

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10327

研究課題名(和文) 骨石灰化因子Plod2の機能不全がもたらす癌顎骨浸潤・転移機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of PLOD2 function in cancer invasion and metastasis of jawbone.

研究代表者

坂本 洋右 (Sakamoto, Yosuke)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50451745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々の先行研究では、PLOD2は胎生致死遺伝子であることが示唆されたため、本研究ではPlod2コンディショナルノックアウトマウスを用いて研究を行った。同マウスの尻尾より線維芽細胞を初代培養し安定した長期培養に成功した。PLOD2ノックアウト細胞モデルにおいては、細胞遊走時に働くと考えられている糸状仮足形成の促進を認め、有意に細胞遊走能の亢進が認められた。遺伝子発現解析、細胞免疫染色においても、この表現型を決定付ける結果となった。したがって、この表現型の正確な役割を理解することは、線維症の病態や創傷治癒を解明するのに役立つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LH2コード遺伝子のPLOD2は、骨形成不全を特徴とするBruck症候群の原因遺伝子として特定され、PLOD2遺伝子が硬組織形成へ特に深く関与することが報告されたが、以前は癌におけるLH2/PLOD2の関与は考えられていなかった。しかし、近年になってLH2過剰発現が肺癌、乳癌などの予後不良因子であることが報告されており、エビデンスが飛躍的に蓄積されている。特に癌転移に関与することも報告されており、PLOD2の未知の機能や性質を解明することは、学術的にも社会的にも大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that conventional PLOD2 knockout mice showed embryonic lethality. In this study, we established PLOD2 conditional knockout mice using a tamoxifen-inducible Cre system. In conclusion, our cellular models provide evidence that PLOD2 deficiency plays a critical role in cell migration mediated through filopodia formation. Understanding the precise role of this phenotype in PLOD2-deficient cells may be helpful to define the pathogenesis of fibrosis. As such, detailed analyses of fibrosis and wound healing using PLOD2-deficient mouse models are needed.

研究分野：口腔科学

キーワード：PLOD2 コンディショナルノックアウトマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔領域に原発する悪性腫瘍は、顎骨内への浸潤や骨破壊をしばしば認め、治療方法や手術範囲の決定に難渋する場合も多く、このような症例の予後は一般に悪い。したがって、悪性腫瘍の顎骨浸潤メカニズムの解明は悪性腫瘍の進展制御ならびに予後改善に極めて重要である。近年、コラーゲン分子間の架橋結合(クロスリンク)の質的・量的な違いが、癌転移を起こす要因となることが示唆されている(J Clin Invest. 2015 Mar 2;125(3):1147-62)が、顎骨浸潤や骨転移における詳細なメカニズムは報告されていない。コラーゲンクロスリンクを規定しているリシン水酸化酵素(Lysine hydroxylase 2)をコードする遺伝子(PLOD2)は、骨の石灰化はもとより、近年では癌転移にも関わるという知見が報告された重要な遺伝子である。われわれの先行研究では、PLOD2は胎生致死遺伝子であることが示唆された。先行研究では、ゲノム編集(CRISPR/Cas9法)を用いたPLOD2ノックアウトマウスの作製を開始し、生殖細胞系伝達が確認できたヘテロマウスを獲得することに成功した。しかし、その後の研究でPLOD2は胎生致死遺伝子であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、この胎生致死を回避するためにゲノム編集技術を基盤として作製したPLOD2コンディショナルノックアウトマウスを作製し、同マウスを用いた細胞遊走能試験などPLOD2の機能解析を行い、これまで不明であったPLOD2の機能の一端を明らかにすることを目的とした。

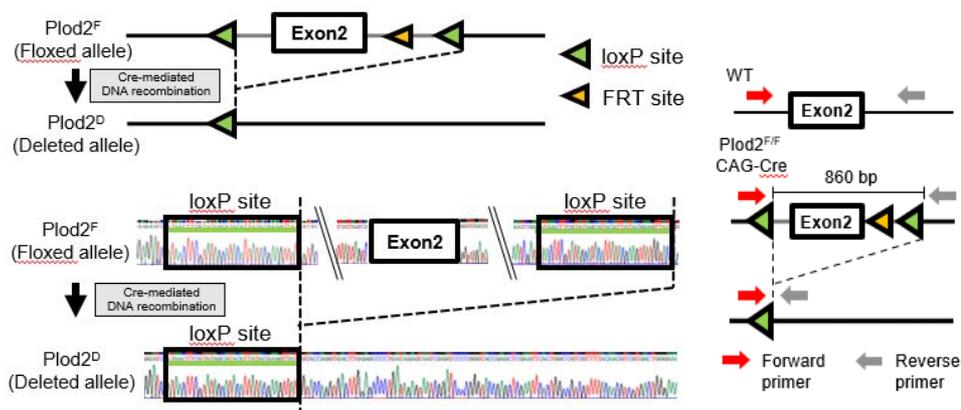
3. 研究の方法

- (1) PLOD2コンディショナルノックアウトマウスの作製・調整をする。
- (2) PLOD2コンディショナルノックアウトマウスの尻尾より線維芽細胞を初代培養し、タモキシフェン誘導性のPLOD2のノックアウトの確認を行う。
- (3) 同マウスの線維芽細胞において、PLOD2の発現の変動に伴う細胞増殖能・細胞遊走能の変化を確認する。
- (4) 同マウスの線維芽細胞の細胞形態学的解析・遺伝子発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) PLOD2コンディショナルノックアウトマウスの作製・調整をする。

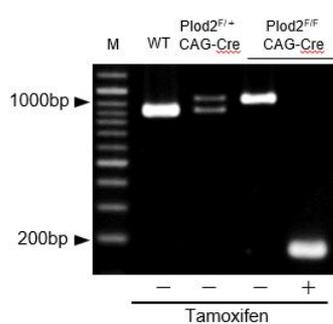
ネオマイシンカセットを切除するために、 $PLOD2^{T/+}$ マウスとFlpリコンビナーゼトランスジェニックマウスを交配し、 $PLOD2^{F/+}$ マウスを作製した。 $PLOD2^{F/+}$ マウスとCAG-Creマウスを交配して、 $PLOD2^{F/+}$ CAG-Creマウスを作製した。次に、この $PLOD2^{F/+}$ マウスと $PLOD2^{F/+}$ CAG-Creマウスを交配し、 $PLOD2^{F/F}$ CAG-Creマウスを作製した。タモキシフェン誘導性のノックアウトであり、シーケンス解析でPLOD2のExon2欠損を確認した。(図1)



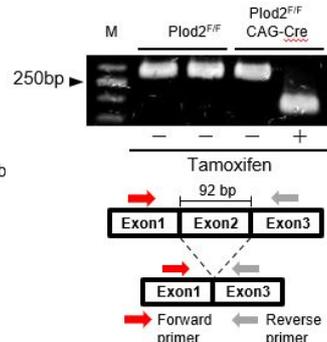
(図1) PLOD2^{F/F} CAG-Cre における DNA シーケンス結果

(2) PLOD2コンディショナルノックアウトマウスの尻尾より線維芽細胞を初代培養し、タモキシフェン誘導性のPLOD2のノックアウトの確認を行う。

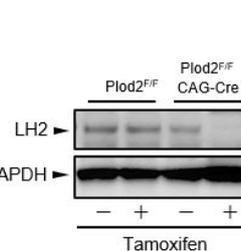
PLOD2 の基本的な性質を確認するためにマウスの尻尾由来の線維芽細胞を初代培養し、安定的な長期培養に成功した。PLOD2^{F/F} CAG-Cre マウスより初代培養した線維芽細胞では、タモキシフェン投与による CAG-Cre が発現することで、Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP に挟み込まれたエクソン 2 のノックアウトが、cDNA・genomic DNA・タンパク質レベルにおいて確認された。(図 2-4)



(図 2) cDNA レベル



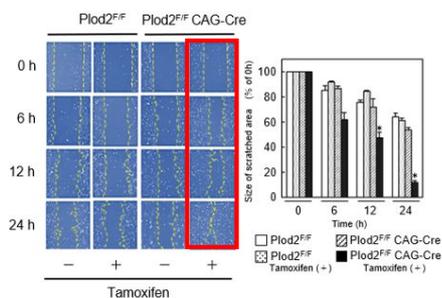
(図 3) genomic DNA



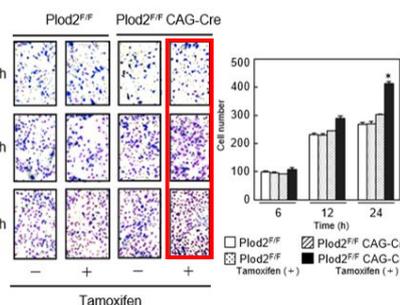
(図 4) タンパク質レベル

(3) 同マウスの線維芽細胞において、PLOD2 の発現の変動に伴う細胞増殖能・細胞遊走能の変化を確認する。

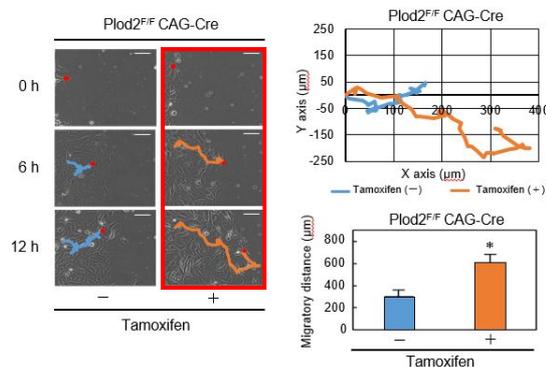
PLOD2^{F/F} CAG-Cre マウスの線維芽細胞において PLOD2 ノックアウト後の機能解析(細胞増殖能試験、細胞遊走能試験)を行った。これまでの論文報告では、癌細胞において PLOD2 の発現抑制により細胞遊走能は低下することが示唆されている。しかしながら、我々の細胞モデルにおいては、PLOD2 ノックアウトにより細胞遊走能は有意に亢進していた。このことから、細胞遊走能に関連した解析を行うことは学術的意義が高いと考えた。そこで、細胞遊走能の解析を、スクラッチアッセイ・Migration チャンバーアッセイ・タイムラプスビデオ撮影において行い、いずれにおいても PLOD2 ノックアウトによりマウス線維芽細胞の細胞遊走能は有意に亢進していた。(図 5-7)



(図 5) スクラッチアッセイ



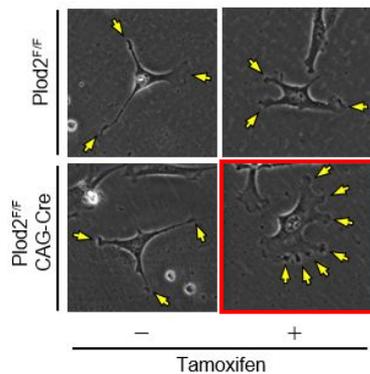
(図 6) Migration チャンバーアッセイ



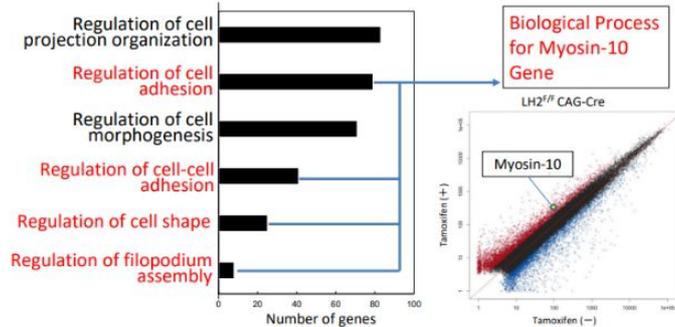
(図 7) タイムラプスビデオ撮影による細胞遊走距離の測定

(4) 同マウスの線維芽細胞の細胞形態学的解析・遺伝子発現解析を行う。

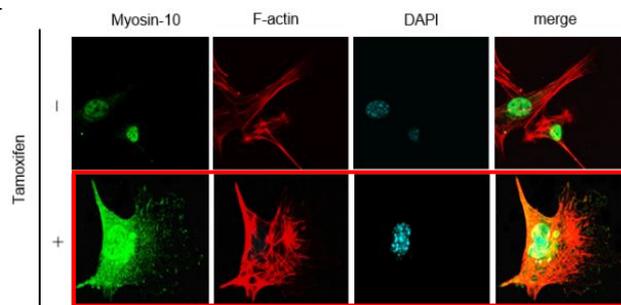
細胞遊走に関連して、PLOD2 ノックアウト細胞において遊走能の亢進とともに、遊走時の細胞形態変化（仮足形成）を認めた。（図 8）また、線維芽細胞より mRNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。PLOD2 ノックアウト細胞において細胞形態変化（仮足形成）細胞遊走能に関連するミオシン 10 の発現亢進を認めた。（図 9）さらに、ミオシン 10 について細胞免疫染色を行った。PLOD2 ノックアウト細胞においてはミオシン 10 の発現亢進を認めた。（図 10）



（図 8）細胞形態学的解析



（図 9）遺伝子発現解析



（図 10）細胞免疫染色

まとめ：

本研究では、PLOD2^{F/F} CAG-Cre マウスより初代培養した線維芽細胞において、PLOD2 ノックアウトすることで、細胞遊走時に働くと考えられている糸状仮足形成の促進を認め、有意に細胞遊走能の亢進が認められた。我々のこの細胞モデルは遺伝子発現プロファイルデータ、細胞免疫染色において、細胞遊走や糸状仮足形成に参与するミオシン 10 の発現亢進が認められ、この表現型を決定付けるものであった。我々の細胞モデルによって、線維芽細胞において PLOD2 の機能が喪失すると、糸状仮足の形成を介して細胞の運動機能に重要な役割を果たすことがわかった。したがって、この表現型の正確な役割を理解することは、線維症の病態や癌に伴う創傷治癒を解明するのに役立つと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小池 一幸 (Koike Kazuyuki) (10618060)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	
研究分担者	丹沢 秀樹 (Tanzawa Hideki) (50236775)	千葉大学・真菌医学研究センター・特任教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関