

主論文の要旨

Neogenin, Defined as a GD3-associated Molecule by Enzyme-mediated Activation of Radical Sources, Confers Malignant Properties via Intracytoplasmic Domain in Melanoma Cells

Enzyme-mediated Activation of Radical Sources法を用いてGD3関連分子として同定したNeogeninは細胞内ドメインを介してメラノーマ細胞の悪性形質を増強する

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：岡島 徹也 教授)

金子 慶

【緒言】

ガングリオシド GD3 はメラノーマの癌特異抗原である。しかし、メラノーマにおける GD3 の詳細な分子機能は不明である。本研究は、ヒトメラノーマ細胞株 SK-MEL-28 において、EMARS/MS 法を用いて GD3 の近傍に存在する分子として同定した neogenin の癌形質における役割と作用機構を検討した。

【対象及び方法】

ヒトメラノーマ細胞株 SK-MEL-28 より樹立した GD3 欠損亜株である SK-MEL-28-N1 に、GD3 の合成酵素 cDNA またはコントロールベクターを遺伝子導入し、作製した GD3 発現細胞株(GD3+)と GD3 欠損細胞株(GD3-)を用いた。GD3 の発現は flow cytometry で解析した。neogenin、presenilin-1 の発現は、RT-qPCR とウェスタンブロッティングで解析した。neogenin 及び、neogenin の細胞内ドメイン(Ne-ICD)の癌形質における機能は、siRNA を用いた neogenin ノックダウン細胞と Ne-ICD 過剰発現細胞に対して、MTT assay、invasion assay を用いて検討した。

GD3 と neogenin の物理的相互作用は、抗 neogenin 抗体を用いて免疫沈降した細胞可溶物を抗 GD3 抗体を用いてウェスタンブロッティングすることで解析した。GD3、neogenin、presenilin-1 の脂質ラフト局在は、ショ糖密度勾配超遠心法により得た分画を用いて、ウェスタンブロッティングすることで解析した。GD3、neogenin、presenilin-1 の細胞内局在は、免疫 3 重染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。Ne-ICD の転写標的遺伝子は、Flag-Ne-ICD 過剰発現細胞を固定、染色体の断片化後、抗 Flag 抗体でクロマチン免疫沈降(ChIP)した DNA 断片の塩基配列を sequence することにより同定した。

【結果】

GD3(+)細胞と GD3(-)細胞において neogenin、presenilin-1 は同程度発現していた(Fig.1)。neogenin のノックダウンにより、GD3(+)細胞、GD3(-)細胞共に、浸潤能と増殖能が有意に減少した(Fig.2)。また、脂質ラフトにおける局在を検討したところ、GD3(-)細胞では neogenin はほとんどラフト分画に存在しないのに対し、GD3(+)細胞では全量の 30%以上の neogenin がラフト分画に局在していた。また、neogenin は GD3 と物理的に相互作用することが免疫共沈降で判明した(Fig.3)。

そこで、ラフトマーカーである caveolin-1 と neogenin、GD3 の細胞内局在を抗体 3 重染色後、共焦点顕微鏡にて観察したところ、GD3(+)細胞において、caveolin-1、neogenin、GD3 が細胞表面のリーディングエッジ部位に共局在していた(Fig.4)。さらに、proteasome 阻害剤を用いて neogenin の細胞内ドメイン(Ne-ICD)のレベルを解析したところ、GD3(+)細胞では GD3(-)細胞と比較して約 4 倍多く Ne-ICD が存在した。さらに、GD3(-)細胞に外部から GD3 を添加したところ、濃度依存的に Ne-ICD が増加した(Fig.5)。

次に、Ne-ICD の生成に関与する γ -secretase の主要構成分子である presenilin-1 は

GD3(+)細胞、GD3(-)細胞において同程度の発現を示したが、GD3(+)細胞では GD3(-)細胞に比べて 2 倍程度多くのラフト局在を認めた (Fig.6)。そこで、3 重免疫染色により presenilin-1 と neogenin、GD3 の細胞内局在を観察したところ、GD3(+)細胞の細胞膜リーディングエッジ部位に共局在を認めた (Fig.7)。次に、Ne-ICD の癌形質における役割を、Ne-ICD の過剰発現細胞を用いて解析した。その結果、Ne-ICD の過剰発現に伴い、浸潤能と増殖能が共に有意に増加した (Fig.8)。

最後に Ne-ICD のメラノーマ細胞における転写標的遺伝子を同定するために、ChIP-sequence を行ったところ、17 個の遺伝子を同定した (Table1)。同定された GPR126 や STXBP5、MMP16、SPATA31A1、S6K 遺伝子では、Ne-ICD の強制発現により、mRNA の発現レベルが亢進することが示された (Fig.9)。

【考察】

neogenin のノックダウンの結果、浸潤能、増殖能が共に抑制されたことより、neogenin がメラノーマの悪性形質を増強することが示された。また、GD3 と neogenin は物理的に会合し、GD3(+)細胞において presenilin-1、neogenin、GD3 が共局在した。また、GD3(+)細胞では、GD3(-)細胞に比べ Ne-ICD がより多く存在しており、GD3(-)細胞に GD3 を添加すると Ne-ICD が増加した。以上の結果より、GD3 の発現により、GD3 と neogenin が会合することで、脂質ラフトに集積して、presenilin-1 による切断効率が亢進すると考えられる。さらに、Ne-ICD の機能を解析するために、ChIP-sequence を行ったところ、MMP16 や S6K、GPR126 のような癌形質に関与する分子を標的遺伝子として同定した。つまり、neogenin は GD3 発現下で Ne-ICD として標的遺伝子の発現を制御することで癌形質の増強に関与することが示唆された。今日までに、neogenin の癌形質における機能については、抑制的あるいは促進的に働くなど、対照的な報告が存在する。癌における neogenin の役割には、neogenin の発現だけでなく、GD3 や presenilin-1 の発現も必要な要素となるかもしれない。今後、種々の細胞系における解析が期待される。

【結語】

ヒトメラノーマ細胞において、GD3 は neogenin と相互作用することで neogenin を脂質ラフトへリクルートし、neogenin、presenilin-1 と共局在する結果、Ne-ICD の高発現を誘導する。さらに、Ne-ICD は転写因子として働き、種々の遺伝子の発現を促進することで癌形質を増強することが明らかとなった。よって、neogenin が、GD3 発現メラノーマ細胞における新規癌形質増強のエフェクター分子と考えられる。今後、メラノーマの治療において、GD3 と neogenin との複合体を標的とすることで、より特異性の高い有効な新規治療法につながることを期待される。