

氏名(本籍)	いし い よし ゆき 石井良征(群馬県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第3177号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines (ヒト悪性黒色腫細胞株における一酸化窒素によるマトリックスメタロプロテアーゼの発現誘導)
主査	筑波大学教授 薬学博士 永田 恭介
副査	筑波大学教授 医学博士 中山 凱夫
副査	筑波大学助教授 医学博士 川上 康

論文の内容の要旨

(目的)

マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix Metalloproteinase, MMP) は細胞外基質を分解する酵素で、がんの浸潤や転移において重要な役割を果たしている。現在までに20種類余りのMMPが発見されており、それらは基質の特異性からコラゲナーゼ、ゲラチナーゼ、ストロメライシン、膜型MMPなどに分類される。これらのMMPは種々の浸潤がん細胞で発現していることが示されてきた。悪性黒色腫(メラノーマ)は転移性の高い腫瘍である。その浸潤や転移においては、細胞外基質の分解と破壊は必須であり、それらの過程にMMPが関与していると考えられている。がん細胞自身あるいはがん組織に浸潤する炎症細胞は、様々な生理作用を有している一酸化窒素(NO)を産出する。悪性黒色腫では誘導型NO合成酵素(iNOS)の発現がみられ、その発現が予後と関連することが報告されていることから、NOの悪性黒色腫の進展への関与が強く疑われている。本研究では、NOのMMPの発現への関与を明らかにし、NOによるMMPの発現誘導の機構を解析することを目的とした。

(対象と方法)

モデル実験材料として、ヒト悪性黒色腫細胞株(C32TGとMewo)を用いた。ヒト悪性黒色腫細胞株をNO処理し、12種類のMMPについてNOによる発現誘導の有無をRT-PCR法にて解析した。NO処理による細胞培養液中のMMP-1(コラゲナーゼ-1)量をウェスタンブロット法により調べた。MMP-1遺伝子プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子を持つプラスミドに組み込み、C32TG細胞に導入後、NOによるプロモーター活性を測定した。さらに、MMP-1遺伝子プロモーター領域内の欠損変異体とAP-1結合配列とEts結合配列に変異を持つ変異体を作成し、同様の解析を行なった。一方、AP-1結合配列を持つ2本鎖DNAを用いたゲルシフトアッセイを用いて、NO処理によるAP-1の活性化の程度を調べた。NOによるMMP-1の発現誘導経路を明らかにするために、MAPキナーゼであるERKとp38の阻害剤であるPD98059とSB202190、PI3キナーゼの阻害剤であるwortmanninおよびguanylate cyclaseの阻害剤であるODQを用いて、NOによるMMP-1の発現誘導への影響を検討した。内因性のNOの役割を調べるために、C32TG細胞にiNOS発現プラスミドを導入し、MMP-1プロモーターの活性化の有無を調べた。

(結果)

C32TG細胞において、NO供与体であるS-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) 処理により、*MMP-1*、*-3*、*-10*、*-13*の発現誘導が認められた。Mewo細胞では、*MMP-1*、*-10*の発現誘導が認められた。NO供与体であるNOC18でも同様の結果が得られた。NOを発生しないSNAPの類似体であるacetylpenicillamineでは発現誘導は観察されなかった。*MMP-1*量をウェスタンブロット法により調べたところ、NO処理により培養液中の*MMP-1*量は著明に増加していた。RT-PCR法およびルシフェラーゼアッセイ法により、NOによる*MMP-1*の増加は*MMP-1*プロモーター活性の上昇によるものと考えられた。AP-1結合配列の欠損変異体および点変異体では、NOによる*MMP-1*プロモーター活性が消失した。AP-1近傍のEts結合配列に変異を導入した場合は、プロモーター活性化率が3.2倍から1.6倍に低下したが、プロモーター活性は保たれていた。またNO処理細胞では、AP-1結合能が増大していた。*MMP-1*の発現誘導はMAPキナーゼであるERKとp38の阻害剤で抑制されたが、PI3キナーゼ阻害剤であるwortmanninやguanylate cyclase阻害剤であるODQでは抑制されなかった。*iNOS*発現プラスミドをC32TG細胞に導入したところ、導入細胞では*MMP-1*プロモーター活性が上昇した。そのプロモーター活性の上昇は、培養液中のnitriteの量と相関していた。*iNOS*によるプロモーター活性の上昇はその阻害剤であるL-NAMEの存在下では著しく低下した。

(考察)

ヒト悪性黒色腫細胞株ではNOによりMMPの誘導が起こる。C32TG細胞では*MMP-1*、*-3*、*-10*、*-13*の発現誘導が、Mewo細胞では*MMP-1*、*-10*の発現誘導が転写レベルで起こることが明らかになった。C32TG細胞でのNOによる*MMP-1*の発現誘導には、MAPキナーゼであるERKやp38を介するシグナル伝達機構の関与が示された。また、NOによる*MMP-1*の転写活性化にはAP-1結合配列がシスエレメントとして重要であることとその近傍のEts結合配列も補助的に働いていることが明らかとなった。さらに、内因性のNOも*MMP-1*を誘導することが明らかとなった。

以上から、悪性黒色腫（メラノーマ）では、がん組織で産出されたNOよりMMPが転写レベルで誘導され、誘導されたMMPが細胞外基質の分解と破壊を起こすことで悪性黒色腫の浸潤と転移に関与している可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、悪性黒色腫（メラノーマ）細胞でのNOによるMMPの発現誘導が転写レベルで引き起こされていることを明らかにし、またその誘導にはMAPキナーゼの関わるシグナル伝達経路が関与していることを示し、悪性黒色腫の浸潤と転移の機構理解に貢献しており、価値ある研究と考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。