

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591612

研究課題名(和文)メラノサイト幹細胞の未分化性維持機構とその破綻による腫瘍発生の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of melanomagenesis based on the failure of pluripotency maintenance of melanocyte stem cells

研究代表者

真鍋 求(MANABE, Motomu)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30138309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：培養メラノーマ細胞を用いて、3次元構造を持つ球体状のメラノーマ細胞群(メラノーマ・スフェロイド)の特性評価を行った。

その結果、メラノーマ・スフェロイドは、生体のメラノーマ腫瘍塊に類似した性質を有していることが実証された。この所見は、メラノーマに対する新規治療法を開発する際に、メラノーマ・スフェロイドがより有益な情報をもたらす可能性を示唆するものである。特に、サリノマイシンと三酸化ヒ素の併用により、高い抗腫瘍効果が得られたことは注目に値する。

研究成果の概要(英文)：Recurrence after chemotherapy is a major cause of cancer mortality: subsets of tumor cells evade initial chemotherapy or radiotherapy and survive to re-propagate the tumor. To develop a novel therapeutic approach for melanoma, we applied a non-adhesive culture system which developed spheroids mimicking the properties of melanoma in vivo. Subsequently, spheroids involved cells exhibiting clonogenic and slow-cycling properties in addition to chemotherapeutic resistance to doxorubicin. Interestingly, while treatment of spheroids with either salinomycin or As203 showed limiting effects, a combinatorial treatment was markedly superior to single treatment with each drug. Thus, melanoma spheroids could be a new platform for studying melanoma biology and are likely to provide a clinically relevant target for the novel chemotherapy.

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：メラノーマ スフェロイド 三酸化ヒ素 サリノマイシン

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では、癌抑制遺伝子産物である *Pten* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) のメラノサイトにおける生物学的役割を検討するため、メラノサイト特異的 PTEN 欠失マウスを作成した。この遺伝子改変マウスの生物学的特性を細胞生物学・分子生物学的手法より解析したところ、メラノサイトにおける *Pten* の欠失は、PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT 経路の活性化により、細胞増殖能亢進やアポトーシス抵抗性の獲得などを生じさせることが判明した (Cancer Res 68: 5760-5768, 2008)。さらに興味深いことに、体毛を抜去すると、野生型マウスでは白髪化するのに対して、*Pten* 欠失マウスではこれに抵抗した。この所見は、「PI3K/AKT 経路が色素幹細胞の維持に貢献し、白髪化を抑制している」ことを示唆するものであり、その分子動態の詳細を解明することが急務となった。

また上述の我々の報告では、メラノーマ発生に関わる分子病態の一端が併せて解明された。まず PTEN が抑制された状態では、PI3K が活性化され、PI(4,5)P₂ をリン酸化して、PI(3,4,5)P₃ へと変換される。続いて PI(3,4,5)P₃ にリン酸化酵素である AKT が結合し活性化され、下流のシグナル伝達分子群を介して、メラノーマの化学発癌に対する感受性が亢進する。すなわち、上記の所見より「PI3K/AKT 経路の活性化はメラノーマの病態形成に関与し、その制御によりメラノーマに対する新規分子標的療法を創生できる」という作業仮説が導き出され、その当否が注目されることになった。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、PI3K 経路の下流分子である STAT3 に着目して、メラノサイト幹細胞の未分化性維持機構とその破綻による腫瘍発生の分子基盤を解明することを計画している。その成果は、メラノサイト幹細胞

が細胞死を起こして枯渇するため生じる白髪化、またメラノサイト系の代表的悪性腫瘍であるメラノーマ、などの分子病態の全貌を解明し、かつ新規治療法を探索する上で貴重な知見となるものと期待される。

3. 研究の方法

我々は本研究課題において、PI3K 経路の下流分子である STAT3 に着目して、メラノサイト幹細胞の未分化性維持機構とその破綻による腫瘍発生の分子基盤を解明することを目指した。この課題を達成するため、*Tyrosinase-Cre* マウスと *Pten-flox/flox* マウスを交配し、メラノサイト特異的 *Pten* ホモ欠失マウスを作成することを試みた。

さらに、PI3K 経路と STAT3 経路の腫瘍発生における動的役割を解明し、かつメラノーマに対するより強固で長期的に使用できる標的治療を可能にするために、マウス B16-BL6 メラノーマ細胞株を使用して先行実験を実施することとした。具体的には、3次元構造を持つ球体状のメラノーマ細胞群(メラノーマ・スフェロイド)の特性評価を行い、スローサイクリング細胞を含む細胞集団を標的とした新たな化学療法の選択肢を検討した。

まず、生体の固形癌に類似した性質を有する細胞群を得るため、寒天でコートした細胞培養皿を用い、B27 サプリメント、LIF, DIF, bFGF などの増殖因子を添加した DMEM/F12 培地中で、培養メラノーマ細胞株 B16-BL6 を 3 日間培養した。さらに trypsin-EDTA 処理後、同じ培養条件でさらに 3 日間培養することにより、メラノーマ・スフェロイドを作成し、単層培養した細胞との特性を以下の如く比較した。

(1) クローン原性の性質を持つ細胞を同定するため、自己複製能アッセイを用いて、単一細胞より増殖する細胞数を定量した。

(2) スローサイクリング細胞を同定するため、プロモデオキシウリジン (BrdU) を添加

し 7 日間培養後、BrdU を含まない培養条件でさらに 6 日間培養し、BrdU 標識保持細胞を免疫染色により同定した。

(3) 化学療法に対する耐性を比較するため、Alamar-blue アッセイを用いて、ドキソルビシン添加後の細胞生存率を定量した。

(4) ドキソルビシンによる細胞死の機序を解明するため、TUNEL 法 (ApopTag®キット) を用いて、アポトーシスに陥った細胞数を検出した。

(5) メラノーマに対する新規治療法を開発するため、スフェロイドに対しサリノマイシンあるいは三酸化ヒ素を単剤ないし併用投与し、細胞生存率を Alamar-blue アッセイを用いて定量した。

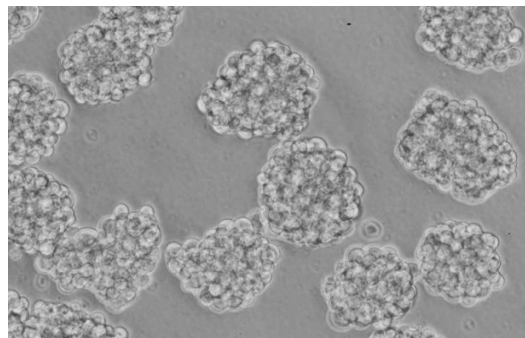
4 . 研究成果

Tyrosinase-Cre マウスと *Pten-flox/flox* マウスを交配し、メラノサイト特異的 *Pten* ホモ欠失マウスを作成したところ、このマウスは、交配を繰り返したにもかかわらず、出生率が低く、生存しても成体にいたるまでに死亡した。そのため、実験に必要な個体数を得ることができなかった。この所見は予想外の結果であったため、多くの時間をかけて交配を繰り返してみたが、同様の結果であった。

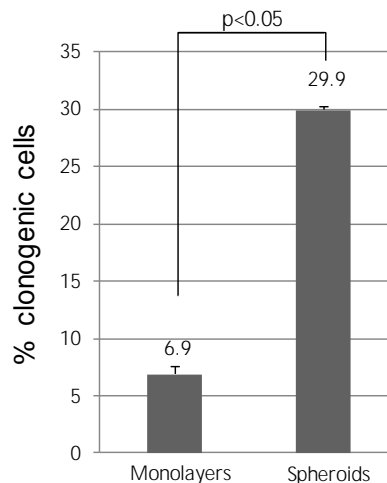
この理由を考察すると、*Tyrosinase* が中枢神経でも発現することと関連があるものと思われる。すなわち、メラノサイト特異的 *Pten* ホモ欠失マウスでは、中枢神経でも *Pten* が欠失しており、そのため脳の肥大と脳浮腫による水痘症が発症しているのであろう。この所見は *Dct* プロモーターを使用した際にも起こったことであるが、*Tyrosinase* プロモーターを使用すると、より高度の異常が生じた可能性がある。

上記の如く、遺伝子改変マウスを用いた研究戦略では十分な成果を挙げられなかったが、培養メラノーマ細胞を用いた研究戦略では、論文として発表するに足る以下の成果が得られた。

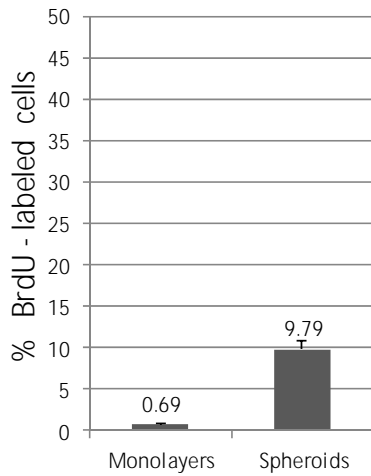
(1) スフェロイドの作成 : 3 次元培養法によりメラノーマ細胞株 B16-BL6 を 3 日間培養し、球体状の構造を持つ細胞集団が形成された。trypsin-EDTA 処理後、同じ培養条件でさらに 3 日間培養することにより、より密な構造を持つ細胞集団が得られた。



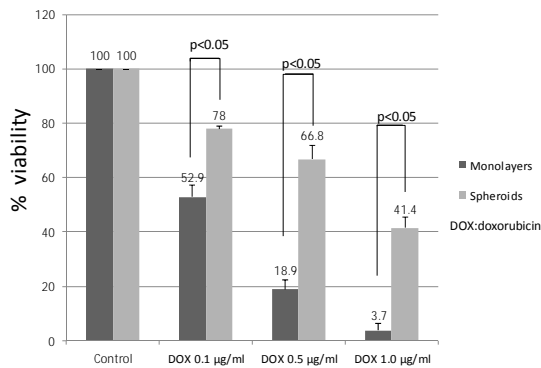
(2) 自己複製能アッセイ : 自己複製能アッセイにより自己再生能力を評価したところ、単層培養細胞と比較して、スフェロイド中にクローン原性の性質を持つ細胞が多く存在していた。



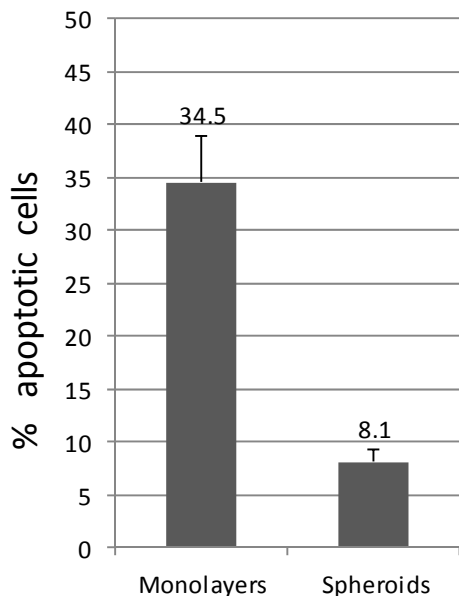
(3) スローサイクリング細胞の同定 : BrdU 保持能より細胞周期の遅い細胞を同定したところ、単層培養細胞と比較して、スフェロイド中に BrdU を保持したスローサイクリング細胞が多く含まれていた。



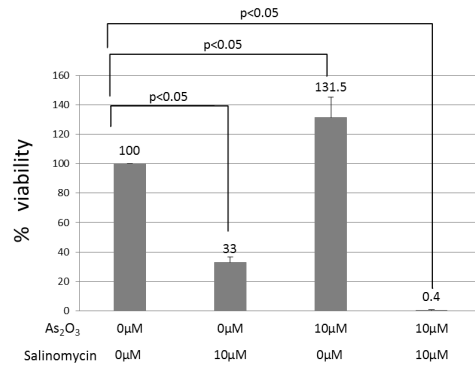
(4) 化学療法に対する抵抗性：各濃度のドキソルビシンを添加した細胞の生存率を比較したところ、単層培養細胞と比較して、スフェロイド中にドキソルビシンに対し抵抗性を有する細胞が多く含まれていた。



この結果を反映して、単層培養細胞と比較して、スフェロイド中にはドキソルビシンによるアポトーシス誘導に抵抗性を有する細胞が多く含まれていた。



(5) サリノマイシンと三酸化ヒ素の併用効果：サリノマイシンあるいは三酸化ヒ素を単剤で投与した場合と比較して、併用して投与した方が、スフェロイド細胞の生存率が顕著に減少した。



以上の所見より、メラノーマ・スフェロイドは、単層培養細胞と比較して、スローサイクリング細胞を多く含み、また既存の化学療法剤であるドキソルビシンに対しより抵抗性を有することより、生体のメラノーマ腫瘍塊に類似した性質を有していることが実証された。この結果は、メラノーマに対する新規治療法を開発する際に、単層培養細胞と比較して、メラノーマ・スフェロイドがより有益な情報をもたらす可能性を示唆するものである。さらに、この手法を用いた生体に近い条件においても、サリノマイシンと三酸化ヒ素の併用により、高い抗腫瘍効果が得られたことは注目に値する。現在、luciferaseを発現する stable transformant を作成中であり、spheroid の多臓器への転移能を検索する予定であり、癌幹細胞を標的とする新規分子の選択に役立つものと期待される。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Ishikawa N ,Takahashi M ,Noguchi N Manabe

M :

Salinomycin sensitizes melanoma spheroids containing slow-cycling cells to the effects of arsenic trioxide .

Akita J Med **40** , 143-150 , 2013 .

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 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 0 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

真鍋 求 (MANABE , Motomu)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 30138309

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :