

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790775  
 研究課題名（和文） 色素幹細胞における Spred-1 の機能と組織幹細胞制御機構の共通分子基盤の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of functions of Spred-1 in melanocyte stem cells and common molecular mechanisms in tissue-specific stem cell regulations.  
 研究代表者  
 田所 優子（TADOKORO YUKO）  
 金沢大学・がん研究所・助教  
 研究者番号：00447343

研究成果の概要：本研究課題では、様々な組織幹細胞システムの制御機構における共通分子基盤の解明を目的とし、Spred-1 に着目して造血幹細胞と色素幹細胞システムを中心に解析を行なった。Spred-1 欠損マウスの解析から、血液系では Spred-1 はサイトカインである幹細胞因子(SCF)による刺激を抑制的に制御することによって造血幹細胞とその維持・分化の場所であるニッチとの親和性を調節していることが示唆された。一方色素系でも同様に Spred-1 欠損マウスを用いた解析を行なった結果、色素細胞が過剰に増殖していることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：再生, 発生, 分化, 幹細胞, 皮膚, 色素

## 1. 研究開始当初の背景

我々の体を構成・維持している様々な臓器・組織の中には、組織特異的幹細胞が存在して幹細胞システムを構築し、組織における細胞のターンオーバーを行なうことによって恒常性を維持していることが知られている。これら組織特異的幹細胞は、幹細胞それ自身を維持する能力（自己複製能）を持ちながら組織を構成する機能的な細胞（分化細胞）を供給する能力も同時に持っている。このような能力を持つ組織幹細胞は、それを取り巻く微小環境であるニッチと呼ばれる場

所に存在し、ニッチによって自己複製能と分化細胞の供給が調節されると考えられている。このような現象は、血液・皮膚・腸・精巣などでの詳細な解析により共通して見られることが知られているため、それを制御している共通のメカニズムや分子基盤が存在していることが考えられるが、その存在についてはあまり理解されていないのが現状である。

本研究では組織幹細胞システムの制御機構における共通のメカニズムを解明することを目指している。そこで研究代表者は、古

くからの遺伝学的研究から知られている stem cell factor (SCF・幹細胞因子)/c-Kit レセプター・チロシンキナーゼシステムの重要性に着目した。このシステムは造血幹細胞・色素幹細胞・生殖幹細胞の発生・維持・分化に必須であることが知られている。研究代表者は、SCF/c-Kit シグナルを細胞内で制御している Spred-1 に着目し、Spred-1 を通して各組織幹細胞システムの共通性を明らかにできるのではないかと考え、本研究課題を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで造血幹細胞で明らかにしてきた Spred-1 による制御機構が、色素幹細胞システムにおいてもその共通性が存在するかどうかを明らかにすることを目的としている。

研究代表者はこれまで、Spred-1 欠損マウスを用いて造血幹細胞の制御機構における Spred-1 の役割を解析してきた。その結果、Spred-1 欠損造血幹細胞ではニッチとの親和性が高くなっていることが示唆された。その分子メカニズムとしては、Ras/Raf/Erk シグナルの活性化や RhoA シグナルの亢進がこれまでの報告から考えられたが、造血幹細胞においては活性型 RhoA の蓄積が示唆された。これまでの報告では SCF/c-Kit シグナルと RhoA シグナルとの関係はほとんど報告されていなかったため、本研究ではまず、Spred-1 がそれら 2 つのシグナル経路を結び付けているかどうかを調べるために、Spred-1 の有無によって SCF/c-Kit シグナルが RhoA シグナルを亢進するかどうかを確認することを目的とした。

またこれらのことが色素幹細胞システムにおいても見られるかどうかを明らかにするために、血液系と同様に Spred-1 欠損マウスの皮膚を用いて解析を行なうことを目的とした。

## 3. 研究の方法

SCF の刺激を受けた細胞において Spred-1 による RhoA 活性化の制御が見られるかどうかを検討するために、SCF 刺激後の活性型 RhoA の pull down assay を行なった。方法としては、c-Kit と Spred-1 の両方を発現している MC9 細胞にレトロウイルスを用いて control GFP、wild type Spred-1、ドミナントネガティブ Spred-1 を強制発現させた。これらの MC9 細胞を 7 時間飢餓状態にした後、SCF を添加した。SCF 添加後 0, 5, 10, 15, 30 分で細胞を回収し、タンパク質を採取した。

これらのタンパク質は RhoA 活性検出キットを用いて pull down し、ウエスタンブロットイング法により活性型 RhoA の定量を行なった。

色素幹細胞システムにおいても Spred-1 の役割を解析するため、通常の Spred-1 欠損マウスを用いた。さらに色素細胞を標識するために、Dct プロモーターの制御下に LacZ 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスと Spred-1 欠損マウスを交配することで、Spred-1 欠損マウスにおいて色素細胞を LacZ 標識したマウスを作製した。また、ヒト型皮膚を持つマウスを作製するために、上記のマウスとケラチン 14 プロモーター制御下に SCF を発現するトランスジェニックマウスを交配し、Spred-1 変異を持つヒト疾患の皮膚モデルマウスを作製した。

Spred-1 変異ヒト疾患モデルマウスにおけるカフェオレ・スポットの有無を調べるために、マウス背中を毛周期の休止期で定期的に抜毛することで観察した。

まずこれらのマウスの皮膚を詳細に観察するために皮膚組織切片を作製した。そのサンプルはヘマトキシリン・エオジン染色を行ない、組織学的解析を行なった。

分子レベルでの解析を行なうために、マウス皮膚サンプルの凍結切片・パラフィン切片を作製し、色素細胞マーカーである c-Kit 抗体、角化細胞基底層のマーカーであるケラチン 15 抗体や  $\alpha 6$  インテグリン抗体、さらに Ki67 抗体、リン酸化 Raf 抗体、リン酸化 p44/p42 MAPK 抗体、p53 抗体、p63 抗体等を用いて免疫染色を行なった。また色素細胞を検出するために LacZ 染色を行なった。さらに FACS を用いて Spred-1 欠損マウス皮膚における各細胞集団の解析を行なった。

追加実験として、Spred-1 欠損マウスと癌抑制遺伝子を欠損した p53 欠損マウスや p16<sup>Ink4a</sup>/p19<sup>Arf</sup> 欠損マウスとの交配を行なった。

## 4. 研究成果

Spred-1 が SCF/c-Kit シグナルの下流において細胞骨格や細胞運動の制御に関わる RhoA シグナルを制御しているかどうかの検討を行なうために、細胞に SCF 刺激を与えた後の活性型 RhoA の量について pull down assay 法により解析を行なった。その結果、野生型細胞に比べて Spred-1 ノックダウン細胞において RhoA の活性化が亢進していることが明らかとなった。また Spred-1 欠損造血幹細胞では、SCF の刺激によって接着性が亢進すると思われる細胞形態に変化することを見出した。これらのデータは造血幹細胞のニッチの獲得・維持において SCF の存在と幹

細胞の形態の変化が重要な役割を果たしていることを示唆しており、今後の幹細胞とニッチの制御機構の解明において重要な知見を与えるものである。

一方、色素幹細胞システムにおいても Spred-1 による制御機構が存在するかどうかを検討するために、Spred-1 欠損マウス皮膚での解析を行なった。他グループによって Spred-1 遺伝子に変異を持つ患者の皮膚にはカフェオレ・スポットが存在することが報告されたことから Spred-1 欠損マウスの外観を観察したところ、野生型に比べ Spred-1 欠損マウスではヒトの皮膚構造に近いマウス尾や耳、足の裏の皮膚において色が黒くなっており、色素細胞の増加あるいは色素産生が亢進していることが示唆された。そこで皮膚組織サンプルを作製しヘマトキシリン・エオジン染色により組織学的解析を行なったところ、耳、尾、足蹄部において色素を産生している細胞数の増加が認められた。さらに免疫組織染色により色素細胞のマーカーである c-Kit の発現を調べたところ c-Kit 陽性細胞の数が増加しており、色素細胞の数が増加していることが示唆された。この色素細胞の増殖状態について Ki67 抗体を用いた免疫染色を行なったところ、野生型との大きな差は認められなかった。この解析は adult において行なったため、マウスの発生あるいは成長過程において増殖していることが考えられた。

また、特に色素細胞の増殖という表現型が顕著であった部位がマウスの足蹄部であった。ヘマトキシリン・エオジン染色により組織学的解析を行なったところ、汗腺部分に特異的に色素細胞の増殖が観察された。一方野生型マウスでは、このような表現型は認められなかった。手のひらや足の裏のような無毛部における症状は Spred-1 遺伝子に変異を持つ患者において報告もなく、また実験動物を用いた解析においても無毛部における色素幹細胞の存在場所についてはこれまでに報告されていなかった。そのため今回得られた結果は、無毛部においても有毛部と同様に色素幹細胞のニッチが存在している可能性があることを新たに示唆している重要なデータである。

一方、当初の計画では想定していなかったが、色素細胞の解析を行なうのと同時に色素細胞を取り囲む皮膚の角化細胞や表皮基底細胞にも着目し解析を行なった。基底細胞のマーカーであるケラチン 15 抗体と  $\alpha 6$  インテグリン抗体で免疫染色を行なった結果、これらの陽性細胞も増加している傾向にあった。これらの c-Kit 陽性色素細胞や基底細胞の増加という結果は、免疫染色法だけでなく FACS を用いた解析によっても同様の結果が得られた。さらに FACS 解析では、 $CD34^+/\alpha 6$  インテグリン<sup>+</sup>毛包幹細胞の増加も明らかにした。

このことから、Spred-1 は色素細胞だけでなく角化細胞の制御にも関与していることが示唆された。研究開始当初は色素細胞側のみ解析予定であったが、今後は色素幹細胞と毛包あるいは表皮幹細胞の両方から解析を進める必要性が出てきた。この結果は、Spred-1 がより広く様々な組織幹細胞制御機構に関与していることを期待させるデータである。

このような色素細胞と角化細胞で観察された表現型の分子メカニズムを理解するために、Ras/Raf/Erk シグナル経路の活性化状態について解析を行なった。Spred-1 遺伝子に変異を持つ患者皮膚のカフェオレ・スポットにおいて、Raf/Erk シグナル経路の活性化が亢進していることが報告されている。そのため、リン酸化 Raf 抗体、リン酸化 p44/p42 MAPK 抗体を用いて免疫染色を行なったが、現在までのところ Spred-1 欠損マウスと野生型マウスとの間で差を見出すことはできていない。また、最近 p53 の発現亢進によりダークスキンの表現型を持つマウスについての報告がされたことから Spred-1 欠損マウスにおいても p53 の発現量について検討したが、野生型マウスとの間で差は見られなかった。今後、分子メカニズムの解析に関して、マウスの解析時期や解析手段を検討しなければならないと考えている。

Spred-1 欠損マウスの解析を進める中で、当初の計画には無かったが Spred-1 とカフェオレ・スポットやメラノーマとの関係を調べることの重要性が高まったため、これらの解析準備も進めた。

Spred-1 とカフェオレ・スポットとの関係における解析については、ケラチン 14 プロモーター制御下に SCF を発現するトランスジェニックマウスと Spred-1 欠損マウスを交配することで Spred-1 変異を持つヒト疾患の皮膚モデルマウスを作製した。このマウスはさらに、Extension 変異マウスを導入して毛色を黄色にすることで観察しやすくしている。このマウス背中を、毛周期の休止期において定期的に抜毛を行なうことで皮膚の状態の観察を行なった。その結果、Spred-1 欠損マウス皮膚においてはカフェオレ・スポットのようなものが観察された。その部分の皮膚組織を採取し LacZ 染色を行なって色素細胞の状態を観察したところ、表皮において LacZ 陽性色素細胞の増加が認められた。カフェオレ・スポットの発生メカニズムに関しては、医学的にも詳細に理解されていないのが現状である。今後、今回観察されたものがカフェオレ・スポットとして確定できるかどうか更なる詳細な解析が必要であるが、もしカフェオレ・スポットとして判定できれば、これまでに報告の無いカフェオレ・スポットモデルマウスとなる。またカフェオレ・スポット

はレーザーによって治療を行なった後も再発することが経験的に知られている。それはカフェオレ・スポットを形成する色素細胞をどこからか供給している細胞が存在している可能性を示唆しており、Spred-1 と色素幹細胞の関係、色素幹細胞とカフェオレ・スポットとの関係を理解する上でこのモデルマウスは有効なツールになり得る。さらにこのような切り口から解析を行なうことによつて、Spred-1 による色素幹細胞制御機構の解明が進展することが期待される。

Spred-1 とメラノーマとの関係における解析については、さらなるモデルマウスの作製を試みている。日本人におけるメラノーマ患者でその発症部位についての統計をとると、比較的高い割合で足の裏に発症することが知られている。さらにヒト足の裏や手のひらにおけるメラノーマは、汗腺の存在する皮丘部に発症し、現在ではこれがメラノーマの診断基準の1つとなっている。今回 Spred-1 欠損マウスにおいて発見した汗腺で特異的に起こる色素細胞の増殖によって引き起こされる足踏部のダークスキン現象は、これまでのモデル動物では報告されていない極めて重要な発見である。このことから Spred-1 欠損マウスは、足の裏に発症するメラノーマの重要なモデルマウスになることが期待された。ヒトのメラノーマにおいては、B-RAF, p16<sup>INK4A</sup>/p19<sup>ARF</sup>, p53 などの遺伝子に変異があることが多いことから、Spred-1 欠損マウスと p16<sup>INK4A</sup>/p19<sup>ARF</sup> 欠損マウスあるいは p53 欠損マウスとの交配を開始し、現在これらのマウス作製を進めている。

今回得られた成果をもとに、今後は色素幹細胞制御機構における Spred-1 の役割を理解するために Spred-1 欠損マウスの解析を行なうだけでなく、今回報告したモデルマウスを用いて、カフェオレ・スポットやメラノーマの解析という切り口からのアプローチが必要であると考えられる。今回の Spred-1 欠損マウスの観察だけからでは分子メカニズムについて深く追求することができなかったが、カフェオレ・スポットやメラノーマといった疾患部位を調べることによつて、より解析が進むことが期待される。また現在行なっているマウスモデルの作製が進めば、これまで不明であった色素幹細胞、カフェオレ・スポット、メラノーマの関係が明らかになるものと思われる。今後は、今回得られた色素幹細胞制御機構の解析結果をより発展させながら他の組織幹細胞システムとの共通原理の解明をより一層進めるとともに、Spred-1 変異による疾患やメラノーマ発症のメカニズム・治療法開発へと発展させていくことを目指したい。

## 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 2 件)

① Shuhei Yamada, Masako Onishi, Reiko Fujinawa, Yuko Tadokoro, Koji Okabayashi, Makoto Asashima and Kazuyuki Sugahara (2009). Structural and functional changes of sulfated glycosaminoglycans in *Xenopus laevis* during embryogenesis. *Glycobiology* 19 (5), 488-498, 査読有.

② Yuko Tadokoro, Hideo Ema, Masaki Okano, En Li, and Hiromitsu Nakauchi (2007). De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine* 204 (4), 715-722, 査読有.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①産業財産権の名称: X V I I 型コラーゲンに関する分化抑制剤

発明者: 西村栄美、清水宏、谷村心太郎、田所優子、澤村大輔、西江涉

利権者: 同上

産業財産権の種類: 特許権

番号: 特願 2007-202319

出願年月日: 2007 年 8 月 2 日

国内外の別: 国内

② 産業財産権の名称: Methods for inhibiting hair depigmentation and hair loss

発明者: 西村栄美、清水宏、谷村心太郎、田所優子、澤村大輔、西江涉

利権者: 同上

産業財産権の種類: 特許権

番号: 12/035, 733

出願年月日: 2008 年 2 月 22 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所 優子 (TADOKORO YUKO)  
金沢大学・がん研究所・助教  
研究者番号：00447343

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし