

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591306
 研究課題名 (和文) 悪性黒色腫における代謝型グルタミン酸受容体発現の意義解明
 研究課題名 (英文) The role of mGluR1 expression in melanoma progression
 研究代表者
 船坂 陽子 (FUNASAKA YOKO)
 神戸大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：30209150

研究成果の概要：

表皮にメラノサイトを維持し、ドキシサイクリンの投与および非投与にて表皮メラノサイトで代謝型グルタミン酸受容体1 (mGluR1) の発現をon, offできるマウスを作成した。本マウスは早期に黒色腫を形成するので、黒色腫形成にかかわる分子機序の解析に有用である。また、ドキシサイクリンon, offによりmGluR1の発現を随時on, offにして解析した結果、mGluR1はメラノサイトの増殖、メラノサイトの悪性への形質転換、黒色腫の増殖に関わることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫、代謝型グルタミン酸受容体、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫はその転移能が高いことより、最も予後不良な皮膚腫瘍の1つとされている。表皮メラノサイトは、周囲ケラチノサイト由来因子 (MSH, bFGF, SCF, ET1 等) により増殖が維持されるのに対し、悪性黒色腫細胞は自律増殖能を獲得しているため、表皮基底層から離れて増殖、浸潤することができる

(Funasaka Y et al. Mol Biol Cell 3:197,1992, Halaban R et al. Oncogene 7:1195, 1992 Halaban R. Cancer Metastasis Rev 10:129, 1991)。培養メラノサイトを用いた系で各種リン酸化蛋白をスクリーニングすることにより、前述のケラチノサイト由来因子による刺激にて、DNA合成が促進されるに至る共通かつ key signal が ERK1/2 の活性化であることを、研究代表

者らは世界で最初に同定した (Funasaka Y et al. *Mol Biol Cell* 3:197,1992, Halaban R et al. *Oncogene* 7:1195, 1992)。一方、培養悪性黒色能を有することを示した (Halaban R et al. *Ann NY Acad Sci* 638:232, 1991, Halaban R et al. *J Immunother* 12:154, 1992)。リン酸化 ERK1/2 を認識する抗体が開発され、*in vivo* において黒色腫細胞がリン酸化 ERK1/2 を発現していること、しかし、ERK1/2 のリン酸化を誘導することができる N-ras, B-raf の変異は、特に本邦で多くみられる肢端黒子型黒色腫では一部の黒色腫細胞に認められるのみであることから、リン酸化 ERK1/2 の活性化はこれら遺伝子変異以外の他の機序に基づく可能性が示唆されている (Takata M et al. *J Invest Dermatol* 125:318, 2005)。

代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) は G タンパク質に共役する 7 回膜貫通型受容体であり、PLC-beta を活性化し、小脳長期抑圧、海馬長期増強等のシナプス可塑性に重要な働きをしていることが知られているが、mGluR1 の異所性発現誘導により悪性黒色腫が高率に発症することが、transgenic mouse において報告された (Pollock PM et al. *Nat Genet* 34:108, 2003)。一方饗場らは、テトラサイクリン誘導システム (Tet off system) を用いた double transgenic mouse (NSE-tTA Tg/TRE-mGluR1 Tg マウス) を作成し、ドキシサイクリンの投与の有無で、mGluR1 の発現を制御できるマウスの作成に成功し、mGluR1 をメラノサイトに発現させると、黒色腫が 100% のマウスで形成されることを見いだしている。また、mGluR1 のシグナル伝達機構において ERK1/2 の活性化が生じることも最近明らかにされた (Marin YE et al. *Cell Signal* 18:1279, 2006)。

腫細胞では、これら因子の非存在下にて、ERK1/2 の常時リン酸化が生じており、結果として自律増殖

予備実験において、研究代表者らはヒト皮膚黒色腫細胞が高頻度で mGluR1 を高発現していることを見いだしており、mGluR1 の発現増強がヒト黒色腫発症に関与している可能性は高いものと考えられる。

2. 研究の目的

ヒト黒色腫における mGluR1 の発現の意義を解明すべく、

- (1) 表皮にメラノサイトを維持し、mGluR1 の発現を制御できる黒色腫モデルマウスを作成する。黒色腫の tumor progression のどの段階に mGluR1 の発現が関与するかを明らかにする。
- (2) 真皮にメラノサイトを保有する double transgenic マウスと表皮にメラノサイトを維持する triple transgenic マウスを用いて、黒色腫発生にどのような相違があるのかを明らかにし、メラノサイトの微少環境因子の tumor progression への関与を明らかにする。
- (3) mGluR1 への特異的 agonist, antagonist を用いて、これらマウスにおいて mGluR1 特異的なメラノサイトの増殖、黒色腫への悪性変換、黒色腫の増殖における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 表皮にメラノサイトを維持する黒色腫モデルマウスの作成

饗場（神戸大医・細胞生物）博士らが作成した代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 をメラノサイトで高発現できるダブルトランスジェニックマウス（NSE-tTA Tg/TRE-mGluR1 Tg マウス）と、メラノサイトを表皮に維持するためにケラチノサイトに特異的に SCF を発現する K14-SCF-Tg マウスをバッククロスすることにより、表皮に大量にメラノサイトを維持し、かつ mGluR1 をメラノサイトに高発現させるマウスを作成し、表皮メラノサイトの段階的悪性を組織学的に検討する。本ダブルトランスジェニックマウスはすでに饗場博士より分与を受けている。

- (2) mGluR1 発現の on/off による解析モデルマウスにドキシサイクリンを投与して mGluR1 の発現を選択的に off とすることにより、どの段階の悪性黒色腫を退縮させるかを明らかにし、mGluR1 発現増強の黒色腫形成における作用機転を明確にする。腫瘍進展の初期に mGluR1 の発現が必要であれば、mGluR1 の発現が off となることにより、増殖刺激シグナル（MAP kinase、phospholipase 等）が不活化されるのか、また腫瘍が進展した時点で mGluR1 の off により腫瘍が退縮するのであれば、apoptosis などが誘導されることによるのかを、組織染色（Tunnel 染色）にて検討する。
- (3) mGluR1 発現に連動する遺伝子発現およびシグナルの profiling
NSE-tTA Tg/TRE-mGluR1 Tg マウスの黒色腫組織より培養黒色腫細胞株を樹立する。将来的には、本細胞を用いてテトラサイクリン添加により

mGluR1 の発現を選択的に off とし、on と off の細胞の microarray およびプロテオーム解析により、mGluR1 高発現により誘導される遺伝子発現および関連分子の profile を明確にする。

- (4) 上述の (1) で作成したマウスに、mGluR1 antagonist および agonist を投与することにより選択的に黒色腫を退縮および増大させることができるか否かを検討する。

4. 研究成果

- (1) NSE-tTA Tg/TRE-GluR1 Tgマウスと K14-SCFTgマウスをバッククロスすることにより、表皮にメラノサイトを維持する triple transgenic マウスを作成した。
- (2) triple transgenicマウスはNSE-tTA Tg/TRE-GluR1 Tgマウスに比較し、早期に黒色腫を形成する（平均、48w vs 20w）。
- (3) 尚、白色を背景にもつ albino と NSE-tTA Tg/TRE-GluR1 Tg とのバッククロスでは、黒色腫が生じなかった。これはNSEのdriveが白色メラノサイトにおいてはかからないためであると考えられる。
- (4) triple transgenic マウスの観察により、外傷部に早期に黒色腫の形成がみられることより、外傷によりシグナル活性化あるいはリガンド刺激が加わる可能性を考え、agonistの局所注射による検討、すなわち50nMおよび500nMのS-DHPGを右足底に10microL皮下注射、controlとしてPBSを10microL左足底に皮下注射することを、週1回6週継続にて、agonist注射で全身の黒色腫の増殖スピードの増大がみられ、mGluR1シグ

ナルは黒色腫の増殖に関わることを見
いだした。

- (5) triple transgenic マウスの耳、背、尾の組織検討にて、毛包由来のメラノサイトの癌化が初期に生じることがわかった。
- (6) mGluR1のligandであるグルタミン酸遊離を阻害するriluzole投与で黒色腫の新生を阻害する事を見だし、mGluR1は黒色腫へのtransformationに関わることを明らかにした。
- (7) mGluR1の下流シグナルであるPLC, PKC, Ca release, cAMP等に対する阻害剤を用いてこれらシグナルが本マウスの色素細胞において細胞増殖、抗アポトーシス、抗老化に働くのかを検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Ohtani Y, Harada T, Funasaka Y (these 3 authors contributed equally) , Nakao K, Takahara C, Abdel-Daim M, Sakai N, Saito N, Nishigori C, Aiba A: Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for in vivo growth of melanoma. Oncogene 27:7162-7170, 2008 査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

船坂 陽子

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30209150

(2)研究分担者

錦織 千佳子

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：50198454

(3)連携研究者
なし