

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790821

研究課題名（和文）白斑モデルマウスの新規樹立と病態解析

研究課題名（英文）Establishment and pathological analysis of novel white spot model mice

研究代表者

熊坂 真由子（KUMASAKA MAYUKO）

中部大学・生命健康科学研究所・研究員

研究者番号：90469023

研究成果の概要（和文）：本研究において、 β -catenin はメラノブラストやメラノサイトの移動に影響を与えることで、白斑の原因となる可能性が示された。また、細胞外基質のうち、この病態にはファイブロネクチンが関与していることも明らかとなった。ファイブロネクチン上において、本白斑症モデルマウス由来のメラノサイトは野生型メラノサイトに比べて移動速度が低下した。この原因として、F-actin の配向の変化とそれに関わるシグナリングの変化を発見することができた。

研究成果の概要（英文）： β -catenin is associated with white spotting induced by abnormal migration of melanoblasts and melanocytes. Among ECMs, fibronectin is suggested to be involved in this phenotype. On fibronectin, melanocytes from the white spot model mice migrate slower than those from wild-type mice. Changes of orientation of F-actin and the associated signaling in this white spot mice are responsible for this phenotype.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

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：白斑症、モデルマウス、色素細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、紫外線照射量の増加は世界規模で顕著になっている。メラニンを正常に産生できないため紫外線から身を守ることに問題のある白斑症の患者にとって、地球は非常に危険な環境になりつつある。ヒトの白斑症の原因としては、メラノサイトの増殖、生存、移動の異常などが考えられている。その中で、メ

ラノサイトの増加や生存の異常に関しては、メラノサイトが激減することにより全身がほとんど白毛になるモデルマウスを用いて研究が勧められている。しかし、メラノサイトの移動にどのような異常があるのかについては、大部分のメラノサイトが失われてしまうため、解析は非常に難しく研究が進んでいない。また、白斑症の治療法としては正常

な皮膚の移植、局所的な UVB の照射があるが、その効果は完全ではなく、未だ治療が困難な状態である。

2. 研究の目的

腹側にのみ顕著な白斑を示すトランスジェニックマウス (*bcat^{sta}-Tg*) を用いて、安定型 β -catenin がメラノblastやメラノサイトの移動にどのように関わっているかを *in vivo*, *in vitro* の両方の系で解析する。 *In vivo* におけるメラノblastの移動能の解析結果、*in vitro* における、細胞形態の観察、移動速度の計測、分子メカニズムの比較といった、より詳細な解析結果を総合することで本白斑モデルマウスの白斑の原因となるメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

(1) 白斑症モデルマウスの胎児におけるメラノblastの分布をステージを追って観察し、メラノblastの移動速度に問題があるかどうかを調べた。メラノサイト系譜を可視化するために、野生型マウス、*bcat^{sta}* マウスを *Dct::LacZ* マウス (メラノサイト系譜に特異的に発現する *Dct* 遺伝子のプロモーターに、*LacZ* 遺伝子を結合させた遺伝子をトランスジェーンとして有するマウス) とあらかじめ交配した。胎児をサンプリングし、固定、*LacZ* 染色後、体幹部のパラフィン切片を作製した。切片の写真を撮影し、神経管から一番腹側に存在するメラノblast (すなわち最も早く移動していると考えられるメラノblast) までの距離を計測した。12.5日~15.5日胚において同様の方法でメラノblastの移動距離を計測した後、メラノblastの移動速度の概算を行った。

(2) 白斑症モデルマウスと野生型マウスの新生児の皮膚からメラノサイトを培養し、time-laps顕微鏡を用いて、細胞の移動能の観察をリアルタイムで行い、細胞の motility に問題があるかどうかを調べた。本研究では、それぞれのマウスから採取したメラノサイトを長期培養することで株化したメラノサイト細胞株を用いた。6ウェルディッシュを用い、ディッシュの半分には野生型メラノサイト、残りには白斑症モデルマウス由来のメラノサイトをまき、10時間の間、4分ごとに写真撮影を行った。細胞外基質としては低濃度から高濃度のファイブロネクチン (1、5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いた。また、ファロイジン染色、抗 vinculin 抗体を用いた免疫染色で F-actin の配向、接着端の分布状態を調べ、白斑症モデルマウス由来のメラノサイトの形態的变化を解析した。

(3) 白斑症モデルマウスと野生型マウスから

培養したメラノサイトにおける Rho ファミリータンパク質 (Rac、Rho) の活性を調べることで、分子的観点から比較を行った。Rho ファミリーに属するタンパク質は、細胞の移動に関わるアクチンの配向の制御に関わっている。Rho ファミリーに属する活性化型 Rac/cdc42 は Rac/cdc42 のエフェクタータンパク質である PAK の CRIB 領域に結合する。活性化型 RhoA は、Rho のエフェクタータンパク質である Rhotekin タンパク質の RBD 領域に結合する。本実験では、GST タグの結合した CRB、RBD タンパク質を用いて GST ブルダウン法により活性化型 Rac1、RhoA の検出を行った。

(4) 白斑症モデルマウスと野生型マウスから培養したメラノサイトから RNA を抽出、cDNA を合成し、マイクロアレイを行った。この解析結果をもとに、白斑症の原因となる遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 白斑症モデルマウスと野生型マウスの胎児における、メラノblastの移動速度を比較した。まず、メラノblastを *LacZ* 染色することで可視化し、最も腹側に移動しているメラノblastと神経管までの距離を12.5日から15.5日胚を用いて計測した後、メラノblastの移動速度を求めた。12.5日胚では2種類のメラノblastの移動速度にほとんど差はないが、メラノblastの移動が活発になる13.5日~15.5日胚においては、白斑症モデルマウス由来のメラノサイトの移動速度が野生型マウスに比べ非常に遅くなるのが分かった。実際にメラノサイトの移動速度を概算して見ると、野生型メラノサイトは1日あたり3.5mm、白斑症モデルマウスメラノサイトでは1日あたり2.3mmの移動速度であった。本研究で用いた白斑症モデルマウスはメラノblastの移動に異常があることがマウスレベルで明らかとなった (図1)。

図1

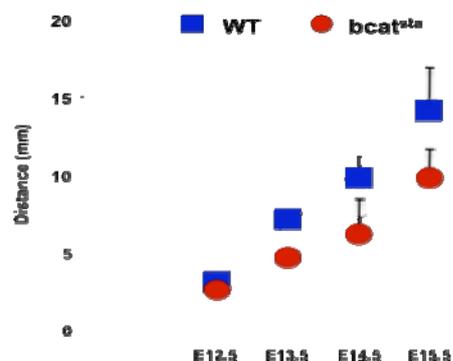


図1の説明) 野生型マウス (□)、白斑症モデルマウス (○) 由来のメラノサイトの胎児期における移動速度をグラフ化した。

(2) 白斑症モデルマウスと野生型マウスのメラノサイトの移動速度の違いを time-laps 顕微鏡を用いて測定した。細胞外基質 (ECM) としてファイブロネクチンを用いた場合、野生型マウス由来のメラノサイトは、ファイブロネクチンの濃度依存的 (0、1、5、10、20、40 μg/ml) に移動速度が上昇した。一方、白斑症モデルマウス由来のメラノサイトの移動速度は、ファイブロネクチンの濃度依存的に上昇するが、その幅は野生型と比較すると非常に小さいことが分かった (図2) (Letort V et al., 2010)。すなわち、本研究で用いた白斑症モデルマウスはメラノサイトの移動に異常があることが in vitro の系でも明らかとなった。なお、ECM として、TypeI コラーゲン、ビトロネクチンも試したが、白斑症モデルマウスの表現型を説明できるような違いは観察されなかった。

図2

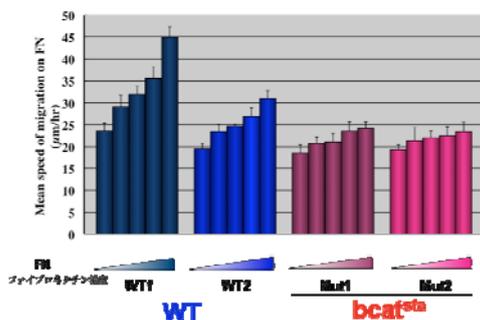


図2の説明) ファイブロネクチン上におけるメラノサイトの移動速度を調べた。Mut1、Mut2 は白斑モデルマウス由来のメラノサイト、WT1、WT2 は野生型マウス由来のメラノサイトを示す。

(3) 白斑症モデルマウスと野生型マウスのメラノサイトのファイブロネクチン上における形態の違いをファロイジン染色で F-actin を検出することで比較した。野生型マウス由来のメラノサイトは、アクチンが編み目状に重合した大きなラメリポディアが観察されたが、白斑症モデルマウス由来のメラノサイトでは、ラメリポディアの大きさは非常に小さかった。さらに、抗 vinculin 抗体を用いて接着端を検出したところ、白斑症モデルマウス由来のメラノサイトでは接着端のサイズが増加し、ECM に強固に結合している可能性が示唆された。すなわち、本研究

で用いた白斑症モデルマウスはメラノサイトにおける F-actin の配向、接着端の形成に異常が生じていることが明らかとなった。

(4) 白斑症モデルマウスと野生型マウスから培養したメラノサイトを用いて Rho ファミリーに属する RhoA と Rac1 の活性を測定した。活性化型 Rac1 はラメリポディアの形成に、活性化型 RhoA はストレスファイバーの形成に関わるからである。本実験では、活性化型 Rac1 を移動能の高い細胞の指標として、活性化型 RhoA を移動能の低い細胞の指標として用いた。Rac1 の活性は、白斑症モデルマウス由来のメラノサイトよりも野生型メラノサイトで高かった。一方活性化型 RhoA は、どちらのメラノサイトでも検出されなかった。すなわち、本研究で用いた白斑症モデルマウスのメラノサイトでは、アクチンの配向に関わる分子シグナルに異常が生じていることが明らかとなった。

(5) 白斑症モデルマウスと野生型マウスから培養したメラノサイトを用いてマイクロアレイを行った。その結果、細胞移動に関わる遺伝子の中で、Arp2/3、Dial1 遺伝子の発現量が白斑症モデルマウス由来のメラノサイトにおいて、増加していることが分かった。複数のメラノサイト細胞サンプルを用いて再現性の確認を行ったところ、Arp2/3 に関しては再現が得られなかった、一方、dial1 に関しては再現が得られた (図3)。Dial1 遺伝子は、アクチンの重合に関わる遺伝子である。この結果より、本白斑モデルマウスのメラノサイトの移動に異常が生じる原因として、Dial1 の関与の可能性が示唆された。

図3

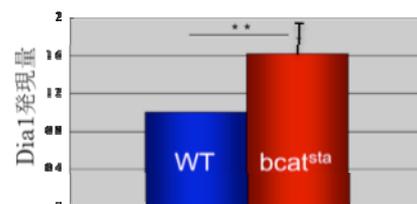


図3の説明) Dial1 の転写量を Real-time PCR にて調べた。右側が白斑症モデルマウスメラノサイト、左側が野生型メラノサイト。

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 Letort V., Fouliard S., Letort G.,

Adanja I., 熊坂真由子, Gallagher S., Debeir O., Larue L., Xavier F. Quantitative analysis of melanocyte migration in *in vitro* based on automated cell tracking under phase contrast microscopy considering the combined influence of cell division and cell-matrix interactions. Math. Model. Nat. Phenom. 5 巻、査読有、2010年、4-33

② A novel mouse model for de novo melanoma. 熊坂真由子, 矢嶋伊知朗, Hossain K., 飯田真智子, 都築豊徳, 大野民生, 高橋雅英, 柳沢正史, 加藤昌志. Cancer Res. 70 巻、査読有、2010年、24-29.

③ Genomic localization of the Z/EG transgene in the mouse genome. Colombo S., 熊坂真由子, Lobe C., Larue L. Genesis. 48 巻、査読有、2010年、96-100.

④ Bypassing melanocyte senescence by b-catenin:a novel way to promote melanoma. Larue L., Luciani F., 熊坂真由子, Champeval D., Demirkan N., Bonaventure J. and Delmas V. Pathological Biol. 57 巻、査読有、2010年、543-547.

[学会発表] (計 2 件)

① 熊坂真由子、紫外線照射によって誘導される悪性黒色腫マーカー遺伝子の探索と発現解析、日本衛生学会第 78 回大会、2009 年 3 月 30 日、東京 (北里大学)

② 熊坂真由子、メラノサイトの移動と Coat color、日本動物学会第 79 回大会、2008 年 9 月 5 日、福岡 (福岡大学)

[図書] (計 1 件)

① 矢嶋伊知朗、熊坂真由子
株式会社エヌ・ディー・エス
『生物の科学 遺伝 ヒトの皮膚・眼の色の遺伝学』2009 年、63-71 頁

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称:デノボ癌を自然発症するモデル動物及びその用途

発明者:加藤昌志、熊坂真由子

権利者:中部大学

種類:特許

番号:2009-199142

出願年月日:2009年8月31日

[その他]

ホームページ等

<http://web.mac.com/chubu5011/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊坂 真由子 (KUMASAKA MAYUKO)

中部大学・生命健康科学研究所・研究員
研究者番号:90469023

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし