

NF- κ B経路阻害剤によるメラノサイトの癌化予防とメラノーマの悪性形質制御の検討

中部大学生命健康科学部
生命医科学科 助手 竹内理香

中部大学生命健康科学部
生命医科学科 教授 古川圭子

1. 研究の背景・目的

悪性黒色腫(メラノーマ)は悪性度が高く、予後不良の皮膚癌の一種である。近年、日本人の皮膚癌の罹患率は増加傾向にあり、その環境要因や分子生物学的な発症メカニズムを明らかにすることは重要である。シアル酸含有スフィンゴ糖脂質(ガングリオシド)のGD3はメラノーマにおいて高発現し(1, 2, 3)、当研究室では以前にGD3がメラノーマ細胞の増殖性、浸潤性、細胞外基質への接着の亢進に働くことを報告した(4, 5)。メラノーマ細胞におけるガングリオシドとその合成酵素遺伝子の発現については以前からいくつかの検討がなされてきたが、正常メラノサイトではほとんど解析されていない。GD3はメラノーマで特徴的に発現し、細胞の接着シグナルを活性化するが(4)、正常なメラノサイトではGM1合成酵素遺伝子は高度に発現するが、GD3合成酵素遺伝子およびGD2合成酵素遺伝子は発現しないか発現レベルは非常に低い(6)。私達はこれまで紫外線によって活性化されたケラチノサイトから分泌されるサイトカインがメラノサイトにおけるGD3合成酵素遺伝子の発現を誘導することを報告してきた。その過程で明らかになったTNF α に着目して、メラノサイトにおけるガングリオシド発現の制御とメラノーマの悪性形質増強に関して解析を行った。

本研究では、UVB照射ケラチノサイトから分泌される炎症性サイトカインやホルモンがGD3合成酵素遺伝子発現を誘導するシグナル伝達経路について、メラノサイトとメラノーマの間の異同に着目して比較検討した。メラノサイトからメラノーマへの移行過程におけるガングリオシドの糖鎖合成酵素遺伝子の発現変化は、メラノーマ細胞におけるガングリ

オシドの役割を理解するために非常に重要である。本研究ではメラノーマの新たな診断指標や治療法の開発のための基礎的知見を明らかにすることを目的とし、メラノサイトとメラノーマ細胞について、糖鎖合成酵素遺伝子の発現制御に関与するシグナル伝達分子の比較検討を行い、その分別的な発現調節機構を解析した。

2. 研究の対象ならびに方法と結果

(1) 培養細胞による GD3 合成酵素遺伝子の発現比較

これまでに私達は、メラノサイトと比較してメラノーマ細胞では GD3 合成酵素遺伝子と GM2/GD2 合成酵素遺伝子の発現が高く、GM1/GD1b 合成酵素遺伝子の発現が低いことを報告した。今回我々はさらに多くのメラノサイト及びメラノーマ細胞株（培養メラノサイト：2種、メラノーマ細胞株：7種）を用いて GD3 合成酵素遺伝子、GM2/GD2 合成酵素遺伝子、GM1/GD1b 合成酵素遺伝子の発現レベルをリアルタイム定量 PCR により定量した。その結果、GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルはメラノサイトよりもメラノーマ細胞で有意に高かった。また、GM2/GD2 合成酵素遺伝子の発現レベルにおいても、メラノサイトよりもメラノーマ細胞で有意に高かった。その一方で、GM1/GD1b 合成酵素遺伝子の発現レベルはメラノサイトにおいてメラノーマ細胞よりも有意に高かった。

(2) TNF α と IKK 阻害剤 Wedelolactone (WDL) による GD3 合成酵素遺伝子発現への影響検討

複数の培養メラノサイトとメラノーマ細胞株に TNF α 、TNF α と WDL、WDL のみの組み合わせで添加を行い、各細胞の GD3 合成酵素遺伝子、GM2/GD2 合成酵素遺伝子及び GM1/GD1b 合成酵素遺伝子の発現レベルをリアルタイム定量 PCR により定量した。その結果、メラノサイトにおいては TNF α の添加により GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルが顕著に増加したが、WDL を併用添加すると GD3 合成酵素遺伝子の発現は低下した。一方、メラノーマでは TNF α を添加しても GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルに変化は認められなかったが、TNF α と WDL の併用、もしくは WDL 単独添加を行った全ての細胞株において、顕著に GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルが低下した。

3. 考察

今回の我々の解析結果では、用いた全てのメラノーマ細胞株において、メラノサイトよりも GD3 合成酵素遺伝子の発現レベルが有意に高くなることが確認出来た。この結果よ

り、メラノーマは遺伝子の変異が多様な癌であるにも関わらず GD3 合成酵素遺伝子は恒常的に高いレベルで発現していることが示唆された。皮膚の表層を覆うケラチノサイトは紫外線の照射をうけると TNF α などの炎症性サイトカインや α -MSH などのホルモンを分泌する。私達はこれらの因子によって活性化される細胞内のシグナルが GD3 合成酵素遺伝子の発現と深く関与することを明らかにした。ケラチノサイトに紫外線が照射されると α -MSHがケラチノサイトから放出され、メラノサイト中のPKAの活性化を促進する。その結果、メラニン産生とそれによる光防御などの抗炎症効果、そしてGD3合成酵素遺伝子の発現抑制などが惹起される。我々の実験結果により、メラノサイトの培養液からのdcAMPの除去、もしくはPKAの阻害剤の培地への添加により、有意にGD3合成酵素遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。よって、メラノサイトにおいてはPKAシグナルがGD3合成酵素遺伝子の発現を抑制することが示唆された。一方で α -MSHと同様にケラチノサイトへのUV照射で産生・分泌されるTNF α はNF- κ B経路を活性化し、GD3合成酵素遺伝子の発現レベルを上昇させた。NF- κ B経路の活性化は細胞増殖やアポトーシスなど様々な生命現象に関与している。また、IKK阻害剤のWDLは、メラノサイトにおいてTNF α の添加によって上昇したGD3合成酵素遺伝子の発現を有意に低下させた。これらの結果から、UV照射により引き起こされた2つの要因が、相異なる細胞内シグナル伝達経路の活性化を引き起こし、メラノサイトのGD3合成酵素遺伝子の発現において拮抗的に働くことが示唆された。更にメラノーマ細胞について同様に検討した結果、メラノーマ細胞においてはTNF α の刺激がなくても高いGD3合成酵素遺伝子の発現が認められるが、この遺伝子発現もWDLにより著しく抑制された。また、WDLを添加した4種のメラノーマ細胞株全てで細胞突起の収縮など細胞形態の変化が認められた。この形態変化がメラノーマの浸潤性や転移性に関与するかどうかは、今後、RT-CES、スクラッチングテスト及びinvasion assay等で検討する予定であり、NF- κ B阻害剤によるメラノーマの発生予防への応用の可能性を明らかにする。

4. 文献

1. Portoukalian J, Zwingelstein G, Doré JF. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur J Biochem.* 15;94(1):19-23. 1979.
2. Carubia JM, Yu RK, Macala LJ, Kirkwood JM, Varga JM. Gangliosides of normal

and neoplastic human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Apr 30;120(2):500-504.

3. Traylor TD, Hogan EL. Gangliosides of human cerebral astrocytomas. *J Neurochem.* 34(1):126-131. 1980.

4. Hamamura K, Furukawa K, Hayashi T, Hattori T, Nakano J, Nakashima H, Okuda T, Mizutani H, Hattori H, Ueda M, Urano T, Lloyd KO, Furukawa K. Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;102(31):11041-11046. 2005.

5. Ohmi Y, Kambe M, Ohkawa Y, Hamamura K, Tajima O, Takeuchi R, Furukawa K, Furukawa K. Differential roles of gangliosides in malignant properties of melanomas. *PLoS One* 13:e0206881. doi: 10.1371/journal.pone.0206881. eCollection, 2018.

6. Miyata M, Ichihara M, Tajima O, Sobue S, Kambe M, Sugiura K, Furukawa K, Furukawa K. UVB-irradiated keratinocytes induce melanoma-associated ganglioside GD3 synthase gene in melanocytes via secretion of tumor necrosis factor α and interleukin 6. *Biochem Biophys Res Commun.* 7;445(2):504-510. 2014.