

細胞内シグナル PTEN/PI3 キナーゼ経路による 白髪化やメラノーマの制御

九州大学生体防御医学研究所 / 秋田大学医学部

鈴木 聡

PTEN is a tumor suppressor gene inactivated in numerous sporadic cancers, including melanomas. To analyze *Pten* functions in melanocytes, we used the *Cre-loxP* system to delete *Pten* specifically in murine pigment-producing cells and generated *DctCrePten^{fllox/fllox}* mice. Half of *DctCrePten^{fllox/fllox}* mice died shortly after birth with enlargements of the cerebral cortex and hippocampus. Melanocytes were increased in the dermis of perinatal *DctCrePten^{fllox/fllox}* mice. When the mutants were subjected to repeated depilations, melanocyte stem cells in the bulge of the hair follicle resisted exhaustion and the mice were protected against hair graying. Although spontaneous melanomas did not form in *DctCrePten^{fllox/fllox}* mice, melanomas developed after carcinogen exposure. *DctCrePten^{fllox/fllox}* melanocytes were increased in size and exhibited heightened activation of Akt and Erks, increased expression of Bcl-2, and decreased expression of p27^{Kip1}. Our results show that *Pten* is important for the maintenance of melanocyte stem cells and the suppression of melanomagenesis.

1. 緒言

白髪化は老化現象の1つであり、コスメトロジーの分野においては、大きな関心事の1つであることは疑いない。白髪形成は遺伝的要素が強いとされるものの、その分子機序の多くはいまだ不明で、Bcl-2、Mitf、Pax3、Notch、c-Kit、Rab27A が欠損したマウスが白髪になることから、メラノサイト幹細胞の細胞死やメラノサイト分化、メラニン色素の産生・輸送機構が白髪形成に関与する可能性があると考えられている。

PI3 キナーゼ (PI3K) は、EGF、FGF、SCF をはじめとする種々の成長因子やサイトカインによって活性化される。活性化された PI3K は、ホスホイノシチド-4,5-二リン酸 (PIP2) をホスホイノシチド-3,4,5-三リン酸 (PIP3) に変換し、さらに PIP3 は主に下流の PKB/Akt を活性化することによって、アポトーシス抵抗性・細胞増殖亢進・細胞遊走亢進に働く。PTEN は、PIP3 を主な基質とするホスファターゼで、PI3K 経路を負に制御する。

我々は、PTEN 欠損マウスが胎生早期に致死であることを示し、次に PTEN の組織特異的な欠損マウス (PTEN^{fllox} マウス) を作成することによって、種々の臓器における PTEN/PI3K 経路の機能を解析してきた^{1), 2)}。

本研究で我々は PTEN^{fllox} マウス³⁾ と DCT-Cre トランスジェニックマウス⁴⁾ とを交配することにより、メラノサイト特異的 PTEN 欠損マウスを作成し、このマウスがメラノサイト幹細胞の枯渇抵抗性から白髪抵抗性に働くこ

と、また化学発がんによるメラノーマ形成を加速することを見出した⁵⁾。

2. 実験

2-1 メラノサイト特異的 PTEN 欠損マウスの作製とメラノサイトの培養:

我々の作製した PTEN^{fllox} マウスと DCT-Cre Tg マウスとを交配し、メラノサイト特異的 PTEN 欠損マウスを作製した。メラノサイト培養細胞はデイスパーゼによって採取した皮膚上皮細胞をタイプ I コラーゲン上で、0.5mM DB-cAMP や 10nM endothelin-1 を含有する melanocyte-defined medium (MDM) を用いて 14 日間培養した。

2-2 マウスの頻回脱毛とメラノサイト幹細胞の可視化:

毛髪周期が第二休止期にあるマウスを麻酔して背中中の毛を刈り、さらにその後テープを用いて脱毛した。その後約 4 週後に背中中の毛が休止期に入っていることを確かめ、さらに脱毛を 5 回繰り返した。マウスの皮膚は最後の脱毛後 8 日目で観察した。

メラノサイト幹細胞の可視化には、c-kit 抗体をマウスの腹腔に投与後⁶⁾、Dct 抗体で染色する方法を用いた。

2-3 発がん剤投与によるメラノーマの発症:

3 週齢のマウスの背中中の毛を剃り、0.5 mg の 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 塗布 2 週後、5 μg phorbol-12-myristate 13-acetate (TPA) を週 2 回、合計 24 週間塗布した。

3. 結果

3-1 メラノサイト特異的 PTEN 欠損マウスの作製:

我々は PTEN^{fllox/+} マウスと Dct-Cre Tg マウスを用いてメラノサイト特異的 PTEN 欠損マウスを作製した。この



Pten/PI3-kinase pathway in melanocytes governs hair graying and melanomagenesis

Akira Suzuki

Medical Institute of Bioregulation,
Kyushu University / Akita University
School of Medicine

マウスでは約70%のメラノサイトでPTENが欠損していた。しかしながら、Dctは胎生期においてメラノサイトのみならず終脳などの神経組織にも発現するために、50%のマウスは脳細胞の膨化による巨脳を呈し、生後2か月以内に死亡した。また生後2か月を超えた残りのマウスも種々の神経症状を呈し、短命であった。

3-2 PTEN 欠損による周産期皮膚真皮メラノサイト数の増加と白髪抵抗性：

メラノサイト特異的PTEN欠損マウスでは、周産期における真皮メラノサイトの数が野生型マウスに比し約2倍増えていたが、毛髪色・皮膚色素量・網膜上皮や虹彩の色素量には変化がなく、成体における真皮メラノサイト数にも変化がみられなかった。

ヒトにおいては約10回の毛髪周期のあと(約40歳相当)、白髪が生じることが知られている。しかしながら一般にマウスはヒトと異なり毛髪周期が終了後も毛髪が毛嚢に残り続けることから、マウスの毛嚢には常時複数の毛髪が存在して白髪が明瞭とはならず、これがマウスを用いた白髪研究を困難にしてきた。

我々はメラノサイト特異的PTEN欠損マウスを用いて、頻回脱毛による毛髪色変化を検討したところ、野生型マ

ウスでは頻回脱毛とともに、白髪になるのに対し、PTEN欠損マウスでは頻回脱毛後の白髪形成に抵抗性であった(図1)。

3-3 PTEN 欠損による頻回脱毛による皮膚メラノサイト幹細胞の枯渇抵抗性：

メラノサイト幹細胞が維持されないと白髪となることが知られている⁷⁾。またc-kit抗体(ACK2)を投与すると分化したメラノサイトやメラノプラストは個体から消失し、メラノサイト幹細胞だけとなってDCT抗体で可視化できる⁶⁾。またPTENはこれまでに前立腺細胞、神経細胞、肺胞細気管支細胞、始原生殖細胞などにおいて幹細胞数を制御することが報告されている⁸⁾。そこで我々はc-kit抗体を投与して可視化したメラノサイト幹細胞が、頻回脱毛によってどのように変化するかを、野生型マウスとPTEN欠損マウスで検討した。

まずメラノサイト幹細胞数は野生型マウスとPTEN欠損マウスで有意な差は認めない。しかしながら野生型マウスでは頻回脱毛によって皮膚メラノサイト幹細胞数が枯渇してくるのに対して、PTEN欠損マウスでは頻回に脱毛しても、いつまでもメラノサイト幹細胞数が保たれることを見出した(図2)。

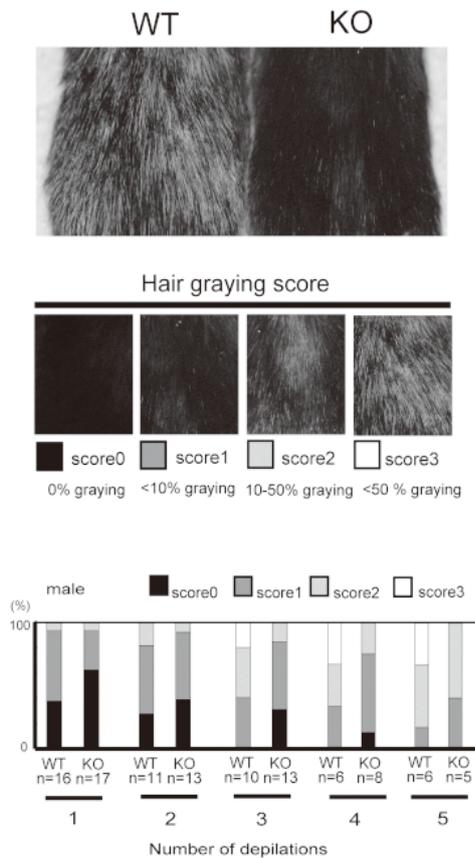


図1 メラノサイト特異的PTEN欠損マウスにみられた白髪抵抗性

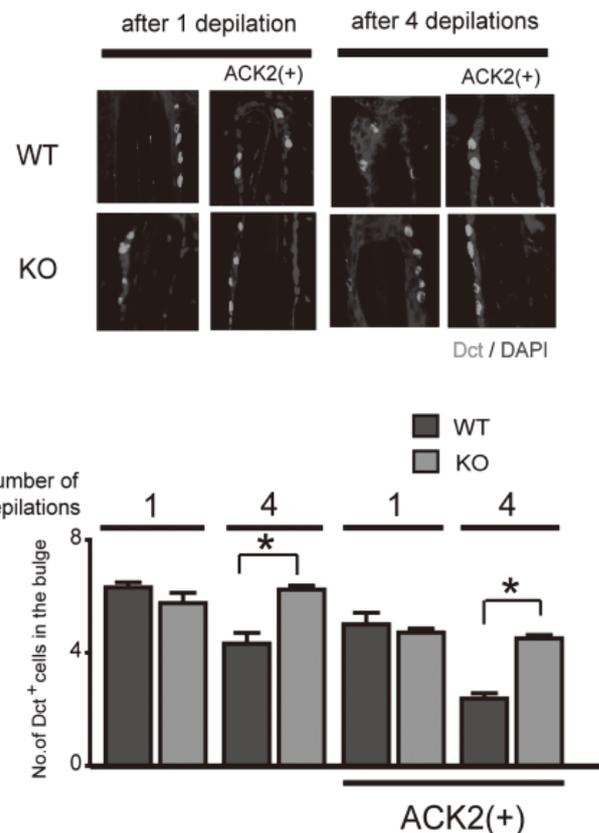


図2 PTEN欠損マウスにみられる、頻回脱毛によるメラノサイト幹細胞の枯渇抵抗性

3-4 PTEN 欠損による発がん剤感受性の亢進：

多くの組織において、PTEN 欠損によってがんが自然発症することから、このマウスを経過観察して自然発症メラノーマがみられるかどうかを検討したが、発症は認められなかった。そこで DMBA+TPA による化学発がんを検討することにした。メラノサイト特異的 PTEN 欠損マウスでは発がん剤投与後、野生型マウスと同様の頻度でケラチノサイト由来の乳頭腫が認められ、その頻度に差はなかった。しかしながら PTEN 欠損マウスでは発がん剤投与後 15 週間の観察期間中約 26% に Spindle cell melanoma が認められたのに対し、野生型では 2% にメラノーマを認めるのみであった (図 3)。

3-5 PTEN 欠損による細胞学的・生化学的変化：

我々は次にこれらマウスの皮膚から作製した培養メラノサイトを用いて PTEN 欠損によっておこる細胞学的・生化学的変化を検討した。PTEN 欠損培養メラノサイトは細胞の個々のサイズが、野生型に比し、有意に増加していた。

また、これまでメラノサイトの分化やメラニン合成に重要であることが報告されている 9 分子の発現を比較検討したところ、PTEN 欠損メラノサイトでは Bcl-2 の発現が著しく高値であった。

さらにこの他にも PTEN 欠損メラノサイトでは Akt や ERK の活性亢進、p27 の発現低下が認められた。さらに PTEN 欠損マウスに DMBA+TPA を投与して引き起こされたメラノーマにおいては、ERK の活性化がさらに増加していたが、Akt の活性化は癌化していない PTEN 欠損メラノサイトと同様であった。

4. 考 察

PTEN 欠損マウスでは、PTEN の下流の Akt や Erk の活性化、またその下流の p27 の発現低下、Bcl-2 の発現亢進をひきおこすことによってメラノサイト幹細胞は枯渇抵抗性となり、白髪抵抗性になったものと考えられる。実際これらの分子の内 Bcl-2 の欠損マウスはメラノサイト幹細胞が維持されず、マウスは第二毛髪周期から白髪を呈し、PTEN 欠損マウスとちょうど反対の発現形を示している⁷⁾。

PTEN 欠損マウスでは自然発症メラノーマは認められなかったが、発がん物質に対して感受性が亢進していた。これまでにメラノーマ形成に関わるシグナル経路としては Ras-ERK 経路、p16-Rb 経路、p19-p53 経路、PI3K-Akt 経路などがある。しかしながらこれらのどの経路も 1 つのシグナル経路ではメラノーマ形成はおきず、2 つあるいは 3 つの経路の変異によってはじめてメラノーマ形成がおきると考えられている。PTEN 欠損マウスでは Akt と ERK の活性化が認められ、これら 2 つの経路は皮膚発がんにおいて相乗的に働くことが示されている。しかしなが

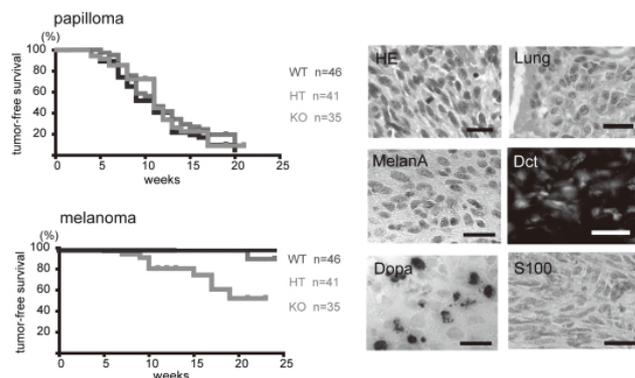


図 3 PTEN 欠損マウスにみられる、発がん剤投与によるメラノーマ発症の加速

ら PTEN 欠損マウスにメラノーマが発症するには DMBA による Ras 変異によってさらに ERK を活性化する必要があるのであろう。実際 PTEN 欠損マウスにおこった化学発がんメラノーマではさらなる ERK の活性化を認めるが、Akt の活性化は化学発がんが見られない PTEN 欠損マウスと同様であった。

我々の研究はメラノサイトにおける PTEN の機能をはじめに解析したものである。また、これまで白髪になる遺伝子改変動物は数多く存在するが、メラノサイト特異的 PTEN 欠損マウスは、はじめての白髪抵抗性モデルマウスであると思われる。

ヒトにおいて白髪は最も容易にわかる加齢現象であり、メラノーマもまた加齢に伴う紫外線や化学物質への暴露によっておこる腫瘍である。本研究は、PTEN やその下流分子は白髪や腫瘍を研究するコスメトロジーやオンコロジー研究者にとって魅力的な分子標的であることを示した。またメラノサイト特異的 PTEN 欠損マウスはヒトの白髪やメラノーマへの新規治療を考えるにあたって優れた動物モデルとなろう。

(引用文献)

- 1) Suzuki A, Nakano T, Mak TW ほか: Portrait of PTEN :Messages from Mutant Mice. *Cancer Science*, 9, 209-213, 2008
- 2) Knobbe CB, Lapin V, Suzuki A ほか: The role of PTEN in development, physiology and tumorigenesis in mouse models: a tissue-by-tissue survey. *Oncogene*, 27, 5398-5415, 2008
- 3) Suzuki A, Yamaguchi MT, Ohteki T ほか: T Cell-Specific Loss of Pten Leads to Defects in Central and Peripheral Tolerance. *Immunity*, 14, 523-534, 2001
- 4) Guyonneau L, Rossier A, Richard C ほか: Expression of Cre recombinase in pigment cells. *Pigment Cell Research*, 15, 305-309, 2002

- 5) Inoue-Narita T, Hamada K, Sasaki T ほか : Pten deficiency in melanocytes results in resistance to hair graying and susceptibility to carcinogen-induced melanomagenesis. *Cancer Research* 68, 5760-5768, 2008
- 6) Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ ほか : SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *Faseb Journal*, 15, 645-658, 2001
- 7) Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE ほか : Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307, 720-724, 2005
- 8) Yanagi S, Kishimoto H, Kawahara K ほか : Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 2929, 2007