

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570135

研究課題名（和文）ジアシルグリセロールキナーゼによるNF κ B活性化機構の解明研究課題名（英文）Studies on the NF κ B activation via diacylglycerol kinase alpha

研究代表者

甲斐 正広 (KAI MASAHIRO)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80260777

研究成果の概要（和文）：ヒトメラノーマ（悪性黒色腫）細胞では腫瘍壊死因子(TNF) α によるアポトーシスが起りにくいことが知られている。本研究ではその原因が、メラノーマで異常に発現の多いジアシルグリセロールキナーゼ(DGK) α がプロテインキナーゼC ζ を介して転写因子NF κ Bを活性化するためであることを示唆した。実際、マウス皮下にメラノーマ腫瘍を形成させ、これにDGK α 発現抑制剤(sirRNA)およびTNF α を投与したところ、腫瘍の成長速度は有意に減少した。メラノーマ治療における新しい標的分子としてDGK α はきわめて有望な候補と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using human melanoma cells, we demonstrated that diacylglycerol kinase (DGK) alpha enhanced tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) via protein kinase C-zeta-dependent phosphorylation of a large subunit of NF-kappaB, p65/RelA. We found that the both of DGKalpha-specific sirRNA and TNF-alpha significantly attenuated the melanoma tumor growth in mice. DGKalpha is suggested to be a novel therapeutic target for melanoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生化学、分子生物学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：NF κ B、アポトーシス、ジアシルグリセロールキナーゼ、メラノーマ

1. 研究開始当初の背景

本研究の申請以前から我々は、脂質代謝酵素—特にジアシルグリセロールとホスファチジン酸を相互変換するジアシルグリセロー

ルキナーゼ(DGK)およびホスファチジン酸ホスファターゼについて、その分子的性質および生理機能について研究を続けてきた。そしてDGKが少なくとも10種のアイソフォームからなる極めて大きなファミリーを形成し

ており、これらアイソフォームが生命現象の中でそれぞれ重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。

こういった一連の研究の中、我々はメラノーマ細胞における DGK α の機能の一部を明らかにした(Yanagisawa K et al, Biochim Biophys Acta, Vol 1771, pp462-474, 2007)。この研究で明らかになったことは主に以下の3点である—(1) DGK α は正常のメラノサイトとはほとんど発現していないがメラノーマ細胞株では広く発現していること、(2) 腫瘍壊死因子 α (TNF α)によって誘導されるアポトーシスは DGK α の活性によって強く抑制されること、(3) このアポトーシス抑制は、DGK α の作用による転写因子 Nuclear Factor- κ B (NF κ B)の活性化が原因であること。すなわち、メラノーマでは DGK α が過剰に発現しているために NF κ B が活性化されているという結論が得られた。

メラノーマは比較的抗がん剤が効きにくいことで知られているが、その原因は不明であった。DGK α を介した NF κ B 活性化が抗がん剤によるアポトーシスを阻害しているならば、DGK α はメラノーマ治療のきわめて有効な標的分子となりうる。また、NF κ B 活性化機構に関する研究はかなり詳細に行われているにもかかわらず、DGK α の関与が予想されるモデルは全く報告がなく、学術的にも興味深い研究テーマと考えられた。これらの事情を背景に、我々は本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的として、(1) TNF α に応答した NF κ B 活性化機構の中で DGK α がどのような役割を果たしているのか明らかにすること、(2) DGK α の発現を抑制することによりメラノーマを人為的にアポトーシス誘導できるかどうかを in vivo 条件で確認すること、の2点を設定した。

3. 研究の方法

(1) DGK α を介した NF κ B 活性化機構について

以前我々はメラノーマ細胞において、TNF α 刺激に応答した NF κ B 活性化には DGK α の酵素活性が必要であることを明らかにした。DGK α はジアシルグリセロール(DG)をリン酸化してホスファチジン酸(PA)を産生する酵素であるから、これら DG あるいは PA によって活性調節される分子がシグナル伝達系に關与しているものと考えられる。

文献調査により、上記条件に適合する分子の有力な候補がプロテインキナーゼ C(PKC)であった。そこで様々な PKC 阻害剤による酵素活性のブロックや、PKC アイソザイムの過剰発現を行い、このとき細胞の NF κ B 活性化にどのような影響が出てくるかを調べた。

(2) メラノーマ腫瘍の成長に対する DGK α 発現抑制の影響

メラノーマ腫瘍に抗がん剤が効きにくいのは DGK α の過剰発現によるものと仮定するならば、逆に言うと DGK α の発現を抑制してやることによりメラノーマ腫瘍の成長を抗がん剤で抑えることができるはずである。実際我々は、AKI ヒトメラノーマ細胞株の DGK α 発現を siRNA 導入法で抑制することにより、この細胞の TNF α 誘導性アポトーシスがより強く起こることを以前の研究で示した。

そこで本研究では、上記 AKI 細胞をヌードマウス皮下に接種して腫瘍を形成、これに DGK-siRNA と TNF α を投与することにより腫瘍成長が抑制されるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) DGK α による TNF α 応答性 NF κ B 活性化増大は PKC ζ を介している

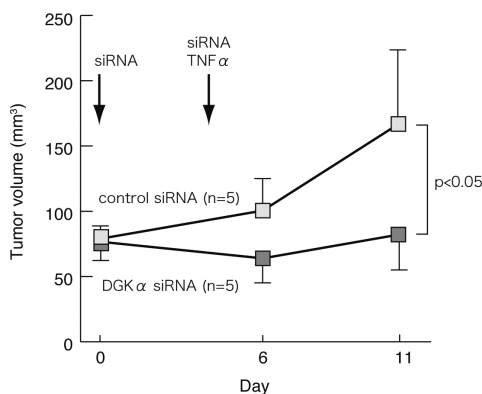
AKI ヒトメラノーマ細胞株を用いた TNF α 投与時の NF κ B 活性化実験において、DGK α -siRNA による DGK α 発現抑制は NF κ B 活性化を強く抑制した。この実験系を使い様々な PKC 阻害剤の影響を調べた結果、novel PKC (PKC ζ , ι/λ) が DGK α を介した NF κ B 活性化シグナル伝達系に關与していることが示唆された。実際、NF κ B の

p65 サブユニットの Ser311 リン酸化 (PKC ζ によることが知られている) は DGK α 発現抑制により大きく減少した。逆に、PKC ζ の発現抑制や過剰発現は NF κ B 活性化に大きな影響を与えた。

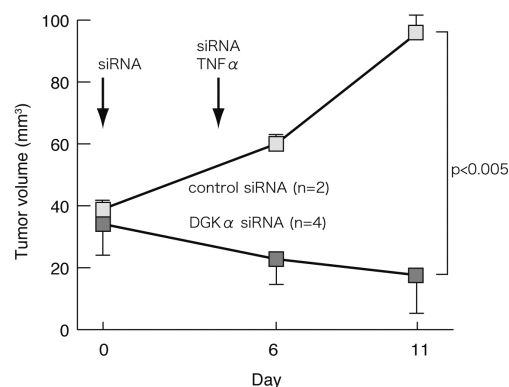
本研究成果は NF κ B 活性化機構に脂質代謝酵素が関与するケースを世界で初めて明らかにしたという点で極めて意義あるものである。どのような形で DGK α がシグナル伝達系に関わっているのか明らかにすることが今後の課題として残った。

(2) マウスにおけるメラノーマ腫瘍の成長は DGK α -siRNA と TNA α の投与により抑制できる

A. 実験開始時の腫瘍サイズが大きい場合



B. 実験開始時の腫瘍サイズが小さい場合



AKI 細胞をヌードマウス皮下に接種して形成された腫瘍に対して DGK α -siRNA と TNA α を同時に投与したところコントロール siRNA 投与時と比べて有意な腫瘍成長速度抑制が観察された (上図参照)。DGK α

-siRNA と TNA α 、どちらか一方だけでは効果が無いことも確認した。

本研究成果はメラノーマの化学療法における新たな標的分子を提示したという点で極めて重要な意味をもっている。今後はより詳細な検討、例えば他のメラノーマ細胞腫瘍への効果や TNF α 以外の抗がん剤などの効果について研究を深め、臨床への応用を探る必要がある。

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)

1. Kai M, Yasuda S, Imai S, Toyota M, Kanoh H, Sakane F. Diacylglycerol kinase α enhances protein kinase C ζ -dependent phosphorylation at Ser311 of p65/RelA subunit of nuclear factor- κ B. FEBS Lett 2009; 583: 3265-3268. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 甲斐正広、安田智、今井伸一、鈴木拓、今井浩三、豊田実、坂根郁夫. PKC ζ による p65 のリン酸化がメラノーマ細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼ α から NF- κ B へのシグナル伝達を仲介する. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 3 日、横浜.
2. Kai M, Yanagisawa K, Yasuda S, Sakane F. Diacylglycerol kinase α suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- κ B activation. In: 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators: 2009 May 28: Tokyo, Japan.

3. 甲斐正広、今井伸一、安田智、柳澤健二、豊田実、加納英雄、坂根郁夫。メラノーマ細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼ α 依存性のNF- κ B活性化にはプロテインキナーゼC ζ が関与する。第31回日本分子生物学会年会／第81回日本生化学会大会 合同大会。2008年12月9日、神戸。
4. 甲斐正広、今井伸一、安田智、鈴木拓、今井浩三、豊田実、坂根郁夫。メラノーマ細胞におけるジアシルグリセロールキナーゼ α 依存性NF- κ B活性化機構にはプロテインキナーゼC ζ が関与する。第67回日本癌学会学術総会。2008年10月28日、名古屋。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 正広 (KAI MASAHIRO)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：80260777

(2) 研究分担者 (2008のみ)

坂根 郁夫 (SAKANE FUMIO)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10183815