

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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890048

研究課題名（和文） ヒト型マウス皮膚をもつ新規メラノーマモデルマウスの確立とメラノーマ発生機序の解明

研究課題名（英文） Establishment of novel melanoma model mice with humanized mouse skin and analysis of their melanoma genesis mechanisms

研究代表者

松村 寛行 (MATSUMURA HIROYUKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：70581700

研究成果の概要（和文）：

メラノーマは、治療に最も苦渋する癌の代表であるが、その発生機序は、未だに明らかにされておらず、その機構解明が待たれている。本研究では、ヒトの皮膚の特徴を模倣するマウスに、さらに遺伝的に手を加えることにより、マウスの皮膚からヒトのメラノーマに酷似する新規メラノーマモデルマウスの作出に成功している。現在、このモデルマウスを用いて、メラノーマの発生機序を詳細に解析中である。

研究成果の概要（英文）：

Malignant Melanomas is representative treatment resistant tumor, and the generating mechanism is not clarified yet, therefore, it waits for mechanism elucidation. We have successfully generated the novel mice model by combination with humanized mouse skin and genetic manipulations. Now, we are analyzing the melanoma genesis mechanism in detail by using their novel model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1260000	378000	1638000
2011年度	1160000	348000	1508000
年度			
年度			
年度			
総計	2420000	726000	3146000

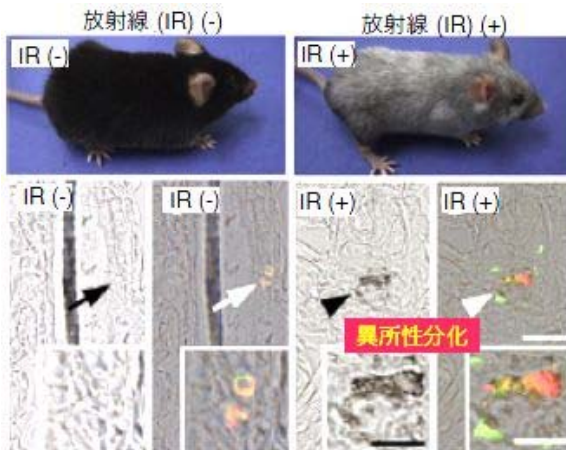
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：メラノーマ、モデル動物、色素幹細胞、実験病理学、NRAS 遺伝子、BRAF 遺伝子、SCF 遺伝子、Ink4a/ARF 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、新しい概念として“がん幹細胞”が注目されている。癌組織は、不均一な細胞集団からなり、その多くは、自己複製能と無制限に分裂できる幹細胞様の特性をもつ“がん幹細胞”なる細胞集団によって生み出されていることが、示唆されてきた。放射線や化学療法などの従来の治療は、増殖の早い細胞を標的にしておりがん幹細胞は、従来の治療に抵抗することから、今後、この点を克服した治療方法を開発することが、癌根治の鍵になると考えられる。悪性黒色腫(メラノーマ)は、治療に最も苦渋する皮膚癌の代表であり、もとより放射線療法にも化学療法に殆ど反応しないという特徴をもつ。我々のグループは、メラノーマの元になる色素細胞系譜の幹細胞である色素幹細胞を毛包バルジ領域に同定し、その維持において周囲の微小環境ニッチが幹細胞の運命決定に重要であることを示してきた。(Nishimura EK et al. Nature 2002, Science 2006) また、メラノーマの元となる正常の色素幹細胞は、休止(G0)期に、放射線感受性が高く、それに伴い、色素細胞ニッチにおいて、異所性分化を引き起こし、最終的には、色素幹細胞が枯渇することにより白髪に導くことを明らかにしている。(Inomata K, ... Nishimura EK et al. Cell 2009) (下図)



これらを踏まえると、色素幹細胞は、放射線などのゲノム損傷を受けた後、そのほとんどは、異所性分化により排除されるが、一部の遺伝子変異をもった色素幹細胞が、メラノーマ幹細胞に転換し、メラノーマを発生させている可能性が考えられる。

これまでのがん幹細胞研究では、腫瘍から取り出したがん細胞やがん細胞株を免疫不全マウスに移植して腫瘍起始細胞の腫瘍起始能力を評価している。例えば、ヒトメラノ

ーマを、Bリンパ球抗原であるCD20や薬剤排出トランスポーター遺伝子の一つであるABCB5で、ソーティングして免疫不全マウス(NOD-SCID)の皮下に移植すると、ソーティング前より少ない数で、腫瘍をつくりだすことが可能であることから、CD20やABCB5陽性細胞をメラノーマ起始細胞としてきた。(Fang D et al. Cancer Research 2005; Schatton T et al. Nature 2008)しかし、ヒトメラノーマをマトリゲル上で培養し、高度免疫不全マウスの皮下(NOD-SCID, IL2rg^{-/-})に移植すると、約1/4もの細胞が再びメラノーマを作りだすことが可能であり、もしかしたら、メラノーマには、幹細胞が存在しないのではないかという報告がなされた。(Quintana E et al. Nature 2008)しかし、これらの手法では、がん病巣内の環境からもとの発生母地からも全く異なる環境へ人為的に移植して評価しているため、微小環境依存性という点で大きなバイアスがかかっており、方法論を根本的に見直す必要があると考えている。がん幹細胞は、周囲の環境によっても幹細胞性が与えられている可能性があり、実際に担がん個体の生体内で“がん幹細胞”と言える細胞があるのかどうか重要であると考えている。これに関連して、最近、腸や前立腺や扁平上皮などの癌は、それぞれの組織幹細胞における遺伝子変異の蓄積により、発生しうることが示されている。(Baker N et al. Nature 2009; Wang X et al. Nature 2009; Malanchi I et al. Nature 2008)しかし、これを標的として治療できるのか、実際のがん幹細胞であるかは明らかではないため、がん幹細胞の運命と治療抵抗性を同時にモニターする新規のシステムが必要である。今までのメラノーマモデルマウスでは、殆どすべての例で、腫瘍細胞は、真皮で増殖しており、実際のヒトでみられる水平および垂直方向の浸潤や表皮内での母斑細胞の胞巣形成は認めず、組織学的にヒトのメラノーマとほど遠く、アニマルタイプの病理組織的特徴をもつ。

そのため、メラノーマ発生機序は、未だに明らかにされておらず、その機構解明が待たれている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトのメラノーマに酷似するメラノーマを早期に自然発症するマウスモデルを作製し、その腫瘍組織環境において色素幹細胞系譜の可視化により治療抵抗性細胞を追跡することで、メラノーマ幹細胞と微

小環境ニッチを同定し、メラノーマの発生機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト皮膚と同様に表皮内に SCF (kit ligand) を発現し、表皮内で色素細胞が生存するマウス (e/e; K14-SCF) にヒトメラノーマで高頻度に変異がみられるがん遺伝子 (NRAS, BRAF) およびがん抑制遺伝子欠損 (Ink4a/ARF, PTEN) を導入し、さらに、色素幹細胞系譜を可視化できるシステム (Det-lacZ、もしくは、Det-H2B-GFP) を導入することにより、色素幹細胞系譜がラベルされ、(下図)



ヒト型皮膚をもち、ヒト型メラノーマを自然発症するモデルマウスを開発する。次に、このマウス由来のメラノーマ発生プロセスについて解析する。

4. 研究成果

ヒト型の皮膚を摸倣できるマウス (extension:K14-SCF) に、ヒトメラノーマで高頻度に見られる変異型 NRAS Q61K を色素細胞特異的に発現できるトランスジーンを導入し、また、ヒトメラノーマで高頻度に欠損の見られる Ink4a/ARF ががん抑制遺伝子の欠損アレルを導入し、さらに色素幹細胞系譜が β-galactosidase によりラベルされるマウスの作出に成功した(下図)。



このマウスにおいて、色素幹細胞系譜からメラノーマや母斑が発生する像も得られている。現在、母斑やメラノーマがどのように発生してくるのか、詳細に解析中である。また、上記のヒト型の皮膚をもち、NRAS 変異の代わりにヒトメラノーマでより高頻度に変異の見られる変異型 BRAF 遺伝子を色素幹細胞特異的かつ成体内で薬剤依存的に誘導で

きるアレルを導入し、このマウスからも同様の検討を行っている。

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)

[学会発表] (計 4 件)

①Shehata M., Matsuyama H., Okubo-Suzuki R., and Inokuchi K.: Neuronal-stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical LTD. MBSJ2011, The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2011. 12. 13-16, Yokohama.

②Shehata M., Matsumura H., Okubo-Suzuki R., and Inokuchi K.: Neuronal-stimulation transiently induces autophagy in hippocampal neurons. Neuroscience 2011, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2011. 11. 16, Washington, DC, USA.

③Shehata M., Matsumura H., Okubo-Suzuki R., Inokuchi K.: Neuronal-stimulation transiently induces autophagy in hippocampal neurons. 第 34 回日本神経科学大会, 2011, 9, 14-17, 横浜.

④ Shehata M., 松村寛行, 鈴木 (大久保) 玲子, 井ノ口馨: Neuronal-stimulation transiently induces autophagy in hippocampal neurons. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 2010, 12, 7-10, 神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 寛行 (HIROYUKI MATSUMURA)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号: 70581700

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし