

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00532

研究課題名(和文) 悪性黒色腫の発生における色素幹細胞の役割と色素性病変の鑑別診断への応用

研究課題名(英文) Identification of melanocyte stem cells in acral palmoplantar skin and elucidation of the early developmental mechanism of acral melanoma

研究代表者

西村 栄美(Nishimura, Emi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70396331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の発生初期において良性と悪性の違いが不明瞭で鑑別が困難な腫瘍も多い。悪性黒色腫(メラノーマ)は予後の極めて悪い皮膚癌として知られ母斑との鑑別診断が重要である。我々は、悪性黒色腫のモデルマウスを作製し組織幹細胞の運命追跡を行いその細胞起源を探った。その結果、汗腺分泌部の色素幹細胞は、遺伝毒性ストレスや外傷に反応し自己複製し移動性の子孫細胞を増やし、末端部悪性黒色腫を模倣した浸潤性腫瘍を発生することがわかった。ヒト掌蹠の色素性病変を解析した結果、遺伝的に不安定な色素幹細胞が汗腺分泌部から増幅し汗管を経て周囲の表皮に拡大する像が特徴的に認められ、母斑との鑑別診断に有効であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は世界ではじめて汗腺内の色素幹細胞の遺伝学的系譜解析に成功し、末端部型悪性黒色腫のオリジンの同定に成功した。同時に、ヒトの末端部型悪性黒色腫を模倣するマウスモデルの作製に成功し、末端部型悪性黒色腫の治療薬の有効性評価や病理発生機序や病態の解明に役立つ実験系をはじめ提供できるようになった。さらに末端部の悪性黒色腫は予後の極めて悪い皮膚癌として知られ、母斑との鑑別診断が極めて重要であるが、比較的簡便な免疫組織学的な解析によりメラノーマ細胞の分布を確認することによって悪性と良性の鑑別診断がはじめて可能となった。特に早期の鑑別診断は熟練した皮膚病理医にとっても困難なことが多いため意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Early differential diagnosis between malignant and benign tumors and their underlying intrinsic differences

are the most critical issues for life-threatening cancers. To study whether human acral melanomas, deadly

cancers that occur on non-hair-bearing skin, have distinct origins, we developed fate-tracing technologies of melanocyte stem cells (McSC) in sweat glands and in melanoma models in mice and compare the cellular dynamics with human melanoma. The results revealed that those McSCs self-renew to expand their migratory progeny in response to genotoxic stress and trauma to generate invasive melanomas in mice that mimic human acral melanomas. The analysis of melanocytic lesions in human volar skin demonstrated that genetically unstable McSCs expand in sweat glands and in the surrounding epidermis in melanomas but not in nevi. The detection of such cell spreading dynamics provides an innovative method for an early differential diagnosis of acral melanomas from nevi.

研究分野：実験病理

キーワード：メラノーマ 癌 幹細胞 診断 オリジン 悪性 汗腺 皮膚

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い、癌が最大の死因となっている。悪性黒色腫(メラノーマ)は、本邦も含め全世界的に増加傾向にあり、免疫チェックポイント阻害剤などの新しい治療法が開発され、その治療も変わりつつあるものの、依然としていったん浸潤性になると極めて悪性度の高い癌であることには変わりはなく、その初期発生機序の解明と初期治療における完全な根絶が必要である。近年、組織幹細胞の研究が進み、組織幹細胞またはその子孫細胞が分化するいずれかの段階で癌を発生することが認識されるようになりつつある。しかし、実際にヒトの固形癌の初期病変やその動物モデルにおいて、組織幹細胞システムから癌が発生している現場、最初期変化を可視化して解析する系はいまだ殆ど存在しない。

悪性黒色腫(メラノーマ)は、本邦も含め全世界的に増加傾向にあり、化学療法や放射線療法に抵抗性で治療に苦渋する癌の代表である。申請者らは、2002年にマウスの毛包内に黒髪のもととなる色素幹細胞を世界に先駆けて発見し(Nishimura EK et al. Nature 2002)、加齢や放射線照射などによるゲノム毒性ストレスによって色素幹細胞が、未分化性を失うようになり自己維持しなくなることで、結果として毛に色素を供給する色素細胞が不足するため白髪を発症することを明らかにしている(Nishimura EK et al. Science 2005, Inomata K et al. Cell, 2009)。また、ヒトの頭皮の毛包内にもマウスの色素幹細胞に相当すると考えられる類似の細胞を見出している(Nishimura EK et al. Science 2005)。しかし、頭皮の色素幹細胞は加齢により枯渇し白髪を発症するものの、頭皮に生じるメラノーマは稀である。一方、毛包の存在しない掌蹠は、メラノーマの好発部位であり(日本人症例の約50%)、掌蹠以外の皮膚の16倍の高頻度でメラノーマを発生する。

近年のダーモスコピーと呼ばれる拡大鏡による診断技術の発展により、汗腺が分布する皮丘に沿った異常色素沈着に特徴づけられる皮丘平行パターンをとる場合には、99%の特異性でメラノーマと診断されることが斎田俊明(共同研究者)らによって明らかにされた。さらに僅か直径数ミリの病変も含め、皮丘平行パターンを示す症例の44%でCyclinD1癌遺伝子の増幅が見つかるなど、メラノーマの発生を考える上でも、診断学上也画期的な発見がなされた。このような背景において、申請者は、特に汗腺に着目して色素幹細胞を同定し、CyclinD1癌遺伝子の増幅に着目することで、メラノーマの初期発生機序を明らかにすることが出来ると考えた。

## 2. 研究の目的

掌蹠のメラノーマは、皮丘に沿った異常色素沈着に特徴づけられる皮丘平行パターンを示すことから(特異性99%)皮丘に分布する汗腺と深い関連を持つことが示唆されてきた。しかし、汗腺と発癌との関連についてはこれまで明らかにされていない。申請者らは、最近、マウスのfootpad、およびヒトの汗腺内に未知のメラノプラストの存在を見出した。この細胞を安定的に可視化出来るマウスを作製し、自己複製を行う組織幹細胞として機能するのか、メラノーマのオリジンとなりうるのかについて、メラノーマモデルと組み合わせることで幹細胞運命の解析を行う。さらに、ヒトのメラノーマin situにおけるCyclinD1遺伝子の増幅を最初に獲得する細胞が汗腺内にいないか調べ、ヒトメラノーマの初期早期の診断と治療へと応用する。

### 3. 研究の方法

申請者らは、本課題の準備として既に休眠状態にある色素幹細胞も含めて安定的に検出できるシステムとして Dct-H2B-GFP トランスジェニックマウスを作製し解析を進めてきた。本システムを用いて見出した汗腺の分泌部に存在する未知の細胞集団が組織幹細胞の条件を満たすかどうか、その運命解析から明らかにする。放射線照射や発癌ストレスに反応してどのような挙動を示すのか解析し、生体内で自己複製するかどうかを検証し、その現場を捉える。さらにヒトの掌蹠において同様の細胞集団が存在するのか、従来の免疫染色よりも大きく感度を上げることで検出を試みる。さらに、母斑およびメラノーマ *in situ* においてどのような分布をとるのか、初期の掌蹠メラノーマ *in situ* で検出される CyclinD1 遺伝子の増幅が分泌部の色素幹細胞集団から始まる可能性を検証し、その病理発生機序の解明へと応用する。これまでのメラノーマ *in situ* の再発例の手術標本を見直し、今後の治療方針へと役立てる。

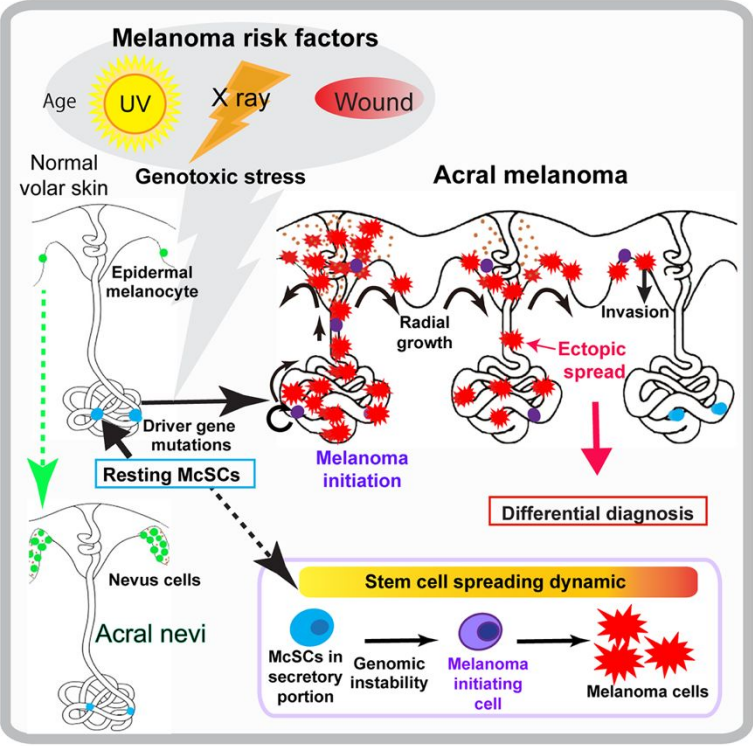
### 4. 研究成果

申請者らは、以前に無毛部の皮膚に存在する汗腺にある色素幹細胞を見出掌蹠などの末端部皮膚に発生するメラノーマの起源を探索した結果、四肢末端の無毛部皮膚に多数分布する汗腺の分泌部において色素幹細胞を見出した(Okamoto N et al. PCMR, 2014)。そこで、汗腺に存在する色素幹細胞とマウスのメラノーマモデルの運命を追跡する技術として、Dct-H2B-GFP トランスジェニックマウスに加えて、Dct-H2B-GFP ノックインマウス、Dct-CreER ノックインマウスを作製し、色素幹細胞の可視化と系譜解析を行なった。

さまざまな遺伝毒性ストレスや創傷などを負荷し、色素幹細胞の分布、運命、形態変化、細胞動態を追跡し、色素幹細胞が放射線や紫外線などの遺伝毒性ストレス、ならびに創傷によって自己複製し子孫細胞を多く表皮に向かって供給する現象が共通して見られることを明らかにした。さらに、ヒトのメラノーマドライバー遺伝子を色素幹細胞に特異的に発現させたマウスモデルにおいて、ヒトの末端部メラノーマを模倣した浸潤性メラノーマをマウスに発生させること、その発生には初期にゲノム不安定性を誘導するストレスまたは創傷が必要であることが明らかになった。

本メラノーマモデルマウスは、病理組織学的にもメラノーマ細胞の形態や分布などにおいてもヒトの末端部メラノーマに酷似することから、メラノーマの研究のモデルとして薬効評価やメラノーマの病理発生機序の更なる解明などにおいても有用なモデルとなると考えられた。

さらに、ヒト掌蹠の色素性病変を解析した結果、遺伝的に不安定な色素幹細胞は、メラノーマでは汗腺や周囲の表皮に拡大するのに対して、母斑では母斑細胞は表皮内に発生しそこに留まり周囲へと拡大することなく色素幹細胞とは無関係であることがわかった。このような幹細胞の拡散ダイナミクスの検出は、特に汗管における色素細胞の分布を検出することで免疫組織学的に可能であり、末端部メラノーマと母斑の早期鑑別診断に活用できることが明らかになった(Eshiba S et al. Cell reports, 2021)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eshiba S, Namiki T, Mohri Y, Aida T, Serizawa N, Shibata T, Morinaga H, Nanba D, Hiraoka Y, Tanaka K, Miura K, Tanaka M, Uhara H, Yokozeki H, Saida T, Nishimura EK	4. 巻 36(5)
2. 論文標題 Stem cell spreading dynamics intrinsically differentiate acral melanomas from nevi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Al-Busani H, Al-Sobaihi S, Nojima K, Tanemura A, Yaguchi T, Kawakami Y, Matsumura H, Nishimura EK, Yokozeki H, Namiki T	4. 巻 97(2)
2. 論文標題 NUAK2 localization in normal skin and its expression in a variety of skin tumors with YAP.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 143-151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.01.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 並木剛、毛利泰彰、西村栄美	4. 巻 2
2. 論文標題 足底のメラノーマの発症メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月間皮膚科（Dermatology）	6. 最初と最後の頁 99-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村 栄美
2. 発表標題 モデル動物から迫る皮膚の再生と老化
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会2020（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 栄美
2. 発表標題 加齢による白髪とメラノーマ(Phenotypic trade-off between graying hair and melanoma)
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村 栄美
2. 発表標題 色素幹細胞と白髪Up To Date
3. 学会等名 第38回日本美容皮膚科学会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Emi K. Nishimura
2. 発表標題 Stem cell competition for skin homeostasis and aging
3. 学会等名 ISSCR 2020 Virtual(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医科学研究所老化再生生物学分野  <a href="https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/aging-regeneration/index.html">https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/aging-regeneration/index.html</a></p> <p>東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞医学分野  <a href="https://www.tmd.ac.jp/mri/scm/index.html">https://www.tmd.ac.jp/mri/scm/index.html</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	並木 剛  (Namiki Takeshi)	東京医科歯科大学・皮膚科・准教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関