

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860881

研究課題名(和文)皮膚のメラニン合成、分解系におけるオートファジーの役割の解明

研究課題名(英文)Autophagy in skin pigmentation

研究代表者

楊 伶俐(YANG, LINGLI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：40711784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト表皮正常メラノサイト(NHEM)を用いて、オートファジー関連因子がメラノソーム合成への影響を観察した。オートファジー機構がメラノサイトのメラノソーム形成、成熟に関与していると考えられる。ヒト表皮正常ケラチノサイト(NHEK)を用いて、培養メラノサイトから抽出、精製したメラノソームを貪食したNHEKにオートファジー関連因子をRNA干渉法よりノックダウンし、ケラチノサイトでのオートファジーがメラノソームの分解に関与していると考えられる。NHEMとNHEKの共培養モデルを確立し、オートファジーが細胞間メラノソーム転送機構への影響を検討した結果、明らかな影響はみられませんでした。

研究成果の概要(英文)：This study tested whether autophagy is essential for skin pigmentation and how to affect the pigmentation in skin. Using normal human epidermal melanocytes (NHEMs) and normal human epidermal keratinocytes (NHEKs), the autophagy-related factors (ATG5, ATG7) were silenced, the melanogenesis-related genes and pathways were investigated in NHEMs, and the melanosome-uptake and melanosome degradation in NHEKs were also analyzed. This study demonstrated that autophagy activity affects melanosome formation and melanin synthesis in epidermal melanocytes, and autophagy is essential in melanosome degradation in epidermal keratinocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：オートファジー 色素産生 メラノサイト

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、リソソームを分解の場とする細胞内タンパク分解機構であり、すべての真核生物に保存されている生命現象である。メラノソームはリソソーム関連オルガネラで、リソソームが持つシステムを利用しながら特殊な生理機能を担うようになったオルガネラで、紫外線から我々の体を守るメラノサイト(メラニン色素を合成、貯蔵する)に存在する、メラニン含有の成熟したメラノソームはメラノサイトから表皮のケラチノサイトへ送られる。これらのオルガネラは相互に制御しながらヒトの生命活動に必須の役割を果たすため、細胞種によって、それらのオルガネラのバイオジェネシスや輸送の障害は様々なヒトの疾患を引き起こす。

メラニン色素は皮膚の基底層に存在するメラノサイト中のメラノソームにおいて産生され、成熟したメラノソームはケラチノサイトに転送されるが、メラノソームの形成およびその後のメラニンの分解についてはまだ不明である。

メラノソームは脂質二重膜で囲まれた LRO であり、メラニンの生合成はこの中でのみ行われる。滑面小胞体から分離されたプレメラノソーム(premelanosome)に、Golgi 装置を経て合成されたチロシナーゼが運ばれ、メラニン合成が開始される。メラノソームの発達段階を、メラニン沈着の程度により stage I, II, III, IV に分ける(下図)。stage IV にまで成熟したメラノソームはメラノサイトの樹状突起から隣接するケラチノサイトへ転送される。C. de Duve がリソソームを発見し、50 年が経過するが、LRO に関してはまだ不明な点が多く残されている。近年、難病である結節性硬化症(TS)で見られる白斑の形成機序としてオートファジーの低下が注目されている。我々は mTOR 阻害剤ラパマイシン外用が TSC の白斑に効果を示すことを報告した(Arch Dermatol. 2012)が、メラニン合成と mTOR の関連性は明らかではない。また、古くから知られていたオートファジー阻害剤ハイドロキノン(ヒドロキノン)はメラニン色素の合成を強力に抑制し、尋常性白斑患者の脱色治療にも使われているが、この機序もまだ不明である。申請者らがオートファジー関連因子をノックダウンした培養メラノサイトで、メラニン合成の低下が観察されたことにより、オートファジー機構がメラノサイトのメラノソーム形成、成熟に関与していると考えている。メラニンはメラノサイトからケラチノサイトへ転送され、有害な紫外線から体を守る大事なシステムである。ケラチノサイトは角化していく過程で、取り込んだメラノソームを消化分解し、角質細胞になるまでにメラノソームのほとんどが分解される。ケラチノサイトの中で、メラノソームはリソソーム構造の働きにより分解されることが明らかになったが、最近、*in vitro* 実験系でケラチノサイト内で、リソソーム関連オートファゴソーム

がメラノソームの分解に寄与することが証明され、ケラチノサイトでのオートファジーとメラノソームの分解の関連性が注目を集めている。

2. 研究の目的

近年、リソソーム関連オルガネラ(LRO)に関する研究が注目を集めている、その中で、皮膚メラノサイトのメラノソームは、メラニンの形成、蓄積、輸送に特化した LRO であり、その形成は皮膚や頭髪の色素形成に重要な役割を果たしている。申請者らは、ケラチノサイトでオートファジーの制御によりメラノソームが分解されるのに対し(Murase Det al. J Invest Dermatol. 2013)、オートファジー関連因子をノックダウンしたメラノサイトでは、メラノソームの形成とメラニン合成が低下し、オートファジー制御がメラノソーム形成および分解に関与することを見出した。そこで、本研究では、皮膚におけるメラニンの産生および分解において、オートファジー制御が果たす生理的役割と色素異常症発症での役割につき研究する。皮膚におけるメラニンの産生および分解において、オートファジーが果たす生理的役割と疾患における役割を明らかにすることにより、さらに、色素異常症の新しい治療法の開発に繋がりたいと考える。

3. 研究の方法

(1) オートファジー関連因子をノックダウンした培養細胞の解析：皮膚メラノサイト、ケラチノサイト培養細胞にオートファジー関連因子をノックダウンし、遺伝子発現パターン、メラノソーム形成、メラニン産生など機能解析することにより、各細胞種におけるオートファジーの役割を明らかにする。

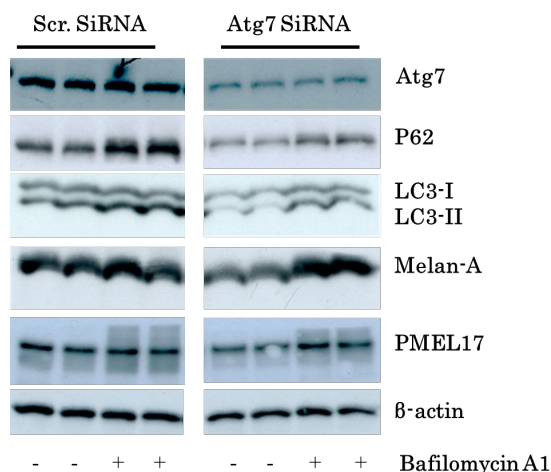
(2) メラノサイト特異的オートファジー欠損マウス、ケラチノサイト特異的オートファジー欠損マウスの解析：メラノサイト特異的オートファジー欠損マウス(MITF-Cre; Atg5 flox/flox マウス) ケラチノサイト特異的オートファジー欠損マウス(K5-Cre; Atg5 flox/flox マウス)を作成することにより、胎児から高齢に至るまでの phenotype を観察する。特に、皮膚毛髪の色素産生異常などを検索することにより、オートファジーの役割を明らかにする。

(3) 各種皮膚色素異常疾患におけるオートファジーの役割の検討：当研究室に保存されているメラノーマ、尋常性白斑、結節性硬化症白斑、伊藤白斑の組織でオートファジー活性を検討し、オートファジーと色素異常疾患の関連性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ヒト表皮正常メラノサイト(NHEM)を用いて、オートファジー関連因子を RNA 干渉法よりノックダウンし、LC3II と p62 を細胞蛍光

染色し、共焦点レーザー顕微鏡による発現を確認する、ウエスタンブロット、更に電子顕微鏡によるオートファゴゾームの形成を観察して確認した。同時に、メラニン産生関連遺伝子の発現パターン、メラノソーム合成の低下が観察された、これらの結果より、オートファジー機構がメラノサイトのメラノソーム形成、成熟に関与していると考えられる(図1)。



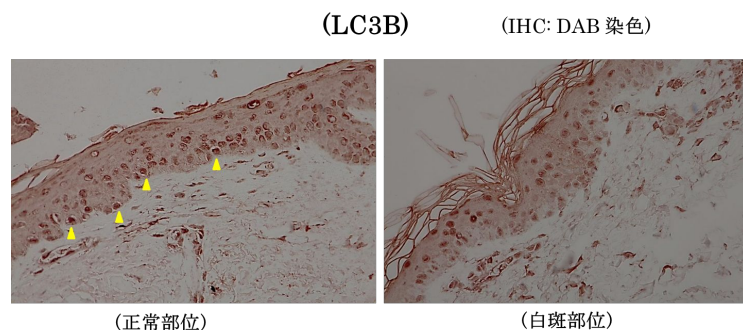
(図1)

(2) ヒト表皮正常ケラチノサイト(NHEK)を用いて、培養メラノサイトから抽出、精製したメラノソームを貪食したNHEKにオートファジー関連因子をRNA干渉法よりノックダウンし、同様にオートファジー関連遺伝子発現、オートファゴゾーム形成の変動を検討した。更に、NHEK細胞内メラニン含有量の変化も定性的に測定した。In vitro実験系でケラチノサイト内で、リソソーム関連オートファゴゾームがメラノソームの分解に寄与することが証明され、ケラチノサイトでのオートファジーがメラノソームの分解に関与していると考えられる。

(3) NHEMとNHEKの共培養モデルを確立した、オートファジー抑制剤、促進剤の投与で、メラニン産生量、細胞間メラノソーム転送機構への影響を検討した結果、明らかな影響はみられなかった。

(4) 皮膚特異的オートファジー欠損マウスにおいて、静止状態での皮膚組織学的顕著な表現型は見られなかった。飢餓状態やストレス的刺激を受けたときの皮膚反応を観察中である。

(5) 皮膚色素異常疾患におけるオートファジーの機能を明らかにするため、各種皮膚色素異常疾患の臨床検体を用いて検討している、当研究室にメラノーマ、尋常性白斑、結節性硬化症白斑、伊藤白斑の凍結組織、凍結ブロック、パラフィンブロックを用いて、組織切片の免疫染色を行っている、樹立した細胞を培養系でオートファジー関連因子を検討し、オートファジーと色素異常疾患の関連性を調べている(図2)。



(正常部位)

(白斑部位)

(図2)

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 4 件)

Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang L, Yang F, Tsuruta D, Nakamura A, Matsumoto S, Hamasaki T, Tanemura A, Katayama I. Clinical and Histologic Analysis of the Efficacy of Topical Rapamycin Therapy Against Hypomelanotic Macules in Tuberous Sclerosis Complex. JAMA Dermatol. 151(7),722-30,2015. DOI:10.1001/ jamadermatol.2014.4298.

Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I. 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma. J Dermatol Sci. 77(3), 182-5, 2015. DOI: 10.1016/ j.jdermsci.2015.01.006.

Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukai K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, Suzuki T, Katayama I. An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododendrol-induced leukoderma patients. J Dermatol Sci. 77(3), 185-8, 2015. DOI: 10.1016/ j.jdermsci.2015.01.002.

楊 伶俐, 金田 真理, 種村 篤, 片山 一朗, 白斑の新しい病因論, MB Derma (デルマ) 2016.

[学会発表](計 1 件)

Yang L, Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang F, Tanemura A, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I. Silencing of tuberous sclerosis complex (TSC) 2 via siRNA causes reduction of autophagy and impairment of melanogenesis in cultured human skin epidermal melanocytes: implication for a potential mechanism of hypopigmented macules in tuberous sclerosis complex. 2015 World Congress of Dermatology, 2015.6.8-6.13, Vancouver,

Canada.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楊 伶俐 (YANG, Lingli)

大阪大学大学院医学系研究科特任研究員

研究者番号: 40711784

(2) 連携研究者

金田 真理 (KANEDA, Mari)

大阪大学大学院医学系研究科 講師

研究者番号: 70397644

片山 一郎 (KATAYAMA, Ichiro)

大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究者番号: 80191980