

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：27102  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K09924  
研究課題名(和文) アミノ酸センサーうま味受容体が担う悪性黒色腫の増殖・浸潤・遠隔転移機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of proliferation, invasion, and distant metastasis of malignant melanoma regulated by the amino acid sensor .

研究代表者  
松尾 拓 (Matsuo, Kou)  
九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70238971  
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)：悪性黒色腫は皮膚や粘膜に発症する悪性腫瘍であり、早期より全身転移するため予後が悪い。悪性黒色腫患者ではplectinが高発現量していたことから、plectinは悪性黒色腫の病態に関連する可能性がある。そこで本研究では、悪性黒色腫の挙動におけるplectinの機能を検討した。CRISPR/Cas9システムを用いてplectin遺伝子を欠失した悪性黒色腫細胞を作製したところ、形成されたスフェロイドでは凝集密度が低下し、細胞塊は機械的刺激によって容易に崩壊した。また、フィブロネクチンに対する接着能も低下した。以上から、plectinは悪性黒色腫の増殖と接着を制御することが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫は非常に悪性度の高い悪性腫瘍であるが、免疫チェックポイント阻害剤の出現により、治療成績が著しく向上してきた。しかしながら、さまざまな臓器に対して免疫関連有害事象をもたらすことも明らかとなってきた。そのため、悪性黒色腫の病態を理解し新たな治療法を確立する必要性は依然として残っており本研究成果はそれらの解決のための一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Malignant melanoma is a malignant tumor that develops on the skin and mucous membranes. Since plectin is highly expressed in patients with malignant melanoma, plectin may be related to the pathogenesis of malignant melanoma. In this study, we investigated the function of plectin in the behavior of malignant melanoma. plectin-deficient malignant melanoma cells were generated using the CRISPR/Cas9 system. The adhesive ability to fibronectin was also decreased. These results suggest that plectin regulates the growth and adhesion of malignant melanoma cells.

研究分野：口腔病理学

キーワード：悪性黒色腫

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性黒色腫は皮膚や口腔を含む粘膜に発症する悪性腫瘍であり、早期より全身転移するため予後が悪い。アミノ酸は、糖新生をはじめとした糖質合成や脂質合成の基質として働くだけでなく、生理活性物質としての機能を持つ。悪性腫瘍は正常細胞とは異なる環境で増殖や転移などの活動をするため、低酸素状態をはじめとする特殊環境に適応する能力を獲得する。その適応の一つとしてアミノ酸代謝のリプログラミングが知られるようになってきた。そこでそのアミノ酸センサーとして *Tas1r1* に着目し、その機能を解析し、細胞増殖を制御する可能性を示したが実験の方向性に若干の修正を加え、*Src* シグナルの制御因子に着目してその悪性黒色腫の機能を解析した。

### 2. 研究の目的

(1) 悪性黒色腫の細胞挙動における *Src* シグナル制御因子の機能を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞培養およびトランスフェクション： B16 および HMV-II 細胞は理研 BRC から購入した。B16 細胞は、10% ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium で培養した。HMV-II 細胞は、10% FBS を添加した Ham's F12 Medium で培養した。B16 および HMV-II 細胞は、マイコプラズマ感染に留意しながら培養した。これら細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine 2000 を用いた。

(2) 逆転写および定量的 PCR (qPCR)： FastGene™ RNA Basic Kit を用いて mRNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用して cDNA に逆転写した。リアルタイム定量的 (q) PCR は、Quantstudio 3 システム (Thermo Fisher Scientific) で評価した。遺伝子発現レベルは、 $\Delta\Delta CT$  法で計算し、mRNA 標的遺伝子をハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin で標準化した。

(3) Western blot 法：細胞は、1% Triton X 含有溶解バッファーで溶解した。回収したタンパク溶解液をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファーで 95°C で 5 分間煮沸した。サンプルは、7.5, 10, 12, および 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) を行い、polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporation, Billerica MA) に転写した。5%ウシ血清アルブミン (BSA) でブロッキングした後、メンブレンを一次抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。使用した抗体は、抗 plectin-1 (#12254), 抗 *Src* pY416 (#2101), 抗 *Pyk2* (#3292), 抗 *Pyk2* pY402 (#3291), 抗 p38 MAPK (#8690), 抗-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (#9211), anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体 (#9102), anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#4370) (Cell Signaling Technology, CST, Danvers, MA), anti-*Src* (ab-1) (Merck, Darmstadt, Germany), anti-DDDDK-tag (Flag-tag, Fla-1), anti-GAPDH mAb-horseradish peroxidase-conjugated (HRP) -DirecT, および  $\beta$ -アクチン。次に、メンブレンを HRP 結合抗マウスまたは抗ウサギ二次抗体と共に常温で 1 時間インキュベートした。最後に、LAS4000 (Fujifilm Wako) と Immobilon ECL Ultra Western HRP Substrate を用いて、デジタルイメージング検出法にて検出した。

(4) 細胞免疫染色： $1 \times 10^4$  個の細胞をカバーガラスに播種し、1 日間培養した。細胞を 3.7% ホルムアルデヒドで固定し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した。細胞を、0.2% Triton X100 含有 PBS で透過処理し、5% BSA で 2 時間または 4 時間ブロッキングした。次に、細胞を抗ビメンチン、抗 Ki-67 ウサギモノクローナル抗体、5% BSA 中の抗 Flag-tag とともに 4°C で一晩インキュベートした。標的タンパク質は、Alexa 488 結合または Alexa 555 結合二次抗体を使用して可視化した。アクチン細胞骨格は、ローダミンファロイジンを使用して可視化した。核は、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を使用して可視化した。標本は、BZ-X810 顕微鏡を使用して画像化し、ImageJ ソフトウェア (NIH) を用いて解析した。

(5) 画像の定量化：細胞数と腫瘍領域は、ImageJ ソフトウェアで定量化した。細胞密度は、細胞数を腫瘍面積で割ったものとして計算した。細胞間の面積は、組織切片の総腫瘍面積から総細胞面積を差し引いたものとして計算した。また、切片を 0.1% azocarmine G solution, aniline blue and orange G solution (Azan staining) で染色し、BZ-X810 顕微鏡を用いて撮影した。

(6) マイクロアレイデータマイニング：NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) からのデータセット (GDS1375) [28, 42] を用いて、悪性黒色腫患者の plectin および *Src* 遺伝子発現について分析した。Dunn の事後検定を行った後、Kruskal-Wallis 分析を行い、平均値を比較した。

(7) データ解析と統計：グループ間の統計的有意性は、一方向 ANOVA とそれに続く Tukey-Kramer 多重比較法を用いて実施した。p<0.05 の場合、統計的に有意差ありとした。データは、平均 ± 平均の標準偏差として表記した (n = サンプル数)。すべての実験は、独立して少なくとも 2 回実施し、同様の結果を得た。

#### 4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫患者は plectin および Src が高発現する：NCBI GEO のデータ解析を行ったところ、正常組織を比較して悪性黒色腫患者では plectin と Src 遺伝子ともに高発現していた (図 1)。これは、plectin と Src シグナルが悪性黒色腫の増悪に関与していることが示唆された。

(2) plectin ノックアウト悪性黒色腫細胞では Src シグナルが減弱する：悪性黒色腫における plectin の役割を調べるために、CRISPR/Cas9 遺伝子導入法を用いて、マウス B16 黒色腫細胞の plectin 遺伝子を欠失させた。作製した細胞の plectin の発現を Western blot 法で確認し、plectin の発現を認めなかった細胞を PKO1, PKO2 と名付けた (図 2 A)。次に、悪性黒色腫細胞において plectin と Src が相互作用するかどうかを調べた。共免疫沈降法を行うと、control の B16 細胞では、plectin は Src と会合していたが、PKO 細胞では会合しなかった (図 2 B)。Src シグナルの活性化の指標であるリン酸化 Pyk2 (Tyr402) と (図 2 C)、Pyk2 と Src の会合は、PKO 細胞で減少した (図 2 D)。Src シグナルが抑制された細胞では通常、太く長いアクチン線維を伴った紡錘形となる。そこで、アクチンの抗体を用いて免疫染色したところ、PKO 細胞のアクチン線維は control 細胞よりも細長く、丸みが少ないことが観察された。また、control 細胞において、ビメンチンは核周囲に局在するが、PKO 細胞ではビメンチンが同部に局限しておらず、びまん性に存在していた。別の悪性黒色腫細胞を用いて同様の実験を行った。すなわち、ヒト悪性黒色腫細胞株 HMV-II に shRNA を導入して plectin をノックダウンした (shPlec)。すると、B16 細胞と同様に、HMV-II においても plectin ノックダウンにより Src シグナルは減弱し、異常な細長い細胞形態を有していた。

(3) plectin は細胞増殖と接着と制御する：腫瘍形成における plectin の機能を評価するために、control または PKO 細胞をヌードマウスの背中に皮下注射した。control 細胞と PKO 細胞の間で腫瘍の重量および体積に有意差は認めなかった。しかし、PKO 腫瘍の密度は control 腫瘍の密度よりも低かった。HE 染色を行ったところ、PKO 腫瘍内の細胞間の面積は control 腫瘍よりも大きく、細胞密度は減少していた。また、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを青く染色されるアザン染色を試みたが、細胞間スペースには赤血球以外の細胞外要素は検出されなかった。これら in vivo データは、plectin が細胞増殖と細胞間結合を制御している可能性が示唆された。

そこで次に、細胞増殖に対する plectin の機能を in vitro で調べた。まず cell viability 法と CCK-8 法を行ったところ、B16 細胞 (図 3 A, 3 B) と HMV-II 細胞いずれも plectin 発現欠損により生存細胞数が大幅に減少した。さらに、細胞周期進行の指標である Cyclin D1 の mRNA レベルと細胞増殖のマーカーである Ki-67 陽性細胞の数も plectin 欠損細胞で減少していた (図 3 D)。

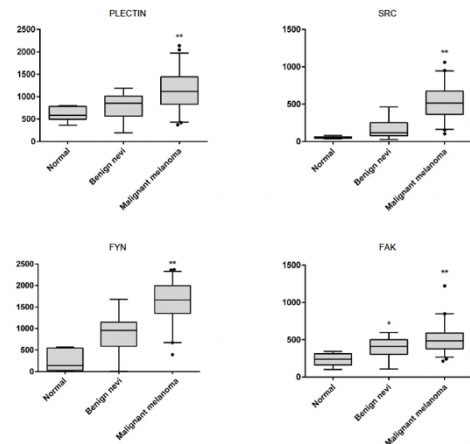


図 1：NCBI GEO のデータ解析 (Mizuta K et al., BMC cancer, 2023 より)

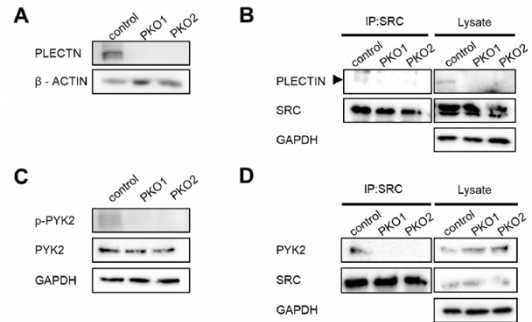


図 2：Plectin は Src と会合する (Mizuta K et al., BMC cancer, 2023 より)

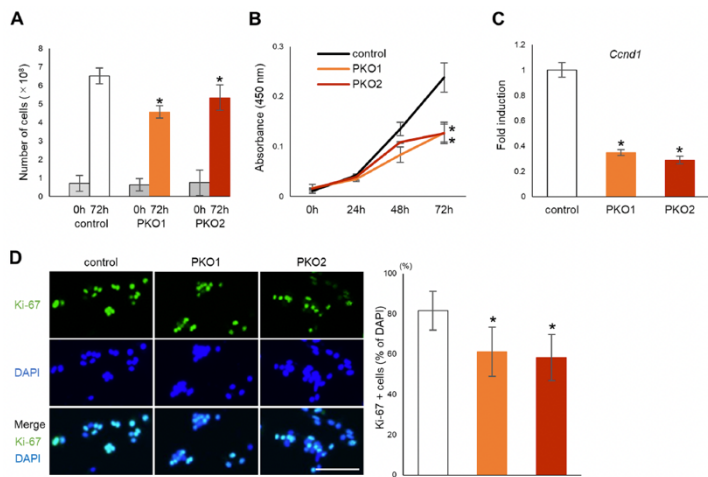


図 3：Plectin は細胞増殖を制御する (Mizuta K et al., BMC cancer, 2023 より)

細胞間結合に対する plectin の機能を評価するために、スフェロイドの形成と Dispase-based dissociation 法を行った。PKO 細胞と shPlec 細胞を使用するとき、control 細胞の時よりも、大きなスフェロイドを形成した (図 4A)。また、Dispase-based dissociation 法では、PKO 細胞が形成した細胞塊は、control 細胞の時と比較して非常に崩れやすく、細胞間接着が脆弱であることが示唆された (図 4B)。次に、細胞と細胞外マトリックスとの接着を cell adhesion 法で検討した。その結果、control 細胞と比較して、フィブロネクチンに対して接着した PKO 細胞と shPlec 細胞数が減少した (図 4C)。また、plectin と細胞骨格を制御する MAPK シグナルとの関係を検討した。Western blot 法から、p38 と Erk のリン酸化が PKO 細胞で増強していることがわかった。以上より、悪性黒色腫細胞の細胞増殖、細胞間接着および細胞外マトリックスへの細胞接着において、plectin が必須であることを示唆している。

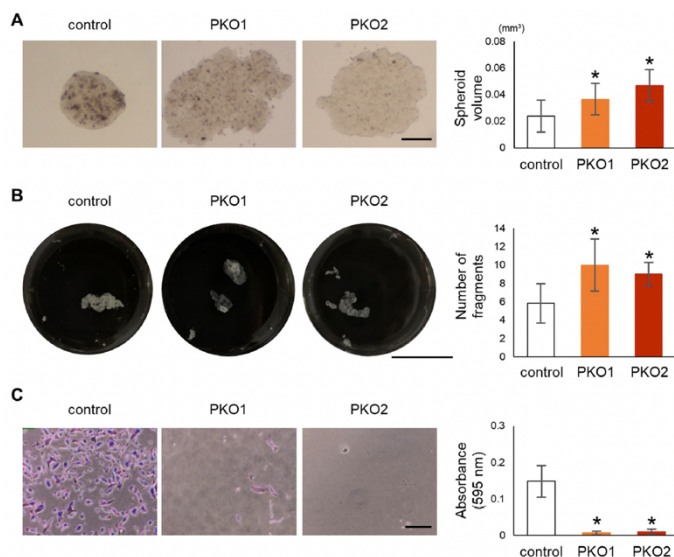


図4: Plectin は細胞接着を制御する

(Mizuta K et al., BMC cancer, 2023 より)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 田部 士郎, 吉岡 泉, 西牟田 文香, 矢田 直美, 松尾 拓, 富永 和宏	4. 巻 67
2. 論文標題 口蓋乳頭嚢胞の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 606-610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 田部 士郎, 土生 学, 矢田 直美, 松尾 拓, 富永 和宏	4. 巻 34
2. 論文標題 上顎洞内側壁に孤立して進展した歯牙腫・複雑型の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔診断学会雑誌	6. 最初と最後の頁 41-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Yaginuma Tatsuki, Gao Jing, Nagata Kengo, Muroya Ryusuke, Fei Huang, Nagano Haruki, Chishaki Sakura, Matsubara Takuma, Kokabu Shoichiro, Matsuo Kou, Kiyoshima Tamotsu, Yoshioka Izumi, Jimi Eijiro	4. 巻 41
2. 論文標題 p130Cas induces bone invasion by oral squamous cell carcinoma by regulating tumor epithelial?mesenchymal transition and cell proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1038 ~ 1048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Udompatanakorn Chatchaphan, Yada Naomi, Matsuo Kou	4. 巻 28
2. 論文標題 Assessing the Expression of Aquaporin 3 Antigen-Recognition Sites in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 611 ~ 620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAI.0000000000000802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田中 純平(九州歯科大学 生体機能学講座口腔内科学分野), 矢田 直美, 高橋 理, 吉賀 大午, 松尾 拓, 富永 和宏, 吉岡 泉	4. 巻 32
2. 論文標題 上唇粘膜に発生した多型腺癌の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔腫瘍学会誌	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 矢田直美, 松尾拓
2. 発表標題 口腔白色病変におけるThinPrep法の細胞像
3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会春期大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 純平, 吉賀 大午, 笹栗 正明, 土生 学, 矢田 直美, 松尾 拓, 富永 和宏, 吉岡 泉
2. 発表標題 口腔癌手術を契機に見られた、頸部に発生した神経節細胞腫の1例
3. 学会等名 第80回九州歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口 和也, 土生 学, 矢田 直美, 笹栗 正明, 松尾 拓, 富永 和宏
2. 発表標題 hTERT protein発現が口腔扁平上皮癌患者の予後に与える影響
3. 学会等名 第80回九州歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢田 直美, 松尾 拓
2. 発表標題 口腔細胞診ガイドラインにおける深層型細胞の解釈【春秋シリーズ】口腔細胞診の報告様式における深層細胞の評価
3. 学会等名 日本臨床細胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢田 直美, 松尾 拓
2. 発表標題 口腔表在癌の病理 口腔細胞診の現状 口腔癌の早期発見へ向けて
3. 学会等名 日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢田 直美(九州歯科大学 健康増進学・口腔病理), 松尾 拓
2. 発表標題 下顎骨に発生した類象牙質を伴った歯原性癌の一例
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢田 直美(九州歯科大学 健康増進学講座口腔病態病理学分野), 松尾 拓
2. 発表標題 口腔細胞診ガイドラインを再考する-現状と問題点- 口腔細胞診新報告様式の判定と病理組織像 特にOLSILとOHSIL判定について
3. 学会等名 日本臨床細胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢田 直美(九州歯科大学 健康増進学講座口腔病態病理学), 佐藤 由紀子, 竹内 賢吾, 小川 郁子, 平林 文香, 吉賀 大午, 大谷 泰志, 松尾 拓
2. 発表標題 口蓋に発生したhigh-grade transformationを伴う腺様嚢胞癌の1例
3. 学会等名 日本唾液腺学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢田 直美(九州歯科大学 健康増進学講座口腔病態病理学分野), 松尾 拓
2. 発表標題 歯肉腫瘍
3. 学会等名 日本口腔診断学会
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
研究分担者	古株 彰一郎 (Kokabu Shoichiro)  (30448899)	九州歯科大学・歯学部・教授  (27102)	
研究分担者	矢田 直美 (Yada Naomi)  (60468022)	九州歯科大学・歯学部・准教授  (27102)	
研究分担者	永野 健一 (Nagano Kenichi)  (60834348)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教  (17301)	

#### 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
---------	---------