



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	乙第1899号
学位記番号	論 第201号
氏名	井上 悠
授与年月日	平成 31年 3月 25日
学位論文の題名	幹細胞を用いたモデル系による表皮構成細胞の分化メカニズムの解析
論文審査担当者	主査： 山村 壽男 副査： 平嶋 尚英, 松永 民秀, 尾関 哲也

名古屋市立大学学位論文

幹細胞を用いたモデル系による表皮構成細胞の
分化メカニズムの解析

2019 年

日本メナード化粧品株式会社 総合研究所

井上 悠

1. 本論文は、2019年3月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 山村 寿男 教授

副査 松永 民秀 教授

副査 尾関 哲也 教授

副査 平嶋 尚英 教授

2. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

(1) Inoue Y, Hasegawa S, Ban S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, Nakata S, Tanaka M, Hirashima N. ZIP2 protein, a zinc transporter, is associated with keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 2014;289: 21451-62.

(2) Inoue Y, Hasegawa S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K, Akamatsu H. Bimodal effect of retinoic acid on melanocyte differentiation identified by time-dependent analysis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25: 299-311.

(3) Inoue Y, Hasegawa S, Miyachi K, Yamada T, Nakata S, Ipponjima S, Hibi T, Nemoto T, Tanaka M, Suzuki R, Hirashima N. Development of 3D imaging technique of reconstructed human epidermis with immortalized human epidermal cell line. *Exp Dermatol* 2018;27: 563-570.

3. 本論文の基礎となる研究は、長谷川 靖司 博士の指導の下に日本メナード化粧品株式会社において行われた。

本論文では以下の略語を用いた。

3D	:	Three dimensional
α -MSH	:	α -Melanocyte-stimulating hormone
ATP	:	Adenosine triphosphate
bFGF	:	Basic fibroblast growth factor
cAMP	:	cyclic AMP
CT	:	Cholera toxin
Col3a1	:	Collagen type III α 1 Chain
CRE	:	cAMP response elements
CREB	:	cAMP response element-binding protein
DEX	:	Dexamethasone
ET-1	:	Endothelin 1
ET-3	:	Endothelin 3
EDNRB	:	Endothelin receptor type B
FGFR1/2	:	Fibroblast growth factor receptor 1/2
FLG	:	Filaggrin
GMCSF	:	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMCSFR	:	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor
IFN- γ	:	interferon γ
ITGB1	:	Integrin β 1
ITGA6	:	Integrin α 6
IVL	:	Involucrin
Kit	:	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
KRT14	:	Keratin 14
LOR	:	Loricrin
MAPK	:	Mitogen-activated protein kinase
MC1R	:	Melanocortin 1 receptor
MEF	:	Mouse embryonic fibroblasts
Mitf-m	:	Melanogenesis associated transcription factor
mRNA	:	Messenger RNA
NGF	:	Nerve growth factor
Ngfr	:	Nerve growth factor receptor
Oct3/4	:	Octamer-binding transcription factor 3/4
Pax3	:	Paired box 3
PBS	:	Phosphate buffered salts

PCR	:	Polymerase chain reaction
PGE2	:	Prostaglandin E2
PGF2 α	:	Prostaglandin F2 α
PKA	:	protein kinase A
PKC	:	Protein kinase C
PLC	:	Phospholipase C
PTGER1, 3	:	Prostaglandin E receptor 1, 3
RA	:	Retinoic acid
SCF	:	Stem cell factor
SDS	:	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	:	Small interfering RNA
SPring-8	:	Super photon ring-8
Sox9	:	SRY-box 9
Sox10	:	SRY-box 10
SR-XRF	:	Synchrotron radiation X-ray fluorescence
SSEA-1	:	Stage-specific embryonic antigen-1
TNF- α	:	tumor necrosis factor α
Tyr	:	Tyrosinase
Tyrp1	:	Tyrosinase related protein 1
WGA	:	Wheat germ agglutinin

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	実験材料及び方法	6
第 3 章	ケラチノサイトの分化に及ぼす亜鉛トランスポーターの役割の解析	
	3-1 : 序	11
	3-2 : 皮膚における各種微量元素の分布解析	13
	3-3 : ケラチノサイト特異的に発現する亜鉛トランスポーターの探索	14
	3-4 : ヒト表皮幹細胞モデルの分化誘導系を用いた ZIP2 の発現変化の解析	16
	3-5 : ZIP2 の発現抑制がケラチノサイトの分化に及ぼす影響の解析	19
	3-6 : まとめ	22
第 4 章	メラノサイトの分化に及ぼすレチノイン酸の影響の解析	
	4-1 : 序	23
	4-2 : ESC からメラノサイトへの分化誘導系の構築	24
	4-3 : メラノサイトの分化に伴う遺伝子発現変化の解析	25
	4-4 : メラノサイトの各分化段階に及ぼす RA の影響の解析 (メラニン生成能)	27
	4-5 : メラノサイトの各分化段階に及ぼす RA の影響の解析 (遺伝子発現)	32
	4-6 : まとめ	33
第 5 章	三次元培養表皮の 3D ライブイメージング技術の開発	
	5-1 : 序	35
	5-2 : 蛍光タンパク質発現 HDK1 を用いた三次元培養表皮の作製	35
	5-3 : 細胞内オルガネラの観察	37
	5-4 : 皮膚刺激性物質の評価	39
	5-5 : まとめ	43
第 6 章	総括	44
	謝辞	45
	引用文献	46

第1章 序論

表皮組織を構成する細胞

皮膚は、大きく分けて表皮・真皮・皮下組織の3層構造から成り、各組織には様々な細胞が存在する。また、これらの細胞にはその供給源として幹細胞が存在することが分かっている(図1)。皮膚のうち、最外層に存在する表皮組織は、水分の保持や外界からの刺激や異物の侵入防止など生体防御機構としての極めて重要な役割を担っている。表皮組織は主にケラチノサイト(表皮細胞)からなる複数の層により構成される(基底層、有棘層、顆粒層、角質層)(1)。ケラチノサイトの幹細胞(表皮幹細胞)は、このうち最も下層に位置する基底層に存在し、必要に応じて増殖と分化を繰り返し、組織に新しい細胞を常に供給していると考えられている(2)。そのため、表皮は絶えず再生を繰り返しており、基底層でケラチノサイトが生まれてから垢となって剥がれ落ちるまでの過程を表皮のターンオーバーという(図2)。

基底層には、ケラチノサイトの他にメラノサイト(色素細胞)と呼ばれるメラニン生成細胞が存在し、ケラチノサイトにメラニンを供給している。メラニンの最も重要な役割は紫外線防御であり、メラノサイトからメラニンを受け渡されたケラチノサイトは、それらを核の上方に集合させ、melanin capを形成して紫外線からDNAを守ると考えられている。以前より、メラノサイトの供給源が皮膚の付属器の一つである毛包にあると考えられていたが、2002年に西村らによって、毛包内のバルジ領域にメラノサイトの幹細胞である色素幹細胞が存在することが報告された(3)。色素幹細胞は、必要に応じて増殖・分化し、メラノサイトの前駆細胞であるメラノブラストを経て、最終的にメラニン生成能を有した成熟メラノサイトを表皮や毛包に供給していると考えられている(3-5)(図3)。

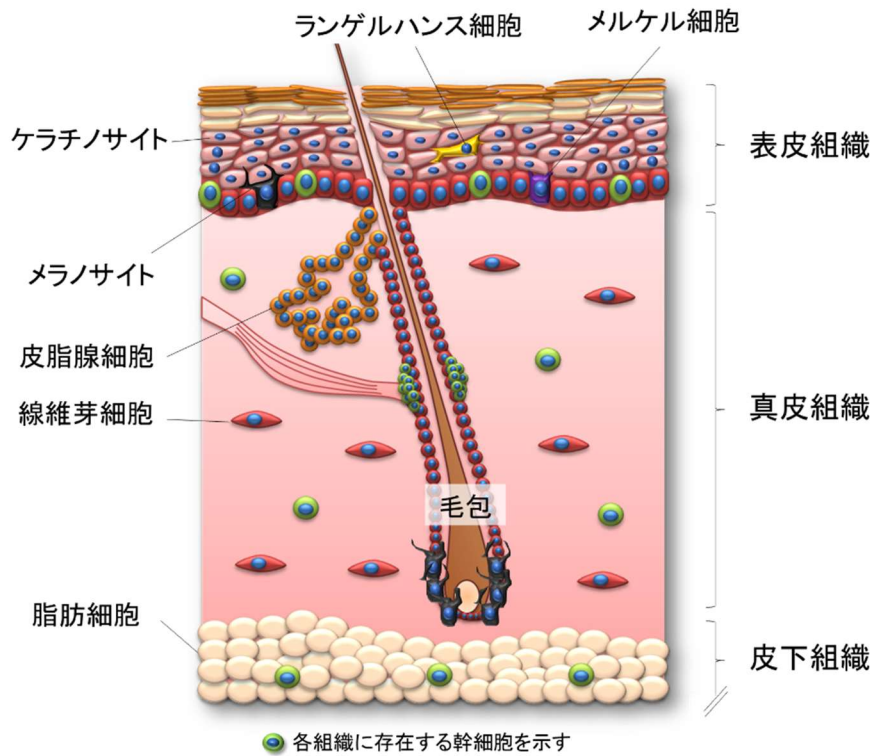


図1 皮膚組織の模式図

皮膚組織は様々な細胞から構成され、各組織には幹細胞が存在することが分かってきている。

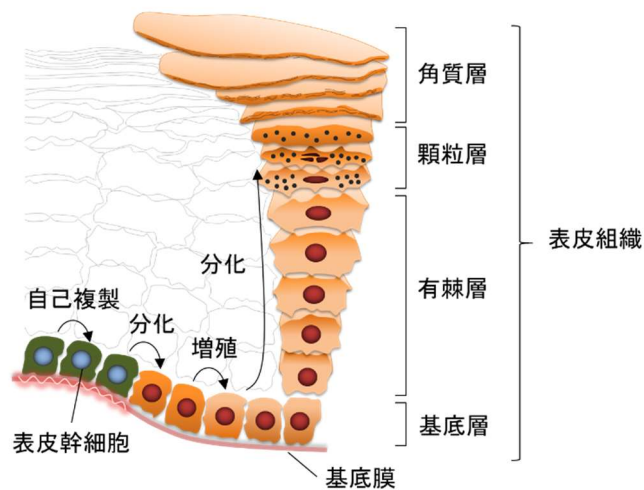


図2 ケラチノサイトの分化過程の模式図

ケラチノサイトの幹細胞（表皮幹細胞）は、基底層に存在し、必要に応じて増殖と分化を繰り返し、組織に新しい細胞を常に供給している。

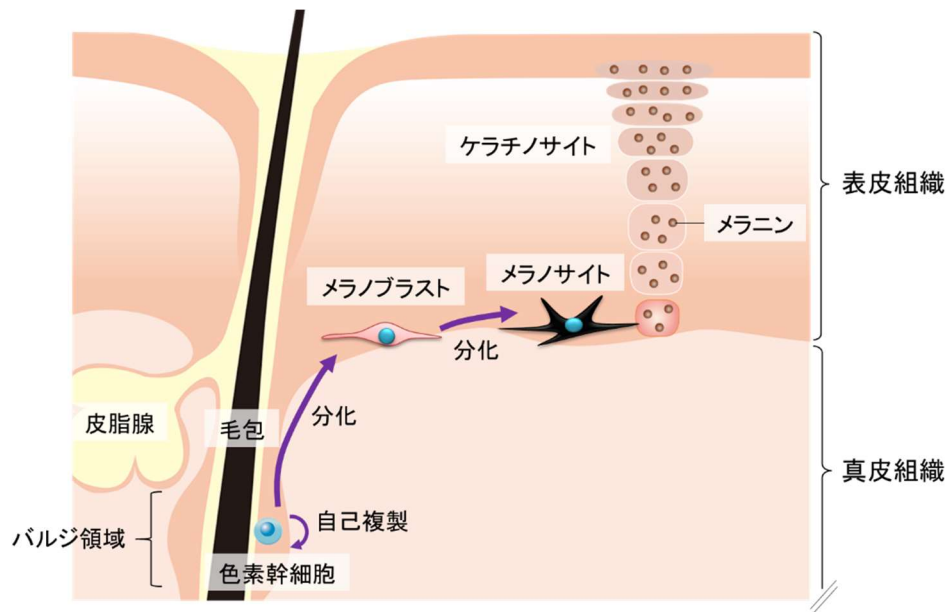


図3 メラノサイトの分化過程の模式図

メラノサイトの幹細胞（色素幹細胞）は、毛包のバルジ領域に存在し、必要に応じて増殖と分化を繰り返し、組織に新しい細胞を常に供給している。

ケラチノサイトとメラノサイトの相互作用

ケラチノサイトは、様々な増殖因子を分泌し、メラノサイトの増殖、分化、メラニン生成及び樹状突起の形成等を刺激する(6-9) (図4)。メラニン生成は、メラノサイト内の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、アミノ酸の一種であるチロシンが複雑な酵素反応を経ることによって進行する。メラニンを含んだメラノソームは、周囲のケラチノサイトに受け渡され、ケラチノサイトのターンオーバーに伴い表皮全体に行き渡り色素沈着を形成する。メラノサイトからケラチノサイトへメラノソームが受け渡されるメカニズムについては、(1)メラノソームを含んだメラノサイトの樹状突起の先端をケラチノサイトが貪食するモデル (Cytophagocytosis model)、(2)メラノサイトとケラチノサイトの細胞膜が融合し、メラノソームが輸送されるモデル (Membrane Fusion model)、(3)メラノサイトが、原形質膜に囲まれたメラノソームに富む小胞を放出し、それをケラチノサイトが貪食するモデル (Shedding-Phagocytosis model)、(4)メラノソーム内のメラニン顆粒がエクソサイトーシスによって、細胞外に放出され、それをケラチノサイトが貪食するモデル (Exocytosis-Endocytosis model) 等が提唱されているが(10, 11)、正確なメカニズムについては、未だ完全には解明されていない。

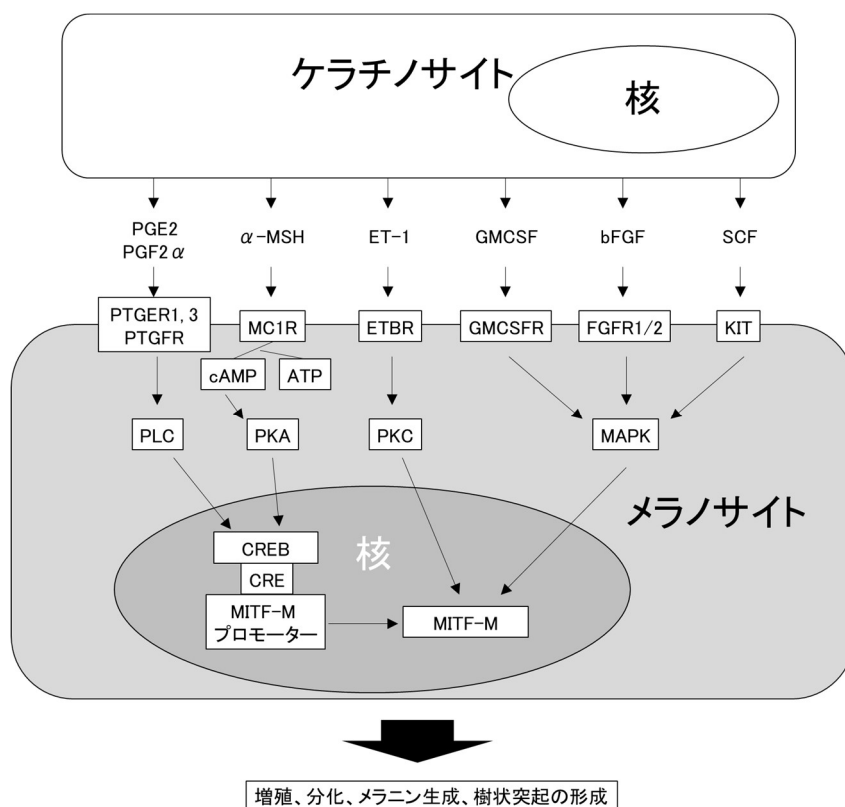


図4 メラノサイトにおける主なシグナル伝達経路

ケラチノサイトから分泌される様々な因子により、メラノサイトの増殖、分化、メラニン生成及び樹状突起の形成が促進される。

ケラチノサイトやメラノサイトの分化異常と皮膚疾患

上述の通り、ケラチノサイトやメラノサイトは必要に応じて、増殖と分化を繰り返し、お互いに相互作用することにより皮膚の恒常性を維持している。そのためケラチノサイトやメラノサイトの増殖・分化・機能に異常が生じると様々な皮膚疾患の原因となる(12, 13) (表1)。乾癬は、炎症を伴う慢性かつ難治性の皮膚疾患(角化症)であり、日本では約43万人が罹患しているとの報告がある(14)。乾癬の患部では、表皮基底細胞が過剰に増殖し、表皮分化マーカーの異常、増殖因子や炎症性サイトカインの過剰産生が認められる(15)。また、アトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰り返す、瘙痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、その患部では健常部に比較してFLG、LORといったケラチノサイトの最終分化に欠かせないタンパク質の発現が低下していることが明らかになっている(16)。アトピー性皮膚炎の患者数は45万人を超すとの報告もある。近年、食生活の欧米化等により、乾癬やアトピー性皮膚炎の患者数は増加傾向にあるといわれている。また、色素異常症は、皮膚の色を決定する色素の量が様々な理由により増加・減少することにより引き起こされる疾患である。このうち、後天的な色素増加症である老人性色素斑は、加齢に伴い顔、手背、腕、背中などの露光部に生じる褐色の色素斑を特徴とし、組織学的にメラノサイトの増加が認められる

(17, 18)。近年、老人性斑におけるメラノサイトの過剰な増加の原因として、色素幹細胞の過剰増殖・分化の関与が示唆されている(19)。

ケラチノサイトが関与する皮膚疾患の例	アトピー性皮膚炎 乾癬 表皮水泡症 魚鱗癬
メラノサイトが関与する皮膚疾患の例 (色素異常症)	<u>メラニン色素の脱失を主体とするもの</u> 眼皮膚白皮症 尋常性白斑 まだら症 Sutton 母斑 脱色素性母斑
	<u>メラニン色素増加を主体とするもの</u> 老人性色素斑 雀卵斑 肝斑 摩擦黒皮症 遺伝性対側性色素異常症

表1 ケラチノサイトやメラノサイトの異常に伴う皮膚疾患の例

本研究の目的

以上の通り、表皮組織を構成するケラチノサイトやメラノサイトの分化メカニズムについては少しずつ明らかになりつつあるが、未だ不明な点が多く残されている。このメカニズムがより詳細に明らかになれば、皮膚の抗老化や各種疾患のメカニズム解明にも貢献できると考える。そこで、本研究では、幹細胞を用いたモデル系によりケラチノサイトやメラノサイトの *in vitro* 分化誘導系を確立するとともに、各細胞の分化に影響を与える因子に着目して研究を行った。さらに、表皮組織をより生体に近い状態で解析できる系を構築するために、三次元培養表皮の3D ライブイメージング技術の確立について検討を行った。

具体的には、ケラチノサイトについては、未分化なヒト不死化ケラチノサイトを表皮幹細胞モデルとして用い、その分化誘導系を用いて、亜鉛やその細胞内取込タンパク質がケラチノサイトの分化に及ぼす影響について解析を行った(第3章)。また、メラノサイトについては、マウス胚性幹細胞からメラノサイトへの分化誘導系を用いて、レチノイン酸(Retinoic acid, RA)がメラノサイトの分化に及ぼす影響について解析を行った(第4章)。最後に、蛍光タンパク質発現ベクターを導入した表皮幹細胞モデルを用いて三次元培養表皮(ヒト表皮モデル)を作製し、ヒト表皮モデルを生体外で生きたまま三次元的に可視化し、評価できる技術について検討を行った(第5章)。

第2章 実験材料及び方法

SR-XRF を用いた皮膚組織の元素分析

SR-XRF (Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence) 分析は、SPring-8 (兵庫県) のビームライン BL37XU にて行われた。具体的には、ヒト皮膚 (KAC, Transkin) を用いて作製した凍結切片を Kapton film 30EN (東レ) に貼り付け、本試験サンプルに放射光 (X線) 照射し (BL37XU, 20-keV, 0.8(H) × 0.6(V) μm^2)、皮膚切片中の元素 (銅、ニッケル、鉄、亜鉛) の分布及び量を測定した。解析した皮膚検体数は5例以上であり、再現性を確認した。

マウス皮膚組織の採取及び分離

HR-1 マウス (日本 SLC) から皮膚組織を採取し、200 units/ml の Dispase II (Godo Shusei) を用いて 4 °C で一晩処理した。翌日、表皮組織と真皮組織を分離した。

免疫組織化学 (immunohistochemistry)

マウス及びヒトの皮膚組織、又は三次元培養表皮の組織切片 (パラフィン切片) に至適濃度に調整した各種一次抗体を滴下し、4 °C で一晩静置した。その後 PBS で洗浄後、至適濃度に調整した各種二次抗体を滴下し、37 °C で1時間静置した。再び PBS で洗浄後、DAPI 溶液 (Dojindo Laboratories) を用いて核を染色した。下記に用いた一次抗体及び二次抗体を記す。いずれの抗体においても、解析した皮膚検体数は3例以上であり、染色の再現性を確認した。

	抗体名	入手元	希釈率
一次抗体	抗KRT14抗体	Covance	100倍
	抗IVL抗体	Spring Bioscience	100倍
	抗ZIP2抗体	Abnova	100倍
	抗FLG抗体	Abcam	100倍
二次抗体	Alexa Fluor 594標識ウサギ抗体	Thermo Fisher Scientific	1000倍
	Alexa Fluor 594標識ヤギ抗体	Thermo Fisher Scientific	1000倍
	Alexa Fluor 488標識マウス抗体	Thermo Fisher Scientific	1000倍

表2 免疫組織化学に用いた一次抗体及び二次抗体のリスト

免疫細胞化学 (immunocytochemistry)

細胞をPBSで洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド (和光純薬) で固定し、0.25% Triton X-100 (Sigma) で30分間透過処理を行った後、至適濃度に調整した各種一次抗体を添加し、37 °C で1時間静置した。その後PBSで洗浄後、至適濃度に調整した各種二次抗体を滴下し、37 °C で30分間静置した。再びPBSで洗浄後、DAPI溶液を用いて核を染色した。下記に用いた一次抗体及び二次抗体を記す。

	抗体名	入手元	希釈率
一次抗体	抗SSEA-1抗体	Santa Cruz	100倍
	抗TYRP1抗体	Santa Cruz	100倍
	抗IVL抗体	Spring Bioscience	100倍
二次抗体	Alexa Fluor 594標識ウサギ抗体	Thermo Fisher Scientific	1000倍
	Alexa Fluor 594標識ヤギ抗体	Thermo Fisher Scientific	1000倍
	Alexa Fluor 488標識マウス抗体	Thermo Fisher Scientific	1000倍

表3 免疫細胞化学に用いた一次抗体及び二次抗体のリスト

フローサイトメトリー

HDK1の細胞懸濁液を抗ITGA6抗体(Bio Legend)及び抗ITGB1抗体 (Becton, Dickinson and Company)を用いて4 °Cで30分間インキュベートし、PBSで洗浄後、二次抗体であるAlexa Fluor 488標識ラット抗体 (Thermo Fisher Scientific)及びAlexa Fluor 647標識マウス抗体(Thermo Fisher Scientific)を用いて4 °Cで30分間インキュベートした。なお、解析にはFACSARIA (BD Biosciences)を用いた。

リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析

TRIzol reagent (Invitrogen)を用いて組織又は細胞からTotal RNAを回収し、PrimeScript RT Master Mix (TAKARA)を用いて逆転写反応によりcDNAを作製した。次に、SuperScript III Platinum two-step quantitative real-time PCR kit (Invitrogen)を用いてリアルタイムPCRを行った。なお、プライマーについては下記の表に示す。得られたCt値をから、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。

ヒトプライマー配列

Gene	Accession number	Sequences	
		Forward (5'- -3')	Reverse (5'- -3')
<i>GAPDH</i>	NM_002046.6	TGCACCACCAACTGCTTAGC	TCTTCTGGGTGGCAGTGATG
<i>18s rRNA</i>	NR_145820.1	CCGAGCCGCCTGGATAC	CAGTTCCGAAAACCAACAAAATAGA
<i>ZIP1</i>	NM_014437.4	GCGCCTACCCCTACATCTAT	GAGGCCAGAGAAGATACAAA
<i>ZIP2</i>	NM_014579.3	GGTCATACCCGGCAGTC	TCCAGGGCTTCAGCAGTCATA
<i>ZIP3</i>	NM_144564.4	CGGGAGTTGCTGGACTGAGA	CCAAGTCCCACGATGTGCTAC
<i>KRT10</i>	NM_000421.3	ACTGAAGAGCTGGCCTATCTGAA	CATCACCAGTGGACACATTTTCG
<i>IVL</i>	NM_005547.3	CCATCAGGAGCAAATGAAACAG	GCTCGACAGGCACCTTCTG
<i>FLG</i>	NM_002016.1	GGCACTGAAAGGCCAAAAGG	AAACCCGGATTACCCATAATCA

マウスプライマー配列

Gene	Accession number	Sequences	
		Forward (5'- -3')	Reverse (5'- -3')
<i>Gapdh</i>	NM_001289726.1	TGCACCACCAACTGCTTAGC	TCTTCTGGGTGGCAGTGATG
<i>Ivl</i>	NM_008412.3	GCAACCAACTCCACATCCTACA	CATGTTTGGGAAAGCCCTTCT
<i>Col3a1</i>	NM_009930.2	TTCTGAAGATGTCGTTGATGTG	TGTTTTTGACAGTGGTATGTAATGTC
<i>Zip1</i>	NM_013901.2	GAGCGACAGCAATGGAGTG	TGGCTGTGATAACTCGGTGAC
<i>Zip2</i>	NM_001039676.2	GTGGCCTTACTCCCATCTACGTG	GACCCTGTGGTGTGACCTGTAG
<i>Zip3</i>	NM_134135.1	TGGGCGTGTTCTTCTTCATG	GTGCGCCTTCTCCAAGTCAG
<i>Zip6</i>	NM_139143.3	TACAGCAAGTGAGAAGAAGGCAG	CCAAGCCAGGCTATTTGTAAG
<i>Zip8</i>	NM_001135150.1	GCTGCACCTCAACCAAGTGTG	GGTGACATTTGAGAAACCATGAAGA
<i>Zip10</i>	NM_172653.2	CTGCATCTACTGCCCATTC	CCGTGCGTATGCTGATGACTG
<i>Zip14</i>	NM_001135151.1	TTCCAGCCCAAGGAAGGAC	GCAAAGAGGTTCCAGAGCTAAAG
<i>Oct3/4</i>	NM_013633.3	GTTGGAGAAGGTGGAACCAA	CTCCTTCTGCAGGGCTTTC
<i>Sox9</i>	NM_011448.4	ACCCACCACTCCCAAAACC	CGCCCTCTCGCTTCAG
<i>Ngfr</i>	NM_033217.3	ATCTTGGCTGCTGTGGTTGTG	TATTTTGCTTGCAGCTGTCCA
<i>Pax3</i>	NM_008781.4	TCGGCCTTGCATTC	CAGGATCTTAGAGACGCAACCA
<i>Sox10</i>	NM_011437.1	TGGAGGTTGCTGAACGAAAGT	GAGCCTCTCAGCCTCCTCAA
<i>Mitf-m</i>	NM_008601.3	TGCCTTGTTTATGGTGCCTTCT	TCCCTTACTTTCTGTAATTCCAATTC
<i>Tyr</i>	NM_011661.5	ACGACCTCTTTGTATGGATGCA	TTTCAGAGCCCCAAGCA
<i>Dct</i>	NM_010024.3	CCGGCCCGACTGTAATC	GGGCAGTCAGGGAATGGATAT
<i>Tyrp1</i>	NM_031202.3	CAACGCTATGCTGAGGACTATGA	GCGGCTATCAGACCATGGA

表4 リアルタイムPCRに用いたプライマーのリスト

細胞培養

ヒト不死化ケラチノサイト (Human Dermal Keratinocyte I, HDK1) は、国立がん研究センター研究所の清野透博士から分譲して頂いた。HDK1の培養は、低カルシウム培地 (カルシウムイオン濃度 <0.1 mM) であるKeratinocyte-SFM (KSFM, Invitrogen)を用いて、5% CO₂存在下37 °Cで行った。また、分化誘導を行う際には、HDK1を播種3日後に(1.0×10⁴個/24 well plate)、calcium chloride (和光純薬)を用いて培地中のカルシウムイオン濃度を3.0 mMまで上昇させたKSFM中で4日間培養した。HDK1を用いた三次元培養表皮の作製には、Millicell hanging cell culture insert (24 well plate用、Millipore)を用いた。まず、2.0×10⁵個のHDK1をcell culture insert内に播種し2~3日間増殖させた。増殖の際には、expansion medium (CNT-07; CELLnTEC)をinsert内及びinsert外のwell内に添加した。細胞がコンフルエントになったことを確認後、insert内の培地を除去し5~10日間空気暴露することにより、三次元培養表皮の形成を誘導した。なお、三次元培養表皮形成誘導時は、インサートの外部のwell内に3D medium (CNT-02-3DP5, CELLnTEC)を添加した。

マウス胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ESC) は、DMEM (Invitrogen)に15% FBS (Si

gma), L-glutamine solution (Chemicon), 2-mercaptoethanol (Chemicon), non essential amino acids (Chemicon), ES cell qualified nucleosides (Chemicon) 及びESGRO (Chemicon)を添加した維持培地を用いて5% CO₂存在下37 °Cで培養した。なお、ESCを未分化状態で培養する際には、フィーダー細胞としてMEF (Millipore)を用いた。ESCからメラノサイトへの分化誘導の際には、フィーダー細胞としてST2細胞(Riken Cell Bank)を用いた。具体的な分化誘導方法としては、ESCをコンフルエントにまで培養したST2細胞上に播種し(500個/12 well plate)、 α MEM (Invitrogen)に10% FBS, 100 nM DEX (Sigma), 20 pM bFGF (PeproTech), 10 pM CT (Bio Academia)及び100 ng/mL ET-3 (和光純薬)を添加した分化誘導培地で24日間培養した。なお、RA (all-trans-retinoic acid, Sigma)は、分化誘導培地に1-100 nMの濃度で添加した。

siRNAによる遺伝子発現抑制

HDK1におけるZIP2の発現抑制は、siRNA導入試薬としてLipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いた。siRNAには、Stealth siRNA (HSS179136 (si-1), HSS179137 (si-2), HSS179138 (si-3)) (Invitrogen)を用いた。なお、ネガティブコントロール(NC)としてnon-targeting siRNA (Invitrogen)を用いた。具体的には、上記試薬を用いて、HDK1を20 nMのsiRNAを含むOpti-MEM (Invitrogen)で4時間培養し、その後カルシウムイオン濃度を3.0 mMまで上昇させたKSFMにて4日間分化誘導を行った。また、三次元培養の試験においては同様にsiRNAを導入後、3D medium (CNT-02-3DP5, CELLnTEC)を用いて5日間培養を行った。

細胞内亜鉛イオン染色及びフローサイトメーターによる測定

細胞内の亜鉛イオン染色には、亜鉛イオン特異的な蛍光指示薬であるFluoZin-3 AM (Invitrogen)を用いた。染色は、DMEMにFluoZin-3 AMを1000 nMの濃度で添加した溶液中でHDK1を培養することにより行い(37 °C、1時間)、その後余分な指示薬を除去する目的で指示薬を含まないDMEMで後培養を行った(37 °C、1時間)。染色後、FACS Ariaを用いて細胞内亜鉛イオンレベルの測定を行った。

メラニン定量及び相対細胞数の測定

ESCからメラノサイトへの分化誘導系において、相対細胞数の測定にはCell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories)を用いた。具体的には、分化誘導後のESCの細胞培養プレート(12 well plate)から培地を除き、そこに至適濃度に調整したCCK-8溶液を添加し、1時間培養を行った。その後、細胞培養プレートから前記溶液を回収し、マイクロプレートリーダーにて吸光度測定(450 nm)を行い相対細胞数を算出した。次に、メラニン定量を行うために、細胞をPBSにて2回洗浄し、2Nの水酸化ナトリウム(和光純薬)を用いて溶解した(60 °C)。2時間後、溶解液を回収し、マイクロプレートリーダーにて吸光度測定(475 nm)を行いメラニン量を算出した。

エレクトロポレーションによる遺伝子導入

tdTomato発現ベクターはClontech社から入手し、mCitrine発現ベクター及びH2B-mCitrine発現ベクターは日比輝正博士（北海道大学情報科学研究科）から分譲して頂いた。各遺伝子発現ベクターは、エレクトロポレーションによりHDK1に導入した。具体的には、Opti-MEMを用いてHDK1の細胞懸濁液(1.25×10^6 cells)を準備し、各プラスミド(5 μ g)添加後、Gene Pulser Xcell (Bio Rad) を用いてエレクトロポレーションを行った。各遺伝子の安定発現株は、G418 (400 μ g/ml, Thermo Fisher Scientific)及びBlasticidin(5 μ g/ml, Thermo Fisher Scientific)を用いた薬剤選択により樹立した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元培養表皮の観察

cell culture insertから三次元培養表皮をメンブレンごと切除し、細胞の生存状態を保ったままPBSで封入し、共焦点レーザー顕微鏡LSM 510 META (Carl Zeiss) を用いて角質層側から観察を行った。

三次元培養表皮を用いた皮膚刺激性物質の評価

空気暴露7日目の三次元培養表皮に0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate, 和光純薬) を添加し、15分間インキュベートした。その後、PBSで3回洗浄し、3D mediumを用いて24時間培養を行い、LSM 510 METAを用いて核の形状観察及びバリア機能の評価を行った。バリア機能の評価に関しては、WGA-488 (WGA labeled with a fluorescent chromophore, Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific)を角質層側から添加し、1時間後にその浸透度を計測することにより行った。なお、画像解析については、ImageJ softwareを用いた。

統計処理

結果は、平均±標準偏差として表記した。有意差の検定は、Student's t-testを行った。また、多重検定については、one-way ANOVAを行った後、Dunnett's multiple comparison testを行った。

第3章 ケラチノサイトの分化に及ぼす亜鉛トランスポーターの役

割の解析

3-1: 序

人体は様々な元素から構成される。これらの元素は大きく多量元素と微量元素に分けられ、多量元素はさらに主要元素と準主要元素に分けられる。主要元素である酸素 (O)、炭素 (C)、水素 (H)、窒素 (N) は、生体を構成するタンパク質や核酸、脂質、糖質などの有機物と水を構成し、これら 4 元素で生体の重量含有率が約 96% となる。ここに、カルシウム (Ca) 等からなる準主要元素 7 種類を含めると、これら 11 元素で生体の約 99% 以上を占めることとなる。一方で、ヒトはこれら 11 元素だけでは生存することができず、残りの微量元素が非常に重要な働きをしていることが分かってきている (表 5) (20)。

微量元素のひとつである亜鉛 (Zn) は、300 種類を超える酵素の活性中心の形成や、様々な転写因子やシグナル伝達分子の立体構造の維持に関与していると考えられている (21)。また、ヒトゲノムの 4~10% の遺伝子が亜鉛結合ドメインを有するタンパク質をコードしていると推定されている (22)。そのため、亜鉛は、成人 (体重 70kg) の体内に僅か 1.5~3.0g (0.002~0.004%) 程度しか含まれていないにも関わらず、その欠乏は味覚異常、貧血、口内炎、易感染症、骨粗しょう症、皮膚炎、脱毛など広範かつ重篤な疾患や症状の原因となる。中でも皮膚、特に表皮は亜鉛が多く存在する部位であるため (23, 24) (表 6)、亜鉛欠乏では皮膚症状が出現しやすいと考えられている。表皮で見られる病理所見としては、表皮内水泡、表皮内・角層の空胞変性などが挙げられ、進行すると乾癬様となる (25)。このことから、亜鉛は表皮の恒常性維持やケラチノサイトの機能と密接に関連していると考えられている。実際、亜鉛がケラチノサイトに及ぼす影響については、これまでに様々な報告がある。例えば、ケラチノサイトを亜鉛欠乏状態や亜鉛過剰状態で培養した場合は、アポトーシスが引き起こされることが報告されている (26, 27)。また、亜鉛は、ケラチノサイトにおいて分化マーカーの発現を促進することや、炎症性サイトカインの産生の抑制する効果を有することが報告されている (28, 29) (表 7)。

上述の通り、亜鉛の生理機能は多岐にわたり、生命活動に必須の因子であるため、その細胞内濃度は 20 種類を超える亜鉛トランスポーターによって極めて厳密に制御されている。亜鉛トランスポーターは大きく分けて 2 つのファミリーに分類される。ZIP ファミリー (Zrt-, Irt-like protein, SLC39A ファミリー) は、細胞質内の亜鉛イオン濃度を上昇させ、反対に ZnT ファミリー (Zn transporter, SLC30A ファミリー) は減少させるように機能する。これらの亜鉛トランスポーターはそれぞれ発現する組織や細胞内における局在が異なり、必要に応じて細胞及び組織内の亜鉛イオン濃度の調節を行っている (30) (図 5)。亜鉛は、

表皮組織に多く存在し(24)、表皮の恒常性維持やケラチノサイトの機能と密接に関連しているため(26-29)、表皮層には亜鉛を特異的に取り込む亜鉛トランスポーターが存在し、上記のようなケラチノサイト特異的な機能に関与していることが予想される。一方で、これまでに、ケラチノサイト特異的に発現する亜鉛トランスポーター及びその役割については、殆ど研究がなされていなかった。そこで、本研究では、表皮層特異的に発現する ZIP を探索し、その機能を解析した。

分類	主な元素	重量含有量
主要元素	O, C, H, N	約96%
準主要元素	Ca, P, S, K, Na, Cl, Mg	約3%
微量元素	Fe, Zn, Cu, Cr, Co, Se, Mn, Mo等	約0.02%

表5 人体を構成する元素

部位	含有率※
筋肉	約60%
骨	約20~30%
皮膚・毛髪	約8%
肝臓	約4~6%
消化管・膵臓	約2.8%
脾臓	約1.6%

※体内に存在する全 Zn のうち各組織に含まれる亜鉛含有率を示す。

表6 生体内で亜鉛が多く存在する部位

細胞種	報告内容	文献番号
HaCat (ヒト表皮不死化ケラチノサイト)	培地に亜鉛キレート剤 (Chelex, TPEN等) を添加すると細胞のアポトーシスが誘導される。	26
HEK (ヒト正常ケラチノサイト)	培地にZnCl ₂ を10 μ M, 100 μ Mの濃度で添加すると細胞のアポトーシスが誘導される。	27
HEK (ヒト正常ケラチノサイト)	培地にZnSO ₄ を14 μ Mの濃度で添加すると分化マーカーIVLの発現が亢進する。	28
HEK (ヒト正常ケラチノサイト)	IFN- γ 刺激によりケラチノサイトからは、炎症性サイトカインTNF- α が産生されるが、培地にZnSO ₄ を50 μ Mで添加することにより抑制される。	29

表7 ケラチノサイトに及ぼす亜鉛の影響

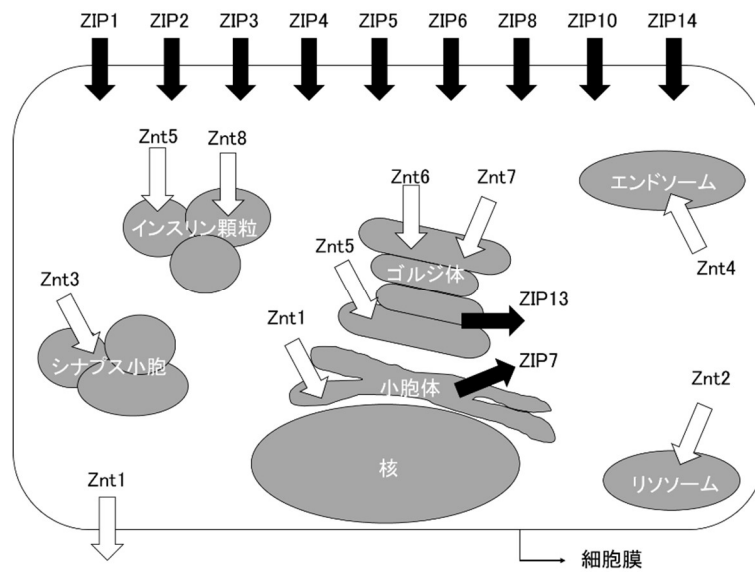


図5 細胞内における亜鉛トランスポーターの局在

各種亜鉛トランスポーターは、様々な局在を示す。矢印は亜鉛イオンの移動方向を示す。

3-2：皮膚における各種微量元素の分布解析

まず、ヒトの皮膚組織における微量元素の分布パターンを確認するために、Spring-8にてSR-XRF分析を行った(図6)。その結果、各元素はそれぞれ特有の分布パターンを示し、中でも亜鉛は、これまでの報告どおり表皮層に強く局在することを確認した(23)。

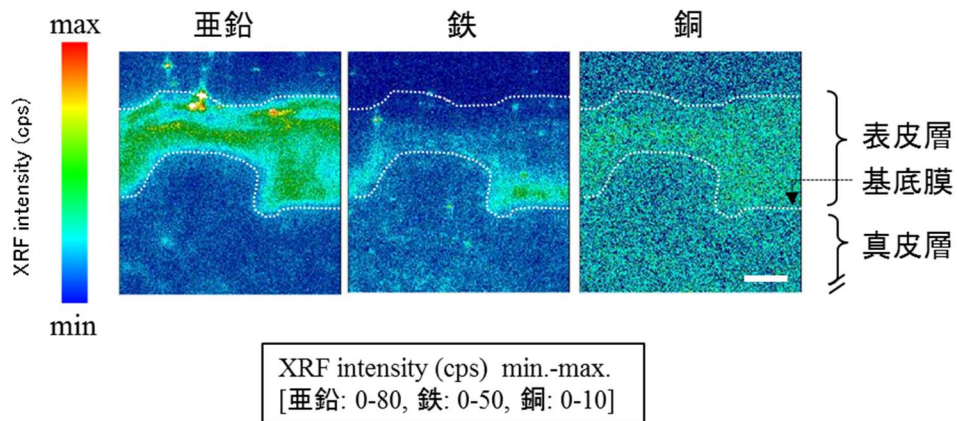


図6 ヒト皮膚組織における元素分布

ヒト皮膚組織における各種元素(亜鉛、鉄、銅)の局在を、SR-XRF分析により検出された蛍光X線強度(cps: count per second)をもとに2次元マッピングした(ピクセルサイズ: $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ 、計測時間: 1 sec/点)。Scale bar=50 μm

3-3 : ケラチノサイト特異的に発現する亜鉛トランスポーターの探索

表皮組織特異的に発現する亜鉛トランスポーターを探索するために、マウスの皮膚組織から表皮組織(epidermis)及び真皮組織(dermis)を分離し、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行った。本研究では、特に細胞膜に存在し、細胞外から細胞内への亜鉛イオン取込みに関与するトランスポーターである Zip1-6, 8, 10 及び 14 に着目して解析を行った。その結果、解析した Zip の中で Zip2 のみが表皮組織特異的に発現が高かった(図 7)。なお、Zip4 及び 5 に関しては表皮組織及び真皮組織ともに発現が確認されなかった(data not shown)。

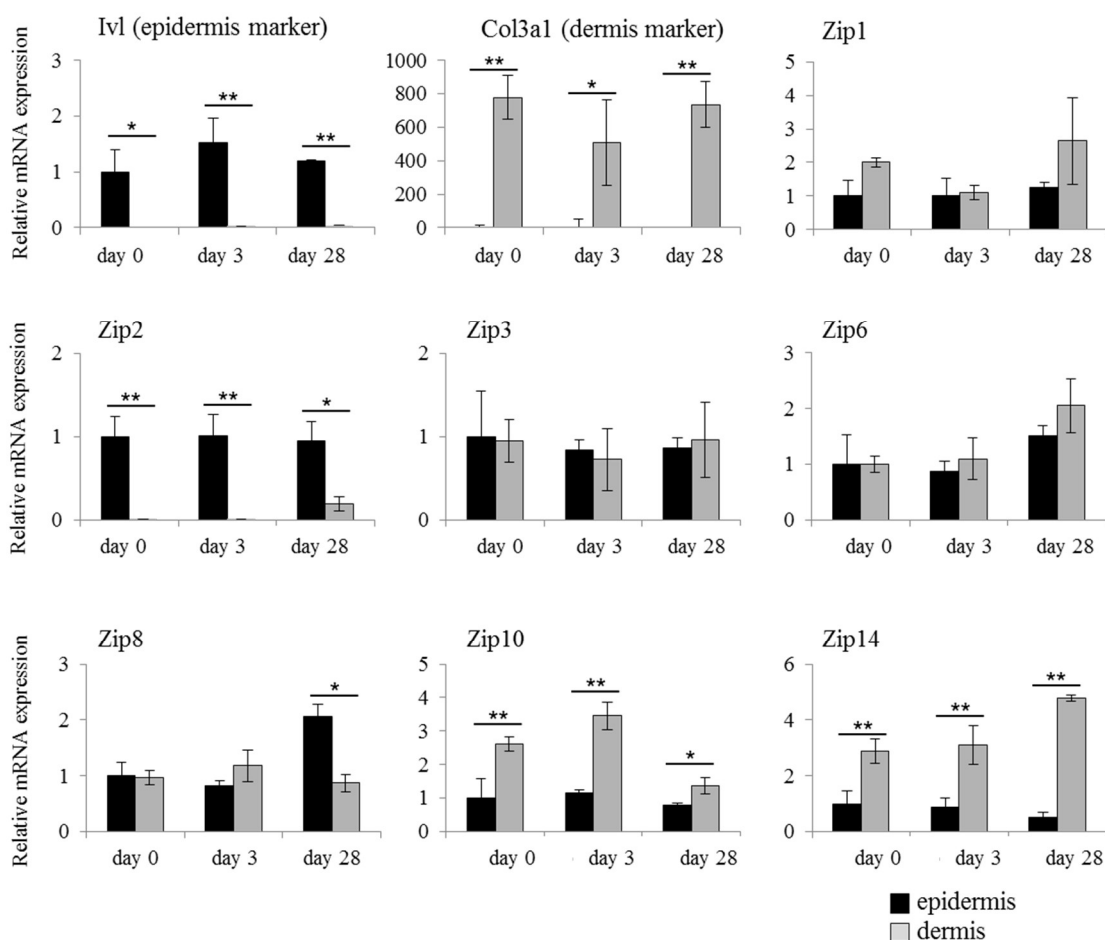


図 7 亜鉛トランスポーターの発現解析

生後 0、3、28 日目のマウス(HR-1)の皮膚組織から分離した表皮組織及び真皮組織を用いて、リアルタイム PCR により各種亜鉛トランスポーターの発現解析を行った。表皮組織(day 0)における各遺伝子の発現量を 1 として比較を行った。

Data are expressed as the mean \pm SD of the three experiments.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the epidermis.

続いて、免疫染色によりマウス皮膚における ZIP2 の発現解析を行ったところ、ZIP2 は表皮層のケラチノサイト特異的に発現することが確認された(図 8A)。興味深いことに、ZIP2 は未分化なケラチノサイトが存在する基底層では発現せず、分化が進行している上層のケラチノサイトで発現していることが明らかとなった。そこで、次にヒトの皮膚組織を用いて同様に ZIP2 の発現解析を行った。ヒト皮膚組織において、基底層ではケラチノサイトの未分化マーカーである KRT14 の発現が確認され、上層においては分化マーカーの IVL の発現が確認された(図 8B, C)。ZIP2 の発現は、マウスでの結果と同様、表皮組織の中でも分化が進行した上層のケラチノサイトにおいて確認された(図 8D upper and lower figure)。このことから、ZIP2 は、表皮幹細胞からケラチノサイトへの分化に何らかに関与していることが予想された。

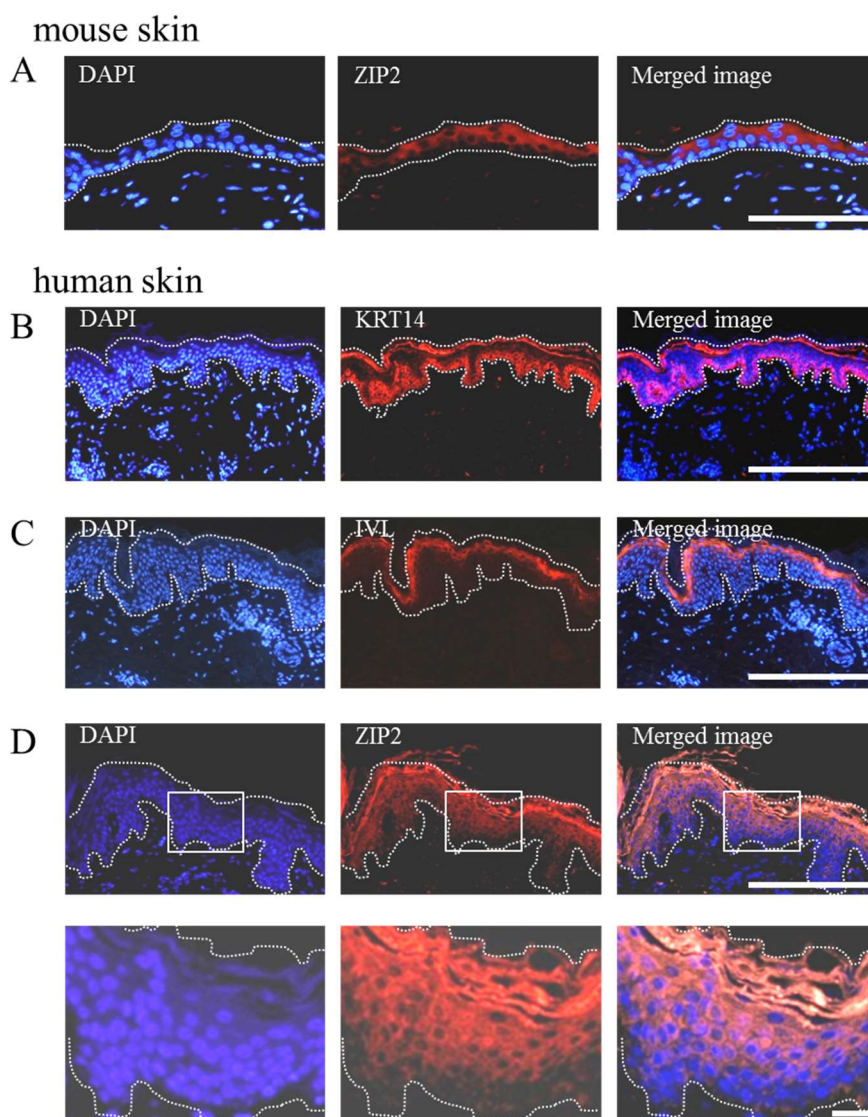


図8 マウス及びヒト皮膚における ZIP2 の発現解析

(A-D) マウス及びヒト皮膚組織切片を各種抗体を用いて免疫染色した画像。ZIP2 の発現は、表皮層特異的に確認され、特に分化が進行したケラチノサイトで発現が高かった。D の lower figure は upper figure の白枠内を拡大したもの。また、各画像によける白点線は表皮組織を示している。

Scale bar: A=100 μ m, B-D (upper figure)=200 μ m, D (lower figure)=20 μ m.

3-4 : ヒト表皮幹細胞モデルの分化誘導系を用いた ZIP2 の発現変化の解析

ケラチノサイトの分化と ZIP2 との関係进行を明らかにするために、未分化な不死化ヒトケラチノサイトである HDK1 を表皮幹細胞モデルとして用いた。HDK1 は、低カルシウムイオン条件下では、未分化な形態を示し、表皮幹細胞マーカーである ITGB1, ITGA6 を発現している (図 9A) (31)。一方で、高カルシウム条件で分化誘導を行うと細胞間接着が高まり、細胞が凝集し (図 9B)、分化マーカーである IVL の発現が亢進する (図 9C)。また、三次元培養を行うと基底層、有棘層、顆粒層、角質層を有した生体表皮に近い表皮モデルを形成する (図 9D)。そのため、本細胞は、ケラチノサイトの分化を解析するにあたって非常に優れたモデルとなる。

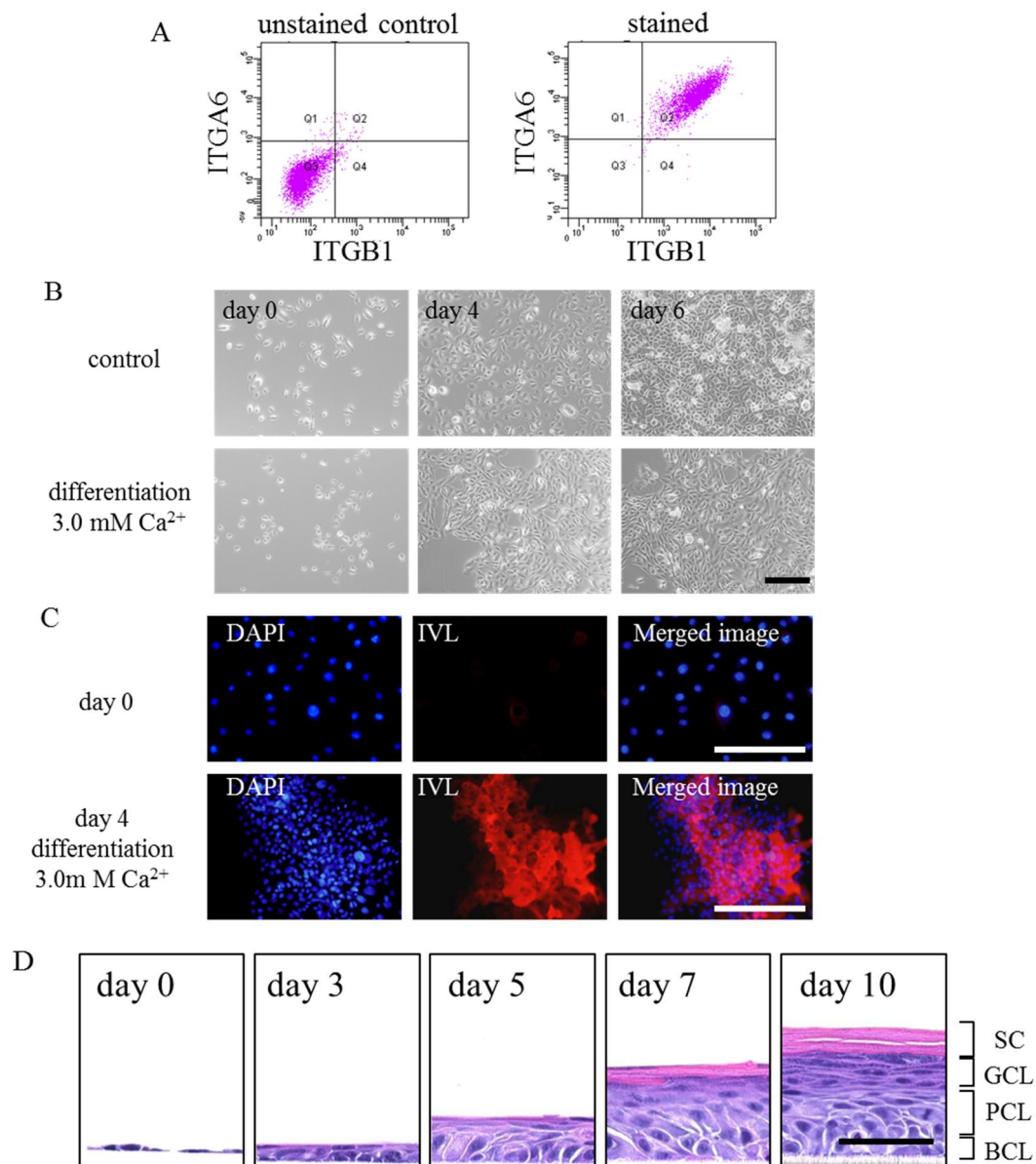


図9 HDK1の分化誘導と三次元培養表皮の作製

(A) HDK1における幹細胞マーカーの発現解析。フローサイトメーターを用いて、ITGB1及びITGA6の発現解析を行った。(B) HDK1の分化過程の画像(平面培養)。HDK1をカルシウムイオン濃度を3.0 mMまで上昇させたKFSMで培養することにより分化誘導を行った。(C) HDK1におけるIVLの発現解析(平面培養)。分化誘導4日目において、免疫染色によりIVLの発現を確認した。(D) HDK1の三次元培養。三次元培養表皮作成後に組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

Scale bar: B, C=200 μ m, D=50 μ m

(SC, stratum corneum; GCL, granular cell layer; PCL, prickle cell layer; BCL, basal cell layer)

まず、平面培養下における HDK1 の分化誘導に伴う ZIP2 の発現変化をリアルタイム PCR により解析した。その結果、ZIP2 の発現は、分化マーカーである IVL の発現と同様に分化に伴って亢進することが明らかとなった(図 10A)。また、亜鉛イオン特異的な蛍光指示薬 FluoZin-3 (Kd for $Zn^{2+}=15$ nM) で細胞を染色した結果、分化に伴う細胞内亜鉛イオン濃度の上昇が確認された(図 10B, C)。本研究で用いた KSFM 培地には約 $0.5 \mu M$ の亜鉛イオンが含まれているため(32)、培地中の亜鉛イオンが細胞内に取り込まれたと考えられる。なお、ヒト血清中における亜鉛イオンの生理学的濃度は $2\sim 15 \mu M$ との報告がある(33)。

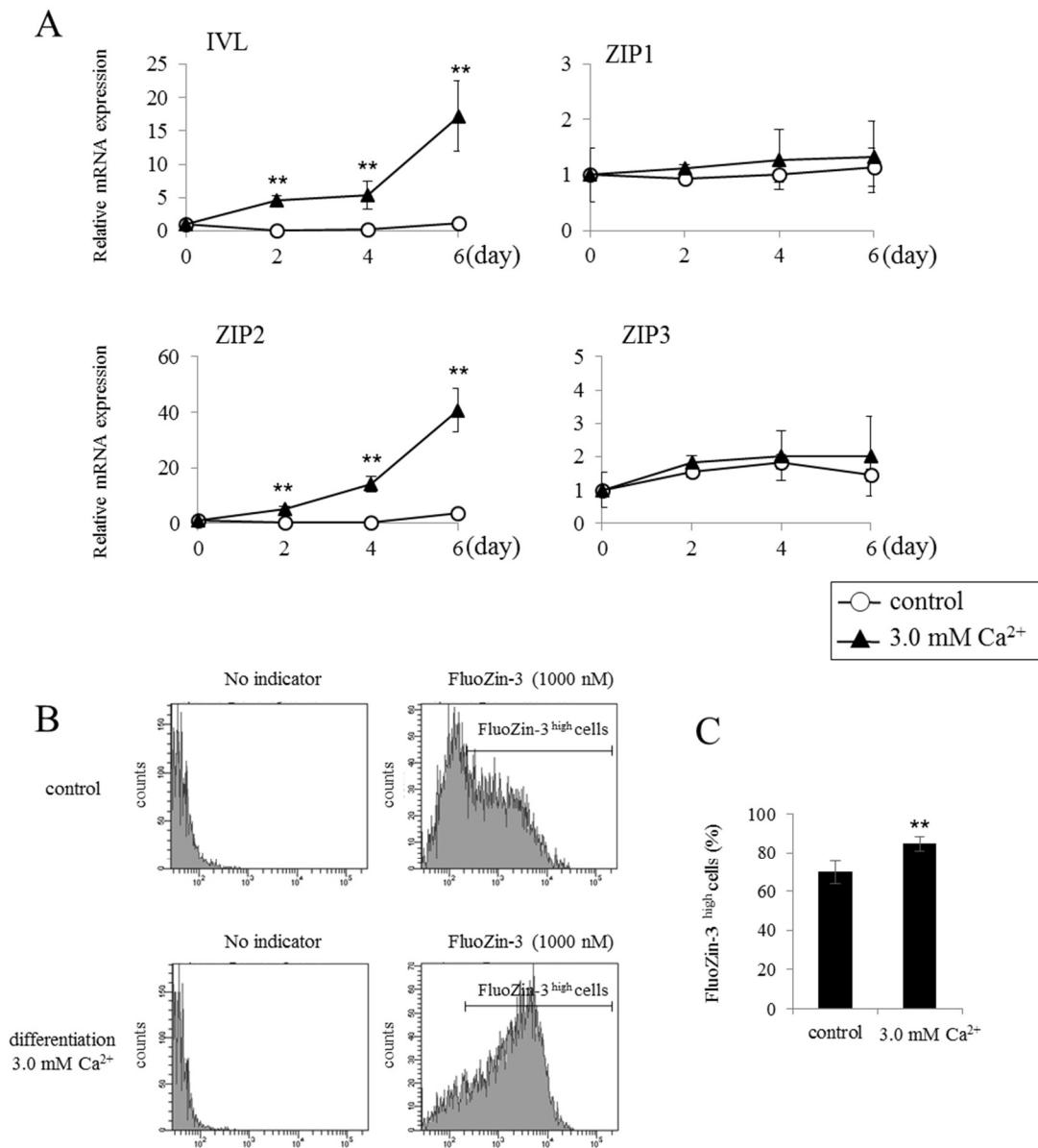


図 10 HDK1 の分化に伴う ZIP2 の発現変化の解析

(A) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析。ZIP2 は、IVL と同様 HDK1 の分化に伴って発現が亢進した。なお、ZIP1, 3 に関しては、変化がなかった。day 0 における各遺伝子の発現量を 1 として比較を行った。(B, C) 細胞内亜鉛イオン濃度の解析 (フローサイトメーター)。4 日間の分化誘導により、細胞内亜鉛イオン濃度が高い細胞 (FluoZin-3^{high} cells) の割合が増加した。Data are expressed as the mean \pm SD of the three experiments. **P < 0.01, compared with the control.

3-5 : ZIP2 の発現抑制がケラチノサイトの分化に及ぼす影響の解析

ケラチノサイトの分化における ZIP2 の役割をより詳細に明らかにするために、siRNA による発現抑制 (knock down, KD) を行った HDK1 の分化状態を解析した。その結果、ZIP2 の siRNA 処理 (ZIP2 KD 群) では、negative control 群 (NC 群) に比較して IVL の顕著な発現抑制及び細胞内亜鉛イオン濃度の減少が確認された (図 11A-C)。一方で、通常の KSMF 培地に含まれる亜鉛イオン濃度 (約 0.5 μ M) に対して過剰量の亜鉛 (ZnCl₂, 50 μ M) を ZIP2 KD 群に対して添加することで IVL の発現が回復することが確認された (図 11D)。また、HDK1 の分化誘導に伴う細胞の凝集は、ZIP2 KD により阻害されるが、これについても過剰量の亜鉛を添加することにより回復することが明らかとなった (図 11E)。以上の結果から、ZIP2 及びそれによって取り込まれた亜鉛はケラチノサイトの分化に関与することが示された。なお、過剰量の亜鉛イオンによって、ZIP2 KD の影響から回復する具体的なメカニズムは明らかではないが、siRNA により阻害されきらなかった ZIP2 や ZIP2 以外の亜鉛トランスポーター (ZIP1 や ZIP3 等) などを通して亜鉛イオンが細胞内に流入した可能性が考えられる。詳細については、今後さらなる解析が必要である。

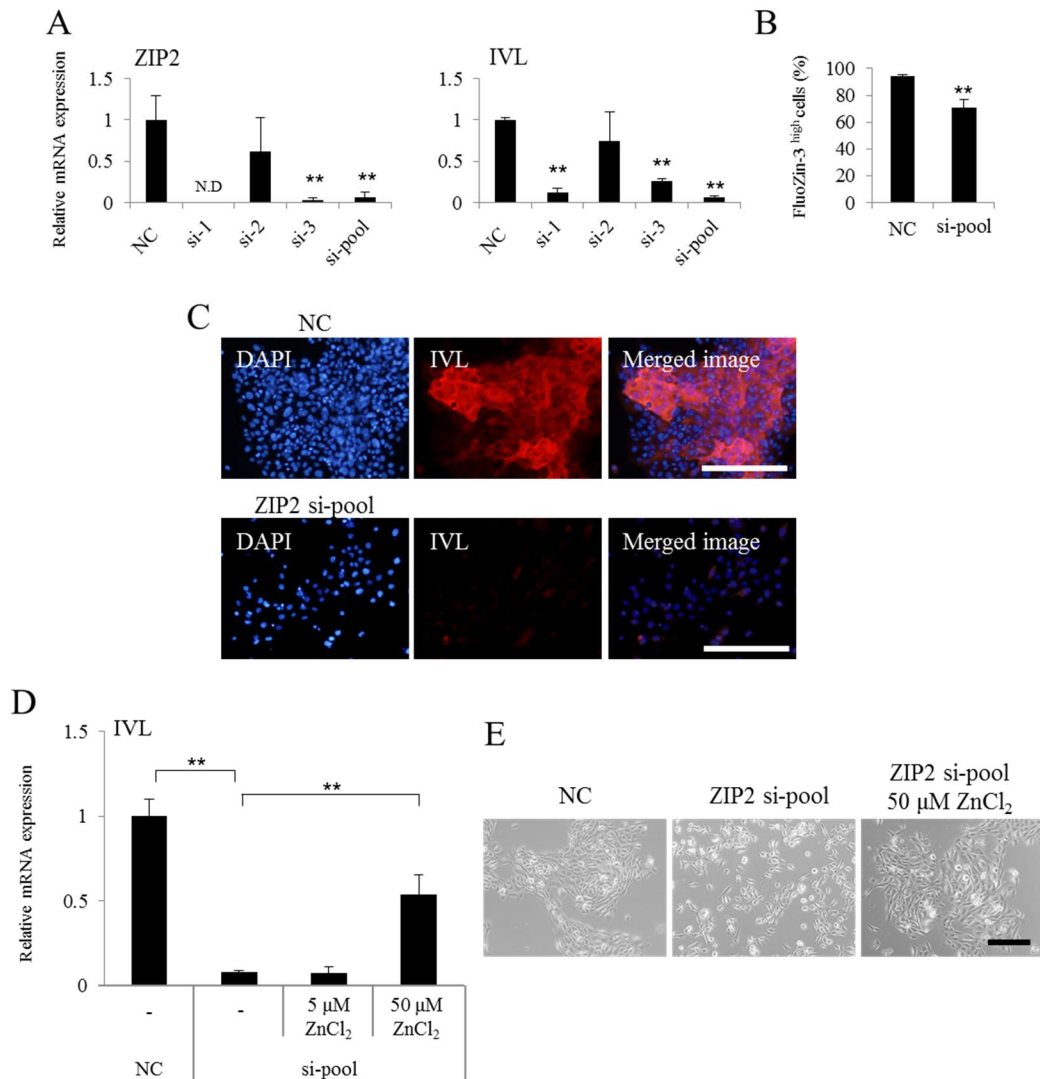


図 11 ZIP2 の発現抑制が HDK1 の分化に及ぼす影響（平面培養）

(A) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析。ZIP2 を KD した HDK1 細胞を分化誘導した。NC 群に比較して、ZIP2 の KD 群では、IVL の発現低下が確認された。NC における ZIP2 の発現量を 1 として比較を行った。なお、si-pool においては、si-1, 2 及び 3 を混合し、全体として 20 nM になるように調整したものをを用いた。(B) 細胞内亜鉛イオン濃度の解析。分化誘導後の細胞内亜鉛イオン濃度は、ZIP2 KD 群で有意に低下していた。(C) HDK1 における IVL の発現解析。ZIP2 KD 群では分化誘導に伴う IVL の発現亢進が抑制されていた。(D) 過剰量の亜鉛添加による影響の解析。50 μM の ZnCl₂ の添加により、ZIP2 KD により低下した IVL の発現が回復した。NC における各遺伝子の発現量を 1 として比較を行った。(E) 細胞形態の観察。ZIP2 の KD により、分化に伴う細胞の凝集が観察されなくなるが、過剰量の亜鉛の添加により細胞の凝集が観察された。Scale bar=200 μm. Data are expressed as the mean ± SD of the three experiments. ** P < 0.01, compared with the NC.

次に、ZIP2 が表皮の三次元的な形成（ターンオーバー）に及ぼす役割を明らかにするために、HDK1 を用いて三次元培養表皮を作成し、ZIP2 の KD の及ぼす影響を解析した。その結果、NC 群においては、基底層マーカー（ケラチノサイトの未分化マーカー）の KRT14 の発現は、三次元培養表皮の最下層に一層確認されるが、ZIP2 KD 群においては、その発現領域が拡大することが明らかとなった（図 12A）。一方で、分化マーカー-IVL の発現領域は NC 群に比較して KD 群では減少することが明らかとなった（図 12B）。さらに、ZIP2 を KD した三次元培養表皮においては、角化が不完全となり（不全角化）、角層の細胞にも核が確認された（図 12A, B）。以上の結果から、ZIP2 及び亜鉛は、表皮の正常なターンオーバーにも必要であることが示唆された。

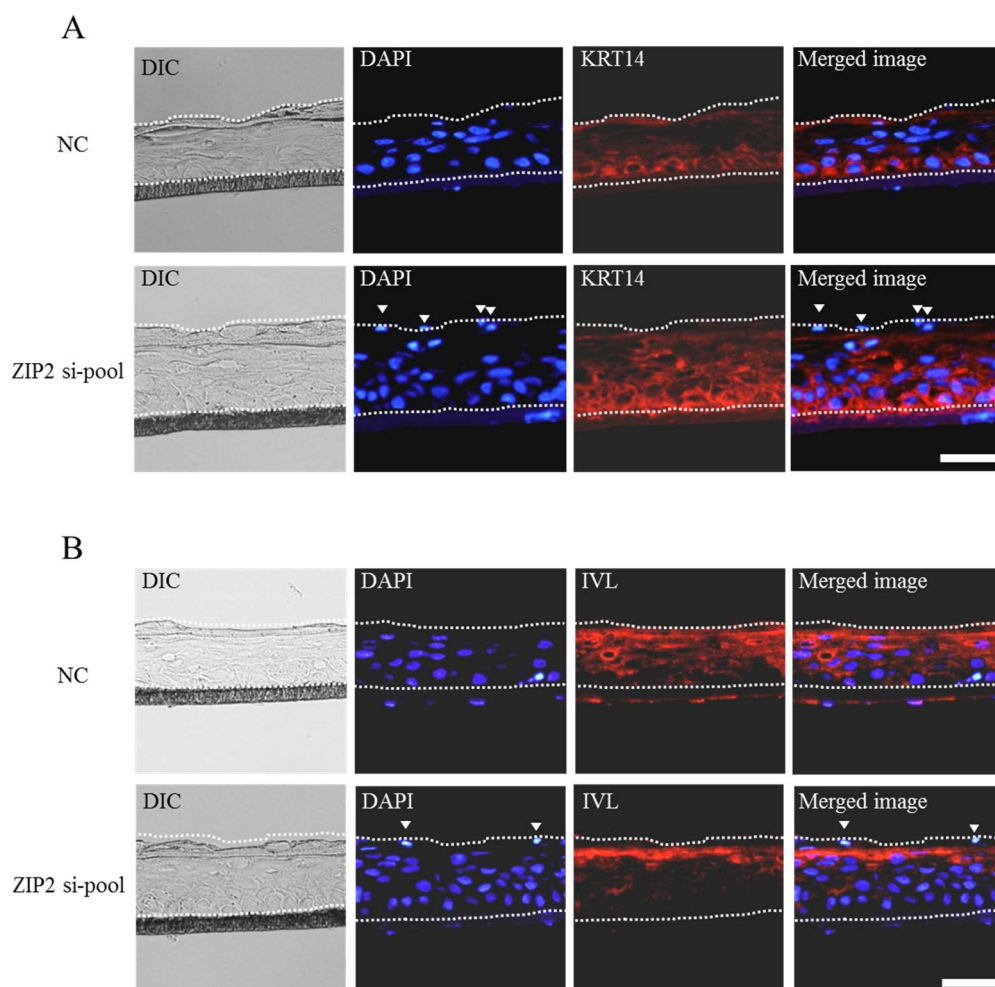


図 12 ZIP2 の発現抑制が表皮の形成に及ぼす影響の解析。

(A) 未分化マーカー-KRT14 の発現解析。NC 群では、KRT14 の発現は、表皮層の最下層にのみ確認される。一方で、ZIP2 KD 群では、その発現領域が拡大した。(B) 分化マーカー-IVL の発現解析。NC 群の三次元培養表皮に比較して、KD 群では、IVL の発現領域が減少した。矢頭=不全角化 Scale bar: A,B=50 μ m

3-6：まとめ

これまでの研究により、亜鉛が表皮組織に多く蓄積していることやケラチノサイトの機能に重要な役割を果たしていることが知られていたが、その特異的なトランスポーターについては解析が十分ではなかった。本研究では亜鉛トランスポーターの中でも特に ZIP2 に着目しその詳細な機能解析を行った。その結果、ZIP2 は表皮組織において分化が進行した上層のケラチノサイト特異的に発現することが明らかとなった。また、*in vitro* 表皮幹細胞分化誘導モデルにおいても、分化の進行に伴う ZIP2 の発現亢進が確認された。さらに、ZIP2 の siRNA による発現抑制によりケラチノサイトの分化や表皮ターンオーバーが阻害されることが明らかとなった。このことから、表皮層特異的に発現する ZIP2 やそれによって取り込まれた亜鉛は、ケラチノサイトの分化や表皮のターンオーバーに大きく関与することが示唆された。一方で、ZIP2 及びそれによって取り込まれた亜鉛の下流で働く具体的な因子については未だ明らかではない。亜鉛は、様々な転写因子や酵素等のタンパク質の立体構造の維持に働くことが知られている。そのため、ZIP2 により細胞内に取り込まれた亜鉛イオンが、ケラチノサイトの分化に関連する亜鉛要求性の転写因子等の機能に関与した可能性が考えられる。実際、亜鉛要求性転写因子の一つである KLF4 は、表皮組織において、ZIP2 と同様分化を開始したケラチノサイトで発現することが知られている(34)。さらに、興味深いことに KLF4 を siRNA により knock down すると、ZIP2 を knock down した場合と同様に IVL の発現が抑制され、三次元培養表皮の正常な形成も阻害されることが示されている(35)。このことから、ZIP2 の下流には、KLF4 のような亜鉛要求性で、かつ、ケラチノサイトの分化を制御するタンパク質の存在が予測される。また、今回は細胞膜に存在し細胞外から細胞内への亜鉛の取込みに関与する ZIP (Zip1-6, 8, 10 及び 14) に着目して研究を行ったが、その他の ZIP 及び排出に関わる Znt に関してもケラチノサイトの分化に影響を及ぼす可能性がある。今後、亜鉛トランスポーターの表皮に及ぼす作用メカニズムのさらなる解明や、その機能を制御する化合物の探索が進むことにより、皮膚の新しい抗老化理論の構築や、各種皮膚疾患の治療法の開発に繋がることが期待される。

第4章 メラノサイトの分化に及ぼすレチノイン酸の影響の解析

4-1: 序

メラノサイトは、メラニン色素を生成し、これにより皮膚や毛髪の色を決めている細胞である。メラノサイトの発生は、神経管から派生する神経堤細胞を起源としており、この神経堤細胞は、その後の発生段階に応じて組織を移動し、様々な細胞に分化しつつ最終的に目的組織に定着すると考えられている。この時、移動経路は大きく腹側の移動経路と背側の移動経路に分けられるが、将来メラノサイトに分化する神経堤細胞は主に背側の移動経路をとることが報告されている(36)(図13)。さらに、この細胞は、真皮及び表皮内を移動しながら最終的に毛包又は表皮の基底層に定着することが明らかとなっている。また、毛包内のバルジ領域付近において、メラノサイトの起源となる幹細胞として“色素幹細胞”の存在が確認されている(3)。色素幹細胞は、必要に応じて増殖するとともに分化し、メラノサイトの前駆細胞であるメラノブラストを経て、最終的にメラニン生成能を有した成熟メラノサイトを表皮や毛母に供給していると考えられている(3-5)。そして、成熟メラノサイトは、自らが生成したメラニンを近傍のケラチノサイトへと受け渡すことで紫外線などからの防御機能を担っているとされている。

これまでの研究により、メラノサイトの増殖や分化及びメラニン生成に影響を与える化合物としてレチノイン酸(Retinoic acid, RA)が知られている。RAはビタミンAの一種であり、様々な細胞の増殖や分化及び組織の恒常性維持に関わっている(37, 38)。ヒト血液中のビタミンAは、ほとんどがレチノールであり(血中濃度はヒトでは1~2 μM)、血液循環によって各組織へ運ばれたレチノールは、細胞内に取り込まれた後、レチノールを経てRAに変換される。RAは、核内受容体であるretinoic acid receptor (RAR)とretinoid X receptor (RXR)を介して標的遺伝子の転写活性を調節する(39)。過去の研究により、RAはメラノーマ細胞やメラノサイトのメラニン産生を促進することが報告されている(40-42)。さらに、RAのヒト皮膚への塗布は、メラニン合成酵素であるTYRの発現を促進することも示されている(43)。一方で、これらの報告とは反対に、RAは紫外線やcAMP経路を促進するような因子等の影響によりメラニン生成が亢進したメラノサイトやメラノーマ細胞に対しては、TYRの発現を抑制し、メラニン生成を抑制することが知られている(41, 44, 45)。また、ヒト皮膚の色素過剰部位に局所塗布した場合は、その症状を改善することも報告されている(46-48)。このように、RAはメラニン生成の促進と抑制という二面的な効果を示すが、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない(表8)。

そこで、本研究では、マウス胚性幹細胞(embryonic stem cell, ESC)からメラノサイトへの分化誘導系を用いて、メラノサイトの発生から成熟に至るまでの全ての過程を通じてRAの及ぼす影響について詳細な解析を行った。

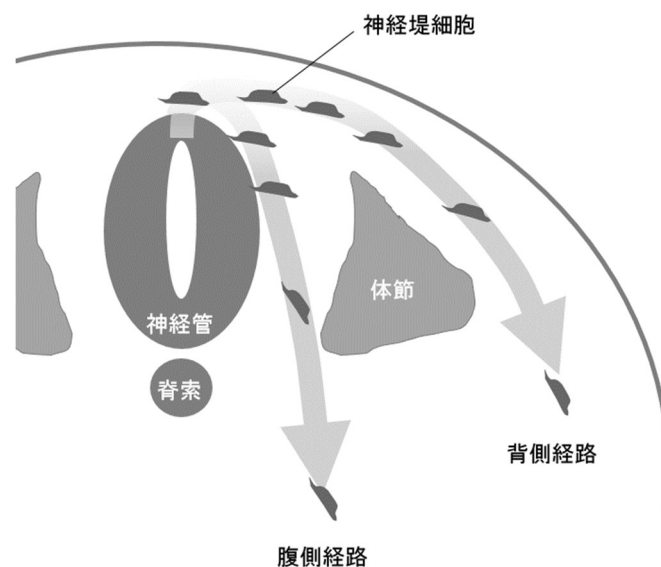


図 13 メラノサイトの発生過程

メラノサイトは、神経管から派生する神経堤細胞を起源としている。神経堤細胞は、メラノサイト以外にも神経細胞、シュワン細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞など多様な細胞種に分化する。将来メラノサイトに分化する神経堤細胞は、主に背側の移動経路をとることが知られている。

	メラニン合成又は 関連遺伝子発現に及ぼす効果	細胞種又は組織	培地への添加濃度	文献番号
<i>in vitro</i>	促進 ↑	マウスメラノーマ細胞	10 μ M	40
	促進 ↑	マウスメラノーマ細胞	1 μ M	41
	促進 ↑	ヒト正常メラノサイト	1, 10, 100 nM	42
	抑制 ↓	マウスメラノーマ細胞・ヒト正常メラノサイト	1 μ M	41
	抑制 ↓	マウスメラノーマ細胞	5, 10, 20 μ M	44
	抑制 ↓	マウスメラノーマ細胞	1 μ M	45
<i>in vivo</i>	促進 ↑	ヒト皮膚	-	43
	抑制 ↓	ヒト皮膚	-	46
	抑制 ↓	ヒト皮膚	-	47
	抑制 ↓	ヒト皮膚	-	48

表 8 RA がメラニン生成又は関連遺伝子発現に及ぼす影響に関する報告

4-2 : ESC からメラノサイトへの分化誘導系の構築

本研究においては、Yamane らの方法を参考にマウス ESC からメラノサイトへの分化誘導系を構築した(49)。顕微鏡観察の結果、分化誘導 18 日目には色素を有したメラノサイトが誘導されることが確認された(図 14A)。また、免疫染色の結果、ESC の未分化マーカーである SSEA-1 の分化誘導に伴う発現減少が確認され(図 14B)、分化誘導 24 日目にはメラノサイトの分化マーカーである TYRP1 の発現が確認された(図 14C)

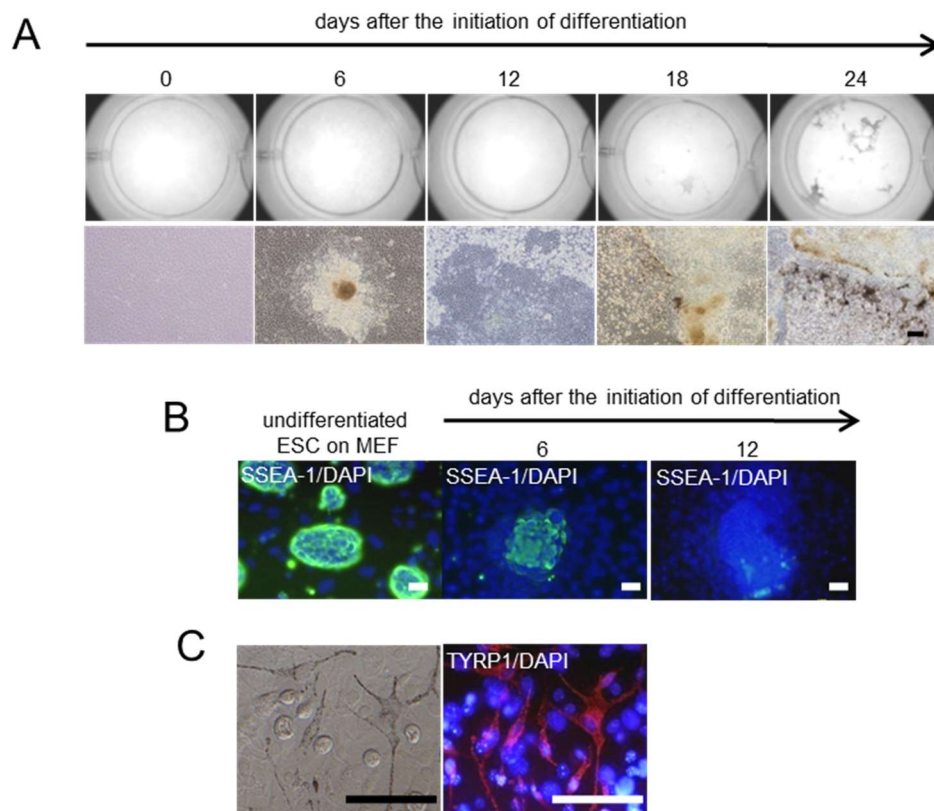


図 14 ESC からメラノサイトへの分化誘導

(A) 分化誘導後 0, 6, 12, 18, 24 日目のシャーレの写真(上図)、及び光学顕微鏡写真(下図)。500 個の ESC を ST2 細胞上に播種し(12 well plate)、分化誘導培地で 24 日間分化誘導を行った。(B) SSEA-1 の免疫染色画像。未分化マーカー SSEA-1 は ESC の分化に伴って発現が消失した。

(C) TYRP1 の免疫染色画像。ESC から分化誘導 24 日目のメラノサイトを分化マーカー TYRP1 に対する抗体で染色した。Scale bar : A=200 μ m ; B, C=50 μ m.

4-3 : メラノサイトの分化に伴う遺伝子発現変化の解析

先に示した 24 日間の分化において、メラノサイトの段階的な分化の進行を確認するために、分化誘導後 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 日目において mRNA を回収し、メラノサイトの分化マーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。また、細胞あたりのメラニン生成量についても同時に測定を行った。その結果、ESC の未分化マーカー(Nanog, Oct3/4)は、分化誘導に伴って発現が低下した。一方で、神経堤細胞マーカー(Sox9, Ngfr, Pax3, Sox10)は 3-9 日目から発現の上昇が確認され、メラノサイトのマスター遺伝子である Mitf-m 及びメラニン合成に関わる遺伝子 Tyr, Dct 及び Tyrp1 は、12-15 日目から発現の上昇が確認された。さらに、メラニン生成については、18 日目から 24 日目にかけて顕著に亢進することが確認された (図 15)。

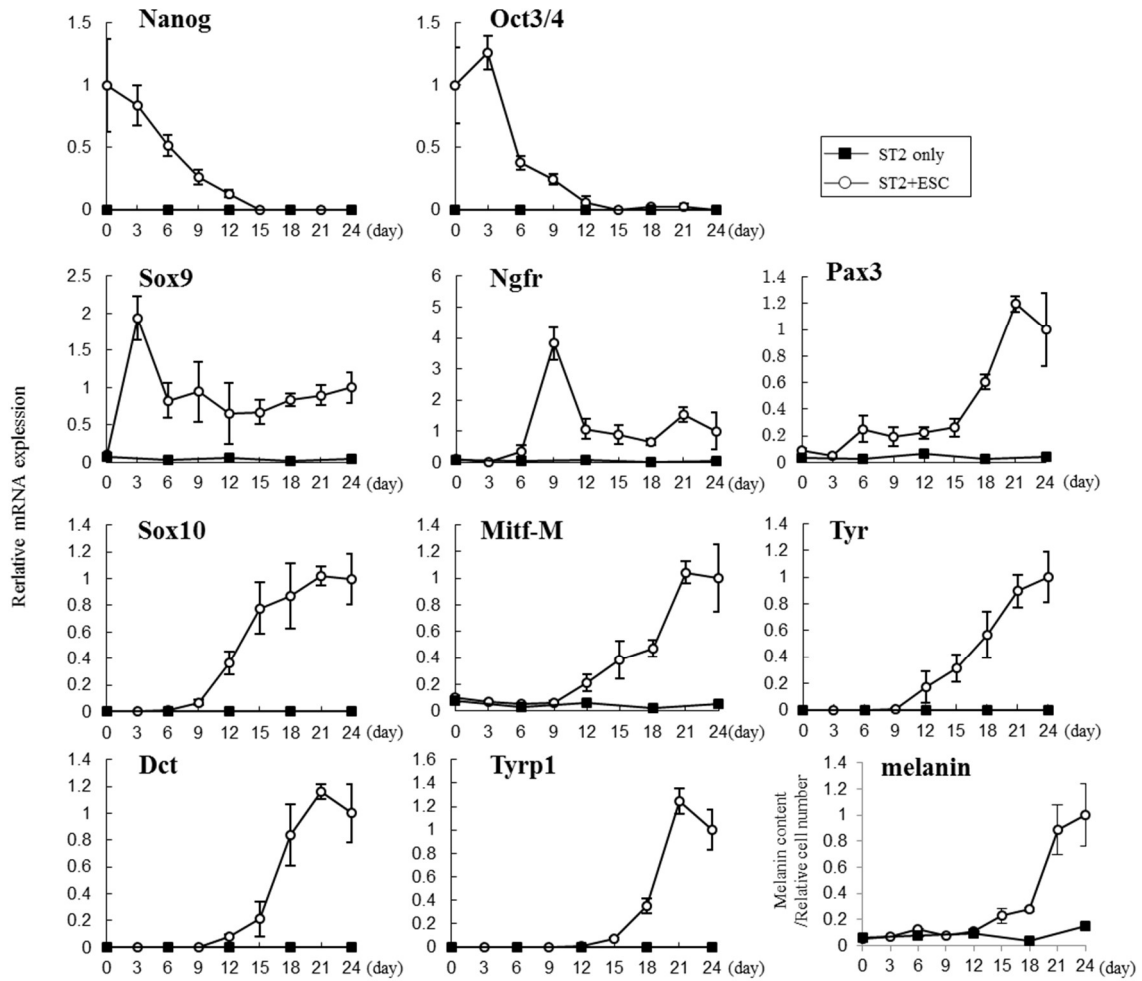


図 15 メラノサイトの分化に伴う遺伝子の発現変化の解析

(A) リアルタイム PCR による遺伝子発現解析及びメラニン定量。分化誘導に伴い、ESC の未分化マーカーの発現低下が確認され、一方で、神経堤細胞及びメラノサイトの分化マーカーの発現やメラニン生成量の増加が確認された。day 24 における各遺伝子の発現量を 1 として比較を行った。Nanog と Oct3/4 については、day 0 における遺伝子の発現量を 1 として比較を行った。

Data represent the mean \pm SD of three experiments.

Symbols: closed squares; ST2 only (negative control) , open circles; ESC+ST2

以上の結果から、本分化誘導系においては、いくつかの分化段階を経てメラノサイトへの分化が進行すると考えられた。具体的には、Sox9, Pax3 (神経堤細胞マーカー) が検出された 6 日目までには神経堤細胞への分化が進行しており、Mitf-m や Tyr 及び Dct の発現が確認されはじめた 12 日目までには、メラノblastへの分化が進行していると考えられた。さらに、誘導後 18 日目には、メラニン色素を生成可能なメラノサイトが出現し始め、18~24 日目にかけてそれらがさらに成熟すると考えられた (図 16)。マウスの発生に

において、神経堤細胞は胎生 9～9.5 日で神経管から剥離し遊走を開始する。そして、メラノブラストマーカは、胎生 10.5～11 日以降に発現し、さらに胎生 16.5 日には表皮に定着し始め、メラニン色素を生成可能なメラノサイトへと分化することが知られている(36)。本分化誘導系においても、生体のメラノサイトに近い発生・分化段階を経ていると考えられる。

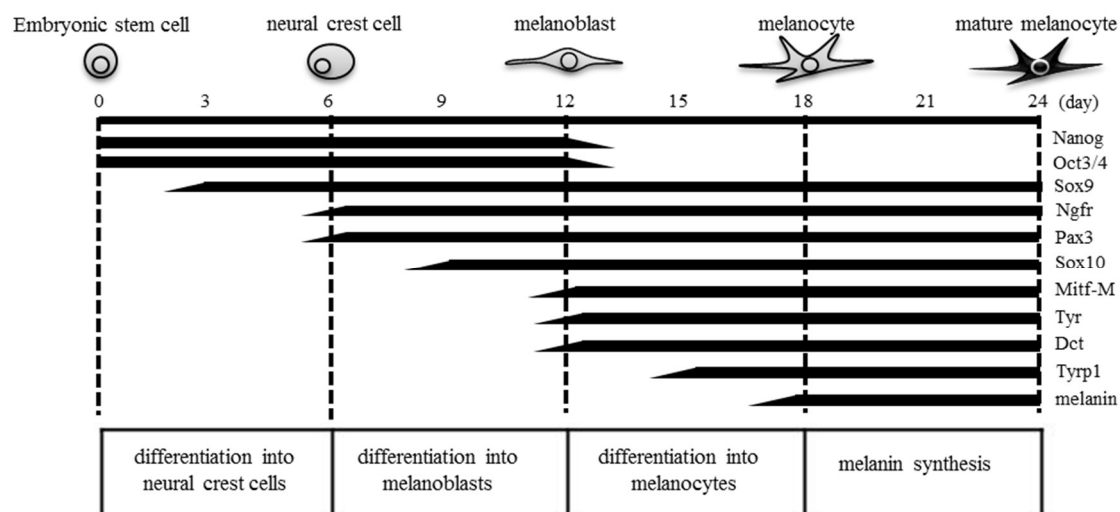


図 16 メラノサイトの分化過程の模式図

ESC からメラノサイトへの分化は段階的に進行する。

Embryonic stem cell: 胚性幹細胞、neural crest cell: 神経堤細胞、melanoblast: メラノブラスト、melanocyte: メラノサイト、mature melanocyte: 成熟メラノサイト

4-4: メラノサイトの各分化段階に及ぼす RA の影響の解析 (メラニン生成能)

次に、本分化誘導系に RA を 1, 10, 100 nM の濃度で 24 日間継続して添加し、分化誘導後にメラニン生成量の定量を行った。その結果、RA は濃度依存的に最終的なメラニン生成量を促進することが明らかとなった(図 17)。

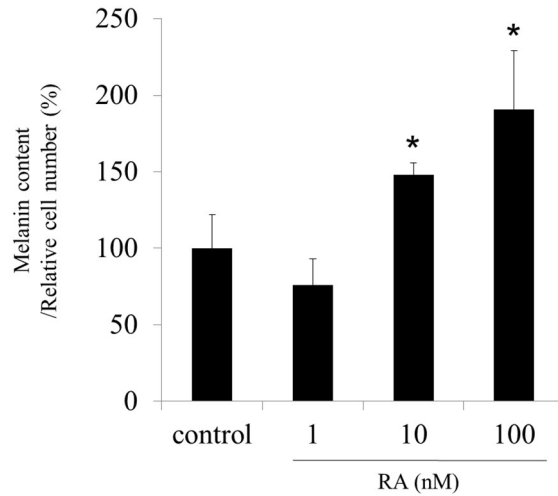


図 17 RA の継続的な添加が誘導 24 日後のメラニン生成量に及ぼす影響の解析

各濃度の RA を 24 日間継続的に添加し、分化誘導後にメラニン生成量及び相対細胞数の定量を行った。control におけるメラニン生成量を 100%としてとして比較を行った。

Data represent the mean \pm SD of three experiments. *P < 0.05

次に、RA がメラノサイトの各分化段階に及ぼす影響を詳細に解析した。具体的には、①幹細胞から神経堤細胞への分化 (0-6 日目)、②神経堤細胞からメラノblastへの分化(6-12 日目)、③メラノblastからメラノサイトへの分化(12-18 日目)、④メラニン生成期間 (18-24 日目)、の各段階に 100 nM の RA を添加し、分化誘導 24 日目にメラニン定量を実施した (図 18)。

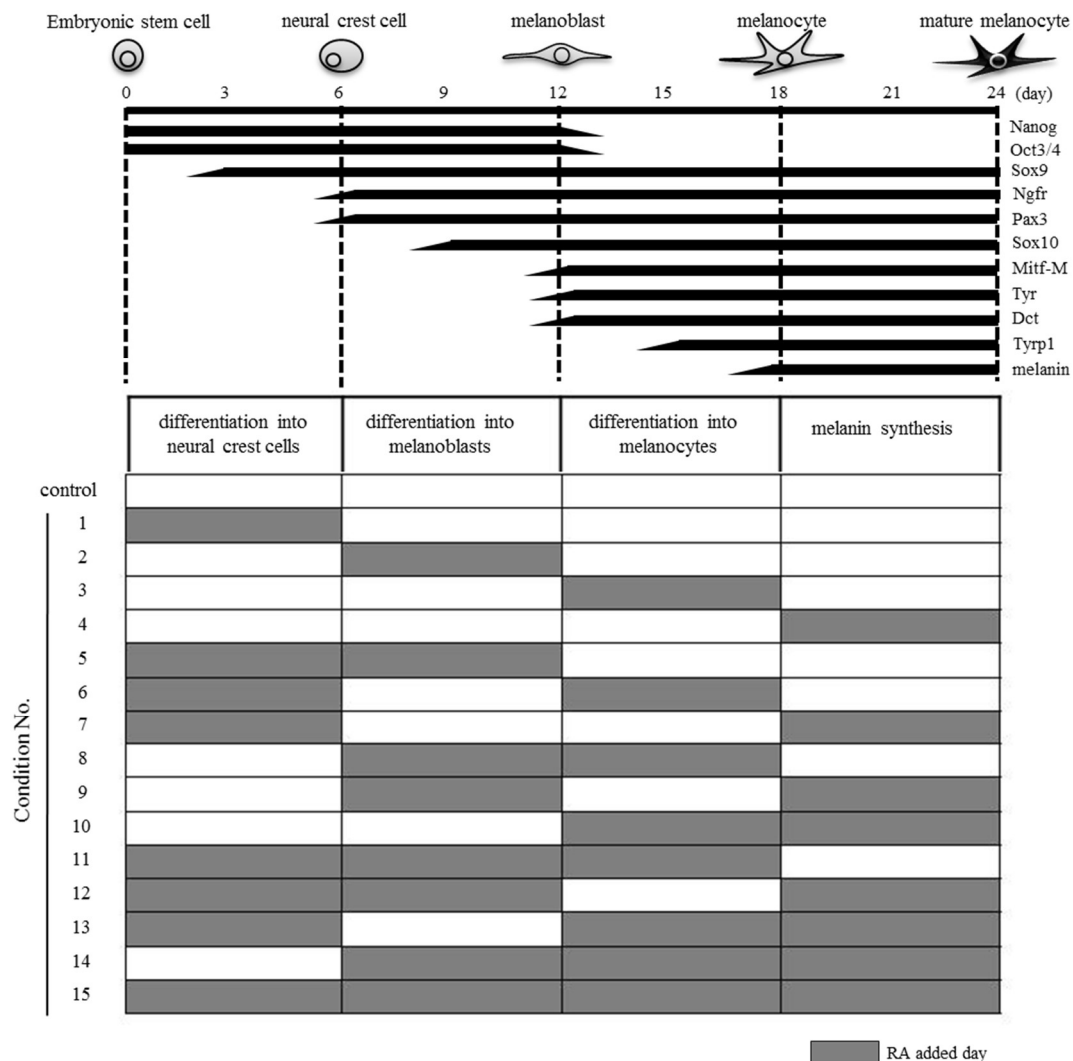


図 18 RA 添加のタイムスケジュールの模式図

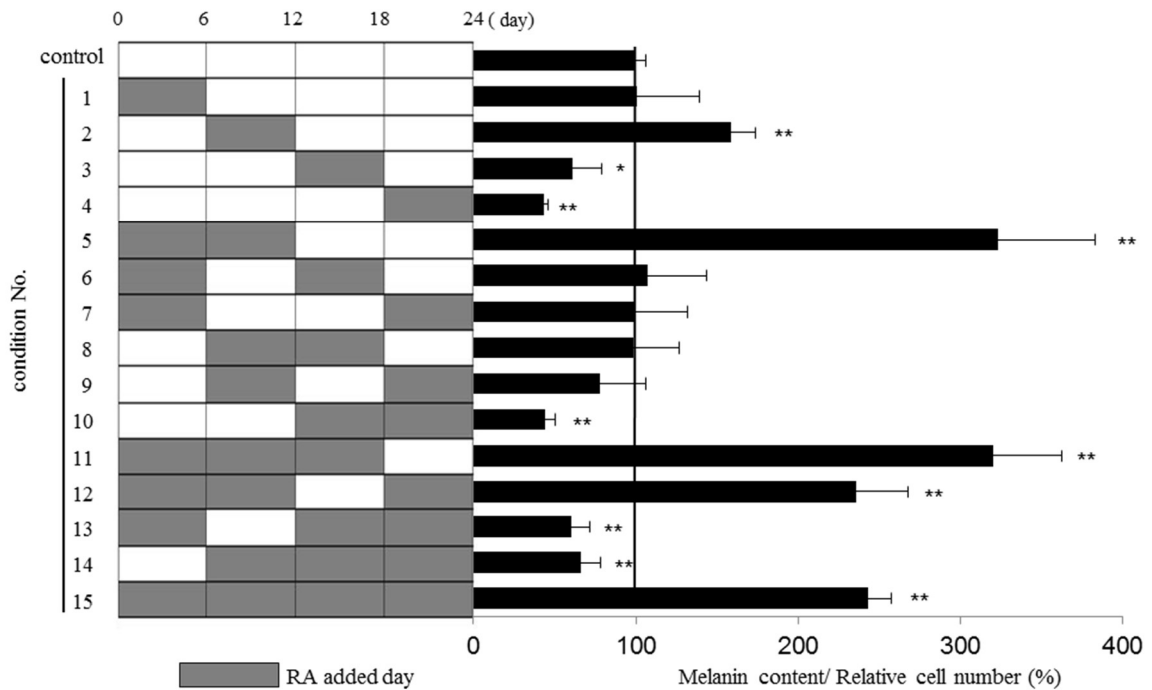
ESC からメラノサイトへの分化誘導系の各段階に 100 nM の RA を添加し、24 日目にメラニン定量を実施した。

その結果、興味深いことに RA は、添加する時期によりメラノサイトに及ぼす影響が大きく異なることが明らかとなった (図 19A)。すなわち、上記②の期間に添加した場合には、最終的なメラニン生成能が促進され (Condition no. 2)、特に①②継続して添加した場合にその効果は顕著であった (Condition no. 5)。一方で、③や④の期間に添加した場合には逆に最終的なメラニン生成能は抑制された (Condition no. 3, 4, 10)。以上の結果から、RA は、メラノサイトの分化の前半 (①、②: 幹細胞からメラノブラストに至る期間) においては、促進効果を示し、一方で後半 (③、④: メラノブラストから成熟メラノサイトに至る期間) においては抑制効果を示すことが明らかとなった。また、この効果は R

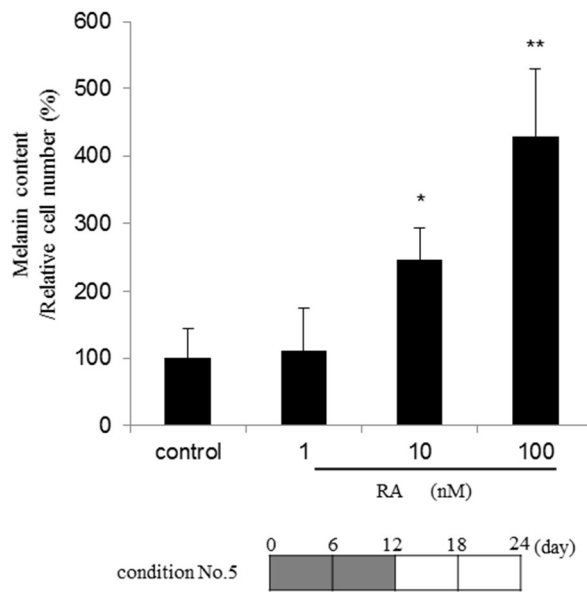
A の濃度依存的であることも確認された (図 19B, C)。

なお、①又は②の期間単独添加(Condition no. 1 又は 2)に比較して、①②の期間継続添加した場合(Condition no. 5)に最終的なメラニン生成量が顕著に促進された原因は、現在のところ明らかではない。一つの可能性として、RA の有するメラノサイト促進効果が顕著に働く期間が誘導後 6 日目以前から始まっている可能性が考えられる。本研究では、メラノサイトの分化段階を 6 日ごとの計 4 つのステージに分割して定義したが、RA の添加する日数をさらに細かく分けることで(例えば 3 日ごと)、RA がメラノサイトの分化促進、抑制に最も効果を示すより詳細な期間が明らかになると考えられる。

A



B



C

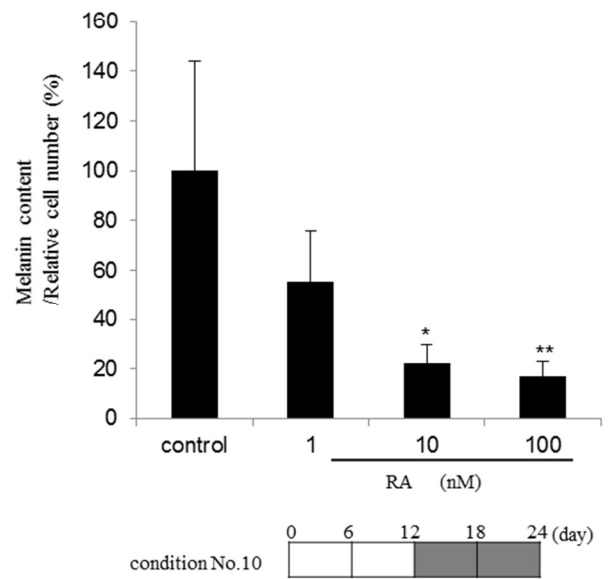


図 19 各分化段階に添加した RA が誘導 24 日後のメラニン生成量に及ぼす影響の解析

(A) 各段階に RA (100 nM) を添加し、誘導 24 日目にメラニン生成量及び相対細胞数の定量を行った。

(B, C) Condition No. 5 及び 10 におけるメラニン生成の促進効果及び抑制効果は、RA の濃度依存的であった。control におけるメラニン生成量を 100% としてとして比較を行った。Data represent the mean \pm S D of three experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4-5: メラノサイトの各分化段階に及ぼす RA の影響の解析 (遺伝子発現解析)

最後に、メラノサイトに対して顕著な分化促進効果と抑制効果を示した Condition no. 5 と 10 について分化マーカーの遺伝子発現解析を行った。その結果、分化の前半に RA を添加した Condition no. 5 では解析した全ての分化マーカーの発現上昇が確認された (図 20A, B)。一方で、分化の後半に RA を添加した Condition no. 10 では多くの遺伝子 (Sox 9, Ngfr を除く) の発現低下が確認された (図 20A, C)。

以上の結果からも、RA はメラノサイトの分化が未熟な段階においては、分化促進効果を示す一方で、分化の後半においては抑制効果を示すことが明らかとなった。

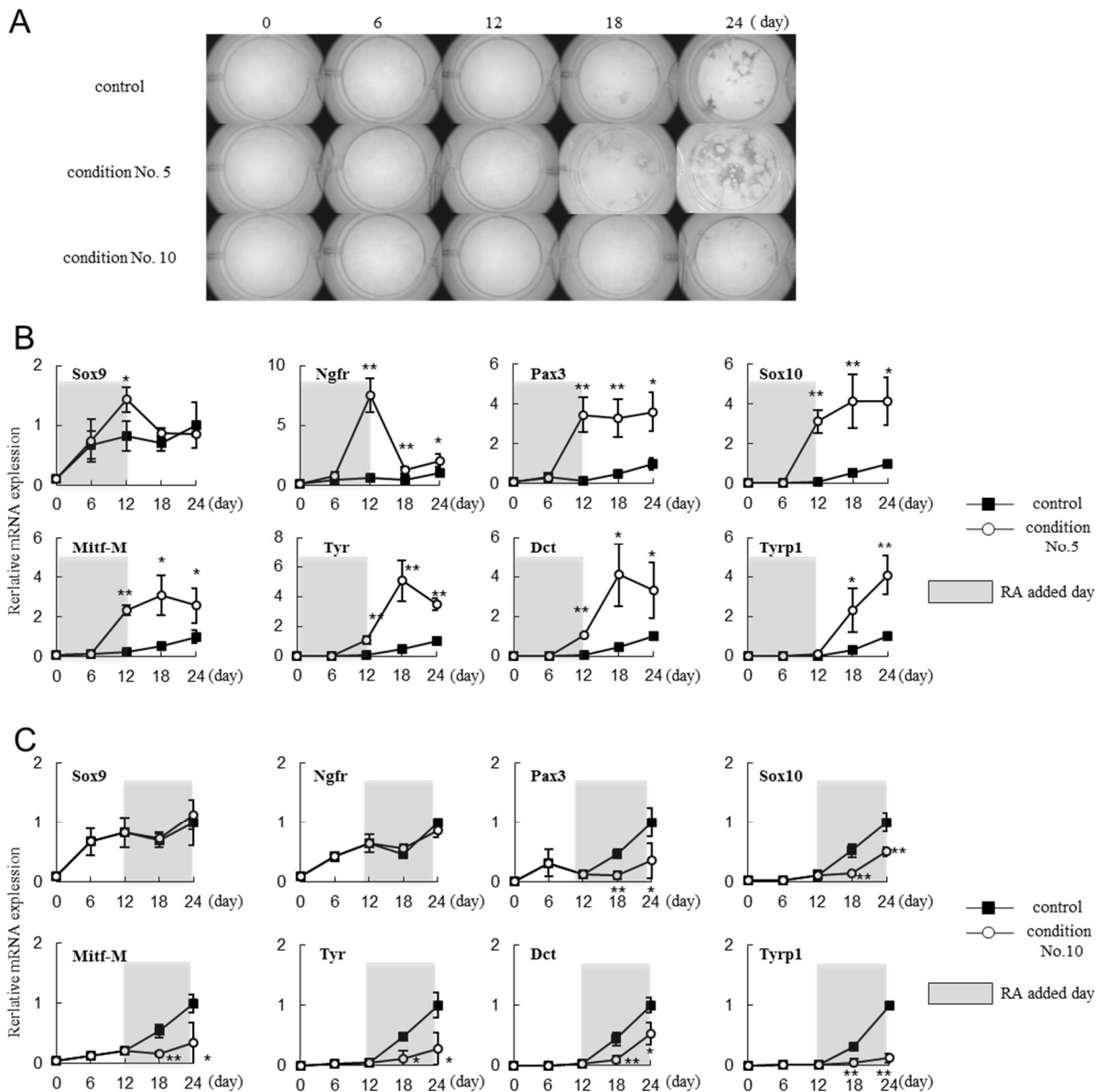


図 20 分化の前半及び後半に添加した RA がマーカー遺伝子の発現に与える影響の解析

(A)各条件における分化誘導 24 日目のシャーレの写真。(B, C)各条件におけるリアルタイム PCR によるメラノサイトマーカー遺伝子の発現変化。分化誘導後 0, 6, 12, 18, 24 日において RNA を回収して神経堤細胞及びメラノサイトの分化マーカーの発現をリアルタイム PCR により定量した。control(day 24)における各遺伝子の発現量を 1 としてとして比較を行った。なお、B, C 中の control は同一のプロットである。

Data represent the mean \pm SD of three experiments. *P < 0.05, **P < 0.01

4-6: まとめ

これまでの研究により、RA はメラノサイトのメラニン生成に対して二面的な効果を示すことが知られていたが、そのメカニズムは明らかではなかった。本研究では、メラノサイトの発生から成熟に至るまでの全ての過程を通じて RA の及ぼす影響について詳細な解析を行った。その結果、RA の効果はメラノサイトの分化段階によって大きく異なることが初めて明らかとなった。すなわち、RA はメラノサイトの分化の初期段階（幹細胞からメラノブラストになる段階）においては分化を顕著に促進する一方で、後期段階（メラノブラストから成熟メラノサイトに至る段階）においては抑制することが分かった。過去の研究において、RA は未分化なマウス ESC に作用して神経堤細胞への分化を促進することが知られている(50)。また、マウスの神経堤細胞由来不死化細胞株を用いた研究では、RA が PKC α 及びその下流の Mitf-m の発現を促進し、神経堤細胞からメラノサイトへの分化を促進することが報告されている(51)。本研究における分化誘導系においても、初期分化段階においては同様の現象の関与が予想される。一方で、RA は、メラニン生成が亢進したメラノサイトにおいて、Mitf-m の上流に存在する cAMP 経路の抑制を介して各種メラニン酵素の遺伝子発現を抑制することが知られている(44)。また、RA は、紫外線によりメラニン生成が刺激されたメラノサイトにおいて、各種メラニン合成酵素の遺伝子発現や活性を抑制することが報告されている(41)。したがって、本分化誘導系においても、各種メラニン合成酵素の遺伝子発現や活性が亢進し始めた分化後期においては、cAMP 経路の抑制などを通じて分化やメラニン生成を抑制した可能性が考えられる(表 9)。これまでの研究では、個々の研究者が、多様な条件で培養されたメラノサイトを用いて RA の効果を確認していたため、統一した見解を得ることが難しかった。一方で、本研究では、一つの培養系の中でメラノサイトの発生から成熟に至るまでの全ての過程を再現し、その全過程に対する RA の効果を詳細に解析した。本研究結果は、これまで詳細が不明であった RA のメラノサイトに対する二面的な効果を説明する上で非常に重要な知見となると考えられる。一方で、メラノサイトは実際のヒトの皮膚（表皮組織）では周辺のケラチノサイトと三次元的かつダイナミックに相互作用しながらその機能を果たしている。そのため、今後、より実際の皮膚に近い状態で RA のメラノサイトに及ぼす影響を解析するためには、ケラチノサイトとメラノサイトを含んだ三次元培養表皮等を用いてその効果をさらに詳細に検証することが望まれる。

効果	本分化誘導系において予測されるRAの作用	文献番号
初期分化に対する促進効果	RAが未分化なESCに作用して神経堤細胞への分化を促進した可能性が考えられる。	50
	RAがPKC α 及びMitf-mの発現を促進し、神経堤細胞からメラノサイトへの分化を促進した可能性が考えられる。	51
後期分化に対する抑制効果	RAがMitf-mの上流に存在するcAMP経路の抑制を介してメラノサイトの分化やメラニン生成を抑制した可能性が考えられる。	44
	RAが各種メラニン合成酵素の遺伝子発現や活性を抑制した可能性が考えられる。	41

表9 RAが各分化段階のメラノサイトに及ぼした影響に関する考察

第5章 三次元培養表皮の3D ライブイメージング技術の開発

5-1：序

表皮組織は分化段階や機能の異なるケラチノサイトが重層化した三次元的な構造をしており、かつ常に増殖と分化を繰り返しダイナミックに変化する組織である。また、表皮組織にはケラチノサイト以外にもメラノサイトやランゲルハンス細胞、メルケル細胞等が存在し、それらは絶えず三次元的に相互作用している(図1)。そのため、表皮組織で起こる様々な現象を正確に解析するためには、組織を三次元かつ生きたまま解析することが重要である。近年、このダイナミックに変化する表皮組織の3D ライブイメージング技術が発達してきている。例えば、Sari Ipponjimaらは核を蛍光タンパク質で可視化できるように遺伝子改変したマウスを多光子顕微鏡で3D ライブイメージングすることにより、基底層におけるケラチノサイトの染色体の微細な形態変化を視覚化している(52)。また、Yokouchiらも、マウスの遺伝子改変技術と多光子顕微鏡を用いた3D ライブイメージングにより表皮顆粒層のタイトジャンクションの動的変化を視覚化している(53)。メラノサイトにおいては、Tad okoroらが、ニワトリ初期胚のメラノサイトを蛍光タンパク質により標識し、表皮組織内で3D ライブイメージングすることにより、メラノサイトからケラチノサイトへのメラノソームの受渡し過程を詳細に観察している(54)。しかしながら、これら実験動物で用いられる遺伝子改変技術やイメージング技術をそのままヒトに用いることは倫理的な観点などからも不可能であるため、ヒト皮膚組織を生きたまま直接的に3D ライブイメージングすることは困難である。

一方、近年、三次元的なヒト表皮モデルを生体外で人工的に作製する様々な方法が確立されており、幅広い研究に用いられている(55, 56)。従来、この人工表皮を作製する際には、主に初代培養のヒトケラチノサイトが用いられていたが、初代培養細胞はヒトの表皮に近似した表皮を作製することができる反面、分裂回数に制限があるため遺伝子導入等を行って安定発現株を得ることが困難であった。この点、本論文第3章で用いたHDK1は、正常な分化能力を維持したまま無限増殖が可能であり、三次元培養により立体的な表皮組織を形成することが可能である(32, 57)。そこで、本研究では、HDK1を蛍光タンパク質発現ベクターの導入により遺伝子改変し、その細胞を用いて三次元培養表皮を作製することにより、ヒト表皮モデルを生きたまま三次元的にイメージングできるモデルの構築を目指した。さらに、本モデルを用いて、ケラチノサイトの分化に伴う細胞やオルガネラのダイナミックな形態変化を観察し、また、皮膚刺激性物質が細胞に与えるダメージや表皮組織のバリア機能に及ぼす影響についても可視化・評価することが可能か検討した。

5-2：蛍光タンパク質発現HDK1を用いた三次元培養表皮の作製

まず、HDK1に蛍光タンパク質mCitrine及びtdTomato発現ベクターを遺伝子導入し、細胞全体をそれぞれの蛍光で標識した細胞を樹立した(C-HDK1, T-HDK1, 図21A)。次に、これ

らの HDK1 を用いて三次元培養表皮を作製し、空気暴露 7 日目に共焦点レーザー顕微鏡で観察を行うことにより、表皮組織を生きたまま三次元的に観察可能であることを確認した(図 21B)。また、C-HDK1 に対して、T-HDK1 を低濃度(0.01%)で混合した後(図 21C)、三次元培養表皮を作製することにより、T-HDK1 のシングルセルイメージングが可能か検討した。空気暴露 7 日目の三次元培養表皮を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、T-HDK1 は、表皮組織の様々な階層に点在しており(基底層: basal cell layer、有棘層: prickle cell layer、顆粒層: granular cell layer、角質層: stratum corneum)、存在する階層によってその形態が大きく変化することが明らかとなった(図 21D)。具体的には、基底層では、細胞が小さく丸い形態をしていた。有棘層では、細胞は少し大きくなり、棘のような構造を有していた。顆粒層、角質層においては、細胞は扁平になり、さらに大きくなった。以上より、本システムを用いれば、表皮組織や組織内部の個々の細胞の形態を、生きたまま、三次元的に観察することができることが明らかとなった。

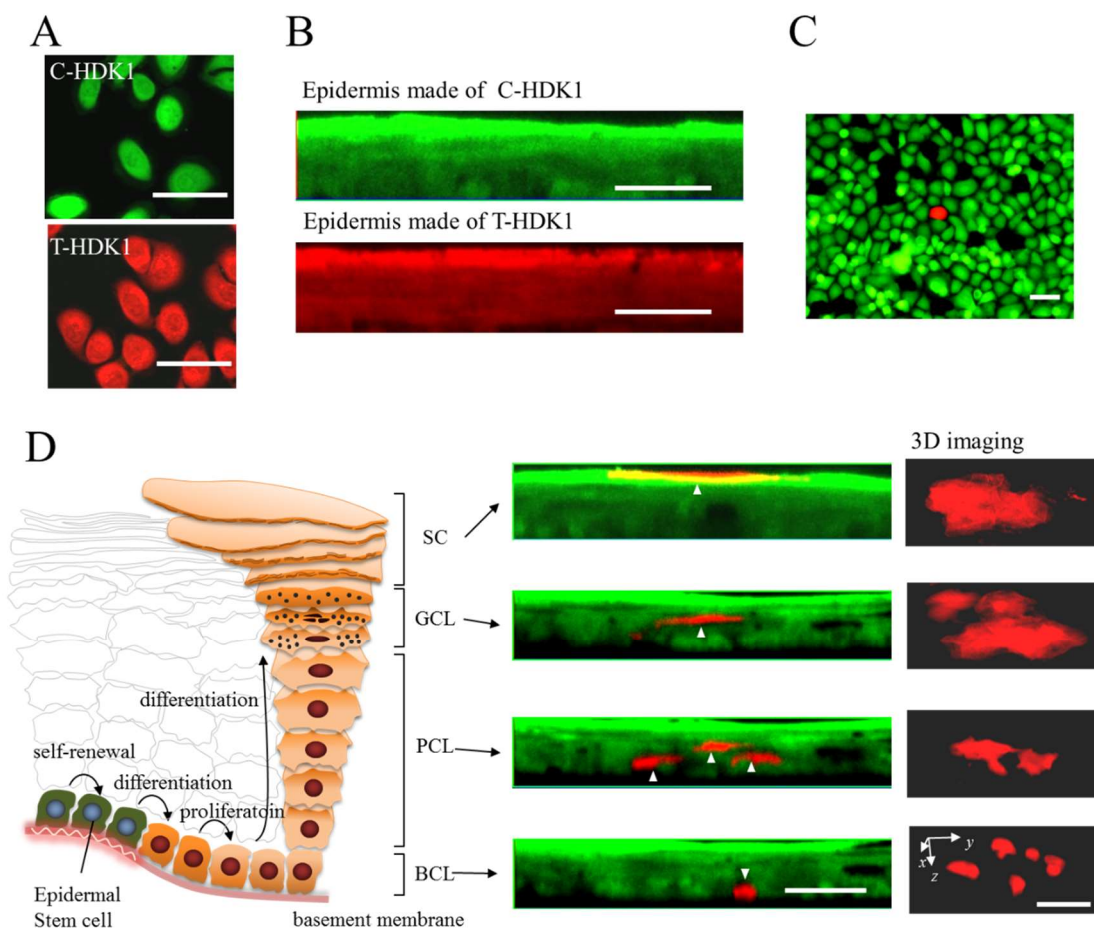


図 21 蛍光タンパク質を発現する HDK1 を用いた三次元培養表皮の作製

(A) C-HDK1 及び T-HDK1 の平面培養の画像。(B) C-HDK1 及び T-HDK1 を用いて作製した三次元培養表皮の垂直方向の断面図(xz images)。(C) C-HDK1 と T-HDK1 の混合培養。C-HDK1 に対して T-HDK1 を 0.01%の割合で播種した。(D)左から表皮の模式図、C-HDK1 と T-HDK1 の混合細胞を用いて作製した三次元培養表皮の垂直方向の断面図(xz images)、表皮層の各階層に存在する T-HDK1 の立体的な形態図。矢頭は、T-HDK1 を示す。Scale bar: A-E=50 μ m

SC, stratum corneum; GCL, granular cell layer; PCL, prickle cell layer; BCL, basal cell layer.

5-3 : 細胞内オルガネラの観察

次に、細胞内オルガネラについても三次元的に可視化できるか検討した。具体的には、T-HDK1 にさらに核移行シグナルを付加した mCitrine 発現ベクターを導入し、細胞質と核とを区別して観察できる HDK1 (T-nC-HDK1) を作製した(図 22A)。本細胞を用いて三次元培養表皮を作製した結果、各階層における核の形態を詳細に観察することができた(図 22B-D)。すなわち、核の面積は基底層に向かうほど小さく、角質層に近づくほど拡大した(図 22E)。また、各階層に存在する核の数は、角質層付近では少なく、基底層に近づくに従って多くなった(図 22F)。以上のように、T-nC-HDK1 を用いて三次元培養表皮を作製することにより、表皮の各階層の核の様子を詳細に観察することができた。

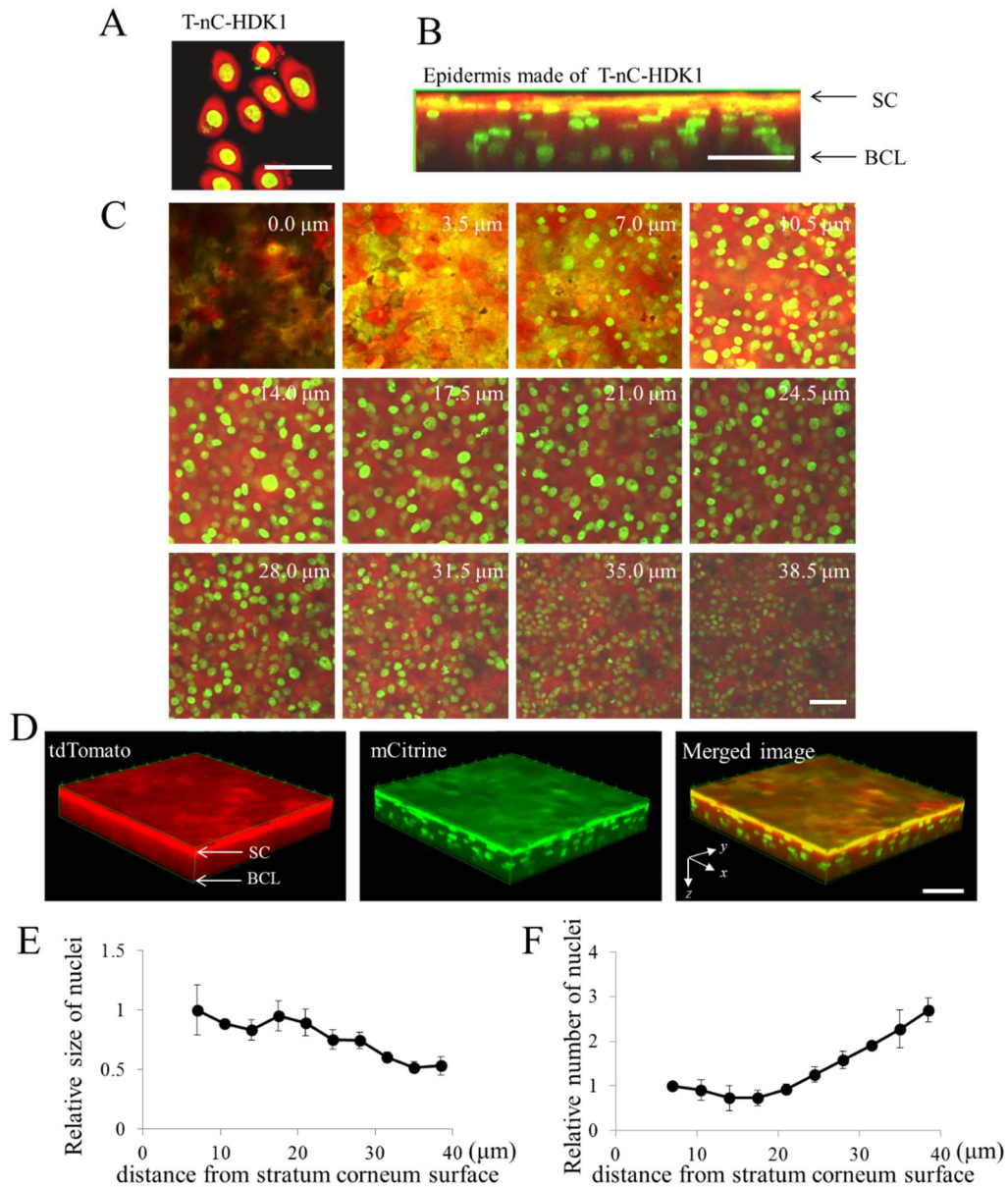


図 22 核を蛍光標識した HDK1 を用いた三次元培養表皮の作製

(A) T-HDK1 にさらに、核移行シグナルを付加した mCitrine 発現ベクターを導入した HDK1 (T-nC-HDK1)。
 (B) T-nC-HDK1 を用いて作製した空気暴露 7 日目の三次元培養表皮の垂直方向の断面図(xz image)。
 (C) 三次元培養表皮の水平方向の断面図(xy images)。画像中の数値は角質層からの距離を示す。
 (D) 三次元培養表皮の立体画像(3D images)。(E) 各階層における核の大きさ。角質層からの距離 7 μm の核の大きさを 1 として解析を行った。画像解析には image J を用いた。(F) 各階層における核の数。角質層からの距離 7 μm の核の数を 1 として解析を行った。画像解析には image J を用いた。

Scale bar: A-D=50 μm

SC, stratum corneum; BCL, basal cell layer.

5-4：皮膚刺激性物質の評価

次に、本モデルを用いて、皮膚刺激性物質の評価ができるか検討した。具体的には、T-nC-HDK1 を用いて作製した三次元培養表皮に対して、代表的な皮膚刺激性物質であるラウリル硫酸ナトリウム(SDS) (58)を角質層側から添加し(図 23A)、15 分間反応させ、その 24 時間後に核の形態変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、0.1% SDS 処理により、クロマチンの凝集が観察され、アポトーシス様の細胞が増加することが明らかとなった(図 23B, C)。本システムにより、皮膚刺激性物質 (SDS) が及ぼす表皮組織へのダメージを、生きたまま三次元的に、かつ簡便に観察することができた。

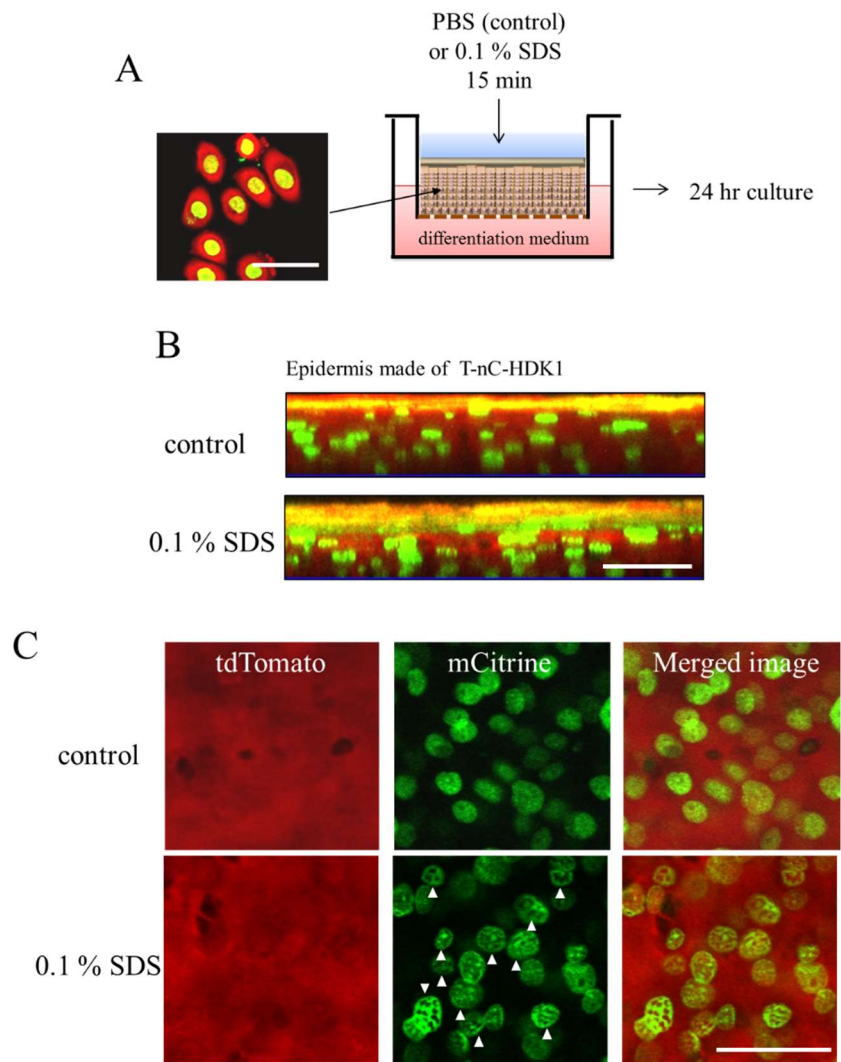


図 23 T-nC-HDK1 由来三次元培養表皮を用いた皮膚刺激性物質の評価

(A) T-nC-HDK1 を用いて作製した三次元培養表皮への SDS 処理のイメージ図。(B) SDS 添加 24 時間後の三次元培養表皮の垂直方向の断面図(xz images)。(C) SDS 添加 24 時間後の三次元培養表皮の水平方向の断面図(xy images)。SDS 処理により、クロマチンの凝集が確認され(矢頭)、アポトーシス様な細胞が増加することが分かった。画像は、角質層からの距離 $24.5 \mu\text{m}$ (有棘層付近)の核の形態を観察したもの。Scale bar:A-C= $50 \mu\text{m}$

次に、SDS 処理が表皮のバリア機能に及ぼす影響についても解析を行った。具体的には、T-HDK1 を用いて、三次元培養表皮を作製後、上記と同様表皮を 15 分間 SDS 処理してダメージを与えた。その 24 時間後に、蛍光物質で標識した WGA (WGA-488) を角質層側から添加し、1 時間浸透させ、WGA-488 が表皮内部への程度浸透するか共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った(図 24A)。その結果、コントロールにおいて WGA-488 は殆ど浸透しないが、SDS 処理をした群では、バリア機能が阻害される結果、より深くまで浸透することが明らかとなった(図 24B, C)。よって、本モデルを利用することにより、表皮のバリア機能についても生きたまま、三次元的に観察することができた。以上に示した通り、蛍光タンパク質を発現する HDK1 を用いて作製した三次元培養表皮を利用すれば、皮膚刺激性物質の評価を簡便かつ詳細に評価できることが示された。

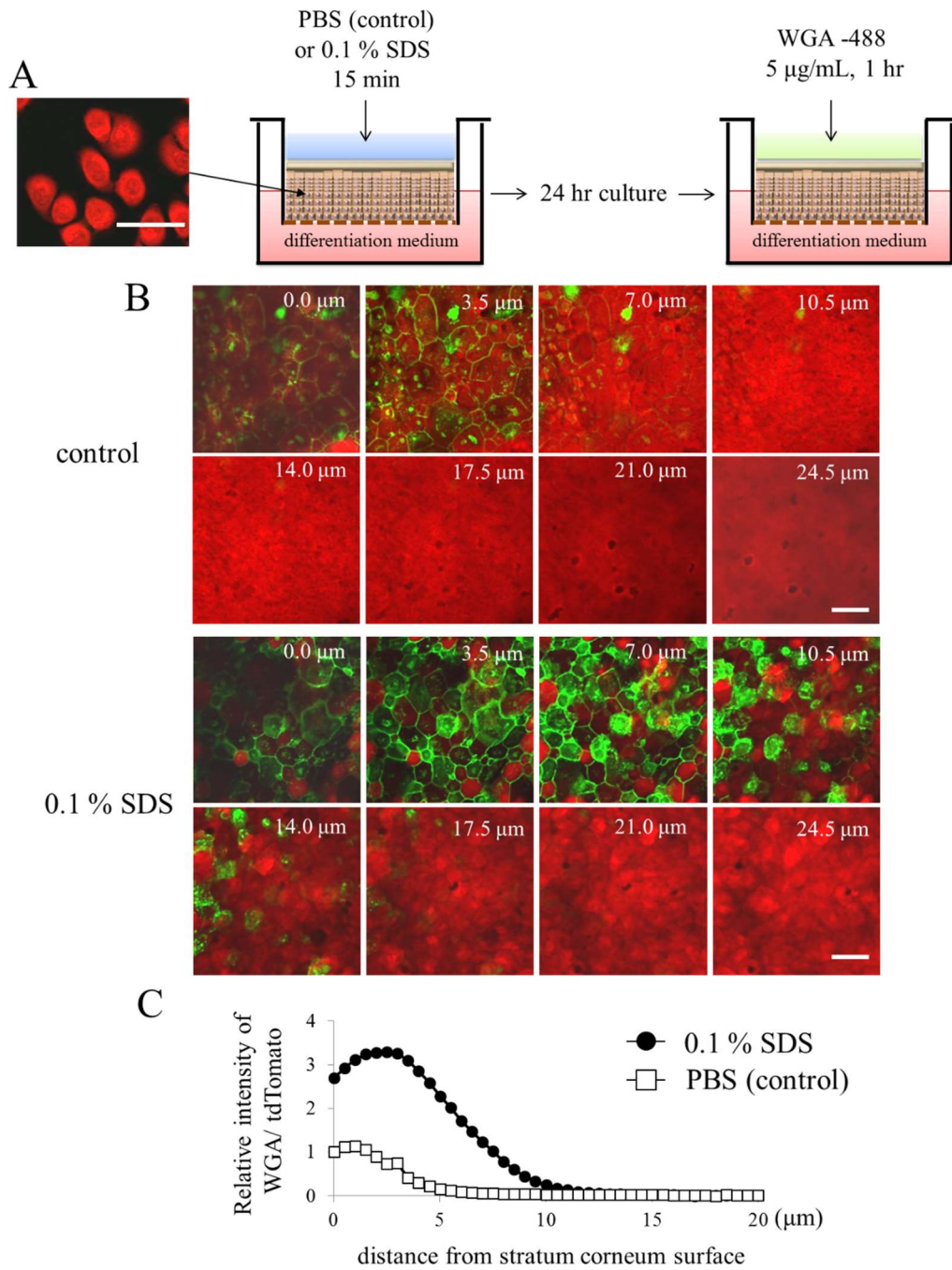


図 24 T-HDK1 由来三次元培養表皮及び WGA-488 を用いた皮膚刺激性物質の評価

(A) T-HDK1 を用いて作製した三次元培養表皮への SDS 処理及び WGA-488 での染色のイメージ図。

(B) SDS 添加に伴う表皮バリア機能の低下。SDS 処理により、表皮のバリア機能が阻害され、WGA-488 がより深くまで浸透した。(C) 三次元培養表皮の各階層における WGA-488 の蛍光強度。角質層からの距離 0 µm の蛍光強度 (control) を 1 として解析を行った。画像解析には image J を用いた。

Scale bar: A, B=50 µm

5-5：まとめ

本研究により、ヒト三次元培養表皮モデルを生きのまま三次元的に観察可能な技術を確立することができ、表皮組織で起こるダイナミックな変化を簡便かつ詳細にとらえることが可能となった。また、本技術は、皮膚刺激物質や有効成分等の評価系としても用いることが可能であり、今後の創薬研究や DDS (drug delivery system) 技術の開発に応用可能であると考えている。今後は、現在の技術をさらに発展させ、細胞質や核だけでなく、様々なオルガネラを可視化できるケラチノサイトを樹立し、細胞の増殖・分化や外部刺激に対する反応について詳細な解析を行いたい。また、表皮組織に存在するケラチノサイト以外の細胞、例えばメラノサイトなどについても同様な遺伝子改変細胞株を樹立し、ケラチノサイトとともに三次元培養することにより、細胞間相互作用を 3D ライブイメージングできるシステムを構築したいと考えている。

第6章 総括

本研究では、幹細胞を用いたモデル系により、表皮を構成するケラチノサイト及びメラノサイトの *in vitro* 分化誘導系を構築し、各細胞の分化に影響を与える因子について詳細な解析を行った。さらに、表皮組織をより生体に近い状態で生きたまま解析できる技術の確立についても検討を行い、下記に示す新しい知見を得た。

(1) ヒト表皮組織に発現する亜鉛取込タンパク質として ZIP2 を見出した。さらに、ヒト表皮幹細胞モデルの分化誘導系を用いた解析により、ZIP2 や ZIP2 により取り込まれた亜鉛がケラチノサイトの正常な分化及び表皮組織のターンオーバーに大きく関与することが示された。

(2) マウス胚性幹細胞の分化誘導系を用いて、メラノサイトの発生から成熟に至るまでの全ての過程における RA の影響について解析を行った。その結果、RA はメラノサイトの初期分化を顕著に促進する一方で、後期分化については抑制することを明らかにした。

(3) 表皮幹細胞モデルに蛍光タンパク質発現ベクターを導入することにより、ヒト三次元培養表皮モデルを生きたまま三次元的に可視化できる技術を確立した。本技術により、表皮組織で起こるダイナミックな変化を簡便かつ詳細にとらえることが可能となった。また、本技術は素材の安全性試験や有効性素材のスクリーニング系としても応用できることが期待された。

以上より、本研究では、生体内で極めて多様な作用を有することが知られる亜鉛及び RA がそれぞれケラチノサイトとメラノサイトの分化に与える影響について、そのメカニズムの一端を明らかにした。また、バイオイメーjing技術の応用により、表皮組織の新規解析手法及び評価系を確立することができた。今後、これらの知見をもとにさらに広範かつ詳細な解析を進め、皮膚の新しい抗老化理論の構築や皮膚疾患との関連解明に貢献することを期待したい。

謝辞

本研究は、日本メナード化粧品株式会社と名古屋市立大学大学院薬学系研究科との共同研究成果をまとめたものです。本研究を遂行するに際し、名古屋市立大学大学院薬学研究科 平嶋尚英教授には終始懇篤なご指導、ご高配を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。また、本論文の執筆に際し、主査/副査として有益なご助言及びご校閲を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科 山村寿男教授、松永民秀教授、尾関哲也教授に深く感謝致します。

非常に恵まれた研究環境を与えて下さり、また、企業の研究者として成長するために本当に多くの経験をさせて頂いた日本メナード化粧品株式会社専務取締役 中田悟氏に心より感謝申し上げます。

幹細胞研究について素人だった私に研究の進め方、実験手法、論文・学会発表スライドの作成方法など研究者として必要な技術について基礎からご指導を賜りました同社総合研究所部長 長谷川靖司博士に深謝致します。

また、研究全般にご協力頂いた同総合研究所副主幹研究員 山田貴亮博士、主任研究員 伊達靖様、宮地克真様をはじめ日本メナード化粧品総合研究所の皆様には感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実験技術の指導及び有益なご助言を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科 田中正彦准教授及び金沢大学医薬保健研究域 鈴木亮教授に深謝致します。

また、各種遺伝子発現ベクターを提供して下さり、論文を作成するにあたり様々なご助言を賜りました北海道大学電子科学研究所 根本知己教授、日比輝正博士、一本嶋佐理博士に深謝致します。

また、学位取得にあたり事務面でご協力頂きました名古屋市立大学薬学部事務室 佐々木綾様に厚く御礼申し上げます。

最後に、学生時代から応援し続けてくれた両親、忙しい中いつも支え続けてくれた妻 美穂と明るく楽しい笑顔で励ましてくれた娘たち 夏帆と茉優に心から感謝します。

引用文献

- [1] Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12: 565-80.
- [2] Akamatsu H, Hasegawa S, Yamada T, Mizutani H, Nakata S, Yagami A, et al. Age-related decrease in CD271(+) cells in human skin. *J Dermatol* 2016;43: 311-3.
- [3] Osawa M, Egawa G, Mak SS, Moriyama M, Freter R, Yonetani S, et al. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development* 2005;132: 5589-99.
- [4] Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 2002;416: 854-60.
- [5] Yamada T, Akamatsu H, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Mizutani H, et al. Melanocyte stem cells express receptors for canonical Wnt-signaling pathway on their surface. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396: 837-42.
- [6] Gordon PR, Mansur CP, Gilchrist BA. Regulation of human melanocyte growth, density, and melanization by keratinocyte derived factors. *J Invest Dermatol* 1989;92: 565-72.
- [7] Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol* 2013;30; 30-41.
- [8] Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem* 1992;267: 24675-80.
- [9] Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y, Kitahara T, Takema Y, Imokawa G. Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am J Pathol* 2004;165: 2099-109.

- [10] Van Den Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J. The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 2006;7: 769-78.
- [11] Wu X, Hammer JA. Melanosome transfer: it is best to give and receive. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29: 1-7.
- [12] Hoffjan S, Stemmler S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol* 2007;157: 441-9.
- [13] Tschachler E. Psoriasis: the epidermal component. *Clin Dermatol* 2007;25: 589-95.
- [14] Kubota K, Kamijima Y, Sato T, Ooba N, Koide D, Iizuka H, et al. Epidemiology of psoriasis and palmoplantar pustulosis: a nationwide study using the Japanese national claims database. *BMJ Open* 2015;5: e006450.
- [15] McKay IA, Leigh IM. Altered keratinocyte growth and differentiation in psoriasis. *Clin Dermatol* 1995;13: 105-14.
- [16] Sugiura H, Ebise H, Tazawa T, Tanaka K, Sugiura Y, Uehara M, et al. Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *Br J Dermatol* 2005;152: 146-9.
- [17] Cario-Andre M, Lepreux S, Pain C, Nizard C, Noblesse E, Taieb A. Perilesional vs. lesional skin changes in senile lentigo. *J Cutan Pathol* 2004;31: 441-7.
- [18] Noblesse E, Nizard C, Cario-André M, Lepreux S, Pain C, Schnebert S, et al. Skin ultrastructure in senile lentigo. *Skin Pharmacol Physiol* 2006;19: 95-100.
- [19] Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Arima M, Yagami A, et al. Comprehensive analysis of melanogenesis and proliferation potential of melanocyte lineage in solar lentigines. *J Dermatol Sci* 2014;73: 251-7.

- [20] 和田 攻, 柳沢 裕之, 北川 泰久. 微量元素とヒト. 化学と生物 1985;23: 526-34.
- [21] Maret W, Li Y. Coordination dynamics of zinc in proteins. Chem Rev 2009;109: 4682-707.
- [22] Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. J Proteome Res 2006;5: 196-201.
- [23] Michaëlsson G, Ljunghall K, Danielson BG. Zinc in epidermis and dermis in healthy subjects. Acta Derm Venereol 1980;60: 295-9.
- [24] 一般社団法人 日本臨床栄養学会 亜鉛欠乏症の診療指針 2016.
- [25] 児玉 浩子、小川 英伸、元山 華穂子、佐藤 恭弘. 亜鉛欠乏症 乳幼児から成人まで. 小児科 2014. 55 3 341-8.
- [26] Wilson D, Varigos G, Ackland ML. Apoptosis may underlie the pathology of zinc-deficient skin. Immunol Cell Biol 2006;84: 28-37.
- [27] Stork CJ, Martorano LM, Li YV. UVB radiation induces an increase in intracellular zinc in human epidermal keratinocytes. Int J Mol Med 2010;26: 463-9.
- [28] Deters A, Schnetz E, Schmidt M, Hensel A. Effects of zinc histidine and zinc sulfate on natural human keratinocytes. Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd 2003;10: 19-25.
- [29] Guéniche A, Viac J, Lizard G, Charveron M, Schmitt D. Protective effect of zinc on keratinocyte activation markers induced by interferon or nickel. Acta Derm Venereol 1995;75: 205-10.
- [30] Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. J Biol Inorg Chem 2011;16: 1123-34.
- [31] Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differ-

ntiating cells. *J Invest Dermatol* 2000;114: 413-20.

[32] Inoue Y, Hasegawa S, Ban S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, et al. ZIP2 protein, a zinc transporter, is associated with keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 2014;289: 21451-62.

[33] Chang KL, Hung TC, Hsieh BS, Chen YH, Chen TF, Cheng HL. Zinc at pharmacologic concentrations affects cytokine expression and induces apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition* 2006;22: 465-74.

[34] Segre JA, Bauer C, Fuchs E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 1999;22: 356-60.

[35] Chew YC, Adhikary G, Xu W, Wilson GM, Eckert RL. Protein kinase C δ increases Kruppel-like factor 4 protein, which drives involucrin gene transcription in differentiating keratinocytes. *J Biol Chem* 2013;288: 17759-68.

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

[37] Fuchs E, Green H. Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 1981;25: 617-25.

[38] Hashimoto Y, Shudo K. Retinoids and their nuclear receptors. *Cell Biol Rev* 1991;25: 209-35.

[39] Khillan JS. Vitamin A/retinol and maintenance of pluripotency of stem cells. *Nutrients* 2014; 1209-22.

[40] Lotan R, Lotan D. Enhancement of melanotic expression in cultured mouse melanoma cells by retinoids. *J Cell Physiol* 1981;106: 179-89.

[41] Roméro C, Aberdam E, Larnier C, Ortonne JP. Retinoic acid as modulator of UVB-induced melanocyte differentiation. Involvement of the melanogenic enzymes expression. *J Cell Sci* 1994;107 : 1095-103.

- [42] Nakajima M, Shinoda I, Mikogami T, Iwamoto H, Hashimoto S, Miyauchi H, Fukuwatari Y, Hayasawa H. Beta-lactoglobulin suppresses melanogenesis in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res* 1997;10: 410-3
- [43] Talwar HS, Griffiths CE, Fisher GJ, Russman A, Krach K, Benrazavi S, et al. Differential regulation of tyrosinase activity in skin of white and black individuals in vivo by topical retinoic acid. *J Invest Dermatol* 1993;100: 800-5.
- [44] Sato K, Morita M, Ichikawa C, Takahashi H, Toriyama M. Depigmenting mechanisms of all-trans retinoic acid and retinol on B16 melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72: 2589-97.
- [45] Oka M, Ogita K, Saito N, Mishima Y. Selective increase of the alpha subspecies of protein kinase C and inhibition of melanogenesis induced by retinoic acid in melanoma cells. *J Invest Dermatol*;100: 204S-208S.
- [46] Griffiths CE, Finkel LJ, Ditre CM, Hamilton TA, Ellis CN, Voorhees JJ. Topical tretinoin (retinoic acid) improves melasma. A vehicle-controlled, clinical trial. *Br J Dermatol* 1993;129: 415-21.
- [47] Griffiths CE, Goldfarb MT, Finkel LJ, Rouλια V, Bonawitz M, Hamilton TA, et al. Topical tretinoin (retinoic acid) treatment of hyperpigmented lesions associated with photoaging in Chinese and Japanese patients: a vehicle-controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 1994;30: 76-84.
- [48] Rafal ES, Griffiths CE, Ditre CM, Finkel LJ, Hamilton TA, Ellis CN, et al. Topical tretinoin (retinoic acid) treatment for liver spots associated with photodamage. *N Engl J Med* 1992;326: 368-74.
- [49] Yamane T, Hayashi S, Mizoguchi M, Yamazaki H, Kunisada T. Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture. *Dev Dyn* 1999;216: 450-8
- [50] Motohashi T1, Aoki H, Chiba K, Yoshimura N, Kunisada T. Multipotent cell fate of neural crest-like cells derived from embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007;25: 402-10.

- [51] Watabe H, Soma Y, Ito M, Kawa Y, Mizoguchi M. All-trans retinoic acid induces differentiation and apoptosis of murine melanocyte precursors with induction of the microphthalmia-associated transcription factor. *J Invest Dermatol* 2002;118: 35-42.
- [52] Ipponjima S, Hibi T, Nemoto T. Three-Dimensional Analysis of Cell Division Orientation in Epidermal Basal Layer Using Intravital Two-Photon Microscopy. *PLoS One* 2016;11: e0163199.
- [53] Yokouchi M, Atsugi T, Logtestijn MV, Tanaka RJ, Kajimura M, Suematsu M, et al. Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape. *Elife* 2016; e19593.
- [54] Tadokoro R, Murai H, Sakai KI, Okui T, Yokota Y, Takahashi Y. Melanosome transfer to keratinocyte in the chicken embryonic skin is mediated by vesicle release associated with Rho-regulated membrane blebbing. *Sci Rep* 2016;6: 38277.
- [55] Maas-Szabowski N, Stärker A, Fusenig NE. Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α . *J Cell Sci* 2003;116: 2937-48.
- [56] Todd C, Hewitt SD, Kempenaar J, Noz K, Thody AJ, Ponc M. Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: effect of ultraviolet radiation. *Arch Dermatol Res* 1993;285: 455-9.
- [57] Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, et al. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 2012;86: 3276-83.
- [58] di Nardo A, Sugino K, Wertz P, Ademola J, Maibach HI. Sodium lauryl sulfate (SLS) induced irritant contact dermatitis: a correlation study between ceramides and in vivo parameters of irritation. *Contact Dermatitis* 1996;35: 86-91.