

令和元年6月18日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05367

研究課題名(和文)色素細胞幹細胞のニッチェ因子の解明

研究課題名(英文)Analysis of niche factors for melanocyte stem cells

研究代表者

國貞 隆弘(KUNISADA, Takahiro)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30205108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：X線照射後のケラチノサイトで発現が低下する遺伝子をDNAアレーとプロテオーム解析の結果から探索し、HMGB2遺伝子を色素細胞幹細胞(MSC)のニッチェ因子の候補遺伝子とした。HMGB2ノックアウトマウスは5GyのX線照射により、同量を照射した野生型マウスよりも白毛化が促進されること、培養ヒトケラチノサイトでHMGB2をノックダウンすると放射線照射後の細胞死が増加し、DNAダメージも蓄積すること、抗酸化作用が減弱することなどからHMGB2が毛包ケラチノサイトが発現するニッチェ因子としてMSCの維持に必要な遺伝子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

色素細胞幹細胞(MSC)のニッチェの実体を機能的に解明することで、色素細胞の分化制御が可能になり、白髪や白癩症の証拠に基づいた治療・予防が可能になる。さらに、我々が探索する分子は成体のケラチノサイトにおいて放射線により発現が明確に変化する分子であり、その機能を遺伝子破壊により確かめることで培養細胞による従来の放射線の評価実験では明らかにできなかった放射線の新しい生物効果を解明できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：HMGB2 gene has been identified as a novel MSC niche factor as a result of the following results. HMGB2 knockout mice did not show any increase in white hair compared to wild-type even when reared for a long time under normal rearing conditions, however, by 5 Gy X-ray irradiation, hair graying was significantly promoted in comparison with the irradiated controls. In addition, immunostaining of the epidermis of HMGB2 knockout mice after irradiation revealed the increase of H2X, a marker for DNA damage of keratinocytes. It was also confirmed that knockdown of HMGB2 in cultured human keratinocytes increased cell death after irradiation, accumulated DNA damage, and further attenuated the antioxidant activity measured by mitochondrial activity. These results suggest that HMGB2 plays an important antioxidant role in cells, which is important for maintenance of MSC under stress environment, and serve as a MSC niche factor of the follicular keratinocyte.

研究分野：発生生物学、幹細胞生物学、再生医学

キーワード：色素細胞幹細胞 毛包ケラチノサイト幹細胞 幹細胞ニッチェ プロテオーム

1.研究開始当初の背景

色素細胞幹細胞 (MSC) を含む組織幹細胞は生体組織の恒常性を維持するために厳密にその増殖が制御されており、その主役はメラノサイトを取り囲んでいる細胞により形成されるニッチェと呼ばれる環境である (1)。MSC のニッチェは同じく幹細胞であるケラチノサイト幹細胞であると予想され、個々のニッチェ因子も明らかにされつつある(2, 3)。ただ、ケラチノサイトから提供され MSC あるいはメラノサイトに作用する因子は数十も報告されており(4)、実際それらの多くが様々な程度で MSC のニッチェ因子として寄与していることが血液幹細胞のニッチェ研究からも予想される。本研究では、MSC ニッチェの全貌をシステムティックに明らかにするための戦略として、ニッチェ因子の候補を表現型に基づいて探索する。

2.研究の目的

皮膚由来の細胞を適切な条件で培養するとケラチノサイトをニッチェとして皮膚 MSC 由来の色素細胞のコロニーが形成されるが、マウスで白毛化が誘導される 5 Gy の X 線を照射した皮膚細胞の培養では、色素細胞のコロニーが形成されなくなる。さらに、X 線を照射した皮膚細胞は X 線を照射していない皮膚細胞の色素細胞コロニー形成を阻害することから、X 線照射された皮膚の表皮ケラチノサイトでニッチェ能力が失われていることを示された (7)。これらの実験に基づき、表皮ケラチノサイトで発現する MSC のニッチェ因子の探索を行うことを計画した。表皮ケラチノサイトは X 線照射でニッチェ能力を失う、つまりニッチェを構成する機能分子の発現が低下すると予想される。それらの候補分子は、マウス表皮ケラチノサイトに発現する mRNA あるいはタンパク分子を X 線照射前後で網羅的に比較することで同定可能であると考え、既に候補遺伝子のリストを得ている。本申請では、それらの MSC ニッチェ候補遺伝子を破壊したクローンマウスを樹立し、白毛化が促進される表現型を確認すること MSC でニッチェ因子であることを確定させる。

3.研究の方法 (CRISP-Cas9 によるノックアウトマウスの樹立、組織や細胞の免疫組織化学染色は標準的な方法であるため省略した)

(1) 放射線照射と表皮採取

C57BL/6 系統マウスは体毛抜去後、24 時間後に放射線照射 (50keV、20mA、5GyX 線) した。照射 24 時間後に背面皮膚を採取した (0Gy N=3、5Gy N=4)。皮膚は 60°C に温めた PBS に 30 秒浸して表皮と真皮を剥離した。PBS をできる限り除去し、表皮のみを -80°C で凍結保存した。

(2) タンパク質抽出・定量・サンプル調整

凍結表皮を融解後に MCL-1 (SIGMA-Aldrich 社) を 250 μ l 添加してペッスルでホモジナイズし、水中に静置した。30 分程度静置後、遠心 (15,000rpm、5min、4°C) して固形物を沈殿させ再度ホモジナイズすることを 3 回程度、固形物がなくなるまで繰り返した。遠心 (15,000rpm、15min、4°C) 後上清のみを採取し、2D Quant Kit (GE Healthcare 社) を用いてタンパク質定量を行った。2 次元電気泳動にて泳動するタンパク質量は 50 μ g を基本とした。精製後のタンパ

ク質に膨潤液;DeStreak Rehydration Solution140 μ l (GE Healthcare 社)、IPG Buffer3-10NL0.7 μ l (膨潤液の0.5%量) (GE Healthcare 社)を加え溶解した。

4.研究成果

(1) 白髪化に伴ってケラチノサイトで発現が低下する MSC ニッチ遺伝子の同定

X線照射後に表皮ケラチノサイトで発現が低下する遺伝子産物をプロテオーム解析により探索することは、申請者らによる共同研究で既に実行されており、いくつかの候補遺伝子を特定している。試験の結果、放射線照射によってマウス表皮中のHMGB2量が有意に多くなっていた (student t-test)。他にも黒髪維持に関連しそうなタンパク質は存在したが、HMGB2は①皮膚・毛髪での研究はされていない点、②老化で減少するタンパク質である点、③既知のHMGB2 KOが致死でない点、④放射線抵抗性のタンパク質である点から、HMGB2をKOしたマウスに放射線を照射した際、最も興味深い表現型が期待できると考えた。

(2) HMGB2はNHEKの放射線照射による細胞死を有意に抑制する

NHEK に siHMGB2 をトランスフェクションすることで HMGB2 の発現量 (タンパク質量を19.8%にまで減少させたところ、siHMGB2 は放射線による細胞死が促進されると共に (図2)、活性酸素量が増加し (図3)、その結果ミトコンドリアの傷害性が増加することで (図4) DNA 損傷をより多く受けていることがわかった (図5)。

(3) HMGB2KO マウスは放射線による白髪化を促進する

HMGB2 KO マウスに5Gyの放射線を照射した。照射1か月後の写真と回収した毛のL*値を図1a、bに示す。HMGB2 KO に放射線を照射することで白髪化が有意に促進されることが分かった。

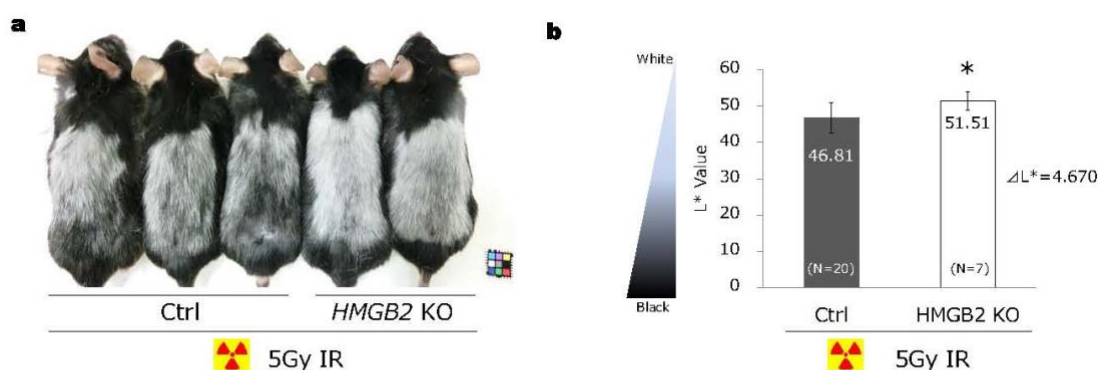


図7 HMGB2 KO の白髪化促進作用

(a) HMGB2 KO とその Littermate に5Gyの放射線を照射後、1か月後の写真。

(b) 放射線照射後のL*値。student t-testにより統計解析を行った(** $p < 0.001$)。

(4) HMGB2 KO マウスは放射線による毛包幹細胞のDNA損傷が有意に増加していた

HMGB2 KO マウスに5Gyの放射線を照射した際の毛包幹細胞のDNA損傷を検討した。試験の結果、HMGB2 KO に放射線を照射することで毛包幹細胞 (CD34 陽性細胞) のDNA損傷が

同配子 (Littermate) に比べて有意に多いことが分かった (図 2 a、b)。

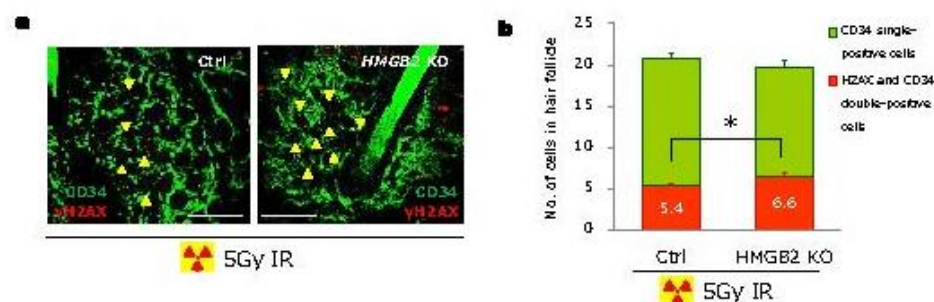


図2 HMGB2 KO の DNA 損傷促進作用

(a) *HMGB2* KO とその Littermate に 5Gy の放射線を照射6時間後のバルジ領域。緑; CD34, 赤; γ H2AX。

(b) 毛包幹細胞に占める DNA 損傷細胞数。student t-test により統計解析を行った(* $p < 0.05$)。

<引用文献>

- 1.Scadden Cell 157, 41-50, 2014. 2. Nishimura et al, Cell Stem Cell 6, 130-140, 2010. 3. Rabbani et al, Cell 145, 941-955, 2011. 4. Hirobe T, Pigment Cell Melanoma Res, 24, 462-478, 2011. 5. Joseph et al, Cell Stem Cell 13, 520-533, 2013. 6. Kunisada et al, Development 125, 2915, 1998. 7. Aoki et al, J Invest Dermatol 133, 2143-2151, 2013。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

1. Reduction in human hair graying by sterubin, an active flavonoid of *Eriodictyon angustifolium*. Taguchi N, Hata T, Kamiya E, Kobayashi A, Aoki H, Kunisada T. J Dermatol Sci. 2018 Dec;92(3):286-289. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.11.002. 査読あり
2. Melanoblasts as Multipotent Cells in Murine Skin. Motohashi T, Kunisada T. Methods Mol Biol. 2019;1879:257-266. doi: 10.1007/7651_2018_144. 査読あり
3. Direct Conversion of Mouse Embryonic Fibroblasts into Neural Crest Cells. Motohashi T, Kunisada T. Methods Mol Biol. 2019;1879:307-321. doi: 10.1007/7651_2018_145. 査読あり
4. Pigmentation of regenerated hairs after wounding. Yuriguchi M, Aoki H, Taguchi N, Kunisada T. J Dermatol Sci. 2016 Oct;84(1):80-87. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.07.004. 査読あり
5. Rhododenol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin. Abe Y, Okamura K, Kawaguchi M, Hozumi Y, Aoki H, Kunisada T, Ito S, Wakamatsu K, Matsunaga K, Suzuki T. J Dermatol Sci. 2016 Jan;81(1):35-43. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.10.011. 査読あり

〔学会発表〕 (計 20 件)

- 1 第 28 回日本色素細胞学会 (神戸) 白髪防止薬のスクリーニング方法とその成果 (ヒドロキシゲンクワニンの効果 口頭発表) 2018 年 田口暢彦、青木仁美、國貞隆弘
- 2 第 10 回国際毛髪科学会 (京都) High mobility group protein B2 (HMGB2) deficient mice develop increased ionizing radiation-induced hair graying by deteriorating DNA damage (国際学会 ポスター発表) 2017. Taguchi N, Aoki H, Kunisada T

3 第23回国際色素細胞学会(米国) Kit signaling seems to work redundantly in melanocytes
(招待講演) 2017. Kunisada T, Taguchi N, Aoki H

他17報

〔産業財産権〕

出願状況(計5件)いずれもホーユー株式会社と岐阜大学の共同発明

名称 毛包ケラチノサイト幹細胞のDNA損傷抑制剤

発明者 田口暢彦 國貞隆弘 青木仁美 百合口稔

権利者 ホーユー株式会社

種類 出願種別(通常)

番号 特開2015-193550

取得年 2018/06/26 拒絶査定

国内外の別 国内

他4件

6.研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:青木 仁美(AOKI, Hitomi) 所属研究機関名:岐阜大学 部局名:大学院医学系研究科 職名:講師 研究者番号(8桁):10550361

研究分担者氏名:原 明(HARA, Akira) 所属研究機関名:岐阜大学 部局名:大学院医学系研究科 職名:教授 研究者番号(8桁):10242728

研究分担者氏名:本橋 力(MOTOHASHI, Tsutomu) 所属研究機関名:岐阜大学 部局名:大学院医学系研究科 職名:講師 研究者番号(8桁):40334932

(2)研究協力者

研究協力者氏名:田口 暢彦 (TAGUCHI, Nobuhiko)