

論文内容要旨

論文題目

フェンホルミンは 7-デヒドロコレステロールレダクターゼの機能阻害を介しコレステロール生合成を抑制することで皮膚黒化を誘導する

指導（紹介）教授： 鈴木 民夫
氏 名： 高野 圭

【内容要旨】（1，200字以内）

【背景・目的】

表皮に存在するメラニンがヒトの皮膚色素沈着を制御する重要な構成成分であることが知られている。本研究では、抗糖尿病治療薬として広く用いられるメトホルミンの高いメラニン合成抑制効果に関する過去の報告に着目し、メトホルミンと同じくピグアニド骨格を有するフェンホルミンの皮膚色制御活性を評価したところ、予想に反し、顕著な皮膚黒化作用を示したことに端を発し、フェンホルミンをバイオプローブとして活用したケミカルジェネティクス的手法により、その詳細な作用機構を明らかにすることを目指した。

【方法】

各化合物の皮膚色制御活性は、ヒト皮膚組織の器官培養系における皮膚色変化を観察した他、フォンタナ・マッソン染色による表皮組織内のメラニン沈着の可視化、ならびに、ウェスタンブロット法によるメラノソームの構造タンパク質である PMEL17 の発現解析により評価した。フェンホルミンが作用する細胞を特定するにあたり、メラノサイトにおけるメラニン合成系に対する効果をドーパオキシダーゼ活性、メラニン合成関連タンパク質であるチロシナーゼ及び TRP1 の発現量、また、細胞内メラニン量を指標として解析した。次に、ケラチノサイトにおけるメラニン分解系に対する効果をメラノーマ細胞株から単離したメラノソーム画分を取り込ませた後の PMEL17 の発現（代謝）を指標として解析した。続いて、フェンホルミンの標的タンパク質を同定するため、ケラチノサイト由来のタンパク質抽出液を対象とし、フェンホルミン固定化ビーズを用いたケミカルプルダウンアッセイを実施した。さらに、ケラチノサイトにおけるオートファジー活性に及ぼす影響をオートファジーマーカーである LC3 及び p62 を指標とした細胞系でのフラックスアッセイ、ならびに、皮膚組織における蛍光免疫染色により解析した。加えて、一連の評価系を用いて、ベルベリンの皮膚色制御能を評価した。

【結果・考察】

フェンホルミンはメラノサイトにおけるメラニン合成を促進せず、ケラチノサイトにおけるメラノソームの分解を抑制することが明らかとなった。また、その機序として、コレステロール生合成の最終段階を触媒する 7-デヒドロコレステロールレダクターゼの機能を阻害することによりコレステロール合成を抑制すること、ならびに、オートファジー活性を抑制することが明らかとなった。さらに、皮膚色素沈着制御に対するコレステロール生合成の関与を裏付けるように、生合成経路の律速酵素である HMG-CoA レダクターゼの阻害剤であるベルベリンにも一連の流れを抑制することによる皮膚黒化作用が新たに見出された。以上、本研究ではケラチノサイトにおけるコレステロール生合成が表皮のメラニン代謝に影響を及ぼすことを初めて明らかにすることができ、本知見は皮膚色素沈着の成り立ちに関する基礎的な理解を深めることに貢献するものであると考えられる。

(1,200字)

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：高野 圭

論文題目：フェンホルミンは7-デヒドロコレステロールレダクターゼの機能阻害を介し
コレステロール生合成を抑制することで皮膚黒化を誘導する

審査委員：主審査委員 藤井 順逸



副審査委員 太田 康之



副審査委員 後藤 薫



審査終了日：令和2年 8月12日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

皮膚色の違いは美容のみならず様々な形で社会生活に影響するため、多くの研究がなされている。皮膚色に大きな影響を与えるメラニンの量や質の調節には、合成や分解をはじめとする複雑な過程が関与し、生活環境や多様な薬剤の影響を受ける。糖尿病治療薬のメトホルミンにはメラニン合成を抑制する作用が報告されている。本研究では、メトホルミンと同様にビグアニド骨格を有するフェンホルミンがむしろ皮膚の黒化を促進することを見出したため、その標的となるタンパク質を同定し、メラニン量の制御に関わる機構を明らかにすることを目的とした。

メトホルミンにはメラニン合成の抑制作用があるが、類似化合物のフェンホルミンは器官培養したヒトの皮膚の黒化をむしろ促進した。フェンホルミンによる皮膚の黒化のしくみを理解するために、メラノサイトを用いて、メラニン合成の鍵を握るドーパオキシダーゼとチロシナーゼに与える影響を調べたが、活性の違いを認めなかった。そこでメラニンを含んだメラノソームを受容して皮膚の黒化に関わるケラチノサイトについて調べたところ、フェンホルミン処理によりメラノソームの蓄積が認められた。フェンホルミンを固定化したビーズを作製し、結合するタンパク質を検索した結果、コレステロール合成の最終段階を触媒する酵素 7-デヒドロコレステロール還元酵素 (DHCR7) とミトコンドリア膜で ADP/ATP 輸送を担う SLC25A5/SLC25A6 を同定した。DHCR7 については、プロット法によってもフェンホルミン固定化ビーズの結合を確認したので、以後は DHCR7 に着目して実験を進めた。フェンホルミンが DHCR7 を阻害することは報告されていたため、フェンホルミン処理したケラチノサイトではコレステロール含有量が低下することを確認した。メラノソームの分解は主にオートファジーによって進行するため、黒化した皮膚ではオートファジーが抑制されている可能性がある。そこで抗体を用いてオートファジーの指標で分解基質でもある LC3 と p62 を検出したところ、フェンホルミン処理により LC3-II と p62 は増加していた。また DHCR7 の阻害剤である AY9944 もオートファジーの進行を抑制した。したがってフェンホルミンと AY9944 は、オートファジーの抑制を介してケラチノサイトにメラノソームを蓄積させ、器官培養した皮膚を黒化させたと推察された。コレステロール合成量の低下が皮膚を黒化させることを確認するため、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の阻害剤であるベルベリンを投与したところ、同様に皮膚の黒化が認められた。以上の結果から、フェンホルミンがコレステロールの合成を抑制することによりケラチノサイトのオートファジー機能を低下させ、メラノソームを蓄積させて皮膚の黒化を進行させたと考えられる。

本研究で得られた結果は、フェンホルミンによる皮膚の黒化にコレステロール合成抑制に関わる可能性を示唆する新たな知見であり、博士（医学）の学位に値すると判断した。