

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34204

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650239

研究課題名(和文) 視聴覚に関わる脈管系の維持に色素細胞は必須か？

研究課題名(英文) Are melanocytes involved in the blood vessel structure of the mouse uvea and the stria vascularis ductus cochlearis?

研究代表者

山本 博章 (Yamamoto, Hiroaki)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：40174809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：神経冠(堤)に由来する色素細胞・メラノサイトの前駆細胞は高い移動能を持ち、皮膚だけでなくブドウ膜、内耳、心臓、脳、脂肪組織、肺等にも分布する。しかしながら皮膚以外のメラノサイトがどのような役割を果たしているか、多くは不明である。これらを明らかにすることは、メラノサイトの機能進化の解明だけでなく、色素異常に伴う未知の疾病の発見につながり、また当該動物をヒトの疾患モデル動物として利用することを可能にする。メラノサイトを分化させられないマウスMitfmi-bwアレルを用いた形態学的また組織化学的解析は、ブドウ膜メラノサイトが当該領域の脈管系の構造に関わることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Melanocytes originate from the neural crest, a vertebrate-specific embryonic cell population, and migrate to a variety of tissues and organs, including the skin, choroid, inner ear, heart, brain, adipose tissue, lung, etc. Although the functions of skin melanocytes are well analyzed, the roles of those extracutaneous melanocytes scattered all over the body, where only a very small fraction of light illuminate their existence, are scarcely understood. It is significant to elucidate such roles and functions in order not only to uncover the functional divergence of these pigment cells during evolution but also to help us find those accompanied symptoms with pigment disorder, which then lead to make such mouse coat color mutants important disease model animals. Morphological and histochemical studies using a recessive mouse coat color allele Mitfmi-bw that impairs melanocyte differentiation suggest that melanocytes may be involved in the structure of the uveal blood vessel structure.

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：色素細胞 脈管系 マイクロCT

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の皮膚や毛髪の色を決めるメラニン色素を合成する色素細胞・メラノサイトは、胚発生時の神経冠(堤)に由来する。この前駆細胞・メラノブラストは移動能の高い細胞集団で、全身に移動し定着するが、皮膚以外での機能はほとんど解析が進んでいない。それら組織や器官には、強い太陽光が直接照射されることがない内耳や心臓等も含まれる。

(2) これら皮膚以外に定着するメラノサイトの機能は何か？ ほとんど解析が進んでいない。少なくとも皮膚における当該細胞の機能としてよく知られる紫外線防御機能等は、当該組織や器官では大きな意義を持つとは考えにくい。

(3) 我々のグループの予備的観察では、内耳や眼球の外側を覆う脈絡膜に密集して分布するメラノサイトは、脈管系と取り囲むような位置取りを示す。この領域の構造がメラノサイトの有無によって影響を受けるか否か、明らかになっていない。なお我々は内耳色素細胞が、酸化ストレス耐性に重要な役割を果たす Gsta4 タンパク質(glutathione S-transferase)を特異的に高発現していることを発見し、この細胞が激しい酸化ストレスに晒されている可能性を強く示唆した(Uehara ら、2009)。この遺伝子の発現は、皮膚メラノサイトでは検出できない。従って、メラノサイトは、それぞれの定着場所によって、皮膚とは異なる機能を発現している可能性が予測される。

(4) もし上記脈管系構造の構築とその維持にメラノサイトが必要であれば、色素疾患に随伴する未知の疾患が隠されている可能性がある。

2. 研究の目的

(1) まずマウス成体の内耳と脈絡膜における脈管系とメラノサイトの共存が、当該

領域の構造に影響を与えるか否か、当該領域の高次構造の解析を詳細に行う。

(2) もし両者の共存が当該領域の高次構造の構築や維持に必要であることが予想された場合には、これら領域における脈管系の構築過程とメラノサイトの侵入過程に相関があるか否か明らかにする。

(3) 脈管系とメラノサイトの強局在の様態を培養系で再現できる系を開発する。

3. 研究の方法

(1) 完成された内耳血管条と脈絡膜における、脈管系とメラノサイト共局在構造の解析
メラノサイトの有無によって当該組織の高次構造がどのような影響を受けるか、まず光学顕微鏡を用いて詳細に観察した。用いたマウスは次の系統である。

C57BL/6 コントロール：

黒眼黒毛色。内耳と脈絡膜メラノサイトは正常。

C57BL/6-*Mitf^{mi-bw}*/ *Mitf^{mi-bw}*：

黒眼白毛色。RPE(網膜色素上皮)は正常分化。メラノサイト欠損。研究室のオリジナルミュータント(Yajima *et al.*, 1999)。*Mitf* 遺伝子は転写因子をコードし、野生型の眼球では網膜色素上皮とメラノサイトで発現。本変異体はメラノサイト特異的なアイソフォーム発現を欠損するため当該細胞が分化できない。劣勢の変異体である。

(2) 続いて、上記変異体間で血管のネットワークに差があるか否か、マイクロCTを用いて解析する。この際、造影剤を用いてイメージングを行う。

(3) 前述と同じマウス系統を用いて、神経冠(堤)からメラノサイトの芽細胞(メラノブラスト)が移動を開始する受精後9.5日前後から、日を追って内耳と眼の領域の凍結切片を作成する。メラノブラストについては *Dct* 遺伝子を早いマーカーとして用いる。

(4) 血管培養系における解析
種々の血管形成における脈管形成と血管新

生の両方を観察できる培養システムが開発されているので、その系にメラノサイトを加えることにより、その効果を解析する。

4. 研究成果

(1) 内耳血管条と脈絡膜における、脈管系とメラノサイト共局在構造の解析

我々の先行研究で、例は少ないものの、メラノサイトを欠損する前記変異体では、脈絡膜において脈管系の配行が「疎」になる現象に気付いていた。今回はこれが再現性良く観察されるか否かが大きな課題であった。その結果、この観察はほぼ正しいことがわかった。

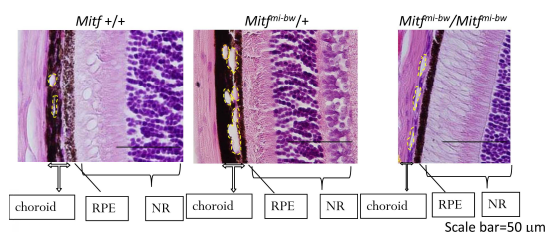


図1. マウス脈絡膜の構造

マウスメラノサイトを欠損する変異体(*Mitf^{mi-bw}/Mitf^{mi-bw}*)では脈管系(点線で囲まれた部分)の断面が「ひしゃげた」ようになる。

内耳においても同様の手法でまず光学顕微鏡像の観察を試みた。内耳血管条は脈管系に富む微小な領域で、眼球外側に位置する脈絡膜に比べてはるかに小規模の組織であり、渦巻管の骨に埋もれている。脱灰操作を経て当該領域にアクセスする必要があることから当該技術に習熟する必要があることがわかった。幸いリンパに富み、壊れやすいこの領域を再現性良く観察できるようになったが、光顕レベルの観察では、野生型、変異体両者の詳細な形態比較は十分でないことがわかった。電子顕微鏡による観察が今後の課題として残った。

次に当該領域のCT再構築像であるが、この取得には多くの試行錯誤を加えた。条件設定は、内耳に比して大きな組織の脈絡膜をまず対象に行った。脈絡膜は眼球の外側を覆っているため、眼窩に埋もれたままでは周囲の

骨に邪魔されてCT像の取得ができない。勢い眼球の摘出を行うことになった。その際、予備的解析から、通常ヒトの診断に用いるような粘度の低い実験動物用造影剤では、眼の摘出時に漏れ出して、当該試薬の保持が難しいことがわかってきた。そこで、還流固定後に導入し、しばらくして固化する置換型の造影剤を使用することになった。できるだけ使用マウス個体数を削減するために、条件設定に時間を費やした。その際考慮すべきは次の点であった。

- 造影剤の種類：置換型の造影剤で、有色のマイクロフィルを用いることにした。
 - 導入速度：粘度が比較的高いため、再現性をよくするためにペリスタポンプを用いたが、生理食塩水の1xG相当の還流速度より低く設定する必要がある。導入中にも少しずつ硬化を始めるためと思われる。
 - 造影剤使用量：前記と関連するが、脈管系末端まで十分行き渡らせるために過剰量の造影剤を用いると、脈絡膜の有窓領域から漏れるだけでなく、アーティファクトと思われる多数の固化造影剤が脈管系ネットワークにオーバーラップして再構築像に反映されてしまう。
- これらを検討し、比較的良好な再構築像が得られるようになった。

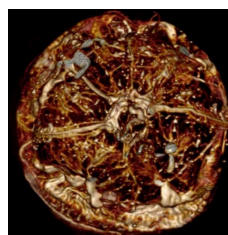


図2. *Mitf^{mi-bw}*ヘテロマウスの脈絡膜脈管系
右眼を視神経側から眺めたCT像

この条件で野生型と変異体の比較解析を開始した。定性的には、前述通り、変異体は脈管系の配行が貧弱に見えることがわかったが、さらに観察数を増やし、それを数値化して比較することが、次の課題として残された。脈絡膜に比して非常に細い血管が走行する

内耳血管系においては、満足な CT 像を得るために継続した努力が必要な状況である。それでも比較的「太い」血管は観察できるようになった。CT 像だけでなく、より粘度の低い樹脂等を用いて、固化後に周囲の骨や組織を取り除いて後、SEM 等で観察する手法も検討する価値がある。

(2) 脈管系の構築過程とメラノサイトの侵入過程に相関があるか否か、についてはマーカーとして利用する予定であった *Dct-LacZ* トランスジェニックマウスで、かつ前記変異アレルをホモに持つ個体数が少なく、十分な解析が行えなかったが、両者の相関があることを示唆する結果を内耳において得つつある。

(3) 血管培養系においては、タイプの異なるコラーゲンを用いて培養条件の検討を継続して行っており、当初予定した期間より時間がかかっている。

二年間の計画において、当初、初年度に利用できると計画した変異体のホモ接合体の個体数が、期待通りに得られず、組織化学的な解析を始め、全体に計画が2年目にずれ込んだ。2年目に入って当該個体数が比較的安定的に得られるようになったが、本研究目的の第一のステップの組織化学的解析に時間を要することとなった。しかしこれらの解析から、実験開始前の予備的な観察はほぼ正しいことを、特に脈絡膜について明らかにできたことは大きな収穫で、さらにマイクロ CT の再構築像取得に大きな改善を見たことは大変重要な成果であった。これらをもとに、機会を得て将来の展望につなげていきたい。

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 1 件)

山本 博章 色素細胞の多様な機能発現について
Frangrance Journal 査読無 vol. 40, 2012,

pp. 37 - 40

[学会発表](計 2 件)

山本 博章、上原 重之、澁谷 仁寿
マウスを用いた色素細胞新機能の探索
日本実験動物科学技術さっぽろ 2014(招待講演)
2014年5月15日~2014年5月17日(札幌コンベンションセンター)

山本 博章
色素細胞の発生と機能発現機構、環境ストレス緩和
日本香粧品学会(招待講演)
2012年06月07日
有楽町朝日ホール

[図書](計 件)

[産業財産権]
○出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本博章 (YAMAMOTO, Hiroaki)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授
研究者番号: 40174809

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：