

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11885

研究課題名(和文) SPARC(オステオネクチン)と悪性腫瘍の再発との関係

研究課題名(英文) Relationship between SPARC (osteonectin) and recurrence of malignant tumor

研究代表者

鈴木 厚子(Suzuki, Atsuko)

奥羽大学・歯学部・講師

研究者番号：90405986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine)は細胞外マトリックスで、286アミノ酸で構成される。しかしながら、SPARCはロイシンジッパーを有するペプチドとの結合が示唆されている。そこでAP-1のメンバーとの結合について、SPARCを分割したペプチドを合成し、解析を行った。また、SPARC遺伝子は3451 bpであり、コード領域は912 bpで、3'-UTRが2475 bpと巨大である。この3'-UTRの一部もしくは全部を発現ベクター内に挿入し、mRNAの安定化と表現形の差異について解析を行い、3'-UTRの意義について解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPARCは分泌タンパクで、骨基質中に多く存在する。SPARCはアパタイトと高い親和性を有するが、体内に広く分布している。一部の腫瘍ではSPARCは浸潤に重要な因子であり、微小環境を制御する可能性が示されている。さらに、SPARCが細胞内に局在することも示されており、未だにSPARCの機能全容について不明な点が多い。本成果の意義は、以下の3点である。SPARCの核内機能を示したSPARCの非石灰化間葉組織での機能を明示したSPARCの3'-UTRの意義について可能性の一部を排除した。これらは、SPARCが関与する悪性腫瘍において、新規治療方法開発の有益な基礎知見に資すると思われる。

研究成果の概要(英文)：SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) is an extracellular matrix protein, and the mature peptide consists of 286 amino acids. However, it has been suggested that SPARC binds to peptides with a leucine zipper. Therefore, we synthesized a recombinant peptide of SPARC and analyzed its binding to Fos and Jun, which are members of AP-1. The SPARC gene (NM_003118) 3451 bp, with coding region of 912 bp, 5'-UTR of 64 bp, and huge 3'-UTR of 2475 bp. We analyzed the significance of the SPARC 3'-UTR by inserting part or all of the 3'-UTR into an expression vector and analyzing differences in mRNA stabilization and cell phenotype.

研究分野：口腔機能分子生物学

キーワード：がん SPARC AP1

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) SPARC/オステオネクチンは酸性でシステインに富む分泌タンパク質として知られており、骨の石灰化のみならず、広く組織に分布して細胞間相互作用や細胞外マトリックスのリモデリングに関与することがわかっている。一部のがん組織では、SPARC が上皮間葉転換を促進することで、腫瘍の成長・浸潤・転移を促進する。一方、悪性腫瘍の種類・病期によっては、SPARC が腫瘍抑制因子として機能する可能性も示されている。未だに、SPARC の多岐にわたる機能の全容解明がなされていないために、これらの相反する事象を説明することは困難である。

(2) SPARC は分泌タンパク質とされるが、核内や小胞体内でも局在することが確認されている。この機構と、その理由や生理学的意義については不明な点多い。加えて、血中循環 SPARC レベルは、がんのみならず、アルツハイマー、肥満などの関連が指摘されているが、この理由に関して、明確な理由付けがなされていない。

2. 研究の目的

(1) がんの微小環境、細胞外マトリックスに SPARC が及ぼす影響を解明する目的で、多分化能を有する未分化間葉細胞を用いて、細胞外 SPARC の機能の解析を行った。

(2) SPARC が細胞内局在する機構と意義の解明

①細胞内に局在する機構を解明する目的で、SPARC 遺伝子のシグナルペプチド相当部領域の意義を解析した。また、実験手法として、強制発現を行う場合、3'-非翻訳領域 (3'-UTR) 相当部を含まない発現ベクターを作成し、解析を行うのが常である。しかし、SPARC のそれは、コード領域 909 bp に対して、2475 bp と無視できないような、巨大なものである。そこで、この 3'-UTR 相当部の長さを変えることで、核内移行（もしくは細胞内蓄積）が起こるのではないかという仮説を立てて、その解明を試みた。

②核内に局在する SPARC の機能を解明する目的で、全長、もしくは断片化させたリコンビナント SPARC を作成し、転写因子のリコンビナントペプチドとの *in vitro* での結合能を評価した。

3. 研究の方法

(1) マウス多分化能を有する未分化間葉細胞、ST2 細胞に、CRISPR- Cas9 を用いて、Sparc ノックアウト細胞を作成した。この細胞を、骨芽細胞分化条件と脂肪細胞分化条件により培養を行った。骨芽細胞分化促進剤として Simvastatin を添加し、経時的に遺伝子発現量の変化を評価した。

(2) ①細胞内に局在する機構を解明

①-1；プレプロトリプシンのシグナルペプチド (PPT) 相当部領域と SPARC コード配列を結合させた発現ベクター (PPT-SPARC 52-912)、野生型 SPARC のシグナルペプチド相当部領域と SPARC コード配列を結合させた発現ベクター (SPARC 1-912)、シグナルペプチドを欠損させた SPARC コード配列を結合させた発現ベクター (SPARC 52-912) を、Sparc ノックアウト細胞に、一過性に強制発現させ、細胞内局在と AP-1 活性を比較した。

①-2；SPARC の 3'-UTR (2475 bp) をルシフェラーゼ発現ベクターに連結させ、この長さを変えることで、3'-UTR の存在の有無おける SPARC mRNA 安定性の評価解析を試みた。

②核内での SPARC の機能解明

糖鎖の影響を排除する目的で *Brevibacillus* による SPARC (18-286)、部分欠損 SPARC (18-135)、SPARC (136-286)、SPARC (18-286 Δ 20-38)、SPARC (18-286 Δ 72-91)、SPARC (18-286 Δ 131-147) を、c Fos や c Jun と試験管内で結合させ評価した。

4. 研究成果

(1) 野生型 ST2 細胞は、骨芽細胞分化条件で、Simvastatin の添加により、有意な石灰化促進を示した。Sparc ノックアウト細胞では、Simvastatin 添加による石灰化促進作用は完全に消去されていた。この原因を確認したところ、少なくともノックアウト細胞では、コラーゲンの合成が抑制されていることがわかった。加えて、マウスメラノーマ細胞 (B16-BL6 細胞) とヒト卵巣がん細胞 (NRS-1 細胞) において、SPARC をノックダウンさせると、MMP9 と MMP13 の有意な抑制が観察された。脂肪細胞分化条件下での野生型 ST2 細胞の培養では、oli red O 染色で選別可能な脂肪滴の蓄積が確認できた。Sparc ノックアウト細胞では、この脂肪滴蓄積が有意に促進した。加えて、これらの脂肪滴蓄積促進は、Simvastatin の抑制を受けたが、この抑制割合は、野生型とノックアウト細胞の間で差は観察できなかった。この脂肪滴の形成と並行して、

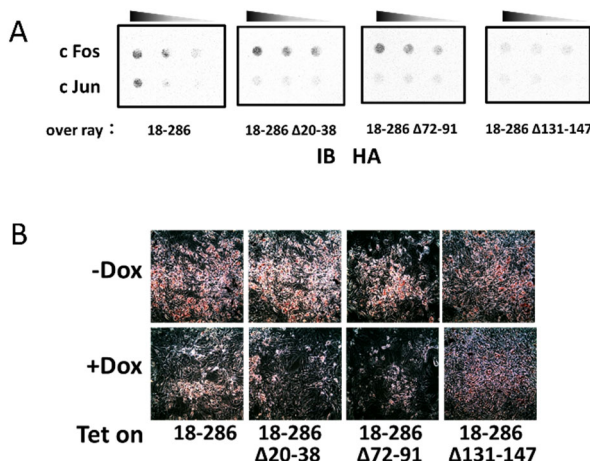
adipsin, adiponectin, Cebpb の遺伝子レベルが Sparc ノックアウトにより増加した。

(2) ①-1 ; ノックアウト細胞では、AP-1 活性が野生型と比較して、有意に増加していた。ノックアウトに細胞に PPT-SPARC 52-912 あるいは SPARC1-912 を導入し、一過性に強制発現させることでレスキューを行うと、AP-1 活性は野生型と同様のレベルまで低下した。シグナルペプチドを欠損させた SPARC52-912 の導入は AP-1 活性に影響を及ぼさなかった。GFP を N 末に結合させた PPT-SPARC52-912-GFP を導入すると、確かに GFP が、核内と細胞質内で、検出された。加えて、PPT-SPARC52-912 の培養上清を、ノックアウト細胞に添加するだけでも、AP-1 活性は、野生型細胞と同様のレベルにまで低下をした。これらのことから、SPARC が AP-1 活性を制御するためには、小胞体移行シグナルペプチドに認識され、一度分泌される必要があり、分泌された細胞外の SPARC は、何らかの機構で細胞内に取り込まれ、AP-1 活性を低下させる機能を演じていることが考えられる。

①-2 ; 2475 bp の 3'-UTR をルシフェラーゼベクターに連結させ、この長さを 0 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 500 bp, 1239 bp, 2475 bp と変化させたが、その安定性には有意な差が観察されなかった。そこで、この領域に結合が予想される mir-29a を加えてみたが、明確な差を見いだすことはできなかった。

②リコンビナントペプチド SPARC (18-286) はリコンビナント c Fos と、in vitro で緩やかな結合をした。しかし、c Jun との結合は観察できなかった。また、SPARC (18-286) の存在は、c FOS, c Jun のオリゴヌクレオチドへの結合を阻害した。c Fos との結合部位を確認する目的で、部分欠損した 18-135, 136-286 を作成し実験に供したところ、N 側の 8-135 でのみ結合が観察された。そこで 18-286 Δ20-38, 18-286 Δ72-91, 18-286 Δ131-147 と c Fos, c Jun との結合試験を行ったところ、c Fos は 18-286 Δ20-38, 18-286 Δ72-91 と結合する可能性が示された (図 1A)。これと脂肪滴の蓄積との関連を調査する目的で、これらの SPARC をドキシサイクリン依存的に発現させたところ、確かに 18-286 Δ20-38, 18-286 Δ72-91 では脂肪滴の蓄積が減少したが、18-286 Δ131-147 では、その減少が確認できなかった (図 1B)。

図1



これらの結果から、一度分泌された SPARC は何らかの機構を介して、細胞内で少なくとも c Fos と弱い結合をすることにより、c Fos と c Jun のダイマー形成を阻害して、AP-1 活性を阻害している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 KOJIMA Tsuyoshi, MAEDA Toyonobu, SUZUKI Atsuko, YAMAMORI Tetsuo, KATO Yasumasa	4. 巻 41
2. 論文標題 Intracellular zinc-dependent TAS2R8 gene expression through CTCF activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 217 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.41.217	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 Sutoo Shusaku, Maeda Toyonobu, Suzuki Atsuko, Kato Yasumasa	4. 巻 37
2. 論文標題 Adaptation to chronic acidic extracellular pH elicits a sustained increase in lung cancer cell invasion and metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Metastasis	6. 最初と最後の頁 133 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10585-019-09990-1	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 Maeda Toyonobu, Suzuki Atsuko, Koga Kaori, Miyamoto Chihiro, Maehata Yojiro, Ozawa Shigeyuki, Hata Ryu-ichiro, Nagashima Yoji, Nabeshima Kazuki, Miyazaki Kaoru, Kato Yasumasa	4. 巻 8
2. 論文標題 TRPM5 mediates acidic extracellular pH signaling and TRPM5 inhibition reduces spontaneous metastasis in mouse B16-BL6 melanoma cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 78312-78326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.20826	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 Kato Yasumasa, Maeda Toyonobu, Suzuki Atsuko, Baba Yuh	4. 巻 54
2. 論文標題 Cancer metabolism: New insights into classic characteristics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 8 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2017.08.003	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15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子良平、森山徹雄、前田豊信、鈴木厚子、内山梨夏、加藤靖正
2. 発表標題 ヒスタチンがマトリックスメタロプロテア - ゼ分泌に及ぼす影響
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86回例会（郡山）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤靖正、鈴木厚子、前田豊信
2. 発表標題 酸性細胞外pHへの馴化はマウス口腔扁平上皮癌細胞のstemnessを誘導する
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会（神戸）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島剛志、金子良平、前田豊信、鈴木厚子、森山徹雄、加藤靖正
2. 発表標題 TAS2R8発現における亜鉛の役割
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会（鹿児島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤靖正、鈴木厚子、前田豊信
2. 発表標題 酸性細胞外pHへの耐性化は癌幹細胞様性質を誘導する(Adaptation to acidic extracellular pH induces cancer stem cell like phenotype)
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤周作、前田豊信、鈴木厚子、加藤靖正
2. 発表標題 酸性細胞外pH馴化と癌細胞の転移能獲得について
3. 学会等名 Journal of Oral Biosciences Supplement
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤靖正、鈴木厚子、前田豊信、小笠原康悦
2. 発表標題 酸性細胞外pH馴化は造腫瘍性を促進する
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川嶋雅之、前田豊信、鈴木厚子、加藤靖正
2. 発表標題 Pak 6/7はマウスB16メラノ - マにおいて酸性細胞外pHによって誘導されるMMP-9レベルを調節する
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川嶋雅之、前田豊信、鈴木厚子、加藤靖正
2. 発表標題 マウスB16メラノ - マにおける酸性細胞外pHによるMMP-9の発現誘導へのPak6/7 の関与
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato Y, Sudo S, Suzuki A, Maeda T
2. 発表標題 Adaptation to extracellular acidification induces metastatic phenotype which sustains within several passage generation at physiological pH in Lewis lung carcinoma
3. 学会等名 17th Biennial Congress of the Metastasis Research Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤靖正, 鈴木厚子, 前田豊信
2. 発表標題 酸性pHeによる転移性細胞の選択と維持
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato Y, Suzuki A, Maeda T
2. 発表標題 Metastatic phenotype and acidic microenvironment
3. 学会等名 第77回日本癌学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角田隆太, 前田豊信, 鈴木厚子, 櫻井裕子, 遊佐淳子, 加藤靖正
2. 発表標題 Concentrated Growth Factorsによる骨代謝能への影響
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正
2. 発表標題 マウスB16メラノーマ細胞では, 酸性細胞外pHによって誘導されるMMP-9 mRNA の発現は, PLD1を介す
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正
2. 発表標題 酸性細胞外pHシグナルを標的とした癌転移抑制の試み
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正
2. 発表標題 SPARCはAP-1活性を抑制して, 骨形成を誘導する。
3. 学会等名 第26回日本がん転移学会
4. 発表年 2017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	前田 豊信 (Maeda Toyonobu) (10382756)	奥羽大学・歯学部・准教授 (31602)	

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	高田 訓 (Takada Satoshi) (40254875)	奥羽大学・歯学部・教授 (31602)	
研究分担者	加藤 靖正 (Kato Yasumasa) (50214408)	奥羽大学・歯学部・教授 (31602)	

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