

メラノサイトの多様性とメラノーマの Cell-of-origin の解析

Dissecting heterogeneity in melanocytes to understand cell-of-origin of melanoma

大阪大学
派遣期間
研究機関

野口 史人
2019年4月15日～2020年4月14日
Cancer Development and Treatment Group, Department of Medicine
Research Laboratories, Alfred Hospital, Monash University
Melbourne, VIC, Australia
Prof. Mark Shackleton

研究指導者

In the skin, melanocytes produce and provide melanin pigment to the skin cells and protect them from UV-induced DNA-damage. The melanocyte lineage is consisted of multiple distinct subpopulations which serve as the progenitors/precursors or functional progenies. The developmental hierarchy of the lineage is also distinct depending to anatomical areas where they reside, e.g. the hairy skin or the glabrous skin. Because dysregulation of the lineage causes melanocytic disorders including melanoma, it is important to understand how its developmental hierarchy is molecularly regulated and how dysregulation of it leads to the diseases, although it is not yet well determined. Our project broadly aims to define developmental lineages in normal and malignant melanocytic cells, by means of our newly developed method for prospective isolation and fractionation of melanocyte subpopulations directly from the skin and high-throughput analysis of them. So far we have succeeded in isolation of melanocytic cells of fresh normal human breast skin or several anatomical regions e.g. dorsal, tail, acral or ear skin of wild-type or melanoma-prone mice. Genetical, phenotypical and functional characterization of them are currently undergoing and a part of achievement in this approach will be shown here.

研究目的

ある一つの組織から phenotype の異なる多様な癌のサブタイプが発生する (Intertumoral heterogeneity)。この多様性の背景として cell-of-origin モデルが提唱されている (1)。細胞は組織内で幹細胞を頂点とする細胞系統のヒエラルキー (細胞系譜) を構成しているが、cell-of-origin モデルによると、正常な細胞系統の中のある特定の細胞集団に、特定の形質転換が起こることで、特定の癌のサブタイプが発生する。この機序により、一つの細胞系統から複数のサブタイプの癌が発生する。従って、形質転換の際の遺伝子変異を解析すると共に、正常組織における細胞系統のヒエラルキーを解析することが、癌の発生を理解する上で重要である。メラノーマは極めて多様性に富む悪性度の高い皮膚癌であり、紫外線 (UV) などによるメラノサイトの形質転換により発

生すると考えられている。皮膚メラノサイトの細胞系統は幹細胞や成熟メラノサイトなどの特定の亜集団から構成されており、各々の存在部位や分子制御機構は有毛部あるいは非有毛部により特異的である (2)。異なるメラノーマのサブタイプ、すなわち表在拡大型、日光黒子型、日本人に多い末端黒子型などの多様性は、このメラノサイトの多様性を基に形成されると考えられる。本研究の目的は、①正常メラノサイトの多様性に基づき細胞系統のヒエラルキーの分子制御機構を解析し、②メラノサイトの悪性形質転換、すなわちメラノーマの発生における cell-of-origin となる特定のメラノサイト亜集団と特定のメラノーマサブタイプおよびこれに関与する特定の遺伝子変異を包括的に同定することで、③得られた結果をメラノーマの予防や早期診断、新規分類、予後の予測、および治療に役立てることである。

研究経過

メラノサイト分離法の確立

ヒトあるいは野生型マウスの皮膚メラノサイトの分離法として従来主として行われてきた手法は、皮膚細胞をメラノサイト特異的培地にて培養し、メラノサイト以外の皮膚細胞の生存を抑制し、かつメラノサイトを増幅させるというものだが、この方法によるとメラノサイトの細胞系統のヒエラルキー、すなわちメラノサイト内の亜集団の比率やその分子制御因子が変化してしまうため、生体内におけるそれを観察することが出来ない。生体におけるメラノサイトの細胞系譜の亜集団や分子制御機構を維持したまま解析するためには、未固定皮膚からメラノサイトを直接分離して High-throughput 解析をする必要がある。これは従来マウスにおいてはメラノサイト特異的な蛍光色素標識を発現する遺伝子改変マウスを用いることで可能だが、ヒトおよび野生型マウスを含むその他のマウス株では難しかった。そこで申請者らは、メラノサイト特異的細胞表面マーカー、表皮細胞マーカーおよび血液細胞マーカー (Lineage marker) を用いた Flow cytometry (FACS) にて、酵素処理したヒトおよびマウスの皮膚より、メラノサイトを高純度で予期的に分離、精製する新規手法を開発した (Figure 1)。

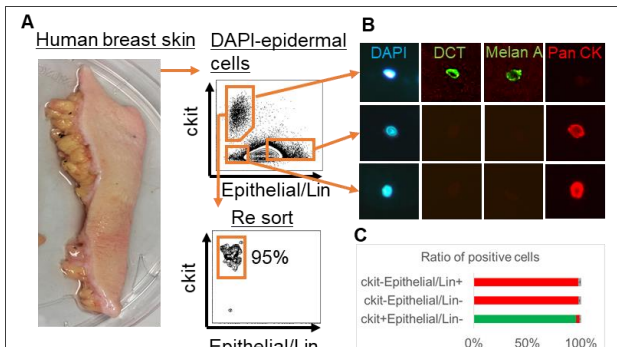


Figure 1. (A) Normal human breast skin was enzymatically processed and the epidermal cells were analyzed by FACS. Melanocytes were identified as ckit+Epithelial/Lin- cells (upper right). Repeatability of ckit+Epithelial/Lin- cells was ~95% in re-sort analysis of the fraction (lower right). Lin, lineage markers.

(B) Confirmation of the phenotypes of the sorted cells by immunocytochemistry. The cells were sorted on slides and stained by DCT (green), Melan A (green) or Pan-cytokeratin (red).

(C) Quantification of the immunocytochemistry in (B) (n=5).

ヒト表皮メラノサイトの多様性解析

上記の手法によりヒト正常胸部皮膚の表皮よりメラノサイトを分離精製し、メラノサイト亜集団とその分子制御機構を解析する目的で Single cell RNA-seq analysis を行った (Figure 2)。サンプル中に混入した表皮細胞を Differentially expressed gene (DEG)

profiling により統計的に除外した後、ヒト表皮メラノサイトはDEGにより4つの特異的な亜集団に分類された。申請者らはPseudotime解析、Cell cycle解析、Protein network解析などの transcriptome 解析の結果、この亜集団の中でALDH1A1など複数の既知のStem cell-makerを有意に高く発現しており、比較的分化度が低く、増殖能が高くかつリボソーム機能が亢進している亜集団を見出した。i) ヒトおよびマウスの毛包間表皮にメラノサイト Precursor cellの存在が報告されており、ii) 複数の組織のStem cell/Precursor cellにおいてリボソームがその生存、増殖、維持に重要な役割を果たしており、iii) 刺激により Activateされたメラノサイト Stem cell/Precursor cellがメラノーマのCell-of-originである可能性が示唆されており、iv) メラノーマのUV関連発癌においてメラノサイトおよび表皮細胞のリボソーム機能亢進が密接に関与していることが報告されている、などのことから(3-6)、申請者らはUV関連ヒトメラノーマのCell-of-originの候補としてこの亜集団に着目し、現在機能解析を行っている。

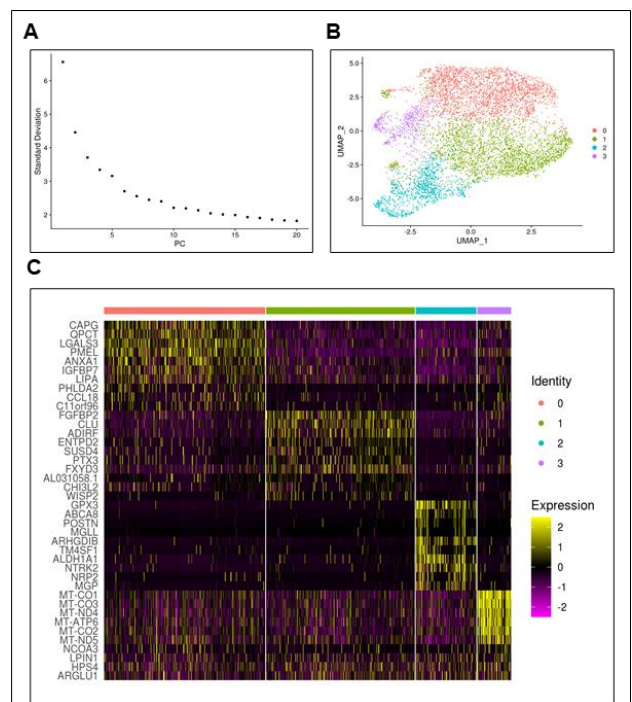


Figure 2. (A) Determination of PC by elbow plot.

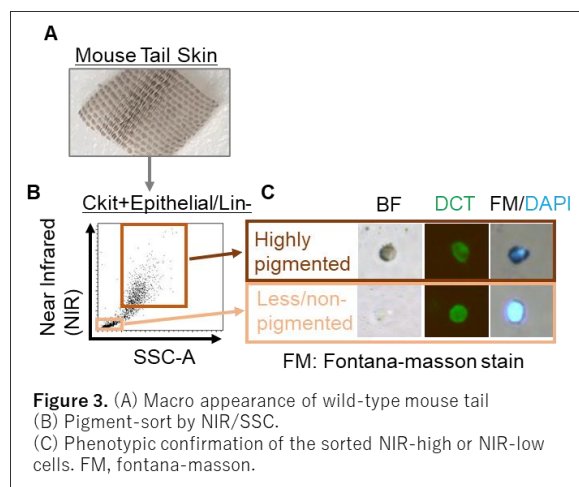
(B) UMAP representation of subpopulations in the melanocytes (n=5889).

(C) Heatmap of unsupervised clustering of the melanocytes into subpopulations by different gene expression analysis. Top 15 genes in each cluster are shown.

野生型マウスメラノサイトの多様性解析

申請者らは上記手法により野生型マウスの体幹、尻尾、掌蹠、耳介皮膚のメラノサイトを分離精製し、

その表現型および機能解析を行っている。メラノサイト Stem cell/Precursor cell は成熟メラノサイトのようにはメラニン産生をせず無色素性である (2)。そこで申請者らは近赤外線 (Near-infrared, NIR) による励起によりメラニンが蛍光を発する性質およびメラニン顆粒が細胞内構造として Side scatter (SSC) を散乱する性質を利用して、FACS によりマウスメラノサイトを色素性 (NIR-high/SSC-high) と無色素性 (NIR-low/SSC-low) に分画した (Figure 3)。野生型マウスにおいて、休止期 (7 週齢) の背部皮膚から分離メラノサイトはほぼ全て NIR-low/SSC-low 分画であり *in vitro* のコロニー形成アッセイにおいて高いコロニー形成能を認めた。一方で成長期 (2 週齢、5 週齢あるいは 10 週齢) 背部皮膚より分離されたメラノサイト中には NIR-high/SSC-high 分画が多く (50%~) 含まれ、この色素性細胞は *in vitro* にてほぼコロニー形成を認めなかった。これは休止期毛包に存在するメラノサイトが Stem cell/Precursor cell であり、成長期毛包には多くの成熟メラノサイトが存在することと合致すると考えられ、この手法により形質、機能の異なる野生型マウスのメラノサイト亜集団を分離可能であることが示唆された。野生型マウスの尻尾、掌蹠、耳介のメラノサイトについても同様に形質、機能の異なる亜集団の分画化が可能であり、今後 RNA-seq などによる野生型マウスメラノサイト亜集団の解剖学的部位、毛包周期、週齢毎の包括的遺伝子解析、機能解析の施行を検討している。



メラノーマモデルマウスにおける変異メラノサイトの多様性解析

申請者らは野生型マウスと同様にメラノーマモデルマウス (Tyr::N-ras^{Q61K}) の体幹、尻尾、掌蹠、耳介

皮膚における変異メラノサイトを分離し形質、機能の解析を行っている。特に、Tyr::N-ras^{Q61K}において、同月齢 (5 か月齢) のヘテロ Tyr::N-ras^{Q61K/+}の毛が黒色を呈するのに対しホモ Tyr::N-ras^{Q61K+/+}は白髪化 (体幹、尻尾) を呈することを見出した。FACS によるメラノサイト分離解析の結果、ヘテロ Tyr::N-ras^{Q61K/+}と比較してホモ Tyr::N-ras^{Q61K+/+}のメラノサイト系細胞は色素含有が低下 (NIR-low/SSC-low) していた。また体幹、尻尾、掌蹠、耳介に共通して、組織学的にホモ Tyr::N-ras^{Q61K+/+}皮膚においては真皮網状層に色素産生のやや低下したメラノサイト系細胞が密な胞巣を形成し増殖する像を認めたが、ヘテロ Tyr::N-ras^{Q61K/+}においては主に真皮乳頭層に色素産生の亢進したメラノサイト系細胞の比較的粗な増殖を認めた。つまり Nras 変異の burden によりメラノサイト系細胞の形質 (メラニン産生、浸潤) が決定されることが示唆された。今後この Phenotype の決定に関与する DEG を RNA-seq により解析していく方針である。

考察

申請者らが開発したメラノサイト分離/亜集団分画の手法は①ヒトおよび野生型マウスを含む遺伝子改変による標識のないメラノサイトを予期的に分離することが可能で、②皮膚細胞中で 0.5%程度とマイナーな細胞種であるメラノサイトの精製度が高く、Single cell RNA-seq による亜集団解析において更にマイナーなメラノサイト亜集団を見出すことが可能であり、③無標識の野生型マウスやメラノーマモデルマウスのメラノサイト亜集団を分離して機能解析や包括的遺伝子解析をすることが可能である、などの従来手法では得られなかった利点があり画期的であると考えられる。これに基づき今後さらにメラノサイトの多様性とその制御機構の研究を進めていく方針である。

参考文献

- doi: 10.1038/nature09781
- doi: 10.1038/416854a
- doi: 10.1002/med.21426
- doi: 10.1084/jem.20122019
- doi: 10.1016/j.stem.2017.09.001
- doi: 10.7554/eLife.42424

研究の発表

口頭発表

1. Researcher Presentation of Monash Animal Research Platform: Identifying a novel functional surface marker of melanocyte progenitors. Fumihito Noguchi, et.al. 2020. 2. 5, Melbourne
2. Morning Seminar, the Dept of Dermatology, Alfred Health: Developing methods to prospectively fractionate melanocytic subpopulation. Fumihito Noguchi, et.al. 2019. 8. 7, Melbourne

誌上発表

無し