

メラニン産生の制御機序の解析を介して 新しい美白剤を開発するための研究

中部大学生命健康科学部生命医科学科環境衛生学

加藤 昌志

Malignant melanoma is one of the most aggressive tumors. Incidence of melanomas is increasing by upregulation of ultraviolet irradiation. Therefore, it is necessary to establish a new drug for preventing against and curing melanoma though the clarification of its mechanism. We established the RET-transgenic mouse line (304/B6), in which spontaneously develops benign melanocytic tumor(s) without exception. About 70% of the benign tumors will be changed to malignant melanomas. We investigated the role of c-Kit in the hereditary melanoma developed in the RET-transgenic mice (line 304/B6). In W^V/W^V -RET (304/B6)-transgenic mice, in which c-Kit function was severely impaired, development of melanoma was strongly suppressed. Whereas 31 of the 44 original RET-transgenic mice died of rapidly growing melanoma within 12 months after birth, only 8 of the 44 W^V/W^V -RET-transgenic mice developed slowly-growing melanocytic tumors with a greatly prolonged mean tumor-free period, two of which died of melanoma at a late stage. Even $W^V/+$ -RET-transgenic mice had a clearly prolonged tumor-free period and a definitely reduced frequency (6/61) of tumor death within 12 months after birth. Melanin production in the skin of these mice was not strongly impaired, suggesting that c-Kit affects the development of melanomas in these mice with only minor effects in melanin production. More importantly, a single injection of anti-c-Kit antibody (ACK2) into RET-transgenic mice soon after birth caused a surprisingly long-lasting suppression of development of melanoma, greatly prolonging the tumor-free period, and none of the 28 ACK2-treated RET-transgenic mice had died from tumors at 12 months of age. The c-Kit function needed for melanin production was also suppressed for an unusual long time in ACK2-treated RET-transgenic mice. These results suggest that c-Kit can be a unique target molecule to prevent against melanoma. In the next step, we should clarify whether c-Kit can be a target of therapy for the developed melanoma or not.

1 緒言

生活水準が向上に伴い、ヒトは外見に気を配るようになる。服装にもこだわるが、最終的には一般的に自身の美しさ重視するようになる。シミ（肝斑）、ソバカス（雀卵斑）、アザ（広範囲にわたる先天母斑）などは、自身の美を障害するものとして、しばしば大きな問題となる。これらの疾患には、すべてメラノサイトとメラニンの過剰産生が関与している。ゆえに、メラノサイト増殖やメラニン産生のメカニズムを探ることは、より質の高い安全な化粧品（美白剤）を提供するために不可欠である。一方、メラノサイト増殖やメラニン産生には c-Kit 分子（チロシンキナーゼ）が関連していることが知られている¹⁾。申請者らは近年全身の皮膚黒色症を必発する RET-トランスジェニックマウスを樹立し²⁾、RET チロシンキナーゼも c-Kit チロシンキナーゼと同様にメラノサイト増殖やメラニン産生に深く関与していることを報告してきた³⁻⁸⁾。さらに、最近では RET-トランスジェニックマウスにおける IL-6 の役割を一

部解明することに成功した⁹⁾。

本研究では、申請者らが樹立した RET-トランスジェニックマウス²⁾と c-Kit の機能の 80% 以上低下している W^V -マウスと交配させる。これにより、RET キナーゼと Kit キナーゼが個体のメラノサイト増殖やメラニン産生において、どのように影響し合うかを調べる。また、抗 c-Kit 抗体を用いて、メラノサイトやメラニンの個体レベルでのコントロールをめざす。

2 実験方法

RET-トランスジェニックマウス（黒色毛）と W^V -マウス（白色毛）を交配することにより c-Kit の機能の著しく低下した RET-トランスジェニックマウス (W^V/W^V -RET-トランスジェニックマウス) を作製することにより、RET と c-Kit の相互作用を個体レベルで解析する。さらに、マウスの検体を用いてウエスタンブロット、免疫沈降、キナーゼアッセイ、免疫組織染色等の手法を用いて RET と c-Kit の相互作用を分子レベルで解析する。

ACK2 のハイブリドーマをヌードマウスに注射し、腹水採取することにより、高濃度で多量の抗 c-Kit モノクローナル抗体を作製する。生後 1 日以内の RET-マウスに抗 c-Kit 抗体 (ACK2) を注射すると、マウスの毛色や皮膚の色を観察する。さらに、抗 c-Kit 抗体を注射されたマウスの皮膚について、免疫組織染色、ウエスタンブロット、



The research to establish the drug for white skin through analysis of melanin production

Masashi Kato

Department of Environmental and Preventive Medicine, Research Institute of Life and Health Sciences, Chubu University

免疫沈降、キナーゼアッセイ等の方法を用いて、抗 c-Kit 抗体がどのようなメカニズムで毛色に作用するのかを解析する。

3 結果と考察

a) W^V -マウスと RET-トランスジェニックマウスを交配させることにより、c-Kit 機能の低下した RET-マウスを作製し、毛色と腫瘍の大きさを調べる

a-1) RET-トランスジェニックマウス（黒色毛）と W^V -マウス（図 1 A：左端の白色マウス）を交配することにより c-Kit の機能の著しく低下した RET-トランスジェニックマウス（図 A：右側の 3 匹）を作製すると、このマウスの毛色は黒色毛と白色毛が混じったパンダ様となった。これは、c-Kit の機能低下によるメラニン産生の低下が、RET キナーゼにより部分的に補われる可能性を示している。

a-2) c-Kit の機能の著しく低下した RET-トランスジェニックマウスでは、白毛部分のメラニン産生は見られない（図 1：B1）。一方、黒毛部分では、毛根からこぼれ落ちるほどのメラニン過剰産生が観察される（図 1：B2）。これは、オリジナル RET-トランスジェニックマウスの毛泡と同じ表現型である。少なくとも毛泡に関しては、白毛部分は W^V -マウスの、黒毛部分は RET-マウスのモザイクになっているかもしれない。

a-3) 生後 8 ヶ月 RET-トランスジェニックマウスでは図 1 C の下段に示すように腫瘍が発症している。しかし、生後 c-Kit の機能の著しく低下した RET-マウスでは、生後 8 ヶ月になっても通常腫瘍の発症はみられなかった。この結果は、RET-マウスにおいて c-Kit 機能が低下することにより、腫瘍の発症を抑制する事ができる可能性を示している。これを証明するためには、数を増やして統計学的検討が必要となる。

a-4) RET-トランスジェニックマウス（図 2 A：RET）、c-Kit 機能の一部低下した RET-トランスジェニックマウス（図 2 A： $W^V/+$ -RET）、c-Kit 機能が著明に低下した RET-トランスジェニックマウス（図 2 A： W^V/W^V -RET）の寿命を生存曲線にて比較すると通常の RET-マウスに比較して c-Kit 機能の一部低下した RET-トランスジェニックマウスの寿命は統計学的に有意に延びていた。c-Kit 機能が著明に低下した RET-トランスジェニックマウスでは、さらに有意に寿命が延びた。

a-5) RET-トランスジェニックマウス（図 2 B：RET）では、100%のマウスに腫瘍が発症し、70%の腫瘍が悪性転化をおこし、メラノーマを発症している。ところが、c-Kit 機能の一部低下した RET-トランスジェニックマウス（図 2 B： $W^V/+$ -RET）では 30%以上のマウスで、

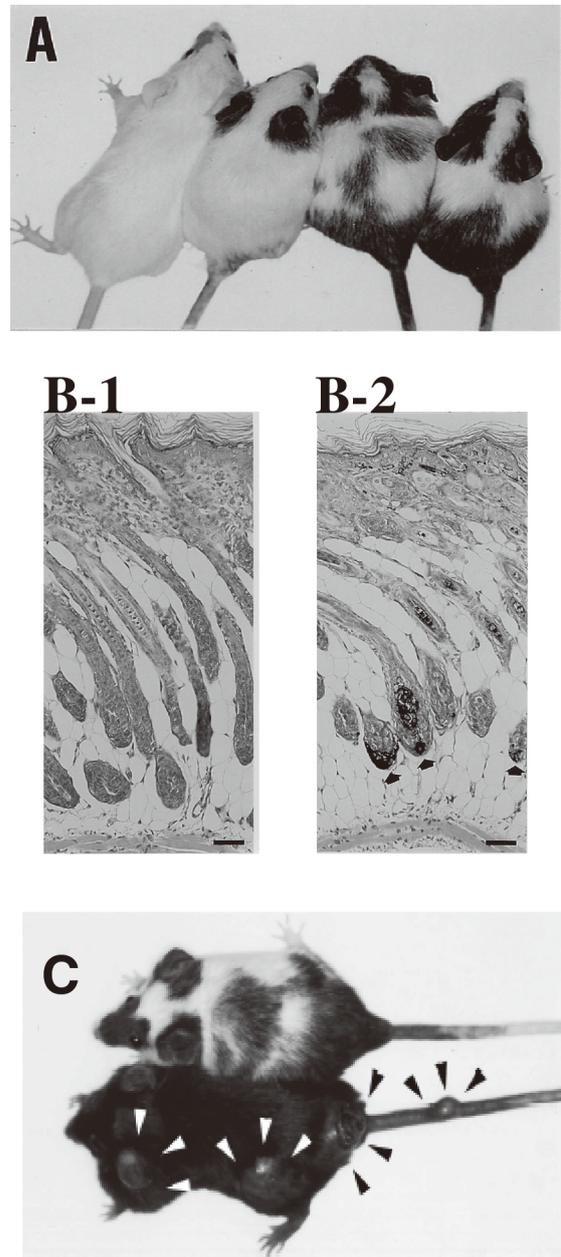


図 1
A：4 週齢の W^V/W^V -マウス（左端）及び同腹の W^V/W^V -RET-トランスジェニックマウス（右側の 3 匹： W^V/W^V 遺伝子を持つ RET-トランスジェニックマウス）。
B： W^V/W^V -RET-トランスジェニックマウスの白色毛部分の皮膚（B-1）と黒色毛部分の皮膚（B-2）の組織像。
C：生後 8 ヶ月の RET-トランスジェニックマウス（上段）と W^V/W^V -RET-トランスジェニックマウス（下段）（Kato M et al. Cancer Res 64:801-806, 2004 の Fig.1 を改変して掲載）。

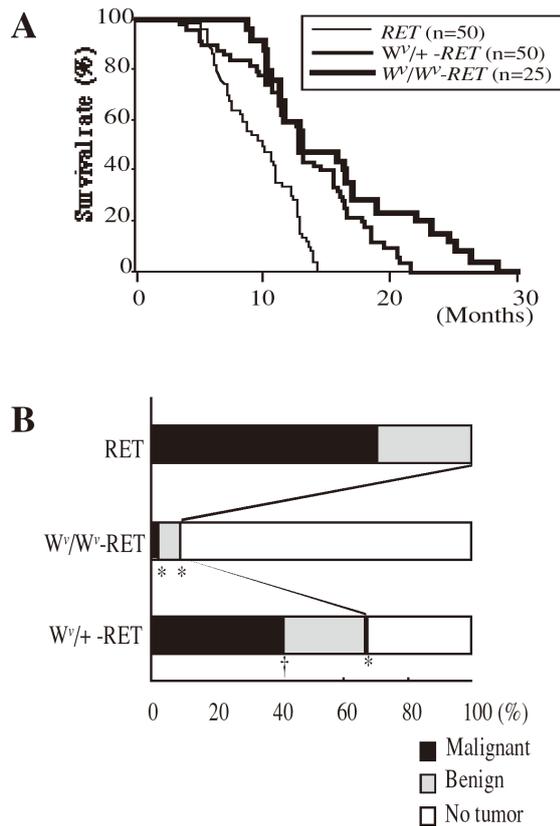


図2

A : RET- トランスジェニックマウス (RET; n=50)、W^V/+ -RET- トランスジェニックマウス (W^V/+ -RET; n=50)、W^V/W^V -RET- トランスジェニックマウス (W^V/W^V -RET; n=25) における寿命。

B : RET- トランスジェニックマウス (RET; n=44)、W^V/+ -RET- トランスジェニックマウス (W^V/+ -RET; n=61)、W^V/W^V -RET- トランスジェニックマウス (W^V/W^V -RET; n=44) における悪性腫瘍 (Malignant)、良性腫瘍 (Benign) の発症率 (Kato M et al. Cancer Res 64:801-806, 2004 の Fig.1 を改変して掲載)。

良性腫瘍さえ発症しなかった。良性腫瘍が発症したマウスは全体の2/3程度であり、悪性転化をおこしたマウスは40%以下であった。さらに、興味深いことに、c-Kit機能が著明に低下したRET-トランスジェニックマウス(図2B: W^V/W^V-RET)では、90%以上のマウスが良性腫瘍さえ発症しなかった。また、悪性転化した腫瘍は全体の5%以下であった。

上記a-1)~a-5)の結果は、1) c-Kit分子を介したメラノサイト増殖メラニン産生はRET分子により一部補う事ができる可能性があること、2) メラノーマを自然発症するRET-トランスジェニックマウスのc-Kit機能を調整することによりメラノサイト系腫瘍の発症をコントロールできる可能性があること、を示している。

b) 抗c-Kit抗体を用いてRET-トランスジェニックマウスのc-Kit機能を人為的に低下させたRET-マウスにて毛色と腫瘍の大きさを調べる

b-1) RET-トランスジェニックマウスに対し、生後24時間以内に0.5mgの抗c-Kit抗体(ACK2)を一度だけ注射し、その後の腫瘍の大きさについて注射を受けていないRET-マウスと比較した(図3A)。ACK2を注射されたマウス(図3A: RET ACK2(+))では、ACK2投与を受けていないRET-マウス(図3A: RET)に比較して、特に生後11-12ヶ月頃まで、著しく腫瘍増殖が抑制された。さらに、オリジナルのRET-マウスでは100%のマウスに腫瘍が発症し、70%の腫瘍が悪性転化をおこし、メラノーマを発症している(図3C: RET ACK2(-))のに対してACK2を投与されたRET-マウスでは、40%以上のマウスに良性腫瘍さえ発症しなかった(図3C: RET ACK2(+))。また、悪性転化した腫瘍は1/3程度に抑制された。以上のように本研究では、メラノーマを自然発症するRET-トランスジェニックマウスにおいてc-Kit機能を調整することによりメラノサイト系腫瘍の発症をコントロールできることをより臨床応用しやすいかたちで示した。

b-2) オリジナルのRET-トランスジェニックマウスでは毛色は一生黒色のままである(図3B: 下段マウス)。生後24時間以内に0.5mgの抗c-Kit抗体(ACK2)を注射されたRet-マウスの毛色は一生グレーままであった(図3B: 上段マウス)。一方、アダルトRET-マウスに対して0.5mgのACK2を注射しても、ほとんど毛色に変化はなかった。

これらの結果は、c-Kit分子は恒常的に発現しているのではなく、年齢特異的に発現している可能性があることを示している。

b-3) 生後24時間以内のACK2投与によりコントロールのC57BL/6マウス(黒色毛)の毛色はいったん完全に白色になるにもかかわらず(図4Cの2)、生後3-4ヶ月後には黒色毛に戻った(図4Cの2)。一方、生後24時間以内に0.5mgの抗c-Kit抗体(ACK2)を注射されたRet-マウスの毛色はグレーのままである(図4Cの4)。野生型C57BL/6マウスとRET-マウスにおけるACK2に対する毛色の違いを説明することは難しい。筆者らは、RET-マウスでは生後24時間以内にほとんどメラノサイトの幹細胞(おそらくc-Kitを発現している)がシンクロナイズして分化するために皮膚黒色症が誘導される。しかし、野生型マウスでは生後24時間以内に一部のメラノサイトの幹細胞が分化するのみであるので、数ヶ月後には白髪が黒く変化するのではないかと考えている。

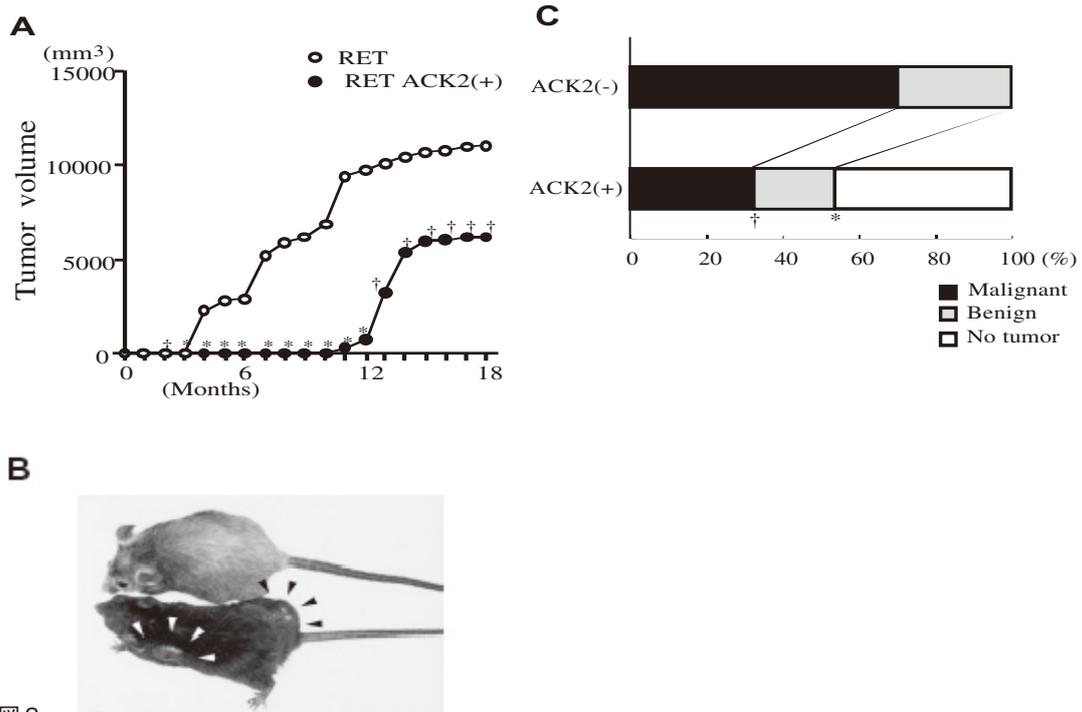


図3

A : 抗 c-Kit 抗体 0.5 mg を生後 24 時間以内に皮下に注射された RET- トランスジェニックマウス (RET ACK2(+); n=21) 及び注射を受けていない RET- トランスジェニックマウス (RET: n=42) の月齢と腫瘍サイズ (*; P<0.0001、†; P<0.01)。
 B : 8 ヶ月齢の抗 c-Kit 抗体 0.5mg を生後 24 時間以内に皮下に注射された RET- トランスジェニックマウス (上段) と同腹の注射を受けていない RET- トランスジェニックマウス (下段) のマクロ所見。
 C : 抗 c-Kit 抗体 0.5mg を生後 24 時間以内に皮下に注射された RET- トランスジェニックマウス (RET ACK2(+); n=22) 及び注射を受けていない RET- トランスジェニックマウス (RET: n=46) の悪性腫瘍 (Malignant)、良性腫瘍 (Benign) の発症率 (*; P<0.0001、†; P<0.005) (Kato M et al. Cancer Res 64:801-806, 2004 の Fig.3 を改変して掲載)。

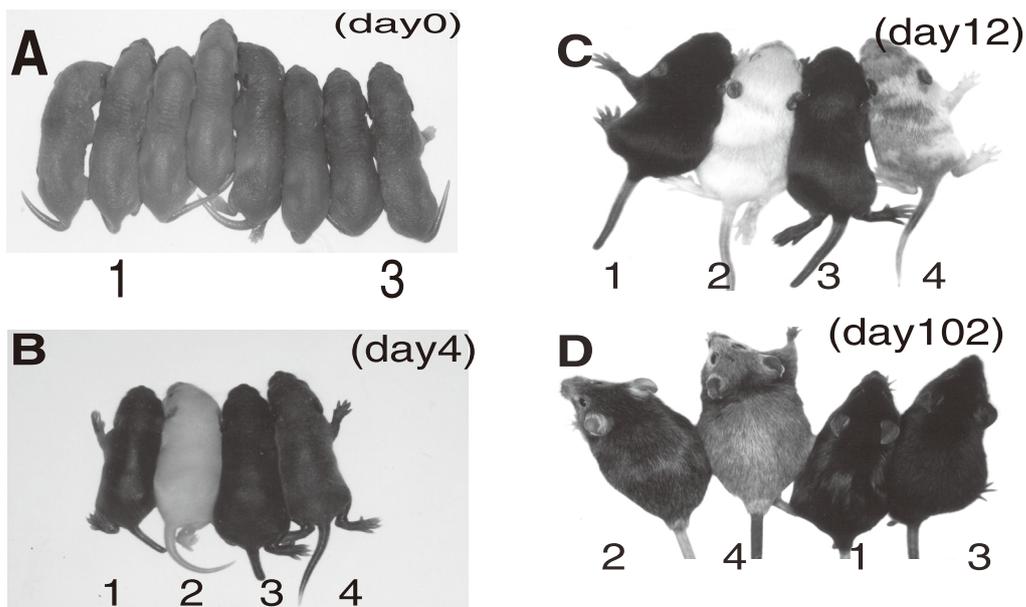


図4

A - D : 抗 c-Kit 抗体 0.5mg を生後 24 時間以内に皮下に注射されたコントロール C57BL/6 マウス (B-D: No.2) と RET- トランスジェニックマウス (B-D: No.4)、注射を受けていない C57BL/6 マウス (A-D: No.1) と RET- トランスジェニックマウス (A-D: No.3) のマクロ所見 (Kato M et al. Cancer Res 64:801-806, 2004 の Fig.4 を改変して掲載)。

4 結語

RET と c-Kit の両チロシンキナーゼは、メラノサイトの増殖及びメラニン産生において相補的に作用していると考えられる。

(参考文献)

- 1) Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Tsuzuki T, Hossain K, Tamakoshi A, Kunisada T, Kambayashi Y, Ogino K, Takahashi M, Nakashima I. c-Kit-targeting immunotherapy for hereditary melanoma in a mouse model. **Cancer Res** 64:801-806, 2004.
- 2) Kato M, Takahashi M, Akhand AA, et al. Transgenic Mouse Model for Skin Malignant Melanoma. **Oncogene** 17: 1885-1888,
- 3) Kato M, Liu W, Akhand AA, et al. Linkage between melanocytic tumor development and early burst of Ret protein expression for tolerance induction in metallothionein-I/ret transgenic mouse lines. **Oncogene** 18: 837-842, 1999.
- 4) Kato M, Isobe K, Dai Y, et al. Further characterization of the Sho-saiko-to-mediated anti-tumor effect on melanoma developed in RET- transgenic mice. **J Invest Dermatol** 114: 599-601, 2000a.
- 5) Kato M, Iwashita T, Takeda K, et al. Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. **Mol Biol Cell** 11: 93-101, 2000.
- 6) Kato M, Liu W, Akhand AA, et al. Ultraviolet Radiation Induces Both Full Activation of Ret Kinase and Malignant Melanocytic Tumor Promotion in RFP-RET-Transgenic Mice. **J Invest Dermatol** 115: 1157-1158, 2000.
- 7) Kato M, Liu W, Yi H, et al. The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits growth and metastasis of malignant melanoma primarily developed in ret-transgenic mice. **J Invest Dermatol** 111: 640-644, 1998.
- 8) Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, et al. Repair by Src Kinase of Function-impaired RET with Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A Mutation with Substitutions of Tyrosines in the COOH-Terminal Kinase Domain for Phenylalanine. **Cancer Res** 62:2414-22, 2002.
- 9) von Felbert V, Cordoba F, Weissenberger J, Vallan C, Kato M, Nakashima I, Braathen LR, Weis J. Interleukin-6 gene ablation in a transgenic mouse model of malignant skin melanoma. **Am J Pathol** 166:831-41, 2005.