

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791182

研究課題名(和文)メラノサイトの癌化過程に関わる細胞膜糖脂質及びその関連分子の同定と作用機構

研究課題名(英文) Identification of glycolipids and associating molecules on cell membrane involved in the process of carcinogenesis of melanocytes, and analysis of their action mechanisms

研究代表者

宮田 麻衣子(Miyata, Maiko)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90397456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマ細胞と培養メラノサイトにおけるガングリオシドと糖転移酵素遺伝子の発現を解析した。メラノサイトに比しメラノーマでGD3とGD3合成酵素遺伝子の発現亢進、GM1/GD1b合成酵素遺伝子の低下を認めた。メラノーマ細胞とメラノサイトのUVB直接照射では効果がなかったが、UVB照射ケラチノサイトの培養上清でメラノサイトを培養すると、GD3合成酵素、GM2/GD2合成酵素の発現亢進、GM1/GD1b合成酵素遺伝子の発現低下を認めた。UVB照射ケラチノサイトの培養上清中に、種々の炎症性サイトカイン分泌を認めたが、その中のTNF およびIL-6がGD3合成酵素遺伝子の発現を誘導することが示された。

研究成果の概要(英文)：To clarify expression of gangliosides and ganglioside synthase genes during evolution of melanomas from melanocytes, their expression was analyzed with cultured melanocytes and melanoma cell lines, showing that that melanomas expressed high mRNA levels of GD3 synthase and GM2/GD2 synthase and low levels of GM1/GD1b synthase genes compared with melanocytes. Despite no effects of ultraviolet B (UVB) irradiation on the expression levels of ganglioside synthase genes in melanocytes, culture supernatants of UVB-irradiated keratinocytes induced definite up-regulation of GD3 synthase and GM2/GD2 synthase genes. Analysis of the supernatants revealed that inflammatory cytokines such as TNF and IL-6 enhanced GD3 synthase gene expression. These results suggest that inflammatory cytokines secreted from UVB-irradiated keratinocytes induced melanoma-associated ganglioside synthase genes, proposing roles of skin microenvironment in the promotion of melanoma-like ganglioside profiles in melanocytes.

研究分野：生化学

キーワード：ガングリオシド メラノーマ メラノサイト 糖転移酵素 ケラチノサイト 紫外線 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫、メラノーマは代表的な皮膚の悪性腫瘍であり、化学療法や放射線治療に抵抗性で有効な治療法がない。以前より酸性スフィンゴ糖脂質(ガングリオシド)GD3やGD2の特異的な発現が知られており、GM3のみを発現するメラノサイトと対照的なガングリオシド発現パターンが特徴的である。私達はこれまで、メラノーマに特異的に発現するGD3やGD2の生物学的な機能の解析を行い、これらの糖脂質糖鎖がメラノーマの悪性形質を増強する事を報告してきた。しかし、メラノサイトがメラノーマになる過程で、どのようなメカニズムでメラノーマに特徴的なガングリオシドの発現が誘導され、いかなる役割を果たすのかについては、ほとんど不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、まずメラノーマに特徴的なガングリオシドの発現が、いかなる糖転移酵素遺伝子の発現変化に基づいて誘導されるのかにつき検討するとともに、皮膚の微小環境において、どのような細胞内外の要因によってメラノーマに特徴的なガングリオシドが誘導されるのかにつき、とくに紫外線照射の影響を中心にメカニズム解明のための検討を行った。

3. 研究の方法

研究に用いた細胞は、スローンケッタリング癌研究所のL.J. Old 博士から供与された、ヒト悪性黒色腫(メラノーマ)細胞株を用いた。7.5%FCS含有D-MEMにより培養した。初代培養メラノサイトについては、クラボウ(K.K.)よりHEMn-LP、軽度色素性ヒトメラノサイトラインを購入した。細胞培養液としては、Medium 254 にヒトMelanocyte Growth Supplement™ 94 (HMGS) (Life Technologies)を添加して使用した。80% confluency に達した時には、7%FCS、抗生物質、1 mM N⁶, 2'-O-Dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate sodium salt, 0.1 mM 3-Isobutyl- 1-methylxanthine, 1 μM Na₃VO₄, 50 ng/ml TPAを添加したHam's F-10 mediumを用いた。また、糖転移酵素遺伝子の発現レベルの解析には、各々の細胞から抽出したRNAを用いたquantitative-RT-PCRを、DyNAmo™ Flash SYBR Green qPCR Kit (FINNZYMES)を用いて実施した。コントロールとして、GAPDHの発現レベルを対象とした相対的mRNAレベルを算出した。使用したプライマーのシーケンスは論文に示した通りである(論文1)。培養液中のサイトカイン(IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNFα, IL-12p70)定量には、BD社のBD™ Cytometric Bead Array (CBA):ヒトHuman Inflammation Kit (BD Biosciences)kit を用いた。キャプチャービーズは培養液と反応後、PE-標識抗体と3時間インキュベートした後、Accuri™ C6 フローサイトメーターとFCAP 134Array™ software (BD Biosciences)により解析した。

メラノサイト、メラノーマ、ケラチノサイトのUVB照射は、細胞をDNA-FIX™ (ATTO)を用いてUVB (312 nm)に暴露することで行った。

4. 研究成果

まず初年度には、

(1) メラノーマ細胞と培養メラノサイトにおいて、定常状態におけるガングリオシドおよび糖転移酵素遺伝子の発現を解析した。メラノーマ細胞株ではGD3が発現増強しているのに対し、培養メラノサイトではGD3の発現はほとんど認められず、GM3が主要なガングリオシドであった。糖転移酵素遺伝子の発現レベルは、メラノーマ細胞株では培養メラノサイトと比較してGD3合成酵素遺伝子が非常に高く、GM1/GD1b合成酵素遺伝子は著しく低かった。よって、メラノーマ細胞株では、GD3合成酵素遺伝子の発現亢進およびGM1/GD1b合成酵素遺伝子の発現抑制によりGD3が蓄積していることが示唆された。ジシアリルガングリオシドは癌性形質増進に働き、モノシアリルガングリオシドは癌性形質抑制に作用するというこれまでの報告と一致した結果が得られた(図1)。

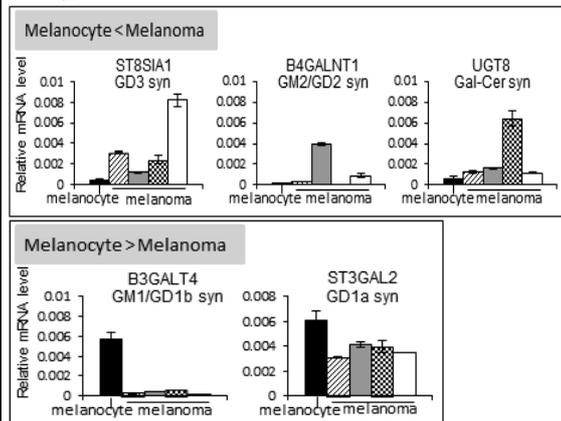


図1: RT-リアルタイムPCRによるヒトメラノサイト及びメラノーマ細胞株SK-MEL-28における糖脂質糖鎖合成酵素遺伝子の発現レベル。

(2)メラノーマ細胞株と培養メラノサイトにおいて、生体内要因としてサイトカイン(TNFα)により細胞を刺激した時のガングリオシドおよび糖転移酵素遺伝子の発現を解析した。培養メラノサイトでは、TNFα刺激によりGD3合成酵素遺伝子の発現が誘導され、GD3の発現が増強された。一方、メラノーマ細胞ではTNFα刺激によりGD3合成酵素遺伝子およびGD3の発現に変化は認められなかった。

(3)メラノーマ細胞株と培養メラノサイトにおいて、外的環境要因としてUV-B照射により細胞に負荷をかけた時のガングリオシドおよび糖転移酵素遺伝子の発現を解析した。メラノーマ細胞株、培養メラノサイトのどちらにおいても、UV-B照射によるGD3およびGD3合成酵素遺伝子の発現誘導は認められなかった。

2年次には、

(1) UVBを照射したケラチノサイト (HaCaT細胞) の培養上清でメラノサイトを培養し、GD3合成酵素、GM2/GD2合成酵素、GM1/GD1b合成酵素遺伝子の発現変化を解析した。新鮮な細胞培養液およびUVB未照射HaCaT細胞の培養上清で培養した時と比較し、GD3合成酵素およびGM2/GD2合成酵素遺伝子の発現は上昇し、GM1/GD1b合成酵素遺伝子の発現は減少した。これらの糖鎖合成酵素遺伝子の発現パターンは、メラノーマ細胞のものと同様であった。

(2) そこで、UVBを照射したケラチノサイト (HaCaT細胞) により培養上清中に分泌される炎症性サイトカインを解析した。その結果、UVB照射によりTNF α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8の産生が誘導された。

(3) メラノサイトをTNF α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8をそれぞれ含む細胞培養液で培養し、GD3合成酵素、GM2/GD2合成酵素、GM1/GD1b合成酵素遺伝子の発現変化を解析した。その結果、GD3合成酵素遺伝子の発現がTNF α およびIL-6により誘導され、IL-1 β によってもわずかな亢進が認められた。GM2/GD2合成酵素およびGM1/GD1b合成酵素遺伝子の発現は、いずれの既知のサイトカイン処理によっても変化が認められなかった。一方、メラノーマ細胞株(SK-MEL-28)をTNF α 、IL-6にて処理した結果、これらの糖鎖合成酵素遺伝子の発現に変化が認められなかった(図2)。

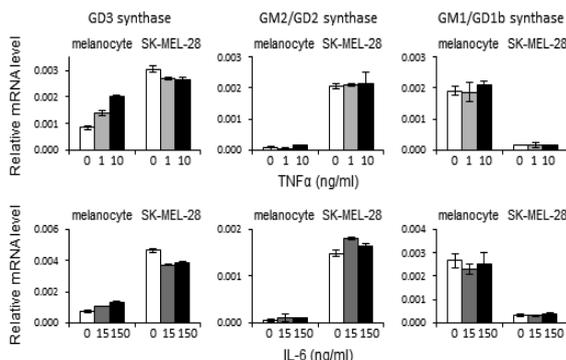


図2: TNF α あるいは IL-6 含有細胞培養液で培養後のメラノサイト及びメラノーマ細胞 (SK-MEL-28) の糖鎖合成酵素遺伝子の発現レベル。

最終年度には、

(1) これまでにメラノーマではメラノサイトに比べて、特徴的なGD3合成酵素 (ST8SIA1) の発現上昇を認めたが、さらにST8SIA1に加えて、関連糖転移酵素遺伝子の動態を、SK-MEL-28を含む6株のメラノーマ細胞株 (SK-MEL-37, SK-MEL-23, SK-MEL-31, SK-MEL-173, SK-MEL-130, MeWo) と他のメラノサイトラインを用いて、広範な解析を行った。その結果、メラノーマ細胞株ではメラノサイトと比較して、GD3合成酵素

(ST8SIA1)、GM2/GD2合成酵素 (B4GALNT1) 遺伝子の発現が高く、GM1/GD1b合成酵素 (B3GALT4) 遺伝子の発現が顕著に低く、これまでの結果と同様の結果が得られた。

(2) 一方、メラノサイトにおいては、IL-1, IL-6, TNF α によりGD3合成酵素遺伝子の発現が誘導されることを明らかにしてきたが、さらに、cAMP刺激を除去することによってもGD3合成酵素遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。従って、メラノサイトではcAMPからのシグナルによりGD3合成酵素遺伝子の発現が抑制されていることが示唆された。

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2件)

1. 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.* 445, 504-510, 2014 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.038. 査読有り
2. Furukawa K, Kambe M, Miyata M, Ohkawa Y, Tajima O, Furukawa K.: Ganglioside GD3 induces convergence and synergism of adhesion and hepatocyte growth factor/Met signals in melanomas. *Cancer Sci.* 105, 52-63, 2014 doi: 10.1111/cas.12310. 査読有り

[学会発表] (計6件)

1. 宮田麻衣子、市原正智、田島織絵、祖父江沙也加、神戸真理子、竹内理香、古川鋼一、古川圭子: UVB照射されたケラチノサイトはTNF α およびIL-6の分泌を通してメラノサイトにおけるメラノーマ関連ガングリオシドGD3合成酵素遺伝子の発現を誘導する. 第87日本生化学会大会 2014年10月15日~2014年10月18日 国立京都国際会館 (京都市・京都府)
2. 古川圭子、宮田麻衣子、田島織絵、神戸真理子、市原正智、祖父江沙也加、古川鋼一: UVB照射ケラチノサイトは炎症性サイトカインを分泌してメラノサイトにおける癌関連GD3合成酵素遺伝子の発現を誘導する. 第73日本癌学会学術総会 2014年9月25日~2014年9月27日 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)

3. Miyata M, Tajima O, Kambe M, Ichihara M, Sobue S, Sugiura K, Furukawa K, Furukawa K: Induction of GD3 synthase gene expression by TNF α in melanocytes and melanomas. 第72回 日本癌学会学術総会 2013年10月3日～2013年10月5日 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)
4. 古川圭子、宮田麻衣子、田島織絵、神戸真理子、祖父江沙矢加、市原正智、杉浦一充、古川鋼一: TNF および紫外線によるメラノサイトとメラノーマのGD3合成酵素遺伝子の発現誘導. 第86回日本生化学会大会 2013年9月11日～2013年9月13日 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)
5. Miyata M, Tajima O, Kambe M, Furukawa K, Furukawa K: Expression profiling of glycosyltransferase genes in human melanocytes and melanoma cells. 第71回 日本癌学会学術総会 2012年09月19日～2012年09月21日 ロイトン札幌 (札幌市・北海道)
6. 宮田麻衣子、田島織絵、神戸真理子、古川鋼一、古川圭子: ヒトメラノサイトおよびメラノーマ細胞における糖転移酵素遺伝子発現プロファイリング. 第76回 日本生化学会中部支部例会 2012年05月26日～2012年05月26日 自然科学研究機構 生理学研究所 (岡崎市・愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田麻衣子(Miyata Maiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 90397456