

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440105

研究課題名(和文)メラニン色素の細胞間輸送法の多様性を理解する

研究課題名(英文) Diversity of intercellular transfer of melanosomes

研究代表者

田所 竜介 (Tadokoro, Ryosuke)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：50425633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者のライブイメージングにより明らかとなった色素細胞から表皮細胞へのメラニン色素の輸送の結果に基づき、輸送方法と色素輸送量の関係に注目して輸送の分子機構と普遍性多様性の理解に努めた。色素細胞内で働く輸送を制御する分子および表皮に発現して輸送を促す分子を同定した。また色素輸送を解析する新たな手法も確立した。加えて、輸送の普遍性を問うためにガン細胞についても解析をおこない、ガン細胞が多様な小胞を放出することも見出した。

研究成果の概要(英文)：Skin pigmentation is achieved through an intercellular transfer of melanin pigments from melanocytes to surrounding keratinocytes. Our live imaging has visualized that the melanosomes are transferred via three pathways, membrane vesicles (small vesicles), filopodia and large vesicles. In this study, we attempted to understand molecular mechanisms and diversity of melanosome transfer. We first clarified that small GTPase Rho regulates membrane vesicles (small vesicles) by several different experiments. Second, we have identified keratinocyte-derived molecule that induce vesicle generation, especially larger vesicles. Finally, to understand conservation and diversity of intercellular transfer, we have examined extracellular vesicles from tumor cells during metastasis.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞間輸送 メラニン色素 色素細胞 表皮細胞

1. 研究開始当初の背景

動物の皮膚にはメラニン色素が存在しており、紫外線防御や保護色に代表されるように重要な機能を果たしている。メラニン色素は表皮に存在する色素細胞内の細胞内小器官（メラニン顆粒と呼ばれる）において合成され、のちにメラニン顆粒ごと周囲の表皮細胞へと輸送される。このとき色素の輸送量は厳密に制御されており、例えばヒトの皮膚の色の濃淡やトリの模様に見られるように、組織や状況によって輸送量が異なる。長きに渡り、色素がどのように輸送されるのかという謎が続くなか、さらに高次元疑問としてこれらの輸送がどのように輸送量を調整するのかという問いがある。研究代表者はこれまでに、トリ胚を用いて皮膚ライブイメージング法を確立して、第一の謎である色素が3種類の経路を介して輸送されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究は研究代表者のこれまでの研究に立脚し、組織ごとのメラニン色素の輸送量が輸送法により調整されるという仮説を立て、3種類の輸送の分子機構と普遍性・多様性の理解に努めた。

3. 研究の方法

① 輸送法と輸送量の関係を探る

1-1. 受精卵（ヒペコ種）は城山鶏園から購入した。受精卵を38.5℃に調整した孵卵器に入れて発生させた。2日孵卵後、卵殻を直径3cm程度切り取り胚がみえる状態にした。色素細胞を標識するため、胚発生2日目胚の神経管に膜結合型EGFP（pT2Acaggs gapEGFP）とトランスポゼースの遺伝子を注入し、8Vの電圧を6回かけて遺伝子を導入した（エレクトロポレーション）。再び孵卵器に入れて胚発生10日目になるまで培養した。この時点で、UVクロスリンカーに卵を入れて卵に開けた穴から紫外線を照射した（200mJ, 300mJ, 400mJ）。さらに1日培養したのち、胚を取り出して色素および色素細胞の状態を顕微鏡で観察した。1-2. トリ胚から足表皮を単離して長期間培養を試みた。皮膚培養で用いる基本培地をカスタマイズして培養して用いた^{1,2}。1-3. 体表の色の濃淡も理解するため、トリ以外の生物も入手し観察をおこなった。特段染色等はせず実体顕微鏡もしくは高倍率の倒立顕微鏡で観察を行った。

② 輸送法の違いを生み出す機構を探る

2-1. 色素細胞内で働く小胞形成に関わる分子機構を調べるために、色素細胞の遺伝子操作を行った。遺伝子導入法は方法1に述べたエレクトロポレーション法を用い、機能遺伝子（Rho dominant negative, Rock dominant negative もしくはC3）を導入した。遺伝子をゲノムに組み込むために Tol2

トランスポゾン法を用い³、これと合わせて薬剤により時期特異的に遺伝子を発現させるために Tet-ON 法を併用した⁴。膜ブレップおよび小胞が形成されはじめる前(E7, E10)にドキンサイクリンを投与し遺伝子発現を誘導した。それぞれ2日後に胚を取り出し、皮膚を剥がして共焦点顕微鏡を用いてイメージングを行った²。その他にも同一個体の異なる色素細胞に上記の遺伝子とコントロールEGFPを遺伝子導入し、同一個体内での機能解析も行った²。加えて、光遺伝学を用いたメラニン顆粒の分布操作を試みた。光刺激(490nm)で結合する分子がメラニン顆粒およびモーター蛋白質に局在するよう遺伝子コンストラクトを作製した。これをメラノーマ(B16)に遺伝子導入し、共焦点顕微鏡下で488nmのレーザー光を照射してタイムラプス観察を行った。2-2. 同一個体において色素細胞と表皮細胞を遺伝子操作する。方法1に示した方法を用いて黒い系統（ヒペコ種）の色素細胞に膜EGFP（ネオマイシン耐性）遺伝子を導入した。のちに皮膚を解離して、薬剤選択をすることにより膜EGFPが導入された色素細胞のみを単離培養した。この色素細胞を、色素を持たない白色レグホン胚（2日目胚）に移植した。このとき白色レグホン胚の表皮にSCFなどの機能分子をもったRCASウイルスを感染させた。これにより表皮にのみ機能分子が発現し、色素細胞は膜EGFPで標識された状態を作ることができる⁵。この皮膚を単離して表皮細胞に機能分子を過剰発現させたときに、色素細胞の形態（小胞形成）に与える影響を調べた。2-3. 網羅的な解析。胚発生10日目に腹表皮、10・14・16日目の足表皮からRNAを抽出し、受託解析（マクロジェン社）により網羅的な発現遺伝子の比較を行った。2-4. 食食アッセイ法の確立。胚発生10～12日目の胚から皮膚を剥がし、ディスペラーゼにより1時間処理して表皮層のみを剥がした。これを培養皿に進展させてDMEMによって培養した。ビーズもしくは食食アッセイに適した液体プローブなどを添加した。

③ 細胞間輸送の普遍性を理解する一環として腫瘍細胞の小胞放出を観察する。

蛍光タンパク質を恒常的に発現する腫瘍細胞（B16, HT1080）の stable line を作製し培養した。コンフルエントのとき、トリプシンで細胞を剥がして細胞懸濁液を調整した。胚発生2日目のトリ胚を用意し2通りの方法で腫瘍細胞を移植した。ガラスキャピラリーを用いて細胞懸濁液をトリ胚の心臓に注入した。注入から～24時間後に卵黄血管から血管外に転移する際の腫瘍細胞の振る舞いと形態を観察した。

4. 研究成果

1. 輸送法と輸送量の関係を探る

1-1. 色素沈着の人為操作を試みた

紫外線処理を施し、人為的に色素沈着量を変化させた場合に、色素輸送の輸送法がどのように変化するかを調べた。方法で述べた通り、卵殻をハサミで切り取り穴をあけ色素細胞に遺伝子導入をおこなった(方法1)。胚発生10日目の時点で、卵に開けた穴から紫外線を照射した(200mJ, 300mJ, 400mJ)(方法2)。いずれにおいても日焼けはみられず、高エネルギーになるにつれ胚体外血管におよぶダメージが多く死亡する。より局所的に光ファイバーなどで紫外線を照射できる機材が必要だと思われるが、今回は適切なものが適切な予算で見つからなかった。そこで、本研究では紫外線照射実験を安定して行え、かつ色素輸送の変化を経時的に観察できる実験系の確立を試みた。

1-2. 輸送法と輸送量の関係を探るため長期培養法を立ち上げた

卵内の胚に直接紫外線を照射するなどの処理が現状の機材で困難なため、卵外で様々な処理を施し輸送の観察できる解析系の確立をおこなった。体の複数の部位を複数の培養液で体外培養し、足の皮膚培養が最も安定して動くことを突き止めた。研究代表者がこれまでに使用していたイメージングは最長でも6時間程度しか安定した解析を行えず、これが解析の幅と精度をかなり狭め、断続的な輸送の観察のみしか行えなかった。今回確立した方法では20時間以上の解析が可能となり、紫外線処理や薬剤処理のち反応を調べることも可能になると考えられる。本研究課題においてこれは大きな成果となった。加えて、一連の色素輸送を連続的に観察できる解析系であり、今後この手法を用いることにより、輸送法と輸送量の関係を含め色素輸送の理解が深まると考えられる。

1-3. トリ以外の生物の皮膚の色素

皮膚の色の濃淡を調べる過程で、研究計画には記載していなかったが、トリ以外の生物種(魚類、両生類、爬虫類)の皮膚についても観察を行った。爬虫類については、日本ヤモリ、アオマルメヤモリ、日本トカゲ、スッポン、ヘビ(ヒバカリ)などについて観察をおこない、いずれの種においても、表皮と真皮に色素細胞が存在し、表皮層にいる色素細胞がトリと同様色素を輸送することを確認した。両生類については、サンショウウオ、アカハライモリ、イペリアトゲイモリ、モリアオガエル、ツチガエルなどについて、観察をおこなった。両生

類についても、表皮と真皮に色素細胞が存在し、真皮の色素細胞は色素細胞内で色素の分布を変え一瞬で色を変える(細胞外に輸送しない)。一方、表皮層に存在する色素細胞はトリの色素細胞と同様に樹状突起を放射状に伸ばして、表皮細胞へと色素を輸送する。魚類については、スポッテドガー、ポリプテルス、ハイランドクーブ、ゼブラフィッシュ、タイ、コチ、スズキ、ナマズ、ウナギ、アンコウをはじめとした様々な種の表皮の観察を行った。小型魚類は細胞外に色素を輸送しない「輸送しない型」であるが、ナマズなど「輸送する型」の魚もいることが分かってきた。本観察から、進化の過程において「色素を輸送しない型」から「輸送する型」が何のために、そしてどのような機構で移り変わったのかという新たな課題が創出された。

2. 輸送法の違いを生み出す機構を理解する

2-1. 色素細胞内で働く機構

小型小胞、糸状仮足およびメガ小胞の3種類について輸送の分子機構の解析を行った。小型小胞については、低分子量Gタンパク質のRhoおよびその下流のRockを阻害することにより、有意に小胞の放出量および小胞放出に先立っておこる膜ブレップが減少することを明らかにした(図1)²。本研究においては、複数の解析系を用いてRhoの関与について検証をおこない、その内容を原著論文として発表した(Tadokoro et al. Scientific Reports, 2016)²。糸状仮足の形成には、ヒト色素細胞の糸状仮足の形成にも関わるMyosinXが関与することを示した(未発表)。メガ小胞については、依然として形成機構が不明である。しかしながら、小胞が形成される領域にメラニン顆粒が蓄積することから、メラニン顆粒と細胞膜の接触刺激が小胞形成に関わることが推測された。この可能性を検証すべく、光遺伝学的な手法を用いて細胞内でメラニン顆粒の分布を操作する手法の開発に挑戦した。研究期間終了の段階で、メラノーマ細胞内のメラニン顆粒の操作を可能にしつつある。

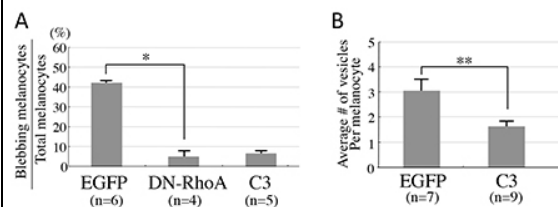


図1. Rhoの活性を阻害すると膜ブレップ(A)と小胞形成(B)が抑制される。

2-2. 表皮細胞からの誘導

ヒトの日焼けに関わる代表的な因子を表皮に過剰発現させて、それぞれ色素輸送に与える影響を調べた。エンドセリン3とメラノサイト刺激ホルモンの過剰発現では、色素沈着量の有意な増加はみられなかった。これに対して stem cell factor (SCF) を発現させると、皮膚が顕著に黒くなる(図2A)。このときの色素細胞の形態を調べるため、色素細胞を膜局在型 EGFP で標識してイメージングを行った。この結果、SCF が発現する領域において顕著に小胞が輸送されることが明らかになった。色素沈着量の多い羽毛においてみられるような丸みを帯びた樹状突起が増加し、メガ小胞も増加した(図2B)。しかしながら、これと同時に小さな小胞の増加もみられた。本研究は色素輸送を促す因子の同定に成功したが、3つの輸送の使い分けに関与する分子の同定は今後の課題として残存した。

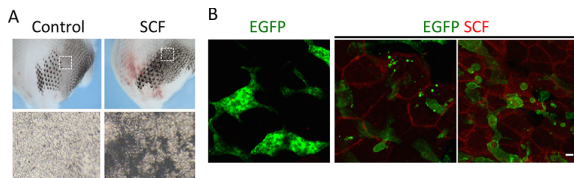


図2. SCF が色素輸送に与える影響

(A) SCF を表皮に過剰発現させると色素沈着が亢進した。(B) 色素細胞からの小胞形成が促進された。SCF 左写真に膜小胞および右写真に大型の小胞を示す。スケールバー 3 μm 。

2-3. 皮膚に発現する分子の網羅的な解析

3種類の輸送をそれぞれ制御する分子を明らかにするため、呈色度の度合いが低い腹表皮と、呈色度合いの高い足表皮(鱗)について、網羅的な遺伝子発現の比較を行った。胚発生10日目の腹表皮と、胚発生14日目および16日目の足表皮の比較から、それぞれ発現変動する2,013および4,210遺伝子を明らかにした。最も発現変動する分子は表皮の構造に関わるケラチンなどであったが、これ以外にエンドセリン1をはじめとしたメラノジェネシスに関わる遺伝子、シナプトタグミンなど膜融合に関わる分子やエクソソーム形成に関わる分子、数多くの転写因子が含まれていた。

2-4. 表皮細胞の貪食能力の違いから体色の濃淡を調べる

ヒトの表皮細胞による貪食を制御することで知られる Protease activated receptor 2 (Par-2) に注目して RT-PCR によって発現解析を行い、色の薄い腹表皮に比べて、色の濃い足表皮において発現が高い

ことを明らかにした。加えて、より生体に近い状態で表皮細胞の貪食能を評価するため、図3に示す通り、単離表皮における貪食解析法を作った(未発表)。

図3. 貪食アッセイ
左に実験手法の概要、右に表皮細胞(緑)が貪食した様子を示す。

3. 細胞間輸送の普遍性を理解する

細胞間輸送は色素細胞のみならず免疫細胞や腫瘍細胞をはじめとして多くの細胞種においてみられる基本的な現象である。例えば腫瘍細胞は膜小胞を介してプロテアーゼを標的組織に発射して転移の障壁となる細胞外基質の分解を行う。本研究は複数種の腫瘍細胞を対象として、腫瘍細胞が発する小胞について理解を進めた。方法に記した通り、腫瘍細胞をトリ胚に移植して、組織内を転移の状況と転移の際の細胞の振る舞いを観察した。ヒト繊維肉腫細胞 HT1080 は、血管に注入後すぐに細い血管に詰まり、注入後4時間くらいで血管外に遊走しはじめる。この際、膜ブレップするものが現れ、遊走および病巣を作る際にマイクロパーティクルに相当すると思われる比較的小さい小胞を放出する。メラノーマ(B16)は、注入から30分程度で細胞の形態が丸型から芋型に変形して血管壁に張り付き、4時間で多くの細胞が血管内から血管外に遊走する(HT1080と比較すると血管外遊走にかかる時間が短い)。遊走する際および血管外で病巣を作る際にメラノーマは小胞を放出する。メラノーマが作る小胞は色素細胞と類似して多様であり、糸状仮足由来の小胞、膜小胞そして大型の小胞が観察された(図4)。以上の結果から、腫瘍細胞が放出する膜小胞の種類は、色素細胞と同様に多様である可能性が示唆された。

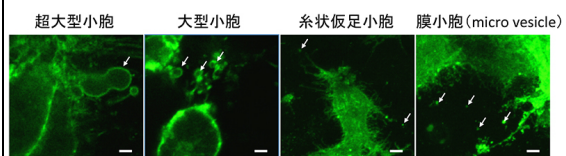


図4. 病巣形成時にメラノーマ(B16)が放出する多様な小胞。スケールバー 3 μm

以上、本研究により色素輸送の機構の理解が深まったとともに、新たな技術や研究課題が生み出された。3種類の輸送についての見解を論文として発表した⁶。本研究を基盤として色素輸送の研究がさらに発展すると考えられる。

参考文献

- ① 田所 竜介, 村井英隆, 酒井謙一郎, 高橋淑子, ライブイメージング法を用いた表皮内メラノサイトの可視化, 小児皮膚科学会紙, 32:5-9, 2013
- ② Tadokoro, R., Murai, H., Sakai, K., Okui, T., Yokota, Y., Takahashi, Y., Melanosome transfer to keratinocyte in the chicken embryonic skin is mediated by vesicle release associated with Rho regulated membrane blebbing. *Scientific Reports*, 6: 38277, 2016
- ③ Sato, Y. *et al.* Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Developmental biology* **305**, 616-624, 2007
- ④ Watanabe, T. *et al.* Tet-on inducible system combined with in ovo electroporation dissects multiple roles of genes in somitogenesis of chicken embryos. *Developmental biology* **305**, 625-636, 2007
- ⑤ Murai, H., Tadokoro, R. (共筆頭著者), Sakai, K., Takahashi, Y., In ovo gene manipulation of melanocytes and their adjacent keratinocytes during skin pigmentation of chicken embryos. *Dev. Growth Differ.* 57: 232-242, 2015
- ⑥ Tadokoro, R. and Takahashi, Y., Intercellular transfer of organelles during body pigmentation. *Current Opinion Genetics and Development*, 2017 in press

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 8 件)

- ① Tadokoro, R. and Takahashi, Y., Intercellular transfer of organelles during body pigmentation. *Current Opinion Genetics and Development*, 2017, 査読有 in press
- ② Nakanho S. Fuse N. Tadokoro R. Takahashi Y. Agata K.: Jak1/Stat3 signaling acts as a positive regulator of pluripotency in chicken pre-gastrula embryos. *Developmental Biology*, 421:43-51, 2017, 査読有
- ③ Tadokoro, R., Murai, H., Sakai, K., Okui, T., Yokota, Y., Takahashi, Y., Melanosome transfer to keratinocyte in the chicken embryonic skin is mediated by vesicle release associated with Rho regulated membrane blebbing. *Scientific Reports*, 6: 38277, 2016, 査読有
- ④ Murai, H., Tadokoro, R. (共筆頭著者), Sakai, K., Takahashi, Y., In ovo gene manipulation of melanocytes and their

adjacent keratinocytes during skin pigmentation of chicken embryos. *Dev. Growth Differ.* 57: 232-242, 2015, 査読有

- ⑤ Takahashi, T., Takase, Y., Yoshino, T., Saito, D., Tadokoro, R., Takahashi, Y., Angiogenesis in the Developing Spinal Cord: Blood Vessel Exclusion from Neural Progenitor Region Is Mediated by VEGF and Its Antagonists. *PLoS One*, 10: e0116119, 2015, 査読有
- ⑥ 田所 竜介, 村井英隆, 酒井謙一郎, 高橋淑子, ライブイメージング法を用いた表皮内メラノサイトの可視化, 小児皮膚科学会紙, 32:5-9, 2013, 査読有
- ⑦ Atsuta, Y., Tadokoro, R., Saito, D., Takahashi, Y., Transgenesis of the Wolffian duct visualizes dynamic behavior of cells undergoing tubulogenesis in vivo. *Dev. Growth Differ.* 55: 579-590, 2013, 査読有
- ⑧ Takase, Y., Tadokoro, R., Takahashi, Y., Low cost labeling with highlighter ink efficiently visualizes developing blood vessels in avian and mouse embryos. *Dev. Growth Differ.* 55:792-801, 2013, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 田所 竜介, 皮膚の呈色時におこるメラノソームの細胞間輸送, 第 2 回京都皮膚科研究, 2015. 8. 19, 京都大学, 京都 (国内研究集会, 日本語口頭発表)
- ② 田所 竜介, トリ胚を用いたライブイメージング解析によりみえてきたメラニン色素輸送, 色素細胞学会, 2016. 11. 12, 岐阜大学サテライトオフィス, 岐阜 (国内研学会, 日本語口頭発表) 招待講演
- ③ 田所 竜介, 表皮内ライブイメージング法を用いたメラニン輸送の可視化, 第 86 回日本動物学会, 2015. 9. 18, 朱鷺メッセ, 新潟 (国内学会, 日本語口頭)
- ④ 田所 竜介, トリ胚表皮を用いたメラニン色素輸送の解析, 第 1 回京都皮膚科研究, 2015. 8. 19, 京都大学, 京都 (国内研究集会, 日本語口頭発表) 招待講演
- ⑤ 田所 竜介, メラニン色素輸送, 第三回皮膚の会, 2015. 3. 7, 京都 (国内研究集会, 日本語口頭発表)

[図書] (計 2 件)

- ① 高橋淑子、田所 竜介、メラニン色素が移動する過程を解明、vol.72, p71, 化学, 化学同人, 2017
- ② Scott F. Gilbert (阿形清和、高橋淑子

監訳) メディカル・サイエンスインターナショナル社, ギルバート発生物学「11章神経堤細胞と神経軸索の特異性」 田所竜介 訳 (2015) .

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所 竜介 (Ryosuke Tadokoro)
京都大学大学院理学研究科生物科学専攻・助教
研究者番号 : 50425633