

学位論文題名

ヒト悪性黒色腫細胞でE-カドヘリンが
発現低下・消失する機序の解析

学位論文内容の要旨

E-カドヘリンは、単に細胞同士の結合を担うだけでなく、細胞の極性、分化にも関与し、発生段階における形態形成や成体における組織構築・機能の維持に重要な役割を果たしている。

癌においてはE-カドヘリンの発現低下や消失がしばしば認められる。E-カドヘリンの機能不全と癌の浸潤性との相関を示す報告がなされており、現在ではE-カドヘリンは「癌浸潤抑制因子」としても捉えられている。E-カドヘリンの機能不全の原因は、大きく2つに分けることができる。ひとつは、E-カドヘリン自身の発現低下・消失である。いまひとつは、E-カドヘリン・カテニン複合体の形成あるいは機能異常である。前者には、食道癌、乳癌、胃癌、前立腺癌などでみられるEカドヘリン発現調節プロモーター領域のメチル化、および胃癌、乳癌、大腸癌、膀胱癌、前立腺癌などでみられる転写抑制因子SnailによるEカドヘリンの転写抑制が挙げられる。後者は、E-カドヘリン遺伝子の変異による部分的に欠損したE-カドヘリン蛋白の産生、 α -カテニンの発現低下や β -カテニンの恒常的リン酸化によるE-カドヘリン・カテニン複合体の機能不全である。

悪性黒色腫は、メラノサイト由来の悪性腫瘍で、転移・浸潤性の高いことがひとつの特徴であり、皮膚原発の悪性腫瘍のなかでも特に予後が悪い腫瘍である。悪性黒色腫におけるEカドヘリンの発現低下は、細胞株を用いた実験で明らかにされ、その後、手術検体を用いた免疫組織化学的解析がなされ、悪性黒色腫のE-カドヘリンの発現はメラノサイト由来の良性腫瘍に比べ低いことが示された。

本研究では、ヒト悪性黒色腫におけるE-カドヘリンの発現低下・消失のメカニズムについて、8系のヒト悪性黒色腫細胞株を用い解析した。

ヒト正常メラノサイトおよび8系の悪性黒色腫細胞株 (MM IV, MeWo, GAK, MMAc, AKI, A375M, 9711, SK-Mel) におけるE-カドヘリン、*snail*の発現を調べた。8株中5株 (MM IV, AKI, A375M, 9711, SKMel) において正常メラノサイトと比較してE-cadherinの発現は低下あるいは消失しておりそのすべての株で*snail*が発現していた。E-カドヘリンが強く発現していた3株 (MeWo, GAK, MMAc)のうち1株 (MMAc)では*snail*の発現が認められず、もう2株 (MeWo, GAK)では*snail*の発現が強く認められた。また、A375M細胞 (E-カドヘリン⁻/*snail*⁺)に

snail のアンチセンス発現ベクターを導入すると、E-カドヘリンの発現がみられるようになった。逆に、MMAc 細胞 (E-カドヘリン+/snail-) に snail センス遺伝子を導入すると、E-カドヘリンの発現低下が認められた。次に、ヒト正常メラノサイトおよび 8 系の悪性黒色腫細胞株における E-カドヘリン DNA のメチル化の有無を MSP 法で調べたところ E-カドヘリンの発現が低下、消失した 6 株のうち 3 株において CpG island のメチル化が検出された。これを脱メチル化剤で処理したところ発現の回復が見られた。このことは、癌細胞によっては、E-カドヘリンの発現が、メチル化ならびに snail 発現増強という二重のシステムによって抑制されることを示している。

2 系の細胞株 (MeWo, GAK) においては、snail が発現しているにもかかわらず、E-カドヘリンの強発現が認められた。この現象について以下の 2 つの可能性を考えている。ひとつは、これらの細胞では、E-カドヘリンプロモーターあるいは Snail に異常が生じているという可能性である。Snail は、E-カドヘリンのプロモーター領域にある 3 つの E ボックスに結合し、E-カドヘリンの転写を抑制することが証明されている。そこで、GAK 細胞について E-カドヘリンのプロモーター領域に存在する 3 つの E ボックスを含む -347 から +48 の塩基配列を調べた。しかし、その塩基配列に変異を見出すことはできなかった。次に snail の coding 領域の塩基配列を検討したが、これまで報告されている塩基配列と同じであった。ただし、GAK のコドン 118 番目はバリン、154 番目はフェニルアラニンであった。これまでに報告されているヒト snail の塩基配列は、コドン 118 番目がバリンあるいはアラニン、コドン 154 番目がフェニルアラニンあるいはセリンをコードしており、これらの違いが、遺伝的多型性なのか点変異なのか結論はでていない。従って、コドン 118 番目にバリン、154 番目にフェニルアラニンをもつ Snail は、他のアミノ酸配列を有するものに比べ、転写抑制活性が低い可能性が考えられる。二つめは、Snail と複合体を形成する分子が異常を起こしている可能性である。Snail は単独ではなく、転写因子複合体を形成し、転写抑制に働くはずである。現在のところ、どのような分子と複合体を形成するのか不明であるが、MeWo および GAK 細胞の Snail に結合する分子に何らかの異常があり、転写抑制作用を発揮できない可能性も考えられる。

本研究により、E-カドヘリンは悪性黒色腫の発生源であるメラノサイトには強く発現しているが、悪性黒色腫細胞株では 8 系中 5 系において発現低下・消失していることが明らかになった。さらに 5 系の悪性黒色腫細胞株における E-カドヘリンの発現低下・消失は、転写抑制因子 Snail の発現あるいは E-カドヘリンのプロモーター領域の DNA メチル化によることが強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

ヒト悪性黒色腫細胞でE-カドヘリンが 発現低下・消失する機序の解析

本研究では、ヒト悪性黒色腫における E-カドヘリンの発現低下・消失のメカニズムについて、8系のヒト悪性黒色腫細胞株を用い解析した。悪性黒色腫細胞株において高頻度に E-カドヘリンの発現低下・消失が認められ、この原因として転写抑制因子 Snail の発現あるいは E-カドヘリンのプロモーター領域の DNA メチル化の関与が明らかにされた。

ヒト正常メラノサイトおよび 8 株の悪性黒色腫細胞株における E-カドヘリン、*snail* の発現を調べた。5 株において正常メラノサイトと比較して E-カドヘリンの発現は低下あるいは消失しており、そのすべての株で *snail* が発現していた。*snail* のセンスあるいはアンチセンス発現ベクター導入実験により Snail が E-カドヘリンの転写を抑制していることが示唆された。次に、8 株の E-カドヘリン DNA のメチル化を調べたところ 3 株においてメチル化が検出され、脱メチル化剤で処理により発現の回復が見られた。以上のことは、癌細胞によっては、E-カドヘリンの発現が、メチル化ならびに Snail 発現増強という二重のシステムによって抑制されることを示していると考えられた。

snail および E-カドヘリンの発現が認められた株に対しては以下の 2 つの可能性を考えた。ひとつは、E-カドヘリンプロモーターあるいは Snail に異常が生じているという可能性である。そこで、このうちの一つの細胞について E-カドヘリンのプロモーター領域の塩基配列を調べたが、変異はなかった。次に *snail* の coding 領域の塩基配列を検討した。コドン 118 番目はバリン、154 番目はフェニルアラニンであったが、これまでの報告の塩基配列は、コドン 118 番目がバリンあるいはアラニン、コドン 154 番目がフェニルアラニンあるいは

セリンをコードしており、これらが、遺伝的多型性なのか点変異なのか結論はでていない。従って、この細胞の Snail は、転写抑制活性が低い可能性が考えられた。二つめは、Snail と複合体を形成する分子が異常を起こしている可能性である。Snail に結合する分子に何らかの異常があり、転写抑制作用を発揮できない可能性も考えられた。

本研究の公開発表にあたって、副査の秋田教授から 1) Snail 以外の E-カドヘリン転写制御因子について、2) Snail とメチル化の共同性について、3) カテニンの発現、機能不全についての質問があった。これに対し申請者は、1) に対して最近の知見から転写抑制因子としては SIP1 および Integrin-linked kinase の存在を挙げた。2) に対しては E-カドヘリンの Snail の結合部位とメチル化をうける部位に共通する部位があることを挙げ、両者による二重の発現抑制システムが存在する可能性がある旨を解答した。3) に関してはカテニンの発現程度に差はなかったが、文献的にはカテニンの機能不全の可能性のある旨を述べた。次いで副査の守内教授から、Snail のアミノ酸配列の違いによる転写活性について、また他の転写制御因子についての質問があった。これに対して申請者は、今回検討した細胞株では遺伝的多型性なのか点変異なのか結論はでておらず、アミノ酸配列により転写抑制活性が変わる可能性が考えられる旨を述べ、他の転写抑制因子の存在についても解答した。最後に主査の杉原教授から E-カドヘリンの臨床的意義および臨床応用に関する質問があった。これに対し申請者は、免疫組織学的手法やマイクロダイゼクション法を用いて E-カドヘリンの発現を見ることは可能であり、臨床検体を用いて腫瘍の進行度と E-カドヘリンの発現の相関に関する研究が必要である旨を解答した。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景に関する詳細な説明を交え、最新の知見を引用し、概ね適切に解答した。

本研究は、ヒト悪性黒色腫細胞における E-カドヘリンの発現低下・消失の原因の一部を明らかにした。さらに悪性黒色腫の浸潤・転移の解明においても重要な研究である。今後、さらに詳しい E-カドヘリンの発現低下・消失の機序解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併わせ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。