

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591435

研究課題名（和文） 毛包特異的癌抑制遺伝子ノックアウトマウスの作製：癌幹細胞の制御を目指して

研究課題名（英文） Hair bulge specific knock-out mouse of tumor suppressor gene

研究代表者

村上 信司（MURAKAMI SHINJI）

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50175626

研究成果の概要（和文）：皮膚癌幹細胞に由来する癌組織の生物学的特性を明らかにし、病理学的にどのように分類されるかを検討するため毛包幹細胞特異的に PTEN をノックアウトしたマウスを作製した。すなわち毛包幹細胞で発現されるケラチン 15 のプロモーターで Cre 酵素を発現するマウスと loxP 配列で PTEN 遺伝子を挟まれたマウスを交配して作製した。約 1 年間マウスを観察したがコントロールマウスと比べて明らかな腫瘍発生の増加を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：To investigate biological specificity and pathological classification of skin cancer stem cell derived tumor, hair bulge stem cell specific knockout mice were made. The transgenic mice that express Cre recombinase via keratin 15 promoter were mated with loxP-flanked PTEN mice and hair bulge stem cell specific PTEN knock-out mice were made. Although we analyzed these mice up to one year, no apparent difference was observed between control and knockout mice in terms of tumor progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：皮膚病理学・皮膚腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌研究の重要性と治療の課題

我が国において癌は死因の第1位を占め、癌克服に向けて新たな知見を見だし新規治療の創出を目指すことが強く望まれている。癌の治療は外科的切除、放射線による局所治

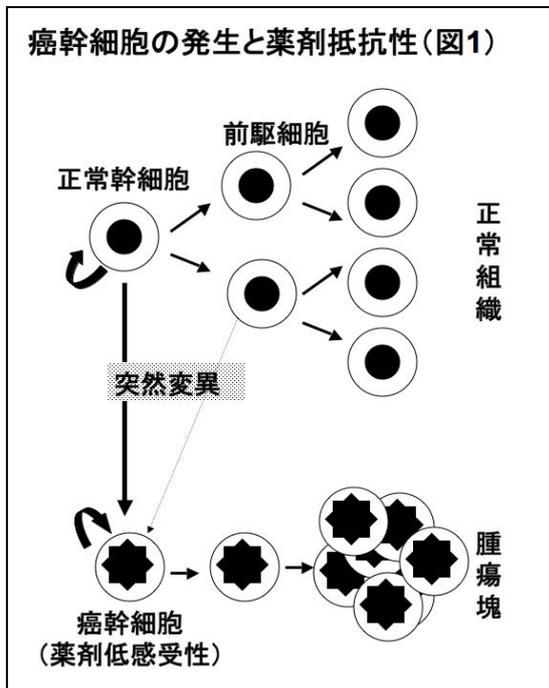
療が基本となる。残存腫瘍あるいは進行癌に対しては化学療法が行われ多くの場合、一定の治療効果が得られる。しかし化学療法抵抗性の腫瘍細胞が残存し癌組織が再生することがしばしば起こる。そのため薬剤抵抗性を克服することは癌治療に進展をもたらすと考えられている。

近年注目されているのは癌幹細胞の存在

である。幹細胞は多分化能と自己複製能を持つ細胞として定義され、癌幹細胞は幹細胞に突然変異が生じる結果幹細胞が癌化すると考えられている (図 1)。癌幹細胞の定義についてはまだ議論がなされているが、その特徴の 1 つとして薬剤排出能が高いことがあげられフローサイトメトリーでサイドポピュレーションとして同定される。

(2)皮膚癌細胞と癌遺伝子

ヒト皮膚悪性腫瘍において癌幹細胞に関する詳細は不明な点が多い。色素性幹細胞の維持に必須である Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) が悪性黒色腫において増加を認め発癌との関連が示唆されている。また悪性黒色腫の発癌初期段階では癌抑制遺伝子が消失し癌化が促進されることも明らかになってきている。PTEN は PIP3 (ホスファジリイノシトール-3,4,5-三リン酸)を主な基質とするホスファターゼで、PI3 キナーゼのシグナルを負に制御する癌抑制遺伝子である。実際、培養悪性黒色腫細胞において複数の株で PTEN の消失が明らかになっている。



2. 研究の目的

(1) 皮膚癌幹細胞に由来する腫瘍モデルマウスの作製

皮膚の代表的な幹細胞は毛包バルジ領域に存在すると報告されている。この毛包幹細胞は細胞骨格をになう中間径線維であるケラチン 15 を発現する。そのため K15 プロモーターで Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと loxP 配列で PTEN 遺伝子を挟まれた loxP-flanked PTEN マウスを交配し毛包幹細胞特異的に PTEN を欠損したマウス (K15-CrePGR/PTEN^{ΔΔ}) を作製し、皮膚癌幹細胞に由来する癌組織の生物学的特徴を明らかにし、病理学的な特性を検討することを目的とした。さらに皮膚癌細胞においてもニッシュすなわち幹細胞を維持する微小環境が腫瘍毛細血管として存在するのか調べることを目的とした。

(2) 腫瘍血管を標的とした癌治療の評価

K15-CrePGR/PTEN^{ΔΔ} マウスに生じた腫瘍における血管新生を組織学的に評価する。また血管新生阻害剤による抗腫瘍効果、さらに癌幹細胞に対する効果を判定することを目的とした。

3. 研究の方法

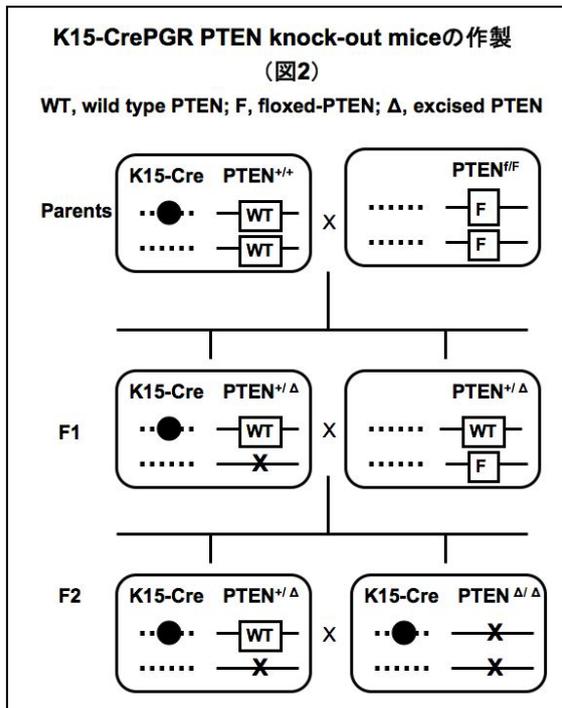
(1) K15-CrePGR (C57BL/6) の作製

K15-CrePGR マウスの系統を統一するためにあらかじめ C57BL/6 と交配を続けて新たな系統 K15-CrePGR (C57BL/6) を作製した。

(2) Cre-loxP システムによる毛包のバルジ特異的 PTEN コンディショナル・ノックアウトマウス (K15-CrePGR/PTEN^{ΔΔ}) の作製

K15-CrePGR (C57BL/6) マウスと loxP 配列で PTEN 遺伝子を挟まれた loxP-flanked PTEN (C57BL/6) マウスを交配した。

K15-CrePGR/PTEN^{+Δ} (コントロール) 及び K15-CrePGR/PTEN^{ΔΔ} を得るために図 2 に示すごとく交配を繰り返した。



(3) Cre リコンビナーゼ発現誘導

K15-CrePGR マウスはプロゲステロン拮抗阻害剤 RU486 を皮膚に塗布することにより Cre リコンビナーゼの発現誘導が可能である。生後8週齢のマウスに5日間にわたり RU486 を塗布した。

(4) 自然発癌誘導

すでに報告されている K5-Cre/PTEN^{ΔΔ} マウスでは自然経過で扁平上皮癌を生じるため本計画においても自然発癌を念頭に観察した。

4. 研究成果

まず交配を続け系統 K15-CrePGR (C57BL/6)を確立した。

続いて loxP-flanked PTEN (C57BL/6)マウスと K15-CrePGR (C57BL/6)を交配し、K15-CrePGR/PTEN^{+/Δ} (コントロール) 及び K15-CrePGR/PTEN^{ΔΔ} を作製した。

PCR にてジェノタイプを確認後、生後8週齢のマウスに5日間にわたり RU486 を塗布し Cre リコンビナーゼの発現誘導を行った。その後約1年間自然発癌の有無について観察を行ったがコントロールマウスと比べてノックアウトマウスでは明らかな異常を認めなかった。

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6件)

1. Tohyama M, Watanabe H, Murakami S, Shirakata Y, Sayama K, Iijima M, Hashimoto K.

Possible involvement of CD14+ CD16+ monocyte lineage cells in the epidermal damage of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. Br J Dermatol. 査読有り 166 (2) 2012:322-30.

2. Suemori K, Hasegawa H, Nanba C, Kohno M, Matsumoto T, Kawamoto Y, Murakami S, Sada E, Hashimoto K, Yasukawa M. Syndrome of

inappropriate secretion of antidiuretic hormone induced by tacrolimus in a patient with systemic lupus erythematosus. Mod Rheumatol. 査読有り 21 (1) 2011:97-100.

3. 難波千佳、白方裕司、宮脇さおり、藤山幹子、花川靖、白石研、岡崎秀規、小田富美子、村上信司、橋本公二、佐山浩二、福田俊平、橋本隆 VII型コラーゲンが抗原と思われた粘膜類天疱瘡の1例 西日本皮膚科 査読有り 73巻6号 2011 Page581-585

4. 浦部由佳里、藤山幹子、白方裕司、村上信司、橋本公二、中村舞、西尾有紀子

尋常性乾癬に尋常性天疱瘡を合併した1例 カポジ水痘様発疹症が天疱瘡診断の契機となった1例 日本皮膚科学会雑誌 査読有り 120巻14号 2010 Page3109-3114

5. 佐藤直樹、藤山幹子、村上信司、青木恵美、橋本公二、田内久道、木村美佳、羽藤直人、庄野佳孝 表皮母斑症候群の1例 西日本皮膚科 査読有り 72巻4号 2010 Page353-355

6. 浦部由佳里, 藤山幹子, 村上信司, 橋本
公二, 森戸浩明 妊婦に生じたZosteriform
Angiolymphoid Hyperplasia with
Eosinophiliaの1例 西日本皮膚科 査読有り
72巻4号 2010 Page356-358

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 信司 (MURAKAMI SHINJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50175626

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし