

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861506

研究課題名(和文)扁平母斑メラノサイトの分子細胞生理学的解析と病態解明

研究課題名(英文)Analysis on melanocytes isolated from nevus spilus

研究代表者

江藤 ひとみ (Eto, Hitomi)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：40612594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：扁平母斑は日本では高頻度にみられる先天性の皮膚色素異常で、治療への需要が非常に高いものの、効果的な治療法がなく、その病態はほとんど解明されていない。扁平母斑は表皮メラノサイトの機能異常と考えられるため、扁平母斑メラノサイトのIn vitroでの分子生物学的解析が必要と考えた。

これまで確立されていないメラノサイトの初代培養に取り組んだ。切除皮膚を酵素で処理し、表皮から真皮を分離除去した後、細胞混濁液をメラノサイト増殖培地で培養した。播種する細胞濃度を調整することでメラノサイトの増殖が得られた。続いて扁平母斑組織からの細胞回収を試みたが、採取量が少なく初代株を得るために難渋している。

研究成果の概要(英文)：Nevus spilus is a congenital pigmentation of skin, which is seen in 10% of Japanese people. Despite of the growing demand for the improvement of the pigmentation, no specific treatment exists yet. Nevus spilus has not been studied currently, and its pathophysiological mechanism remains to be elucidated. Dysfunction of epidermal melanocytes may be implicated in the pathology, so it is necessary to study melanocytes isolated from nevus spilus with molecular biological approach, such as gene expression analysis.

I challenged the primary culture of cutaneous melanocyte, which has been reported to be difficult. Excised skin tissue was treated with enzyme, dermis was separated, and then epidermal cells were suspended and cultured with melanocyte growth medium. Successful cell growth was obtained by experimental test of cell density on culture dishes. However, we have a lot of trouble to establish primary culture of melanocytes isolated from nevus spilus skin.

研究分野：形成外科

キーワード：扁平母斑 メラノサイト

1. 研究開始当初の背景

扁平母斑(Nevus spilus)は、日本では「先天性ないし後天性に生じる、終生不変の扁平な褐色斑」と定義されている。一般的に「茶アザ」と呼ばれ、日本人では10%と高頻度で見られる。部位や大きさによっては整容的に問題になるため、多くの患者が治療を希望して来院している。しかし、整容的な障害が患者の社会生活上大きな問題となる一方で、重篤な機能障害や致命的な経過につながることはない扁平母斑は研究対象としての注目度が低く、科学的な既知の情報は非常に少ないのが現状である。そもそもその病因も不明であり、効果的な治療法は確立していない。現在選択されることが最も多いレーザー治療では、一時的な改善はあっても継続する効果は期待できず、長期的に治療を繰り返して色素沈着や脱失を生じることもある。外科的切除に踏み切った大きな瘢痕を残したり、もしくは治療を諦めるといった転帰をたどる患者も多い。

扁平母斑はカフェオレ斑(Café-au-lait macules; CALM)とも呼ばれ、神経線維腫症型(NF1)患者のほぼ100%で見られる皮膚症状としてよく知られている。NF1に伴うCALMでは、病理組織学的に表皮メラノサイトが増加しており、メラニン産生能(チロシナーゼ活性)は正常と報告されている。NF1遺伝子がコードするneurofibromin発現レベルの変化やNF1患者の真皮線維芽細胞から分泌されるサイトカインの中でHGFとSCFが増加している

ことが示唆されている [Griesser J. et al., Biol Chem Hoppe Seyler, 1995],

[Kunisada T. et al., J Exp Med, 1998]

一方、扁平母斑の単発症例では、病理組織学的に表皮におけるメラニン色素の増加以外に皮膚の構造上の異常はない。表皮基底層におけるメラノサイトの数は健常部と同じかわずかに増加している程度であり、表皮メラノサイトの機能異常、つまりメラニン産生能(チロシナーゼ活性)亢進が病態と考えられる。他の表皮色素異常である、紫外線によるメラノーシス(sunburn, suntan)、日光性色素斑(老人性色素斑)、炎症後色素沈着、脂漏性角化症、尋常性疣贅はすべて表皮基底層メラノサイトの増加を伴うことを考えると、単発扁平母斑の病態は非常に特殊といえる。メラノサイトと他の細胞(ケラチノサイトや線維芽細胞)の間にはメラニン生成に関わるサイトカイン分泌ネットワークがあることが指摘されており、さまざまな表皮色素異常ではネットワークの up-もしくは down-regulation が発見されている。扁平母斑の場合、ケラチノサイトからの Endothelin-1 分泌が亢進しているとの報告があり [Okazaki M. et al., Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 2005] メラノサイトは液性因子の影響を受けていると考えられるが、そのメカニズムは完全には解明されていない。扁平母斑は表皮基底層メラノサイトの機能的な異常(メラニン産生能亢進)が本態であると考えられるため、

メラノサイトそのものの遺伝子発現や細胞内シグナル伝達系の変化を追究することも必要だと思われるが、現状ではそのような報告はない。そもそも扁平母斑に関する基礎的な研究は非常に少なく、この5年以内の論文報告はみられない。またメラノサイトは表皮細胞の2-4%と少なく、増殖能が高くないため、ヒトメラノサイトの初代培養は困難とされている。まずは初代培養の確立が重要である。

2. 研究の目的

表皮メラノサイトの解析を *In vitro* で行うために、初代培養法を確立して解析に十分な細胞数を確保すること。扁平母斑組織から表皮メラノサイトを採取して解析すること。正常および扁平母斑組織から採取したメラノサイトの遺伝子発現やシグナル解析などを行い、扁平母斑の基礎的な病態解明を行うこと。

3. 研究の方法

顕微鏡下に皮膚組織から用手的に脂肪組織を除去した後、ディスペーゼで4下に一晩反応させ、真皮層を除去した。続いて0.075%トリプシンを加えて4時間37下シェイキングし、遠心分離して細胞懸濁液をメラノサイト増殖培地(M254 mediumにhuman melanocyte growth supplementを加えたもの、いずれもGibco)で培養した。

チロジナーゼ活性は、60mmディッシュで培養した細胞をPBSで洗浄した後1%Triton

X-100とおよび凍結融解法で溶解して上清を96-wellプレートに入れ、10mMのL-DOPAを加えた。37で1時間反応させたあと、475nmでの吸光度を測定した。

4. 研究成果

上記方法での細胞懸濁液を培養すると、ケラチノサイトとともに、樹状突起を有する接着細胞が観察され、メラノサイトと思われた。しかし少数ながら混入した線維芽細胞が有意に増殖するようになり、最終的に駆逐する減少となった。

そこで細胞懸濁液の細胞密度を変えて培養をしたところ、初回播種細胞密度を高くすることで、線維芽細胞が増殖する前に十分なメラノサイトが得られた。この細胞を継代し、P3の細胞を60mmディッシュで培養し、チロジナーゼ活性を調べたところ、コントロールセルと比較して高い吸光度値が得られ、メラノサイトであることが確認された。

メラノサイトは増殖が遅く、継代を重ねてもなかなか十分量の細胞数を得る事が難しいことが分かった。メラノサイト確認として、MITF, TYR, TRP1,2の遺伝子発現量をReal time RT-PCRで解析する事を試みたが、十分量のRNAを抽出することができなかった。

扁平母斑皮膚組織の検体は非常に量が少なく、採取できる細胞が少ないため、高い細胞密度で播種する事ができず、そこからのメラノサイト回収は十分にできていない。

今後の解析をすすめるために、メラノサイトを効率的に選択的に増幅させる方法を研

究している。例えば細胞内シグナル伝達阻害剤が培養細胞の増殖に細胞特異性に影響することに関する実験を同研究室で行っている事から、それらの因子の増殖への影響を調べている。

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0件)

〔図書〕(計0件)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

江藤ひとみ (Hitomi Eto)

杏林大学・医学部・形成外科・任期助教

研究者番号：40612594