

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 皮膚組織の再生に向けた皮膚由来幹細胞に関する研究

氏名 山田 貴亮

## 論文内容の要旨

皮膚は、我々の体の中でも最も大きな臓器であり、外界からの異物の侵入や刺激を防ぐためのバリアとして機能するとともに、体温調節や知覚など様々な生理的役割を担っている。一方、皮膚組織の異常や機能低下はヒトの外観にも大きく影響することから、生活の質（quality of life; QOL）の維持および向上においても極めて重要な臓器である。皮膚組織の恒常性維持や機能修復には、皮膚を構成する様々な細胞の供給源となる幹細胞が大きな役割を担っていると考えられており、皮膚組織に存在する幹細胞の性質や機能制御メカニズムが明らかになれば、皮膚の老化や様々な疾患の新しい治療法の確立につながることを期待される。本研究では、皮膚組織の再生を目的とし、皮膚や毛髪の色を左右するメラノサイトの幹細胞（色素幹細胞）の性質を解析するとともに色素異常症との関連について検討した。また、組織再生のための幹細胞源として期待されている脂肪組織由来幹細胞（adipose-derived stem cell: ASC）について、加齢との関係を検討した。

### 1) 色素幹細胞マーカーの探索

メラノサイトは、表皮あるいは毛球部に存在し、メラニンを合成することで皮膚及び毛髪の色を制御している。メラノサイトの供給源となる色素幹細胞は、毛包のバルジ領域と呼ばれる部位に存在し、毛周期と同調してメラノサイトを供給する。これまでに、色素幹細胞が発現するマーカーとしては、Kit、MITF、Pax3、Dct が報告されているが、これらはいずれも成熟したメラノサイトにおいても発現することが知られている。そこで、C57BL/6 マウスにおいて、色素幹細胞特異的マーカーを探索した結果、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の受容体である Frizzled-4/7 (Fzd4/7) 及び low density lipoprotein receptor-related protein-5/6 (Lrp5/6) がバルジ領域で高発現していた。Fzd4 または Fzd7 陽性細胞を皮膚より分離・培養した結果、メラノサイトの前駆細胞

である **Kit** 陽性細胞よりも遅れてメラノサイトに分化したことから、これらマーカーを発現する細胞はより未分化な色素幹細胞であると考えられた。したがって、色素幹細胞特異的マーカーとして、**Fzd4** 及び **Fzd7** が有用であると考えられた。

## 2) 紫外線照射による色素幹細胞から表皮メラノサイトへの分化メカニズム

皮膚の不均一な色素沈着は外観を損なうことから、色素増加や色素脱失を特徴とする色素異常症は患者の **QOL** の著しい低下をもたらす。しかしながら、様々な色素異常症の発症メカニズムには不明な点が多く、現在の治療方法では効果は多くの場合部分的である。紫外線は、健常皮膚の色素沈着を引き起こすだけでなく、メラノサイトの消失に起因して皮膚の色が部分的に消失する尋常性白斑では、紫外線を照射することにより毛包周囲から色素が回復することが知られている。このことは、毛包内の色素幹細胞から新たにメラノサイトが供給されることを示唆するが詳細は不明であった。そこで、色素保有ヘアレスマウスとして、**Hr-1** マウスと **HR/De** マウスを交配させた **F1** マウスを用いて紫外線 (**UVB**) による色素沈着過程を解析した。その結果、**UVB** 照射後、毛包内で一過的に色素幹細胞がメラノblastへと分化し、表皮へと移動した後、色素沈着が生じることが分かった。**Wnt7a** に対する **siRNA** および **Wnt/β-catenin** 経路の阻害剤 **IWR-1** の投与により、この分化過程は一過的な **Wnt7a** の発現による **β-catenin** の活性化によるものであることが明らかになった。以上の結果より、**Wnt/β-catenin** 経路が表皮メラノサイトの分化において極めて重要な役割を果たすとともに、白斑の新しい治療法開発のためのターゲットとなり得ることが示された。

## 3) 老人性色素斑における色素細胞系譜の解析

老人性色素斑 (**solar lentigo: SL**) は、顔、手背、上腕等の露光部に加齢とともに生じる色素沈着斑の形成を特徴とする色素異常症である。**SL** では、表皮におけるメラニン合成の亢進とともにメラノサイト数の増加が報告されているが、健常皮膚と **SL** 病変部における一個一個のメラノサイトのメラニン合成能の違いや、メラノサイトの前駆細胞であるメラノblastや色素幹細胞の数に関して詳細に解析した報告はなかった。そこで、ヒト健常皮膚組織及び **SL** 病変組織において、表皮における個々のメラノサイトのメラニン合成能をメラノblastからメラノサイトまで広く発現している **melanoma antigen recognized by T-cells (MART-1)** に対するメラニン合成の律速酵素であるチロシナーゼ (**TYR**) の発現量を指標に解析した。その結果、健常部と比較して、**SL** 病変部では一個一個のメラノサイトにおけるメラニン合成能が高いことを確認した。また、毛漏斗部における **TYR** 陰性/**MART-1** 陽性のメラノblast、バルジ領域に存在する **MITF** 陽性/**FZD4** 陽性の色素幹細胞の数が、いずれも **SL** 病変部で多いことが明らかとなった。したがって、**SL** におけるメラノサイトの増加は色素幹細胞の増加に起因していると考えられた。以上の結果より、**SL** の根本的な治療には表皮メラノサイトのメラニン合成を抑制するとともに、色素幹細胞の数を適切に

制御することが必要であると考えられた。

#### ④加齢に伴う皮下脂肪組織由来幹細胞の変化

再生医療分野では、何らかの要因によって損傷した組織を修復するために、組織に存在する幹細胞を外から制御する方法、または組織から採取した幹細胞を加工して体内へ戻す方法の開発が進められている。皮下脂肪組織には、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell: BM-MSC) と同等の能力を有し、外科的侵襲が比較的少なくて済む ASC が存在し、その応用性に期待が集まっている。しかしながら、幹細胞と加齢の関係については不明な点が多く、ASC を再生医療へ応用するには、加齢に伴う幹細胞の数や能力の変化を明らかにする必要がある。そこで、3~24 週齢の ICR マウスの鼠径部より皮下脂肪を採取し、ASC マーカーである p75 neurotrophin receptor (p75NTR, CD271) を発現する細胞の数及び脂肪・骨芽・軟骨・平滑筋細胞への分化能を比較した。その結果、加齢に伴い組織重量当たりの p75NTR 陽性細胞数及びシャーレへの接着能が低下していた。一方、分化能は加齢に伴い減少するものの、ある程度までは維持されており、増殖能の低下も認めなかった。したがって、加齢に伴い ASC の能力は低下するものの、幹細胞としての能力はある程度維持されていることが示された。したがって、高齢者からも十分能力のある ASC の採取が期待され、高齢者自身の幹細胞を用いた皮膚組織の再生が可能であると考えられた。

本論文では、新たに見出した色素幹細胞マーカーを利用することで、紫外線照射による色素幹細胞の分化メカニズムや色素異常症における色素幹細胞の関与について明らかにした。また、ASC の能力は加齢に伴い低下するものの、多分化能は維持されていることから、高齢者の ASC は皮膚組織の再生に応用可能であると考えられた。本研究によって得られた知見が、今後健全な皮膚組織の再生に役立つことが期待される。