

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893012

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) Melanocytes induction from adipose-derived stem cells and studies on the mechanism for controlling melanin production for the development of therapeutic methods of vitiligo

研究代表者

土山 健一郎 (Tsuchiyama, Kenichiro)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：50711743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脂肪組織由来の幹細胞から多能性幹細胞の一つであるMuse細胞を分離し、この細胞を特殊な分化誘導用の培養液で培養することにより、色素を産生する細胞へと分化誘導させることに成功しました。脂肪組織由来のMuse細胞から誘導された細胞は、正常の色素細胞に似た形態を持ち、メラニン色素を産生していました。このMuse細胞由来色素細胞を混ぜた混合した人工の3次元培養皮膚を作成したところ、この細胞は、生体の色素細胞と同じように皮膚の基底層に位置しており、表皮内でメラニン色素を産生し、またそのメラニン色素を周囲の表皮角化細胞に渡していることを確認できました。

研究成果の概要(英文)：We found that multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells, a distinct stem cell type among human adipose tissue, can be easily reprogrammed into functional melanocytes.

Muse cells can be isolated as cells positive for stage-specific embryonic antigen-3, a marker for undifferentiated human embryonic stem cells, and differentiate into cells representative of all three germ layers from a single cell, while also being non-tumorigenic. The use of certain combinations of factors induces Muse cells to express melanocyte markers. When Muse cell-derived melanocytes were incorporated into three-dimensional cultured skin models, they located in the basal layer of the epidermis and produced melanin in the same manner as authentic melanocytes.

This technique may be applicable to the efficient production of melanocytes from accessible human adipose tissue by utilizing Muse cells, thereby contributing to autologous transplantation for melanocyte dysfunctions, such as vitiligo.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 色素細胞 尋常性白斑 Muse細胞

1. 研究開始当初の背景

後天性白斑症は、原因不明の難治性疾患であり、部位や範囲によっては患者の生活の質を著しく低下させる。免疫抑制剤外用や紫外線療法がまず最初に行われる。これらの治療が奏功しない場合は皮膚移植術などが行われるが、治療効果の芳しくない例も多い。色素細胞の増殖や色素の産生、放出などの制御機構についてはまだ不明なことが多く、白斑症の治療のためにも解明が望まれている。

2010年に東北大学出澤真理教授らにより間葉系組織由来のヒト多能性幹細胞である Muse 細胞 (Multilineage-Differentiating Stress Enduring Cells)の存在が報告された (Proc Natl Acad Sci USA.2010;107(19):8639-43)。この細胞は、ヒトの間葉系組織内に自然に存在している多能性幹細胞であり、樹立に際して倫理的な問題がなく、さらに遺伝子導入などの操作も必要ないために今後の臨床応用が期待されている。

また、2013年に、線維芽細胞由来の Muse 細胞を色素細胞に分化誘導することに私達は成功しており (J Invest dermatol, 2013. Oct;133(10):2425-35)、この Muse 細胞由来色素細胞を用いての白斑部への移植療法や色素細胞のメラニン産生や放出機構の解明が期待されている。

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。具体的には、ヒト脂肪組織由来の Muse 細胞から色素産生細胞を分化誘導させる方法を検討する。続いて、色素細胞におけるメラニン産生やメラニン蓄積の制御機構、角化細胞へのメラニン移行機構についての検討を行う。

3. 研究の方法

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た。まず、ヒト脂肪組織を一型コラーゲンで処理をして脂肪幹細胞を集める。この細胞を抗 stage specific embryonic antigen 3 (SSEA-3)抗体で染色し、FACSにより 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。

続いて脂肪組織由来 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、色素細胞を誘導した。分化誘導因子として、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 の 10 個の因子を用いた。これらの因子を加えた DMEM 培地で 6 週間の培養をおこなった。

色素細胞誘導開始後一週毎に形態や色調変化の観察をおこなった。また、誘導した細胞のメラニン産生能を L-DOPA 反応で評価し、色素細胞特異的遺伝子の発現の確認に RT-PCR 法、タンパク質発現の確認には免疫細胞化学法をおこない、Muse 細胞から色素細胞への継時的な変化を観察した。また、6 週間培養後の細胞を、メラニン細胞刺激ホルモン (α-MSH)を加えた誘導培地でさらに 3 週間培養して、メラニン産生能に変化があるかどうかを観察した。

続いて Muse 細胞由来色素細胞が、機能的にメラニンを産生し、角化細胞へメラニンを移譲できることを確認するために、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同細胞の遊走能や局在、角化細胞へのメラニンの移譲について観察した。三次元培養皮膚の作成については、私たちの過去の論文 (J Invest dermatol, 2013. Oct;133(10):2425-35)を参照にし、コラーゲン type1 と線維芽細胞を混ぜたゲルの上に、角化細胞と Muse 細胞由来色素細胞を 5:1 の割合で混合したものを播種し作成した。Muse 細胞由来色素細胞の局在や遊走、色素細胞特異的タンパク質の発現については、同培養皮膚を中世ホルマリンで固定した後に免疫組織化学法やヘマトキシリンエオジン染色での観察を行い評価した。メラニン産生能についてはフォンタナマッソン染色や抗 gp100 抗体を用いた免疫組織化学法を行い、評価を行った。

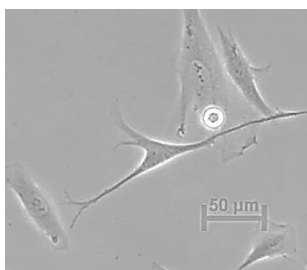
4. 研究成果

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。
 外科的手術の際に廃棄された余剰脂肪を1型コラーゲナーゼで酵素処理をすることによって、脂肪組織に存在する脂肪幹細胞を単離した。この脂肪幹細胞を培養し、Dishに100%コンフルエントになるまで細胞数を増やしてから、抗SSEA-3抗体で染色し、FACSによりSSEA-3陽性細胞を選別し、脂肪組織由来 Muse 細胞とした。
 続いて色素細胞への分化誘導をおこなった。脂肪組織由来 Muse 細胞を Wnt3a、stem cell factor などの前述した10種類の試薬を含む誘導培地で6週間培養した結果、複数の突起を持った色素細胞様の形態に変化した(図1)。

図1

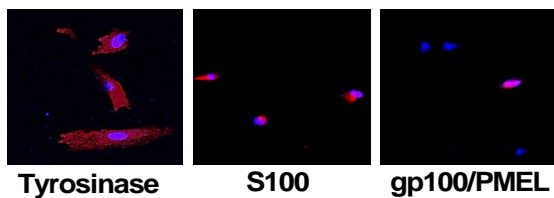
Cell morphology



この色素細胞様の細胞の蛋白発現を免疫細胞化学法により調べたところ、gp100 や tyrosinase, S100 などの色素細胞に特異的な蛋白を発現していた(図2)。

図2

Immunofluorescence analysis

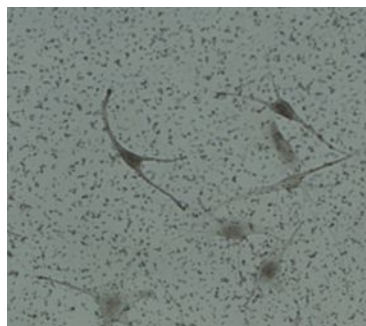


また、遺伝子発現を RT-PCR で調べたところ、同様に色素細胞マーカーである tyrosinase, gp100, MITF などの発現を確認した。6週間誘導後の脂肪組織由来 Muse 細胞は L-DOPA 反応に陽性であり、メラニン産生能を

持つことを確認できた(図3)。

図3

L-DOPA activity



また、この6週間培養した脂肪組織由来 Muse 細胞をメラニン細胞刺激ホルモン(-MSH)を含んだ誘導培地で、さらに3週間培養したところ色調が黒色調に変化した。このことから、脂肪組織由来 Muse 細胞から誘導された色素細胞は、培地に -MSH を加えることでメラニン産生能が増強されることが示唆された。以上の実験結果から、脂肪組織由来 Muse 細胞から色素細胞を誘導できることが確認できた。

続いて、この Muse 細胞由来色素細胞を混ぜた3次元培養皮膚を作成し、H.E染色や免疫組織化学法で検討した。Muse 細胞由来色素細胞は正常の色素細胞と同じ様に基底層に局在していた。免疫組織化学法では、tyrosinase、gp100、malan-A、S100 など色素細胞特有の蛋白質を発現していた。また色素細胞周囲の角化細胞を観察した結果、抗 gp100 抗体に対する陽性反応が確認できたため、Muse 細胞由来色素細胞がメラニンを産生し、そのメラニンを周囲の角化細胞に移行していることが考えられた。以上の実験結果からは、ヒト脂肪組織由来 Muse 細胞から作成した色素細胞は生体内でもヒト色素細胞と同様の機能的役割をもちうることを示された。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

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・医員

研究者番号 : 50711743