

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24076

研究課題名(和文)軸索誘導因子Netrinに着目した悪性黒色腫の進展における腫瘍-血管連関の解明

研究課題名(英文)The role of netrin, axon guidance factor in melanoma progression focusing the relationship between tumor and blood vessel

研究代表者

本田 尚郁(Hiromi, Honda)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10840085

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):近年,Netrin は多くのがん細胞に対して悪性度を亢進させることがわかり,治療のターゲットとして注目されている.まず,データベース解析から,メラノーマに発現するNetrin-1, -4の発現が高い患者の方が,生存率が低い傾向にあることがわかった.次にマウスメラノーマ細胞株B16を用いて実験を行った.すると,Netrin-1, -4処理によりB16の生存細胞数は増加し,CyclinD2やCyclinD2の発現量も増加したことから,両Netrin共にメラノーマの増殖を促進することが明らかとなった.また,Wound healing assayからB16細胞の移動を促進すると考えられた.

研究成果の学術的意義や社会的意義

Netrinがメラノーマの悪性化因子であることを示せば液性因子であるNetrinに対する中和抗体は有力な治療の候補となり得る.実際,Netrin-1に対する抗体は進行性固形がんに対しての第1相試験が終了している.さらにNetrin-1の発現量と悪性黒色腫の悪性度や予後との相関が明らかになれば,血液中を循環するNetrin-1量をELISA等で定量することで,再発や転移のリスクを反映する有用なバイオマーカーとなる可能性がある.

研究成果の概要(英文):Netrins were originally founded as axon guidance factors in nerve tissue. Recently netrins are known to be expressed by many kinds of cells and have multifunction in physiological and pathological conditions. In this study we examined the relationship between melanoma and Netrin-1 and Netrin-4. Database analysis revealed that the melanoma patients with high expression levels of netrin-1 or netrin 4 tend to have a low survival rate. Treatment of netrin-1 and netrin-4 increased the number of B16 cells. The treatment of murine netrin-1 and netrin-4 also increased the expression levels of cell cycle related genes such as cyclinA2 and cyclinD2. Furthermore, both netrin-1 and netrin-4 promote the migration of B16 cells assessed by wound healing assay.

研究分野:口腔保健学

キーワード:Netrin-1 Netrin-4 メラノーマ

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは口腔粘膜にも発生する悪性度の高いがんである。がんでは腫瘍の成長に伴い、がん細胞、血管内皮細胞、さらにこれらの細胞を支持する間質細胞から構成されるがん微小環境が構築される。このがん微小環境内では細胞間同士がコミュニケーションをとり、腫瘍の増殖・浸潤・転移を制御する。Netrin-1 と Netrin-4 (Netrin-1, 4) は多くの悪性腫瘍細胞の移動・浸潤に関わるが、メラノーマにおける Netrin-1 および Netrin-4 の役割には不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、まずメラノーマに発現する Netrin-1 および Netrin-4 の量と予後の相関を調べる。さらにメラノーマの増殖と移動における Netrin-1 と Netrin-4 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

The human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) を利用し、Netrin-1 および Netrin-4 の量と予後の相関を調べた。In vitro 実験にはマウスメラノーマ細胞株 B16 を用いた。B16 細胞を recombinant human Netrin-1 または recombinant human Netrin-4 で処理を行なった。細胞数は CCK-8 アッセイで定量した。CyclinA2 と CyclinD2 の mRNA の発現量は SYBR Green を用いたリアルタイム PCR 法で定量した。細胞の移動能は Wound healing アッセイで定量した。

4. 研究成果

(1) データベース解析

データベース解析を行ったところ、悪性黒色腫患者 102 名の病理組織マイクロアレイ解析 (TCGA からのデータ) では Netrin-1 (図 1 A) と Netrin-4 (図 1 B) の発現が高い組織を持つ患者の方が、生存率が低い傾向にあることが明らかとなった。

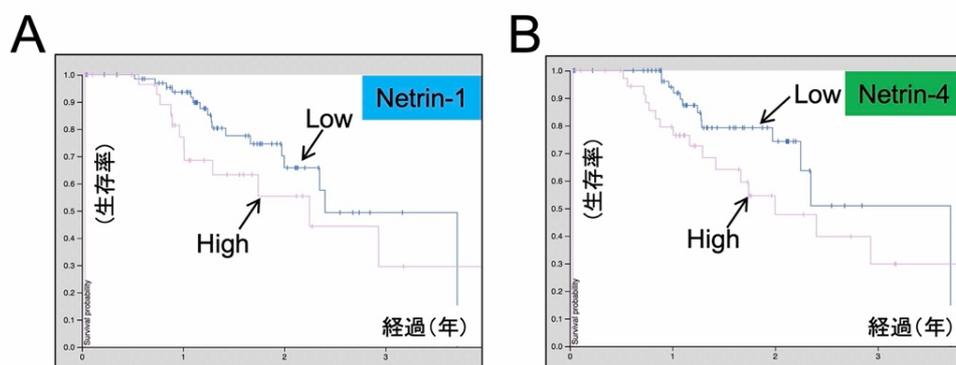


図 1

(2) 細胞の増殖に対する Netrin-1 と Netrin-4 の作用

Netrin-1 および Netrin-4 処理により、B16 の生存細胞数は増加した (図 2 A)。また、細胞周期に関連する遺伝子 CyclinA2 (図 2 B) や CyclinD2 (図 2 C) の発現量が増加したことから、Netrin-1 と Netrin-4 は共にメラノーマの増殖を促進する可能性があることがわかった。

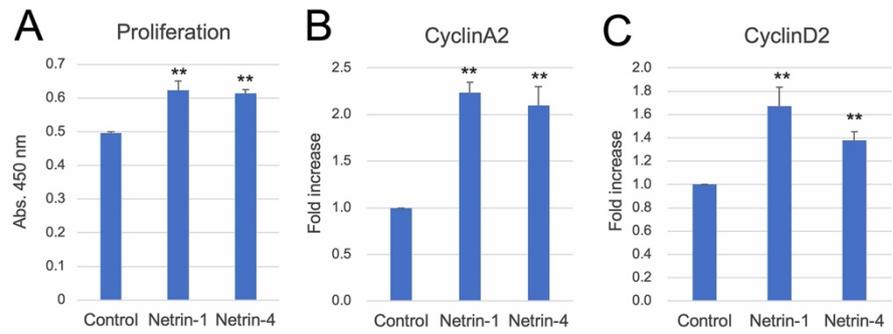
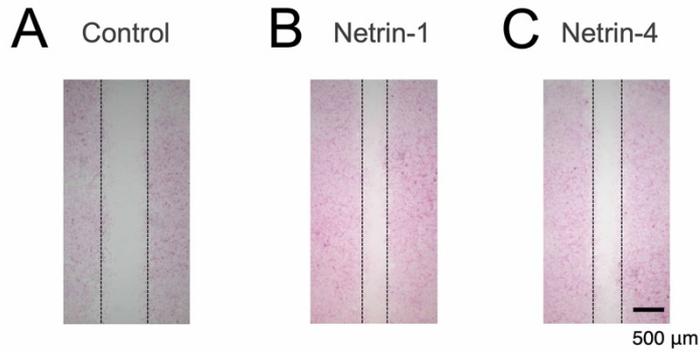


図 2

(3) 細胞の移動に対する Netrin-1 と Netrin-4 の作用

プレート上の細胞を同一幅で剥離したところコントロール (図 3A) と比べて Netrin-1 (図 3B) や Netrin-4 (図 3C) 処理により剥離した部分へ移動してくる細胞数が多かった (剥離した部分の幅が狭まった)。すなわち、Netrin-1 と Netrin-4 は B16 細胞の移動を促進すると考えられた。



(図 3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Ogawa M, Yaginuma T, Nakatomi C, Nakajima T, Tada-Shigeyama Y, Addison WN, Urata M, Matsubara T, Watanabe K, Matsuo K, Sato T, Honda H, Hikiji H, Watanabe S, Kokabu S | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Transducin-like enhancer of split 3 regulates proliferation of melanoma cells via histone deacetylase activity | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget | 6. 最初と最後の頁 404-414 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.26552. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 本田尚郁, 松原琢磨, Addison WN, 中道敦子, 古株彰一郎 |
| 2. 発表標題 Netrin-1は悪性黒色腫細胞B16細胞の増殖を制御する |
| 3. 学会等名 第79回九州歯科学会総会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Honda H, Matsubara T, Addison WN, Nakamichi A, Kokabu S |
| 2. 発表標題 Netrins regulate the proliferation of B16 murine melanoma cells |
| 3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2019（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 本田 尚郁, 邵 仁浩, 浪花 真子, 久保田 浩, 中道 敦子 |
| 2. 発表標題 OSCE 形式を用いた歯周組織検査実技試験の試行 |
| 3. 学会等名 第10回日本歯科衛生教育学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 本田尚郁 |
| 2. 発表標題 口腔機能低下症と歯科衛生士のかかわり |
| 3. 学会等名 第12回九州・山口口腔ケアシンポジウム ~人生100年の食を支援する口腔管理~ |
| 4. 発表年 2020年 |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |