

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20614

研究課題名（和文）ROCKシグナルを標的とした犬悪性黒色腫の新規治療法の探索

研究課題名（英文）Exploring a novel therapy for canine malignant melanoma by targeting ROCK signalling

研究代表者

高橋 洋介（Takahashi, Yosuke）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員

研究者番号：50912549

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：犬悪性黒色腫は極めて転移性が高く、効果的な全身療法がないため、外科手術で病変を切除しても、その後、転移し、予後は1年未満と短いことから、新たな全身療法の確立が求められている。本研究では犬悪性黒色腫の新たな転移機構として、PDPN-Rho-ROCKを同定し、その詳細なシグナル機構を解明した。さらに、犬悪性黒色腫細胞株において、PDPN-Rho-ROCKシグナルを阻害することで、転移能を低下させることができることを明らかにした。したがって、犬悪性黒色腫において、PDPN-Rho-ROCKシグナルの阻害薬が新たな全身療法の確立に有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬の悪性黒色腫はとくに口腔内に発生が多く、口腔腫瘍の中で最も発生頻度が高い。大部分の症例が外科手術や放射線療法等の局所療法を行っても早期のリンパ節転移や肺転移のために、発症後1年以内に死に至る。現状では、犬において有効な化学療法や免疫療法がなく、全身投与により転移細胞を死滅させることが可能な、新たな治療法の開発が切望されている。本研究では、犬悪性黒色腫において、PDPN-Rho-ROCKシグナルが転移機構に関与しており、その阻害薬が新たな全身療法の確立に有用である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Canine malignant melanoma is a metastatic tumor and, due to the lack of effective systemic therapy, even after surgical resection of the lesion, the disease subsequently metastasises and the prognosis is short - less than one year - and therefore the establishment of a new systemic therapy is required. In this study, we identified PDPN-Rho-ROCK as a novel metastatic mechanism of canine malignant melanoma and elucidated its detailed signalling mechanism. Furthermore, we found that inhibition of PDPN-Rho-ROCK signalling in canine malignant melanoma cell lines can reduce the metastatic potential. Therefore, we have shown that inhibitors of the PDPN-Rho-ROCK signalling pathway may be useful in the development of new systemic therapies for canine malignant melanoma.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：犬悪性黒色腫 転移

1. 研究開始当初の背景

- (1) 悪性黒色腫はヒトや犬を含めた種々の動物種で認められるメラニン色素産生細胞の腫瘍であり、多くの場合、極めて悪質な挙動をとる。
- (2) 犬においても悪性黒色腫は発生の多い腫瘍であり、とくに口腔内犬悪性黒色腫は口腔腫瘍の中で最も発生頻度が高く、大部分の症例が外科手術や放射線療法等の局所療法を行っても早期のリンパ節転移や肺転移のために、発症後1年以内に死に至る。
- (3) 現状では、犬において有効な化学療法や免疫療法がなく、全身投与により転移細胞を死滅させることが可能な、新たな全身療法の開発が切望されている。
- (4) 採択者は犬悪性黒色腫の予後指標分子である増殖マーカーの発現と発現が関連する治療標的分子の探索を行い、ポドプラニン(PDPN)と呼ばれる分子が犬悪性黒色腫において異所性に高発現し、増殖マーカーの発現と正の関連を示すことを見出した。
- (5) PDPNは下流にRho-ROCKシグナルを有し、胎児期のリンパ管の発生において、リンパ管内皮細胞の増殖や運動を制御することで、リンパ管の発生・分化を担う細胞膜蛋白であり、犬悪性黒色腫細胞の増殖や運動を制御することで、転移に関与している可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、犬悪性黒色腫におけるPDPN-Rho-ROCKシグナルと転移促進機構の関連解明とその治療応用の検証を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) PDPNを高発現する犬悪性黒色腫細胞株2株を用いて、Crisper/Cas9法にて作成したPDPNノックアウト犬悪性黒色腫細胞株の機能変化を検証するためにトランスウェルアッセイ、マトリゲルアッセイ、WST1増殖アッセイ、AnnexinV FACS染色法を用いた解析を行なった。
- (2) PDPNノックアウト犬悪性黒色腫細胞株と親株を用いて、ウェスタンブロット法にて、PDPN-ERM-Rho-ROCK-MLC2分子の活性化状態を検証した。
- (3) PDPNノックアウト犬悪性黒色腫細胞株と親株を用いて、網羅的遺伝子発現変化をRNAシークエンスにて解析した。
- (4) 犬悪性黒色腫細胞株にROCK阻害剤3剤(Fasudil, Y-27632, GSK269962A)の添加を行い、トランスウェルアッセイ、マトリゲルアッセイ、WST1増殖アッセイ、AnnexinV FACS染色法を用いた解析を行なった。

4. 研究成果

(1) PDPN ノックアウト犬悪性黒色腫細胞株では、親株に比べ、トランスウェルアッセイ、マトリゲルアッセイ、WST1 増殖アッセイ、AnnexinV FACS 染色法において、移動能、浸潤能、増殖能が有意に低下し、アポトーシス細胞率が有意に上昇した。

(2) ウェスタンブロットを用いた解析において、PDPN ノックアウト犬悪性黒色腫細胞株では、親株に比べ、リン酸化 ERM の発現増加、RhoA-GTP の発現増加、リン酸化 MYPT1 およびリン酸化 MLC2 の発現増加が認められた。

(3) RNA シークエンス解析では、PDPN ノックアウト犬悪性黒色腫細胞株では、親株に比べ、浸潤や移動、増殖に関わる遺伝子発現の増加を認め、GSEA 解析においても有意であった。

(4) 犬悪性黒色腫細胞株に ROCK 阻害剤 3 剤(Fasudil, Y-27632, GSK269962A)の添加を行ったところ、PDPN 欠損犬悪性黒色腫細胞株と同様に移動能、浸潤能、増殖能の低下およびアポトーシスの誘導が認められた。

(5) まとめ

本研究では、PDPN 欠損犬悪性黒色腫細胞株を用いた解析および ROCK 阻害剤の添加実験により、犬悪性黒色腫において PDPN-Rho-ROCK シグナルを介した転移の促進機構を実証し、ROCK 阻害剤を用いた新たな全身療法の可能性を示した。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 KAMOTO Satoshi, SHINADA Masahiro, KATO Daiki, TSUBOI Masaya, YOSHIMOTO Sho, YOSHITAKE Ryohei, ETO Shotaro, IKEDA Namiko, TAKAHASHI Yosuke, HASHIMOTO Yuko, CHAMBERS James, UCHIDA Kazuyuki, YAMADA Shinji, KANEKO Mika K., NISHIMURA Ryohei, KATO Yukinari, NAKAGAWA Takayuki	4. 巻 83
2. 論文標題 Expression of podoplanin in various types of feline tumor tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1795 ~ 1799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0608	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masahiro Shinada, Daiki Kato, Namiko Ikeda, Toshio Li, Yuka Kodera, Masaya Tsuboi, James Chambers, Kazuyuki Uchida, Yukinari Kato, Ryohei Nishimura, Takayuki Nakagawa.
2. 発表標題 Podoplanin promotes the tumor growth of canine malignant melanoma via Rho-associated kinase signals
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 品田真央、加藤大貴、池田凡子、李捷生、小寺優佳、青木督、太田峻介、高橋洋介、橋本裕子、坪井誠也、チェンバースジェームズ、内田和幸、加藤幸成、西村亮平、中川貴之。
2. 発表標題 イヌ悪性黒色腫のPDPN-ROCKシグナルを標的とした新たな分子標的治療の検証
3. 学会等名 第25回日本獣医がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嘉本諭、加藤大貴、品田真央、坪井誠也、池田凡子、青木督、小寺優佳、李捷生、太田峻介、高橋洋介、橋本裕子、チェンバースジェームズ、内田和幸、金子美華、西村亮平、加藤幸成、中川貴之
2. 発表標題 犬悪性黒色腫に対する抗ポドプラニン抗体を用いた分子標的治療の開発
3. 学会等名 第25回日本獣医がん学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------