

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461704

研究課題名(和文) 白斑・悪性黒色腫治療のためのヒトメラノサイト分化とiPS細胞研究

研究課題名(英文) Melanocyte and iPS cell research for treatment of vitiligo and melanoma

研究代表者

川上 民裕 (Kawakami, Tamihiro)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20297659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：メラノサイト色素細胞の欠如・機能不全疾患である尋常性白斑や脱色素斑、メラノサイトが癌化した悪性黒色腫メラノーマ、色素幹細胞が機能していない白髪に対する有意義な治療法確立を目指し、研究を遂行している。1)培養系からメラノサイト分化・増殖・遊走能、メラニン色素生成機序を解明する。2)ヒト血液からiPS細胞を作製し、メラノサイトへ効率よく分化・増殖させ、白斑・脱色素斑・白髪皮膚へ移植する新規治療法の確立。採血により獲得した血液Tリンパ球に、センダイウイルスを用い山中4因子を遺伝子導入したヒトiPS細胞を入手し、メラノサイトへの誘導をより正確にそしてより効率よく大量に増殖させる独自の条件設定が完成。

研究成果の概要(英文)：We established a new in vitro approach to generate induced pluripotent stem (iPS) cell-derived human melanocytes which have higher proliferation rates and increased melanin production compared to melanocytes prepared by previously reported approaches. We designed two original methods, transferring black colonies by pipet and recovering black cell pellets from centrifuged medium, and numerous human iPS cell-derived melanocytes proliferated in gelatinous dishes coated with Matrigel after 12 days. We also succeeded in inducing melanin pigmentation in nude mouse skin in vivo using those human iPS cell-derived melanocytes. We propose that this new method using iPS cells established from T cells in the blood of normal human volunteers could be applied clinically to develop regenerative medicine and cell therapies for various forms of human pigmentation disorders.

研究分野：皮膚科

キーワード：メラノサイト 皮膚色素細胞 iPS細胞 白斑 悪性黒色腫 白髪

1. 研究開始当初の背景

当教室は、マウス胎仔から神経管を分離したマウス神経冠初代培養系を用いて、マウス神経冠細胞 (neural crest cells, NCC) から NCCmelan5(NCC 由来成熟メラノサイト細胞株) (Ooka S, et al. Pigment Cell Res (Pigm Cell Melanoma R),2001)、NCCmelb4(NCC 由来メラノサイト前駆細胞株) (Ito M, et al. Pigment Cell Res (Pigm Cell Melanoma R),2004)、NCCmelb4M5(NCC 由来未熟メラノサイト細胞株) (Kawa Y, et al. Pigment Cell Res (Pigm Cell Melanoma R),2005)といった様々な分化段階のマウス皮膚メラノサイト系細胞株を樹立し、メラノサイト分化・増殖・遊走能、メラニン色素生成機序を検討してきた。私は、TGF β がメラノサイト分化に必須とされる Kit/Kit ligand (KL)(stem cell factor と同じ) シグナル伝達系を最幼若な段階で制御している (Kawakami T, et al. J Invest Dermatol,2002)、活性型ビタミン D3(1,25-dihydroxyvitamin D3)には直接的なメラノサイト分化誘導作用とエンドセリン B レセプター発現を介したメラノサイト分化増殖作用がある、レチノイン酸がその強力な分化誘導作用でメラノサイトにアポトーシスを誘導する (Watabe H, Kawakami T, et al. J Invest Dermatol, 2002)、BMP4 が Kit 発現を誘導し、最幼若分化段階でメラノサイトの分化を制御する (Kawakami T, et al. J Invest Dermatol,2008)、最幼若分化段階で BMP4 が Ret を抑制する (Kawakami T, et al. J Dermatol Sci, 2011) 等の重要な新知見を提示してきた。しかし全てはマウスメラノサイトに関する結果であるので、より臨床応用を意識し、ヒトメラノサイト・ヒトメラノプラスト・ヒトメラノーマ細胞を使用して、同様なメラノサイトの分化・増殖・遊走能やメラニン色素生成機序の検討をしたい。

尋常性白斑や脱色素斑は、皮膚メラノサイトが表皮から消失・メラニン色素生成の機能不全した疾患である。活性型ビタミン D3 外用やステロイド軟膏、紫外線療法等の現状治療は、効果が不十分で色素の回復に至らない。外科的治療では、患者正常皮膚を採取しメラノサイトを分離し培養増殖させ、浮遊培養状態のメラノサイトとして白斑や脱色素斑に移植する (移植時には白斑皮膚をアブレーション) 治療が試みられている (Yu-Fu Chen, et al. J Am Acad Dermatol, 2004)。しかし、皮膚採取部位と移植時アブレーションで創傷が残り、培養増殖時間がかかり、移植後も色素が均等にせず、まだら状になってしまったりしている。そこでヒト iPS 細胞から色素細胞へ分化させた報告に注目した (Ohta S et al. 2011; Nissan X et al. 2011)。しかし、両論文ともヒト iPS 細胞誘導色素細胞が、正常ヒトメラノサイトと比較して、各種関連因子の発現等が 70-80%程度であり、充分な分化を誘導していない。私は、通常のヒト線維芽

細胞から iPS 細胞樹立ではなく、採血により獲得した血液 T リンパ球に、センダイウイルスを用いた山中 4 因子を遺伝子導入したヒト iPS 細胞を入手し、培養維持の技術を修得している。このヒト iPS 細胞を使い、メラノサイトへの誘導をより正確に、そしてより効率よく分化・増殖させる独自の条件設定を目指す。本細胞は、皮膚生検での患者への侵襲を避け、採血だけで済ませられ、より臨床に適している。分化誘導の条件設定には、(1) のヒトメラノサイト・メラノプラストでの研究結果を参考とする。また、白斑や脱色素斑への移植には、アブレーションではなく、より侵襲のないマイクロニードルを改良、開発して用いる。

2. 研究の目的

ヒト皮膚メラノサイトとヒト皮膚メラノプラストを使用した研究から、メラノサイト分化・増殖・遊走能とメラニン色素生成機序を各種の免疫学的、生化学的、分子生物学的手法を駆使して明らかにする。さらに、ヒトメラノーマ細胞との相違を検討する。こうした結果は、尋常性白斑や脱色素斑、悪性黒色腫の病因や進展機序、治療を解明する上で重要な位置づけになる。

尋常性白斑や脱色素斑の新規治療として、採血で得た T 細胞からヒト iPS 細胞を樹立し、メラノサイトへ効率よく分化・増殖させ、遊走能を活性化した状態で、微小な注射針を先端に備えた Hollow type マイクロニードルに補充し、患者皮膚へ移植する手法を確立する。特に、ヒト iPS 細胞からメラノサイトへの誘導条件設定の検討、Hollow type マイクロニードルのより簡便な改良が、重要な研究となる。

3. 研究の方法

メラノサイトの異常が原因である尋常性白斑、脱色素斑、悪性黒色腫に対する治療への応用を意識した研究を行う。本研究には、以下の二つから構成される。

(1) ヒトメラノサイトとヒトメラノーマ細胞を使用した研究では、メラノサイト分化・増殖・遊走能やメラニン色素産生機序における BMP4・活性型ビタミン D3・レチノイン酸・アスコルビン酸等の関連物質の役割や効果、作用を明らかにする。

(2) ヒト iPS 細胞誘導メラノサイトを使用した研究では、ヒト iPS 細胞の培養維持を継続するとともにメラノサイトへのより効率の高い分化・より増殖率の高い培養条件を検討していく。そして、生成されたメラノサイトの正常性を確認する。また、実験動物を使用し Hollow type マイクロニードルの安全性を確認すると共に、臨床でより使用しやすい器具への開発を図る。

4. 研究成果

メラノサイト (色素細胞) の欠如・機能不

全疾患である尋常性白斑や脱色素斑、メラノサイトが癌化した悪性黒色腫(メラノーマ)、色素幹細胞が機能していない白髪に対する有意義な治療法確立を目指し、以下の二つの研究を遂行している。

(1)蓄積してきたマウスメラノサイトに関するデータを活かし、ヒトメラノサイト・ヒトメラノプラストを使用して、メラノサイト分化・増殖・遊走能、メラニン色素生成機序を解明し、尋常性白斑や脱色素斑、悪性黒色腫、白髪の黒毛化の治療法開発への足がかりとする。ヒト皮膚メラノサイトと、より未分化なヒトメラノプラストを使用して、活性型ビタミン D3 とレチノイド(ビタミン A 誘導体)の効果を検討した。活性型ビタミン D3 は、メラノサイト分化を刺激し、エンドセリン B レセプターを介して、メラニン色素の産生を助長する作用が確認された。一方、レチノイドは、メラノサイト分化を抑制し、エンドセリン B レセプターを介して、メラニン色素の産生を抑制する作用が確認された。活性型ビタミン D3 外用はメラニン色素を誘発し、白斑の治療に有効である根拠となる。トレチノイン(レチノイン酸)はメラニン色素を抑制し、色素沈着の治療に有効である根拠となる。

(2)ヒト血液からヒト iPS 細胞を作製し、メラノサイト・色素幹細胞へ効率よく分化・増殖させ、遊走能を活性化した状態で、白斑・脱色素斑・白髪皮膚へ移植する、新規治療法の確立を目指す。

通常のヒト線維芽細胞から iPS 細胞樹立ではなく、採血により獲得した血液 T リンパ球に、センダイウイルスを用い山中 4 因子を遺伝子導入したヒト iPS 細胞を入手し、培養維持している。このヒト iPS 細胞を使い、メラノサイトへの誘導をより正確にそしてより効率よく大量に増殖させる独自の条件設定が完成した(特許申請中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

深井和吉、大磯直毅、川口雅一、佐藤美保、堀田喜裕、種村篤、金田眞里、川上民裕、西村栄美、林思音、山下英俊、錦織千佳子、佐野栄紀、片山一朗、鈴木民夫：眼皮膚白皮症診療ガイドライン 補遺 日本皮膚科学会雑誌 2017;127:133-135

Goto Y, Yajima I, Kumasaka M, Ohgami N, Tanaka A, Tsuzuki T, Inoue Y, Fukushima S, Ihn H, Kyoya M, Ohashi H, Kawakami T, Bennett DC, Kato M. Transcription factor LSF (TFCP2) inhibits melanoma growth. *Oncotarget*. 2016;7(3):2379-2390 doi: 10.18632/oncotarget.6230.

大橋洋之、松岡摩耶、大石佳奈、岡野達郎、武藤真悠子、久保悠、齋藤千尋、門野岳史、川上民裕、相馬良直、生野雅也 悪性黒色腫の皮膚転移からの出血に対し経カテーテル動脈塞栓術と Mohs ペーストが有効であっ

た 1 例 *Skin Cancer* 2015;30:108-112

大塚陽子、太田口里沙子、木村聡子、川上民裕、相馬良直、夕部由規謙：肛門部悪性黒色腫 皮膚病診療 2014;36(6):559-562

Kawakami T, Ohgushi A, Hirobe T, Soma Y. Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on human epidermal melanocytes and melanoblasts. *J Dermatol Sci*. 2014; 76(1): 72-74

[学会発表](計 9 件)

廣川悠季、松岡摩耶、門野岳史、川上民裕、相馬良直：ロドデノール白斑を伴った friction melanosis の 1 例 日本皮膚科学会第 870 回東京地方会 2016 年 12 月 17 日 ソリッドスクエアホール 川崎

Hirokawa Y, Kawakami T, Matsuoka M, Kadono T, Soma Y. Rhododendrol-induced leukoderma in a patient with frictional dermal melanosis. The 27th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research (JSPCR meeting 2016) 2016, November 12-13, Gifu, Japan

Kawakami T. Unilateral nevoid telangiectasia on the lower extremity of a pediatric patient. *Pediatric Dermatology 2016 International Conference on Pediatric Dermatology 2016*, October 10-12, Manchester, United Kingdom

川上民裕. ヒト iPS 細胞由来色素細胞(メラノサイト)を使用した興味ある動物実験の結果 黒い iPS 細胞で、白斑・白髪を治す イノベーション・ジャパン 2016 -大学見本市 & ビジネスマッチング- 2016 年 8 月 25 日 -26 日 東京ビッグサイト, 東京

松岡摩耶、門野岳史、川上民裕、相馬良直. 聖マリアンナ医科大学病院における過去 11 年間の皮膚悪性腫瘍の統計 第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2016 年 5 月 28 日 かがしま県民交流センター 鹿児島

川上民裕. ヒト iPS 細胞から分化誘導した色素細胞(メラノサイト)を用いたメラニン関連疾患治療法の開発 第 79 回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会シンポジウム「色素再生」 2016 年 2 月 20 日 京王プラザホテル(新宿)

宮野薫、岡野達郎、井上彩子、黒田瑛里、白土麻澄、松浦哲彦、武藤真悠子、竹内そら、松岡摩耶、門野岳史、川上民裕、相馬良直. 巨大先天性色素性母斑に生じた悪性黒色腫の 1 例 日本皮膚科学会第 865 回東京地方会 2016 年 1 月 16 日 横浜情報文化センター 横浜

大橋洋之、松岡摩耶、大石佳奈、岡野達郎、武藤真悠子、久保悠、齋藤千尋、川上民裕、相馬良直、生野雅也. 悪性黒色腫の皮膚転移からの出血に対し経カテーテル動脈塞栓術と Mohs ペーストが有効であった 1 例 第 31 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2015 年 7 月 3 日 大阪国際会議場 大阪

川上民裕. iPS 細胞からメラノサイトを分化誘導する技術 イノベーション・ジャパン 2014 -大学見本市- 独立行政法人 科学技術振興機構 産学連携展開部 産学連携支援グループ 2014 年 9 月 11 日-12 日 東京ビッグサイト, 東京

〔図書〕(計 1 件)

川上民裕:メラノサイトの発生過程 色素細胞 基礎から臨床へ 監修 伊藤祥輔、柴原茂樹、錦織千佳子 慶應義塾大学出版会株式会社、東京、2015 年 8 月、17 - 22 頁 .

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 高分化度の多能性幹細胞由来細胞の製造方法
発明者: 川上民裕
権利者: 川上民裕
種類: 特願
番号: 2017-006673
出願年月日: 2017 年 1 月 18 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 民裕(KAWAKAMI, Tamihiro)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20297659