



In Vitro Expansion of Immature Melanoblasts and Their Ability to Repopulate Melanocyte Stem Cells in the Hair Follicle

米谷, さおり

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4067

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004067>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	米谷 さおり
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1869 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 19 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

In Vitro Expansion of Immature Melanoblasts and Their Ability to Repopulate Melanocyte Stem Cells in the Hair Follicle（純化したマウス未分化メラノブラストの試験管内培養法の確立と移植実験による色素幹細胞システムの再構築）

審 査 委 員

主 査	教 授	田原 真也
	教 授	根木 昭
	教 授	林 祥剛

成体幹細胞（体性幹細胞、組織幹細胞）は、自己複製能および特定の機能をもついくつかの系譜細胞に分化する能力を併せ持つ細胞と定義されている。成体幹細胞はこれらの相反する性質を併せ持つことにより、個体において生涯にわたり存在する組織において分化細胞を供給し続けているのである。成体幹細胞の維持機構の分子基盤を明らかにすることは、基礎生物学においても再生医療や癌治療などの臨床応用においても非常に重要である。しかし、組織内で成体幹細胞がどのように維持制御されているかは未だ十分に解明されていない。組織において成体幹細胞はある限られた特定の場所に存在することが分かってきており、この特殊な部位は“幹細胞ニッチ”とよばれている。この幹細胞ニッチで成体幹細胞は維持制御されていると考えられている。各々の組織において幹細胞ニッチの場所を特定することや成体幹細胞のみを特異的に標識することは困難であるため、幹細胞ニッチや幹細胞の制御維持に関しては十分に理解されていないことが多い。なかでも色素幹細胞維持に係る遺伝子の異常は体毛色の異常（白髪化）で容易に分かり、メラノサイト（色素細胞）系譜細胞の欠損は個体の生命に係らず、個々の幹細胞を同定することが比較的容易で、周期的に再生を繰り返している組織に存在しているといったことから色素幹細胞は成体幹細胞研究の良いモデルとなると考えられている。このように色素幹細胞は幹細胞研究における絶好のモデルとなり得るにもかかわらず、色素幹細胞の機能評価に適切な *in vitro* でのアッセイ法が現在のところ存在しないため、その維持制御機構にかかわる分子の研究はあまり進んでいない現状にある。そこで我々は色素幹細胞の機能評価に適切なアッセイ法を確立することを目的として実験を行った。

これまでにマウスのメラノプラスト（色素芽細胞、色素前駆細胞）の培養法についてはいくつかの方法が報告されてきているが、どの方法においても胎児あるいは新生児マウスの皮膚あるいは表皮から分離した細胞を用いるため、培養を開始する時点ではケラチノサイト（角化細胞）や線維芽細胞など皮膚に存在するメラノサイト系譜細胞以外の系列の細胞が含まれている。またこれらの既存の培養法では生体内に存在しない TPA やコレラトキシン、dbcAMP といった非常に強力な growth factor を用いる必要があった。まず、これらの既存の培養法の第一の問題点を克服するために、色素細胞系譜細胞のみを GFP で標識したトランスジェニックマウス（ $Dcf^{m1(Cre)Bee}/CAG-CAT-GFP$ ）（胎生 15.5 日）よりフローサイトメーターを用いて GFP 陽性未分化メラノプラストをソーティングし、単離することに成功した。その後の実験においてこれらの純化未分化メラノプラストは単独での培養は困難であることが判明した。そこで、支持細胞の存在下で共培養を行うと培養が可能となった。さらに、線維芽細胞系の細胞株（OP9、PA6、NIH3T3）と比較し

て、特にケラチノサイトの細胞株である XB2 が支持細胞として極めて優れているということが分かった。また、この純化未分化メラノプラストは、既存の培養法の第二の問題点である生体内に存在しない強力な growth factor を添加することなく、生体内に存在する growth factor である SCF と FGF2 のみを添加することにより、XB2 ケラチノサイトを支持細胞として未分化な状態のまま効率よく増殖することを見出した。そして、これらの増殖させた未分化メラノプラストは、分化を誘導するような条件下で培養するとメラニン顆粒を有する成熟メラノサイトへ分化する能力を有することが確認された。

通常、試験管内で増殖させた培養細胞が幹細胞としての性質を持つかどうかは、最終的には内因性の幹細胞を取り除いた状態で試験管内で増殖させた細胞を生体内に移植することにより、生体組織を再構築できるかどうかを調べることで確認される。例えば造血幹細胞においては既に移植実験によるアッセイ法が確立されてきている。しかしメラノサイトにおいてはこのような培養幹細胞のアッセイ法がいまだ確立されていない。我々は上記の方法により XB2 ケラチノサイトを支持細胞として SCF と FGF2 を添加して効率よく試験管内で増殖させた未分化メラノプラストをすでに確立されているマウスケラチノサイトの毛包再構築法を用いることによって（内因性のメラノサイト系譜細胞を欠く）表皮由来の細胞と真皮とともに移植する方法により、再生した毛包の毛色の色素沈着を認め毛色を再構築するということを確認した。また剃毛により次の毛周期を誘導した際にも毛色の色素沈着が認められることも確かめた。一方、分化メラノサイトを移植した時には毛色の着色は認められなかった。これらのことから上記の方法で試験管内で増殖させた未分化メラノプラストは色素幹細胞として毛色を再構築する能力を有するということが証明された。

我々はマウスより純化未分化メラノプラストを単離し、これらの純化未分化メラノプラストを未分化な状態のまま効率よく増殖させる方法の確立に成功した。また培養した未分化メラノプラストは *in vivo* でも成体幹細胞としての機能を有していることも確認された。今回確立したアッセイ法は生体の状態を反映した画期的なものと言える。今後、このアッセイ法に遺伝子操作等を組み合わせることで色素幹細胞の分子機構をより詳細に解明する非常に有効な方法となり得るであろう。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 1871 号	氏 名	米谷 さおり
論 文 題 目 Title of Dissertation	純化したマウス未分化メラノブラストの試験管内培養法の確立と移植実験による色素幹細胞システムの再構築 <i>In Vitro</i> Expansion of Immature Melanoblasts and Their Ability to Repopulate Melanocyte Stem Cells in the Hair Follicle		
審 査 委 員 Examiner	主 査 田 原 真 也 Chief Examiner 副 査 梶 子 昭 Vice-examiner 副 査 林 祥 剛 Vice-examiner		
審 査 終 了 日	平成 19 年 7 月 18 日		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

成体幹細胞は、自己複製能および特定の機能をもついくつかの系譜細胞に分化する能力を併せ持つ細胞と定義され、これらの相反する性質を併せ持つことにより個体において生涯にわたり分化細胞を供給し続けている。成体幹細胞の維持機構の分子基盤を明らかにすることは、基礎生物学においても再生医療や癌治療などの臨床応用においても非常に重要である。組織において成体幹細胞は“幹細胞ニッチ”とよばれる特定の場所に存在し、維持制御されていると考えられている。各々の組織において幹細胞ニッチの場所を特定することや成体幹細胞のみを特異的に標識することは難しいため、幹細胞ニッチや幹細胞の制御維持に関しては未だ十分に解明されていない。なかでも色素幹細胞維持に係る遺伝子の異常は体毛色の異常（白髪化）で容易に分かり、メラノサイト（色素細胞）系譜細胞の欠損は個体の生命に係らず、個々の幹細胞を同定することが比較的容易で、周期的に再生を繰り返している組織に存在しているといったことから色素幹細胞は成体幹細胞研究の絶好のモデルとなると考えられている。にもかかわらず、色素幹細胞の機能評価に適切な *in vitro* でのアッセイ法が現在のところ存在しないため、その維持制御機構にかかわる分子の研究はあまり進んでいない。そこで申請者達は色素幹細胞の機能評価に適切なアッセイ法を確立することを目的として実験を行った。

これまでにマウスのメラノサイト系譜細胞の培養法はいくつかの方法が報告されてきているが、いずれも胎児や新生児の皮膚又は表皮から分離した細胞を用いるため、培養開始時にはケラチノサイト（角化細胞）や線維芽細胞など他の系譜細胞が含まれている。また既存の培養法では生体内に存在しない TPA やコレラトキシン、dbcAMP といった非常に強力な growth factor を用いる必要があった。まず既存の培養法の第一の問題点を克服するため、色素細胞系譜細胞のみを GFP で標識したトランスジェニックマウス（Dctm1(Cre)Bee/CAG-CAT-EGFP）（胎生 15.5 日）よりフローサイトメーターを用いて GFP 陽性未分化メラノブラストをソーティングし、単離することに成功した。これらの純化未分化メラノブラストは単独での培養は困難であったが、支持細胞の存在下での共培養が可能であった。更に線維芽細胞系の細胞株（OP9、PA6、NIH3T3）と比較して、ケラチノサイトの細胞株である XB2 が支持細胞として極めて優れていた。またこの純化未分化メラノブラストは、既存の培養法の第二の問題点の生体内に存在しない強力な growth factor を添加せず、SCF と FGF2 のみを添加することにより、XB2 ケラチノサイトの存在下で未分化な状態のまま効率よく増殖した。これらの増殖させた未分化メラノブラストは、分化を誘導する条件下では

メラニン顆粒を有する成熟メラノサイトへ分化し得ることを確認した。

通常、培養細胞が幹細胞としての性質を持つかは、内因性の幹細胞を取り除いた状態で培養細胞を生体内に移植すると生体組織を再構築できるかどうかにより確認される。例えば造血幹細胞では既に移植実験によるアッセイ法が確立されている。しかしメラノサイトでは培養幹細胞のアッセイ法が未だ確立されていない。申請者達は上記の方法により試験管内で増殖させた未分化メラノブラストをすでに確立されたマウスメラチノサイトの毛包再構築法を用いて（内因性のメラノサイト系譜細胞を欠く）表皮細胞と真皮とともに移植する方法により、再生毛の色素沈着を認め毛色を再構築するということを確認した。また剃毛し次の毛周期を誘導し毛色の色素沈着を確認した。一方、分化メラノサイトを移植した時には毛色の着色は認められなかった。以上より試験管内で増殖させた未分化メラノブラストは色素幹細胞として毛色の再構築能を有するということを証明した。

本研究はマウスより純化未分化メラノブラストを単離し、これらの純化未分化メラノブラストを未分化な状態のまま効率よく増殖させる方法を確立し、培養した未分化メラノブラストが *in vivo* でも成体幹細胞としての機能を有していることを示した。今回確立したアッセイ法は生体の状態を反映した画期的なもので、今後、このアッセイ法に遺伝子操作等を組み合わせることで色素幹細胞の分子機構のより詳細な解明を可能にする重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

(氏名・南 裕明) NO 1)

Cantor の三角級数の研究によって始められた集合論は、1970 年代の Cohen による強制法の発明によって著しい発展を遂げた。実数の集合論はその発展によって生じた分野のひとつで、主にベールの性質や測度などの実数の性質や自然数の順序構造などを強制法などの集合論の手法を使って調べることを通して、実数の性質を明らかにすることを目的としている

本論文では次の観点から実数の集合論の研究を行った。

- 1 有限反復強制法と組合せ原理 “パラメータ付ダイヤモンド $\Diamond(A, B, E)$ ” の関係、
- 2 順序 $((\omega)^\omega, \leq^*)$ の基数不変量と Cichoń の図式にあらわれる基数不変量の関係。

1 に関しては実数の集合論で主要な技法である反復強制法を組合せ原理の知識を用いて詳しく分析することで、反復強制法の知識をより洗練させることを目指した。ここで組合せ原理とは実数や順序数の組合せ論的な主張のことで、集合論の公理や内部モデルの性質を抽象したものである。

特に注目したのは [Moore et al] で導入されたパラメータ付ダイヤモンド $\Diamond(A, B, E)$ とよばれる組合せ原理で、実数の集合論で重要な Borel 不変量によってパラメータ付けされた組合せ原理の広い枠組みである この組合せ原理は [Jensen] によって導入されたダイヤモンド原理 \Diamond より一般に弱い、 $\Diamond(M, \mathbb{R}, \mathcal{F})$ から Suslin の仮説の否定が示されるなど \Diamond から導かれるいくつかの性質や実数に関する命題を証明することができる。またパラメータ付ダイヤモンドは Borel 不変量同士の順序関係 Borel-Tukey 順序 \leq_B^P に関して「 $\langle A_1, B_1, E_1 \rangle \leq_B^P \langle A_2, B_2, E_2 \rangle$ かつ $\Diamond(A_2, B_2, E_2)$ が成り立てば $\Diamond(A_1, B_1, E_1)$ も成立する」という階層をなしており、 \Diamond の解析に関して重要な役割を果たすと考えられる。

本論文ではまずパラメータ付ダイヤモンドの階層に関する研究について述べる。Moore, Hrušák と Džamonja らはパラメータ付ダイヤモンドの階層の連続体仮説のもとでの分離可能性に関して次の問題を提出した。

問題 二つの Borel 不変量 $\langle A_1, B_1, E_1 \rangle, \langle A_2, B_2, E_2 \rangle$ が与えられたとき、Borel 不変量から与えられる基数に関して $\langle A_1, B_1, E_1 \rangle < \langle A_2, B_2, E_2 \rangle$ をみたすモデルが存在するとき、連続体仮説と $\Diamond(A_1, B_1, E_1)$ をみたすが $\Diamond(A_2, B_2, E_2)$ が成り立たないモデルが存在するか？

この問題に関して実数の集合論でよく使われる ω_1 回の c.c.c 半順序の有限反復強制法 \mathbb{P}_{ω_1} に着目して研究を行い、 $\Diamond(A, B, E)$ を強制するために各回で付加される実数がみたすべき条件を明らかにした。さらに有限反復 c.c.c 強制法における保存定理を参考に、generic 拡大と基礎モデルの間で、関係 E に関してある種の “保存” が成り立つならば、generic 拡大を行っても $\Diamond(A, B, E)$ の否定が保存されることを証明した。これらの結果をもちいて Cichoń の図式にあらわれる Borel 不変量に対するパラメータ付ダイヤモンドの階層の分離を行い、この問題を解決した。

次に ω_2 回の Suslin c.c.c 強制法の有限反復強制法からどのようなパラメータ付きダイヤモンドが強制されるかについて述べる。 ω_2 回の proper な強制法の可算反復強制法に関しては [Moore et al] によりどのようなパラメータ付ダイヤモンドが強制されるか証明されているが、有限反復強制法に関しては同様の議論が成り立たない。そこで c.c.c 強制法の有限反復強制法における基数不変量の保存定理を解析し Suslin c.c.c 強制法の反復強制法の完備埋め込みに関する性質と、完備埋め込みによって導かれる商順序に着目することで ω_2 回の Suslin c.c.c 強制法による有限反復強制法でパラメータ付ダイヤモンドを強制する技法を開発した。この技法をもちいて 4 つの無矛盾性に関する結果を証明する

2 に関して、自然数の無限分割全体に “ほとんど粗い” という関係で順序をいれた構造 $((\omega)^\omega, \leq^*)$ の解析を行った。実数の集合論では ω の部分集合全体を有限部分集合のなすイデアル fin で割った商構造 $p(\omega)/fin$ に “ほとんど含まれる” という関係 \leq で順序を入れた構造 $(p(\omega)/fin, \leq)$ が

(氏名・南 裕明) NO 2)

基数不変量などをとおして非常に深く研究されてきた 近年、 $(p(\omega)/fin, \leq)$ に類似の順序構造 $(p(\omega)/I, \leq_I)$ や $(Dense(\mathbb{Q}), \leq_{nwd})$ についても基数不変量が導入され、その性質が研究されてくるようになり、 $((\omega)^\omega, \leq^*)$ において同様に研究が行われていたが [Cichoń][Halbeisen], 多くの問題が未解決のまま残されていた。

本論文では双対分離基数 s_d 、双対非分離基数 τ_d や双対独立基数 i_d などを中心にこれらの基数に関する性質や無矛盾性の結果を紹介する。

まず $(p(\omega)/fin, \leq_{fin})$ において定義される独立基数 i を参考に双対独立基数 i_d を定義した。さらに $(p(\omega)/fin, \leq_{fin})$ にはない $((\omega)^\omega, \leq^*)$ の代数的な性質に着目することで Cohen 強制法で i_d が保存されることを示すことで、次を証明した

Theorem 1. $i_d < c$ は ZFC と無矛盾。

次に s_d および τ_d と van Douwen の図式にあらわれる基数不変量との間の関係の研究を行った。[Cichoń et al] などの結果から $\tau_d \leq \tau$ および $s_d \geq s$ が知られていた。さらに $s > \tau$ が無矛盾であるので $s_d > \tau$ の無矛盾性も導かれる。これに関連して以下の問題が未解決のまま残されていた：

問題 $s_d < \tau$ は無矛盾か？

この問いに対して [Cichoń et al] においてあらわれる強制概念 IDS の性質を詳しく調べて、神戸大学の Brendle が $s_d < \mathfrak{d}$ および $\tau_d > \mathfrak{b}$ の無矛盾性を示す際にもちいたコンパクトトリックの技法を精密化することにより次の定理を証明した。

Theorem 2. $V \models \mathfrak{b} = \mathfrak{c}$ ならば $V^{DS_{\omega_1}} \models s_d = \omega_1 < \tau = \mathfrak{c}$

これにより s_d と τ は良く似た性質を持つものの、大小関係に関しては ZFC では決定できないことを明らかにした

さらに s_d および τ_d と Cichoń の図式にあらわれる基数不変量との間の関係の研究を行った。[Cichoń et al], 神戸大学の Brendle や大阪府立大学の加茂静夫らの結果より $\tau_d \leq \text{non}(\mathcal{N}), \text{non}(\mathcal{M}), \mathfrak{d}$ および $s_d \geq \text{cov}(\mathcal{N}), \text{cov}(\mathcal{M}), \mathfrak{b}$ が ZFC において示されており、 τ_d の上界および、 s_d の下界は知られていた。そこで τ_d の下界および、 s_d の上界を調べるため次の問題を考えた。

問題 $\text{add}(\mathcal{M}) \leq \tau_d?$ $\text{cof}(\mathcal{M}) \geq s_d?$

この問いに対して新たな基数不変量 s_{pair} を導入して $s, \tau_d \leq s_{\text{pair}}$ を証明し、さらに Hechler 強制法の rank の技法を精密化することによって s_{pair} が Hechler 強制法による拡張で保存されることを示すことで次の定理を証明した。

Theorem 3. $\tau_d < \text{add}(\mathcal{M})$ および $s_d > \text{cof}(\mathcal{M})$ が ZFC と無矛盾。

本論文は次の構成からなる。第 1 章では集合論についての基本的な内容について解説する。第 2 章ではパラメータ付ダイヤモンドを導入して、有限反復強制法との関係を述べる。この章の内容は [Minami1][Minami2] を含む。第 3 章では $((\omega)^\omega, \leq)$ についての定義や基本的な性質について述べ、いくつかの基数不変量を導入する。第 4 章では $((\omega)^\omega, \leq)$ の基数不変量についての研究の結果を述べる。この章の内容は [Minami3][Minami4] を含むものである。

参考文献

[Cichoń]Jacek Cichoń, Adam Krawczyk, Barbara Majcher-Iwanow, Bogdan Węglorz, “Dualization of the van Douwen diagram”, J. Symbolic Logic 65 (2000), no. 2, 959–968.
[Halbeisen]Lorenz Halbeisen, “On shattering, splitting and reaping partitions”, Math. Logic. Quart. 44 (1998), no. 1, 123–134.