

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08267

研究課題名(和文) 白斑における表皮メラノサイトニッチの消失と再生に関する研究

研究課題名(英文) Loss of melanocyte niche and its regeneration in vitiligo

研究代表者

片山 一郎 (KATAYAMA, ICHIRO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：80191980

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)：白斑部で発現低下を示す蛋白のスクリーニングを行い、GPNMBが基底層ケラチノサイトで消失し、IFNによりJAK2依存性に制御している可能性を見いだした(Sci Rep. 2020)。紫外線照射は容量依存性にGPNMB発現を抑制したが、SCF、TNFの発現を増強した。この蛋白をsiRNAにてノックダウンした培養ヒトケラチノサイトはSCFの発現を増強したことより、酸化ストレスと免疫応答により白斑が誘導された病変部ではメラノサイトの消失と平行してGPNMBが減少することで炎症性サイトカインの産生誘導によるメラノサイトの消失と白斑発症に関わる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白斑病変部ケラチノサイトでGPNMBの発現が低下しており、in vitroの解析でIFNがJAK2依存性にGPNMBの発現を制御していること、さらにGPNMBが細胞成長因子や炎症性サイトカインの発現制御御をしている事を見だし、現在開発が進められているJAK阻害薬の標的の一つとなる可能性を考えており、今後の白斑治療薬開発に貢献しうる成果と考える。

研究成果の概要(英文)：We screened the expression of cell adhesion related -proteins in the lesional skin of vitiligo and found that melanocyte marker protein, GPNMB is expressed in basal keratinocytes of the normal skin and disappeared in the vitiligo skin under possible regulation by IFN induced -JAK2 confirmed by in vitro study (Sci Rep. 2020 Mar 18;10(1):4930). UV irradiation significantly downregulated GPNMB expression in a dose dependent fashion with upregulated expression of SCF and TNF. In addition to UV stress, knockdown of GPNMB in keratinocyte by siRNA significantly upregulated SCF production which is confirmed by RT-PCR and WB analysis. These results suggest that induction of vitiligo through stress and/or autoimmune mediated melanocyte loss in the vitiligo is correlated with increased inflammatory cytokine production possibly related to decreased expression of GPNMB by keratinocytes and provide new therapeutic strategies for the refractory vitiligo.

研究分野：皮膚科学関連

キーワード：酸化ストレス メラノサイトニッチ 細胞接着 肥満細胞 GPNMB

1. 研究開始当初の背景

尋常性白斑は後天性白斑の中で最も頻度が高いが、治療抵抗性で、再発頻度も高い難治性の疾患であり、発症部位により患者の QOL を著しく低下させ、社会活動も障害するが、その本態は不明であり、病因論に基づく有効な治療薬の開発へのニーズが高い。正常ヒト色素細胞は胎生期に神経管から C-Kit を介して皮膚に遊走し、毛嚢バルジ領域に存在するとされる Niche を介して皮膚表皮基底層に一定の間隔で分布するとされているが、白斑など後天性の色素脱失症における色素細胞の再分布、局在を調節する機構は不明であり、その解析は白斑の新たな治療を可能にするのみならず、紫外線発がんや老化に伴う機能異常の予防など新たな創薬のシーズを提供しうると考える。

2. 研究の目的

正常ヒト色素細胞は胎生期に神経管から C-Kit を介して皮膚に遊走し、毛嚢バルジ領域に存在するとされる Niche を介して皮膚表皮基底層に一定の間隔で分布するとされているが、白斑など後天性の色素脱失症における色素細胞の再分布、局在を調節する機構は不明であり、その解析は白斑の新たな治療を可能にするのみならず、紫外線発がんや老化に伴う機能異常の予防など新たな創薬のシーズを提供しうると考える。本研究では先ず、正常皮膚表皮基底層でのメラノサイトとケラチノサイトの共存部位(メラノサイトニッチと仮称)の検討を免疫組織学、プロテオミクスなどを用いて網羅的に検討し、メラノサイトのニッチからの遊離・消失機構を明らかにする。さらに、ロドデンドロール白斑モデルマウスを用いて、ニッチの消失とメラノサイトの遊離制御に対する新たな外用抗酸化剤の評価を行い、経皮膚抗酸化外用薬の創薬を目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではメラノサイトとケラチノサイトの共存する部位をニッチと規定し、「表皮基底層でのニッチの存在の証明とその分解機序」「メラノサイトの基底層からの遊離後の Dendritic cell (メラノソーム、パーベック顆粒を持たない樹状細胞)によるニッチ占拠の証」「ロドデンドロール白斑モデルマウスでニッチ構成分子の消失を標的とした経皮膚的抗酸化治療薬の開発」を目指す。

(1) メラノサイト 色素細胞の同定とヒトでの表皮メラノサイトニッチの検討

白斑部表皮を色素細胞のマーカー(抗 TRP, 抗 MITF)による免疫染色法、免疫電顕法により確認する。色素脱失部中心から辺縁は比較的発症早期から後期のメラノサイトが存在すると考えられ、経時的な変化を捉えることが可能と考えられる。合わせて白斑部で増加している樹状細胞(メラノソームを欠く)に関して、ランゲルハンス細胞のマーカー(CD1a, CD207)とメラノサイトのマーカー(Melan A, Pmel17)を用いて、免疫染色および免疫電顕にて確認する。現在、白斑部ではメラノサイトの E-カドヘリンの発現低下がメラノサイトの消失の誘因と考えられているがメラノサイトとの接着に関わると考えられる表皮基底層ケラチノサイト、基底膜領域蛋白の発現動態は不明である。そこで表皮幹細胞マーカー(Lgr6, Krt6B, Podoplanin)、表皮 Transient amplifying cell マーカー、(6-Integrin, E-FABP)、メラノサイトマーカー(GPNMB, Ecadherin)、基底膜蛋白(Col17A1, Laminin V, 4-Integrin)などを免疫染色、可能であればプロテオミクス解析にて検討し、消失蛋白とメラノサイトの関係を解析する。

(2) マウスにおけるメラノサイトニッチの消失機序の検討

正常マウスではメラノサイトは毛嚢、耳介、尾部では皮膚表皮基底層にもみられる。 *In vivo* および3次元培養 *ex vivo* モデルを用い、(1)-3 で得られた分子を siRNA よりノックダウンし、発現低下させた後に、メラノサイトが表皮基底層から遊離するか検討する。毛髪老化によるミニチュア化では、毛嚢幹細胞由来のプロテアーゼによる毛嚢バルジ領域の基底膜の Col17A1 の分解亢進が関与していることが報告されている (Matsumura H, et al. Science 2016 5;351(6273):aad4395)。我々は白斑病変部において肥満細胞の増加を確認しており、肥満細胞由来のトリプターゼ投与による同様の検討を行う。我々は現在正常ヒトメラノサイトとケラチノサイトの共培養の系(写真)で両細胞の接着とメラノソーム移送の検討を行っている。この系を用いて(1)-3 で得られた分子を siRNA によりノックダウンし、その接着能、メラノソーム移送への影響を検討する。また FACS にてこれら分子の発現ケラチノサイトを回収し、共培養を行い、同様の検討を行う。

(3) ロドデンドロールによる白斑モデルでのメラノサイトニッチの動態解析

美白化粧品ロドデンドロールにより白斑が誘発され、またそのマウスモデルが報告されている。

(Abe Y, et al. J Dermatol Sci. 2016 ;81:35-43) 今回の検討では正常マウスの耳介、尾部にロドデンドロールを Abe 等の報告に基づいて塗布し、その経過でのメラノサイトニッチマーカの消失と基底層からのメラノサイトの遊離を検討する。

ロドデンドロールによる白斑モデルでの治療介入

(4) マウスモデルでのメラノサイト消失に対する抗酸化剤の効果の検討

最近、代表的な皮膚の自己免疫疾患である汎発性白斑においてミトコンドリアの機能障害による酸化ストレスの亢進による活性酸素の増加が白斑の進展に関与し、その理由として miR-211 の低下が報告されているがその機序は不明であり、抗酸化物質の全身投与の効果も不定である (Sahoo A, et al. J Invest Dermatol. 2017 137(9):1965-1974.)。我々は現在、ショウガなどいくつかの植物由来成分の抗酸化作用を検討しており、そのいくつかで Nrf2 の誘導による抗酸化作用を確認している。ロドデンドロール白斑マウスモデルを用いて植物由来新規抗酸化外用薬の開発とその応用を検討する。マウスモデルに植物由来成分含有ローションを外用し、メラノサイトニッチ消失予防効果とメラノサイトの遊離阻止効果を検討する。可能であれば紫外線との併用効果を医師主導治験への展開と皮膚老化防止外用薬としての応用を検討する。

4. 研究成果

白斑部で発現低下を示す蛋白のスクリーニングを行い、メラノサイトマーカーである GPNMB が基底層ケラチノサイトにも存在し、*in vitro* 解析で IFN により JAK2 依存性に白斑部で消失している可能性を見いだした (Sci Rep. 2020 Mar 18;10(1):4930)。紫外線ストレスは単独では容量依存性に GPNMB 発現を抑制したが、逆に SCF、TNF の発現を増強した。さらにこの蛋白を siRNA にてノックダウンした培養ヒトケラチノサイトは SCF の発現を増強した。これらの結果より、酸化ストレスと免疫応答により白斑が誘導された病変部ではメラノサイトの消失と平行して GPNMB が減少することで炎症性サイトカインの産生誘導によるメラノサイトの消失と白斑発症に関わる可能性が考えられた。

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 0件）

1. 著者名 Biswas KB, Takahashi A, Mizutani Y, Takayama S, Ishitsuka A, Yang L, Yang F, Iddamalgoda A, Katayama I, Inoue S.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 GPNMB is expressed in human epidermal keratinocytes but disappears in the vitiligo lesional skin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61931-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yang F, Yang L, Wataya-Kaneda M, Teng L, Katayama I.	4. 巻 15(1)
2. 論文標題 Epilepsy in a melanocyte-lineage mTOR hyperactivation mouse model: A novel epilepsy model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0228204.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0228204. eCollection 2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takafuji M, Tanemura A, Katayama I.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 An Extremely Rare Case of Leukoderma Induced by Cosmetics Containing Ascorbic Acid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Rep Dermatol.	6. 最初と最後の頁 86-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000499031. eCollection 2019 Jan-Apr.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ha D, Tanaka A, Kibayashi T, Tanemura A, Sugiyama D, Wing JB, Lim EL, Teng KWW, Adeegbe D, Newell EW, Katayama I, Nishikawa H, Sakaguchi S.	4. 巻 116
2. 論文標題 Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 609-618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1812186116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bae JM, Oh SH, Kang HY, Ryoo YW, Lan CE, Xiang LH, Kim KH, Suzuki T, Katayama I, Lee SC; East Asia Vitiligo Association.	4. 巻 32
2. 論文標題 Development and validation of the Vitiligo Extent Score for a Target Area (VESTA) to assess the treatment response of a target lesion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pigment Cell Melanoma Res.	6. 最初と最後の頁 315-319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcmr.12730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yang F, Yang L, Wataya-Kaneda M, Hasegawa J, Yoshimori T, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I.	4. 巻 89
2. 論文標題 Dysregulation of autophagy in melanocytes contributes to hypopigmented macules in tuberous sclerosis complex.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 155-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2017.11.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yang F, Yang L, Wataya-Kaneda M, Yoshimura T, Tanemura A, Katayama I.	4. 巻 138
2. 論文標題 Uncoupling of ER/Mitochondrial Oxidative Stress in mTORC1 Hyperactivation-Associated Skin Hypopigmentation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 669-678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2017.10.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto A, Murota H, Terao M, Katayama I.	4. 巻 138
2. 論文標題 Attenuated Activation of Homeostatic Glucocorticoid in Keratinocytes Induces Alloknesis via Aberrant Artemin Production.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1491-1500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.02.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yang L, Yang F, Teng L, Katayama I.	4. 巻 21
2. 論文標題 6-Shogaol Protects Human Melanocytes against Oxidative Stress through Activation of the Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 3537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103537.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto A, Yang L, Kuroda Y, Guo J, Teng L, Tsuruta D, Katayama I.	4. 巻 22
2. 論文標題 Local Epidermal Endocrine Estrogen Protects Human Melanocytes against Oxidative Stress, a Novel Insight into Vitiligo Pathology.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010269.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yang L, Wong P.M, Yang L, Katayama I, Wu H, Zhang H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Vitiligo effectively treated with electrocautery needling technique.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dermatol Ther.	6. 最初と最後の頁 e14154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dth.14154. Epub 2020 Aug 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda M, Sekiguchi A, Kishi C, Toki S, Arase N, Takahashi A, Yang F, Tanemura A, Hayashi M, Abe Y, Hamada T, Suzuki T, Katayama I, Ishikawa O.	4. 巻 99
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of rhododendrol-induced leukoderma in improved and aggravated cases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 140-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.06.011. Epub 2020 Jun 29.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oiso N, Yang L, Tsuruta D, Katayama I, Kawada A.	4. 巻 34
2. 論文標題 Nevus depigmentosus following the Blaschko lines with the robustly activated mTOR pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Eur Acad Dermatol Venereol .	6. 最初と最後の頁 e410-e412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.16348. Epub 2020 May 8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	楊 伶俐 (YANG LINGLI) (40711784)	大阪市立大学・大学院医学研究科・特任准教授 (24402)	

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
---------	---------