



Title	皮膚有棘細胞癌におけるFAM83Hの機能解析
Author(s)	得地, 景子
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15454号
Issue Date	2023-03-23
DOI	10.14943/doctoral.k15454
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90070
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2772
File Information	TOKUCHI_Keiko.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

皮膚有棘細胞癌における FAM83H の機能解析

(Functional analysis of FAM83H

in cutaneous squamous cell carcinoma)

2023年3月

北 海 道 大 学

得 地 景 子

学 位 論 文

皮膚有棘細胞癌における FAM83H の機能解析

(Functional analysis of FAM83H
in cutaneous squamous cell carcinoma)

2023年3月

北 海 道 大 学

得 地 景 子

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
実験方法	12 頁
実験結果	49 頁
考察	120 頁
結語	123 頁
謝辞	124 頁
利益相反	125 頁
引用文献	126 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Tokuchi K, Kitamura S, Maeda T, Watanabe M, Hatakeyama S, Kano S, Tanaka S, Ujiie H, Yanagi T

Loss of FAM83H promotes cell migration and invasion in cutaneous squamous cell carcinoma via impaired keratin distribution.

Journal of Dermatological Science 104: 112-121, (2021)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Keiko Tokuchi, Shinya Kitamura, Takuya Maeda, Masashi Watanabe, Shigetsugu Hatakeyama, Satoshi Kano, Shinya Tanaka, Hideyuki Ujiie, Teruki Yanagi.

Loss of FAM83H plays a promoting role for cell migration and invasion in cutaneous squamous cell carcinoma via altered keratin distribution.

The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology, 2021.12. (Online).

得地景子、北村真也、前田拓哉、渡部 昌、畠山鎮次、加納里志、田中伸哉、氏家英之、柳 輝希

FAM83H の発現低下はケラチン分布の変化を介して皮膚有棘細胞癌の遊走と浸潤を促進する

第 86 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、新潟（ハイブリッド開催）、2022

要旨

【背景と目的】

皮膚悪性腫瘍の多くは、紫外線が発生要因の一つであるため、高齢化やオゾン層の破壊の進行とともに今後の発症増加が予測され、さらなる診断方法や新薬の開発、治療レジメンの開発など、臨床的・基礎的な研究開発が望まれている。皮膚有棘細胞癌 (Squamous cell carcinoma, 以下 SCC と略す) は、世界で 2 番目に多い皮膚悪性腫瘍であり、主に慢性的に日光にさらされる高齢者の皮膚に好発する。人種別に見ると、紫外線の影響を反映して、白人における発症率がアジア系と比較して高いが、本邦でも急速な人口動態の高齢化に伴い、その発症率は年々上昇している。早期の症例で、外科的切除により治療ができた場合には予後良好であるが、進行すると miserable な外観を呈して、本人や家族の Quality of Life (以下、QOL と略す) が損なわれるだけでなく、リンパ節や他臓器に転移した場合は、非常に予後不良である。しかし、転移率は 1~3% と低いためか確立された化学療法に乏しく、小さな症例シリーズや臨床試験に基づき、施設ごとに様々な治療が行われているのが現状である。そのため、進行期の皮膚 SCC に対して有効性が期待できる新たな治療法の確立が望まれている。

最近、我々の研究グループは、TRIM 29 (tripartite motif-containing protein 29, 以下 TRIM29 と略す) が扁平上皮において高発現していること、またケラチン・FAM83H と結合しケラチンの分布を調節することで細胞遊走を調整すること、皮膚 SCC では TRIM29 発現が抑制され浸潤能・転移能を獲得していることを見出した (Yanagi et al., 2018)。FAM83H は、family with sequence similarity83 の一つで、その変異により常染色体優性低石灰化エナメル質形成不全症を引き起こすことから、エナメル質形成に必須のタンパク質であるが (Kim et al., 2008)、近年の研究により様々な腫瘍形成に関与することが示唆されている。また、悪性腫瘍における FAM83H の発現レベルは、その組織・細胞によってさまざまであると予測される。

現在のところ、皮膚悪性腫瘍 (とくに SCC) における FAM83H の機能や役割についての検討はされておらず、また正常な表皮角化細胞における機能も明確ではない。本研究課題の目的は、表皮角化細胞および皮膚 SCC 細胞における FAM83H に注目し、この分子の皮膚腫瘍における発現、細胞内局在、結合分子の同定、ケラチンやデスモゾーム関連分子との関係などを検討することによって、FAM83H の未知の分子機能を明らかにするとともに、FAM83H が、皮膚 SCC の予後予測分子や新規治療ターゲットになり得るかを検討することである。

【対象と方法】

Human protein atlas などの public database を検索することにより FAM83H

の臓器ごとの発現を調べた。臨床検体として、SCC51 検体について FAM83H の免疫組織化学染色を行い、FAM83H の発現量と病期や分化度、予後などの臨床情報との相関について解析を行った。TRIM29 とケラチンの免疫組織化学染色も行い、FAM83H の発現との相関を評価した。

ヒト不死化ケラチノサイトである HaCaT 細胞株、頭頸部 SCC 細胞である SAS 細胞株、皮膚 SCC 細胞である DJM1 細胞株に対して、shRNA ベクターを用いて FAM83H ノックダウン細胞を作製し、*in vitro* および *in vivo* での細胞増殖能や遊走能、浸潤能および転移能などについて解析をおこなった。pQCXI-puro vector による FAM83H 過剰発現細胞を作製し、*in vitro* での遊走能・浸潤能を評価した。

また、分子機構を解明するために免疫沈降法や免疫蛍光染色法を行った。さらに、電子顕微鏡を用いて FAM83H ノックダウン細胞の超微細形態学的解析を行った。

【結果】

データベースの検索により、FAM83H は、皮膚などの重層上皮にて高発現することが分かった。臨床検体の解析では、皮膚 SCC における FAM83H の発現レベルは、正常皮膚に比べて低下しており、浸潤部では、表皮内病変や微小浸潤部と比較してさらに低下していた。mRNA レベルで皮膚 SCC での FAM83H 発現が低下していることを確認した。FAM83H の発現レベルと腫瘍の分化度との間に相関を認め、腫瘍が低分化になるほど、FAM83H の発現が低下していた。細胞増殖能の解析では、FAM83H ノックダウン細胞群とコントロールとで、細胞増殖能に有意差はなかった。しかし、細胞遊走能と浸潤能は、FAM83H ノックダウン群で、コントロールと比較して有意に亢進した。また、ヌードマウスに異種移植した Xenograft モデルの解析では、FAM83H ノックダウン細胞はコントロールに比べて肺への転移が有意に亢進した。細胞の免疫染色では、FAM83H ノックダウンにより、正常では細胞質内にびまん性に分布しているケラチン線維が核周囲に凝集した。免疫沈降法により、FAM83H が TRIM29 およびケラチンと複合体を形成していることや、FAM83H のノックダウンによりケラチンの可溶性が変化することが明らかとなった。電子顕微鏡による解析では、FAM83H ノックダウンによりケラチン線維の太さ・数がコントロールと比較して有意に減少した。臨床検体について、TRIM29 およびケラチンの免疫組織化学染色も行ったところ、FAM83H と TRIM29 の発現レベルには正の相関を認めた。また、FAM83H の発現が低下している部分では、ケラチンが核周囲に凝集しており、免疫染色の結果と一致した。

【考察】

本研究により、皮膚 SCC 細胞において FAM83H の発現が低下すると、通常

では細胞質にびまん性に分布しているケラチン線維が核周囲に凝集することが明らかになった。ケラチン線維が核周囲に凝集すると、細胞の遊走・浸潤が亢進することは先行研究で認められているため (Beil et al., 2003; Rolli et al., 2010)、FAM83H はケラチンの分布を調節することで、皮膚 SCC 細胞の遊走・浸潤・転移に関与していると考ええる。

【結論】

FAM83H は皮膚 SCC において細胞遊走や細胞浸潤を制御する分子として機能しており、皮膚 SCC における新規治療ターゲット分子候補となりうる。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

BCC	Basal cell carcinoma
BSA	Bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DUF	domain of unknown function
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transformation
FAM	family with sequence similarity
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein
HE	Hematoxylin and Eosin
HRP	horseradish peroxidase
IP	immunoprecipitation
IS	immunostaining score
IVIS	In Vivo Imaging System
mRNA	messenger RNA
OS	overall survival
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimine
PFS	progression-free survival
QOL	Quality of Life
RNA	ribonucleic acid
SCC	Squamous cell carcinoma
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
SPC	sphingosylphosphorylcholine
TRIM	tripartite motif-containing protein

緒言

皮膚悪性腫瘍について

皮膚悪性腫瘍は、その起源となる細胞によって細かく分類され、悪性黒色腫、基底細胞癌、有棘細胞癌、乳房外パジェット病、メルケル細胞癌などが含まれる。悪性黒色腫においては免疫チェックポイント阻害薬の開発により、生命予後が飛躍的に改善したが、その他の癌については、致死率が高くないことや希少癌が多いこともあって研究が遅れており、治療レジメンが確立されていないものも多く、限られた数の患者を対象とした小さな症例シリーズや臨床試験の結果に基づいて化学療法が行われている。本邦では有棘細胞癌、基底細胞癌、乳房外Paget病、悪性黒色腫の4種が皮膚悪性腫瘍取り扱い規約（日本皮膚悪性腫瘍学会）にガイドラインとして取り上げられており、診療指針があるが、その他の皮膚悪性腫瘍においては、「有棘細胞癌に基づいた治療を行う」と位置づけられており、皮膚悪性腫瘍全般の臨床研究および治療開発が広く望まれている。

FAM83H について

FAM83H は、family with sequence similarity 83 (FAM83) のメンバーであり、主に皮膚、食道、胃、大腸などの上皮に発現している (図 1)。FAM83H 遺伝子は染色体 8q24.3 にあり、1179 アミノ酸の 127 kDa タンパク質である FAM83H をコードしている。FAM83H は、常染色体優性低石灰化エナメル質形成不全症の原因遺伝子として報告されているが (Kim et al., 2008)、近年、癌との関連も示唆されている。大腸癌、乳癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌などでは、FAM83H の発現レベルは上昇するが、脳の星状細胞腫や乏突起膠腫では発現レベルが低下しており (Snijders et al., 2017)、悪性腫瘍における FAM83H 発現は、その組織・細胞によってさまざまであると推測される。また、大腸癌においては、過剰発現した FAM83H が、CK-1 α をケラチン線維に補充することで、ケラチン線維を分解し、遊走・転移に関与するといわれている (Kuga et al., 2013)。しかし、FAM83H の正常および悪性の表皮細胞における分子機能は明らかではない。

TRIM ファミリー分子は、RING finger domain, B-box domain, coiled-coil region を共通に持つ分子群であり、蛋白分解、転写調節、癌化への関与など、細胞の重要な機能を制御している。近年、我々のグループは、TRIM29 の発現低下が、ケラチン分布の調節を介して皮膚 SCC の遊走、浸潤、および転移に関連していることを明らかにした (Yanagi et al., 2018)。TRIM29 は、ケラチンおよび FAM83H と複合体を形成しているが、この複合体は相互作用し、ケラチンの分布に関与していると推測される。しかし、皮膚 SCC における TRIM29 と FAM83H の機能は詳細には解明されていない。本研究では、表皮細胞および扁平上皮癌における TRIM29 関連分子である FAM83H に注目し、この分子の皮膚腫瘍における発現、細胞内局在、結合分子の同定、ケラチンやデスモゾーム関連分子との関係などを検討することにより、FAM83H の未知の機能を解析した。

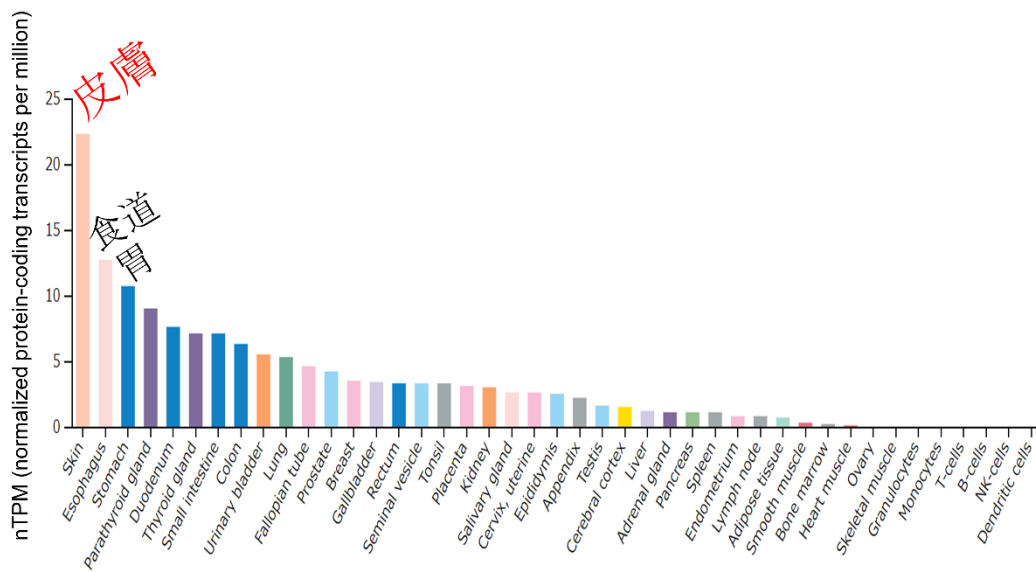


図 1 : 正常組織での FAM83H の発現
 主に皮膚、食道、胃、大腸などの重層上皮に発現している
 (<https://www.proteinatlas.org/>)。

皮膚有棘細胞癌について

皮膚 SCC (Squamous cell carcinoma, 以下 SCC)は、世界で 2 番目に多い皮膚悪性腫瘍であり、非黒色腫皮膚悪性腫瘍の約 20%を占める (Alam et al., 2001)。SCC の発生には紫外線、慢性炎症、外傷などの機械的刺激、ヒトパピローマウイルスなどのウイルス感染、放射線、喫煙、免疫抑制などが関与する。人口の高齢化、レクリエーションによる日光浴の増加、免疫抑制等により、皮膚 SCC の発生率は過去 30 年間で 200%増加している。米国では毎年 100 万人の皮膚 SCC 患者が治療を受けており、死亡者数は 8,000 人に達する (Pacella et al., 2021)。日本における発症率に関する明確な統計はないが、毎年 人口 10 万人あたり約 2.5 人に発生するとされている (石原ら, 1994)。

SCC は、小丘疹～結節として生じるが、増大すると腫瘤や難治性の潰瘍などを形成するようになる。日光角化症、Bowen 病、熱傷瘢痕、化膿性汗腺炎、慢性円板状エリテマトーデスなどを発生母地とすることもある。表面の角化が高度になると、カリフラワー状と形容される、表面が乳頭状の腫瘤性病変を呈する。紫外線の影響を受けやすい顔面を含めた頭頸部が好発部位であるが、近年はマスク着用が習慣化され、腫瘍が人目につきにくいことにより、受診が遅れ進行した状態で発見される傾向がある。また、角質や痂皮、あるいは壊死組織などを付着し、細菌の二次感染を来たして、独特な悪臭 (癌臭) を伴うものも多く、患者の Quality of Life (以下、QOL と略す) を大幅に損ねることも多々ある。病理組織学的には、角化細胞に分化した好酸性の胞体と時に核異型・核分裂を有する細胞が、個細胞角化や細胞の配列の乱れ、細胞分裂・癌真珠などを形成しながら不規則に真皮に増殖する。少なくとも一部で表皮との連続性を認める。未分化になるほど、角化傾向が少なくなり、浸潤・増殖能も強く、一般的には予後が悪くなる (You et al., 2012)。

SCC は、低悪性度のうちは、90%以上が外科的切除で治癒できるが、転移を伴うような進行例になると、治療反応性に乏しく、予後は芳しくない。フランスの共同研究 (Chapalain et al., 2020)のデータによると、進行期皮膚 SCC 患者の全身治療後の無増悪生存期間 (progression-free survival, 以下 PFS と略す)と全生存期間 (overall survival, 以下 OS と略す) の中央値はそれぞれ 6 ヶ月、18.3 ヶ月と非常に予後不良である (図 2)。

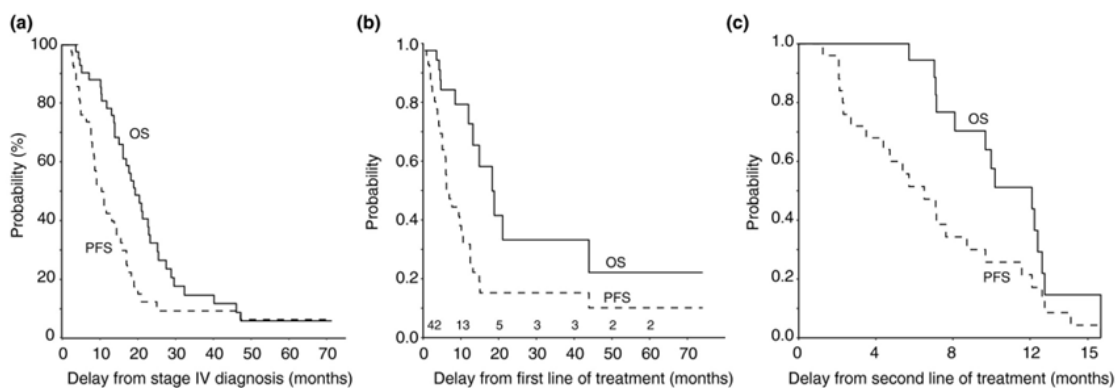


図 2 : (a) 全生存期間 (OS) と無増悪生存期間 (PFS) , (b) first-line の全身治療の OS と PFS, (c) second-line の OS と PFS

4 年全生存率は 6% で、first-line の全身治療の奏効率 55%、PFS 中央値 6.18 カ月、second-line では奏効率 12%、PFS 中央値 6.51 か月であった (Chapalain et al., 2020 より引用)。

化学療法としては、5-FU/シスプラチン、5-FU/カルボプラチン、またはパクリタキセル/カルボプラチンの併用療法が最も一般的に使用されているレジメンだが、持続的な寛解はまれであり、高齢者には忍容性が低いことが問題である。近年では、epidermal growth factor receptor（以下 EGFR と略す）阻害剤や免疫チェックポイント阻害薬が進行性皮膚 SCC にある程度有効であると報告されているが、従来 of 化学療法と比較して明らかに予後を改善するには至っていない。進行期の SCC の治療選択肢や治療効果はいまだ限られており、有効な新規治療の開発が望まれる。

実験方法

1. 細胞株と細胞培養

本研究では、ヒト SCC の細胞株として、外陰部の粘膜皮膚癌に由来するヒト皮膚 SCC 細胞株である A431、ヒト皮膚 SCC 細胞株である DJM-1 細胞、ヒト頭頸部 SCC 細胞株の SAS 細胞の 3 種類およびヒト不死化ケラチノサイト細胞株の HaCaT 細胞を使用した。A431 は ATCC から購入、DJM1 は Kitajima からのもの (Kitajima et al., 1987)、SAS 細胞は Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank から入手、HaCaT 細胞は、Cell Lines Service 社から購入した。

細胞培養は、37 度 5%CO₂ 条件下のインキュベーターで行われ、10%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, 以下 FBS と略す, Life Technology) 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (以下 DMEM と略す, Nacalai Tesque) を培養液として使用した。

細胞の継代は、細胞の割合が 70-80%コンフルエントに達した時点で行った。Phosphate buffered saline (以下、PBS と略す, Nacalai Tesque) で 2 回洗浄し、1 mL の 0.25% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) に浸し、37°C で 5 分間静置した。タッピングしながら、顕微鏡下で細胞がディッシュから剥がれていることを視認した後、DMEM を 9 mL 加えて十分に懸濁し、新しい 10 cm ディッシュに培養液を 9 mL 添加しておき、懸濁液 1 mL を一様になるように添加・混和して、10:1 の細胞比で播種した。本研究で行った実験は、継代数が 6 以下の細胞を使用した。すべての細胞は、マイコプラズマがないことを確認した。

2. 試薬と抗体

本研究に用いた試薬および抗体は以下の通りである。

RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)

抗 FAM83H 抗体 (希釈倍率: ウェスタンブロット 1/1000, 免疫蛍光染色 1/200, 免疫化学染色 1/200, ウサギ: HPA024604, Sigma)

抗 TRIM29 / ATDC 抗体 (希釈倍率: ウェスタンブロット 1/1000, 免疫蛍光染色 1/200, 免疫化学染色 1/200, マウス: A-5, Santa Cruz)

抗ケラチン 5 抗体 (希釈倍率: ウェスタンブロット 1/1000, 免疫蛍光染色 1/200, ウサギ: PRB160P, Covance)

抗ケラチン 14 抗体 (希釈倍率: ウェスタンブロット 1/1000, ウサギ: PRB155P, Covance)

抗ケラチン 1 抗体(希釈倍率:ウエスタンブロット 1/1000, ウサギ:PRB-165P、Covance)

抗ケラチン 10 抗体(希釈倍率:ウエスタンブロット 1/1000, ウサギ:PRB-159P、Covance)

抗デスモグレイン 3 抗体 (希釈倍率 : ウエスタンブロット 1/1000, マウス : 651112S、BioLegend/PROGEN)

抗プラコグロビン 3 抗体 (希釈倍率 : ウエスタンブロット 1/1000, マウス : 61005S、BioLegend/PROGEN)

抗デスコモリン 3 抗体(希釈倍率:ウエスタンブロット 1/1000, マウス:61093S、BioLegend/PROGEN)

抗パンサイトケラチン (34bE12) 抗体 (希釈倍率 : 免疫蛍光染色 1/200, 免疫化学染色 1/200, マウス : ab191208、Abcam)

抗 FLAG 抗体 (希釈倍率 : ウエスタンブロット 1/1000, マウス:M2、F1804、Sigma)

抗 β -アクチン抗体 (希釈倍率 : ウエスタンブロット 1/1000, マウス:AC-74、Sigma)

抗 E-カドヘリン抗体 (希釈倍率 : ウエスタンブロット 1/1000, 免疫蛍光染色 1/200, マウス: sc-21791、Santa Cruz)

抗インテグリン β 4 (希釈倍率 : 免疫蛍光染色 1/200, ウサギ: 4707S, Cell Signaling)

Horseradish peroxidase (以下 HRP と略す) 標識抗マウス IgG 抗体 (希釈倍率 : ウエスタンブロット 1/3000, #7076, Cell Signaling Technology)

HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (希釈倍率 : ウエスタンブロット 1/3000, #7074, Cell Signaling Technology)

3. 発現抑制実験

FAM83H の発現を RNA 干渉により抑制するため、pooled small interfering RNA (以下、siRNA と略す) をダーマコンより購入し、細胞内へのトランスフェクションは 6 穴プレートで行った。20%コンフルエントになるようにあらかじめ細胞を播種しておき、24 時間 37°C でインキュベートした後、20 μ M の siRNA 1 μ L と RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) 5 μ L を 250 μ L の Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) と混合し、室温で 15 分静置した。その後各ウェルに添加してトランスフェクションした。トランスフェクション後、24–72 時間後に、表現型解析・発現解析などの実験をおこなった。

また、恒久的な FAM83H のノックダウンには、pLKO short-hairpin RNA (図 3, 以下 shRNA と略す) を用いたレンチウイルスによる感染実験を行った。

pLKO-shRNA は Sigma Aldrich から購入し、使用した。本研究で使用した shRNA の配列は表 1 の通りである。レンチウイルスの作製は Addgene: Protocol - pLKO.1 - TRC Cloning Vector や Moffat らの論文を参照し (Moffat et al., 2006)、以下のように実施した。翌日 20%コンフルエントになるようにあらかじめ 293T 細胞 (Invitrogen, R700-07) を 6 cm ディッシュに播種しておき、24 時間 37°C でインキュベートした後、20 μ M の shRNA vector (pLKO-TRCN0000162437, TRCN0000161974, scrambled-puromycin, 1 μ g/mL) 3 μ L と DNAmix (pLP1, pLP2, pVSVG, 各 1 μ g/mL) 9 μ L をそれぞれ 1 mL の Opti-MEM で溶解し、さらに 50% Polyethylenimine (以下 PEI と略す、Sigma Aldrich) 15 μ L を加えてよく混合し、室温で 15 分静置した。この混合液を、準備した 293T 細胞に添加し、24 時間 37°C でインキュベートし、翌日培地交換した。293T 細胞へのトランスフェクション効率を確認するため、コントロールとして enhanced green fluorescent protein (以下 EGFP と略す) を発現するプラスミドの pcDNA3-EGFP (Sigma Aldrich, 1 μ g/ μ L) 3 μ L と、50% PEI 15 μ L を 1 mL の Opti-MEM に混合し、室温で 15 分静置した混合液を 293T 細胞に添加した。24 時間後に蛍光顕微鏡で green fluorescent protein (以下 GFP と略す) の蛍光を観察し、トランスフェクション効率を確認した。また、同日に HaCaT、SAS、および DJM1 細胞を 6 cm ディッシュに、翌日に 30%コンフルエントになるように播種しておき、24 時間 37°C でインキュベートした。トランスフェクション 48 時間後に 293T 細胞から得られたウイルス上清は、0.45 μ m フィルター (Fujifilm) を通して回収した。播種しておいた HaCaT、SAS、および DJM1 細胞にウイルス上清を 1 mL ずつ添加し 48 時間インキュベートした。puromycin (Thermo Fisher Scientific, 最終濃度 1 μ g/mL) を培地に加えて感染細胞のセレクションを行った。以降、培養液には puromycin を添加して培養した。

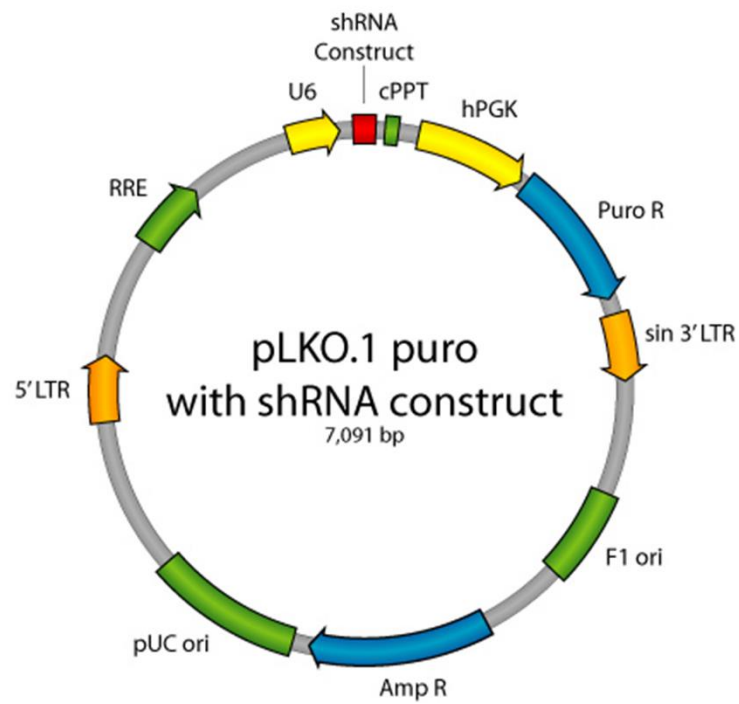


図 3 : pLKO shRNA のプラスミド構造

puromycin 耐性遺伝子が組み込まれており、puromycin によるセレクションをおこなった ([Addgene: Protocol - pLKO.1 - TRC Cloning Vector](#))。

表 1 : 本研究でを使用した shRNA の配列情報

shRNA	TRC クローン ID	配列
#1	TRCN0000162437	CCTAAGAGGGAACTGATTTAA
#2	TRCN0000161974	GAAGTCCAACACTACAGGATTTA
Scrambled control	-	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG

4. FAM83H 発現プラスミドとレトロウイルスによる細胞導入

FAM83H の全長をコードする cDNA (FAM83H 翻訳領域配列, 3,537 bp) は、久我博士 (摂南大学、Kuga et al., 2013) から当科に供与された。

4-1 : 全長 FAM83H 発現プラスミド (pQCXIP-Flag-FAM83H) の作製

FAM83H の翻訳領域の両端に制限酵素配列を付加するべく PCR 反応を下記の要領で実施した。

10× Buffer for KOD-plus	5 μL
2mM dNTPS	5 μL
25mM MgSO ₄	3 μL
プライマー (10 μM ずつ)	forward: 1.5 μL, reverse: 1.5 μL
テンプレート DNA (FAM83H)	1 μL
KOD-Plus	1 μL
Autoclaved, distilled water	32 μL

上記合計 50 μL を混合して PCR し、電気泳動し、予測される位置にバンドが出ていることを確認した (図 4)。

PCR 条件

95°C	02:00	} 35 サイクル
98°C	00:10	
65°C	00:30	
68°C	03:00	
68°C	03:00	
4°C	∞	

この PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用して精製した。まず 5 倍量 (250 μL) の PB buffer を加えて、カラムにアプライし、60 秒間遠心して DNA を結合させた。750 μL の buffer PE をアプライし、遠心し、ろ液は棄てて、更に 1 分間カラムを遠心した。新しいチューブにカラムをのせて Buffer EB で DNA を溶出した。

次に下記の要領で、2 種類の制限酵素で pQCXIP-Flag ベクターをカットした。

pQCXIP-Flag (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	5 μL
EcoRI-HF	2.5 μL
XhoI-HF	2.5 μL
cut smart	5 μL
distilled water	35 μL

上記合計 50 μL をよく混合し、37°Cで3時間静置し、上述と同様に QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

次に PCR 産物と pQCXIP ベクターの制限酵素処理産物を mix して In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio USA) を使用し、下記の In-fusion 反応で PCR 産物とベクターをつないだ。

Purified PCR fragment (105.9 ng/ μL)	1 μL
Linearized vector (81.2 ng/ μL)	2 μL
5 \times - In Fusion HD Enzyme Premix	2 μL
distilled water	5 μL

上記合計 10 μL を混ぜ、50°C、15 分間静置し、氷上に移動し、大腸菌 DH5 α 株に 3 μL 加えた。20 分静置し、42°Cのお湯に 30 秒つけて氷上に 3 分間静置した。SOC (Sigma Aldrich) 150 μL を加えて 37°Cに 60 分間静置し、アンピシリンプレートに撒いた。翌日 100 個以上の大腸菌コロニーを確認し、コロニーを 4 つ回収してアンピシリン混合（最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）LB 培地（Trypton 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%）を 2 mL 加え、37°Cで 8 時間振盪培養した。

大腸菌からのプラスミドの回収は、miniprep kit (QIAGEN) を用いた。大腸菌培養液を 8,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を捨てて沈殿したものに 250 μL Buffer P1 を加えて vortex し、250 μL Buffer P2 を加えて 4~6 回転倒混和し、透明になったら 5 分間静置した。350 μL Buffer N3 を入れて転倒混和し、13,000 rpm で 10 分間遠心した。上清 800 μL をカラムに移して 13,000 rpm で 1 分間遠心し、0.75 μL Buffer PE で洗浄した後 13,000 rpm で遠心し、新しいチューブにカラムをのせて Buffer EB 50 μL を加えて遠心した。mini prep プラスミドに目的のインサートが含まれているかを確認するため、制限酵素処理を行った。

mini prep 済のプラスミド	6 μ L
EcoRI-HF	1 μ L
XhoI-HF	1 μ L
cut smart	2 μ L
distilled water	10 μ L

上記 20 μ L を混ぜて 37°C に 90 分間静置し、電気泳動し、目的のインサートが含まれていることを確認した (図 5)。

この目的のインサートが含まれているプラスミドについて

- ① サンガー法による DNA 配列の確認を実施し、
- ② 100 mL 大腸菌を用いた Midi culture と Midi prep を行い、レトロウイルス感染用とした。

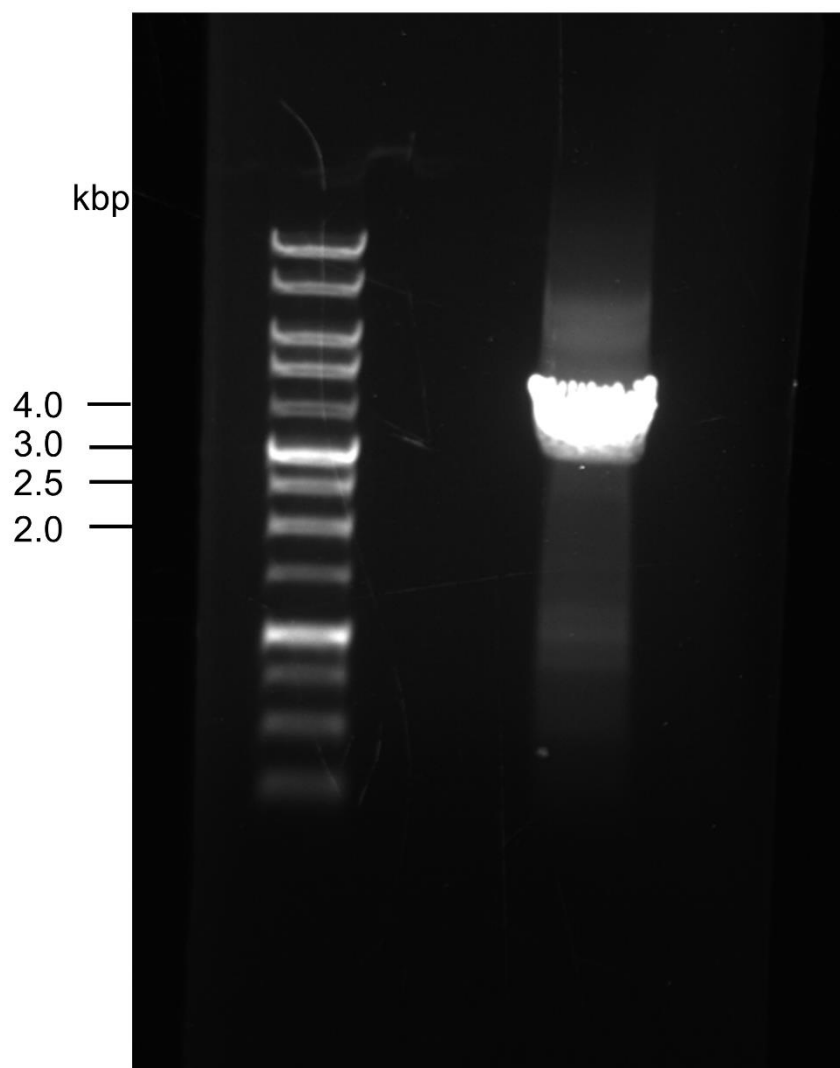


図 4 : 全長 FAM83H の PCR 産物の電気泳動
予想される位置 (3,537 bp) にバンドを確認した。

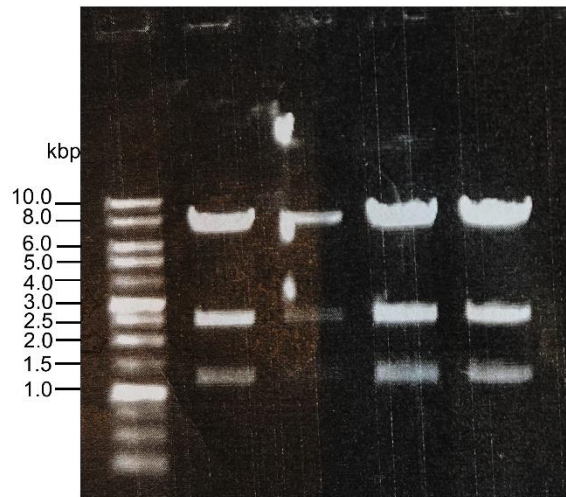
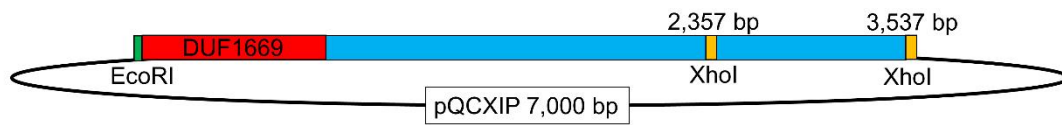


図 5 : 制限酵素処理後の全長 FAM83H の電気泳動

上図は、制限酵素の位置を示す模式図であるが、図のように FAM83H の中に制限酵素サイトがあり、3 か所で切断される (EcoRI は 0 cutter で、XhoI は 1 cutter)。回収した大腸菌コロニー4 つすべてで予想される位置 (2,357 bp, 1180 bp, 7,000 bp) にバンドが見られ、目的の配列がインサートされていることを確認した。

4-2 : FAM83H 短縮変異体の作製

FAM83H の短縮変異体として、FAM83 ファミリーが共通して持つ DUF (domain of unknown function) 1669 の前後で短縮変異体 (FLAG-FAM83H- Δ 1, FLAG-FAM83H- Δ 2) を樹立した。

まず、FLAG-FAM83H- Δ 1 [アミノ酸 1-286, 858 bp] および FLAG-FAM83H- Δ 2 [アミノ酸 286-1179, 2679 bp] を発現するベクターを作製した。

変異体の作製に用いた PCR 用プライマーは以下の通りである。

FLAG-FAM83H- Δ 1 :

フォワードプライマー

5'-CCGCGGATCCGAATTCATGGCCCGTCGCTCTCAGA-3'

リバースプライマー

5'-GGGGGGGGCGCTCGAGTCACGAGGGCACAAGCGGCTC -3'

FLAG-FAM83H- Δ 2:

フォワードプライマー

5'-CCGCGGATCCGAATTCCTGGCCCGCATGGACGCCT-3'

リバースプライマー

5'-GGGGGGGGCGCTCGAGTCACTTCTTGCTTTTGAACGTGCC-3'

まず、FAM83H の DUF1669 の前後を PCR で増幅した。

FLAG-FAM83H- Δ 1 :

10× Buffer for KOD-plus	5 μ L
2mM dNTPS	5 μ L
25mM MgSO ₄	3 μ L
プライマー (10 μ M ずつ)	forward: 1.5 μ L, reverse: 1.5 μ L
テンプレート DNA (FAM83H)	1 μ L
KOD-Plus	1 μ L
Autoclaved, distilled water	32 μ L

FLAG-FAM83H-Δ 2:

10× Buffer for KOD-plus	5 μL
2mM dNTPS	5 μL
25mM MgSO4	3μL
プライマー (10 μM ずつ)	forward: 1.5 μL, reverse: 1.5 μL
テンプレート DNA (FAM83H)	1 μL
KOD-Plus	1 μL
Autoclaved, distilled water	32 μL

上記それぞれ合計 50 μL を混合して PCR (DNA ポリメラーゼとして KOD-plus version2 を使用) し、電気泳動し、各々予測される位置にバンドが出ていることを確認した (図 6, 図 7)。

PCR 条件**FLAG-FAM83H-Δ 1 :**

95°C	02:00	} 35 サイクル
98°C	00:10	
65°C	00:30	
68°C	03:00	
68°C	03:00	
4°C	∞	

FLAG-FAM83H-Δ 2 :

95°C	02:00	} 35 サイクル
98°C	00:10	
66°C	00:30	
68°C	03:00	
68°C	03:00	
4°C	∞	

この PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用して精製した。まず 5 倍量 (250 μL) の PB buffer を加えて、カラムにアプライし、60 秒間遠心して DNA を結合させた。750 μL の buffer PE をアプライし、遠心し、ろ液は棄てて、更に 1 分間カラムを遠心した。新しいチューブにカラムをのせて Buffer EB で DNA を溶出した。

次に制限酵素で pQCXIP-Flag ベクターをカットした。

pQCXIP-Flag (1 µg/ µL)	5 µL
EcoRI-HF	2.5 µL
XhoI-HF	2.5 µL
cut smart	5 µL
distilled water	35 µL

上記合計 50 µL をよく混合し、37°Cで3時間静置し、上述と同様に QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した。

次に PCR 産物とベクターの制限酵素処理産物を mix して In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio USA)を使用して In-fusion 反応で PCR 産物とベクターをつないだ。

FLAG-FAM83H-Δ1 :

Purified PCR fragment (59.5 ng/ µL)	2 µL
Linearized vector (81.2 ng/ µL)	2 µL
5×- In Fusion HD Enzyme Premix	2 µL
distilled water	4 µL

FLAG-FAM83H-Δ2 :

Purified PCR fragment (34.7 ng/ µL)	3 µL
Linearized vector (81.2 ng/ µL)	2 µL
5×- In Fusion HD Enzyme Premix	2 µL
distilled water	3 µL

上記、各々合計 10 µL を混ぜ、50°C、15 分間静置し、氷上に移動し、大腸菌 DH5α 株に 3 µL 加えた。20 分静置し、42°Cのお湯に 30 秒つけて氷上に 3 分間静置した。SOC 150 µL を加えて 37°Cに 60 分間静置し、アンピシリンプレートに撒いた。12 時間後、コロニーを FLAG-FAM83H-Δ1 は 4 つ、FLAG-FAM83H-Δ2 は 3 つ回収した。回収したコロニーに、アンピシリン混合（最終濃度 100 µg/ mL）LB 培地（Trypton 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%）を 2 mL 加え 37°Cで 8 時間振盪培養した。

大腸菌からのプラスミドの回収は、miniprep kit (QIAGEN) を用いた。大腸菌培養液を 8,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を捨てて沈殿したものに 250 µL Buffer P1 を加えて vortex し、250 µL Buffer P2 を加えて 4~6 回転倒混和し、透明になったら 5 分間静置した。350 µL Buffer N3 を入れて転倒混和し、13,000 rpm で 10 分間遠心した。上清 800 µL をカラムに移して 13,000 rpm で 1 分間

遠心し、0.75 μL Buffer PE で洗浄した後 13,000 rpm で遠心し、新しいチューブにカラムをのせて Buffer EB 50 μL を加えて遠心した。mini prep プラスミドに目的のインサートが含まれているかを確認するため、制限酵素処理を行った。

FLAG-FAM83H- Δ 1 :

mini prep 済のプラスミド	6 μL
EcoRI-HF	1 μL
XhoI-HF	1 μL
cut smart	2 μL
distilled water	10 μL

FLAG-FAM83H- Δ 2 :

mini prep 済のプラスミド	6 μL
EcoRI-HF	1 μL
XhoI-HF	1 μL
cut smart	2 μL
distilled water	10 μL

上記各々20 μL を混ぜて 37°C に 90 分間静置し、電気泳動し、目的のインサートが含まれていることを確認した (図 8, 図 9)。

この目的のインサートが含まれているプラスミドについて

- ① サンガー法による DNA 配列の確認を実施し、
- ② 100 mL 大腸菌を用いた Midi culture と Midi prep を行い、レトロウイルス感染用とした。

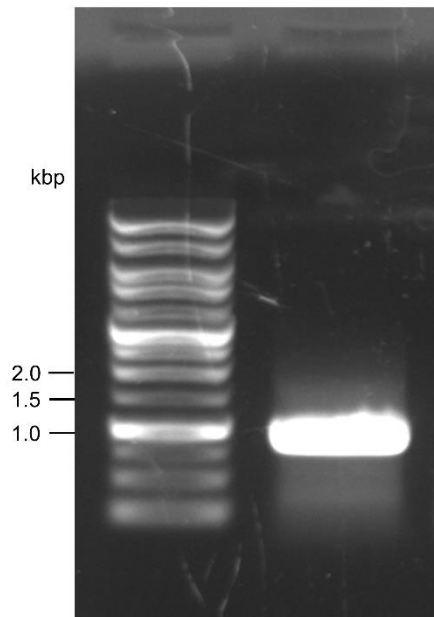


図 6 : FLAG-FAM83H- $\Delta 1$ の PCR 産物の電気泳動
予想される位置 (858 bp) にバンドを確認した。

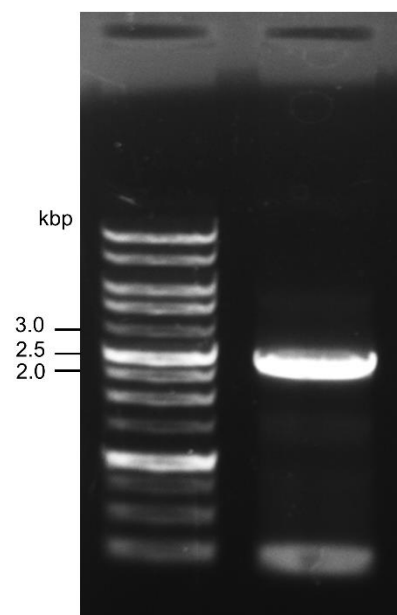


図 7 : FLAG-FAM83H- $\Delta 2$ の PCR 産物の電気泳動
予想される位置 (2679 bp) にバンドを確認した。

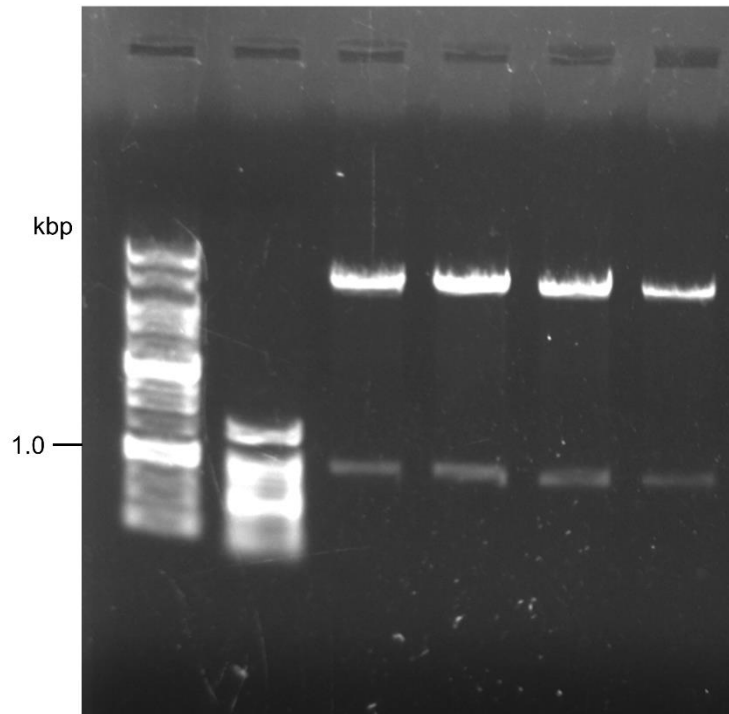


図 8 : FLAG-FAM83H- Δ 1 の制限酵素処理後の電気泳動
回収した大腸菌コロニー4つすべてで予想される位置 (858 bp) にバンドを認め、目的の配列がインサートされていることを確認した。

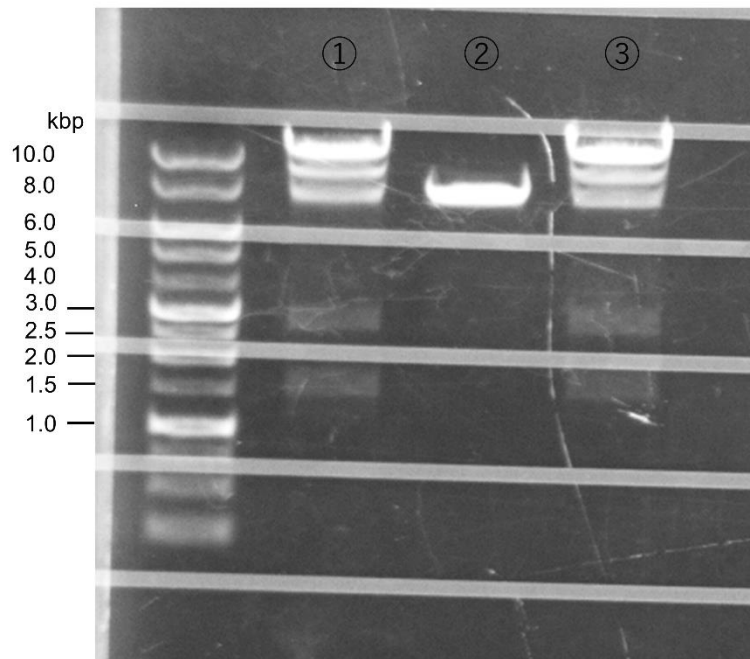


図 9 : FLAG-FAM83H- $\Delta 2$ の制限酵素処理後の電気泳動
回収した大腸菌コロニー3つのうち、①、③の2つで予想される位置 (2679 bp)
にバンドを認め、目的の配列がインサートされていることを確認した。

4-3：レトロウイルスを用いた FAM83H 過剰発現細胞株および短縮変異体の作製

種々の FAM83H を発現する細胞株を樹立するために、Ecotropic receptor を発現させたヒト細胞株に、レトロウイルスを感染させた。遺伝子組換え実験は承認済みである（承認番号 2020-013）。

具体的なレトロウイルスの作製方法・感染方法は以下のとおりである。

4-3-1：ヒト細胞株（HaCaT, DJM1, SAS）に ecotropic receptor を発現させる

Day1：293T 細胞 (1.2×10^6 cells/4 mL DMEM + 10% FBS) を 6 cm コラーゲンディッシュに撒いた（1 種類に対して 4 枚）。

Day2：トランスフェクションを行った。

Opti-MEM	200 μ L
pE ampho	2 μ g
pGP	2 μ g
pEcoVR : ecotropic receptor	4 μ g
50% PEI	10 μ L

6 時間後、培地をすべて吸って DMEM + 10% FBS 培地 12 mL に培地交換した。

Day3：感染用に HaCaT, DJM1, SAS 細胞を 12 well plate に 0.1×10^6 個ずつまいた（1 種類に対して 1 枚ずつ）。

Day4：1 回目の感染を行った。

トランスフェクションから 48 時間後、上清のウイルス溶液（2 dish 分）を 0.45 μ m フィルターを通して回収した。ウイルス溶液 8 mL（2 dish 分）と DMEM 2 mL, polybrene（Sigma Aldrich, 最終濃度 4 μ g/mL）をよく混合し、HaCaT, DJM1, SAS 細胞に添加した。

Day5：2 回目の感染を行った。

293T 細胞上清のウイルス溶液（2 dish 分）を 0.45 μ m フィルターを通して回収し、上記 HaCaT, DJM1, SAS 細胞に、ウイルス溶液 8 mL（2 dish 分）と DMEM 2 mL, polybrene（最終濃度 4 μ g/mL）をよく混合し、添加した。

Day6 : ウイルス含有培地をすべて吸い、新しい DMEM 培地に交換した。

4-3-2 : 種々の FAM83H 発現レトロウイルス感染

Day1(4-3-1 の Day3) : 翌日 20%コンフルエントになるように 293T 細胞を 6 well plate に播種し、24 時間 37°C でインキュベートした。

Day2 : pQCXIP-puro ベクターのトランスフェクションを行った。

Opti-MEM	200 μ L
DNA	1 μ g
(pQCXIP-Flag-FAM83H: 821.9 ng/ μ L \rightarrow 1.22 μ L)	
(pQCXIP-Flag-FAM83H- Δ 1: 1021.3 ng/ μ L \rightarrow 1.0 μ L)	
(pQCXIP-Flag-FAM83H- Δ 2: 231.9 ng/ μ L \rightarrow 4.3 μ L)	
50% PEI	10 μ L

上記をよく混合し、室温で 15 分静置した。この混合液を、準備した 293T 細胞に添加した。また、293T 細胞へのトランスフェクション効率を確認するため、コントロールとして pcDNA3-EGFP (Sigma Aldrich, 1 μ g/ μ L) 1 μ L と、50% PEI 10 μ L を 200 μ L の Opti-MEM に混合し、室温で 15 分静置した混合液を 293T 細胞に添加し、24 時間後に蛍光顕微鏡で GFP の蛍光を観察し、トランスフェクション効率を確認した

Day3 : 培地交換を行った。

Day4 : レトロウイルスの感染を行った。

トランスフェクションから 48 時間後、293T 細胞から得られたウイルス上清を、0.45 μ m フィルターにて回収・濾過したのち、polybrene (最終濃度 4 μ g/mL) を添加し、上述の Ecotropic receptor を発現させた HaCaT、SAS、および DJM1 細胞への感染に使用した。ウイルス感染 2 日後、細胞は puromycin (最終濃度 1 μ g/mL) によりセレクションした。

5. 全 RNA の抽出と qRT-PCR 分析

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を使用して、培養細胞または新鮮な凍結切片を粉砕して適切な量の Buffer RLT Plus でホモジナイズし、ライセートを抽出して、トータル RNA を単離した。RNA 濃度は分光光度計(nanodrop)で測定し、サンプルは使用するまで -80 °C で保存した。 SuperScript IV VILOMasterMix (11756050、Thermo Fisher Scientific) を使用して RNA を cDNA に逆転写した。10× ezDNase Buffer 1 μL, ezDNase enzyme 1 μL に単離した RNA を 1.0 μg 加え、合計 10 μL になるように Nuclease-free Water を加えゆっくりと混合した。37°C で 2 分間インキュベートし、氷上に移して SuperScript™ IV VILO™ MasterMix 4 μL, Nuclease-free Water 6 μL を加えた。ゆっくりと混合し、25°C で 10 分間、続いて 50°C で 10 分間、さらに 85°C で 5 分間インキュベートした。

次に SYBR Green System (Takara) を使用して、cDNA 発現を分析した。下記に示す PCR 反応液を調製した。

TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 ×)	10 μL
1 × PCR Forward Primer (10 μM)	0.8 μL
1 PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL
ROX Reference Dye (50 ×)	0.4 μL
Template cDNA (< 100 ng)	2 μL
滅菌精製水	6 μl

よく転倒混和し、試薬を均一にしてから、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで PCR 反応を行った。検出機器は、StepOnePlus Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

Stage 1 : 初期変性

Reps : 1

95°C 30 秒

Stage 2 : PCR 反応

Reps : 40

95°C 5 秒

60°C 30 秒

Stage 3 : Melt Curve

反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、検量線を作成して定量した。ヒト FAM83H に特異的なプライマーとヒト GAPDH のコントロール遺伝子の配列を表 2 に示す。リアルタイム PCR 用の FAM83H 特異的なプライマーは、roche assay design center (<https://diagnostics.roche.com/us/en/products/product-category/assay-offerings.html>) というサイトを使用して設定した。すべての実験はそれぞれ 2 回ずつ実施し、サンプルを正常表皮の GAPDH 値で補正し、比較した。

表 2 : ヒト FAM83H とヒト GAPDH に対する定量的 PCR 用プライマー

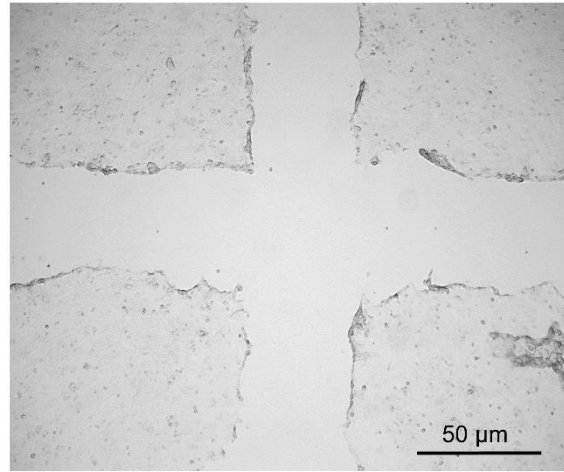
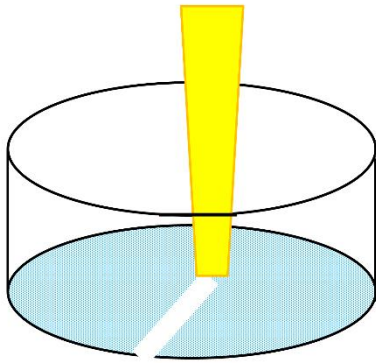
ヒト FAM83H	フォワード	5'-ATGGCCCGTCGCTCTCAGA-3'
	リバース	5'-CTTCTTGCTTTTGAACGTGCC-3'
ヒト GAPDH	フォワード	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
	リバース	5'-ATGGGATTTCCATTGATGAC-3'

6. 細胞増殖アッセイ

96 ウェルプレートを用いて細胞を 1 ウェルあたり 5.0×10^3 個ずつ播種し、培地は 100 μl ずつ加えた。72 時間後、MTT アッセイ (Promega, G3582) を行った。色素溶液を 1 ウェルあたり 15 μl ずつ添加し、プレートを 2 時間インキュベートした。可溶化溶液/ストップミックスを 1 ウェルあたり 100 μl ずつ加えた。1 時間培養した後、96 ウェルプレートリーダーを使用して 570 nm での吸光度を記録した。また、Cell Titer Glo (Promega) によって細胞増殖を評価した。細胞を 96 ウェルプレートに $5 \sim 10 \times 10^3$ 細胞ずつ、培地を 100 μl ずつ加えて、48 時間培養した。1 ウェルあたり 100 μl の Cell Titer Glo 溶液を添加し、プレートを 15 分間暗所に置いてから、プレートリーダー (Spectra Max Paradigm; Molecular Devices) で測定した。

7. 細胞遊走能および浸潤能の解析

遊走能を解析するために、6 cm プレートに 3.0×10^6 個の細胞を播種し、一晚培養した。200 μL 用のイエローチップを用いて 100%コンフルエントの細胞を十字形にスクラッチした (図 10)。4、8、12、16、および 24 時間後の移動距離を測定した。



スクラッチ4時間後

図 10 : 遊走能アッセイの模式図

100%コンフルエントの細胞をチップで十字形にスクラッチし、経時的に移動距離を計測した (scale bar = 50 μm)。

細胞浸潤能の検討は、8.0 μm のメンブレンポア付きコーニング BioCoat マトリゲル浸潤チャンバー (Corning、# 354480) を使用して実施した (図 11)。ウェルに培地を加え、インサートに 0.5×10^5 個の細胞懸濁液を加えて 72 時間培養後、下部ウェルを 70%メタノールで固定し、0.4%クリスタルバイオレット溶液で染色した。下部ウェルに浸潤し、染色された細胞をランダムに選択した 4 視野 (400 倍視野) で撮影し、カウントした。

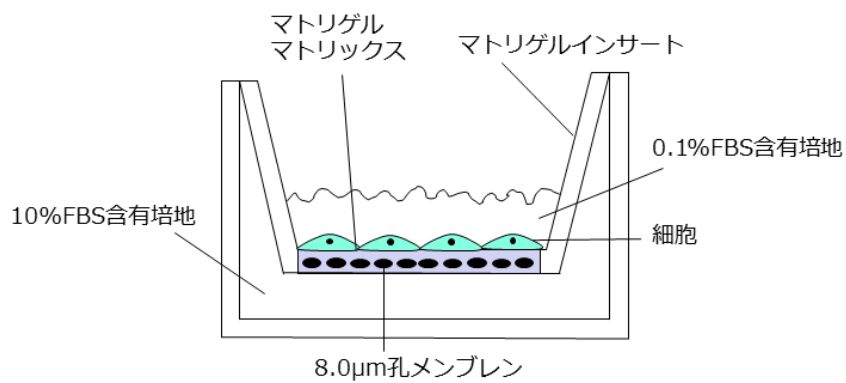


図 11：浸潤能アッセイの模式図

インサートに細胞を撒いて 72 時間培養し、8.0 μm の孔を通り抜けて下部ウェルに移動し、紫色に染色された細胞の数をカウントした。

8. ウェスタンブロット

8-1 : ライセートの回収

Lysis buffer には、RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, NP40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, NaF, final concentration 1 nM, NaV_3O_4 , final concentration 10 μM , Wako) または IP バッファー (1% NP40 バッファー、Thermo Fisher Scientific) を使用した。対象細胞を PBS で 2 回洗浄した後、Lysis buffer を添加し、氷上で 30 分静置した。次に、セルスクレーパーを用いて各ウェルの表面を擦過し、融解液をすべて 1.5 mL のエッペンチューブに回収した。4°C, 15,000 rpm で 20 分遠心した後、上清を回収して別のエッペンチューブに移し、NuPAGE LDS Sample Buffer (lithium dodecyl sulfate, pH 8.4, Invitrogen), NuPAGE Sample Reducing Agent (500 mM dithiothreitol at a ready-to-use 10 \times concentration, Invitrogen) を加え混和し、70°C でボイルし、細胞抽出液とした。

8-2 : 電気泳動、転写、ブロッキング

回収した細胞抽出液をマーカーとともに SDS-PAGE 5-10%Gel (Invitrogen) にセットした。バッファーには MOPS SDS Running Buffer (#1908733, Life Technology) を使用し、電気泳動を行った。その後、iBLOT2 (Invitrogen) で polyvinylidene difluoride membranes (Invitrogen) に転写した。転写したメンブレンは、5% スキムミルク溶液 (Wako)、1 \times TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20) に浸し、室温で揺らしながら 60 分間ブロッキングを行った。

8-3 : 1 次抗体, 2 次抗体による酵素抗体反応

1 次抗体を加えて 4°C で揺らしながら、12~16 時間の抗原抗体反応を行った。1 \times TBS-T で 20 分 3 回洗浄した後、HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) および HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を二次抗体として 60 分間室温で抗原抗体反応させた。再度 1 \times TBS-T で 3 回洗浄した後、ECLTM Prime Luminol Enhancer Solution (Cytiva), ECLTM Prime Peroxide Solution (Cytiva) をそれぞれ 500 μL ずつ混ぜて、約 1 分間浸した。Image Quant LAS4000 (GE Healthcare) で撮像した。タンパク質の溶解性と不溶性を区別する際には、細胞を PBS で洗浄し、1% NP40 バッファーで再懸濁した。次に、細胞抽出物を 14,000 \times g で 10 分間遠心分離し、可溶性画分を収集し、ペレットを不溶性画分として 1 \times Laemmli SDS Sample Buffer に再懸濁し、70°C で 10 分間ボイルした。

9. 免疫沈降

対象細胞を IP Lysis Buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 5% グリセロール, Thermo Fisher Scientific) で溶解した。氷上に 20 分置き、セルスクレーパーにて細胞を回収した。14,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を細胞抽出液とした。ここに 2 μ g の抗体を添加し、4°C で 2 時間インキュベートし抗原抗体複合体を形成させた。Dynabeads Protein G (Life Technologies, #10004D) 30 μ l を加え、4°C で 1 時間インキュベートした。これらの混合物を lysis buffer で 4 回洗浄した。その後、NuPAGE™ LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) と denaturing buffer を加え、これらの混合物を 70°C で 10 分間加熱し、電気泳動およびウエスタンブロットで分析した。

10. In vivo 異種移植モデル (Xenograft)

5 週齢、メスの BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA) を用いて実験を行った。マウスは北海道大学医学部の動物実験施設にて管理され、搬入されたマウスは少なくとも 5 日間当施設で飼育し、食事や睡眠のリズムが付き、環境に適応したことを確認して実験に用いた。尚、本研究の動物実験申請については、ヘルシンキ宣言に基づき、当院動物実験承認機関で審査承認済である（動物実験番号 19-0086）。

移植する細胞株は、ルシフェラーゼ標識 scrambled shRNA/shRNA#2 DJM1 細胞を選択した。ルシフェラーゼ標識細胞の作製は、まず、20%コンフルエントになるようにあらかじめ 293T 細胞 (Invitrogen, R700-07) を播種しておき、24 時間 37°C でインキュベートした後 pLenti-PGK-Blast-V5-luc (Addgene plasmid 19166, Campeau et al., 2009): psPAX2 (Addgene): pMD2G (Addgene) = 4:3:1 になるように混合し、Opti-MEM 200 μ L, 50% PEI 15 μ L を加えてよく混合し、室温で 15 分静置した。この混合液を、準備した 293T 細胞に添加し、24 時間 37°C でインキュベートした。また、同日に DJM1 細胞を 6 cm ディッシュに 30%コンフルエントになるように播種しておき、24 時間 37°C でインキュベートした。293T 細胞から得られたウイルス上清は、0.45 μ m フィルターを通して回収した。播種しておいた DJM1 細胞にウイルス上清を 1 mL ずつ添加し、48 時間インキュベートした。puromycin (最終濃度 1 μ g/mL) および blastcidin (最終濃度 1 μ g/mL, Thermo Fisher Scientific) を培地に加えて感染細胞のダブルセレクションを行った。以降、培養液には puromycin, blastcidin の両方を添加して培養した。

マウス 1 匹あたり 5×10^5 個の細胞を移植に使用した。対象細胞は PBS で洗浄後、0.25% Trypsin-EDTA を加えて 37°C で 5 分間静置し、10% FBS 含有 DMEM を 9 mL 加えて懸濁した。その後、懸濁液を全てファルコンチューブに回収し、

1,000 rpm で室温で 3 分間遠心させ、上清を全て吸引し、PBS で再懸濁した。細胞の個数を測定し、 5×10^5 個の細胞数になるように PBS を加えてトータル 100 μL に調整した。この混合液を 1 mL の注射器 (27G 針) に吸引し、氷上で保存した。これらを、速やかにヌードマウスの尾静脈に注射して異種移植し、Xenograft を作成した (図 12)。その後、In Vivo Imaging System (以下、IVIS と略す, Caliper Life Sciences) を用いて経時的に腫瘍転移を観察した。

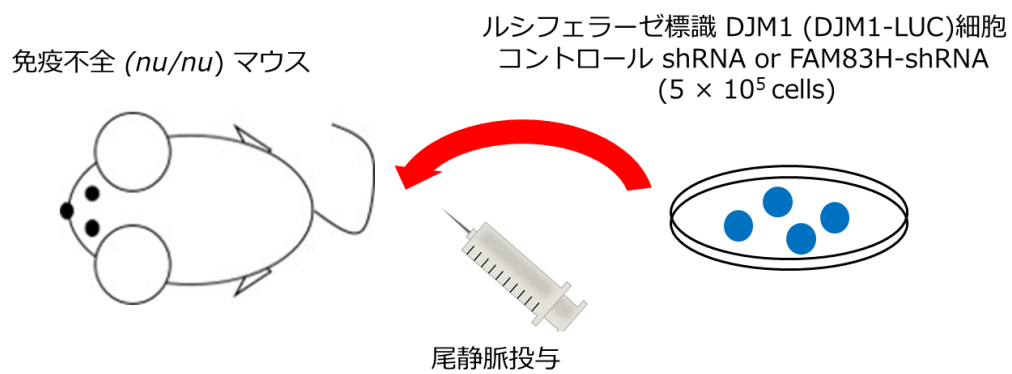


図 12 : Xenograft 作製の模式図

ルシフェラーゼ標識した DJM1 コントロール細胞と FAM83H ノックダウン細胞を 5×10^5 個ずつ免疫不全マウスに投与し、xenograft モデルを作製した。

11. 生体反応画像解析

IVIS を用いて、マウスのライブ画像を撮影した。マウスは D-Luciferin potassium salt (VivoGlo Luciferin, Promega) を 30 mg/mL になるように D-PBS (without Mg^{2+} and Ca^{2+} , Nacalai Tesque) で溶解し、300 mg/kg になるように調節して解析の 10 分前に腹腔内投与し、導入麻酔ボックス内にて豊富な酸素を混合させた 2% イソフルラン (Abbie) で麻酔をかけた。画像は IVIS を用いて取得し、画像表示解析は、living image software (Xenogen) を用いて行い、IVIS によって白色光下で取得した動物の写真画像の上に、定量的な生物発光を重ねて表示した。腫瘍細胞からの発光は、living image software の関心領域 (region of interest) ツールを用いて測定した。

12. 免疫蛍光染色

細胞を 8 ウェルチャンバースライド (Lab-Tek II, Thermo Fisher Scientific) 上に 8.0×10^5 個ずつ播種した。24 時間後、培養液を吸引して PBS で 2 回洗浄した後、細胞を 4% パラホルムアルデヒド (Wako) により室温で 20 分間固定した。固定液を吸引し、PBS で 2 回洗浄し、0.5% Triton X-100 (Sigma Aldrich) 含有 PBS により 15 分間透過処理した。一次抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄した後、蛍光色素を結合した二次抗体を加えて室温で 60 分間インキュベートした。観察用に、細胞を DAPI 入り Vectashield Hardset Mounting Medium (H1500, Vector Laboratories) で保存した。細胞の観察には、BZ-9000 顕微鏡 (Keyence) または FV-1000 共焦点顕微鏡 (Olympus) を使用した。

13. 免疫組織学的解析

10% ホルマリン (Wako) 固定パラフィン切片を 4 μm の厚さで切り出して、免疫染色を施行した。同一観察者 (筆者) によりスコアリングを行い、別視野で少なくとも 3 回それぞれ 100 個の細胞をランダムに選択して評価した。免疫染色スコアは、proportional score (免疫強度; 0 なし、1 0-25%, 2 25-50%, 3 50-75%, 4 >75%)、intensity score (染色強度; 0 なし、1 弱陽性、2 中等度陽性、3 強陽性) の 2 つのパラメータの和で算出した。

14. 電子顕微鏡による観察

細胞は 2.5% グルタルアルデヒド溶液で固定し、1% OsO_4 で後固定、脱水した後に Epon 812 に包埋した。ダイヤモンドナイフでエポキシ樹脂ブロックを超薄切した。薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡 (日立:

H-7650) で観察した。断面のケラチンフィラメント束の測定は image J (<https://imagej.nih.gov/ij>) を用いて行った (倍率 2,000 倍)。

15. 患者選定

本研究には、北海道大学病院皮膚科で診断および治療した皮膚 SCC 患者 51 名、基底細胞癌 (basal cell carcinoma, 以下 BCC と略す) 患者 10 名、頭頸部 SCC (head and neck SCC, 以下 HN-SCC) 患者 35 名、尋常性疣贅患者 3 名、脂漏性角化症患者 3 名の腫瘍検体を使用した。これらの検体は、北海道大学病院の施設審査委員会承認のプロトコールに基づいて、インフォームドコンセントの免除に適切と見なされた。これらの研究は、ヘルシンキ宣言に従って実施した。臨床情報として、年齢、性別、原発巣の部位、大きさ、臨床病期、予後、分化度をカルテから抽出した。なお、本研究は北海道大学病院の臨床研究倫理委員会で審査承認済みである (承認番号 016-0435, 017-0263)。皮膚および HN-SCC の臨床情報を表 3、表 4 に示す。

表 3 : 皮膚 SCC51 例の臨床情報

Case#	Age	Sex	Site	Metastasis	Clinical stage	Differentiation	Prognosis
					at diagnosis	grade	
1	79	F	rt. temporal	-	I	1	alive
2	89	F	lt. nasolabial	-	I	2	alive
3	80	M	lt. dorsum of hand	-	I	1	alive
4	84	M	lt. preauricular	-	I	1	alive
5	51	M	rt. thigh	-	I	1	alive
6	72	F	genital	-	I	1	alive
7	84	M	dorsum of nose	-	I	1	alive
8	103	M	lt. cheek	-	I	1	alive
9	91	F	lt. cheek	-	I	1	alive
10	61	M	lt. preauricular	-	I	1	alive
11	94	F	rt. lower leg	-	I	1	alive
12	81	F	lt. 5th finger	-	I	1	alive
13	68	F	lower lip	-	I	1	alive
14	70	M	thigh, lower leg	-	I	1	alive
15	75	M	rt. 2nd finger	-	I	1	alive
16	74	F	lt. thigh	LN	IV	1	alive
17	66	F	genital	LN	III	1	alive
18	69	F	extra genital	Lung	IV	2	alive
19	75	F	abdomen	LN	IV	2	alive
20	69	F	lt. lower leg	Skin, Liver, Lung, LN	IV	2	dead
21	86	F	extra genital	Lung	IV	1	dead
22	77	F	extra genital	Skin, LN	IV	1	dead
23	64	F	extra genital	Skin	III	1	dead
24	83	F	rt. jaw	Lung	III	1	dead
25	80	M	rt. cheek	Paroid gland, brain	I	1	dead
26	60	F	lt. head	LN	II	2	alive
27	82	M	rt. groin	Lung	IV	1	alive
28	88	F	lt. thumb	LN	IV	1	alive
29	71	F	rt. thigh	LN	I	2	alive
30	89	F	extra genital	Skin, LN	I	1	alive
31	54	M	lt. abdomen	Lung, LN	I	2	alive
32	65	M	rt. back	-	II	1	alive
33	64	F	lower lip	-	III	1	alive

34	89	M	rt. postauricle	-	III	1	alive
35	49	F	rt. cervix	bone, multiple LN	IV	2	dead
36	61	M	lt. sole	-	II	1	alive
37	96	F	nasal dorsum	-	III	2	alive
38	69	M	lt. auricle	-	I	1	alive
39	86	M	lt. postauricle	-	I	3	alive
40	94	F	lt. preauricular	-	III	1	alive
41	79	M	rt. dorsum of hand	-	II	1	alive
42	91	M	lt. maxilla	LN	III	3	alive
43	82	M	lt. temple	-	II	3	alive
44	92	F	rt. temple	-	II	3	alive
45	81	M	rt. ear	-	II	4	alive
46	85	M	rt. shoulder	-	II	4	alive
47	65	M	philtrum	-	III	2	alive
48	86	M	rt. temple	-	I	2	alive
49	78	M	rt. temple	-	I	2	alive
50	70	M	rt. thigh	-	II	2	alive
51	99	F	rt. temple	-	I	3	alive

F; Female, M; Male, LN; Lymph node

表 4 : HN-SCC35 例の臨床情報

	Number	Sex (male:female)	Age (mean)	Clinical stage
Tongue SCC	35	30:5	58.8 (39-81)	Stage I : 10, Stage II : 12, Stage III: 11, Stage IV: 12

16. 分化度

SCCの臨床検体は、癌登録サイトである Surveillance, Epidemiology and End Results (以下、SEER と略す) が提唱する ICD-O-3 コードを用いて4つのグレードに分類した (Thomas et al., 2014)。グレードIは高分化、グレードIIは中分化、グレードIIIは低分化、グレードIVは未分化・未分化を示す。

17. 遺伝子発現

組織特異的な遺伝子発現情報は、Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) から抜粋した。

18. 統計解析

本研究での定量データはすべて平均±標準偏差で示し、誤差範囲は、グラフのエラーバーで示した。サンプル数は少なくとも $n \geq 3$ とした。統計解析は、Statcel-the Useful Addin Forms on Excel-4th ed (OMS Ltd.) を使用した。2群間の比較には t 検定 (Student の t 検定または Welch の t 検定)、群間の一対比較の評価には Tukey-Kramer 検定 (パラメトリック) または Steel-Dwass 検定 (ノンパラメトリック) を使用した。FAM83H の発現量と臨床情報の相関解析には、順位検定による Spearman の相関係数を用いた。分割表の解析には、独立性のカイ二乗検定を使用した。生存曲線には Kaplan-Meier 法で導出し、生存期間を対象とした。全ての統計学的解析において、 $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。

実験結果

1. 皮膚有棘細胞癌では、FAM83H の発現レベルが低下する

緒言に記載したように、FAM83H は皮膚を含む扁平上皮で高発現している。当科で手術した皮膚有棘細胞癌組織に対して免疫組織化学染色法を用いて FAM83H の発現レベルを調べた。FAM83H の発現レベルは、皮膚有棘細胞癌において、隣接する正常な表皮組織よりも低下していた (図 13)。さらに、FAM83H の発現レベルは、腫瘍原発巣よりも浸潤部およびリンパ節転移部において有意差をもって低下していた。

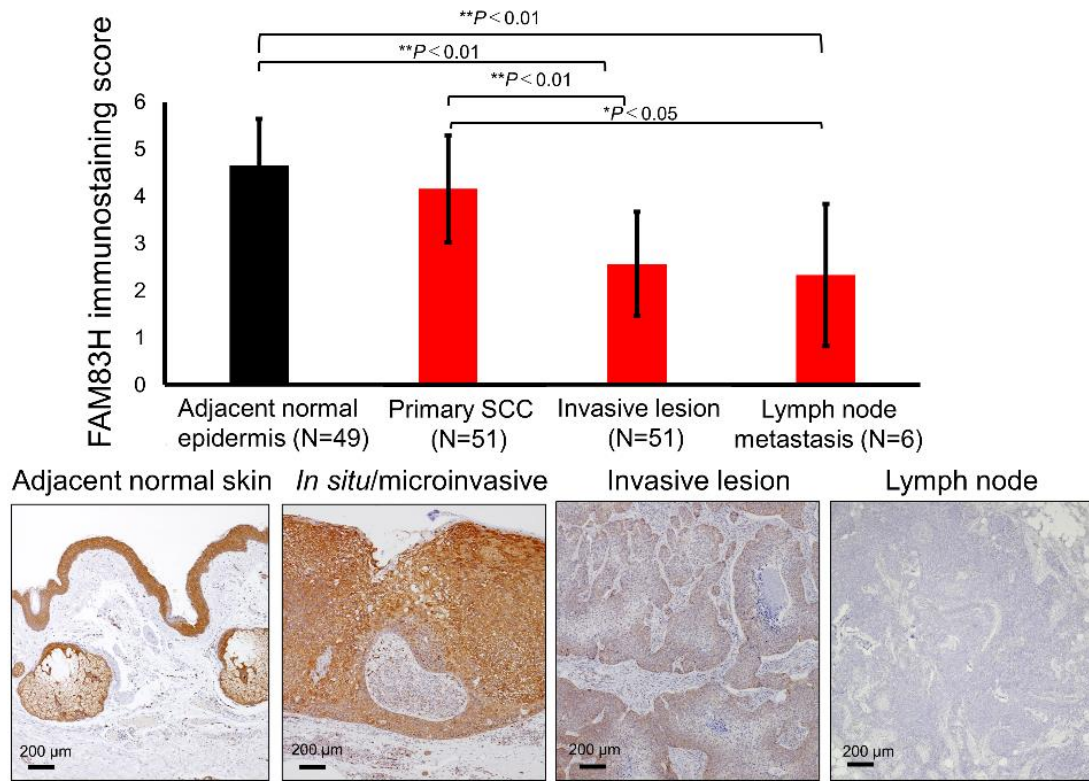
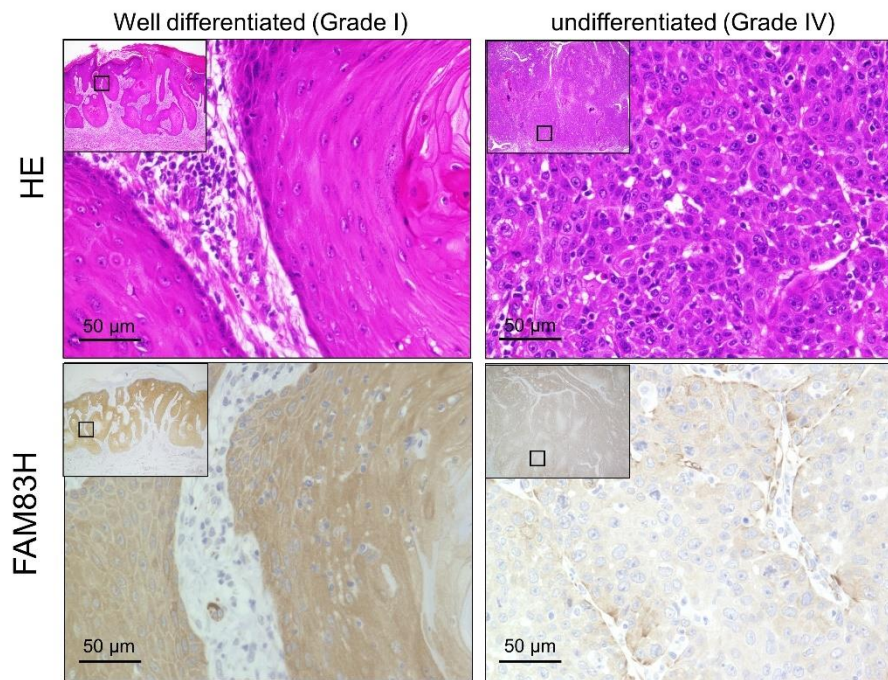


図 13 : 皮膚 SCC 臨床検体における FAM83H 染色スコア
 FAM83H 発現レベルは表皮内・微小浸潤 SCC で低下し、浸潤病変やリンパ節転移部で有意差をもって低下していた。

また、FAM83H の発現レベルは、腫瘍の分化度と相関しており、高分化病変よりも低分化病変の方が低下していた (図 14)。



FAM83H is	Differentiation grade				Total
	I	II	III	IV	
0	1	1	0	0	2
1	0	1	0	0	1
2	13	8	4	2	27
3	9	3	1	0	13
4	5	0	0	0	5
5	2	0	0	0	2
6	1	0	0	0	1
Total	31	13	5	2	51
<i>P</i> < 0.01 <i>r</i> = -0.3					

図 14 : FAM83H 発現レベルと分化度との相関
腫瘍が低分化であるほど、FAM83H 発現レベルが低下していた (is = immunostaining score, scale bar = 50 μm)。

また、皮膚 SCC 検体における FAM83H の messenger RNA (以下、mRNA と略す) 発現を評価したところ、皮膚 SCC の FAM83H の mRNA 発現は、正常な表皮組織よりも低下していた (図 15)。

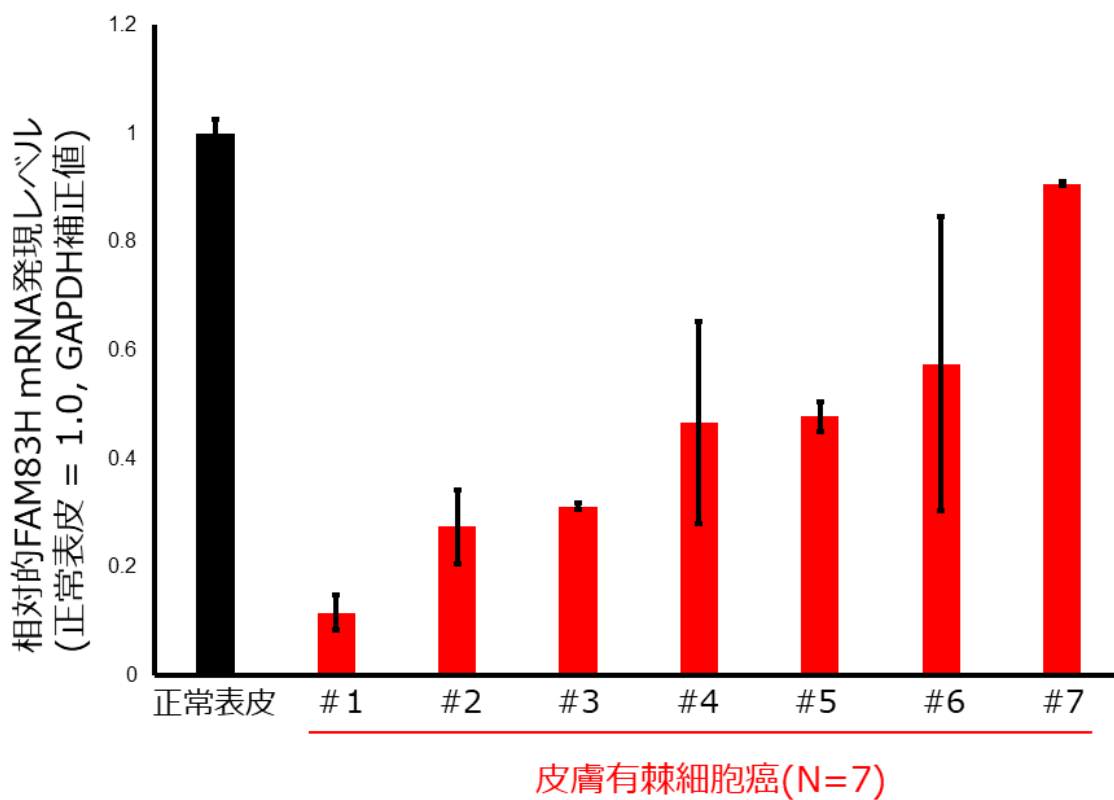
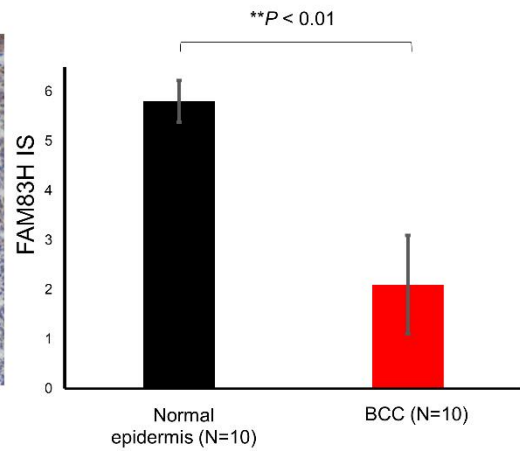
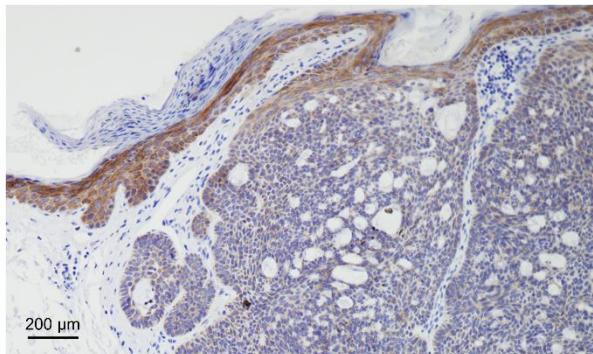


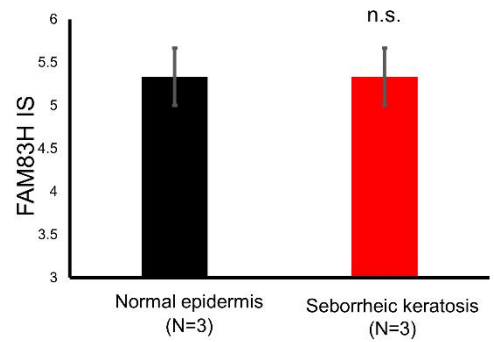
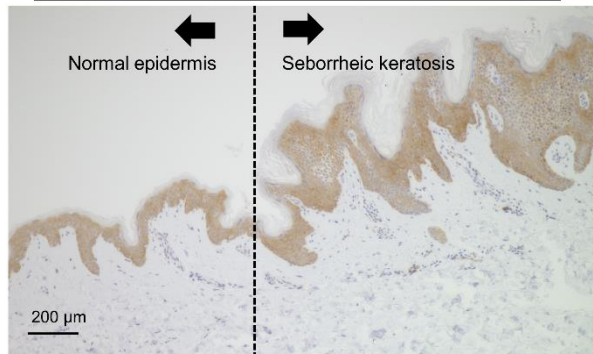
図 15 : 皮膚 SCC 臨床検体における FAM83H の mRNA 発現レベル
 皮膚 SCC では、FAM83H 発現が mRNA レベルで低下していた。

また、SCC と同様に表皮角化細胞由来の皮膚悪性腫瘍である基底細胞癌 (Basal cell carcinoma, 以下 BCC と略す) では、FAM83H 発現レベルは、正常表皮より低下していた。一方、良性の皮膚病変 (脂漏性角化症 (Seborrheic keratosis)、尋常性疣贅 (Verruca vulgaris)) では正常な表皮組織と同等であった (図 16)。

基底細胞癌 (Basal cell carcinoma)



脂漏性角化症 (Seborrheic keratosis)



尋常性疣贅 (Verruca vulgaris)

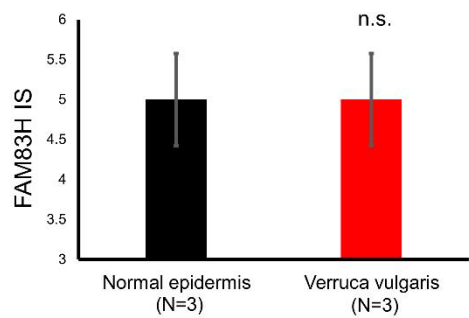
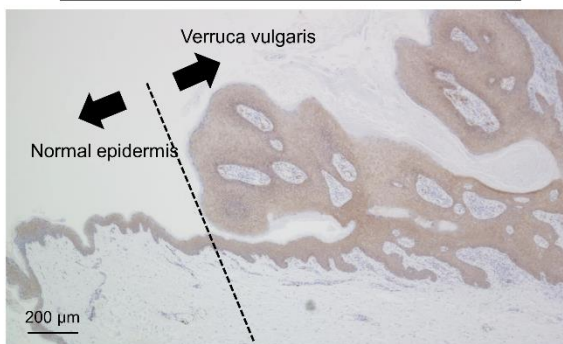


図 16 : BCC および良性病変における FAM83H 染色スコア
 基底細胞癌 (BCC)では FAM83H 発現レベルが低下、良性病変では正常表皮と同等に発現していた (scale bar = 200 μm, n.s. = not significant)。

次に、頭頸部 SCC（原発性舌癌、n = 35）における FAM83H の発現レベルも評価した。予想に反して、FAM83H の発現レベルは、正常粘膜上皮よりも頭頸部 SCC 腫瘍で高発現していたが、微小浸潤部よりも浸潤部の方が低下していた（図 17）。

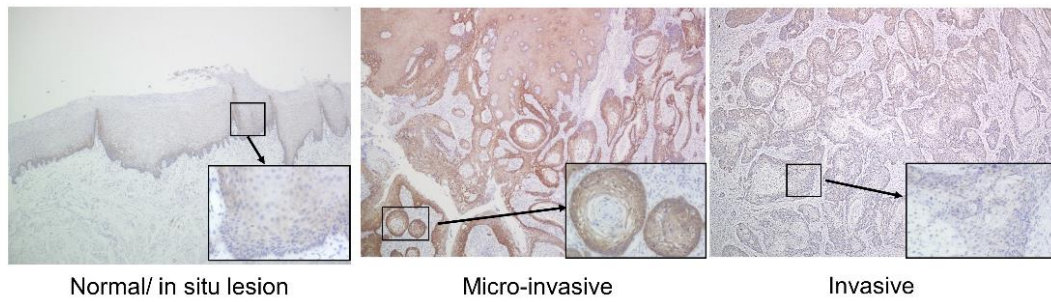
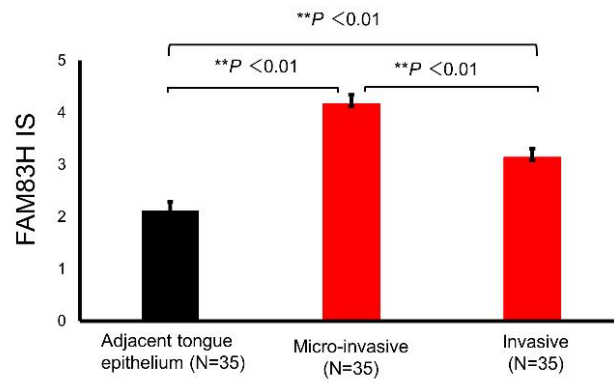


図 17 : 頭頸部 SCC 臨床検体における FAM83H 染色スコア

正常上皮には FAM83H はほとんど発現していない。SCC になると発現が亢進するが、浸潤部では微小浸潤部よりも発現が低下する。

また、頭頸部 SCC の浸潤性病変における FAM83H の発現低下は、予後不良と相関していた (図 18)。

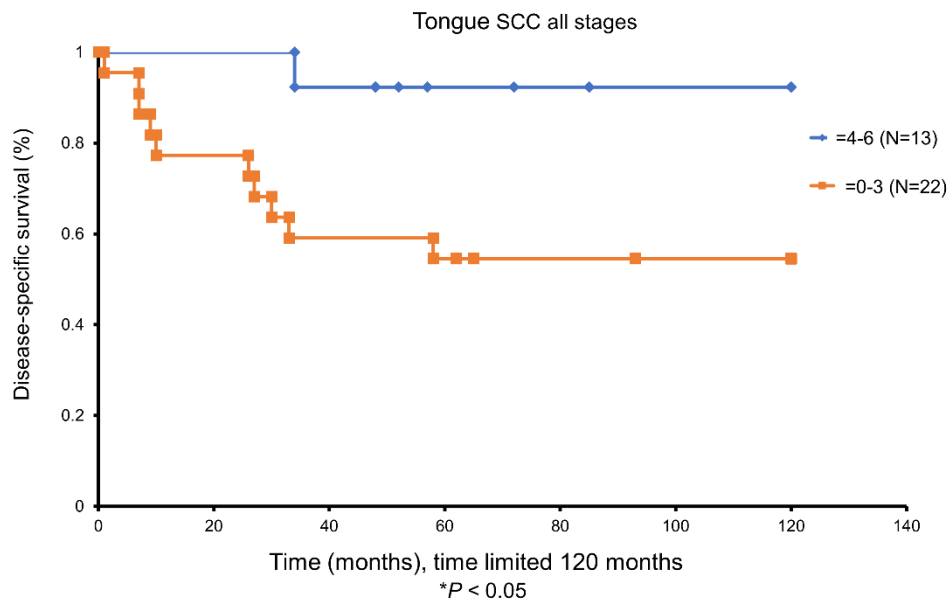


図 18 : 頭頸部 SCC 浸潤部において FAM83H 免疫染色スコアの high/low で分けて描写した生存曲線

FAM83H の発現が低下しているものは、高発現しているものと比較して有意に予後不良であった。

2. FAM83H のノックダウンは有棘細胞癌細胞の遊走と浸潤活性を促進する

最初に、HaCaT、A431、DJM1、および SAS 細胞における定常状態の FAM83H の発現を確認した (図 19)。

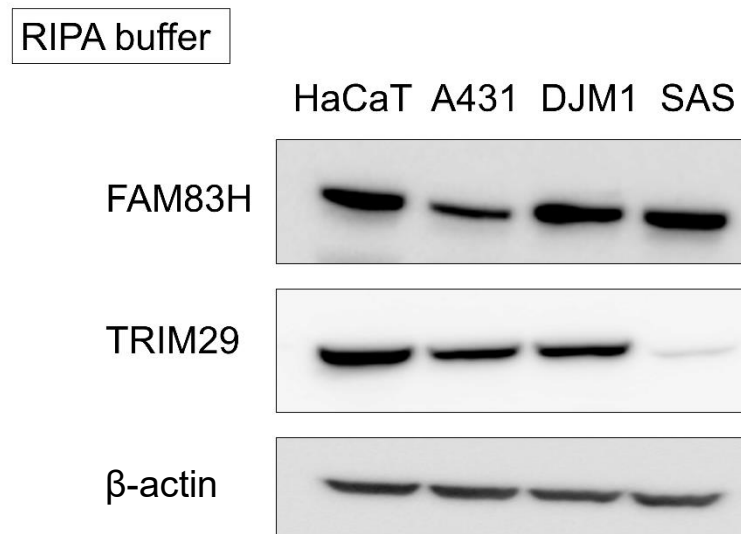


図 19 : 使用した細胞株の FAM83H 発現レベル
 使用した上皮細胞株のライセートを抽出し、ウエスタンブロットで解析したところ、すべての細胞株で FAM83H が恒常的に発現していた。

皮膚 SCC 細胞に対する FAM83H ノックダウンまたは過剰発現の影響を評価するために、FAM83H ノックダウンおよび過剰発現細胞を樹立した。ウエスタンブロット法により、HaCaT、SAS、および DJM1 細胞で FAM83H のタンパク質レベルのノックダウン (図 20) および SAS および DJM1 細胞での FAM83H の強制発現 (図 21) を確認した。



図 20 : shRNA による FAM83H のノックダウン実験

HaCaT, SAS, DJM1 細胞にそれぞれ shRNA を用いて FAM83H をノックダウンした細胞株を作成した。ウエスタンブロットにより、タンパクレベルで HaCaT, SAS, DJM1 いずれの細胞株でも FAM83H の発現量が低下していることを確認した。

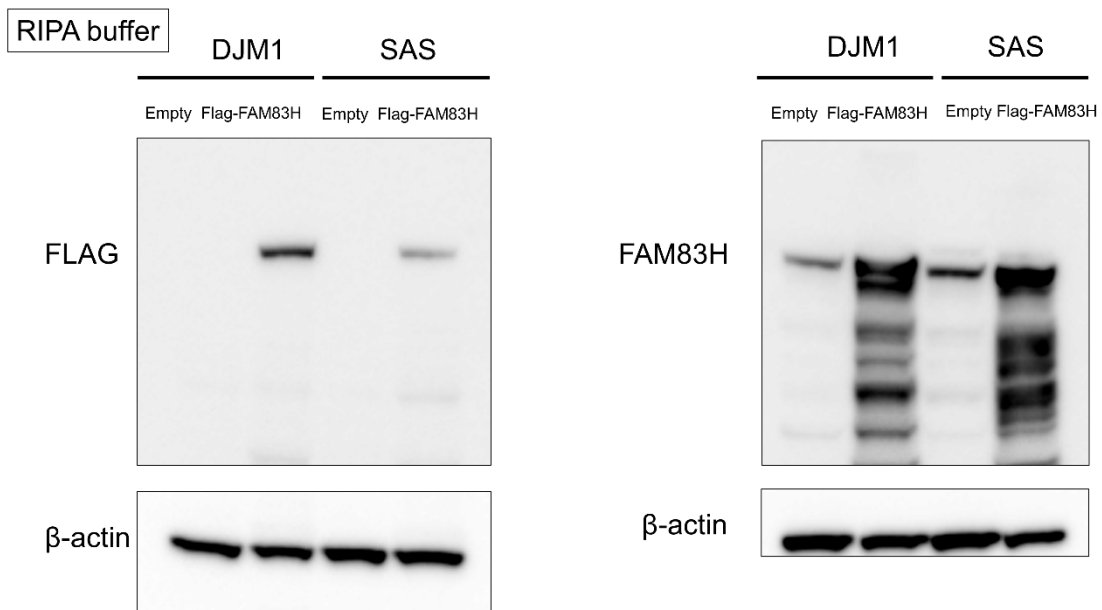


図 21 : pQCXI-puro vector による FAM83H 過剰発現実験
 FAM83H 過剰発現 DJM1, SAS 細胞を樹立した。ウエスタンブロットにより、
 タンパクレベルで SAS, DJM1 いずれの細胞株でも FAM83H が過剰発現して
 いることを確認した。

MTT 細胞増殖アッセイでは、FAM83H ノックダウンと過剰発現のいずれも細胞増殖には影響を与えなかった (図 22、図 23)。

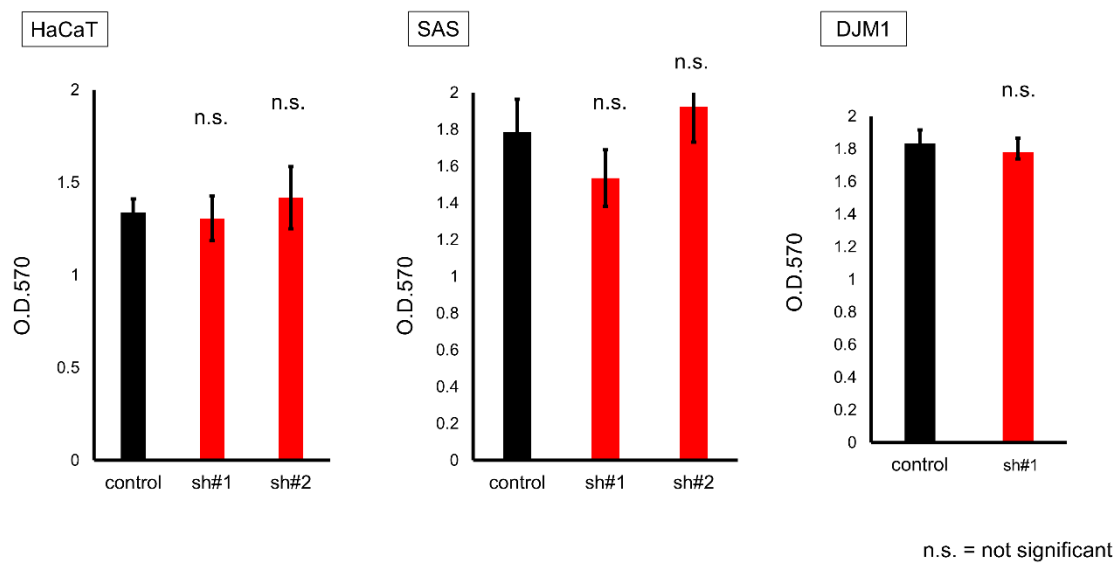


図 22 : shRNA で FAM83H をノックダウンした細胞株の MTT アッセイ 570 nm における吸光度を測定したところ、FAM83H ノックダウン細胞とコントロール細胞の増殖能に有意差を認めなかった (72 時間後に測定)。

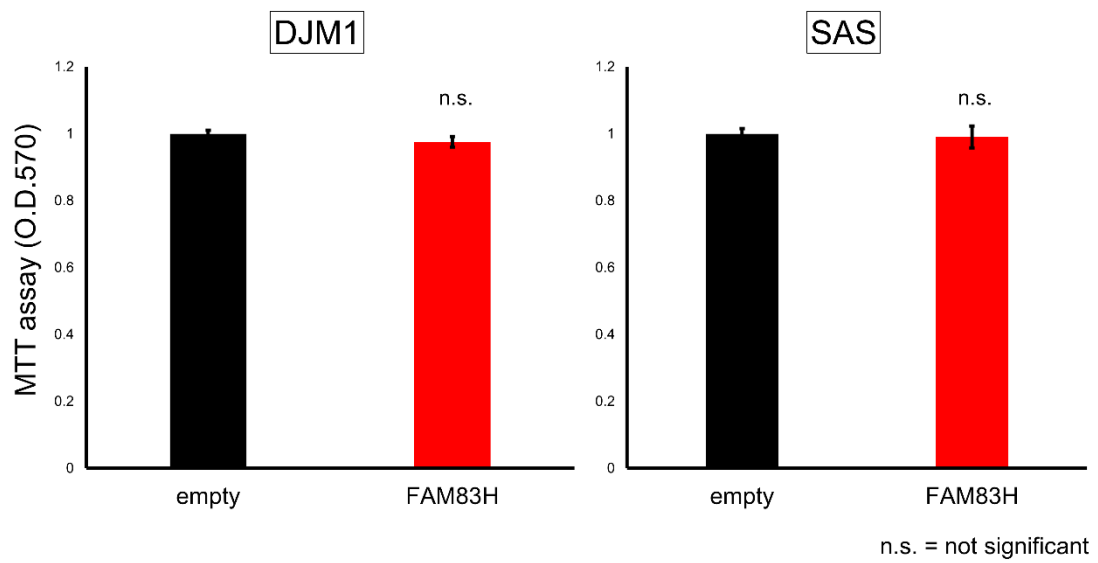


図 23 : FAM83H 過剰細胞株を用いた MTT アッセイ
 FAM83H を過剰発現させても細胞増殖能に影響を与えなかった (72 時間後に測定)。

創傷治癒アッセイを用いて遊走能を検討したところ、**FAM83H** ノックダウンは **HaCaT** 細胞の遊走能を有意に亢進させることが分かった (図 24)。

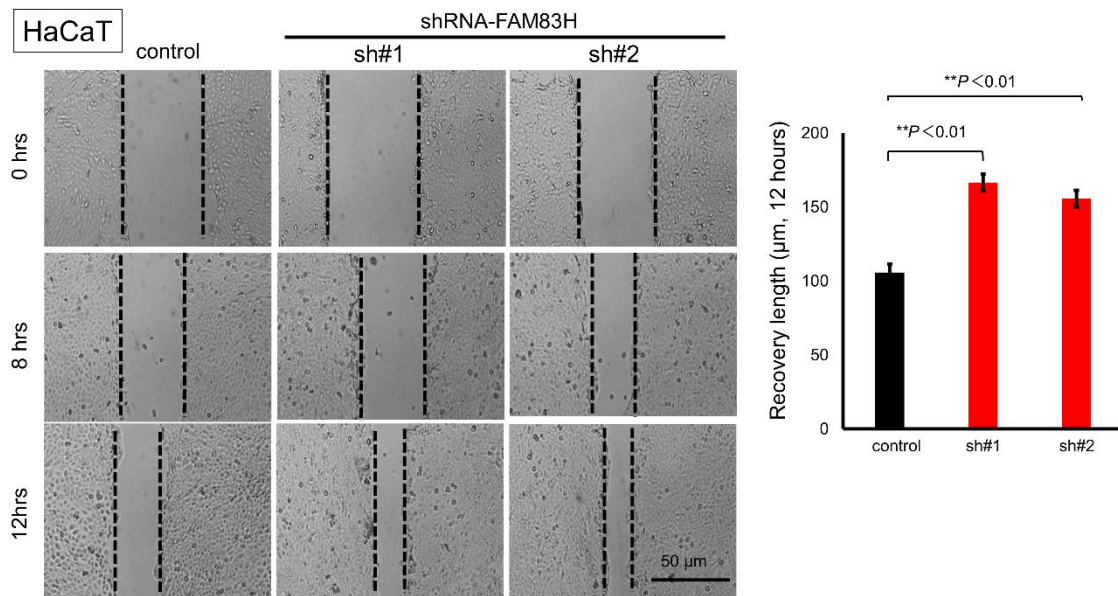


図 24 : FAM83H をノックダウンした時の遊走能
 HaCaT 細胞において shRNA で FAM83H をノックダウンすると、コントロール群と比較して有意に細胞の移動距離が亢進した (t -test, scale bar = 50 μ m)。

逆に、FAM83H を過剰発現させた DJM1 および SAS 細胞では、コントロールと比較して遊走能が有意に低下した (図 25)。

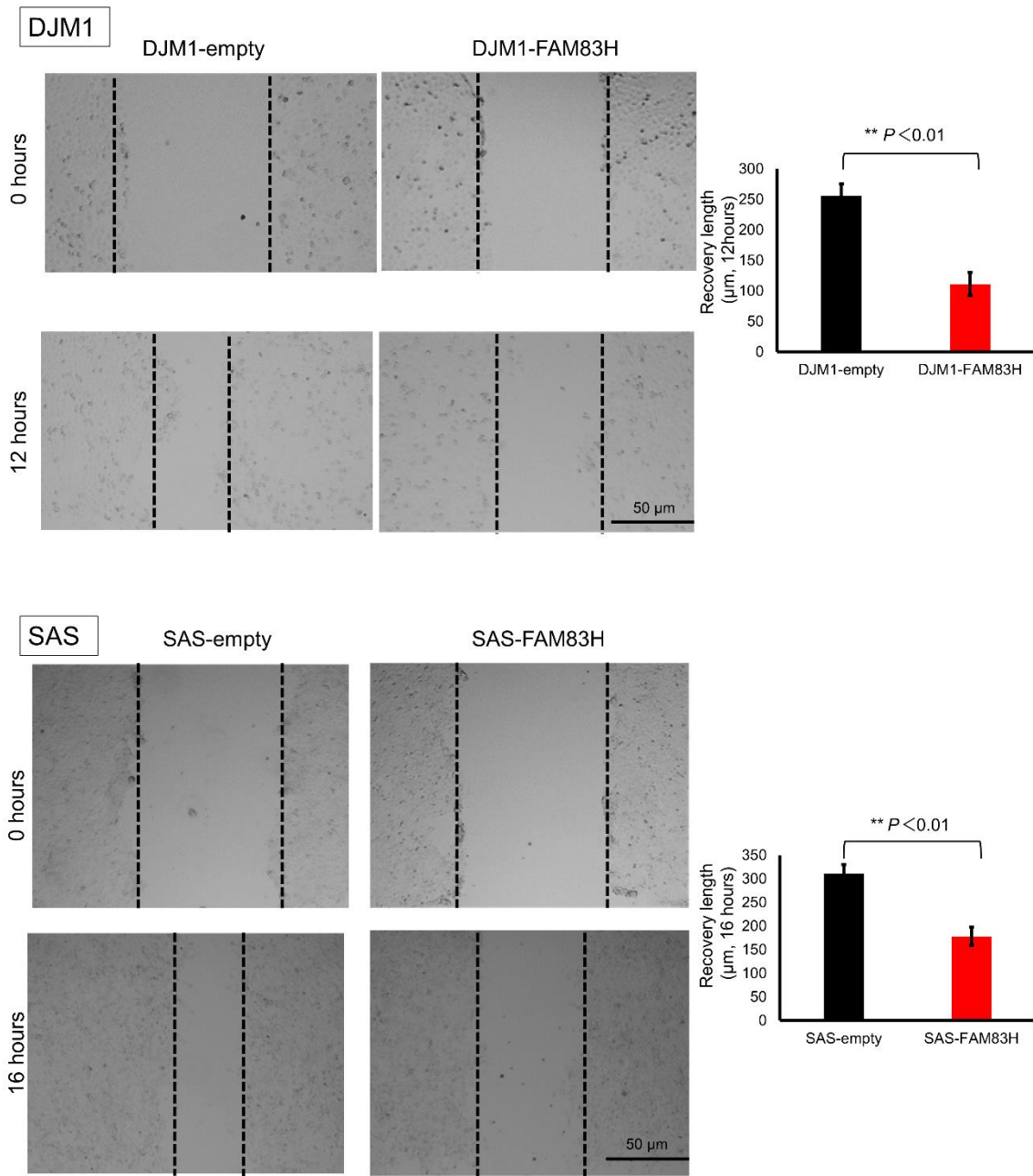
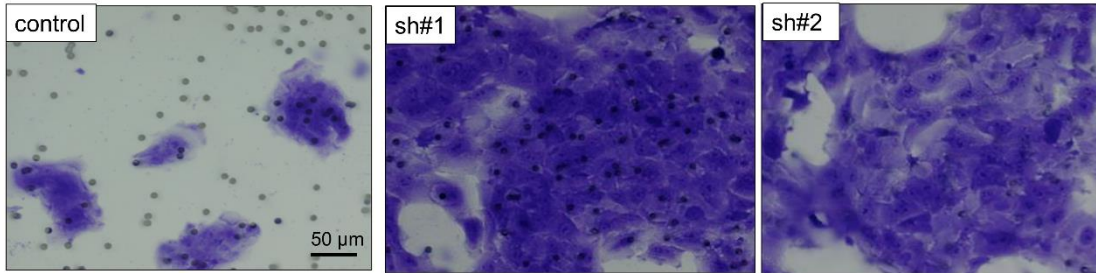
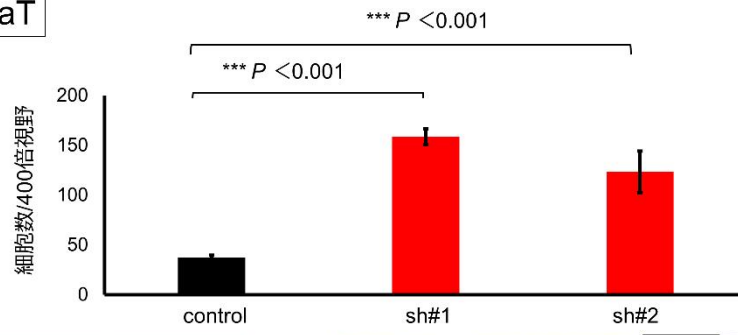


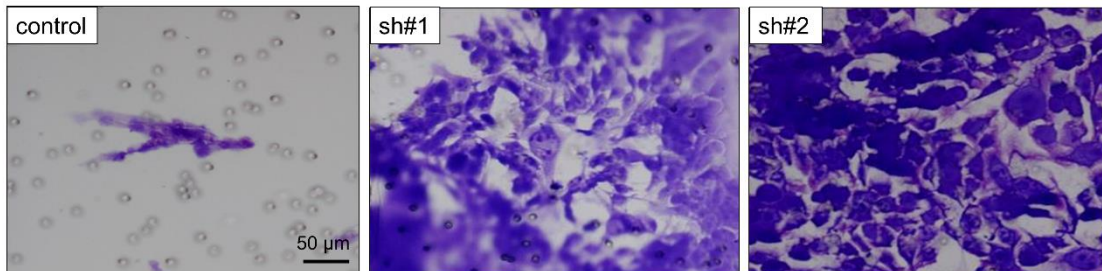
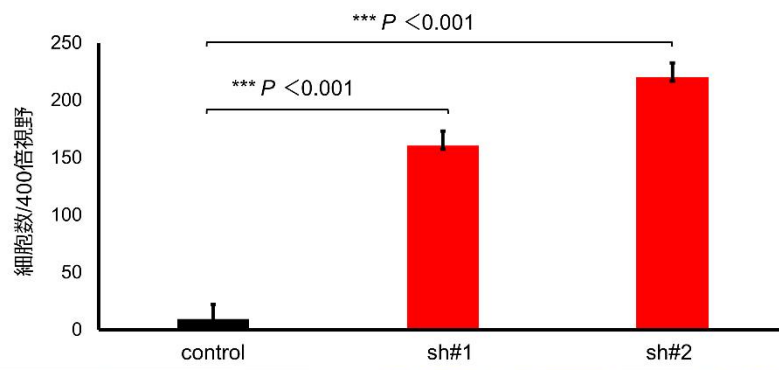
図 25 : FAM83H を過剰発現させた時の遊走能
 FAM83H を過剰発現させると、ノックダウンした時とは反対に、コントロールと比較して遊走能が低下した (t test, scale bar = 50 μ m)。

次に、マトリゲルチャンバーを使用して浸潤能を評価した。FAM83H ノックダウン HaCaT、SAS、および DJM1 細胞の浸潤能は、コントロールと比較し有意に亢進した (図 26)。

HaCaT



SAS



DJM1

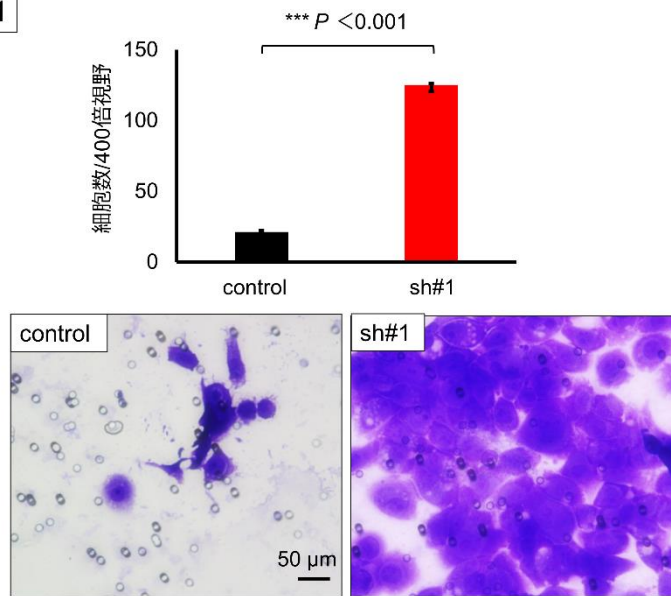


図 26 : FAM83H をノックダウンした時の浸潤能

HaCaT、SAS、DJM1 細胞いずれにおいても、FAM83H ノックダウンにより孔を通り抜けて下部ウェルに浸潤する細胞が有意に増加した (scale bar = 50 μm)。

逆に、FAM83H を過剰発現する SAS 細胞の浸潤能は、コントロールと比較して低下していた (図 27)。

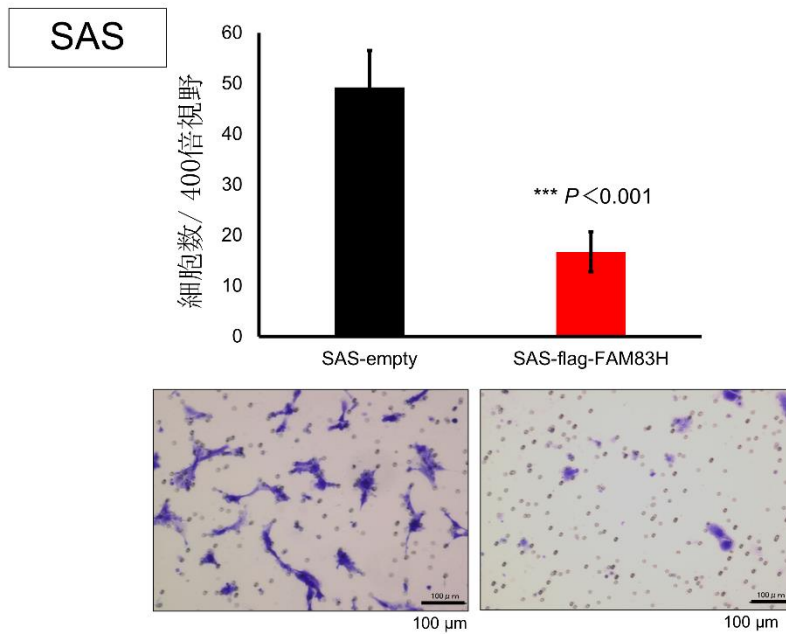


図 27 : FAM83H を過剰発現した時の浸潤能
 FAM83H を過剰発現すると浸潤する細胞は減少した (t -test, scale bar = 100 μm)。

これらの結果は、FAM83H の過剰発現が皮膚 SCC 細胞の遊走と浸潤を低下させる方向に調節していることを示している。

次に、In vivo における FAM83H の SCC における機能について評価するため、ルシフェラーゼ標識した DJM1 細胞を、 5.0×10^5 個ずつ 5 匹のヌードマウスに尾静脈注射し、Xenograft マウスモデルを作製した。In Vivo Imaging System (以下、IVIS と略す) を用いて経時的に腫瘍の肺転移について観察したところ、FAM83H をノックダウンした shRNA#2 の群では、コントロールに比べて腫瘍細胞の肺への転移が有意に亢進していた (図 28)。

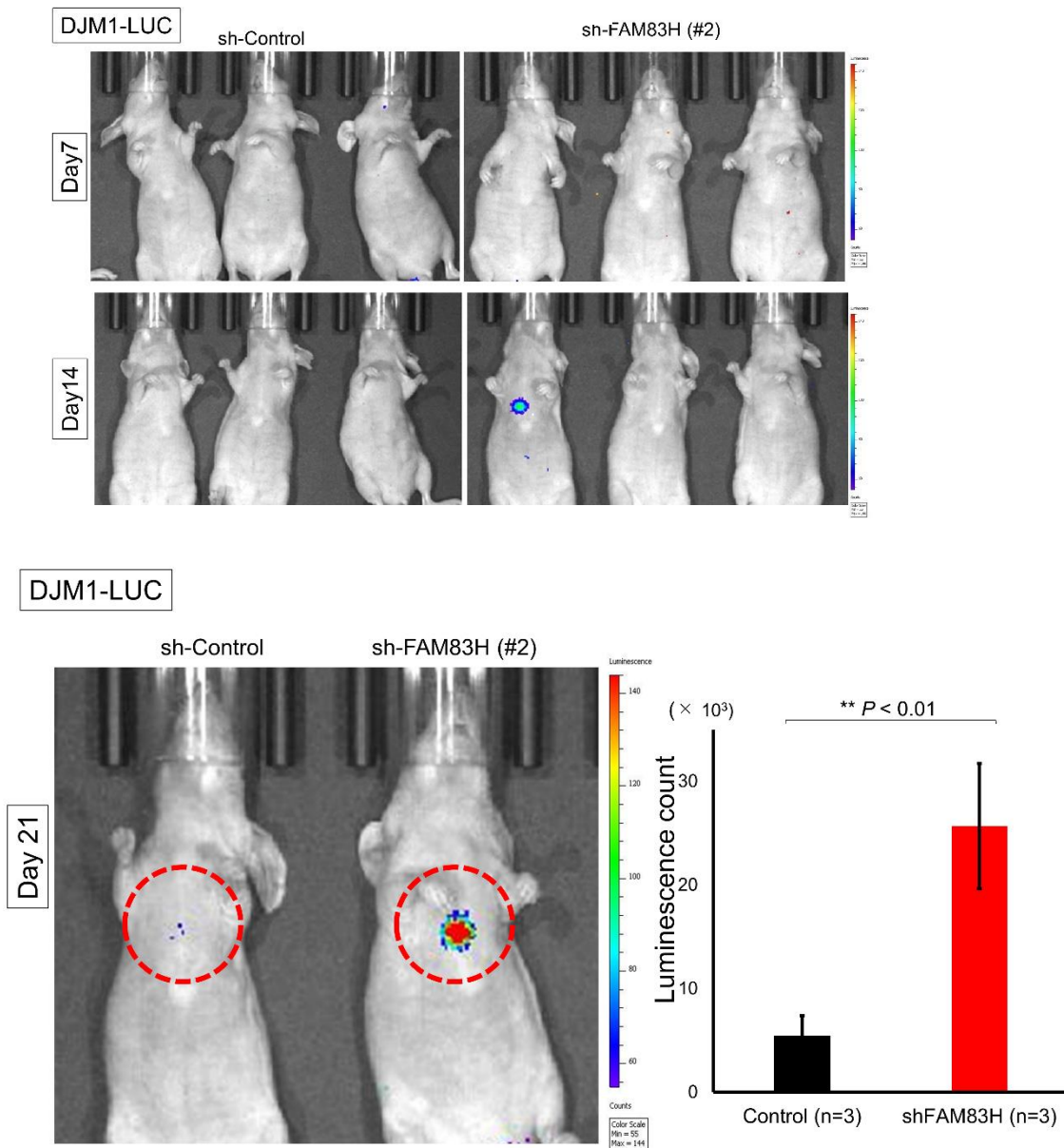


図 28 : Xenograft の肺転移能

IVIS を用いて、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光イメージを定量化した。青いほど発光量が少なく、赤いほど発光量が多い。腫瘍からの光子束は、ルシフェラーゼを発現している生細胞の数に比例するので、生物発光は腫瘍の大きさと直接的な相関を示す。光子束は、living image software の関心領域 (region of interest, 破線の赤丸) ツールを用いて測定・数値化した。

移植後 1 週間毎に経時的に観察したところ (上図)、移植後 21 日目の観察で、FAM83H ノックダウン群ではコントロール群と比較して、より多くの腫瘍細胞が肺へ転移していた (t test, 各群 $n = 3$)。

3. FAM83H は TRIM29 およびケラチンと複合体を形成する

表皮細角化細胞における FAM83H の分子機能を明らかにするために、まず FAM83H の細胞内局在を評価した。FAM83H の免疫蛍光染色および免疫組織化学染色により、FAM83H は主に細胞質に発現していることが明らかになった (図 29)。

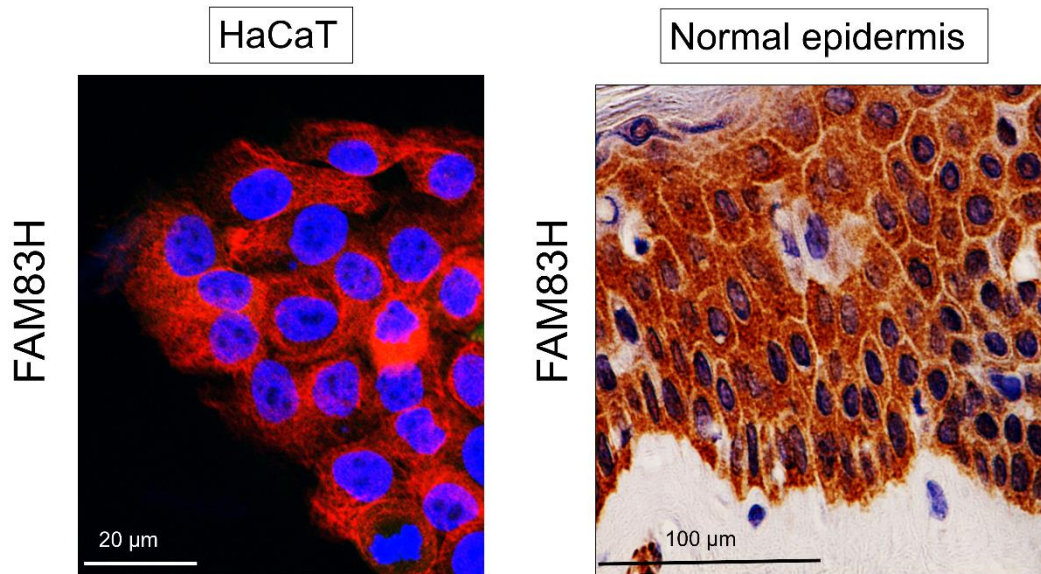


図 29 : HaCaT 培養細胞を用いた FAM83H 免疫蛍光染色および臨床検体を用いた FAM83H 免疫組織化学染色
FAM83H は、細胞質にびまん性に発現している（左図 : scale bar = 20 μm , 右図 : scale bar = 100 μm ）。

以前の我々のグループの研究結果 (Yanagi et al., 2018) と一致して、今回、筆者が実施した免疫沈降法により、FAM83H と TRIM29 およびケラチンは、細胞内で複合体を形成していることが明らかになった (図 30)。

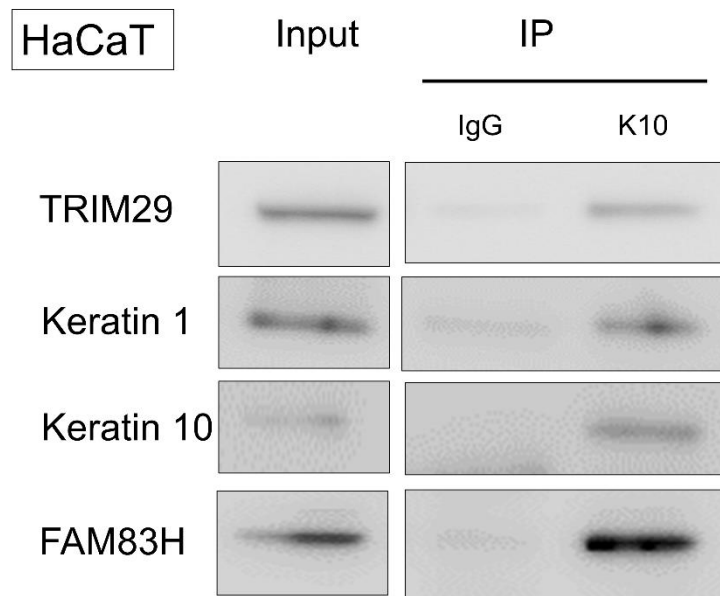


図 30 : HaCaT 細胞から抽出したタンパクを用いた免疫沈降法
 筆者が、ケラチン 10 (K10) 抗体にて免疫沈降法を実施し、FAM83H, TRIM29,
 ケラチン 1/10 のタンパク質結合を確認した。

FAM83H 過剰発現細胞を用いた実験でも同様に FAM83H と TRIM29 の結合を確認した (図 31)。

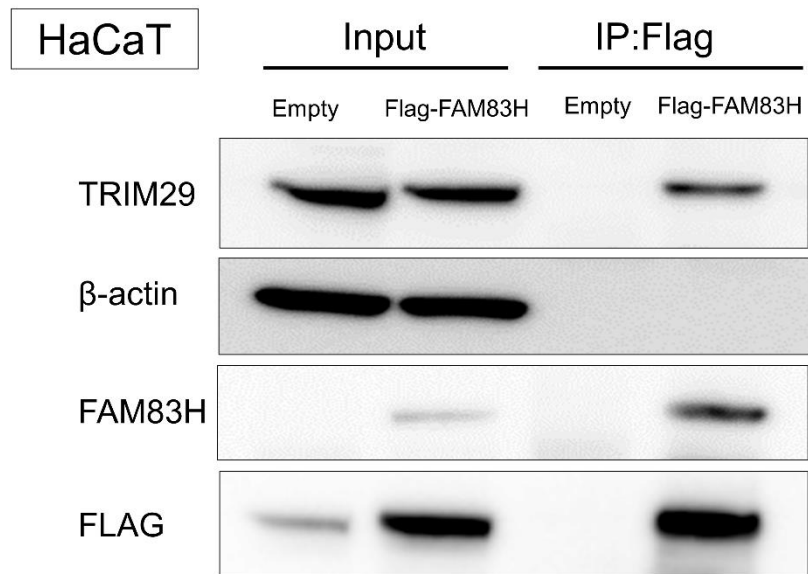


図 31 : FAM83H 過剰発現 HaCaT 細胞から抽出したタンパクを用いた免疫沈降法
 筆者が、抗 Flag 抗体 (M2) を用いて免疫沈降法を行った。FAM83H 過剰発現細胞でも
 同様に FAM83H と TRIM29 の結合を確認した。

一方、FAM83H とデスモゾーム関連タンパク質（デスモグレイン 3、プラコグロビン 3、およびデスモコリン 3）との結合は観察されなかった（図 32）。

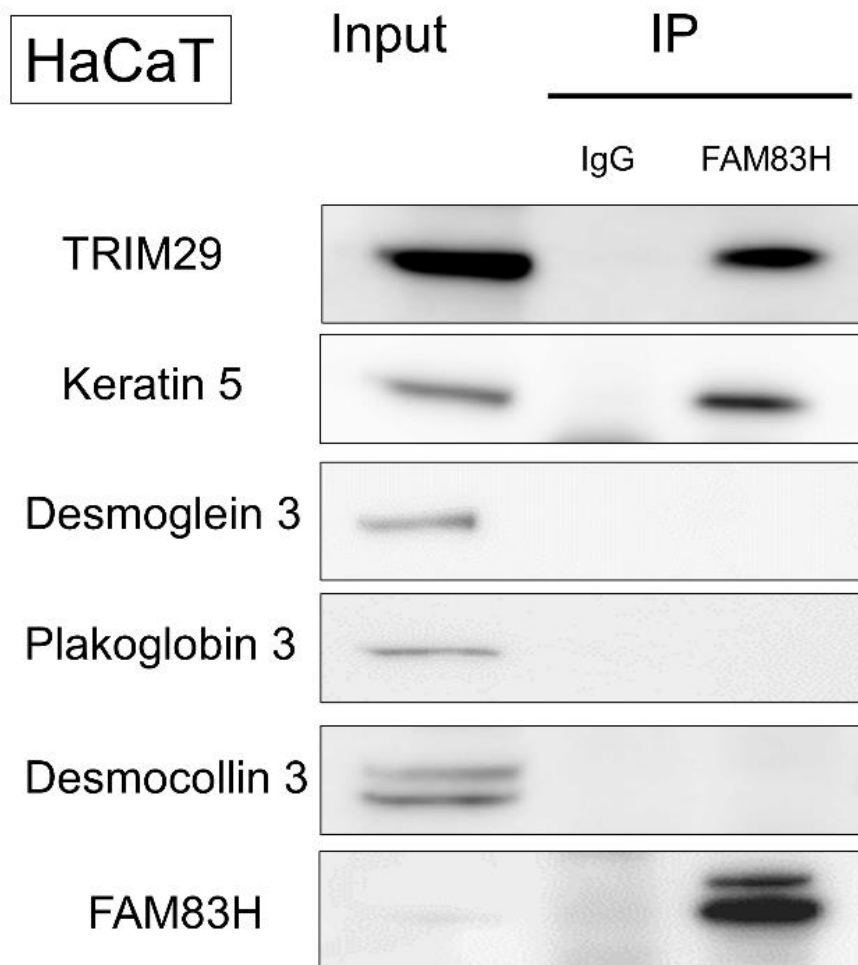


図 32 : HaCaT 細胞から抽出したタンパクを用いた免疫沈降法
 FAM83H、TRIM29、ケラチン 5 と結合は認められるものの、FAM83H とデス
 モゾーム関連タンパクとの結合は認められなかった。

次に、FAM83H が TRIM29/ケラチン間の複合体形成に影響を与えるかどうかを分析した。免疫沈降法の結果、FAM83H ノックダウンは TRIM29 とケラチン間の相互作用に影響を与えないことが明らかになった (図 33)。

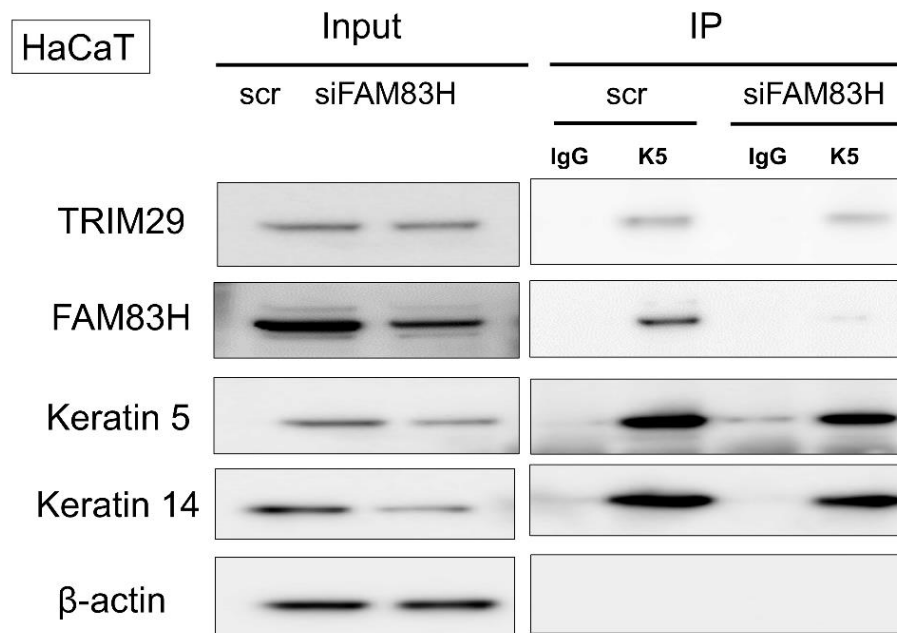


図 33 : siRNA により FAM83H をノックダウンした時の免疫沈降法
 FAM83H をノックダウンしてもコントロールと比較して、TRIM29 とケラチン
 のタンパク結合は変化しなかった。

同様に、TRIM29 をロックダウンしても FAM83H とケラチン間の結合は変化しなかった (図 34)。

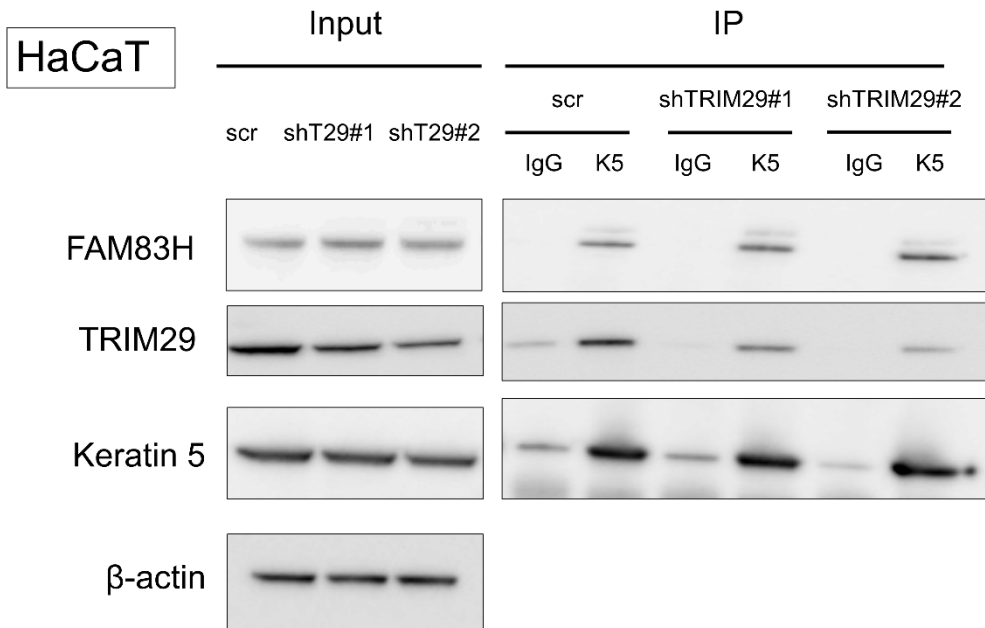


図 34 : shRNA により TRIM29 をノックダウンした時の免疫沈降法
 TRIM29 をノックダウンしても FAM83H とケラチンのタンパク結合は変化し
 なかった。

これらの結果は、**FAM83H** または **TRIM29** がそれぞれ独立してケラチンと結合することを示唆している。

さらに、**FAM83H** のケラチン相互作用ドメインを調べるために **FAM83H** の短縮型変異体を樹立した（図 35）。

筆者が実施した免疫沈降法とウエスタンブロットにより、FAM83H の C 末端ドメインが FAM83H-ケラチン複合体の形成に必要であることが明らかとなった (図 36)。これは Kuga らの先行研究結果と一致する (Kuga et al., 2013)。

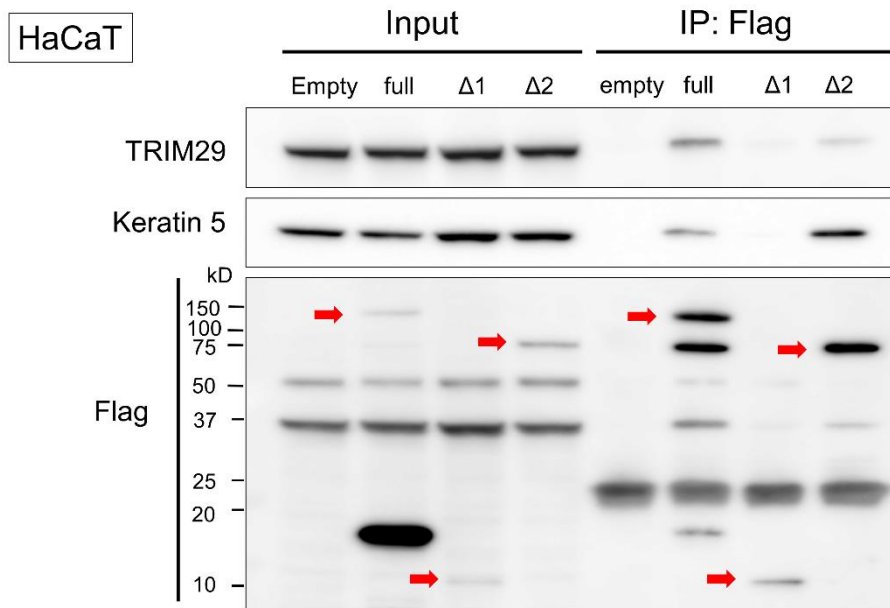


図 36：全長および短縮型変異体 FAM83H を用いた免疫沈降法
 筆者が、1%NP40 ライセートを用いた免疫沈降法を行ったところ、FAM83H の C 末端ドメインが TRIM29-ケラチン-FAM83H 複合体の形成に必要であることが示された。(赤矢印：全長あるいは短縮型変異体 FAM83H)。

4. FAM83H はケラチンの分布と可溶性を調節する

以前、我々のグループは、TRIM29 が HaCaT および皮膚 SCC 細胞のケラチン分布を調節することを報告した (Yanagi et al., 2018)。それをうけて、筆者は、FAM83H をノックダウンした HaCaT 細胞におけるケラチンの細胞内分布を調べた。免疫蛍光染色により、FAM83H をノックダウンすると、ケラチン線維が核周囲に凝集することが明らかになった (図 37)。

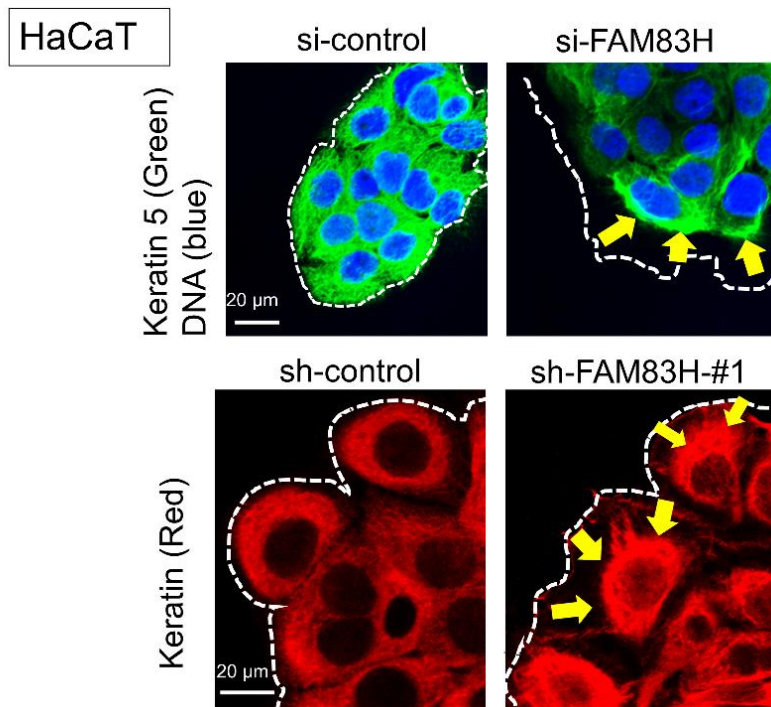


図 37 : siRNA および shRNA により FAM83H をノックダウンした時の免疫蛍光染色

FAM83H のノックダウンにより、ケラチン線維が核周囲に凝集した (上段 : 緑 ; ケラチン 5、青 ; DNA。下段 : 赤 ; パンサイトケラチン。上下段 : 白破線 ; 細胞の境界、黄矢印 ; 核周囲に凝集したケラチン線維。scale bar = 20 μm)。

FAM83H と TRIM29 をダブルノックダウンしても、同様にケラチン線維は核周囲に凝集した (図 38)。

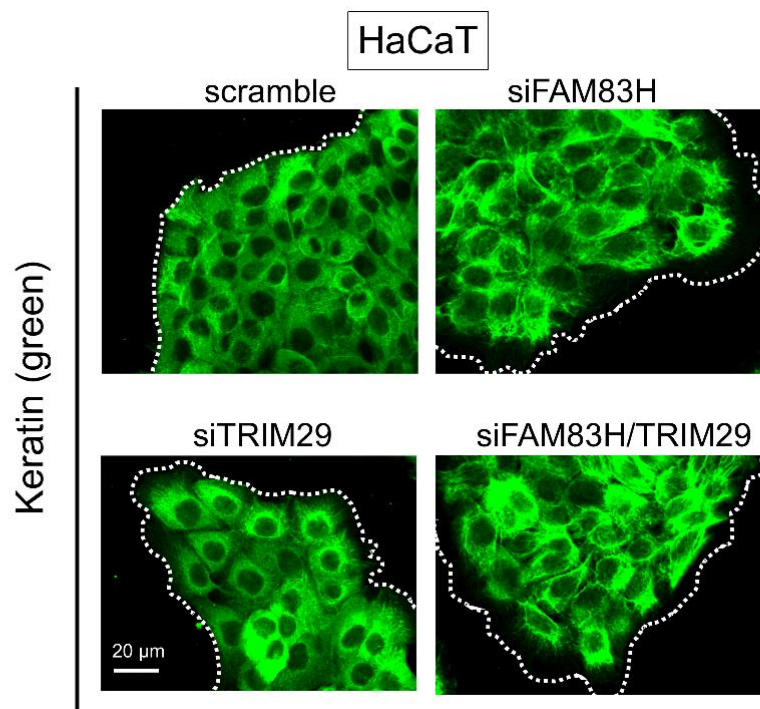


図 38 : siRNA により FAM83H/TRIM29 両方をノックダウンした時の免疫蛍光染色

FAM83H・TRIM29 ダブルノックダウンによりケラチン線維が核周囲に凝集した (緑 : パンサイトケラチン、白破線 : 細胞の境界、scale bar = 20 μm)。

次に、FAM83H は、ケラチン線維の分布のみでなく構造も変化させている可能性を考え、電子顕微鏡での超微細形態学的観察を行った。その結果、FAM83H ノックダウン HaCaT 細胞では、ケラチンフィラメントの太さと数がコントロール細胞に比べ有意に減少した (図 39)。

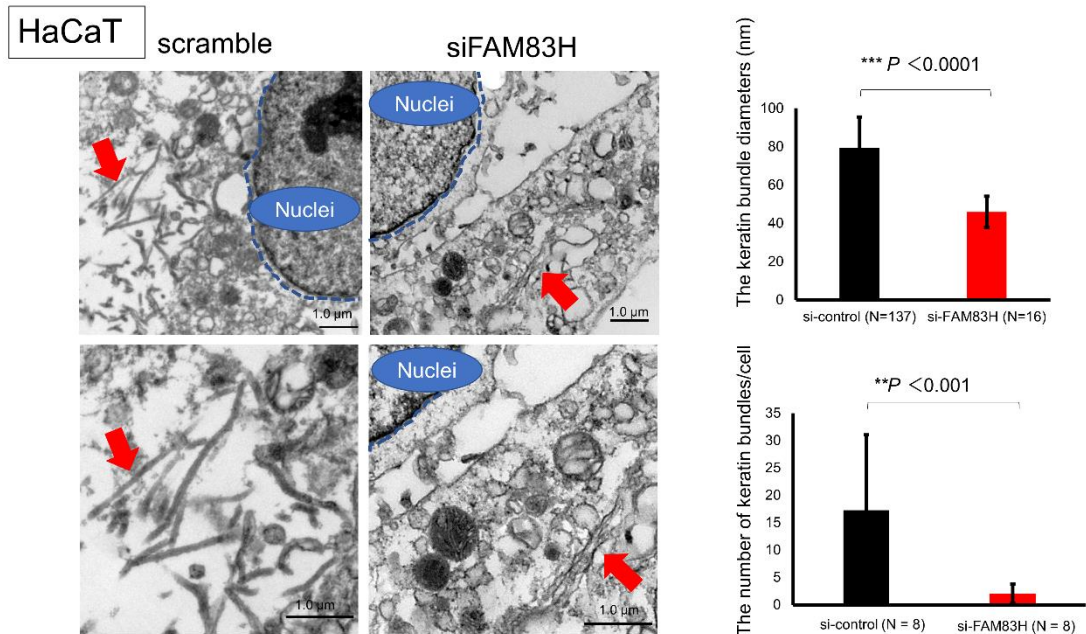


図 39 : siRNA により FAM83H をノックダウンした HaCaT 細胞の超微細構造
 コントロール、FAM83H ノックダウン細胞それぞれ 8 個の細胞において、核の
 辺縁から 5.0 μm までの範囲にあるケラチン束を観察した。コントロール細胞で
 は合計 137 本、FAM83H ノックダウン細胞では合計 16 本のケラチン束を認め
 た。FAM83H ノックダウンによりケラチン束の径は細くなり、細胞あたりのケ
 ラチン線維の数も減少した (赤矢印 : ケラチン束、青破線 : 核、上段 : 1000 倍、
 下段 : 2000 倍、scale bar = 1.0 μm, *t* 検定)。

ケラチンの分布の変化とは異なり、FAM83H ノックダウンは TRIM29 または E-カドヘリンの分布や発現に影響を与えなかった (図 40)。

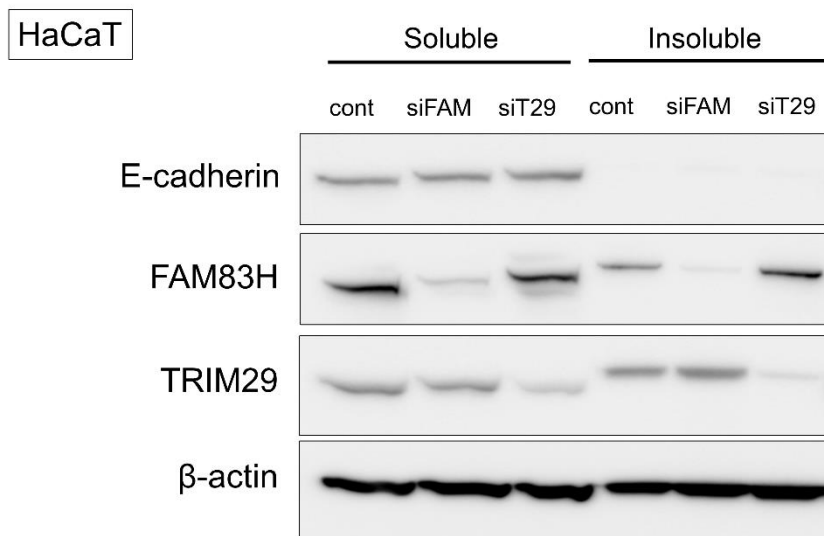
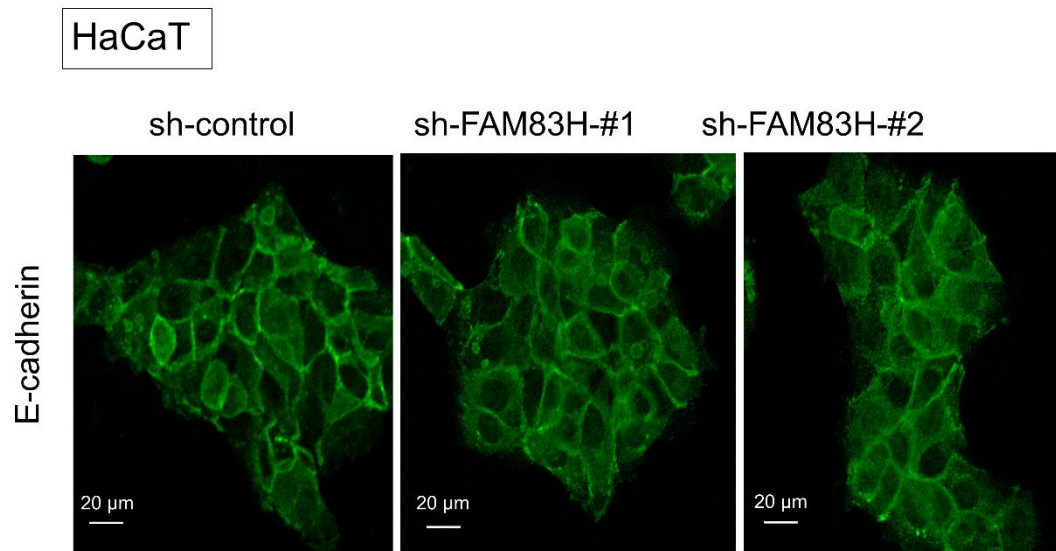


図 40 : FAM83H をノックダウンした時の E-cadherin の免疫蛍光染色 (上図) と免疫沈降 (下図)
 FAM83H をノックダウンしても E-cadherin の分布や発現量は変化しなかった。

また、細胞の遊走性を調節する他のタンパクとの関連について調べたところ、スクラッチ創傷アッセイで、FAM83H ノックダウンにより創傷端での **integrin 64** の発現が亢進した (図 41)。

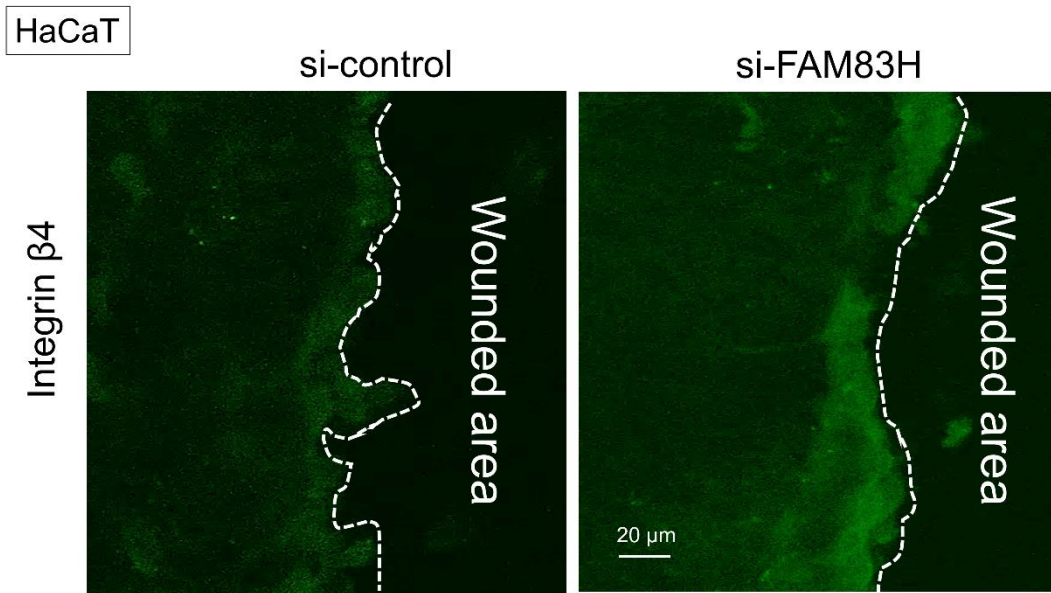


図 41 : FAM83H をノックダウンし遊走させた時の integrin $\beta 4$ の免疫蛍光染色
 FAM83H をノックダウンし、スクラッチにより細胞を遊走させると、創傷辺縁
 の integrin $\beta 4$ の発現が亢進した（スクラッチ 4 時間後、白破線：創傷辺縁、
 scale bar = 20 μm ）。

また、FAM83H ノックダウン細胞を使用してケラチンの溶解度を評価した。1%NP40 で溶解したサンプルを使用した免疫ブロット法により、FAM83H ノックダウンによって可溶分画でのケラチン（ケラチン 5、およびケラチン 14）の発現レベルが低下することが明らかになった。しかし、不溶分画での発現は変化しなかった（図 42, 図 43）。

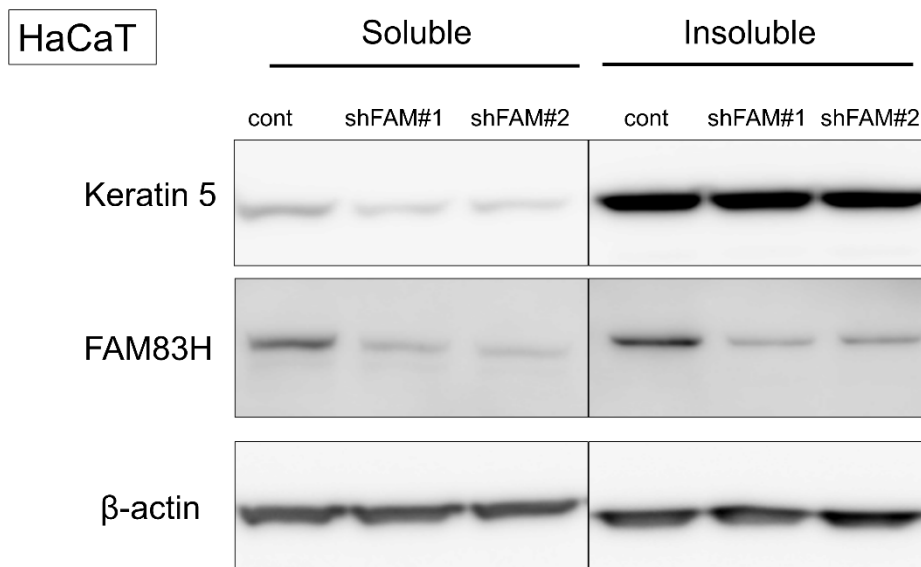
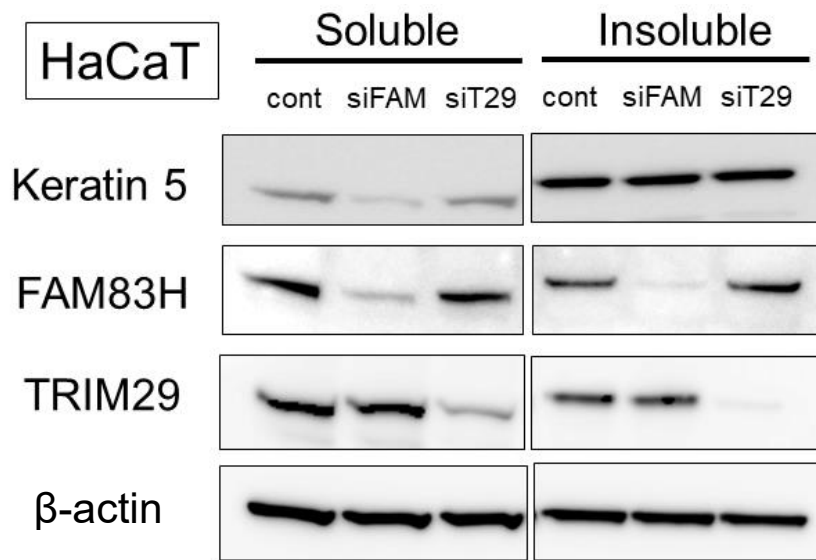


図 42: siRNA および shRNA により FAM83H をノックダウンした時の HaCaT 細胞におけるケラチンの溶解度

HaCaT 細胞において siRNA および shRNA による FAM83H のノックダウンによって、可溶分画でのケラチンの発現レベルは低下したが、不溶分画での発現は変化しなかった。

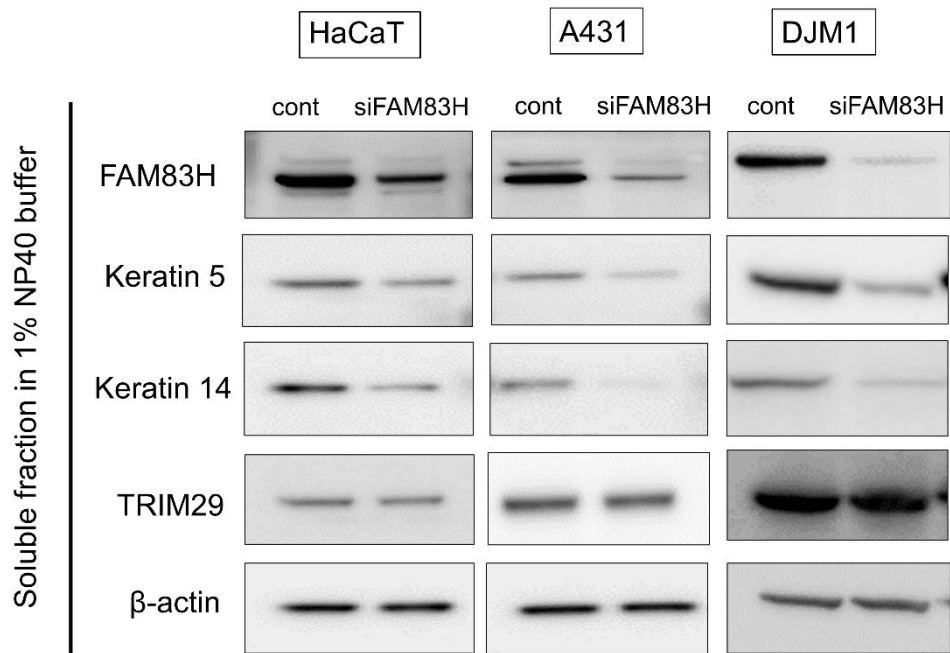


図 43 : siRNA により FAM83H をノックダウンした時のケラチンの溶解度
 HaCaT 細胞において、図 42 と同様に可溶分画におけるケラチンの発現レベル
 の低下が再現され、A431, DJM1 細胞においても同様の結果であった。

ケラチン線維の構成には、タイプⅠケラチンとタイプⅡケラチンとで構成されるヘテロダイマーの形成が必須であり、さらに二量体、四量体が重合していくことで、成熟した中間径フィラメントを形成する。そのため、ケラチン線維の基本構成単位である二量体形成に、FAM83H が影響を及ぼすかを評価したが、FAM83H ノックダウンはケラチンの二量体形成には影響を与えなかった (図 44)。

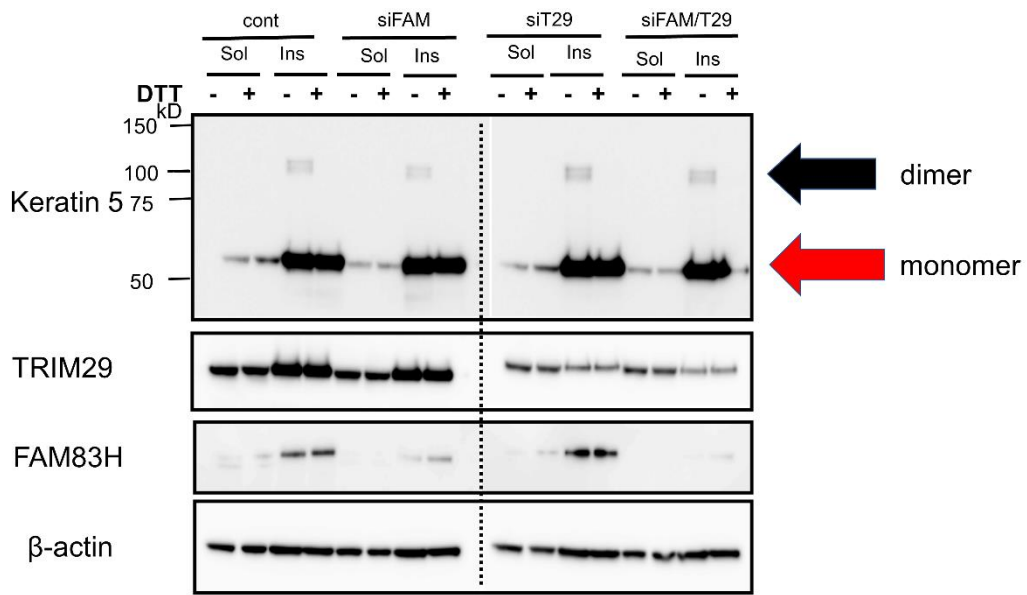
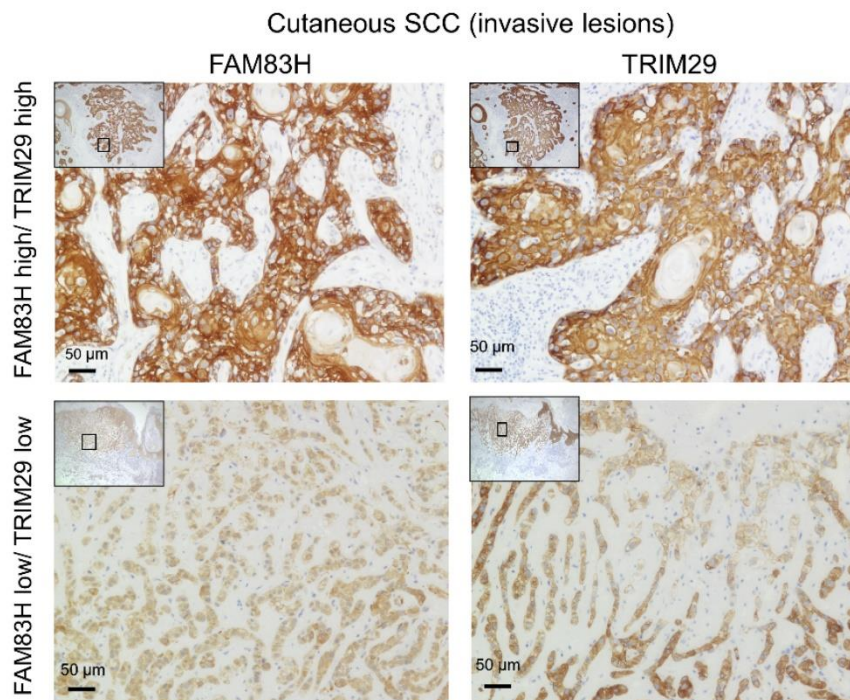


図 44 : FAM83H のノックダウンは、ケラチンの二量体化に影響を与えない
 HaCaT 細胞に、FAM83H (siFAM)、TRIM29 (siT29)、両方 (siFAM/T29) またはコントロール (cont) を標的とした siRNA を導入した。トランスフェクション後 48 時間で、1% NP40 バッファーを用いて細胞抽出液を採取した。1%NP40 可溶性および不溶性画分を還元 (DTT で処理) または非還元 (DTT なし) の 2 つの部分に分け、示した抗体を用いてウエスタンブロットで分析した。FAM83H をノックダウンしてもケラチンの二量体化には影響を及ぼさなかった (赤矢印: ケラチン 5 の単量体、黒矢印: ケラチン 5 の二量体)。

これらの結果は、FAM83H がケラチンの分布と可溶性を調節していることを示している。

5. FAM83H の発現低下は、ケラチンの細胞内分布に關与する

臨床検体（皮膚 SCC および隣接する正常表皮組織、各々 $n = 60$ ）を用いて FAM83H の発現と、TRIM29 の発現およびケラチンの分布パターンとの相関関係を調べた。臨床検体において、FAM83H の発現と TRIM29 の発現との間に正の相関を認めた（図 45）。

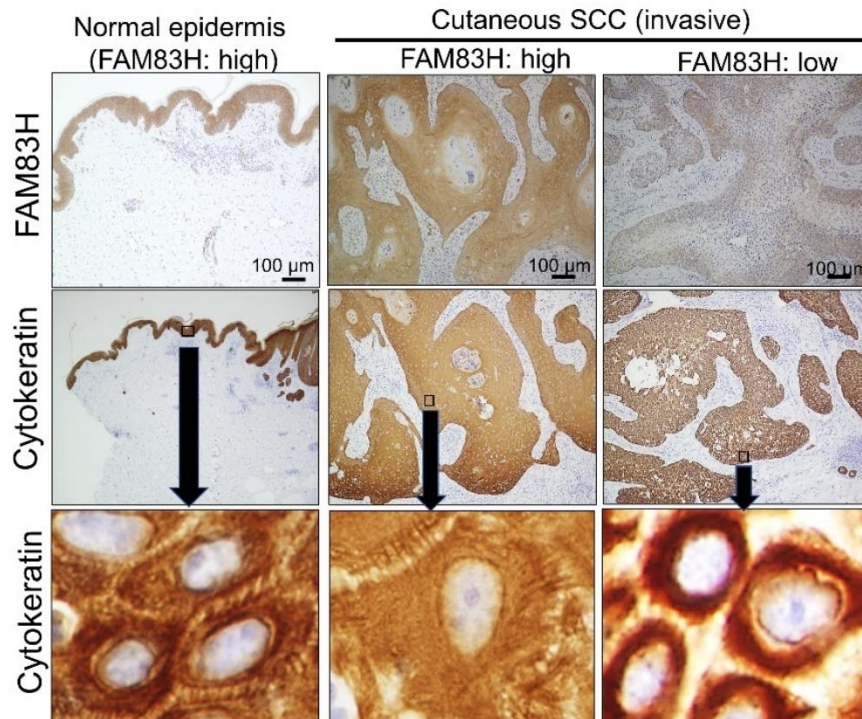


FAM83H score	TRIM29 score							Total
	0	1	2	3	4	5	6	
0	0	0	0	1	1	0	0	2
1	0	0	0	0	1	0	0	1
2	0	0	0	0	7	5	1	13
3	0	0	0	0	4	6	3	13
4	0	0	0	0	4	0	11	15
5	0	0	0	0	1	0	12	13
6	0	0	0	0	1	0	2	3
Total	0	0	0	1	19	11	29	60

$P < 0.01$ $r = 0.64$

図 45：臨床検体を用いた FAM83H および TRIM29 の染色スコア
皮膚 SCC において、FAM83H と TRIM29 の発現レベルは正に相関していた
(scale bar = 50 μm)。

ケラチン分布に関しては、**FAM83H** が高発現している部分ではケラチン線維が細胞質にびまん性に発現していた。逆に、**FAM83H** の発現が低下している部分では、ケラチン線維は核周囲にリング状に凝集していた（図 46）。



Cutaneous SCC and normal epidermis (Total N = 59)	Keratin distribution	diffuse	nondiffuse	Total	* $P < 0.05$
	FAM83H is high (≥ 4)	26	5	31	
FAM83H is low (≤ 3)	14	14	28		

図 46 : 臨床検体における FAM83H の染色スコアとケラチン分布の相関
 皮膚 SCC 臨床検体において、FAM83H が高発現している部分ではケラチンは細胞質にびまん性に分布しているのに対し、FAM83H の発現が低下している部分では、ケラチンは核周囲に凝集していた (scale bar = 100 μm)。

さらに、肺転移マウスモデルにおけるケラチンの発現・分布を調査した。**FAM83H** のノックダウンにより、肺転移した癌細胞のケラチンは核周囲に凝集したが、コントロールの肺転移性癌細胞のケラチンは、細胞質にびまん性に拡散していた (図 47)。

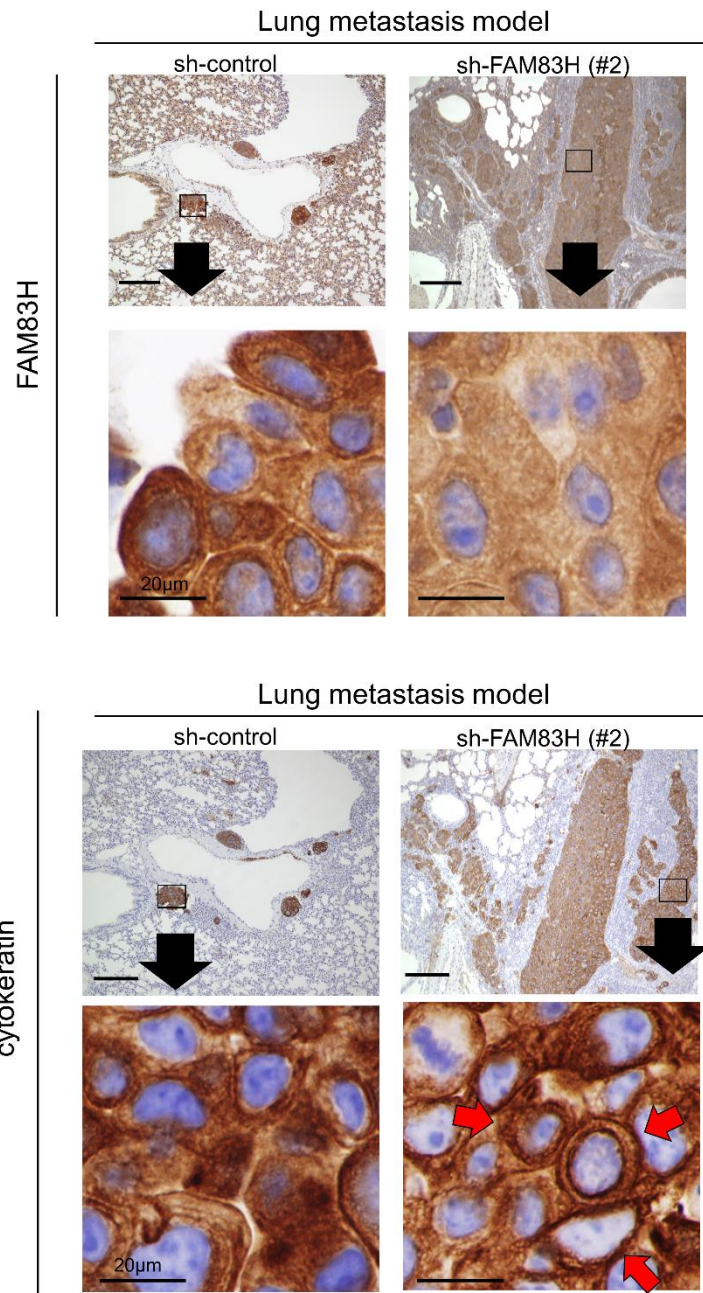


図 47 : Xenograft の肺転移腫瘍細胞のケラチン分布
 FAM83H ノックダウン細胞を移植したマウスでは、肺転移した腫瘍細胞のケラチンは、核周囲に凝集していた（赤矢印：核周囲に凝集したケラチン、scale bar = 20 μ m）。

これらの結果は、**FAM83H** の発現低下がケラチンの分布の変化に関連していることを示しており、培養細胞を用いた実験結果と一致した。ケラチンの分布の乱れは、細胞の遊走を促進することが先行研究で報告されている (**Omary et al., 2009**)。したがって、**FAM83H** ノックダウンによってケラチンが核周囲に凝集すると、細胞の遊走/浸潤が亢進する (図 48)。

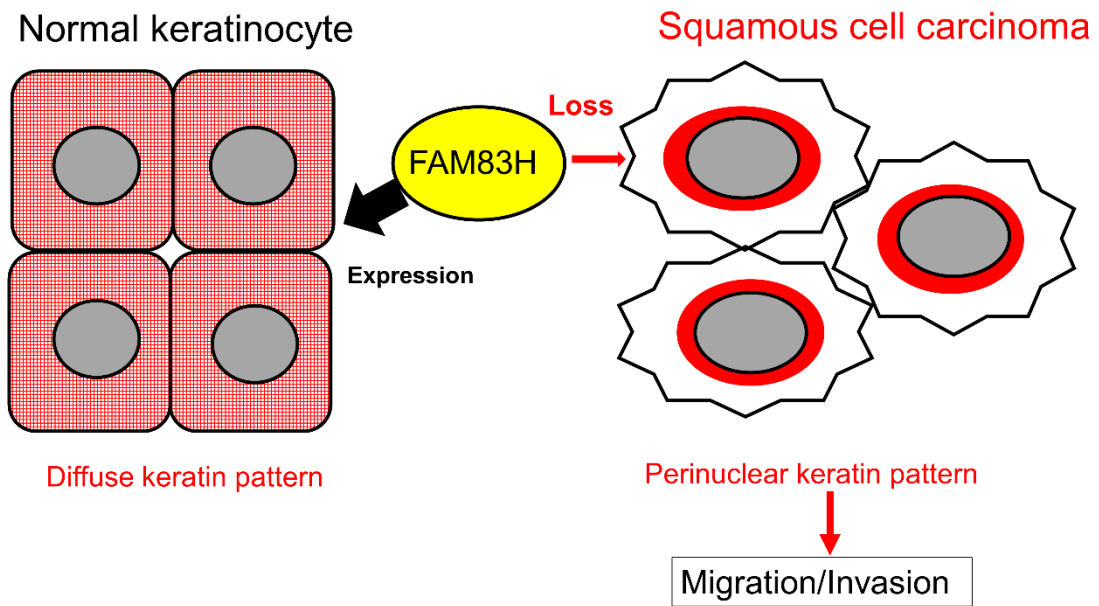


図 48 : FAM83H の発現低下が皮膚 SCC に及ぼす影響の模式図
 皮膚 SCC において FAM 83H の発現が低下すると、正常では細胞質にびまん性に分布しているケラチン線維が核周囲に凝集することにより、皮膚 SCC 細胞の遊走/浸潤が亢進する。

考察

本研究により、FAM83H が皮膚の SCC 細胞においてケラチン分布の変化を介した遊走と浸潤に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。過去に、Kuga らは、FAM83H の短縮型変異体が、エナメル上皮腫細胞においてケラチン線維の核周囲への凝集をもたらすことを報告した (Kuga et al., 2016)。したがって、本研究結果は、Kuga らによる先行研究結果と一致した。TRIM29 に関する我々のグループの研究で、TRIM29 の発現低下によりケラチン分布が変化し、皮膚 SCC の浸潤と転移が促進されることが明らかとなったため (Yanagi et al., 2018)、FAM83H と TRIM29 はケラチン分布と細胞遊走の調節に同様の役割を果たしていると説明できる。上皮細胞の主要な細胞骨格成分であるケラチン線維は、機械的および非機械的ストレスから上皮細胞を保護する上で重要な役割を果たす (Windoffer et al., 2011)。癌細胞の浸潤と転移におけるケラチンの関与については、マウス L 細胞に K8 / 18 をトランスフェクトすると、ケラチンフィラメントが形成され、より高い遊走能と浸潤能を獲得したとする報告や (Chu et al., 1993)、ビメンチンと K8 / K18 の実験的共発現が、ヒト黒色腫 (Chu et al., 1996) および乳癌 (Hendrix et al., 1997) 細胞の浸潤能と遊走能を亢進させたとする報告がある。乳癌、下垂体癌など、いくつかの癌細胞において、ケラチンの分布が変化することも報告されている。たとえば、乳癌では、免疫組織化学染色において乳管癌はケラチン 8 がびまん性に染色されるのに対し、小葉癌ではケラチン 8 が核周囲に染色される。さらに、浸潤性小葉癌は、浸潤性乳管癌よりも多病巣性および両側性に浸潤する傾向が有意に高い (Lehr et al., 2000)。免疫蛍光染色で、核周囲ケラチンパターンを呈する成長ホルモン分泌腺腫は、点状または混合パターンを呈する成長ホルモン分泌腺腫よりも侵襲性が高い傾向がある (Bakhtiar et al., 2010)。

さらに、生理活性脂質であるスフィンゴシルホスホリルコリン (sphingosylphosphorylcholine, 以下 SPC) は、上皮癌細胞においてケラチン線維を核周囲に凝集させることで細胞の弾力性を高め、細胞の形状を変化させることで、周囲組織への遊走・浸潤を亢進させる (Beil et al., 2003; Rolli et al., 2010)。さらに、健常者のヒト皮膚での創傷治癒実験で、創傷辺縁部の表皮細胞では核周囲にケラチンが凝集し、創傷部への遊走が促進されることが報告されている (Paladini et al., 1996)。これらの結果は、ケラチンの核周囲の分布が、正常および癌化細胞における細胞の遊走性を促進することを示唆している。

また、FAM83H のノックダウンにより、ケラチンフィラメント束の太さと数が増加した。これまでの報告では、ケラチン束の抑制やケラチンの欠失は、より遊走を促進することが示されている (Long et al., 2006; Müller et al., 2018)。

FAM83H ノックダウンは、ケラチン分布だけでなく、ケラチン構造も制御することで遊走と関連している可能性がある。さらに、FAM83H ノックダウンにより、創傷端での integrin $\beta 4$ の発現が増加することを見出した。Miyazaki らや Elaimy らの報告にあるように、創傷端近傍のケラチノサイトや上皮細胞で $\beta 4$ integrin の発現が増加すると、遊走が促進される (Miyazaki et al., 2015; Elaimy et al., 2019)。これらの結果は、FAM83H のノックダウンが、ケラチン分布だけでなく、インテグリン $\beta 4$ の発現を調節することによって、細胞の遊走性を高めることを示唆している。このように、FAM83H-TRIM29-ケラチン複合体は、RNA 療法やエピジェネティック療法を通じて、皮膚 SCC の治療ターゲットとなる可能性がある。

本研究では、FAM83H ノックダウンにより、可溶性画分中のケラチン 5/14 の発現量が減少することがわかった。ケラチンの可溶性については、有糸分裂時に可溶性が増加することで、新たに合成された 2 つの娘細胞間におけるケラチンの再分布が促進される可能性が示唆されている (Skalli et al., 1991)。しかし、本研究では、FAM83H ノックダウンが細胞増殖に影響を与えることはなかった (図 22)。ケラチンの溶解度と細胞の遊走・浸潤の関連性は、まだ不明である。

本研究の検討課題として、まず、FAM83H の抗体が FAM83H のみを特異的に認識しているかは検証しておらず、他の FAM83 ファミリーにも反応している可能性が否定しきれないため、本抗体を用いた染色結果は参考所見にとどまる。増殖能は 2D カルチャーでしか評価していないが、3D カルチャーまで検討しなければ増殖能に差がないとは言い切れず、特に本研究で用いた重層して増殖するタイプの細胞では、3D カルチャーでの評価が望ましいと考える。浸潤アッセイで、細胞をインサートに播種した 72 時間後に評価しているが、24 時間以上経過すると上下の層で chemoattractant としての機能を失うので、浸潤した細胞の増殖能を評価している可能性がある。また、同様に浸潤能の検討において FAM83H をノックダウンした系のコントロール細胞と、過剰発現させた系のコントロール細胞の浸潤数が大きく異なっており、実験手技の問題から正確な再現性を得られていない可能性がある。Xenograft モデルの実験で、マウスに細胞を投与した 10 分後程度に、投与した細胞数が揃っているかの確認を怠っているため、正確な比較ができていないと考えられる。同じく Xenograft モデルの転移能の解析で、肺への転移細胞を living image software を用いて測定・数値化した際、Luminescent count が 10^3 個と低値であった。しかし、sacrifice したマウスの肺の病理組織では腫瘍細胞の転移を認めたため (図 47)、細胞の特性による影響と考える。FAM83H の発現が低下することにより細胞の遊走性が亢進しているが、代償性に運動性を担う分子の発現が亢進することや上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transformation, 以下 EMT) への転換が起こるこ

とが予測される。E カドヘリンについては明らかな発現や分布の変化は認めなかったが、今後 N カドヘリンやビメンチン、フィブロネクチンなどの細胞接着分子やチューブリンなどの細胞骨格分子との関連も検討する必要がある。本研究では主に有棘層に発現するケラチン 1, 10 および表皮の基底層に発現するケラチン 5, 14 についての FAM83H・TRIM29 との結合や可溶性の変化しか確認していないが、ケラチンは 20 種類あり、細胞や組織によって発現しているケラチンペアが異なるため、ケラチンサブタイプ毎の FAM83H の発現や機能についても解析すべきである。さらに、ケラチンの可溶性が減少することとケラチンが核周囲に凝集することが連動した事象なのかは解析できておらず、免疫染色や電子顕微鏡で核周囲に凝集しているケラチンが可溶性なのか不可溶性なのかに着目した更なる機序解析が必要である。また、FAM83H の発現が低下することと、ケラチンが核周囲に凝集することのどちらが皮膚 SCC の浸潤性や予後を予測する上で鋭敏なマーカーとなるのかを比較するスタディも検討したい。

我々は FAM83H が細胞遊走・浸潤とケラチン分布の調節に重要な役割を担っていることを明らかにした。本研究および先行研究の結果は、FAM83H/TRIM29 の発現低下が皮膚 SCC 細胞の遊走性を亢進させる要因であり、これらの分子が皮膚 SCC の新規治療ターゲットとなる可能性を示唆している。

結語

- ・皮膚 SCC における FAM83H の発現レベルは、正常皮膚に比べて低下する。
- ・皮膚 SCC における FAM83H の発現レベルは、腫瘍の分化度と相関する。
- ・FAM83H をノックダウンすると皮膚 SCC 細胞の遊走能および浸潤能が亢進する。
- ・FAM83H を過剰発現させると皮膚 SCC 細胞の遊走能および浸潤能は低下する。
- ・In vivo において FAM83H をノックダウンすると肺への転移が亢進する。
- ・FAM83H のノックダウンにより、ケラチン束の太さと数が減少する。
- ・FAM83H をノックダウンするとケラチンの可溶分画が減少するが、不可溶分画には影響を与えない。
- ・FAM83H の発現が低下すると、正常では細胞質にびまん性に分布しているケラチン線維が、核周囲に凝集する。

以上の結果から、FAM83H は、ケラチンの分布や構造を変化させることで、皮膚 SCC 細胞の遊走/浸潤/転移に関与していると考えられる。皮膚 SCC では FAM83H の発現低下が腫瘍の進行に寄与し、反対に FAM83H を過剰発現させると、腫瘍の進行を抑制し得ると推測される。しかし、大腸癌など他の癌では FAM83H の発現が亢進しているため、皮膚 SCC に対する治療として臨床応用する際には、腫瘍局所的に FAM83H の発現を亢進させるような投与方法の工夫が必要である。

また、FAM83H のノックダウンによりケラチン束の太さ・数やケラチンの可溶性が変化するメカニズムについては、本研究では解明できておらず、今後の課題として残っている。ケラチン束の太さ・数の変化については、Xenograft モデルを作製し、in vivo での超微細形態学的解析を検討している。また、舌 SCC における FAM83H の発現様式は皮膚 SCC とは大きく異なっており、上皮組織における FAM83H の発現や癌化との関連についても解明していきたい。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多くのご指導とご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 清水宏名誉教授および氏家英之教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導いただきました北海道大学病院皮膚科 柳輝希講師に心より深謝いたします。そして、本研究にご協力くださいましたすべての患者様に深く御礼申し上げます。また、最後になりましたが、北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室の教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Alam, M., Ratner, D. (2001). Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 344, 975-983.

Bakhtiar, Y., Hirano, H., Arita, K., Yunoue, S., Fujio, S., Tominaga, A., Sakoguchi, T., Sugiyama, K., Kurisu, K., Yasufuku-Takano, J., et al. (2010). Relationship between cytokeratin staining patterns and clinicopathological features in somatotropinomas. *Eur. J. Endocrinol.* 163, 531-539.

Beil, M., Micoulet, A., von Wichert, G., Paschke, S., Walther, P., Omary, M. B., Van Veldhoven, P. P., Gern, U., Wolff-Hieber, E., Eggermann, J., et al. (2003). Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. *Nat. Cell Biol.* 5, 803-811.

Campeau, E., Ruhl, V. E., Rodier, F., Smith, C. L., Rahmberg, B. L., Fuss, J. O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P. K., Kaufman, P. D. (2009). A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS. One* 4, e6529.

Chapalain, M., Baroudjian, B., Dupont, A., Lhote, R., Lambert, J., Bagot, M., Lebbe, C., Basset-Seguin, N. (2020). Stage IV cutaneous squamous cell carcinoma: treatment outcomes in a series of 42 patients. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 34, 1202-1209.

Chu, Y. W., Runyan, R. B., Oshima, R. G., Hendrix, M. J. (1993). Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 4261-4265.

Chu, Y. W., Seftor, E. A., Romer, L. H., Hendrix, M. J. (1996). Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. *Am. J. Pathol.* 148, 63-69.

Elaimy, A. L., Wang, M., Sheel, A., Brown, C. W., Walker, M. R., Amante, J. J.,

Xue, W., Chan, A., Baer, C. E., Goel, H. L., et al. (2019). Real-time imaging of integrin $\beta 4$ dynamics using a reporter cell line generated by Crispr/Cas9 genome editing. *J. Cell Sci.* 132, 231241.

Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Trevor, K. T. (1997). Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am. J. Pathol.* 150, 483-495.

Kim, J. W., Lee, S. K., Lee, Z. H., Park, J. C., Lee, K. E., Lee, M. H., Park, J. T., Seo, B. M., Hu, J. C., Simmer, J. P. (2008). FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 489-494.

Kitajima, Y., Inoue, S., Yaoita, H. (1987). Effects of pemphigus antibody on the regeneration of cell-cell contact in keratinocyte cultures grown in low to normal Ca^{++} concentration. *J. Invest. Dermatol.* 89, 167-71.

Kuga, T., Kume, H., Kawasaki, N., Sato, M., Adachi, J., Shiromizu, T., Hoshino I., Nishimori, T., Matsubara, H., Tomonaga, T. (2013). A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I α and FAM83H in colorectal cancer. *J. Cell Sci.* 126, 4721-4731.

Kuga, T., Sasaki, M., Mikami, T., Miake, Y., Adachi, J., Shimizu, M., Saito Y., Koura, M., Takeda, Y., Matsuda, J., et al. (2016). FAM83H and casein kinase I regulate the organization of the keratin cytoskeleton and formation of desmosomes. *Sci. Rep.* 6, 26557.

Lehr, H. A., Folpe, A., Yaziji, H., Kommoss, F., Gown, AM. (2000). Cytokeratin 8 immunostaining pattern and E-cadherin expression distinguish lobular from ductal breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 114, 190-196.

Long, H. A., Boczonadi, V., McInroy, L., Goldberg, M., Määttä, A. (2006). Periplakin-dependent re-organisation of keratin cytoskeleton and loss of collective migration in keratin-8-downregulated epithelial sheets. *J. Cell Sci.* 119, 5147-5159.

Miyazaki, A., Ohkubo, T., Hatta, M., Ishikawa, H., Yamazaki, J. (2015). Integrin $\alpha 6\beta 4$ and TRPV1 channel coordinately regulate directional keratinocyte migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 161-167.

Moffat, J., Grueneberg, D. A., Yang, X., Kim, S. Y., Kloepfer, A. M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T. M., Luo, B., Grenier, J. K., et al. (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124, 1283-1298.

Müller, S., Djudjaj, S., Lange, J., Iacovescu, M., Goppelt-Struebe, M., Boor, P. (2018). HIF stabilization inhibits renal epithelial cell migration and is associated with cytoskeletal alterations. *Sci. Rep.* 8, 9497.

Omary, M. B., Ku, N. O., Strnad, P., Hanada, S. (2009). Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *J. Clin. Invest.* 119, 1794-1805.

Pacella, G., Capell, B. C. (2021). Epigenetic and metabolic interplay in cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp. Dermatol.* 30, 1115-1125.

Paladini, R. D., Takahashi, K., Bravo, N. S., Coulombe, P. A. (1996). Onset of Re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J. Cell Biol.* 132, 381-397.

Rolli, C. G., Seufferlein, T., Kemkemer, R., Spatz, J. P. (2010). Impact of tumor cell cytoskeleton organization on invasiveness and migration: a microchannel-based approach. *PLoS. One* 5, 8726-8733.

Skalli, O., Goldman, R. D. (1991). Recent insights into the assembly, dynamics, and function of intermediate filament networks. *Cell Motil. Cytoskel.* 19, 67-79.

Snijders, A. M., Lee, S. Y., Hang, B., Hao, W., Bissell, M. J., Mao, J. H. (2017). FAM83 family oncogenes are broadly involved in human cancers: an

integrative multi-omics approach. *Mol. Oncol.* 11, 167-179.

Thomas, B., Stedman, M., Davies, L. (2014). Grade as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma: a population-based analysis of the data. *Laryngoscope* 124, 688-694.

Windoffer, R., Beil, M., Magin, T. M., Leube, R. E. (2011). Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J. Cell Biol.* 194, 669-678.

Yanagi, T., Watanabe, M., Hata, H., Kitamura, S., Imafuku, K., Yanagi, H., Homma, A., Wang, L., Takahashi, H., Shimizu, H., et al. (2018). Loss of TRIM29 alters keratin distribution to promote cell invasion in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 78, 6795-6806.

You, T. K., Kim, K. M., Noh, S. J., Bae, J. S., Jang, K. Y., Chung, M. J., Moon, W. S., Kang, M. J., Lee, D. G., Park, H. S. (2012). Expressions of E-cadherin, Cortactin and MMP-9 in Pseudoepitheliomatous Hyperplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Their Relationships with Clinicopathologic Factors and Prognostic Implication. *Korean J. Pathol.* 46, 331-340.

石原和之, 池田重雄, 森 俊二. (1994). 皮膚悪性腫瘍の診断と治療指針ならびに全国アンケートの集計. *Skin Cancer* 9, 7-12.