

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19672

研究課題名(和文) 白斑症治療を目的とした幹細胞からの色素細胞誘導とメラニン産生・蓄積制御機構の検討

研究課題名(英文) Studies of the melanocytes induction from adipose-derived stem cells and the mechanisms of melanin production in melanocytes applied to the treatment of vitiligo

研究代表者

土山 健一郎 (Tsuchiyama, Kenichiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50711743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脂肪組織から単離したMuse細胞を色素細胞に分化誘導することに成功した。ヒト脂肪組織から脂肪幹細胞を単離し、この脂肪幹細胞からFACSによってSSEA-3陽性細胞を選別することにより脂肪組織由来Muse細胞を樹立した。脂肪組織由来Muse細胞を分化誘導培地で培養したところ、Muse細胞は色素細胞様の形態を持ち、色素細胞特異的な遺伝子、タンパク質の発現する細胞に分化した。この細胞は三次元培養皮膚内で、正常メラノサイトと同じ部位に位置し、メラニンを産生していることを確認した。また、Muse細胞の由来個体の年齢によって分化能に差があるかを検討したところ、分化能に差がないことを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we quantitate Muse cells in adipose-mesenchymal stem cells of human subcutaneous tissue obtained from 11 subjects of various ages, and measured efficacy of melanocytes induction from Adipose-MSC-derived Muse cells. There was a statistically significant negative correlation between the age of donors and the numbers of adipose-MSCs recovered per g fat as well as the percentage of SSEA3+ cells in the adipose-MSC populations, but isolated hASC-Muse cells showed pluripotency and growth curves equally regardless the age of donors. Adipose-Muse cells sequentially expressed melanocyte-related genes including KIT, MITF, TYRP1, PMEL, DCT, melanocortin 1 receptor (MC1R), and TYR at a comparable level to melanocytes during 6-week culture. These studies suggest that induction of melanocytes from adipose-Muse is a novel approach to obtain sufficient numbers of melanocytes for clinical application and in vitro study of melanocyte differentiation.

研究分野：間葉系幹細胞

キーワード：色素細胞 間葉系幹細胞 Muse細胞 脂肪組織由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

色素異常症としての白斑症について：白斑症は遺伝子異常に伴う先天性白斑症（白皮症）と、遺伝子異常が明らかでない後天性白斑症に分けられる。頻度が高く日常診療で治療に苦慮するのが後天性白斑症であり、尋常性白斑、Sutton 後天性遠心性白斑、老人性白斑がこれに含まれる。後天性白斑の発症機序の詳細は解明されていないが、色素細胞や関連分子にたいする自己免疫異常や限局性自立神経障害もしくは加齢による色素細胞の機能障害が、発症機序として想定されている。尋常性白斑のうちの汎発型（非限局型）と黒子や黒色腫に伴う Sutton 後天性遠心性白斑皮膚は、自己免疫性疾患の様相を呈し、紫外線療法と共にステロイドなどの免疫抑制剤が治療に用いられる。一方、分節型尋常性白斑や老人性白斑では、紫外線療法やステロイドの効果は限定的であり、色素細胞の移植が必要とされることが多い。私は、東北大学病院皮膚科で白斑専門外来を担当しており、分節型尋常性白斑症例に対して、年間に 30 件ほどのミニ・パンチグラフトによる色素細胞移植を遂行している。経過が良好であれば、移植片から色素細胞が増殖・移動し、移植片周囲にも色素を供給するが、必ずしも効果は一定しない。広範囲な白斑に対する治療としては単純な移植だけでは不十分であり、色素細胞の増殖と色素産生能を増強させることができれば、分節型尋常性白斑に対して低侵襲かつ効率的に治療ができると常日頃に考えている。皮膚に存在する幹細胞 Muse 細胞について：Muse 細胞 (Multilineages-Differentiating Stress Enduring Cells)は、東北大学出澤真理教授らによって見いだされた間葉系組織由来のヒト多能性幹細胞であり、骨髄や真皮、脂肪組織内に存在している(Proc Natl Acad Sci USA.2010;107(19):8639-43)。Muse 細胞は、ES 細胞や iPS 細胞などの他の多能性幹細胞と異なり、ヒト成人の間葉系組織内に自然に存在している細胞であり、細胞樹立に際しての倫理的な問題がなく、遺伝子導入などの煩雑な操作をする必要もない。さらに、Muse 細胞は ES 細胞や iPS 細胞と異なり、腫瘍形成をしないという長所を持つため、同一個体から採取した場合の臨床応用への障壁が最も少ない多能性幹細胞と考えられる。Muse 細胞からは三胚葉（内、外、中胚葉）性の細胞を誘導しうる事が、確認されている。私たちの研究室では出澤教授らと共同で、市販の線維芽細胞から単離した Muse 細胞を色素細胞へ分化誘導することに成功している(J Invest dermatol, 2013.Epub ahead of print)。色素細胞への誘導刺激を与えられた Muse 細胞は、チロシナーゼや MITF などの色素細胞特異的な遺伝子や蛋白を発現し、さらに SCID マウスの背部皮膚内でメラニンを産生し、周囲の角化細胞へ分配していた。Muse 細胞を用いることで、(1)採取が比較的

容易な間葉系組織から、多数の色素細胞をえることができ、(2)発生段階とは異なる体性幹細胞からの色素細胞分化誘導過程を検討できる、(3)さらに、三次元皮膚培養法の併用により、皮膚や真皮内での色素細胞の遊走機構や表皮角化細胞との協調作用について検証できる、等の利点がある。

また、将来的には自己 Muse 細胞由来色素細胞の白斑部への移植治療の可能性が期待できる。

自然免疫と色素細胞について：色素細胞は、皮膚では主として表皮に存在する。皮膚は外界との接点となる人体最大の臓器であり、皮膚の細胞群、特に表皮角化細胞は、陸上の乾燥し温度変化の大きい外界環境から、体内の恒常性を保つためのバリア機能を担っている。外界からの刺激は自然免疫機構で感知され、表皮角化細胞ではその研究が推進されている。メラニン色素細胞は周囲の表皮角化細胞に色素を提供することで、紫外線に代表される電磁線から細胞核を保護しているが、表皮基底層に存在するメラニン色素細胞での自然免疫機構の作用はほとんど報告がない。予備実験で、私はツール様受容体(TLR)を介するシグナルが、メラニン合成もしくは分泌を誘導し、角化細胞へメラニン移譲を促進することを見いだした。本研究では、さらに角化細胞へのメラニン移行・蓄積機構を解析することで、効率的な色素誘導方法を検討する事を目的とする。この研究は、炎症後色素沈着等の色素過剰症の病態理解にも応用できると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、後天性白斑症の有効な治療法を検討することである。そのために、まず(1)真皮内や皮下脂肪組織内に存在する多能性幹細胞である Muse 細胞から色素細胞を誘導する方法を検討し、この Muse 細胞由来色素細胞と正常ヒト色素細胞を用いて、色素細胞の遊走に関わる因子の検討や、メラニンの産生、輸送、角化細胞への移行機構の検討を行う。(2)では三次元培養皮膚作成の技術を併用して、真皮内や表皮内での色素細胞の挙動を検討する。(3)のためには、色素細胞が外界に接する表皮に存在することから、外界の刺激を感知する自然免疫機構シグナルが、色素細胞内におけるメラニンの合成や輸送、色素細胞からケラチノサイトへのメラニン移行分配、そして角化細胞でのメラニン排出機構にどのように関与しているかなどを検討する。これらの検討で、皮膚色調制御機構を解析することを本研究期間の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究計画 1 : Muse 細胞からの色素細胞誘導方法の検討。概要；ヒト線維芽細胞およびヒト脂肪組織由来幹細胞から単離された Muse 細胞を色素細胞に誘導させる方法を検

討する。すでに私は、市販のヒト線維芽細胞由来の Muse 細胞から色素細胞を誘導する方法を報告している(J Invest Dermatol, 2013. Epub ahead of print)。今後は、より効率よく色素細胞を誘導させる方法を検討するとともに、ヒト脂肪組織由来の Muse 細胞でも同じように色素細胞の誘導が可能かどうかを検討する。機能的色素細胞の誘導確認には、色素細胞のマーカーの発現や、三次元培養皮膚内でのメラニン産生能(フォンタナ・マッソン染色)を調べる。

実行計画 1-A; Muse 細胞の同定・単離方法の検討(平成 27 年度): Muse 細胞の単離、同定培養方法は、東北大学出澤研究室にて確立されている方法を用い、その技術を習得する(Proc Natl Acad Sci USA, 2010;107(19):8639-43)。Muse 細胞の単離のために、二つの供給源を検討する。一つは実験室レベルで用いられる方法で、市販されている線維芽細胞から単離する方法で有り、安定供給と再現性の観点から有益な供給源である(Proc Natl Acad Sci USA, 2010;107(19):8639-43)。二つ目は生体からの単離方法の確立を目的としたもので、手術時の余剰皮膚(真皮や脂肪組織)からの単離である。採取する組織の種類・大きさと、そこから単離しうる Muse 細胞数の相関を検討することで、目的に応じた Muse 細胞の供給源を決定する示標とする。

□ 実行計画 1-B; Muse 細胞からの色素細胞誘導(平成 27 年度): 単離された Muse 細胞に、色素細胞の活性化因子とされる分子群を投与し、色素細胞を誘導しうるか検討する。特に、真皮や脂肪組織など由来の異なる Muse 細胞において、色素細胞の誘導効率や色素産生能などが異なるかを検討する。誘導刺激に使用する分子は、Wnt3A, デキサメサゾン、インスリン、トランスフェリン、リノレイン酸、アスコルビン酸、Stem cell factor、endothelin-3, cholera toxin, TPA, basic FGF、等である。これらを組み合わせて培地内に添加し、6 週間の培養を継続する。色素細胞誘導開始後一週毎に形態・色調変化、ドーパ反応、遺伝子の発現、蛋白質発現を確認し、色素細胞に特異的な変化の確認を行う。前述の参考図 1 のごとく、これらの因子の組み合わせにより、Muse 細胞からメラニンを産生する色素細胞を誘導できる確認しているが、最適化や安全性の確認が必要である。

□ 実行計画 1-C; Muse 細胞から誘導された色素細胞の機能評価(平成 27 年度以降): Muse 細胞由来色素細胞が、機能的にメラニンを産生し角化細胞へ移譲できることを確認するために、Muse 細胞由来色素細胞メラノサイトの培養液中のメラニン量の測定(OD400-450 nm の計測)し、Muse 細胞由来色素細胞と表皮角化細胞を共培養し、メラノソームの角化細胞への移譲を観察する。さらに、Muse 細胞由来色素細胞を混ぜた三次元培養皮膚を作成し、その三次元培養皮

膚内での遊走能や局在、また周囲角化細胞へのメラニンの移譲を確認し、生体での作用を確認するために、マウス皮膚に Muse 細胞由来色素細胞を移植し、メラニン移譲を確認する。の手技は培養液の混濁度でメラニン放出を確認する方法で、広く用いられている。

の手技では、メラノソームを抗 gp100 抗体で角化細胞の形状を抗ケラチン抗体で、細胞核を DAPI で染色することにより、MUSE 細胞由来色素細胞から表皮角化細胞へのメラノソーム移譲の有無を確認する。の手技では、線維芽細胞含有コラーゲン層の上に表皮細胞層を形成させて三次元培養皮膚を作る手法を応用する。表皮細胞対色素細胞を 5 対 1 の割合で混合することで、色素細胞を含んだ表皮細胞層を作成できる。正常色素細胞は三次元培養皮膚内で表皮-真皮境界部の基底層に分布するが、Muse 細胞由来色素細胞が同様の挙動、樹状突起の延長、メラニンの移譲を為し得るかを検討する。は、上記 - で安定した Muse 細胞由来色素細胞が得られた後に、マウスへ移植することで生体内での挙動を確認するために行う。マウスは白色の SCID マウスを用いることで、移植を容易にし、色素沈着を確認しやすいように工夫する。

研究計画 2: 自然免疫機構によるメラニン産生・分泌・角化細胞への移譲の制御機構の検討概要; 細菌要素による自然免疫機構活性化因子(TLRs 刺激因子)で、培養正常ヒト色素細胞を刺激し、メラニン産生関連遺伝子の発現、メラニン分泌能、角化細胞のメラニン取り込み能を検討する。先ず正常ヒト色素細胞を用いての検討を行い、皮膚における自然免疫機構が、色素沈着や脱失に如何に影響を与えるかを確認する。いずれ Muse 細胞由来色素細胞でのメラニン合成効率化への足がかりとする研究でもある。

□ 実行計画 2-A; 自然免疫シグナルによるメラニン合成能の検討(平成 27 年度): 培養正常ヒト色素細胞を TLRs 刺激因子(TLR1-9 リガンド)で刺激し、24・48 時間後のメラノソーム関連遺伝子の変動、蛋白質発現・局在、形態・色調変化、ドーパ反応をそれぞれ RT-PCR, ウェスタンブロット・免疫染色法、位相差顕微鏡、生化学検査で確認し、メラニン合成能を解析する。

□ 実行計画 2-B; 自然免疫シグナルによるメラニン分泌能の検討(平成 27 年度): 培養正常ヒト色素細胞を TLRs 刺激因子(TLR1-9 リガンド)で刺激し、24・48 時間後の培養液中へのメラニン/メラノソームの放出を測定(OD400-450 nm の計測)する。また、表皮角化細胞との共培養下で、角化細胞へのメラノソーム移譲を観察する。メラノソームを抗 gp100 抗体で、角化細胞の形状を抗ケラチン抗体で、細胞核を DAPI で染色することにより、メラノソームの移譲を免疫染色法で経時的に観察する。

□ 実行計画 2-C; メラノソーム移譲機構関連分子の検討(平成 27 年度以降):

実行計画 2-A と 2-B でメラノソーム移譲が確認された条件下での、膜輸送関連分子とファゴサイトーシス、糸状仮足（フィロポディア）関連分子の発現を検討する。主として Rab/Rho ファミリーを中心として検討し、東北大学福田光則教授の協力を得る (J. Cell Sci. 125, 1508-1518, 2012)。この計画は、先ず遺伝子発現の変化を検討し、優位に変動した遺伝子はその蛋白変動を確認すると共に、siRNA で遺伝子の活動を抑制した状態でメラノソームの移譲が起こるかを確認する。これらにより、自然免疫シグナル下でのメラノソーム輸送に關与する分子群を同定する。Muse 細胞に關連しては出澤真理教授（東北大学医学系研究科組織細胞学）の、メラノソーム膜輸送に關連しては福田光則教授（東北大学生命科学研究科膜輸送機構解析分野）の協力をえる予定である。研究の進捗がはかどる場合には、実行計画 1-D として Muse 細胞由来色素細胞の白斑部皮膚への移植の検討と実行計画 2-D として角化細胞内に輸送されたメラノソーム分解機構の解析を行う。

4. 研究成果

平成 27 年度は、ヒト脂肪組織から単離した Muse 細胞を色素細胞に文化誘導することに成功した。外科的手術の際に廃棄された余剰脂肪を 1 型コラゲナーゼで酵素処理することによって、脂肪組織に存在する脂肪幹細胞を単離した。この脂肪幹細胞を stage specific embryonic antigen 3 (SSEA-3) で染色し、FACS によって SSEA-3 陽性細胞を選別することにより脂肪組織由来 Muse 細胞を樹立した。脂肪組織由来 Muse 細胞を Wnt3, stem cell factor など 10 種類の試薬を含む誘導培地で 6 週間培養した結果、形態が色素細胞様になりヒト色素細胞とほぼ同じレベルの色素細胞特異的な遺伝子、タンパク質の発現をしていることが確認された。また、この 6 週間培養した細胞をメラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) を含んだ誘導培地でさらに 3 週間培養すると色調が黒色に変化した。誘導後の Muse 細胞は L-DOPA 反応に陽性であった。以上のことから、脂肪組織から単離された Muse 細胞から色素細胞が誘導できることが分かった。この脂肪組織由来 Muse 細胞から作成した色素細胞を混ぜた三次元培養皮膚を作成し、HE 染色や免疫組織化学法で検討したところ、Muse 細胞由来色素細胞はヒトメラノサイトと同様に基底層に位置しており、tyrosinase などの色素細胞特有の蛋白を発現していた。また、周囲の角化細胞を観察した結果、gp100 陽性所見を認めたため、Muse 細胞由来色素細胞から周囲のケラチノサイトにメラニンを渡していることを確認できた。以上のことから、脂肪組織由来 Muse 細胞から作成した色素細胞は、生体内でもヒトメラノサイトと同等の機能を持つことと考えられた。

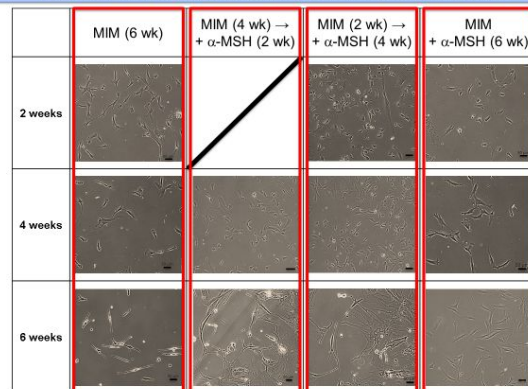
平成 28 年度は、分化誘導中の α -MSH の添加

タイミングや Muse 細胞の由来個体によって分化能が異なるかどうかを検討した。

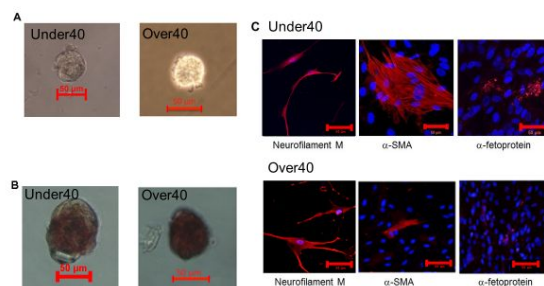
まず、 α -MSH を分化誘導の 0, 2, 4 週目に誘導培地に 10nM となるように添加し、色素細胞への分化誘導が促進されるかを検討した。その結果、 α -MSH の受容体である MC1R が発現する培養 4 週目に α -MSH を培地に添加することで、色素細胞関連遺伝子の発現とタンパク質発現の両方が増加し、色素細胞への分化が促された。一方で、培養 0 週目と 2 週目に α -MSH を添加すると色素細胞へは分化しなかった。以上のことから、分化誘導を開始してから 4 週目に α -MSH を誘導培地に添加することにより、色素細胞への分化を促進することができることがわかった。

また、Muse 細胞の由来個体による分化能の違いの検証では、40 歳以上 3 例、40 歳以下 3 例の 2 群に分けて、脂肪組織由来幹細胞から Muse 細胞を単離し、その多能性と分化能を検討した。両群とも単離した Muse 細胞は ALP 染色が陽性であり、外肺葉、中胚葉、内胚葉の細胞へと分化誘導することができた。さらに、これらの Muse 細胞を色素細胞へと分化誘導した結果、両群由来の Muse 細胞とも色素細胞へと分化誘導され、色素細胞特異的な遺伝子の発現が確認できた。以上より、年齢によらず Muse 細胞は多能性と分化能を持っており、また色素細胞への分化誘導が可能であることが明らかとなった。

Result ① Morphology of Muse cells cultured in MIM for 6 wks.



Result 2; 由来個体による分化能の差異



5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamauchi T, Yamasaki K, Tsuchiyama K, Koike S, Aiba S.

A quantitative analysis of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells in human adipose tissue and efficacy of melanocytes induction. J Dermatol Sci: DOI: 10.1016/j.jdermsci. 2017

Jun;86(3):198-205 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

土山 健一郎 (Tsuchiyama Kenichiro)

東北大学大学病院・助教

研究者番号：50711743