京都大学	博士（応用発生生物学学）	氏　名	西川（鳥飼）聡美
論文題目	Functional characterization of melanocyte stem cell in hair follicles （毛包に存在する色素幹細胞の機能的解析）		

（論文内容の要旨）

色素細胞は動物の発生初期に神経冠細胞から派生し、真皮、表皮へ移動の上、最終的に毛包の中に取り込まれる。毛包の伸長とともに分化した色素細胞は毛根に移動し色素を産生する成熟色素細胞(Mc)になるが、色素幹細胞は毛包上部のバルジ領域にあるニッチに留まり静止状態に入る。毛包の中の色素幹細胞は静止状態、自己複製と分化を繰り返しながら生涯維持されていくが、この静止状態がいかに誘導され維持されるのかについて機序は未だ明らかではない。造血幹細胞では、その動態を解析する場合、in vitro 培養システムと in vivo 再構築システムを組み合わせることが有効であり、分離、培養、移植の一連の解析法が既に活用されている。しかし色素幹細胞に関しては同様の解析法が未確立であり、本研究では色素幹細胞分離、培養、毛包再構築の方法の確立を試みた。

まず単一の胎児色素細胞(Melanoblast: Mb)の増殖分化を支持する培養条件を確立した。次に、バルジ領域にある色素幹細胞がこの条件で増殖するかを検討した。色素細胞特異的に GFP（green fluorescent protein）を発現する遺伝子改変マウスから毛包を一本ずつ分離し、顕微鏡下で色素幹細胞を含む上部と色素細胞の増殖分化が進む下部に分離した。続いて蛍光細胞ソータ（FACS）で GFP 陽性細胞を分取し、上述の条件で培養した。その結果、色素幹細胞を含む毛包上部の色素細胞のみが増殖し、それらの細胞は分化誘導培地に変えると成熟色素細胞に分化した。次に、この培養法を用いたアッセイにより、遺伝子改変マウスの皮膚由来の色素幹細胞の分離法を検討し、GFP 陽性、c-kit^{low}, side scatter(SSC)^{low}, forward scatter(FSC)^{low}細胞を分離することで幹細胞が純化できることを明らかにした。次に、毛包内では静止期色素幹細胞のみが c-kit 非依存的に生存できる性質を利用して、この FACS プロフィルを持つ細胞集団が静止期幹細胞かどうかを検討した。c-kit 機能を抑制する ACK2 抗体をマウスに投与し、静止期幹細胞以外の色素細胞を選択的に消失させ FACS で解析した。その結果、処理前には様々なサブグループに分かれて存在していた GFP 陽性色素細胞が、処理後はほぼ c-kit^{low}, SSC ^{low}, FSC^{low}分画にのみ限局すること、またそれらの細胞が ACK2 非処理マウス由来の GFP 陽性色素幹細胞と比べて高い増殖能を示す均一な集団になっていることが明らかになった。上述の培養条件で一週間培養した静止期幹細胞を、色素を持たないマウスの真皮シートとともにヌードマウスの背中に移植すると、色素をもつ毛包が in vivo で再構築された。再構築された毛包は組織学的に正常毛包と差は認められず、ニッチにも色素幹細胞が存在した。最後に、遺伝子改変マウスで得られた解析結果（c-kit^{low}/SSC ^{low}/FSC^{low}）に基づいて野生型マウスから色素幹細胞の分取を試み、試験管内増殖を示す静止期幹細胞を純化することに成功した。このように本研究では、単一 Mb および静止期色素幹細胞が増殖可能な培養法、および FACS による静止期幹細胞の分離法を確立し、in vivo 再構築を用いた色素幹細胞機能評価実験系を完成させた。これらの方法は、幹細胞の増殖と静止の分子機構を研究する重要なツールになると期待される。

（論文審査の結果の要旨）

色素幹細胞は毛包のバルジ領域に存在し、静止状態と自己複製を繰り返しながら維持されるが、その機序は未だ明らかではない。幹細胞の動態を解析する場合、in vitro 培養システムと in vivo 再構築システムを組み合わせることが有効であることから、本研究では色素幹細胞分離、培養、毛包再構築の方法の確立を試みた。

まず単一の胎児色素細胞の増殖分化を支持する培養条件を確立した。次に、色素細胞を蛍光蛋白質（GFP）で標識した遺伝子改変マウスを用いて、バルジ領域にある色素幹細胞がこの条件で増殖することを確認した。この培養法を用いたアッセイにより、蛍光細胞ソータ（FACS）を用いて遺伝子改変マウスの皮膚から GFP^{+}／c-kit^{low}／side scatter(SSC)^{low}／forward scatter(FSC)^{low} 細胞を分離することで幹細胞が純化できることを明らかにした。次に、静止期幹細胞以外の色素細胞を選択的に消失させ FACS で解析した。その結果、GFP^{+}細胞が、c-kit^{low}／SSC^{low}／FSC^{low}分画にのみ限局する、高い増殖能を示す均一な集団になっていることが明らかになった。上述の培養条件で培養した静止期幹細胞をヌードマウスに移植すると、色素をもつ毛包が再構築された。最後に、遺伝子改変マウスの解析結果に基づいて、野生型マウスから試験管内増殖を示す静止期幹細胞を純化することに成功した。

本研究は、静止期色素幹細胞の分離、培養、移植による機能評価という一連の解析手法を確立した初めての報告という点で大きな意味を持つものであり、今後の色素幹細胞の静止、増殖、分化を制御する分子機構の解明に寄与することが期待できる。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成２３年１１月９日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降