

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592403

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌細胞の悪性形質における SPARC の役割

研究課題名（英文）Role of SPARC on malignant phenotype of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

加藤 靖正 (KATO YASUMASA)

研究者番号：50214408

研究成果の概要（和文）：MF1系 SPARC ノックアウトマウスからバッククロスにより C3H 系の SPARC ノックアウトマウスを作製した。C57Bl/6 系 SPARC ノックアウトマウスを含め 3 系統の肺で共通して発現が変化している遺伝子を探索した結果、Camp、Ngp、Ig- γ 、Saa3、Gpr84、Ptk6 の遺伝子が SPARC ノックアウトにより発現が上昇していることを見出した。これらの遺伝子が肺転移の転移総形成に何らかの影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Here we established new SPARC knock out mouse on C3H strain from MF strain by back crossing method. Using microarray technique, expression of 6 kinds of gene such as Camp, Ngp, Ig- γ , Saa3, Gpr84, Ptk6 was induced in the lung of SPARC knock our mice. These were suggested to be candidate genes associating lung metastasis of cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,800,000	540,000	23,400,000
22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	25,740,000

研究分野：腫瘍生物学

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、癌、肺転移

1. 研究開始当初の背景

SPARC は、オステオネクチンとしても知られる糖タンパク質である。当初、骨基質特異的として考えられてきたが、種々の組織においても発現が報告されている。これまでに私たちは、SPARC が腎癌悪性化に関与すること、VEGF の刺激により血管内皮細胞からの SPARC 合成が促進されること、腎癌細胞の遊走性を促進することなどを見出し報告してきた。さらに転移性メラノーマでの発現が高いこと、また、stage II の舌癌患者における SPARC 発

現症例での 5 年生存率が短いことなども見出している。本研究では、舌癌を中心とした口腔扁平上皮癌細胞を標的細胞として、宿主の SPARC が浸潤や転移などの悪性形質にどのように関与するかについて検討を行うために、マウス口腔扁平上皮癌細胞株の移植モデル構築のため、C3H 系の SPARC ノックアウトマウスを作成し、SPARC により遺伝子発現が変化し、かつ肺転移に影響を及ぼす因子を同定することを目的とした。

2. 研究の目的

SPARC ノックアウトマウスは、MF1 系と C57BL/6 系があるが、マウスの形質について解析した結果は、ほとんど C57BL/6 系のものである。しかしながら、マウスの系統差を考慮した研究は少ない。そこで、本研究では MF1 マウスからバッククロスにより C3H 系マウスを樹立することを目的とした。また、肺特異的転移を想定し、SPARC ノックアウトによる遺伝子発現の変化を調べ、候補遺伝子として、3 種類のマウスの系統に共通して増減する遺伝子の探索を行うべく、マイクロアレイにより SPARC ノックアウトにおける肺での遺伝子発現プロファイリングを行った。

3. 研究の方法

(1) C3H 系 SPARC ノックアウトマウスの作成。MF1 系 SPARC ノックアウトマウスは、College 博士 (英国ケンブリッジ大) から供与頂いた。MF1 系 SPARC ノックアウトマウス♂をワイルドタイプ C3H ♀と交配させ、F1 ヘテロを得た。ヘテロ♂とワイルドタイプ C3H ♀と交配を繰り返すことで、F9 ヘテロを得た。F9 より SPARC ホモノックアウトマウス♂とワイルドタイプ♂を作成し、実験に供した。マウスの Genotyping は、SPARC のエクソン 6 内に作成したプライマーとネオマイシン耐性遺伝子内に作成したプライマーを構築し、尻尾から抽出した DNA をテンプレートとして PCR にて確認した。また、C57BL/6 系 SPARC ノックアウトマウスについては、Sage 博士 (米国 Hope Heat 研) より供与頂いた。

(2) 肺における遺伝子発現プロファイリング
7 週齢♂マウスの肺を、ネンプタル麻酔下で摘出し、直ちに液体窒素にて凍結後、トリゾルにて総 RNA を抽出し、マイクロアレイ (アジレント社マウス 44k×4) により解析した。

4. 研究成果

(1) C3H 系 SPARC ノックアウトマウス (F9) を樹立した。

(2) マイクロアレイの結果から、SPARC ノックアウトすることにより 6 種類 (Camp、Ngp、Ig- γ 、Saa3、Gpr84、Ptk6) の遺伝子発現が上昇することを見出した。

(3) 3 系統共に SPARC をノックアウトすることにより遺伝子発現が低下するものはなかった。

(4) これらの他、系統別に SPARC をノックアウトすることで発現が 2 倍未満の変動は不変として 2 倍以上変化した遺伝子数は下記の通りであった。

- MF1 系のみ高く、C57BL/6 系と C3H 系では不変であった遺伝子数：674。
- C3H 系のみ高く、C57BL/6 系と MF1 系では不変であった遺伝子数：360。
- C57BL/6 系のみ高く、MF1 系と C3H 系では不変であった遺伝子数：205。
- C3H 系で高く、MF1 系で低く、C57BL/6 系では不変であった遺伝子数：143。
- C57BL/6 系と MF1 系で高く、C3H 系では不変であった遺伝子数：78。
- MF1 と C3H のみ高く、C57BL/6 系では不変であった遺伝子数：62。
- C57BL/6 系で高く、MF1 系で低く、C3H 系では不変であった遺伝子数：43。

その他の組み合わせでの発現の一致は、10 遺伝子以下であり、系統間で一致して SPARC ノックアウトすることにより発現が低下する遺伝子は少なかった。

(5) これまでに、皮膚などで遺伝子発現変化すると報告のあった、TGF- β や I 型コラーゲン遺伝子 (Col1A1、Col1A2) には、変化はなかった。

以上のことから、SPARC ノックアウトすることにより発現が増加した SPARC ノックアウトすることにより 6 種類 (Camp、Ngp、Ig- γ 、Saa3、Gpr84、Ptk6) の遺伝子が、肺転移に関与することが示唆された。

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 13 件)

1. 山本龍生, 加藤靖正, 菅谷彰, 塚本秀人, 辻本勝美, 中村澄夫, 林田丞太, 町田宏夫, 平田幸夫. 学校法人神奈川歯科大学の学生・職員における喫煙経験と性・年齢, 学生の所属, 職員の職種, 健康状態, および喫煙に対する知識・意識との関係. 神奈川歯学, 査読有, 46: 57-64, 2011.
2. Baba Y, Kato Y. Hemangioma with phleboliths in the floor of the mouth presenting as a submental swelling: a case report. J. Med. Cases, 査読有, 2(1): 28-30, 2011.
DOI:10.4021/jmc108w
3. Baba Y, Kato Y, Ogawa K. Unusual computed tomography findings of radio-necrosis after chemoradiation of stage IV hypopharyngeal cancer: a case report. J. Med. Case Reports, 査読有, 5(1): 25, 2011.
DOI:10.1186/1752-1947-5-25
4. Baba Y, Kato Y, Ogawa K. Hyperplasia of

- lymphoid structures in the hypopharynx: a case report. *J. Med. Case Reports*、査読有、4: 388, 2010. DOI:10.1186/1752-1947-4-388
5. Nakazaki K, Kato Y, Taguchi T, Inayama Y, Ishiguro Y, Tsukuda M. Heterozygous mutation (G/G→G/A) at 2607 is closely associated with increase in EGFR copy number and mRNA half life but impaired EGFR protein synthesis in squamous cell carcinoma of the head and neck - implication to the gefitinib efficacy-. *Oncol. Lett.*、査読有、1: 1017-1020, 2010. DOI: 10.3892/ol.2010.188
 6. Maehata Y, Ozawa S, Kobayashi K, Kato Y, Yoshino F, Miyamoto C, Izukuri K, Kubota, E, Hata R, Lee MC. Reactive oxygen species (ROS) reduce the expression of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Free Radical Res.*、査読有、44(8): 913-924, 2010. DOI:10.3109/10715762.2010.490836
 7. Ozawa S, Ito S, Kato Y, Kubota E, Hata R. Human p38δ MAP kinase mediates UV irradiation induced up-regulation of the gene expression of chemokine BRAK/CXCL14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読有、396(4) 1060-1064, 2010. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.05.072
 8. Komori R, Ozawa S, Kato Y, Shinji H, Kimoto S, Hata R. Functional characterization of proximal promoter of gene for human chemokine BRAK / CXCL14. *Biomed. Res.*、査読有、31(2): 123-131, 2010. DOI:10.2220/biomedres.31.123
 9. Sato K, Ozawa S, Izukuri K, Kato Y, Hata R. Expression of tumor-suppressing chemokine BRAK/CXCL14 reduces cell migration rate of HSC-3 tongue carcinoma cells and stimulates attachment to collagen and formation of elongated focal adhesions in vitro. *Cell Biol. Int.*、査読有、34: 513-522, 2010. DOI:10.1042/CBI20090108
 10. Baba Y, Kato Y, Ogawa K. Inostamycin prevents malignant phenotype of cancer: inhibition of phosphatidylinositol synthesis provides a therapeutic advantage for head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Biol Int.*、査読有、34(2):171-175, 2010. DOI:10.1042/CBI20090310
 11. Ozawa S, Kato Y, Kubota E, Hata R. BRAK/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse. *Biomed. Res.*、査読有、30(5): 315-318, 2009. DOI:10.2220/biomedres.30.315
 12. Ozawa S, Kato Y, Ito S, Komori R, Shiiki N, Tsukinoki K, Ozono S, Maehata Y, Taguchi T, Imagawa-Ishiguro Y, Tsukuda M, Kubota E, Hata R. Restoration of BRAK / CXCL14 gene expression by gefitinib is associated with antitumor efficacy of the drug in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*、査読有、100(11): 2202-2209, 2009. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01281.x
 13. Baba Y, Kato Y, Saito H, Ogawa, K. Management of deep neck infection by a transnasal approach: a case report. *J. Med. Case Reports*、査読有、3: 7317, 2009. DOI: 10.4076/1752-1947-3-7317
- [学会発表] (計 14 件)
【国際発表】
1. Hata R, Izukuri K, Kato Y. NK Cell-dependent suppression of tumor growth and metastasis in CXCK14 / BRAK transgenic mice. Roche / Nature Medicine symposium on cancer immunology and immunotherapy (Nutley, NJ, USA), September 11-13, 2011.
 2. Komori R, Ozawa S, Kato Y, Maehata Y, Shinji H, Hata R, Kimoto S. Analysis of promoter region of human BRAK/CXCL14 in SCC cells. 89th General Session & Exhibition of the IADR/40th Annual Meeting of the AADR/35th Annual Meeting of the CADR (San Diego, CA, USA), March 14-10, 2011.
 3. Hata R, Izukuri K, Kato Y. CXCL14 transgenic mice are resistant to carcinoma growth and metastasis. 89th General Session & Exhibition of the IADR/40th Annual Meeting of the AADR/35th Annual Meeting of the CADR (San Diego, CA, USA), March 14-10, 2011.
- 【国内発表】**
1. 加藤靖正, 畑隆一郎, 佃 守, 宮崎 香. TRPM5 は、酸性細胞外 pH シグナルに関与し、メラノーマの肺転移に関与する. 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋). 2011. 10.
 2. 加藤靖正, 前畑洋次郎, 前田豊信, 畑隆一郎. オステオネクチンノックアウトマウスの肺における遺伝子発現プロファイリング. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (岐阜) 2011. 10.

3. 畑隆一郎, 佐藤一楠畑かおり, 小澤重幸, 加藤靖正, 古江一楠田美保. ケモカイン CXCL14/BRAK は幹細胞分化促進因子か? 第 43 回日本結合組織学会学術大会/第 58 回マトリックス研究会大会 合同学術集会 (別府). 2011. 6.
 4. 山本龍生, 加藤靖正, 菅谷 彰, 菅原光則, 田口利秋, 塚本秀人, 辻本勝美, 長尾 健, 中村澄夫, 林 弘之, 林田丞太, 町田宏夫, 米田陸夫, 平田幸夫. 習慣的喫煙経験と学生の学科, 職員の職種, 健康状態, 喫煙の知識・意識との関係. 神奈川歯科大学学会第 45 回総会. (横須賀) 2010. 12.
 5. 宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 生駒丈晴, 小森令賀, 居作和人, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李昌一. ROCK 阻害剤 Fasudil による抗腫瘍性ケモカイン BRAK/CXCL14 の細胞外分泌促進と腫瘍進展抑制の検討. 第 123 回日本薬理学会関東部会. (栃木県下野市) 2010. 10.
 6. 前畑洋次郎, 小澤重幸, 小林杏, 吉野文彦, 宮本千央, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李昌一. 口腔扁平上皮癌細胞において Gefitinib(Iressa) は酸化ストレスに誘導される抗腫瘍性ケモカイン BRAK/CXCL14 の発現低下を抑制する. 第 123 回日本薬理学会関東部会. (栃木県下野市) 2010. 10. 23.
 7. 畑隆一郎, 居作和人, 加藤靖正. 癌進展抑制因子 BRAK/CXCL14 遺伝子の発現制御機構-MAP キナーゼシグナルのクロストークによる制御-. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会. (東京). 2010. 9.
 8. 居作和人, 加藤靖正, 畑隆一郎. BRAK/CXCL14 遺伝子トランスジェニックマウスの腫瘍抑制・転移抑制機構の解明. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会. (東京). 2010. 9.
 9. 宮本千央, 前畑洋次郎, 高橋俊介, 高橋聡子, 杉山秀太, 徳富文彬, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李昌一. 阻害剤はケモカイン BRAK/CXCL14 の細胞外分泌を促進し抗腫瘍効果を発揮する. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会. (東京). 2010. 9.
 10. 宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李昌一. ROCK 阻害剤 Fasudil はケモカイン BRAK/CXCL14 の細胞外分泌を促進し抗腫瘍効果を発揮する. 第 42 回日本結合組織学会学術大会/第 57 回マトリックス研究会大会 合同学術集会 (秋田). 2010. 8.
 11. 前田豊信, 加藤靖正, 堀内 登. ST2 細胞において Simvastatin は骨分化を促進し、脂肪分化を抑制する. 第 42 回日本結合組織学会学術大会/第 57 回マトリックス研究会大会 合同学術集会 (秋田). 2010. 8.
 12. 加藤靖正, 田口享秀, 石黒由香利, 佃 守. 頭頸扁平上皮癌において, Gefitinib は BRAK/CXCL14 の発現を介して抗腫瘍効果を示す. 第 22 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (大阪). 2009. 11.
 13. 畑隆一郎, 加藤靖正. 頭頸部癌進展抑制因子 BRAK/CXCL14 遺伝子の発現制御配列の解析. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (新潟) 2009. 9.
- [図書] (計 1 件)
1. 畑隆一郎, 高橋信博, 宇田川信之, 東 俊文, 上條竜太郎, 石崎明, 加藤靖正 (編著), 早川太郎, 須田立雄, 木崎治俊 (監修) 口腔生化学 題 5 版, 医歯薬出版, 2011 年 7 月
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
加藤 靖正 (KATO YASUMASA)
奥羽大学・歯学部・教授
研究者番号: 50214408
 - (2) 連携研究者
小澤 重幸 (OZAWA SHIGEYUKI)
神奈川歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 40434394

