

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	岡 本 奈 都 子
論文題目	A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin （掌蹠の汗腺内における色素幹細胞とメラノーマ前駆細胞の同定）		
(論文内容の要旨)			
メラノーマ（悪性黒色腫）は悪性度の高い色素細胞系譜の悪性腫瘍であり、非白人種では特に無毛部である掌蹠（手掌、足底）にメラノーマが多く発生する。掌蹠の早期メラノーマでは、病理組織でエクリン汗腺近傍の表皮にメラノーマ細胞が認められ、ダーモスコピーでは“parallel ridge pattern”と呼ばれる診断に有用な特徴的パターンを示すことが知られている。有毛部では、毛のバルジ領域に色素幹細胞が存在し同領域がニッチとなっているが、掌蹠を含む無毛部における色素幹細胞（前駆細胞）のニッチは未だ特定されていない。掌蹠メラノーマの病理組織所見・ダーモスコピーパターンから、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。 毛包のバルジ領域に存在する色素幹細胞は未熟で slow-cycling な状態で存在し、ゲノムストレスを受けると子孫細胞を分化させ表皮に供給することが明らかとなっている。汗腺で同様の性質を持つ色素系譜細胞の存在を証明することを試みた。 従来色素細胞を追跡する際に用いられてきた <i>Dct-LacZ</i> 遺伝子改変マウスでは、若齢・老齢期マウス、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陽性細胞を検出することができたが、成体マウスにおいては陽性細胞をほとんど検出することができなかった。そこで、ヒストン GFP 融合タンパクが維持される性質を利用した <i>Dct-H2B-GFP</i> 遺伝子改変マウスを新しく作成して解析したところ、休眠状態の色素芽細胞を安定的にマーキングすることに成功した。 マウス掌蹠の発生過程を調べたところ、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最終的に分泌部となる部位にとどまった。この細胞は新生児期には色素合成に関連する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、未熟な細胞であることが判明した。次に、BrdU 実験で汗腺分泌部の GFP 陽性細胞は周囲の細胞に比して BrdU 標識が数ヶ月で徐々に薄まることから slow-cycling な細胞であると判明した。放射線照射で刺激を与えると、細胞は 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分泌部より上方の汗管や周囲表皮にも観察されるようになったことから、自己複製すると同時に分化成熟する子孫細胞を供給する能力を持つことを確認した。以上より、汗腺分泌部色素細胞は幹細胞の性質を持つことを証明した。 次に、ヒトサンプルでは、正常掌蹠皮膚の汗腺分泌部に色素細胞系譜マーカーである MART1 免疫染色に陽性の細胞を認め、これらは MCM2 陰性で、マウスの色素幹細胞に類似する細胞であると考えた。メラノーマサンプルでは病変と領域の特定の汗腺分泌部とその汗管に MART1 陽性細胞を多数認め、これらは MCM2 陽性であった。また、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 <i>CyclinD1</i> 遺伝子の増幅の解析では、病変部の特定の汗腺にのみ分泌部から汗管と表皮に連続的に cyclinD1 増幅細胞がみられ、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。これらのことから、ヒトの汗腺分泌部に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もつ成熟したメラノーマ細胞を表皮へ供給しうると考えた。			

以上より、マウスの掌蹠皮膚でエクリン汗腺の分泌部に色素幹細胞を同定し、ヒトのメラノーマにおいても分泌部に未熟なメラノーマ細胞が分布しうること示した。以上のことから、臨床の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た。 （論文審査の結果の要旨） メラノーマ（悪性黒色腫）は悪性度の高い色素細胞系譜の悪性腫瘍であり、非白人種では特に無毛部である掌蹠（手掌、足底）にメラノーマが多く発生する。掌蹠の早期メラノーマでは、病理組織でエクリン汗腺近傍の表皮にメラノーマ細胞が認められダーモスコピーでは“parallel ridge pattern”と呼ばれる診断に有用な特徴的パターンを示すことが知られているが、色素幹細胞の存在や色素細胞の挙動は明らかではない。申請者らは掌蹠メラノーマの病理組織所見・ダーモスコピーパターンから、無毛部では毛と同じ皮膚付属器である汗腺に色素幹細胞が局在するニッチがある可能性を考えた。 色素細胞を安定的にマーキングすることが可能な ”<i>Dct-H2B-GFP</i> 遺伝子改変マウス”を新しく作成して解析を行い、毛包のバルジ領域に存在する色素幹細胞と同じく、未熟で slow-cycling な状態で存在しゲノムストレスを受けると子孫細胞を分化させ表皮に供給することが可能な色素系譜細胞が、無毛部の汗腺に存在することを証明した。 さらにヒトサンプルの解析でも、正常掌蹠皮膚の汗腺分泌部にマウスの色素幹細胞に類似する細胞を捉えた。また、メラノーマサンプルでは病変と領域の汗腺に色素細胞マーカー陽性の細胞を多数確認し、cyclinD1 増幅細胞解析とあわせ、ヒトのメラノーマにおいても汗腺分泌部に未熟なメラノーマ細胞が分布しうること示した。 以上の研究は掌蹠色素細胞の幹細胞の存在とその挙動の解明に貢献し、予後不良である掌蹠メラノーマの病態解明に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 11 月 26 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
