

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

布村 順一

2023

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 の発現, 放出および機能	4
2.1	緒言	5
2.2	材料と方法	6
2.2.1	材料	6
2.2.2	細胞培養	7
2.2.3	MMP-3 活性測定	7
2.2.4	細胞遊走能測定	8
2.2.5	統計学的解析	8
2.2.6	Real-time RT-PCR	8
2.3	結果	9
2.3.1	IL-1 β 誘導性の MMP-3 放出	9
2.3.2	IL-1 β 誘導性の MMP-3 mRNA 発現	9
2.3.3	MMP-3 の細胞遊走への関与	10
2.4	考察	10
第 3 章	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	16
3.1	緒言	17
3.2	材料と方法	17

3.2.1	材料	17
3.2.2	細胞培養	18
3.2.3	Real-time RT-PCR	18
3.2.4	Western blotting	19
3.2.5	統計学的解析	20
3.3	結果	20
3.3.1	NF- κ B 阻害剤による IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現抑制	20
3.3.2	IL-1 β による NF- κ B の活性化と NF- κ B 阻害剤による抑制	21
3.4	考察	21
第 4 章	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	26
4.1	緒言	27
4.2	材料と方法	27
4.2.1	材料	27
4.2.2	細胞培養	28
4.2.3	Real-time RT-PCR	28
4.2.4	Western blotting	29
4.2.5	siRNA の細胞導入	30
4.2.6	統計学的解析	30
4.3	結果	31
4.3.1	NF- κ B p65 および p105 ノックダウン細胞の作製	31
4.3.2	NF- κ B p65 および p105 ノックダウン細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現	31

4.4 考察	32
第5章 総括	38
謝辞	41
参考文献	42

第 1 章

序 論

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。イヌのメラノーマは進行性の腫瘍であり、自然発生が認められる (Bergman, 2007)。そのほとんどが悪性であり、特に口腔内に発生するメラノーマは予後不良を示し (Palma et al., 2021),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 (Bostock et al., 1979)。また、ヒトの粘膜メラノーマに類似しており、遠隔臓器への転移が早く、化学療法の効果も弱い (Gillard et al., 2014; Simpson et al., 2014; Hernandez et al., 2018)。無治療の生存期間が極めて短いために、外科手術などが施されているが、外科治療単独では術後の1年生存率は25% 未満である (Tuohy et al., 2014)。放射線療法や化学療法も行われているが、放射線治療での中央生存期間は約5.3ヶ月～11.9ヶ月であり、顎骨切除などの侵襲的な外科手術を行っても約9ヶ月と非常に短い (Todorof et al., 1979)。化学療法は奏率が約30%と低く、抗がん剤のカルボプラチンと放射線療法の併用で中央生存期間は286日と報告されている (Rassnick et al., 2001)。他に様々な化学療法剤が用いられているが、明らかな有効性は認められていないため、イヌ口腔内メラノーマは予後が非常に悪い腫瘍とされている。そのため、新たな治療戦略が求められている。

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微小環境を作り出す因子としてマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、その中でもMMP-3 に着目し、IL-1 β によるMMP-3の発現および、NF- κ Bの関与について検討した。

第2章では、イヌメラノーマ細胞におけるIL-1 β によるMMP-3のタンパク質の細胞外への放出を培地中のMMP-3活性を測定することを検討した。また、Real-time

RT-PCRによりIL-1 β によるMMP-3 mRNA発現を検討した。さらに、MMP-3阻害剤を用いて、スクラッチアッセイによりMMP-3の機能としての細胞遊走能について検討した。

第3章においては、イヌメラノーマ細胞におけるIL-1 β 誘導性のMMP-3発現制御への転写因子NF- κ Bの関与を検討した。NF- κ Bの関与は、薬理的にNF- κ B阻害剤の効果を検討し、さらに、IL-1 β 刺激細胞でNF- κ Bを構成するp65およびp50の前駆体であるp105の活性化のリン酸化をWestern blottingにて検出することで検討した。

第4章においては、第3章で活性化が示されたNF- κ Bのp65およびp105のsiRNAを細胞導入して、それぞれをノックダウンしたイヌメラノーマ細胞を作成し、IL-1 β 誘導性のMMP-3発現に関わるサブユニットの機能を検討した。

第2章

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

2.1 緒言

インターロイキン-1 (IL-1) は、IL-1 ファミリーの 1 つであり、炎症性サイトカインとして免疫と炎症のメディエーターとしてとして機能することが知られている(Dinarello, 2009)。IL-1 β を含む IL-1 は、様々な種類の腫瘍の微小環境において発現が促進することが報告されており、他の炎症性遺伝子の発現を誘導することにより腫瘍の進行や転移に関わると考えられている (Voronov et al., 2003; Lewis et al., 2006; Litmanovich et al., 2018)。

腫瘍における微小環境とは、腫瘍細胞だけでなく、免疫細胞、線維芽細胞、血管細胞、神経細胞、細胞外マトリックスなど、腫瘍を構成する様々な要素とその相互作用によって形成される局所的な環境のことを指す。

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。しかし、炎症の制御が適切になされないことにより、様々な疾病を引き起こすことに繋がる。炎症は、腫瘍の微小環境を変化させる要因の 1 つであり、炎症性微小環境は、腫瘍の発生、促進、成長、浸潤、転移などの悪性化に影響すると考えられている (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010; Coussens et al., 2013; Fernandes et al., 2015; Hagerling et al., 2015; Schneider et al., 2015; Yang et al., 2017)。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、成長因子などによる様々な炎症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好ましい微小環境を整える作用を有している。

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、コラーゲン、ラミニン、エラスチン、フィブロネクチン、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックス (ECM) 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 (Allan et al., 1995)。基質特異性と細胞内分布から、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメライシン、マトリライシン、膜型 MMP に分類される (Cabral-Pacheco et al., 2020)。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 (Pittayaprupek et al., 2016)。

MMP-3 は、ストロメライシン-1 と呼ばれ、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プロテアーゼである (Chambers et al., 1997; Kähäri et al., 1999)。また、MMP-3 は、MMP-1, MMP-7, 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 (Murphy et al., 1987; Ogata et al., 1992; Knäuper et al., 1993; Kähäri et al., 1999)。MMP-3 は、進行性尿路上皮がん (Gohji et al., 1996)、小細胞肺がん (Michael et al., 1999)、高異型度子宮内膜間質肉腫 (Liokumovich et al., 1999) など、様々ながんで発現の促進が報告されていることからがんとの関連が指摘されている。ヒトでは、メラノーマ (悪性黒色腫) でも MMP-3 の高発現が報告されており、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 (Walker et al., 1999; Bodey et al., 2001)。

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

2.2 材料と方法

2.2.1 材料

イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株) は DS ファーマバイオメディカル株式会社 (日本, 大阪) より入手した。

ダルベッコ改変イーグル培地 (1g/L グルコース含有, DMEM-LG) およびウシ胎児血清 (FBS) は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (日本, 大阪) から購入した。リコンビナントイヌ IL-1 β は, Kingfisher Biotech, Inc. (Saint Paul, MN) から購入した。Culture-Insert 2 Well は ibidi GmbH (Am Klopferspitz, Germany) より購入した。MMP3 Inhibitor Screening Assay Kit は Abcam (Cambridge, UK) から購入した。StatMate IV は, ATMS (日本, 東京) から入手した。

2.2.2 細胞培養

イヌメラノーマ細胞は, 10% FBS 添加 DMEM-LG を用いて, 5% CO₂, 37 °C の条件下で静置培養し, 週に一度培地交換を行った。細胞が 90-95%コンフルエントに達した時点で 0.25%トリプシン-EDTA で細胞を採取し, CELLBANKER 1 plus 培地に 2 \times 10⁶ cells/500 μ L の密度で懸濁させた。細胞懸濁液(500 μ L) を滅菌済み血清チューブに注ぎ, 凍結容器 (BICELL) に入れ, -80°C で凍結保存した。実験使用時にバイセルからチューブを取り出し, 37°Cのウォーターバスに浸けて凍結保存した細胞懸濁液を融解した。解凍した細胞懸濁液を, 10% FBS 添加 DMEM-LG に加え, 300 \times g で 3 分間遠心分離した。細胞ペレットを 10% FBS 入り DMEM-LG に再懸濁し, 75-cm² 培養フラスコに移した。その後, 凍結保存前と同じ条件下で静置培養を行った。細胞が約 90%のコンフルエントに達した時点で, 0.25%トリプシン-EDTA を用いて細胞を回収し, 1 \times 10⁶/75-cm² の培養フラスコの密度で播種した。

2.2.3 MMP-3 活性測定

イヌメラノーマ細胞を 6 ウェル培養プレートに 3.0 \times 10⁵ cells/well の密度で播種した。24 時間の飢餓状態の後, 細胞を IL-1 β で 0-48 時間刺激し, 培養液を回

収した。培養液中の MMP-3 活性は、メーカーの説明書に従って MMP3 Inhibitor Screening Assay Kit に含まれる MMP-3 活性測定用の基質を用いて測定した。

2.2.4 細胞遊走能測定

イヌメラノーマ細胞の遊走能は、スクラッチアッセイを使用して測定した (Kitanaka et al., 2019)。35 mm ディッシュに Culture-Insert 2 Well (ibidi GmbH, Am Klopferspitz, Germany) を置き、70 μ L の細胞懸濁液 (1×10^6 /mL) を Culture-Insert 2 Well の各ウェルに適用して 37°C で 24 時間培養後、細胞培養挿入物を慎重に取り出して IL-1 β で刺激した。位相コントラスト画像は、ImageJ の MRI Wound Healing Tool を使用して解析した (Baecker et al., 2012)。

2.2.5 統計学的解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析は StatMate IV を用いて行った。時間依存性の実験データは二元配置分散分析を用いて解析し、その他の実験データは paired t test を用いて解析した。P 値が 0.05 よりも少ない場合に統計的に有意差があるものと考えた。

2.2.6 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR は、既に報告した方法にて実施した (Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2018; Nakano et al., 2020; Suwabe et al., 2021)。イヌメラノーマ細胞からの total RNA の抽出は、TRIzol 試薬を用いて行った。第一鎖 cDNA の合成は 500 ng の total RNA を用いて PrimeScript RT Master Mix を用いて行った。Real-time RT-PCR は、2 μ L の第一鎖 cDNA、12.5 μ L の SYBR Premix Ex Taq II、イヌ MMP-3 またはコントロールとして用いたハウスキーピングタンパク質である

TATA box binding protein (TBP) に対する 0.4 μM プライマーを含む 25 μL 反応液で実施した。使用したプライマーの塩基配列は表 2-1 に示したものを使用した。無鋳型対照および無逆転対照の Real-time RT-PCR は、それぞれ 2 μL の RNase および DNA フリー水と 2 μL の各 RNA サンプルで行った。PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System II を使用し、95°C 30 秒の変性を 1 サイクル、95°C 5 秒の変性を 40 サイクル、60°C 30 秒のアニーリング/エクステンションを 1 サイクルで行った。結果は、Real-time RT-PCR 解析ソフトを用い、二次微分最大法、比較サイクル閾値 ($\Delta\Delta\text{Ct}$) 法で解析した。内因性コントロールとして、同量の cDNA からの TBP の増幅を適用し、校正標準として、時間 0 のイヌメラノーマ細胞からの cDNA 増幅を使用した。

2.3 結果

2.3.1 IL-1 β 誘導性の MMP-3 放出

イヌメラノーマ細胞を無刺激の状態ですべて 0-48 時間インキュベートすると、培養液中の MMP-3 活性が時間依存的に増加した (図 2-1)。細胞を 100 pM の IL-1 β で 0-48 時間刺激すると、培養液中の時間依存的な MMP-3 活性上昇はさらに促進された (図 2-1a)。これらの結果は、イヌメラノーマ細胞からの MMP-3 放出は構成的になされているが、IL-1 β 刺激により調節がなされると考えられる。

様々な濃度の IL-1 β (0-100 pM) による MMP-3 放出についても検討した。24 時間刺激したメラノーマ細胞では、IL-1 β 刺激による MMP-3 の放出が用量依存的に増加した (図 2-1b)。

2.3.2 IL-1 β 誘導性の MMP-3 mRNA 発現

次に、この IL-1 β 刺激による MMP-3 の活性の上昇が MMP-3 mRNA の転写に

レベルで誘導されるかを確かめるため、イヌメラノーマ細胞における MMP-3 mRNA 発現に対する IL-1 β の効果を検討した。100 pM の IL-1 β でイヌメラノーマ細胞を 0-24 時間刺激すると、図 2-2a に示すように、時間依存的に MMP-3 mRNA 発現は誘導された。種々の濃度の IL-1 β (0-100 pM) で 24 時間刺激したイヌメラノーマ細胞においては、図 2-2b に示すように、IL-1 β の濃度に依存して MMP-3 mRNA 発現が誘導された。これらの結果は、イヌメラノーマ細胞において IL-1 β が MMP-3 mRNA の発現を介して産生を誘導することを示唆している。

2.3.3 MMP-3 の細胞遊走への関与

続いて、MMP-3 の機能としてのイヌメラノーマ細胞の遊走能への関与を検討した。図 2-3 に示すように、イヌメラノーマ細胞を 100 pM IL-1 β で刺激をすると、無刺激に比べて遊走が誘導された。しかし、MMP-3 阻害剤 UK356618 (2 μ M) の存在下では、細胞遊走に対する IL-1 β の効果は有意に阻害された。この結果は、IL-1 β 誘導性の MMP-3 がメラノーマ細胞の遊走に関与することを示唆している。

2.4 考察

本章では、イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性の MMP-3 発現と細胞遊走能への関与を示した。

ヒトにおいて、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る (Kähäri et al., 1999)。このことから、MMP-3 はがんの悪性化の過程に関わる可能性が考えられている (Walker et al., 1999; Bodey et al., 2001)。また、MMP-3 の高発現と患者の生存率との相関は、The Cancer Genomu Atlas (TCGA) でも示されている (Shoshan et al., 2016)。さらに、がん遺伝子を導入して作成し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、MMP-3 発現ががんの転移能と関連することが報告されている (Sreenath et al., 1992)。また、転移能を有するヒトのメラノーマでは、MMP-3 の高発現が無病生存期間の短縮と関連することが報告され (Nikkola et al., 2002), これは Sreenath らの研究結果と一致している。ヒトメラノーマでは、MMP-3 タンパク質の発現と分泌が、侵襲性の強い高転移性の細胞株で観察されている (Shoshan et al., 2016)。MMP-3 を過剰発現したヒト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 を不活性化したメラノーマ細胞の移植では転移が抑制される (Hofmann et al., 1999; Shoshan et al., 2016)。IL-1 β 誘導性のメラノーマ細胞の遊走は MMP-3 阻害剤により有意に阻害されたことから、ヒトメラノーマ細胞の転移に MMP-3 が関与していることを示唆していると考えられる。

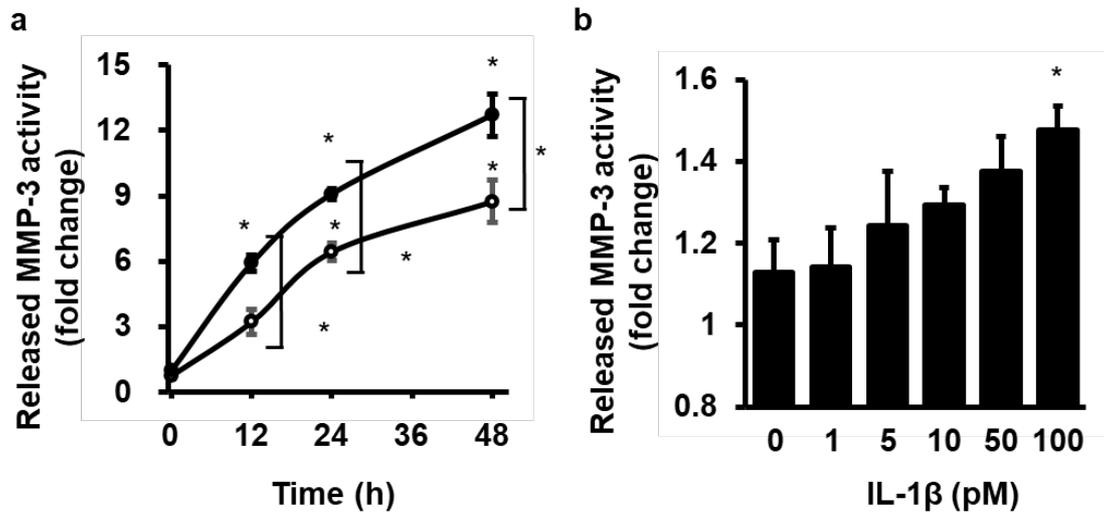


図 2-1. イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 タンパク質放出

(a) イヌメラノーマ細胞を IL-1 β (100 pM) 存在下 (●) および非存在下 (○) で 0-48 時間インキュベートし, medium 中に放出された MMP-3 タンパク質を測定した。(b) イヌメラノーマ細胞を 0-100 pM の IL-1 β で 24 時間刺激をし, medium 中に放出された MMP-3 タンパク質を測定した。結果は, 3 回の独立した実験結果の平均 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$.

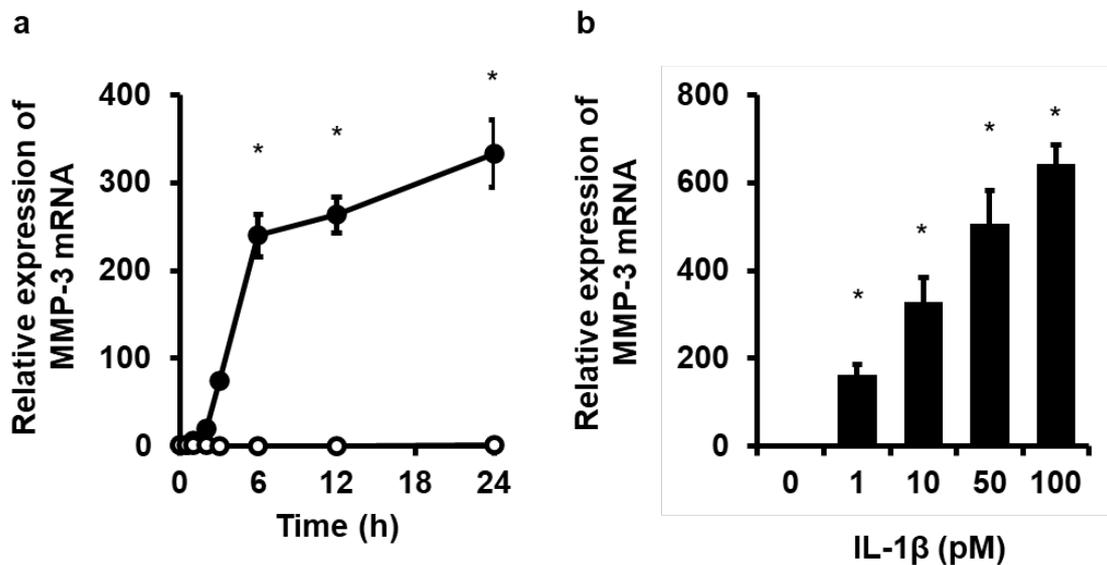


図 2-2. イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現

(a) イヌメラノーマ細胞を IL-1 β (100 pM) 存在下 (●) および非存在下 (○) で 0-24 時間インキュベートし、Real-time RT-PCR により MMP-3 mRNA 発現の変化を測定した。(b) イヌメラノーマ細胞を 0-100 pM の IL-1 β で 24 時間刺激をし、Real-time RT-PCR により MMP-3 mRNA 発現の変化を測定した。TBP を内部標準として使用し、MMP-3 mRNA の発現レベルを 0 時間での発現と比較した。結果は、3 回の独立した実験結果の平均 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$.

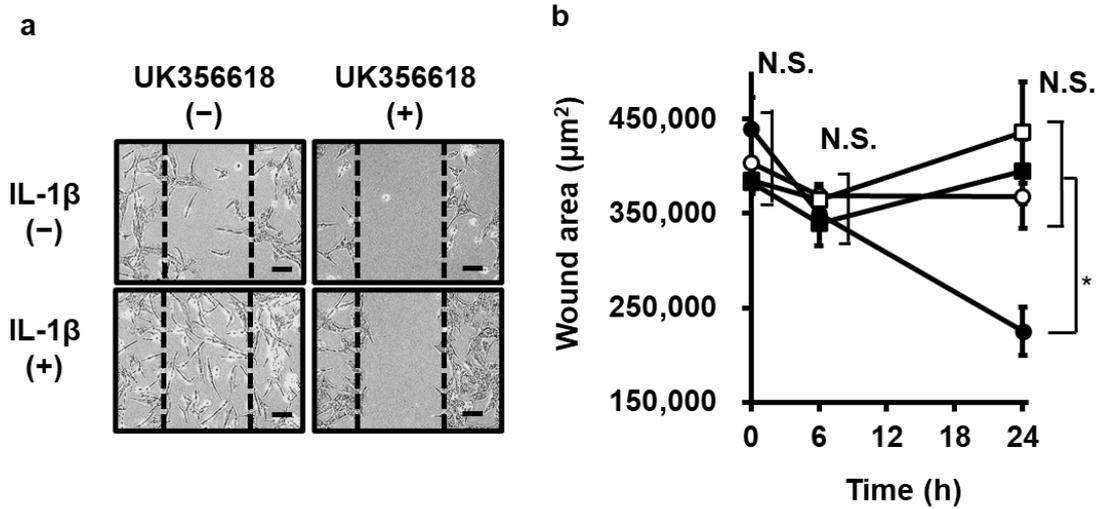


図 2-3. MMP-3 阻害剤による IL-1 β 誘導性イヌメラノーマ細胞の遊走の抑制

イヌメラノーマ細胞を、MMP-3 阻害剤 UK356618 (2 μ M) の存在下 (■) および非存在下 (□) で 2 時間前処理した後、100 pM IL-1 β の存在下 (●) および非存在下 (○) で 0-24 時間インキュベートし、細胞の遊走能を傷面積の変化により測定した。MMP-3 阻害剤により IL-1 β によるイヌメラノーマ細胞の遊走は有意に抑制された。(a) 代表的な 24 時間目の結果を示す。(b) 3 回の独立した実験結果の平均 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 。

表 2-1 Primer sequences for RT-qPCR.

Gene Name	Gene bank ID	Primer sequences
<i>MMP-3</i>	NM_001002967.1	F: 5'- TGACGATGATGAACAATGGACAAG-3' R: 5'- GCTAGGGTCAGCCGAGTGAAAG-3'
<i>TBP</i>	XM_863452	F: 5'-ACTGTTGGTGGGTCAGCACAAG-3' R: 5'-ATGGTGTGTACGGGAGCCAAG-3'

第3章

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

3.1 緒言

核内因子 κ B (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。免疫グロブリン κ 鎖遺伝子のエンハンサー領域に結合するタンパク質として発見され (Sen et al., 1986), NF- κ B ファミリーと呼ばれる 5 つのメンバー, p65 (RelA), RelB, c-Rel (Rel), p50/p105 (NF- κ B1) および p52/p100 (NF- κ B2) で構成され, 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 つとなっている (Lawrence, 2009; Baker et al., 2011; Ben-Neriah et al., 2011; Hayden et al., 2012; Xia et al., 2014)。また, 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ことが知られている (Baker et al., 2011; Hayden et al., 2012)。

第 2 章では, イヌのメラノーマ細胞における IL-1 β 刺激が MMP-3 発現を促進することを明らかにした。一方, IL-1 β は, 転写因子である NF- κ B の活性化を介して, MMP を含む多くのタンパク質の mRNA 発現に関わることが知られている。そこで本章では, イヌのメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 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。

3.2 材料と方法

3.2.1 材料

前章と同様に, イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株, 13 歳雄イヌ, 染色体数 $2n=74$) は DS ファーマバイオメディカル株式会社 (大阪, 日本) より入手した。ダルベッコ改変イーグル培地 (1g/L グルコース含有, DMEM-LG), HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) および PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した。リコンビナントイヌ IL-1 β は, Kingfisher Biotech, Inc. (Saint Paul, MN) から購入し

た。NF- κ B 阻害剤である TPCA-1 (2-[(aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide)はバイオテクネジャパン (東京, 日本) より購入した。TRIzol は Life Technologies Co. (Carlsbad, CA) から購入した。SYBR Premix Ex Taq II, Thermal Cycler Dice Real Time System II, PrimeScript RT Master Mix, TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio Inc. (滋賀, 日本) から購入した。ヒトリン酸化 p65 (93H1), ヒト total-p65, ヒトリン酸化 p105 およびヒト total-p105 に対するウサギモノクローナル抗体は, Cell Signaling Technology Japan, K.K. (Tokyo, Japan) から購入した。マウス β -actin に対するマウスモノクローナル抗体 (AC74) は, Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO)から購入した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識 (HRP 標識) 抗マウス IgG および抗ウサギ IgG 抗体, ImageQuant LAS 4000 mini および ECL Western blotting Analysis System は GE Healthcare (Piscataway, NJ)から購入した。Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes と Mini-PROTEAN TGX gel は Bio-Rad (Hercules, CA) から購入した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture と Block Ace は Roche (Mannheim, Germany) から購入した。StatMate IV は, ATMS (日本, 東京) から入手した。

3.2.2 細胞培養

前章に詳述したように, 凍結保存したイヌメラノーマ細胞懸濁液を融解し, 75-cm² の培養フラスコに 1 \times 10⁶ 個の密度で播種した。10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加 DMEM-LG を用いて, 5% CO₂, 37°Cのインキュベーターで静置培養し, 実験に供した。週に一度培地の交換を行った。

3.2.3 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR は, 既に前章にて報告した方法にて実施した。イヌメラノーマ

マ細胞からの total RNA の抽出は、TRIzol 試薬を用いて行った。第一鎖 cDNA の合成は 500 ng の total RNA を用いて PrimeScript RT Master Mix を用いて行った。(Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2018; Nakano et al., 2020; Suwabe et al., 2021)。Real-time RT-PCR は、2 μ L の第一鎖 cDNA、12.5 μ L の SYBR Premix Ex Taq II、イヌ MMP-3 またはコントロールとして用いたハウスキーピングタンパク質である TATA box binding protein (TBP) に対する 0.4 μ M プライマーを含む 25 μ L 反応液で実施した。使用したプライマーの塩基配列は表 2-1 に示したものを使用した。無鋳型対照および無逆転対照の Real-time RT-PCR は、それぞれ 2 μ L の RNase および DNA フリー水と 2 μ L の各 RNA サンプルで行った。PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System II を使用し、95°C 30 秒の変性を 1 サイクル、95°C 5 秒の変性を 40 サイクル、60°C 30 秒のアニーリング/エクステンションを 1 サイクルで行った。結果は、Real-time RT-PCR 解析ソフトを用い、二次微分最大法、比較サイクル閾値 ($\Delta\Delta$ Ct) 法で解析した。内因性コントロールとして、同量の cDNA からの TBP の増幅を適用し、校正標準として、時間 0 のイヌメラノーマ細胞からの cDNA 増幅を使用した。

3.2.4 Western blotting

Western blotting は、以前に報告した方法を用いて行った (Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2018; Nakano et al., 2020; Suwabe et al., 2021)。

サンプルバッファー (20 mM HEPES, 1 mM PMSF, 10 mM sodium fluoride および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, pH 7.4) を用いてイヌメラノーマ細胞の lysate を作成した。タンパク質濃度を Bradford 法 (Bradford, 1976) にて定量した後、dithiothreitol (DDT) 添加 sodium dodecyl sulfite (SDS) バッファーを加えて 98°C で 5 分間煮沸した。サンプルを 10 μ g ずつ 7.5%または

12% Mini-PROTEAN TGX gel にロードし、電気泳動にてタンパク質の分画を行った。分画後、PVDF 膜へ転写し、Block Ace にて 50 分間室温にてブロッキングを行った。その後、PVDF 膜を一次抗体[p-p65 (1:1000), t-p65 (1:1000), p-p105 (1:1000), t-p105 (1:1000), β -actin (1:10,000)および β -actin (1:10,000)] を用いて、室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後、膜を HRP-conjugated anti-rabbit IgG または HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:10,000) と共に室温で 90 分間インキュベートした。免疫反応は ECL Western blotting Analysis System を用いて検出した。PVDF 膜の化学発光シグナルは Amersham ImageQuant 8000 を用いて測定した。

3.2.5 統計学的解析

統計解析は StatMate IV を用いて行った。データは平均値 \pm 測定値の標準誤差で示した。実験データは paired t test を用いて解析した。

3.3 結果

3.3.1 NF- κ B 阻害剤による IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現抑制

最初に、転写因子である NF- κ B のイヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現への関与を薬理的に検討した。第 2 章で示したように、イヌメラノーマ細胞を IL-1 β (100 pM) で 24 時間刺激すると、MMP-3 mRNA 発現は有意に増加した。一方、NF- κ B 阻害剤である TPCA-1 (10 μ M) で 1 時間前処理したメラノーマ細胞では、図 3-1 に示すように、IL-1 β による MMP-3 mRNA の発現が著しく抑制された。この結果は、イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現に NF- κ B 活性化が関与していることを示唆している。

3.3.2 IL-1 β による NF- κ B の活性化と NF- κ B 阻害剤による抑制

IL-1 β を含むサイトカインは NF- κ B p65 や p105 の活性化を介して様々なタンパク質の発現に関わることが知られている。p65 や p105 はリン酸化により活性化される。そこで、IL-1 β 刺激されたイヌメラノーマ細胞における NF- κ B のリン酸化を検討した。細胞を 100 pM の IL-1 β で 0-180 分間刺激すると、図 3-2a および b に示すように、刺激後 5-15 分に p65 が 5-30 分に p105 の一過性のリン酸化が認められた。

IL-1 β による p65 と p105 のリン酸化に対する NF- κ B 阻害剤 TPCA-1 の効果を検討した。図 3-3a および b に示すように、TPCA-1 (10 μ M) で 1 時間前処理したメラノーマ細胞では、IL-1 β 誘導性の p65 と p105 のリン酸化は有意に抑制された。これらの結果は、IL-1 β が NF- κ B の活性化を介して MMP-3 mRNA の発現制御に関わることを強く示唆している。

3.4 考察

本章では、イヌメラノーマ細胞を IL-1 β 刺激することで NF- κ B の p65 および p105 の活性化が認められ、NF- κ B 阻害剤が IL-1 β による NF- κ B 活性化を抑制し、同時に IL-1 β 刺激による MMP-3 mRNA 発現を抑制することから、イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 発現制御に NF- κ B が関与することを明らかにした。

NF- κ B のシグナル伝達経路は、canonical (古典的) 経路と non-canonical (非古典的) 経路の 2 つから構成されている (Hayden et al., 2012; Mitchell et al., 2016; Sun, 2017)。canonical 経路では、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。一方、non-canonical 経路においては、p100 の限定分解により産生された p52 が DNA に結合して転

写活性を示す (Hayden et al., 2012; Mitchell et al., 2016; Sun, 2017)。IL-1 β を含むサイトカインは canonical 経路を介するとされているが、イヌメラノーマ細胞においても、IL-1 β 刺激は p65 および p105 を活性化したことから、canonical NF- κ B 経路を介して MMP-3 発現がなされると考えられる。

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、細胞質内に局在している (Beg et al., 1992; Ganchi et al., 1992; Ferrari et al., 1997; Marui et al., 2005)。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。

一方、抑制タンパク質から放出された p65 は様々なタンパク質リン酸化酵素によりリン酸化され、二量体として核内に移行し、遺伝子発現を制御する (Karin, 1999; Lawrence, 2009; Hayden et al., 2012; Mitchell et al., 2016)。p105 もリン酸化により限定分解され p50 が産生され、p65 と二量体を形成する。本章で得られた結果からは、イヌメラノーマ細胞においても p65 や p105 のリン酸化が NF- κ B のシグナル伝達の重要な機能に関わることが考えられる。

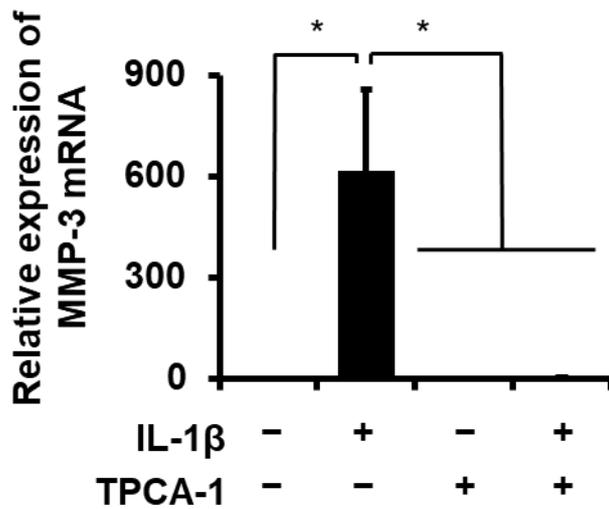


図 3-1. NF- κ B 阻害剤 TPCA-1 による IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現の抑制
 イヌメラノーマ細胞を TPCA-1 (10 μ M) の存在下および非存在下で 1 時間前処理し、その後 IL-1 β (100pM) の存在下および非存在下で 24 時間インキュベート後、MMP-3 mRNA 発現レベルを測定した。TBP を内部標準として使用し、IL-1 β 刺激したメラノーマ細胞における MMP-3 mRNA の発現レベルを 0 時間での発現と比較した。結果は、平均値 \pm 標準誤差 (SE) として表す。* P <0.05.

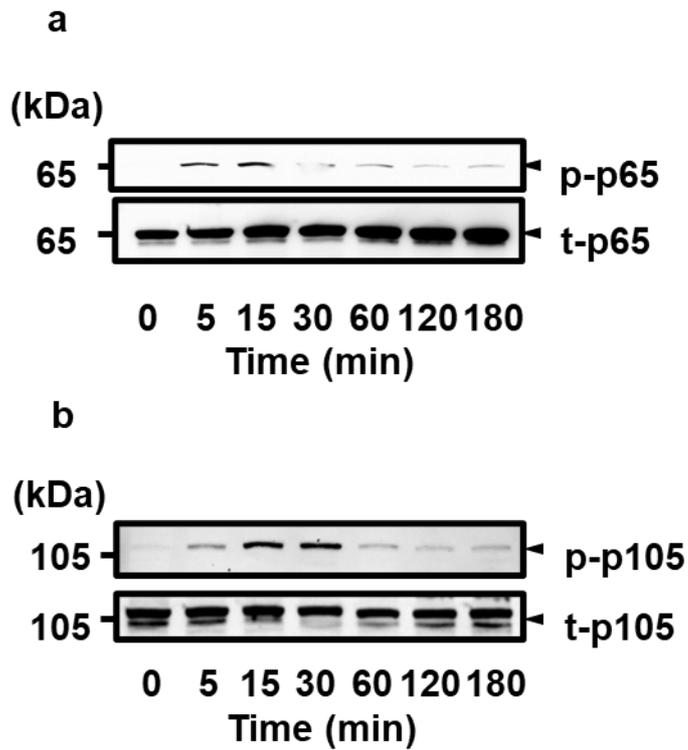


図 3-2. イヌメラノーマ細胞における IL-1 β による NF- κ B の活性化

イヌメラノーマ細胞を IL-1 β (100 pM) で刺激し、リン酸化 p65 (p-p65) および total p65 (t-p65) 発現 (a), リン酸化 p105 (p-p105) および total p105 (t-p105) 発現 (b) を Western blotting にて検出した。3 例の代表的な結果を示す。p-p65 と p-p105 の一過性の変化が認められた。

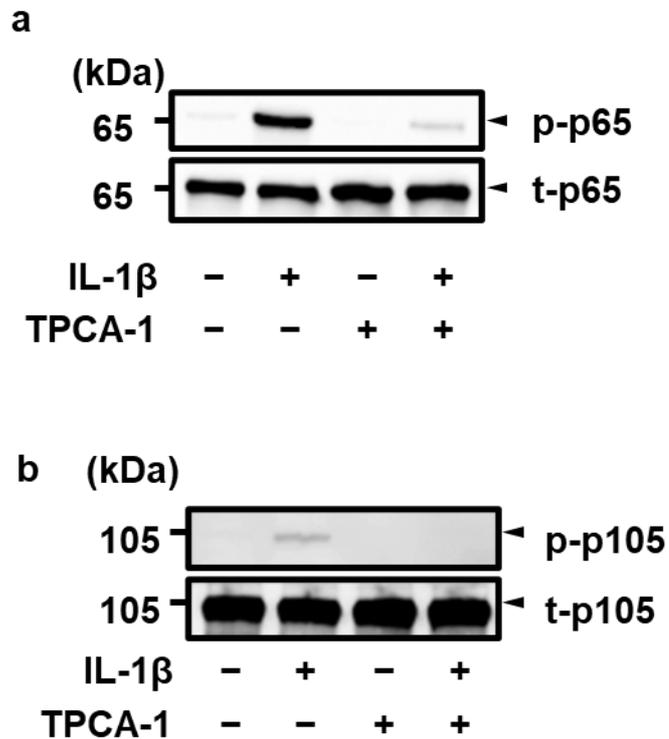


図 3-3. NF- κ 阻害剤 TPCA-1 による IL-1 β 依存性 p65 と p105 のリン酸化の抑制
 イヌメラノーマ細胞を TPCA-1 (10 μ M) の存在下および非存在下で 1 時間前処理し、IL-1 β (100 pM) で 15 分間刺激しリン酸化 p65 (p-p65) および total p65 (t-p65) 発現 (a), リン酸化 p105 (p-p105) および total p105 (t-p105)発現 (b) を Western blotting にて検出した。3 例の代表的な結果を示す。TPCA-1 により IL-1 β 誘導性の p65 と p105 のリン酸化の阻害が認められた。

第4章

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

4.1 緒言

NF- κ B は転写因子の 1 つであり、ヒトにおいては炎症やがんなどの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 (Lawrence, 2009; Baker et al., 2011; Ben-Neriah et al., 2011; Hayden et al., 2012; Xia et al., 2014)。NF- κ B は、p65 (RelA), RelB, c-Rel (Rel), p50/p105 (NF- κ B1) および p52/p100 (NF- κ B2) の 5 つのファミリーと称されるメンバーで構成されており、この NF- κ B ファミリーメンバーのタンパク質は、アミノ末端に Rel homology domain を有し、この構造が DNA との結合やホモおよびヘテロ二量体複合体形成に関わっている (Lawrence, 2009; Hayden et al., 2012)。

前章では、イヌメラノーマ細胞において炎症性サイトカインである IL-1 β が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、また、その IL-1 β の効果には NF- κ B p65 および p105 の活性化が関わることを示唆した。しかしながら、それぞれのサブユニットについての検討がなされていないことから、本章においては、NF- κ B のサブユニットの関わりについて検討した。

4.2 材料と方法

4.2.1 材料

前章と同様に、イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株) は DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan) より入手した。また、別のイヌメラノーマ細胞株 (CMe1, CMMe2 および LMe 細胞株) は東京大学の中川貴之先生よりご提供いただいた。ダルベッコ改変イーグル培地 (1g/L グルコース含有, DMEM-LG), フッ化ナトリウム, HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) および PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。リコンビナントイヌ IL-1 β は, Kingfisher Biotech, Inc. (Saint

Paul, MN) から購入した。TRIzol, Lipofectamine 2000 および Opti-MEM は Life Technologies Co. (Carlsbad, CA) から購入した。SYBR Premix Ex Taq II, Thermal Cycler Dice Real Time System II, PrimeScript RT Master Mix, TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan) から購入した。ヒト total-p65, ヒト total-p105 に対するウサギモノクローナル抗体は, Cell Signaling Technology Japan, K.K. (Tokyo, Japan) から購入した。マウス β -actin 抗体に対するマウスモノクローナル抗体 (AC74) は, Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO) から購入した。Horseshoe peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG および抗ウサギ IgG 抗体, Amersham ImageQuant 800 および ECL Western blotting Analysis System は GE Healthcare (Piscataway, NJ) から購入した。Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes と Mini-PROTEAN TGX gel は Bio-Rad (Hercules, CA) から購入した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture and Block Ace は Roche (Mannheim, Germany) から購入した。StatMate IV は, ATMS (Tokyo, Japan) から入手した。

4.2.2 細胞培養

前章に詳述したように、凍結保存したイヌメラノーマ細胞懸濁液を融解し、75-cm² の培養フラスコに 1×10^6 個の密度で播種した。10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加 DMEM-LG を用いて、5% CO₂, 37°C のインキュベーターで静置培養し、実験に供した。週に一度培地の交換を行った。

4.2.3 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR は、第 2 章で報告した方法にて実施した。イヌメラノーマ細胞からの total RNA の抽出は、TRIzol 試薬を用いて行った。第一鎖 cDNA の合成は 500 ng の total RNA を用いて PrimeScript RT Master Mix を用いて行った。

(Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2018; Nakano et al., 2020; Suwabe et al., 2021)。

Real-time RT-PCR は、2 μ L の第一鎖 cDNA、12.5 μ L の SYBR Premix Ex Taq II、イヌ MMP-3 またはコントロールとして用いたハウスキーピングタンパク質である TATA box binding protein (TBP) に対する 0.4 μ M プライマーを含む 25 μ L 反応液で実施した。使用したプライマーの塩基配列は表 2-1 に示したものをを使用した。無鋳型対照および無逆転対照の Real-time RT-PCR は、それぞれ 2 μ L の RNase および DNA フリー水と 2 μ L の各 RNA サンプルで行った。PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System II を使用し、95°C 30 秒の変性を 1 サイクル、95°C 5 秒の変性を 40 サイクル、60°C 30 秒のアニーリング/エクステンションを 1 サイクルで行った。結果は、Real-time RT-PCR 解析ソフトを用い、二次微分最大法、比較サイクル閾値 ($\Delta\Delta$ Ct) 法で解析した。内因性コントロールとして、同量の cDNA からの TBP の増幅を適用し、校正標準として、時間 0 のイヌメラノーマ細胞からの cDNA 増幅を使用した。

4.2.4 Western blotting

Western blotting も前章と同様に行った。サンプルバッファー (20 mM HEPES, 1 mM PMSF, 10 mM フッ化ナトリウムおよび complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, pH 7.4) を用いてイヌメラノーマ細胞の lysate を作成した。タンパク質濃度を Bradford 法 (Bradford, 1976) にて定量した後、dithiothreitol (DDT) 添加 sodium dodecyl sulfate (SDS) バッファーを加えて 98°C で 5 分間煮沸したサンプルを 10 μ g ずつ 7.5%または 12% Mini-PROTEAN TGX gel にロードし、電気泳動にてタンパク質の分画を行った。分画後、PVDF 膜へ転写し、Block Ace にて 50 分間室温にてブロッキングを行った。その後、PVDF 膜を一次抗体 [t-p65 (1:1000), t-p105 (1:1000) および β -actin (1:10,000)] を用いて、室

温で 120 分間インキュベートした。洗浄後、膜を HRP-conjugated anti-rabbit IgG または HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:10,000) と共に室温で 90 分間インキュベートした。免疫反応は ECL Western blotting Analysis System を用いて検出した。PVDF 膜の化学発光シグナルは Amersham ImageQuant 800 を用いて測定した。

4.2.5 siRNA の細胞導入

siRNA の細胞導入は、以前に報告した方法で実施した (Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2018; Nakano et al., 2020; Suwabe et al., 2021)。イヌメラノーマ細胞を 1×10^5 cells/35 mm dish または 5×10^5 cells/90 mm dish の密度で播種し、 $5 \mu\text{L/mL}$ Lipofectamine 2000 と 100 nM p65, p105 または scramble siRNA を含む Opti-MEM で 6 時間トランスフェクションした後、培地を 10% FBS 入り DMEM-LG に変え、5% CO₂, 37°C の条件下で 5 日間培養した。表 4-1 に 使用した siRNA の配列を示す。siRNA の効率を、Western blotting により確認した。

4.2.6 統計学的解析

統計解析は StatMate IV を用いて行った。データは独立した 3 例の実験結果の平均値 \pm 測定値の標準誤差で示した。データは一元配置分散分析にてそれぞれ分析した。

4.3 結果

4.3.1 NF- κ B p65 および p105 ノックダウン細胞の作製

IL-1 β を介した MMP-3 mRNA 発現への NF- κ B p65 および p105 それぞれの関与を検討するために、p65 または p105 の siRNA を細胞導入し、p65 または p105 ノックダウンしたイヌメラノーマ細胞を作成した。図 4-1 に示すように、対照とした scramble siRNA を導入したメラノーマ細胞と比較して、p65 または p105 siRNA を導入したメラノーマ細胞では、それぞれ p65 または p105 タンパク質発現の明らかな減少が Western blotting により確認された。

4.3.2 NF- κ B p65 および p105 ノックダウン細胞における IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現

p65 または p105 siRNA を導入してノックダウンしたイヌメラノーマ細胞における IL-1 β による MMP-3 mRNA 発現への効果を検討した。図 4-2 に示すように、対照とした scramble siRNA を導入したメラノーマ細胞においては、IL-1 β は MMP-3 mRNA 発現を促進したが、p65 のノックダウン細胞においては IL-1 β 誘導性の MMP-3 mRNA 発現は著しく減少した。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 発現が認められた。

さらに、別のイヌメラノーマ細胞株である CMe1, CMMe2 および LMe 細胞株を用いて、p65 または p105 siRNA を導入によるノックダウン細胞を作製し、IL-1 β による MMP-3 mRNA 発現への効果を検討した。図 4-3 に示すように、いずれの細胞株においても、p65 ノックダウン細胞では、p105 のノックダウン細胞と比較すると、IL-1 β 誘導性の MMP-3 mRNA 発現は有意に抑制された。これらの結果から、イヌメラノーマ細胞において、IL-1 β による MMP-3 の発現には NF- κ B p65 の活性化が p105 の活性化よりも優位に関与していることが示唆された。

4.4 考察

前章では、IL-1 β で刺激したイヌメラノーマ細胞では p65 および p105 のリン酸化が認められ、活性化が示された。しかしながら、本章においては、siRNA を用いたノックダウン細胞においては、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 p105 の活性化の関与は弱く、p65 の活性化が発現制御に関わることが明らかとなった。

MMP-3 遺伝子の転写調節部位はまだ同定されていないが、ヒトにおいては MMP-3 発現の転写調節に NF- κ B が関与することが報告されている (Bond et al., 1999; 2001; Borghaei et al., 2002; Chase et al., 2002; Bondeson et al., 2007; Souslova et al., 2010)。MMP-3 遺伝子のプロモーターには多型性があり、転写に影響を与えていることから、NF- κ B は多型部位である 5A および 6A アリルに作用することが示唆されている (Borghaei et al., 2004; 2009; Souslova et al., 2010)。

リコンビナント p50 ホモダイマーが MMP-3 遺伝子の多型部位に結合することや、線維芽細胞に p50 と p65 を過剰発現させると MMP-3 の発現が抑制されることが報告されている (Borghaei et al., 2004; 2009)。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機能していると考えられている (Borghaei et al., 1999; 2004; 2009)。一方、単球においては、p50 と p65 を過剰発現させると、多型部位への結合を介して MMP-3 の発現が活性化されることが報告されている (Souslova et al., 2010)。イヌメラノーマ細胞では、前章に示したように、IL-1 β 刺激では p65 だけでなく p50 の前駆体である p105 の活性化が認められた。しかしながら、本章で明らかにしたように、IL-1 β 誘導性の MMP-3 mRNA 発現は p65 ノックダウン細胞では抑制されたが、p105 ノックダウン細胞では認められなかったことから、イヌメラノーマ細胞における IL-1 β 誘導性の MMP-3 発現は、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 p105 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 (Riedlinger et al., 2019)。

本章で示したノックダウン細胞の結果からも、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 (Riedlinger et al., 2019)。MMP-3 の発現に NFAT1 (Shoshan et al., 2016), zinc-binding protei-89 (Ye et al., 1999; Borghaei et al., 2016), SOX2 (Girouard et al., 2012), actin-binding protein α -actinin 4 (Aksenova et al., 2013) 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。

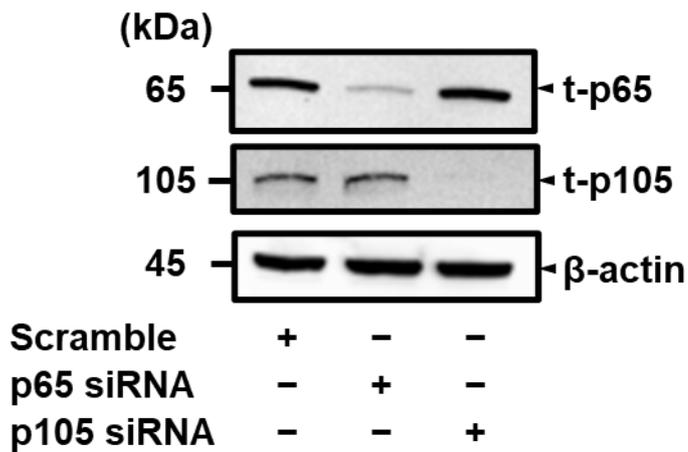


図 4-1. NF- κ B p65 および p105 siRNA 導入イヌメラノーマ細胞における p65 および p105 タンパク質発現の低下

イヌメラノーマ細胞に p65, p105 siRNA または対照として scramble siRNA を導入後, total p65 (t-p65) または total p105 (t-105) 発現を Western blotting にて検出した。内在性コントロールとして β -actin を用いた。対照と比較して, p65 または p105 siRNA 導入細胞ではそれぞれ p65 または p105 の発現低下が認められた。結果は, 3 回の独立した実験結果の代表例を示す。

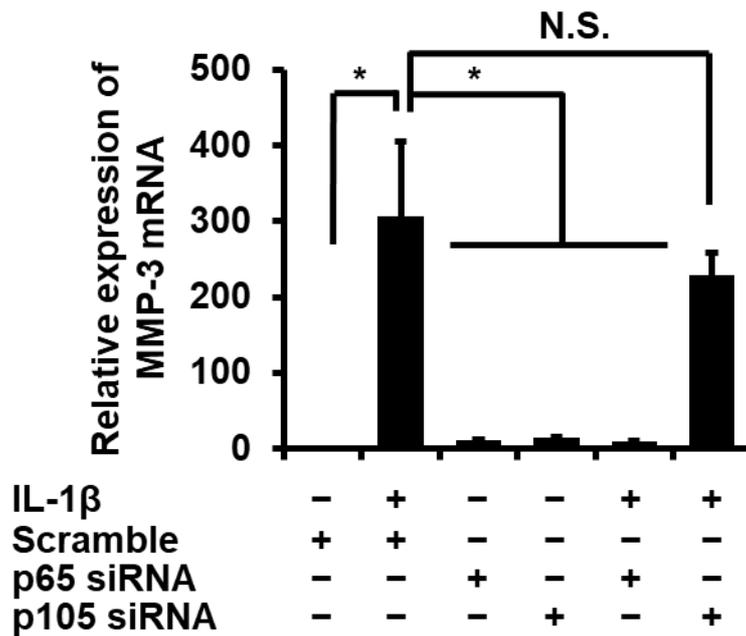


図 4-2. NF-κB p65 および p105 siRNA 導入イヌメラノーマ細胞における IL-1β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現

NF-κB p65, p105 または scramble siRNA を導入したイヌメラノーマ細胞を, IL-1β (100 pM) の存在下および非存在下で 24 時間インキュベートした後, MMP-3 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて測定した。内部標準として TBP を使用し, 対照としたスクランブル RNA および p105 siRNA 導入細胞においては IL-1β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現の促進が認められたが, p65 siRNA 導入細胞においては, IL-1β による MMP-3 mRNA 発現は有意に抑制された。結果は, 3 回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。* $P < 0.05$.

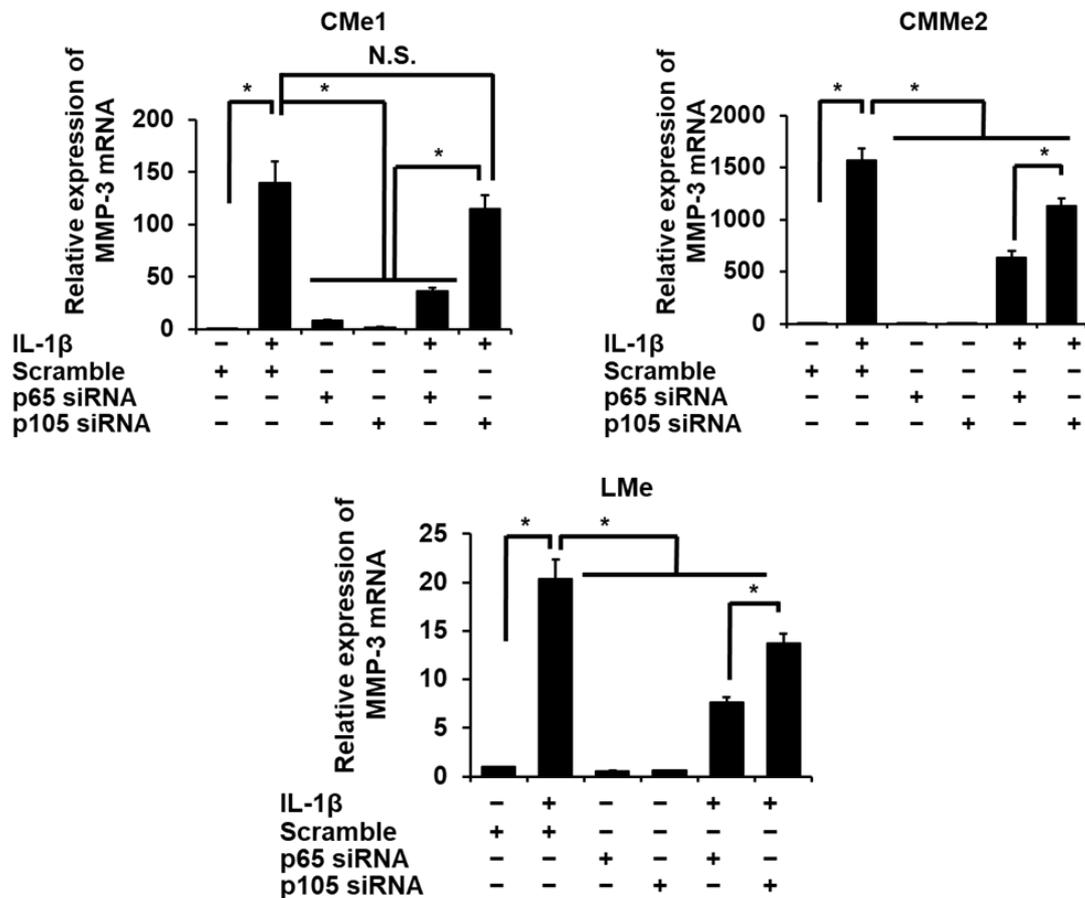


図 4-3. 各種イヌメラノーマ細胞株における IL-1β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現に対する NF-κB p65 および p105 siRNA 導入の効果

CMe1, CMMe2 および LMe イヌメラノーマ細胞に NF-κB p65, p105 または scramble siRNA を導入後, IL-1β (100 pM) の存在下および非存在下で 24 時間インキュベートした後, MMP-3 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて測定した。内部標準として TBP を使用した。p65 siRNA 導入細胞においては, p105 siRNA 導入細胞よりも IL-1β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現の有意な抑制が認められた。結果は, 3 回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 。

表 4-1 Sequences for siRNA transfection.

Gene Name	GenBank ID	siRNA sequences
<i>p65/RelA</i>	XM_014121307.2	GCAUCUCCUGGUCACCAA
<i>p105</i>	AB183419.1	CUGCAAAGGUUAUUGUUCA

第5章

総括

イヌの口腔内メラノーマは全口腔内悪性腫瘍の中で最も多く認められ、治療法も確立されておらず、予後も極めて悪い腫瘍である。一方、腫瘍の微小環境において炎症は、腫瘍の悪化に関与すると考えられている。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炎症に中心的な役割を担うサイトカイン IL-1 β 刺激を行った時の応答能としてのマトリックスメタロプロテアーゼの1つである MMP-3 の発現と、その発現に関わる転写因子 NF- κ B の役割について検討した。

第2章では、イヌメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞) において、IL-1 β は細胞外マトリックスの構成要素を分解する MMP-3 の mRNA 発現を促進することを明らかにした。また、IL-1 β 刺激で細胞の培養液中の MMP-3 活性が上昇することを示し、IL-1 β 刺激はメラノーマ細胞の遊走を促進するが、MMP-3 阻害剤により IL-1 β による細胞遊走が抑制されることから、IL-1 β 誘導による MMP-3 発現はメラノーマの転移に関わることを示唆した。

第3章では、イヌメラノーマ細胞において IL-1 β 刺激は転写因子 NF- κ B の p65 および p105 のリン酸化を引き起こすことを示し、NF- κ B の活性化を介して、MMP-3 の転写を誘導することを明らかにした。

第4章では、イヌメラノーマ細胞に siRNA 細胞導入し、NF- κ B p65 および p105 ノックダウン細胞を作製し、IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現の確認をした。NF- κ B p65 ノックダウン細胞により、IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現は抑制されたが、p105 ノックダウン細胞では有意な抑制は認められないことを示し、さらに、MCM-N1 細胞以外のイヌメラノーマ細胞 (CMe1, CMMe2 および LMe 細胞) においても、p65 ノックダウンは IL-1 β 誘導性 MMP-3 mRNA 発現を有意に抑制することを示した。

以上の結果より、イヌメラノーマ細胞においては、IL-1 β 誘導性に p65 の活性化を介した MMP-3 発現が促進されることを明らかにし、また、メラノーマの転移に関わることを示唆し、イヌメラノーマにおける微小環境である炎症と関わり的一端を明らかにした (Nunomura et al., 2022)。

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、NF- κ B、特に NF- κ B p65 がイヌメラノーマの治療標的となる可能性を示し、悪性度の高いイヌメラノーマの治療に向けての礎になることが期待できる。

謝 辞

本研究を纏めるにあたり，終始ご指導ご鞭撻いただきました日本大学獣医放射線学研究室教授 中山智宏先生，杉谷博士名誉教授，獣医薬理学研究室教授 山崎 純先生，獣医伝染病学研究室教授 小川健司先生，理化学研究所の中野令先生に深謝いたします。

また，さまざまな議論に多くの時間をいただきました共同研究者の，諏訪部陽子先生，成毛淳人先生，岡田純一先生，中野真澄氏，ありがとうございました。

最後に，獣医放射線学研究室の合屋征二郎先生，大学院受験のきっかけをいただきましたマーブル動物医療センター 難波信一先生，兩名には時に夜中まで公私にわたり様々なご指導ご鞭撻を頂戴しましたこと，大変感謝しております。

皆様誠にありがとうございました。

参考文献

- Aksenova V, Turoverova L, Khotin M, Magnusson KE, Tulchinsky E, Melino G, Pinaev GP, Barlev N, Tentler D. Actin-binding protein alpha-actinin 4 (ACTN4) is a transcriptional co-activator of RelA/p65 sub-unit of NF- κ B. *Oncotarget* 2013; 4: 362-372.
- Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J.* 1995; 309: 299–306.
- Baecker V. ImageJ macro tool sets for biological image analysis. Paper presented at the ImageJ User and Developer Conference, Luxembourg, Centre de Recherche Public Henri Tudor, 2012.
- Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* 2011; 13: 11-22.
- Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA, Baldwin AS Jr. I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- κ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev.* 1992; 6: 1899-1913.
- Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat. Immunol.* 2011; 12: 715–723.
- Bergman PJ. Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007; 22: 55–60.
- Bodey B, Bodey B Jr., Siegel SE, Kaiser HE. Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis. *In Vivo.* 2001; 15: 57-64.
- Bond M, Baker AH, Newby AC. Nuclear factor κ B activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 264: 561–567.
- Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF- κ B reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2001; 50: 556–565.
- Bondeson J, Lauder S, Wainwright S, Amos N, Evans A, Hughes C, Feldmann M, Caterson B. Adenoviral gene transfer of the endogenous inhibitor I κ B α into human osteoarthritis synovial fibroblasts demonstrates that several matrix metalloproteinases and aggrecanases are nuclear factor- κ B-dependent. *J Rheumatol.* 2007; 34: 523–533.
- Borghaei RC, Gorski G, Javadi M. NF- κ B and ZBP-89 regulate MMP-3 expression via a polymorphic site in the promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 382:

269-273.

- Borghaei RC, Gorski G, Seutter S, Chun J, Khaselov N, Scianni S. Zinc-binding protein-89 (ZBP-89) cooperates with NF- κ B to regulate expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in response to inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 471: 503-509.
- Borghaei RC, Rawlings PL, Jr., Javadi M, Woloshin J. NF- κ B binds to a polymorphic repressor element in the MMP-3 promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 316: 182–188.
- Borghaei RC, Sullivan C, Mochan E. Identification of a cytokine-induced repressor of interleukin-1 stimulated expression of stromelysin 1 (MMP-3). *J Biol Chem.* 1999; 274: 2126-2131.
- Bostock DE. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet Pathol.* 1979; 16: 32-40.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.
- Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 9739.
- Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1260–1270.
- Chase AJ, Bond M, Crook MF, Newby AC. Role of nuclear factor- κ B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 765–771.
- Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* 2013; 339: 286–291.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 519–550.
- Fernandes JV, Cobucci RN, Jatobá CA, Fernandes TA, de Azevedo JW, de Araújo JM. The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol Oncol Res.* 2015; 21: 527-534.
- Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, Schulze-Osthoff K. Extracellular ATP activates transcription factor NF- κ B through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF- κ B p65. *J Cell Biol.* 1997; 139: 1635-1643.
- Ganchi PA, Sun SC, Greene WC, Ballard DW. I κ B/MAD-3 masks the nuclear

- localization signal of NF- κ B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF- κ B p65 DNA binding. *Mol Biol Cell*. 1992; 3: 1339-1352.
- Gillard M, Cadieu E, De Brito C, Abadie J, Vergier B, Devauchelle P, Degorce F, Dréano S, Primot A, Dorso L, Lagadic M, Galibert F, Hédan B, Galibert MD, André C. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014; 27: 90-102.
- Girouard SD, Laga AC, Mihm MC, Scolyer RA, Thompson JF, Zhan Q, Widlund HR, Lee CW, Murphy GF. SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Lab Invest*. 2012;
- Gohji K, Fujimoto N, Komiyama T, Fujii A, Ohkawa J, Kamidono S, Nakajima M. Elevation of serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 as new predictors of recurrence in patients with urothelial carcinoma. *Cancer* 1996; 78: 2379–2387.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140: 883–899.
- Hagerling C, Casbon AJ, Werb Z. Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends Cell Biol*. 2015; 25: 214-220.
- Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012; 26: 203–234.
- Hernandez B, Adissu HA, Wei BR, Michael HT, Merlino G, Simpson RM. Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 394.
- Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Zendman AJ, Cornelissen IM, Ruiter DJ, van Muijen GN. Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br J Cancer*. 1999; 81: 774-782.
- Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix proteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. *Ann Med* 1999; 31: 34–45.
- Karin, M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 1999; 18: 6867-6874.
- Kitanaka N, Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Konno T, Nakayama T, Sugiya H. NF- κ B p65 and p105 implicate in interleukin 1 β -mediated COX-2 expression in melanoma cells. *PLoS One*. 2018; 13: e0208955.
- Kitanaka N, Nakano R, Sakai M, Kitanaka T, Namba S, Konno T, Nakayama T, Sugiya H. ERK1/ATF-2 signaling axis contributes to interleukin-1 β -induced MMP-3 expression in dermal fibroblasts. *PLoS ONE* 2019; 14: e0222869.
- Knäuper V, Wilhelm SM, Seperack PK, DeClerck YA, Langley KE, Osthues A,

- Tschesche H. Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochem J.* 1993; 295: 581–586.
- Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 2009; 1: a001651.
- Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med.* 2006; 4: 48.
- Litmanovich A, Khazim K, Cohen I. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of cancer and its potential as a therapeutic target in clinical practice. *Oncol Ther.* 2018; 6: 109-127.10.
- Liokumovich P, Goldberg I, Davidson B, Gotlieb WH, Zahavi T, Ben-Baruch G, Reder I, Kopolovic J. Expression of metalloproteinases endometrial stromal sarcoma: immunohistochemical study using image analysis. *J Clin Pathol.* 1999; 52: 198–202.
- Litmanovich A, Khazim K, Cohen I. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of cancer and its potential as a therapeutic target in clinical practice. *Oncol Ther.* 2018; 6: 109-127.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436–444.
- Marui N, Medford RM, Ahmad M. Activation of RelA homodimers by tumour necrosis factor α : a possible transcriptional activator in human vascular endothelial cells. *Biochem J.* 2005; 390: 317-324.
- Michael M, Babic B, Khokha R, Tsao M, Ho J, Pintilie M, Leco K, Chamberlain D, Shepherd FA. Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 1802–1808.
- Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016; 8: 227-241.
- Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J.* 1987; 248:265–268.
- Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Sugiya H. Protein kinase C ϵ regulates nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase, which contributes to bradykinin-induced cyclooxygenase-2 expression. *Sci Rep.* 2018; 8: 8535.
- Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Suwabe Y, Konno T, Yamazaki J, Nakayama T, Sugiya H. Non-transcriptional and translational function of canonical

- NF- κ B signaling in activating ERK1/2 in IL-1 β -induced COX-2 expression in synovial fibroblasts. *Front Immunol.* 2020; 11: 579266.
- Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Kähäri VM, Pyrhönen S. High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 2002; 97: 432-438.
- Nunomura J, Nakano R, Naruke A, Suwabe Y, Nakano M, Yachiku N, Kuji M, Sugimura M, Namba S, Kitanaka T, Kitanaka N, Sugiya H, Nakayama T. Interleukin-1 β triggers matrix metalloproteinase-3 expression through p65/RelA activation in melanoma cells. *PLoS One* 2022; 17: e0278220.
- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 1992; 267: 3581–3584.
- Palma SD, McConnell A, Verganti S, Starkey M. Review on canine oral melanoma: An undervalued authentic genetic model of human oral melanoma? *Vet Pathol.* 2021; 58: 881-889.
- Pittayapruek P, Meehansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016; 17: 868.
- Rassnick KM, Ruslander DM, Cotter SM, Al-Sarraf R, Bruyette DS, Gamblin RM, Meleo KA, Moore AS. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000) *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 218: 1444-1448.
- Riedlinger T, Liefke R, Meier-Soelch J, Jurida L, Nist A, Stiewe T, Kracht M, Schmitz ML. NF- κ B p65 dimerization and DNA-binding is important for inflammatory gene expression. *FASEB J.* 2019; 33: 4188–4202.
- Schneider SL, Ross AL, Grichnik JM. Do inflammatory pathways drive melanomagenesis? *Exp Dermatol* 2015; 24: 86–90.
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928.
- Shoshan E, Braeuer RR, Kamiya T, Mobley AK, Huang L, Vasquez ME, Velazquez-Torres G, Chakravarti N, Ivan C, Prieto V, Villares GJ, Bar-Eli M. NFAT1 directly regulates IL8 and MMP3 to promote melanoma tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2016; 76: 3145-3155.
- Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, Webster JD, Prasad ML, Conway CM, Prieto VM, Gary JM, Goldschmidt MH, Esplin DG, Smedley RC, Piris A, Meuten DJ, Kiupel M, Lee CC, Ward JM, Dwyer JE, Davis BJ, Anver MR, Molinolo

- AA, Hoover SB, Rodriguez-Canales J, Hewitt SM. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27: 37-47.
- Souslova V, Townsend PA, Mann J, van der Loos CM, Motterle A, D'Acquisto F, Mann DA, Ye S. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-3 gene by transcription factor NF κ B. *PLoS One* 2010; 5: e9902.
- Sreenath T, Matrisian LM, Stetler-Stevenson W, Gattoni-Celli S, Pozzatti RO. Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res.* 1992; 52: 4942-4947.
- Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17: 545-558.
- Suwabe Y, Nakano R, Namba S, Yachiku N, Kuji M, Sugimura M, Kitanaka N, Kitanaka T, Konno T, Sugiya H, Nakayama T. Involvement of GLUT1 and GLUT3 in the growth of canine melanoma cells. *PLoS One.* 2021; 16: e0243859.
- Todoroff RJ, Brodey RS. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1979; 175: 567-571.
- Tuohy JL, Selmic LE, Worley DR, Ehrhart NP, Withrow SJ. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998-2011). *J Am Vet Med Assoc.* 2014; 245: 1266-1273.
- Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 2645–2650.
- Walker RA, Woolley DE. Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases-1, -2 and -3 in human melanoma. *Virchows Arch.* 1999; 435: 574-579.
- Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* 2014; 2: 823–830.
- Yang L, Lin PC. Mechanisms that drive inflammatory tumor microenvironment, tumor heterogeneity, and metastatic progression. *Semin Cancer Biol.* 2017; 47: 185-195.
- Ye S, Whatling C, Watkins H, Henney A. Human stromelysin gene promoter activity is modulated by transcription factor ZBP-89, *FEBS Lett.* 1999; 450: 268-272.