

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670092

研究課題名(和文)色素細胞の系譜と分布から予想される脊椎動物の神経堤細胞の起源

研究課題名(英文) Dual origin of melanocytes defined by Sox1 expression and their distribution in the skin

研究代表者

國貞 隆弘 (Kunisada, Takahiro)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30205108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経管形成期に必要な転写因子Sox1 にCre 遺伝子を挿入したSox1-cre/ ROSA26R-YFP マウスを用いて神経管由来の神経堤細胞を遺伝的にラベルし、神経堤起源であることが実証されている色素細胞にはSox1-Creでラベルされる群とされないに2群があることを発見し、色素細胞が起源の異なる神経堤細胞により構成されること、起源によってメラノサイトの性質・分布に違いがあることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Melanocytes are pigment-producing cells generated from neural crest cells (NCCs) that delaminate from the dorsal neural tube. We used transgenic mice expressing Cre recombinase under control of the Sox1 promoter crossed to the Rosa26-YFP reporter strain that contains a floxed stop cassette preventing YFP expression until the Cre-induced deletion (Sox1-Cre/+; Rosa26R-YFP/+ mice), we noticed that melanocytes were derived differently from Sox1-Cre+ and from Sox1-Cre- populations in Sox1-Cre/YFP embryos. We showed that a significant population of melanocytes in the skin of mice are derived from trunk NCCs that originated from the non-neuroepithelium. We also observed a clear segregation of these two types of melanocytes in adult mouse skin suggesting a competitive acquisition of their stem cell niche.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経堤細胞 色素細胞 細胞系譜 Sox1 Kit

## 1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は神経管形成期に表皮外胚葉側と神経外胚葉表皮の境界部(神経堤)から移動性の高い細胞群として発生し(上皮間充織転換)、胚の様々な部位へ移動後、神経・色素細胞・骨細胞・間葉細胞・内分泌細胞などへ分化する。胚発生の中期(マウスではE9前後)に三胚葉の細胞へ分化する能力のある第四の胚葉とも呼ぶべき細胞が新たに外胚葉から誘導されるこの事象は脊椎動物に特徴的であり、発生現象のあらゆる側面を研究可能なモデルとして連綿と研究されている。

我々は神経管形成期に必要な転写因子Sox1にCre遺伝子を挿入したSox1-cre/ROSA26R-YFPマウスを用いて神経管由来の神経堤細胞を遺伝的にラベルし、神経堤起源であることが実証されている色素細胞にはSox1-Creでラベルされる群とされないに2群があることを発見し、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

色素細胞の一部のみがSox1-Cre陰性の神経堤細胞に由来し、他の神経堤細胞由来細胞および残りの色素細胞がSox1-Cre陽性神経堤細胞に由来することを細胞系譜の遺伝的マーキングとセルソーターによる精製と培養による分化能力の確認により直接確認する。ホヤで見られる最初の移動性神経堤様細胞は全て色素細胞であるという報告(Nature 431, 696, 2004)と比較し、脊椎動物ではそのような最初の神経堤はSox1-Cre陰性の細胞群として維持され、新たに神経管の出現とリンクしてSox1-Cre陽性の神経堤細胞群が進化したという仮説を実証したい。

## 3. 研究の方法

(1)色素細胞が起源の異なる神経堤細胞(Sox1-Cre陽性Dct陽性、およびSox1-Cre陰性Dct陽性細胞)により構成されることを胚の免疫組織染色により確認し、Sox1-Cre

陰性の神経堤細胞が色素細胞のみで構成されることを検証する。

(2)両色素細胞を実際にセルソーターで分離・精製し様々な条件で培養・移植することにより起源によって色素細胞の性質に違いがあることを検証する。

(3)表皮のSox1-Cre陽性細胞色素細胞を人工的・遺伝的に除去し、その分布様式を確認する。

(4)両色素細胞の遺伝子発現パターンを比較し、差異の分子基盤を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) Sox1遺伝子が発生時の神経管全体で発現することを利用して Sox1-cre/ROSA26R-YFPマウスを用いた神経堤細胞の cell lineage 解析を行い、Sox1遺伝子の発現の有無により神経堤細胞由来の色素細胞が2分されること、Sox1発現を経験していない色素細胞 lineage (Sox1陰性細胞)が頭部と尾部に局在し、Sox1を発現したことのある lineage (Sox1陽性細胞)は胴部に局在することを確認した。

(2) 神経堤特異的な Cre 発現を誘導する Wnt-cre/ROSA26R-YFPマウスでは全ての色素細胞がラベルされることを確認したが、本年度神経以外の外胚葉(表皮)に Cre を発現する k14-Sox1-cre/ROSA26R-YFPマウスの精密な cell lineage 解析を行い、確かに、Sox1-Cre陰性の色素細胞が k14-Cre陽性の色素細胞とオーバーラップすることを確認した。

(3) 色素細胞が起源の異なる神経堤細胞により構成されること、起源によってメラノサイトの性質・分布に違いがあるという我々の予想の検証は着実に達成された。Sox1-Cre陽性細胞に関しては Sox1の発現する神経板由来と判断できるが、Sox1-Cre陰性細胞の由来は確認が困難であった。神経以外の外胚葉(表皮)に Cre

を発現する k14-Cre マウスを利用することにより Sox1-Cre 陰性細胞はおそらく神経管形成時の神経板周辺の表皮由来であることが強く示唆されたが, k14-Cre 陽性細胞が Sox1-Cre 陽性細胞と完全に異なる集団であることは証明できなかった。

(4) これらの事実を機能的に確認するための Sox1-Cre/Kitflox/flox マウスを作成を試みた。これまでの結果から, このマウスでは Sox1-Cre 陽性細胞に由来する色素細胞でのみ色素細胞の分化に必要な Kit 遺伝子が欠損するため, Sox1-Cre 陽性細胞に由来する色素細胞細胞によって占有されるべき表皮部分が白色化するはずである。現在のところ Sox1-Cre/Kitflox/+マウスしか得られていないので答えは出せていないが, 興味深いことに Sox1-Cre/Kitflox/+マウスは脳神経系の低形成のため胎生致死であることが判明し, Kit の神経幹細胞の分化における新しい機能を発見したと考えている。

#### 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 4 件)

Motohashi T, Watanabe N, Nishioka M, Nakatake Y, Yulan P4 Mochizuki H, Kawamura Y, Ko MS, Goshima N, Kunisada T. Gene array analysis of neural crest cells identifies transcription factors necessary for direct conversion of embryonic fibroblasts into neural crest cells. *Biol Open*. 5, 311-322, 2016. doi: 10.1242/bio.015735. 査読あり

Motohashi T and Kunisada, T. Extended multipotency of neural crest cells and neural crest-derived cells. *Current Topics in Developmental Biology*, 111, 69-95, 2015. 査読あり

Kunisada T, Tezulka KI, Aoki H, Motohashi T. The stemness of neural crest cells and their derivatives. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 102, 251-262, 2014. 査読あり

Yoshimura N, Motohashi T, Aoki H, Tezuka K, Watanabe N, Wakaoka T, Era T, Kunisada T. Dual origin of melanocytes defined by Sox1 expression and their region-specific distribution in mammalian skin. *Dev Growth Differ*. 55, 270-281, 2013. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

T. Kunisada, 64<sup>th</sup> Montagna symposium of the biology of skin (2015.10, Oregon, USA, Symposium, Kitl and other factors forming the niches for melanocyte stem cells; Invited speaker)

T. Kunisada, Master Class in Vitiligo and Pigmentary Disorders (2014.11, Amritsar, India, Kit receptor tyrosine kinase and skin color.

T. Kunisada, The XXII International Pigment Cell Conference (2013.09, Singapore, Singapore, Pigmentation Of The Regenerated Hair Follicles After Wounding.

T. Kunisada, The XXII International Pigment Cell Conference (2013.09, T. Kunisada, The XXII International Pigment Cell Conference (2013.09, Singapore, Singapore, Conditional Deletion Of Kit Induces White Spotting Phenotype Through Cell-Autonomous Requirement Of Kit Signaling.

國貞隆弘, 第 25 回日本色素細胞学会 (平成 25 年 11 月, 大阪大学銀杏会館(大阪府・吹田市), キーノートレクチャー「Kitl (SCF) トランスジェニックマウスと色素細胞研究」

〔図書〕(計 1 件)

國貞隆弘、脊椎動物における色素細胞の発生-神経堤からメラノサイトが出現するメカニズム-: 伊藤祥輔, 芝原茂樹, 錦織千佳子監修, 色素細胞 第 2 版 基礎から臨床へ 第 1 章, 慶應義塾大学出版会; 2015 年: 1-16.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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

國貞隆弘 (Kunisada Takahiro)  
岐阜大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：30205108

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：