



Title	Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells
Author(s)	森山, 麻里子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47520">https://hdl.handle.net/11094/47520</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	もり やま まり こ 森 山 麻 里 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 6 4 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 8 月 18 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Notch signaling via <i>Hes1</i> transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells (Notch シグナルによる <i>Hes1</i> 転写因子を介した色素細胞前駆細胞及び色素細胞幹細胞の生存維持)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 杉野 明雄  (副査) 教 授 仲野 徹 教 授 濱田 博司

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [ 目 的 ]

色素細胞前駆細胞 (Mb) は神経冠より発生し、真皮結合組織を經由して表皮中を移動、最終的に毛包へと局在する。毛包の中に移動した Mb の多くは毛母において色素細胞へと成熟するが、一部はバルジと呼ばれる領域付近で未分化な状態を保ちながら留まり、色素細胞幹細胞 (MSC) となる。これまでに Mb 及び MSC は周囲の表皮ケラチノサイトとの細胞間相互作用により厳密に制御されていると考えられてきたが、その詳細な分子機構などは明らかになっていない。一方、Notch シグナルは細胞間相互作用により活性化され、細胞の運命決定、増殖、生存などに重要な役割を果たしている。今回我々は、Notch シグナルが Mb 及び MSC で活性化していることを見出した。そこで、Notch シグナルの Mb 及び MSC における働きを明らかにする目的で本研究を行った。

#### [ 方法ならびに成績 ]

1. 活性化 Notch1 に対する抗体と色素細胞系のマーカーに対する抗体で、胎生 16.5 日目のマウス胎児及び生後 4 日目のマウス皮膚を組織染色したところ、Notch1 は Mb 及び MSC で活性化していた。
2. Mb の周囲に存在する表皮ケラチノサイトにおける、Notch 受容体のリガンドの発現を調べるために、胎生 16.5 日目のマウス胎児皮膚で *in situ* hybridization を行ったところ、*Jagged-2* が表皮基底層のケラチノサイトに発現していた。
3. Mb において、Notch シグナルの下流である *HES* ファミリー遺伝子の発現を RT-PCR 及び Q-PCR にて調べたところ、Mb においては、*Hes1*、*Hes5*、*Hey1* が発現しており、その発現レベルは *Hes1* が最も高かった。
4. *Hes1* promoter の制御により EGFP を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、この Tg マウスの胎生 16.5 日目、生後 4 日目背部皮膚において、色素細胞系のマーカーと抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、分化した色素細胞は GFP 陰性であるのに対し、Mb、MSC は GFP 陽性であった。つまり、Mb、MSC では *Hes1* が

発現している事が示された。

5. 色素細胞系譜特異的に Notch シグナルを抑制させるため、*RBP-J* コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作成し、その表現系を観察した。このマウスは生直後より毛色が薄い表現系を示し、さらに次の毛周期に生えてきた毛は完全に白髪になっていた。免疫組織染色により、この cKO マウスの胎生 16.5 日目胎児皮膚では著しく Mb が減少しており、生後皮膚においては、生後 4 日目では観察されたバルジ付近の MSC が生後 12 日目ではほとんど消失していた。

6. 胎生 15.5 日目の胎児皮膚を器官培養し、Notch シグナル阻害剤 ( $\gamma$ -secretase 阻害剤) である DAPT を作用させ、その培養皮膚を免疫染色し、また免疫不全マウスに移植した。Notch シグナルを阻害した培養皮膚では、Mb が劇的に減少したが、色素細胞特異的に Hes1 を発現させた Tg マウスではそのような現象は見られなかった。また、DAPT で処理した野生型の培養皮膚で、培養開始短時間後には多くの Mb が TUNEL 陽性、活性化型 Caspase3 陽性であったことより、Notch シグナルを阻害すると、Mb はアポトーシスによる細胞死を起こす事が判明した。

#### [ 総 括 ]

Mb 及び MSC では、周囲の表皮ケラチノサイトとの細胞間相互作用によって Notch シグナルが活性化しており、その下流の転写因子である Hes1 が発現している。Notch シグナルを抑制する事により、Mb 及び MSC はアポトーシスによる細胞死に至るが、Hes1 を強制発現する事で細胞死は回避される。Hes1 が転写抑制因子であることを考えると、Notch シグナルは Hes1 を介して何らかのアポトーシス実行因子の発現を抑制する事により、Mb 及び MSC をアポトーシスによる細胞死から保護しているものと思われる。また、Mb が活発に表皮内を移動している事を考慮すると、Mb における Notch シグナルの生理学的な意義としては、Mb が表皮ケラチノサイトの制御下においてのみ生存や増殖を可能にする状況を作り出しているのではないかと思われる。

### 論文審査の結果の要旨

未分化な色素細胞であるメラノブラスト (Mb) と色素細胞幹細胞 (MSC) は周囲の表皮ケラチノサイトとの細胞間相互作用によって厳密に制御されていると考えられているが、詳細な機構については明らかになってはいない。一方、Notch シグナルは細胞間相互作用によって活性化され、細胞の運命決定、増殖、生存などに関与していることが分かっている。

本研究では、Notch シグナルが Mb および MSC において、その生存を制御していることを見いだした。まず、Mb、MSC において Notch シグナルが活性化していることを確認した。色素細胞特異的に Notch シグナルを抑制させたコンディショナルノックアウト (cKO) マウスでは毛色が著しく希釈されており、その後生え変わってきた毛も白髪になってしまった。この表現系は Mb および MSC がこの cKO マウスでは維持されないことによることが判明した。また器官培養した皮膚に Notch シグナルの阻害剤を作用させたところ、Mb はアポトーシスによって死に至り、それは Notch シグナルの下流分子である Hes1 を強制発現させることによって回復させることが出来た。つまり、Notch シグナルは Hes1 を介して Mb と MSC の生存維持に関与していることが明らかとなった。これらのことより、Notch シグナルが Mb、MSC と表皮ケラチノサイトとの相互作用により、その生存を厳密に制御していることが判明した。最近、色素細胞の癌である悪性黒色腫でも Notch シグナルが活性化しているとの報告がなされており、本研究は正常な色素細胞が悪性黒色腫へと変化する機構を説明しうる可能性を秘めている。その意味でも本研究の持つ意味は非常に大きいと考えられる。以上より、本研究は学位の授与に値すると思われる。