

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：20K10185

研究課題名（和文）悪性黒色腫の増殖・浸潤・転移における細胞骨格制御因子Plectinの役割

研究課題名（英文）Role of cytoskeletal regulator Plectin in growth, invasion, and metastasis of malignant melanoma.

研究代表者

吉岡 泉 (Yoshioka, Izumi)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10305823

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）：近年われわれは、Src活性を制御する新たな因子としてplectinを見出した。そこで本研究では、悪性黒色腫の細胞挙動におけるplectinの機能を検討した。ヌードマウスにPlectinをノックアウトした細胞を接種したところ、野生型細胞に比べて腫瘍細胞の密度は低く、細胞間隙は広く疎であった。また、フィブロネクチンに対する接着能も低下した。さらに、ノックアウト細胞の細胞増殖能を評価したところ、経時的な細胞数の増加が低下した。plectinはがん遺伝子Srcシグナルを介し、悪性黒色腫の増殖と接着を制御する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔領域に生じる悪性黒色腫は皮膚に発生した悪性黒色腫と比較すると予後不良であるにも関わらず、発症頻度が低いために研究は進んでいない。また、近年開発された新しい抗がん剤ruthenium pyridinecarbothioamidはplectinを標的とするが、その詳しい作用機序などはわかっていなかった。本研究はこれらの一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Recently, we have identified plectin as a new factor that regulates Src activity. In this study, we investigated the function of plectin in the cell behavior of malignant melanoma. When nude mice were inoculated with plectin knockout cells, the density of tumor cells was lower than that of wild-type cells, and the interstitial spaces between cells were wider and sparser. Adhesion to fibronectin was also decreased. Furthermore, the proliferative ability of the knockout cells was evaluated, and the increase in cell number over time was reduced. plectin regulates the growth and adhesion of malignant melanoma via the oncogene Src signaling.

研究分野：口腔外科学

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、皮膚に生じる悪性腫瘍である。悪性黒色腫の細胞増殖能は高く、早期から全身転移を起こすため、悪性黒色腫患者の予後は悪い。近年、悪性黒色腫の治療薬として、CTLA-4やPD-1をターゲットとした阻害薬、すなわち免疫チェックポイント阻害薬が用いられている。しかし、これらの治療薬は、大腸炎、間質性肺炎やI型糖尿病などの有害な副作用を引き起こす可能性がある。

(2) 一部の腫瘍では免疫チェックポイント阻害薬効果を示さず、免疫チェックポイント療法中に耐性を獲得することもある。さらに、悪性黒色腫はコルチゾールやリンパ毒性中間体などの免疫抑制物質を分泌することなどから、新しい治療法の開発が望まれている。

(3) 癌原遺伝子として最初に同定された非受容体チロシンキナーゼである Rous sarcoma oncogene (Src) は、細胞増殖、細胞接着や細胞移動など様々な生理現象に関与しているだけでなく、悪性黒色腫を含むいくつかの腫瘍の悪性化、増殖や浸潤に関与する。Src シグナルが活性化されると、protein tyrosine kinase 2 beta (Pyk2) やアクチン結合タンパク質などの基質がリン酸化される。アクチン細胞骨格が変化すると、ストレスファイバーにより形成される紡錘形の細胞から、点状のアクチン構造を持つ丸い細胞に変換する。

(4) これまでに、質量分析法により plectin が Src と結合し、さらに破骨細胞で Src シグナルを活性化するという報告をしてきた。

2. 研究の目的

(1) Plectin は、4000 以上のアミノ酸からなる大きなタンパク質であり、アクチン、微小管やビメンチンなどの中間径フィラメントに結合することで、細胞骨格、細胞の形状および染色体構造を調節する。

(2) Plectin は悪性腫瘍で高発現し、さらに plectin が、悪性黒色腫の腫瘍増殖を抑制する ruthenium pyridinecarbothioamide の標的である可能性が報告されている。

(3) 本研究では、悪性黒色腫細胞挙動における plectin の役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養： 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。

(2) plectin ノックアウト B16 細胞の樹立：マウス plectin ターゲットオリゴヌクレオチド 5'-GGCGATGTCGAGATAGTCC-3' を pGuide-it-ZsGreen1 ベクターに挿入し、B16 に導入した。限界希釈法により単一細胞クローンを選択した。plectin の発現は、ウエスタンブロット法を用いて確認した。

(3) 動物実験 (腫瘍形成)：10 週齢のオス BALB/cAJcl-nu/nu マウスは、日本クレア株式会社から購入した。この実験は、九州歯科大学の動物管理使用委員会によって承認されたのち実施した (承認 #19-020)。麻酔には三種混合麻酔 (0.3 mg/体重 kg medetomidine, 4.0 mg/体重 kg midazolam, および 5.0 mg/体重 kg butorphanol) を用いた。麻酔したマウスに、 1×10^5 個/100 μ l の細胞を皮下注射した。2 週間後、マウスを三種混合麻酔薬で麻酔し、4% パラホルムアルデヒド/PBS で灌流固定した。次に、形成した腫瘍を摘出し、ノギスで大きさを測定し、電子天秤を用いて重量を測定した。体積は、短径²×長径×0.52 で計算した。クライオスタットを用いて 10 μ m の切片を作製した。切片を hematoxylin and eosin (H&E) で染色し、BZ-X810 顕微鏡を用いて画像化した。

(4) 細胞増殖および cell viability 法：細胞増殖は、Cell Counting Kit-8 を使用し、製品プロトコールに従って評価した。細胞を 96well プレートに 5000 細胞/well の密度で播種した。Cell viability 法は、Trypan Blue 色素排除法による生細胞の直接計数を行い評価した。細胞を 2.5×10^4 細胞/ウェルの密度で 24well プレートに播種した。3 日後、Trypan Blue 混合 trypsin で細胞を剥がし、TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad) で計測した。

(5) スフェロイド形成：細胞培養 dish の蓋の内側に 5000 個/15 μ l の細胞を滴下した。次に、蓋を上下逆さまにして、細胞を 37°C、5% CO₂ で 7 日間培養した。形成したスフェロイドは、Leica EZ4 HD 顕微鏡で撮影し、ImageJ ソフトウェアを用いて解析した。

(6) Dispase-based dissociation 法 : 6well プレートに 1 well あたり 1.0×10^6 個の細胞を播種した。コンフルエントの状態から 24 時間後, 細胞を 1440 PU/ml の Dispase II 溶液で, 37°C 40 分間インキュベートして, well の底から細胞を単層で剥がした。次に, Dispase 溶液を, 1ml ピペットを用いて新しい 6well プレートに慎重に移した。次に, ピペッティングを 7 回繰り返すことによって, 単層で剥離した細胞膜に機械的ストレスを加えた。

(7) cell adhesion 法 : $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ フィブロネクチンを 96well プレートに塗布し, 4°C , 一晩インキュベートした。次いで, フィブロネクチンをコーティングした well を室温で 2 時間, 2% BSA でブロッキングした。細胞を無血清培地に 1well あたり 3×10^4 個の細胞を播種し, 37°C , 5% CO_2 で 2 時間付着させた。非接着細胞を無血清培地で洗い流した。残りの接着細胞を 1% glutaraldehyde/PBS を用いて 10 分間固定し, 2% methanol 含有 crystal violet /PBS で室温で 20 分間振盪しながら染色した。ImageJ ソフトウェアを用いて接着細胞を計測した。また, Crystal violet を 1% SDS で溶解し, マイクロプレートリーダーを用いて 595nm で吸光度を測定し, 定量化した。

(8) データ解析と統計処理: 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 \pm 平均の標準偏差として表記した。

4. 研究成果

(1) 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 (図 1 A, 図 1 B)。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 (図 1 C, 図 1 D)。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。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。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。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。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。また, plectin と細胞骨格を制御

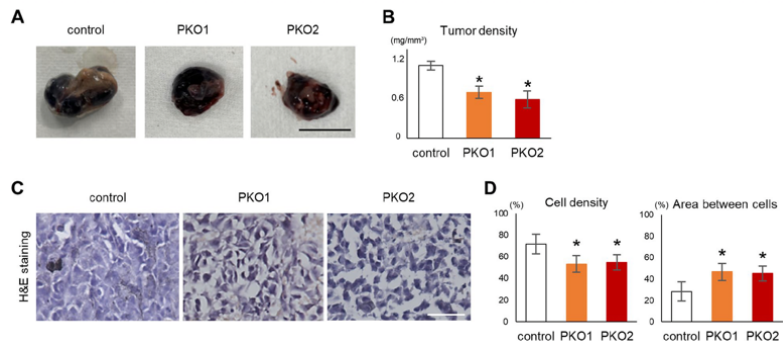


図1: 形成した腫瘍 (Mizuta K et al., BMC cancer, 2023 より)。

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 (図 1 C, 図 1 D)。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。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。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。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。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。また, plectin と細胞骨格を制御

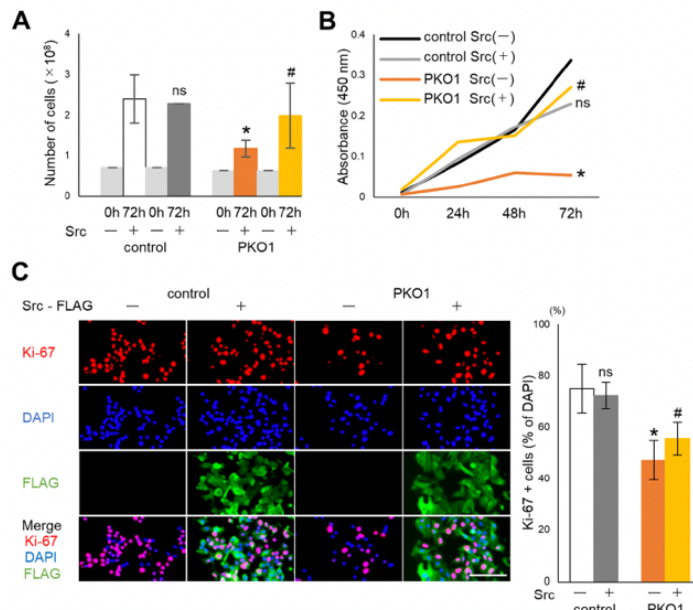


図2: Src 過剰発現は細胞増殖を回復する (Mizuta K et al., BMC cancer, 2023 より)。

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。

(2) Src 過剰発現は plectin ノックアウト細胞の細胞増殖と接着を回復する: Plectin 遺伝子欠損による表現型が Src シグナルを介していたかどうかを確認するために、PKO 細胞に恒常活性型 Src を過剰発現させ Src シグナルを再構築した。恒常活性型 Src を過剰発現すると、control 細胞と PKO 細胞ともに、リン酸化 Pyk2 の発現が増加した。Src シグナルを再構築した PKO 細胞では、細長い形態をした細胞が減少し、野生型の B16 細胞と同様の形態を示し、ビメンチンが核周囲に局限した。

Src を過剰発現させた PKO 細胞は、生存細胞数と Ki-67 陽性細胞

数を増加させたことから、細胞増殖が回復したと考えられた (図 2 A-2 C)。また、Src を再構築した細胞は、control 細胞と同程度まで凝集したスフェロイドを形成し (図 3 A)、Dispase-based dissociation 法では、機械的刺激による細胞塊の崩壊が減少したことから、PKO 細胞における細胞間接着の減弱が Src 依存的であると示唆された (図 3 B)。さらに、Src を再構築させた PKO 細胞ではフィブロネクチンに対して接着した細胞数も増加した (図 3 C)。以上より、悪性黒色腫において Plectin は Src シグナルを活性化することにより細胞増殖と細胞接着を制御していることが確認された。

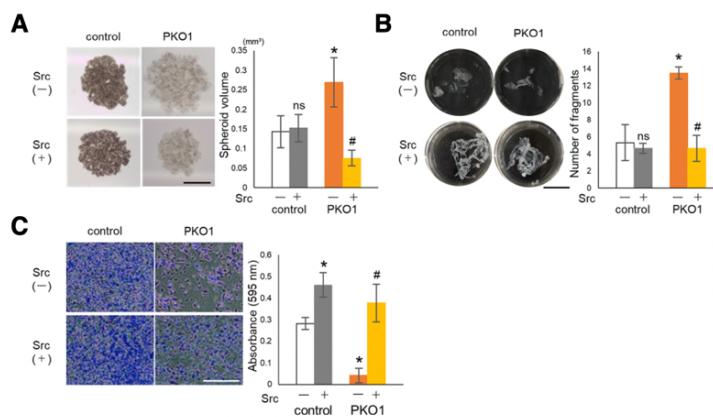


図3: Src 過剰発現は細胞接着を回復する

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

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Haraguchi K, Habu M, Yada N, Sasaguri M, Yoshioka I, Tominaga K	4. 巻 15
2. 論文標題 Human telomerase reverse transcriptase protein expression is associated with survival in patients with oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Clin Exp Pathol	6. 最初と最後の頁 29-37
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 Yoshiga Daigo, Yoshioka Izumi, Habu Manabu, Sasaguri Masaaki, Tominaga Kazuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Effective ancillary role and long-term course of daily or weekly teriparatide treatment on refractory medication-related osteonecrosis of the jaw: a clinical case series	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bjoms.2021.10.004	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 Takahashi Osamu, Tanaka Junpei, Habu Manabu, Yoshiga Daigo, Sasaguri Masaaki, Uehara Masataka, Hayakawa Mana, Yoshioka Izumi, Tominaga Kazuhiro	4. 巻 63
2. 論文標題 A simple sandwich technique using buttons combined with a tie-over technique for an intraoral split-thickness skin graft	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 101 ~ 103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.19-0510	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 Haraguchi Kazuya, Yoshiga Daigo, Oda Masafumi, Tabe Shirou, Mitsugi Sho, Takahashi Osamu, Habu Manabu, Sasaguri Masaaki, Morimoto Yasuhiro, Yoshioka Izumi, Tominaga Kazuhiro	4. 巻 131
2. 論文標題 Depth of invasion determined by magnetic resonance imaging in tongue cancer can be a predictor of cervical lymph node metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 231 ~ 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oooo.2020.07.005	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 Takahashi Osamu, Tanaka Junpei, Habu Manabu, Yoshiga Daigo, Sasaguri Masaaki, Uehara Masataka, Hayakawa Mana, Yoshioka Izumi, Tominaga Kazuhiro	4. 巻 63
2. 論文標題 A simple sandwich technique using buttons combined with a tie-over technique for an intraoral split-thickness skin graft	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 101 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnugd.19-0510	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 Haraguchi Kazuya, Yoshiga Daigo, Oda Masafumi, Tabe Shirou, Mitsugi Sho, Takahashi Osamu, Habu Manabu, Sasaguri Masaaki, Morimoto Yasuhiro, Yoshioka Izumi, Tominaga Kazuhiro	4. 巻 131
2. 論文標題 Depth of invasion determined by magnetic resonance imaging in tongue cancer can be a predictor of cervical lymph node metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 231 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oooo.2020.07.005	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 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 Matsubara Takuma, Yaginuma Tatsuki, Addison William N., Fujita Yuko, Watanabe Kouji, Yoshioka Izumi, Hikiji Hisako, Maki Kenshi, Baron Roland, Kokabu Shoichiro	4. 巻 132
2. 論文標題 Plectin stabilizes microtubules during osteoclastic bone resorption by acting as a scaffold for Src and Pyk2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115209 ~ 115209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115209	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 水田 奏, 松原 琢磨, 後藤 晶乃, 宮脇 有希, 野島 淳也, 佐藤 毅, 柳沼 樹, 吉賀 大午, 富永 和宏, 吉岡 泉, 古株 彰一郎
2. 発表標題 がん遺伝子Src結合分子Plectinは悪性黒色腫の増殖, 移動および接着を制御する
3. 学会等名 第75回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水田 奏, 松原 琢磨, Addison William, 吉岡 泉, 古株 彰一郎
2. 発表標題 Plectinはがん遺伝子Srcの活性化を介して悪性黒色腫の接着能を制御する
3. 学会等名 第80回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水田 奏, 松原 琢磨, Addison William, 吉岡 泉, 古株 彰一郎
2. 発表標題 Plectinはがん遺伝子Srcの活性化を介して悪性黒色腫の接着能を制御する
3. 学会等名 先端歯学スクール2022 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田浩範, 土生学, 笹栗正明, 吉賀大午, 高橋理, 三次翔, 吉岡泉, 富永和宏
2. 発表標題 予防的顎部郭清術の適応を再考する
3. 学会等名 第40回口腔腫瘍学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuta K, Matsubara T, Addison, W., Yaginuma T, Yoshioka I, Kokabu S
2. 発表標題 PLECTIN, a SRC oncogene-binding protein, promotes the growth and adhesion of malignant melanoma via regulation of SRC activity
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuta K, Matsubara T, Addison W, Yaginuma T, Yoshioka I, Kokabu S
2. 発表標題 Oncogene Src binding protein Pectin control regulates growth of malignant melanoma by activation of oncogene Src
3. 学会等名 International Association of Dental Research (IADR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水田 奏, 松原 琢磨, 吉岡 泉, 古株 彰一郎
2. 発表標題 悪性黒色腫細胞の増殖・遊走における中間径フィラメント関連タンパク質Plectinの役割
3. 学会等名 第74回NPO法人日本口腔科学会学術集会
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	松原 琢磨 (Matsubara Takuma) (00423137)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (27102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	矢田 直美 (Yada Naomi) (60468022)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (27102)	

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