

原著

ヒトメラノーマ細胞における RETINOIC ACID-INDUCIBLE GENE-I 発現との関連と細胞増殖

西川陽平¹⁾ 松崎康司¹⁾ 木村一之¹⁾ 北村英夫¹⁾
中野創¹⁾ 今泉忠淳²⁾ 佐藤敬²⁾ 澤村大輔¹⁾

抄録 Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)はウイルスの二本鎖RNAを認識すると1型interferon (IFN)など多様な遺伝子の発現を誘導し、抗ウイルス作用を惹起する。1型IFNであるIFN-βはメラノーマにおける標準的な治療として有効性が確立されている。今回我々は、培養ヒトメラノーマ細胞を用いて、IFN-β及び種々のサイトカインで刺激した際のRIG-I発現および細胞増殖へ与える影響について検討した。各種培養ヒトメラノーマ細胞をIFN-βで刺激すると、多くの培養細胞ではRIG-I発現が増強したが、唯一MeWoにおいてRIG-I発現に変化がみられなかった。さらに、IFN-β添加においてRIG-I発現能をもつ501melでは細胞増殖が抑制されたが、MeWoの細胞増殖能は不変であった。そこで、RIG-I発現ベクターをMeWoに導入し、細胞増殖を検討した。その結果、MeWo細胞の増殖はIFN-βにより抑制され、RIG-IがIFN-βによる細胞増殖抑制に重要な役割を担っていることが示唆された。このことよりヒトメラノーマ細胞にはRIG-Iタンパク発現能をもたない群が存在すること、並びにメラノーマ組織別のRIG-I発現レベルが、それをもつ患者のメラノーマに対してIFN-βがどのくらい効果をもつか決定する可能性が示唆された。

弘前医学 63 : 21—27, 2012

キーワード : retinoic acid-inducible gene-I ; interferon-β ; メラノーマ ; アポトーシス。

ORIGINAL ARTICLE

RELATION BETWEEN RETINOIC ACID-INDUCIBLE GENE-I EXPRESSION AND CELL PROLIFERATION IN HUMAN MELANOMA CELLS

Yohei Nishikawa¹⁾, Yasushi Matsuzaki¹⁾, Kazuyuki Kimura¹⁾, Hideo Kitamura¹⁾,
Hajime Nakano¹⁾, Tadaatsu Imaizumi²⁾, Kei Satoh²⁾ and Daisuke Sawamura¹⁾

Abstract Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) is a cytoplasmic receptor recognizes the double stranded RNA derived from viruses, and activates antiviral responses such as the production of type 1 interferon (IFN). IFN-β (type 1 IFN) has been established as one of the treatments for malignant melanoma. This study investigated the effects of various cytokines, including IFN-β, on RIG-I expression and cell growth in human melanoma cells. IFN-β upregulated RIG-I expression in a number of human melanoma cell lines except for MeWo melanoma cells. The cellular proliferative potential of 501mel cells, which represented the IFN-β-induced RIG-I upregulation, was suppressed by IFN-β. However, MeWo cells under conditions of IFN-β stimulation showed neither RIG-I upregulation nor suppression of cell growth. Therefore, we introduced the RIG-I expression vector to MeWo cells and examined the cell growth. The result showed suppression of cell growth by IFN-β, indicating that RIG-I plays essential roles for the inhibition of the cellular proliferative potential by IFN-β. Thus, we revealed the existence of melanoma cells lacking the expression of RIG-I protein, and suggested that expression levels of RIG-I in melanoma tissues may determine how effect IFN-β treatment has on melanoma of these patients.

Hirosaki Med. J. 63 : 21—27, 2012

Key words: retinoic acid-inducible gene-I; interferon-β; melanoma; apoptosis.

¹⁾ 弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座

²⁾ 弘前大学大学院医学研究科附属脳神経血管病態研究
施設脳血管病態学講座
別刷請求先：松崎康司
平成23年12月13日受付
平成23年12月28日受理

¹⁾ Department of Dermatology, Hirosaki University
Graduate School of Medicine, Hirosaki, Japan

²⁾ Department of Vascular Biology, Institute of Brain
Science, Hirosaki University Graduate School of
Medicine, Hirosaki, Japan

Correspondence: Y. Matsuzaki

Received for publication, December 13, 2011

Accepted for publication, December 28, 2011

緒 言

近年, 細胞質内でウイルスの侵入を認識する分子として retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) が同定された^{1,2)}. RIG-I は DexH/D box ファミリーに属する RNA ヘリケースであり, C末端の helicase domain でウイルスの複製過程でできる二本鎖 RNA を認識し, N末端に存在する2つの caspase recruitment domain から IFN 誘導シグナルを下流へと伝達すると考えられている³⁾.

我々はこれまでにヒト表皮細胞で interferon (IFN) γ , tumor necrosis factor (TNF) α といったサイトカインや疑似的ウイルス感染を生じる polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) の刺激によって RIG-I の発現が増強されること, 更には免疫組織化学的に炎症性皮膚疾患である尋常性乾癬患者の皮膚病変において, 有棘層および基底層で RIG-I が高発現していることを明らかにした⁴⁾. これらのことから RIG-I は自然免疫に関わる RNA ヘリケースだけではなく, 炎症性疾患におけるサイトカインネットワークのメディエーターとしても機能している可能性が示唆された.

一方, メラノーマは悪性度が高く遠隔転移を起こしうる皮膚悪性腫瘍だが, 術後補助療法として, DTIC, ACNU および VCR の3者併用療法 (DAV 療法) に加え, IFN- β の局所投与を併用する DAV Feron 療法が標準的に行われている. 1型 IFN である IFN- β は DNA 合成抑制などによる直接作用, および免疫系の関与による間接作用により抗腫瘍効果を示すと考えられている⁵⁾. また, RIG-I は免疫系への関与だけではなく, 他方では細胞をアポトーシスへ誘導する反応系とも密接に関連していることが明らかになっている⁶⁾.

今回我々は各種培養ヒトメラノーマ細胞におけるサイトカイン存在下での RIG-I タンパクの発現について検討するとともに, RIG-I タンパクの発現が細胞増殖に与える影響についても解析した.

実験材料と方法

【細胞と刺激】今回の実験には培養ヒトメラノーマ細胞である 501mel, MeWo, Colo679, G361, SK-MEL-28 を用いた. いずれの細胞も 10% ウシ

胎児血清 (FBS), 炭酸水素ナトリウム (2 mg/ml), ペニシリン (100 μ g/ml), ストレプトマイシン (100 μ g/ml), アンホテリシン B (2.5 mg/ml) を添加した Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) を用い, 5% CO₂ のインキュベーター内で培養した. 細胞密度が 60% になった時点で PBS 溶液で 2 回細胞を洗浄し, 0.1% FBS 含有 DMEM に交換し, 12 時間後に各種サイトカインまたは poly (I:C) を添加した. それぞれ濃度が IFN- β (10,000 unit/ml), IFN- γ (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), transforming growth factor (TGF) β (10 ng/ml), poly (I:C) (10,000 ng/ml) となるように調整した. また, 501mel を用いて各種濃度 (0, 10, 100, 1,000, 10,000 unit/ml) に調整した IFN- β を添加し, これらは添加後 12 時間培養した. さらに, 501mel に IFN- β (10,000 unit/ml) を投与し, 同様の方法で 3, 6, 12, 24, 36 時間の培養を行った.

【ウェスタンブロットティング】いずれの培養ヒトメラノーマ細胞も RIPA buffer を用いて回収し, 超音波破碎にて細胞からタンパクを抽出した後, Protein assay (BIO-RAD, CA, U.S.A) を用いた Bradford 法で濃度測定を行った. 15 μ g のタンパクを 8% SDS-polyacrylamide gel で電気泳動し, Hybond nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) にブロットティングを行った. 1 次抗体は 1:10,000 希釈した rabbit anti-RIG-I 抗体を, 2 次抗体は horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2,000, Amersham Biosciences) を使用した. バンドは ECL-Western blotting detection system (Amersham Biosciences) で検出した.

【細胞増殖能】96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1,000 個の細胞を含んだ 10% FBS 含有 DMEM 100 μ l を添加し, 5% CO₂ のインキュベーター内で 24 時間培養した. そして IFN- β (10,000 unit/ml) を添加し, さらに 48 時間培養した後に CellTiter-Glo (Promega, WI, U.S.A) 試薬を使用してルミノメーターで測定した.

【形質転換】p3xFLAG-CMV-7.1 (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A) に human RIG-I cDNA (2,778 bp) を挿入し, RIG-I タンパクの発現ベクターを作成した. 細胞密度が 30% の時点で Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, U.S.A) を用いて発現ベクターも

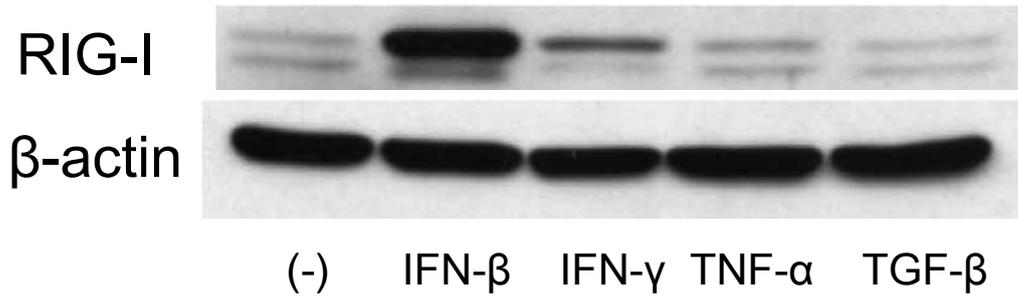


Fig. 1 501 mel におけるサイトカイン刺激時の RIG-I タンパクの発現

培養ヒトメラノーマ細胞である501 mel に IFN- β (10,000 unit/ml), IFN- γ (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), TGF- β (10 ng/ml) 添加し12時間培養したところ, IFN- β 存在下において RIG-I タンパクの発現が最も著明に増強していた.

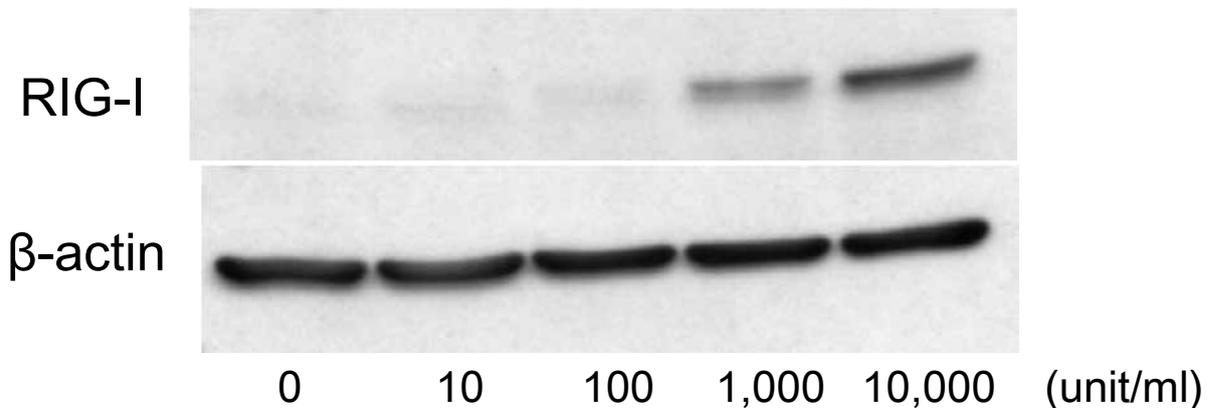


Fig. 2 IFN- β の濃度依存性 RIG-I 発現誘導

501 mel に種々の濃度(0, 10, 100, 1,000, 10,000 unit/ml)の IFN- β にて12時間刺激した際, RIG-I タンパクの発現は IFN- β 濃度依存性に増強した.

しくは空ベクターのトランスフェクションを行い, 24時間後培地交換し IFN- β (10,000 unit/ml) を添加した. 観察開始時と48時間後の培養細胞を顕微鏡下で観察し比較検討した.

結 果

「ヒトメラノーマ細胞におけるサイトカインによる RIG-I の発現誘導」

一般的な培養ヒトメラノーマ細胞である501 mel を IFN- β , IFN- γ , TNF- α および TGF- β で刺激し, 12時間後の RIG-I タンパクの発現をウェスタンブロットニングにて確認したところ, IFN- β 刺激下において RIG-I タンパクの発現が著明に増強していた(Fig. 1). IFN- γ 刺激でも軽度の発現増強を認め, TNF- α 刺激では僅かに増強するのみであった. 一

方, TGF- β を投与しても RIG-I タンパクの発現増強は示さなかった.

「IFN- β の RIG-I 発現誘導」

501 mel に種々の濃度(0, 10, 100, 1,000, 10,000 unit/ml)の IFN- β を添加し, 12時間後の RIG-I タンパクの発現をウェスタンブロットニングにて確認したところ, 濃度依存的に発現の増強がみられ, 10,000 unit/ml の IFN- β 刺激で最も著明であった(Fig. 2).

501 mel を用い IFN- β (10,000 unit/ml) 刺激による RIG-I タンパク発現の経時的变化を検討したところ, 刺激後6時間で発現は最大となり, その後は一定の発現を示した(Fig. 3).

「各ヒトメラノーマ細胞における RIG-I 発現」

培養ヒトメラノーマ細胞である SK-MEL-28, Colo 679, 501 mel, MeWo, G 361 に対して IFN- β

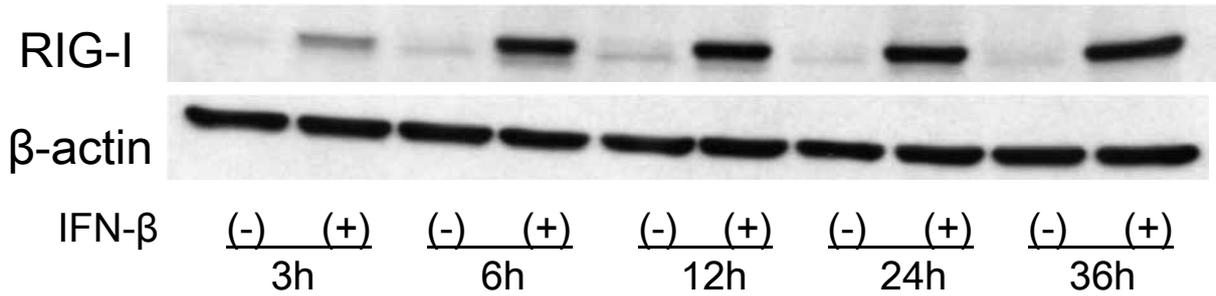


Fig. 3 IFN-β 誘導性 RIG-I タンパクの経時的変化

501 mel を IFN-β (10,000 unit/ml) で刺激し, RIG-I タンパク発現の経時的変化を検討した。刺激後 6 時間で発現は最大となり, その後は一定の発現を示した。

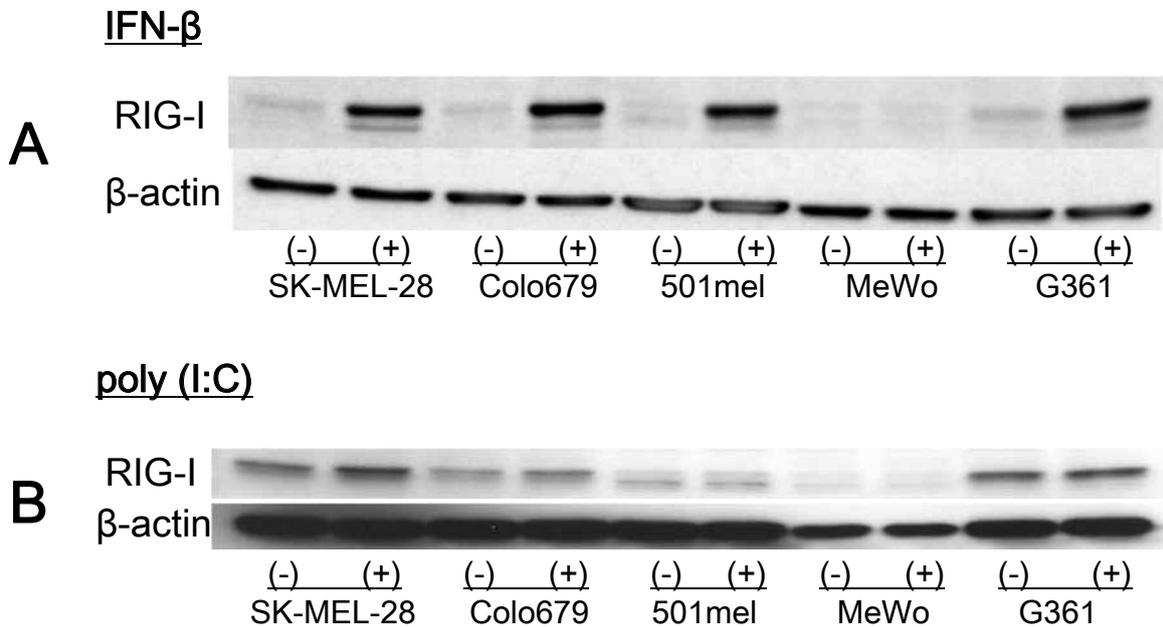


Fig. 4 IFN-β および poly (I:C) による培養ヒトメラノーマ細胞における RIG-I タンパクの発現誘導

(A) 5 種のメラノーマ細胞を IFN-β (10,000 unit/ml) 添加または非添加の状態にて 12 時間培養したところ, MeWo のみ RIG-I タンパクの発現増強が確認されなかった。(B) いずれのメラノーマ細胞も poly (I:C) (10,000 ng/ml) 存在下において RIG-I タンパクの発現増強を示さなかった。

および poly (I:C) を添加し, RIG-I 発現の差異を比較, 検討した。IFN-β 刺激では, MeWo を除く 4 種類の細胞では, 非刺激群と比較して明らかに RIG-I タンパクの発現増強がみられたが, 唯一 MeWo においては増強を示さなかった (Fig. 4A)。一方, poly (I:C) 刺激では全てのメラノーマ細胞で RIG-I タンパクの発現増強は認めなかった (Fig. 4B)。

「IFN-β および RIG-I の細胞増殖抑制効果」

培養ヒトメラノーマ細胞の 501 mel, MeWo を IFN-β (10,000 unit/ml) で刺激して 48 時間培養を

行い, 細胞増殖能試験および培養細胞の肉眼的観察により細胞ごとの反応性の違いを比較した。細胞増殖能試験では, 501 mel において IFN-β で刺激した細胞はコントロールである非刺激群と比較して 67% 程度まで細胞増殖能が有意に低下したのに対し, MeWo では全く低下傾向を示さなかった (Table 1)。

肉眼的に観察した場合も細胞増殖能試験と同様に, 501 mel は IFN-β 存在下で明らかな細胞増殖の抑制がみられたが (Fig. 5A), MeWo において

Table 1 IFN-β による培養ヒトメラノーマ細胞の増殖抑制効果

Cell line	Cell viability (RLU)	
	Control	IFN-β
501mel	8050 ± 1235.1	5390 ± 496.3*
MeWo	9374.4 ± 1117.0	9389.4 ± 1003.2

*p<0.05

501 mel, MeWo を IFN-β (10,000 unit/ml) で 48 時間刺激し, 細胞増殖能試験を行った. 501 mel では IFN-β 刺激群はコントロールと比較して 67% 程度まで細胞増殖能が低下し有意な差が認められた ($t=3.58$, $df=8$, $p<0.05$). 一方, MeWo では全く低下傾向を示さなかった.

は IFN-β による抑制効果はみられず, 非刺激の細胞と同様の細胞増殖能を示した (Fig. 5B).

一方, IFN-β による RIG-I 発現増強を示さない MeWo に対し RIG-I タンパク発現ベクターを導入したところ, RIG-I 非発現の対照群と比較して明らかに細胞の増殖が抑制されていた (Fig. 6).

考 察

ウイルス感染した細胞は, 免疫応答を惹起する 1 型 IFN の発現を誘発し, またウイルスを除去できない場合はアポトーシスに導かれる. RIG-I および melanoma differentiation associated gene (MDA) -5 はウイルス由来 RNA を検出し, 1 型 IFN の発現を誘導する細胞質受容体である⁷⁾. 線維芽細胞に RNA ウイルスであるニューキャッスルウイルス (NDV) を感染させると 1 型 IFN の発現誘導が強く認められるが, RIG-I 欠損線維芽細胞に NDV を感染させると 1 型 IFN の発現誘導が野生型と比べて著しく減弱しており, RIG-I は 1 型 IFN 発現に必須な生体防御因子と考えられている⁸⁾.

RIG-I と MDA-5 はミトコンドリアの表面にある IFN-β promoter stimulator 1 に働きかけ, 転写因子である IFN regulatory factor 3 を介して 1 型 IFN を発現させるが, その一方で, ミトコンドリア内膜よりシトクロム c を放出させ感染細胞のアポトーシスを誘導する⁷⁾.

我々は, ヒトメラノーマ細胞を IFN-β で刺激した際に RIG-I 発現がタンパクレベルで増強することを明らかにした. しかし, その中で唯一 MeWo では IFN-β 誘導性 RIG-I タンパクの発現

増強を示さなかった. これより, メラノーマ細胞のうち IFN-β 存在下における RIG-I タンパク発現能を有さない群の存在が示された.

さらに我々は, RIG-I タンパク発現能を有する培養ヒトメラノーマ細胞である 501 mel と, 非発現細胞である MeWo において, IFN-β 刺激による影響について検討したが, MeWo では IFN-β による細胞増殖の抑制効果は認めなかった. これらの結果は IFN-β のもつ細胞増殖の抑制効果に RIG-I が深く関与していることを示唆している. 一方で, MeWo 細胞に RIG-I 発現ベクターを導入して RIG-I タンパクを強制的に発現させた場合, 非発現群と比較して IFN-β による細胞増殖抑制効果が確認されており, RIG-I タンパクの存在と細胞増殖抑制との密接な関連性が裏付けされた.

IFN-β はサイトカインの中で培養メラノーマ細胞に対する増殖抑制効果が最も強く, 1985 年には悪性黒色腫皮膚転移に対する IFN-β 局所投与による抗腫瘍効果 (奏効率 50%) が認められ, その適用が認可された⁹⁾. 現在では本邦におけるメラノーマ治療の第一選択薬の一つである. しかし, なかには局所再発や所属リンパ節転移など治療への抵抗性を示すものも少なくない. 現在では, 臨床の場においてメラノーマの治療の際に IFN-β 局所療法に対する反応性を予測することは不可能である. 本実験結果より, メラノーマ細胞に IFN-β を添加した際, その細胞が有する RIG-I タンパク発現能について解析することが治療効果の予測に有用である可能性が示唆された.

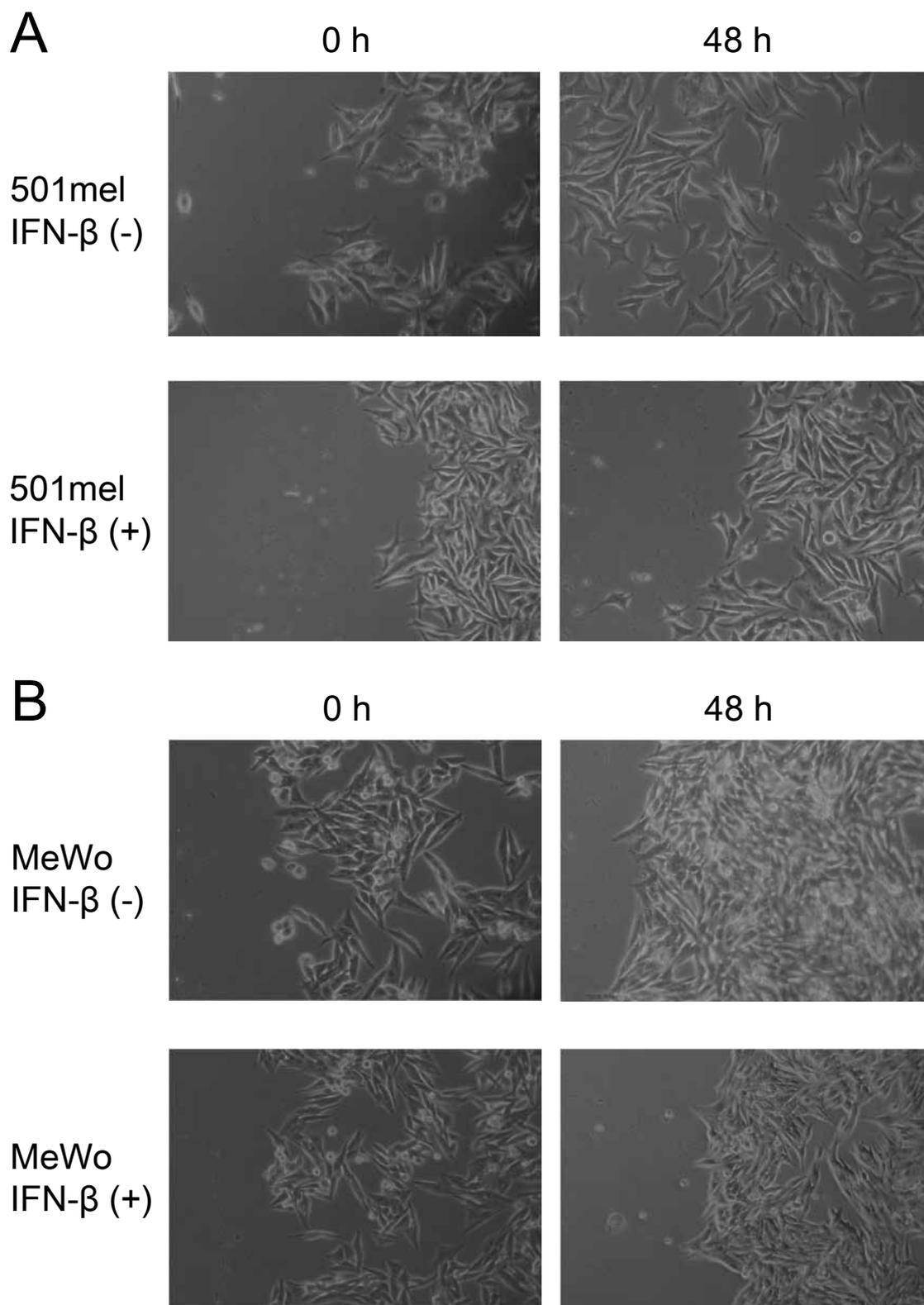


Fig. 5 IFN- β による細胞増殖抑制効果の顕微鏡下観察

501 mel, MeWo を IFN- β (10,000 unit/ml) で刺激し, 48時間培養を行い観察した. 501 mel では IFN- β による細胞増殖の抑制がみられたが(A), MeWo では抑制されなかった(B).

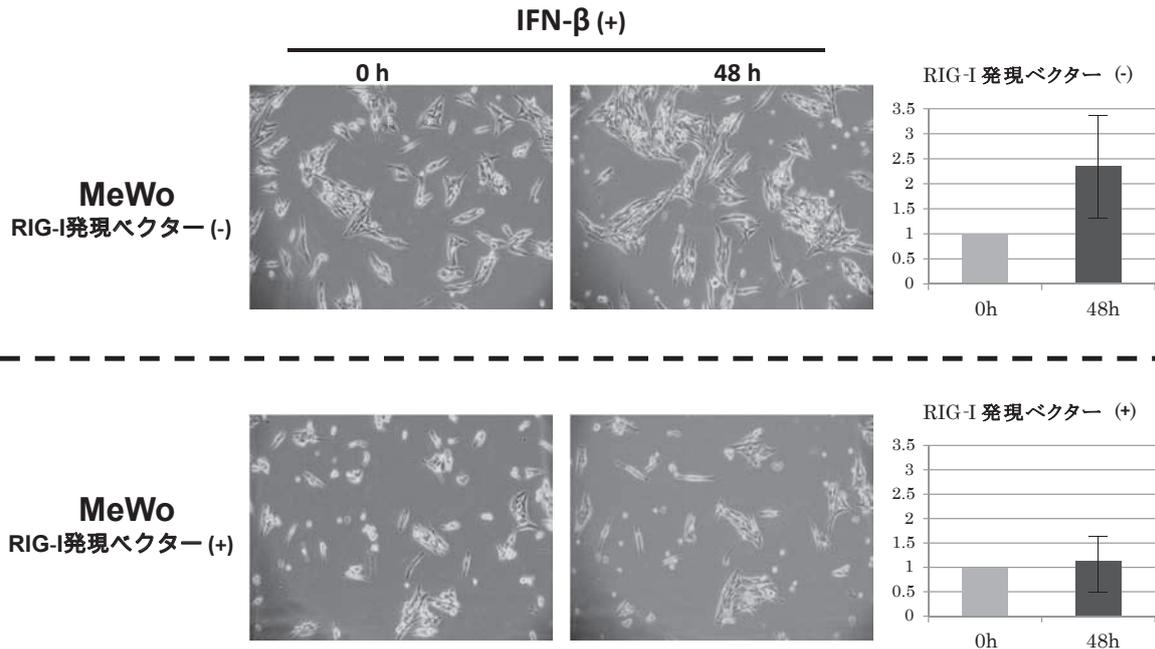


Fig. 6 RIG-I タンパク強制発現時における MeWo の細胞増殖
RIG-I タンパクの発現ベクターを導入された MeWo 細胞は、RIG-I 非発現細胞と比較して明らかな IFN- β による細胞増殖の抑制が確認された。

謝 辞

皮膚科学講座の豊巻由香技術員，田村由起子，鷹木由里子，清藤奈菜子，神田由起実験助手のご協力に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kalali BN, Köllisch G, Mages J, Müller T, Bauer S, Wagner H, Ring J, et al. Double-stranded RNA induce an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J Immunol* 2008;437:1167-72.
- 2) Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 437:1167-72.
- 3) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.
- 4) Kitamura H, Matsuzaki Y, Kimura K, Nakano H, Imaizumi T, Satoh K, Hanada K. Cytokine modulation of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2007;45:127-34.
- 5) 斎田俊明, 山本明史. 悪性黒色腫の診断・治療指針. 1 版. 東京, 金原出版, 2001:108-17.
- 6) Min P, Songmei G, Sheng xiang X, Jianwen R, Yan L, Xiaoli L, Zhengxiao L. Apoptosis induced by synthetic retinoic acid CD437 on human melanoma A375 cells involves RIG-I pathway. *Arch Dermatol Res* 2009;301:15-20.
- 7) Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Häcker G, Berking C, Hornung V, et al. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* 2009;119:2399-411.
- 8) Hiroki K, Osamu T, Shizuo A. Cell type specific involvement of RIG-I in antiviral responses. *Nippon Rinsho Vol 64* 2006-7;7:1244-7.
- 9) 山本明史. フェロン・DAV 併用療法の基礎と臨床. *Skin cancer* 1996;11:358-66.