

88. 幹細胞システムにおける癌の初期発生機序

西村 栄美

Key words : 色素幹細胞, メラノーマ, がん, 幹細胞,
ニッチ

東京医科歯科大学 難治疾患研究所
幹細胞医学分野

緒言

固形がんの初期発生部位を特定することは、がん発生機序や診断治療を考える上で、極めて重要な課題であるが、これまで困難とされてきた。悪性黒色腫（メラノーマ）は、色素細胞系譜のがんで、いったん浸潤性となると極めて予後の悪いがんの代表として知られる。非白人においては、メラノーマの約半数が掌蹠などの四肢末端に生じ、掌蹠以外の皮膚の約16倍の頻度で発生する。また、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進歩により、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（左下端図）をとる場合に、約99%の特異性でメラノーマと診断できるようになった¹⁾。これによって、掌蹠に見つかるわずか数ミリの小色素斑においても術前診断が可能となっている。しかしながら、メラノーマ前駆細胞のニッチについては明らかにされていない。我々は、がんの初期発生機序を明らかにするために、まず掌蹠の皮膚において色素細胞系譜が幹細胞システムを形成しているのかどうかについて検討し、色素幹細胞とそのニッチを同定し、同じ部位が、早期メラノーマ細胞のニッチとして機能している可能性、色素幹細胞がメラノーマの起源となる可能性について検討を行なった。

方法および結果

1. マウスの掌蹠皮膚の汗腺における色素幹細胞の同定

ヒトやマウスの皮膚は、色素細胞が産生するメラニン色素によって固有の色を呈し、個体の識別のみならず、皮膚の紫外線防御などにも役立っている。我々は、色素細胞の供給源として、マウス、およびヒトの毛包内のバルジ-サブバルジ領域に色素幹細胞が存在し、毛、および表皮の色素細胞の供給源として機能していること^{2,4)}、さらに毛包内のバルジ-サブバルジ領域の毛包幹細胞がニッチ細胞として機能することを明らかにした^{5,6)}。一方、掌蹠を含む無毛部においては、毛包そのものが存在しておらず、汗腺が豊富に存在するが（図1A-C）、色素幹細胞とそのニッチは未だ同定されていない。ヒト掌蹠皮膚の表皮に色素細胞が存在するが、その供給源となる細胞は明らかではなく、掌蹠メラノーマにおいて汗腺が分布する皮丘に沿った異常色素沈着パターンを示すことから¹⁾、毛と同じ皮膚付属器である汗腺にニッチが存在する可能性を考えた。

毛のバルジ領域に存在する色素幹細胞は、Dct-LacZ トランスジェニック (Tg) マウス⁷⁾を用いて LacZ 陽性細胞として検出できる未分化で slow-cycling な細胞である¹⁾。加齢によって、あるいは非致死量のゲノムストレスを受けると自己複製せずにニッチ内で分化して枯渇できなくなるため、あらたに生えてくる毛に色素が沈着しなくなる⁸⁾。一方、同じく皮膚付属器である汗腺内に色素細胞系譜の細胞が存在するかどうかすら明らかではない。そこで、Dct-LacZ Tg マウス（図1F）を用いてマウスの掌蹠の footpad に分布する汗腺内における LacZ 陽性細胞の分布を解析した。その結果、若齢、および、老齢のマウス、あるいは放射線照射でゲノムストレスを受けた成体マウスにおいて LacZ 陽性細胞を検出することができた（図1G, I, K）。しかし、成体マウスにおいては陽性細胞がごく稀に検出されるのみであり（図1H, J）、Dct-LacZ 陽性のメラノプラストの大部分が、長期間に渡って静止期 (Go) で非活性化状態において維持され、いわば“休眠状態”にあることを想定した。そこで、そのような状態においても安定的に細胞を検出できる系として、GFP 遺伝子の変わりのヒストン GFP 融合タンパクを Dct-プロモーター下において発現する Tg マウスをあらたに作製し解析した（図1N-S）。

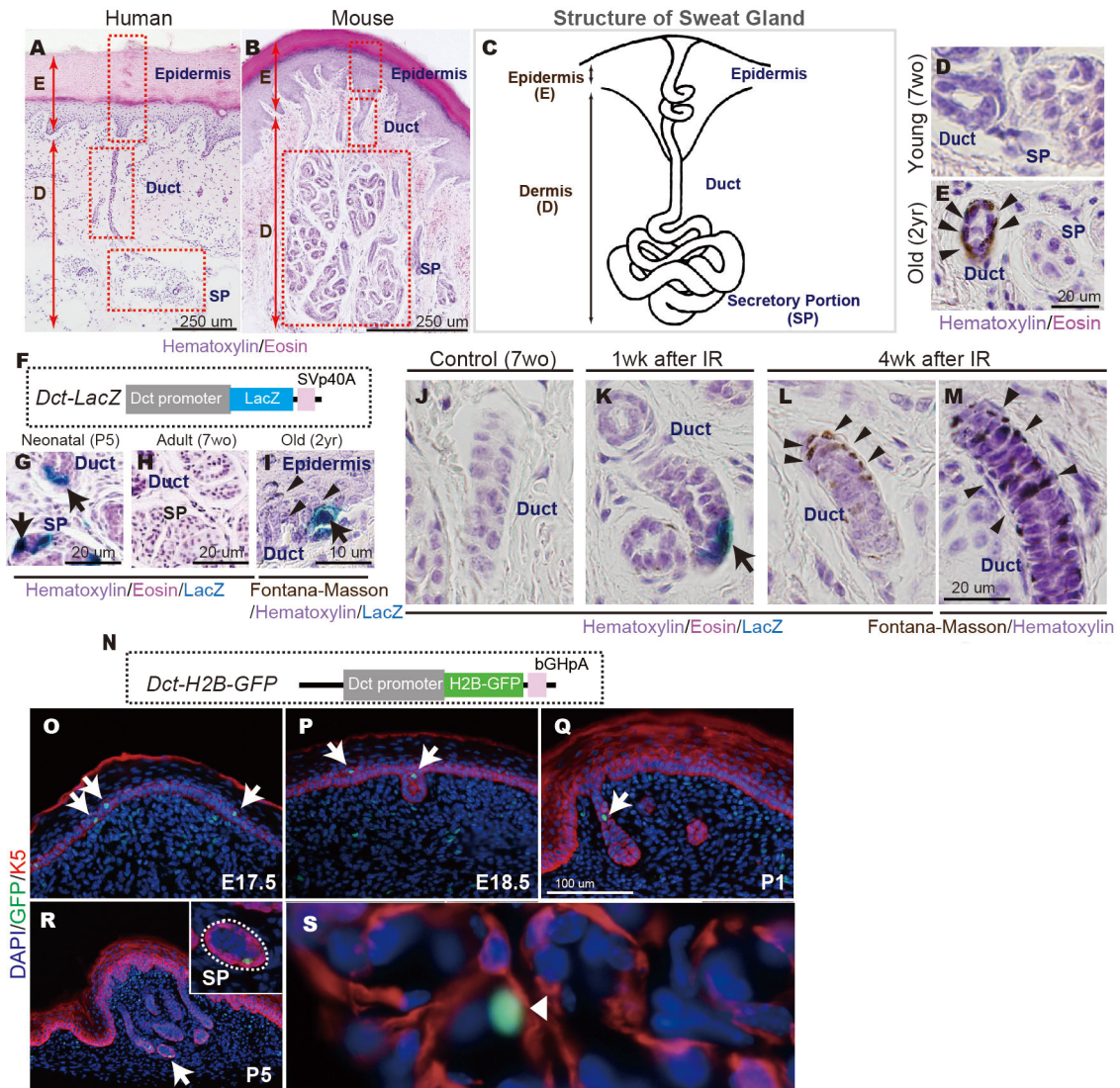


図1. ヒト及びマウスの掌蹠皮膚の汗腺内に色素細胞が存在する。

A, B, C) マウスおよびヒトの掌蹠皮膚の HE 染色像 (A, B) とその組織構築 (C). D, E) 7 週齢 (D) および 2 年 齢 (E) のマウスの汗腺分泌部の HE 染色像. 加齢マウス (2 年 齢) では汗管内にメラニン色素を持つ細胞が分布する. F) *Dct-LacZ* トランスジェニック (Tg) マウスのコンストラクト図. G, H, I) Tg マウスの肉球 (footpad) 内の *LacZ* 陽性細胞は, 5 日 齢 (G) では *LacZ* の陽性細胞が分泌部 (SP) に局在するのが検出できるのに対して, 7 週 齢 (H) では検出できない. 一方, 2 年 齢 (I) では表皮内汗管辺りに検出される. J-M) 5 Gy の X 線照射を行ったマウスでは, *Dct-LacZ* 陽性細胞 (矢印) が照射後 1 週間内に汗管 (Duct) に出現し (K), 4 週間内に明視野で色素を持つようになった (L, 矢頭). フォンタナマッソン染色によってこれらの色素がメラニン色素であることを確認した (M). N) *Dct-H2B-GFP* Tg マウスのコンストラクト図. O-S) *Dct-H2B-GFP* Tg マウスの肉球皮膚切片のケラチン 5 (K5) 免疫染色像. 発生中の H2B-GFP 陽性細胞 (緑蛍光) の分布と発生後の局在. GFP 陽性細胞 (緑) は, K5 陽性の表皮基底細胞や汗腺の筋上皮細胞 (赤蛍光) の内側の汗腺内に分布している. 発生中 (O: 胎 生 17.5, P: 胎 生 18.5) の表皮内から発生中の汗管を経て (Q: 1 日 齢), 分泌部 (R: 5 日 齢) へと分布するようになる (矢印). 成体においては, 分泌部 (SP) (破線にて囲む) に分布する (S).

マウス掌蹠 footpad の発生過程における *Dct-H2B-GFP* 陽性細胞の分布を調べたところ, 胎生期に汗腺の成長に伴い GFP 陽性色素芽細胞が表皮から後に分泌部となる汗腺先端まで下行し (図 1 O, P, Q), 最終的に分泌部となる部位にとどまった (図 1 R, S). この細胞は新生児期には *Pax3*, *Mitf*, *Dct* といった色素合成へと繋がる色素細胞系譜におい

て重要な分子やマーカーを発現したが成体マウスでは発現がほぼ消失しており、未熟な色素芽細胞であることが判明した⁹⁾。次に、BrdU のパルスチェイスの実験によって、汗腺分泌部の GFP 陽性細胞は周囲の細胞に比して BrdU 標識が長期間に渡って維持されること、さらに数ヶ月間の間に徐々に薄まることから slow-cycling な細胞であることが判明した⁹⁾。

2. 汗腺内の色素幹細胞の自己複製と発癌ストレス下における分化細胞の表皮へ供給

マウスの footpad において、時折、分化した色素細胞が汗管や表皮に認め、加齢に伴ってより高頻度にそのような現象を認めたため、加齢の過程で生理的に行っている DNA 損傷応答が色素幹細胞の活性化や自己複製に関わる可能性を考え、これを検証するために、マウスに放射線照射を行った。その結果、5 Gy 程度の X 線照射によって、上述の Dct-H2BGFP 陽性のメラノブラストは、non-G0 期マーカーである Mcm2 やメラニン産生遺伝子である Trp1 を発現するようになり、同部に留まると同時に、同様の細胞が汗腺の分泌部より上方の汗管や周囲表皮にも分布するようになることが判明した (図 2 A-J)。汗腺分泌部では、再び Mcm2 や Tyr 陰性へと戻るのに対して、汗腺分泌部の外では次第にメラニン色素を持ち樹状の形態を持つ細胞へと分化成熟するのが観察された (図 2 H-J, N-P, T-V)。DMBA などの発癌ストレスによっても同様の現象が誘導されたことから、汗腺分泌部の Dct-H2BGFP 陽性のメラノブラストは、ゲノムストレス/発癌ストレスにตอบสนองして自己複製すると同時に子孫細胞を分化させる能力を持つことが判明した。以上より、汗腺分泌部のメラノブラストは幹細胞の性質を持つことを証明した⁹⁾。

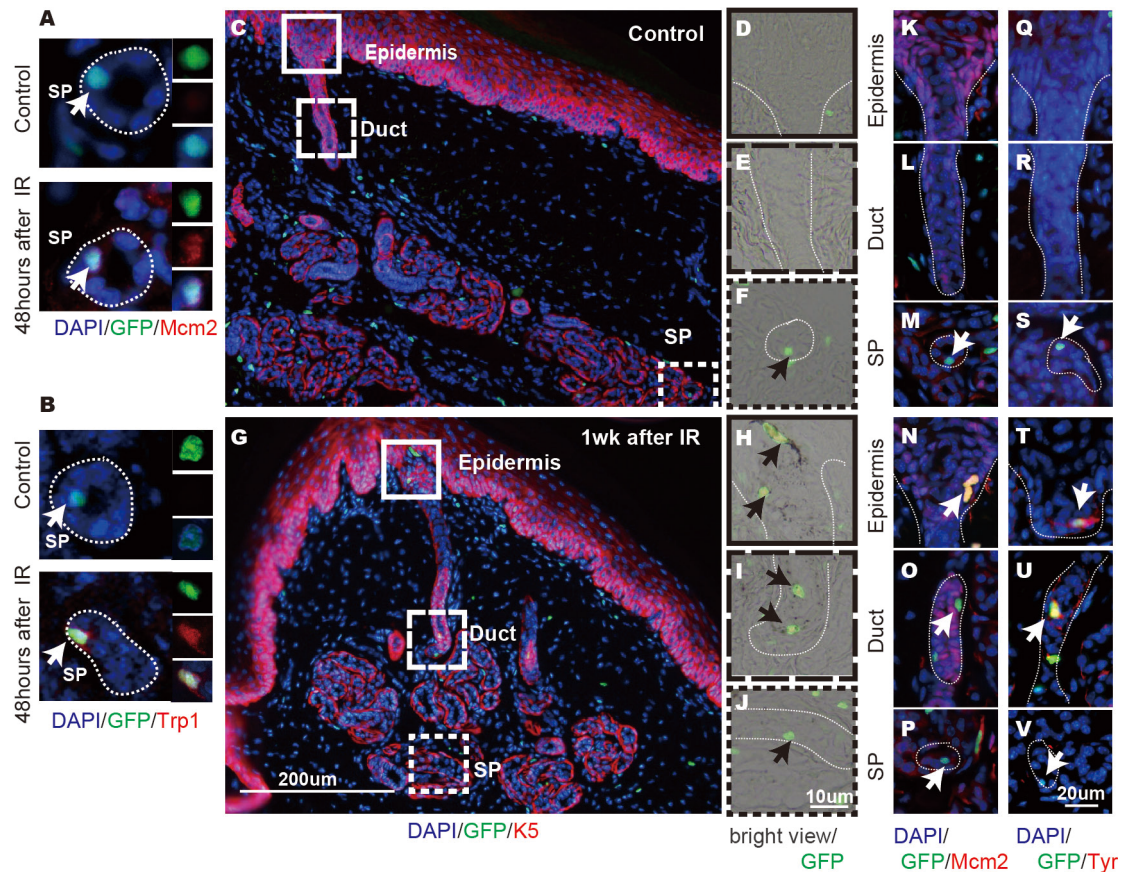


図2. 汗腺分泌部のメラノプラストは、放射線や癌化ストレスに反応して自己複製すると同時に増殖分化細胞を表皮へと供給する。

A-T) Dct-H2B-GFP Tg マウスの 5 Gy の放射線照射 (IR) 後の汗腺内の GFP 陽性細胞の細胞周期マーカー (Mcm2: Non-Go 期にある細胞のマーカー), および分化マーカー (Trp1) の発現と細胞の分布. 汗腺内の GFP 陽性細胞 (緑蛍光, 矢印) は, 分泌部 (SP) において Mcm2 陰性 TRP1 陰性にて維持されているが (C-F), 放射線照射後 48 時間内に一過性に Mcm2 陽性 TRP1 陽性となり, 1 週間内に, 汗腺内の上方に相当する汗管や表皮内汗管, さらに表皮内にも分布するようになる (G-J). K5 免疫染色 (C, G), DIC view (D-F, H-J). Mcm2 免疫染色 (K-P), チロシナーゼ (Tyr) 免疫染色 (Q-V). 汗管内および表皮内においてはメラニン色素を持ち樹状の形態を示し, メラニン合成を担う酵素であるチロシナーゼを発現するが (U, T), 分泌部においては発現せず色素も持たず, 胞体は小さいままである. 分泌部においては, 通常はメラノプラストが未分化状態, 休眠状態にて維持される環境にあると考えられた.

3. ヒトの掌蹠皮膚の汗腺分泌部に分布する色素幹細胞様のメラノプラストの同定とメラノーマ初期におけるその増殖
 マウスの汗腺と同様の構築を持つヒトの汗腺において, 色素幹細胞に相当する細胞が存在する可能性について検証するため, ヒトの掌蹠皮膚を解析したところ, 正常掌蹠皮膚の汗腺分泌部に色素細胞マーカーとして最も頻用されている MART1 免疫染色では陽性細胞を認めなかったが, チラミドによるシグナル増幅を試みたところ, 正常皮膚の汗腺分泌部に MART1 陽性細胞が検出され, メラノーマ病変部においても色素細胞系譜特異性を示した (図 3 C-F). さらに正常皮膚の汗腺分泌部の MART1 陽性細胞は, メラニン色素を持たず, 小型の胞体を持つ MCM2 陰性の静止期の細胞であり (図 3C), マウスの色素幹細胞に類似する細胞であると考えられた. 初期メラノーマにおいては, 病変部の中心付近の特定の汗腺分泌部にメラニン色素を持たない未熟な MART1 陽性細胞を複数認め, これらは MCM2 陽性であった (図 3F). さらにこれらの細胞は, その直上の汗管と周辺の表皮までほぼ連続する形で分布しており, これら分泌部の

外に存在する細胞のなかには MCM2 陽性と陰性が混在し、陰性細胞の多くはメラニン色素を持つ分化したメラノーマ細胞とであった⁹⁾ (図 3 E, D).

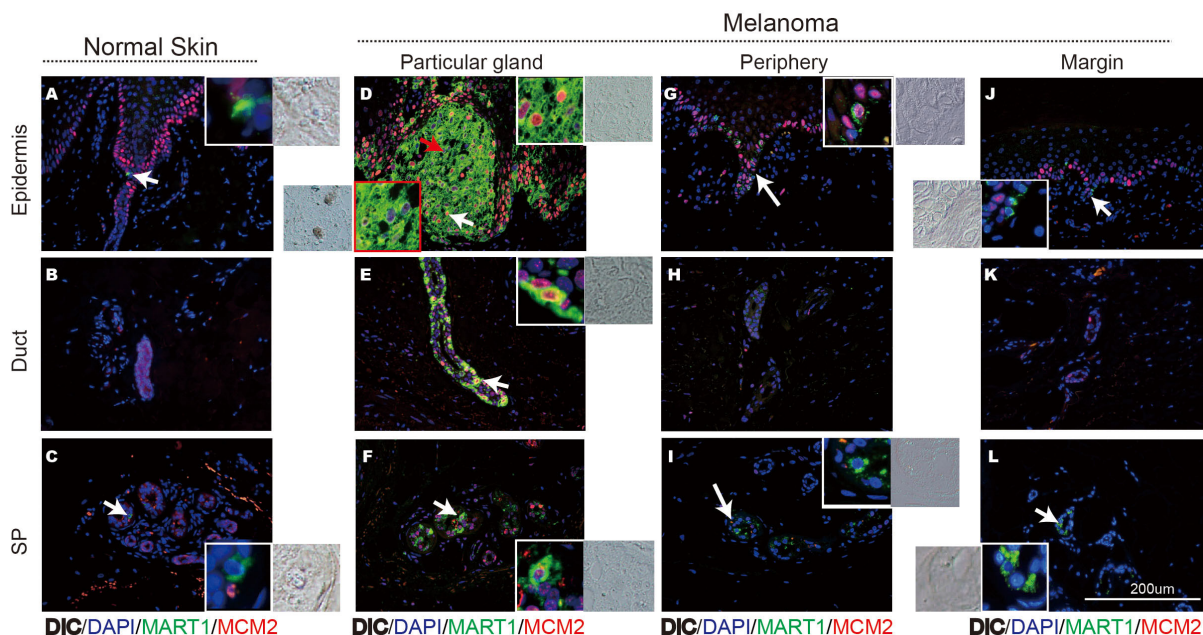


図 3. ヒト掌蹠皮膚の汗腺分泌部のメラノブラストは、四肢末端メラノーマ細胞の供給源となりうる。

ヒト掌蹠の正常皮膚 (A-C) と早期メラノーマ (D-L) の MCM 2 および色素細胞系譜マーカー MART1 のチラミド増幅による免疫染色. 汗腺内におけるメラノブラスト/メラノーマ細胞の分布と細胞周期を示す. A-C) 正常の掌蹠皮膚では, MART1⁺メラノブラストが皮丘の表皮内に分布するほか (A), 汗腺分泌部にも分布するが, 汗管には分布していない. またこれらの MART1⁺メラノブラストは, MCM2⁻であった. D-L) 一方, メラノーマ病変の中心部付近の汗腺のなかに, 特定の皮丘とその中を貫通する汗管および分泌部に MART1⁺陽性のメラノーマ細胞が連続的に存在する部位を認める (D-F). MART1⁺MCM2⁺を示し, かつメラニンを持たないで増殖している未分化なメラノーマ細胞が汗腺分泌部内に認める (F) のに対して, その直上に位置する表皮内汗管周辺の表皮内の MART1⁺細胞の多くは, MCM2^{low/-}でメラニンを含有しながらも増殖していない分化したメラノーマ細胞が多く分布する (D). メラノーマの辺縁付近では分泌部に正常皮膚と同様の MART1⁺メラノブラストが分布するものの (I, L), 汗管内には細胞は分布せず, 病変部の辺縁に MART1⁺MCM2⁺MCM2⁻メラノーマ細胞を認めるが, 切除標本の断端付近にはそのような細胞の分布を認めず, 正常皮膚のパターンを示す. 矢印の細胞の拡大 DIC view を各写真の右または左端に示す.

4. 四肢末端黒子型メラノーマにおける CyclinD1 遺伝子の汗腺分泌部内での増幅

初期メラノーマの組織における MART1 陽性細胞の分布と, 増殖状態, および分化状態を考えあわせると, ヒトの掌蹠皮膚の汗腺分泌部に見つかった正常メラノブラストが, 早期メラノーマ病変部中心部の汗腺分泌部において増殖している細胞の直接のオリジンとなる可能性が考えられる. そこで, 掌蹠メラノーマ細胞の 23.8-44.4%にみられると報告されている CyclinD1 遺伝子の増幅を認めるかどうかについて検証するため, CCND1 ゲノム領域と Cep11 セントロメア領域 (コントロール) の遺伝子多型について, 正常皮膚またはメラノーマ *in situ* を含む初期の掌蹠メラノーマ症例の組織切片を用いて FISH 解析を行った. 正常皮膚では, CyclinD1 遺伝子の掌蹠メラノーマ病変部の特定の汗腺において, 分泌部と表皮に cyclinD1 遺伝子の増幅がみられ, かつ, 分泌部よりも表皮に分布する細胞のほうが高度に増幅されていた⁹⁾ (図 4).

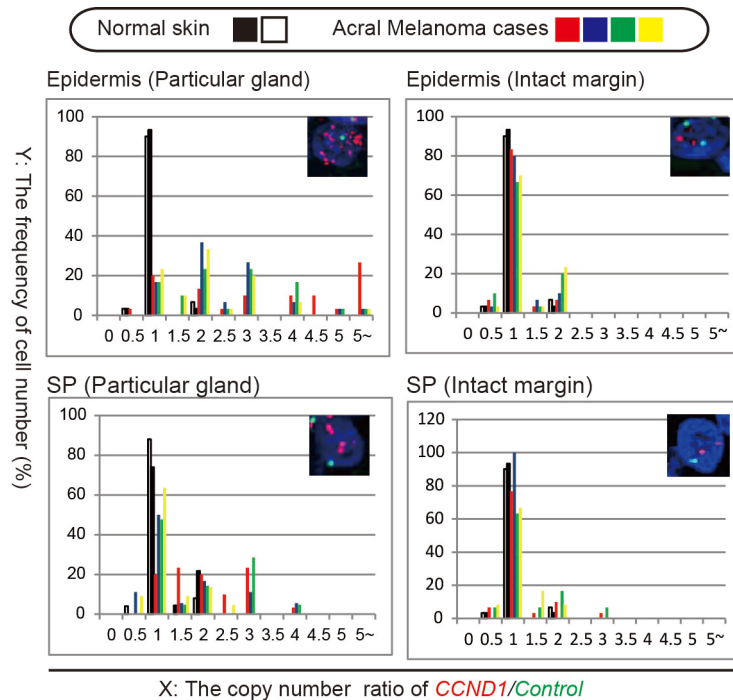


図4. 初期メラノーマの汗腺分泌部と表皮における11q13 CCND1 ゲノム領域のコピー数多型解析.

CCND1 ゲノム領域と Cep11 セントロメア領域 (コントロール) の FISH 解析から得られるコピー数多型の比を示す. 赤, 青, 黄, 緑色は初期掌蹠メラノーマの各症例. 白と黒は健全皮膚. 正常皮膚またはメラノーマ *in situ* を含む初期の掌蹠メラノーマ症例において表皮および汗腺分泌部のそれぞれについてコピー数多型を調べたところ, メラノーマ病変部の表皮のみではなく, その直下の汗腺分泌部においても CCND1 ゲノム領域の増幅を認めた.

考 察

本研究では, マウス汗腺内に自己複製可能な色素幹細胞をはじめて発見し, 同様の細胞集団をヒトの掌蹠皮膚においても見出した. いずれも汗腺分泌部に位置しており, 同様に通常は静止期で未分化な状態で維持されていたことから, 汗腺分泌部が幹細胞ニッチであると考えられた. さらに, ヒトの掌蹠の早期メラノーマの解析から, ニッチに相当する汗腺分泌部に未分化な状態で増殖するメラノーマ前駆細胞が分布し, 汗管を通じてメラニン顆粒を持った成熟したメラノーマ細胞を汗管周辺の表皮へ供給していた. さらに FISH 解析から, 初期メラノーマで高頻度で見られる CyclinD1 遺伝子の増幅を示すことが明らかになった (図5). 以上のことから, ヒト掌蹠の汗腺分泌部に分布している色素幹細胞様のメラノブラストは, メラノーマ 初期病変の発生源となりうる可能性が示唆された⁸⁾. さらに, これらの細胞がメラノーマに特徴的なメラニン分布パターンとしてダーモスコピーにて検出されるパターンを形成していると推察された. 以上の一連の研究から, 初期の掌蹠メラノーマの診断と治療において, 汗腺分泌部の評価が重要であると考えられる. 今後の更なる解析によってより正確な早期がんの病理診断, さらにより適切な治療法の選定へと繋がることが期待される (図5).

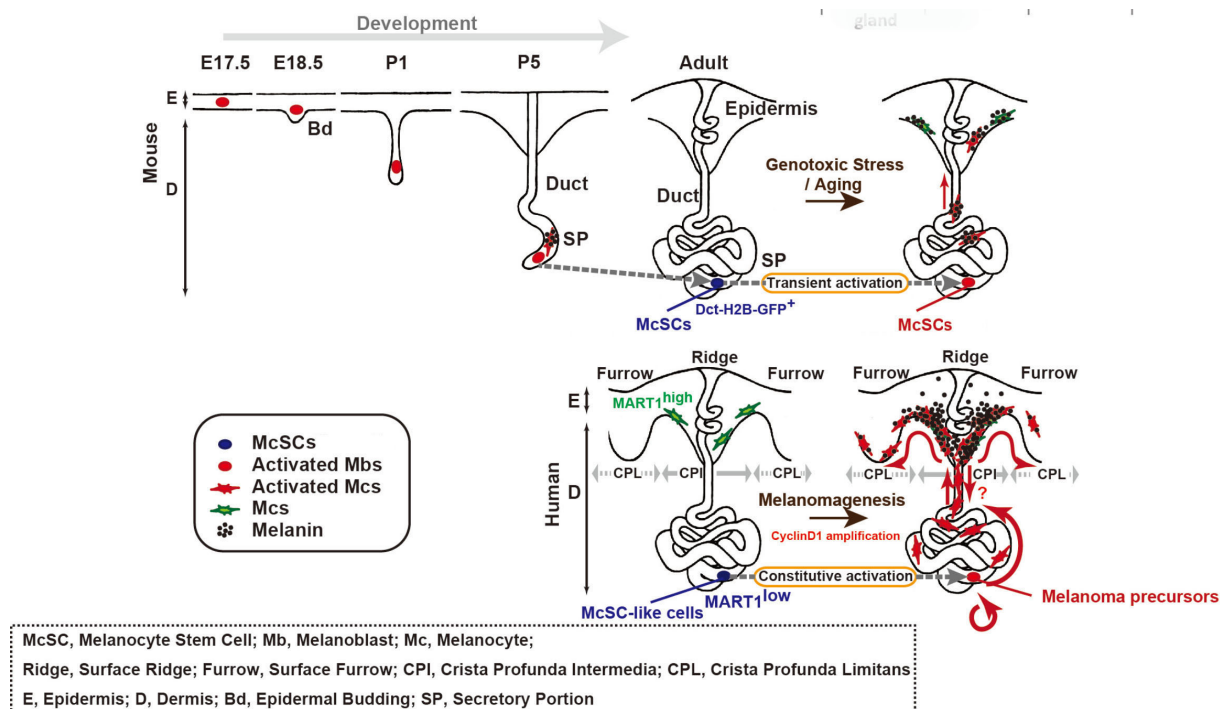


図5. 汗腺内の色素幹細胞の発生・再生・癌化.

発生中及び発生後の汗腺と色素幹細胞および子孫細胞の分布，およびメラノーマ発生への関与（仮説）. 増殖中のメラノblast（赤）は，発生中に表皮から汗腺の分泌部予定領域へと移動し，静止期 (Go) にて未分化な状態で休眠するようになり，色素幹細胞として維持される（青）. これらの色素幹細胞は，加齢やゲノムストレス，癌化ストレスなどによって一過性に活性化され，自己複製すると同時に分泌部から汗管内を経て表皮へと色素細胞を供給する. ヒトの初期の掌蹠メラノーマにおいて，一見正常の組織像を示す汗腺分泌部に CyclinD1 遺伝子の増幅や増殖マーカーの発現を認めることから，初期メラノーマで認める表皮内の分化したメラノーマ細胞の起始細胞となっていることが考えられる.

共同研究者

本研究は，東京医科歯科大学難治疾患研究所幹細胞医学分野と前任地の金沢大学がん研究所幹細胞医学研究分野にて研究を行った岡本奈都子先生および青戸隆博先生，そして共同研究者の信州大学皮膚科の斎田俊明先生および宇原久先生のほか，国立生育医療研究センター研究所の阿久津英憲先生，梅澤明弘先生，東京大学医科学研究所の中内啓光先生，山崎 聡先生，および京都大学皮膚科の宮地良樹先生との共同研究である. 最後に，本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く深謝致します.

文献

- 1) Saida, T., Koga, H. & Uhara, H. : Key points in dermoscopic differentiation between early acral melanoma and acral nevus. *J. Dermatol.*, **38** : 25-34, 2011.
- 2) Nishimura, E. K., Jordan, S. A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I. J., Barrandon, Y., Miyachi, Y. & Nishikawa, S.-I. : Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature*, **416** : 854-860, 2002.
- 3) Nishimura, E. K., Granter, S. R. & Fisher, D. E. : Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science*, **307** : 720-724, 2005.
- 4) Nishimura, E. K. : Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigm. Cell Melanoma Res.*, **24** : 401-410, 2011.
- 5) Tanimura, S., Tadokoro, Y., Inomata, K., Binh, N. T., Nishie, W., Yamazaki, S., Nakauchi, H., Tanaka, Y., McMillan, J. R., Sawamura, D., Yancey, K., Shimizu, H. & Nishimura, E. K. : Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell*, **8** : 177-187, 2011.

- 6) Nishimura, E. K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F. & Fisher, D. E. : Key roles for transforming growth factor-beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell*, **6** : 130-140, 2010.
- 7) Mackenzie, M. a. F., Jordan, S. A., Budd, P. S. & Jackson, I. J. : Activation of the receptor tyrosine kinase kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Devel. Biol.*, **192** : 99-107, 1997.
- 8) Inomata, K., Aoto, T., Binh, N. T., Okamoto, N., Tanimura, S., Wakayama, T., Iseki, S., Hara, E., Masunaga, T., Shimizu, H. & Nishimura, E. K. : Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell*, **137** : 1088-1099, 2009.
- 9) Okamoto, N., Aoto, T., Mohri, Y., Yokozeki, H. & Nishimura, E. K. : A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigm. Cell Melanoma Res.*, **27** : 1039-1050, 2014.