

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591658

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Mitf、RETとの相互関係

研究課題名(英文)BMP, Mitf, and RET on melanocytes and melanoma cell

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

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)：マウス皮膚色素細胞(メラノサイト)の分化研究から、MITF、チロシナーゼ関連蛋白(Tyrp1、DOPAクロムトウトメラゼ)、Kit、チロシナーゼ、エンドセリンBレセプター、DOPAといった物質が重要であることが確認できた。Tyrp1は、MITFと関連のない系でも重要な因子として色素細胞に作用している。また、BMP4はメラノサイト分化最初期に影響している因子であり、メラノサイトの癌化したメラノーマでは、Retとの関連が推測できた。こうしたデータは、今後、研究対象としているヒトiPS細胞からの色素細胞誘導の条件設定の参考となっている。

研究成果の概要(英文)：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 also 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. BMP-4 was added to the medium and incubated for 3 days at varying concentrations. After incubation with 10 ng/ml BMP-4 for 3 days, Ret protein expression was decreased, and disappeared completely when BMP-4 was added at 20 ng/ml. Ret protein expression in NCCmelb4M5 cells showed a dose-dependent decrease in expression elicited by BMP-4. Based on these findings, the combined effects of Ret and BMP-4 might provide important clues towards understanding the roles and working mechanisms in melanocyte development.

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、BMP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。

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-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生し、生後10-12ヶ月後に高率に悪性黒色腫を発生する。そしてリンパ節と肺に転移をおこす。

尋常性白斑は、メラノサイト(色素細胞)が表皮から消失したり、皮膚メラノサイトのメラニン色素形成機序が機能しない疾患である。その発症機序は不明な点が多く、従って治療方法も十分ではない。活性型ビタミンD3外用やステロイド軟膏、紫外線療法等の現状治療の多くが、色素の完全な回復には至っていない。外科的治療として、患者正常皮膚を採取し、実験室でメラノサイトを分離し培養増殖させ、浮遊培養状態のメラノサイトとして白斑や脱色素斑に移植する(移植時に

は白斑皮膚をアブレーション)治療が試みられている(Yu-Fu Chen, et al. J Am Acad Dermatol, 2004)。しかし、皮膚採取部位と移植時アブレーションで創傷が残り、培養増殖時間がかかり、移植後も色素が均等に出ず、まだら状になってしまったりしている。

遺伝性対側性色素異常症は常染色体優性遺伝の色素異常症で、原因遺伝子が2本鎖RNA特異的 adenosine deaminase 遺伝子(ADAR1)と同定され診断法が確立した。

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ミュー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、メラノサイトの悪性腫瘍である悪性黒色腫やメラノサイトが欠損した白斑や遺伝性対側性色素異常症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。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との関係を*in vitro*で調べられる。

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。

転写因子 MITF は、発生初期の色素細胞の生存維持に大きな役割をしている。そこで、MITF の影響を除外する目的で、MITF を突然変異させた *Mitf^{mi-ew}* マウスを用いた。このマウスの神経冠初代培養系を施行した。そこに、TPA とコレラトキシンを加え分化の刺激をすると、多くの *Typr1* 陽性細胞が出現してきた。また、NCCmelb4M5 細胞を使用した。マウスメラノプラスト NCCmelb4M5 細胞は、*Typr1* の RNA 干渉によって、細胞死を起こしてしまう。そこで、NCCmelb4M5 細胞、*Typr1* の siRNA 導入後に Bax と Fas の発現を調べてみると、mRNA 量が増加し、アポトーシスの関与が推測できた。一方、NCCmelb4M5 細胞より分化段階が上の NCCmelb4 細胞と NCCmelan5 細胞は、*Typr1* の RNA 干渉を行っても、正常に増殖し細胞死はない。ここから、*Typr1* は、MITF や BMP4、Ret と関連のない、より未分化な状況で、重要な因子として何らかの作用を行っている可能性が高い。

細胞増殖能をみる実験系 Alamar blue 法にて、マウスメラノプラストと活性型ビタミン D3 との変化をみた。NCCmelb4M5 細胞は、活性型ビタミン D3 10^{-9} M 以上の濃度で細胞増殖を阻害された。やや分化の進んだ NCCmelb4 細胞は、 10^{-8} M 以上で阻害された。さらに、NCCmelan5 細胞は、 10^{-7} M 以上で阻害された。ここから、より未分化なマウスメラノプラスト程、活性型ビタミン D3 の影響をうけていることが明らかとなった。

48 歳、男性の遺伝性対側性色素異常症の診断として ADAR1 遺伝子のシーケンス検査を行い、c.3203G>T,p.G1068V の変異をもつことが確認された。さらに、ミニグラフト術を施行し、色素をおこすことに成功した。

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 8 件)

1. Kawakami T, Otaguchi R, Kyoya M, Soma Y, Suzuki T. A patient with dyschromatosis symmetrica hereditaria treated with mini punch grafting, followed by excimer light therapy. J Dermatol. 査読有 40(9):771-2. (2013)
2. 中野敦子、木村聡子、岩藤美佳、川上民裕、相馬良直、音羽孝則、中野信行、柴垣有吾、木村健二郎：灰緑色の腹水を伴った塩酸ミノサイクリンによる色素沈着の 1 例 皮膚科の臨床 査読有 55(2) 155-8. (2013)
3. Kawaguchi M, Hayashi M, Murata I,

Hozumi Y, Suzuki N, Ishii Y, Wataya-Kaneda M, Funasaka Y, Kawakami T, Fukai K, Ochiai T, Nishigori C, Mitsuhashi Y, Suzuki T: Eleven novel mutations of the ADAR1 gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria. J. Dermatol. Sci. 査読有 66:244-5. (2012)

4. Kawakami T, Soma Y. Tyrosinase-related protein1 in mouse melanocytes at early embryonic stage. J Dermatol Sci. 査読有 67 (3): 194-6. (2012)
5. 中川恵子、芳賀恒夫、布施恵理、川上民裕、相馬良直：14 トリソミーが見出された Linear and whorled nevoid hypermelanosis の 1 例 皮膚科の臨床 査読有 54(7): 999-1002. (2012)
6. Kawakami T, Hashimoto T. Disease severity indexes and treatment evaluation criteria in vitiligo. Dermatol Res Pract. 査読有 750342. Epub (2011)
7. Kawakami T, Kumasaka M, Kato M, Mizoguchi M, Soma Y. BMP-4 down-regulates the expression of Ret in murine melanocyte precursors. J Dermatol Sci. 査読有 63(1): 66-9. (2011)
8. 島田恵子、木村聡子、川上民裕、相馬良直：爪囲線維腫の主訴より診断された結節性硬化症の 1 例 皮膚科の臨床 査読有 53(3) 475-8. (2011)

[学会発表](計 5 件)

1. 川上民裕 血管炎と白斑・脱色素斑 - 実臨床への応用を目指した研究のすすめ - 第 35 回 Marianna Research Council 2013 年 12 月 5 日 川崎
2. Kawakami T, Ohgushi A, Soma Y, Hirobe T: Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and all-trans retinoic acid in human epidermal melanocyte and melanoblast. The 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research 2013 年 11 月 17 日, Osaka
3. Otaguchi R, Kyoya M, Kawakami T, Soma Y, Suzuki T: A patient with dyschromatosis symmetrica hereditaria treated with mini punch grafting, followed by excimer light therapy. The 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research 2013 年 11 月 17 日, Osaka
4. 中野敦子、木村聡子、岩藤美佳、川上民裕、相馬良直、音羽孝則、中野信行、柴垣有吾、木村健二郎：灰緑色の腹水を伴った塩酸ミノサイクリンによる色素沈着の 1 例 第 839 回 日本皮膚科学会東

- 京地方会 2012年3月 横浜
5. 芳賀恒夫、川上民裕、相馬良直、和田康
菜、木口一成 : 5%イミキモドクリーム
外用が奏効した外陰部悪性黒色腫の1例
第74回日本皮膚科学会東京支部学術大
会 2011年5月 横浜

研究組織

(1)研究代表者

川上 民裕 (KAWAKAMI, TAMHIRO)
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