

論文の内容の要旨

氏名：布村 順一

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：イヌメラノーマ細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ 3 発現と転写因子 NF- κ B に関する研究

炎症は様々な感染症や病気に対する正常な免疫応答であるが、腫瘍の微小環境を変化させる要因の 1 つであり、悪性化にも影響する。がん細胞自身や間質細胞、腫瘍部位に浸潤した白血球が産生する様々な炎症性および微小環境因子が、腫瘍の発生や成長に好ましい微小環境を整える作用を有している。

炎症性サイトカインのインターロイキン-1 β (IL-1 β) は、様々な種類の腫瘍の微小環境において発現が促進され、他の炎症に関わる因子の遺伝子発現を誘導し、腫瘍の進行や転移に関わっている。

メラノーマ（悪性黒色腫）はメラニン色素を作り出すメラノサイトががん化する悪性腫瘍である。イヌの口腔内メラノーマは口腔内悪性腫瘍の中でも最も多く認められ、局所浸潤、リンパ節転移や主に肺への遠隔転移も早いと報告されている。また、明らかに有効な治療法がないため、予後が非常に悪い腫瘍とされており、新たな治療戦略が求められている。

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は細胞外マトリックスの構成要素を分解する機能を有する亜鉛依存性のエンドペプチダーゼのファミリーである。MMP は、細胞の成長、分化、移動を調節し、腫瘍の発達に適した微小環境を作り出し、腫瘍の進行に不可欠な役割を担っている。

NF- κ B は転写因子として機能するタンパク質複合体である。IL-1 β を含むサイトカインは、NF- κ B の活性化を介して、炎症に関わる様々な因子の遺伝子発現を誘導する。

本研究では、イヌメラノーマの新たな治療戦略に繋げることを目的とし、イヌメラノーマ細胞における MMP の 1 つである MMP-3 の発現に対する IL-1 β の効果を検討し、さらに IL-1 β 誘導性 MMP-3 発現における NF- κ B の関与について検討した。

1. イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 の発現、分泌および機能

腫瘍において炎症性微小環境は、腫瘍の発生、促進、成長、浸潤、転移などに影響し、悪性化に関与すると考えられている。がん細胞自身や間質細胞、腫瘍部位に浸潤した白血球が産生するサイトカイン、ケモカイン、成長因子などの炎症性および微小環境因子は、直接的または間接的に腫瘍の発生や成長に適した微小環境を整える作用を有している。炎症性サイトカイン IL-1 β もその 1 つであり、他の炎症性遺伝子の発現を誘導し腫瘍の進行や転移に関わると考えられている。

MMP は、種々の細胞外マトリックスの構成要素を分解する機能を有するエンドペプチダーゼファミリーであり、その 1 つである MMP-3 は、ストロメライシン-1 とも呼ばれ、IV, V, IX, X 型コラーゲン、ラミニン、エラスチン、フィブロネクチン、非線維性コラーゲンなどの広範な細胞外基質を分解する。また、MMP-1, MMP-8, MMP-9, MMP-13 などの他の MMP の前駆体を切断して活性化する役割も担っている。MMP-3 は、様々な種類のがんで発現の促進が報告されている。ヒトメラノーマでも MMP-3 の高発現が報告され、悪性メラノーマの浸潤過程への MMP-3 の関与が示唆されている。

本章では、イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株) における IL-1 β 誘導性の MMP-3 の発現と放出と、機能としてのメラノーマ細胞の遊走について検討した。

イヌメラノーマ細胞の培養液中の MMP-3 活性は時間依存的には増加したが、IL-1 β 存在下では活性はさらに増加し、IL-1 β 依存性の MMP-3 放出が認められ、濃度依存性も認められた。IL-1 β 刺激は、イヌメラノーマ細胞における MMP-3 mRNA 発現を時間依存的、濃度依存的に促進した。IL-1 β 刺激はイヌメラノーマ細胞の遊走を促進することがスクラッチアッセイで認められ、MMP-3 阻害剤 UK356618 存在下ではこの IL-1 β による細胞遊走は有意に阻害された。

転移能を有するヒトのメラノーマでは、MMP-3 の高発現と無病生存期間の短縮との関連が報告されており、MMP-3 のがんの転移能への関与が考えられている。実験的には、がん遺伝子導入により作製された高転移能を有するラット胚細胞株では、高レベルの MMP-3 発現が認められ、侵襲性の強い高転移性のヒトメラノーマ細胞株では MMP-3 タンパク質の発現と分泌が観察されている。また、MMP-3 を過剰発現したヒ

メラノーマ細胞をヌードマウスに移植した研究では、細胞増殖と共に転移が有意に増加し、一方、MMP-3 を不活性化させたメラノーマ細胞の移植では転移が抑制される。本章の結果より、イヌメラノーマ細胞において IL-1 β は MMP-3 発現を誘導して放出を促進し、細胞遊走を促進することが示されたことから、イヌメラノーマ細胞の転移に MMP-3 が関与すると考えられる。

2. イヌメラノーマ細胞の IL-1 β 誘導性 MMP-3 発現における NF- κ B の関与

NF- κ B は転写因子として機能するタンパク質複合体であり、炎症やがんなどのヒト疾患と密接に関連する核内転写因子のファミリーの 1 つである。NF- κ B ファミリーは、p65 (RelA), RelB, c-Rel (Rel), p50/p105 (NF- κ B1) および p52/p100 (NF- κ B2) の 5 つのメンバーで構成されている。NF- κ B1 の p105 と NF- κ B2 の p100 はそれぞれ p50 と p52 の前駆体であり、プロテアソームにより限定分解を受けて生成される。本章では、IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現における NF- κ B シグナル伝達経路の関与を検討した。

NF- κ B 阻害剤 TPCA-1 前処理したイヌメラノーマ細胞では IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現が有意に減少した。IL-1 β 刺激した細胞では、p65 および p105 の一過性のリン酸化が促進され、NF- κ B 阻害剤存在下では p65 と p105 のリン酸化は有意に抑制された。I κ B α は、非刺激細胞で p65 や p50 サブユニットと複合体を形成して抑制性に機能するタンパク質であるが、IL-1 β 刺激により I κ B α 発現は一過性に減少した。これらの結果より、IL-1 β 刺激による p65 および p105 の活性化が示された。

NF- κ B のシグナル伝達経路は、canonical 経路と non-canonical 経路の 2 つで構成されているが、p65 と p105 が限定分解されて産生される p50 が二量体を形成し、核内に移行し、遺伝子発現を制御するのが canonical 経路である。非刺激細胞では、p65 サブユニットは、ホモダイマーまたは p50 サブユニットとのヘテロダイマーとして存在し、I κ B α などの抑制性 I κ B タンパク質と複合体を形成して細胞質内に局在している。刺激後、I κ B タンパク質は I κ B キナーゼによってリン酸化され、その後ユビキチン化され、プロテアソームにて分解されるが、抑制タンパク質から放出された p65 と p50 が核内に移行し、遺伝子発現を制御する。本章の結果から、イヌメラノーマ細胞においては、IL-1 β 刺激は canonical NF- κ B 経路を活性化し、MMP-3 発現が誘導されたと考えられる。

3. イヌメラノーマ細胞の IL-1 β 誘導性 MMP-3 発現における NF- κ B p65 の関与

前章では、イヌメラノーマ細胞において IL-1 β 誘導性 MMP-3 発現に NF- κ B の活性化が関わることを示した。そこで、本章ではそれぞれのサブユニットの関わりについて、p65 または p105 の siRNA を細胞導入してノックダウンしたイヌメラノーマ細胞を作製し、さらに検討した。

p65 のノックダウン細胞においては、対照とした Scramble siRNA 導入細胞と比較して、IL-1 β 誘導性の MMP-3 mRNA 発現は有意に減少した。一方、p105 ノックダウン細胞においては、対照と同様な IL-1 β 誘導性の MMP-3 mRNA 発現が認められ、ノックダウンの効果は認められなかった。以上の検討に用いた MCM-N1 細胞株とは異なるイヌメラノーマ細胞株、CMe1 細胞、CMMe2 細胞および LMe 細胞を用いて siRNA を用いて p65 と p105 ノックダウン細胞を作製し、IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現を検討すると、いずれの細胞株においても、p105 ノックダウン細胞と比較して、p65 のノックダウン細胞においては IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現は有意に減少した。本章の結果は、イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 発現には NF- κ B p65 の活性化が優位に関与しており、p105 の活性化の関与は低いことを示唆している。

ヒト MMP-3 遺伝子のプロモーターには多型性があり、転写に影響を与えることから、多型部位である 5A および 6A アリルに NF- κ B は作用することが示唆されている。リコンビナント p50 ホモダイマーの MMP-3 遺伝子の多型部位への結合や、p50 と p65 を過剰発現させた線維芽細胞での MMP-3 の発現抑制の報告もある。しかし、p50 には転写活性化ドメインが存在しないため、p50 は MMP-3 の発現抑制因子としての機能が考えられている。一方、p50 と p65 を過剰発現させた単球では、多型部位を介した MMP-3 発現の活性化が報告されている。イヌメラノーマ細胞では、IL-1 β 誘導性の MMP-3 mRNA 発現は p65 ノックダウン細胞で優位に抑制されたので、ヒトで考えられているような MMP-3 遺伝子の多型部位における p65 と p50 を介したメカニズムとは異なると考えられる。

近年、TNF- α などのサイトカインで刺激した細胞での遺伝子発現誘導には、p65 のホモ二量体化と DNA 結合が重要であることが p65 欠損 HeLa 細胞やマウス胚性線維芽細胞を用いて報告された。本章で示したノックダウン細胞の結果からは、p65 のホモ二量体化が重要と考えられる。また、p65 ホモ二量体を介した遺伝子発現には、AP-1 など他の転写因子との協同性が関与することが示唆されている。MMP-3 の発現に NFAT1, zinc-binding protein 89, SOX2, actin-binding protein α -actinin 4 などの転写因子の関与も報告されている

ことから、イヌのメラノーマ細胞における p65 の活性化を介した MMP-3 の発現を明らかにするためには、p65 とこれらの転写因子の関係についてさらに検討する必要があると考えられる。

4. 総括

本研究では、イヌメラノーマ細胞において炎症性サイトカインの IL-1 β が細胞外マトリックスの構成要素を分解する機能を有するマトリックスメタロプロテアーゼの 1 つである MMP-3 発現を促進することを明らかにした。また、IL-1 β 誘導性の MMP-3 が細胞遊走能に関与することから、イヌメラノーマの転移に関与することを示唆した。次に、IL-1 β 刺激が転写因子 NF- κ B を活性化し、それが MMP-3 発現制御に関わることを明らかにした。さらに、siRNA 細胞導入によるノックダウン細胞を用いることにより、イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 発現には p65 の活性化が優位に関わることを明らかにした。MMP-3 の発現は、メラノーマを含む様々な悪性度の高いがん細胞で観察され、がんの悪性化の過程に関わる可能性が考えられている。このことから、本研究の結果は、悪性度の高いイヌメラノーマへの治療に向けての礎になることが期待でき、獣医療にとって大きな貢献が期待できる。