

色素細胞幹細胞の制御による白斑症治療モデルの開発

岐阜大学大学院医学系研究科

國貞 隆弘

Piebaldism is an autosomal dominant genetic pigmentary disorder, characterized by congenital white hair and patches located on the forehead, anterior trunk, and extremities. Most piebald patients have a mutation of the *Kit* gene, which encodes a tyrosine kinase receptor involved in pigment cell development. The white hair and patches of such patients are already completely formed at birth and do not usually expand thereafter. This stability of pigmented spots also applies to *Kit^W* and *Kit^{sl}* mutant mice. However, 2 novel cases of piebaldism were reported in 2001, in which both mother and daughter having a novel Val620Ala mutation in their *Kit* gene showed progressive depigmentation. To prepare an animal model of this mutation to explore undefined functions of KIT signaling for maintaining pigmented melanocytes in the skin or more specifically the integrity of the melanocyte stem cell system in the postnatal skin, we produced transgenic mice expressing Val620Ala Kit. These mice well mimicked the white spotting pattern of patients; however, no change in this pattern was observed after birth, even after increasing the transgene expression by various means. Here, we report the unexpectedly extremely stable maintenance of the melanocyte stem cell system under stringent conditions for KIT signaling.

1. 緒 言

色素細胞は発生初期に神経管から離脱した多分化能をもつ幹細胞である神経堤細胞に由来する。神経堤細胞はマウスでは9.5日胚で移動を開始し、13.5日までは体の様々な部分へ移動し、その場所で色素細胞を含め、神経、内分泌、結合組織、骨組織など様々な細胞・組織へと分化する。色素細胞へと運命決定された細胞は色素細胞幹細胞（色素芽細胞）として表皮の近傍の真皮中を移動し、表皮に一斉に移動後毛包の形成と共に一部はその中に進入する。毛包で（ヒトでは毛包以外の表皮中にも）生涯色素細胞は維持され、UVなどの外部刺激に反応してその密度が増減すること、毛周期に同調して増殖・分化を繰り返すことから、幹細胞システムとして皮膚（ケラチノサイト）の再生と関連しながら再生し続けると考えられる¹⁻³⁾。

例えば、White Spotting (*W*) マウスでは受容体型チロシンキナーゼ遺伝子 *Kit* の突然変異により、それを発現する色素細胞幹細胞は体内環境から十分なシグナル（ここではリガンドとして *Kit* に結合する SLF）を得られなくなり、移動能力が低下する。その結果、神経管から遠位にある腹部、額、臀部、四肢の先端を中心に色素細胞幹細胞が到達せず、その部分は色素細胞の存在しない白斑になる。同様

のメカニズムで白斑を生じる分子として、先述の SLF や ET3 EDNR3 MITF PAX3、などが知られている^{4, 5)}。

皮膚の色素異常は多彩な臨床症状を示し、The Pigmentary System⁶⁾によると実に141種の病名が報告されている。分類の大まかな基準は、先天的か後天的か、色素過剰か色素過小か、表皮性か真皮性か、あるいは発生段階で生じるか成長してから生じるかであり、臨床例として最も多い白斑症（vitiligo）は自己抗体の形成などによる後天的な原因で色素細胞が失われ白斑が形成されと考えられている。例えば、*mi^{vit}* というマウスの突然変異は、先天的な白斑（後天的なものとは区別して piebaldism あるいは Waardenburg 症候群として記載される）を持つ。*mi^{vit}* では加齢と共に色素が減少することからヒトの vitiligo のモデルと考えられてきたが、原因遺伝子が Waardenburg 症候群の原因遺伝子と同じ転写調節因子 MITF であること、ヒト vitiligo に MITF 遺伝子の変異が見つかっていないこと、などから典型的な白斑症のモデルとは考えられていない。いずれにしても、動物モデルを通して色素異常症の研究を進めることは、病態の分子的な本質を明らかにする上で必要不可欠である。

我々は、Richard, 深井らにより2001年に報告されたヒト piebaldism（まだら症）の臨床報告⁷⁾に注目した。その患者母娘は *c-kit* に変異を持ちまだら症と診断されたが、娘には生後白斑の拡大が観察された。白斑形成は、表皮の色素細胞幹細胞の発生・維持ができず色素細胞が消失する、いわば幹細胞システムの破綻として統一的に扱うことができる。白斑形成という表現型を持つ毛色の突然変異体の解析により幹細胞の増殖・分化・自己複製を制御する因子（遺伝子）のほとんどが明らかにされている。そのような遺伝



Establishment of animal models for piebaldism by the regulation of melanocyte stem cells

Takahiro Kunisada

Department of Tissue and Organ Development, Gifu University Graduate School of Medicine

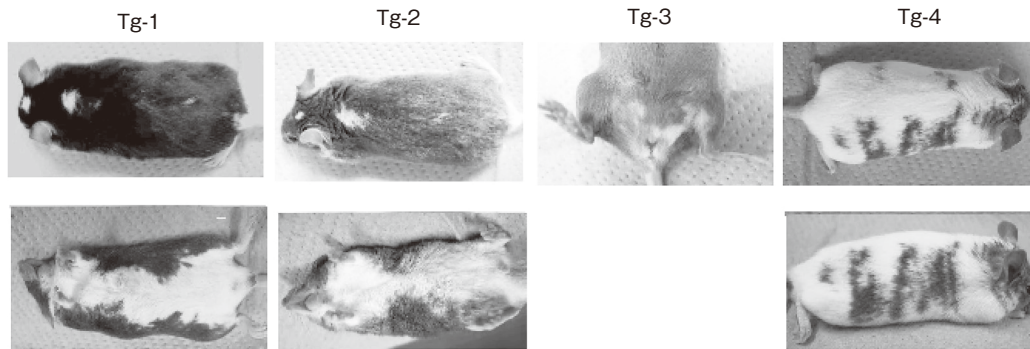


図 1

子のひとつとしてマウスやヒトを含むいくつかの哺乳動物で受容体型チロシンキナーゼ c-kit の様々な変異が知られている。c-kit 変異マウスを含む白斑を持つマウス変異体では白斑パターンが生後に変化する現象は報告されていない。体表の一部に色素細胞が存在しない領域は、分子的原因が何であれ発生中の色素細胞の異常によって生じたものであり、いずれも生後には白斑のパターンは決まっており、成長に比例してそのサイズは拡大するがパターンは変化しないとされている。

ところが、この論文で報告された c-kit 変異 (Val620Ala) では、一旦形成された娘の白斑領域が加齢に伴って拡大したことが報告されている。生後表皮の成長とは無関係に色素細胞が減少するということは一端毛包に定着した色素細胞幹細胞が失われることを意味し、発生時に形成された白斑部が安定して維持され、一端発生過程で形成された色素細胞の分布のパターンは生涯変わらないという従来のまだら症に対する認識を覆すものである。この表現型が再現できれば、受容体型チロシンキナーゼのシグナル異常によって生後に進行する白斑症 (vitiligo) が生じることを証明できるだけでなく、表皮における色素細胞幹細胞の維持機構の解明に直接つながると考えた。

本申請では報告されたまだら症と同一の点突然変異を導入した c-Kit 遺伝子をメタロチオネイン遺伝子の転写調節領域の下流に接続して色素細胞で強制発現させたトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作成し、この大変希なまだら症の表現型の再現を試みた⁸⁾。

2. 実験

ヒトまだら症の c-kit Val620 Ala 変異はこの受容体の細胞内チロシンキナーゼ部位の数百アミノ酸にわたってヒトとマウスではほぼ完全に保存されている領域で起こっており、マウス c-kit 遺伝子に同様の変異を導入することで再現可能と考えられた。ミスマッチ PCR プライマーを用いて Val620Ala 変異を導入したマウス c-kitcDNA を作成し、これをメタロチオネイン I 遺伝子の転写プロモーター領域と接続した DNA コンストラクト作成し、これを用いてト

ランスジェニックマウスを作成した (mt-kit^{V620A}Tg マウス)。メタロチオネインプロモーターは色素細胞を含む様々な組織や細胞で発現を誘導するが、全く c-Kit を発現しない W マウスですら必ずしも致死的でないことから、ドミナントネガティブに機能すると予想される Val620Ala 変異を広範囲の細胞に発現させても個体の生存に影響することはないと考えた。これらの操作を含む実験の詳細は文献 8) に詳述した。

3. 結果

3.1 Tg マウスの表現型

7 個の独立した mt-kit^{V620A}Tg マウスが得られ、4 個体の白斑が遺伝することが確かめられ、下図 1 のように Tg-1,2,3,4 とした。この中から、比較的白斑の面積が少ない Tg-1 と、白斑が最も大きい Tg-4 を株として維持した。白斑のサイズやパターンに個体差はあるものの、Tg-1 と Tg-4 が外見で区別できないほどではなく、世代を重ねても安定に維持された。トランスジーンの発現量を皮膚で比較すると Tg-4 の方が圧倒的に多く、ドミナントネガティブ c-kit 遺伝子の発現量と白斑の面積が比例していることになり、白斑形成がトランスジーンに起因することが示された。つまり、この変異はヒトと同じくマウスにもまだら症を誘発することが確認された。

3.2 mt-kit^{V620A}Tg マウスでの加齢に伴う白斑の変化

これらの Tg マウスにおいて白斑の拡大が認められるか、長期にわたって観察した。最も大きな白斑を持つ Tg-4 でも、生後の白斑の大きさや形状は、成長による表皮の拡大以外は認められなかった (図 2)。Tg-1 の小さな白斑も、拡大も縮小もしなかった。多数の mt-kit^{V620A}Tg マウスについて観察を行ったが、いずれも同様であった。従って、通常の飼育状態においては、c-kit の V 6 2 0 A 変異は、発生を反映した白斑形成はヒトの症例と同じく生じるものの、生後の白斑の拡大は起こらないと考えられる。

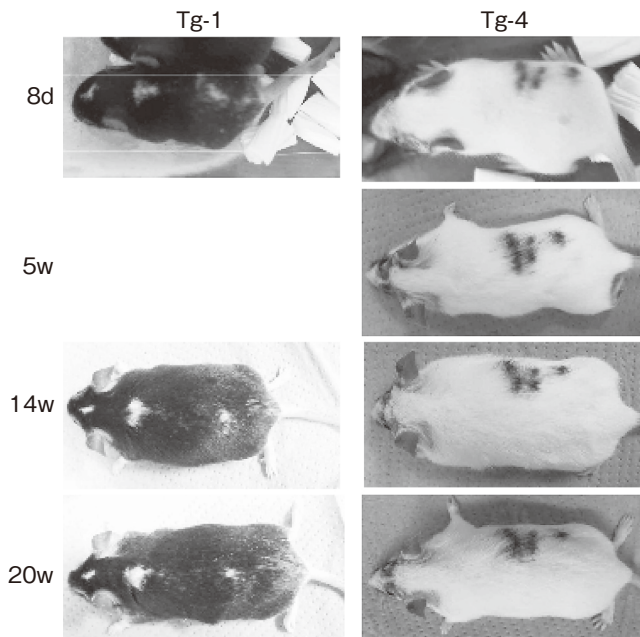


図2

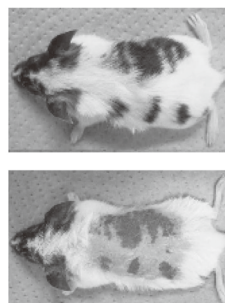
3.3 トランスジーンの発現量の増加による白斑の変化

mt-kit^{V620A} の発現を担うメタロチオネインプロモーターは重金属の添加により活性が増大する。実際に、Tg-1 や Tg-4 においても ZnSO₄ を飲用させることで数倍の転写亢進が認められた。このようにして mt-kit^{V620A} の発現を高めた Tg マウスも、たとえ生後直ちに ZnSO₄ の飲用を開始し長期観察しても、生後の白斑の拡大は観察されなかった。Tg-1 のホモ個体では、mt-kit V620A の発現量が2倍になると考えられ、実際その白斑は Tg-4 よりも大きくほとんど白色の固体も見られたが、そこにわずかに残った黒毛も生涯消失することはなかった。

3.4 ヒトに類似した色素細胞分布を示す SLF-Tg マウスにおける mt-kit^{V620A} トランスジーンの効果

マウスでは、生後速やかに毛包以外の色素細胞が失われるので、ヒトの色素細胞の動態を調べるモデルとしては限界がある。ヒトでいう白斑の拡大とは、主に毛包以外の表皮に存在する色素細胞が消失を指すからである。この点を克服するため、我々が以前開発した毛包以外の表皮にも生涯色素細胞が維持されるヒト型の表皮を持つモデルマウス (hk14-SCFTg マウス⁹⁾) と mt-kit^{V620A} Tg マウスとを交配し、白斑の状態を調べた。図3に示したように、例えば SLFTg/+;Tg-4/+ ダブルトランスジェニックマウスは

SLFTg/+;mt-KIT Tg-4/+



4w

図3

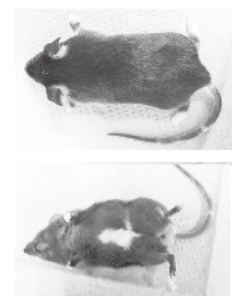
やや白斑が小さい (黒毛のストライプが太い) こと以外毛色のパターンは Tg-4 と変わらないが、実際に毛を剃ってみると表皮にメラノサイトが存在し、色素が沈着しているのがわかる。このマウスを剃毛後も飼育を続け再び剃毛したところ、表皮の白斑のパターンは変化していなかった。このようなダブルトランスジェニックマウスを Tg-1 でも作製したが同様の結果であった。さらに、これらのダブルトランスジェニックマウスに ZnSO₄ を飲ませても、パターンが変化することはなかった。従って、ヒトと同様に毛包以外の表皮に色素細胞が常在する状態でも、mt-kit^{V620A} によって生後に白斑が拡大することは無いことがわかった。

4. 考察

以上、ヒト kit^{V620A} 変異の生後の白斑の拡大を再現すべく行った様々な試みは現在のところ全て失敗した。マウスの多くの piebaldism 変異体で一旦発生過程で生じた白斑の生後の拡大は報告されておらず、我々がそれらのマウスを飼育した経験でもそのようなことは観察されなかった。もちろん、ヒトでもこのような報告は一例のみである。従って、ヒトでの症例報告では、mt-kit^{V620A} に加えて何らかの別の遺伝的な要因、あるいは環境因子が付加することによって白斑の拡大が生じたと考えるのが妥当と思われる。

このように、ヒトの症例を再現する試みは成功しなかったが、本研究の過程で色素細胞の増殖・分化・維持に関していくつかの点が明らかになった。まず、色素細胞の発生異常により生じた piebaldism の白斑の安定性である。発生過程での白斑のサイズあるいは形態には c-Kit シグナルが影響を及ぼすことは、今回作製した mt-kit^{V620A} Tg マウスを見ても明らかであり、実際 SLFTg/+; mt-kitTg-1/+ ダブルトランスジェニックには図4のように Tg-1 では決して観察されない腹部の白斑が極端に小さなものがしばしば生じたが、c-Kit のリガンドである SLF の強制発現により、mt-kit^{V620A} の活性が上昇したため、色素細胞がより野生型に近い分布を示すようになったと考えられる。ただし、この場合ですら生後の白斑の変化は見られなかった。マウスの場合、SLF の発現は生後においては毛包に限局されるが、SLFTg では表皮全体に発現し続けるので、我々は白斑の周囲の色素細胞が活性化され、幹細胞を含めた色素細胞が存在しない白斑に進入することは大変考えやすいと予想したが、実際には半年後でも白斑のサイズや形状は変化しなかった。もともと、c-Kit や ET3 などのシグナルの不足により生じた piebaldism の白斑が生後も

SLFTg/+;mt-KIT Tg-1/+



5w

図4

変化しないのは十分予想されることであるが、いくらそれを強制発現させたりガンドで活性化し、シグナルの不足分を補っても（実際に発生過程ではほとんど腹部の白斑が消失するという著しい効果として現れているのだが）、生後の白斑のパターンは一切変化しない。シグナルの不足に対しても、過剰に対しても、一旦形成された胎児期の白斑のパターンは強固に維持される。

神経堤由来の色素細胞は発生中皮膚の広範囲を移動し、それには c-Kit が必要であることが実験的に確実に示されている。生後も、毛包のバルジに存在する色素細胞幹細胞が毛周期に対応して毛球部へ移動することは確認されており³⁾、今回確認されたことを言い換えると、生後の色素細胞は個々の生存シグナルの増大や減少には反応せず、毛包から毛包へ移動することはない、ということになる。生後の色素細胞は、毛包でも表皮でもこれほど移動に対して抵抗することは、多くの脊椎動物が体表の配色を種や個体の識別に使っていることを考えると進化的な合理性があるとも考えられる。発生中の色素細胞と、生後のメラノサイトのどのような違いによってこのような移動性の差異がもたらされるかを明らかにすることは、piebaldism 以外の白斑症の発症機構にも参考になると思われる。色素細胞でなく、表皮の側に原因があることも考えられる。我々は十分な検討をしていないが、UV 照射や発癌剤の投与で表皮が一気に黒化する現象の動態を詳しく調べることも必要かもしれない。色素細胞の幹細胞が刺激に対して柔軟に反応しないことが、白斑が自然治癒しない大きな原因と考えられるからである。

白斑症あるいは白髪などを含め、色素細胞の発生異常という観点から症状の分子機構を調べ、治療あるいは予防を行おうという試みは最近国内外で盛んである。ただ、実用化という観点では、海外メーカーによるチロシナーゼ遺伝子に対するアンチセンス DNA を用いた美容液等新しいメラニンコントロール法の実用化は国内外で活発であるが、色素細胞幹細胞の動態を制御する効果の高い製品は存在しない。その原因は、モデル動物を通した白斑あるいは白髪

作製には至らなかったが、たとえば ET3 など他のシグナルも同時に操作することで、様々な白斑症のマウスを作出したい。

(引用文献)

- 1) Hall, B.K. (1999) The Neural Crest In Development and Evolution. New York: Springer.
- 2) Le Douarin, N. M., and Kalcheim, C. (1999) The Neural Crest. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- 3) Nishimura E K, Jordan S A, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson I J, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S, : Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. Nature 416, 854-860, 2002.
- 4) Bennett DC, Lamoreux ML, : The color loci of mice - a genetic century, Pigment Cell Res., 16, 333-344, 2003.
- 5) Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, : Mouse Coat Color Mutations: From Fancy Mice to Functional Genomics, Dev. Dyn. 235, 2401-2411, 2006
- 6) The Pigmentary System, J.J. Nordlund, R.E. Boissy, V.J. Hearing, R.A.King, and J-P Ortonne, eds (New York, NY: Oxford University Press) , pp. 475-487.
- 7) Richards KA, Fukai K, Oiso N, Paller AS, : A novel KIT mutation results in piebaldism with progressive depigmentation. J Am Acad Dermatol 44: 288-292, 2001
- 8) Tosaki H, Kunisada T, Motohashi T, Aoki H, Yoshida H, Kitajima H, : Mice transgenic for KitV620A: recapitulation of piebaldism, but not progressive depigmentation, seen in humans with this mutation. J. Invest. Dermatol. 126, 1111-1118, 2006.
- 9) Kunisada T, Yoshida H, Yamazaki H, Miyamoto, A, Hemmi H, Nishimura E, Shultz LD, Nishikawa S-I, Hayashi S-I, : Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors. Development 125, 2915-2923, 1988.