

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19592185  
 研究課題名（和文）酸性細胞外 pH による SPARC/オステオネクチンのプロセッシングとその生理的意義  
 研究課題名（英文）Physiological role of acidic extracellular pH-mediated SPARC processing  
 研究代表者  
 加藤 靖正（Kato Yasumasa）  
 神奈川歯科大学・歯学部・准教授  
 研究者番号：50214408

## 研究成果の概要：

SPARC は osteonectin としても知られる細胞外基質タンパク質である。本研究では癌細胞の悪性形質発現への役割について検討した。その結果、癌細胞が作り出す微小細胞外 pH の酸性化は、高転移性 B16-BL6 からの SPARC の processing を促進し、癌細胞の悪性形質発現に寄与していることが示唆された。また、酸性細胞外 pH 刺激により活性化する細胞内情報伝達には、細胞外からの Ca<sup>2+</sup>の流入による phospholipase D の活性化の他、acidic sphingomyelinase の活性化も重要であることを見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,450,000

## 研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：SPARC, 腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

SPARC は、分子量 43-kDa の糖タンパク質で、当初骨特異的蛋白質として見出されたが、現在では種々の組織における主要な細胞外基質タンパク質として知られている。これまで多くの癌細胞で SPARC の発現と悪性度や患者の予後と相関するという臨床例が示されているにもかかわらず、細胞株を用いた実験報告では、SPARC の活性は、増殖抑制、転移抑制、アポトーシス促進など相反する報告が多い。私たちは、このような SPARC が腫瘍の進展に積極的にかかわっているとの仮説のも

とに研究を進め、stage II の舌癌患者の生存率や手術後の再発率などが、SPARC 陽性症例において高率であることを見出し、さらに皮膚化学発癌モデルにおいては、扁平上皮癌の発生に SPARC が必須であることを、SPARC ノックアウトマウスを用いて証明した。また、私達は、SPARC KO マウスと同系の B16BL6 メラノーマを用いて、癌細胞の転移への SPARC の役割について検討した結果、SPARC KO マウスにおいて転移結節数の低下が観察され、同様な結果は、B16BL6 細胞の SPARC 発現をノックダウンさせても見ら

れ、さらに、癌細胞側と宿主側の SPARC 発現の低下による転移結節数の低下には相加効果が見られた。

## 2. 研究の目的

本研究では、臨床例と相反する事象が報告されていることの原因として、SPARC 自身の processing による影響を考え、本研究ではこの仮説を検証した。

## 3. 研究の方法

対象とした細胞株は、高転移性 B16-BL6 メラノーマのほか、前立腺がん細胞株 PC3、腎癌細胞株 ACHN, YCR を用いた。

SPARC の processing を検証するため、Flag タグを結合したフュージョンタンパク質を発現するベクターを構築し、細胞にトランスフェクトし安定発現細胞株を作成した。

SPARC のプロセッシングの検出はウエスタンブロット法により、MMP-9 の活性検出はザイモグラフィにより行った。

遺伝子発現のスクリーニングには、マイクロアレイ法、および RT-PCR 法により行った。

## 4. 研究成果

- 酸性環境で誘導され、かつ SPARC をプロセッシングできる酵素の発現について、マイクロアレイ法および RT-PCR 法にて検討したところ、MMP-9 のほか MMP-11 の発現も誘導されることが見出された。
- SPARC ノックアウトマウスでは、B16-BL6 メラノーマ細胞の実験転移結節数が減少することから、SPARC ノックアウトマウスの肺における遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法で解析した結果、いくつかの遺伝子発現の増減が確認された。これについては、マウスの系統に由来する事象か否かについて現在検討を進めている。
- SPARC のプロセッシングは、細胞内で起こるのか細胞外で生ずるのかを検証するために、SPARC 固有の signal peptide をトリプシンのものに置換させ発現させる系を構築した。内在性の SPARC の断片化は、培養液中のみならず、細胞の lysate からも検出されたのに対して、SPARC の signal peptide をトリプシンのものに置換して発現させた SPARC は、培養液中にのみ見出され、細胞の lysate からは検出されなかった。さらに酸性 pH で培養することにより、断片化は一層亢進した。
- SPARC の断片化は、マウス B16 メラノーマだけではなく、ヒト前立腺癌細胞株 PC3 でも確認された。
- 酸性細胞外 pH の細胞内シグナル伝達機

構には、細胞外からの Ca<sup>2+</sup>の流入によるホスホリパーゼDの活性化の他、酸性スフィンゴミエリナーゼの活性化も重要であることを見出した。

- 以上のことから、SPARC は、細胞内や細胞外プロセッシングを受けることが見出され、細胞外でのプロセッシングには細胞外 pH の低下が微小環境として重要であることを示している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- Maehata, Y., Takamizawa, S., Ozawa, S., Izukuri, K., Kato, Y., Sato, S., Lee, M.C., Kimura, A., Hata, R. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *Matrix Biol.* 26(5): 371-81, 2007. (査読有り)
- Kato, Y., Ozawa, S., Tsukuda, M., Kubota, E., Miyazaki, K., St-Pierre, Y., Hata, R. Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *FEBS J.* 274(12): 3171-83, 2007. (査読有り)
- Taguchi, T., Tsukuda, M., Imagawa-Ishiguro, Y., Kato, Y., Sano, D. Involvement of EGFR in the response of squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines to gefitinib. *Oncol Rep.* 19(1): 65-71, 2008. (査読有り)
- Kimura, M., Kato, Y., Sano, D., Fujita, K., Sakakibara, A., Kondo, N., Mikami, Y., Tsukuda, M. Soluble form of ephrinB2 inhibits xenograft growth of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Oncol.* 34(2): 321-7, 2009. (査読有り)
- Ito, S., Ozawa, S., Shiiki, N., Tsukinoki, K., Kubota, E., Kato, Y., Taguchi, T., Imagawa-Ishiguro, Y., Tsukuda, M., Hata, R. Chemokine BRAK stimulates apoptosis of oral squamous cell carcinoma caused by gefitinib. *Bull. Kanagawa Dent. Coll.* 36(2): 87-89, 2008. (査読無し, 招待原稿)

6. Komori, R., **Ozawa, S.**, **Kato, Y.**, Shinji, H., Kimoto, S., **Hata, R.** Determination of transcriptional start site and promoter sequence of BRAK/CXCL14 gene. *Bull. Kanagawa Dent. Coll.* 36(2): 90-92, 2008. (査読無し, 招待原稿)

[学会発表] (計 16 件)

1. **加藤靖正**, 西村行生, 佃 守, 宮崎 香, **畑隆一郎**. 酸性細胞外 pH によるマトリックス・メタロプロテアーゼ 9 発現誘導における Rho の役割. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.28-30.
2. 木村真知子, **加藤靖正**, 藤田恭子, 佐野大祐, 佃 守. 頭頸部扁平上皮癌における *in vivo* での, ephB4 のリガンド ephrinB2 の抗腫瘍効果について. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008 年 10 月
3. 伊藤 慎, **小澤重幸**, **加藤靖正**, 槻木恵一, 久保田英朗, **畑隆一郎**. 口腔癌細胞におけるケモカイン BRAK (CXCL14) による Gefitinib (Iressa) のアポトーシス増強機構. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 東京, 2008 年 9 月
4. **加藤靖正**, **小澤重幸**, **畑隆一郎**. ゼラチナーゼ B (MMP-9) 発現を誘導する酸性細胞外 pH シグナリングにおける NF-kappaB の活性化機構. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 東京, 2008 年 9 月
5. **Kato, Y.**, **Ozawa, S.**, Kubota, E., Tsukuda, M., Miyazaki, K., St-Pierre, Y., and **Hata, R.** Distinct roles of NF-kB subunits in matrix metalloproteinase-9 expression induced by acidic extracellular pH. MRS-AACR Joint Meeting, Vancouver, BC, Canada, August 2008.
6. Komori, R., **Ozawa, S.**, **Kato, Y.**, Shinji, H., Kimoto, S., and **Hata, R.** Determination of transcription start-site of CXCL14/BRAK in squamous cell carcinoma. 86th General Session & Exhibition of the International Association of the Dental Research, Toronto, ON, Canada. July 2008.
7. **Ozawa, S.**, **Kato, Y.**, Ito, S., Komori, R., Maehata, Y., Kubota, E., **Hata, R.** p38 signaling up-regulates BRAK expression in squamous cell carcinoma. 86th General Session & Exhibition of the International Association of the Dental Research, Toronto, ON, Canada. , July 2008.
8. Maehata, Y., Takamizawa, S., **Ozawa, S.**, Izukuri, K., **Kato, Y.**, Sato, S., Yoshino, F., Lee, M.C., and **Hata, R.** Type III collagen regulates growth of human osteoblastic cells. 86th General Session & Exhibition of the International Association of the Dental Research, Toronto, ON, Canada. July 2008.
9. **加藤靖正**, **小澤重幸**, 久保田英朗, 佃 守, 宮崎 香, **畑隆一郎**: Matrix metalloproteinase-9 発現を誘導する酸性細胞外 pH シグナリングにおける NF-kappaB サブユニットの役割. 第 40 回日本結合組織学会学術大会・第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 東京, 2008 年 5 月
10. **加藤靖正**, 宮崎香, **畑隆一郎**: 酸性細胞外 pH によるマトリックス・メタロプロテアーゼ-9 発現誘導における NFκB サブユニットの役割. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会. 2007 年 12 月
11. Maehata, Y., Takamizawa, S., **Ozawa, S.**, Izukuri, K., **Kato, Y.**, Sato, S., Lee, MC., and **Hata, R.**: Type III collagen is essential for growth acceleration of osteoblasts. 55th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR), Yokohama, Japan, November 2007.
12. 前畑洋次郎, 高見沢紳治, **小澤重幸**, **加藤靖正**, 吉野文彦, 高橋俊介, 塗々木和男, **畑隆一郎**, 李 昌一: ヒト骨芽細胞において活性型ビタミン C は III 型コラーゲン合成を介して細胞増殖を促進する. 第 49 回歯科基礎医学会, 札幌, 2007 年 8 月
13. 前畑洋次郎, 吉野文彦, 小林 杏, **小澤重幸**, **加藤靖正**, **畑隆一郎**, 李 昌一. 頭頸部扁平上皮癌細胞における ROS の CXCL14(BRAK)遺伝子発現に及ぼす影響の解析. 第 29 回 日本フリーラジカル学会/日本過酸化脂質・フリーラジカル学会 第 31 回大会合同学会 (名古屋), 2007 年 6 月
14. 木村真知子, **加藤靖正**, 山下ゆき子, 佐野大祐, 藤田恭子, 佃 守: 頭頸部扁平上皮癌における hypoxia での Eph/ephrin 及び VEGF-A の発現変化について. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 大阪, 2007 年 5 月
15. 前畑洋次郎, 高見沢紳治, **加藤靖正**, 李昌一, **畑隆一郎**: ヒト骨芽細胞において活性持続型ビタミン C は III 型コラーゲン合成を介して細胞増殖を促進する. 日本結合組織学会学術大会・マトリックス研究会大

会合同学術集会，東京，2007年5月

16. **加藤靖正**. メラノーマの悪性形質と酸性細胞外微小環境-マトリックスメタロプロテアーゼ-9発現を誘導する酸性細胞外pHの細胞内情報伝達機構-**大高賞受賞講演**，第39回日本結合組織学会学術大会・第54回マトリックス研究会大会合同学術集会（東京），2007年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 靖正 (Kato Yasumasa)

神奈川歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：50214408

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

畑 隆一郎 (Hata Ryuichiro)

神奈川歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10014276

小澤 重幸 (Ozawa Shigeyuki)

神奈川歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40434394