

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590454

研究課題名(和文) Meis1 遺伝子の表皮正常およびがん幹細胞維持における役割

研究課題名(英文) Meis1 regulates epidermal stem cells and is required for skin tumorigenesis

研究代表者

若林 雄一 (Wakabayashi, Yuichi)

千葉県がんセンター(研究所)・実験動物研究室・室長

研究者番号：40303119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：Meis1遺伝子をマウスを用いて皮膚特異的に欠損させ、DMBA/TPAを用いた発がん刺激を与えた。その過程で発がん刺激開始前、開始後の異なる2点においてMeis1を欠損させた。その結果、扁平上皮がんへの悪性化が発がん刺激開始後のほうがより有意に抑制された。このことはMeis1が有力ながん治療標的となり得ることを示唆している。これらの結果については最近、PLoS Oneに採択された。

研究成果の概要(英文)：We uncover two roles for Meis1 in the epidermis: as a critical regulator of epidermal homeostasis in normal tissues and as a proto-oncogenic factor in neoplastic tissues. In normal epidermis, we show that Meis1 is predominantly expressed in the bulge region of the hair follicles where multipotent adult stem cells reside, and that the number of these stem cells is reduced when Meis1 is deleted in the epidermal tissue of mice. Mice with epidermal deletion of Meis1 developed significantly fewer DMBA/TPA-induced benign and malignant tumors compared with wild-type mice, suggesting that Meis1 plays a role in both tumor development and malignant progression. This is consistent with the observation that Meis1 expression increases as tumors progress from benign papillomas to malignant carcinomas.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：発がん 幹細胞 表皮 化学発がん

### 1. 研究開始当初の背景

Meis1 は TALE (Three Amino-acid Loop Extension) ファミリーに属するホメオドメインを持つ転写因子である。元々 Meis1 はレトロウイルス挿入変異を用いてマウスに誘導した白血病細胞のレトロウイルス挿入部位近傍から同定された。また、Meis1 は白血病において検出される MLL 融合タンパクの下流で働くことが知られている。即ち、Meis1 はそれ自身ががん遺伝子的な働きを持つと同時に、がん遺伝子としての下流で signal transducer 的な働きも示すということが出来る。

以上のように Meis1 は白血病における知見が先行して蓄積したが、近年の網羅的発現解析の登場により、白血病以外の肺腺がん、腎芽腫、卵巣がん、神経芽腫ら様々な腫瘍においても発現の上昇を示し、白血病と同様にがん遺伝子的な働きを持つことが示唆されている。そこで上皮系腫瘍モデルの代表格である多段階皮膚化学発がんモデルを用い、このモデルにおける Meis1 の役割について検討した。

### 2. 研究の目的

Meis1 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを利用し、皮膚特異的に Meis1 遺伝子を欠損させ、Meis1 遺伝子の皮膚正常/がん幹細胞維持における役割を詳細に検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

① Meis1 コンディショナルノックアウト/K14-CreER マウスを用いた毛包形態の組織学的解析

Meis1 コンディショナルノックアウト/K14-CreER マウスの背中を剃毛後、まず tamoxifen (1mg/マウス) を塗布し Cre を誘導することで Meis1 を欠失させる。まずは体毛の再生の状態について詳細に観察を行う。その後、体毛形成過程の皮膚組織のパラフィンあるいは凍結切片を作製し、毛包形態を観察する。さらに、蛍光免疫染色法により皮膚幹細胞の特異的マーカーである、抗 CD34 抗体あるいは抗 K15 抗体を用いてノックアウトマウスにおける皮膚幹細胞の分布あるいはバルジ形態について共焦点レーザー顕微鏡を用いて調査する。また、BrdU を Meis1 コンディショナルノックアウトマウスの腹腔に注射して 3 週間程度放置し、皮膚幹細胞を特異的に標識する。その後 Meis1 を欠失後に、抗 BrdU 抗体で免疫染色を行う。

② Meis1 コンディショナルノックアウトマウスの DMBA/TPA 処理

Meis1 コンディショナルノックアウトマウスと K14-CreER マウスとを交配する。マウスの背中を剃毛後、まず tamoxifen (1mg/マウス) を塗布し Cre を誘導し、Meis1 を欠損させる。翌日、DMBA (0.1mg/マウス) を塗布

する。その後、TPA (10mg/マウス) 処理を開始し、週 2 回 20 週間続ける。通常、マウスは TPA 処理開始後 7,8 週付近から良性腫瘍であるパピローマを発症し始める。パピローマは背中に multiple type の tumor として出てくるので、20 週まで週 1 回のカウントを続ける。20 週間で TPA 処理を終了しその後マウスをさらに 20 週間、維持し扁平上皮がんへの進展を待つ。同様の実験を引き続き行うが、tamoxifen を塗布して Meis1 を欠損させるポイントを変える。パピローマを発症したマウスに tamoxifen を投与し、パピローマへの治療効果、もしくは悪性化を阻害する効果がないかどうか検討する。最終的には 20 週以上経過して悪性化した扁平上皮がんに進化した腫瘍に対してもその効果をテストする。

### 4. 研究成果

Meis1 コンディショナルノックアウト/K14-CreER マウスを用いて BrdU による表皮幹細胞の標識実験を行った結果、Meis1 を欠損させた場合には表皮幹細胞が著明に減少することがわかった (図 1)

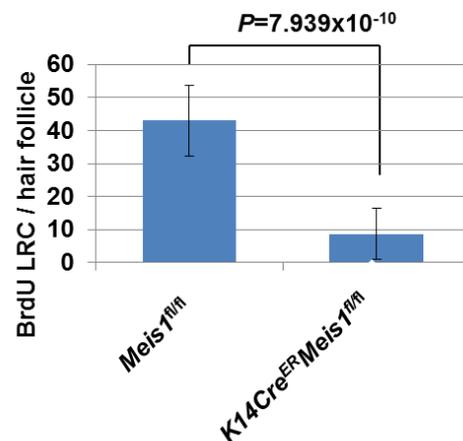


図 1. Meis1 欠損は正常表皮幹細胞数を減少させる。

次に Meis1 遺伝子をコンディショナルノックアウトマウスを用いて皮膚特異的に欠損させ、DMBA/TPA を用いた発がん刺激を与えた。その過程で発がん刺激開始前、開始後の異なる 2 点において Meis1 を欠損させた。その結果、パピローマ発症は発がん刺激開始前、開始後も同程度に抑制されたが、扁平上皮がんへの悪性化は発がん刺激開始後のほうがより有意に抑制された (図 2)。Meis1 欠損は休止状態の正常表皮幹細胞を減少させ、正常表皮の形態形成を阻害することも我々の研究によりわかった。しかしながら、発がん刺激開始後の Meis1 欠損のほうが扁平上皮がんへの悪性化が有意に抑制されたという事実は、Meis1 が腫瘍悪性化において特異的な機能を持ち、Meis1 が有力ながん治療標的とな

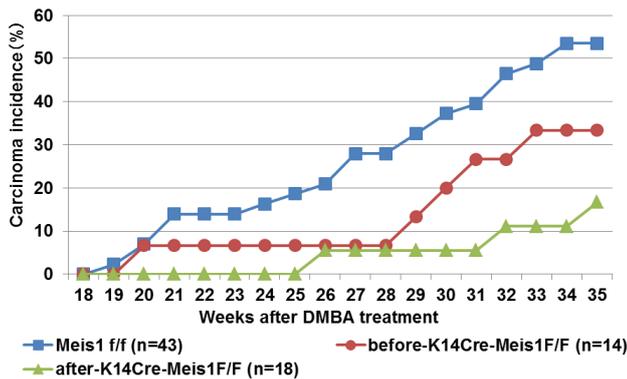


図 2. Meis1 を発がん刺激開始後に欠損させたほうが (after)、発がん刺激開始前に欠損させるよりも (before)、腫瘍の悪性化を著明に減少させる

り得ることを示唆している。また、Meis1 タンパクが正常表皮では休止状態の幹細胞が存在する毛包のバルジ領域に主に局在するのに対して、パピローマではむしろ逆ががん幹細胞マーカーではなく分化細胞マーカーと共発現することから、正常表皮と腫瘍細胞では明らかに異なる機能を Meis1 が持つものと考えられる。(図 3) これらの結果については最近、PLoS One に採択された。

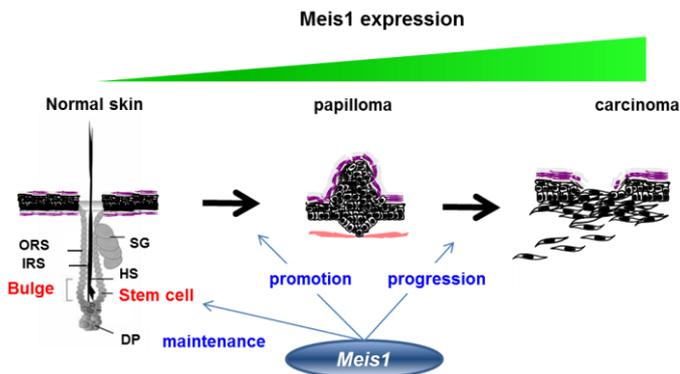


図 3. Meis1 は正常表皮幹細胞の維持、腫瘍発生、および悪性化のすべてのステップにおいて特異的な機能を持つ。

#### 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. Okumura K, Saito M, Aoto Y, Hachiya T, Sakakibara Y, Katsuragi Y, Hirose S, Kominami R, Goitsuka R, Nakamura T and Wakabayashi Y. Meis1 regulates epidermal stem cells and is required for skin tumorigenesis. *PLoS One*. (in press).

2. Saito M, Okumura K, Miura I, Wakana S, Kominami R, and Wakabayashi Y. Identification of Stmm3 locus conferring

resistance to late-stage chemically induced skin papillomas on mouse chromosome 4 by congenic mapping and allele-specific alteration analysis. *Experimental Animals*. (in press).

3. Okumura K, Saito M, Isogai E, Miura I, Wakana S, Kominami R, and Wakabayashi Y. Congenic mapping and allele-specific alteration analysis of Stmm1 locus conferring resistance to early-stage chemically induced skin papillomas. *PLoS One*. 9 (5) : e097201. (2014).

4. Chung Kang H, Quigley DA, Kim IJ, Wakabayashi Y, Ferguson-Smith MA, D'Alessandro M, Birgitte Lane E, Akhurst RJ, Goudie DR, Balmain A. Multiple Self-Healing Squamous Epithelioma (MSSE): Rare Variants in an Adjacent Region of Chromosome 9q22.3 to Known TGFBR1 Mutations Suggest a Digenic or Multilocus Etiology. *J Invest Dermatol*. 133 : 1907-1910. (2013).

5. Kang HC, Wakabayashi Y, Jen KY, Mao JH, Del Rosario R, and Balmain A. Ptch overexpression drives skin carcinogenesis and developmental defects in K14PtchFVB mice. *J Invest Dermatol*. 133 (5) : 1311-1320. (2013).

6. Okumura K, Sato M, Miura I, Wakana S, Mao JH, Miyasaka Y, Kominami R, and Wakabayashi Y. Independent genetic control of early and late stages of chemically induced skin tumors in a cross of a Japanese wild derived inbred strain, MSM/Ms. *Carcinogenesis*. 33 (11) : 2260-2268. (2012).

[学会発表] (計 7 件)

1. 齋藤 慈、奥村和弘、八谷剛史、榊原康文、大澤光次郎、岩間厚志、廣瀬哲史、木南凌、後飯塚 僚、中村卓郎、若林雄一  
Meis1 の腫瘍悪性化プロセスにおける役割  
第 27 回モロシヌス研究会 2013 年 6 月 29 日 つくば

2. 奥村和弘、齋藤 慈、大澤光次郎、廣瀬哲史、木南 凌、後飯塚 僚、中村卓郎、若林雄一  
Meis1 は腫瘍悪性化を制御する  
第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 4 日 横浜

3. 奥村和弘、齋藤 慈、青戸良賢、八谷剛史、榊原康文、葛城美徳、廣瀬哲史、木南 凌、後飯塚 僚、中村卓郎、若林雄一

Meis1 は表皮幹細胞の維持と皮膚発がんに必要なである

第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日 神戸

4. 若林雄一

Meis1 遺伝子の表皮幹細胞における機能の解析

マウス遺伝学研究集会・マウス遺伝学の進歩 2012年3月2日 新潟

5. 奥村和弘

皮膚正常/がん幹細胞における Meis1 の機能解析

第26回モロシヌス研究会 2012年6月16日 東京本郷

6. 奥村和弘、佐藤美穂、廣瀬哲史、後飯塚僚、中村卓郎、若林雄一

Meis1 は皮膚毛包幹細胞の維持に重要である  
第59回日本実験動物学会年会 2012年5月24日 別府

7. 奥村和弘、佐藤美穂、広瀬哲史、後飯塚僚、中村卓郎、若林雄一

表皮幹細胞における Meis1 遺伝子の機能解析  
"第58回日本分子生物学会年会"  
2011年12月13-16日 横浜"

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/soshiki/jikkendobutsu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林雄一(千葉県がんセンター研究所)

研究者番号: 40303119

(2) 研究分担者

奥村和弘(千葉県がんセンター研究所)

研究者番号: 80584680

(3) 連携研究者

後飯塚 僚(東京理科大学)

研究者番号: 50301552