

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 4 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22591221

研究課題名（和文） 悪性黒色腫形成・増殖に関わるシグナルの同定、特に紫外線誘発黒色腫形成機序の解明

研究課題名（英文） Identification of signals involved melanomagenesis and melanoma growth, especially, UV-induced melanoma formation

研究代表者

船坂 陽子 ( FUNASAKA YOKO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30209150

研究成果の概要（和文）：

赤毛の白人で黒色腫の発症頻度が高いが、異なるメラニン種を有する黒色腫形成マウスモデルを作成し、中波長紫外線 UVB および長波長紫外線 UVA を照射した。UVA 単独では黒色腫形成には働かず、UVB が黒色腫形成に深く関わること、さらに赤毛の白人に多いフェオメラニン含有マウスで、黒色腫が早期に形成された。フェオメラニン含有マウスでは DNA 損傷シクロブタン型チミン二量体が持続して残り、DNA 損傷修復欠損マウスの結果より DNA 損傷が黒色腫形成のトリガーとなることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Fair skin caucasians with red hair are more susceptible to UV-induced melanoma. We generated melanoma model mouse harboring epidermal melanocytes with different melanin species, then irradiated with UVB or UVA. UVA irradiation did not accelerate melanoma formation, however, UVB did so. Especially, pheomelanin, which is produced more in caucasians. Pheomelanin containing epidermis showed prolonged CPDs after UVB irradiation. DNA repair-deficient mouse also showed early melanoma formation. These results indicate that DNA damages caused by UVB and pheomelanin could be a trigger of melanoma formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、発癌、メラニン、紫外線、DNA 損傷

## 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, Funasaka Y et al. Oncogene 7:1195, 1992)。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、申請者らは同定した(Funasaka Y et al., Mol Biol Cell 3:197,1992)。一方、培養悪性黒色腫細胞では、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能を有することを示した

(Halaban R, Funasaka Y et al. Ann NY Acad Sci 638:232, 1991, Halaban R, Funasaka Y 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、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担うが、

mGluR1の異所性発現誘導により悪性黒色腫が高率に発症し、ERK1/2の活性化が生じることが、transgenic mouseにおいて報告された(Pollock PM et al. Nat Genet 34:108, 2003, Marin YE et al. Cell Signal 18:1279, 2006)。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/TRE-mGluR1 Tgマウス)を作成し、ドキシサイクリン投与の有無で、mGluR1の発現時期を自在に制御できるマウスの作成に成功し、申請者らとの共同研究にてmGluR1の発現がメラノサイトの増殖、メラノサイトの悪性形質変換、黒色腫細胞の増殖の3点に關与することを明らかにした(Ohtani Y, Harada T, Funasaka Y et al. triple first author, Oncogene 27:7162-7170, 2008)。このdouble transgenic mouseでは黒色腫形成の評価に1年近く要するために、実験期間が長期にわたることが難点であった。この点を克服するために、申請者は本double transgenic mouseにK14-SCF-Tgマウスをバッククロスし、triple transgenic mouseを作成した。ケラチノサイトに特異的にSCFを発現させることにより、表皮に大量にメラノサイトを維持できる。Triple transgenic mouseでは、double transgenic mouseと同様の黒色腫(解剖学的部位、細胞形態、転移能)の発症を短期間(肉眼的腫瘍として平均22w, 組織学的な黒色腫細胞の出現は13w)に誘導できる。本マウスにおいて、mGluR1のantagonistおよびTet offによるmGluR1の発現を消失させるためのドキシサイクリン投与にて、黒色腫がregressionすることを見いだしている(論文準備中)。そこで、黒色腫発症およびtumor progressionに關わるmGluR1の下流に存在するsignalを阻害実験により同定し、黒色腫の新規分子標的薬の開発を目指す。

さらに triple transgenic mouse でメラニン産生能の異なるマウスおよび DNA 修復能欠損マウスを作成し、紫外線による黒色腫形成に関わるメラニン種および DNA 損傷の役割およびその機序を明らかにする。

## 2. 研究の目的

- (1) mGluR1 の下流に存在する signal 伝達系 PLC, IP<sub>3</sub>, PKC, MEK1/2, cAMP phosphodiesterase の阻害剤, Ca<sup>2+</sup>遊離および calmodulin のアンタゴニスト、adenylyl cyclase 活性化剤を投与することにより、黒色腫形成および黒色腫細胞の増殖に必須の signal を同定する。
- (2) マウス黒色腫より Tet off system が組み込まれた黒色腫細胞の培養細胞株を既に樹立した。本細胞を用いて Doxy on-off 細胞の microarray およびプロテオーム解析にて、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。(1) の結果と合わせて、黒色腫形成および黒色腫細胞の増殖に関与する分子機構を明確にする。
- (3) 黒色メラニン (ユーメラニン) のみを産生する C57/BL6J、melanocortin 1 receptor (MC1-R)の機能不全のために黄色メラニン (フェオメラニン) を選択的に産生する recessive yellow マウス、メラニンを産生しない HOS-hr-1 マウスの毛色を背景とする上記 double および triple transgenic mouse と DNA 損傷修復が不全な XPA-KO マウスをバッククロスしたマウスをすでに作成しており、メラニン種および DNA 損傷の紫外線照射による黒色腫形成に関わる役割およびその機序を明らかにし、その予防薬を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 黒色腫形成および黒色腫細胞の増殖に関わるシグナルの同定

- ① triple transgenic mouse(NSE-tTA /TRE-mGluR1/K14-SCF Tg マウス)を用いて黒色腫形成阻害については離乳可能となる生後3週目より Doxy off として mGluR1 の発現を誘導し、同時に②の各種阻害剤を与え、5w、10w、15w、20w、25w 後に背、尾、耳より組織を採取し、黒色腫細胞の出現の有無につき解析する。同様に、腫瘍形成についても水のみを与えたマウスをコントロールとして、比較解析する。
  - ② mGluR1 の下流に存在する signal 伝達系 PLC, IP<sub>3</sub>, PKC, MEK, cAMP phosphodiesterase などの阻害剤および antagonist として、1-[6-[[[(17b)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione(U-73122)および 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphorylcholine (Et-18-OCH<sub>3</sub>) (PLC 阻害剤)、2-aminoethoxydiphenylborate (IP<sub>3</sub> receptor 阻害剤)、Chelerythrine chloride, Genistein (PKC 阻害剤), BAY43-9006, U0126(MEK1/2 阻害剤), rolipram( cAMP phosphodiesterase 阻害剤)、Trifloroperadine(Calmodulin antagonist), verapamil(Ca release antagonist). Forscolin(adenylyl cyclase activator)を投与することにより、①で述べた評価系にて黒色腫形成および黒色腫細胞の増殖の阻害に必須の signal を同定する。
- ### (2) mGluR1 発現抑制による黒色腫細胞の regression 機序の解析
- mGluR1 の agonist, の glutamate の遊離抑

抑制剤である Riluzole および Tet off による mGluR1 の発現を消失させるためのドキシサイクリンの投与にて、黒色腫が regression することを見いだしている(論文準備中)が、この regression の機序の一つとして、apoptosis および細胞増殖の抑制が関与しているかを明らかにするために、TUNEL 法、PCNA および Ki-67 染色にて検討する。

### (3) 紫外線誘発黒色腫形成に関わるメラニン種および DNA 損傷の役割解析

黒色メラニン (ユーメラニン) のみを産生する C57/BL6J、melanocortin 1 receptor (MC1-R)の機能不全のために黄色メラニン (フェオメラニン) を選択的に産生する recessive yellow マウス、メラニンを産生しない HOS-hr-1 マウスの毛色を背景とする上記 double および triple transgenic mouse に DNA 損傷修復が不全な XPA-KO マウスをバッククロスして作成したマウスに UVB を生後 7 日めに 1J/cm<sup>2</sup> 照射し、4 週間後には親から離して Doxy off の状態で 3 回/週に UVB を、XPA の wild mouse には 1.5J/cm<sup>2</sup>(4MED)、XPAKO mouse には 0.1J/cm<sup>2</sup> (4MED) を 8 週間照射し、黒色腫発症率および DNA 損傷 (CPD, 8OHdG) について免疫染色について解析する。生後 6-7 日めに照射する理由はすでに、HGF Tg mouse にて生後 3-7 日めに照射した方が、大人マウスに照射するよりも黒色腫の発症率が高いとの報告があること、申請者の予備実験で、メラニンが皮膚において明らかに産生されるのが生後 3 日では不完全で、6-7 日めが最短でも必要で、本研究の目的はメラニン種の影響を検討することにあるためである。申請者らの preliminary な結果ではこの照射にて XPA wild mouse にて黒色腫が生じることが確認できている。

### 3. 研究成果

- (1) 各種シグナル阻害実験より、黒色腫形成には PLC, PKC, ERK, cAMP のすべてのシグナル伝達の活性化および Ca イオンの流入が必要で、いずれのシグナル抑制剤を投与しても、黒色腫形成は有意に遅延した。特に、ERK 阻害剤で、顕著であった。
- (2) 黒色腫形成後に阻害剤を投与することにより、腫瘍増殖が抑制されるか否かについては、PLC, PKC のシグナル伝達および Ca イオンの流入の阻害剤には増殖抑制効果はなかった。ERK の阻害剤にて増殖抑制がみられ、cAMP の活性化にて増殖促進がみられた。これらより形成された後の黒色腫の増殖には ERK の活性化と cAMP の活性化が関与していることが明らかとなった。
- (3) cAMP の活性化剤の投与と同時に ERK の阻害剤を投与すると、cAMP 活性化による黒色腫の増殖は阻害された。このことは cAMP の下流に ERK の活性化シグナルが存在することを示唆する。これらのことより、mGluR の transgenic mouse における黒色腫形成およびその増殖は cAMP の活性化と ERK の活性化が関与しており、特に ERK の活性化が key signal であることが明らかとなった。
- (4) ERK の阻害剤による黒色腫の増殖抑制において、TUNEL 陽性細胞の動態とは相関せず、PCNA 陽性細胞と逆相関がみられたことより、ERK の活性化は黒色腫形成後の黒色腫の細胞増殖に重要な役割を担っていることが明らかとなった。
- (5) UVA 照射では黒色腫形成および増殖の促進はみられなかったが、UVB 照射にて黒色腫形成の誘導が促進され、特にフェオ

メラニン含有マウスでその作用は強かった。

- (6) フェオメラニン含有マウスはUVB照射後DNA損傷のCPDがユーメラニン含有マウスよりも長く、多く存在し、DNA損傷がUVB照射マウスの黒色腫形成誘導のinitiatorの一つであることが示唆された。
- (7) (6)の件を確認するためにXPAノックアウトマウスとの交配で作成したマウスにUVB照射実験を施行したところ、生後3日目にXPAノックアウトマウスにUVBを照射した場合、より早期に黒色腫が形成されることがわかり、(6)の結論を示唆する結果であった。
- (8) 赤毛の白人で、UVAにより黒色腫発症が高いとの疫学的調査であるが、initiationにはUVBが必要であることが判明した。UVBによるinitiation後にUVAの照射にて黒色腫形成が促進されるかについては現在検討中である。

#### 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)

Abdel-Daim, M, Funasaka Y (double first), Komoto M, Nakagawa Y, Yanagita E, Nishigori C: Pharmacogenomics of metabotropic glutamate receptor subtype-1 and in vivo malignant melanoma formation. J Dermatol 37:635-646, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計6件)

1. 船坂陽子: 紫外線発癌としての黒色腫-DNA損傷と免疫反応- 第76回日本皮膚科学会東京支部学術大会、東京、2/16/2013, シ

ンポジウム

2. 船坂陽子: 代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)に注目した悪性黒色腫形成および増殖に関わるシグナル伝達の同定 第8回加齢皮膚医学研究会 第5回ロート賞受賞記念講演, 高知、7/8/2012
3. Funasaka Y, Oyama S, Okazaki S, Kawana S, Nishigori C.: Ultraviolet B, but not ultraviolet A initiates and promotes melanoma formation in metabotropic glutamate receptor 1 transgenic mouse. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 12/9-10/2011 Concurrent Session
4. Funasaka Y, Oyama S, Okazaki S, Kawana S, Nishigori C.: Ultraviolet B, but not ultraviolet A initiates and promotes melanoma formation in metabotropic glutamate receptor 1 transgenic mouse. 21<sup>st</sup> International Pigment Cell Conference, Bordeaux France, 9/21-24/2011 Concurrent Session
5. 船坂陽子: UVAおよびUVBによる発癌, 太陽紫外線防御研究委員会第21回シンポジウム、京都、3/11/2011
6. Funasaka Y, Abdel-Daim M, Harada T, Aiba A, Kawana S, Nishigori C.: Signals involved in oncogenic activities of metabotropic glutamate receptor 1. 16<sup>th</sup> Annual Meeting of European Society for Pigment Cell Research, Cambridge, 9/4-7/2010

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

船坂 陽子 (FUNASAKA YOKO)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30209150

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし