

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08660

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来メラノサイトでの白斑治療・悪性黒色腫解明・美白物質の研究

研究課題名(英文) Various studies using human iPS cell-derived melanocyte

研究代表者

川上 民裕 (Kawakami, Tamihiro)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：20297659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非分節型(汎発型)白斑患者の非白斑皮膚におけるメラノサイトを検証した。白斑患者の非白斑皮膚から皮膚メラノサイトを単離し培養することを試みた。しかし徐々に成長が鈍くなり、十分な細胞数の獲得に繋がらない。そこで培養液にRho関連タンパク質キナーゼ(ROCK)阻害薬を添加すると、primary human skin melanocytesの樹立が成功できた。この melanocytesは、小眼球症関連転写因子(MITF)発現低下、E-cadherinなどのメラノサイト関連細胞接着因子発現低下を発見した。非分節型(汎発型)白斑患者の非白斑皮膚から獲得したメラノサイトは、正常ではないことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒトiPS細胞由来メラノサイトを使用して、白斑・悪性黒色腫など関連疾患を検討することである。ヒトiPS細胞をadvanced iDMMで培養することで、2週間で成熟ヒトメラノサイトが完成できる。この細胞を使用することで、白斑におけるメラノサイトの脆弱性や悪性黒色腫におけるメラノサイトの発癌性を解明できる。また、白斑治療では、欠損や機能不全になったメラノサイト病変部へ大量の良質メラノサイトを供給できる、悪性黒色腫治療では、患者本人からヒトiPS細胞由来メラノサイトを作成し、試験管レベルでどの免疫チェックポイント阻害薬がどの段階で有効かが把握でき、より適切な治療が確立できる。

研究成果の概要(英文)：Adding Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to the culture medium dramatically increased the yield of pure melanocytes. RT-qPCR analysis of vitiligo-derived primary melanocytes revealed significantly decreased mRNA levels of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) compared to normal melanocytes. In contrast, mRNA expression levels of stem cell factor (SCF) were significantly higher in co-culture of vitiligo-derived primary melanocytes and normal keratinocytes than in co-culture of normal melanocytes and normal keratinocyte. RT-qPCR analysis of melanocyte related adhesion molecules in vitiligo-derived primary melanocytes revealed significantly decreased mRNA levels compared to normal melanocytes. Based on these findings, we suggested that human primary melanocytes from non-depigmented skin in a patient with non-segmental vitiligo could be not normal melanocytes.

研究分野：皮膚科

キーワード：メラノサイト 白斑 悪性黒色腫

1. 研究開始当初の背景

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、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。しかし、皮膚採取部位と移植時アブレーションで創傷が広い範囲に残る、メラノサイトの単独培養増殖には時間がかかる、など問題点も多い。メラノサイトが癌化した悪性黒色腫は、免疫チェックポイント阻害薬が開発された。しかし十分な予後改善に至っておらず、より有効な治療法の確立が求められている。美白化粧品ロドデノールの薬害は、過度な美白効果から白斑を発症してしまった。美白物質への正しい評価試験開発への期待が高まっている。

これまでマウス胎仔神経管由来の様々な分化段階の皮膚メラノサイト細胞株を樹立し、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。マウス神経冠細胞に抗 TGF β 1 抗体を添加したところ、細胞増殖は抑制し Kit 発現も抑制した(Kawakami T, et al. J Invest Dermatol, 2002)、活性型ビタミン 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(Kawakami T, et al. J Dermatol Sci, 2014)、BMP4 が Kit 発現を誘導、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た。採血により獲得した血液 T リンパ球から作成したヒト iPS 細胞を使い、メラノサイトへの誘導をより正確により効率大量に増殖させる独自の条件設定が完成した(Kawakami T, et al. J Invest Dermatol, 2018)。実験動物を使用し生成されたメラノサイトの正常性を確認した。

皮膚生検からメラノサイトを分離し培養で大量産生されることは、困難な技術とされている。白斑の治療でヒトメラノサイトを白斑皮膚に移植するためには、広範囲の皮膚からでないと大量のメラノサイトが獲得できない。メラノサイトが癌化した悪性黒色腫の発症機序が不明である一因は、ヒトメラノサイトの培養が困難で細胞レベルでの検証がなされていないことが挙げられる。美白化粧品の成分を開発する際に行われる評価試験で、最も重要なデータとなるのがヒトメラノサイトに対する効果である。その対象となるヒトメラノサイト株は購入できるが、日本人由来のものがなく白人や黒人由来である。さらにロット毎にメラノサイト株を採取されたヒトが異なる。従って実験データのばらつきが多く安定性に欠ける。そのため開発時の評価試験データを信頼し過ぎると、実臨床での効果を見誤ってしまう可能性がある。本研究テーマにおける学術的「問い」に応えるのは、実臨床に活用できるオーダーメイドの正常メラニン色素を産生するメラノサイトを大量に培養することである。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞由来メラノサイトを独自の条件設定で、効率よく分化・増殖させ、大量産生に成功した(特許取得)。本研究は、この細胞のさまざまな臨床応用へのステップである。

- (1)メラノサイトの欠如・機能不全疾患である尋常性白斑や脱色素斑への移植を含めた再生医療。
- (2)メラノサイト癌化した悪性黒色腫の機序解明に使用、重要因子発見と有意義な治療法の開発。
- (3)美白化粧品主成分物質のメラノサイトへの効果を検証する美白化粧品開発に利用。

今までのメラノサイト関連研究の多くはマウスであった。本研究の対象はヒト細胞であり、治療を最終目標とした研究として最適である。しかも、採血で獲得した T 細胞から作成されたヒト iPS 細胞を使用し、安全性が高い無血清で生体物質のみの独自開発した培地を使用して、ヒトメラノサイトを産生することに成功した。採血であるので比較的容易に対象患者から採取できる、無血清かつ生体物質のみの使用であるので iPS 細胞の癌化の危惧を払拭できる、といった実際の臨床応用を想定した場合、好都合である条件下で研究をすすめている。過去の報告と比較して、メラノサイトへの分化誘導期間が短く、成熟度が高い。すでにヒト iPS 細胞から色素細胞へ分化させた報告がある(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、十分な分化を誘導していない。さらに移植に必要なメラノサイトを大量培養できる技術ではない。

3. 研究の方法

皮膚メラノサイト(色素細胞)は、メラニン色素を産生することで、ヒトの皮膚に色をつけている。そして紫外線から体を防御している。われわれは、ヒトの血液 1 滴から iPS 細胞を樹立し、独自の条件設定で、メラノサイトを効率よく分化・増殖させ、大量に iPS 細胞メラノサイトを産生することに成功した(特許取得)。この特許を獲得した独自培地(Human iPS cell-derived melanocyte medium ; iDMM)は、数週間でヒト iPS 細胞から成熟したヒトメラノサイトが産生される。開発はすすみ、advanced iDMM が完成し、ヒト iPS 細胞を advanced iDMM で培養することで、たった 2 週間でメラノサイトに分化誘導することに成功した。本研究の中心は、この短期間で大量に産生できるヒト iPS 細胞由来メラノサイトの使用である。併行して、病変皮膚から直接、培養した皮膚由来メラノサイトを使用した研究を行う。

われわれは、このヒト iPS 細胞由来メラノサイトをヌードマウス皮膚に注射し、皮膚に青～黒の色素が産生され、注射量に比例して色調が濃くなることを確認した。色素が産生された注射部位に一致して、病理組織にて正常ヒトメラノサイトが検出され、表皮にも達していた。ヒトメラノサイトをコントロールし、皮膚の“色”を自由に操れる技術である。

(1) 白斑は全人口の約 1%が罹患し、皮膚の色が消えてしまう、白くなってまだら状となる等、患者の精神的な負担は想像以上であり、QOL が著しく低下している。本研究で確立した白斑や脱色素斑への新規治療法は、有効な治療法がない現在の医療に、大きな貢献を及ぼすことが予想できる。

(2) 悪性黒色腫患者本人からヒト iPS 細胞由来メラノサイトを作成し、試験管レベルでどの免疫チェックポイント阻害薬がどの段階で有効かが把握でき、より適切なオーダーメイド治療法が確立できる。さらに、発癌機序解明・新薬開発には、正常ヒトメラノサイトの定期的な大量培養が肝要である。本研究のヒト iPS 細胞由来メラノサイトは、定期的に大量培養が可能であるのでここに貢献できる。

(3) これまで、ヒトメラノサイトの産生は、美白化粧品開発試験に使用する量に増殖することが困難で良質でないことから、データのばらつきが多く、結果として実際の使用時の信憑性に欠けてきた。美白化粧品のより安全で適切な製品を希望する患者に対して、上記方法から短期間に正常のメラニン色素を産生する患者独自のメラノサイト大量培養が可能となる。美白化粧品の開発時における評価試験で、この細胞を使用すれば、試験データが信頼できる。すなわち、患者オーダーメイドの美白化粧品を開発できる。

4 . 研究成果

美白化粧品で有名なコウジ酸をヒト iPS 細胞由来メラノサイトに添加したところ、コウジ酸はフェオメラニンを増加させて、黒色を淡く見せる効果があることがわかった。さらに、ヒト iPS 細胞由来メラノサイトとケラチノサイトの共培養系を確立 (Kawakami T et al. J Dermatol 2021) した。加えて、白斑患者から単離培養されたメラノサイト (primary melanocytes) の脆弱性と ROCK 阻害薬添加の重要性、さらに新たな概念である melanocytorrhagy などを概説した (Kawakami T et al. J Dermatol 2022) 。

一見、健全皮膚色に見える非分節型(汎発型)白斑患者の非白斑皮膚におけるメラノサイトを検証した。白斑患者 6 症例の非白斑皮膚から皮膚メラノサイトを単離し培養することを試みた。この単離培養細胞は、primary human skin melanocytes と呼ばれる。6 例中 3 例は、メラノサイトの単離培養施行中、突然の細胞死が生じるなどで樹立が困難であった。残りの 3 例は、培養可能であった。しかし、培養をすすめていくと、徐々に成長が鈍くなり、十分な細胞数の獲得に繋がらない。そこで培養液に Rho 関連タンパク質キナーゼ (ROCK) 阻害薬を添加すると、primary human skin melanocytes の樹立が成功できた。この非分節型(汎発型)白斑患者由来 primary human skin melanocytes を使用して、販売されている正常メラノサイトとの相違を検証した。評価には RT-qPCR 法を用いた。小眼球症関連転写因子(MITF)発現低下、E-cadherin などのメラノサイト関連細胞接着因子発現低下を発見した。また、販売されている正常ケラチノサイトと非分節型(汎発型)白斑患者由来 primary human skin melanocytes の共培養では、正常ケラチノサイトと正常メラノサイトの共培養と比較して、幹細胞増殖因子 (SCF) 発現増加、同様の細胞接着因子発現増加を認めた。以上から、非分節型(汎発型)白斑患者の非白斑皮膚から獲得したメラノサイトは、正常ではないことが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Ikeda T, Komatsu T, Yokoyama K, Takahashi K, Kawakami T.	4. 巻 48
2. 論文標題 Early add-on administration of mepolizumab and intravenous immunoglobulin effective in treating eosinophilic granulomatosis with polyangiitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 529-532.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15709.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawakami T, Tamura Y, Dong Y, Yoshinari M, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A.	4. 巻 48
2. 論文標題 Anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous vasculitis: possible involvement in the pathogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 703-706.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15810.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Li X, Qian H, Natsuaki Y, Koga H, Kawakami T, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii N, Hashimoto T.	4. 巻 185
2. 論文標題 Clinical and immunological findings in 55 cases of anti-laminin-332-type mucous membrane pemphigoid.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Dermatol	6. 最初と最後の頁 449-451.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.20099.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawakami T, Okiyama N, Kodera M, Seishima M, Yamaguchi Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 The relationship between anti-phosphatidylserine/prothrombin complex IgM antibodies and cutaneous ulcers in patients with cutaneous vasculitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 1457-1458.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Qian H, Natsuaki Y, Koga H, Kawakami T, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii N, Li X, Hashimoto T.	4. 巻 26
2. 論文標題 The second study of clinical and immunological findings in anti-laminin 332-type mucous membrane pemphigoid examined at Kurume University - Diagnosis criteria suggested by summary of 133 cases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 771766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.771766.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi S, Kawakami T, Okano T, Shida H, Nakazawa D, Tomaru Y, Ishizu A, Kadono T.	4. 巻 89
2. 論文標題 Elevated myeloperoxidase-DNA complex levels in sera of patients with IgA vasculitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 23-28.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000519869.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami T, Kikuchi A, Miyabe C, Ikeda T, Takeuchi S, Tamura Y, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A.	4. 巻 38
2. 論文標題 Relationship between lysosomal-associated membrane protein-2 and anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibody in pathogenesis of cutaneous vasculitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 161-165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami T, Komatsu T, Yokoyama K, Iwama E, Dong Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Establishment of co-culture of human induced pluripotent stem (iPS) cell-derived melanocytes and keratinocytes in vitro.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 123-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Yoshiyuki, Saeki Keigo, Dobashi Hiroaki, Kawakami Tamihiro, Hayashi Taichi, Kobayashi Masaki, Kaname Shinya, Harigai Masayoshi, Tamura Naoto	4. 巻 31
2. 論文標題 Clinical characteristics and social productivity levels of patients with malignant rheumatoid arthritis based on a nationwide clinical database in Japan: annual survey from 2003 to 2013	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1795390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyabe C, Nomura J, Ikeda T, Takahashi K, Kawakami T.	4. 巻 47
2. 論文標題 Skin biopsies using dermoscopy for earlier diagnosis of intravascular large B-cell lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 e276-e278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda T, Shirota Y, Iwama E, Yokoyama K, Takahashi K, Kawakami T.	4. 巻 47
2. 論文標題 Pityriasis lichenoides et varioliformis associated with anti-Ku positive refractory interstitial lung disease and dermatomyositis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 e403-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa M, Inoue Y, Kaneko S, Kanoh H, Shintani Y, Tsujita J, Fujita H, Motegi S, Pavoux AL, Asai J, Asano Y, Abe M, Amano M, Ikegami R, Ishii T, Isei T, Isogai Z, Ito T, Irisawa R, Iwata Y, Otsuka M, Omoto Y, Kato H, Kadono T, Kawakami T, et al.	4. 巻 47
2. 論文標題 Wound, pressure ulcer and burn guidelines-1: Guidelines for wounds in general, second edition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 807-833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami T, Akiyama M, Ishida-Yamamoto A, Nakano H, Mitoma C, Yoneda K, Suga Y.	4. 巻 47
2. 論文標題 Clinical practice guide for the treatment of perforating dermatosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1374-1382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kawakami T, Tamura Y, Dong Y, Yoshinari M, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A.
2. 発表標題 Anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous vasculitis: Possible involvement in the pathogenesis.
3. 学会等名 2021 Society for Investigative Dermatology Virtual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上民裕
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来メラノサイトを使用した白斑治療戦略と美白化粧品の評価試験への応用
3. 学会等名 第5回・第6回花王メラニン研究会成果報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上民裕
2. 発表標題 白斑の未来を見据えた再生治療 -メラノサイト脆弱性の克服-
3. 学会等名 第3回日本白斑学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤秀哉、横井一範、種村篤、川上民裕、市橋正光
2. 発表標題 白斑メラノサイトと正常メラノサイトの相違点 -メラニン量が多い白斑患者由来メラノサイト-
3. 学会等名 第3回日本白斑学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上民裕
2. 発表標題 白斑の再生治療とiPS細胞
3. 学会等名 第7回白斑白皮症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawakami T.
2. 発表標題 Establishment of human iPS cell-derived melanocyte as potential source for melanocyte regeneration.
3. 学会等名 The XX International Pigment Cell Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawakami T.
2. 発表標題 Dermatological perspective on eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA), including the MIRRA study (mepolizumab, an anti-IL-5 antibody treatment). Mepolizumab EGPA seminar.
3. 学会等名 The XX International Pigment Cell Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawakami T, Komatsu T, Yokoyama K, Ikeda T, Takahashi K, Dong Y.
2. 発表標題 Establishment of co-culture of human induced pluripotent stem (iPS) cell-derived melanocyte and keratinocytes in vitro.
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川上民裕
2. 発表標題 今後の治療法 白斑の病態と治療
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-004816	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------