

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：31602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659842

研究課題名(和文) 転写抑制因子としてのSPARCの癌転移への役割

研究課題名(英文) Role of SPARC on tumor metastasis as the transcription inhibitory factor

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌の増殖や浸潤、転移におけるSPARC(オステオネクチン)の役割についての報告には、様々な相違点が見られる。私達は3系統のSPARCノックアウトマウスに共通して発現上昇する遺伝子(Camp、Ngp、Saa3)のプロモーター活性に共通した転写制御因子に注目して検討したところ、SPARCがAP-1活性を抑制していることを見出した。シグナル配列の欠失させたSPARC発現ベクターの導入効果は、プレプロトリプシンのシグナル配列に置換させた分泌型SPARC発現ベクターの導入効果と酷似していた。従ってSPARCは細胞内においてAP-1活性の抑制因子として機能していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Roles of SPARC/osteonectin on tumor growth, invasion, and metastasis, are still controversial. Because AP-1 plays common role of following gene expression, Camp, Ngp, and Saa3, whose expression was up-regulated in SPARC knockout mice, we focused on AP-1 as SPARC target to be down-regulated. AP-1 activity was upregulated by SPARC gene knockout and inhibited by introduction of SPARC expression vector having signal peptide of preprotypsin as the secreted form. Similar results were found when we used signal peptide-deleted expression vector to induce SPARC expression as the intracellular protein. These results suggested that SPARC plays a role of AP-1 inhibition as the intracellular function.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：SPARC AP-1

#### 1. 研究開始当初の背景

SPARC は、マトリセルラールプロテインに属す酸性糖蛋白質である。癌の増殖や浸潤、転移に対する SPARC (オステオネクチン / BM-40) の役割については、ヒト臨床検体による報告と SPARC ノックアウトマウスを用いた研究結果に様々な相違点が見られる。これまでに私達は、SPARC ノックアウトマウスにおいて、B16-BL6 メラノーマ細胞を尾静脈に注射し肺転移結節数を比較してみると、SPARC ノックアウトマウスにおいて、転移が抑制されることを見出している。遺伝子のノックアウトマウスの表現型には、系統差が大きいとの報告もあることから、私達は、既存の 2 系統 (C57BL/6 と MF1) の SPARC ノックアウトマウスに加えて、新たに C3H 系 SPARC ノックアウトマウスを作出し、肺に発現している遺伝子のうち、SPARC により発現が制御される遺伝子が肺転移に関与しているとの仮説をたて、マイクロアレイにより検討した。その結果、3 系統の SPARC ノックアウトマウスの肺に共通して Camp (cathericidin antimicrobial peptide の 1 つ)、Ngp (neutrophilic granule protein)、Saa3 (serum amyloid A3)、Ig- $\gamma$  遺伝子発現が、上昇していることを見出した。本研究では、分泌性蛋白質をコードする Camp、Ngp、Saa3 に焦点を絞り、SPARC による遺伝子発現制御機構を解析するとともに、癌細胞の転移との関連性について検討を行い、これまでの臨床結果とマウスでの実験結果の相反性に対する合理的な解釈を目指した。

#### 2. 研究の目的

SPARC の新たな生理活性として、転写制御因子活性を持つことについて検討した。

#### 3. 研究の方法

培養細胞の SPARC 発現を低下させるために、siRNA や CRISPR/Cas9 システムを用いて行った。強制発現系としてワイルドタイプの SPARC 発現ベクター (SPARC WT-signal vector)、SPARC のシグナルペプチドを欠失させ、細胞内発現型ベクター (SPARC  $\Delta$ signal vector)、SPARC のシグナル配列の代わりにプレプロトリプシノーゲンのシグナル配列に置換した分泌型ベクター (SPARC PPT-signal vector) を構築した。B16BL6 メラノーマと ST2 細胞に、これらのベクターを導入し検討した。また、B16BL6 メラノーマと ST2 細胞に発現する内在性の SPARC の影響を排除するため、CRISPR/Cas9 で SPARC 発現をノックアウトしたのち、これらのベクターにて SPARC 発現をレスキューした。各遺伝子発現は、real-time PCR 法にて行った。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では、まず、マイクロアレイの結果を real-time PCR により確認し、さらに、

B16BL6 細胞に SPARC の siRNA を作用させて、遺伝子発現の影響を調べた。その結果、SPARC ノックアウトマウス肺でワイルドタイプよりも最も発現上昇していたのは、Ngp であり、この結果は、B16BL6 細胞に SPARC の siRNA を作用させた場合も同様であった。最近、NGP が癌転移を抑制するとの報告がなされた。従って、SPARC ノックアウトマウスでの肺転移抑制には、NGP 発現の上昇が考えられ、SPARC は NGP の発現調節因子として機能していることが示唆された。

(2) 細胞外 SPARC 発現ベクター導入細胞では、Ngp 発現が抑制されたものの Saa3 発現には影響しなかった。これに対して、細胞内 SPARC 発現細胞では、Ngp 発現には影響せず、Saa3 の発現上昇が見られた。Camp については両ベクターの導入で発現が変化しなかった。一方、SPARC による発現低下として既に報告のある E-cadherin に関しては、細胞外 SPARC 発現で抑制され、細胞内 SPARC 発現でさらに抑制された。このことは、SPARC が細胞内で蛋白質の発現制御に関与することを示しているとともに、細胞外 SPARC を取り込み細胞内で作用していることも示唆している。

(3) 内在性 SPARC の影響を排除するために、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集により B16BL6 メラノーマ細胞から SPARC 遺伝子をノックアウトした細胞を作製し、その効果の普遍性を検討した。その結果、ノックアウトマウスの肺同様に CAMP、NGP、SAA3 遺伝子の発現上昇が確認され、さらに MMP3 や MMP9 発現も上昇することも見出された。これらの遺伝子発現には、AP-1 の関与が重要なので、構成因子である c-Fos や c-Jun の発現を調べてみると、SPARC ノックアウト細胞では、ホルボルエステル刺激で c-Fos や c-Jun 発現が顕著に上昇することを見出した。さらに骨髄ストローマ由来 ST2 細胞を用いて、SPARC をノックアウトするとホルボルエステル刺激で AP-1 活性が上昇することが見出された。B16-BL6 細胞にシグナル配列の異なる SPARC 発現ベクターを導入して検討したところ、細胞内 SPARC 発現ベクター (SPARC  $\Delta$ signal vector) と分泌型 SPARC 発現ベクター (SPARC PPT-signal vector) の導入効果、つまり、SPARC 発現抑制により上昇した遺伝子発現レベルの抑制効果は酷似していた。このことは、SPARC の細胞内作用を強く示唆するものである。従って、SPARC は、AP-1 の活性を制御する細胞内因子であ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 15 件)

1. Maeda T, Suzuki A, Yuzawa S, Baba Y, Kimura Y, Kato Y. Mineral trioxide aggregate induces osteoblastogenesis via Atf6. *Bone Rep 2*: 36–43, 2015. <doi:10.1016/j.bonr.2015.03.003>
2. Hata R, Izukuri K, Kato Y, Sasaki S, Mukaida N, Maehata Y, Miyamoto C, Akasaka T, Yang X, Nagashima Y, Takeda K, Kiyono T, Tniguchi M. Suppressed rate of carcinogenesis and decreases in tumour volume and lung metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. *Sci Rep 5*: 9083, 2015. <doi:10.1038/srep09083>
3. Baba Y, Fujii M, Maeda T, Suzuki A, Yuzawa S, Kato Y. Deguelin Induced Apoptosis by Targeting both EGFR-Akt and IGF1R-Akt Pathways in Head and Neck Squamous Cell Cancer Cell Lines. *BioMed Res Int 2015*: 657179, 2015. <doi: 10.1155/2015/657179>
4. 小関健由, 加藤一夫, 佐藤勉, 千葉逸朗, 森田学, 伊藤博夫, 天野敦雄, 齋藤俊行, 廣瀬公治, 山本龍生, 川崎弘二. 口腔衛生関連用語に関する提言(第6回) 歯周疾患関連用語について. 口腔衛生学会雑誌 65(1): 48-49, 2015. <http://www.kokuhoken.or.jp/jsdh/journal.html>
5. 前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤 仁, 馬場優, 加藤靖正. CRISPR/Cas9 を用いた MC3T3-E1 細胞における Gpr81 遺伝子のノックアウト. 奥羽大学歯学 41(3-4), 123-128, 2014. <https://ohu-lib.repo.nii.ac.jp/?page\_id=26>
6. 沼田匠, 廣瀬公治. ニコチンによるマクロファージからの炎症性サイトカイン産生促進機構の検索. 奥羽大学歯学誌 41(3-4): 107-114, 2014. <https://ohu-lib.repo.nii.ac.jp/?page\_id=26>
7. 渡辺敦, 福井和徳, 廣瀬公治. レチノイン酸はヒト歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチド産生を誘導する. 奥羽大学歯学誌 41(3-4): 99-105, 2014. <https://ohu-lib.repo.nii.ac.jp/?page\_id=26>
8. 森田学, 天野敦雄, 伊藤博夫, 齋藤俊行, 佐藤勉, 廣瀬公治, 山本龍生, 川崎弘二. 歯周疾患の疫学指標の問題点と課題. 口腔衛生学会雑誌 64(3), 299-304, 2014. <http://www.kokuhoken.or.jp/jsdh/journal.html>
9. Suzuki A, Maeda T, Baba Y, Shimamura K, Kato Y. Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. *Cancer Cell Int 14*(1):129, 2014. <doi:10.1186/s12935-014-0129-1>
10. Kobayashi R, Terakawa J, Kato Y, Azimi S, Inoue N, Ohmori Y, Hondo E. The contribution of leukemia inhibitory factor (LIF) for embryo implantation differs among strains of mice. *Immunobiology 219*(7): 512–521, 2014. <doi:10.1016/j.imbio.2014.03.011>
11. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int 13*:89, 2013. <doi: 10.1186/1475-2867-13-89>
12. Yoshihama K, Kato Y, Baba Y. Vocal cord actinomycosis mimicking a laryngeal tumor. *Case Rep Otolaryngol 2013*; 361986, 2013. <doi: 10.1155/2013/361986>
13. Baba Y, Yoshihama K, Nishiyama T, Kato Y. Levocetirizine hydrochloride tablet improves the nasal conditions of patients with cedar pollen allergy and maintains their QOL. *Clin Exp Med Sci 1*(7): 329-341, 2013. <doi:10.12988/cems>
14. 門倉弘志, 山崎崇秀, 和田康弘, 菊井徹哉, 西村翼, 廣瀬公治, 天野義和, 横瀬敏志. 塩化リチウムによる -catenin のリン酸化阻害がラット象牙芽細胞分化と ectodin 発現に及ぼす影響について. 日本歯科保存学雑誌 5(3), 231-238, 2013. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009674433>
15. Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Ikoma T, Kubota E, Izukuri K, Kato Y, Hata R, Lee MC. Fasudil suppresses fibrosarcoma growth by stimulating secretion of the chemokine CXCL14/BRAK. *J Pharmacol Sci 120*(3): 241-249, 2012. <doi: 10.1155/2012/986725>

[学会発表](計 31 件)

(特別講演)

1. 加藤靖正. 酸性細胞外 pH は, がん細胞の悪性形質を促進する微小環境因子で

ある.第 5 回アクリジンオレンジ治療研究会(京都).2014.

(シンポジスト)

1. **Kato Y.** Epithelial-mesenchymal transition and extracellular acidic pH. The 3rd Symposium of the International Society for Proton Dynamics in Cancer Kyoto, 2012.

(国際学会)

1. Hata R, Izukuri K, **Kato Y**, Maehata Y, Miyamoto C, Akasaka T, Kiyono T. Expression of chemokine CXCL14/BRAK whether in melanoma cells or in non-tumor cells in their environment suppresses metastasis to the lung. 15th International Biennial Congress the Metastasis Research Society, Heidelberg, Germany. 2014.
2. **Kato Y**, Maeda T, Suzuki A, Yuzawa S, Baba Y, Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Kubota E, Hata R. Neutrophilic granule proteins (*Ngp*) is a SPARC target gene to be reduced. 15th International Biennial Congress the Metastasis Research Society Heidelberg, Germany. 2014.
3. Hata R, Izukuri K, **Kato Y**. Tumor-suppressing chemokine CXCL14/BRAK is a cell-surface associated matrix component. 9th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium Hong Kong. 2013.
4. **Kato Y**, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. Adaptation to acidic extracellular pH induces epithelial-mesenchymal transition as stable phenotype in Lewis lung carcinoma model. The 4th Annual Meeting of the International Society for Proton Dynamics in Cancer. Munich, Germany. 2013.
5. Kato Y, Suzuki A, Maeda T, Shimamura K. Acidic extracellular pH induces epithelial-mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. 14th International Biennial Conference on Metastasis Research Society Brisbane, Australia. 2012.

(国内学会)

1. 前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤仁, **加藤靖正**. MC3T3-E1細胞において, MTAはATF6を介して石灰化を促進させる. 第56回歯科基礎医学会学術大会(福岡). 2014.

2. **廣瀬公治**, 大橋明石, 竹下玲, 安井利一. *Porphyromonas gingivalis*による肺上皮細胞からのLL-37の発現について. 第63回日本口腔衛生学会・総会(熊本). 2014.
3. 前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤仁, 阿部匡聡, **加藤靖正**. MTAは骨芽細胞様細胞でATF6を介して石灰化を促進させる. 第87回日本生化学会大会(京都). 2014.
4. 前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤仁, 馬場優, 木村裕一, **加藤靖正**. Mineral Trioxide Aggregateセメントの骨形成作用. 第57回奥羽大学歯学会(郡山). 2014.
5. 畑隆一郎, 居作和人, **加藤靖正**, 前畑洋次郎, 宮本千央, 赤坂徹, 佐々木宗一郎, 向田直史. 微小環境が発癌, 癌の進展を制御する: 癌に強いマウスの作製. 第46回日本結合組織学会学術大会/第61回マトリックス研究会大会 合同学術集会(名古屋). 2014.
6. 畑隆一郎, 佐々木宗太郎, **加藤靖正**, 向田直史. CXCL14/BRAKは多機能癌抑制分子である. 第72回日本癌学会学術総会(横浜). 2013.
7. **加藤靖正**. 腫瘍の悪性形質に対する酸性細胞外pHの急性および慢性影響. 第72回日本癌学会学術総会(横浜). 2013.
8. 畑隆一郎, 居作和人, **加藤靖正**. ケモカインCXCL14/BRAKは多段階癌抑制分子である. 第55回歯科基礎医学会学術大会(岡山). 2013.
9. 畑隆一郎, 居作和人, **加藤靖正**, 佐々木宗一郎, 向田直史. 癌に強くなる遺伝子の発見. 第86回日本生化学会大会(横浜). 2013.
10. **加藤靖正**, 鈴木厚子, 前田豊信. 酸性細胞外pHへの順化は, 酸性細胞外pH刺激の感受性を増加し, MMP9の産生能と運動能を促進する. 第86回日本生化学会大会(横浜). 2013.
11. 伊藤準, 前田豊信, **加藤靖正**, 山森徹雄. 唾液中Histatin5濃度と苦味受容体遺伝子発現の関連. 第47回日本味と匂学会(仙台). 2013.
12. 畑隆一郎, 居作和人, **加藤靖正**. PubMedを過信してはいけない. 第45回日本結合組織学会学術大会/第60回マトリックス研究会合同学術大会(和歌山). 2013.
13. 畑隆一郎, 佐々木宗太郎, **加藤靖正**, 向田直史. CXCL14/BRAKは多機能癌抑制分子である. 第72回日本癌学会学術総会

(横浜). 2013.

14. **加藤靖正**. 腫瘍の悪性形質に対する酸性細胞外 pH の急性および慢性影響. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜). 2013.
15. 畑隆一郎, 居作和人, **加藤靖正**. ケモカイン CXCL14/ BRAK は多段階癌抑制分子である. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会 (岡山). 2013.
16. 畑隆一郎, 居作和人, **加藤靖正**, 佐々木宗一郎, 向田直史. 癌に強くなる遺伝子の発見. 第 86 回日本生化学会大会 (横浜). 2013.
17. **加藤靖正**, 鈴木厚子, 前田豊信. 酸性細胞外 pH への順化は, 酸性細胞外 pH 刺激の感受性を増加し, MMP9 の産生能と運動能を促進する. 第 86 回日本生化学会大会 (横浜). 2013.
18. 伊藤準, 前田豊信, **加藤靖正**, 山森徹雄. 唾液中 Histatin5 濃度と苦味受容体遺伝子発現の関連. 第 47 回日本味と匂学会 (仙台). 2013.
19. 畑隆一郎, 居作和人, **加藤靖正**. PubMed を過信してはいけない. 第 45 回日本結合組織学会学術大会/第 60 回マトリックス研究会合同学術大会 (和歌山). 2013.
20. **加藤靖正**. 酸性細胞外 pH はルイス肺癌細胞の上皮間葉移行を誘導する. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌). 2012.
21. 畑隆一郎, **加藤靖正**, 竹田和由, 清野透, 向田直史, 谷口克. CXCL14/BRAK の発現は癌の増殖と転移を抑制し担癌マウスの寿命を延長する. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌). 2012.
22. 畑隆一郎, 居作和人, **加藤靖正**. ケモカイン CXCL14/ BRAK は癌細胞の肺転移を抑制する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (郡山). 2012.
23. **加藤靖正**, 鈴木厚子, 前田豊信, 島村和宏. 酸性細胞外 pH は上皮間葉移行を誘導する微小環境因子である. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (郡山). 2012.
24. **加藤靖正**, 前田豊信. 高転移性 Lewis 肺癌細胞の pH 依存性. 第 44 回日本結合組織学会学術大会/第 59 回マトリックス研究会合同学術集会 (東京). 2012.

[図書] (計 3 件)

1. **The Research and Biology of Cancer II**, Resistance to EGFR inhibitor in head and neck cancer (Baba Y, Fujii M, Tokumaru Y, **Kato Y**), iConcept Press, Hong Kong, China, 2014. (<https://www.iconceptpress.com/download/paper/12053117155666.pdf>)

2. **Hypothesis in clinical medicine** (Eds: Shoja MM, Agutter PS, Tubbs RS, Ghanei M, Ghabili K, Harris A, Loukas M) (ISBN: 978-1-62257-276-2), A proposal for a new strategy in the treatment of head and neck cancer: combination chemotherapy targeting the PI<sub>3</sub>kinase/Akt and EGFR signaling pathways. (Chapter 12). (Baba Y, Fujii M, Tokumaru Y, **Kato Y**), 188-198, Nova Science Publishers, Inc, New York, USA, 2013. <[https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=37736](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=37736)>
3. **Head and neck cancer** (Ed. Mark Agulnik) (ISBN: 978-953-51-0236-6), Cell signalings and the communications in head and neck cancer (Chapter 4). (Baba Y, Fujii M, Tokumaru Y, **Kato Y**.) InTech Press. 2012. <doi: 10.5772/ 30815>

[その他]

1. **加藤靖正**. 供与を受けた 2 系統の SPARC ノックアウトマウスと, 新たに作出した SPARC ノックアウトマウスを理研に寄託した.
  - RBRC06313: B6.129-*Sparc*<sup><tm1Hwe></sup>
  - RBRC06314: C3.129(MF1)-*Sparc*<sup><tm1Cam></sup>
  - RBRC06315: MF1.129-*Sparc*<sup><tm1Cam></sup>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
加藤 靖正 (Yasumasa Kato)  
奥羽大学・歯学部・教授  
研究者番号: 50214408
- (2) 連携研究者  
廣瀬 公治 (Kimihiro Hirose)  
奥羽大学・歯学部・教授  
研究者番号: 10218836