

Melanocortin-1 수용체 길항제의 배양된 인간 멜라노사이트에 대한 효과

이상화^{***#} · 장윤희^{*} · 이설훈^{*} · 이증훈^{**}

*LG생활건강기술연구원, **충남대학교 의과대학 의학과 피부과학교실
(Received January 14, 2014; Revised January 23, 2014; Accepted January 24, 2014)

Effects of Potential Melanocortin-1 Receptor Antagonists on Cultured Normal Human Melanocytes

Sanghwa Lee^{***#}, Yun-Hee Chang^{*}, Seol-Hoon Lee^{*} and Jeung Hoon Lee^{**}

^{*}LG Household & Healthcare R&D Center, Daejeon 305-343, Korea

^{**}Department of Dermatology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 310-747, Korea

Abstract — We have developed 8 peptide derivatives as potential MC1R antagonists and their inhibitory effects on α -MSH induced cell growth in cultured normal human melanocytes (NHM) were investigated. From these experiments, the two most potent peptide derivatives, 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₆NH₂ (P 6) and 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₉NH₂ (P 7) were selected for further studies. In α -MSH depleted NHM cells, we have found that the treatment with 1 μ M of these two peptide derivatives, P 6 and P 7, inhibited the cell proliferation induced by the addition of 1 nM α -MSH by 70% and 72%, respectively. In NHM cells without previous α -MSH depletion, 1 μ M treatment in the presence of 10 nM α -MSH resulted in 70% (P 6) and 80% (P 7) decrease in cell growth and 64% (P 6) and 71% (P 7) reduction in melanin synthesis, respectively. The peptide derivatives P 6 and P 7 were proved to have no apparent cytotoxicity and inhibited the elevation of intracellular cAMP concentration triggered by α -MSH. In conclusion, our data suggest that the peptide derivatives reported in this study, 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₆NH₂ (P 6) and 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₉NH₂ (P 7) strongly antagonize α -MSH, inhibit cell proliferation and melanin synthesis, and lower the intracellular cAMP concentration, hence have a promising potential as a novel skin lightening agent.

Keywords □ melanocortin 1 receptor, melanogenesis, α -melanocyte stimulating hormone, cyclic adenosine mono phosphate, melanocyte

α -Melanocyte Stimulating Hormone(α -MSH)은 멜라닌 색소의 생성을 촉진하는 펩타이드 중의 하나이며 피부를 포함한 비 뇌하수체 조직에서도 발견 된다. 자외선에 노출되거나 pro-inflammatory cytokine에 노출되면 keratinocyte와 melanocyte 같은 상피세포들은 α -MSH를 합성하여 분비한다. α -MSH의 세포 분열촉진 능력과 멜라닌 생성촉진능력은 melanocortin 1 수용체(melanocortin 1 receptor, MC1R)에 의하여 매개되는데 이 수용체는 정상 및 malignant melanocyte에서 발현되며 α -MSH 수용체로 알려져 있다.^{1,2)} Proopiomelanocortin(POMC)은 31~

36 kDa의 단백질로서 효소의 작용으로 잘라져 MSH, adrenocorticotropin(ACTH), lipotrophin(β -LPH) 및 endorphin과 같은 여러 종류의 펩타이드를 생성한다.³⁾ POMC의 주요 생성위치는 뇌하수체이나 피부를 포함한 다른 부위에서 생성되고 processing 된다. α -MSH는 POMC 펩타이드 중에서 피부에서 발견된 첫 번째 펩타이드이지만⁴⁾ 그 이후로 표피에서 α -MSH 및 다른 종류의 POMC 펩타이드가 존재한다는 많은 보고가 있었다. Keratinocyte가 이러한 펩타이드들의 중요한 생산원이나⁵⁻⁸⁾ melanocyte와 Langerhans 세포에서도 발견되었다. 그러므로 피부는 POMC 펩타이드의 타깃일 뿐만 아니라 source라고도 할 수 있다. POMC 펩타이드는 피부에 다양한 효과를 가지고 있다. 예를 들면 α -MSH, ACTH와 β -LPH는 피지선을 자극한다고 알려져 있다. α -MSH와 ACTH는 다른 cytokine과 상호작용하여 면역 조절작용 및 항염작용을 한다는 것 또한 잘 알려져 있다. 그렇지만 MSH 펩타이드들은 melanocyte에 미치는 영향으로 가

#Corresponding Author

Sanghwa Lee
LG Household & Healthcare R&D Center, Daejeon 305-343, Korea
Tel.: 042-860-8718 Fax.: 042-863-2076
E-mail: shleek@lgcare.com

장 잘 알려져 있으며 많은 척추동물 종들에서 외피의 색을 조절하는 생리적인 호르몬으로 여겨지고 있다. 예를 들어 α -MSH는 양서류와 파충류에서 즉각적인 피부의 흑화를 유발하고 마우스에서는 모낭의 eumelanin 생성을 촉진시킨다. 사람 자원자들에게 많은 양의 α -MSH를 주사한 경우 피부 흑화가 유발되었으며^{9,10} 생리적인 농도에서 α -MSH는 각기 다른 피부 타입의 사람에게서 분리되어 배양된 사람의 정상 melanocyte의 멜라닌생성을 유발시키고 세포분열을 촉진시킨다.¹¹ 현재까지 다섯 개의 다른 melanocortin 수용체 subtype(MC1R-MC5R)이 클로닝 되어 분리된 순서대로 번호가 붙여졌으며 조직상에서의 분포 및 여러 종류의 melanotropic 펩타이드들에 대한 affinity가 다르다는 것이 알려졌다.^{1,2,12-14} Melanocortin 1 수용체(MC1R)는 7개의 transmembrane 영역을 가진 G protein coupled receptor의 하나로 α -MSH에 대한 높은 친화력으로 α -MSH 수용체로 알려져 있다. 또한 ACTH와 γ -MSH에도 반응한다. α -MSH의 작용은 MC1R의 활성화를 통해 이루어지며 그 결과 세포 내 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 농도가 증가하고 이어서 melanocyte의 수치상 돌기, tyrosinase 활성 및 멜라닌 생성이 증가하게 된다.¹⁵ 포유류의 피부가 자외선에 노출되면 멜라닌의 생합성이 증가하여 향후 발생될지 모르는 자외선에 의한 피해에 대한 보호역할을 하게 된다. 자외선에 대한 반응은 melanocyte 세포수의 증가, 멜라닌 합성의 증가 및 주변 keratinocyte로의 멜라닌 입자의 전달 증가를 포함한다.¹⁶ 자외선에 의해 유도되는 멜라닌 생성의 분자적인 기반이 MSH/MSH 수용체 시스템의 활성화라고 제안하는 많은 보고들이 있다.¹⁷⁻¹⁹

이러한 발견들을 모두 종합하면 α -MSH와 그 수용체인 MC1R은 정상시와 자외선에 의한 피부색소 생산 모두를 조절하는데 있어 중추적인 역할을 하는 것으로 보인다. 이와 같은 맥락에서 α -MSH/MC1R의 작용을 저해하거나 길항하려는 노력들은 새로운 피부 미백제를 개발하는데 있어 특별한 의미를 가지고 있다. 본 연구에서 우리는 펩타이드 유도체인 두 개의 MC1R 길항체인 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₆NH₂(P 6)와 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₉NH₂(P 7)를 개발하였으며 이들 물질은 배양된 사람의 정상 melanocyte에서 α -MSH에 의하여 유도된 세포증식과 멜라닌 생성을 강력하게 저해하였다. 이러한 저해효과는 α -MSH에 의하여 증가되는 세포 내 cAMP의 농도를 감소시켜주는 것임을 확인하였다.

재료 및 실험방법

MC1R 길항제

펩타이드 유도체들은 애니젠(한국 광주)사에서 합성하였다. 본 연구에서는 모두 8개의 펩타이드 유도체가 MC1R 길항제 후보로서 합성되었다(Fig. 1).

세포 배양

사람의 정상 melanocyte(Normal Human Melanocyte, NHM)는 MCDB 153 배지(sigma)에 0.5 μ g/ml hydrocortisone(Sigma), 5 μ g/ml bovine insulin(Sigma), 1 ng/ml human recombinant basic fibroblast growth factor(β FGF, Sigma), 10 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA, Sigma), 10 ng/ml α -MSH(Sigma), 1% heat inactivated FBS(Gibco), 1.176 g/l sodium bicarbonate 및 antibiotics(penicillin-streptomycin-fungizone, Gibco)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. V79-4 Chinese hamster lung fibroblast 세포는 DMEM(Gibco)에 10% FBS(Gibco)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

MC1R 길항제들의 α -MSH에 의하여 유도된 세포분열에 대한 효과

세포를 24-well plate에 well당 2×10⁴개의 농도로 접종하고 2일간 배양했다. 세포가 부착된 후 배지를 α -MSH가 없는 배지로 바꾸어 주고 2일간 더 배양하였다. 그 다음 세포들은 음성 대조군은 α -MSH가 없는 배지로, 양성 대조군은 1 nM α -MSH 함유 배지로 처리하였고 실험군은 1 nM α -MSH와 길항제 후보 peptide 유도체를 동시에 처리하였다. 모든 실험은 triplicate로 수행하였다. 세포의 성장을 평가하기 위하여 1 μ Ci의 ³H-methyl thymidine(Amersham, UK)을 각 well에 처리하였다. 처리 후 2일간 배양하였다. 배양 후 배지를 버리고 세포를 PBS로 rinse하였고 1 N NaOH 용액 0.5 ml를 가하여 세포를 용해시키고 60°C에서 30분간 incubation하였다. Cell lysate를 liquid scintillation counter vial로 옮기고 5 N HCl 0.1 ml를 가하여 중화시킨 후 radioactivity를 LS6500 scintillation system(Beckman, USA)을 이용하여 측정하였다.

MC1R 길항제들의 멜라닌 생성과 세포성장성에 대한 효과

세포를 24-well plate에 well당 2×10⁴개의 농도로 접종하고 2일간 배양했다. 세포가 부착된 후 배지를 새 배지(대조군) 또는 여러 농도의 펩타이드 유도체를 포함한 배지로 교환하였다. 2일간 배양 후 1 μ Ci의 ³H-methyl thymidine(Amersham, UK) 또는 0.2 μ Ci의 ¹⁴C-Tyrosine(Amersham, UK)을 각 triplicate culture well에 처리하였다. 여기서 thymidine은 세포의 성장을, tyrosine은 멜라닌 생성을 평가하기 위하여 사용하였다. 처리 후 2일간 배양 후 앞서 언급한 바와 같이 radioactivity를 측정하였다.

세포 내 cAMP의 농도에 미치는 영향

세포를 24-well plate에 well당 2×10⁴개의 농도로 접종하고 2일간 배양했다. 세포가 부착된 후 배지를 α -MSH가 없는 배지로 바꾸어 주고 2일간 더 배양하였다. 그 다음 세포들은 음성 대조군은 α -MSH가 없는 배지로, 양성 대조군은 1 nM α -MSH 함유

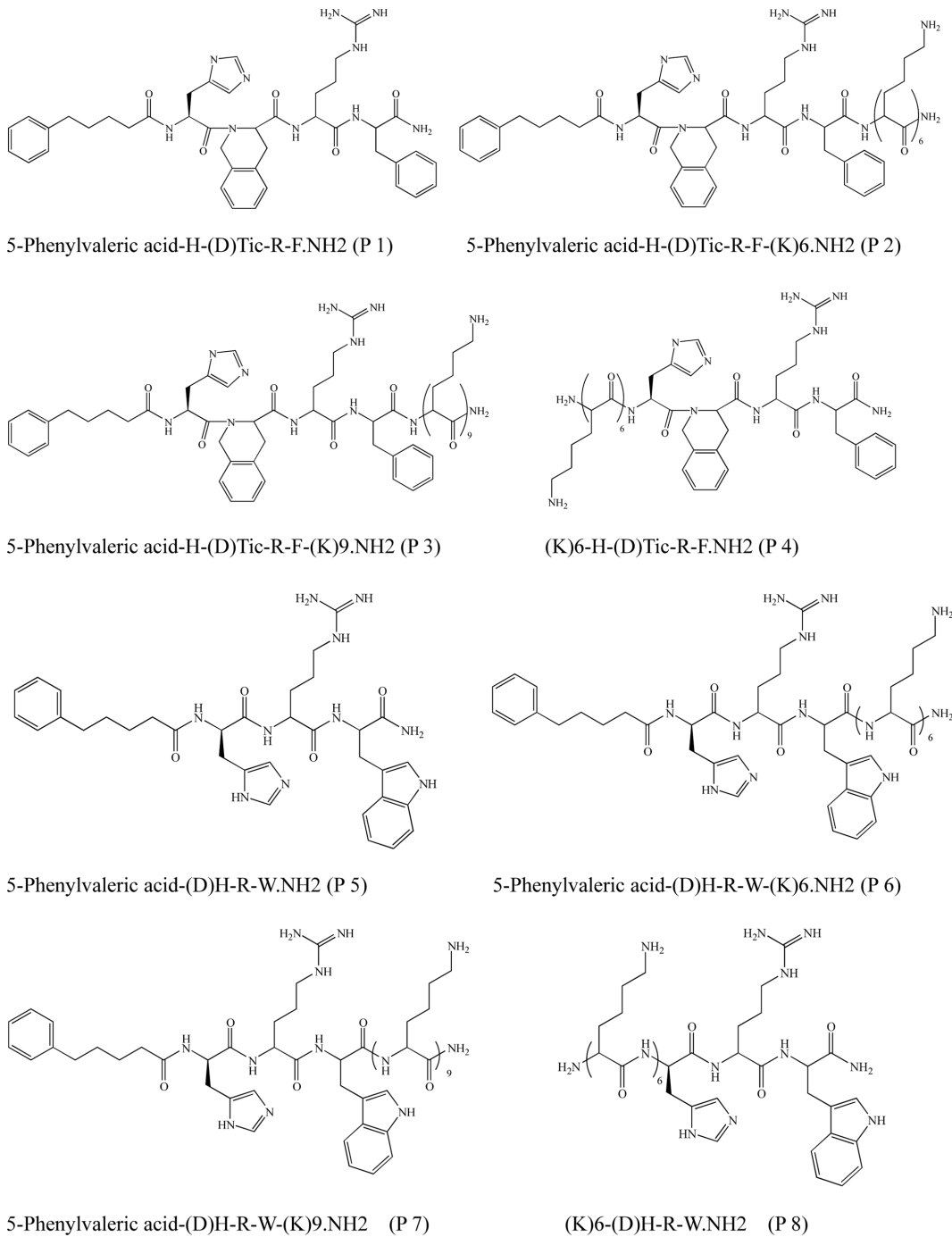


Fig. 1 – Structures of peptides used in this study.

배지로 처리하였고 실험군은 1 nM α -MSH와 길항제 후보 peptide 유도체를 동시에 처리하였다. 모든 실험은 triplicate로 수행하였다. 다른 set의 실험에서는 α -MSH의 depletion 과정 없이 같은 처리를 수행하였다. 1일간 배양한 후 well당 500 μ l의 cell lysis buffer를 가하여 세포를 용해시킨 후 BIOTRAK cAMP enzymeimmunoassay system(Amersham pharmacia biotech, UK)을 이용하여 제조자의 설명서에 따라 세포 내 cAMP의 농도

를 측정하였다.

세포독성

V79-4 세포를 1×10^4 개의 농도로 접종하고 1일간 배양했다. 배지를 새로운 serum-free DMEM으로 갈아주면서 다양한 농도의 MC1R 길항제를 처리해 주고 1일간 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 rinse한 후 0.5 mg/ml의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; Sigma) 용액 100 μ l를 각 well에 넣어주었다. 37°C에서 2시간 incubation 후 상등액을 제거하고 100 μ l의 isopropanol을 가하여 녹여준다. Microplate reader(Power Wave 340, Bio-Tek Instrument, Inc.)를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

실험결과

MC1R 길항제들의 α -MSH에 의하여 유도된 세포분열에 대한 효과

MC1R의 길항효능의 척도로서 α -MSH에 의하여 유도된 세포 증식에 대한 펩타이드 유도체들의 저해효과를 연구하였다. Fig 2(A와 B)에 펩타이드 유도체들이 5 μ M과 10 μ M을 처리했을 때 배양된 사람의 정상 melanocyte세포의 α -MSH 유발 세포 증식에 대한 효과를 나타내었다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 1 nM의 α -MSH를 처리하면 melanocyte의 증식은 90% 정도 증가하였으며 이러한 세포증식의 증가는 펩타이드 유도체 처리에 의하여 억제

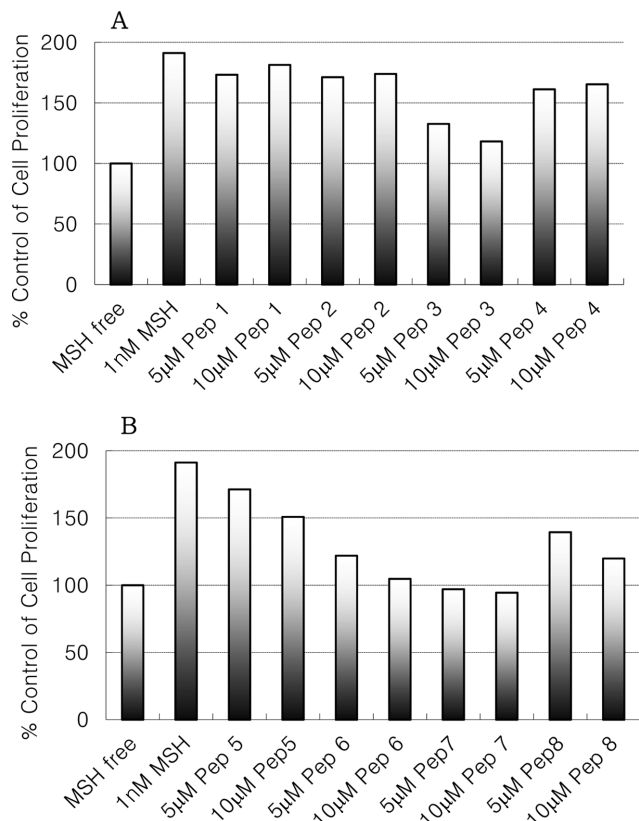


Fig. 2 – Effect of peptide derivatives on the α -MSH induced cell proliferation. Peptide derivatives were tested for their abilities to inhibit α -MSH induced cell proliferation at concentrations of 5 and 10 μ M. A and B shows the results of the derivatives of 5-phenylvaleric acid-(D)Tic-Arg-Phe backbone and 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp backbone, respectively.

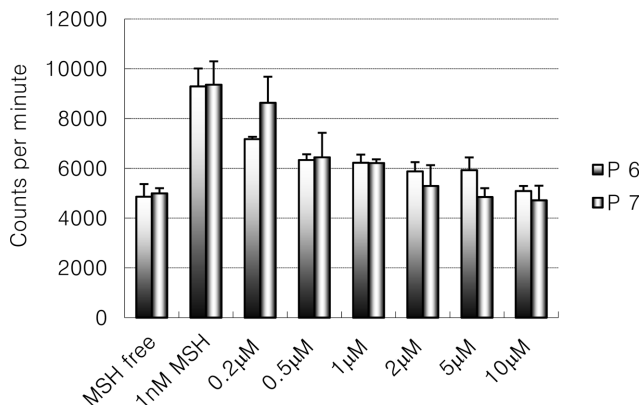


Fig. 3 – Effect of MC1R antagonists on the α -MSH induced cell proliferation. P 6 and P 7 were further tested for their abilities to inhibit α -MSH induced cell proliferation at broader concentration ranges.

되었다. P 1, P 2, P 4, 및 P 5의 처리에 의해서는 5~20% 정도의 약한 수준에서 중등도 수준의 저해를 나타내었다. 그러나 P 3, P 6, P 7, 및 P 8을 처리 했을 경우 매우 강한 α -MSH 유발 세포 증식의 저해 효과를 나타내었으며 저해 정도는 25~50% 수준이었는데 본 실험에서 48% 저해는 α -MSH의 세포증식효과를 완전히 억제한 수준이었다. 이들 펩타이드들 중에서 가장 강력한 효과를 보였던 P 6와 P 7를 선정하여 다음단계의 연구를 진행하였다. 실험 결과 P 6와 P 7은 농도 의존적으로 α -MSH를 길항하는 것으로 나타났다. Fig. 3에서 나타냈듯이 P 6의 경우 5 μ M 이상, P 7의 경우 10 μ M 이상 처리하면 α -MSH의 세포증식효과를 완전히 억제한 결과를 얻을 수 있었다.

MC1R 길항제들의 멜라닌 생성과 세포성장에 대한 효과

MC1R 길항제들의 배양된 사람의 정상 melanocyte에 대한 세포 성장과 멜라닌 생성에 미치는 영향을 α -MSH의 depletion과정 없이 수행하였다. 대조군 배지에는 10 nM의 α -MSH가 포함되었다. P 6와 P 7을 각각 0.2 μ M의 농도로 처리했을 경우 세포의 성장은 각각 14%와 5% 저해되었다(Fig. 4A). 이 경우 멜라닌 생성도 각각 16%와 9% 감소하였다(Fig. 4B). 하지만 P 6와 P 7을 각각 1 μ M의 농도로 처리했을 경우 세포의 성장과 멜라닌 합성 모두 극적인 감소를 나타내었다. 세포성장은 각각 70% 및 82% 억제되었으며(Fig. 4A) 멜라닌 생성도 각각 64%와 71% 감소하였다(Fig. 4B). 이러한 결과로부터 MC1R 길항제인 P 6와 P 7은 배양된 NHM에서 세포증식과 멜라닌 생성에 대하여 강력한 저해작용이 있음을 알 수 있었다.

세포독성

MC1R 길항제들에 의한 세포성장 억제효과가 일반적인 세포 독성에 의하여 유발된 것이 아니라는 것을 확인하기 위하여 P 6

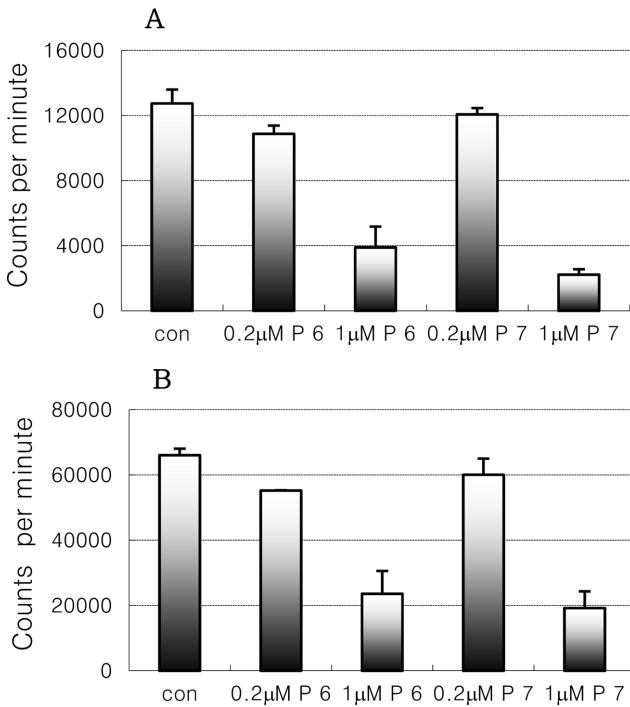


Fig. 4 – Effects of MC1R antagonists on the cell growth (A) and melanin synthesis (B) in cultured normal human melanocytes without α -MSH depletion. Normal human melanocyte cells were cultured in 24 well culture plate without α -MSH depletion, then treated with 0.2 and 1 μ M of P 6 and P 7. Sets of triplicate cultures were treated with 3 H-thymidine or 14 C-tyrosine then radioactivities were measured as described in materials and methods.

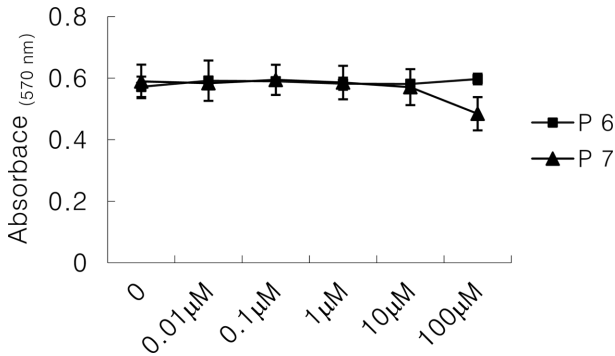


Fig. 5 – MTT assay for MC1R antagonists. Cytotoxicity was measured by MTT assay in V79-4 Chinese hamster lung fibroblast cells after 1d incubation in the presence of various concentrations of P 6 and P 7.

와 P7에 대하여 V79-4 Chinese hamster lung fibroblast 세포를 이용하여 세포독성실험인 MTT 실험을 수행하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 P 6와 P 7은 NHM cell 에 실험했던 농도의 100 배 높은 100 μ M 농도까지 뚜렷한 세포독성을 보이지 않았다. 이러한 데이터를 통해서 우리가 개발한 물질의 NHM에 대한 세포 증식 억제효과는 세포독성에 의하여 야기된 것이 아닌, α -MSH

의 작용을 길항하여 발생된 것임을 알 수 있다.

세포 내 cAMP의 농도에 미치는 영향

α -MSH는 그것의 mitogenic 효과와 멜라닌 생성촉진효과를 G-protein coupled receptor의 일종인 MC1R의 activation을 일으키고 이어서 세포 내 cAMP의 농도를 증가시킴으로 나타낸다고 알려져 있다.¹⁵⁾ 따라서 P 6와 P 7의 배양된 NHM에 대한 세포 내 cAMP 농도에 미치는 영향을 연구하였다. Fig. 6B에서 볼 수 있듯이 P 6와 P7 모두 0.1~0.5 μ M 농도로 처리하였을 경우 α -MSH에 의하여 발생하는 세포 내 cAMP의 증가를 저해하였다. 1 μ M 이상의 농도를 처리하였을 때에는 α -MSH에 의한 세포 내 cAMP의 증가를 완전히 저해하였으며 심지어 세포 내 cAMP의 완전한 depletion을 유발하였다(Fig. 6D).

고 찰

수중의 합성된 펩타이드 유도체들에 대하여 배양된 사람의 정상 melanocyte세포에서 α -MSH에 의하여 발생하는 세포분열 및 멜라닌 생성의 증가에 대한 저해 효과를 실험하였다. 실험에 사용된 펩타이드 유도체들은 melanocortin 4의 functional assay에 실험하기 위하여 만들어진 5-phenylvaleric acid-His-(D)Tic-Arg-Phe과 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp 의 2가지 backbone에 기초하여 만들어 졌다. 이것에 세포와 transdermal delivery를 위하여 3개 또는 6개의 lysine을 N- 또는 C- 말단에 붙여 유도체를 합성한 것이다. 예상했던 것처럼 1 nM의 α -MSH를 처리했을 때 NHM의 세포성장은 α -MSH 결핍시킨 대조군에 비하여 90% 정도 증가하였다. 이들 중 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₆NH₂(P 6)와 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₆NH₂(P 7)의 2가지 유도체가 가장 강력한 저해효과를 나타내었다. 저해효과는 농도 의존적인 형태였으며 P 7의 경우 5 μ M 이상, P 6의 경우 10 μ M 농도 이상 처리했을 경우 NHM cell에 대한 α -MSH의 mitogenic 효과를 완전히 억제하였으며 이러한 세포 성장 억제효과는 1 μ M 이상의 농도에서 saturation된 것과 같은 행태를 보여주었다. 우리는 이 두 가지의 펩타이드들이 α -MSH depletion을 시키지 않은 NHM cell에서 세포성장과 멜라닌의 신규 생성을 억제함을 밝혔다. 이들이 v79-4 Chinese hamster lung fibroblast 세포와 같은 다른 종류의 세포에서는 100 μ M 농도 처리시까지 세포독성을 보이지 않았기 때문에(Fig. 5) 펩타이드에 의한 세포성장 억제는 세포독성에 기인하지 않음을 알 수 있었다. 또한 P 6와 P 7은 α -MSH의 가장 전형적인 신호전달체계로 알려져 있는 세포내 cAMP의 농도를 감소시켜 줌으로써 세포성장과 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 알 수 있었다(Fig. 6). 이상의 결과를 모두 종합해 보면 비록 우리가 직접적으로 receptor binding assay는 수행하지는 않았지만 P 6와

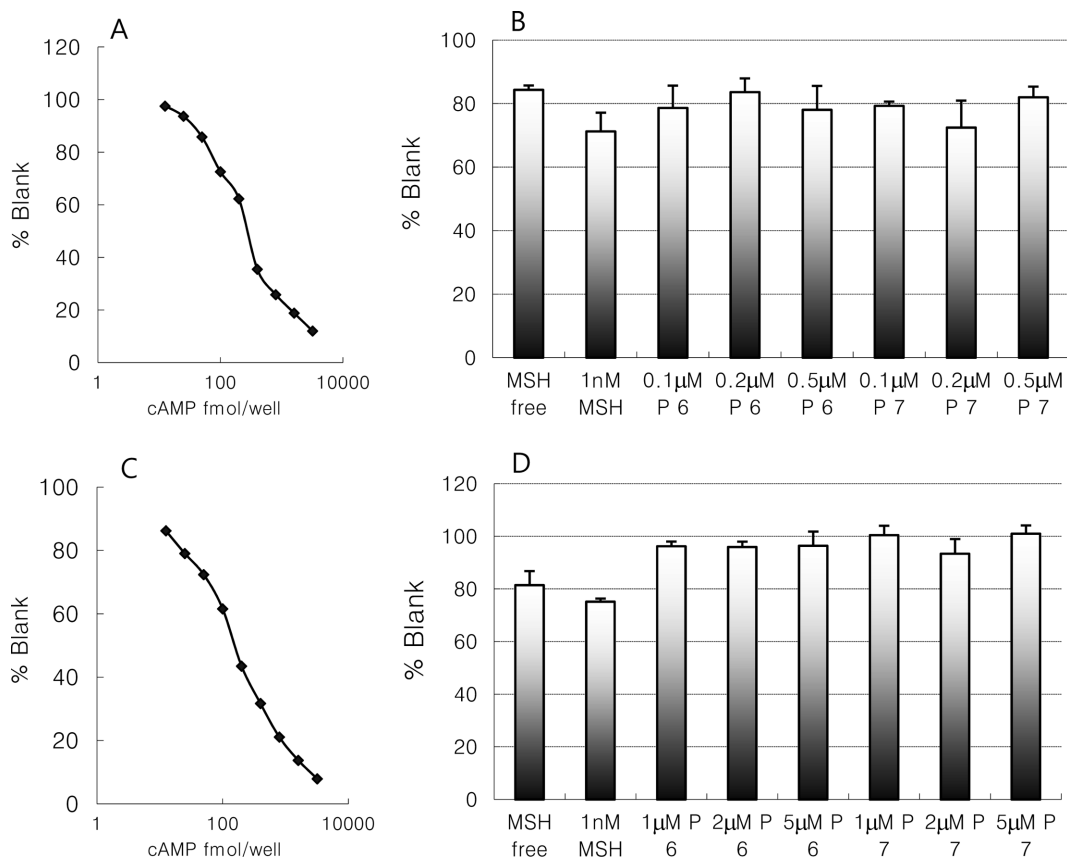


Fig. 6 – Effects of MC1R antagonists on the intracellular cAMP concentration. Normal human melanocyte cells were cultured, deprived of α -MSH, and treated with various concentrations of MC1R antagonists. Intracellular cAMP concentrations were measured as described in materials and methods. A and C are standard curves for B and D, respectively.

P 7은 melanocortin 1의 길항제로 작용함을 알 수 있었다. 앞서 언급하였지만 α -MSH는 사람에서 평상시 또는 자외선에 의한 피부의 멜라닌 생성과정에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다.^{9,10)} 이러한 이유로 α -MSH와 MC1R의 작용을 저해하거나 길항하는 것은 화장품학적이거나 피부 임상적으로 중요한 의미를 갖는다.²⁰⁾ 우리는 실험 결과에서 매우 흥미로운 사실을 알았는데 많은 경우 저해능력은 펩타이드에 덧붙여진 라이신의 개수에 비례한다는 점이었다(Fig. 1). 우리는 라이신이 많을수록 더욱 더 positive charge를 띠게 되고 이것이 α -MSH의 수용체인 MC1R이 존재하는 세포막의 negative charge와의 interaction을 쉽게 만들어 주기 때문이라고 생각된다.

결론적으로 우리는 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₆NH₂(P 6)와 5-phenylvaleric acid-(D)His-Arg-Trp-(Lys)₉NH₂(P 7)의 2가지 펩타이드 유도체가 배양된 사람의 정상 melanocyte 세포의 α -MSH에 의한 세포성장 및 멜라닌 생성을 효과적으로 저해한다는 것을 밝혔으며 이러한 세포 성장 저해효과가 세포독성에 의한 것이 아닌 melanocortin 1 receptor(MC1R)의 길항 작용에 의한 것이라는 것과 마지막으로 이러한 저해효과는 세포 내의 cAMP 농도를 낮추어 줌으로써 나타난다는 것 또한 밝혔다.

참고문헌

- 1) Mountjoy, K. G., Robbin, L. S., Mortrud, M. T. and Cone, R. D. : The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* **257**, 1248 (1992).
- 2) Chhajlani, V. and Wikberg, J. E. S. : Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* **309**, 417 (1992).
- 3) Eipper, B. A. and Mains, R. E. : Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr. Rev.* **1**, 1 (1980).
- 4) Thody, A. J., Ridley, K., Penny, R. J., Chalmers, R., Fisher, C. and Shuster, S. : MSH peptides are present in mammalian skin. *Peptides* **4**, 813 (1983).
- 5) Slominski, A., Paus, R. and Wortsman, J. : On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology. *Mol. Cell Endocrinol.* **93**, C1 (1993).
- 6) Schauer, E., Troatlinger, F., Kock, A., Schwartz, A. and Luger, T. A. : Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* **93**, 2258 (1994).

- 7) Chakraborty, A., Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J. and Pawelek, J. : Ultraviolet B and melanocyte stimulating hormone (MSH) stimulate mRNA production for alpha MSH receptors and proopiomelanocortin derived peptides in mouse melanoma cells and transformed keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 655 (1995).
- 8) Wintzen, M. and Gilchrist, B. A. : Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 673 (1996).
- 9) Lerner, A. B. and McGuire, J. S. : Effect of Alpha- and beta-melanocyte stimulating hormones on the skin colour of man. *Nature* **189**, 176 (1961).
- 10) Lerner, A. B. and McGuire, J. S. : Melanocyte-stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone - their relation to pigmentation. *N. Eng. J. Med.* **270**, 539 (1964).
- 11) Abdel-Malek, Z., Swope, V. B., Suzuki, I., Akcali, C., Harriger, M. D., Boyce, S. T., Urabe, K. and Hearing, V. J. : Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1780 (1995).
- 12) Gantz, I., Miwa, H., Konda, Y., Shimoto, Y., Tashiro, T., Waston, S. J., DelVaile, J. and Yamada, T. : Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 15174 (1993).
- 13) Roselli-Rehffuss, L., Mountjoy, K. G., Robbins, L. S., Mortrud, M. T., Low, M. J., Tatro, J. B., Entwistle, M. L., Simerly, R. B. and Cone, R. D. : Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8856 (1993).
- 14) Labbe, O., Desarnaud, F., Eggerickx, D., Vassart, G. and Parmentier, M. : Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* **33**, 4543 (1994).
- 15) Busca, R. and Ballotti, R. : Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**, 60 (2000).
- 16) Goldsmith, L. A. : *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*, Oxford University Press, New York (1991).
- 17) Pawelek, J. M., Chakraborty, A. K., Osber, M. P., Orlow, S. J., Min, K. K., Rosenzweig, K. E. and Bologna, J. L. : Molecular cascades in UV-induced melanogenesis: a central role for melanotropins. *Pigment Cell Res.* **5**, 348 (1992).
- 18) Suzuki, I., Cone, R. D., Im, S., Nordlund, J. and Abdel-Malek, Z. A. : Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* **137**, 1627 (1996).
- 19) Suzuki, I., Im, S., Tada, A., Scott, C., Akcali, C., Davis, M. B., Barsh, G., Hearing, V. and Abdel-Malek, Z. : Participation of the melanocortin-1 receptor in the UV control of pigmentation. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 29 (1999).
- 20) Park, S. Y., Jin, M. L., Kim, Y. H., Kim, Y. and Lee, S. J. : Aromatic-turmerone inhibits α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways. *Arch. Dermatol. Res.* **303**, 737 (2011).