

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09287

研究課題名(和文) 転移の鍵をにぎるSPP1遺伝子発現制御機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation and application of the regulatory mechanism of SPP1 gene in human cancer cells

研究代表者

小阪 美津子 (KOSAKA, MITSUKO)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：50270476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：SPP1 (Secreted Phosphoprotein) は、多種類の癌の悪性進展の過程で上昇することが知られる分泌因子として知られているが、そのしくみや意義に関しては不明な点が多かった。本研究では、癌細胞が産生するSPP1の量を調節する機構の一端を明らかにした。さらに初期胚多能性維持に必須であるOCT4という転写調節因子が癌細胞が産生するSPP1レベルを上昇させる因子の一つであることが判明した。OCT4-SPP1軸は早期肺腺癌検体においても確認でき、予後不良と相関が高いことが分かった。さらにこの分子軸は、癌細胞集団の移動に重要な意味を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPP1は、多種類の癌の悪性進展の過程で上昇することが知られる分泌因子として知られている。本研究では、SPP1遺伝子の発現量を調節する機構に着目した。その結果、癌が悪性進展する際にSPP1が上昇するしくみとその役割についての新規情報を得ることができた。さらに早期肺腺癌検体での調査から、新たなバイオマーカー分子軸を同定した。本研究結果は、良性腫瘍と悪性腫瘍の性質の違いや悪性進展へ向かうしくみを理解する上で解明に貢献すると同時に、早期癌の予後予測や超早期転移診断に応用できる可能性が高い。正確な予後予測が可能となれば、一人ひとりのがん患者のQOLの向上だけでなく、医療経済上の社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：We found that OCT4A and SPP1C are co-expressed in highly aggressive human breast, endometrial, and lung adenocarcinoma cell lines, but not in mesothelial tumour cell lines. Ablation of OCT4-positive cells in lung adenocarcinoma cells significantly decreased cell migration and SPP1C mRNA levels. The OCT4A/SPP1C axis was found in primary, early-stage, lung adenocarcinoma tumours.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌 悪性進展 予後予測 転移 早期診断法 発現調節機構

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SPP1 (Secreted Phosphoprotein 1, 別名オステオポンチン, OPN) は、肺がんを含む多くの固形がんの発生、進行、浸潤、転移の多段階に関与が知られる最も信頼度の高い予後不良因子である。しかしながら、SPP1 は多種類の細胞によって産生され、炎症、組織再生など生理的・病理的現象に関わる多機能糖タンパク質であることから、がん転移の予測、超早期診断や治療標的薬の開発への応用は実現していない。細胞外マトリックスタンパク質 SPP1 は、インテグリンや CD44 を介したシグナルにより、様々な病態の微小環境を制御することが報告されているが、がん細胞自身における SPP1 産生機構やその特性についての理解は進んでいない。

当初申請者らは、ヒト SPP1 遺伝子上流の塩基配列を単離しレポーター遺伝子の構築を準備しており、それらを用いてがん細胞における SPP1 発現調節機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

「がん細胞自身が産生する SPP1 の発現制御機構に着目し、予後予測、転移の超早期診断に活用できる基盤情報を得ること」を目的とした。SPP1 遺伝子発現制御領域から、がん細胞での SPP1 発現に必要な制御領域を特定し、その配列に作用して SPP1 発現を調節する分子の探索を行い、臨床的有用性を検証する。さらに、ヒト SPP1 遺伝子 5' 上流領域を用いて、SPP1 遺伝子発現細胞を可視化し挙動追跡することで、その特性を明らかにする。

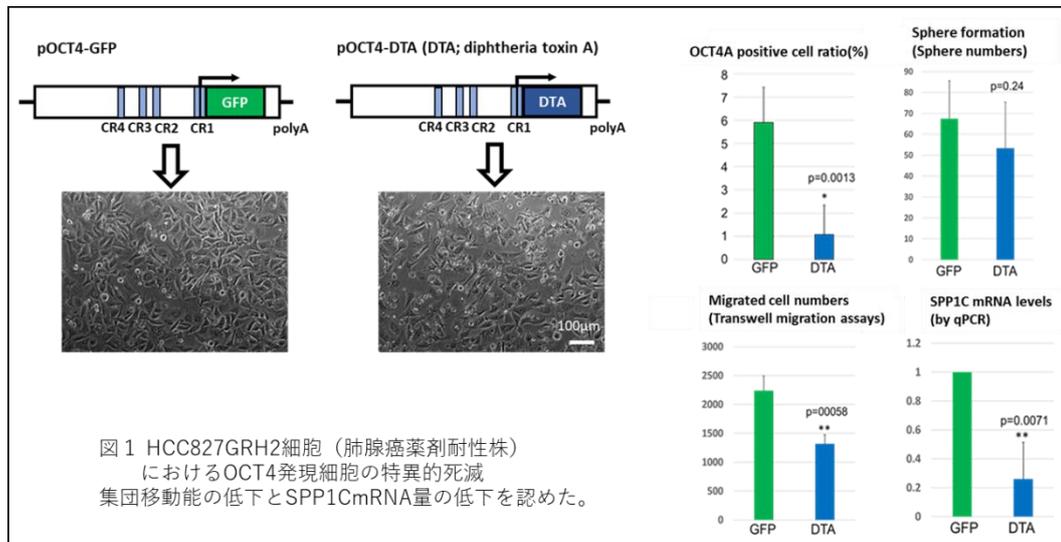
3. 研究の方法

- ① Real-time RT-PCR 法、RT-PCR 法による発現解析：SPP1 各バリエーション特異的 PCR プライマーを設計して real-time PCR 法にて各々の発現レベルを調査した。対象は各種がん細胞株および臨床検体を用いた。
- ② SPP1 遺伝子発現調節に関わる制御領域の決定：SPP1 遺伝子上流配列に蛍光タンパク質 EGFP の遺伝子をつないだレポーター遺伝子を構築し、各種癌細胞株への導入により、その特異性を評価した。In situ hybridization 法にて内在性発現での一致を確認した。
- ③ 癌細胞の特性調査には、wound healing assay, spheroid assay, soft agar colony formation, invasion assay を用いた。
- ④ 臨床検体解析は岡山大学倫理審査委員会での承認を得て(研 1612-023)、岡山大学病院バイオバンクに保管された早期肺腺癌検体を対象に用いた (Okadai Biobank Ref. No. OC17003)。

4. 研究成果

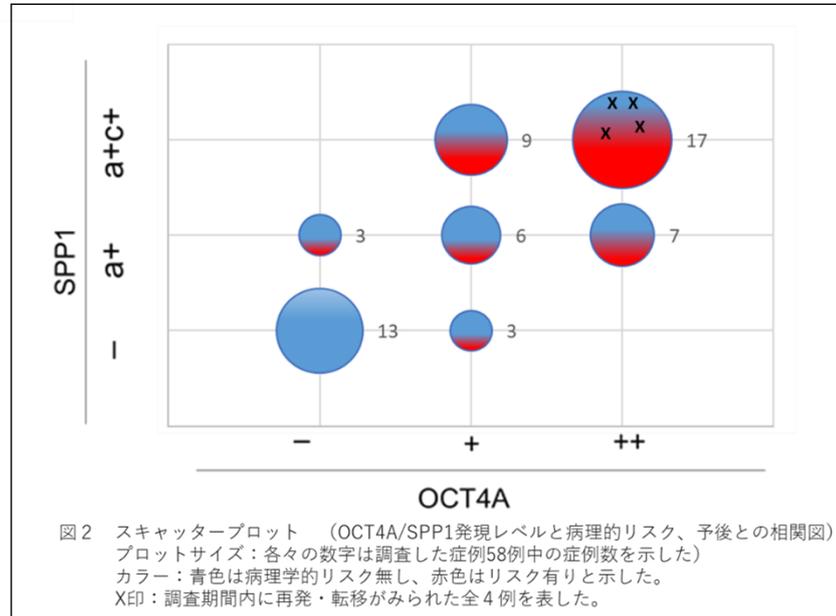
- ① SPP1 の転写産物は現在までに 5 種類知られており、その各々の特異的 PCR プライマーを設計し発現量を比較した。悪性度の低いものから高いものを含む肺腺癌、乳がん、子宮体癌由来の細胞株 12 種類について発現量を比較した結果、各バリエーションともに、悪性度の高い癌細胞株に高発現が認められた。
- ② ゲノム DNA より PCR によって SPP1 遺伝子上流の DNA 領域から長さの異なる制御領域下に蛍光タンパク (EGFP, RFP) をコードした塩基配列を挿入することによりレポーター遺伝子を作成した。それらを各細胞株に導入し蛍光を指標に特異的制御領域の絞り込みを行った。短い領域では発現の特異性がでないことを確認し、より長い領域の単離を行い in situ hybridization 法を用いて内在性発現との一致を現在検証中である。

- ③ 各種癌細胞株を用いた種々のアッセイから、SPP1 発現は癌細胞の集団移動能と相関が高いことを確認した。高悪性度薬剤耐性肺癌細胞株 HCC827GRH2 を用いて、OCT4A (Octamer binding transcription factor A) 発現重集団細胞を死滅させると、SPP1C の発現量が低下することを見出し、OCT4A/SPP1C 軸が癌細胞の悪性進展に関与することが示唆された (図 1)。



- ④ ステージ I 期の早期肺腺癌検体を用いて OCT4 と SPP1 の各バリエーションを含む発現を調査した結果、OCT4A と SPP1C には発現相関がみられ、双方とも高発現の検体では、病理学的リスクとなる微小浸潤所見例が多く含まれていた。さらに、解析した 58 例のうち、調査期間内に再発・転移が見られた 4 例すべてにおいて、OCT4A/SPP1C 軸高発現群に属することが判明した。逆に

OCT4A/SPP1C 共陰性群では病理学的リスクも低く再発・転移例は見られなかった。これらから、この分子軸は、早期肺腺癌の予後予測マーカーとして期待できることが明らかとなった (図



2)。成果の一部は、癌転移学会 (2021)、米国癌学会 (2022)、学術論文 (BMC Cancer 2020) にて発表した。

今後の展望: 本研究により、これまで知られていなかった癌細胞における SPP1 発現調節機構の解明にむけた基盤情報を集積した。今後、特異的レポーターを用いた発現細胞の挙動解析や様々な癌種の臨床検体を用いた横断的解析が進めることで、多くの癌の悪性進展の共通するしくみの理解を深め、早期診断・予後予測・新たな治療戦略の創出につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koshimune Seijiro, Kosaka Mitsuko, Mizuno Nobuhiko, Yamamoto Hiromasa, Miyamoto Tomoyuki, Ebisui Kohta, Toyooka Shinichi, Ohtsuka Aiji	4. 巻 20
2. 論文標題 Prognostic value of OCT4A and SPP1C transcript variant co-expression in early-stage lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 521 (p1-13)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-06969-0	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小阪美津子, 水野伸彦, 入江恭平, 大前凌, 大塚愛二
2. 発表標題 ヒト腫瘍におけるPOU5F1とPOU5F1-PG1の役割の違い
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小阪美津子, 水野伸彦, 藤谷陽子, 大塚愛二
2. 発表標題 マウスとヒトにおけるPOU5F1遺伝子産物
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 入江恭平, 水野伸彦, 越宗靖二郎, 宮本朋幸, 大塚愛二, 山本寛斉, 豊岡伸一, 増山寿, 小阪美津子
2. 発表標題 子宮内膜癌および肺腺癌細胞におけるOCT4A/SPP1C共発現とその臨床的意義
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kyohei Irie, Nobuhiko Mizuno, Tomoyuki Miyamoto, Aiji Ohtsuka, Hiromasa Yamamoto, Shinichi Toyooka, Hisashi Masuyama, Mitsuko Kosaka.
2. 発表標題 Biological and clinical value of OCT4A/SPP1C axis in endometrial and lung adenocarcinoma
3. 学会等名 AACR ANNUAL MEETING 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	水野 伸彦 (Mizuno Nobuhiko)		
研究協力者	豊岡 伸一 (Toyooka Shinichi)		

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
---------	---------