

毛包の色素幹細胞形質維持におけるエピジェネティクス機構の関与と白髪形成予防法の研究

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 周産期病態研究部

秦 健一郎

Epigenetic regulation is necessary for normal development. Not only for development, it has crucial roles to maintain stemness of melanocyte. Usually melanocyte stem cells in hair follicle produce melanin for pigmented hair. If these stem cells lose melanin production, hair change into gray. To clarify epigenetic mechanisms, we compared melanocyte stem cells in gray hair follicle and those in pigmented hair follicle. We found dozens of genomic regions which DNA methylation status are different between gray hair follicle and pigmented hair follicle. These might cause critical change of related gene expression levels.

1. 緒言

DNAメチル化やヒストンタンパク質の化学的修飾は、哺乳類の発生と生存に必須のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構である。これらのエピジェネティクス機構は、発生過程の脱分化や分化過程でダイナミックに変化し、細胞の全能性あるいは多能性分化能を維持させ、その逆に細胞系譜の命運決定に重要な役割を担う。発生過程のみならず、組織幹細胞の分化能維持や、最終分化後の恒常性維持にも、同様の機構が働いている。最近、ES細胞やiPS細胞のDNAメチル化状態やヒストンの修飾状態を網羅的に解析した結果が報告された¹⁾。それぞれの修飾状態は、細胞の起源や細胞株によって僅かに異なり、それぞれの細胞の個性を産み出していると考えられる。細胞は、環境要因等の外部からの刺激を含め、なんらかの要因によって遺伝子発現変化が誘導され、組織の再生や分化につながっていくと考えられる。しかもそのような要因が失われても、遺伝子発現の変化は長期にわたって続く場合がある。このような変化は、一旦分化した組織・臓器が異分化を起こさないように恒常性を維持するのに必須であると共に、近年、いわゆる生活習慣病等の原因が、胎児期や新生児期・幼児期の環境に遡る可能性が指摘されている^{2,3)}。再生医療の分野をこのような観点から捉えると、治療に用いる幹細胞を、臨んだ形質をもつ細胞に正確にかつ効率よく分化させ、しかもその形質を維持させる事ができなければ、安全かつ長期にわたる治療効果は期待できない。全能性・多能性を有する幹細胞は、一旦分化した後は、脱分化能や異分化能を抑制せねばならない。すなわち、幹細胞

の分化過程では、分化後には必要とされない遺伝子群を、長期にわたり安定して抑制することが、個体の恒常性の維持に必須であると考えられている。このような長期安定した遺伝子制御情報の担い手として、エピジェネティックな機構が働いており、様々な臓器の分化過程で、普遍的な役割を担っていると考えられている⁴⁾。

毛包の色素幹細胞は上皮系幹細胞と同じく、皮脂腺下部のバルジに存在する⁵⁾。毛髪が抜け落ち、新たな毛髪が形成する時にバルジにある色素幹細胞が分化し、形成途中の毛球部に取り込まれながら皮下脂肪層へ移動する。そして、成熟した毛球部を形成し、毛幹にメラニン色素を供給する。毛髪はこのような周期を繰り返す。しかし、ジェノトキシクな影響⁶⁾や、不要なアポトーシスの発生⁷⁾により色素幹細胞が枯渇する状況になると、分化した色素細胞を供給できなくなり白髪が発生する。また、分化した色素細胞が形成されても、何らかの原因により毛球部への移行が損なわれたり、あるいは何らかの原因によりメラニン合成酵素の不調がきたしても白髪は形成される⁸⁾。色素細胞の移動能については、毛乳頭細胞の間に細胞外マトリックスを介した相互作用も推測されている⁹⁾。このように白髪形成には幾つかの説が唱えられ、ある種の化合物(p-aminobenzoic acid)は白髪の回復に有効との報告もあるが¹⁰⁾、エピジェネティクスと関連性は検討されていない。

本研究は、エピジェネティックな機構を介した色素(幹)細胞のメラニン産生能制御機構を解析し、同機構を介したメラニン産生能の人為的操作法開発に資する知見を得ることを目的とする。本研究で対象とする幹細胞の一種である色素幹細胞は、皮膚に色素細胞を供給し、紫外線からの防御、個体識別などの生物学的に重要な役割を担っている。分化した色素細胞から産生されるメラニンは皮膚色や毛髪色を決定し、前述の機能に深く関与しているとともに、美容上の観点からも重要な意味を持っている。通常幹細胞は、自己再生のための対称性分裂と共に、非対称性の分裂を繰り返して分化細胞を供給し続け、生命の恒常性維持に深く関与する細胞である。しかし、色素幹細胞、特に毛包の色



Epigenetic regulation in maintenance of stemness of melanocyte stem cells in hair follicle

Kenichiro Hata

Department of Maternal-Fetal Biology
National Research Institute for Child Health and Development

色素幹細胞は、成人後比較的早い時期からの白髪形成に見られるように、何らかの原因により生涯を通じて成熟した分化色素細胞を供給し続けることができない特殊な幹細胞である。また色素幹細胞は、比較的容易に生体試料を入手することが可能であり、幹細胞としての性質の維持と破綻を比較解析するのに有用なモデル系である。

前述の白髪形成の原因として、ジェノトキシクな要因あるいはアポトーシス異常による色素幹細胞自身の死滅、分化色素細胞周囲の上皮系細胞または間葉系細胞との相互作用不良によるメラノジェネシス異常などが提唱されているが、いまだ十分に解明されていない。幹細胞から終末細胞への分化を制御する機構に、DNAメチル化などのエピジェネティクスが関与する事例が既に報告されているが、白髪形成過程をそのような観点から解析した報告は無い。本研究では、色素幹細胞の分化に関与するエピジェネティックな要因を解析し、新たな白髪発生の分子機構や予防策に関する知見を見出すことを目標とする。さらには、本研究の進展により、幹細胞多能性維持の普遍的メカニズムの理解にも、重要な貢献を成すことが期待される。

2. 実験方法

1) 「試料回収調製」

ヒト個体の遺伝的多様性の影響を除くため、白髪を有する同一人から、白髪と黒髪を採取した。採取した毛髪から、色素細胞と近接する毛包上皮系細胞部あるいは色素細胞に隣接する間葉系細胞（毛乳頭細胞）を顕微鏡下で単離する。採取した毛包上皮系細胞部からは直接、または毛乳頭細胞は分離後培養増幅した後に、ゲノムDNAを調製した。

2) 「網羅的 DNA メチル化解析」

調製したゲノムDNAは、bisulfite法により、非メチル化シトシンをウラシルに変換した後に、illumina社のビー

ズアレイシステム（Infunium HumanMethylation 27K）を用い、ゲノム上の約2万7千箇所のプロモーター領域近傍のCpG配列を中心に、DNAメチル化状態を検証した。

3. 結果

回収したゲノムDNAの網羅的DNAメチル化解析を、4つの検体について行った（図1）。レーン#1と#2が白髪由来、#3と#4が黒髪由来である。約27,000箇所のDNAメチル化定量解析結果を階層クラスター解析をすると、#3と#4が比較的近いことがわかる。その一方で、細部を見ると、DNAメチル化異常体が異なる部分も散見される。一方、#1と#2のDNAメチル化状態は、黒髪由来の#3、#4と大きくは異なるが、#3と#4の間に見られる類似性に比べると、差異が大きい系統である事が見て取れる。また、#1と#2の相同性は、#3と#4の相同性と比較して変化が大きく、エピジェネティックな観点からは、やや不均一な集団となっている可能性が考えられる。

図2は、サンプル#2と#3で定量解析した各CpGをドットで表し、DNAメチル化状態を比較した図である。ほぼ傾き1の直線上に乗る点が大多数であり、ほとんどのゲノム領域では、白髪でも黒髪でも類似のDNAメチル化状態を保っている可能性が推測される。一方で、傾き1の直線から大きく離れたドット（ゲノム領域）は、DNAメチル化状態が大きく変化している領域であり、今後、これらのDNAメチル化状態の変化の生理的意義の解析が、重要であると考えられる。

今年度は本助成を利用して以上の解析を行ったが、今後は、以下の要領で解析を進めていく。

「遺伝子発現解析」同じく調製した細胞からtotal RNAを回収し、発現マイクロアレイ解析を行い、白髪・黒髪で発現量の異なる遺伝子をスクリーニングする。

「標的候補領域の決定」今年度の網羅的DNAメチル化解

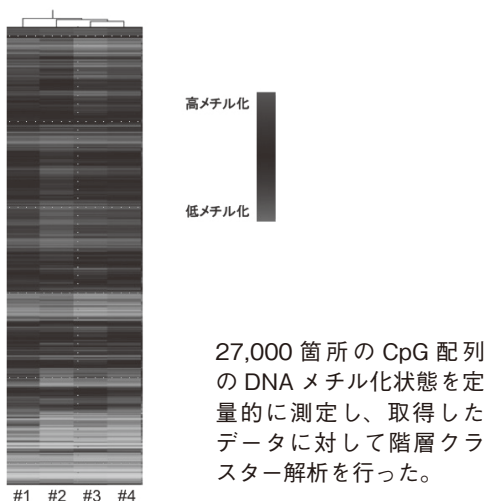


図1 網羅的 DNA メチル化解析結果の比較

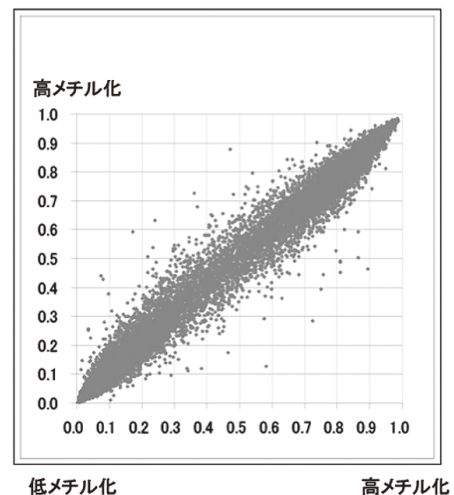


図2 二検体間での DNA メチル化状態比較

析結果を基に、遺伝子発現解析と網羅的DNAメチル化解析の二つのデータを参照し、白髪が形成される際に、発現量とメチル化状態が同時に変化する領域を絞り込む。

「人為的黒髪白髪誘導条件の検討」次に、これらの絞り込まれた数カ所の遺伝子領域に着目して、化学物質等による黒髪化および白髪化の人為的な誘導の可能性を検討する。例として、前述細胞に白髪改善効果が知られているp-aminobenzoic acidを加え、白髪および黒髪の毛髪由来細胞の遺伝子発現状態やメチル化状態の変化を検証する。これらの網羅的発現解析とエピゲノム解析結果、および誘導モデル系での詳細の検証を統合的に行う事で、白髪予防薬剤の開発、抗白髪サプリメントの開発、食生活指導プログラム開発等々の医学的、美容医学的領域に展開が可能である。

4. 考 察

高齢化社会を迎え、医学的観点からの疾病や老化のみならず、老徴の克服を含めたコスメトロジーに対する国民の希求が高まっている。本研究課題の成果により、基礎医学的には、色素幹細胞分化および毛髪色加齢変化におけるエピジェネティクスの役割という新しい概念を提案することができる。また、コスメトロジーの観点からは、多くの人々の美容上の大きな悩みである「白髪」改善へのアプローチ方法を示すことが期待できる。近年薄毛対処法は、複数種の医薬品の登場により改善の手立てが提供されてきているが、白髪に関しては未だに有力な解決策が提示されておらず、本研究の成果が重要な知見をもたらすと期待できる。

(参考文献)

1) Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem

cells. *Nature*. Mar 3;471 (7336) : 68-73.

- 2) Heijmans BT, Tobi EW, Lumey LH, Slagboom PE. The epigenome: archive of the prenatal environment. *Epigenetics*. 2009 Nov 16;4 (8) :526-31.
- 3) 久須美真紀、中林一彦、秦健一郎. 体外培養・長期培養の胚発生への影響：動物実験と臨床データから. *J Mammal Ova Res* 2008;25 (4) :221-30.
- 4) Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 2007 Feb 23;128 (4) :747-62.
- 5) Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, et al. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*. 2002 Nov 28; 420 (6914) : 426-9.
- 6) Inomata K, Aoto T, Binh NT, Okamoto N, Tanimura S, Wakayama T, et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell*. 2009 Jun 12;137 (6) :1088-99.
- 7) McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*. 2002 Jun 14;109 (6) :707-18.
- 8) Tobin DJ, Paus R. Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Exp Gerontol*. 2001 Jan;36 (1) : 29-54.
- 9) Ideta R, Soma T, Tsunenaga M, Ifuku O. Cultured human dermal papilla cells secrete a chemotactic factor for melanocytes. *J Dermatol Sci*. 2002 Jan;28(1):48-59.
- 10) Cline DJ. Changes in hair color. *Dermatol Clin*. 1988 Apr;6 (2) :295-303.