

令和元年9月4日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16319

研究課題名(和文) 尋常性白斑の治療への応用をモデルとしたMuse細胞再生医療応用可能性の検討

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脂肪組織に存在するSSEA-3陽性細胞数はドナーの年齢が高いほど低下する傾向があった。一方、ドナーの年齢によらずMuse細胞は、3胚葉の細胞へと分化誘導することができ、さらに、色素細胞へと分化誘導することができた。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わかった。

また、Muse細胞が色素細胞へと分化誘導する過程での遺伝子発現を調べた。Muse細胞は誘導初期に多能性マーカーを発現し、2週目から神経堤細胞マーカーを発現した。メラノブラストのマーカーは分化誘導後5週目から認め、成熟色素細胞のマーカーは中期から後期に発現を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの体内に自然に存在する多能性幹細胞であるMuse細胞を色素細胞に分化誘導することに成功した。また、生体内で神経堤由来の細胞が色素細胞前駆細胞を経て色素細胞に分化するのと同じように、Muse細胞は分化誘導の初期では神経堤細胞に関連した遺伝子を発現し、分化誘導の中期以降で色素細胞前駆細胞に関連した遺伝子を、そして分化誘導の最終段階で成熟した色素細胞の遺伝子を発現することを確認した。Muse細胞由来色素細胞の遺伝子発現の変遷を明らかにしたことは、将来この細胞を白斑などの色素異常症の治療に応用する際の一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：As rejuvenate therapy, ES cells and iPS cells have been reported to generate melanocytes. Other than ES and iPS cells, human skin tissues maintain pluripotent stem cells, named multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. We employ Muse cells isolated from human adipose tissue to differentiate into melanocytes (Muse-MC). Muse-MC express melanocyte-related molecules, such as tyrosinase and DCT, and show tyrosinase activity. We also succeeded to differentiate Muse cells into fibroblasts and keratinocytes and created three-dimensional (3D) reconstituted skin with Muse cell-derived melanocytes, fibroblasts and keratinocytes. The 3D reconstituted skin of Muse cell-derived cells coordinately showed epidermis layers and Muse-MC localized in the basal layer of the epidermis. Thus Muse cells in the human skin can be a source of rejuvenation medicine for the skin reconstruction.

研究分野：皮膚科、再生医療

キーワード：Muse細胞 色素細胞 多能性幹細胞 再生医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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。当研究室では、これまでに線維芽細胞由来 Muse 細胞 (Multilineage-Differentiating Stress Enduring Cells) から機能的なメラノサイトの分化誘導 (J Invest Dermatol, 2013. 133(10): 2425-35) (図 1) ならびに脂肪組織からの Muse 細胞の分離培養 (Stem Cell Dev 2014. 23: 717-728) に成功している。そこで尋常性白斑の治療を目的として予備実験ではあるが、ヒト脂肪組織由来幹細胞 (hASC) から単離した Muse 細胞から色素細胞を分化誘導することを試みている。既に予備実験では、約 10 g の脂肪から約 1.5 万の Muse 細胞が培養でき、それを Wnt3a, stem cell factor など 10 因子を含む色素細胞誘導培地で増殖させながら 6 週間分化誘導すると約 1000 万細胞のメラノサイト様細胞が得られることを確かめている。さらに、そのうち約 43% の 460 万細胞が色素細胞特異的タンパク質を発現していた。ヒトの皮膚には 1mm² 当たり 1000 細胞の色素細胞が存在するという報告があり、1.5 万の Muse 細胞から約 40cm² 分の白斑部位を治療することができる計算になる。しかし、この方法を臨床応用するためには、さらに効率よく多数のメラノサイトを分化誘導する培養方法の確立が不可欠である。そのためには Muse 細胞をその多能性を維持させたまま増殖させる方法の確立が必要となる。また、これまでの我々の予備的検討から、脂肪幹細胞を培養し続けても、その中に含まれる SSEA3 陽性細胞の比率は必ずしも減少しないことが示されている。そこで、培養中の脂肪幹細胞において、SSEA3 細胞の増殖あるいは SSEA3 陰性細胞から SSEA3 細胞への分化が起こっている可能性が想定される。また、これまでの報告でも Wnt/ -catenin 経路 (Cell Stem Cell 2008 3:132-135)、Akt/PI3K 経路 (Development 2016, 143: 350-3060) が活性化することより、多能性マーカーが出現することが報告されている。そこで、培養脂肪幹細胞の中で一定の比率で SSEA3 が存在し続けるメカニズムまた SSEA3 陰性細胞から SSEA3 陽性細胞への分化あるいは SSEA3 細胞自身の増殖を促進するメカニズム解析を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト皮膚脂肪細胞に存在する多能性幹細胞である Muse 細胞を単離培養し、色素細胞へ分化誘導するための効率的なシステムの構築をめざすことである。そのために、以下の 6 つの項目について検討する。A) ヒト脂肪組織中の脂肪幹細胞とその中に含まれる Muse 細胞の定量と年齢や性別などによる個人差の有無、B) Muse 細胞からの効率的な機能的色素細胞の分化誘導 C) 脂肪幹細胞の培養中に Muse 細胞マーカーである SSEA3 陽性細胞が増殖するか否か、D) SSEA3 陽性細胞の出現頻度を高める培養条件の開発、E) 新たに SSEA3 を発現した細胞の生物学的、遺伝子的な解析、F) 新たに SSEA3 を発現した細胞が色素細胞へと分化するか否かの検討

3. 研究の方法

ヒト脂肪組織由来の Muse 細胞から色素細胞を効率的に誘導する方法を検討する

ヒト脂肪組織由来幹細胞を培養中に、SSEA-3 陽性細胞数の割合に変化があるかどうかを検討する。

ヒト脂肪組織由来幹細胞から単離した SSEA-3 陽性の細胞集団の培養を続けたときに、SSEA-3 陰性の細胞がどの程度出現してくるのか、またその逆に SSEA-3 陰性の細胞集団の培養を続けたときに、SSEA-3 陽性の細胞が出現してくるのかどうかを検討する。

4. 研究成果

Muse 細胞の由来個体による SSEA-3 陽性細胞数や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。ヒト脂肪組織に存在する SSEA-3 陽性細胞数は年齢が高いほど低下する傾向があったが、両群とも単離した Muse 細胞は ALP 染色が陽性であり、外胚葉、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。

Muse 細胞を遊走させる因子についても検討を行った。我々の研究で、3次元再構成皮膚の真皮へ Muse 細胞または Muse 細胞由来色素細胞を移入しても、これらの細胞は表皮基底層へ移動し、基底層に定住することが分かっている (Tsuchiyama et al., JID, 2013, 133, 2425-2435)。そこで、今回我々は、Muse 細胞を誘導させるタンパク質またはケモカインを特定するための実験を行った。分化誘導前の Muse 細胞を用いて、boyden chamber assay 法により検討を行った。タンパク質は Wnt3a とケモカイン (SDF-1、RANTES など) 8 種類を用いて行った。その結果、Muse 細胞は SDF-1 と RANTES にて有意に細胞遊走が確認された。この結果から、Muse 細胞はケモカインにより遊走されることが分かった。

また、Muse 細胞から色素細胞へ分化誘導する際に発現または消失する色素細胞関連遺伝子、幹細胞関連遺伝子の確認もおこなった。

1. 多能性に関与する遺伝子の変遷

分化誘導前、分化誘導 1 週間後の Muse 細胞は Nanog、SOX2、OCT3/4 の発現が確認できた。しかし、分化誘導 2 週目以降の Muse 細胞ではそれぞれの遺伝子発現が減少していた。

2. 神経堤細胞関連遺伝子の変遷

Muse 細胞から色素細胞への分化は神経堤細胞を経由して分化することがわかっている。そこで我々は神経堤細胞マーカーを PCR 法にて確認した。PAX3、FOXD3、SNAI1、SNAI2 は分化誘導前に比して分化誘導後で遺伝子の発現が確認できた。色素細胞への分化誘導 1-3 週間後で FOXD3、SNAI1 の発現が確認できた。また分化誘導 4-5 週目で PAX3、SNAI2 の発現が確認できた。これにより、分化誘導培地で Muse 細胞は神経堤細胞へと分化していることがわかった。

3. Melanoblast (色素細胞前駆細胞) 関連遺伝子の変遷

色素細胞は色素細胞前駆細胞から分化し、それは神経堤細胞から分化する。そこで我々は色素細胞前駆細胞マーカーを PCR 法にて確認した。MITF、KIT は分化誘導直後から発現していたが、DCT は分化誘導 5 週間後から発現が確認できた。これにより分化誘導 5 週間後には Muse 細胞は色素細胞前駆細胞へと分化していることがわかった。

4. 色素細胞関連遺伝子の変遷

色素細胞は Melanin を作る細胞であり、メラニン合成酵素として tyrosinase (TYR) や tyrosinase related protein 1 (TYRP1) がある。また、メラノソーム蛋白質として PMEL (Gp100) がある。そこで我々は色素細胞マーカーを PCR 法にて確認した。分化誘導後から TYRP1 は発現が見られるが、分化誘導 3 週間後から十分な発現が見られる。PMEL は分化誘導 5 週間後に TYR は分化誘導 6 週間後にそれぞれ発現が確認できた。

5. メラニン放出関連遺伝子

以上の検討から、Muse 細胞から色素細胞へ分化することがわかり、さらにこの分化方法が生体内で外胚葉から色素細胞へと分化するルートを通っていることがわかった。しかし、この Muse 細胞から分化した色素細胞が正常ヒト色素細胞と同様にメラニンを放出することはわかっていない。そこでメラニン放出関連遺伝子を PCR 法にて確認した。分化誘導 3 週間後から AP-1、AP-2、Oca2 の発現が正常ヒト色素細胞と同等のレベルまで発現していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

著者名: Yamauchi T, Yamasaki K, Tsuchiyama K, Aiba S

論文表題: Artificial Pigmented Human Skin Created by Muse Cells.

雑誌名: Advances in Experimental Medicine and Biology

掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子): 10.1007/978-4-431-56847-6_14

1103 巻. 2018 年. 255-271 頁

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。