

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791166

研究課題名(和文) マウス真皮におけるメラノサイトの遊走と分化解析

研究課題名(英文) Melanocyte behaviors in C57BL/6 nu/nu mice

## 研究代表者

加藤 裕史 (KATO, HIROSHI)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30570709

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)：ヒトや動物の肌の色はメラニンという物質で作られており、これを生成するのはメラノサイトという細胞である。マウスにおいてメラノサイトは皮膚には定着せず、毛に移動する。我々はC57BL/6という毛が黒いマウスから作成されたヌードマウス(毛がないマウス)に着目した。このマウスは出生時には皮膚に色が無いが、成長するに従って黒色を呈し、更に成長すると色が白く抜ける。我々はこのマウスでのメラノサイトの分化、遊走などについて研究を行い、毛に移動できずに皮膚に居続けた場合、メラノサイトが皮膚で成熟して、死滅していく事、定着しないメラノサイトは他の組織への移動を行っていくことなどを確認した。

研究成果の概要(英文)：The skin color of mammal was made by color from the pigment called melanin. Melanocyte was the cell that produces melanin. In the mouse, melanocytes didn't migrate into the skin, but into hairs. C57BL/6 nude was the black and hairless mouse. At birth, the skin color of this mouse was white. As the body grows, it changed into black and decolorized with weeks. We researched the differentiation and migration of the melanocyte with this mouse. The melanocytes which were not able to migrate into hairs, matured in the skin and became apoptotic death. These immature melanocytes had migratory ability into other tissue.

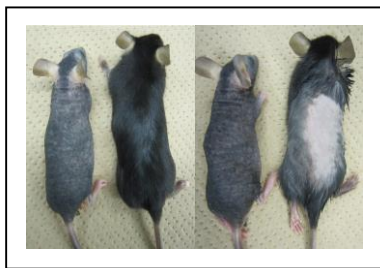
研究分野：皮膚科学

キーワード：melanocyte melanoblast C57B/L6 ヌードマウス 分化 誘導

### 1. 研究開始当初の背景

マウスにおけるメラノサイトの遊走と分化に関しては過去に多くの報告がある。発生においては神経冠から分化したメラノサイト前駆体(メラノプラスト)が真皮から表皮を介して、毛球に移動し、そこで成熟し、メラノサイトとなり、メラニン産生を開始する。Petersらの報告によれば、毛のできる部位には Stem Cell Factor (SCF)が集中し、c-KITを発現したメラノプラストがそこに引かれて成熟メラノサイトとなり、c-KITの発現が少ないメラノプラストはバルジを形成し、メラノサイトを供給するようになる。(Peters E.M.J et al, J Histochem Cytochem., 50,751-66,2002) よって、C57BL/6 野生型においてはメラノプラストの遊走、分化が終了する日齢になると毛髪に色素を認めるようになってくる。SCFや HGF などの一部の遺伝子を導入したマウスでは毛髪へのメラノサイトの遊走が阻害され、表皮にとどまる事も知られている。(Yamazaki F et al, J Invest Dermatol., 125, 521-5, 2005), (Noonan F.P et al, Nature, 412, 217-2, 2001)

一方真皮にメラノサイトが存在するといった状況は、報告が少ない。遊走、分化の段階を過ぎればメラノサイトは真皮には存在せず、毛髪や表皮に遊走してしまう為である。そこで我々は C57BL-6 nu/nu マウスに注目した。このマウスは、毛髪を欠き、日齢 6 頃より黒色の体色を呈してくる。成長に伴って、日齢 30 頃より徐々に体色が薄れて徐々に肌色となってくる。このマウスにおけるメラノサイトの移動を調べる事により、メラノサイトの分化、誘導を解析した。



### 2. 研究の目的

当研究では、C57BL/6 野生型及び、C57BL/6 nu/nu マウスを用いて、真皮におけるメラノサイトの遊走と分化を解析する。C57BL/6 nu/nu マウスは出生時には野生型と同様に色素が存在しないが、徐々に黒色を呈して、更に成長に従って色素が消失するという特徴を持っている。このマウスでは真皮にメラノサイトが残り、そこで成熟するといった、通常のマウスと異なった分化を辿ることがわかり、真皮にメラノサイトが居続けるといった特殊な環境においてメラノサイトにどのような因子が発現し、どのように分化が起こるのかを解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) C57BL/6 nu/nu 及び野生型の皮膚に対して各種メラノサイトマーカーの免疫染色を行う。

・皮膚採取

生後 0 日、3 日、6 日、9 日、12 日、30 日、60 日の C57BL/6 nu/nu 及び C57BL/6 野生型マウスを屠殺し、背部の皮膚を採取し、ホルマリン固定切片、凍結切片を準備する。

・固定した皮膚を免疫染色する。免疫染色に関しては Nestin, TRP2 などのメラノプラストのマーカーとなる因子や Tyrosinase などの成熟メラノサイトのマーカーとなるものを検討している。

・染色された切片を観察し、各日齢における成熟したメラノサイト及び未熟なメラノサイト(メラノプラスト)の局在を確かめる。

(2) 日齢 6 の GFP・C57BL/6 ノードマウス及び野生型の皮膚を同系野生型マウスに移植し、移植片でのメラノサイトの動きに関して GFP を指標にして観察する。

・GFP transgenic C57BL/6 nu/nu 及び野生型の作成を行う。

・Mitf のカウントにて(研究目的参照)最も差が開いた日齢 6 の皮膚を採取する。

C57BL/6 野生型(GFP 標識無し)に皮膚移植を行い、日齢 6,9,12,15,18 にて皮膚を採取し、それらを免疫染色(上記(1)と同様の方法)し、GFP 陽性細胞の移動を観察する。

・染色された切片を観察し、メラノサイト(Mitf 陽性細胞)がどの段階で毛包へ遊走するのか、もしくは遊走はせず、その場にとどまるのかを検証する。

(3) 日齢 5 の GFP・C57BL/6 ノードマウス及び野生型の皮膚を SCID マウスへ移植し、白色の毛髪が黒色に変化するかどうかを肉眼的に観察する。

・(2)と同様の手順で行う。

・移植後は実体顕微鏡を用いてマクロでの移植片周囲の毛髪の色調を観察する。

(4) 各日齢のマウスの皮膚切片よりメラノサイトを培養し、免疫染色を用いて比較する。

・日齢 0, 3, 6, 9, 12, 30, 60 の C57BL/6 nu/nu 及びコントロールとして同系野生型マウスの背部皮膚を採取し、EDTA・trypsin にて細胞接着を解除し、メラノサイト用培養液にて培養を行う。

・培養した細胞を、培養時間などの条件を合わせた上で免疫染色を行う。

(5) 培養したメラノサイトを Real time PCR にて解析し、メラノサイト自体の性質の違いについて検討する。

・上記にて採取したメラノサイト(メラノプラスト)より RNA を抽出する。

・Mitf, Nestin, TRP2 などの各種メラノサイトマーカーとなるプライマーを用いて PCR

にて解析を行う。

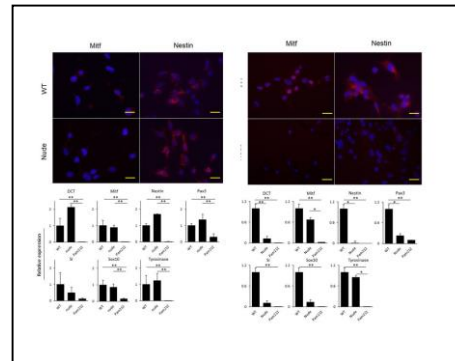
・コントロールとしてマウスメラノーマ細胞及びマウス線維芽細胞などを用いる予定である。

(6) アポトーシスマーカーによる染色を行い、メラノサイトのアポトーシスを観察する。  
・アポトーシスマーカーでの免疫染色

#### 4. 研究成果

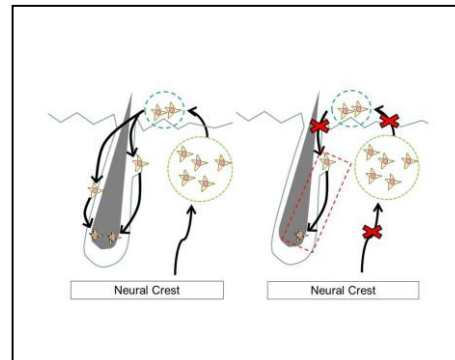
今回我々はマウス真皮におけるメラノサイトの遊走と分化解析を行うため、C57BL/6 野生型マウス(WT)及び C57BL/6nu/nu マウス(nu/nu)を用いてそれらの真皮におけるメラノサイトの分化と誘導について研究を行った。まずWT及びnu/nuの皮膚に対して各種メラノサイトマーカーの免疫染色を行ったところ、WTでは過去の報告の通り日齢6-9までは真皮にメラノサイトが存在していたが、それ以降では消失していた。一方nu/nuにおいては、真皮内メラノサイトは漸減していくが、日齢30日の段階でまだ存在していた。このことからメラノサイトが真皮内に存在することが分かった。次にこのメラノサイトの分化度を調べるため、免疫染色を行ったところ、WT、nu/nuいずれにおいてもメラノblast(分化段階のメラノサイト)は日齢6以降では真皮内から消失した。一方成熟メラノサイトはWTにおいては真皮内に存在しなかったが、nu/nuにおいては徐々に数を増加させ、その後日齢9をピークとして漸減していった。また、アポトーシスのマーカーを用いた染色を追加したところ、日齢12よりnu/nuにおいては真皮内および毛周囲でのアポトーシスが見られた。これらのことから、nu/nuにおいては、真皮でメラノサイトが成熟し、ある段階を境にアポトーシスしていくと考えられた。更にこれらのメラノサイトの挙動を確認するため、GFPを導入したWT及びnu/nuの皮膚をSCIDマウスに移植し、それを免疫染色した。結果、WT、nu/nuいずれにおいても日齢6ではメラノサイトの移動は認められなかったが、日齢18においては、WTの皮膚を移植したマウスの、正常真皮内にメラノサイトを認めた。このことから、nu/nuの真皮に存在したメラノサイトは成熟したもので、それ以上の移動をしないであろう事が考えられた。次に日齢0のWT、nu/nu、日齢6のWT、nu/nuよりそれぞれメラノサイト(メラノblast)を採取し、培養することに成功した。それらのメラノサイトの性質を免疫染色およびreal-time PCRを用いて解析した。結果、日齢0のマウスから採取したメラノサイトに関してはいずれも多くはメラノblastであったが、日齢6のマウスから採取したメラノサイトについては、WTではメラノblastが主であったが、nu/nuでは成熟したものが主であることがわかった。このことより、nu/nuにおいては、毛に移行することができなかったメラノblast(未熟なメラノサイ

ト)が真皮で成熟し、アポトーシスを起こしていることが裏付けられた。これらの結果より、C57/BL6 nu/nuマウスにおけるメラノサイトの挙動が解明できた。

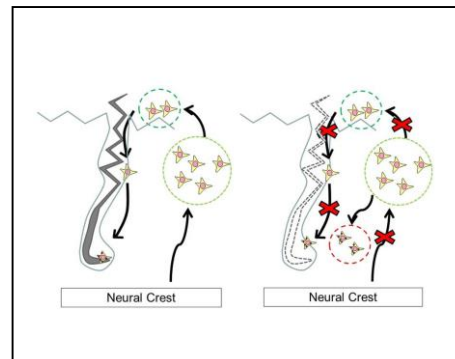


日齢0(左)と日齢6(右)でのメラノサイトのreal time PCR解析結果

日齢0では野生型とnu/nuで明らかな違いを認めないが、日齢6では明らかな性質の差を認める。(nu/nuでは成熟メラノサイトのマーカーが優位に上昇)



C57BL/6野生型でのメラノサイトの移動  
野生型では毛に遊走したメラノサイトが成熟し、皮膚には存在しなくなる。



C57BL/6 nu/nuでのメラノサイトの移動  
Nu/nuにおいては毛に遊走できなかったメラノサイトが真皮で成熟し、アポトーシスを起こしていく。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Hiroshi Kato, Motoki Nakamura, Erika Ito, Osamu Taguchi, and Akimichi Morita: Melanocyte behaviors in C57BL/6 nu/nu mice, 2011 Society for Investigative Dermatology Annual Meeting, phoenix.(USA) 2011.5.4

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 裕史 (KATO HIROSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：30570709

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

中村 元樹 (NAKAMURA MOTOKI)

田口 修 (TAGUCHI OSAMU)

森田 明理(MORITA AKIMICHI)