

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770233

研究課題名(和文)メラノサイト・ケラチノサイト共培養系を用いた細胞間メラノソーム転送機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of melanosome transfer between melanocytes and keratinocytes

研究代表者

肥田 時征(Hida, Tokimasa)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90464487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：新しいメラノサイト-ケラチノサイト共培養法を用いて、メラノサイトからケラチノサイトへのメラノソーム転送を解析した。メラノサイトとケラチノサイトの境界でのメラノソーム転送を電子顕微鏡、光学顕微鏡を用いて観察し、さらに、転送されたメラニン量を計測することができた。この系を用いることにより、各種メラニン合成阻害剤のメラノソーム転送への影響を解析することが可能であることが明らかとなった。また、臨床応用として、色素性乳房パジェット病における表皮メラニン分布について解析し、腫瘍細胞に転送されたメラノソームが受動的に経表皮性排泄されることを示し、ダーモスコピーがその診断に有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A new co-culture method for melanocytes and keratinocytes has been developed. By using this method, melanosomal transfer from melanocytes to keratinocytes could be visualized with electron and optical microscopes and the melanin content of transferred melanosomes could be analyzed. The effect of inhibitors of melanin synthesis on melanosomal transfer could also be analyzed. To apply the result for clinical practice, the melanin distribution in the nipple skin of patients with pigmented mammary Paget's disease was examined with histopathology, immunohistochemistry and dermoscopy. It was suggested that tumor cells transferred melanin from reactive melanocytes are subject to passive elimination from the epidermis and form characteristic dermoscopic patterns. This finding is useful in diagnosing pigmented mammary Paget's disease.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：メラノソーム

1. 研究開始当初の背景

ヒトの皮膚にはメラニンが存在し、表皮角化細胞(ケラチノサイト)の紫外線、酸化ストレスなどからの防御に重要な役割を果たしている。メラニンは表皮基底層に散在するメラノサイト内の細胞小器官であるメラノソーム内で産生、貯蔵され、成熟したメラノソームは細胞質内を遠心性に移動し、樹状突起先端部を経由して周囲のケラチノサイトへ転送される。転送されたメラノソームは、ケラチノサイト細胞質内を求心性に移動して核近傍に集合し、あたかも細胞核を保護するかのように supranuclear cap を形成する。メラノサイトおよびケラチノサイト内のメラノソームの輸送については、キネシンやダイニンなどの分子モーターと微小管・アクチン線維を介した細胞内輸送機構が解明されつつあるが、メラノサイト-ケラチノサイト間の転送機構については、いまだ解明されていない。仮説としては、メラノソームを含むメラノサイト樹状突起がケラチノサイトに取り込まれる(サイトファゴサイトーシス)、細胞外に一度分泌されたメラノソームがケラチノサイトのファゴサイトーシスで取り込まれる(エクソサイトーシスとファゴサイトーシス)、メラノサイトとケラチノサイトの細胞膜がフィロポディアを介して一時的に融合しメラノソームが転送される、の3つが想定されている。現在まで、メラノサイト・ケラチノサイト共培養や、細胞の蛍光標識、メラノソームの蛍光標識など、様々なアプローチで研究されてきたが、成功に至っていない。

2. 研究の目的

ケラチノサイトとメラノサイトの共培養法を用いて、各細胞間の相互作用、特にメラノソームの転送機構を解明する。この共培養法により、第一に両細胞の接触環境を電子顕微鏡で観察し、形態学的な解析を行う。次に共培養後に両細胞を分離し、細胞内メラニン量の測定等の生化学的解析を行う。さらに、培養液への各種増殖因子の添加、紫外線照射を行って培養環境を変化させ、それに伴うメラニン転送の質的、量的変化を解析する。従来の単層培養条件下での共培養では、細胞同士が密集し、異なる細胞同士の接触点を観察することが容易でなく、また共培養後にそれぞれの細胞を分取することが困難であった。本研究では、メラノサイト、ケラチノサイトの樹状突起を介した接触点のみを観察する。共培養後の細胞分取が容易で、分離後にそれぞれの細胞を単独で培養継続することも可能なため、例えば、共培養期間中にケラチノサイトが受容したメラニンを定量的に解析することができる。

本研究は様々な色素異常症の病態解析、治療に応用することができる。皮膚色素異常症

には、メラニン量が増加するもの(カフェオレ斑、肝斑、雀卵斑など、いわゆる“しみ”)と、減少するもの(チロシナーゼ陽性白皮症、伊藤白斑、脱色素性母斑など)が存在する。これらの病態解明と治療には、メラノサイト内でのメラノソーム形成過程のみならず、メラノソーム輸送機構の解明が必須であるためである。

一方、本研究は皮膚悪性腫瘍の臨床にも関連する。非メラノサイト系の上皮性皮膚腫瘍において、腫瘍細胞のメラニン取り込み増加が起こることが知られている。例えば、基底細胞癌、有棘細胞癌、パジェット病は皮膚科診療で高頻度に遭遇する悪性腫瘍であるが、これらは黒褐色を呈することがある。特に基底細胞癌は、日本人においてその多くが黒色調を呈する。これらの腫瘍細胞は元来色素を有さないが、正常メラノサイトが腫瘍内に取り込まれ活発なメラニン産生を行い、メラノサイト内および周囲の腫瘍細胞にメラノソームが蓄積することによって肉眼的に黒色調となる。本研究は、腫瘍細胞と正常細胞間の細胞内小器官の転送という、より広義のメカニズムの解明につながり、これは悪性腫瘍治療における drug delivery にも重要な概念である。

3. 研究の方法

1) メラノサイト・ケラチノサイト共培養系の確立: メラノサイトは C57BL6 マウス由来の株化細胞 melan-a を、ケラチノサイトにはマウス奇形腫由来のケラチノサイト株 XB2 を使用する。まず共培養条件の決定と安定化を行い、両細胞の培養条件(細胞数、培養期間)を最適化する。細胞増殖を停止させる手段として、接触阻害やマイトマイシン処理を利用する。

2) 形態学的観察: 走査および透過電子顕微鏡を用いて形態学的にメラノソーム転送を観察する。従来の共培養と異なり、メラノサイトとケラチノサイトの接触箇所を観察することができ、転送機構解析に有用な情報が得られることが予想される。

3) 生化学的解析: 一定期間の共培養後に細胞を分取し、生化学的解析、メラニン量測定を行う。

4) メラニン転送の促進・阻害: メラニン合成促進物質、メラニン合成阻害物質を培養液に添加することで、メラニン転送の変化、および、ケラチノサイト内に転送されたメラノソームの形態学的、機能的変化を検討する。

5) ヒト細胞を用いた解析: 共培養系を応用し、ヒトの皮膚におけるメラノソーム転送を解析する。ヒト正常メラノサイトやヒト正常ケラチノサイトを用いて共培養系による解

析を行い、また、皮膚癌モデルを用いて解析する。

6) メラニンによる皮膚色・毛色の調節機構の解析：本研究の臨床応用として、皮膚色や毛色のメラニン調節機構を解析する。とくに色素異常症の皮膚の解析や、色素性皮膚悪性腫瘍におけるメラノソーム転送障害について解析する。

4. 研究成果

1) メラノサイト・ケラチノサイト共培養系の確立：当初の計画通り、C57BL6 マウス由来の株化細胞 melan-a, マウス奇形腫由来のケラチノサイト株 XB2 を用いて共培養系の最適化を行った。各種細胞は 20~25 継代の細胞を使用し、XB2 についてはマイトマイシン C 処理による増殖抑制を行った。培養環境の最適化を行い、培養液 RPMI1640, 10% CO₂ 環境下での培養条件を整備し、最適な培養日数の設定を行った。

2) 形態学的観察：上記の培養条件にて、電子顕微鏡でメラノソームの転送を解析した。電子顕微鏡試料の作成には、通常のペレットとは異なる手技が必要であることが判明した。以下にメラノソーム転送を捉えた結果を示す。

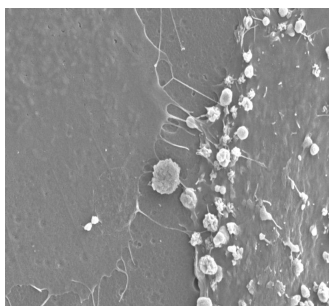


図 1 走査電子顕微鏡観察。melan-a (右) から XB2 (左) にフィロポディアを介してメラノソームが転送されている。

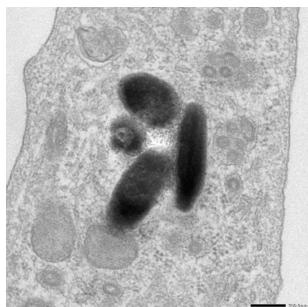


図 2 透過電子顕微鏡観察。XB2 内に取り込まれたメラノソームの集合体。

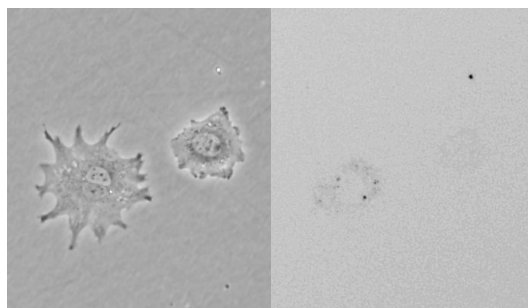


図 3 共培養後に分取した XB2 の位相差像 (左) と明視野像 (右)。メラノソームの取り込みが観察される。

3) メラニン合成阻害剤を用いた共培養：共培養期間に各種阻害剤を用いてメラニン転送にどのような影響がみられるかを検討した。阻害剤 B, 阻害剤 C ではメラニン転送の低下が観察されたが、阻害剤 A ではむしろメラニン転送が増加することが明らかとなった。

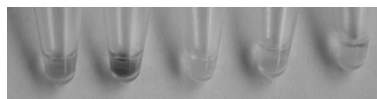


図 4 メラニン阻害剤によるメラニン転送の変化。左から対照, 阻害剤 A, 阻害剤 B, 阻害剤 C, 共培養していない対照。

4) 遺伝性色素異常症におけるメラニン生成の解析：眼皮膚白皮症 4 型におけるメラニン生成阻害を分子生物学的に検討した。この疾患では、メラノソーム膜に存在する SLC45A2 の遺伝子変異により、メラノソーム内の pH が変化し、チロシナーゼ活性が低下する病態が想定されている。この疾患の患者について、ゲノム DNA, mRNA の解析を行ったところ、新たな SLC45A2 発現異常が確認された。

5) 色素性乳房パジェット病 (pigmented extramammary Paget's disease, PMPD) における病変部メラニン転送の解析：乳房パジェット病は乳癌の一亜系であり、腫瘍細胞が乳頭部の乳腺開口部周囲に広がったものである。通常、病変部皮膚はびらん、紅斑などを呈するが、稀にメラニンの沈着を伴うことがある (PMPD)。4 例の PMPD について、臨床的、病理組織学的に解析した。ダーモスコープを用いた観察で、リング状の色素線条や小斑が観察されることが多く、この所見が本疾患の診断に有用であることが判明した。この色素パターンが起こる機序として、病変部メラノサイトから腫瘍細胞へ転送されたメラノソームが、受動的に経表皮性排泄を受けることが原因であることが示唆された。

6) 研究のまとめと今後の展望：本研究により、新しいメラノサイト・ケラチノサイト共培養法が確立され、メラノソーム転送を容易に観察することが可能となった。さらに、こ

の系を用いることにより、メラニン合成阻害剤のメラノソーム転送への影響を計測できることが明らかとなった。これらの結果から、今後のメラニン合成阻害剤の分析、新規開発への応用が期待される。転送されたメラニンの定量的解析については、扱える細胞数が限られるため十分な解析を行うことができなかった。この点については今後の検討課題である。また、本研究では臨床への応用として、眼皮膚白皮症でのメラニン生成、色素性乳房パジェット病でメラニン転送を解析した。

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5件)

1. Hida T, Kase K, Hamada T, Matsuda M, Hashimoto T, Yamashita T. Ankyloblepharon-ectodermal defects-cleft lip/palate syndrome: a case with a novel p63 mutation associated with abnormal keratohyalin granules. *Eur J Dermatol*, 2014 (in press). 査読有

2. Hida T, Yamashita T: Pigmented mammary Paget's disease presenting with dermoscopic features of multiple dots. *Australas J Dermatol*, 2013 (in press). DOI: 10.1111/ajd.12086. 査読有.

3. Sugiyama Y, Masumori N, Fukuta F, Yoneta A, Hida T, Yamashita T, Minatoya M, Nagata Y, Mori M, Tsuji H, Akaza H, Tsukamoto T: Influence of isoflavone intake and equol-producing intestinal flora on prostate cancer risk. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 1-4, 2013. DOI: DOI:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.1.1. 査読有.

4. Hida T, Yoneta A, Nishizaka T, Ohmura T, Suzuki Y, Kameshima H, Yamashita T. Pigmented mammary Paget's disease mimicking melanoma: report of three cases. *Eur J Dermatol* 2012; 22: 121-124. DOI: 10.1684/ejd.2011.1580. 査読有.

5. Utsu M, Hida T, Takahashi H, Yamashita T. Etanercept-induced lichen planus-like eruptions following the lines of Blaschko. *Eur J Dermatol* 2012; 22: 544-545. DOI: 10.1684/ejd.2012.1747. 査読有.

[学会発表](計9件)

1. 肥田時征, 黄倉真恵, 山下利春: 眼皮膚白皮症4型の一例. 第25回日本色素細胞学会学術大会. 2013年11月, 大阪.

2. 肥田時征, 加瀬貴美, 濱田尚宏, 松田光弘, 橋本隆, 浅沼秀臣, 重富浩子, 山下利春: Ankyloblepharon-ectodermal defects-cleft lip/palate syndrome. 日本人類遺伝学会第58回大会. 2013年11月, 仙台.

3. 肥田時征, 加瀬貴美, 濱田尚宏, 松田光弘, 橋本隆, 浅沼秀臣, 山下利春: AEC症候群の1例. 第395回日本皮膚科学会北海道地方会. 2013年8月, 札幌.

4. Hida T, Yoneta A, Yamashita T: Dermoscopic findings of pigmented mammary Paget's disease. The 9th Asian Dermatological Congress. 2013 Jul 10-13, Hong Kong.

5. 肥田時征: 原因物質により多彩な臨床像を示す異物肉芽腫～診断の第一歩として問診が重要な肉芽腫～. 第112回日本皮膚科学会総会教育講演. 2013年6月, 横浜.

6. 肥田時征, 箆井泰江, 小野一郎, 山下利春: インドシアニングリーン蛍光法を併用した悪性黒色腫センチネルリンパ節生検. 第111回日本皮膚科学会総会. 2012年6月, 京都

7. Okura M, Osai Y, Hida T, Mori S, Yamashita T. Diagnosis of xeroderma pigmentosum by recombinant adenovirus infection and measurement of UV sensitivity of patient fibroblasts. The 2nd Eastern Asia Dermatology Congress: 2012 Jun 13-15: Beijing, China.

8. Okura M, Hagiwara K, Hida T, Yoneta A, Yanagisawa K, Horio Y, Yamashita T. Effects of a low-molecular-weight polyphenol (oligonol) on the growth and melanogenesis of primary melanocytes and melanoma cells. The 19th International Pigment Cell Conference: 2011 Sep 20-24: Bordeaux, France.

9. Yoneta A, Nishizaka T, Hida T, Goto S, Ozawa M, Yamashita T. Two cases of advanced melanoma treated with dendritic cell vaccination therapy. The 22nd World Congress of Dermatology: 2011 May 24-29: Seoul, Korea.

[図書](計1件)

1. 肥田時征, 山下利春: 貧血母斑. 皮膚科臨床アセット15-母斑と母斑症-. 中山書店: pp.120-3, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

肥田 時征（HIDA TOKIMASA）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90464487

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし