

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08794

研究課題名(和文)色素細胞に対するZEB2の役割

研究課題名(英文)The role of ZEB2 in melanocytes

研究代表者

寺石 美香(Teraishi, Mika)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40437736

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)：Mowat-Wilson症候群患者は毛髪が茶色であることが多い。メラニン分析の結果、健常日本人と比較して患者毛髪はメラニン総量が少なく、黄色ないし赤色色素であるフェオメラニンと褐色色素であるユーメラニンの比が高く、フェオメラニンの絶対量が多いことが分かった。このメラニンの化学変調が本疾患の責任遺伝子ZEB2の変異に基づくか否かを培養ヒトメラニン細胞を用いて検討した。CRISPR-Cas9システムによりZEB2変異を誘導した培養ヒトメラニン細胞は総メラニン量の減少とフェオメラニン/ユーメラニン比の増加を示し、ZEB2がメラニンの化学フェノタイプの決定に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ZEB2はメラニン細胞の遊走、分化、増殖に必須の遺伝子であることが知られているが、メラニン色素産生における役割は不明である。本遺伝子の変異が色素フェノタイプ変調を誘導することを証明すれば色素フェノタイプ決定の新たな機構が明らかとなり、色素異常症の治療標的にもなり得る。

研究成果の概要(英文)：Patients with Mowat-Wilson syndrome caused by de novo heterozygous mutation of the ZEB2 gene, shows light brown hair. Chemical analysis of melanin revealed that the total amount of hair melanin of the patients was decreased and the ratio of pheomelanin/eumelanin as well as the absolute amounts of pheomelanin were increased. To investigate the effect of ZEB2 gene knockdown of melanocytes on melanin chemical phenotype change, we used the CRISPR-Cas9 system to generate melanocytes with the ZEB2 gene knocked down. We found that human epidermal melanocytes with ZEB2 knockdown had reduced total amount of melanin and increased ratio of pheomelanin/eumelanin. Our results indicated the possible involvement of ZEB2 in regulation of melanin chemical phenotype.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Mowat-Wilson症候群 メラニン細胞 ZEB2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メラニン是非常に身近で認知度の高い生体成分でありながら、その構造や化学的性状について分かっていないことが多い。メラノサイトは、神経堤より上皮-間葉移行した細胞が、表皮基底層や毛髪の毛母細胞へ遊走し、分化したものである。上皮-間葉移行に關与する ZEB2 遺伝子の変異によって発症する Mowat-Wilson 症候群 (MOWS) 患者は、色白で茶髪であることが多く、メラニン合成異常が色調の変化を誘導している可能性が示された。MOWS 患者におけるメラノサイトの機能を検討することで、ZEB2 のメラノサイトにおける新たな制御機能を明らかにし、尋常性白斑や悪性黒色腫の新規治療法の創出を目指す。

### 2. 研究の目的

表皮基底層や毛髪に存在するメラニンは、紫外線による悪性腫瘍の発生抑制を行う重要な生体成分であるが、その構造や性状、合成から輸送までのシステムなど、未だ解明されていない点が多い。メラニンを合成するメラノサイトは神経堤由来の細胞であるが、近年、マウスを用いた研究で、神経堤細胞の遊走に關与する ZEB2 遺伝子が、メラノサイトの遊走や分化に關与すると報告された。申請者は ZEB2 遺伝子の de novo 変異をもつ MOWS 患者の皮膚および毛髪の色調が薄い事を見出している。本研究は MOWS 患者の皮膚および毛髪のメラニン、メラノサイトの異常を解析し、メラノサイトにおける ZEB2 遺伝子の役割を明らかにして色素異常症や悪性黒色腫などの新規治療につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 患者および健常人の毛髪メラニン分析

患者 22 名と年齢を合わせた健常人 24 名の毛髪のメラニン分析を行った。毛髪を水中でホモジナイズし、ソルエン 350 で可溶化したものをサンプルとし、500nm における吸光度を測定し、メラニン総量の指標とした。さらに、毛髪をホモジネートでアルカリ性過酸化水素により酸化して得られる pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid (PTCA) とヨウ化水素酸により還元的に水解して得られる 4-amino-3-hydroxyphenylalanine (4-AHP) をそれぞれユーメラニン、フェオメラニンのマーカーとした。

#### (2) ZEB2 ノックダウンメラニン細胞のメラニンケミカルフェノタイプ変調の検討

ZEB2 siRNA を用いて正常メラニン細胞の ZEB2 ノックダウン実験を行った。Medium254 培地で培養した Normal human epidermal melanocyte (new born) NHEM(NB) Asian/Caucasian(クラボウ)を用いて、ZEB2 siRNA を用いた ZEB2 ノックダウンにより、メラノサイトの成熟やメラニン合成誘導のマスター遺伝子である MITF や、その下流にあるメラニン合成に必須の酵素 Tyrosinase (TYR)、Tyrosinase-related protein1 (TYRP1) の遺伝子および蛋白発現を調べた。ZEB2 siRNA (Invitrogen) をトランスフェクト (Invitrogen lipofectamine transfection kit 使用) し、24, 48, および 72 時間後に回収したメラノサイトから mRNA を抽出し、rt-PCR にて ZEB2, TYR, TYRP1 の発現を評価した。Western blot にて ZEB2, MITF, TYR の蛋白発現を検討した。

正常ヒトメラニン細胞の ZEB2 ノックダウンでは ZEB2 蛋白発現が低下しなかったため、ヒトメラノーマ細胞株を用いた検討を行った。ヒトメラノーマ細胞株 HMV

に CRISPR-Cas9 システムを用いて *ZEB2* 遺伝子変異を導入することを試みた。毛髪のコルメラニン/フェオメラニン比の顕著な低下を示す患者に同定された *ZEB2* 遺伝子の変異部位をターゲットにして sgRNA をデザインし、ピューロマイシン耐性遺伝子および GFP 遺伝子をマーカーとして搭載したプラスミド DNA をリポフェクタミンにより HMV 細胞に導入した。GFP 導入細胞はフローサイトメトリーによりソートし、96 ウェルプレートで単細胞から培養して 34 クローンを得たが、PCR 法にて変異の入った *ZEB2* 遺伝子は検出できなかった。ピューロマイシン導入細胞はピューロマイシン添加により選択された細胞を限界希釈法により単細胞から培養し、44 クローン得た。このうち PCR 法にて *ZEB2* 遺伝子変異の導入を確認できた 4 クローンについてメラニン分析を行った。

メラノーマ細胞のメラニン量にはばらつきが大きかったため、正常メラニン細胞を再度評価した。Cas9 ribonucleoprotein(RNP) complex を用いて electroporation により *ZEB2* 遺伝子に変異導入を試みた。electroporation 後の細胞をそのまま培養し、メラニン分析に必要な  $1 \times 10^6$  個まで増やしてからメラニン分析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 患者は健常人と比較して 500nm における吸光度が有意に低く ( $0.15 \pm 0.053$  vs  $0.175 \pm 0.033$ ,  $p=0.03$ )、患者の毛髪はメラニン総量が少ないことが示された。また患者では健常人と比較して PTCA は有意に低く ( $160.7 \pm 51.8\text{ng/mg}$  vs  $194.3 \pm 27.5 \text{ ng/mg}$ ,  $p=0.0053$ )、4-AHP は有意に高かった ( $20.8 \pm 28.49\text{ng/mg}$  vs  $2.91 \pm 1.58\text{ng/mg}$ ,  $p=0.0039$ )。以上より MOWS 患者は毛髪のコルメラニン総量が少なく、フェオメラニン/コルメラニン比が高く、フェオメラニンの絶対量が多いことが、髪色が茶色いことの原因であると考えられた。

(2)

*ZEB2* siRNA トランスフェクション後のメラノサイトにおいて、24, 48, 72 時間後いずれにおいても *ZEB2* 蛋白の低下は認めなかった。同様に MITF, TYR 蛋白にも影響がみられなかった。

*ZEB2* 変異を有するメラノーマ細胞株は正常メラノーマ細胞株に比べ、PTCA ( $6.8 \pm 2\text{ng/mg}$  vs  $33.2 \pm 10.6\text{ng/mg}$ )、4-AHP ( $74.1 \pm 21.5\text{ng/mg}$  vs  $339.8 \pm 101.5\text{ng/mg}$ ) とも有意に低下していたが、4-AHP/PTCA 比 ( $10.9$  vs  $10.9$ ) には差がなかった。またメラノーマ細胞株のコルメラニン量にはばらつきが大きかった。

*ZEB2* 変異を有する正常メラニン細胞は野生型と比較して PTCA ( $1058\text{ng/mg}$  vs  $3055\text{ng/mg}$ )、4-AHP ( $561\text{ng/mg}$  vs  $757\text{ng/mg}$ ) ともに低く、4-AHP/PTCA 比 ( $0.53$  vs  $0.25$ ) は高かった。

#### <まとめ>

1) MOWS 患者の毛髪が赤色から茶色であるのは、メラニン総量の低下とともにフェオメラニンが増加しており、フェオメラニン/コルメラニン比が大きいことによることが示された。

2) 患者の毛髪にみられたメラニンの化学型変調が、疾患責任遺伝子 *ZEB2* の変異を導入したメラニン細胞において再現されるかどうかを検討した。CRISPR-Cas9 を用いて *Zeb2* をノックダウンしたメラノーマ細胞株ではコルメラニン、フェオメラニン

ともに減少し、フェオメラニン/ユーメラニン比には差を認めず、患者毛髪のようにフェオメラニン優位とはならなかった。Cas9 RNP complex により *ZEB2* をノックダウンした正常ヒトメラニン細胞においてはフェオメラニン/ユーメラニン比が野生型に比較して高い傾向を認めた。ただし、メラニン分析に要する細胞数を得るために、変異導入後も培養を継続したため、*ZEB2* 変異により細胞増殖が著しく低下した場合、選択的に増殖した変異が導入されなかった細胞のフェノタイプを見ている可能性が否定できない。今後、変異導入後すみやかに回収した細胞で再検を行うこととする。

< 結語 >

*ZEB2* 遺伝子変異により、メラノーマ細胞株でも正常ヒトメラニン細胞でもメラニン総量は減少した。*ZEB2* 遺伝子変異メラノーマ細胞株では MOWS 患者毛髪のようなフェオメラニン優位となる傾向は確認できなかった。ヒトメラニン細胞では *ZEB2* 遺伝子変異によりフェオメラニン優位の傾向がみられた。今後、変異が導入されていることを確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本真有子、柴田夕夏、寺石美香、大湖健太郎、中島喜美子、若松一雅、伊藤祥輔、佐野栄紀
2. 発表標題 Mowat-Wilson症候群患者の毛髪メラニン分析
3. 学会等名 第118回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Yamamoto, Y. Shibata, M. Teraishi, K. Ohko, K. Nakajima, K. Wakamatsu, S. Ito, S. Sano
2. 発表標題 Alteration in hair eumelanin and pheomelanin in patients with Mowat-Wilson syndrome
3. 学会等名 第44回日本研究皮膚科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本真有子、柴田夕夏、寺石美香、大湖健太郎、中島喜美子、若松一雅、伊藤祥輔、佐野栄紀
2. 発表標題 ZEB2のメラニン合成への関与
3. 学会等名 第3回日本白斑学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔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	中島 喜美子  (Nakajima Kimiko)  (20403892)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授    (16401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山本 真有子 (Yamamoto Mayuko)  (20423478)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教  (16401)	
研究分担者	柴田 夕夏 (Shibata Yuka)  (60795186)	高知大学・医学部附属病院・医員  (16401)	
研究分担者	佐野 栄紀 (Sano Shigetoshi)  (80273621)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授  (16401)	

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