

皮膚組織の再生に向けた
皮膚由来幹細胞に関する研究

山田 貴亮

2014年3月

目次

略号一覧

第1章 序論	1-18
第2章 色素幹細胞特異的マーカーの探索	19-32
第3章 紫外線による色素幹細胞の分化誘導メカニズムの解析	33-57
第4章 老人性色素斑における色素細胞系譜のメラニン合成能及び増殖能の解析	58-73
第5章 加齢に伴う皮下脂肪組織由来幹細胞の能力変化に関する解析	74-90
第6章 総括	91-94
実験の部	95-115
引用文献	116-130
謝辞	
報文目録	

略号一覧

6BIO	(2'Z, 3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime
α -MSH	α -melanocyte stimulating hormone
ASC	adipose-derived stem cell
bFGF	basic fibroblast growth factor
BM-MSC	bone marrow-derived mesenchymal stem cell
BSA	bovine serum albumin
BPE	bovine pituitary extract
BrdU	bromodeoxyuridine
DBcAMP	dibutyryl cyclic adenosine monophosphate
Dct	dopachrome tautomerase
Dkk	dickkopf
Edn1	endothelin-1
Edn3	endothelin-3
Ednrb	endothelin receptor B
EGF	epidermal growth factor
FBS	fetal bovine serum
Fzd	frizzled
HGF	hepatocyte growth factor
HSC	hematopoietic stem cell
IWR-1	inhibitor of Wnt response 1
KGF	keratinocyte growth factor
LEF1	lymphocyte enhancer factor 1
Lrp5/6	low density lipoprotein-related receptor-5/6
Mc1r	melanocortin receptor 1
MART-1	elanoma antigen recognized by T-cells
Mitf	microphthalmia-associated transcription factor
LRC	label-retaining cell
NHEK	normal human epidermal keratinocyte
NHEM	normal human epidermal melanocyte
OCA	oculocutaneous albinism
p75NTR	p75 neurotrophine receptor
Pax3	paired box gene 3
PDGF	platelet-derived growth factor
QOL	quality of life
Ror2	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
Ryk	receptor-like tyrosine kinase

SCF	stem cell factor
siRNA	small interfering RNA
Sfrp	secreted frizzled-related protein
SL	solar lentigo
Sox10	SRY-box containing gene 10
SVF	stromal vascular fraction
TCF	T cell factor
TGF- β	transforming growth factor- β
Tyr	tyrosinase
Tyrp1	tyrosinase-related protein 1
UV	ultraviolet
Wif1	Wnt inhibitory factor-1

第 1 章

序論

第一章

序論

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いるが、詳細なメカニズムや皮膚疾患との関連については不明な点が多く残されている。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。

1-1. 皮膚組織の構造

皮膚組織は周囲の環境や乾燥から身体を守る最も大きな臓器であり、物理的、化学的あるいは微生物に対するバリアとして働くだけでなく、機械的な刺激、痛み、温度などに対するセンサーとしても機能する。その構造は、外側からおおまかに表皮、真皮、皮下組織に分けられ (Fig. 1-1)、表皮と真皮は、IV型コラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリクスによって構成される基底膜により隔てられている (Breitkreutz *et al.*, 2013)。表皮は主にケラチノサイトによって構成され、常に分裂と分化のサイクルを繰り返しており、その分化段階に応じて基底層から有棘層、顆粒層、そして角層へと変化していく (Fig. 1-2)。基底膜に接着している基底層ケラチノサイトは最も未分化な集団であり、その中には幹細胞も含まれる (Dupé *et al.*, 2012)。皮膚の最外層は分化の過程で脱角し死んだ角化細胞からなる角層であり、外界からの異物の侵入を防ぐバリア機能や水分保持能を有している。表皮を構成するケラチノサイト以外の細胞としては、抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞、色素細胞であるメラノサイトなどが挙げられる。真皮は細胞外マトリクスに富んだ組織であり、線維芽細胞が産生するI型及びIII型コラーゲンを主とする膠原線維やエラスチンなどの弾性線維により構成される。また、ヒアルロン酸などのグリコサミノグリカンやプロテオグリカンが多く存在し、水分保持及び線維の安定化により皮膚の柔軟性を生み出している。真皮組織では毛細血管が発達するとともに、肥満細胞、組織球、樹状細胞などの免疫細胞も存在する。真皮の下方に存在する皮下脂肪組織は主に脂肪細胞により構成され、中性脂肪の蓄積に重要である。また、物理的な力に対するクッション及び体温の保持などの役割がある。このような表皮・真皮・皮下組織の3層以外の構造としては、付属器に属する毛包、皮脂腺、汗腺などがある。毛包は外側から結合組織鞘、外毛根鞘、内毛根鞘から形成される。成長期の毛包の下端には毛球が存在し、毛乳頭細胞を取り囲むように存在する毛母細胞が毛へと分化する。また、毛母には毛髪にメラニンを供給するメラノサイトも存在する。毛は成長期、退行期、休止期からなる毛周期とともに成長と退縮を繰り返すが (Fig. 1-3)、立毛筋が付着する毛包のバルジと呼ばれる領域から上方の恒常部は毛周期に関わらず維持されており、下方の変部のみが毛周期に支配される。バルジ領域の上には、皮膚表面の皮膜の形成や微生物の侵入や感染を防ぐ皮脂の分泌を司る皮脂腺があ

る。皮脂腺や毛包を構成する上皮系の細胞は、バルジ領域に存在する毛包幹細胞から分化すると考えられている (Cotsarelis, 2006; Oshima *et al.*, 2001; Petersson *et al.*, 2011)。

1-2.メラノサイト

メラノサイトは、発生過程において神経堤細胞に由来する。神経堤細胞は神経管から背側および側方経路を移動しながらメラノサイトの前駆細胞であるメラノブラストとして皮膚へと移動し、表皮または毛球メラノサイトとして皮膚または毛髪へメラニンを供給するようになる。ヒトの皮膚では、平均して 1 mm² 当たり 1500 個のメラノサイトが存在する。人種によるメラノサイトの数に差はないため、それぞれのメラノサイトのメラニン合成能の違いが人種間の皮膚色の違いを生み出す。ヒトとは異なり、マウスでは生後数日から表皮メラノサイトが著しく減少し、一ヶ月程度でほとんど観察されなくなる (Hirobe T, 1984)。詳しくは後述するが、この発生過程で毛包内に移動したメラノブラストの一部は、毛包内のバルジ領域に定着し、色素幹細胞となって生涯にわたるメラノサイトの供給源となる (Mak *et al.*, 2006)。白毛を呈するマウスやヒトの遺伝性色素異常症における遺伝子解析から、メラノサイトの発生・維持・メラニン合成に必要な遺伝子がいくつも同定されている。例えば、*Mitf* (*microphthalmia-associated transcription factor*) はメラノサイトのマスターレギュレーターとされる塩基性領域-ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (basic helix-loop-helix leucine zipper: bHLH-LZ) 構造を持つ転写因子をコードする。*Mitf* 遺伝子の変異により、メラノサイトの発生に異常が生じると毛色が斑になったり、白くなったりすることが分かっている。また、*Sox10* (SRY-box containing gene 10)、*Pax3* (*paired box gene 3*) にコードされる転写因子は、*Mitf* のプロモーター領域に結合して転写を調節するため、これらの遺伝子もメラノサイトの発生に深く関与する (Hou *et al.*, 2008)。さらに、リガンド及び受容体の組み合わせとして *Kitl* (*Kit ligand, stem cell factor: Scf*) 及び *Kit*、*Edn3* (endothelin-3) 及び *Ednrb* (*endothelin receptor b*) がメラノサイトの正常な発生に必要であることも明らかとなった (Fig. 1-4)。*MITF*、*PAX3*、*SOX10*、*EDN3*、*EDNRB* は、Waardenburg 症候群と呼ばれる皮膚白斑、光彩異常及び難聴を呈するヒトの遺伝性疾患の原因遺伝子としても同定されている (Tachibana *et al.*, 2003)。

メラノサイトの重要な役割は、細胞内でメラニンを合成し周囲の細胞へと受け渡すことで皮膚や毛髪の色を制御することである。メラニンの合成はメラノソームと呼ばれるメラノサイト特有の細胞内小器官で行われ、多くの場合いくつかのメラノソームがパッケージングされてケラチノサイトや毛母細胞へと受け渡されることが分かっている (Wu *et al.*, 2012; Ando *et al.*, 2012)。メラノソームは成熟度によりステージ I から IV に分類され、メラニン合成酵素を獲得しながら成熟していく。現在までに明らかになっているメラノソーム内におけるメラニン合成経路を Fig. 1-5 に示す。メラニンの生合成経路は、出発物質であるチロシンがドーパを経てドーパキノンへと本経路の律速酵素であるチロシナーゼ (tyrosinase: Tyr) によって返還されることで始まる。システイン存在下では、ドーパキノンはシステニルドーパを経て黄色から赤色のフェオメラニンへと変換される。一方、ドーパキノンはドーパクロムトートメラーゼ (*dopachrome tautomerase: Dct*) やチロシナーゼ関連タンパク質 1 (tyrosinase-related protein-1: *Tyrp1*) の働きにより茶褐色から黒色のユーメラニンへと変換される。このようなフェオメラニンとユーメラニンが混ざり合い、肉眼的に観察される色を呈する。例えば、毛髪はフェオメラニンだけでは金髪に、ユーメラニン含量が多いほど黒髪に近づく。メラニン合成に必要な酵素の遺伝子発現は、メラノサイトの発生

過程にも重要な転写因子である *Mitf* により制御されている。*Mitf* には、N 末端の異なる 5 つのアイソフォームが存在し、その中でも *Mitf-M* はメラノサイトに特異的なアイソフォームである。*Tyr*、*Dct*、*Tyrl* のプロモーター上に存在する M ボックスと呼ばれる配列に *Mitf* タンパク質は結合し、これらメラニン合成酵素の遺伝子発現を亢進させる (Vachtenheim *et al.*, 2010)。*Mitf* 自身の制御としては、*Wnt/β*-カテニンシグナルの活性化、 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) による melanocortin 1 receptor (*Mc1r*) を介した細胞内 cAMP 濃度の上昇などによる転写制御、あるいは *Scf/Kit* シグナルによる *Mitf* のリン酸化による転写活性可能の促進が挙げられる。マウスにおいて、遺伝子変異によるメラノサイトの発生または機能異常は生後の体毛の色で肉眼的に容易に判別できることから、メラノサイトに関わる多くの遺伝子が同定されている (Color Genes, <http://www.espcr.org/micemut/>)。しかしながら、未だクローニングに至っていない遺伝子も多く存在し、今後の解析が期待される。

1-3. 皮膚と紫外線

紫外線 (ultraviolet: UV) とは、可視光よりも波長の短い電磁波 (10~400 nm) であり、波長の長さにより UVA (400~320 nm)、UVB (320~280 nm)、UVC (200~280 nm) に分けられる。これらの UV はいずれも太陽光に含まれているが、300 nm 以下の波長はオゾン層で吸収されるため、UVA と UVB の一部が地表に到達する。地表に到達する UV の大部分は UVA であり、約 5 %程度が UVB であるが、近年、オゾン層の破壊により UVB の地表への到達量は増加している。皮膚と UV の関係は深く、有益である一方で有害性も高い。生体にとって不可欠なビタミン D₃ は、皮膚が UV に曝されることで合成されることから、UV は我々の生命機能の維持に重要な役割を果たす。また、皮膚の異常角化を示す乾癬の治療に UV が利用される。しかしながら、UV には多くの有害な側面がある (Pattison *et al.*, 2006)。UVA は、スーパーオキシドアニオン (O₂⁻•)、過酸化水素 (H₂O₂)、ヒドロキシルラジカル (OH•)、一重項酸素 (¹O₂) の産生を促し、DNA の 1 本鎖切断や DNA-タンパク質の架橋を形成し、DNA にダメージを与えることが知られている (Kyam *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 2004)。245~290 nm の UV は DNA に吸収されるため、UVB は変異原性が高い (Tornaletti *et al.*, 1996; Linge, 1996)。UVB は cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) や pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct (6-4PP) を形成し、CC→TT あるいは C→T への変換を誘発することで遺伝子変異を引き起こす (Brash *et al.*, 1991)。また、UV 照射は、皮膚の免疫機能を低下させたり (Yoshikawa *et al.*, 1990)、化学物質の光感作性を誘発させたりするため (Kruft *et al.*, 2011)、皮膚にとって極めて有害な一面を持っている。

皮膚の色素沈着と日光暴露への暴露による皮膚がんの発症率には逆の相関があることから、メラノサイトが合成するメラニンは皮膚の細胞を UV から保護する役割があると考えられている (Gilchrist *et al.*, 1999)。メラニンの防御効果は、UV を散乱または吸収することで UV の表皮の透過を防ぐことによる (Kaidbey *et al.*, 1979)。一般的に、UV 照射によりヒトの皮膚は黒くなるが、これはいくつかの段階を経ることが分かっている。UV 照射後直後に生じる即時型の色素沈着は、最初のステップである。これは即時黒化 (一次黒化、immediate pigment darkening: IPD) と呼ばれ、新たなメラニン合成によるものではなく、すでに皮膚に存在するメラニンが酸化・重合し一時的に黒化するために生じる (Routaboul *et al.*, 1999)。次のステップである持続型即時黒化 (persistent pigment darkening: PPD) では、IPD と同様にメラニンの酸化による黒化が認められ、照射数時間後から数日間観察される

(Moyal *et al.*, 2000; 2006)。PPD は UVB よりも UVA によって強く誘導される。最後のステップである遅延型黒化 (二次黒化、delayed tanning: DT) は、照射数日後から生じるが、IPD や PPD とは異なり、メラニン合成の亢進を伴う。DT は、メラノサイト数の増加及びメラノサイトの活性化 (樹状突起、メラニン合成、メラニン輸送の増加) によるものであり (Parrish *et al.*, 1982, Pathak *et al.*, 1980)、TYR の発現亢進を認める (Friedmann *et al.*, 1987)。UV 照射に応答してケラチノサイトは SCF、EDN1 (endothelin-1)、 α -MSH (α -melanocyte stimulating factor)を分泌し、メラノサイトではこれらに対応する受容体を介してシグナルを伝達し、メラニン合成が亢進する (Brenner *et al.*, 2008)。

1-4. 色素異常症

皮膚の色調に異常をきたす色素異常症の多くは、皮膚におけるメラニンの増減による。すなわち先天的または後天的な要因によって、メラニン産生やメラノサイトの数に異常が生じ、皮膚の色素増加または脱失を生じる。常染色体劣性遺伝性の色素脱失症である眼皮膚白皮症 (oculocutaneous albinism: OCA) は、皮膚だけでなく髪や眼のメラニン色素の減少あるいは消失を認める (Biswas, *et al.*, 1999; Grønskov *et al.*, 2007)。ただし、メラノサイトの減少は認めない。直接メラニン合成に関わる TYR や TYRP1 遺伝子に変異が認められる眼皮膚白皮症 1 型 (OCA1) や眼皮膚白皮症 3 型 (OCA3)、メラノソームの機能に関わる *membrane-associated transporter protein (MATP)* や *P* 遺伝子に変異が認められる眼皮膚白皮症 2 型 (OCA2) や眼皮膚白皮症 4 型 (OCA4) がある。常染色体劣性遺伝で出血傾向を示す OCA である Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) は、細胞内のタンパク質輸送に関わると考えられる HPS の遺伝子変異が報告されている。この疾患では、TYR などのメラニン合成に関わる酵素には異常が認められないため、OCA1 などとは異なり、皮膚や毛髪にある程度色素を認める場合が多い (Oh *et al.*, 1996, Dell'Angelica *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002)。その他にも、KIT 遺伝子の変異によるまだら症 (Giebel, *et al.*, 1991)、メラノソームの細胞内輸送に関わる myosin Va (*MYO5A*) や *RAB27A* の変異による Griscelli 症候群 (Pastural *et al.*, 1997; Ménasché *et al.*, 2000)、前述の Waardenburg 症候群など、先天的な色素異常症は多い。これに対し、後天的な色素脱失症である尋常性白斑は、メラノサイトの消失を特徴とし、脱色素斑が神経支配領域に沿って生じる分節型や全身に生じる汎発型などがある。その発症メカニズムには、自己免疫説、色素細胞破壊説、神経説、生化学説などが提唱されているが、中でも自己免疫説が有力であり、多くの知見が報告されている。82%の白斑患者では正常メラノサイトに対する抗体が検出されたこと (Naughton *et al.*, 1992)、患者の血清中に TYR、DCT、TYRP1 と合致する分子量 75kDa のタンパク質に反応する抗色素細胞抗体が存在すること (Cui *et al.*, 1983) はこの仮説を支持する。また、尋常性白斑患者の血液中に活性化 T 細胞の増加が認められることから、細胞性免疫の関与も考えられる (Mahmoud *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2001)。したがって、尋常性白斑の発症メカニズムには、液性及び細胞性免疫の両者が関与する可能性があり、今後の解明が期待される。治療法としては、ステロイドなどの外用剤以外に、PUVA (ソラレン内服及びUVA照射) 療法、ナローバンドUVB (NB-UVB) 照射療法、エキシマレーザー療法などの光線療法が有用である。また、サクシオンブリスター法により採取した健常部の表皮組織やメラノサイトを含む表皮細胞の懸濁液を移植する方法なども有効であると考えられている。患者ごとに効果は異なるが、これらの治療法では完全な色素回復は難しい場合も多い。しかし、光線療法

などによって再色素沈着が生じることは色素幹細胞が生存していることを示唆しており、新しい治療法の開発次第で完治に期待できる。

色素増加症としては、老人性色素斑、肝斑、雀卵斑などが挙げられる。老人性色素斑は、加齢に伴い顔や手背などの露光部に生じる褐色の色素斑を特徴とする。組織学的に表皮メラノサイトの増加を認める (Cario-Andre *et al.*, 2004; Noblese *et al.*, 2006)。また、メラノサイトの増殖やメラニン合成の亢進に関わると考えられる SCF や EDN1 の発現亢進が報告されている (Kadono *et al.*, 2001; Hattori *et al.*, 2004)。肝斑は 30 代以降の女性に多く認められる頬部を中心とした色素沈着斑であり、ホルモンなどの影響によると考えられている (Passeron *et al.*, 2013)。雀卵斑はいわゆるそばかすのことであり、顔や前腕などの露光部に幼少期より出現する褐色の色素斑である。メラニン合成の亢進を認めるものの、メラノサイトの数は増加しない。また、家族内発生が多く、一部は *MC1R* の遺伝子多型が関与するとの報告がある (Bastiaens *et al.*, 2001)。これらの色素斑は日本をはじめとするアジアでは外観を損なうと認識されており、色素沈着を改善するための美白剤が多く開発されている。例えば、アスコルビン酸誘導体やアルブチンなどが挙げられる。これらはメラニンの還元や *TYR* の活性阻害作用などにより皮膚明度を向上させる。しかし、根本的な色素斑形成メカニズムは不明であり、より詳細な解析と予防及び改善方法のさらなる進展が期待される。

1-5. 幹細胞と再生医療

幹細胞の大きな特徴として、以下の 3 つが挙げられる。未分化な細胞であること、自己複製能を有すること、そして特定の細胞への分化能を有することである。分化能に関しては、あらゆる細胞へ分化可能である万能性、複数の細胞へ分化可能である多能性、一種類の細胞へ分化可能である単能性に分けられる。我々の体内に存在する幹細胞、すなわち体性幹細胞 (または成体幹細胞) は多能性または単能性を有し (Loeffler *et al.*, 1997)、所属する組織の恒常性維持や損傷時の機能修復に重要な役割を果たしていると考えられている (Fig. 1-6)。これに対し、胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) は、いずれも生体外で人工的に作成された幹細胞であり、万能性を有している (Boheler, 2009)。このような幹細胞に特有の能力を、病気やケガによって失われた組織の再生を目的とした再生医療へ応用する試みが進められている。具体的には、幹細胞を損傷した組織に未分化な状態で移植することにより幹細胞がその組織特異的な細胞へ分化することを期待する方法、*in vitro* で特定の細胞へ分化誘導した後、目的組織へ移植する方法などである。また、最近では幹細胞が分泌するサイトカインや増殖因子が組織の修復に関与するとの報告もある。このような幹細胞の供給源としては、前述の体性幹細胞、ES 細胞、iPS 細胞が挙げられるが、それぞれにメリットとデメリットがある。ES 細胞は、受精卵が胚盤法まで成長した時期に内部細胞塊を取り出し、フィーダー細胞上で培養することにより得られる極めて未分化な細胞集団である。万能性を有することからあらゆる組織の再生に応用可能であると考えられる。また、未分化な状態を維持しながら半永久的に培養することが可能で、非常に多くの細胞を得ることができる。しかしながら、受精卵を破壊して作製するという倫理的な問題とともに、移植対象の患者自身から作製することができないため、移植後の拒絶反応が懸念される (Condic *et al.*, 2010)。iPS 細胞は、2006 年にマウス線維芽細胞に特定の遺伝子を導入することにより、体細胞を初期化することで ES 細胞と同等の万能

性を有した細胞を作製することに成功し (Takahashi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2007)、名付けられた比較的歴史の浅い細胞である。作製に受精卵を必要としないため ES 細胞が抱えるような倫理的問題がない。一方、ウイルスベクターを用いて Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc という遺伝子を導入するのが最も一般的な作製方法であるが、この中で導入したがん遺伝子 c-Myc が再活性化する恐れがある。また、iPS 細胞から分化した細胞を移植した際に未分化な iPS 細胞がわずかでも混入しているとテラトーマを形成してしまうため、iPS 細胞を完全に分化させる方法あるいは未分化な iPS 細胞を除去する方法の開発が必要となる。iPS 細胞は ES 細胞と異なり患者自身の細胞から作製することが可能なため、拒絶反応のリスクが小さいものの、現状では作製期間が長いという課題もある。体性幹細胞は、脳、肝臓、小腸、皮膚などの我々の体を構成する多くの組織に存在する幹細胞であり、組織特異的な役割を担っている。通常、体性幹細胞は極めて細胞周期が長く分裂頻度が低いが、組織の損傷などに応答して活発に増殖あるいは分化して組織修復に働くと考えられている。これら体性幹細胞は、患者自身の組織から採取できるため移植後の拒絶反応の問題がない。また、採取から移植までの期間が、幹細胞から目的の細胞への分化に必要な期間だけで良いというメリットもある。しかしながら、現在のところ、体性幹細胞は万能性ではなく多能性あるいは単能性であることから、修復可能な組織は限定的である。これらの幹細胞について、現在、世界中で臨床への応用性が検討されている (Prestwich *et al.*, 2013; Siqueria *et al.*, 2011)。

1-6. 色素幹細胞

色素幹細胞は、2002 年に Nishimura らによってその存在が初めて報告された (Nishimura *et al.*, 2002)。これまで、尋常性白斑の治療目的で紫外線を患部に照射した際に毛孔に一致して色素沈着が生じること (Staricco *et al.*, 1962)、毛包の外毛根鞘にドーパ反応陰性のメラノサイト (amelanotic melanocyte) の存在が確認されたことから (Montagna *et al.*, 1956; Staricco *et al.*, 1959)、毛包内にメラノサイトの供給源があると考えられてきたが、その実態は明らかになっていなかった。Nishimura らは、Dct プロモーター下で LacZ を発現するトランスジェニックマウスを作製し、毛包のバルジ領域に存在する LacZ 陽性細胞の性質を解析した。細胞分裂時に BrdU を取り込ませ、長期間経った後に BrdU を保持している細胞 (label retaining cell: LRC) を検出することで、体性幹細胞の特徴である細胞分裂の頻度が低い細胞を見極めることができる。マウスに BrdU を処理し長期間飼育したところ、毛包のバルジ領域に存在する LacZ 陽性細胞が LRC であることが示された。また、抗 Kit 抗体を投与することで、メラノblast及びメラノサイトを枯渇させた際にも、バルジに存在する LacZ 陽性細胞は Kit 非依存性に生存可能であり、明らかにメラノblastやメラノサイトとは性質が異なる細胞であることが証明された。毛周期が休止期から成長期へ移行する際に分裂してメラノサイトを供給することが明らかになり (Fig. 1-7)、体性幹細胞の定義を満たすとして色素幹細胞と名付けられた。その後、加齢に伴うマウスの白毛あるいはヒトの白髪では毛包内の色素幹細胞が減少あるいは消失していることが明らかになった (Nishimura *et al.*, 2005)。本来、毛包のバルジ領域には未分化な色素幹細胞が存在するが、色素を失った毛包のバルジ領域では色素幹細胞がメラノサイトへ異所性に分化してしまっていることが示された。また、マウスに放射線を照射すると、色素幹細胞はアポトーシスや細胞老化を引き起こすことなく、バルジ領域で異所性にメラノサイトへと分化し、白毛化することが示された (Inomata *et al.*, 2009)。

この現象は DNA 修復に関わる ATM 欠損マウスにおいて、より低濃度の放射線照射によって引き起こされるため、DNA 損傷を修復できない色素幹細胞が未分化性を失い自己複製することなく分化した結果、色素幹細胞が消失したことが考えられた。また、色素幹細胞の維持には TGF- β シグナルが必要であることが示された。バルジ領域には、色素幹細胞だけでなく毛包幹細胞も存在する。毛周期が退行期に移行する際に、毛包幹細胞が TGF- β を分泌し、色素幹細胞の未分化性が維持されることが報告された (Nishimura *et al.*, 2010)。一方、色素幹細胞の分化には、Wnt/ β -カテニン経路の活性化が必要であることが示された。色素幹細胞が休眠状態にある休止期毛では、Groucho が Dct の発現を抑制することで未分化状態が維持されているが、成長期に移行する際に活性化した β -カテニンが Groucho により置き換わることで Dct の発現が亢進する (Lang *et al.*, 2005)。色素幹細胞の分化メカニズムや制御異常をもたらす現象についての知見が集積しつつあるものの、これらはいずれも毛周期によって分化が制御される毛球メラノサイトと色素幹細胞の関係についての検討であり、表皮メラノサイトとの関係については不明な点が多かった。

1-7. 皮下脂肪組織由来幹細胞

皮下脂肪組織に多能性幹細胞が存在することが初めて報告されて以来、再生医療分野における応用性が検討されてきた。脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) の発見よりも前から、骨髄組織には多能性幹細胞が存在することが知られていた。この骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell: BM-MSC) は、骨髄に含まれる細胞のうちシャーレに付着性の細胞であり、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などへの多分化能を示すとともに、*in vitro* で培養して数を増やせることから、再生医療への応用が検討されている (Pittenger *et al.*, 1999)。ASC は BM-MSC と同等の能力を有しながらも (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002)、外科的侵襲が比較的少なく豊富に採取可能であることから、BM-MSC に代わる幹細胞ソースになりうると考えられる。最近では、非常に多岐にわたる細胞種への分化能を有することも明らかになってきた。特に、胚葉を超え、外胚葉由来であるメラノサイト (長谷川ら, 2006) や神経細胞 (Bossio *et al.*, 2013)、内胚葉由来である肝細胞 (Seo *et al.*, 2005) にも分化誘導が可能であり、多くの組織の修復に応用できる可能性を秘めている。

皮下脂肪組織を酵素処理し遠心すると、液面に成熟した脂肪細胞が集まり、間質血管細胞群 (stromal vascular fraction; SVF) と呼ばれる未分化な細胞を含む集団がペレットとして得られる (Fig. 1-8)。このペレットの中に、ASC が含まれる。SVF は未分化な細胞を非常に多く含むことから、SVF 自体を ASC とみなす場合もある。しかし、表面抗原の解析結果から、SVF は複数の未分化な細胞集団の集まりだと考えられている。体性幹細胞の一種である造血幹細胞は、その表面抗原の発現パターンにより明確にキャラクタライズされている。一方、ASC や BM-MSC については、CD105、CD73、CD90 などの間葉系幹細胞マーカーと考えられている表面抗原を発現することが報告されているもの (Hamid *et al.*, 2012; Sachs *et al.*, 2012)、厳密な定義はなされていない。SVF は、これらの間葉系幹細胞マーカーとされる表面抗原を異なるパターンで発現する複数の幹細胞集団が存在すると考えられている。中でも、低親和性神経成長因子受容体 (p75 neurotrophine receptor: p75NTR, CD271) 陽性の SVF 由来 ASC は、p75NTR 陰性細胞と比較して、高い分化能を有することが報告されている

(Yamamoto *et al.*, 2007)。表面抗原や各種細胞への分化能のキャラクタライズが進められるものの、最終的には再生医療分野における臨床への応用が目標である。実用化を見据えた場合、幅広い年代の患者において ASC を用いた再生医療が適用できること、すなわち年齢と幹細胞の質の関係を知る必要がある。しかしながら、ASC と加齢との関連については、不明な点が多い。

1-8. Wnt シグナル

Wnt シグナルは、胚発生や成体の組織の恒常性維持において、細胞の分化、増殖、極性、移動などを制御する重要な役割を担っている。Wnt は分泌タンパク質であり、哺乳類では 19 種類のホモログが同定されている。Wnt の分泌は、いくつかの段階を経て行われる。まず、小胞体の膜上に局在する Porcupine (Porc) によりパルミトイル化を受けた後 (MacDonald *et al.*, 2009; Port *et al.*, 2010)、ゴルジ体に輸送され、さらに Wntless (Wls) によって細胞膜へと輸送されて分泌される。また、この過程で N 末端に糖鎖が付加されることが分泌には必須であることが分かっている (Komekado *et al.*, 2007; Kurayoshi *et al.*, 2007)。Wnt が細胞表面の受容体に結合することによって活性化されるシグナル経路は、 β -カテニンに依存する古典的経路 (β -カテニン経路) と依存しない非古典的経路に大別される (Nusse., 2008)。Wnt 非存在下では、 β -カテニンは細胞質内で GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β)、APC (adenomatous polypsis coli)、Axin、CK1 (casein kinase 1) からなる複合体によりリン酸化された後、ユビキチン-プロテアソーム系により分解されるため、低いレベルで発現が保たれている。古典的経路では、Wnt リガンドが Fzd (frizzled) 及び Lrp5/6 (low density lipoprotein-related receptor 5/6) に結合すると GSK-3 β による β -カテニンのリン酸化が抑制され、 β -カテニンは細胞質内に蓄積する。その後、核内へと移行した β -カテニンは、TCF (T cell factor) /LEF (lymphocyte enhancer factor 1) と結合して標的遺伝子の発現を誘導する (Fig. 1-9)。非古典的経路はさらに Ca²⁺経路、PCP (planar cell polarity)経路に分けられる。Ca²⁺経路では、細胞内へ Ca²⁺を動員し、CaMKII (calmodulin dependent protein kinase II)を活性化し細胞運動を制御する。PCP 経路では、低分子量 G タンパク質である Rho または Rac を介し、Rho キナーゼや JNK が活性化され、細胞極性や運動を制御する。また、Wnt シグナルを負に制御するタンパク質としては、Wnt に直接結合することで Wnt が受容体に結合するのを阻害する secreted frizzled-related protein (Sfrp) や Wnt inhibitory factor-1 (Wif1)、Lrp に結合する Dickkopf (Dkk) が知られている (Kawano *et al.*, 2003; Hsieh *et al.*, 1999; Bafico *et al.*, 2001)。

1-9. 本研究の目的

皮膚組織に存在する幹細胞の詳細な機能や役割を明らかにすることは、皮膚の老化や疾患のメカニズム解明にとっても非常に重要であると考えられる。中でも色素幹細胞の性質や分化メカニズムを解明することは、皮膚の生理的な色素沈着だけでなく色素異常症の治療法開発に有益な知見が期待できる。しかしながら、色素幹細胞に関する研究は少なく、その性質及び疾患との関連については不明な点が多かった。そこで本研究では、皮膚組織の再生を目的とし、色素幹細胞特異的マーカー、紫外線照射時の皮膚組織における色素幹細胞の分化メカニズム、老人性色素斑と色素幹細胞の関

係について解析した。さらに、新しいメラノサイトの供給源となりうる ASC の加齢に伴う変化について検討した。

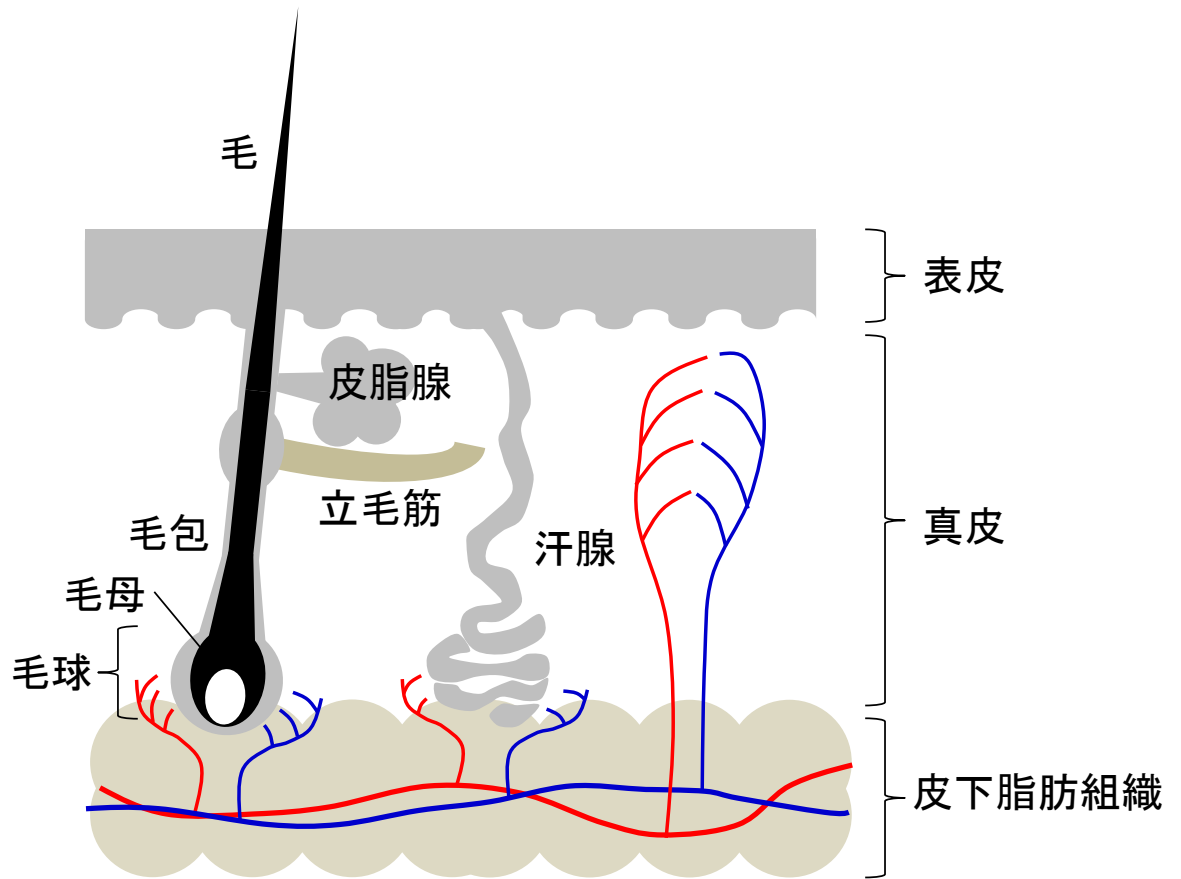


Fig. 1-1 皮膚の構造

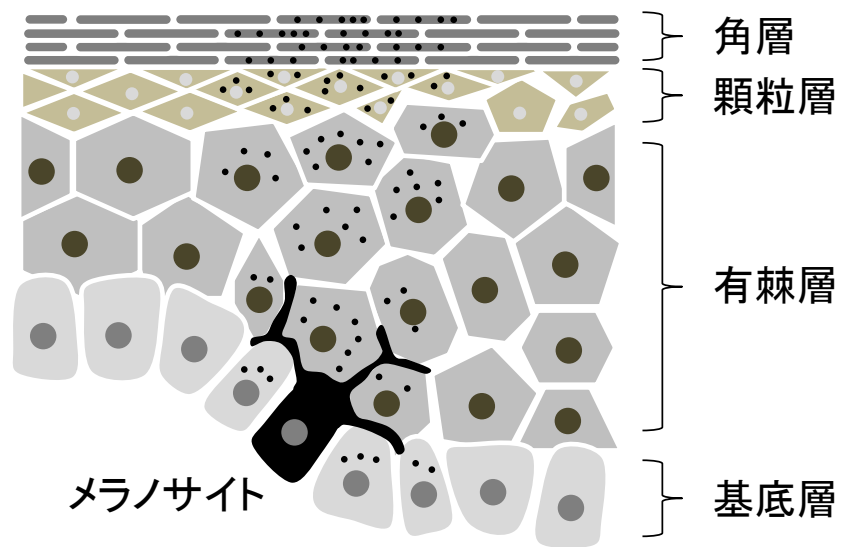


Fig. 1-2 皮膚の構造

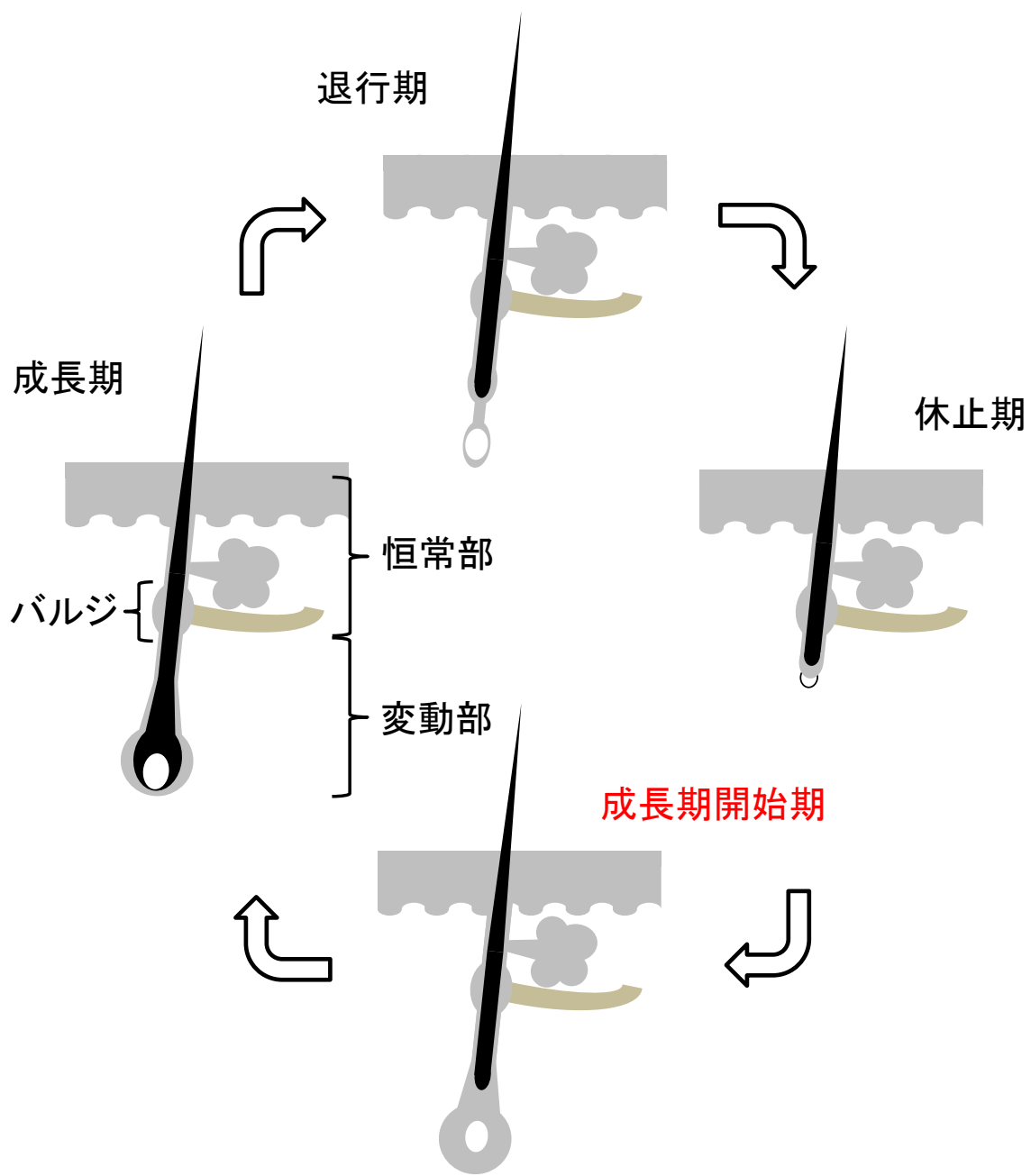


Fig. 1-3 毛周期に伴う毛包構造の変化

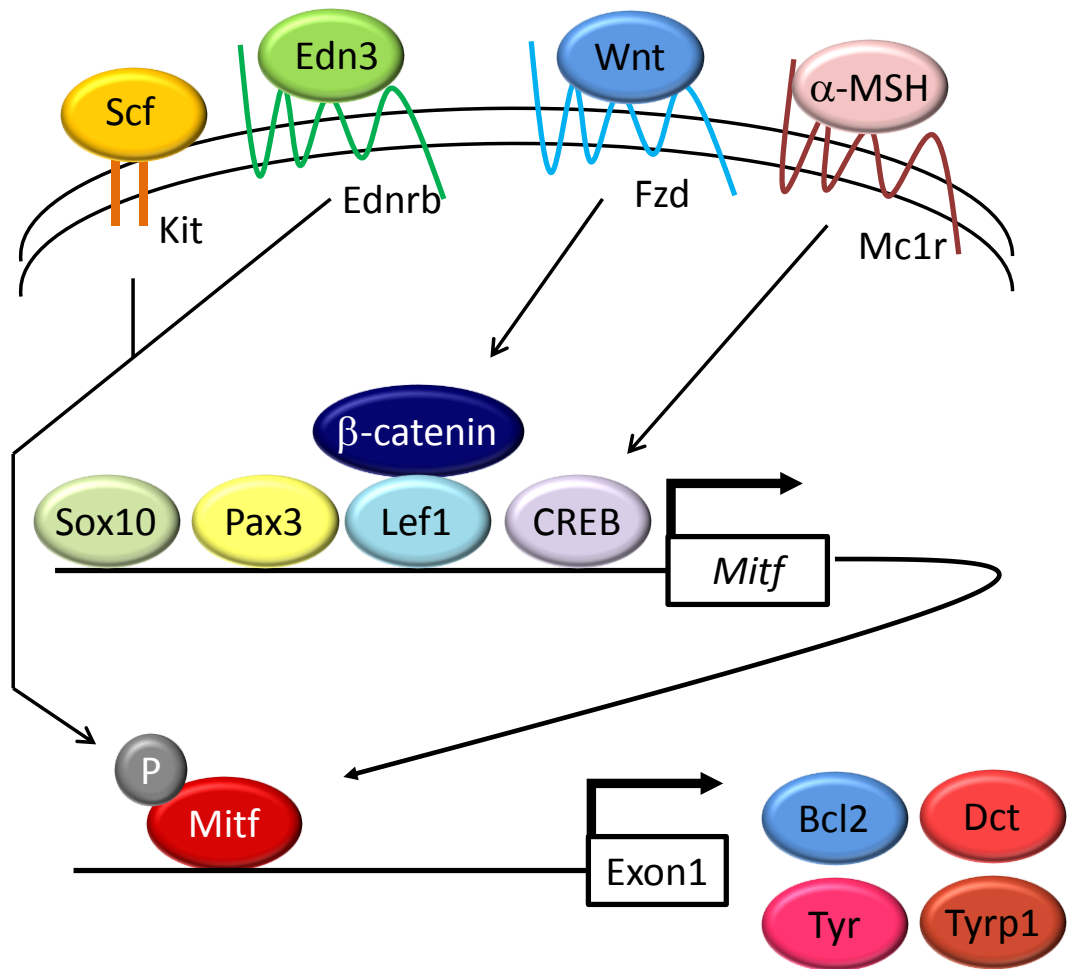


Fig. 1-4 メラノサイトの発生に関わる因子

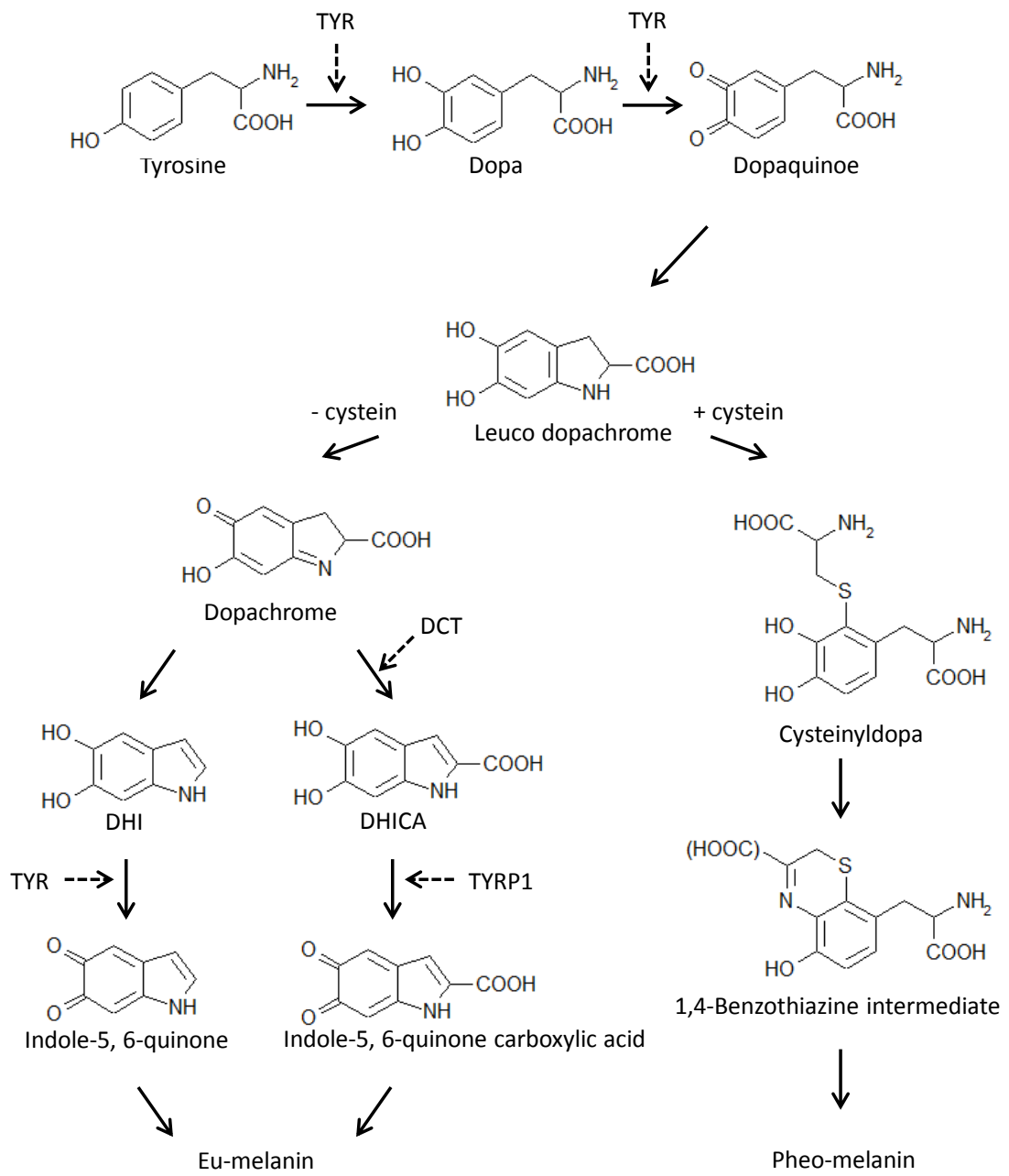


Fig. 1-5メラニンの合成経路

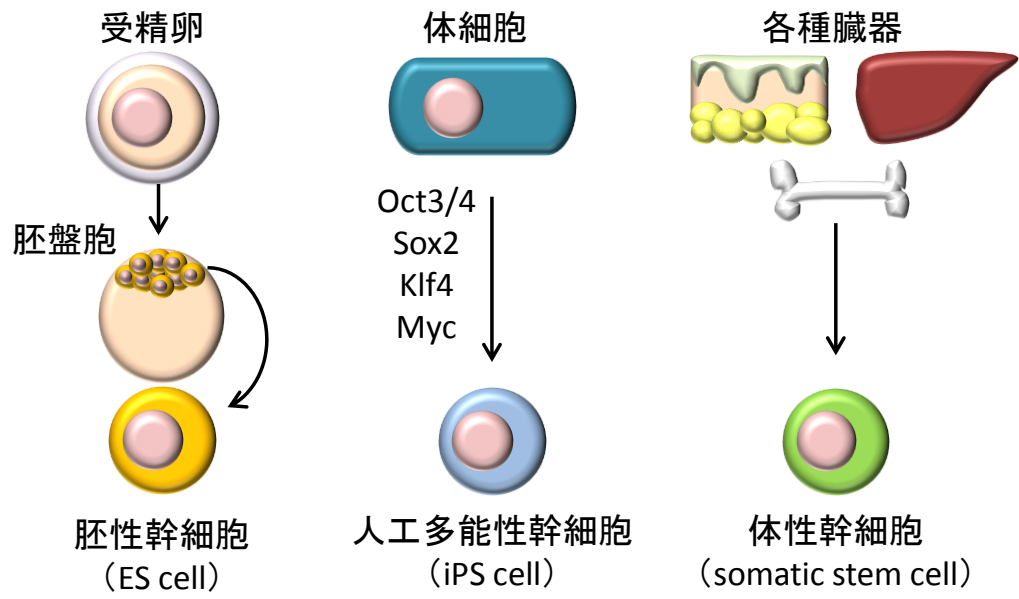


Fig. 1-6 幹細胞の種類

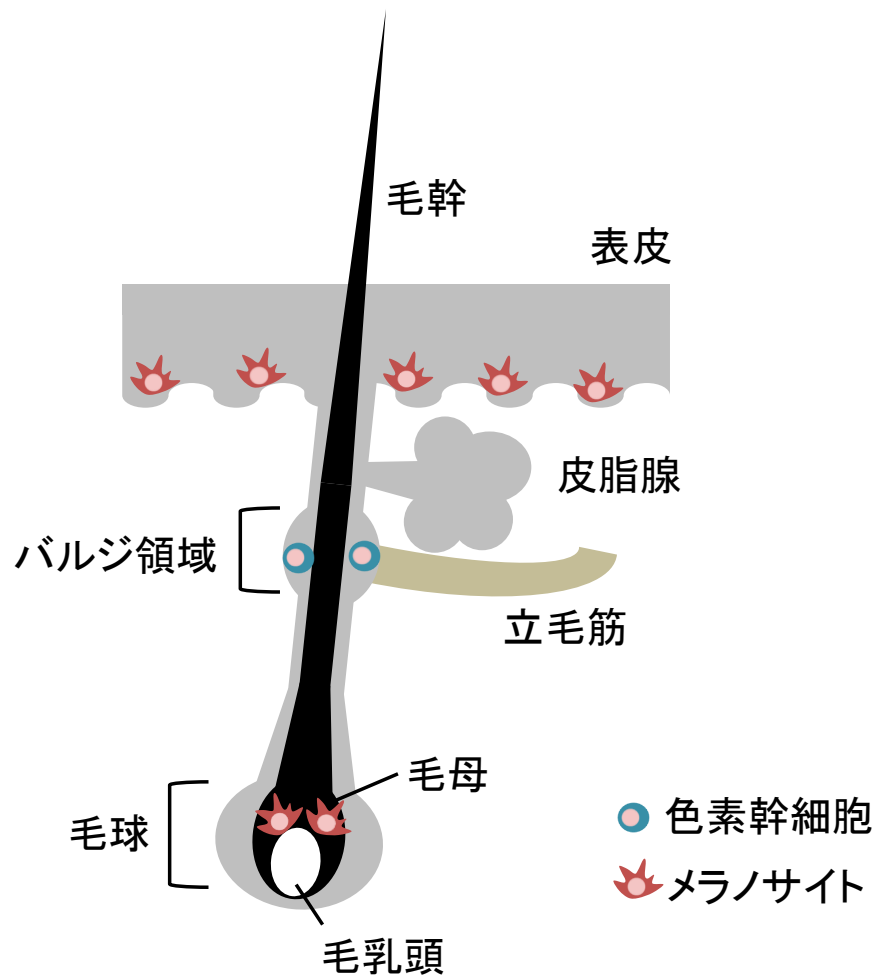


Fig. 1-7 色素細胞系譜の分布

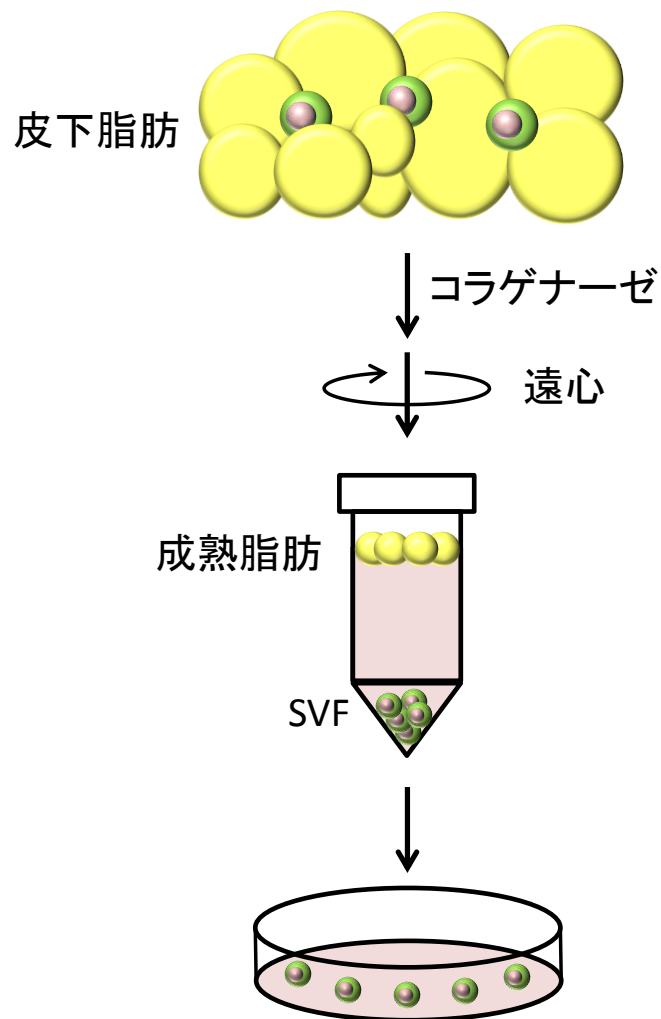


Fig. 1-8 ASCの分離方法

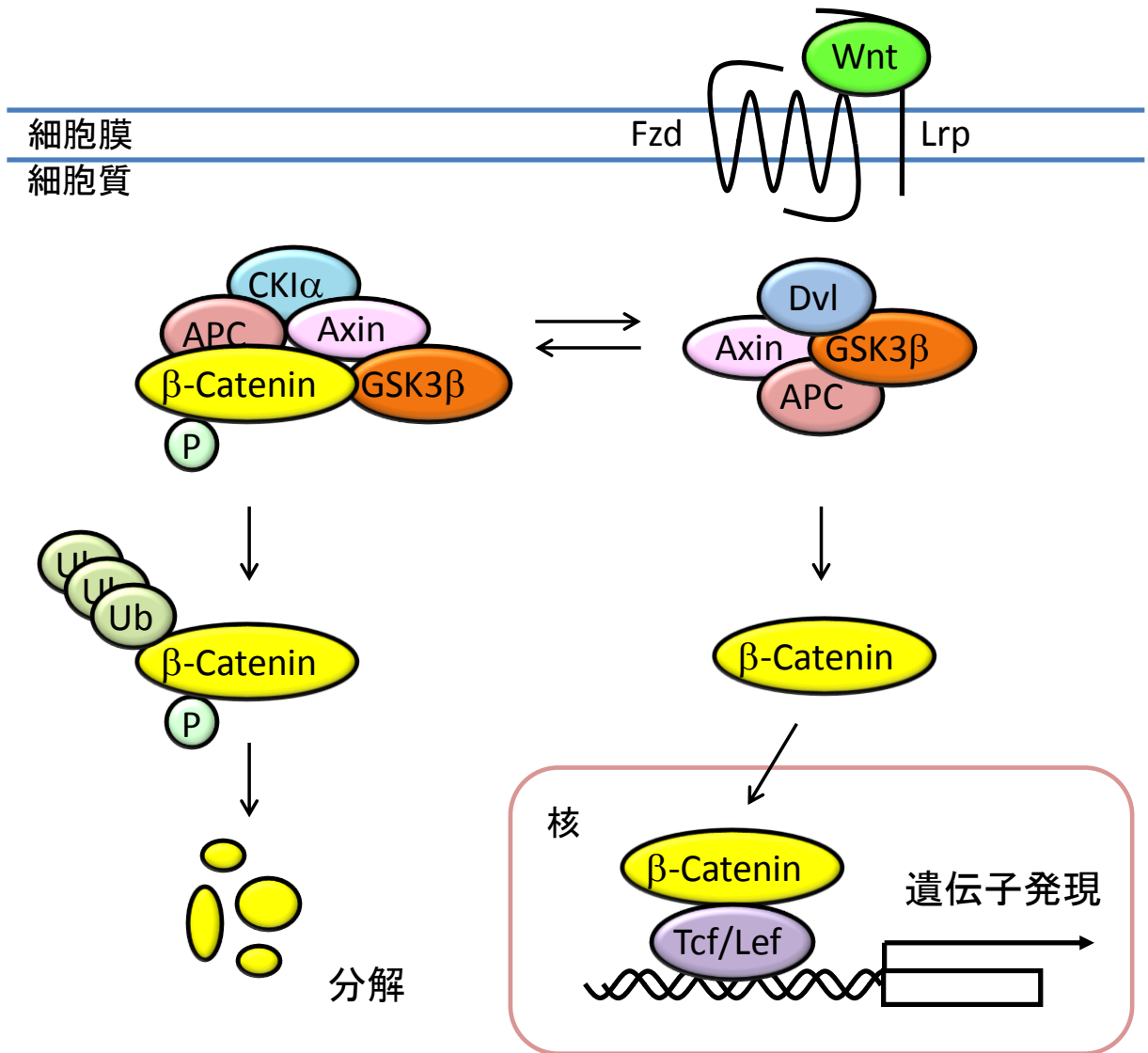


Fig. 1-9 古典的Wnt経路(Wnt/ β -カテニン経路)

第2章

色素幹細胞特異的マーカーの探索

第2章

色素幹細胞特異的マーカーの探索

要約

毛包のバルジ領域に局在する色素幹細胞に特異的な表面マーカーを探索するため、レーザーマイクロダイセクションにより毛包を4区画に分けて採取し、遺伝子発現を比較した。その結果、バルジ領域では *Fzd4* 及び *Fzd7* の遺伝子発現が高いことを見出した。また、免疫染色によりバルジ領域に *Fzd4* 陽性細胞及び *Fzd7* 陽性細胞が存在することを確認した。フローサイトメーターにより解析した結果、これらの *Fzd4* 及び *Fzd7* 陽性の細胞は、*Kit* 陽性細胞の集団とはほとんど一致しないことが明らかとなった。*Fzd4*、*Fzd7*、*Kit* 陽性の細胞集団をそれぞれ分離し、*in vitro* にてメラノサイトに分化誘導したところ、*Fzd4* または *Fzd7* 陽性において *Kit* 陽性細胞に遅れてメラニン合成能を獲得することが分かった。以上の結果より、*Fzd4* または *Fzd7* 陽性細胞は、メラノblastよりも未分化な色素幹細胞であることが強く示唆され、*Fzd4* 及び *Fzd7* は色素幹細胞特異的マーカーとして有用であると考えられた。

2-1. 緒言

様々な組織に存在する体性幹細胞は、組織の恒常性維持や損傷時の修復に重要な役割を担うため、体性幹細胞の枯渇や機能異常は老化や疾患につながると考えられている。皮膚組織にも、表皮、真皮、毛包の機能維持に関わる表皮幹細胞 (Clayton *et al.*, 2007, Mascré *et al.*, 2012)、真皮幹細胞 (Fernandes *et al.*, 2004, Haebe *et al.*, 2011)、毛包幹細胞 (Oshima *et al.*, 2001, Tumber *et al.*, 2004) などの複数の体性幹細胞が存在することが報告されている。これらの幹細胞は、皮膚の恒常性維持や老化に関わると考えられている。メラノサイトは、皮膚や毛髪の色を左右するメラニンの合成を担う色素細胞であり、表皮や毛球に局在する (Yamaguchi *et al.*, 2007, Slominski *et al.*, 2005)。Dct プロモーター下で *LacZ* を発現するトランスジェニックマウス (Dct-*LacZ* マウス) を用いた解析の結果、毛包のバルジ領域にメラノサイトを供給する細胞が存在することが明らかとなり、色素幹細胞と名付けられた (Nishimura *et al.*, 2002)。色素幹細胞は、毛周期に同調して毛髪にメラニンを供給する毛球部メラノサイトへと分化する。すなわち、休止期毛ではバルジ領域で休眠状態にある色素幹細胞は、毛周期が成長期へと移行する際に分裂し、まだメラニン合成能を獲得していないメラノサイトの前駆細胞であるメラノblastを供給する。メラノblastはバルジから毛球へと移動し、成熟したメラノサイトへと分化して毛髪にメラニンを供給するようになる。その後、毛周期が退行期へと移行すると、毛球部のメラノサイトはアポトーシスして消失するのに対し、色素幹細胞はバルジ領域で生存し続け、再びに次の成長期にはメラノblastを供給する。色素幹細胞が、退行期にアポトーシスを逃れるためには、*Bcl2* の発現や *Notch* シグナルが必要であることが示されている (Mak *et al.*, 2006, Moriyama *et al.*, 2006)。発生過程において、神経堤細胞由来の未分化なメラノblastが真皮を通過して表皮に到達するとともに毛包内へ侵入し、表皮や毛球のメラノサイトとなることが以前から分かっている (Goding *et al.*, 2007, White

et al., 2008, Thomas *et al.*, 2008)。この過程で、毛包内に移動したメラノブラストの一部がバルジ領域にとどまり、色素幹細胞として長期間維持されることが明らかとなった (Mak *et al.*, 2006)。

これまでにマウスを用いた検討から、バルジ領域に局在する色素幹細胞の性質が明らかになってきた。細胞表面の受容体である Kit にそのリガンド Scf (stem cell factor) が結合することが生存に必須であるメラノブラストやメラノサイトと異なり (Nishikawa *et al.*, 1991; Kunisada *et al.*, 1998)、色素幹細胞は Kit 非依存的に生存することが可能であることが示された。Kit 受容体をブロックする抗 Kit 抗体をマウスに投与すると、毛球部のメラノサイトが消失し白毛となるが、色素幹細胞は影響を受けないため、毛周期が成長期へ移行すると新しいメラノサイトが供給されて色素が回復する。また、メラノサイトが発現する Dct, Pax3, Tyr, Tyrp1, Mitf, Sox10 などのマーカーのうち、色素幹細胞は Dct 及び Pax3 だけを発現することが示された (Osawa *et al.*, 2005)。これらのマーカーは細胞内の核またはメラノソームに局在するため、発現パターンや細胞の局在部位により色素幹細胞とメラノサイトを区別することは可能だが、トランスジェニックマウスを作製せずにフローサイトメーターなどによって分離し、詳細に解析することは難しい (Yonetani *et al.*, 2008)。白髪や色素異常症の発症メカニズムや治療及び改善方法の開発には、色素幹細胞特異的に発現する表面マーカーを利用して色素幹細胞の性質をより詳細に解析する必要がある。また、2005 年に、色素幹細胞の分化を Groucho が抑制していることが示された (Lang *et al.*, 2005)。Groucho は古典的 Wnt シグナル経路であるβ-カテニン経路において、β-カテニンと LEF1/TCF 複合体の非存在下では標的遺伝子を抑制する。毛周期が成長期に移行し色素幹細胞が分化する際には、β-カテニンの活性化に伴い Dct プロモーターから Groucho が乖離することが必要である。したがって、色素幹細胞の分化に関与すると考えられる Wnt シグナルを中心に色素幹細胞特異的に発現する表面マーカーの探索を行った。

2-2. 結果

2-2-1. マウス毛包における遺伝子発現解析

これまでの色素幹細胞研究の多くは Dct-LacZ マウスを用いることで、色素幹細胞を毛包のバルジ領域に局在する LacZ 陽性かつドーパ反応陰性の細胞として検出することを可能としてきた (Nishimura *et al.*, 2002, Nishimura *et al.*, 2005)。まず、体毛が完全に出来上がっている生後 9 日目の C57BL/6 マウスの背部皮膚組織において、免疫染色により Dct 陽性細胞の検出を試みた。その結果、Fig. 2-1 に示すように、毛包のバルジ領域及び毛球部に Dct 陽性細胞の存在を確認した。次に、色素幹細胞特異的に発現するマーカーを同定するために、Dct の免疫染色像を参考に (Fig. 2-2A)、毛包を以下の 4 区画に分けて、それぞれの遺伝子発現を比較した。毛包を下から順に①毛球 (hair bulb)、②バルジ下 (lower bulge)、③バルジ (bulge)、④バルジ上 (upper bulge) として、Fig. 2-2B に示すようにレーザーマイクロダイセクションにより別々に採取した。採取した組織から total RNA を抽出し、リアルタイム PCR によりメラノサイトマーカーや細胞表面に発現する受容体の遺伝子発現量を解析した。その結果、成熟したメラノサイトのマーカーであり、メラニン合成酵素やメラノソーム形成に関わる Tyr, Tyrp1, Si, P については、毛球でのみ発現を認めた (Fig. 2-3)。一方、色素幹細胞とメラノサイトの共通マーカーである Dct 及び Pax3 については、毛球部と比較すると発現量は低いもののバルジ領域でも発現を認めた。次に Wnt シグナル関連の受容体について検討した結果、Fzd2/4/7 (Fig. 2-4)、古

典型的経路の共受容体である Lrp5/6 の発現がバルジ領域で高いことを見出した (Fig. 2-5)。その他の Fzd や、非古典的経路の受容体である *Kremen1/2*、*receptor-like tyrosine kinase (Ryk)*、*receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (Ror2)* の発現は低かった。なお、内部標準遺伝子としては、色素幹細胞からメラノサイトまで比較的安定して発現している *ribosomal protein L23 (Rpl23)* を指標としたが (Osawa *et al.*, 2005)、*Gapdh* を内部標準とした場合も同様の傾向を示した。Fzd2 は色素幹細胞と同様にバルジ領域に存在する毛包幹細胞のマーカーとしても知られる (Blanpain *et al.*, 2004)。また、毛包の形成にはβ-カテニンの活性化が必要であることから (Gat *et al.*, 1998, Huelsken *et al.*, 2001)、古典的経路の共受容体である Lrp5/6 は毛包幹細胞にとっても重要であると考えられる。したがって、色素幹細胞特異的のマーカー候補として Fzd4 及び 7 が有力であると考え、以降の実験を行った。

2-2-2. 皮膚組織における Fzd4 または Fzd7 陽性細胞の局在

Fzd4 遺伝子の変異は色素細胞の発生異常を生じ (Color Genes, <http://www.espcr.org/micemut/>)、Fzd7 は発生過程でメラノサイトの起源となる神経堤細胞に重要であることから (Abu-Elmagd *et al.*, 2006)、これらの Wnt 受容体は色素幹細胞特異的マーカーの候補として妥当であると考えられる。Fzd4 及び Fzd7 のタンパク質レベルの局在を解析するため、生後 9 日目の C57BL/6 マウスの背部皮膚組織において免疫染色を行った。その結果、毛包の外毛根鞘に Fzd4 (Fig. 2-6A, B) または Fzd7 陽性細胞が観察され (Fig. 2-6C, D)、特にバルジ領域で強い染色を認めた。また、毛球部においては、これらの陽性細胞の存在は認めなかった。

Scf 受容体である Kit は、色素幹細胞における発現は極めて低いか検出限界以下であり、メラノブラストやメラノサイトでは強く発現していることが知られている (Jordan *et al.*, 2000)。また、新生仔マウスの皮膚における Kit 陽性細胞の多くは比較的未分化なメラノブラストであると考えられている (Nishikawa-Torikai *et al.*, 2011)。メラノブラストにおける Fzd4 及び Fzd7 の発現を確認するため、生後 1 日齢の C57BL/6 マウスの背部皮膚組織から毛包及び表皮の基底細胞集団を分離し、Fzd4/Kit または Fzd7/Kit の二重染色を行い、フローサイトメーターにより細胞集団の解析を行った。Fig. 2-7 に示したように、Fzd4⁺/Kit⁺細胞及び Fzd7⁺/Kit⁺細胞はほとんど検出されなかった。色素幹細胞であると期待される Fzd4⁺/Kit⁺細胞は 2.1 ± 1.1 %、Kit 陽性のメラノブラストは 2.4 ± 0.6 % であった (Fig. 2-7A)。また、同様に色素幹細胞であると期待される Fzd7⁺/Kit⁺細胞は 2.1 ± 1.1 % であった (Fig. 2-7B)。以上の結果より、バルジ領域に存在する Fzd4 または Fzd7 陽性細胞は、メラノブラストとは異なることが示された。

2-2-3. Fzd4 または Fzd7 陽性細胞の分離及びメラノサイトへの分化誘導

次に、*in vitro* における Fzd4 または Fzd7 陽性細胞の性質を解析するため、Kit、Fzd4、Fzd7 陽性の細胞を、生後 1 日齢の C57BL/6 マウスの背部皮膚組織からフローサイトメーターにより分離した。分離した細胞は、IV型コラーゲンをコートしたディッシュに播種し、10 % FBS、50 ng/mL SCF、100 ng/mL EDN3、0.5 mM DBcAMP 存在下で 21 日間培養してメラノサイトへと分化誘導した。経時的に顕微鏡下で観察した結果、Kit 陽性のメラノブラストは、培養 7 日後にはメラニン含有量は少ないものの樹状突起を有するメラノサイトへ分化し始める様子が観察された (Fig. 2-8B)。14 日後には、大部分の細胞

が多くの樹状突起をもったメラノサイトへ分化した (Fig. 2-8C)。21 日後には、細胞の形態的な変化は観察されなかったが、細胞内のメラニン量の増加を認めた (Fig. 2-8D)。一方、Fzd4 または Fzd7 陽性細胞は、一部の細胞はメラニンを含有していたものの、7 日後までにはほとんど形態的な変化を示さなかった (Fig. 2-8F, J)。14 日後には、メラニンを含有するメラノサイトの数は顕著に増加し、7 日後のメラノブラストに近い段階まで分化した (Fig. 2-8G, K)。21 日後には、さらに分化の段階が進み、樹状突起を有し、メラニンを大量に含有するメラノサイトに分化した (Fig. 2-8H, L)。以上の結果から、Fzd4 または Fzd7 陽性細胞は、Kit 陽性のメラノブラストに遅れてメラノサイトへと分化することが示唆された。

メラノサイトへの分化の過程をより詳細に解析するために、リアルタイム PCR によりメラニン合成関連遺伝子の発現変化を解析した (Fig. 2-9)。Kit 陽性のメラノブラストでは、*Dct*、*Tyr*、*Tyrp1* の遺伝子発現はいずれも分化誘導 14 日後までは経時的に増加し、14 日～21 日後にかけてはほぼ一定であった。一方、Fzd4 及び Fzd7 陽性細胞では、Kit 陽性細胞に遅れてこれらの遺伝子発現が亢進したが、Kit 陽性細胞と比較すると低かった。分化誘導 21 日後の *Dct*、*Tyr*、*Tyrp1* の遺伝子発現量は、Kit 陽性細胞に対して、Fzd4 陽性細胞で 67 %、59 %、77 % であり、Fzd7 陽性細胞で 60 %、54 %、86 % であった。以上の結果より、Fzd4 及び Fzd7 陽性細胞は、メラノブラストよりも未分化な色素細胞系譜であることが示された。また、バルジ領域に局在することから色素幹細胞であることが強く示唆され、Fzd4 及び Fzd7 は色素幹細胞特異的のマーカースとして有用であると考えられた。

2-3. 考察

これまでに、毛包のバルジ領域に存在する色素幹細胞は、遺伝子レベル、タンパク質レベルのいずれにおいても *Dct* 及び *Pax3* を発現することが報告されている (Nishimura *et al.*, 2002, Osawa *et al.*, 2005, Lang *et al.*, 2005)。これらの知見をもとに開発された *Dct* や *Pax3* のプロモーター下で *LacZ* や *GFP* を発現するトランスジェニックマウスは、色素幹細胞を解析する上で非常に便利なツールである (Yonetani *et al.*, 2008, Djian-Zaouche *et al.*, 2012)。しかしながら、白髪や色素異常症の発症メカニズムにおける色素幹細胞の関与や新しい治療法の開発には、これまで以上に詳細な解析が必要となるが、ヒトや野生型のマウスあるいは他の因子の発現を蛍光タンパク質や *LacZ* で確認するためのトランスジェニックマウスでは、*Dct* や *Pax3* を指標として色素幹細胞を解析していくことは難しい。なぜなら、*Dct* はメラノソームに、*Pax3* は核に局在するタンパク質であるために、これらを指標に生きた色素幹細胞を分離することはできない。また、これらはいずれも分化したメラノブラストやメラノサイトでも発現するため、色素幹細胞と他の色素細胞系譜の区別は、その局在に大きく依存するため、組織切片等でなければ色素幹細胞を特定できないという問題がある。したがって、これらの問題を解決し、色素幹細胞を詳細に解析するには、色素幹細胞に特異的に発現する表面マーカースの同定が不可避であった。

これまでに、色素幹細胞の分化には古典的 Wnt シグナル経路である β -カテニン経路の活性化が必要であることが報告されていることから (Lang *et al.*, 2005)、色素幹細胞は常に分化の刺激となる Wnt に反応する準備をしていると考えられ、その受容体を発現していると予想された。本研究では、色素幹細胞特異的のマーカースを同定するために、色素幹細胞の分化に関与すると考えられる Wnt シグナルを中心に毛包の中でもバルジ領域で特に発現が高い遺伝子を探索した。レーザーマイクロダイセクションにより毛包を 4 区画に分けて採取し、遺伝子発現解析を行ったところ、*Fzd4*、*Fzd7*、*Lrp5*、*Lrp6* が

バルジ領域で高発現していた (Fig. 2-4, 2-5)。これらは古典的 Wnt シグナル経路の受容体であることから、色素幹細胞マーカーの候補として有力であると考えられた。免疫染色によりバルジ領域において Fzd4 及び Fzd7 がタンパク質レベルでも発現することを確認した (Fig. 2-6)。Lrp5 及び Lrp6 についてはタンパク質レベルの発現は解析していないが、これらは Wnt に対する Fzd の共受容体であるため、色素幹細胞において Fzd4 及び Fzd7 と協調して働いていると推察される。Fzd4 遺伝子の変異マウスは体毛の色素が薄くなること (Color Genes, <http://www.espcr.org/micemut/>)、Fzd7 は胚発生過程におけるメラノブラストの起源となる神経堤細胞の発生に必要な不可欠であることが知られている (Abu-Elmagd *et al.*, 2006)。したがって、これらの Wnt 受容体はいずれも色素細胞系譜の発生あるいは分化に関与すると考えられ、色素幹細胞に特異的に発現することは妥当なことだと考えられる。フローサイトメーターによる解析により、Fzd4 及び Fzd7 陽性細胞では Kit の発現はほとんど検出されなかったことから (Fig. 2-7)、これらの細胞はメラノブラストとは異なる細胞であることが示された。実際に Fzd4、Fzd7、Kit をそれぞれ発現する細胞を分離し、*in vitro* でメラノサイトへと分化誘導した結果、Kit 陽性細胞に遅れて Fzd4 及び Fzd7 陽性細胞が、細胞内にメラニンを含有した樹状突起を持つメラノサイトへ分化することが明らかになった (Fig. 2-8)。また、細胞の形態だけでなく、メラニン合成関連の遺伝子発現も同様の傾向を示した (Fig. 2-9)。以上の結果より、Fzd4 及び Fzd7 陽性細胞は、バルジ領域に存在し、メラノサイトへの分化能を持ったメラノブラストよりも未分化な細胞であることが証明された。このような特徴は色素幹細胞の性質と一致することから、Fzd4 及び Fzd7 陽性細胞は色素幹細胞であるとみなすことができる。すなわち、Fzd4 及び Fzd7 は色素幹細胞特異的のマーカーとして有用であると考えられた。

毛包幹細胞や表皮幹細胞などの皮膚組織に存在する幹細胞は、Wnt (Silva-Vargas *et al.*, 2005, Ito M *et al.*, 2007, Lowry *et al.*, 2005, Van Mater *et al.*, 2003)、Notch (Aubin-Houzelstein *et al.*, 2008, Moriyama *et al.*, 2008, Blanpain *et al.*, 2006)、BMP (Blanpain *et al.*, 2009, Kobiela *et al.*, 2007, Horsley *et al.*, 2008) などの様々なシグナルによって制御されることが知られている。色素幹細胞では、Mitf の Dct プロモーターへの結合を Pax3 が競合的に阻害することで Dct の発現レベルが低く保たれて未分化状態が維持されていることが報告されている (Lang *et al.*, 2005)。古典的 Wnt シグナル経路の活性化に伴いβ-カテニンが核内に移行すると、Groucho が Dct プロモーターから解離し、Mitf が結合して Dct の遺伝子発現が亢進する。すなわち、色素幹細胞の分化には古典的 Wnt シグナル経路の活性化、すなわち色素幹細胞の表面に発現する Wnt 受容体への Wnt リガンドの結合が必要である。したがって、色素幹細胞は常に分化の刺激となる Wnt に反応する準備をしていると考えられ、その受容体を発現しているはずである。今回得られた知見は、この仮説と一致する。つまり、Fzd4 及び Fzd7 と Lrp5 及び Lrp6 が、分化の刺激となる Wnt をいつでも受け取ることができるように、色素幹細胞表面に発現していると考えられる。また、Wnt シグナルの抑制因子である Wif1 (wnt inhibitory factor 1)、Sfrp1 (secreted frizzled-related protein 1)、Dkk4 (dikoppf 4) が色素幹細胞で発現していることが示されており、これらは通常、分化を抑制し未分化性の維持に寄与していると予想される。Wnt シグナルがどのように色素幹細胞の分化を調節するのかについて、詳細は今後さらなる検討を必要とするが、少なくとも Fzd4 及び Fzd7 は色素幹細胞マーカーとしては有用であり、今後の色素幹細胞研究の進展に貢献する知見であると考えられる。

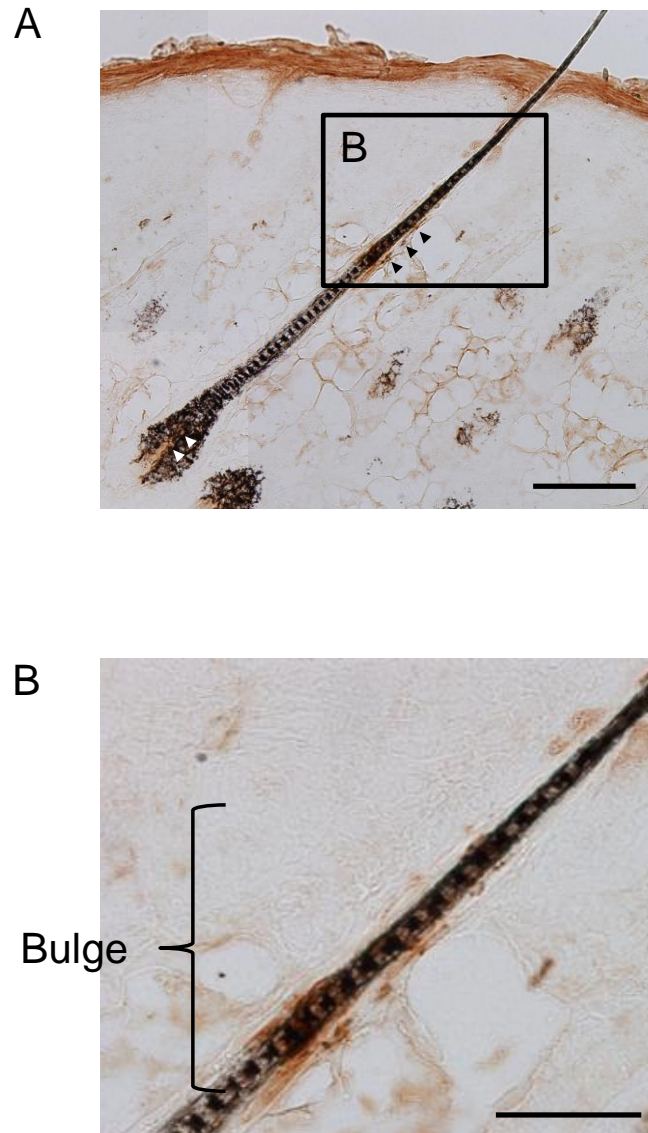


Fig. 2-1 C57BL/6マウスにおけるDctの免疫染色

(A) 9日齢のC57BL/6マウス背部皮膚組織切片におけるDctの免疫染色 (Scale bar = 100 μ m)。

矢頭はDct陽性部位。

(B) (A) のバルジ領域の拡大像 (Scale bar = 50 μ m)。

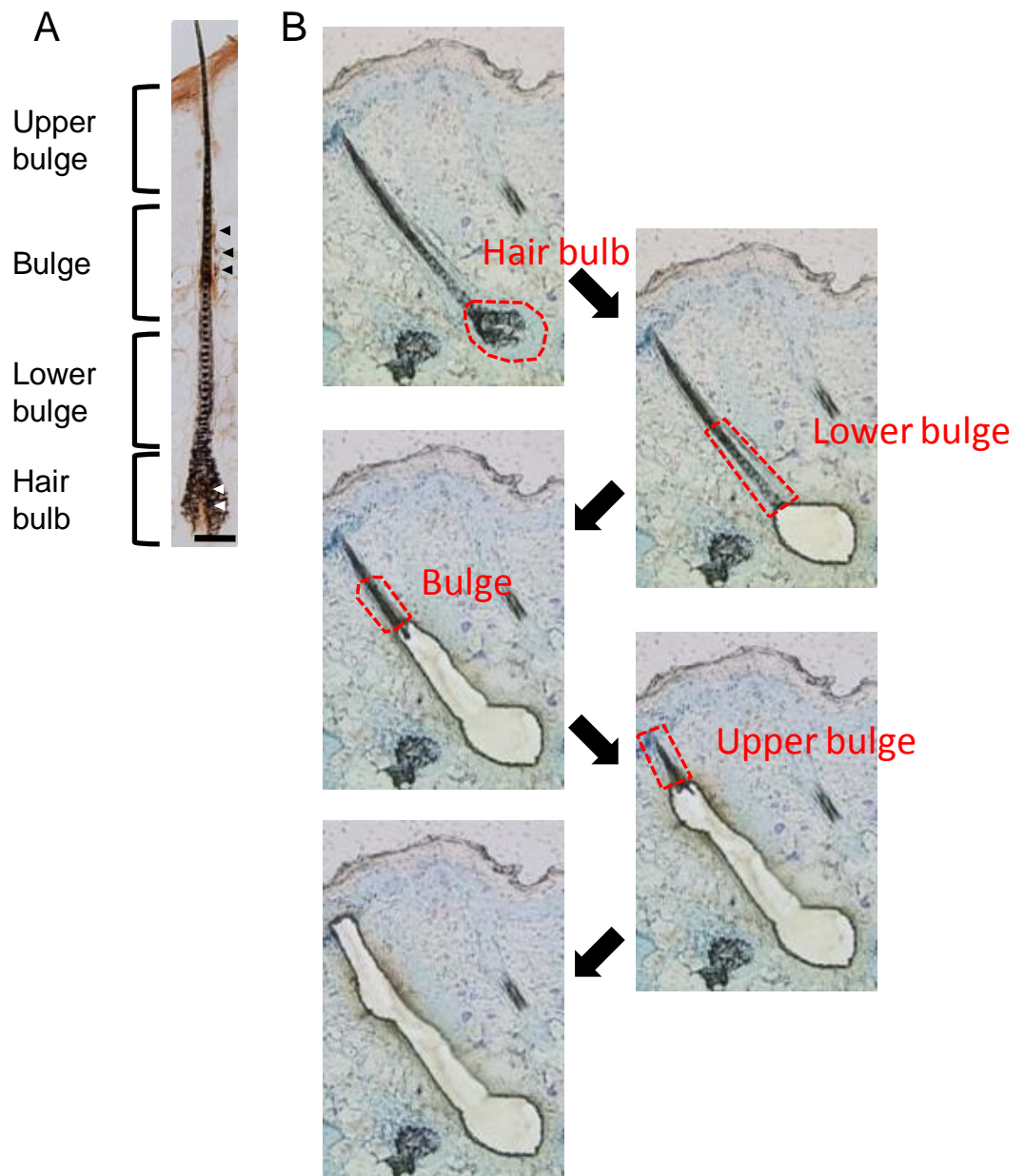


Fig. 2-2 レーザーマイクロダイセクションによる毛包組織の採取

(A) 9日齢のC57BL/6マウス毛包を4区画に分けた (Scale bar = 50 μm)。

(B) トルイジンブルー染色後に、レーザーマイクロダイセクションにより、毛球 (hair bulb) →バルジ下 (lower bulge) →バルジ (bulge) →バルジ上 (upper bulge) の順に採取した (Bar = 50 μm)。

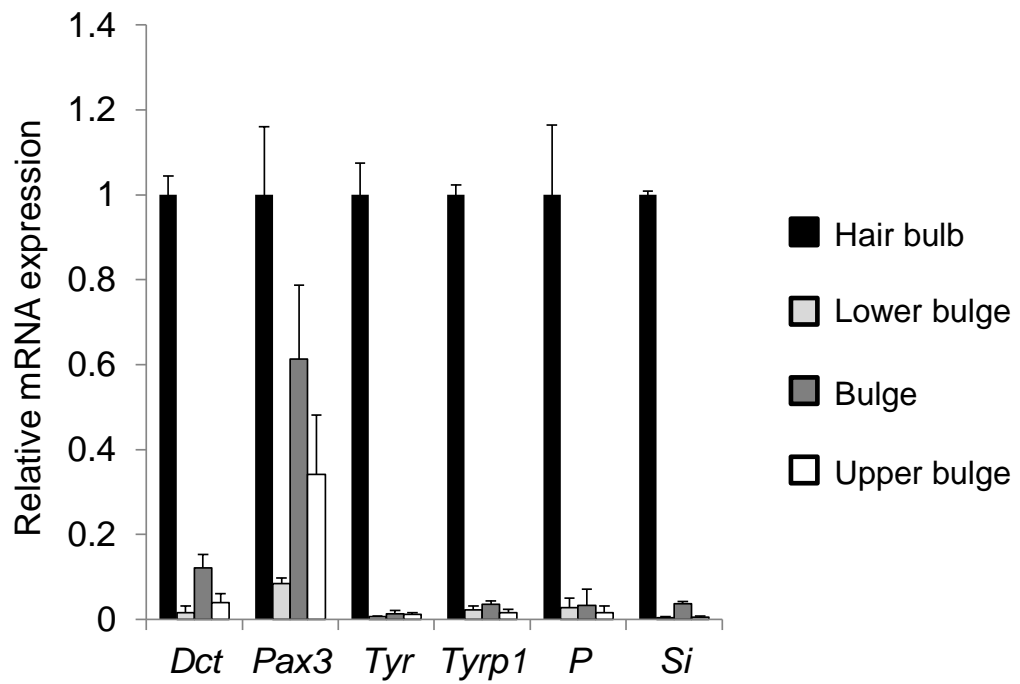


Fig. 2-3 毛包の各部位におけるメラノサイト関連遺伝子の発現

レーザーマイクロダイセクションにより採取したサンプルについて、リアルタイムPCRにより、メラノサイト関連遺伝子の発現解析を行った。

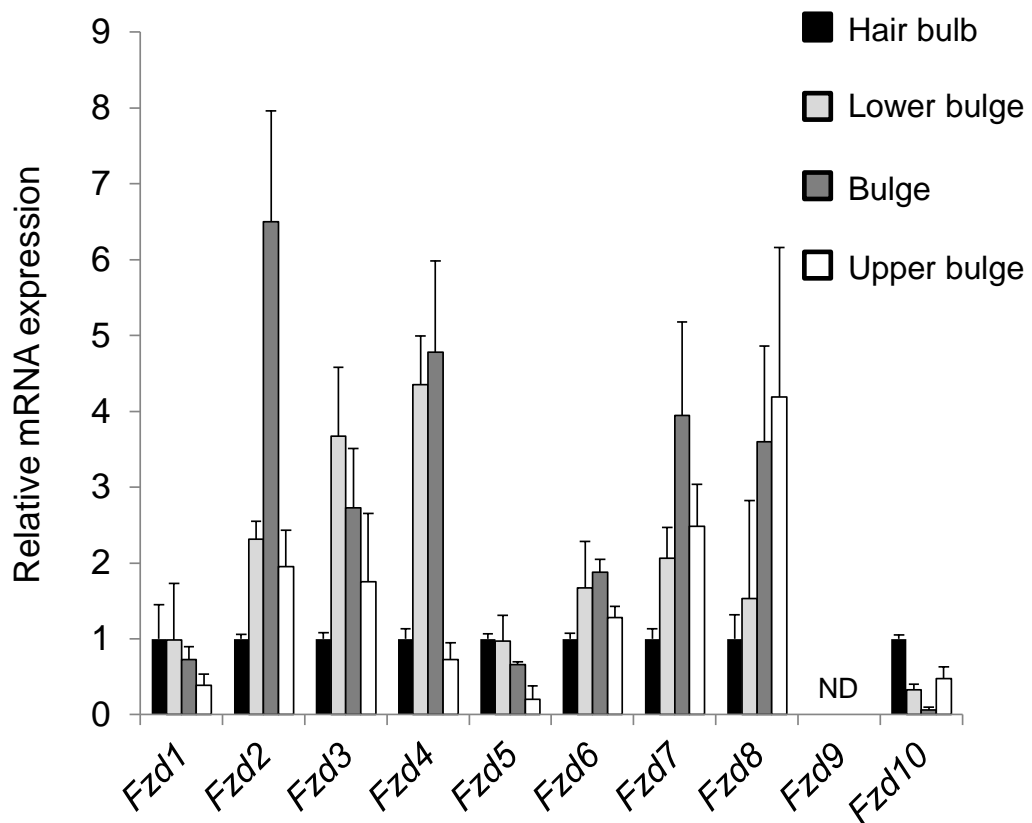


Fig. 2-4 毛包の各部位におけるFzdの遺伝子の発現

レーザーマイクロダイセクションにより採取したサンプルについて、リアルタイムPCRにより、Fzd遺伝子の発現解析を行った (ND, not detected)。

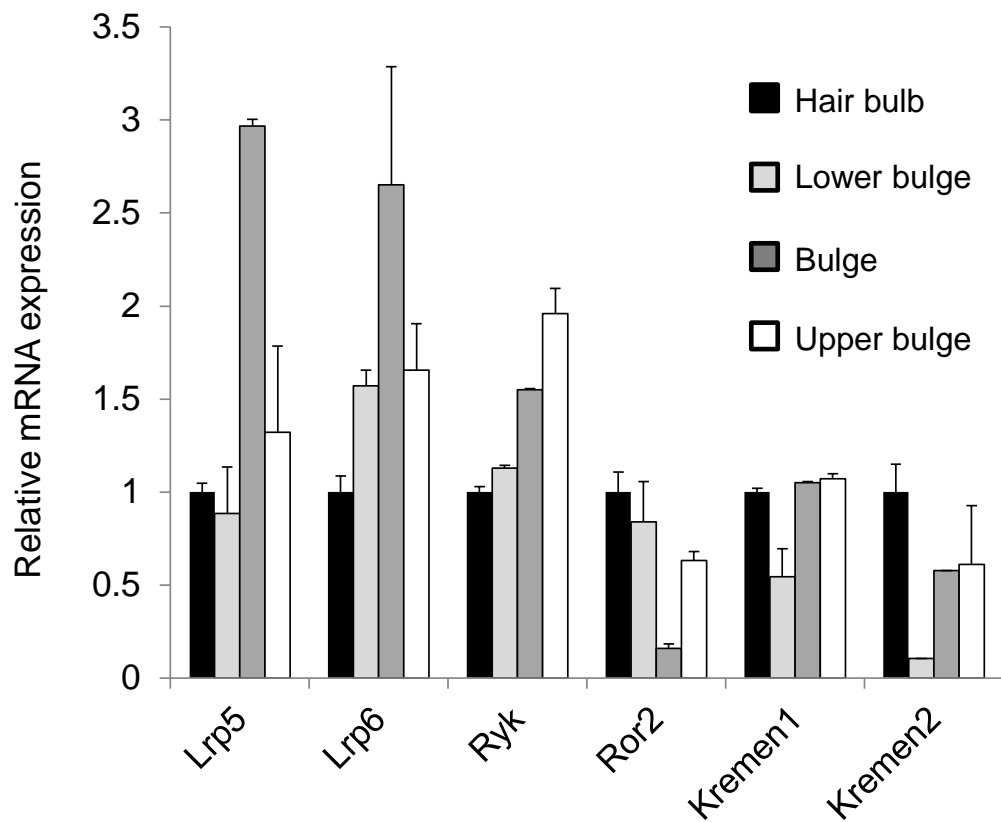


Fig. 2-5 毛包の各部位におけるWnt関連受容体の遺伝子の発現

レーザーマイクロダイセクションにより採取したサンプルについて、リアルタイムPCRにより、Wnt関連受容体遺伝子の発現解析を行った。

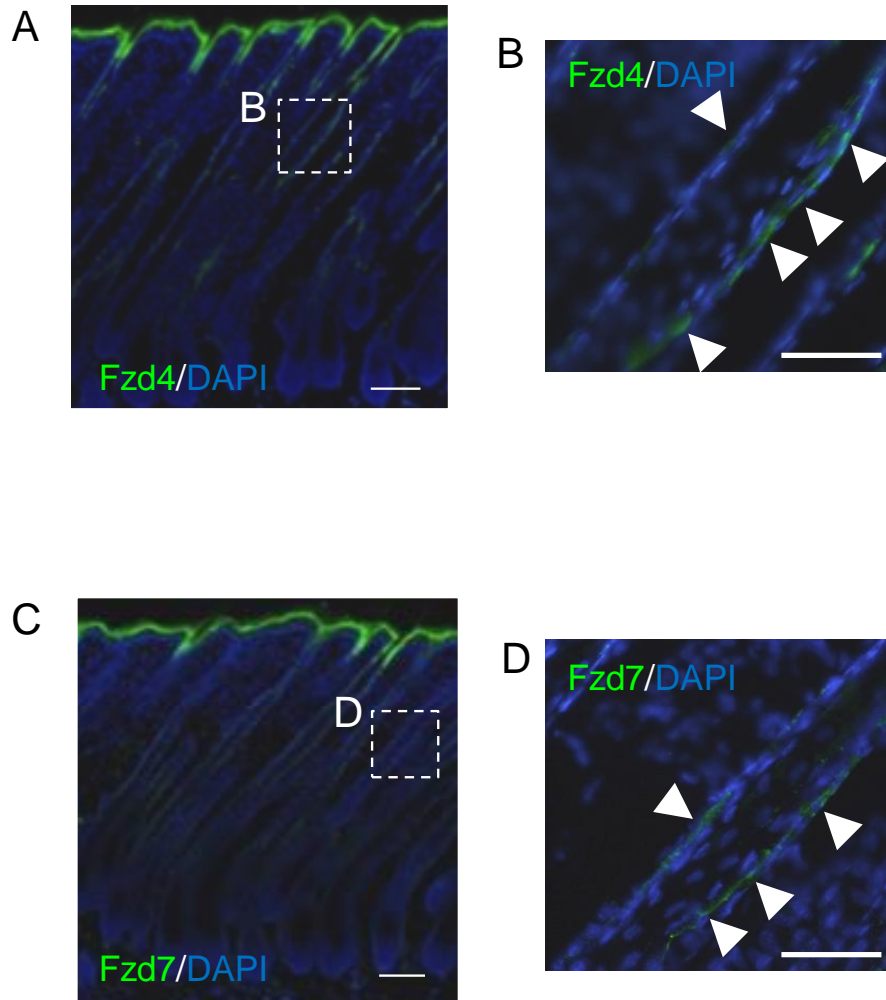


Fig. 2-6 毛包におけるFzd4及びFzd7の局在解析

(A) 9日齢のC57BL/6マウス背部皮膚組織切片におけるFzd4の免疫染色 (Scale bar = 50 μ m)。

(B) (A) のバルジ領域の拡大像 (Scale bar = 50 μ m)。

(C) 9日齢のC57BL/6マウス背部皮膚組織切片におけるFzd7の免疫染色 (Scale bar = 50 μ m)。

(D) (C) のバルジ領域の拡大像 (Scale bar = 50 μ m)。

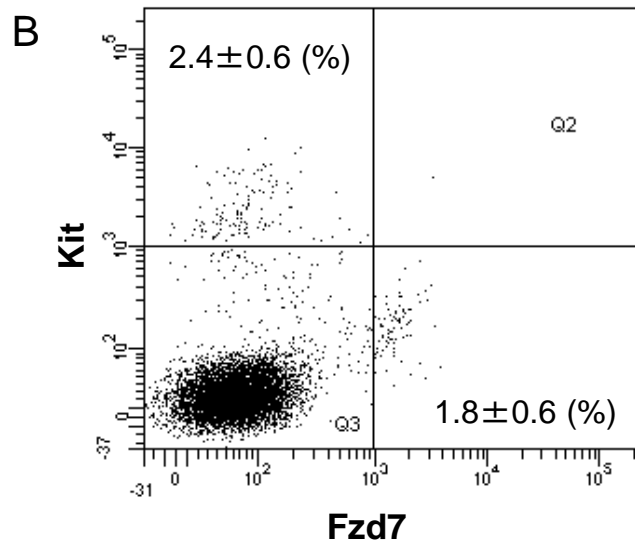
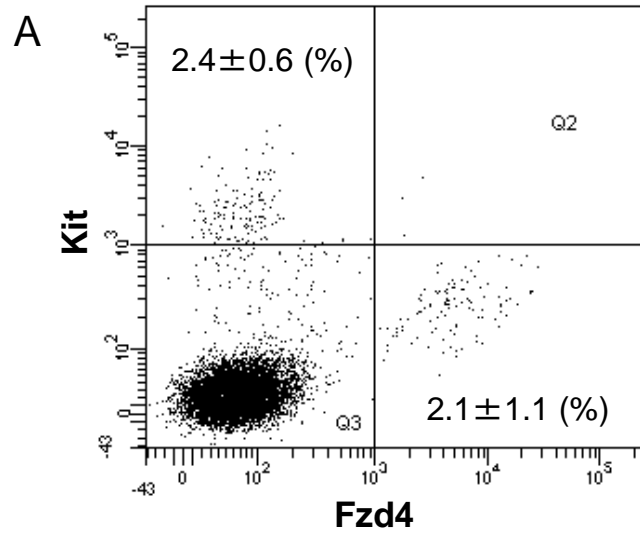


Fig. 2-7 Fzd4及びFzd7陽性細胞集団の解析

1日齢のC57BL/6マウスの表皮基底細胞におけるKit及びFzd4 (A) またはFzd7 (B) 陽性細胞について、フローサイトメーターにより解析した。

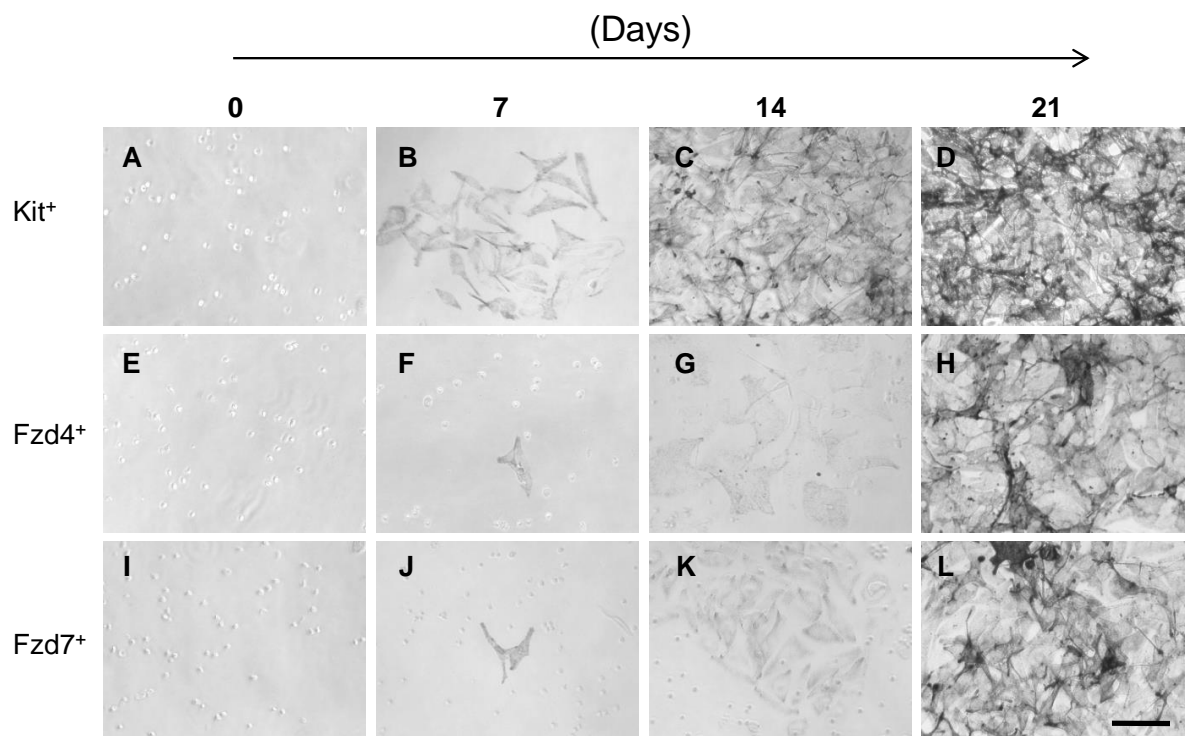


Fig. 2-8 メラノサイトへの分化誘導過程における細胞の形態変化

1日齢のC57BL/6マウスより分離したKit (A-D)、Fzd4 (E-H)、Fzd7 (I-L) 陽性細胞をフローサイトメーターにより分離し、メラノサイト分化誘導培地にて培養した (Scale bar = 50 μ m)。

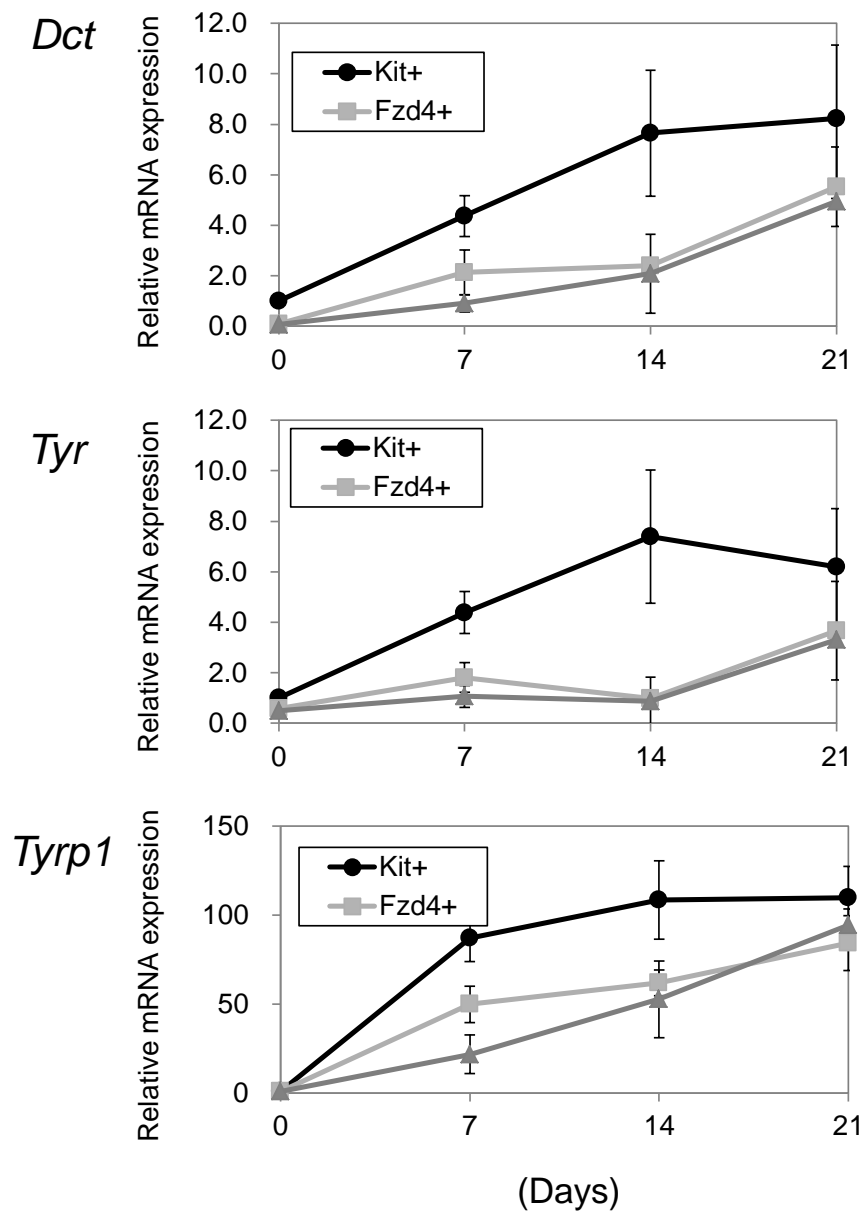


Fig. 2-9 メラノサイトへの分化誘導過程における遺伝子発現変化

Kit、Fzd4、Fzd7陽性細胞の分化過程において、リアルタイムPCRによりメラニン合成関連酵素 (*Dct*, *Tyr*, *Tyrp1*)の遺伝子発現を解析した。

第3章

紫外線による色素幹細胞の分化誘導 メカニズムの解析

第3章

紫外線による色素幹細胞の分化誘導メカニズムの解析

要約

紫外線 (ultraviolet: UV) は、代表的な表皮色素沈着のインデューサーであり、尋常性白斑の治療にも応用されている。表皮の色素沈着過程における色素幹細胞の関与を検討するため、HR-1 と HR/De の F1 マウスに UVB を照射し、色素細胞系譜を解析した。その結果、UVB 照射 3 日後をピークに、一過的に毛包内にメラノブラストが出現し、次いで 7 日後から表皮メラノサイトの増加が観察された。また、照射 1 日後に *Wnt7a* の発現亢進及び 1~3 日後に色素幹細胞における β -カテニンの核内移行を確認した。*Wnt7a* に対する siRNA 及び β -カテニンの阻害剤を処理することで、UVB 照射による表皮メラノサイトの増加が抑制された。以上の結果より、UVB 照射により、色素幹細胞がメラノブラストへ分化し、このメラノブラストが表皮へと移動してメラノサイトに最終分化することが示された。このような色素幹細胞から表皮メラノサイトへの分化メカニズムに関する知見は、尋常性白斑だけでなく他の色素異常症の新しい治療法の確立に有益であると考えられた。

3-1. 緒言

UV は最もよく知られた表皮色素沈着のインデューサーであり、表皮ケラチノサイトからメラニン合成を刺激するサイトカインや増殖因子の分泌を促す。表皮メラノサイトの消失により生じる脱色素斑を特徴とする尋常性白斑の治療では、患部への UV 照射によって毛孔に一致して再色素沈着が認められる場合がある (Falabella *et al.*, 2009; Falabella, 2009)。また、UV 照射以外に漢方薬による治療過程でも、毛包が再色素沈着に重要であることが報告されていた (Cui *et al.*, 1991)。このような現象から、毛包の中には UV などの刺激に反応してメラノサイトへ分化しながら表皮へと移動するメラノサイトの供給源となる細胞が存在すると推察されていたが、長い間その詳細は不明であった。その後、毛包内のバルジ領域に色素幹細胞が存在し、毛周期に応じて毛球にメラノサイトを供給することが明らかとなった (Nishimura *et al.*, 2002; Steingrímsson *et al.*, 2005)。通常マウスの表皮にはメラノサイトはほとんど存在しないが、ケラチン 14 プロモーター下で基底層ケラチノサイトに特異的に SCF を発現させたトランスジェニックマウスでは、メラノサイトが毛球だけでなく表皮にも局在する (Kunisada *et al.*, 1998)。このマウスに抗 Kit 抗体を投与することで Kit 依存的に生存するメラノブラストやメラノサイトを枯渇させると、体毛及び皮膚の色素が消失する (Nishikawa *et al.*, 1991)。抗 Kit 抗体の投与をやめると、体毛だけでなく皮膚の色素も回復することから、色素幹細胞は毛球メラノサイトと同様に表皮メラノサイトの供給源であることが示された。毛周期が休止期から成長期に移行する際に、色素幹細胞が毛球メラノサイトを供給するためにメラノブラストへと分化するメカニズムには、Wnt シグナルが関与することが報告されている。Wnt は大きなファミリーを形成する分泌タンパク質であり、受容体である Fzd に結合することで細胞内にシグナルを伝える。哺乳類では Wnt は 19 種類、Fzd は 10 種類同定されており (Nusse, 2008)、細胞の種類や目的に応じて使い分けられていると推測されている。色素幹細胞の分化に重要なのは古典的 Wnt 経路であり、毛周期が成長期に入る際に Wnt の発現が一過的に亢進することや (Rabbani *et al.*, 2010)、Groucho による Dct の発現抑制を解除することが報告されている (Lang *et al.*,

2005)。また、色素幹細胞の未分化維持に関与する因子として TGF- β シグナルの重要性が指摘されている (Nishimura *et al.*, 2010; Tanimura *et al.*, 2011)。

これまでに、色素幹細胞が本来未分化状態で維持されるべきバルジ領域において、異所性に分化した結果、色素幹細胞が枯渇することが明らかになっている。これにより、メラノサイトが供給できなくなり、白髪が生じると考えられている (Nishimura *et al.*, 2005)。その理由は、DNA 修復に関わる Atm の欠損マウスで色素幹細胞の異所性分化が起こりやすいことから (Inomata *et al.*, 2009)、不十分な DNA 損傷の修復が引き金となっていると推察されている。このように、毛の色と色素幹細胞の関係については比較的多くの知見が集積しつつあるが、表皮メラノサイトと色素幹細胞の関係については不明な点が多い。一般的な成体マウスの表皮にはメラノサイトが存在しないことから (Hirobe, 1984)、これまでは表皮ケラチノサイトによって強制的に Scf や Edn1 を発現させたトランスジェニックマウスでなければ、色素幹細胞が表皮メラノサイトへ分化する様子は観察されていなかった。これらの知見は、色素幹細胞が表皮メラノサイトへ分化しうることを示すものであるが、紫外線による表皮色素沈着過程における色素幹細胞の関与についての報告はなかった。すなわち、白斑の治療過程で観察される再色素沈着の詳細な分子メカニズムは不明なままであった。そこで本研究では、成体の表皮においてもメラノサイトが存在することが報告されている HR-1 と HR/De の F1 マウス (HRDeF1 マウス) に UVB を照射し (Furuya *et al.*, 2009)、表皮色素沈着過程における色素幹細胞の関与について検討した。

3-2. 結果

3-2-1. UVB 照射による表皮メラノサイトの増殖

これまでの報告をもとに、表皮色素沈着を誘導する UVB 照射条件として、麻酔下で 100 mJ/cm² を週に 3 回、4 週間で合計 12 回照射することとした (Fig. 3-1)。麻酔のみで UVB を照射しないマウスをコントロール群とし、UVB 照射群と比較した。HRDeF1 マウスの背部に UVB を照射すると、照射開始 14 日後には肉眼的にも明らかな色素沈着を認め (Fig. 3-2A)、14 日後と 28 日後では差は認めなかった (Fig. 3-2B)。次に、この色素沈着が表皮に常在するメラノサイトによるメラニン合成の亢進によるのか、あるいは新たにメラノサイトが供給されたことによるのかを検討した。マウスから摘出した背部皮膚を NaBr 処理することで表皮を剥離し、得られた表皮シートについてメラノサイトマーカーである Tyrp1 の免疫染色を行った。その結果、Tyrp1 陽性の表皮メラノサイトは、皮膚色に変化を認めなかった UVB 照射 7 日後には増加しており、肉眼的に色素沈着が認められる 14 日後にはより顕著に増加していることが明らかとなった (Fig. 3-3A)。また、皮膚色の変化と同様に、14 日後と 28 日後では差は認めなかった。免疫染色結果をもとに単位面積あたりの Tyrp1 陽性細胞の数をカウントし、経時的な表皮メラノサイトの数の変化を定量した結果、UVB 照射 14 日後以降に有意な増加を認めた (Fig. 3-3B)。

また、表皮シートを L-Dopa とインキュベーションし、ドーパ反応を利用してメラニン合成能を有する細胞が褐色に染色されるドーパ染色を実施した結果、UVB 照射 7 日後には表皮メラノサイトが増加することを確認した (Fig. 3-4A)。また、銀親和性反応を利用してメラニン保有細胞を黒色に染色するフォンタナ・マッソン染色によっても同様の表皮メラノサイトの増加を認めた (Fig. 3-4B)。表皮シートから total RNA を抽出し、リアルタイム PCR によりメラニン合成に関わる Tyrp1、Dct、Tyr の遺伝子発現を解析した結果、いずれも UVB 照射 7 日後には増加し、14 日後にはさらに増加していた。また、14 日後と

28 日後では差は認めず、表皮メラノサイトの数の変化と同様の傾向を示した (Fig. 3-5)。以上の結果より、UVB 照射により表皮メラノサイトが増加することが示された。

3-2-2. UVB 照射による毛包内メラノブラストの出現

UVB 照射 7 日後に出現する Tyrp1 陽性メラノサイトの供給源をつきとめるために、7 日後までの表皮における Tyrp1 陽性メラノサイトの数の変化を解析した。UVB 照射 0、1、3、7 日後に皮膚組織を採取し、表皮シートについて Tyrp1 の免疫染色を行った結果、UVB 照射 7 日後よりも前には表皮における Tyrp1 陽性メラノサイトの増加は認められなかった (Fig. 3-6A 上段)。一方、UVB 照射後、一過的に毛包内に Tyrp1 陽性細胞の存在が確認された (Fig. 3-6A 下段)。毛包内の Tyrp1 陽性細胞は、UVB 照射 1 日後から検出され、3 日後をピークに 7 日後には減少した (Fig. 3-6B)。データとしては示さないが、毛包内に Dopa 染色陽性細胞を認めなかったことから、この Tyrp1 陽性細胞はメラニン合成能を獲得する前のメラノブラストであると考えられた。これらの結果から、UVB 照射により、色素幹細胞から分化したメラノブラストが表皮へと移動した可能性が考えられたため、次に色素幹細胞マーカーである *Fzd4* 及び *Fzd7* について遺伝子発現解析を行った。UVB 照射 7 日後までの皮膚組織について新鮮凍結切片を作成し、トルイジンブルー染色後にレーザーマイクロダイセクションにより表皮と毛包を分けて採取した。毛包と表皮における色素幹細胞マーカーの発現についてリアルタイム PCR により解析した結果、毛包における *Fzd4* 及び *Fzd7* の発現は UVB 照射 1 及び 3 日後に一過的に減少することが分かった (Fig. 3-7)。一方、表皮における発現はほとんど検出されなかった。UVB 照射後、一過的に色素幹細胞が減少している可能性が考えられたため、*Fzd4* 及び *Dct* の共染色を行った。これらはいずれも色素幹細胞マーカーであるが、*Fzd4* はメラノブラストやメラノサイトでは発現しない一方、*Dct* はメラノブラストからメラノサイトまで広く発現する。したがって、毛包内において色素幹細胞は *Fzd4*⁺/*Dct*⁺細胞として、メラノブラストは *Fzd4*⁺/*Dct*⁺細胞として検出される。免疫染色の結果、UVB 照射前に毛包内に存在した *Fzd4*⁺/*Dct*⁺細胞は、UVB 照射 1 及び 3 日後に減少し、7 日後に再び照射前のレベルに戻ることが示された (Fig. 3-8A, C)。一方、UVB 照射 1 及び 3 日後には毛包内に *Fzd4*⁺/*Dct*⁺細胞の存在を確認し、色素幹細胞とメラノブラストの数に逆の相関があることが示された。さらに *Dct* 及び *Kit* の共染色を行った。*Kit* は色素幹細胞ではほとんど検出されず、メラノブラストにおいて高い発現を示す。したがって、毛包内において色素幹細胞は *Dct*⁺/*Kit*⁺細胞として、メラノブラストは *Dct*⁺/*Kit*⁺細胞として検出される。*Dct*⁺/*Kit*⁺細胞は、*Fzd4*⁺/*Dct*⁺細胞と同様に UVB 照射 1 及び 3 日後に減少し、7 日後には再び照射前のレベルに戻っていた (Fig. 3-8B, D)。*Dct*⁺/*Kit*⁺細胞もまた *Fzd4*⁺/*Dct*⁺細胞と同様の挙動を示し、UVB 照射 1 及び 3 日後に毛包内に存在を確認した。この結果からも、色素幹細胞とメラノブラストの数に逆の相関があることが示された。以上の結果をまとめると、UVB 照射後、色素幹細胞は減少し、メラノブラストは増加する。その後、色素幹細胞の数はもとのレベルまで回復し、メラノブラストは消失する。したがって、毛包における *Fzd4* 及び *Fzd7* の遺伝子発現量が低下した理由は、色素幹細胞が減少したためであると考えられた。また、UVB 照射 1~3 日後に出現したメラノブラストが 7 日後に消失する理由としては、表皮へと移動した可能性が考えられる。以上の結果より、UVB 照射により、毛包内で色素幹細胞がメラノブラストへ分化した後、メラノブラストが表皮へと移動する一方で、色素幹細胞は増殖することが示唆された。

3-2-3. Scf/Kit シグナル経路の関与

メラノブラストが表皮へ移動するためには、表皮においてメラノブラストの遊走を促す因子が発現している必要があると考え、UVB 照射後の *Scf* の遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した。*Scf* の遺伝子発現は、UVB 照射 1 日後から増加し、3~7 日後まで亢進したままであった (Fig. 3-9)。このことは毛包内に出現したメラノブラストが *Scf* により表皮へと遊走した可能性を支持するが、*Scf* にはメラノブラストの増殖や分化を促進する効果があることが知られている (Halaban, 2000; Ito *et al.*, 1999)。したがって、もともと表皮に存在するメラノブラストが増殖または分化した結果、表皮のメラノサイトの数が増加した可能性は否定できない。そこで、表皮にメラノサイトやメラノブラストが存在しない環境を作るため、抗 *Kit* 抗体 (ACK2) の投与により UVB を照射する前にあらかじめメラノブラストやメラノサイトを枯渇することを試みた。*Scf* にはメラノブラストやメラノサイトをアポトーシスから保護する効果もあり、*Scf* の受容体である *Kit* を抗体によってブロックすることで、メラノブラストやメラノサイトを枯渇させる一方で、色素幹細胞には影響しないことが知られている (Nishikawa *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1999)。ACK2 を 1 日おきに合計 3 回、20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるように皮内投与し (Fig. 3-1)、採取した表皮シートを免疫染色した結果、もともと表皮に存在した *Typr1* 陽性細胞が消失していることを確認した (Fig. 3-10A)。同様の条件で UVB 照射の 7、5、3 日前に ACK2 を処理したところ、UVB 照射 3 日後の毛包内メラノブラストの増加、7 及び 14 日後の表皮メラノサイトの増加はいずれも抑制されなかった (Fig. 3-10B)。したがって、UVB 照射により増加した表皮メラノサイトは、もともと表皮に存在したメラノブラストの増加によるものではなく、色素幹細胞が分化して新たに供給されたメラノブラストに由来することが示された。また、色素幹細胞から分化したメラノブラストの表皮への移動やその後の分化には、*Scf* が関与する可能性が高いと考えられた。

3-2-4. UVB 照射による古典的 Wnt シグナル経路の活性化

色素幹細胞は、古典的 Wnt シグナル経路の受容体である *Fzd4*、*Fzd7*、*Lrp5*、*Lrp6* を発現するとともに、色素幹細胞の分化には本経路の活性化が関与するとの報告がある (Rabbani *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2005)。UVB は、ケラチノサイトによる様々なサイトカインや増殖因子の分泌を誘導するが (Yamaguchi *et al.*, 2009)、UVB 照射と Wnt シグナルの関係については明らかになっていない。そこで、UVB 照射によって誘導される色素幹細胞の分化において、Wnt シグナルの関与を検討するため、UVB 照射 7 日後までの経時的な Wnt リガンドの遺伝子発現変化をリアルタイム PCR により解析した。その結果、UVB 照射 1 日後に *Wnt7a* の遺伝子発現のみが顕著に亢進した (Fig. 3-11A)。*Wnt7a* は古典的 Wnt シグナル経路を活性化することが知られており (Spinsanti *et al.*, 2008)、色素幹細胞の分化にも大きく関与する可能性が考えられた。UVB は表皮ケラチノサイトからの増殖因子などの分泌を誘導するが、バルジ領域において色素幹細胞と隣接して存在する毛包幹細胞が色素幹細胞の分化制御因子を分泌することから (Tanimura *et al.*, 2011; Rabbani *et al.*, 2011)、*Wnt7a* を発現する細胞の特定を試みた。UVB 照射 1 日後の表皮より採取した基底細胞を抗 *CD34*、*CD49f*、*CD29*、*Fzd4* により染色し、フローサイトメーターにより *CD34*⁺/*CD49f*⁺ の毛包幹細胞、*CD34*⁻/*CD49f*^{low} の毛包ケラチノサイト (外毛根鞘細胞)、*CD34*⁻/*CD49f*^{high} の表皮ケラチノサイト、*Fzd4*⁺ の色素幹細胞をそれぞれ分離した後、RNA を抽出してリアルタイム PCR を実施した。その結果、*Wnt7a* の遺伝子発現は、毛包幹細胞、

毛包ケラチノサイト、表皮ケラチノサイトのいずれにおいても顕著に亢進していたが、色素幹細胞では検出されなかった (Fig. 3-11B)。UVB によって発現が誘導された *Wnt7a* が色素幹細胞の分化に関与するのであれば、色素幹細胞において古典的 Wnt シグナル経路の活性化が認められるはずである。そこで、古典的 Wnt シグナル経路の活性化の指標であるβ-カテニンの核内移行について検討するため、β-カテニンと *Dct* の共染色を行った。UVB 照射により、核内β-カテニン陽性の *Dct* 陽性細胞が一過的に増加し、本経路が色素幹細胞から分化したメラノblastにおいて活性化されていることが示された (Fig. 3-12)。以上の結果より、UVB 照射により、上皮系細胞において誘導される *Wnt7a* の発現が、色素幹細胞の分化の引き金となっていることが推察された。

3-2-4. 古典的 Wnt シグナル経路による UVB 誘導性色素幹細胞の分化制御

Wnt7a によって活性化された古典的 Wnt シグナル経路が色素幹細胞の分化を誘導し、最終的に表皮メラノサイトの増加を引き起こしているのかどうかを検証するため、β-カテニンの活性化を阻害する阻害剤 IWR-1 (inhibitor of Wnt response 1) または siRNA による *Wnt7a* のノックダウンによる効果を検討した。IWR-1 は、β-カテニンの分解に関わる Axin を安定化することで、β-カテニンの分解を促進し、古典的 Wnt シグナル経路の活性化を抑制する低分子化合物である。IWR-1 は 10 mM となるように DMSO に溶解し、PBS で 0.1 mM に希釈してマウスの皮内に投与した。コントロール群には、溶媒を投与した。また、siRNA については、オフターゲット効果を最小限にとどめるために *Wnt7a* に対する 3 種類の siRNA とトランスフェクション試薬 (in vivo jetPEI) を混合したものを皮内に投与した。コントロール群には、非特異的なネガティブコントロール siRNA とトランスフェクション試薬を混合したものを投与した。いずれも UVB 照射の 1 日前、当日、1 日後の 3 回投与した (Fig. 3-1)。IWR-1 または *Wnt7a* に対する siRNA の投与により、UVB 照射 1 日後の *Fzd4*/*Dct*⁺細胞及び核内β-カテニン陽性の *Dct* 陽性細胞の増加が有意に抑制され (Fig. 3-13)、*Wnt7a* によるβ-カテニンの活性化が、UVB による色素幹細胞からメラノblastへの分化に関与することが証明された。このとき、siRNA の投与により *Wnt7a* の遺伝子発現は 66.4 ± 3.2 % まで抑制されていた。さらに、同様の条件で IWR-1 または *Wnt7a* に対する siRNA を投与し、UVB 照射 14 日後の表皮シートにおいて *Typr1* の免疫染色を実施した。その結果、いずれにおいても *Typr1* 陽性の表皮メラノサイトの増加が有意に抑制された (Fig. 3-14)。また、この時のメラニン合成関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析したところ、IWR-1 または *Wnt7a* に対する siRNA の投与によって *Typr1*、*Tyr*、*Dct* の発現が有意に抑制された (Fig. 3-15)。以上の結果より、UVB 照射による表皮の色素沈着過程では、*Wnt7a* によるβ-カテニンの活性化が色素幹細胞の分化を誘導し、表皮メラノサイトの増加を引き起こすことが証明された。

3-2-5. in vitro ヒト色素幹細胞モデルにおける分化メカニズムの解析

最後に、ヒトの細胞を用いて UVB による色素沈着メカニズムを解析した。これまでに、TGF-βによる色素幹細胞の分化抑制効果を検証するために、in vitro ヒト色素幹細胞モデルとして、初期継代のヒト正常メラノサイト (NHEM、passage 1-4) が用いられている。本研究においてもこの in vitro 色素幹細胞モデルを用いて、UVB 照射による表皮色素沈着過程における、古典的 Wnt シグナル経路の関与を検討した。NHEM またはヒト正常ケラチノサイト (NHEK) に 10 mJ/cm² の UVB を照射し、24 時間後の *WNT7A* の遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した結果、NHEK においてのみ *WNT7A* の発

現亢進を認めた (Fig. 3-16A)。マウスの毛包の色素幹細胞において、活性化された β -カテニン休止期では低いレベルで保たれている Dct の発現を亢進する。NHEM にリコンビナントヒト WNT7A タンパク質または古典的 Wnt シグナル経路を活性化する低分子化合物 6BIO を添加した。6BIO は β -カテニンをリン酸化する GSK3 β を阻害することで、 β -カテニンを安定化することが知られている。WNT7A 及び 6BIO のいずれを添加した場合も、72 時間後に DCT 遺伝子の発現亢進を認めた (Fig. 3-16B)。また、セルカルチャーインサート上に NHEM を播種し、UVB 照射直後の NHEK と 24 時間共培養した。その後、NHEM だけをさらに 48 時間培養したところ、NHEM における DCT の発現が亢進し、これは IWR-1 の添加により抑制されることを確認した (Fig. 3-16C)。これらの結果は、ケラチノサイト由来の Wnt が、 β -カテニンの活性化を介して色素幹細胞の分化を引き起こすことを示している。したがって、*in vitro* での検討ではあるが、ヒトにおいても UVB 照射によって誘導される古典的 Wnt シグナル経路の活性化により、色素幹細胞は表皮メラノサイトへ分化することが証明された。

2-3. 考察

UV は最もよく知られた表皮色素沈着のインデューサーであり、尋常性白斑の治療にも非常に重要な役割を担う (Falabella *et al.*, 2009; Falabella, 2009)。UV 照射、ステロイドの外用、メラノサイトを含む表皮細胞の移植は表皮の最色素沈着を誘導する。しかしながら、この措置は長期間かかるものであり、何度も通院する必要がある。また、一部は外科的措置も必要になるとともに、完全に色素は回復しないことも多いため、負担が少なく、より効果の高い治療法の開発が期待されている。色素幹細胞の分化メカニズムと UV 誘導性の色素沈着の関係が解明できれば、色素幹細胞の分化メカニズムを理解するとともに尋常性白斑の新しい治療法の開発に役立てることができる。そこで本研究では、UVB 照射による色素沈着における色素幹細胞の関与を検討した結果、UVB によって発現が誘導される Wnt7a が、 β -カテニンの活性化を介して色素幹細胞の分化を引き起こすことが明らかになった。

まず、肉眼的に明らかな色素沈着を認める UVB 照射 14 日後よりも前に、7 日後には表皮において Tyrp1 陽性及び Dopa 反応陽性のメラノサイトが増加することを確認した (Fig. 3-3)。また、表皮においてメラノサイトの増加を認める前に、UVB 照射 3 日後をピークとして一過的に毛包内に Tyrp1 陽性のメラノブラストが出現することが示された (Fig. 3-6)。このとき、毛包内において色素幹細胞の数は一過的に減少し、メラノブラストの数と逆の相関を示した (Fig. 3-8)。UVB を照射する前に、もともと表皮に存在するメラノサイトやメラノブラストを抗 Kit 抗体を投与することにより枯渇させても、毛包内メラノブラストの出現や表皮メラノサイトの増加は抑制されなかった (Fig. 3-10)。これらの結果から、UVB はこれまで検討されてきたメラニン合成の亢進作用だけでなく、メラノサイト新生作用があることが明らかとなった。一過的な色素幹細胞の減少は、有害な UVB の刺激から皮膚を防御するために、色素幹細胞が増殖せずに即時的に分化したためであると考えられる。最近、Dct-LacZ マウスを用いて、皮膚の創傷治癒過程及び UVB 照射後の色素幹細胞の動きを追跡した結果が報告された (Chou *et al.*, 2013)。創傷過程では、バルジに局在する LacZ 陽性細胞 (色素幹細胞) は分裂せずに直接表皮に移動してしまうために色素幹細胞が枯渇してしまうが、UVB 照射に対しては、一部の LacZ 陽性細胞のみが表皮に移動することが示された。この結果は、本研究において UVB 照射の影響で色素幹細胞の分化が亢進し、一時的に色素幹細胞の数が低下することと一致する。UVB 照射 1 日後には、全ての Wnt リガン

ドの中で *Wnt7a* の発現のみが顕著に亢進していた (Fig. 3-11)。*Wnt7a* の発現亢進は、毛包幹細胞、毛包ケラチノサイト、表皮ケラチノサイトのいずれにおいても認められ、UVB 照射に対して上皮系の細胞が同様の反応を示すことが明らかとなった。一方、色素幹細胞においては *Wnt7a* の発現は検出されなかった。一般的に、UVB は表皮ケラチノサイトからの増殖因子などの分泌を誘導する。また、毛周期の移行に伴う色素幹細胞の分化過程では、バルジ領域において色素幹細胞と隣接して存在する毛包幹細胞が色素幹細胞の分化制御因子を分泌する (Tanimura *et al.*, 2011; Rabbani *et al.*, 2011)。今回得られた知見は、表皮ケラチノサイトだけでなく毛包の上皮系細胞も UVB に反応することを意味しており、非常に興味深い。ただし、マウスに比べるとヒトの表皮は厚いため、ヒトの皮膚でも同様の現象が起こることを確認する必要がある。毛包内において UVB 照射 3 日後をピークに核内に β -カテニン陽性のメラノブラストが出現したことから (Fig. 3-12)、*Wnt7a* の一過的な発現が色素幹細胞からメラノブラストへの分化を誘導したと考えられた。*Wnt7a* に対する siRNA や β -カテニンの阻害剤を投与することで、UVB 照射による毛包内メラノブラストの出現や表皮メラノサイトの増加が有意に抑制された (Fig. 3-13, 14)。したがって、UVB 照射による表皮メラノサイトの供給源は、毛包内の色素幹細胞であり、UV は色素幹細胞の分化を誘導することが明らかになった。これまでに毛周期が成長期に移行する際に、毛包幹細胞が色素幹細胞の分化を促す *Wnt* リガンドを発現することが報告されている (Rabbani *et al.*, 2011)。今回の結果からもあらためて色素幹細胞の分化は、周囲の上皮系細胞によって調節されていることが確認できた。表皮メラノサイトの増加に対する *Wnt7a* 特異的 siRNA や β -カテニンの阻害剤の効果が部分的であった理由としては、siRNA の導入効率や阻害剤の処理条件が不十分であった可能性が考えられる。また、もともと表皮に存在したメラノブラストが関与する可能性が考えられるが、抗 Kit 抗体処理によっても UVB 照射による表皮メラノサイトの増加は抑制されなかったことから、極めて部分的であると考えられた。初期継代の NHEM を *in vitro* 色素幹細胞モデルとして用いた場合も、UVB 照射によりケラチノサイトにおける *WNT7A* の発現は亢進し、*WNT7A* が色素幹細胞の分化を促進することが示された (Fig. 3-16)。あくまで *in vitro* の実験だが、ヒトにおいてもマウスと同様の色素幹細胞の分化メカニズムが存在することを示唆している。実際のヒトの皮膚における反応については、今後詳細に検討する必要がある。

今回得られた結果とこれまでの報告をまとめると、表皮と毛髪の色素形成過程における色素幹細胞の分化メカニズムには共通点と相違点がある。興味深いことに、色素幹細胞から表皮メラノサイト及び毛球部メラノサイトへの分化には、いずれも β -カテニン依存的な古典的 *Wnt* シグナル経路の活性化が必要である。これは、上皮系細胞において発現される *Wnt* リガンドにより、色素幹細胞の分化の引き金になる β -カテニンが活性化するためである。どちらの系においても古典的 *Wnt* シグナル経路が色素幹細胞の分化に重要であるという点は、生物にとって非常に合理的であると考えられる。ただし、*Wnt* リガンドを発現する上皮系細胞には違いが認められた。毛髪の形成時には毛包幹細胞が、UVB 照射による表皮色素沈着過程では毛包幹細胞、毛包ケラチノサイト、表皮ケラチノサイトにおいて *Wnt* の発現が亢進する。毛周期は毛包のバルジと毛乳頭によって制御されるため空間的に限定されるのに対し (Millar, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Sharov *et al.*, 2005; Enshell-Seijffer *et al.*, 2010)、UVB 照射は表皮全体の変化を促すため、皮膚における上皮系細胞の多くが関与する可能性が考えられる。

本研究において知見をまとめると、UVB 照射による表皮の色素沈着過程は以下の 4 つのステップによって段階的に起こることが明らかとなった (Fig. 3-17)。

- ①UVB 照射による Wnt7a の発現亢進
- ②色素幹細胞における β -カテニンの核内移行及び即時的なメラノブラストへの分化
- ③メラノブラストの表皮への移動及び毛包内の色素幹細胞の増殖
- ④表皮におけるメラノブラストの増加、メラノサイトへの分化とメラニン合成の亢進

これらのメカニズムに基づいた尋常性白斑の新しい治療法の開発が期待できると考える。例えば、古典的 Wnt シグナル経路を制御する物質は外用剤への応用が可能である (Lim *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2009; Nyati *et al.*, 2010)。これによって、患者は通院による紫外線照射治療や移植などの侵襲性の高い治療方法を回避できる可能性がある。ただし、毛包がないか、極めて少ない皮膚の部位においては、色素幹細胞だけでなく表皮に存在するメラノブラストの制御も合わせて考える必要がある (Tobin *et al.*, 2000)。今回得られた知見から、Wnt シグナル経路の異常は色素幹細胞の表皮メラノサイトへの分化異常を引き起こす可能性が考えられるため、今後、Wnt シグナル経路と色素異常症の関連について詳細に解析することで、その発症メカニズムの解明や治療法の開発につながることを期待できると考える。

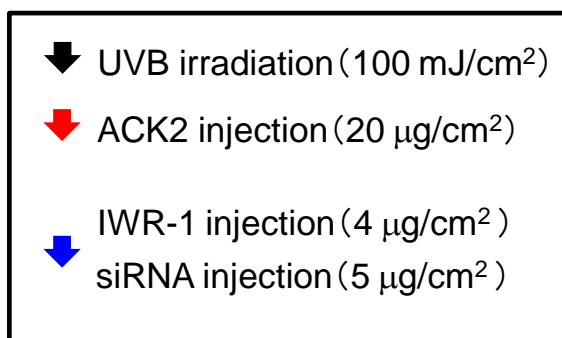
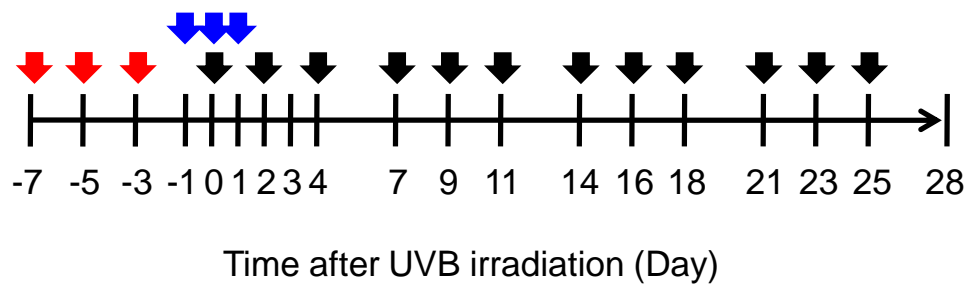


Fig. 3-1 UVB照射スケジュール

7週齢のHRDeF1の背部に、UVBを週に3回、4週間 (合計12回) 照射した (黒矢印)。

ACK2は、最初のUVB照射の3、5、7日前に投与した (赤矢印)。

IWR-1及びsiRNAは、最初のUVB照射の1日前、当日、1日後に投与した (青矢印)。

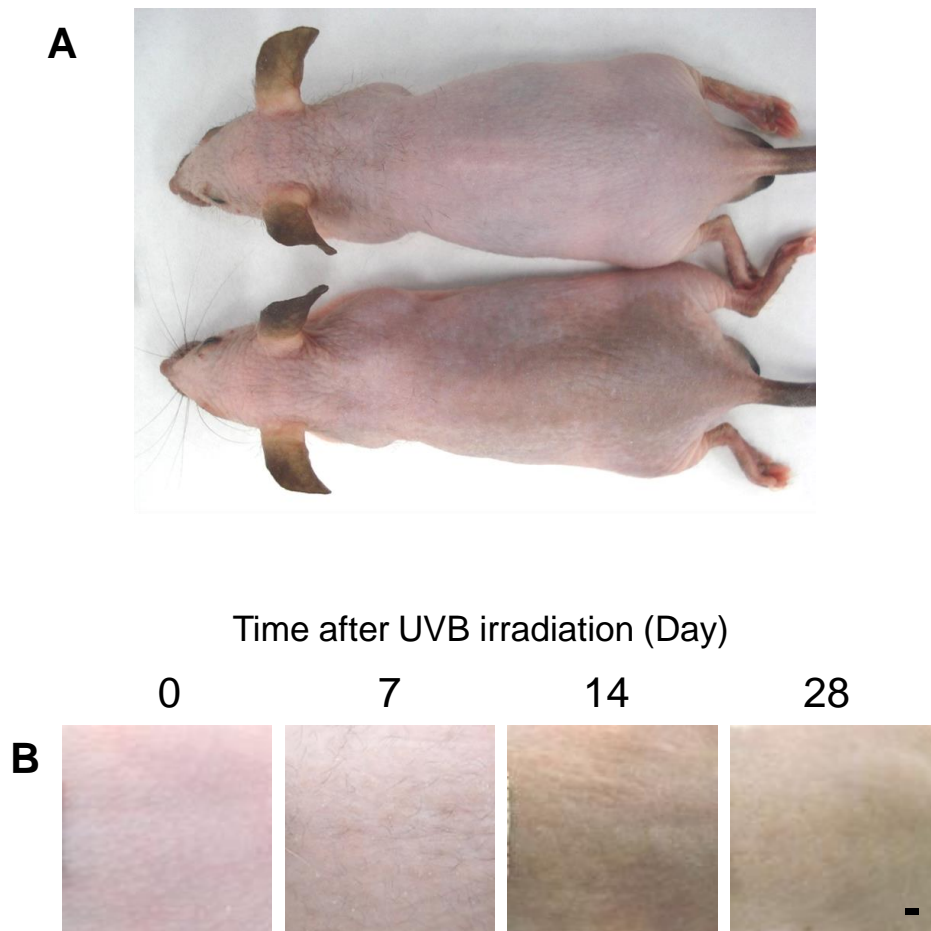


Fig. 3-2 UVB照射後の皮膚外観の変化

(A) 28日後のコントロール群 (上) 及びUVB照射群 (下) の代表例の皮膚外観。

(B) UVB照射群における経時的な皮膚外観の変化(Scale bar = 1 mm)。

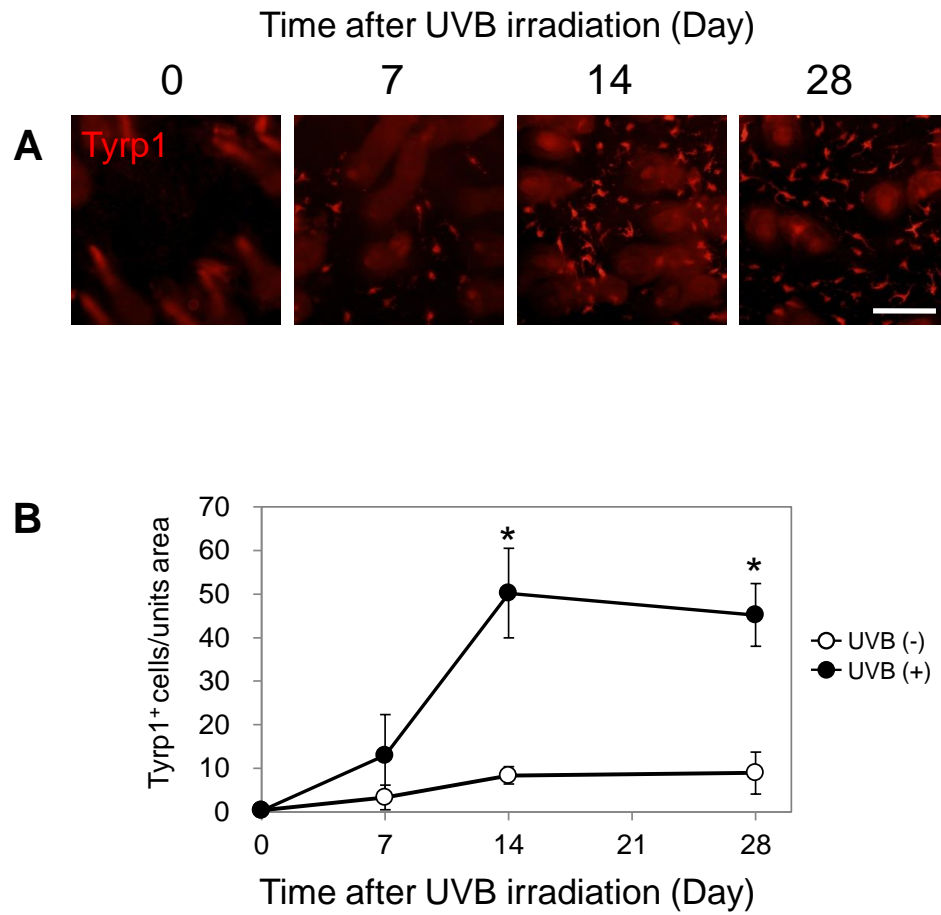


Fig. 3-3 UVB照射後のTyrp1陽性細胞数の変化

(A) UVB照射群の表皮シートにおけるTyrp1の免疫染色 (Scale bar = 100 μ m)。

(B) UVB照射後の表皮における経時的なTyrp1陽性細胞数の変化 (* $P < 0.05$ vs コントロール)。

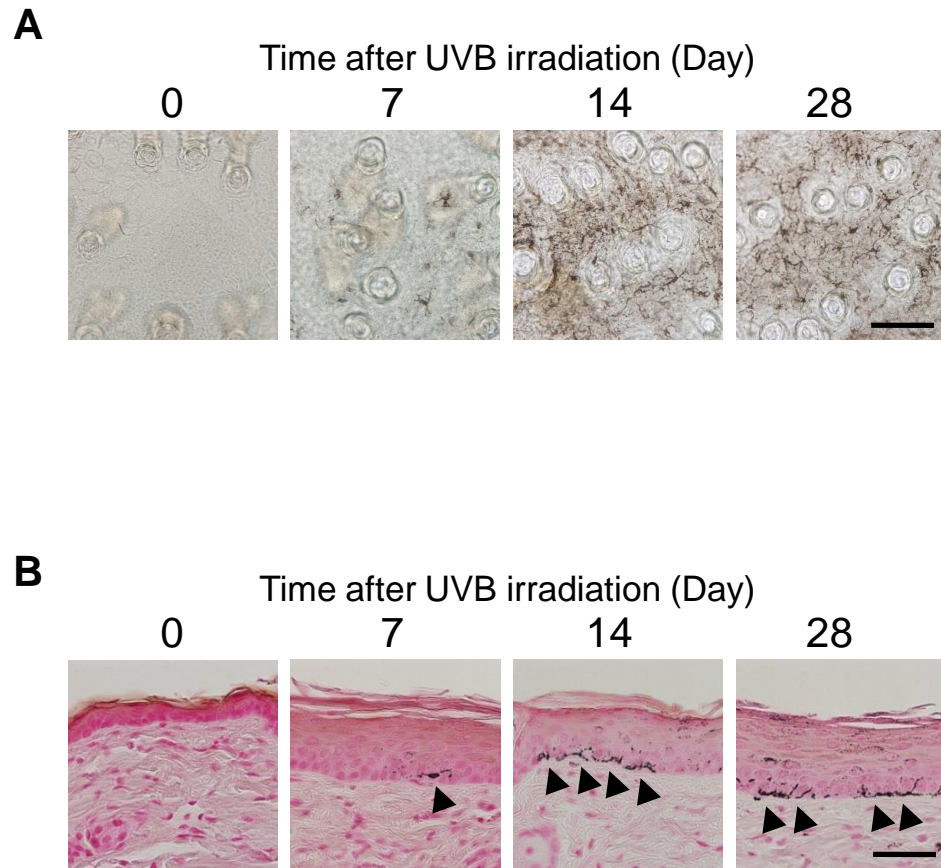


Fig. 3-4 UVB照射後の表皮メラノサイトの変化

(A) UVB照射群の表皮シートにおけるDopa染色 (Scale bar = 100 μ m)。

(B) UVB照射群の皮膚組織切片におけるフォンタナ・マッソン染色 (Scale bar = 100 μ m)。

矢頭は、メラニン陽性のメラノサイト。

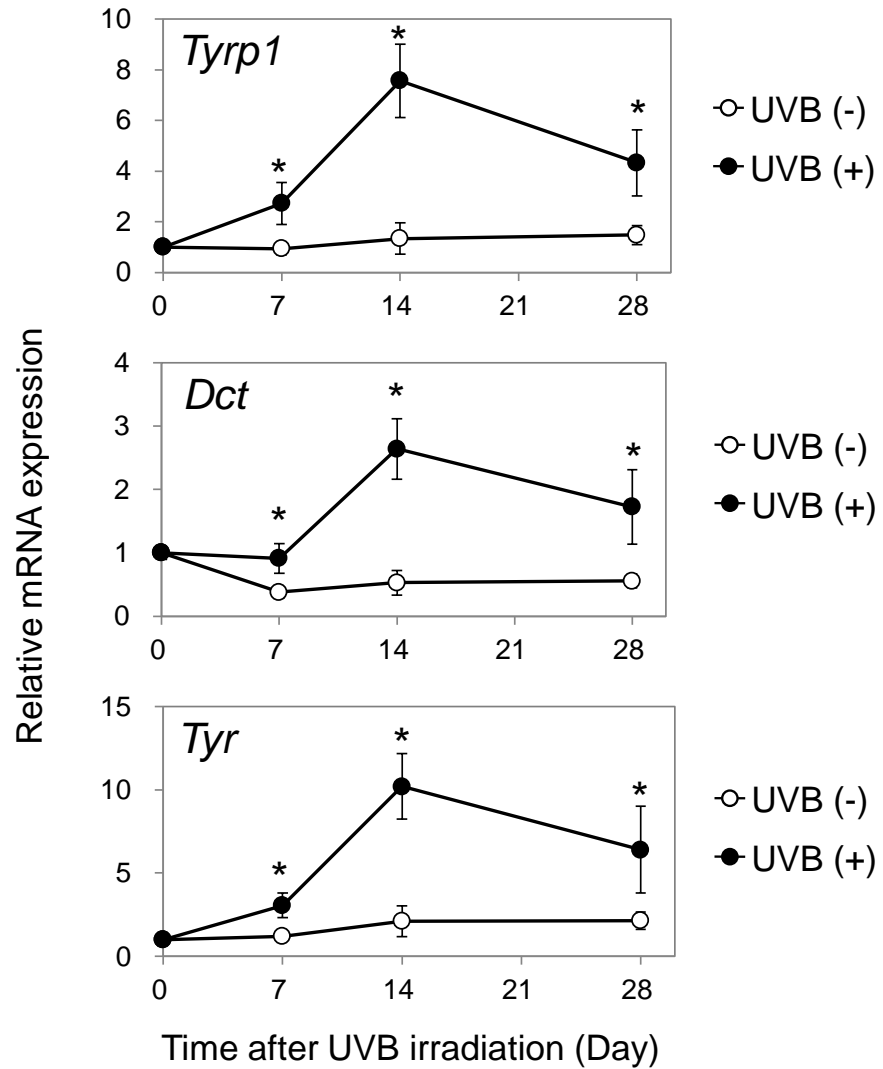


Fig. 3-5 UVB照射後の表皮におけるメラニン合成関連遺伝子の発現変化
 UVB照射後の表皮シートからRNAを抽出し、リアルタイムPCRによりメラニン合成関連酵素 (*Tyrp1*, *Dct*, *Tyr*) の遺伝子発現を解析した (* $P < 0.05$ vs コントロール)。

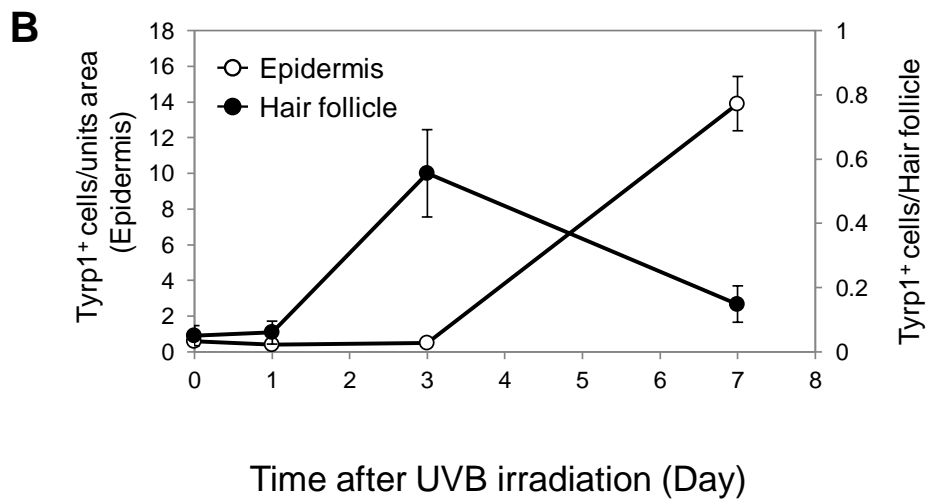
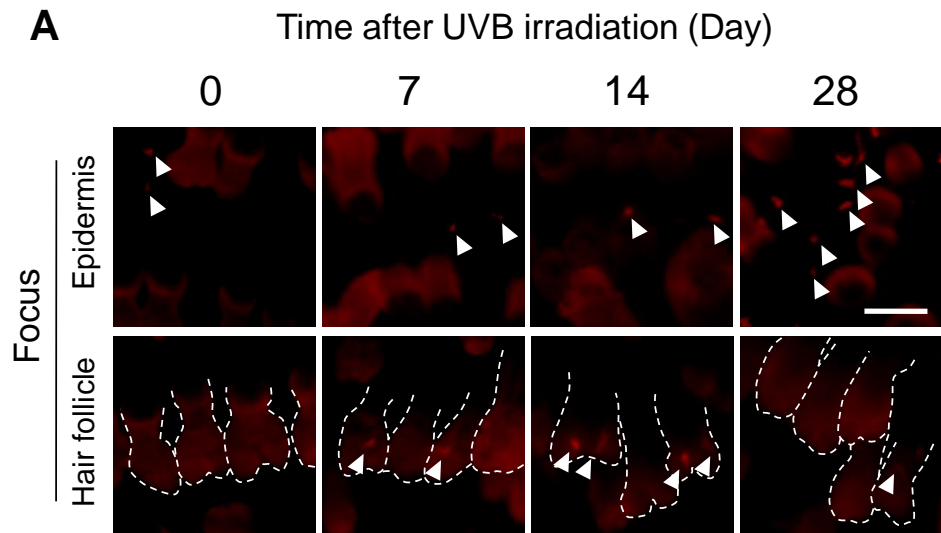


Fig. 3-6 UVB照射7日後までの表皮及び毛包におけるTyrp1陽性細胞数の変化

(A) UVB照射群の表皮シートにおけるTyrp1の免疫染色 (Scale bar = 100 μ m)。表皮及び毛包に焦点を合わせて観察した。毛包を破線で示した。

(B) UVB照射後の表皮及び毛包における経時的なTyrp1陽性細胞数の変化。

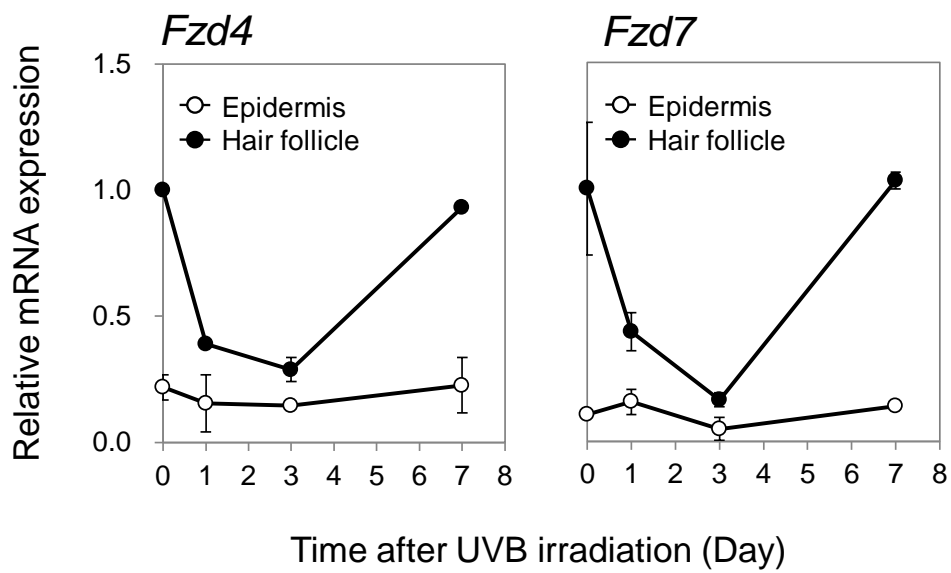


Fig. 3-7 UVB照射による色素幹細胞マーカー遺伝子の発現変化

UVB照射群の皮膚組織からレーザーマイクロダイセクションにより表皮と毛包を分けて採取し、RNAを抽出後、リアルタイムPCRにより*Fzd4*及び*Fzd7*の遺伝子発現を解析した。

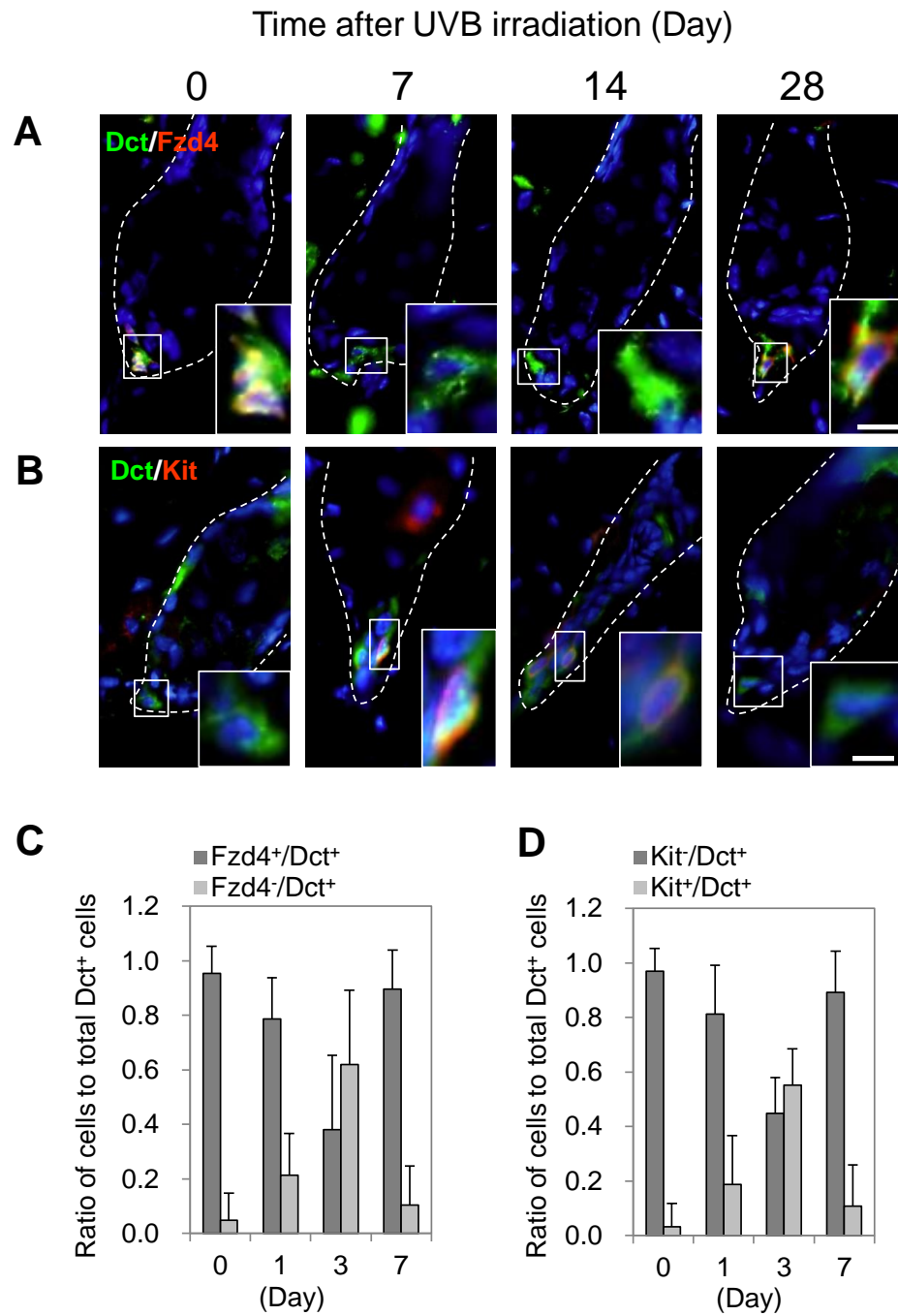


Fig. 3-8 UVB照射による毛包内色素幹細胞数の変化

(A, B) UVB照射後の毛包におけるDct及びFzd4 (A) またはKit (B) の免疫染色 (Scale bar = 10 μ m)。DAPIにより核染色を行い (青色)、毛包を破線で示した。また、線で囲まれた部位の拡大像を右下に示した。

(C, D) UVB照射後の毛包におけるFzd4⁺/Dct⁺及びFzd4⁻/Dct⁺細胞 (C) またはKit/Dct⁺及びKit⁺/Dct⁺細胞 (D) の数の変化。

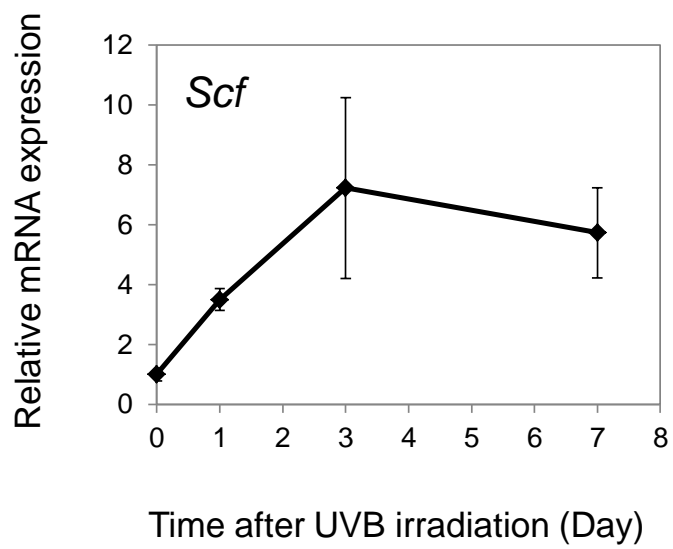


Fig. 3-9 UVB照射によるScfの発現変化
UVB照射後の表皮シートからRNAを抽出し、リアルタイムPCRによりScfの遺伝子発現を解析した。

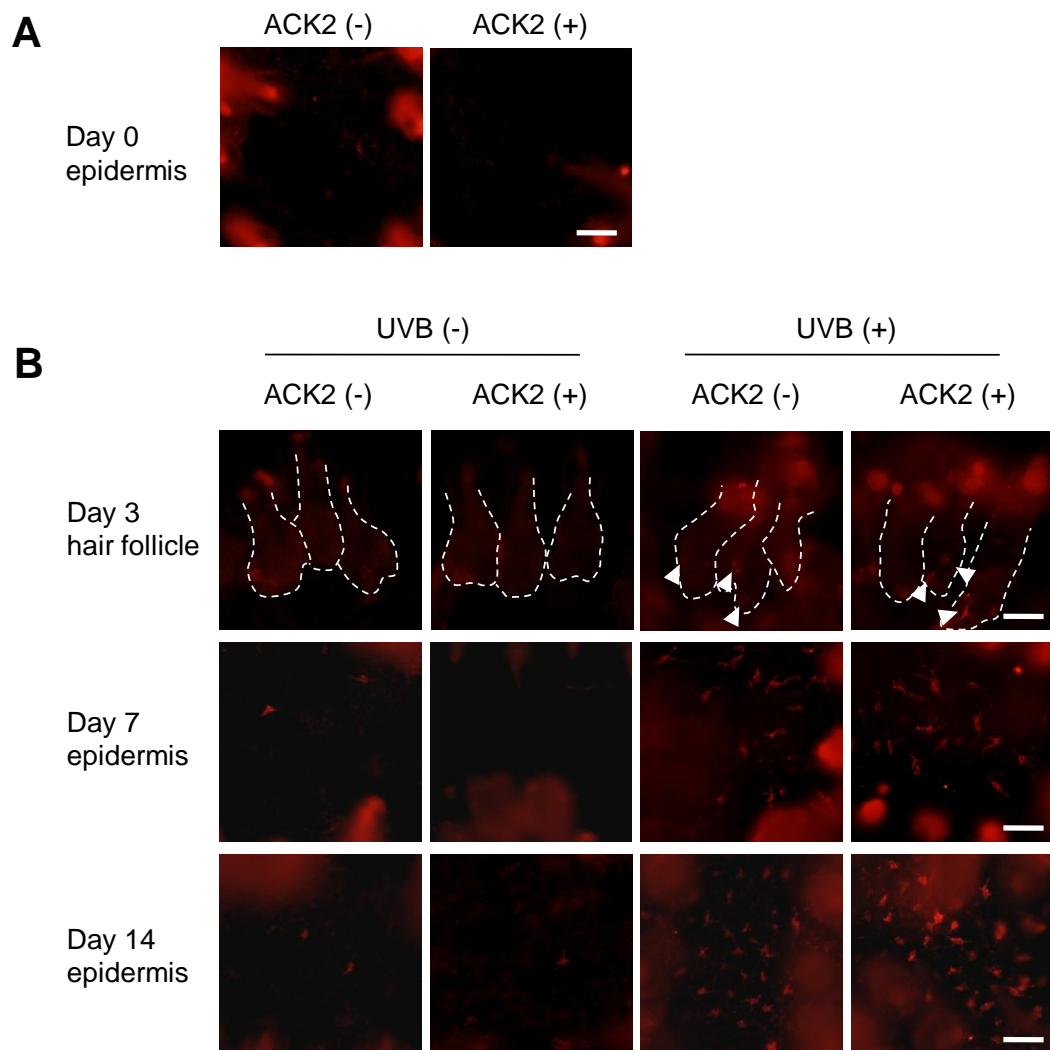


Fig. 3-10 UVBによる表皮メラノサイトの増加に対する抗Kit抗体投与の効果

(A) 抗Kit抗体 (ACK2) 投与後の表皮シートにおけるTyrp1の免疫染色 (Scale bar = 100 μ m)。

(B) ACK2投与後にUVBを照射した表皮におけるTyrp1の免疫染色 (Scale bar = 100 μ m)。毛包を破線で示し、Tyrp1陽性細胞を矢頭で示した。

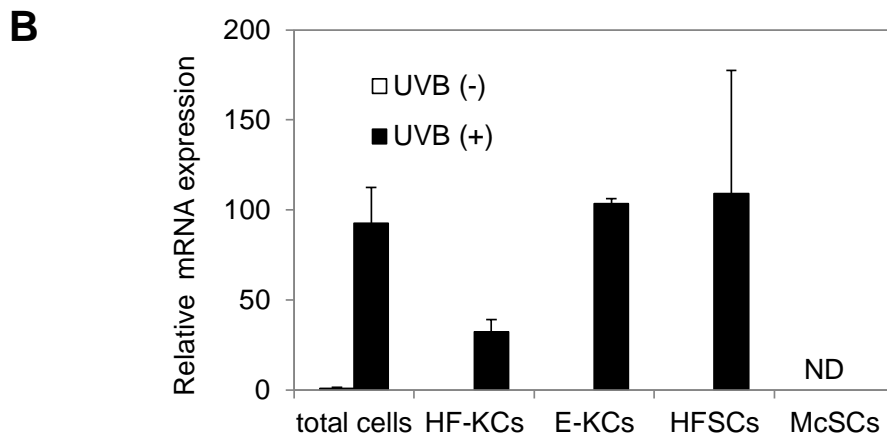
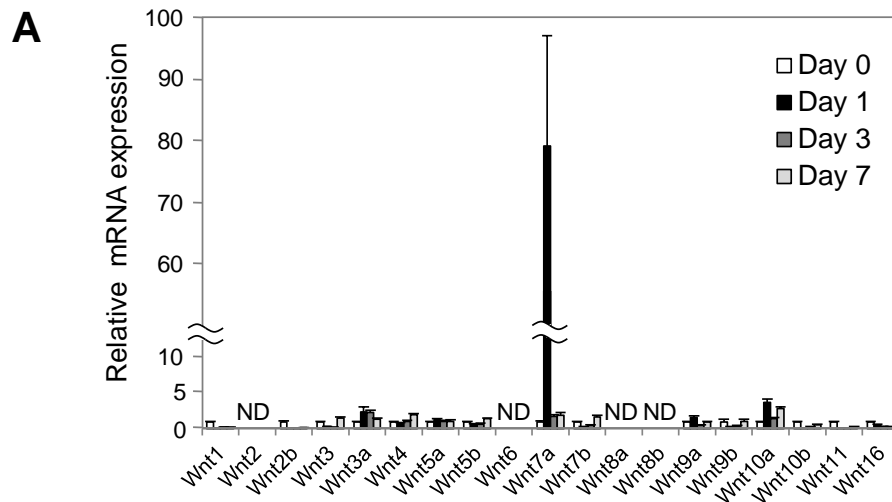


Fig. 3-11 UVB照射によるWnt7aの発現亢進

(A) UVB照射後の表皮シートについて、リアルタイムPCRによりWntの遺伝子発現を解析した。

(B) UVB照射1日後の表皮より、CD34⁺/CD49⁺の毛包幹細胞 (HFSCs)、CD34⁻/CD49^{low}の毛包ケラチノサイト (HF-KCs)、CD34⁻/CD49^{high}の表皮ケラチノサイト (E-KCs)、Fzd4⁺の色素幹細胞 (McSCs) をそれぞれ分離し、Wnt7aの遺伝子発現を解析した。ND, not detected。

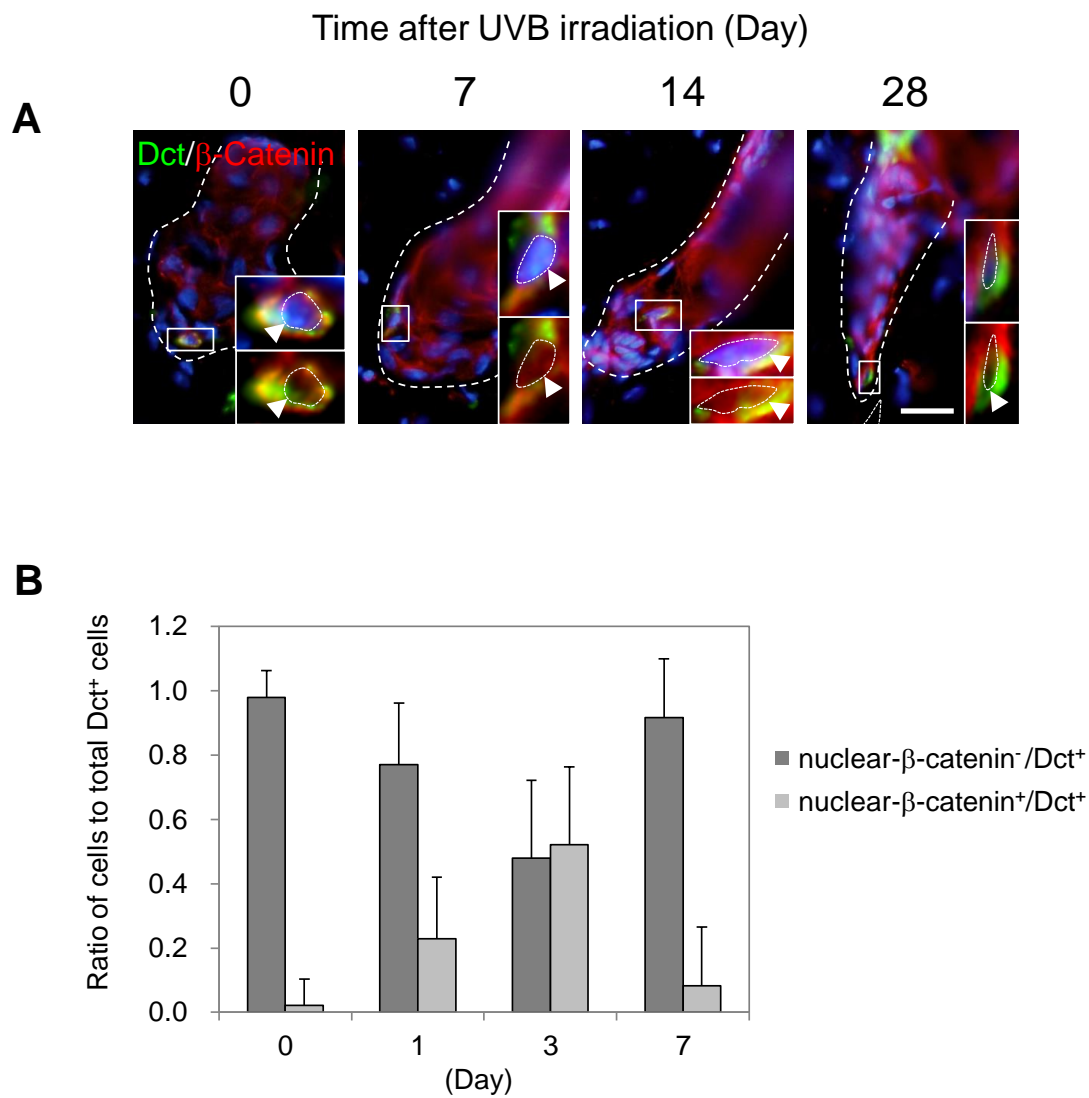


Fig. 3-12 UVB照射によるβ-カテニンの活性化

(A) UVB照射後の毛包におけるDct及びβ-カテニンの免疫染色 (Scale bar = 20 μm)。DAPIにより核染色を行い (青色)、毛包を破線で示した。また、線で囲まれた部位の拡大像を右下に示し、核を破線で囲った。

(B) 核内β-カテニン⁻ (nuclear-β-catenin⁻)/Dct⁺及び核内β-カテニン⁺ (nuclear-β-catenin⁺)/Dct⁺細胞の数の変化。

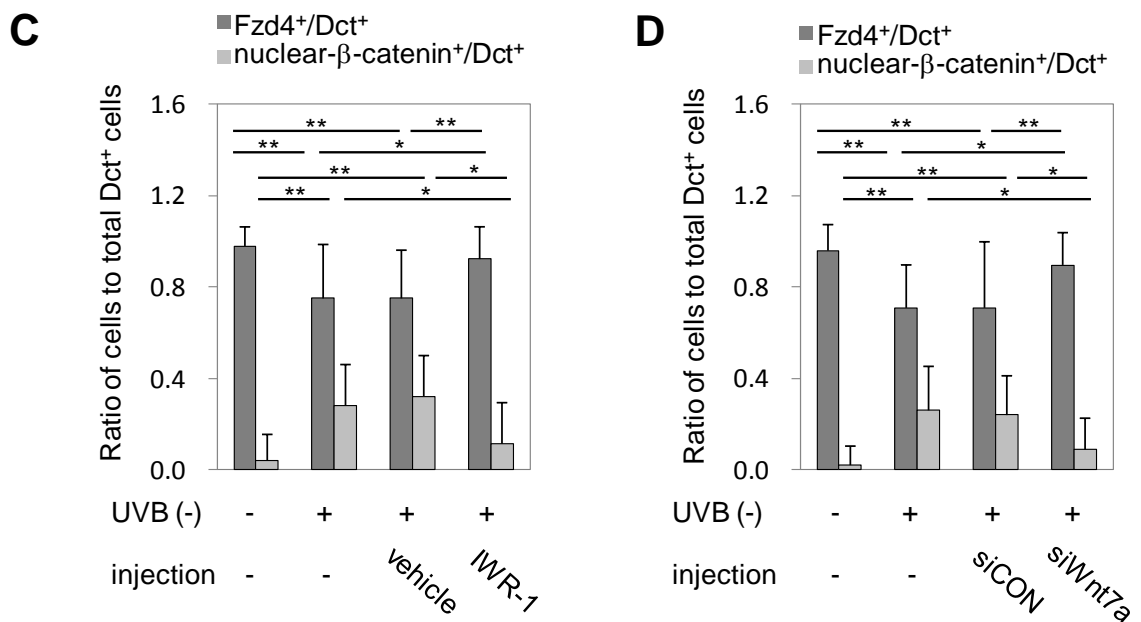
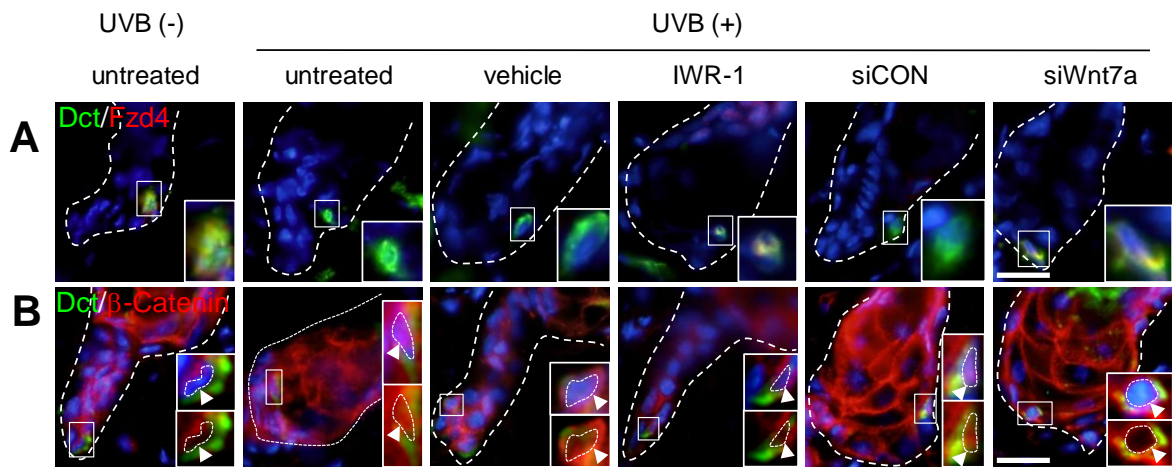


Fig. 3-13 Wntシグナル阻害による色素幹細胞の分化抑制効果

(A, B) IWR-1またはsiRNA投与後にUVBを照射した毛包におけるDct及びFzd4 (A) またはβ-カテニン (B) の免疫染色 (Scale bar = 10 μm)。
 (C, D) IWR-1 (C) またはsiRNA (D) 投与後にUVBを照射した毛包におけるFzd4⁺/Dct⁺及び核内β-カテニン⁺(nuclear-β-catenin⁺)/Dct⁺細胞の数の変化 (**P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs コントロール)。

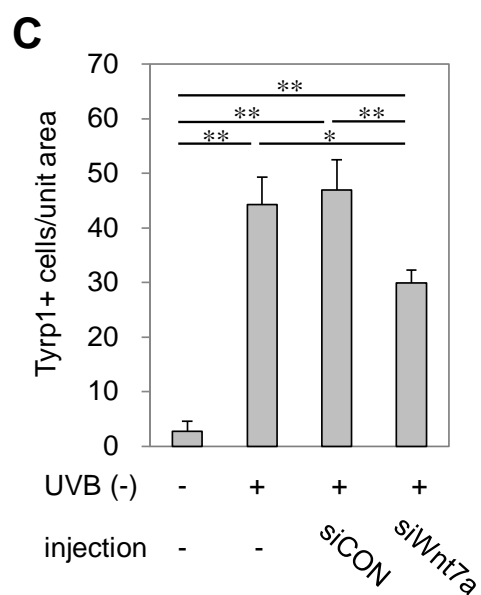
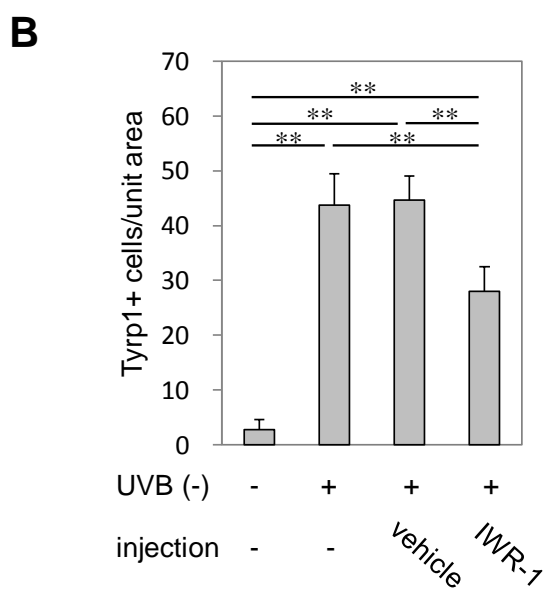
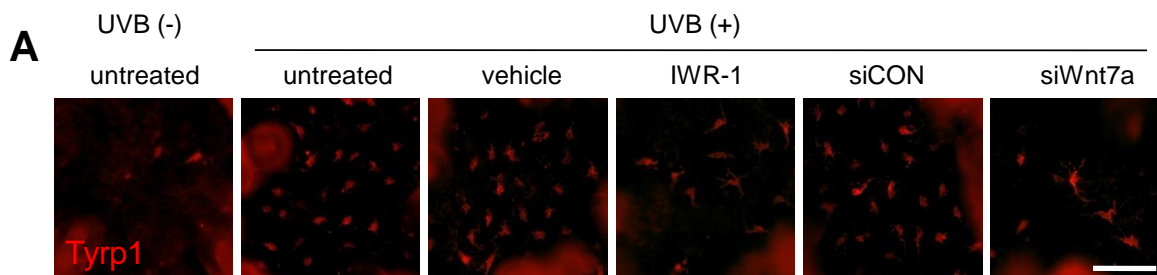


Fig. 3-14 表皮メラノサイト増加に対するWntシグナル阻害の効果

(A) IWR-1またはsiRNA投与後にUVBを照射した表皮におけるTyrp1の免疫染色 (Scale bar = 100 μ m)。

(B, C) IWR-1 (B) またはsiRNA (C) 投与後にUVBを照射した表皮におけるTyrp1陽性細胞の数の変化 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs コントロール)。

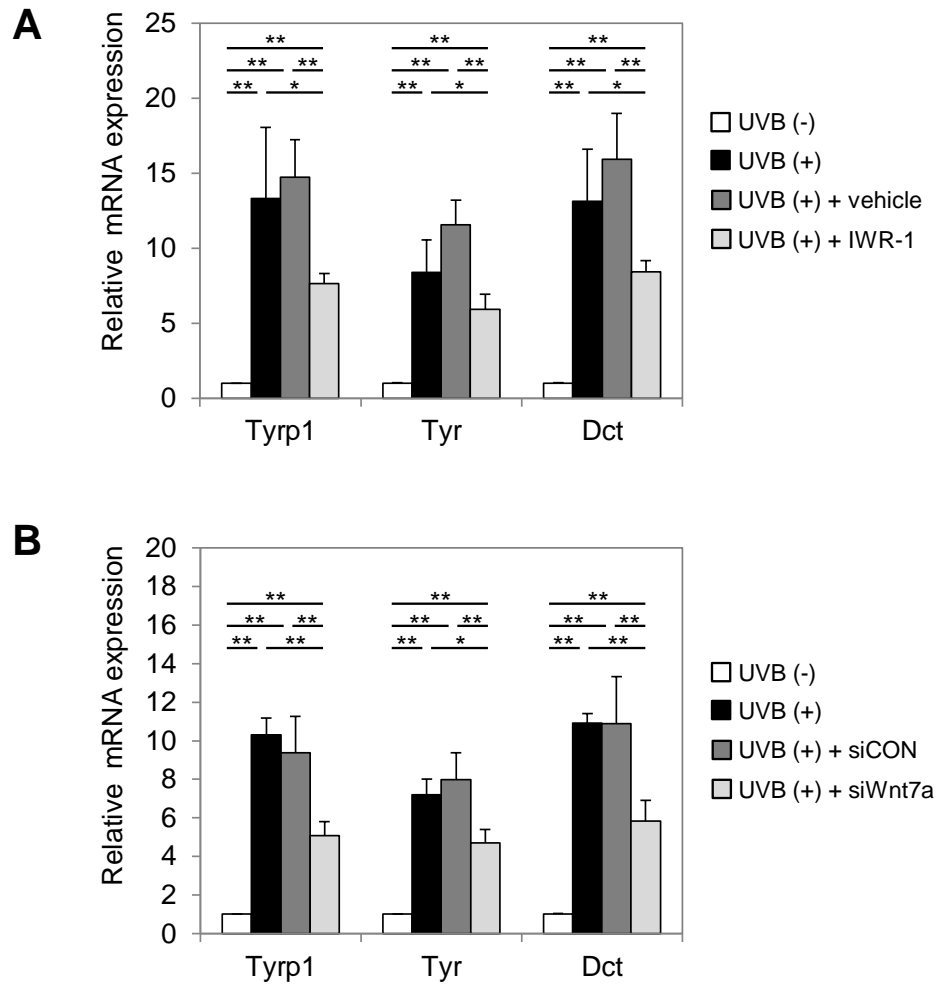


Fig. 3-15 Wntシグナル阻害によるメラニン合成関連遺伝子の発現抑制効果

(A, B) IWR-1 (A) またはsiRNA (B) 投与後にUVBを照射した表皮からRNAを抽出し、リアルタイムPCRによりメラニン合成関連酵素 (*Tyrp1*, *Dct*, *Tyr*) の遺伝子発現を解析した (* $P < 0.05$ vs コントロール)。

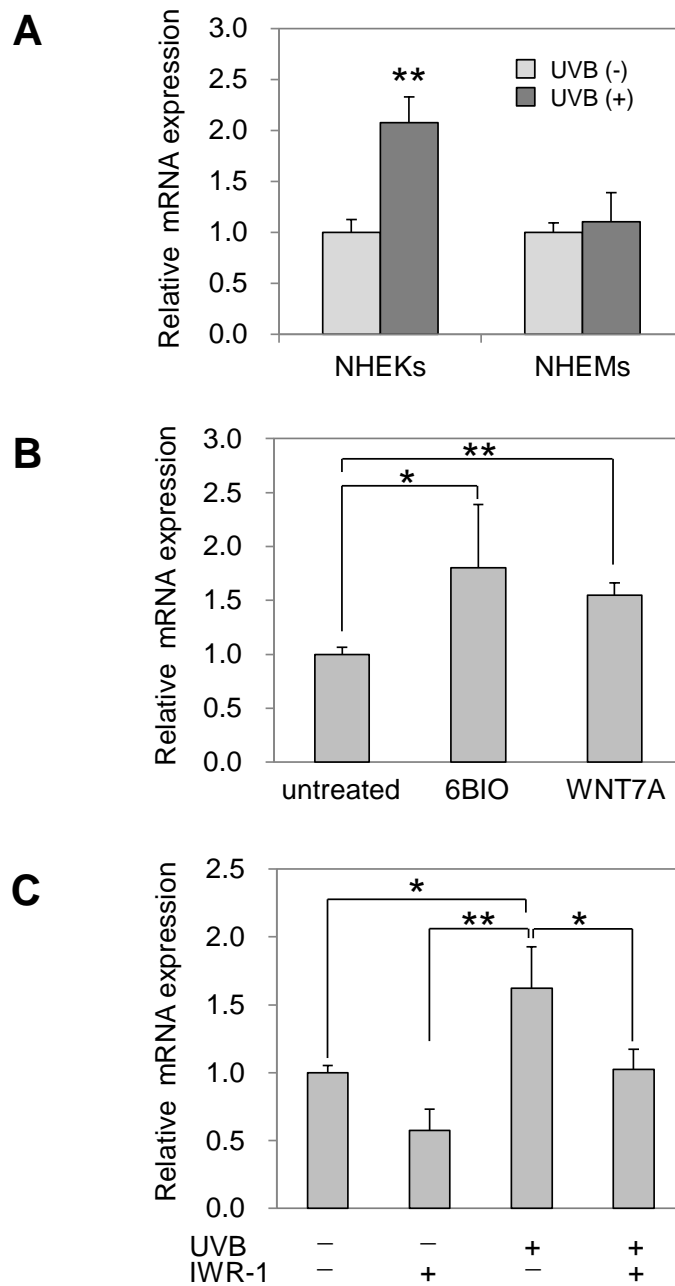


Fig. 3-16 in vitro色素幹細胞モデルにおける分化誘導解析

(A) UVB照射 (10 mJ/cm²) 24時間後のNHEK及びNHEMIにおいて、リアルタイムPCRにより *WNT7A*遺伝子の発現を解析した。

(B) 6BIO (10 μM) またはリコンビナントヒトWNT7Aタンパク質 (10 ng/mL) 添加72時間後のNHEKにおいて、リアルタイムPCRにより*DCT*遺伝子の発現を解析した。

(C) UVB照射直後のNHEKと24時間共培養し、さらに単独で48時間培養したNHEMIにおいて、リアルタイムPCRにより*DCT*遺伝子の発現を解析した (**P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs コントロール)。

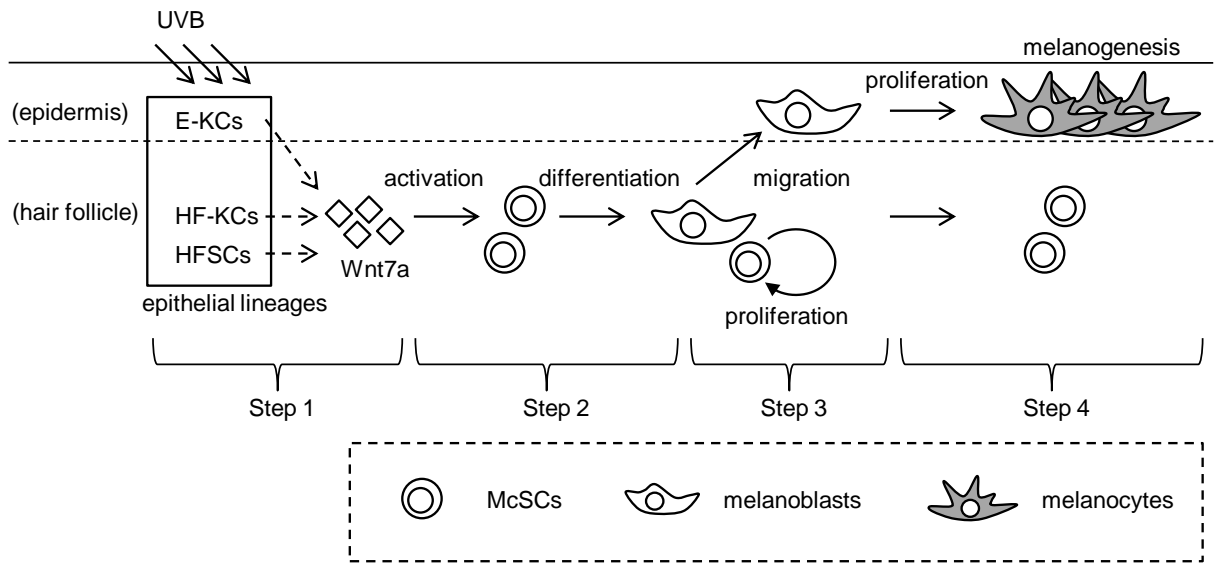


Fig. 3-17 UVB照射による色素幹細胞の表皮メラノサイトへの分化メカニズム
 HFSC, 毛包幹細胞; HF-KC, 毛包ケラチノサイト; E-KC, 表皮ケラチノサイト; McSC, 色素幹細胞

第4章

老人性色素斑における色素細胞系譜の
メラニン合成能及び増殖能の解析

第4章

老人性色素斑における色素細胞系譜のメラニン合成能及び増殖能の解析

要約

老人性色素斑 (solar lentigo: SL) は、露光部に形成される色素沈着斑であり、表皮におけるメラノサイトの数やメラニン量の増加が認められる。しかしながら、メラニン量の増加がメラノサイトの数と個々のメラノサイトのメラニン合成能の違いのどちらによるものなのか、なぜメラノサイトの数が増加するのかといった疑問があった。これらの観点から SL の病理メカニズムを解明するために、ヒトの皮膚健常部及び SL 病変部における色素細胞系譜のメラニン合成能及び増殖能を解析した。表皮メラノサイトのメラニン合成能を TYR の発現を指標に解析した結果、SL 病変部における個々のメラノサイトのメラニン合成能は、健常部のメラノサイトと比較して有意に高いことが示された。表皮のメラノサイト、毛漏斗部のメラノブラスト、毛包バルジ領域の色素幹細胞の数及び増殖能について検討した結果、これらの色素細胞系譜の全てにおいて、SL 病変部では数が増加していたものの、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性細胞はほとんど検出されず、健常部と SL 病変部で有意な差を認めなかった。以上の結果より、SL における色素沈着は、メラノサイトの数の増加と個々のメラノサイトのメラニン合成能の高さの両方が関与していることが示された。また、このメラノサイトの数はバルジ領域における色素幹細胞の増加に起因する可能性が考えられた。

4-1. 緒言

老人性色素斑 (solar lentigo: SL) は、顔や上腕などの露光部に生じる色素沈着斑であり、周りの皮膚に比べてメラニン合成が亢進しているために不均一な皮膚色を呈する (Cario-Andre *et al.*, 2004; Noblese *et al.*, 2006)。過去の日光への暴露時間、特にまとめて大量の紫外線にさらされた後、長期間経ってから形成されると考えられているが (Monestier *et al.*, 2006)、詳細な病理メカニズムについては不明な点が多い。顔などの目立つ部分に SL が生じると外観に対して負の感情を抱きやすいことから、患者の生活の質 (quality of life: QOL) を著しく損ねることが知られている。現在の SL の改善方法としては、アスコルビン酸やその誘導体、アルブチンなどの美白剤の外用、レーザーによる光線療法がよく知られているが (Bukvić Mokos *et al.*, 2006; Gillbro *et al.*, 2011)、より効果が高く安全な方法の開発が期待されている。これまでに、SL におけるメラニン合成の亢進はいくつかの増殖因子の発現増加が関与すると推察されている。病変部の表皮において、最もよく知られるメラニン合成関連因子である EDN1 や SCF の発現が亢進していることが示されている (Kadono *et al.*, 2001; Hattori *et al.*, 2004)。また、線維芽細胞では SCF だけでなく、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) やケラチノサイト増殖因子 (keratinocyte growth factor: KGF) の発現が亢進していることが報告されている (Kovacs *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010)。これらの増殖因子は SL 病変部においてメラノサイトのメラニン合成を刺激していると考えられるが、表皮全体ではなく個々のメラノサイトのメラニン合成能を解析した報告はない (Motokawa *et al.*, 2005)。また、いくつかのメラノサイト特異的抗原に対する免疫染色により、SL 病変部における表皮メラノサイトの有意な増加が認められている (Cario-Andre *et al.*, 2004; Kadono *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2007; Hilleshem *et al.*, 2011)。前述の増殖因子は、メラニン合成だけ

でなく *in vitro* においてメラノサイトの増殖も促すことから (Hirobe *et al.*, 2003; Hirobe *et al.*, 2004)、SL 病変部のメラノサイト数の増加にも関与している可能性が考えられる (Hirobe, 2005)。しかしながら、SL における表皮メラノサイトの増殖能について検討した報告はなかった。表皮におけるメラニン合成の亢進やメラノサイトの増加は SL のよく知られた特徴であるが、メラニン量の増加がメラノサイトの数と個々のメラノサイトのメラニン合成能の違いのどちらによるものなのか、なぜメラノサイトの数が増加するのかといった疑問があった。これらの課題に対して、本研究では、TYR の発現を個々のメラノサイトのメラニン合成能を評価する指標として用いて解析し、健常皮膚と SL 病変部の比較を行った。また、2002 年に毛包のバルジ領域にメラノサイトの供給源となる色素幹細胞の存在が報告されて以来 (Nishimura *et al.*, 2002)、SL における色素幹細胞の関与を検討した報告はないため、色素細胞系譜の局在及び増殖能を比較し、SL の形成と色素幹細胞の分化の関係について検討した。

4-2. 結果

4-2-1. 表皮メラノサイトにおけるメラニン合成能及び増殖能の解析

同年代のヒトの顔の皮膚から得られたそれぞれ 11 検体の健常部と SL 病変部を解析に用いた。詳細は Fig. 4-1 に示した。SL 病変部の検体は、Cario-Andre らの分類によると 10 検体が stage 1、残り 1 検体が stage 2 であった (Cario-Andre *et al.*, 2004)。Stage 1 は、SL の初期段階であり、表皮突起の伸長が少ない。一方、stage 2 は表皮突起の顕著な伸長が認められ、stage 1 から進行したものと考えられる。健常部と SL 病変部のメラニン量を解析するために、フォンタナ・マッソン染色を実施し、NIH image を用いて画像を解析した (Miot *et al.*, 2012)。健常部と比較して、SL 病変部では明らかにメラニン量の増加を認めた (Fig. 4-2A)。また、単位面積あたりのメラニン量を相対メラニン量として算出した結果、SL 病変部において有意な増加を認めた (Fig. 4-2B)。次に、表皮におけるメラノサイトの数と個々のメラノサイトのメラニン合成能を評価するため、TYR と MART-1 (melanoma antigen recognized by T-cells) の共染色を行った (Fig. 4-3)。MART-1 は、比較的未分化なメラノブラストから成熟したメラノサイトまで広く発現しており、メラニン合成の律速酵素である TYR は成熟したメラノサイトで発現する。健常部と比較して、SL 病変部では TYR⁺/MART-1⁺の表皮メラノサイト数の有意な増加を認め、この結果はこれまでの報告と一致した (Figs. 4-3, 4-4)。個々のメラノサイトのメラニン合成能は、MART-1 の発現量に対する TYR の発現量として算出した。MART-1 は初期段階のメラノソームにおいてすでに発現しており、後期のメラノソームで発現する TYR よりも早い段階から発現することから (Sitaram *et al.*, 2012; Cook *et al.*, 2003)、MART-1 は色素細胞系譜を広く解析するのに適したマーカーであると考えられている。したがって、個々のメラノサイトにおける特定のタンパク質の発現量の補正に用いることができる。まず、画像解析により個々のメラノサイトの TYR と MART-1 の蛍光強度を定量し (Fig. 4-5A 緑及び赤字で記した値)、MART-1 の蛍光強度に対する TYR の蛍光強度を相対 TYR 発現量 (TYR-A) として算出した (Fig. 4-5A 黄字で記した値)。次に、ひとつの検体における TYR-A の平均値を算出し、その検体の個々のメラノサイトの相対 TYR 発現量 (TYR-B) とした。最後に、健常部の TYR-B の値または SL 病変部の TYR-B の値の平均値を別々に算出し、健常部と SL 病変部の個々のメラノサイトにおけるメラニン合成能を比較した。その結果、健常部と比較して、SL 病変部では個々のメラニン合成能が有意に亢進していることが明らかになった (Fig. 4-5B)。以上の結果から、SL 病変部ではメラノサ

イトの数及びメラニン合成能のいずれも増加していることが示された。

4-2-2. 表皮メラノサイトにおける増殖能の解析

SL 病変部におけるメラノサイトの数の増加が表皮におけるメラノサイトの増殖によるものかどうかを検討するため、細胞増殖マーカーである Ki67 と MART-1 の共染色を実施した。Ki67 は、増殖性細胞の核小体及び核分裂期の染色体上に発現する分子であり、G1 期後期から発現量が増加し始め、M 期で最大になるといわれている。免疫染色の結果、Ki67⁺/MART-1⁺細胞は表皮基底層に存在するものの、その数は極めて少なく、ほとんど検出されなかった (Fig. 4-6)。また、健常部と SL 病変部で有意な差は認めなかった (Fig. 4-4)。したがって、SL におけるメラノサイトの増加は、表皮におけるメラノサイトの増殖によるものではないと考えられた。

4-2-3. 毛包内メラノblast及び色素幹細胞における増殖の解析

次に、SL における表皮メラノサイトの増加が色素幹細胞からメラノblast及びメラノサイトへの分化過程に起因するかどうかを検討するため、色素細胞系譜の局在を解析した。これまでに、ヒトの色素幹細胞は毛包のバルジ領域の外毛根鞘に局在する MITF 陽性細胞として同定されている (Nishimura *et al.*, 2005)。また、第 2 章において、マウスの色素幹細胞マーカーとして、Fzd4 を同定した。そこで、ヒトの皮膚組織について MITF と FZD4 の共染色を実施したところ、バルジ領域に MITF⁺/FZD4⁺細胞を認め (Fig. 4-7)、FZD4 はヒトの色素幹細胞マーカーとしても有用であることが示された。色素幹細胞から分化したメラノblastがメラノサイトに最終分化する過程を解析するために、MART-1 と TYR の共染色を毛包の皮脂腺～毛孔の間に位置する毛漏斗部について実施した。その結果、MART1⁺/TYR⁺細胞が毛漏斗部下部に存在し、MART1⁺/TYR⁺細胞が毛漏斗部上部から表皮にかけて存在することが示された (Fig. 4-8)。これらの結果は、メラニン合成能を持たない比較的未分化なメラノblastは表皮から遠い部位に存在し、成熟したメラノサイトは表皮に近接した部位に存在することを示している。毛漏斗部におけるこれらの細胞が SL 形成に関与しているかどうかを検討するため、MART-1 及び Ki67 の共染色を実施した (Fig. 4-9)。健常部と比較して、毛漏斗下部及び上部の MART-1⁺細胞であるメラノblast及びメラノサイトの数はいずれも有意に多いものの、Ki67⁺/MART-1⁺細胞はほとんど検出されなかった (Fig. 4-4)。したがって、SL では、メラノblastの段階ですでに数が増加していることが明らかになった。しかしながら、これらの細胞の増殖能には差がないことが示され、さらに分化の前の段階である色素幹細胞の関与が推察された。最後に、色素幹細胞の増殖能を解析するため、Ki67 及び FZD4 の共染色を行った (Fig. 4-10)。その結果、Ki67⁺細胞はほとんど検出されず、健常部と SL 病変部で差を認めなかったものの、FZD4⁺細胞の数は SL で有意に増加していた (Fig. 4-11)。以上の結果より、メラノサイトの供給源である色素幹細胞の増加が SL における表皮メラノサイトの増加の原因である可能性が考えられた。

4-3. 考察

これまで、SL の病理メカニズムについては、表皮ケラチノサイトにおける SCF や EDN1 の発現亢進 (Kadono *et al.*, 2001; Hattori *et al.*, 2004)、真皮線維芽細胞における KGF や HGF の発現亢進など

(Kovacs *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010)、メラノサイトにおけるメラニン合成を刺激する増殖因子の発現に関する知見が報告されている。これらの増殖因子は、メラノサイトのメラニン合成だけでなく表皮メラノサイトの増加を引き起こすと考えられてきた (Hirobe *et al.*, 2003; Hirobe *et al.*, 2004)。表皮におけるメラニン合成の亢進やメラノサイトの増加は SL のよく知られた特徴であるが、メラニン量の増加がメラノサイトの数と個々のメラノサイトのメラニン合成能の違いのどちらによるものなのか、なぜメラノサイトの数が増加するのかといった疑問があった。本研究の結果から、これらの問いに対し、次の答えに到達した。SL 病変部におけるメラニン合成の亢進は、メラノサイトの数と個々のメラノサイトのメラニン合成能の増加の両方に起因するものである。また、バルジ領域における色素幹細胞の増加が表皮メラノサイトの増加に関与する可能性が高い。

今回の検討から、SL において個々のメラノサイトにおける TYR の発現は高く、SL 病変部のメラノサイトは高いメラニン合成能を有することが示された (Fig. 4-5)。また、これまでの報告と同様に、表皮におけるメラノサイトの増加を認めた (Fig. 4-4)。これらの結果は、高いメラニン合成能を有するメラノサイトの数が多いことが、SL の形成に関与することを意味する。興味深いことに、メラノサイトの増加は表皮メラノサイトの増殖によるものではないことが示された。したがって、メラノサイトが表皮に局在するよりも前の段階、すなわち色素幹細胞からメラノサイトへの分化過程が関与していると考えられ、毛包におけるメラノサイト、メラノblast、色素幹細胞の数及び増殖能を解析した。その結果、毛漏斗部下部に存在するメラノblast及びバルジ領域に存在する色素幹細胞のいずれも健常部に比べて SL では数が多いことが明らかとなった。しかしながら、これらの細胞の増殖能には健常部との差を認めなかった (Figs. 4-4, 4-11)。以上の結果より、SL では色素幹細胞の数が増加するために、表皮メラノサイトの数が増加していると推察されるが、色素幹細胞の数が増加しているにも関わらず増殖マーカーである Ki67 がほとんど検出されない理由を突き止める必要がある。可能性の1つとして、過去に UV に暴露されてから SL が形成されるまでの過程で、色素幹細胞が異常に増加し、その後も維持されつつ、メラノblastを供給していることが考えられる。SL は過去の日光への暴露時間、特にまとめて大量の紫外線にさらされた後、長期間経ってから形成されることが多く (Monestier *et al.*, 2006)、UV と加齢の2つの要素が複雑に SL の病理メカニズムには関与している。別の可能性として、健常部と SL における色素幹細胞の分裂様式の違いである。体性幹細胞は対称分裂と非対称分裂により、自己複製と分化のバランスを保っている (Alison *et al.*, 2009; Mascré *et al.*, 2012; Knoblich, 2008)。この分裂様式は、2つ幹細胞を生み出す対称分裂、1つの幹細胞と一つの分化細胞を生み出す非対称分裂、そして2つの分化細胞を生み出す対称分裂である。この分裂様式のバランスが崩れると幹細胞の数が増加になると考えられる。例えば色素幹細胞が2つのメラノblastへ分化する対称分裂の頻度が、健常部よりも SL 病変部で少なければ、SL における色素幹細胞の数は多くなる。また、一般的に、大部分の体性幹細胞は非常に長い細胞周期 (slow-cycling) で分裂するため、増殖中の幹細胞を検出するのは難しい。今回の検討では、健常部と SL 病変部における色素幹細胞の増殖に差は認めなかったが、SL の形成は長い時間を必要とすることから、ほんのわずかな差が増幅されている可能性は否定できず、もしわずかでも色素幹細胞の自己複製や細胞分裂の頻度が高いと結果として生じる色素幹細胞やメラノblastの数は多くなる。その結果、色素幹細胞の増殖や分化が促進され、メラノサイトの増加につながっているのかもしれない。そのメカニズムについては分からないが、前述のメラニン合成関連因子の関与が推察される。K14 プロモーター下で基底層ケラチノサイトに SCF や Edn1 を強制的に発現さ

せると、本来メラノサイトが存在しないマウスの皮膚にメラノサイトが出現することから、この推測がある程度妥当であると考えられる (Nishimura *et al.*, 2002; Rabbani *et al.*, 2011)。色素幹細胞の分化には、古典的 Wnt シグナル経路の活性化が必要であり、逆に TGF- β シグナルは未分化状態の維持に重要な役割を果たす (Nishimura *et al.*, 2010)。SL の病理メカニズムに、これらの色素幹細胞の制御シグナルが関与している可能性も考えられ、今後、より詳細に色素幹細胞の分裂及び分化状態を解析する必要があると考える。

これまでの報告は表皮で起こっている現象に着目したものであったが、今回、SL において色素幹細胞からメラノblast及びメラノサイトへの分化過程との関連について初めて解析した。さらに、この過程が SL の病理メカニズムに関与することを示し、特に分化の初期段階である色素幹細胞が密接に関与することを示した。従来、SL の改善方法はメラノサイトが存在する表皮をターゲットとしたものであったが、色素幹細胞の分化を適切に制御することで、より進歩した改善方法が提供できると考えられる。今後、さらなる詳細な解析とともに、新しい SL の改善方法の開発に期待したい。

Control			SL			
Number	Age	Sex	Number	Age	Sex	Stage
1	41	F	1	41	F	1
2	49	F	2	52	F	1
3	58	F	3	56	F	1
4	58	F	4	57	F	1
5	67	F	5	71	F	2
6	69	F	6	71	F	1
7	76	F	7	81	F	1
8	80	F	8	89	F	1
9	90	F	9	45	M	1
10	60	M	10	69	M	1
11	80	F	11	78	M	1
Average	66.7 ± 14.7			64.5 ± 15.4		

Fig. 4-1 解析したヒト健常部皮膚及び老人性色素斑病変部のドナー情報
Control, 健常部; SL, 老人性色素斑病変部
F, 女性; M, 男性

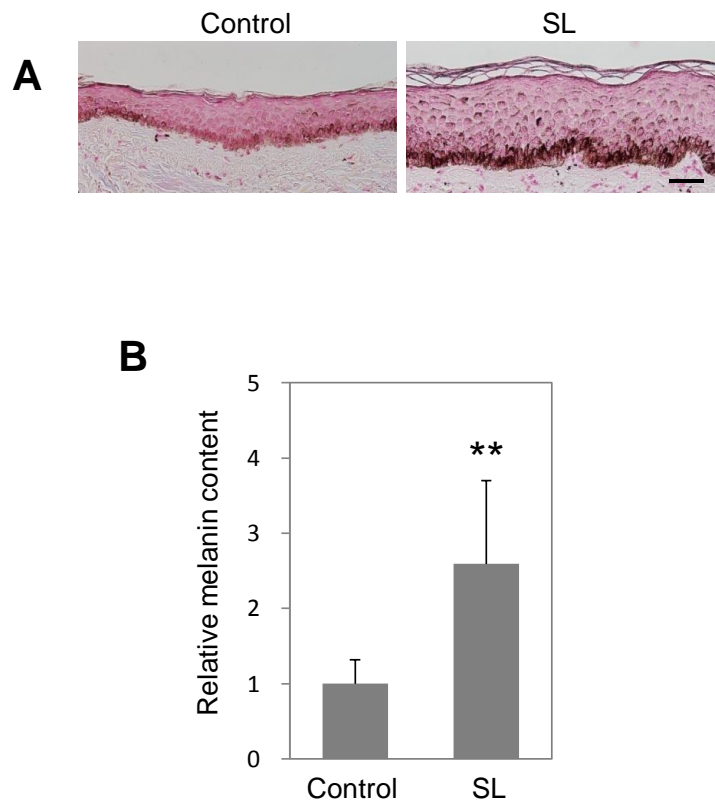


Fig. 4-2 健常部とSL病変部におけるメラニン量の比較

(A) 健常部及びSL病変部におけるフォンタナ・マッソン染色 (Scale bar = 50 μ m)。

(B) フォンタナ・マッソン染色の結果をもとに、画像解析により相対メラニン量を解析した (** $P < 0.01$ vs コントロール)。

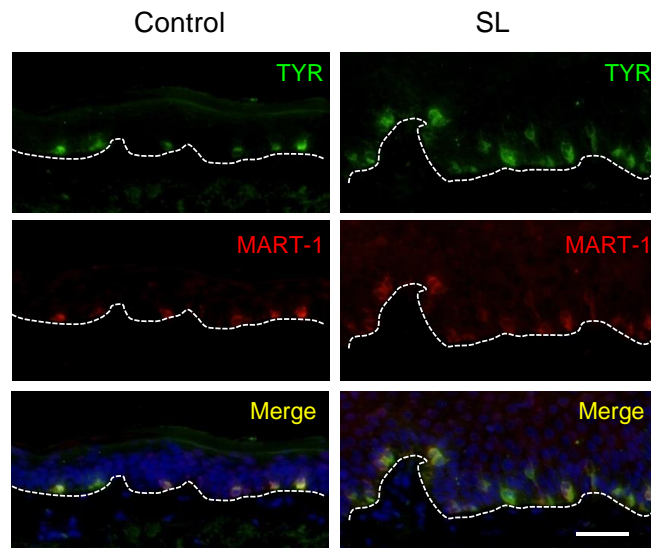


Fig. 4-3 健常部とSL病変部におけるメラノサイトの染色

健常部及びSL病変部におけるTYR及びMART-1の免疫染色 (Scale bar = 50 μm)。核染色をDAPI (青色) により行い、表皮と真皮の境界を破線で示した。

		Total basal cell number	MART-1 ⁺ cells / total basal cells	MART-1 ⁺ , Ki67 ⁺ cells / total basal cells	MART-1 ⁺ , Ki67 ⁺ cells / total MART-1 ⁺ cells
Epidermis	Control	45 ± 4.6	11.6 ± 3.8	0.12 ± 0.38	0.83 ± 2.64
	SL	53 ± 8.4*	20.8 ± 5.4**	0.15 ± 0.34	0.60 ± 1.45
Upper infundibulum	Control	34 ± 5.1	8.4 ± 3.0	0.09 ± 0.25	0.78 ± 2.21
	SL	33 ± 3.0	18.5 ± 6.1**	0.25 ± 0.62	1.04 ± 6.3
Lower infundibulum	Control	31 ± 7.9	6.1 ± 1.7	0.07 ± 0.18	1.56 ± 4.42
	SL	35 ± 2.4	9.8 ± 4.1*	0.08 ± 0.20	0.46 ± 1.13

Fig. 4-4 健常部とSL病変部におけるメラノサイトの数と増殖能

全細胞数 (total basal cell number) は、1視野当たりの基底層に観察された細胞の数として示した。また、MART-1⁺及びKi67⁺細胞の全細胞数またはMART-1⁺細胞数に対する割合 (%) を示した (**P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs コントロール)。

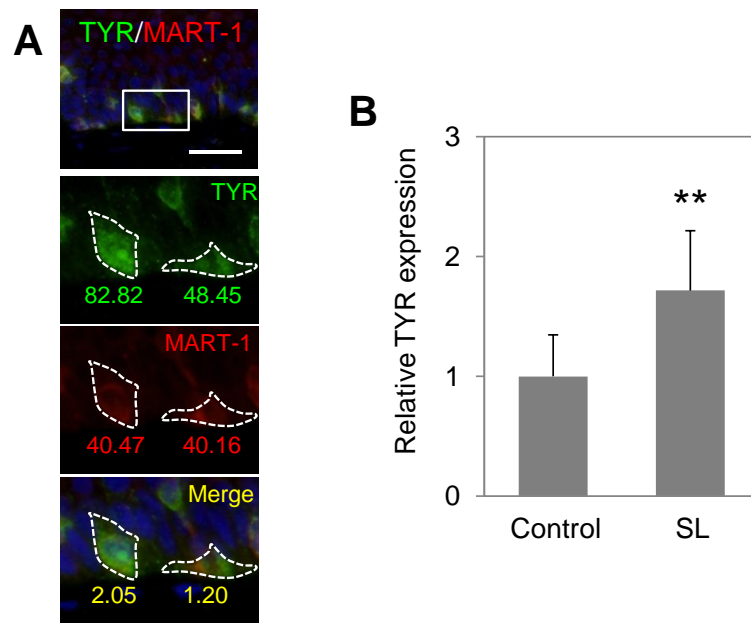


Fig. 4-5 健常部とSL病変部における個々のメラノサイトのメラニン合成能

- (A) 画像解析によるTYR及びMART-1の定量例。最上段の画像の線で囲まれた部分を拡大して下に示した。核染色はDAPI (青色) により行った。破線で囲まれたメラノサイト一つ一つについて、TYR及びMART-1の相対蛍光強度をNIH imageにより解析し (緑または赤字の数字)、MART-1の相対蛍光強度に対するTYRの相対蛍光強度を相対TYR発現量として算出した (黄字)。
- (B) 健常部とSL病変部の個々のメラノサイトにおけるメラニン合成能の比較。(A) にて算出した個々のメラノサイトの相対TYR発現量をもとに、各検体におけるメラノサイト1個あたりの相対TYR発現量を算出した。次に、健常部の検体間の相対TYR発現量、SL病変部の検体間の相対TYR発現量をそれぞれ平均し、健常部及びSL病変部における個々のメラノサイトの相対TYR発現量 (メラニン合成能) を算出した (** $P < 0.01$ vs コントロール)。

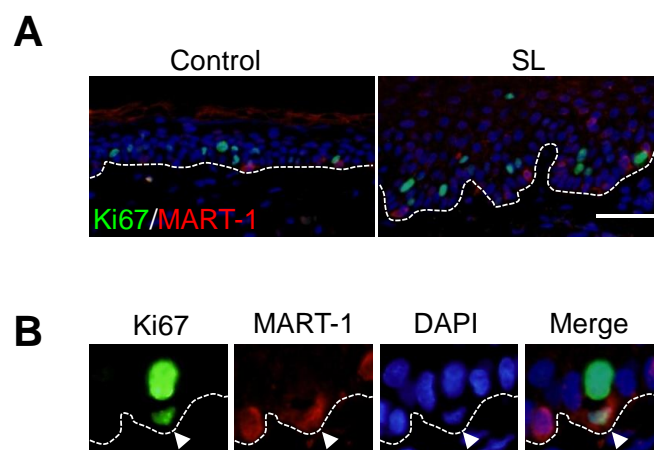


Fig. 4-6 表皮における増殖性メラノサイトの解析

(A) 健常部及びSL病変部の表皮におけるMART-1及びKi67の免疫染色 (Scale bar = 50 μ m)。核染色をDAPI (青色) により行い、表皮と真皮の境界を破線で示した。
 (B) 観察されたKi67⁺/MART-1⁺細胞 (矢頭)。

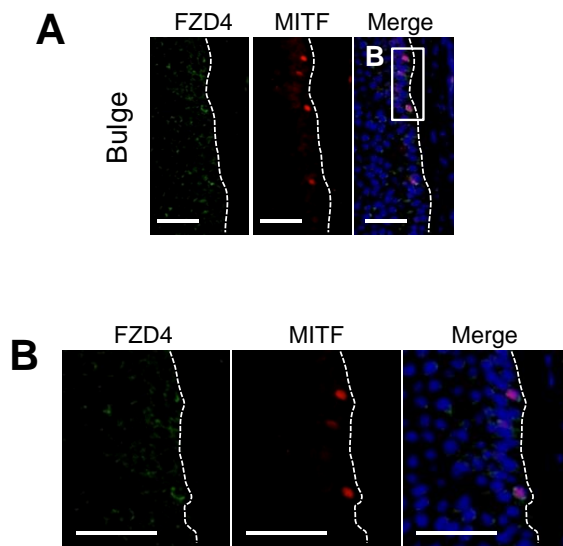


Fig. 4-7 バルジ領域における色素幹細胞の局在解析

(A) 毛包のバルジ領域におけるFZD4及びMITFの免疫染色 (Scale bar = 50 μ m)。核染色をDAPI (青色) により行い、毛包と真皮の境界を破線で示した。

(B) (A)の線で囲まれた部分の拡大像を示した (Scale bar = 50 μ m)。

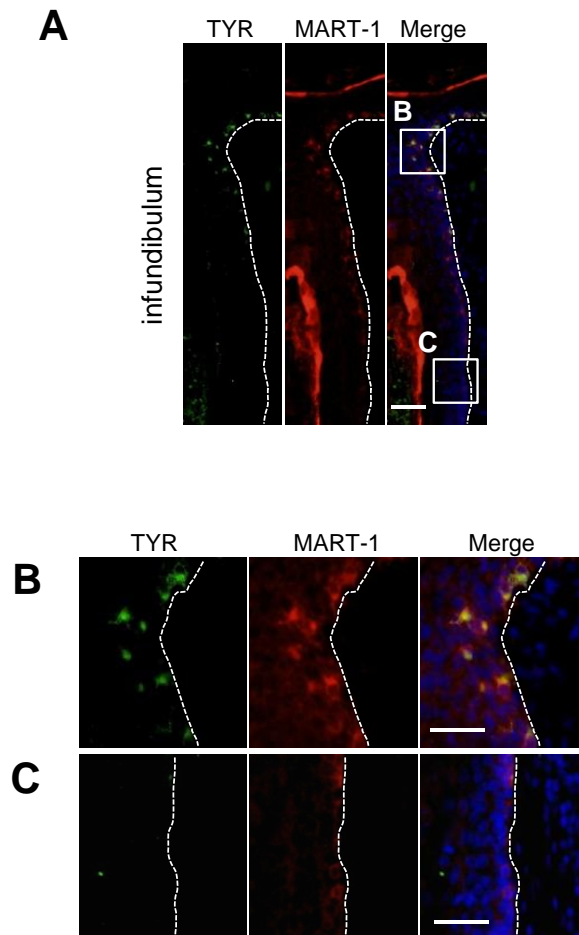


Fig. 4-8 毛漏斗部におけるメラノプラスト及びメラノサイトの局在解析

- (A) 毛漏斗部におけるTYR及びMART-1の免疫染色 (Scale bar = 50 μ m)。核染色をDAPI (青色) により行い、毛包と真皮の境界を破線で示した。
 (B, C) (A)の線で囲まれた部分の拡大像を示した (Scale bar = 50 μ m)。

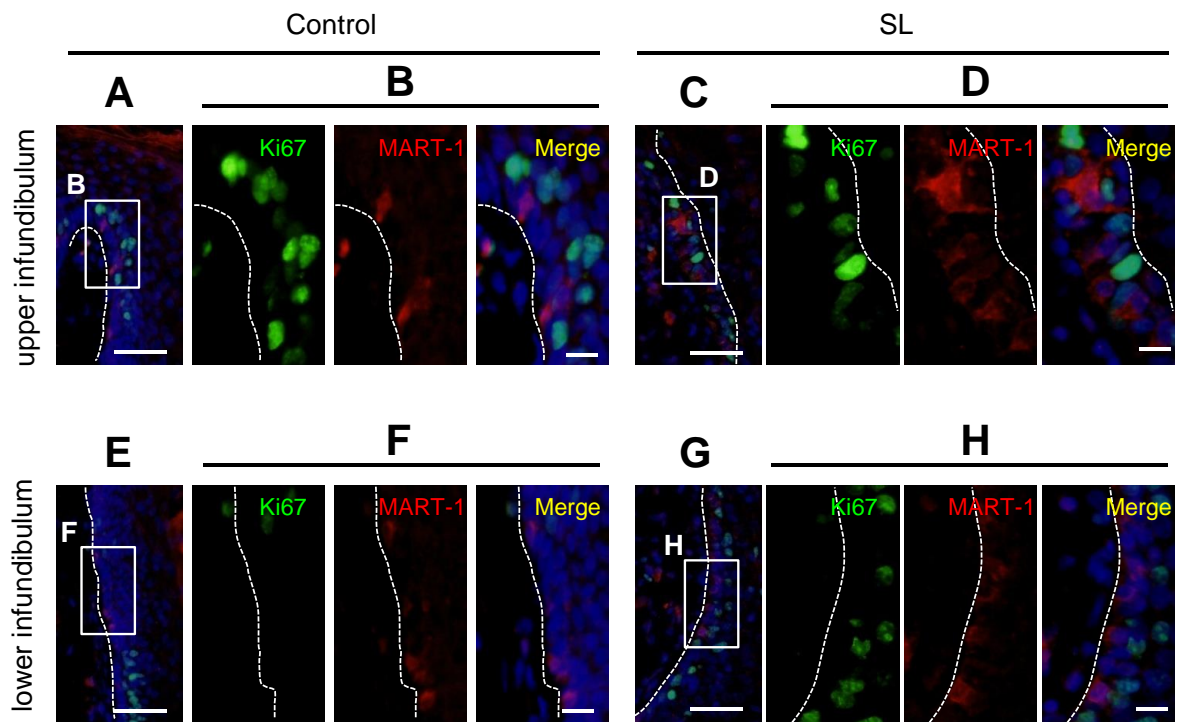


Fig. 4-9 健常部及びSL病変部の毛漏斗部における増殖性メラノblast及びメラノサイトの解析
 健常部 (A, E) 及びSL病変部 (C, G) の毛漏斗部におけるKi67及びMART-1の免疫染色 (Scale bar = 50 μ m)。核染色をDAPI (青色) により行い、毛包と真皮の境界を破線で示した。(A)、(C)、(E)、(G) の線で囲まれた部分の拡大像を (B)、(D)、(F)、(H) に示した (Scale bar = 10 μ m)。

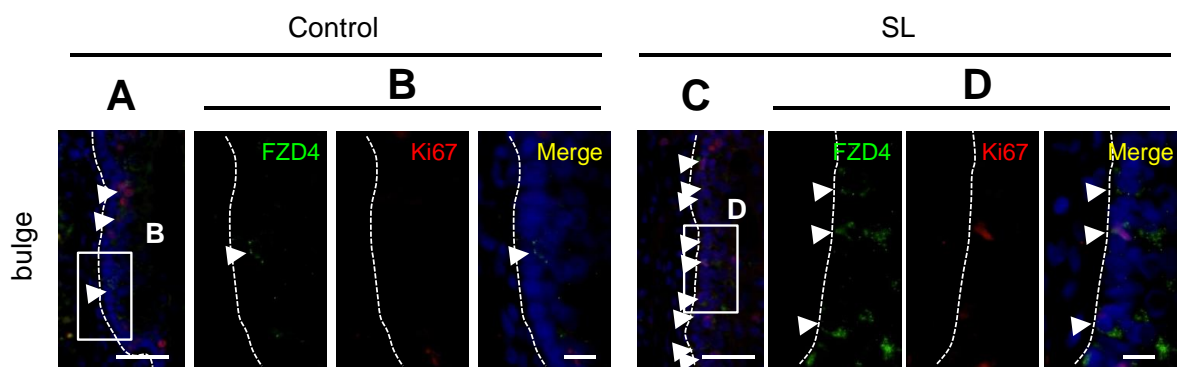


Fig. 4-10 健常部及びSL病変部のバルジ領域における増殖性色素幹細胞の解析

健常部 (A) 及びSL病変部 (B) のバルジ領域におけるKi67及びFZD4の免疫染色 (Scale bar = 50 μ m)。核染色をDAPI (青色) により行い、毛包と真皮の境界を破線で、FZD4陽性細胞を矢頭で示した。また、(A)、(C) の線で囲まれた部分の拡大像を (B)、(D) に示した (Scale bar = 10 μ m)。

		Total basal cell number	FZD4 ⁺ cells / total basal cells	FZD4 ⁺ , Ki67 ⁺ cells / total basal cells	FZD4 ⁺ , Ki67 ⁺ cells / total MART-1 ⁺ cells
Bulge	non-SL	44 ± 6.9	4.29 ± 2.90	0.09 ± 0.38	3.43 ± 9.80
	SL	42 ± 2.9	8.24 ± 3.86 **	0.78 ± 1.77	10.42 ± 26.44

Fig. 4-11 健常部とSL病変部のバルジ領域における色素幹細胞の数と増殖能

全細胞数 (total basal cell number) は、1視野当たりの基底層に観察された細胞の数として示した。また、FZD4⁺及びKi67⁺細胞の全細胞数またはMART-1⁺細胞数に対する割合 (%) を示した (***P* < 0.01 vs コントロール)。

第5章

加齢に伴う皮下脂肪組織由来幹細胞の能力
の変化に関する解析

第5章

加齢に伴う皮下脂肪組織由来幹細胞の能力の変化に関する解析

要約

皮下脂肪組織に多分化能を示す幹細胞が存在することが知られている。これまでに、この脂肪幹細胞 (adipose tissue-derived stem cell: ASC) の中でも p75 neurotrophine receptor (p75NTR: CD271) 陽性細胞が特に高い分化能を有することが示されている。再生医療への ASC の応用を考えた場合、幅広い年齢のドナーから得られた ASC の能力を見極めておく必要があり、p75NTR 陽性 ASC の加齢に伴う数や能力の変化について検討した。3~24 週齢の ICR マウスの皮下脂肪組織について解析した結果、加齢に伴い p75NTR 陽性 ASC の組織重量あたりの数やシャーレへの生着率が低下することが示された。一方、細胞の増殖能や老化の指標となる SA- β gal (senescence-associated β galactosidase) の陽性率には、週齢間で有意な差を認めなかった。また、脂肪細胞及び骨芽細胞への分化能は加齢とともにわずかに低下したものの、軟骨細胞及び平滑筋細胞への分化能には差を認めなかった。以上の結果より、加齢に伴い p75NTR 陽性 ASC の数は減少するが、増殖能や多分化能はある程度まで保持されていることが示された。したがって、加齢に関わらず皮下脂肪組織に存在する p75NTR 陽性 ASC の自己複製能や多分化能は維持されていると考えられた。

5-1. 緒言

万能性を持つ ES 細胞や iPS 細胞とは異なり (Boheler, 2009; Takahashi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2007)、体性幹細胞の分化能は限定的であると考えられているが、再生医療を必要とする患者本人から採取することが可能なため、拒絶反応の恐れが少ないというメリットがある。また、倫理的な問題やがん化の可能性も極めて低いため、再生医療への応用が最も現実的であると期待されている。体性幹細胞の中でも、造血幹細胞や骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived stem cell: BM-MSC) がよく知られている (Orlic *et al.*, 1994; Kiel *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 1998; Pittenger *et al.*, 1999)。造血幹細胞は、白血病患者への骨髄移植などで知られるように、その医療への応用の歴史は長い。一方、同じ骨髄内に存在する BM-MSC は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などへの分化能を有し、*in vitro* で増幅可能なため、様々な組織の修復に適用できる可能性を持っている。しかしながら、骨髄から得られる量や採取時の患者への負担が大きいという問題がある。これに対し、ASC は BM-MSC に比べて外科的侵襲が比較的少なく、大量に採取可能であるという利点がある。また、BM-MSC と同等の多分化能を有していることから (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002)、その再生医療への応用に期待が集まっている。ASC はメラノサイトへの分化能を有していることも報告されており (長谷川ら, 2006)、色素異常症の治療におけるメラノサイトの供給源としても期待できる。これまでにいくつかの表面抗原の発現が報告されているものの、造血幹細胞とは異なり、BM-MSC や ASC などの間葉系幹細胞の定義は定まっていない (Hamid *et al.*, 2012; Sachs *et al.*, 2012)。ASC の中でも、低親和性神経成長因子受容体 (p75 neurotrophine receptor: CD271) 陽性 ASC 画分は、陰性画分比べて高い多分化能を示すことから (Yamamoto *et al.*, 2007)、この細胞の再生医療への応用が望ましいと考えられる。

病気や事故などによって損傷した組織の再生を目的とする再生医療は、子供から老人まで広い年齢層が治療の対象となる。したがって、様々な患者から幹細胞を採取し、その幹細胞が再生医療へ適用できるかどうかを検討する必要がある。さらに、それぞれの幹細胞の能力の違いを理解することは治療において非常に重要であり、特に加齢に伴う幹細胞の変化を知っておくことは、治療を円滑に進める手助けとなると考えられる。これまでに、骨髄または皮膚由来幹細胞の数や分化能が加齢に伴い低下するとの報告がある (Roobrouck *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2008)。また、ASC に関しても加齢に伴う変化についての報告があるが、結論は出ていない (Ding *et al.*, 2013; De Barros *et al.*, 2013; Mantovani *et al.*, 2013)。したがって、より詳細に加齢に伴う ASC の変化について解析し、再生医療への応用について考察する必要がある。そこで、本研究では、ASC の中でも高い分化能を持つと考えられる p75NTR 陽性 ASC に着目し、3~24 週齢のマウス皮下脂肪組織から得られた p75NTR 陽性 ASC の増殖能及び多分化能について比較した。

5-2. 結果

5-2-1. 皮下脂肪組織に存在する p75NTR 陽性細胞の数

3~24 週齢の ICR マウスから得られた皮下脂肪組織を採取したところ、マウスの週齢に伴い大きくなっていることを確認した (Fig. 5-1A)。組織学的に解析するために、これらの皮下脂肪組織からパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を行った。その結果、脂肪滴が発達したために染色されない分化した脂肪細胞の比率が加齢に伴い増加し、一方、エオジン陽性の未分化細胞と予想されるエリアが減少することが明らかになった (Fig. 5-1B)。p75NTR 陽性細胞の皮下脂肪組織における局在を解析するため、p75NTR に対する免疫染色を実施した。その結果、p75NTR 陽性細胞は、エオジン陽性の未分化な細胞が存在する領域に局在していた (Fig. 5-2A)。染色結果をもとに p75NTR 陽性細胞の数を計測し、単位面積当たりの p75NTR 陽性細胞の数を定量したところ、加齢に伴う減少が認められ、24 週齢では 3 週齢の 15 % にまで低下していた (Fig. 5-3A)。また、皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、遠心して成熟脂肪細胞を除いた画分 (stromal vascular fraction: SVF) を ASC として採取し、抗 p75NTR 抗体により染色してフローサイトメーターにより解析した。その結果、すなわち ASC 全体に対する p75NTR 陽性 ASC の占める割合は、加齢に伴い低下していた (Fig. 5-2B)。フローサイトメーターにより、1 個体から得られる ASC を全て解析し、皮下脂肪重量当たり存在する p75NTR 陽性 ASC の数を定量した結果、免疫染色の結果と同様に加齢に伴う p75NTR 陽性細胞の顕著な減少を認めた (Fig. 5-3B)。

5-2-2. p75NTR 陽性 ASC の接着能及び増殖能の解析

次に、加齢に伴う p75NTR 陽性 ASC の能力の変化を検討するために、フローサイトメーターにより 3~24 週齢のマウスから p75NTR 陽性 ASC を分離し、培養した。フローサイトメーターにより分離した p75NTR 陽性 ASC をシャーレに播種し、24 時間培養後に顕微鏡下で細胞を観察したところ、加齢に伴ってシャーレに接着する細胞が減少していた (Fig. 5-4A)。シャーレに接着している細胞の数をカウントし、播種した細胞数を 100 % として接着率を算出した結果、加齢に伴い有意に減少することが示された (Fig. 5-4B)。12 週齢以降の接着率は 10 % 未満であり、3 週齢の 5~6 分の 1 であった。したがっ

て、高齢のマウスより分離した p75NTR 陽性 ASC は、ほとんど接着しないことが明らかとなった。このような接着率の低下は、p75NTR 陽性 ASC における細胞表面の接着分子の関与が推察された。そこで、分離した p75NTR 陽性 ASC における 4 種類のインテグリン (*integrin β1: Itgb1*, *integrin β3: Itgb3*, *integrin α2: Itga2*, *integrin αv: Itgav*) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により解析した。その結果、8 週齢以降のマウスから分離した p75NTR 陽性 ASC における *Itgb3*, *Itga2*, *Itgav* の遺伝子発現が有意に低下していることを確認した (Fig. 5-5)。また、細胞老化の指標としてよく知られる老化関連β-ガラクトシダーゼ (senescence-associated β galactosidase: SA-β gal) の発現を解析するために、接着した p75NTR 陽性 ASC について SA-β gal 染色を実施した。しかしながら、分離したほとんどの p75NTR 陽性 ASC は SA-β gal 陰性であり (Fig. 5-6A)、細胞接着率とは対照的に週齢間で有意な差を認めなかった (Fig. 5-6B)。また、分離した p75NTR 陽性 ASC の増殖能を比較するため、一度増殖した細胞を播種しなおして 5 日間培養し、1 継代 (P1) の p75NTR 陽性細胞の倍加時間を算出した結果、週齢間で有意な差はなかった (Fig. 5-7)。

5-2-3. p75NTR 陽性 ASC の多分化能の解析

次に、3~24 週齢のマウスから分離した p75NTR 陽性 ASC の脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞への多分化能を解析した。まず、P2 の p75NTR 陽性 ASC を脂肪細胞分化誘導培地により 2 週間培養し、オイルレッド O 染色を行った。分化した脂肪細胞は、細胞内に脂肪滴と呼ばれるトリグリセリドをリン脂質が取り囲んだ構造体を有する。オイルレッド O は、脂溶性の赤色色素であり、この脂肪滴に取り込まれる。染色した細胞を顕微鏡下で観察したところ、加齢に伴いわずかに脂肪滴を形成する細胞の減少を認めた (Fig. 5-8A)。脂肪の中に取り込まれたオイルレッド O をイソプロパノールにより抽出し、520 nm の吸光度を測定した結果、3 週齢のマウスから分離した p75NTR 陽性 ASC と比較して、5 週齢以降で有意な減少を認めた (Fig. 5-8B)。ただし、24 週齢においても、吸光度の低下は約 27 % であり、脂肪細胞への分化能は失っていないことが示された。また、脂肪細胞マーカーであるペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (*peroxisome proliferator-activated receptor γ: Pparγ*) の遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析したところ (Davis *et al.*, 2008) 加齢に伴う傾向を示し、12 週齢以降では有意な低下を認めたが、12 週齢と 24 週齢の間に差はなかった。以上の結果より、加齢に伴い p75NTR 陽性細胞の脂肪細胞への分化能は低下するが、一定の分化能は維持されていると考えられた。

骨芽細胞への分化能を評価するために、骨芽細胞分化誘導培地により 3 週間培養し、アリザリンレッド S 染色を行った。アリザリンレッド S はカルシウムに結合することが知られており、分化した骨芽細胞の表面が赤色に染色される。アリザリンレッド S 染色の結果、顕微鏡観察下では顕著な差は認められなかった (Fig. 5-9A)。しかしながら、10 % ギ酸によりカルシウムを溶出させ、カルシウム沈着量を定量したところ、3 週齢のマウスから分離した p75NTR 陽性 ASC と比較して 5 週齢以降で有意な低下を認めた (Fig. 5-9B)。ただし、24 週齢においてもその低下は約 18 % であり、12 週齢と 24 週齢の間に差を認めないことから、骨芽細胞への分化能は失っていないことが示された。また、骨芽細胞マーカーであるオステオカルシン (*osterocalcin: OCN*) の遺伝子発現量には有意な差は認めなかった (Fig. 5-9C)。以上の結果より、加齢に伴い p75NTR 陽性細胞の骨芽細胞への分化能は低下するが、脂肪細胞への分化能と同様に、一定の分化能は維持されていると考えられた。

軟骨細胞への分化は、p75NTR 陽性 ASC を 15 mL のポリプロピレンチューブに回収して 500 rpm で遠心してペレットにし、軟骨細胞培養用培地で培養することで誘導した。培養過程で、ペレット状の p75NTR 陽性 ASC はチューブの底から剥がれ、球状へと変形していく。2 週間培養して分化誘導した結果、分化した軟骨細胞の塊の形状や大きさに顕著な差は認めなかった (Fig. 5-10A)。グリコサミノグリカン (GAG) は軟骨の主要な構成成分であるため、分化した軟骨細胞の塊を protenase K により溶解し、グリコサミノグリカンの量を定量した。その結果、週齢間で有意な差は認めなかった (Fig. 5-10B)。また、軟骨細胞マーカーである II 型コラーゲンの遺伝子発現を解析したが、こちらも有意な差を認めなかった (Fig. 5-10C)。以上の結果より、p75NTR 陽性細胞における軟骨細胞への分化能は脂肪細胞や骨芽細胞への分化能とは異なり、加齢による影響はほとんど受けず、維持されると考えられた。

平滑筋細胞への分化は、平滑筋細胞分化誘導培地にて 2 週間培養することで誘導した。平滑筋細胞マーカーである α -smooth muscle actin (α SMA) の免疫染色を行ったところ、3~24 週齢のいずれにおいても α SMA の発現を確認した (Fig. 5-11A)。画像解析により、 α SMA の発現を定量したところ、3~24 週齢の間に有意な差を認めなかった (Fig. 5-11B)。また、 α SMA の遺伝子発現についても同様に差を認めなかった (Fig. 5-11C)。以上の結果から、p75NTR 陽性細胞における平滑筋細胞への分化能は、軟骨細胞と同様に維持されると考えられた。

4-3. 考察

今回の検討より、マウスにおいて、皮下脂肪組織から得られる p75NTR 陽性 ASC の数は減少することが示された (Figs. 5-2, 5-3)。マウスの加齢とともに皮下脂肪は肥大することから、加齢に伴い未分化な ASC は成熟脂肪細胞へと分化していくために、減少してしまう可能性が考えられる。また、分離した p75NTR 陽性 ASC のシャーレへの接着能も顕著に低下していることが分かった (Fig. 5-4)。しかしながら、3~24 週齢のマウスから得られた p75NTR 陽性 ASC の増殖能 (倍加時間) には差は認められず、SA- β gal 陽性細胞の割合にも有意な差はなかった (Figs. 5-6, 5-7)。一方、加齢に伴う脂肪細胞または骨芽細胞への分化能には低下が見られるものの、一定の分化能は維持されていると考えられた。また、軟骨細胞または平滑筋細胞への分化能には差を認めなかったことから、老齢の個体から得られた p75NTR 陽性 ASC は増殖能及び多分化能を有していることが示された。

再生医療は、子供から老人まで広い年齢層が治療の対象となるため、様々な患者から幹細胞を採取し、その幹細胞が再生医療へ適用できるかどうかを検討する必要がある。さらに、それぞれの幹細胞の能力の違いを理解することは治療において非常に重要であり、特に加齢に伴う幹細胞の変化を知っておくことは、治療を円滑に進める手助けとなると考えられる。しかしながら、加齢と体性幹細胞の関係についてはいくつかの知見があるものの、未だ答えは出ていない。例えば、加齢に伴い BM-MSC の数や分化能が低下することが報告されている (Tokalov *et al.*, 2007)。4 週齢と 24 週齢のラットを比較した場合、BM-MSC の数は減少するものの、細胞表面マーカーの発現パターンや脂肪細胞及び骨芽細胞への分化能には変化がないことが示されている。また、12 か月齢のマウスから得られた BM-MSC の脂肪細胞及び骨芽細胞への分化能は、6 日齢マウスの BM-MSC に比べて、約 40 % 程度であることが報告されている (Kretlow *et al.*, 2008)。これらの報告から、種間でいくらかの違いはあると考えられるが、BM-MSC の数は加齢とともに減少し、増殖能や多分化能は老齢の個体に

においてもある程度のレベルで維持されていると考えられる。今回の検討から、皮下脂肪組織に存在する p75NTR 陽性 ASC は加齢とともに減少するが、組織から得られた細胞の増殖能や多分化能の差は小さいことが示された。骨髄と皮下脂肪という異なる組織由来の幹細胞が、加齢に伴い同様の変化を示すということは非常に興味深く、間葉系幹細胞に共通の特徴かもしれない。

これまでに加齢に伴う ASC の変化について検討した報告は少ないが、Shi らは 6 日齢と 60 日齢のマウスから分離した ASC の能力を比較している。彼らは、特定の表面抗原を利用して ASC を純化しておらず、遠心によって得られたクルードな ASC について解析している (Shi *et al.*, 2005)。60 日齢のマウスから得られた ASC は接着能、増殖能、脂肪細胞への分化能が低下していることを示した。一方、骨芽細胞への分化能には変化を認めなかった。彼らは、接着能の低下はインテグリンやカドヘリンのような接着分子の発現低下によるものだろうと推測している (Rezania *et al.*, 1999; Vlemminckx *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 1998)。今回の検討において、加齢に伴う ASC の接着能の低下と、Itgb3、Itga2、Itgav の遺伝子発現量の減少を認めた。これらの結果は、幹細胞の接着能、言い換えると細胞表面の接着分子の発現とドナーの年齢には相関がある可能性を示している。したがって、高齢の患者からはより多くの皮下脂肪組織または骨髄から幹細胞を分離する必要がある、年齢に応じて組織の採取量を設定しなければならないと考えられる。また、Shi らの検討では、加齢による骨芽細胞への分化能の低下を認めなかったが、今回の検討では加齢に伴い有意な低下を認めた。その理由として、ASC の分離に用いた表面抗原が異なるために、解析した細胞集団が違う可能性が考えられる。その他の理由として、骨芽細胞への分化誘導培地の組成の違いも考えられる。幹細胞の増殖または分化誘導培地については、様々な検討がなされており、用いる培地によって結果が異なる可能性も示唆されている。再生医療への ASC の応用を実現化するには、老齢の個体から得られた ASC の能力を高い状態で維持するような増殖培地やより高い分化効率を示す分化誘導培地の開発が不可欠であると考えられる。

ヒトの ASC と加齢の関係についてもいくつかの報告がある (Schipper *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009)。これらの検討では、何人かのドナーから得られた ASC の増殖能や多分化能が解析されている。Schipper らの検討では、ASC の増殖能については加齢によりわずかに減少するものの、有意な差は認められなかった。また、脂肪細胞への分化能も低下しないことが示された。ただし、皮下脂肪組織の採取部位により分化能やアポトーシス感受性が異なることが示されており、ヒト ASC の能力については、年齢だけでなく部位差を考慮する必要がある。Zhu らの検討では、加齢により骨芽細胞への分化能が低下することが示されている。一方、最近、Ding らはヒトの ASC の分化能とドナーの年齢には相関がないことを報告しており (Ding *et al.*, 2013)、ヒトの ASC と加齢との関係についての答えは出ていない。その理由として、実験結果が選択された ASC のドナーの違いに大きく左右される可能性が考えられる。ヒトでは、年齢や性別だけでなく既往歴や生活習慣などの様々な因子が幹細胞の性質に関与する可能性が考えられ、これらを統一することは難しい。したがって、条件を揃えて検討できるマウスなどにおいて、ASC の能力についてのさらなる検討を行い、その上でヒトの ASC に適用していくのが近道であると考えられる。

これまでに p75NTR 陽性 ASC は陰性細胞と比較して高い分化能を示すことが分かっており、再生医療への応用に期待ができる。今後、p75NTR 陽性 ASC が優れた能力を有する理由や加齢に伴う変化の原因を解明する必要があるが、少なくとも老齢の個体においても数は減少するが p75NTR 陽性 ASC が存在することが示された。また、今回の検討により十分な増殖能や一定の多分化能を示すこと

が明らかとなり、幅広い年齢の患者由来の ASC が再生医療に応用できる可能性を示唆している。今回の検討結果と同じように、老齢の個体から得られたヒト ASC においても一定の能力も維持されていれば、高齢者への再生医療への応用にも期待できると考える。

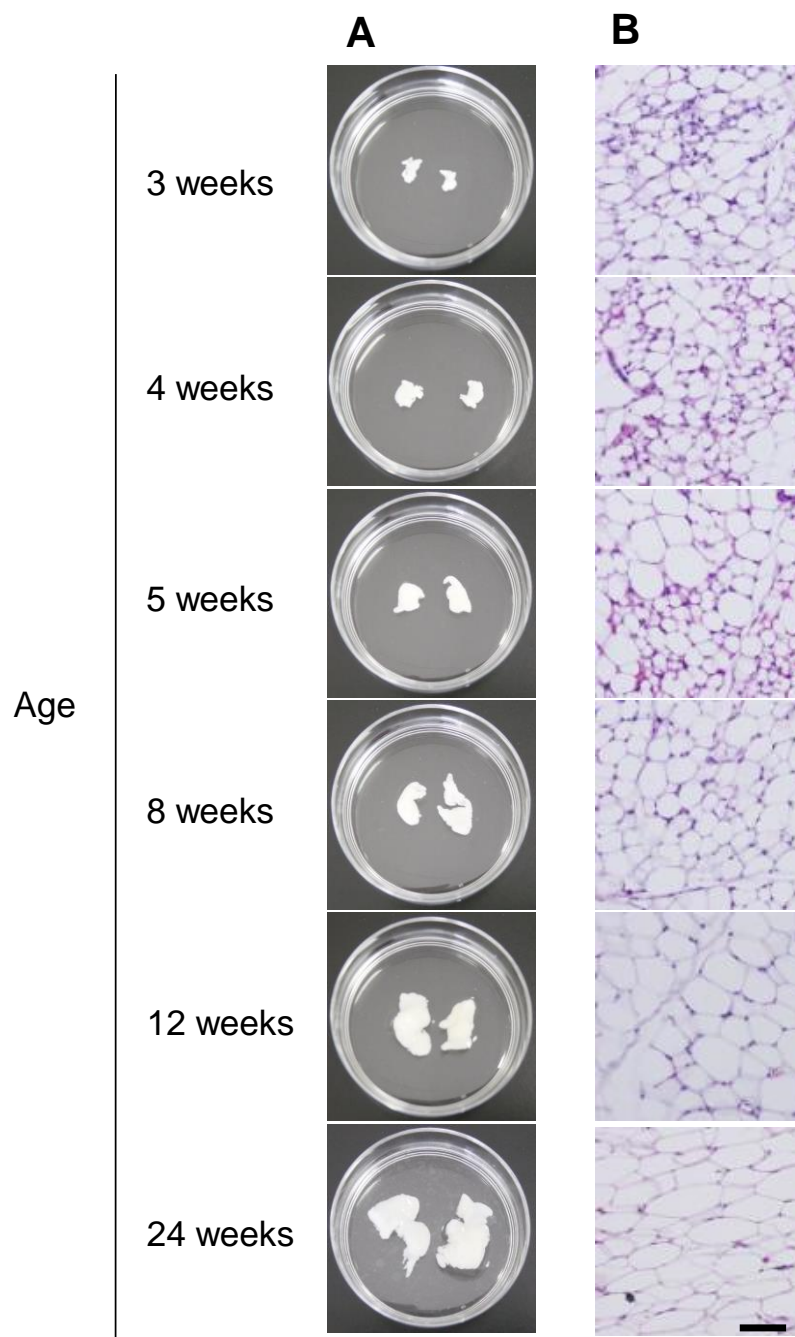


Fig. 5-1 加齢に伴う皮下脂肪の変化

(A) ICRマウスの鼠径部より摘出した皮下脂肪組織。

(B) ICRマウスの皮下脂肪組織におけるHE染色 (Scale bar = 100 μ m)。

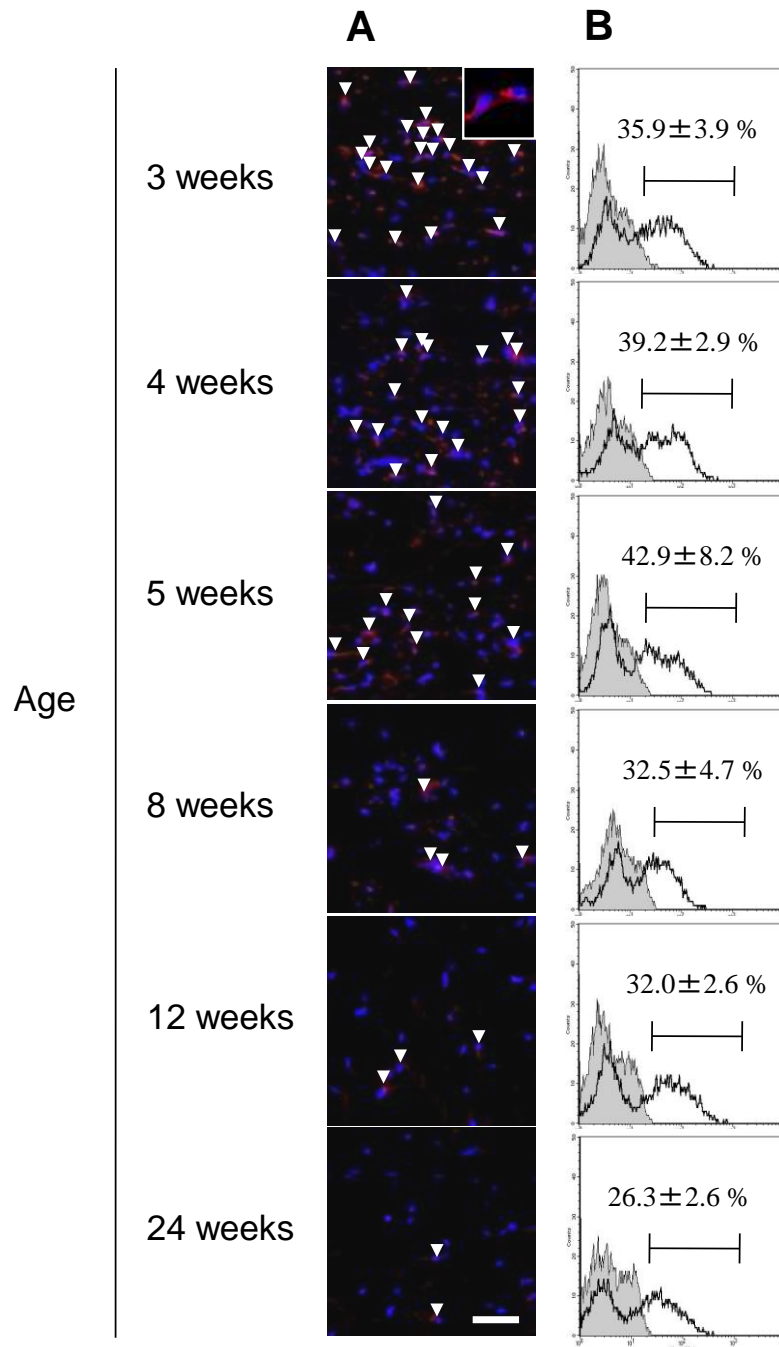


Fig. 5-2 加齢に伴うp75NTR陽性ASCの変化

(A) ICRマウスの皮下脂肪組織におけるp75NTRの染色 (Scale bar = 200 μ m)。角染色はDAPIにより行い (青色)、p75NTR陽性細胞を矢頭で示した。

(B) ICRマウスの皮下脂肪組織由来SVFにおけるp75NTR陽性細胞の割合をフローサイトメーターにより解析した。色つきのヒストグラムはネガティブコントロール。

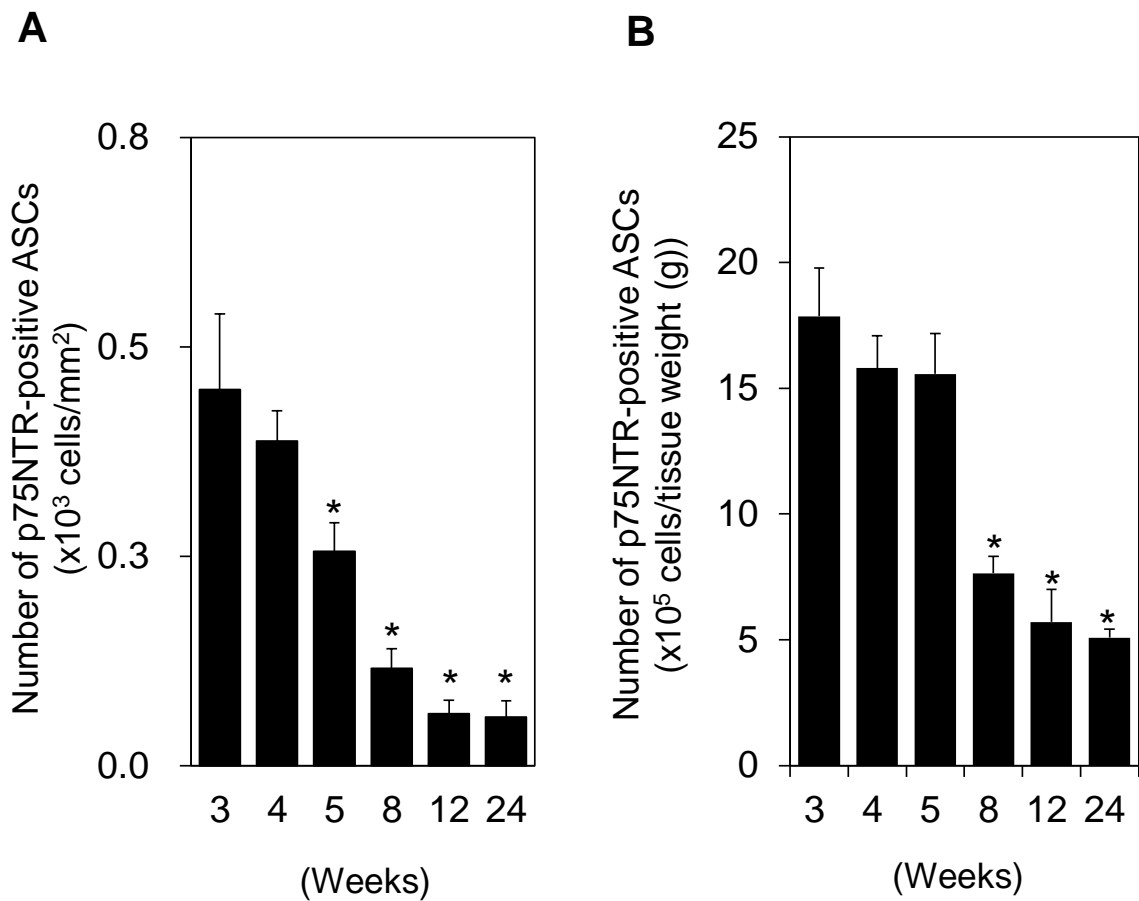


Fig. 5-3 p75NTR陽性ASC数の定量

- (A) 皮下脂肪組織におけるp75NTRの免疫染色結果をもとに、NIH imageによりp75NTR陽性細胞の数を計測し、単位面積当たりのp75NTR陽性ASCの数を算出した (* $P < 0.01$ vs 3週齢)。
- (B) フローサイトメーターにより1個体当たりのSVFに含まれるp75NTR陽性細胞の数をカウントし、脂肪組織重量あたりのp75NTR陽性ASCの数を算出した (* $P < 0.01$ vs 3週齢)。

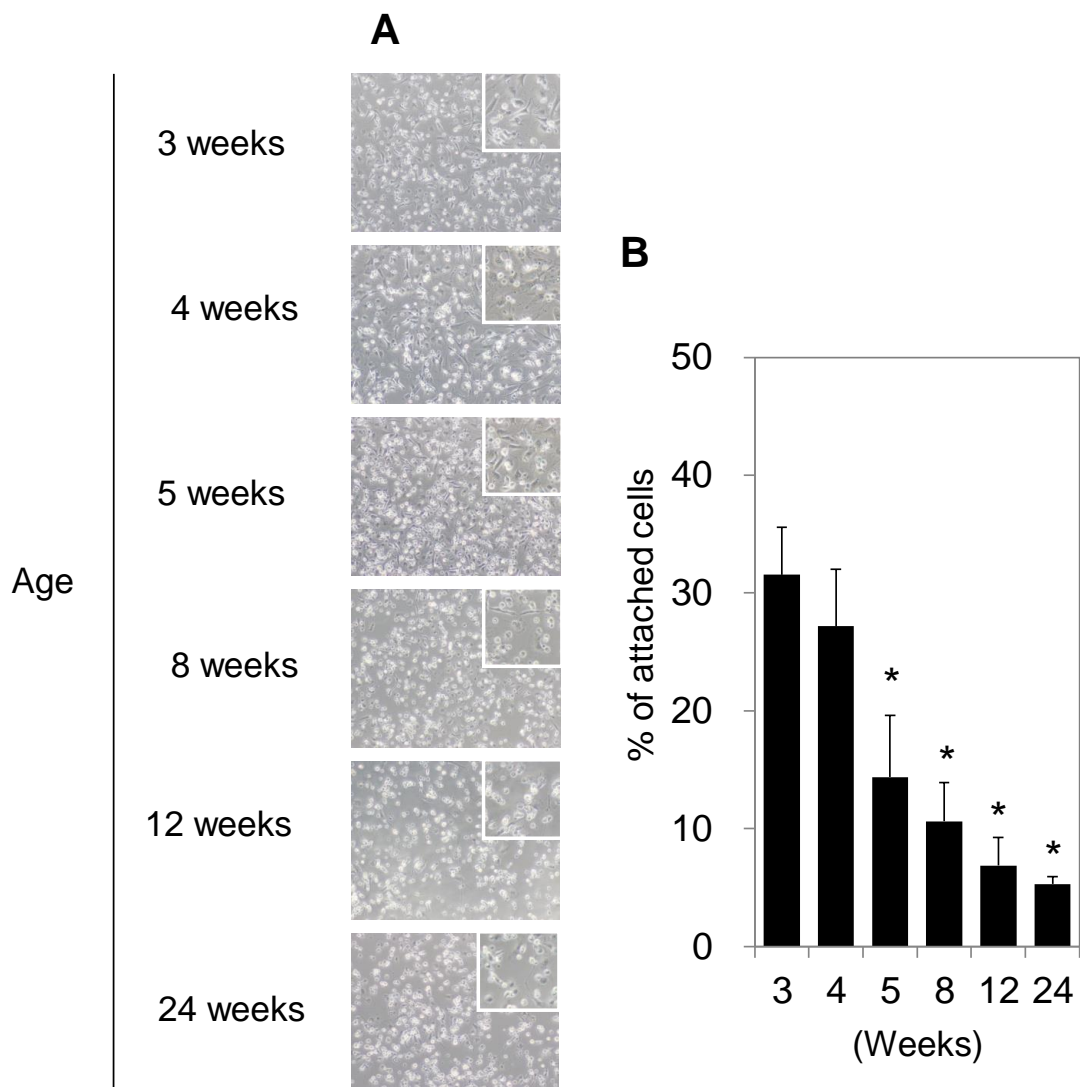


Fig. 5-4 加齢に伴うp75NTR陽性ASCの接着能の変化

(A) フローサイトメーターによりp75NTR陽性ASCを分離し、シャーレに播種して48時間後の細胞の形態を観察した。拡大像を右上に示した。

(B) 接着した細胞をカウントし、播種した細胞に対する割合 (%) を算出した (* $P < 0.01$ vs 3週齢)。

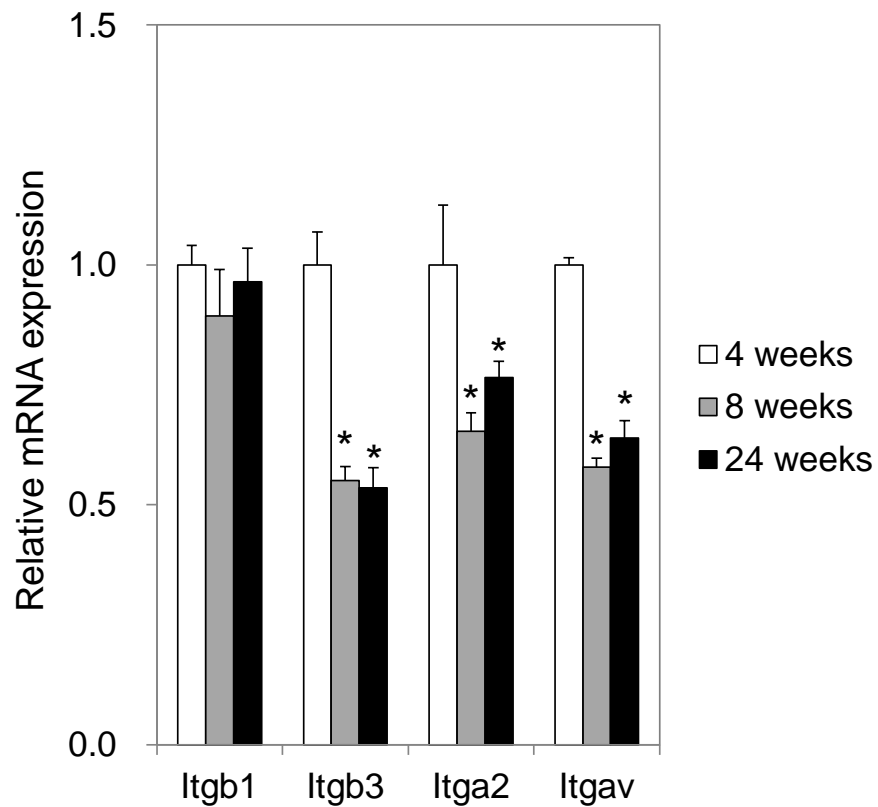


Fig. 5-5 加齢に伴うp75NTR陽性ASCの接着分子の発現変化

フローサイトメーターによりp75NTR陽性ASCを分離し、total RNAを抽出してリアルタイムPCRにより、接着分子の遺伝子発現を解析した (* $P < 0.01$ vs 3週齢)。

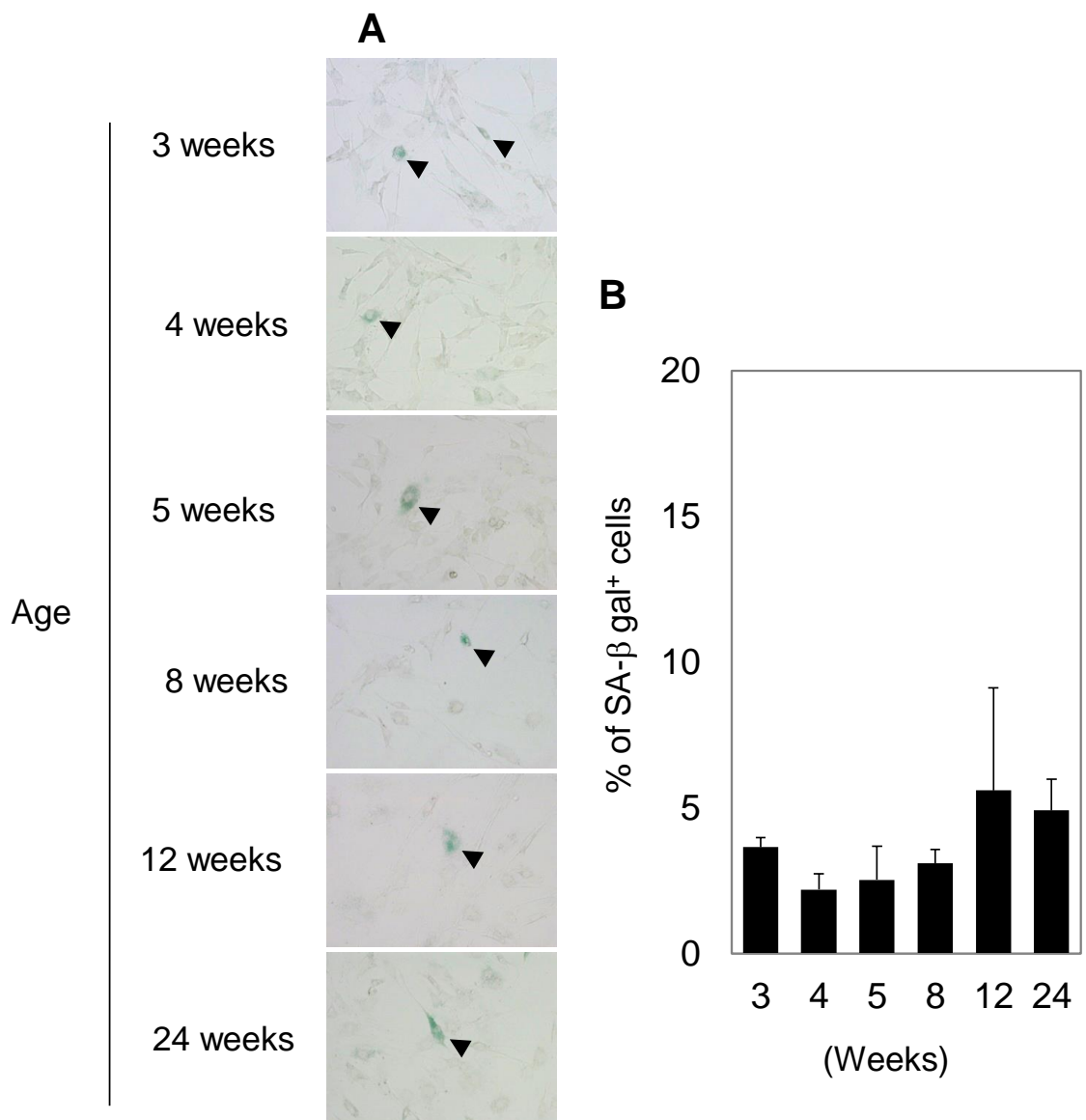


Fig. 5-6 p75NTR陽性ASCにおける細胞老化の解析

(A) フローサイトメーターによりp75NTR陽性ASCを分離し、接着したp75NTR陽性ASC について SA-β gal染色を実施した。SA-β gal陽性細胞を矢頭で示した。

(B) SA-β gal陽性細胞をカウントし、接着した全ての細胞に対する割合 (%) を算出した。

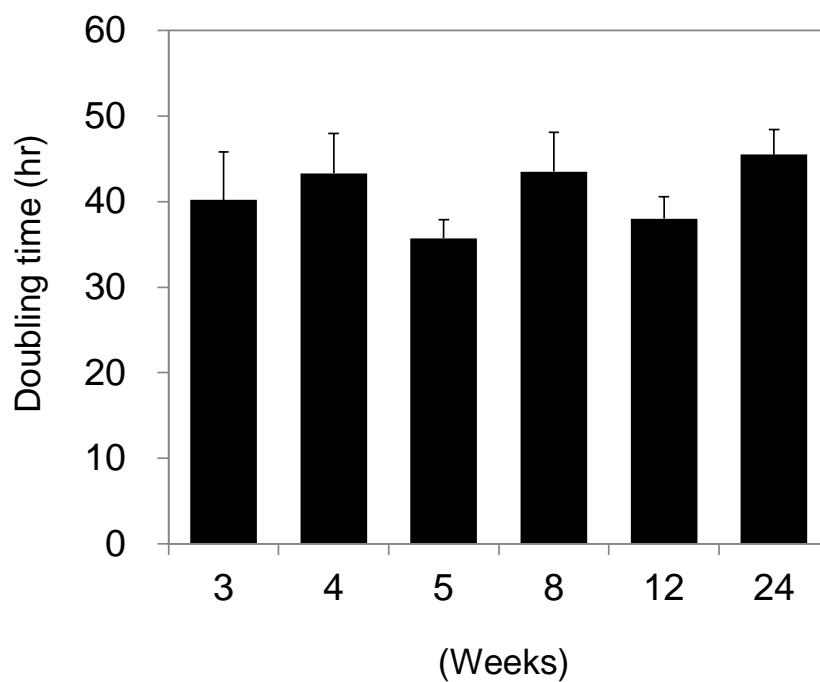


Fig. 5-7 p75NTR陽性ASCの倍加時間の解析

フローサイトメーターによりp75NTR陽性ASCを分離し、一度増殖した細胞を播種しなおして5日間培養し、倍加時間を算出した。

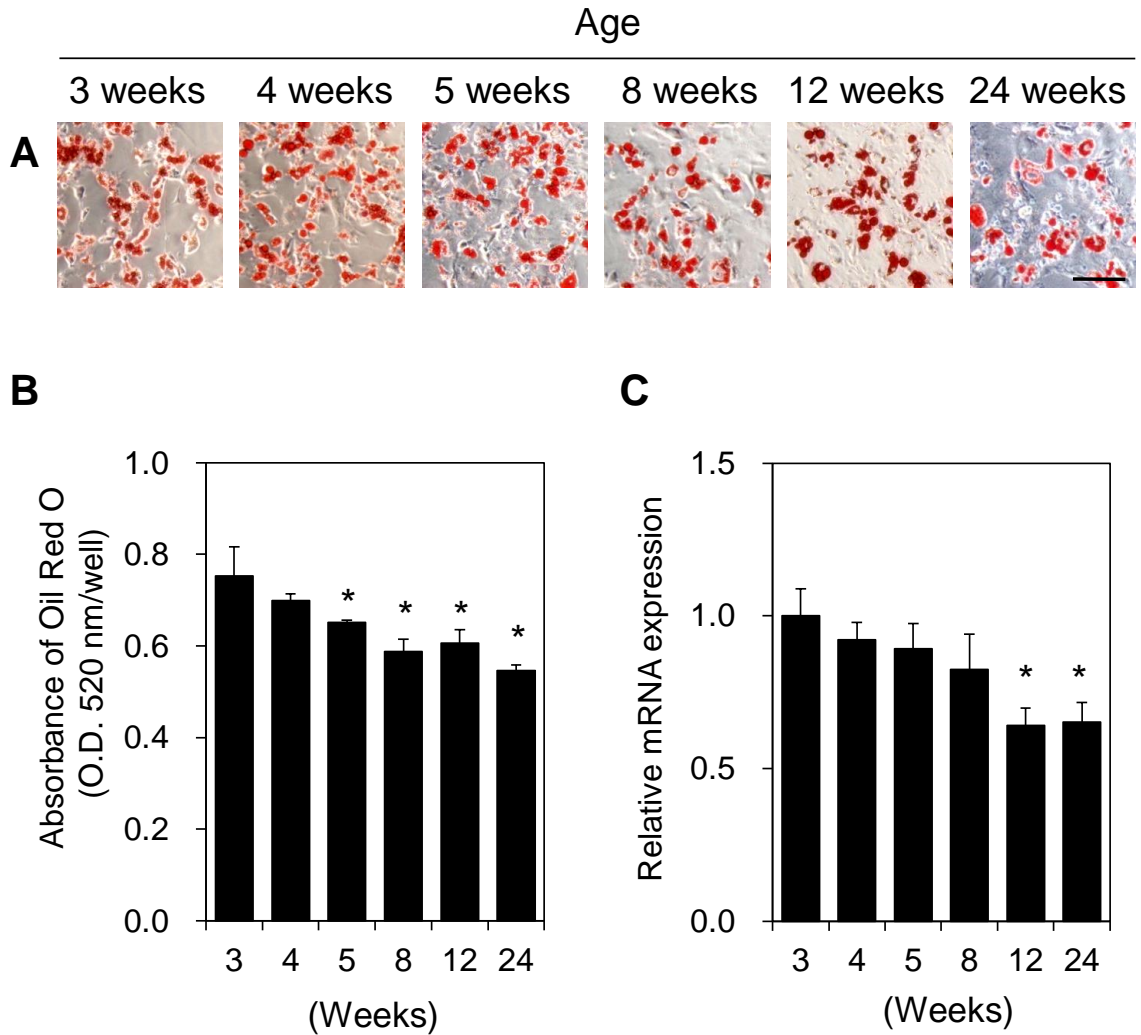


Fig. 5-8 加齢に伴うp75NTR陽性ASCの脂肪細胞への分化能の変化

(A) p75NTR陽性ASCを脂肪細胞へ分化誘導し、オイルレッドO染色を実施した (Scale bar = 100 μ m)。

(B) オイルレッドOを抽出し、520 nmの吸光度を測定した (** $P < 0.01$)。

(C) 分化誘導後の細胞からtotal RNAを抽出し、リアルタイムPCRにより*Ppar γ* の遺伝子発現を解析した (* $P < 0.01$)。

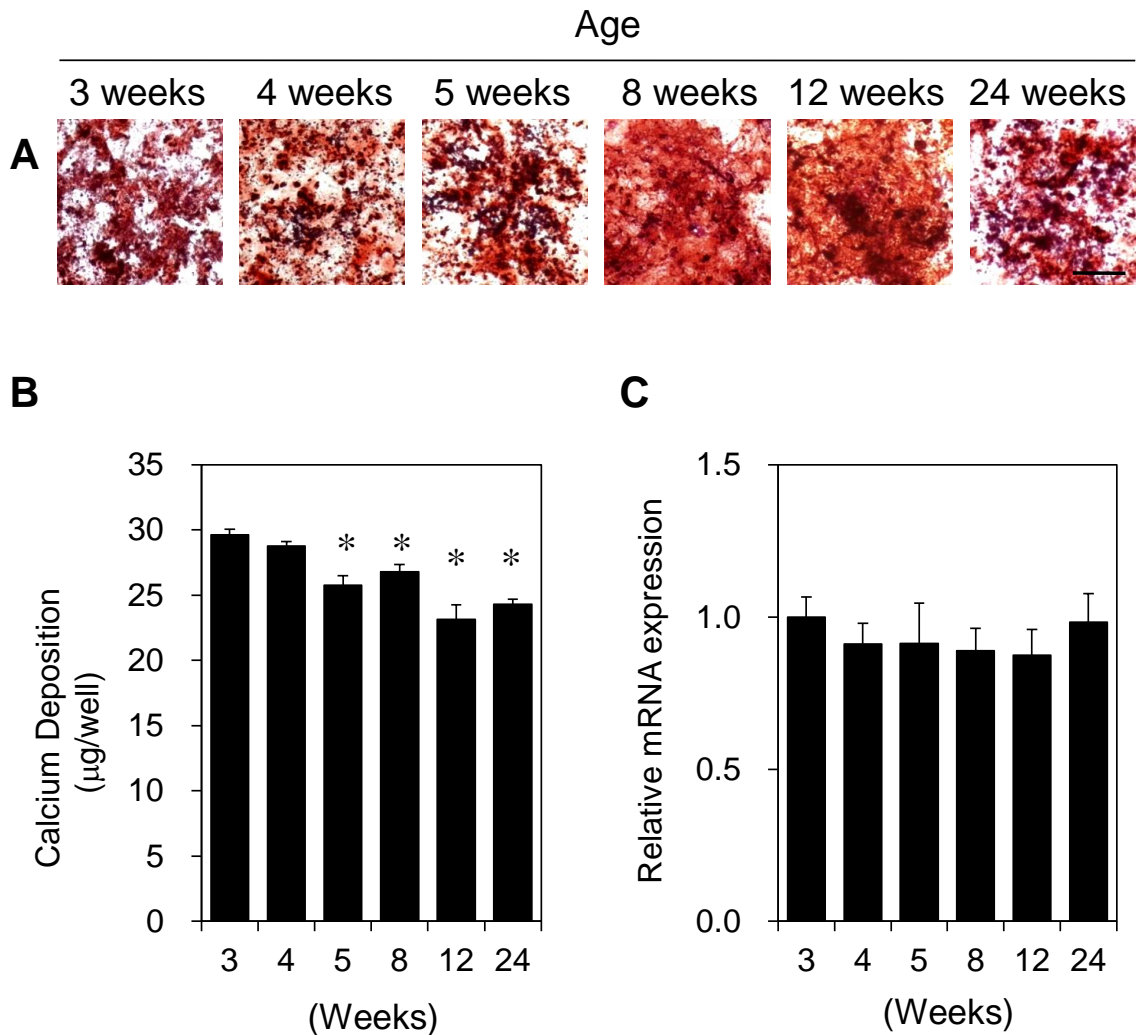


Fig. 5-9 加齢に伴うp75NTR陽性ASCの骨芽細胞への分化能の変化

(A) p75NTR陽性ASCを骨芽細胞へ分化誘導し、アリザリンレッドS染色を実施した (Scale bar = 200 µm)。

(B) 細胞表面に沈着しているカルシウムを溶出し、定量した (** $P < 0.01$)。

(C) 分化誘導後の細胞からtotal RNAを抽出し、リアルタイムPCRにより*Osteocalcin*の遺伝子発現を解析した (* $P < 0.01$)。

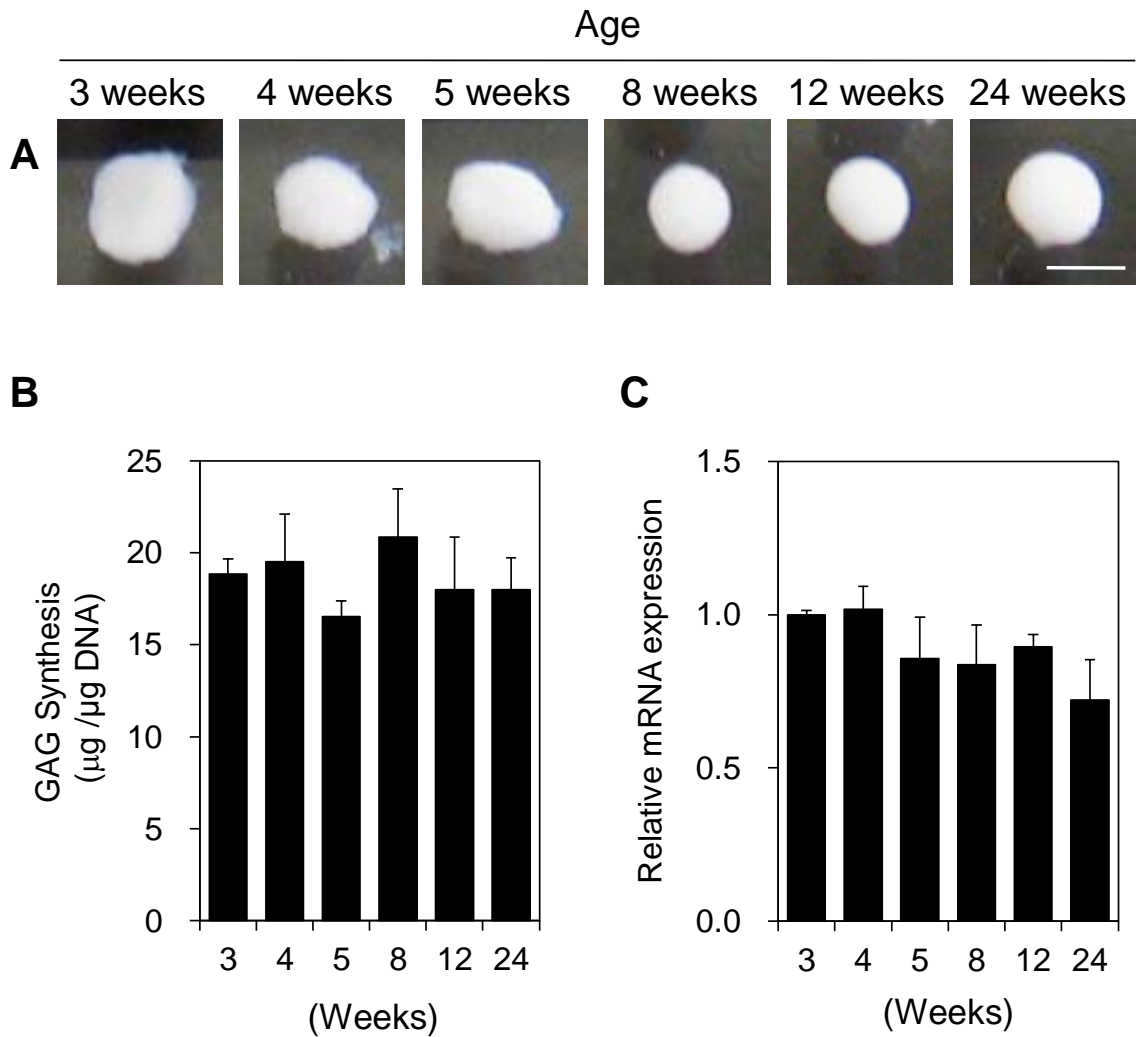


Fig. 5-10 加齢に伴うp75NTR陽性ASCの軟骨細胞への分化能の変化

(A) p75NTR陽性ASCを軟骨細胞へ分化誘導し、形態を観察した (Scale bar = 1 mm)。

(B) 軟骨細胞をProKに溶解し、グリコサミノグリカンを定量した。

(C) 分化誘導後の細胞からtotal RNAを抽出し、リアルタイムPCRによりII型コラーゲンの遺伝子発現を解析した。

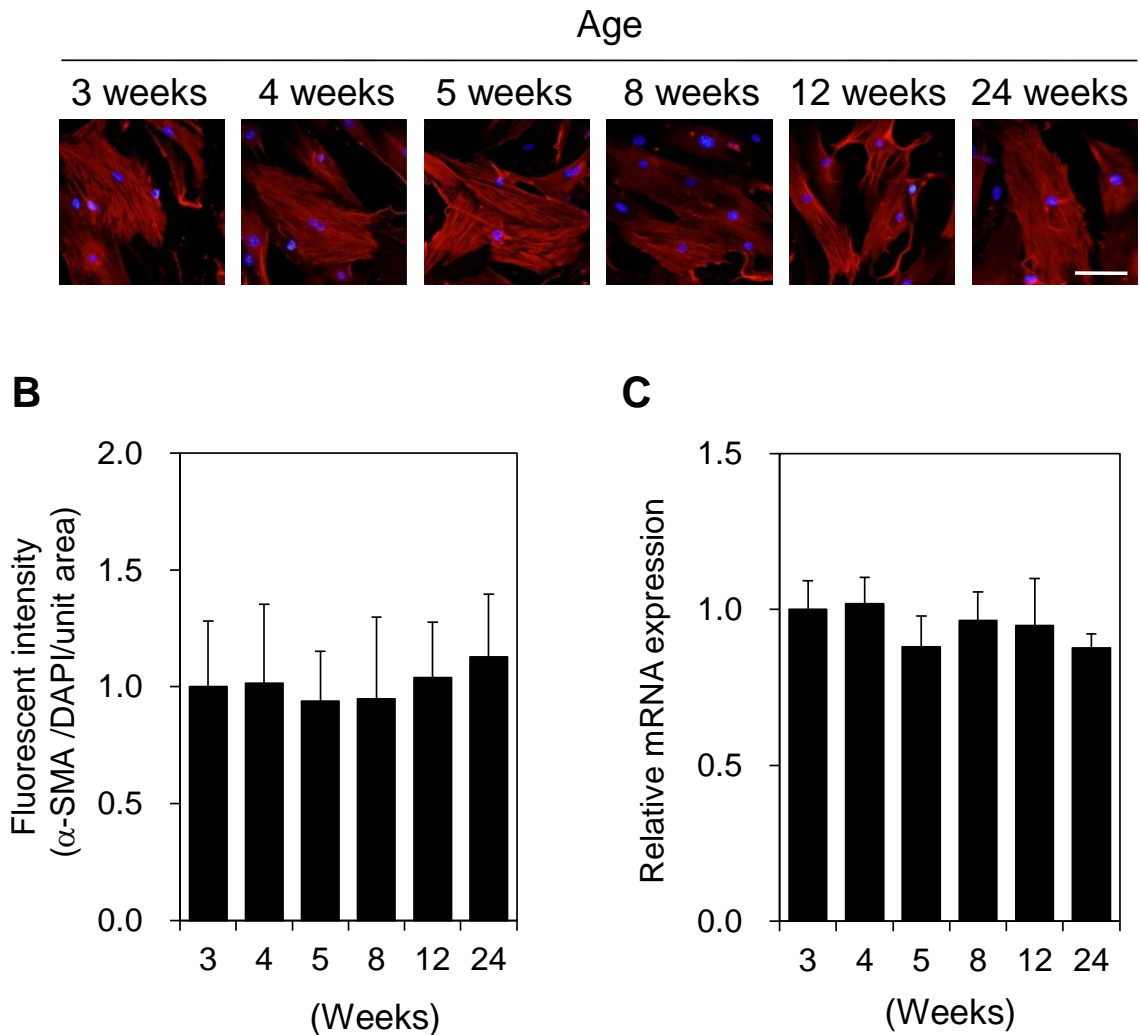


Fig. 5-11 加齢に伴うp75NTR陽性ASCの平滑筋細胞への分化能の変化

- (A) 分化誘導後の細胞について、 α SMAの免疫染色し、核はDAPI (青色) により染色した (Scale bar = 100 μ m)。
- (B) 免疫染色の結果をもとに、NIH imageにより、 α SMAの相対発現量を相対蛍光強度として計測した。
- (C) 分化誘導後の細胞からtotal RNAを抽出し、リアルタイムPCRにより α SMAの遺伝子発現を解析した。

第 6 章

総括

第6章

総括

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。中でも、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。このような色素異常症では、なんらかの要因によってメラニン合成を担うメラノサイトの機能が障害されていることが多い。脱色素斑の形成を特徴とする尋常性白斑では表皮に存在するメラノサイトの大部分が消失する。また、色素沈着斑の形成を特徴とする老人性色素斑ではメラノサイトの増加やメラニン合成の亢進が認められる。しかしながら、これらの色素異常症の発症メカニズムについては不明な点が多く、その解明とより効果の高い治療法の開発が望まれている。

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いる。メラノサイトの幹細胞についても、2002 年に毛包のバルジ領域に存在することが示され、色素幹細胞と名付けられた。色素幹細胞は、毛周期が休止期から成長期に移行する際にメラノサイトの前駆細胞であるメラノブラストを供給し、その後、毛球へ移動したメラノブラストがメラノサイトへ最終分化し、毛髪にメラニンを供給する。一方、基底層ケラチノサイトにおいてケラチン14プロモーター下で SCF を強制的に発現させたトランスジェニックマウスを用いて、色素幹細胞から表皮メラノサイトが供給されることが示された。これまでに、色素幹細胞が異所性にバルジ領域内で分化して消失してしまうことが、白髪化のメカニズムとして提唱されているが、表皮メラノサイトへの詳細な分化メカニズムや皮膚の色素沈着における色素幹細胞の関与については明らかになっていなかった。

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、組織再生ための幹細胞源として期待されている皮下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。

第2章では、色素幹細胞特異的に発現する表面マーカーの探索を行った。9日齢の C57BL/6 マウスの毛包を下から順に①毛球、②バルジ下、③バルジ、④バルジ上の4区画に分け、レーザーマイクロダイセクションにより採取して遺伝子発現を解析した。色素幹細胞が局在するバルジでは、古典的 Wnt シグナル経路の受容体である *Fzd4* 及び *Fzd7* がバルジ領域で高発現していた。また、免疫染色によりバルジ領域において *Fzd4* 及び *Fzd7* がタンパク質レベルで発現することを確認し、これらが色素幹細胞マーカーの候補として有力であると考えられた。生後1日齢の C57BL/6 マウスの表皮から基底細胞を分離し、メラノブラストマーカーである *Kit* と *Fzd4* または *Fzd7* の共染色を行い、フローサイトメーターによりそれぞれの発現パターンを解析した。色素幹細胞であると期待される *Fzd4*⁺/*Kit* 細胞は

2.1±1.1 %、Kit 陽性のメラノブラストは 2.4±0.6 %であった。また、同様に色素幹細胞であると期待される Fzd7⁺/Kit⁺細胞は 2.1±1.1 %であった。Fzd4⁺/Kit⁺細胞及び Fzd7⁺/Kit⁺細胞は、ほとんど検出されず、バルジ領域に存在する Fzd4 または Fzd7 陽性細胞は、メラノブラストとは異なることが示された。次に、Kit、Fzd4、Fzd7 陽性の細胞をフローサイトメーターにより分離し、*in vitro* でメラノサイトへと分化誘導した結果、Kit 陽性細胞が培養 7 日後にはメラニン合成するメラノサイトへ分化するのに対し、Fzd4 または Fzd7 陽性細胞は培養 14 日後からメラノサイトへ分化する様子が観察された。また、分化誘導過程において、メラニン合成関連遺伝子の発現を解析した。Kit 陽性細胞では、*Dct*、*Tyr*、*Tyrp1* の遺伝子発現はいずれも経時的に増加し、分化誘導 14 日後にプラトーに達した。一方、Fzd4 または Fzd7 陽性細胞では、Kit 陽性細胞に遅れてこれらの遺伝子発現が亢進した。以上の結果より、Fzd4 及び Fzd7 陽性細胞は、メラノブラストよりも未分化な色素細胞系譜であることが示された。また、バルジ領域に局在することから色素幹細胞であることが強く示唆され、Fzd4 及び Fzd7 は色素幹細胞特異的のマーカーとして有用であると考えられた。

第3章では、代表的な皮膚の色素沈着インデューサーである UVB による色素幹細胞の分化メカニズムの解析を行った。色素保有ヘアレスマウスである Hr-1 マウスと HR/De マウスの F1 マウスに UVB を照射すると、7 日後には表皮において Tyrp1 陽性及び Dopa 反応陽性のメラノサイトが増加し、14 日後に肉眼的に明らかな色素沈着を認めた。また、表皮においてメラノサイトの増加を認める前に、UVB 照射 3 日後をピークとして一過的に毛包内に Tyrp1 陽性のメラノブラストが出現することが示された。逆に、色素幹細胞の数は一過的に減少した。もともと表皮に存在する Kit 依存的に生存するメラノサイトやメラノブラストを抗 Kit 抗体を投与することにより枯渇させた場合においても、毛包内メラノブラストの出現や表皮メラノサイトの増加は抑制されなかった。これらの結果から、UVB はこれまで検討されてきたメラニン合成の亢進作用だけでなく、メラノサイト新生作用があることが明らかとなった。UVB 照射 1 日後には、全ての Wnt リガンドの中で *Wnt7a* の発現のみが顕著に亢進していた。*Wnt7a* の発現亢進は、毛包幹細胞、毛包ケラチノサイト、表皮ケラチノサイトのいずれにおいても認められ、UVB 照射に対して上皮系の細胞が同様の反応を示すことが明らかとなった。一方、色素幹細胞においては *Wnt7a* の発現は検出されなかった。また、毛包内において UVB 照射 3 日後をピークに核内にβ-カテニン陽性のメラノブラストが出現したことから、*Wnt7a* の一過的な発現が色素幹細胞からメラノブラストへの分化を誘導したと考えられた。*Wnt7a* に対する siRNA やβ-カテニンの阻害剤を投与することで、UVB 照射による毛包内メラノブラストの出現や表皮メラノサイトの増加が有意に抑制された。したがって、UVB 照射による表皮メラノサイトの供給源は、毛包内の色素幹細胞であり、UV は色素幹細胞の分化を誘導することが明らかになった。また、もともと表皮に存在したメラノブラストの関与については、抗 Kit 抗体処理によっても UVB 照射による表皮メラノサイトの増加は抑制されなかったことから、極めて部分的であると考えられた。初期継代の NHEM を *in vitro* 色素幹細胞モデルとして用いた場合も、UVB 照射によりケラチノサイトにおける *Wnt7a* の発現は亢進し、*Wnt7a* が色素幹細胞の分化を促進することが示された。あくまで *in vitro* の実験だが、ヒトにおいてもマウスと同様の色素幹細胞の分化メカニズムが存在することを示唆している。実際のヒトの皮膚における反応については、今後詳細に検討する必要がある。以上の結果より、UVB による色素沈着過程において、UVB 誘導性の *Wnt7a* の発現が色素幹細胞の分化の引き金となり、分化したメラノブラストが表皮へ移動してメラノサイトへ最終分化

することが、明らかとなった。これらのメカニズムに基づき、古典的 Wnt シグナル経路を制御する物質を外用剤などに応用することで、通院による紫外線照射治療や移植などの侵襲性の高い治療方法を回避できる新しい尋常性白斑の治療法開発に期待できる。

第4章では、老人性色素斑 (solar lentigo: SL) における色素細胞系譜 (色素幹細胞、メラノブラスト、メラノサイト) の局在や増殖能を中心に解析し、SLの発症メカニズムにおける色素幹細胞の関与を検討した。特に、SL病変部におけるメラニン量の増加がメラノサイトの数と個々のメラノサイトのメラニン合成能の違いのどちらによるものなのか、なぜメラノサイトの数が増加するのかといった点について解析した。健常部及びSL病変部の組織切片についてTYR及びMART-1の共染色を実施し、個々のメラノサイトにおけるメラニン合成能の指標としてMART-1に対するTyr発現量を評価した。その結果、SLにおいて個々のメラノサイトにおけるTYRの発現は高く、SL病変部のメラノサイトは高いメラニン合成能を有することが示された。さらに、表皮におけるTYR⁺/MART-1⁺細胞の数はSL病変部で有意に多かった。ただし、表皮におけるメラノサイトは細胞増殖マーカーであるKi67陰性であり、増殖性には差がないことが示された。したがって、より前の分化段階が関与していると考えられ、毛包におけるメラノサイト、メラノブラスト、色素幹細胞の数及び増殖能を解析した。SLにおいて、毛漏斗上部に存在するTYR⁺/MART-1⁺メラノサイト、毛漏斗下部に存在するTYR⁻/MART-1⁺メラノブラストの数は増加していた。しかし、Ki67陽性細胞の割合は少なく、表皮同様ほとんど検出されなかった。バルジ領域に存在するFZD4⁺/MITF⁺の色素幹細胞の数もSL病変部で有意に高いことが示された。ただし、色素幹細胞においてもKi67陽性細胞はほとんど検出されなかった。以上の結果取より、なんらかの要因によって生じた色素幹細胞の増加が、SLにおける表皮メラノサイトの増加につながると考えられた。

第5章では、再生医療への応用が期待される皮下脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) の加齢に伴う能力の変化について検討した。3~24週齢のICRマウスの鼠径部の皮下脂肪組織に存在するp75NTR陽性細胞の数を免疫染色により検討したところ、加齢に伴い有意に減少していた。皮下脂肪組織を酵素処理し遠心すると、成熟した脂肪細胞を含まない間質血管細胞群 (stromal vascular fraction; SVF) と呼ばれる未分化な細胞集団を得ることができる。p75NTR陽性ASCのSVFに含まれる割合をフローサイトメーターにより解析すると、こちらも加齢に伴い有意に減少していた。また、3~24週齢のマウスより分離したp75NTR陽性ASCのシャーレへの接着率及び接着因子は、加齢に伴い減少した。しかしながら、細胞増殖や細胞老化マーカーであるSA-βgal染色を用いた結果、週齢間で有意な差を認めなかった。脂肪細胞及び骨芽細胞への分化能に関しては、加齢に伴い低下したものの、ある程度は維持されていることが示された。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おり、再生医療分野における細胞の供給源として高齢者でも応用可能であると考えられた。

本研究において、色素幹細胞特異的マーカーを同定し、これを利用することでUVB照射による色素沈着過程や老人性色素斑における色素幹細胞の関与を明らかにすることができた。また、加齢に伴いp75NTR陽性ASCの数は減少するものの、一定の増殖能及び多分化能を有していることが明らかになった。ASCはメラノサイトへの分化能を有しているため、幅広い年齢の色素異常症患者に対し、

ASC を用いた皮膚の色素再生が可能であることを示唆する。今後、これらの知見をもとにさらに広範かつ詳細な解析が進むことで、皮膚の再生医療の実現化に貢献することを期待したい。

実験の部

1. 試薬及び使用機器

本研究においては、試薬は全て特級以上のものを使用し、水は全て超純水(MilliQ)を使用した。主な試薬については、本文中または以下に示した。なお、特に記載がないものは、和光純薬工業製の試薬を用いた。

1-1. 試薬類

6BIO	Enzo Life Science
Ascorbic acid 2-phosphate	Sigma-Aldrich
Biotin	Sigma-Aldrich
BMP-2	PeproTech
bFGF	PeproTech
DAPI	Roche Applied Science
dbcAMP	Sigma-Aldrich
Dexamethasone	Sigma-Aldrich
DMEM	Sigma-Aldrich
DMEM/F-12	Life Technologies
β -glycerophosphate	Sigma-Aldrich
L-Dopa	Sigma-Aldrich
EDTA	同仁化学
FBS	ニチレイバイオサイエンス
in vivo jetPEI	PolyPlus-transfection
Indomethacin	Sigma-Aldrich
Insulin solution	Sigma-Aldrich
3-isobutyl-1-methylxanthine	Sigma-Aldrich
ITS-X supplement	Life Technologies
ITS+1 liquid	Sigma-Aldrich
IWR-1	Sigma-Aldrich
Lipofectamine RNAiMAX	Life Technologies
α MEM	Life Technologies
MCDB201	Sigma-Aldrich
Normal donkey serum	Abcam
Opti-MEM	Life Technologies
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich
PDGF-BB	PeproTech
SCF	ATGen

Silver nitrate	Sigma-Aldrich
TGF-β1	PeprTech
TGF-β3	PeprTech
Trypsin	BD Bioscience
WNT7A	PeprTech

1-2. 抗体関連

・一次抗体

抗 Dct 抗体	Santa Cruz Biotechnologiy
抗 Tyrp1 抗体	Santa Cruz Biotechnologiy
抗 Frizzled-4 抗体	R&D systems
抗 Frizzled-4 抗体	Millipore
抗 Frizzled-7 抗体	R&D systems
抗 Tyrosinase 抗体	Theromo Scientific
抗 MITF 抗体	Theromo Scientific
抗 MART-1 抗体	Theromo Scientific
抗 Ki67 抗体	Theromo Scientific
抗β-catenin 抗体	Cell Signaling Technology
抗 Kit 抗体	Biologend
抗αSMA 抗体	Abcam
抗 p75NTR 抗体	Millipore

・二次抗体

HRP 標識二次抗体	Jackson ImmunoReseach
AlexaFluor®488 標識抗ウサギ抗体	
AlexaFluor®488 標識抗マウス抗体	
AlexaFluor®488 標識抗ヤギ抗体	
AlexaFluor®488 標識抗ラット抗体	
AlexaFluor®594 標識抗ウサギ抗体	
AlexaFluor®594 標識抗マウス抗体	
AlexaFluor®594 標識抗ヤギ抗体	
AlexaFluor®594 標識抗ラット抗体	

全て Life Technologies

1-3. 機器類

冷却遠心機	KUBOTA3700
冷却遠心機	KUBOTA6200
恒温槽	ThermoMAX TM-2 (AS ONE)

蛍光顕微鏡	OLYMPUS IX71
倒立位相差顕微鏡	OLYMPUS CKX41
正立顕微鏡	OLYMPUS BX51
サーマルサイクラー	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
フローサイトメーター	BD FACSAria
pH メーター	堀場製作所 F-12
吸光マイクロプレートリーダー	Molecular Device VersaMax tunable
蛍光マイクロプレートリーダー	Molecular Device SpectraMax Gemini
CO ₂ インキュベーター	SANYO
安全キャビネット	AIRTEC BHC-1306
オートクレーブ装置	HIRAYAMA HICLAVE HG-50
レーザーマイクロダイセクション	Leica Microsystems LMD-6000
リアルタイム PCR 装置	Applied Biosystems StepOne Plus Realt-time PCR system
リアルタイム PCR 装置	Applied Biosystems StepOne 7300 Realt-time PCR system
吸光度計	NanoDrop ND-1000
ソニケーター	SONICS Vibra Cell
バキュームロータリー	サクラファインテック VRX-23
マイクローム	サクラファインテック Crosstome
クライオスタット	Carl Zeiss MICROM HM520
パラフィン包埋機	サクラファインテック ディスペンシングコンソール 5242
UVB ランプ	Toshiba FL-20 SE fluorescent lamp

2. 基本実験

2-1. 基本操作

2-2-1. 皮膚組織切片の染色

新鮮凍結切片の作製

〈準備〉

- ・ドライアイス
- ・OCT コンパウンド (サクラファインテック)
- ・包埋皿ティッシュテッククリオモルドスタンダード (サクラファインテック)
- ・シランコーティングスライドガラス (Dako)
- ・フィルム付きスライドガラス (Leica Microsystems)
- ・ドライヤー

〈操作〉

- ① 包埋皿に OCT コンパウンドを満たし、氷上に置いた。
- ② マウスを安楽死させた後、背部皮膚組織を眼科剪刀にて 1 cm×5 mm の大きさを採取した。
- ③ 包埋皿をドライアイスの上に移動し、速やかに採取した皮膚組織を包埋皿の中に入れた。
- ④ OCT コンパウンドが凍結したら、切片を作製するまで-80℃に保存した。
- ⑤ OCT コンパウンドを少量添加したクライオスタットのホルダーに皮膚組織の入った包埋皿をセットし、皮膚組織を OCT コンパウンドごとホルダーに接着させた。
- ⑥ 包埋皿を除去し、ホルダーを-20℃に設定したクライオスタットにセットし、10 μm の厚さで組織を薄切した。
- ⑦ 薄切した組織をシランコーティングスライドガラスまたはレーザーマイクロダイセクション用のフィルム付きスライドガラスに密着させ、ドライヤーで乾燥させた後、-80℃で保存した。

パラフィン包埋切片の作製

〈準備〉

- ・4%パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液
- ・ユニ・カセット (サクラファインテック)
- ・包埋皿
- ・キシレン
- ・エタノール
- ・パラフィン

〈操作〉

- ① マウスを安楽死させた後、背部皮膚組織を眼科剪刀にて 5 cm×3 cm の大きさを採取した。
- ② 採取した皮膚組織を濾紙に貼り付け、4% PFA 溶液に浸し、4℃にて 24 時間静置した。

- ③ 固定した皮膚組織を PBS で洗浄し、3 mm×5 mm の大きさに成形し、ユニ・カセットに入れてバキュームロータリーにセットした。
- ④ 2 時間ごとに、エタノール×4、キシレン×4、パラフィン×2 に浸漬した。
- ⑤ 包埋器の上で、包埋皿にパラフィンを満たし、皮膚組織を包埋皿の底に立てて包埋した。
- ⑥ 包埋したブロックは、4℃で保存した。
- ⑦ 包埋したブロックをミクロトームにセットし、4 μm の厚さで組織を薄切した。
- ⑧ 薄切した組織を水上でシランコーティングスライドガラスに乗せた後、50℃に設定したウォーターバスの中でしっかりと伸ばし、水気を切って 40℃に設定した伸展器の上で一晩静置した。

HE 染色(ヘマトキシリン・エオジン染色)

〈準備〉

- ・キシレン
- ・エタノール
- ・染色バット
- ・染色カゴ
- ・マイヤーヘマトキシリン (サクラファインテックジャパン)
- ・エオジン (サクラファインテックジャパン)
- ・エンテランニュー

〈操作〉

- ① パラフィン包埋切片をキシレン×4、エタノール×4、60 %エタノールに 5 分間ずつ浸漬した後(脱パラ処理)、流水で洗浄した。
- ② ヘマトキシリン溶液に 5 分間浸した後、10 分間流水洗浄した。
- ③ エオジン溶液に 3 分間浸した後、軽く水洗した。
- ④ 70 %エタノール×1 回、90 %エタノール×1 回、100%×3 回、キシレン×3 回の順に浸し、脱水した。
- ⑤ エンテランニューを用いてサンプルを封入した。

フォンタナ・マッソン染色

〈準備〉

- ・アンモニア銀液

10 %硝酸銀水溶液 10 mL 中にアンモニア水を滴下し、攪拌しながら黒色の沈殿を溶解させる。10 %硝酸銀水溶液を滴下し、白濁したところで水超純にて 100 mL にメスアップする。

- ・0.25 %チオ硫酸ナトリウム水溶液
- ・ケルンエヒトロート液

ケルンエヒトロート 0.1 g、硫酸アルミニウム 5g を超純水 100 mL に加温溶解する。冷却後、濾過して使用する。

〈操作〉

- ① パラフィン包埋切片を脱パラ処理後、流水洗浄した。
- ② アンモニア銀液に浸し、暗所にて一晩静置した。
- ③ 蒸留水にて洗浄後、0.25 % チオ硫酸ナトリウム水溶液に 1 分間浸漬した。
- ④ 蒸留水にて洗浄後、ケルンエヒロート液に 5 分間浸漬した。
- ⑥ 水洗し、70 % エタノール×1 回、90 % エタノール×1 回、100%×3 回、キシレン×3 回の順に浸し、脱水した。
- ⑦ エンテランニューを用いてサンプルを封入した。

免疫染色(蛍光抗体法)

〈準備〉

・ブロッキング溶液

PBS (-) に BSA を 0.5 %、normal donkey serum を 5 % となるように添加した。

・一次抗体

・AlexaFluor 標識二次抗体

・DAPI 溶液 (1 mg/mL 水溶液)

・湿潤箱

・Fluorescence Mounting Medium (DAKO)

〈操作〉

- ① -80℃に保存しておいた新鮮凍結切片を取り出し、アセトン固定した (10 分間、-20℃)。
- ② PBS (-) に浸した後、ブロッキング溶液を組織の上に滴下し、湿潤箱中でインキュベートした (1 時間、37℃)。
- ③ ブロッキング溶液に適切な倍率に希釈した一次抗体を組織に滴下し、インキュベートした (一晩、4℃)。
- ④ PBS (-) で洗浄し、ブロッキング溶液に適切な倍率に希釈した二次抗体を組織に滴下し、インキュベートした (1 時間、室温)。
- ⑤ DAPI 溶液を上から添加し、インキュベートした (5 分間、室温)。
- ⑥ PBS (-) で洗浄し、Fluorescence Mounting Medium で封入した。

免疫染色(酵素抗体法)

〈準備〉

・3 % 過酸化水素水

・ブロッキング溶液

PBS (-) に BSA を 0.5 %、normal donkey serum を 5 % となるように添加した。

・一次抗体

・HRP 標識二次抗体 (Jackson ImmunoResearch)

・シンプルステイン DAB 溶液 (ニチレイバイオサイエンス)

- ・湿潤箱
- ・エンテランニュー

〈操作〉

- ① -80°C に保存しておいた新鮮凍結切片を取り出し、アセトン固定した (10 分間、 -20°C)。
- ② PBS (-) に浸した後、3 % 過酸化水素水に浸した (3 分間、室温)。
- ③ ブロッキング溶液を組織の上に滴下し、湿潤箱中でインキュベートした (1 時間、 37°C)。
- ④ ブロッキング溶液に適切な倍率に希釈した一次抗体を組織に滴下し、インキュベートした (一晩、 4°C)。
- ⑤ PBS (-) で洗浄し、ブロッキング溶液に適切な倍率に希釈した二次抗体を組織に滴下し、インキュベートした (1 時間、室温)。
- ⑥ シンプルステイン DAB 溶液を添加し、インキュベートした (5~10 分間、室温)。
- ⑦ PBS (-) で洗浄し、脱水後、エンテランニューで封入した。

2-2-2. フローサイトメーターによる細胞の解析及び分離

細胞の標識

〈準備〉

- ・PBS (-)
- ・一次抗体
- ・AlexaFluor 標識二次抗体 (Life Technologies)
- ・抗体反応溶液
フェノールレッド不含 DMEM/F-12 (Life Technologies) に 5 % となるように FBS (ニチレイバイオサイエンス) を添加した。
- ・セルストレーナー 5 mL チューブ

〈操作〉

- ① 組織から分離した細胞を 15 mL チューブに移し、PBS (-) 10~15 mL に懸濁して遠心した (1,500 rpm、5 分、 4°C)。
- ② 上清を除去し、適切な倍率になるように一次抗体を添加した抗体反応溶液 1 mL に細胞を懸濁した。
- ③ 5~10 分間毎にタッピングして細胞を懸濁しながら、氷中にて 30 分間インキュベートした。
- ④ PBS (-) 14 mL を加え、細胞をよく懸濁して遠心した (1,500 rpm、5 分、 4°C)。
- ⑤ 上清を除去し、PBS (-) 15 mL を加え、細胞をよく懸濁して遠心した (1,500 rpm、5 分、 4°C)。
- ⑥ 上清を除去し、1,000 倍になるように二次抗体を添加した抗体反応溶液 1 mL に細胞を懸濁した。
- ⑦ 5~10 分間毎にタッピングして細胞を懸濁しながら、氷中にて 30 分間インキュベートした。
- ⑧ PBS (-) 14 mL を加え、細胞をよく懸濁して遠心した (1,500 rpm、5 分、 4°C)。
- ⑨ 上清を除去し、PBS (-) 15 mL を加え、細胞をよく懸濁して遠心した (1,500 rpm、5 分、 4°C)。
- ⑩ 上清を除去して PBS (-) 0.5 mL に細胞を懸濁し、セルストレーナー 5 mL チューブに細胞を濾過し

ながら移してフローサイトメーターに用いた。

フローサイトメーターによる解析及び分離

〈準備〉

- Accudrop beads (BD Bioscience)

〈操作〉

- ① FACS Aria のソートブロックの蓋を開き、メイン電源を ON にし、続いてレーザーの電源を ON にした。
- ② 5 分後、コンピューターの電源を ON にする。
- ③ 流路がつまっていないことを確認し、Prime after tank refill を行った後、フィルター内の気泡を除いた。
- ④ Startup を行い、ノズルを外して、ソニケーターで洗浄した。
- ⑤ ノズルに O リングをのせ、ソートブロックにセットした。
- ⑥ 液滴が適切に形成されていることを確認し、サンプルをセットして解析した。
- ⑦ 細胞を分離する場合は、Accudrop beads を用いて drop delay を設定した後、サンプルをセットして解析した。
- ⑧ 分離する細胞数及びゲートを設定し、電極に電圧をかけて目的の細胞を分離した。

2-2-3. リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析

Total RNA の抽出

〈準備〉

- TRIzol (Invitrogen)
- クロロホルム
- 2-プロパノール
- 70 % エタノール
- RNase-free 水

〈操作〉

- ① 細胞を冷 PBS (-) で洗浄した後、TRIzol 1mL に溶解し、1.5 mL チューブに回収してボルテックスした。組織の場合は TRIzol の入った 1.5 mL チューブ内で 3 秒×回ソニケーションを行った。
- ② クロロホルム 0.2mL を添加し、15 秒間ボルテックスした。
- ③ 5 分間静置した後、遠心した (12,000 rpm、15 分間、4°C)。
- ④ 上層を新しい 1.5 mL チューブに移し、等量の 2-プロパノールを添加し、転倒混和した。
- ⑤ 5 分間静置した後、遠心した (12,000 rpm、10 分間、4°C)。
- ⑥ 上清を除き、70 % エタノールを 1 mL 加え、遠心した (12,000 rpm、5 分間、4°C)。
- ⑦ 上清を除き、ペレットを風乾した後、RNase-free 水に溶解した。

逆転写反応による cDNA の合成

〈準備〉

- RNase-free 水
- SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

〈操作〉

- ① RNase-free 水に溶解した total RNA の濃度を NanoDrop により定量した。
- ② 200 μL チューブに、以下に示すように SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR に付属の試薬を用いて反応溶液を調製した。

2×RT Reaction Mix	5 μL
RT Enzyme Mix	2 μL
total RNA	500 ng
RNase-free 水	全量が 10 μL になるように調整

- ③ チューブをサーマルサイクラーにセットし、(1) 25°C、10 分、(2) 42°C、50 分、(3) 85°C、5 分、の順でインキュベートした後、氷冷した。
- ④ 0.5 μL の *E. Coli* RNaseH を添加し、37°C、20 分インキュベートした。
- ⑤ 合成した cDNA 溶液は水で 5 倍希釈してリアルタイム PCR に用いた。

リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

〈準備〉

- SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green qPCR Kit with SYBR® Green (Invitrogen)
- プライマー (10 μM 、Forward 及び Reverse)

〈操作〉

- ① 1 反応当たり以下に示すように SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green qPCR Kit with SYBR® Green に付属の試薬を用いて反応溶液を調整した。

Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	5.0 μL
ROX reference dye	0.2 μL
プライマー (Forward)	0.1 μL
プライマー (Reverse)	0.1 μL
cDNA	2.0 μL
水	2.6 μL

- ② 96 ウェルプレートに反応液を分注し、以下に示すようにリアルタイム PCR を行った。
50°C、2 分
95°C、2 分
95°C、15 秒→60°C、31 秒 (50 サイクル)

- ③ 得られた Ct 値をもとに、Gapdh または 18s rRNA をもとに $\Delta\Delta$ Ct 法により相対遺伝子発現量を算出した。

マウスプライマー配列

Gene Symbol	Forward		Reverse	
	(5'-	-3')	(5'-	-3')
<i>Typ1</i>	CAACGCTATGCTGAGACTATGA		GCGGCTATCAGACCATGGA	
<i>Dct</i>	CCGGCCCCGACTGTAATC		GGGCAGTCAGGGAATGGATAT	
<i>Tyr</i>	ACGACCTCTTTGTATGGATGCA		TTTCAGAGCCCCAAGCA	
<i>Mif-m</i>	TGCCCTGTTTTATGGTGCCTTCT		TCCCTCTACTTTCTGTAATTCCAATTC	
<i>Pax3</i>	TCGGCCTTGCGTCATTTTC		CAGGATCTTAGAGACGCAACCA	
<i>Si</i>	CCCTTGCTCAGCCAGTT		CACACTCAGGAGAAAGGTACCT	
<i>P</i>	ATGCGCCTAGAGAACAAGAC		TAGCAGGTTTGACGGTCAGC	
<i>Fzd1</i>	CGTTTATCTGTTTCATTGGCACTTCT		CGGATGCGGAAGAGTGACA	
<i>Fzd2</i>	CGCCGCTCTTCGTATACCTGTT		CGGATGCGGAAGAGTGACA	
<i>Fzd3</i>	ATGCTTTGAATGGCCAGTTT		CCGGCTCTCATTCACTATCTCTTT	
<i>Fzd4</i>	TGGTCTGCCAAAACCTTTCACA		TACCTTCCCAGAATTCACCAATC	
<i>Fzd5</i>	CCTGAACCTACTACGAGGCTTTG		CGGATGCGGAAGAGTGACA	
<i>Fzd6</i>	TCCTCTTAGCCGGCATCATC		TCCGGCCATCATGCTGTAT	
<i>Fzd7</i>	CTTCATCGGGACGTCCCTTCT		TGCGGATGCGAAAGAGAGA	
<i>Fzd8</i>	AGCAGCAAGGAGGTCCAACAAAG		AGAGGCCCAAGCGGATCAT	
<i>Fzd9</i>	CAGGAGGGTCTGGAACACACA		AGCTGGCCATCCGAAAT	
<i>Fzd10</i>	TCTGGTCCGTGCTGTGCTT		GCATGGGTGATGAGGAA	
<i>Lrp5</i>	CCCCTCAGGGGTGTCAA		TGCTCCACTGAGCTCCCAT	
<i>Lrp6</i>	TGGCTTGGCGGTGTGAT		CACACGGGACAATTGAGTTCA	
<i>Ryk</i>	CGAATAGCCAGCCAATCA		CCAGCAACAGGCCATCACA	
<i>Ror2</i>	GCTTGTGCGCGCTTCAT		TCAATCTCCCCCTGCATCTG	
<i>Kremen1</i>	GGAGAGACCTGCTGTCAACCA		TGACTGAGGTTGGCTTGCT	
<i>Kremen2</i>	CGATAGGTGCCCGAGCTTCT		GCAGTAGGGACAGGAGCAACA	
<i>Rpl23</i>	CAAGGGACGGCTGAACAGACT		CTTAACTGTGGCCATCACCATGT	
<i>Wnt1</i>	AGCGTTTCATCTTCGCAATCA		AAATCGATGTTGTCAGTGCAGC	
<i>Wnt2</i>	CTGGCTCTGGCTCCCTCTG		GGAAGTGGTGTGGCACTCTG	
<i>Wnt2b</i>	CGTTCGTCTATGCTATCTCGTCA		ACACCGTAATGGATGTTGCACTAC	
<i>Wnt3</i>	CAAGCACAACAATGAAGCAGGC		TCGGGACTCACGGTGTTCCTC	
<i>Wnt3a</i>	CACCACCCTCAGCAACAGCC		AGGAGCGTGTCACTGCGAAAG	
<i>Wnt4</i>	CTGGAGAAGTGTGGCTGTGA		GGAGCTCCACAAGGACTGT	
<i>Wnt5a</i>	GGCATCAAGGAATGCCAGTA		GTACGTGAAGCCCGTCTCTC	
<i>Wnt5b</i>	ATGCCCGAGAGCGTGAGAAG		ACATTTGCAGGCGACATCAGC	
<i>Wnt6</i>	TGCCCGAGGCGCAAGACTG		ATTGCAACACGAAAGCTGTCTCTC	
<i>Wnt7a</i>	CGACTGTGGCTGCGACAAG		CTTCATGTTCTCCTCCAGGATCTTC	
<i>Wnt7b</i>	TCTCTGCTTTGGCTCCTCTAC		GCCAGGCCAGGAATCTTGTG	
<i>Wnt8a</i>	ACGGTGGAAATGCTTGAGCATG		GATGGCAGCAGAGCGGATGG	
<i>Wnt8b</i>	TCCAAGGCTTACCTGGTCTACTC		CAGAGCTGATGGCTGCACA	
<i>Wnt9a</i>	GCAGCAAGTTTGTCAAGGATTC		GCAGGAGCCAGACACCATG	
<i>Wnt9b</i>	AAGTACAGCACCAGTTCTCAGC		GAACAGCACAGGAGCCTGACAC	
<i>Wnt10a</i>	CCTGTTCTTCTACTGCTGCTGG		CGATCTGGATGCCCTGGATAGC	
<i>Wnt10b</i>	TTCTCTCGGATTTCTTGATTC		TGCATCTCCGTTCCAGGTTTTC	
<i>Wnt11</i>	CTGAATCAGACGCAACACTGTAAAC		CTCTCTCCAGGTCAAGCAGGTAG	
<i>Wnt16</i>	AGTAGCGGCACCAAGGAGAC		GAAACTTTCTGCTGAACCACATGC	
<i>Itgb1</i>	CTGATTGGCTGGAGGAATGT		TGAGCAATTGAAGGATAATCATAG	
<i>Itga2</i>	CCCACAAGGCAACTGGCTAC		ACATCTCCATTCCGGTTCAG	
<i>Itgav</i>	TGGTGTGGATCGAGCTGTCTT		CACCTTCAAGGCCAGCATTTACA	
<i>Itgb3</i>	CCTCTCAGATGCGCAAGCTTA		TCCACGAAGGCCCCAAA	
<i>Acta2</i>	TCTCTCCAGCCATCTTTCATTG		TGATGCTGTTATAGGTGGTTTCGT	
<i>Bglap1</i>	CGGCCCTGAGTCTGACAAA		CCGGAGTCTGTTCACTACCTT	
<i>Pparg</i>	TCACAAGAGCTGACCAATGG		GATCGCACTTTGGTATTCTTGGA	
<i>Col2a1</i>	GAGCAGCAAGAGCAAGGAAAA		TCGCCATAGCTGAAGTGAA	
<i>Gapdh</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC		TCTTCTGGGTGGCAGTGATG	

ヒトプライマー配列

Gene Symbol	Forward		Reverse	
	(5'-	-3')	(5'-	-3')
18s rRNA	CCGAGCCGCTGGATAC		CAGTTCGAAAACCAACAAATAGA	
WNT7A	TCAGTTTCAGTTCCGCAATGG		CTTTGAGCTCCTCCCGAAGA	
DCT	GGAATGCTTTGGAAGGTTTG		AAAGCGTTTGTCCCGTTACG	

3. 第二章における実験操作

3-1. レーザーマイクロダイセクション

〈準備〉

- エタノール
- RNase-free 水
- トルイジンブルー溶液
- 0.5 mL チューブ
- RNeasy Micro Kit (QIAGEN)

〈操作〉

- ① フィルム付きスライドガラスを用いて作製した新鮮凍結切片を解凍した (20 秒間、室温)。
- ② 75 %エタノール (30 秒間)、水 (30 秒間)、トルイジンブルー溶液 (1 分間)、水 (30 秒間)、75 %エタノール (30 秒間)、95 %エタノール (30 秒間)、10 %エタノール (30 秒間) の順に浸漬した。
- ③ 10 分間風乾し、レーザーマイクロダイセクションサンプルとした。
- ④ RNeasy Micro Kit に付属の Buffer RLT 65 μ L を 0.5 mL チューブの蓋に添加し、チューブをレーザーマイクロダイセクション装置にセットした。
- ⑤ トルイジンブルー染色したスライドガラスをレーザーマイクロダイセクション装置にセットし、キャリブレーション後、任意の部位を採取した。
- ⑥ 採取したサンプルから、RNeasy Micro Kit を用いて RNA を抽出し、リアルタイム PCR 用サンプルとした。

3-2. 細胞培養

〈準備〉

- IV型コラーゲン (新田ゼラチン)
- 分化誘導培地
10 %FBS、50 ng/mL SCF、100 ng/mL EDN3、0.5 mM DBcAMP 含有 α MEM

〈操作〉

- ① 48 ウェルプレートにIV型コラーゲンをコートした (1~2 時間、37°C)。
- ② Kit 陽性細胞、Fzd4 陽性細胞、Fzd7 陽性細胞をそれぞれフローサイトメーターにより分離した。
- ③ 分離した細胞を 1×10^4 cells/well となるように分化誘導培地に懸濁して播種した。
- ④ 2~3 日ごとに新しい培地に交換し、3 週間後まで培養を継続した。

4. 第三章における実験操作

4-1. UVB 照射

〈準備〉

- ネンブタール

5 g のペントバルビタール (東京化成) を 40 mL の水に溶解し、10.5 mL のプロピレングリコール、10.5 mL のエタノールを加え、pH を 9.0~9.5 に調整した。マウスに投与する際は、生理食塩水で 10 倍に希釈した。

・UV メーター (DERMARAY UV-METER、TERUMO)

〈操作〉

- ① 7 週齢の HR-1 と HR/De マウスの F1 マウスの腹腔内に、ネンブタールを 10 mL/kg となるように投与し麻酔した。
- ② UV 測定器により、FL-20 SE fluorescent lamp の照射強度を測定し、照射量が 100 mJ/cm² となる時間を算出した。
- ③ マウスの背部に②で算出した時間 UVB を照射した。
- ④ ①~③を週に 3 回、1 日おき (月、水、金曜日) に実施した。

4-2. 表皮シートの DOPA 染色

〈準備〉

・2 M NaBr 水溶液

・0.1 % DOPA 溶液

L-DOPA を 0.1 % となるように PBS (-) に溶解した (用事調整)。

・エタノール

・キシレン

〈操作〉

- ① マウスを安楽死させた後、背部皮膚組織を採取した。
- ② 5 mm×5 mm の大きさの皮膚組織を 2 M NaBr 水溶液に浮かべインキュベートした (37°C、2 時間)。
- ③ ピンセットを用いて皮膚組織から表皮を剥離し、表皮シートを得た。
- ④ 0.1 % DOPA 溶液に表皮シートを基底層側が下になるように浮かべ、インキュベートした (37°C、2 時間)。
- ⑤ 70 %エタノール、100%エタノール、キシレンの順に浸し、エンテランニューで封入した。
- ⑥ 免疫染色を行う場合は、③で得られた表皮シートをアセトン固定し (5 分間、-20°C)、新鮮凍結切片と同様の手順で染色した。

4-3. 増感法による免疫染色

〈準備〉

・一次抗体

・AlexaFluor 標識二次抗体 (Life Technologies)

・HRP 標識二次抗体 (Jackson ImmunoResearch)

・TSATM キット (Life Technologies)

- DAPI 溶液
- 湿潤箱
- Fluorescence Mounting Medium (DAKO)

〈操作〉

- ⑦ -80°C に保存しておいた新鮮凍結切片を取り出し、アセトン固定した (10 分間、 -20°C)。
- ⑧ PBS (-) に浸した後、TSA™ キットに付属のブロッキング溶液を組織の上に滴下し、湿潤箱中でインキュベートした (1 時間、 37°C)。
- ⑨ ブロッキング溶液に適切な倍率に希釈した一次抗体を組織に滴下し、インキュベートした (一晩、 4°C)。
- ⑩ PBS (-) で洗浄し、ブロッキング溶液に適切な倍率に希釈した AlexaFluor®594 標識二次抗体及び HRP 標識二次抗体を組織に滴下し、インキュベートした (1 時間、室温)。この時、増感して検出したい抗原に対する一次抗体に対し、HRP 標識二次抗体を反応させた。
- ⑪ TSA™ キットに付属の amplification buffer に AlexaFluor®488 標識 tyramide を組織に滴下し、インキュベートした (5 分間、室温)。
- ⑫ DAPI 溶液を上から添加し、インキュベートした (5 分間、室温)。
- ⑬ PBS (-) で洗浄し、Fluorescence Mounting Medium で封入した。

4-4. マウス背部への皮内投与

〈準備〉

- 中和用抗 c-kit 抗体 (ACK2, Biolegend)
- IWR-1 溶液

10 mM となるように IWR-1 を DMSO に溶解し、ストック溶液とした。使用直前に PBS (-) に 0.1 mM となるように希釈した。

- siRNA 溶液

Wnt7a に対する 3 種類の Stealth siRNA (oligo ID: MSS238710、MSS238711、MSS278848、Life Technologies) のまたはネガティブコントロール siRNA を in vivo-jetPEI (Polyplus-transfectionS SA) と混合し、室温で 15~30 分間静置した。

〈操作〉

- ① ACK2 を UVB 照射の 7、5、3 日前に $20\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるようにマウスの背部皮膚組織にインジェクションした。
- ② IWR-1 溶液及び siRNA 溶液は、UVB 照射の 1 日前、当日、1 日後にそれぞれ 4 または $5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるようにマウスの背部皮膚組織にインジェクションした。
- ③ 投与部位が分かるように、投与した部位の四隅にマジックで印を付けた。

4-5. 細胞培養

〈準備〉

・ヒト正常メラノサイト (NHEM)

黒人新生児表皮由来のものを TOYOBO より購入した。NHEM は、5～6 倍に増殖するのに約 1 週間かかる。そのため、2～3 毎に新しい培地に交換した。実験には、P1～3 のものを用いた。

・ヒト正常ケラチノサイト (NHEK)

白人新生児表皮由来のものを TOYOBO より購入した。NHEK は、4 倍に増殖するのに約 1 週間かかる。そのため、2～3 毎に新しい培地に交換した。実験には、P1～3 のものを用いた。

・NHEM 培養用培地

Medium 254 (Life Technologies) に 1 %となるように Human Melanocyte Growth Supplement (Life Technologies) を添加した。

・NHEK 培養用培地

Keratinocyte Serum Free Medium (Life Technologies) に付属の EGF 及び BPE を添加した。

・Recombinant human WNT7A protein (PeproTech)

100 µg/mL となるように PBS (-) に溶解した。

・6BIO (Enzo Life Sciences)

10 µM となるように DMSO に溶解した。

・セルカルチャーインサート (ポアサイズ 1.0 µm、BD Bioscience)

〈操作〉

- ① 4×10^4 cells/ウェルとなるように、NHEM を 24 ウェルプレートに播種した。NHEM と NHEK を共培養する際は、NHEK を、NHEM をセルカルチャーインサートに播種した。
- ② 48 時間培養後、UVB を照射する場合は、NHEM または NHEK の培地を PBS (-) に置換し、UVB を照射した。その後、PBS (-) を NHEM または NHEK 培養用培地に置換し、24 時間培養した。
- ③ 6BIO 及び WNT7A を添加する場合は、新しい NHEM 培養用培地にそれぞれ 10 µM また 10 ng/mL となるように添加した。その後 72 時間培養した。
- ④ 共培養の場合、NHEK の培地を PBS (-) に置換し、UVB を照射した。その後、PBS (-) を NHEK 培養用培地に置換し、24 時間培養した。この時 NHEM については、新しい NHEM 培養用培地に 10 µM となるように IWR-1 を添加した。24 時間の共培養後、NHEM だけをさらに 48 時間培養した。

5. 第四章における実験操作

5-1. 皮膚組織検体

市販(ケー・エー・シー)の皮膚組織よりパラフィン包埋ブロックを作製し、実験に用いた。また、一部は藤田保健衛生大学医学部皮膚科にて外科手術の際に採取された組織をパラフィン包埋ブロックとして保管した検体を用いた。

5-2. 同種宿主由来一次抗体を用いた二重免疫染色

〈準備〉

- ・ブロッッキング溶液

PBS (-) に BSA を 0.5 %、normal donkey serum を 5 % となるように添加した。

- ・抗ヒト TYR マウスモノクローナル抗体 (Thermo Scientific)
- ・抗ヒト MART-1 マウスモノクローナル抗体 (Thermo Scientific)
- ・AlexaFluor®488 標識二次抗体
- ・DAPI 溶液
- ・湿潤箱
- ・Fluorescence Mounting Medium (DAKO)
- ・Zenon® Alexa Fluor® 594 Mouse IgG1 Labeling Kit (Life Technologies)

〈操作〉

- ① 脱パラ処理した皮膚組織切片に、ブロッッキング溶液を組織の上に滴下し、湿潤箱中でインキュベートした (1 時間、37°C)。
- ① ブロッッキング溶液に 50 倍に希釈した抗ヒト TYR マウスモノクローナル抗体を組織に滴下し、インキュベートした (一晩、4°C)。
- ② PBS (-) で洗浄し、ブロッッキング溶液に 1000 倍に希釈した AlexaFluor®488 標識二次抗体を組織に滴下し、インキュベートした (1 時間、室温)。
- ③ AlexaFluor®594 で標識された Zenon®マウス IgG 標識試薬と抗ヒト MART-1 マウスモノクローナル抗体を混合し、インキュベートした (室温、5 分間)。
- ④ ③の抗体溶液に Zenon®ブロッッキング試薬を添加し、インキュベートした (室温、5 分間)。
- ⑤ ④の抗体溶液を組織に滴下し、インキュベートした (1 時間、室温)。
- ⑥ DAPI 溶液を上から添加し、インキュベートした (5 分間、室温)。
- ⑦ PBS (-) で洗浄し、Fluorescence Mounting Medium で封入した。

5-3. 蛍光強度の解析

〈操作〉

- ① 免疫染色した皮膚組織切片を蛍光顕微鏡下で観察し、1 検体あたり 3 枚の画像をランダムに取得した。
- ② NIH image を用いて、個々のメラノサイトにおける TYR と MART-1 の蛍光強度を解析した。
- ③ TYR の蛍光強度を MART-1 の蛍光強度で補正し、個々のメラノサイトにおける TYR の相対発現量を算出した。
- ④ 同一検体の全メラノサイトにおける TYR の相対発現量の平均値を算出し、検体ごとの TYR の相対発現量とした。
- ⑤ 健常皮膚検体及び SL 病変検体において、検体ごとの TYR の相対発現量の平均値をそれぞれ算出し、健常皮膚の TYR の相対発現量及び SL 病変部の TYR の相対発現量とした。

6. 第五章における実験操作

6-1. 皮下脂肪組織の採取

〈準備〉

•1%コラゲナーゼ溶液

フェノールレッド不含 DMEM/F-12 (Gibco) にコラゲナーゼ S1 (新田ゼラチン) を1%となるように溶解し、0.45 μm のフィルターで濾過し、 -20°C に保管した。

•FBS

•セルストレーナー (100 μm 、BD Bioscience)

•赤血球除去トリス緩衝液 (ACT 液)

0.83% NH_4Cl 水溶液を調整する (1液)。トリスヒドロキシメチルアミノメタン 20.594 g を 500~700 mL の水に溶かし、1N HCl で pH7.65 に調整して 1L にメスアップする (2液)。1液と2液を 9:1 で混合し、フィルター滅菌した。

〈操作〉

- ① マウスを安楽死させた後、鼠蹊部のリンパ節を除去した後、皮下脂肪組織を採取した。
- ② 採取した組織を PBS (-) で洗浄した後、水分をキムタオルで除去して 60 mm シャーレの中で眼科剪刀を用いて細切した。
- ③ 1 mL の 1%コラゲナーゼ溶液を 4 mL のフェノールレッド不含 DMEM/F-12 で希釈し、FBS を 0.2 mL 添加したものをシャーレに注いだ。
- ④ 37°C で 1 時間インキュベートし、パスツールピペットで均一にならした後、セルストレーナーで濾過し、15 mL チューブに移した。
- ⑤ 遠心し (1,500 rpm、5 分、 4°C)、上清及び液面に浮遊している成熟脂肪細胞層を除去した。
- ⑥ ペレットに 5 mL の ACT 液を加え、ピペットで混合した後、5 分間静置した。
- ⑦ PBS (-) を 10 mL 加え、遠心した (1,500 rpm、5 分、 4°C)。
- ⑧ 上清を除去し、PBS (-) を 15 mL 加え、遠心した (1,500 rpm、5 分、 4°C)。
- ⑨ 得られたペレットを SVF 画分とし、フローサイトメーターにより細胞を分離した。

6-2. 細胞培養

〈準備〉

•ASC 培養用培地

DMEM 250 mL と α MEM (Life Technologies) 250 mL を混合し、5 mL の antibiotic-anti-mycotic (Life Technologies)、10 mL の FBS、5 mL の ITS-X supplement (Life Technologies)、50 μL の 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bFGF (PeproTech)、500 μL の ESGRO® (Chemicon) を添加した。

•0.25%トリプシン-EDTA 溶液

トリプシン 1.25 g、EDTA \cdot 4Na 0.1 g を、PBS (-) 500 mL に溶解し、フィルター滅菌した。

•10%FBS 含有 DMEM

Antibiotic-Antimycotic を 1%となるように、予め 30 分間 56°C で補体を失活させた FBS を 10%となるように DMEM に添加した。

〈操作〉

- ① フローサイトメーターにより分離した細胞を ASC 培養用培地に懸濁し、60 mm シャーレに 1×10^6 cells を播種した。
- ② 2~3 日に一回培地交換をし、サブコンフルエントになったら、PBS (-) で一度洗浄し、1 mL の 0.25 %トリプシン-EDTA 溶液を添加して、1 分間静置した。
- ③ 細胞が剥がれてきたら 10 %FBS 含有 DMEM を 5 mL 加え、ピペッティングしながら 15 mL チューブに回収した。
- ④ 遠心し (1,500 rpm、5 分)、ASC 培養用培地に懸濁し、再び播種した (P1)。

6-3. 細胞増殖能の評価

〈操作〉

- ① P1 の細胞を 35 mm シャーレに 1×10^5 cells/dish となるように播種した。
- ② 24 時間ごとに、細胞をトリプシン-EDTA を用いて剥がし、生細胞の数をカウントした。
- ③ 対数増殖期において、倍加時間を計算した。

6-4. 細胞老化の評価

〈準備〉

・固定液

2 %ホルムアルデヒド/0.2 %グルタルアルデヒドとなるように PBS (-) に溶解した。

・Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 染色液

1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (Sigma)、5 mM potassium ferrocyanide、5 mM potassium ferricyanide、150 mM NaCl、2 mM MgCl₂、40 mM trisodium citrate となるように水に溶解し NaH₂PO₄ で pH 6.0 に調整した。

〈操作〉

- ① P1 の細胞を 24 ウェルプレートに 2×10^4 cells/ウェルとなるように播種した。
- ② 24 時間培養し PBS (-) で洗浄後、固定液を加えインキュベートした (室温、3-5 分間)。
- ③ PBS (-) で洗浄後、SA- β -gal 染色液を加えインキュベートした (37°C、12-16 時間)。
- ④ 顕微鏡下で、青色に染色された細胞をカウントし、全細胞数に対する SA- β -gal 陽性細胞の割合を算出した。

6-5. 細胞の分化

6-5-1. 脂肪細胞の分化

〈準備〉

・脂肪細胞分化誘導培地

DMEM (10 %FBS、1 μ M dexamethasone、0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、0.2 mM indomethacin、10 μ g/mL insuline、33 μ M biotin (全て Sigma) を含む)

・脂肪細胞維持培地

DMEM (10 %FBS、10 μ g/mL insuline、33 μ M biotin を含む)

〈操作〉

- ① P1 の細胞を 24 ウェルプレートに 2.5×10^4 cells/ウェルとなるように播種した。
- ② 3 日間培養しコンフルエントになったら、脂肪細胞分化誘導培地に交換し 7 日間培養した (2~3 日ごとに培地交換をする)。
- ③ 脂肪細胞維持培地に交換しさらに 7 日間培養した (2~3 日ごとに培地交換をする)。

6-5-2. 骨芽細胞の分化

〈準備〉

・骨芽細胞分化誘導培地

DMEM (10 %FBS、10 mM β -glycerophosphate、50 μ M ascorbic acid 2-phosphate)

〈操作〉

- ① P1 の細胞を 24 ウェルプレートに 2.5×10^4 cells/ウェルとなるように播種した
- ② 3 日間培養しコンフルエントになったら、骨芽細胞分化誘導培地に交換した。
- ③ 骨芽細胞分化誘導培地を 2-3 日ごとに交換しながら 3 週間培養した。

6-5-3. 軟骨細胞の分化

〈準備〉

・軟骨細胞分化誘導培地

DMEM (3 %FBS、0.5 \times ITS-X supplement、50 μ M ascorbic acid 2-phosphate、0.1 μ M dexamethasone、5 ng/mL TGF- β 3 (PeproTech)、5 ng/mL BMP-2 (PeproTech))

〈操作〉

- ① P1 の細胞をポリプロピレンチューブに回収して遠心した (500 rpm、5 分)。
- ② 上清を除去し、1 mL の軟骨分化誘導培地を静かに加えた。
- ③ 軟骨細胞分化誘導培地を 2-3 日ごとに交換しながら 2 週間培養した。

6-5-3. 平滑筋細胞の分化

〈準備〉

・平滑筋細胞分化誘導培地

60 %DMEM:40 %MCDB201 (1 \times ITS+1 liquid、100 μ M ascorbic acid、2.5 ng/mL TGF- β 1 (PeproTech)、5 ng/mL PDGF-BB (PeproTech))

〈操作〉

- ① P1 の細胞を 24 ウェルプレートに 2.5×10^4 cells/ウェルとなるように播種した。
- ② 3 日間培養しコンフルエントになったら、平滑筋細胞分化誘導培地に交換した。
- ③ 平滑筋細胞分化誘導培地を 2-3 日ごとに交換しながら 2 週間培養した。

6-6. 分化効率の解析

6-6-1. 脂肪細胞の評価 (オイルレッド O 染色)

〈準備〉

- 4 % PFA
- 2-プロパノール
- オイルレッド O ストック溶液

オイルレッド O (Sigma) を 0.3 % となるように 2-プロパノールに溶解した。

- オイルレッド O 染色液

オイルレッド O ストック溶液:水=3:2 となるように混合し、0.45 μm のフィルターでろ過した。

〈操作〉

- ① 分化誘導終了後、細胞を静かに PBS (-) で洗浄し 4 % PFA により固定した。
- ② PBS (-) で洗浄後、60 % 2-プロパノール 500 μL を加えインキュベートした (室温、1-2 分)。
- ③ 60 % 2-プロパノールを除去し、オイルレッド O 染色液を 250 μL 加えインキュベートした (室温、15 分)。
- ④ オイルレッド O 染色液を除去し、60 % 2-プロパノールを 500 μL 加えプレートを軽く攪拌し、脂肪滴に取り込まれていないオイルレッド O の残りを洗浄した。
- ⑤ PBS (-) を加え、顕微鏡下で画像を撮影した。
- ⑥ PBS (-) を除去した後、2-プロパノールを 500 μL 加えプレートを軽く攪拌してオイルレッド O 抽出した。
- ⑦ 200 μL ずつ 96 ウェルプレートに抽出液を移し 520 nm の吸光度を測定した。

6-6-2. 骨芽細胞の評価 (アリザリンレッド S 染色)

〈準備〉

- 4 % PFA
- アリザリンレッド S 染色液

アリザリンレッド S (Sigma) を 1 % となるように水に溶解し、ろ紙でろ過した。

〈操作〉

- ① 分化誘導終了後、細胞を静かに PBS (-) で洗浄し 4 % PFA により固定した。
- ② PBS (-) で洗浄後、アリザリンレッド S 染色液を加えインキュベートした (室温、5 分)。
- ③ PBS (-) で洗浄後、顕微鏡下で画像を撮影した。

6-6-3. 骨芽細胞の評価 (カルシウム沈着量の測定)

〈準備〉

- 4 % PFA
- 10 % ギ酸水溶液

・カルシウム E-テストワコー (和光純薬工業)

〈操作〉

- ① 分化誘導終了後、細胞を静かに PBS (-) で洗浄し 4 % PFA により固定した。
- ② PBS (-) で洗浄後、10 %ギ酸水溶液を加えプレートを軽く攪拌しながら骨芽細胞の表面に沈着したカルシウムを抽出した。
- ③ 抽出液 10 μ L またはカルシウム E-テストワコーに付属のスタンダードを 1.5 mL チューブに移し、カルシウム E-テストワコーに付属の緩衝液 400 μ L と混合した。
- ④ さらに発色試液を 200 μ L を加え混合し、200 μ L ずつ 96 ウェルプレートに抽出液を移し 610 nm の吸光度を測定した。
- ⑤ スタンダードの吸光度の値からカルシウム量を算出した。

6-6-4. 軟骨細胞の評価 (グリコサミノグリカン量の測定)

〈準備〉

- ・Proteinase K 溶液 (ProK 溶液、50 μ g/mL)
- ・DMMB 溶液
- ・DMMB decomplexation solution
- ・standard chondroitin 4 sulfate
水に溶解し、100 μ g/mL に調整した。

〈操作〉

- ① 分化誘導終了後、培地を除去し、PBS (-) で洗浄した後、ProK 溶液を 200 μ L 加えインキュベートした (56°C、16-24 時間)。
- ② 90°C で 10 分間インキュベートし、ProK を失活させた。
- ③ 遠心し (1,500 rpm、5 分)、上清または standard chondroitin 4 sulfate 50 μ L を 1.5 mL チューブに移し、DMMB 溶液 1 mL を加えた。
- ④ 断続的にボルテックスしながらインキュベートした (室温、20 分)。
- ⑤ 遠心し (12,000 rpm、10 分)、上清を除去した。
- ⑥ DMMB decomplexation solution 1 mL を加え、断続的にボルテックスしながらインキュベートした (室温、20 分)。
- ⑦ 200 μ L ずつ 96 ウェルプレートに抽出液を移し 656 nm の吸光度を測定した。
- ⑧ スタンダードの吸光度の値からグリコサミノグリカン量を算出した。

6-6-5. 平滑筋細胞の評価 (α -smooth muscle actin 量の測定)

〈操作〉

- ① 分化誘導終了後、細胞を静かに PBS (-) で洗浄し 4 % PFA により固定した。
- ② PBS (-) で洗浄後、 α -smooth muscle actin の染色を実施した。
- ③ 蛍光顕微鏡下で観察し、ランダムに画像を取得した。

- ④ α -smooth muscle actin の相対蛍光強度を DAPI 陽性の数 (細胞数) で補正し、相対 α -smooth muscle actin 発現量を算出した。

参考文献

- Abu-Elmagd M, Garcia-Morales C, Wheeler GN. (2006) Frizzled7 mediates canonical Wnt signaling in neural crest induction. *Dev Biol.* 298, 285-98.
- Alison MR, Islam S. (2009) Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 217, 144-60.
- Alonso L, Fuchs E. (2003) Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 Suppl 1, 11830-5.
- Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB, Ichihashi M. (2012) Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J Invest Dermatol.* 132, 1222-9.
- Aoki H, Moro O, Tagami H, Kishimoto J. (2007) Gene expression profiling analysis of solar lentigo in relation to immunohistochemical characteristics. *Br J Dermatol.* 156, 1214-23.
- Aubin-Houzelstein G, Djian-Zaouche J, Bernex F, Gadin S, Delmas V, Larue L, Panthier JJ. (2008) Melanoblasts' proper location and timed differentiation depend on Notch/RBP-J signaling in postnatal hair follicles. *J Invest Dermatol.* 128, 2686-95.
- Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol.* 3, 683-6.
- Bastiaens M, ter Huurne J, Gruis N, Bergman W, Westendorp R, Vermeer BJ, Bouwes Bavinck JN. (2001) The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene. *Hum Mol Genet.* 10, 1701-8.
- Biswas S, Lloyd IC. (1999) Oculocutaneous albinism. *Arch Dis Child.* 80, 565-9.
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. (2004) Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell.* 118, 635-48.
- Blanpain C, Lowry WE, Pasolli HA, Fuchs E. (2006) Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* 20, 3022-35.
- Blanpain C, Fuchs E. (2009) Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 207-17.

Boheler KR. (2009) Stem cell pluripotency: a cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and a checkpoint deficient cell cycle. *J Cell Physiol.* 221, 10-7.

Bossio C, Mastrangelo R, Morini R, Tonna N, Coco S, Verderio C, Matteoli M, Bianco F. (2013) A simple method to generate adipose stem cell-derived neurons for screening purposes. *J Mol Neurosci.* 51, 274-81.

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J. (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 10124-8.

Breitkreutz D, Koxholt I, Thiemann K, Nischt R. (2013) Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2013/179784.

Brenner M, Hearing VJ. (2008) The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* 84, 539-49.

Bukvić Mokos Z, Lipozencić J, Pasić A, Fattorini I. (2006) Laser therapy for solar lentigines: review of the literature and case report. *Acta Dermatovenerol Croat.* 14, 81-5.

Cario-Andre M, Lepreux S, Pain C, Nizard C, Noblesse E, Taïeb A. (2004) Perilesional vs. lesional skin changes in senile lentigo. *J Cutan Pathol.* 31, 441-7.

Carvalho RS, Schaffer JL, Gerstenfeld LC. (1998) Osteoblasts induce osteopontin expression in response to attachment on fibronectin: demonstration of a common role for integrin receptors in the signal transduction processes of cell attachment and mechanical stimulation. *J Cell Biochem.* 70, 376-90.

Chen N, Hu Y, Li WH, Eisinger M, Seiberg M, Lin CB. (2010) The role of keratinocyte growth factor in melanogenesis: a possible mechanism for the initiation of solar lentigines. *Exp Dermatol.* 19, 865-72.

Chou WC, Takeo M, Rabbani P, Hu H, Lee W, Chung YR, Carucci J, Overbeek P, Ito M. (2013) Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mc1r signaling. *Nat Med.* 19, 924-9.

Clayton E, Doupé DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. (2007) A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature.* 446, 185-9.

- Condic ML, Rao M. (2010) Alternative sources of pluripotent stem cells: ethical and scientific issues revisited. *Stem Cells Dev.* 19, 1121-9.
- Cook AL, Donatien PD, Smith AG, Murphy M, Jones MK, Herlyn M, Bennett DC, Leonard JH, Sturm RA. (2003) Human melanoblasts in culture: expression of BRN2 and synergistic regulation by fibroblast growth factor-2, stem cell factor, and endothelin-3. *J Invest Dermatol.* 121, 1150-9.
- Cotsarelis G. (2006) Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol.* 126, 1459-68.
- Cui J, Harning R, Henn M, Bystryk JC. (1992) Identification of pigment cell antigens defined by vitiligo antibodies. *J Invest Dermatol.* 98, 162-5.
- Cui J, Shen LY, Wang GC., Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. (1991) *J Invest Dermatol.* 97, 410-6.
- Davis LA, Zur Nieden NI. (2008) Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch. *Cell Mol Life Sci.* 65, 2658-74.
- De Barros S, Dehez S, Arnaud E, Barreau C, Cazavet A, Perez G, Galinier A, Casteilla L, Planat-Bénard V. (2013) Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Mol Ther.* 21, 399-408.
- Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS. (1999) Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell.* 3, 11-21.
- Ding DC, Chou HL, Hung WT, Liu HW, Chu TY. (2013) Human adipose-derived stem cells cultured in keratinocyte serum free medium: Donor's age does not affect the proliferation and differentiation capacities. *J Biomed Sci.* 20:59.
- Djian-Zaouche J, Campagne C, Reyes-Gomez E, Gadin-Czerw S, Bernex F, Louise A, Relaix F, Buckingham M, Panthier JJ, Aubin-Houzelstein G. (2012) Pax3(GFP) , a new reporter for the melanocyte lineage, highlights novel aspects of PAX3 expression in the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25. 545-54.
- Doupé DP, Jones PH. (2012) Interfollicular epidermal homeostasis: dicing with differentiation. *Exp Dermatol.* 21, 249-53.

- Enshell-Seijffers D, Lindon C, Wu E, Taketo MM, Morgan BA. (2010) Beta-catenin activity in the dermal papilla of the hair follicle regulates pigment-type switching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 21564-9.
- Falabella R. (2009) Vitiligo and the melanocyte reservoir. *Indian J Dermatol*. 54, 313-8.
- Falabella R, Barona MI. (2009) Update on skin repigmentation therapies in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 22, 42-65.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 279, 1528-30.
- Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD. (2004) A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol*. 6, 1082-93
- Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, Blasco MA. (2008) The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev*. 22, 654-67.
- Furuya R, Yoshida Y, Moro O, Tsunenaga M, Aoki H, Kishimoto J, Ifuku O, Hirobe T. (2009) Immunohistochemical survey of the distribution of epidermal melanoblasts and melanocytes during the development of UVB-induced pigmented spots. *J Dermatol Sci*. 55, 99-107.
- Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. (1998) De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell*. 95, 605-14.
- Giebel LB, Spritz RA. (1991) Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88, 8696-9.
- Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. (1999) The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med*. 340, 1341-8.
- Gillbro JM, Olsson MJ. (2011) The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents--existing and new approaches. *Int J Cosmet Sci*. 33, 210-21.
- Goding CR. (2007) Melanocytes: the new Black. *Int J Biochem Cell Biol*. 39, 275-9.

- Grønskov K, Ek J, Brøndum-Nielsen K. (2007) Oculocutaneous albinism. *Orphanet J Rare Dis.* 2:43.
- Hamid AA, Idrus RB, Saim AB, Sathappan S, Chua KH. (2012) Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics (Sao Paulo).* 67, 99-106.
- Halaban R. (2000) The regulation of normal melanocyte proliferation. *Pigment Cell Res.* 13, 4-14.
- Hasebe Y, Hasegawa S, Hashimoto N, Toyoda M, Matsumoto K, Umezawa A, Yagami A, Matsunaga K, Mizutani H, Nakata S, Akamatsu H. (2011) .Analysis of cell characterization using cell surface markers in the dermis. *J Dermatol Sci.* 62, 98-106.
- Hattori H, Kawashima M, Ichikawa Y, Imokawa G. (2004) The epidermal stem cell factor is over-expressed in lentigo senilis: implication for the mechanism of hyperpigmentation. *J Invest Dermatol.* 122, 1256-65.
- Hillesheim PB, Slone S, Kelley D, Malone J, Bahrami S. (2011) An immunohistochemical comparison between Mitf and MART-1 with Azure blue counterstaining in the setting of solar lentigo and melanoma in situ. *J Cutan Pathol.* 38, 565-9.
- Hirobe T. (1984) Histochemical survey of the distribution of the epidermal melanoblasts and melanocytes in the mouse during fetal and postnatal periods. *Anat Rec.* 208, 589-94.
- Hirobe T. (2005) Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res.* 18, 2-12.
- Hirobe T, Osawa M, Nishikawa S. (2003) Steel factor controls the proliferation and differentiation of neonatal mouse epidermal melanocytes in culture. *Pigment Cell Res.* 16, 644-55.
- Hirobe T, Osawa M, Nishikawa S. (2004) Hepatocyte growth factor controls the proliferation of cultured epidermal melanoblasts and melanocytes from newborn mice. *Pigment Cell Res.* 17, 51-61.
- Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH, Fuchs E. (2008) NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell.* 132, 299-310.
- Hou L, Pavan WJ. (2008) Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell Res.* 18, 1163-76.

Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J. (1999) A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*. 398, 431-6.

Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. (2001) beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*. 105, 533-45.

Inomata K, Aoto T, Binh NT, Okamoto N, Tanimura S, Wakayama T, Iseki S, Hara E, Masunaga T, Shimizu H, Nishimura EK. (2009) Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell*. 137, 1088-99.

Ito M, Kawa Y, Ono H, Okura M, Baba T, Kubota Y, Nishikawa SI, Mizoguchi M. (1999) Removal of stem cell factor or addition of monoclonal anti-c-KIT antibody induces apoptosis in murine melanocyte precursors. *J Invest Dermatol*. 112, 796-801.

Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE, Cotsarelis G. (2007) Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*. 447, 316-20.

Jordan SA, Jackson IJ. (2000) MGF (KIT ligand) is a chemokinetic factor for melanoblast migration into hair follicles. *Dev Biol*. 225, 424-36.

Kadono S, Manaka I, Kawashima M, Kobayashi T, Imokawa G. (2001) The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpigmentation mechanism of lentigo senilis. *J Invest Dermatol*. 16, 571-7.

Kaidbey KH, Agin PP, Sayre RM, Kligman AM. (1979) Photoprotection by melanin--a comparison of black and Caucasian skin. *J Am Acad Dermatol*. 1, 249-60.

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 121, 1109-21.

Kawano Y, Kypta R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 116, 2627-34.

Knoblich JA. (2008) Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 132, 583-97.

Kobielak K, Stokes N, de la Cruz J, Polak L, Fuchs E. (2007) Loss of a quiescent niche but not follicle

stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 10063-8.

Kovacs D, Cardinali G, Aspite N, Cota C, Luzi F, Bellei B, Briganti S, Amantea A, Torrisi MR, Picardo M. (2010) Role of fibroblast-derived growth factors in regulating hyperpigmentation of solar lentigo. *Br J Dermatol*. 163, 1020-7.

Komekado H, Yamamoto H, Chiba T, Kikuchi A. (2007) Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells*. 12, 521-34.

Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, Zhang WJ, Hong TH, Zhou G, Baggett LS, Mikos AG, Cao Y. (2008) Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol*. 9:60.

Kruft BI, Greer A. (2011) Photosensitization reactions in vitro and in vivo. *Photochem Photobiol*. 87, 1204-13.

Kunisada T, Yoshida H, Yamazaki H, Miyamoto A, Hemmi H, Nishimura E, Shultz LD, Nishikawa S, Hayashi S. (1998) Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors. *Development*. 125, 2915-23.

Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S, Kikuchi A. (2007) Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem J*. 402, 515-23.

Kvam E, Tyrrell RM. (1997) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis*. 18, 2379-84.

Lang KS, Caroli CC, Muhm A, Wernet D, Moris A, Schittek B, Knauss-Scherwitz E, Stevanovic S, Rammensee HG, Garbe C. (2001) HLA-A2 restricted, melanocyte-specific CD8(+) T lymphocytes detected in vitiligo patients are related to disease activity and are predominantly directed against MelanA/MART1. *J Invest Dermatol*. 116, 891-7.

Lang D, Lu MM, Huang L, Engleka KA, Zhang M, Chu EY, Lipner S, Skoultchi A, Millar SE, Epstein JA. (2005) Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature*. 433, 884-7.

Lim K, Han C, Xu L, Isse K, Demetris AJ, Wu T. (2008) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 activates beta-catenin in human cholangiocarcinoma cells: evidence for inhibition of these signaling pathways by omega 3 polyunsaturated fatty acids. *Cancer Res*. 68, 553-60.

- Linge C. (1996) Relevance of in vitro melanocytic cell studies to the understanding of melanoma. *Cancer Surv.* 26:71-87.
- Loeffler M, Potten CS (1997) in *Stem Cells*
- Lowry WE, Blanpain C, Nowak JA, Guasch G, Lewis L, Fuchs E. (2005) Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev.* 19, 1596-611.
- MacDonald BT, Tamai K, He X. (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 17, 9-26.
- Mahmoud F, Abul H, al-Saleh Q, Haines D, Burtleson J, Morgan G. (1998) Peripheral T-cell activation in non-segmental vitiligo. *J Dermatol.* 25, 637-40.
- Mak SS, Moriyama M, Nishioka E, Osawa M, Nishikawa S. (2006) Indispensable role of Bcl2 in the development of the melanocyte stem cell. *Dev Biol.* 291, 144-53..
- Mantovani C, Raimondo S, Haneef MS, Geuna S, Terenghi G, Shawcross SG, Wiberg M., 2012 Morphological, molecular and functional differences of adult bone marrow- and adipose-derived stem cells isolated from rats of different ages. *Exp Cell Res.* 318, 2034-48.
- Mascre G, Dekoninck S, Drogat B, Youssef KK, Broheé S, Sotiropoulou PA, Simons BD, Blanpain C. (2012) Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature.* 489, 257-62.
- Ménasché G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S, Wulffraat N, Bianchi D, Fischer A, Le Deist F, de Saint Basile G. (2000) Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet.* 25, 173-6.
- Millar SE. (2002) Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol.* 2002 118, 216-25.
- Miot HA, Brianezi G, Tamega Ade A, Miot LD. (2012) Techniques of digital image analysis for histological quantification of melanin. *An Bras Dermatol.* 87, 608-11.
- Monestier S, Gaudy C, Gouvernet J, Richard MA, Grob JJ. (2006) Multiple senile lentigos of the face, a skin ageing pattern resulting from a life excess of intermittent sun exposure in dark-skinned caucasians:

a case-control study. *Br J Dermatol.* 2006 154, 438-44.,

Montagna W, Chase HB. (1956) Histology and cytochemistry of human skin. X. X-irradiation of the scalp. *Am J Anat.* 99, 415-45

Moriyama M, Durham AD, Moriyama H, Hasegawa K, Nishikawa S, Radtke F, Osawa M. (2008) Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development. *Dev Cell.* 4, 594-604.

Moriyama M, Osawa M, Mak SS, Ohtsuka T, Yamamoto N, Han H, Delmas V, Kageyama R, Beermann F, Larue L, Nishikawa S. (2006) Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J Cell Biol.* 173, 333-9.

Motokawa T, Kato T, Katagiri T, Matsunaga J, Takeuchi I, Tomita Y, Suzuki I. (2005) Messenger RNA levels of melanogenesis-associated genes in lentigo senilis lesions. *J Dermatol Sci.* 37, 120-3.

Moyal D, Chardon A, Kollias N. (2000) Determination of UVA protection factors using the persistent pigment darkening (PPD) as the end point. (Part 1). Calibration of the method. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 16, 245-9.

Moyal D, Wichrowski K, Tricaud C. (2006) In vivo persistent pigment darkening method: a demonstration of the reproducibility of the UVA protection factors results at several testing laboratories. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 22, 124-8.

Naughton GK, Eisinger M, Bystryn JC. (1983) Antibodies to normal human melanocytes in vitiligo. *J Exp Med.* 158, 246-51.

Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Era T, Sakakura T, Nishikawa S. (1991) In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J.* 10, 2111-8.

Nishikawa-Torikai S, Osawa M, Nishikawa S. (2011) Functional characterization of melanocyte stem cells in hair follicles. *J Invest Dermatol.* 131, 2358-67.

Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S. (2002) Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature.* 416, 854-60.

Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE. (2005) Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte

stem cell maintenance in the niche. *Science*. 307, 720-4.

Nishimura EK, Suzuki M, Igras V, Du J, Lonning S, Miyachi Y, Roes J, Beermann F, Fisher DE. (2010) Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell*. 6, 130-40.

Noblesse E, Nizard C, Cario-André M, Lepreux S, Pain C, Schnebert S, Taïeb A, Kurfurst R. (2006) Skin ultrastructure in senile lentigo. *Skin Pharmacol Physiol*. 19, 95-100.

Nusse R. (2008) Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res*. 18, 523-7.

Nyati S, Ranga R, Ross BD, Rehemtulla A, Bhojani MS. (2010) Molecular imaging of glycogen synthase kinase-3beta and casein kinase-1alpha kinases. *Anal Biochem*. 405, 246-54.

Oh J, Bailin T, Fukai K, Feng GH, Ho L, Mao JI, Frenk E, Tamura N, Spritz RA. (1996) Positional cloning of a gene for Hermansky-Pudlak syndrome, a disorder of cytoplasmic organelles. *Nat Genet*. 14, 300-6.

Orlic D, Bodine DM. 1994 What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood*. 84, 3991-4

Osawa M, Egawa G, Mak SS, Moriyama M, Freter R, Yonetani S, Beermann F, Nishikawa S., (2005) Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development*. 132, 5589-99.

Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. (2001) Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 104, 233-45.

Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR. (1982) Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem Photobiol*. 36, 187-91.

Passeron T. (2013) Melasma pathogenesis and influencing factors - an overview of the latest research. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 27 Suppl 1, 5-6.

Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq-Lagelouse R, Certain S, Sanal O, Jabado N, Seger R, Griscelli C, Fischer A, de Saint Basile G. (1997) Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet*. 16, 289-92.

Pathak MA, Jimbow K, Fitzpatrick, (1980) Photobiology of pigment cells. *Phenotypic expression in*

pigment cells. University of Tokyo Press. 655-670.

Pattison DI, Davies MJ. (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*. 96, 131-57.

Petersson M, Brylka H, Kraus A, John S, Rappl G, Schettina P, Niemann C. (2011) TCF/Lef1 activity controls establishment of diverse stem and progenitor cell compartments in mouse epidermis. *EMBO J*. 30, 3004-18.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284, 143-7.

Port F, Basler K. (2010) Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading. *Traffic*. 11, 1265-71.

Prestwich GD, Erickson IE, Zarembinski TI, West M, Tew WP. (2012) The translational imperative: making cell therapy simple and effective. *Acta Biomater*. 8, 4200-7.

Rabbani P, Takeo M, Chou W, Myung P, Bosenberg M, Chin L, Taketo MM, Ito M. (2011) Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration. *Cell*. 145, 941-55.

Rezania A, Healy KE. (1999) Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *J Orthop Res*. 17, 615-23.

Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. (2008) Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*. 314, 1937-44.

Routaboul C, Denis A, Vinche A. (1999) Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. *Eur J Dermatol*. 9, 95-9.

Sachs PC, Francis MP, Zhao M, Brumelle J, Rao RR, Elmore LW, Holt SE. (2012) Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell Tissue Res*. 349, 505-15.

Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. (2004) Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol*. 43, 326-35.

- Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. (2005) Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 328, 258-64.
- Sharov A, Tobin DJ, Sharova TY, Atoyan R, Botchkarev VA. (2005) Changes in different melanocyte populations during hair follicle involution (catagen). *J Invest Dermatol.* 125, 1259-67.
- Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. (2005) The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg.* 116, 1686-96.
- Silva-Vargas V, Lo Celso C, Giangreco A, Ofstad T, Prowse DM, Braun KM, Watt FM. (2005) Beta-catenin and Hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. *Dev Cell.* 9, 121-31.
- Siqueira RC. (2011) Stem cell therapy for retinal diseases: update. *Stem Cell Res Ther.* 2, 50.
- Sitaram A, Marks MS. (2012) Mechanisms of protein delivery to melanosomes in pigment cells. *Physiology (Bethesda).* 27, 85-99.
- Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, Schallreuter KU, Paus R, Tobin DJ. (2005) Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol.* 124, 13-21.
- Spinsanti P, De Vita T, Caruso A, Melchiorri D, Misasi R, Caricasole A, Nicoletti F. (2008) Differential activation of the calcium/protein kinase C and the canonical beta-catenin pathway by Wnt1 and Wnt7a produces opposite effects on cell proliferation in PC12 cells. *J Neurochem.* 104, 1588-98.
- Staricco RG. (1959) Amelanotic melanocytes in the outer sheath of the human hair follicle. *J Invest Dermatol.* 33, 295-7.
- Staricco RG, Miller-Milinska A. (1962) Activation of the amelanotic melanocytes in the outer root sheath of the hair follicle following ultra violet rays exposure. *J Invest Dermatol.* 39, 163-4.
- Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. (2005) Melanocyte stem cell maintenance and hair graying. *Cell.* 121, 9-12.
- Suzuki T, Li W, Zhang Q, Novak EK, Sviderskaya EV, Wilson A, Bennett DC, Roe BA, Swank RT, Spritz RA. (2001) The gene mutated in cocoa mice, carrying a defect of organelle biogenesis, is a homologue of the human Hermansky-Pudlak syndrome-3 gene. *Genomics.* 78, 30-7.

Suzuki T, Li W, Zhang Q, Karim A, Novak EK, Sviderskaya EV, Hill SP, Bennett DC, Levin AV, Nieuwenhuis HK, Fong CT, Castellan C, Mitterski B, Swank RT, Spritz RA. (2002) Hermansky-Pudlak syndrome is caused by mutations in HPS4, the human homolog of the mouse light-ear gene. *Nat Genet.* 30, 321-4.

Tachibana M, Kobayashi Y, Matsushima Y. (2003) Mouse models for four types of Waardenburg syndrome. *Pigment Cell Res.* 16, 448-54.

Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126, 663-76.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131, 861-72.

Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK. (2011) Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell.* 8, 177-87.

Thomas AJ, Erickson CA. (2008) The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 598-610.

Tobin DJ, Swanson NN, Pittelkow MR, Peters EM, Schallreuter KU. (2000) Melanocytes are not absent in lesional skin of long duration vitiligo. *J Pathol.* 191, 407-16.

Tokalov SV, Gruener S, Schindler S, Iagunov AS, Baumann M, Abolmaali ND. (2007) A number of bone marrow mesenchymal stem cells but neither phenotype nor differentiation capacities changes with age of rats. *Mol Cells.* 24, 255-60.

Tornaletti S, Pfeifer GP. (1996) UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays.* 18, 221-8.

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. (2004) Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 2004 303, 359-63.

Vachtenheim J, Borovanský J. (2010) "Transcription physiology" of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Exp Dermatol.* 19, 617-27.

Van Mater D, Kolligs FT, Dlugosz AA, Fearon ER. (2003) Transient activation of beta -catenin

signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice. *Genes Dev.* 17, 1219-24.

Vlemminckx K, Kemler R. (1999) Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays.* 21, 211-20.

Wu XS, Masedunskas A, Weigert R, Copeland NG, Jenkins NA, Hammer JA. (2012) Melanoregulin regulates a shedding mechanism that drives melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1109, E2101-9.

Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S, Yamada T, Nakata S, Ohkuma M, Miyachi E, Marunouchi T, Matsunaga K. (2007) Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J Dermatol Sci.* 48, 43-52.

Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. (2007) The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem.* 282, 27557-61.

Yamaguchi Y, Hearing VJ. (2009) Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors.* 35, 193-9.

Yonetani S, Moriyama M, Nishigori C, Osawa M, Nishikawa S. (2008) In vitro expansion of immature melanoblasts and their ability to repopulate melanocyte stem cells in the hair follicle. *J Invest Dermatol.* 128, 408-20.

Yoshikawa T, Rae V, Bruins-Slot W, Van den Berg JW, Taylor JR, Streilein JW. (1990) Susceptibility to effects of UVB radiation on induction of contact hypersensitivity as a risk factor for skin cancer in humans. *J Invest Dermatol.* 95, 530-6.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211-28.

Zhong H, Zou H, Semenov MV, Moshinsky D, He X, Huang H, Li S, Quan J, Yang Z, Lin S. (2009) Characterization and development of novel small-molecules inhibiting GSK3 and activating Wnt signaling. *Mol Biosyst.* 5, 1356-60..

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7,

211-28.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13, 4279-95.

長谷川靖司、山本直樹、丸野内隼、松永佳世子 (2006) 皮下脂肪組織由来幹細胞のメラノサイトへの分化誘導. 第5回日本再生医療学会

Color Genes, <http://www.espcr.org/micemut/>

謝辞

本研究は、日本メナード化粧品株式会社と藤田保健衛生大学応用細胞再生医学講座、同大学医学皮膚科学講座、同大学共同利用研究施設との共同研究成果をまとめたものである。皮膚の幹細胞研究という大変興味深いテーマに出会う機会を与えて下さり、日々励ましのお言葉を頂いた日本メナード化粧品株式会社専務取締役兼総合研究所所長 中田悟氏に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、温かいご指導を賜りました同総合研究所部長 水谷宏博士、同総合研究所副主幹研究員 長谷川靖司博士に深く感謝致します。また、色素幹細胞研究をサポートしてくれた井上悠様、伊達靖様、脂肪幹細胞研究をサポートしてくれた吉村知久様、応用細胞研究グループの皆様に感謝致します。

幹細胞については素人だった私にいつもの確な御助言をくださった藤田保健衛生大学応用細胞再生医学講座教授 赤松浩彦先生に深く感謝致します。幹細胞研究の前に皮膚のアレルギー研究に取り組んでいた時から熱心に御指導を賜りました同大学医学部皮膚科学講座教授 松永佳世子先生に厚く御礼申し上げます。また、新しい実験系の立ち上げ等で多くのアドバイスを頂きました同大学共同利用研究施設准教授 山本直樹先生に感謝致します。

学生時代に指導教官として熱心にご指導頂き、また今回学位取得の機会を賜りました名古屋大学大学院生命農学研究科食品機能化学研究室教授 内田浩二先生に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。研究のイロハと楽しさを教えて頂いた同食品機能化学研究室助教 柴田貴広先生、熊谷剛先生(現北里大学薬学部)、近藤光量様に深く感謝致します。また、学位取得にあたり事務面でご協力頂きました本堂由紀様に厚く御礼申し上げます。

最後に、学生時代から応援してくれた両親、いつも支えてくれた妻 きさと明るい笑顔で励ましてくれた息子達に心から感謝します。

2014年 3月

山田 貴亮

報文目録

Yamada T, Akamatsu H, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Mizutani H, Yamamoto N, Matsunaga K, Nakata S. (2010) Melanocyte stem cells express receptors for canonical Wnt-signaling pathway on their surface. *Biochem Biophys Res Commun.* 396, 837-42.

Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Yamamoto N, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K, Akamatsu H. (2013) Wnt/ β -Catenin and Kit Signaling Sequentially Regulate Melanocyte Stem Cell Differentiation in UVB-Induced Epidermal Pigmentation. *J Invest Dermatol.* 133, 2753-62.

Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Arima M, Yagami A, Iwata Y, Abe M, Takahashi M, Yamamoto N, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K, Akamatsu H. (2014) Comprehensive analysis of melanogenesis and proliferation potential of melanocyte lineage in solar lentigines. *J Dermatol Sci.* 73, 251-257.

Yamada T, Akamatsu H, Hasegawa S, Yamamoto N, Yoshimura T, Hasebe Y, Inoue Y, Mizutani H, Uzawa T, Matsunaga K, Nakata S. (2010) Age-related changes of p75 neurotrophin receptor-positive adipose-derived stem cells. *J Dermatol Sci.* 58, 36-42.