

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792146

研究課題名(和文)MAPキナーゼ経路制御因子Sproutyによる舌癌増殖/転移抑制機構の解明

研究課題名(英文)A study of the suppression mechanism of tongue cancer growth/ metastasis by Sprouty, the regulating factor of MAP kinase cascade.

研究代表者

武富 孝治 (Taketomi, Takaharu)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10553290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト舌癌細胞株における Sprouty/Spred ファミリーの発現を調べたところ、Sprouty2,4 と Spred1 の発現が強く、それぞれが MAPK 経路を介して発現が誘導されていた。なかでも Sprouty2 は舌癌細胞株において EGF および FGF 刺激による MAPK 経路の活性化を抑制するのみでなく、さらに別の癌増殖シグナルとして知られる TGF- β スーパーファミリー刺激による Smad 1/5/8 の活性化を抑制する結果を得た。また、癌細胞における血管上皮増殖因子(VEGF)の発現を抑制することが示され、癌の増殖のみならず転移機構の抑制に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：After examining the expression of Sprouty/Spred family in the human tongue cancer cell line, expression of Sprouty2,4 and Spred1 was expressed and each expression was induced through MAPK cascade. Among them, Sprouty2 inhibited not only the activation of MAPK induced by EGF and FGF stimulation in tongue cancer cell line but also inhibited the activation of Smad 1/5/8 due to the transforming growth factor-beta superfamily stimulation to be known as yet another cancer growth signal. Furthermore, Sprouty2 suppressed the expression of vascular epidermal growth factor (VEGF) in tongue cancer cell line, so it was suggested that Sprouty2 was associated with the suppression of the metastatic mechanism as well as the growth.

研究分野：医歯薬学

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：Sprouty 舌癌 口腔癌 MAPK 経路

1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖や分化は、多くの細胞外刺激が細胞表面にあるチロシンキナーゼ型受容体を活性化することにより制御されているが、一方で、チロシンキナーゼ型受容体からの刺激は、そのシグナルにおける抑制因子を転写・誘導し、負のフィードバック機構を形成することで細胞外からの刺激を調節している。

Sprouty/Spred ファミリーは、こうしたチロシンキナーゼ型受容体からの刺激により転写・誘導される負の調節因子で、哺乳類においては、現在までに 4 種類同定されている状況であった。

Sprouty と癌に関しては、乳癌、前立腺癌などいくつか報告されていたが、そのほとんどが原発巣の growth 及び migration の抑制に関する研究であった。また、Sprouty と似た配列を C 末端に持つ Spred は、骨肉腫の細胞株において、転移を抑制することが報告され、転移抑制機構にも深く関わっている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

口腔癌の中でも代表的な舌癌および骨肉腫細胞株の増殖と転移機構において、MAPK 経路制御因子である Sprouty ファミリーがどのような役割を有しているかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

Sprouty ファミリーによる扁平上皮癌および骨肉腫の増殖およびリンパ行性転移抑制機構を解明するため、以下の 3 点について調べた。

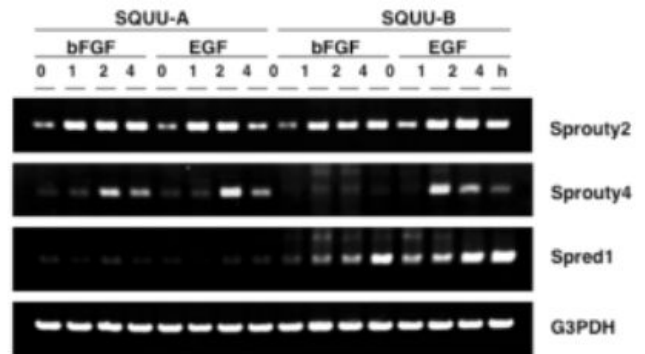
- (1). ヒト扁平上皮癌 (舌癌) 細胞株 / 骨肉腫細胞株における Sprouty ファミリーの発現
 - (2). 腫瘍細胞 (SQUU-A, B および SaOS-2) の増殖と転移機構における Sprouty ファミリーの作用
 - (3). リンパ管新生に対する Sprouty ファミリーの役割
- (1) 同一患者より分離した舌癌細胞株 SQUU-A, B 細胞および骨肉腫細胞株として知られる SaOS-2 細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法により cDNA を作製、real-time PCR 法にて、各 Sprouty ファミリーの発現を調べた。mRNA レベルでの発現確認後、タンパク質レベルでの発現・局在の違いについて、免疫組織学的手法をもちいて検討した。
 - (2) 各種 Sprouty ファミリーの Plasmid を作製し、それらを各種細胞に遺伝子導入し、増殖因子にて刺激後に細胞内シグナル伝達分子で細胞増殖に関わる分子の活性化を western blot 法にて調べた。
 - (3) リンパ節転移に関わると考えられている細胞による VEGF 産生に関して、遺伝子導入した各種細胞の培養上清をもちいて

ELISA 法にてその産生量を比較した。

4. 研究成果

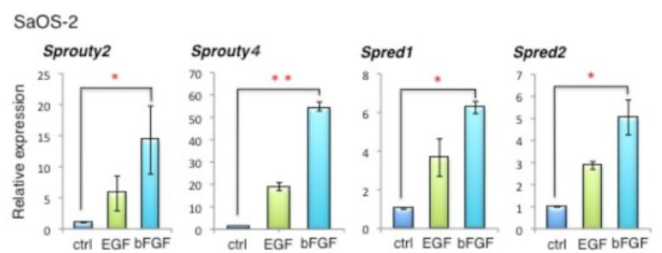
SQUU-A, B 細胞における Sprouty ファミリーの mRNA の発現を調べたところ、EGF・FGF 刺激の種類によらず、Sprouty2 は SQUU-A, B 両細胞で発現しており、Sprouty4 は EGF 刺激で特に強く誘導されていた。また、Spred1 は高転移株である SQUU-B 細胞でのみ発現していた (図 1)。

図 1.



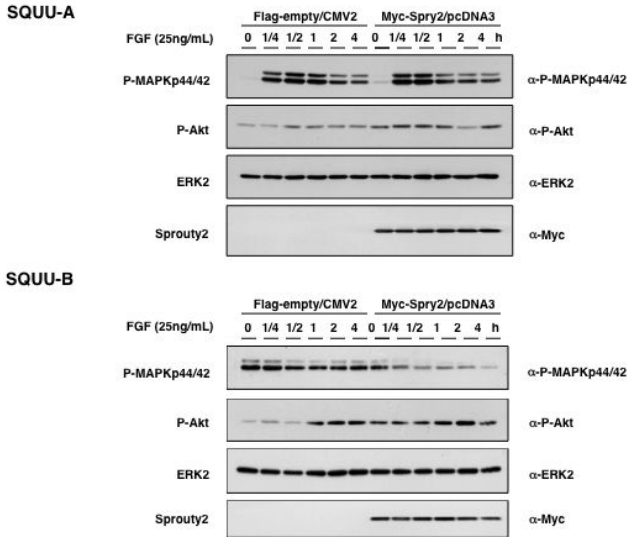
次に、SaOS-2 細胞における Sprouty ファミリーの mRNA の発現を調べたところ、EGF 刺激よりも FGF 刺激の方がより強く発現誘導することが分かった (図 2)。

図 2.



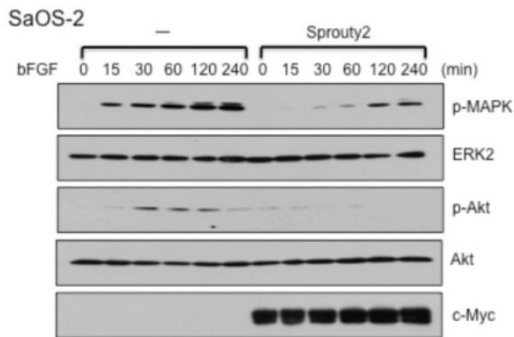
次に、各種 Sprouty ファミリーを細胞に遺伝子導入し、細胞増殖に関わる細胞内シグナル伝達分子の活性化にどのように影響しているかを調べた。なかでも、刺激に関わらず発現の強かった Sprouty2 遺伝子導入群では、FGF 刺激時、SQUU-B 細胞における MAPKp44/42 の活性化を抑制していた (図 3)。

図 3.



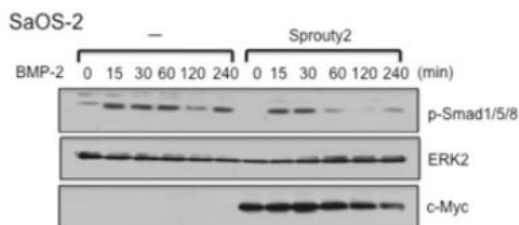
また、SaOS-2 細胞における つぎに Sprouty2 の細胞内シグナルに対する影響を調べたところ、FGF 刺激において MAPKp44/42 の活性化を抑制し、併わせて Akt のリン酸化を抑制していた (図 4)。

図 4.



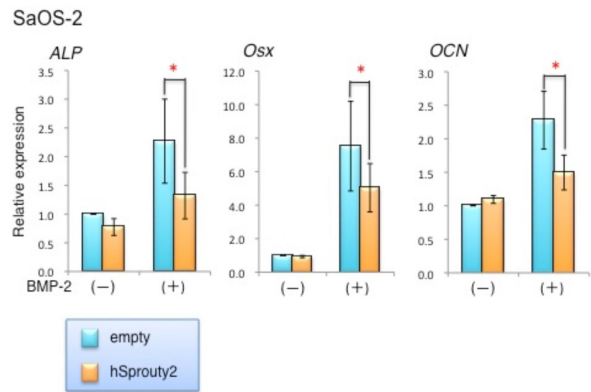
一方で、癌の増殖シグナルには MAPK 経路シグナルのみならず、TGF-シグナルが重要な働きをしていることが知られており、TGF-スーパーファミリーのなかでも BMP-2 は骨肉腫の増殖にも深く関わっている可能性が高いことから、Sprouty2 を遺伝子導入した SaOS-2 細胞を BMP-2 で刺激し、下流のシグナルの活性化を調べた。その結果、Sprouty2 を強制発現した SaOS-2 細胞における Smad1/5/8 のリン酸化が時間依存的に抑制されていた (図 5)。

図 5.



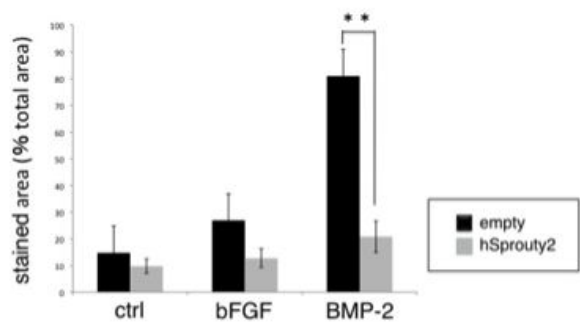
また、SaOS-2 細胞において、BMP-2 刺激における Smad のリン酸化への Sprouty2 の役割を確認するため、さらに下流の分子の mRNA の発現を調べた。その結果、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステリックス (Osx)、オステオカルシン (OCN) の発現を調べたところ、Sprouty2 遺伝子導入群でこれら下流因子の mRNA 発現誘導が抑制されていた (図 6)。

図 6.



さらに、SaOS-2 の石灰化に対する Sprouty2 の影響を調べたところ、Sprouty2 が石灰化を抑制していた (図 7)。

図 7.



SQUU-A, B 細胞における VEGF 産生に対する Sprouty2 の影響を調べるため、VEGF-C の発現を調べた。また、プレリミナルな結果であるが、Sprouty2 強制発現群で VEGF-C の発現が抑制されていた。

以上の結果から、Sprouty ファミリーは特に Sprouty2 において、口腔扁平上皮癌や骨肉腫などの悪性腫瘍の増殖抑制に深く関わっており、その転移機構に関しても抑制性に働く可能性が示唆された。

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 3 件)

<査読あり>

1. Daichi Muratsu, Daigo Yoshiga, Takaharu Taketomi, Tomohiro Onimura, Yoshihiro Seki, Akinobu Matsumoto, Seiji Nakamura. : Zoledronic Acid Enhances Lipopolysaccharide -Stimulated Proinflammatory Reactions through Controlled Expression of SOCS1 in Macrophages. - *PLOS ONE* 8 (7): e67906, (2013). doi:10.1371/journal.pone.0067906

2. Takao Fukuda, Terukazu Sanui, Kyosuke Toyoda, Urara Tanaka, Takaharu Taketomi, Takeshi Uchiumi, Fusanori Nishimura. : Identification of Novel Amelogenin-Binding Proteins by Proteomics Analysis. - *PLOS ONE* 8 (10): e78129, (2013). doi:10.1371/journal.pone.0078129

3. 緒方 絹子, 武富 孝治, 高野 雅代, 津山治己, 岩本 修, 楠川 仁悟: 下顎骨骨切り術中の甲状腺クリーゼ発症により判明したバセドウ病の 1 例 - 日本口腔外科学会誌 Vol.59, No.12, 796-800, (2013). <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjoms/-char/ja/>

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 武富 孝治, 中村 守蔵, 原田 真知子, 古賀 真, 津山 治己, 岩本 修, 楠川 仁悟: 軟口蓋に発生した基底細胞腺癌の 1 例; 第32回 日本口腔腫瘍学会総会, 札幌 (2014.1.23).

2. 武富 孝治, 鬼村 朋宏, 吉賀 大午, 松村 香織, 中村 誠司, 吉村 昭彦, 楠川 仁悟: FGF アンタゴニスト Sprouty2 による骨芽細胞増殖・分化制御機構の解明; 第 20 回 BMP 研究会, 浜松, (2013.7.5).

3. Sanui Terukazu, Tanaka Urara, Toyoda Kyosuke, Fukuda Takao, Takaharu Taketomi, Atomura Ryo, Hamachi Takafumi, Maeda Katsumasa, Sprouty2 regulates osteoblastogenesis via Runx2 signaling. ,91nd General Session & Exhibition of the IADR, in Helsinki (2013.3.23).

4. 鬼村 朋宏, 武富 孝治, 吉賀 大午, 村津 大地, 中村 誠司 FGF シグナル抑制因子 Sprouty2 による骨芽細胞増殖制御機構の解析 第 30 回骨代謝学会, 東京,

(2012.7.20).

5. 鬼村 朋宏, 武富 孝治, 吉賀 大午, 村津 大地, 中村 誠司 FGF シグナル抑制因子 Sprouty による骨芽細胞増殖制御機構の解析 第66回日本口腔科学会学術集会, (2012.5.17).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

武富 孝治 (TAKETOMI Takaharu)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 10553290

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: