

主論文の要約

**UVB-irradiated keratinocytes induce  
melanoma-associated ganglioside GD3 synthase gene  
in melanocytes via secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$   
and interleukin 6**

UVB 照射されたケラチノサイトは TNF  $\alpha$  および IL-6 を分泌することにより  
メラノサイトにおけるメラノーマ関連ガングリオシド GD3  
合成酵素遺伝子の発現を誘導する

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
生物化学講座 分子細胞化学分野

(指導：古川 鋼一 教授)

宮田 麻衣子

## [緒言]

メラノーマは化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことから新たな治療法の開発が望まれている。シアル酸含有スフィンゴ糖脂質であるガングリオシドはメラノーマ組織において腫瘍関連抗原として同定され、とくに GD3 及び GD2 はメラノーマ特異抗原として利用されてきた。また、メラノーマ細胞の悪性形質における GD3 および GD2 の作用が解明され、GD3 発現により細胞増殖や浸潤、細胞外マトリックスへの接着が亢進することが示された。本研究は、メラノサイトとメラノーマにおいて糖脂質の生合成に関わる糖鎖合成酵素遺伝子の発現パターンを比較検討し、メラノサイトからメラノーマへの移行過程における細胞膜糖脂質の挙動を解析した。さらに、メラノーマの発生において重要な環境因子である紫外線について、糖鎖合成酵素遺伝子発現への影響を解析した。

## [対象及び方法]

2 種の培養メラノサイトとメラノーマ細胞 (SK-MEL-28、-37、-23、MeWo) において、スフィンゴ糖脂質の生合成に関わる糖鎖合成酵素遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。リアルタイム RT-PCR は 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して行った。両者において発現レベルに差が見られた遺伝子について、紫外線 (UVB) を直接照射した場合、及び UVB 照射後のケラチノサイト (HaCaT 細胞) の培養上清で処理した場合の発現変化を解析した。培養上清中のサイトカインの測定には、BD™ Cytometric Bead Array (CBA): Human Inflammation Kit (BD Biosciences) を用いた。

## [結果]

メラノーマでは、メラノサイトと比較して GD3 合成酵素 (ST8SIA1) および GM2/GD2 合成酵素 (B4GALNT1) 遺伝子の発現レベルが高かった。一方、GM1/GD1b 合成酵素遺伝子 (B3GALT4) はメラノサイトにおいて高い発現を示したのに対し、メラノーマでは著しく低かった。グルコシルセラミド、ラクトシルセラミドおよび GM3 合成酵素遺伝子の発現レベルは、メラノサイトとメラノーマ間において同程度であった。以上の結果は、複数の正常ヒトメラノサイトにおいて共通に認められた (図 1)。

メラノサイトおよびメラノーマに UVB を照射した場合、GD3 合成酵素、GM2/GD2 合成酵素及び GM1/GD1b 合成酵素遺伝子の発現に著明な変化は認められなかった (図 2A)。これに対し、メラノサイトを UVB 照射 HaCaT 細胞の培養上清で培養した場合、GD3 合成酵素及び GM2/GD2 合成酵素遺伝子の発現が上昇し、GM1/GD1b 合成酵素遺伝子の発現は減少した (図 2B)。

HaCaT 細胞の培養上清におけるサイトカイン (IL-12p70、TNF  $\alpha$ 、IL-10、IL-1  $\beta$ 、IL-6、IL-8) 濃度を測定した結果、UVB を照射後の HaCaT 細胞では TNF  $\alpha$  (585.90 pg/ml)、IL-1  $\beta$  (193.65 pg/ml)、IL-6 (23.16 ng/ml) および IL-8 (63.16 ng/ml) の産生が誘導された (図 3A)。そこでメラノサイトを TNF  $\alpha$ 、IL-6、IL-1  $\beta$ 、IL-8 でそれぞれ

処理したところ、GD3 合成酵素遺伝子の発現は TNF  $\alpha$  および IL-6 により誘導され、IL-1  $\beta$  によってもわずかな亢進が認められた。GM2/GD2 合成酵素および GM1/GD1b 合成酵素遺伝子の発現は、いずれのサイトカイン処理によっても変化が認められなかった（図 3B）。メラノサイト及びメラノーマを TNF  $\alpha$ 、IL-6 にて処理した結果、メラノサイトにおいて GD3 合成酵素遺伝子の発現誘導が認められた。メラノーマでは、これらの糖鎖合成酵素遺伝子の発現に変化が認められなかった（図 3C）。

### [考察]

ヒトメラノーマ細胞におけるガングリオシドの発現、機能、作用機構について正常細胞であるメラノサイトと比較した研究はほとんどない。本研究において、糖鎖合成酵素遺伝子の定量 RT-PCR により、メラノーマにおける ST8SIA1 (GD3 合成酵素) 及び B4GALNT1 (GM2/GD2 合成酵素) 遺伝子の発現上昇と B3GALT4 (GM1/GD1b 合成酵素) 遺伝子の著明な発現抑制が示された（図 1B）。以上の結果は、ジシアリルガングリオシドは癌性形質を増強し、モノシアリルガングリオシドは抑制的に働くというこれまでの報告と一致していた。

UVB は皮膚において DNA 損傷、免疫抑制、炎症、細胞死、癌を誘導する重要な環境因子である。しかし、培養メラノサイトに直接 UVB を照射した場合、糖鎖合成酵素遺伝子の発現に明らかな変化は認められなかった（図 2A）。これに対し、UVB を照射したケラチノサイト (HaCaT 細胞) の培養上清添加によりメラノサイトにおける糖鎖合成酵素遺伝子の発現が著しく変化した（図 2B）ことから、皮膚における微小環境の重要性が示唆された。ケラチノサイトは様々なサイトカインおよびケモカインを分泌することにより皮膚の微小環境を調節する。特に TNF  $\alpha$  は皮膚における炎症カスケードの重要な因子である。本研究において、TNF  $\alpha$  が強い ST8SIA1 遺伝子発現誘導効果を示した（図 3）ことから、生体内での作用が示唆された。一方、UVB 照射ケラチノサイトの培養上清によりメラノサイトにおける B4GALNT1 (上昇) 及び B3GALT4 遺伝子 (抑制) の発現変化が認められたが、それに関与する因子は同定されなかった。今後、プロテオミクス解析により、候補因子を検討する必要がある。

慢性炎症が様々な炎症性サイトカインあるいは遺伝子突然変異やエピジェネティック変化を通して発癌を誘発することが提唱されている。今後、UVB 誘導性サイトカインやケモカインによる糖鎖合成酵素遺伝子の発現調節機構について、転写レベルおよびエピジェネティックレベルにおいて検討する必要がある。

### [結論]

正常細胞であるメラノサイトと比較し、メラノーマ細胞では GD3 合成酵素 (ST8SIA1) 及び GM2/GD2 合成酵素 (B4GALNT1) 遺伝子の発現が高く、GM1/GD1b 合成酵素 (B3GALT4) 遺伝子の発現が低かった。UVB 照射ケラチノサイトからの炎症性サイトカインにより、メラノサイトにおいてメラノーマに類似したガングリオシド発現パターンへ導く糖鎖合成酵素遺伝子の発現変化が誘導されたことから、紫外線照射時に、皮膚の微小環境

によりメラノサイトにおけるメラノーマ関連ガングリオシド合成酵素遺伝子の誘導が惹起されることが示唆された。以上の結果は、メラノサイトからメラノーマへの移行過程におけるガングリオシドの発現調節機構と意義を理解する上で重要な知見となる。