

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 林 えりか

学位論文題名

Studies on the role of α -MSH-MC1R-MITF signaling pathway on TGF- β production in melanoma cells

(メラノーマ細胞における TGF- β 産生に関与する α -MSH-MC1R-MITF シグナル経路の役割に関する研究)

【背景と目的】

メラノーマは皮膚癌の中でも悪性度が高く、転移性が高いという特徴もあり、従来の化学療法や免疫療法に対して抵抗性を示すことが言われている。日本や世界における患者数は過去数十年前から統計的に増加していると報告されている。メラノーマの特徴を示す原因の1つとして幾つかの増殖因子やサイトカインの関与が考えられている。TGF- β 1 はサイトカインの1つで、細胞の増殖、分化、生存への関与が報告されている。悪性度の増したメラノーマ患者の血中において TGF- β 1 濃度が健常ドナーのものと比較して高くなっていた。また、メラノーマ患者の組織染色を行った結果、TGF- β 1 の顕著な発現が見られた患者における生存率は低下していたとの報告がなされている。これらの報告から、TGF- β 1 とメラノーマの悪性化に何らかの関連性が言われている。

メラノーマの細胞表面には、 α -MSH の受容体であるメラノコルチン受容体 1 (MC1R) が発現している。MC1R の下流において、ERK1/2、p38、MEK といった様々なシグナル経路の存在が既に報告されている。更に、メラノーマ細胞の核内では、転写因子 MITF が発現していることが報告されており、悪性化への関与が考えられる。しかしながら、メラノーマ細胞において、TGF- β 1 産生に関与する具体的な経路について明らかにされていない。そこで、本研究では TGF- β 産生に関与する経路について解明することを目的とした。

【材料と方法】

マウスメラノーマ細胞 B16 細胞において、MC1R の発現が見られるか PCR 法でまず発現解析を行った。また、MC1R のリガンドである α -MSH が、メラノーマ細胞において TGF- β 1 産生に関与するかどうか、遺伝子発現やウェスタンブロットティング及びバイオアッセイ法で検討した。TGF- β 1 産生に関わる MC1R の下流のシグナル経路を特定するため、インヒビターを用いて検討した。また、MC1R および MITF shRNA を発現するレンチウイルスを用いてそれぞれノックダウンした B16 細胞株を作製し、バイオアッセイ法で、TGF- β 1 産生を検討した。さらに転写因子 MITF による TGF- β 1 の応答性を確認するため、TGF- β 1 プロモーターを用いて、レポーター遺伝子アッセイにて解析した。Vivo モデルにおいて検討するため、MC1R ノックダウン細胞をマウスの皮下に移植し、腫瘍増殖について統計的に検討した。ヒトのメラノーマ細胞株 AK1、C8161、A375M 細胞株について MC1R の発現解析および TGF- β 1 の産生について PCR にて解析した。

【結果】

マウスメラノーマ B16 細胞において、MC 受容体の発現を検討した結果、MC1R の発現が確認できた。B16 細胞を α -MSH で刺激し、遺伝子発現および B16 細胞の培養上清をウェスタンブロッティングにてタンパク発現を検討したところ、無刺激に比べ刺激ありでは TGF- β 1 が高発現していた。活性型 TGF- β 1 に応答して細胞増殖を抑制する特徴がある NBL-7 細胞を用い、バイオアッセイでの検討においても、同様に、刺激ありの培養上清を用いた方での増殖が抑制傾向にあり、 α -MSH 刺激により TGF- β 1 が産生されることが示唆された。

次に、MC1R の発現をノックダウンすることで、TGF- β 1 の産生に影響が生じるかどうか検討した。培養上清をから、ウェスタンブロッティング法にて TGF- β 1 の産生を検討したところ、顕著な低下が認められた。また、バイオアッセイ法においても、同様に MC1R ノックダウン株の培養上清では対照株に比べ NBL-7 細胞の増殖低下の解除が認められた。この時 shRNA 導入による細胞増殖の影響はなかった。

更に、MC1R の下流経路について検討するため、インヒビターを用いて検討すると、ERK1/2 および p38 経路の関与が認められた。メラノーマの核内では転写因子である MITF-M が発現していることが知られている。そこで、MITF と TGF- β 1 産生との関連性について着目した。レポータージーンアッセイ法を用いて、プロモーターの活性化を検討した結果、MITF の濃度に依存して、プロモーター活性が上昇した。shRNA を用いて、MITF の発現をノックダウンさせた B16 メラノーマ細胞株を作製し、TGF- β 1 の産生について検討したところ、TGF- β 1 産生は抑制傾向を示した。

C57BL/6 マウスの皮下に MC1R ノックダウン細胞株を移植し、マウスモデルにおける腫瘍増殖について検討した結果、コントロールに比べ、MC1R ノックダウン細胞株では、有意に腫瘍増殖は低下していた。

ヒトのメラノーマ細胞株 AK1、C8161、A375M について MC1R の発現および TGF- β 1 の発現について検討すると、MC1R の発現が高いと TGF- β 1 の産生が高いという結果であった。

【考察】

マウスメラノーマ B16 細胞株について検討を行った結果、TGF- β 1 産生には α -MSH-MC1R-MITF シグナル経路の関与が有力であることが示唆された。MC1R のノックダウンにより、TGF- β 1 産生が減少したことや in Vivo における腫瘍増殖が抑制傾向にあったこと、さらにヒトのメラノーマ細胞において、MC1R と TGF- β 1 の発現において何らかの相関性があることが示唆されたことから、MC1R の働きを制御することで、TGF- β 1 の産生を抑制できる可能性があると考えられた。治療の標的となりうる可能性が考えられた。

【結論】

本研究より、メラノーマ細胞における TGF- β 1 の産生制御には、 α -MSH-MC1R-MITF のシグナル経路の関与が有力であることが明らかとなった。また、MC1R の発現を制御することにより、TGF- β 1 の産生及び腫瘍形成にコントロールできる可能性があり、今後、メラノーマの治療法への応用が期待される。