産生されたメラニンも、このターンオーバーに伴い、早くて概ね1ヶ月で角質と共に体外へ排出され、サンタンが回復すると考えられている。本研究で用いたオリジナルモデルマウス、HL-HPSマウスでも、UVB照射から5-10日にかけて色素沈着が観察され、産生されたメラニンはsupranuclear melanin capの形態をとった。また、この色素沈着は紫外線照射から約40日をかけて徐々に回復した。HL-HPSマウスに誘導されたUVB照射による一時的な色素産生亢進(サンタン)は、少なくとも上記の点においてヒトと類似する。

一時的なメラニン産生の亢進(サンタン)は、自然回復可能であるのに対し、肝斑等の色素沈着症(シミ)は、通

常、そのままでは回復が困難である¹⁾。また、その発症は、サンタンと比べると、紫外線等の曝露から比較的長い時間を経て発症する¹⁰⁾。肝斑(シミ)等の色素異常症の病理学的解析では、メラニン沈着は表皮層全体で見られるものの、特に表皮基底細胞において顕著であることが報告されている²⁾。HL-HPSマウスで観察された遅延性色素沈着も、最初のUVB照射から16週間後に発症した。また、自然回復がみられず、メラニンの表皮基底細胞への顕著な蓄積が観察された。以上の点において、HL-HPSマウスに発症したUVB誘発性の遅延性色素沈着は、ヒトの肝斑等の色素沈着症と類似している。

さらに、特筆すべきことは、本モデルマウスでは、僅か1回のUVB照射によって遅延性色素沈着を生じたことである。さらに、遅延性色素沈着を認めるまでに要した時間は、16週であった。過去に、本研究においてコントロールとして使用したHL-マウスに紫外線を1週間に3回、4週間にわたって連続照射することにより、28週後に遅延性の色素沈着が発症することが報告されている¹¹⁾。このHL-マウスを用いた研究では、野生型マウスで遅延性色素沈着の誘導している点で優れており、このマウスでもヒト類似の色素沈着が誘導されている¹¹⁾。一方、我々のモデルマウスでは、遺伝子改変マウスを用いることで、1回の紫外線照射によりヒトと類似した色素沈着を短時間で再現できるため、より鋭敏な色素沈着のモデルマウスとして有用である。

5. 総 括

当研究室にて開発された有色皮膚を持つオリジナルモデルマウス(HL-HPSマウス)において、ヒト類似の紫外線誘発性サンタン、および、遅延性色素沈着が鋭敏に再現された。肝斑、日光黒子等の色素沈着(シミ)は、紫外線によって増悪することが知られる。色素沈着症は難治性疾患であり、革新的な治療薬の開発が求められる。一方、美容的にも悩まれる患者さんも多い。化粧品の開発に実験動物を用いることは禁忌であり、今後、本モデルマウスに発症した色素沈着症の病態解明を進め、その分子基盤をもとにした鋭敏な動物代替法による薬剤選別法の開発が重要である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なるご援助を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Torok HM. A comprehensive review of the long-term and short-term treatment of melasma with a triple combination cream. *Am. J. Clin. Dermatol.* 7,

- 223-230, 2006.
- 2) Sehgal VN, Verma P, Srivastava G, Aggarwal AK, Verma S. Melasma: treatment strategy. *J. Cosmet. Laser Ther.* 13, 265-279, 2011.
 - 3) Yoshida H, Kunisada T, Grimm T, Nishimura EK, Nishioka E, Nishikawa SI. Melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 6, 1-5, 2001.
 - 4) Yajima I, Kumasaka MY, Iida M, Oshino R, Tanihata H, Al Hossain A, Ohgami N, Kato M. Arsenic-mediated hyperpigmentation in skin via NF-kappa B/endothelin-1 signaling in an originally developed hairless mouse model. *Arch Toxicol.* 91, 3507-3516, 2017.
 - 5) Kato M, Iida M, Goto Y, Kondo T, Yajima I. Sunlight exposure-mediated DNA damage in young adults. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 20,1622-1628, 2011.
 - 6) Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 1493-1506, 2009.
 - 7) Kobayashi N, Nakagawa A, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, Ishigaki Y, Ohnishi T, Mori T. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 110, 806-810, 1998.
 - 8) Halprin KM. Epidermal "turnover time"--a re-examination. *Br. J. Dermatol.* 86, 14-19, 1972.
 - 9) Weinstein GD, Van Scott EJ. Autoradiographic analysis of turnover times of normal and psoriatic epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 45, 257-262, 1965.
 - 10) Jadotte YT, Schwartz RA. Melasma: insights and perspectives. *Acta. Dermatovenerol. Croat.* 18, 124-129, 2010.
 - 11) Naganuma M, Yagi E, Fukuda M. Delayed induction of pigmented spots on UVB-irradiated hairless mice. *J Dermatol Sci.* 25, 29-35, 2001.