

学位論文抄録

悪性黒色腫におけるHigh Molecular Weight Melanoma-Associated Antigenの病理学的検討と、
悪性黒色腫細胞株におけるJNKのアイソフォーム特異的な細胞活性の検討
(The Expression of human high molecular weight melanoma-associated antigen in malignant melanoma,
and the role of JNK isoforms in the cellular activity of melanoma cell lines)

西 葉月

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻皮膚機能病態学

指導教員

尹 浩信 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻皮膚機能病態学

学位論文抄録

[目的] 悪性黒色腫(メラノーマ)はメラノサイト系細胞の悪性腫瘍である。High Molecular Weight Melanoma-Associated Antigen (HMW-MAA) は膜結合型の Chondroitin Sulfate Proteoglycan で、今回、ホルマリン固定パラフィン切片を用いて、末端黒子型黒色腫と表在拡大型黒色腫の HMW-MAA の発現を検討、比較した。また、メラノーマの分子生物学的側面より、MAP(mitogen-activated protein)キナーゼ経路の一つである JNK(c-Jun N-terminal kinase)のシグナル特異的阻害剤やアイソフォーム特異的 small interfering RNA(siRNA)を用いて、メラノーマ細胞株における JNK の発現、リン酸化を調べ、アイソフォーム特異的な JNK の増殖、遊走、浸潤に果たす役割を調べた。

[方法] (1) HMW-MAA の発現 ; 95 例の末端黒子型黒色腫と、13 例の表在拡大型黒色腫のホルマリン固定標本を用いて免疫染色を行った。染色は、CSA II (ビオチンフリータイラミドシグナル増幅システム) の変法にて、一次抗体は、マウス抗 HMW-MAA モノクローナル抗体 D2. 8. 5-C4B8 を用いて行った。(2)メラノーマ細胞株における JNK の発現と機能 ; ヒトメラノーマ細胞である SK-MEL3、SK-MEL-28、WM164 において、免疫プロット法を用いて JNK、リン酸化 JNK の発現を調べた。その後、SK-MEL3、SK-MEL-28 を用いて、JNK 阻害剤である SP600125 で処理し、72 時間後の細胞数を計測した。次に SK-MEL3 と SK-MEL-28 を用いて、JNK1 と JNK2 の siRNA にて RNA 干渉法を行い、JNK1 と JNK2 のノックダウンを行い、Transwell® polycarbonatr membrane insert と BD マトリゲルを用いて migration, invasion assay を行った。

[結果] (1) HMW-MAA の発現 ; 末端黒子型黒色腫の 53. 6% で陽性となった。陽性例のうち、3/4 は弱陽性を示し、陽性細胞の比率には Stage 間に差はみられなかった。一方、表在拡大型黒色腫 13 例では、全例で陽性となった。(2)メラノーマ細胞株における JNK の発現と機能 ; SK-MEL-3 では JNK1 と JNK2 の両方に、SK-MEL-28 と WM169 では JNK1 にのみリン酸化が認められた。JNK 阻害剤により、SK-MEL-3、SK-MEL-28 とともに細胞増殖抑制がみられた。siRNA の導入では、SK-MEL-3 では JNK1 のノックダウンで遊走能が低下し、JNK1、JNK2 のノックダウンで著明な浸潤能の低下がみられた。一方、SK-MEL-28 では JNK1 のノックダウンにより遊走能、浸潤能の変化は認められなかった。

[考察] HMW-MAA は、末端黒子型黒色腫では従来の報告よりも発現率が高く、ホルマリン固定パラフィン切片でもその発現を十分に確認できると考えられた。また、JNK はメラノーマ細胞株で活性化しており、JNK2 はリンパ節転移病変細胞株である SK-MEL-3 のみでリン酸化しており、JNK2 の活性化がメラノーマの転移に必要な可能性が示唆された。JNK 阻害剤での細胞増殖抑制効果からは、JNK1 と JNK2 の両方が細胞増殖に関与していることが推察され、遊走能、浸潤能については、細胞特異性があるが、細胞遊走は JNK1 に細胞浸潤は JNK1 と JNK2 の両方に制御されている可能性が考えられた。

[結論] メラノーマにおいて、HMW-MAA は、ホルマリン固定パラフィン切片標本でも発現の評価ができた。また、JNK はメラノーマ細胞株において細胞増殖に関与しており、細胞特異的に遊走、浸潤能にも関与していることが推察された。