

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791747

研究課題名（和文）前立腺癌骨転移とオステオネクチンの関連についての研究

研究課題名（英文）The effect of osteonectin on prostate cancer and bone metastasis

研究代表者

三輪 聡太郎 (MIWA SOTARO)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80507070

研究成果の概要（和文）：SPARC（Secreted Protein and Rich in Cysteine, オステオネクチン）は細胞外マトリックスタンパク質である。この前立腺癌での作用を明らかにした。SPARC の発現が前立腺癌由来間質細胞で低下していた。SPARC が AKT のリン酸化の阻害をすることによって前立腺癌細胞の増殖、及び遊走能を阻害した。これらの SPARC の作用は、SPARC がインテグリン $\beta 1$ に直接結合した後に作用することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：SPARC (Secreted Protein and Rich in Cysteine, osteonectin) is extracellular matrix protein. We identified effects of SPARC on prostate cancer. Expression of SPARC decreased with stromal cells derived from prostate cancer. SPARC inhibited the proliferation of prostate cancer cells and migrating ability by inhibiting the phosphorylation of AKT. It came to light that the effects of these SPARC acted after SPARC bound to integrin beta 1 directly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、SPARC、インテグリン $\beta 1$ 、AKT

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の増殖、浸潤、転移には癌細胞だけでなく、周囲の微小環境、すなわち間質細胞からの影響を強く受けている。これが前立腺癌が選択的に骨に転移しやすくしている一因と考えられている。我々は、前立腺癌細胞と前立腺由来間質細胞を共培養することで、前立腺癌細胞への影響を明らかにしてきた。今回、間質細胞から分泌されている SPARC

(Secreted Protein and Rich in Cysteine, オステオネクチン) に注目し、前立腺癌細胞での機能を明らかにすることにした。

2. 研究の目的

前立腺癌は早期に骨転移を起こすことが知られておりその基礎的な研究が進められているが、骨に“organ-specific”な転移を起こすメカニズムについてはまだ十分に解明され

ていない。癌転移においてその転移臓器特有の環境因子が癌細胞転移の遊走、増殖、浸潤に何らかの影響を及ぼしていることが推測される。前立腺癌細胞と骨芽細胞をco-cultureすると両細胞がともに増殖することからお互いの細胞を刺激し増殖させる活性物質がでていることが推測される。その中で近年、SPARC (オステオネクチン) が骨転移における重要因子として注目されている。前立腺癌での「SPARCの発現の程度を明らかにし、前立腺癌組織内での機能を明らかにする。

3. 研究の方法

前立腺癌組織内での SPARC の発現レベルを調べるために、tissue microarray を用いて SPARC の免疫染色を行い、その発現の程度を明らかにする。

SPARC の発現の程度を正常前立腺由来間質細胞と前立腺癌由来間質細胞とで比較検討する。

SPARC の前立腺癌細胞での機能を明らかにするために、SPARC を添加後の AKT の発現とそのリン酸化の違いを観察する。

前立腺癌細胞に及ぼす SPARC の働きを明らかにするため、SPARC による増殖の変化、遊走能の変化を観察する。

さらに SPARC の細胞内でのシグナルがどのように伝わるのかを明らかにする。

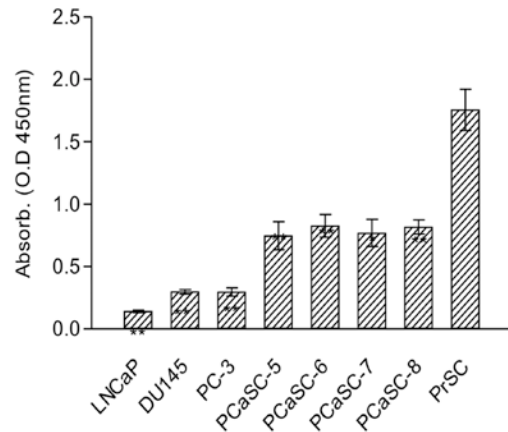
4. 研究成果

前立腺癌組織での SPARC の発現を tissue microarray を用いて免疫組織染色にて調査した (Table 1) .

病理組織所見	SPARC expression		
	(-)	(+)	(++)
Normal	1	2	19
PIN	2	3	5
Gleason score			
5, 6	7	2	1
7	28	2	0
8, 9, 10	23	1	0
Total number	61	10	25

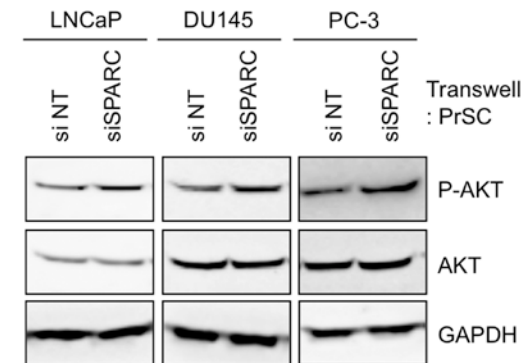
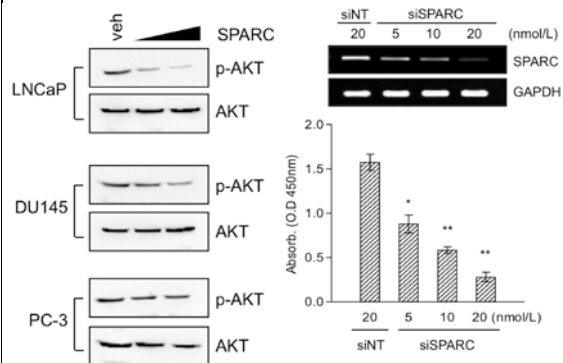
正常前立腺組織は SPARC を発現していたのに対して、前立腺癌組織はその減弱が認められた。

次に、前立腺間質細胞と前立腺癌由来間質性



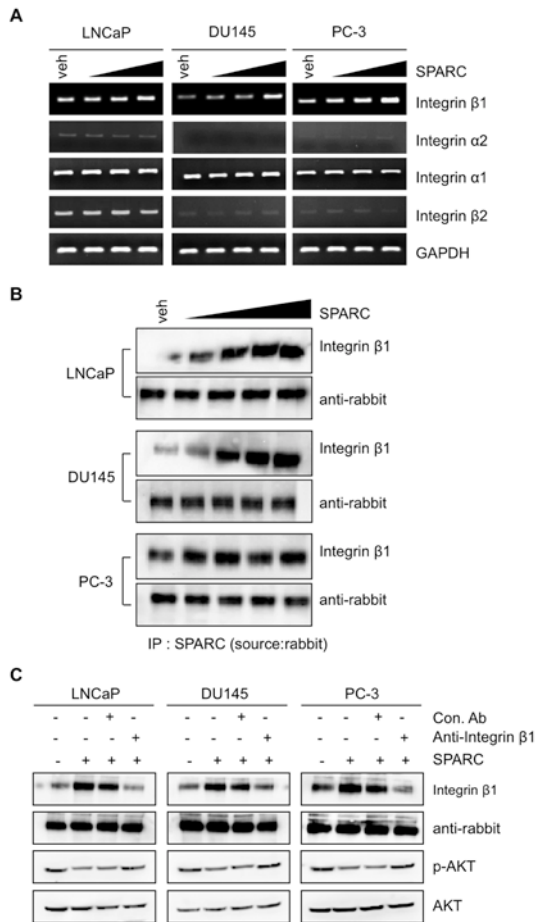
棒での SPARC の発現を ELISA にて調べると、癌由来間質細胞で発現が減弱していた (Fig. 1)。

外因性 SPARC が前立腺癌細胞で及ぼす影響を



明らかにするために、癌の増殖に強く関わる AKT の発現、AKT のリン酸化を調べると、SPARC は AKT のリン酸化を抑制した (Fig. 2)。逆に間質細胞の SPARC の発現をノックダウンし、前立腺癌細胞と共培養すると、AKT のリン酸化が回復した。以上より、SPARC は AKT のリン酸化を制御していることが明らかとなった。

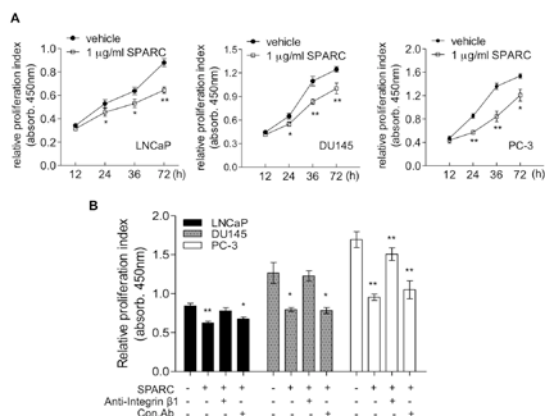
SPARC はインテグリンと相互作用しているとの報告があるために、様々なインテグリンの発現を調査した。SPARC を細胞に添加するとインテグリン $\beta 1$ の発現が亢進した。このた



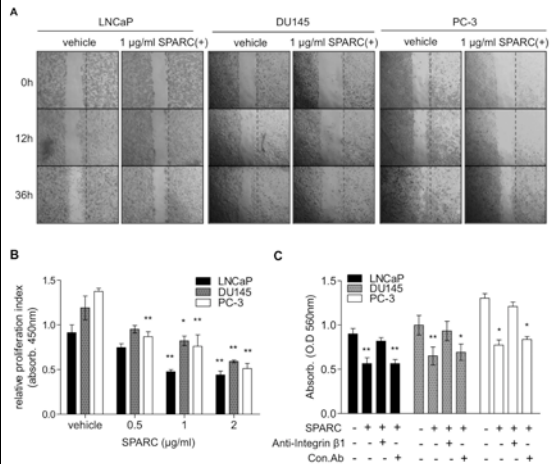
め、インテグリン $\beta 1$ と直接結合するかどうかを明らかにするために、SPARC を用いて免疫沈降を行うと、インテグリン $\beta 1$ は SPARC とともに結合していることが判明した。さらにインテグリン $\beta 1$ の中和抗体を使用すると、SPARC による AKT のリン酸化抑制が解除された (Fig. 3)。

SPARC は受容体であるインテグリン $\beta 1$ を介して AKT のリン酸化を阻害していることが示唆された。

SPARC を 3 種類の前立腺癌細胞に添加し、細胞増殖の変化を調べると、SPARC は増殖を阻害したが、それはインテグリン $\beta 1$ の中和抗体により解除された (Fig. 4)。



また、SPARC は前立腺癌細胞の遊走能も阻害



し、インテグリン $\beta 1$ の中和抗体により、解除された (Fig. 5)。

これらの結果より、前立腺では間質脂肪から分泌される SPARC はインテグリン $\beta 1$ と結合し、AKT のリン酸化を阻害することで癌抑制因子として働いている。しかし、前立腺癌となると、間質細胞から分泌される SPARC のレベルが減少することで、AKT のリン酸化を阻害できず、増殖、遊走能が亢進し、前立腺癌が進行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 1 件)

Minkyong Shin, Atsushi Mizokami, Jungim Kim, Mitsuo Ofude, Hiroyuki Konaka, Yoshifumi Kadono, Yasuhide Kitagawa, Sotaro Miwa, Misako Kumaki, Evan T. Keller, and Mikio Namiki. Exogenous SPARC Suppresses Proliferation and Migration of Prostate Cancer by Interacting With Integrin $\beta 1$, (査読有) Prostate in press 2013 DOI 10.1002/pros.22664

[学会発表] (計 1 件)

Minkyong Shin, Atsushi Mizokami, Jungim Kim, Mitsuo Ofude, Hiroyuki Konaka, Yoshifumi Kadono, Yasuhide Kitagawa, Sotaro Miwa, Misako Kumaki, Evan T. Keller, and Mikio Namiki. Osteonectin suppresses proliferation and migration of human prostate cancer cells, AACR 2013 発表日 : 2013. 4. 9 (Washington, D. C. Convention Center, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 聡太郎 (MIWA SOTARO)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80507070