

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21153

研究課題名(和文) 特定波長光の照射・遮蔽による悪性黒色腫細胞の増殖コントロール

研究課題名(英文) Control of melanoma with irradiation of specific wave length light

研究代表者

高須 啓之 (Takesu, Hiroyuki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：40566022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫は皮膚に発生する悪性腫瘍の中でも悪性度の高い腫瘍とされる。われわれはこれまでに皮膚の細胞が光受容タンパク質を介して外界からの光を受容することを明らかとしてきた。同様にメラノーマ細胞に光受容タンパク質が発現している可能性があり、その場合の光照射による細胞増殖のコントロールの可能性を探った。本研究により、(1)メラノサイトおよびメラノーマ細胞においてメラノプシンと呼ばれる光受容タンパク質が発現している、(2)セカンドメッセンジャーであるGタンパク質が共発現している、(3)光を照射することで細胞内カルシウム濃度が上昇すること を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The malignant melanoma is one of the high malignancy tumor occurring on skin. So far, we have shown that a cell of the skin received light from the outside environment through photoreceptor protein. Similarly, photoreceptor protein might be expressed in a melanoma cell and considered the possibility of the control of the cell proliferation by the light irradiation. In this study, we had cleared the following; (1) melanocyte and a melanoma cells express photoreceptor protein, melanopsin, (2) G protein as a second messenger is co-expressed with melanopsin, (3) Blue light irradiation influenced cytosolic calcium uptake.

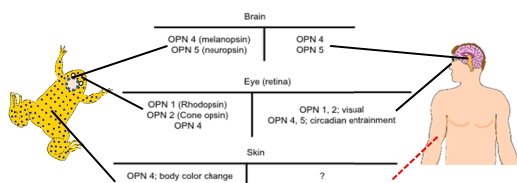
研究分野：形成外科学

キーワード：光受容 メラノーマ

1. 研究開始当初の背景

ヒトは進化の過程で体毛を失い、皮膚の多くは日常的に光線に暴露される。皮膚に存在する細胞のうち、メラノサイトは紫外線によりメラニンの合成を促進し、皮膚の色素形成を促進することは古くから知られている。一方で、細胞がいかんして紫外線の暴露を受けたことを認識するのか、という根本的なメカニズムについては諸説あるが、確定的ではなかった。一方で、両生類や魚類などの下等脊椎動物では皮膚に存在する色素胞が光受容物質を介して光情報を取得し、これを細胞内シグナルへと変換、その結果、体表の色調を環境に応じて変化させることが知られている。この光受容物質は通常は中枢神経系に発言しているとされるメラノプシンと呼ばれるタンパク質で、無脊椎動物型の視物質である。タコなどの軟体動物も同様に、同系に属する視物質を介して体表の色調を変化させる。このことから、われわれは、まず、下等脊椎動物の色素胞が高等脊椎動物におけるメラノサイトと進化上、相同という仮説を立てた。またメラノサイトは起源は神経堤細胞に由来するため、視物質が発現している可能性も考慮した。そこで、皮膚細胞におけるメラノプシンの発現解析を行った。その結果、皮膚を構成する主要な細胞(メラノサイト、ケラチノサイト、ファイブロブラスト)のいずれにおいてもメラノプシンが発現していることを明らかとした。

メラノーマは皮膚に由来する悪性腫瘍の中でも悪性度が高い。光線暴露と悪性化との関連は古くから示唆されているが一旦、悪性化した細胞と光線暴露(受容)との関連については定かではない。そこでわれわれは、これらの背景から下記の研究を計画した。



2. 研究の目的

本研究の目的は、メラノーマの細胞が光を受容するのか、受容した場合、光シグナルは細胞内シグナルへと変換されるのか、を探ることにある。メラノーマにおいてもメラノサイトと同様にメラノプシンの発現が保存されていた場合、メラノプシンの感受性波長(480nm程度)に暴露されることで、光情報が細胞内シグナルへと変換され、細胞の挙動に影響を及ぼす可能性がある。もし、これが細胞の増殖に対して正の影響を及ぼすのであれば、手術待機までの期間、あるいは手術不能例において、病変に対して480nm光を遮断する必要がある。また逆に細胞増殖に対して負の影響を及ぼすのであれば積極的に感受性光を照射することで進行を抑制できる可能性もあり、特定波長光によるメラノ

マ挙動の制御を将来的な目標としている。本研究課題では、その基盤として、メラノーマ細胞には光受容タンパク質が発現しているのか、また発現していた場合、これを介して光に応答するのかどうか、について検討することを目的と設定した。

3. 研究の方法

メラノーマ細胞株の選定・培養

BRAF 変異のある細胞株(G361)および変異のない細胞株(Mewo)を cell bank より購入した。ここで2つの細胞株を用いたのは、近年、分子標的薬が BRAF 遺伝子の変異の有無で適用が区分されており、また、BRAF は MAPK の上流を支配するからである。MAPK のカスケードは、メラノプシンも同様に支配しており、シグナルが共有されている部位でもあることもこれら2つの細胞株を用いた理由である。いずれの細胞株も MEME 培地を用いて、継代培養を行なった。以下の実験においても同様に培養を行なっている。

メラノサイト・メラノーマ細胞株におけるメラノプシンの発現解析

i) RT-PCR

ヒト皮膚より単離培養したメラノサイトおよび上記 G361 株・Mewo 株を培養皿上で回収し、ISOGEN(Nippongene 社)中でホモジェナイズした。製品のプロトコルに従い total RNA を回収した。これを鋳型とし、ヒトメラノプシンに対して設計された PCR プライマーを用いて RT-PCR を行なった。

ii) ウェスタンブロッティング

RT-PCR と同様に、それぞれの細胞を可溶化バッファー中にホモジェナイズし、タンパク質溶液を得た。これを SDS ゲルに電気泳動・メンブレンに転写したのち、抗メラノプシン抗体を一次抗体として用いてウェスタンブロッティングを行なった。

iii) 免疫組織科学

ガラスボトムディッシュ中に培養されたそれぞれの細胞をホルマリン固定した。PBS で十分に洗浄を行なったのち、一次抗体として抗メラノプシン抗体および抗 Gnaq 抗体(これはメラノプシンのセカンドメッセンジャーである)を用いて蛍光二重染色を行なった。蛍光顕微鏡を用いて、観察を行なった。

カルシウムアッセイによる細胞の光応答

メラノサイトおよびそれぞれのメラノーマ細胞をガラスボトムディッシュに培養した。メラノプシンの光受容を検討することを目的としているため、培養は暗室内で暗条件下に行なった。

メラノプシンの感受性波長は480nm近傍とされており、蛍光顕微鏡の B 励起波長は488nm であることから、カルシウム指示薬は488nm で励起される Fruo4 を用いることとした。暗室内で培養液に Fruo4 などを添加・30分のインキュベーションののち、蛍

顕微鏡を用いて B 励起下に検鏡・ビデオ撮影を行った。

4. 研究成果

メラノサイト・メラノーマ細胞におけるメラノプシンの発現

i) RT-PCR による発現の確認
われわれが設計したヒトメラノプシンに対する PCR プライマーを用いた場合に増幅される PCR 産物は下図の通りである。メラノサイト・いずれのメラノーマ細胞から抽出された total RNA においても compatible な長さの PCR 断片が検出された。なお、本フラグメントについては先行研究により塩基配列は同定されており、確かにメラノプシンの塩基配列であることは確認済みである。



ii) ウェスタンブロッティング法による発現の確認

抗メラノプシン抗体を一次抗体として用いた結果、メラノサイト・メラノーマ各細胞株においてもタンパク質レベルでのメラノプシンの発現を認めた。また、メラノサイトにおいては、抗 Gnaq 抗体を用いた共免疫沈実験においても、抗 Gnaq 抗体で沈降させるとメラノプシンも沈降し、また逆に抗メラノプシン抗体で沈降させると Gnaq が沈降しており、これらが共役していることが強く示唆された。

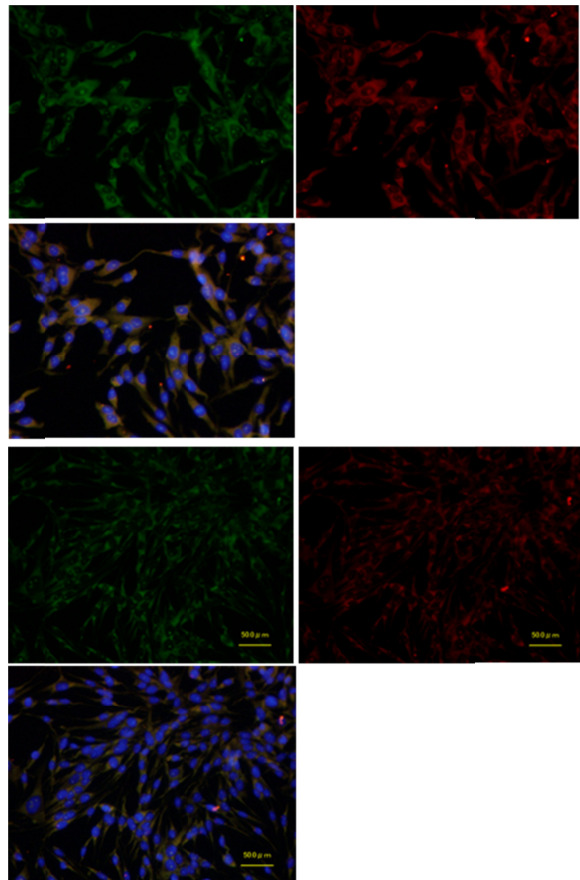


iii) 免疫組織化学法による発現の確認

抗メラノプシン抗体（緑色の蛍光）および抗 Gnaq 抗体（赤色の蛍光）を一次抗体として二重蛍光染色を行った結果、メラノサイト・各メラノーマ細胞株のいずれにおいてもこれらタンパク質の共発現が確認された。

以上の結果より、メラノサイトおよびその腫瘍化したメラノーマ細胞において、メラノプシンは遺伝子レベルでもタンパク質レベルでも発現していることが確認された。また、神経系細胞では 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体

(GPCR) であるメラノプシンはセカンドメッセンジャーとして各 G タンパク質の内、Gnaq をセカンドメッセンジャーとす

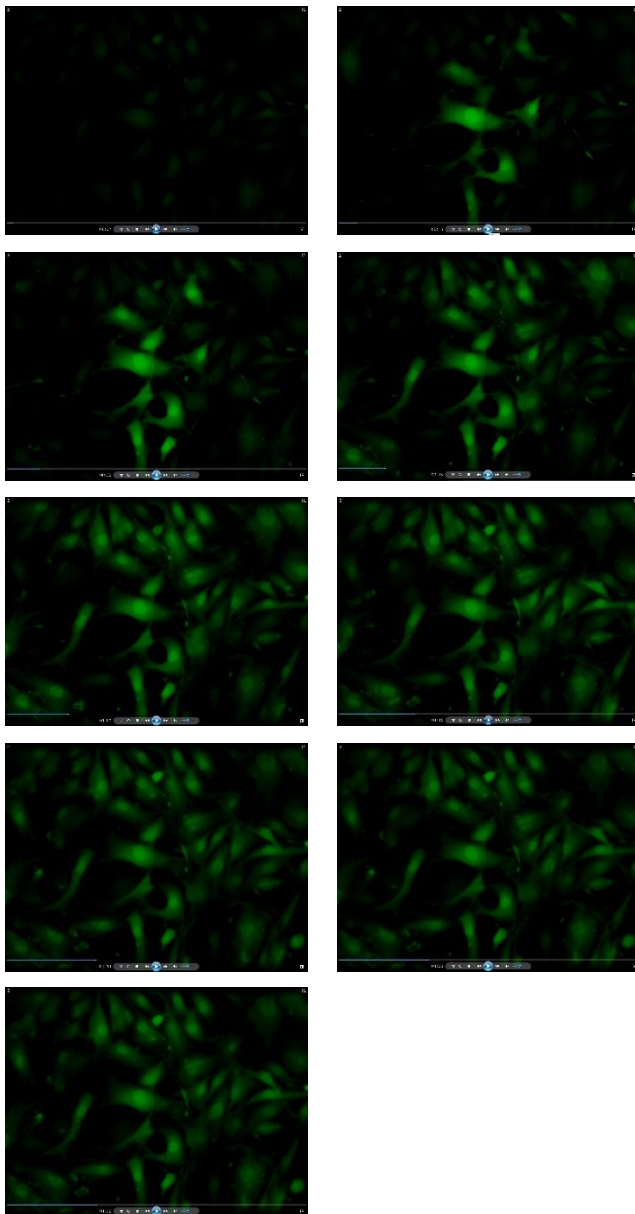


ることが知られているが、皮膚の細胞においても共役していることが強く示唆され、また、細胞レベルにおいても今日発現していることから、これら現象がさらに強く示唆される結果となった。

以下の図は上 3 つは G361、下 3 つは Mewo 株であり緑色の蛍光はメラノプシンを、赤色の蛍光は Gnaq を、青色の蛍光は核を示す。

光照射によるカルシウム取り込みの促進

Fluo4 が細胞内に取り込まれたのち、細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇するとこれらが結合し、蛍光を発する。B 励起によりカルシウムの取り込みを検出するが、メラノプシンの感受性波長もこの波長近傍にあるため、Fluo4 とメラノプシンの励起波長が同じくなり、蛍光顕微鏡により観察を行った。その結果、メラノサイト・各メラノーマ細胞のいずれにおいても青色光を照射後、カルシウムが経時的に取り込まれることが確認された。



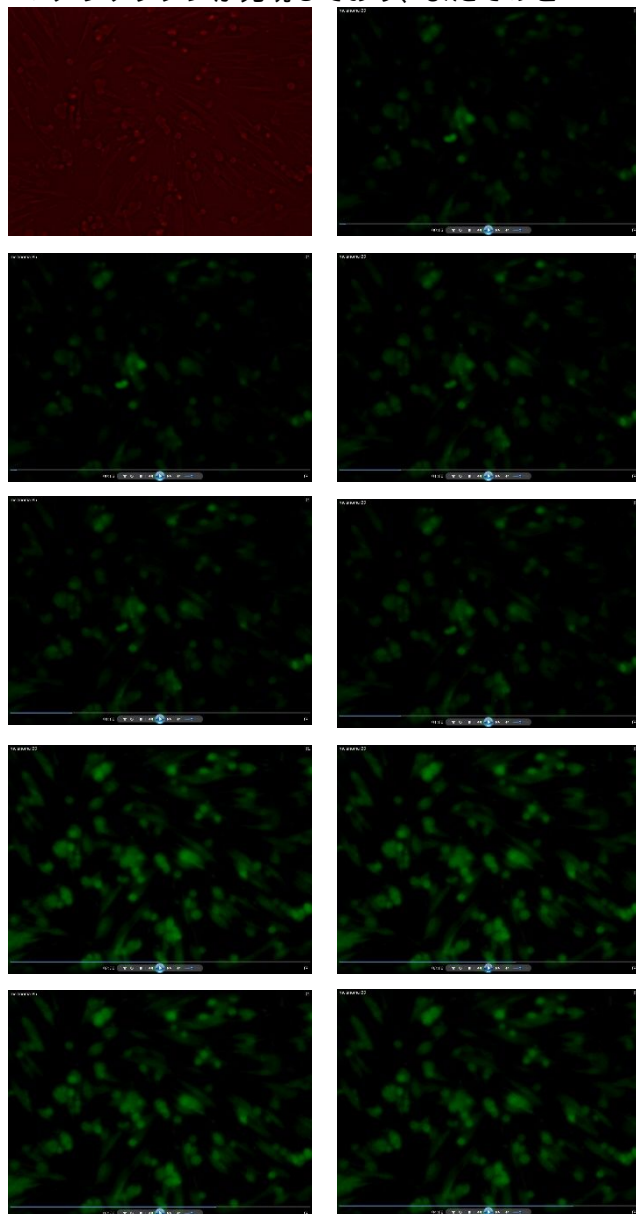
<メラノサイト>

B 励起光(488nm)を照射した。上より右 左斜め下 右・・・の順に、照射後 0 秒、15 秒、30 秒、45 秒、60 秒、75 秒、90 秒、105 秒、120 秒。中心部分は光照射より約 30 秒でカルシウム取り込みが最大となり、その後、カルシウム濃度は減少するが、周囲は 75 秒がピークとなる。これは光路の関係から光強度が変化していることが一因かもしれない。

<メラノーマ>

上より右 左斜め下 右・・・の順に、照射後 0 秒(明視野)、0 秒、30 秒、60 秒、90 秒、120 秒、150 秒、180 秒、210 秒、240 秒。中心部分は光照射より約 150 秒でカルシウム取り込みが最大となり、その後、カルシウム濃度は減少した。

以上の結果より、メラノーマを含むヒトメラノサイト系の細胞には青色光に感受性を持つメラノプシンが発現しており、またそのセ



カンドメッセンジャーである Gnaq も共発現・共役していることが明らかとなった。また、カルシウムアッセイで示されたように、細胞は光シグナルを細胞内シグナルへと変換していることも明らかとなった。今後の展望として、光受容タンパク質を介したシグナル入力はメラノーマ細胞にどのように影響していくのか、をさらに探り、臨床へのフィードバックを行いたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高須 啓之 (TAKASU, Hiroyuki)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：40566022

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)

神戸大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：50444592