

機関番号 : 32713

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20591356

研究課題名 (和文) メラノサイト及びメラノーマ細胞における BMP と Kit, Mitf との相互関係

研究課題名 (英文) BMP, Kit and Mitf on melanocytes and melanoma cells

研究代表者

川上 民裕 (KAWAKAMI TAMIHIRO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 20297659

研究成果の概要 (和文) :

マウス神経冠細胞(NCC)に由来した NCC primary culture 培養系を介して、NCCmelan5(NCC 由来成熟メラノサイト細胞株)、NCCmelb4(NCC 由来メラノサイト前駆細胞株)、NCCmelb4M5(NCC 由来未熟メラノサイト細胞株) を確立し使用した。BMP4 が Kit の発現を誘導し、メラノサイトの分化を制御している可能性を示した。BMP4 はそのシグナル伝達系を介して、最も幼若な分化段階のメラノサイトで Kit 発現に関与している。さらに、NCCmelb4M5 細胞で Ret 蛋白が発現、NCCmelb4 細胞、NCCmelan5 細胞は陰性で、NCCmelb4M5 細胞 Ret は、BMP4 添加で減少した。Mel-Ret 細胞と比較すると癌メカニズムに BMP と Ret が関連していることが推測された。

研究成果の概要 (英文) :

We previously established three distinct cell populations of mouse neural crest (NC) cells, NCCmelb4, NCCmelb4M5 and NCCmelan5. BMP4 is activated and is involved in the regulation of Kit expression on most immature melanocyte precursors. We further investigated the influence of BMP4 in vitro using primary NC cells cultured from wild-type mice. Addition of BMP4 to the medium increased the number of Kit-positive cells compared to untreated controls. We have identified BMP4 as an important factor for prepubertal Kit-negative melanoblasts just prior to entering the Kit-dependent cycle of melanogenesis. Western blotting revealed expression of the Ret protein in NCCmelb4M5 and in Mel-Ret cells, but in contrast, there was no expression of the Ret protein in NCCmelb4 or NCCmelan5 cells. Immunostaining revealed that NCCmelb4M5 and Mel-Ret cells are positive for Ret, but NCCmelb4 and NCCmelan5 cells are negative for Ret. Thus, Ret protein is expressed in most immature melanoblasts, while melanocytes are negative for Ret. Based on these findings, the combined effects of Ret and BMP4 might provide important clues towards understanding the roles and working mechanisms in melanocyte development.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード : メラノサイト、メラノーマ、BMP、Kit、Mitf、Ret

## 1. 研究開始当初の背景

マウス皮膚メラノサイトはマウス神経冠細胞 (neural crest cells, NCC) に由来し、胎生 9 日頃、神経管から皮膚に向かい遊走し、胎生 12 日頃に表皮に到達するといわれている。この胎生期の NCC から成熟メラノサイトに至るにはいろいろな因子が関与する。この NCC から NCC primary culture 培養系を介して、NCCmelan5(NCC 由来成熟メラノサイト細胞株)、NCCmelb4(NCC 由来メラノサイト前駆細胞株)、NCCmelb4M5(NCC 由来未熟メラノサイト細胞株) を確立し、メラノサイトの分化や増殖、メラニン色素生成の検討に活用している。NCCmelb4M5 は Kit 陰性を呈し、チロシナーゼ関連蛋白 (Trp-1、Trp-2/DOPA クロマトウトメラゼ; Dct) 陽性で、チロシナーゼ、Ednrb、DOPA 反応は陰性である。一方、NCCmelb4 は Kit、Trp-1、Dct 陽性であるが、チロシナーゼ、Ednrb、DOPA 反応は陰性を呈する。NCCmelan5 は Kit、Trp-1、Dct、チロシナーゼ、Ednrb、DOPA すべてが陽性を示す。電子顕微鏡により、NCCmelb4、NCCmelb4M5 ともにメラノソームは stage I、電顕 DOPA 陰性、チロシナーゼ活性陰性を示す。以上より、NCCmelb4M5 株は最も幼弱なメラノサイトであり、移動することのない神経上皮細胞から活発に移動する NCC 細胞 (後のメラノサイト) への最初の段階に相当すると推測される。NCCmelb4 は Kit 発現があることから、NCCmelb4M5 がより分化した次の段階にあたる。NCCmelan5 は成熟したマウスメラノサイト細胞株といえる。

Kit は神経管からメラノサイト前駆細胞が離れる時期に発現し分化を誘導していく。われわれは、Kit/Kit ligand (KL) 情報伝達はメラノサイト前駆細胞が皮膚へ遊走するある一定の必須時期で、TGF $\beta$  は Kit/KL 伝達系も含めたより広い範囲で増殖、分化に関与していることなどを報告してきた。

BMP は、TGF $\beta$  スーパーファミリーの一つであり、生体の発生や形態形成、アポトーシスに重要な役割をする。初期発生に始まり、その後のほとんど全ての器官形成に関与する。BMP は NCC が神経上皮細胞から活発に移動しメラノサイトへ分化していくのを調整する。この発生初期段階で、腹側に位置する細胞が分泌する BMP に対し、背側細胞は神経誘導因子である Noggin を分泌し BMP と拮抗的かつ相互的に働く。BMP は NCC が遊走能をもち、分化している時期に発現し、影響を及ぼす。BMP がヒト皮膚のメラノサイトに関与していることが示された。われわれは、BMP が Kit の発現を誘導し、メラノサイトの分化を制御している可能性を示した。

色素細胞の分化・増殖を制御する遺伝子が

小眼球症関連転写因子(Mitf)である。Mitf はマスター遺伝子としてメラノサイト全体を総括し、メラノサイトの分化や増殖、メラニン色素形成に重要な役割をなす。その機能異常はメラノサイトの色素異常症ともいえる白斑や老人性色素斑、白髪などに関連する。

Ret は多発性内分泌腫瘍症(MEN)2A 型、MEN2B 型、家族性甲状腺髄様癌、Hirschsprung 病といった複数の遺伝性疾患の原因遺伝子である。その後、Ret のリガンドが神経栄養因子 Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)であることが明らかとなった。この Ret を導入した新系統の MT/RET<sup>-/-</sup>トランスジェニックマウスが樹立された。Ret トランスジェニックマウスでは、生下時より全身の皮膚黒色症を呈し、生後 3-4 ヶ月後に良性メラノサイト系腫瘍を発し、生後 10-12 ヶ月後に高率に悪性黒色腫を発症する。そしてリンパ節と肺に転移をおこす。

抗リン脂質抗体であるカルジオリピンやホスファチジルセリンは細胞膜内側に存在し、細胞膜表面にはでていない。ところが、細胞にアポトーシスが生じると、カルジオリピンやホスファチジルセリンは細胞膜表面にでてくる。ここに、抗カルジオリピン抗体や抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体が抗原抗体反応を起こし、局所に炎症を起こす。

## 2. 研究の目的

上記のいろいろな分化段階をもつ NCC 由来培養細胞や Mitf ミュウタントマウスを用いて、メラノサイトの分化・増殖及び遊走能、メラニン合成に関わる BMP、Mitf、Ret などの関連物質の役割や効果、作用を明らかにしたい。加えて、NCC primary culture 培養系を用い、より生体に近い状況で同様の関連物質の相互作用を検討する。

さらに、マウス悪性黒色腫由来細胞株である Mel-Ret 細胞、色素幹細胞等を使用し、BMP、Mitf、Ret などの役割と関連を検討したい。色素幹細胞は白斑の治療に発展性が期待できる。抗リン脂質抗体を関連させて悪性黒色腫細胞にアポトーシスを起こさせられれば、癌細胞を除去することが可能となる。

これらの結果が、実際の臨床で、メラノサイトによる色素異常症といえる白斑や老人性色素斑、白髪及びメラノサイトの悪性腫瘍である悪性黒色腫の病因や進展メカニズム、治療を解明する上でも重要な位置づけになると思われる。

## 3. 研究の方法

メラノサイトの発生を研究する際、胎生マウスより採取した NCC primary culture 培養系を用いるが、培養系自体が不安定で、か

つ多彩な因子が関連してしまい、実験系に限界があった。それに比べ、われわれが用いる3系統の分化段階が異なる培養細胞株は取り扱いが簡便であり、より広範囲の検索が可能である。特に Kit 発現が生じる発生初期段階のモデルともいえる NCCmelb4(NCC 由来メラノサイト前駆細胞株)、NCCmelb4M5(NCC 由来未熟メラノサイト細胞株) を使用し比較することで、BMP、Mitf、Ret との関係性を *in vitro* で調べられる。反対に、この結果を踏まえ、*in vivo* により近い NCC primary culture 培養系を用いた実験の条件設定などが容易に進行できる。

#### 4. 研究成果

NCCmelb4M5(NCC 由来未熟メラノサイト細胞株) は BMP 添加により形態学的にも NCCmelb4M5 から NCCmelb4 への変化を認めた。NCC primary culture 培養系で、BMP 添加は Kit 陽性細胞を増加させた。BMP は NCC が遊走能をもち、分化している時期に発現し、影響を及ぼす。BMP がヒト皮膚のメラノサイトに関与していることが示された。われわれは、BMP が Kit の発現を誘導し、メラノサイトの分化を制御している可能性を示した。BMP はそのシグナル伝達系を介して、最も幼若な分化段階のメラノサイトで Kit 発現に関与していることが示唆された。さらに、NCCmelb4M5 細胞で Ret 蛋白が発現、NCCmelb4 細胞、NCCmelan5 細胞は陰性であった。この NCCmelb4M5 細胞で Ret 蛋白が発現は、BMP 添加で減少した。Mel-Ret 細胞と比較すると癌メカニズムに BMP と Ret が関連していることが推測された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Kawakami T, Kimura S, Soma Y. Unilateral nevoid telangiectasia on the lower extremity of a pediatric patient. J Am Acad Dermatol. 査読 62(3):528-30. (2010)
2. Kawakami T, Saito C, Soma Y. Acquired dermal melanocytosis naevus of Ota-like macules on the face and extremities lesions. Acta Derm Venereol. 査読 89(4):415-6. (2009)
3. Chang CH, Kawa Y, Tsai RK, Shieh JH, Lee JW, Watabe H, Kawakami T, Soma Y, Tajima S, Mizoguchi M. Melanocyte precursors express elastin binding protein and elastin-derived peptide (VGVAPG) stimulates their melanogenesis and dendrite formation. J Dermatol Sci. 査読 51(3):158-70. (2008)
4. Kawakami T, Kimura S, Kawa Y, Kato M, Mizoguchi M, Soma Y. BMP-4 upregulates Kit expression in mouse melanoblasts prior to the Kit-dependent cycle of melanogenesis. J Invest Dermatol. 査読 128(5):1220-6. (2008)
5. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y. High titer of serum antiphospholipid antibody levels in adult Henoch-Schönlein purpura and cutaneous leukocytoclastic angiitis. 査読 Arthritis Rheum. 59(4):561-7. (2008)
6. Kawakami T, Kimura S, Kato M, Mizoguchi M, Soma Y. Transforming growth factor-beta overexpression in cutaneous extramedullary hematopoiesis of a patient with myelodysplastic syndrome associated with myelofibrosis. J Am Acad Dermatol. 査読 58(4):703-6. (2008)
7. Kawase A, Kushimoto T, Kawa Y, Ohsumi K, Nishikawa H, Kawakami T, Mizoguchi M, Soma Y. Proteomic analysis of immature murine melanocytes at different stages of maturation: a crucial role for calreticulin. J Dermatol Sci. 査読 49(1):43-52. (2008)

[学会発表] (計 9 件)

1. Kawakami T, Vasculitis from the dermatological point of view From 'The Clinic' to 'The Laboratory Bench'. The 35th Annual Meeting of the JSID 2010 年 12 月 3 日, Wakayama
2. Kawakami T, Soma Y, High serum levels of IL6, IL8, and antiphospholipid antibodies in adult Henoch-Schonlein purpura. the First Eastern Asia Dermatology Congress (EADC2010), 2010 年 10 月 3 日, Fukuoka
3. Kawakami T, Soma Y, Churg-Strauss Syndrome in childhood. European journal of pediatric dermatology. 2010 年 5 月 21 日, Lausanne
4. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y: Differences in anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies and cutaneous vasculitis between regular livedo reticularis and livedo racemosa. The 34th Annual Meeting of the JSID, 2009 年 12 月 6 日, Fukuoka
5. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y: Differences in anti-phosphatidylserine-prothrombin complex anti

bodies and cutaneous vasculitis between regular livedo reticularis and livedo. Incorporating the inaugural meeting of the Asian Academy of Dermatology & Venereology. 2009年11月7日, Hanoi

6. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y: Remission of hepatitis B virus-related cryoglobulinemic vasculitis with entecavir. The 4th joint meeting of Japanese Dermatological association and Australasian college of dermatologists. 2009年7月11日, Supporo
7. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y: High titer of serum antiphospholipid antibody levels in adult Henoch-Schönlein purpura and cutaneous leukocytoclastic angiitis. 17th congress of the European academy of dermatology and venereology. 2008年9月20日, Paris
8. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y: High titer of anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous polyarteritis nodosa. The fifth Joint Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (JSID), Society for Investigative Dermatology (SID), and European Society for Dermatological Research (ESDR). 2008年5月15日, Kyoto
9. Kawakami T, The presence of anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies associated with cutaneous polyarteritis nodosa. 2nd International conference on cutaneous lupus erythematosus. 2008年5月11日, Kyoto

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川上 民裕 (KAWAKAMI TAMIHIRO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20297659

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし