

第67回 奥羽大学歯学会例会講演抄録

(令和元年6月15日)

1) SPARCが脂肪蓄積に及ぼす影響

○羽鳥 智也

(奥羽大・大学院・口腔生理・生化)

【目的】 SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) はオステオネクチンとして骨で発見され、骨組織だけでなく、軟組織などからも分泌され、細胞の接着や細胞増殖に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。SPARC ノックアウトマウスの表現形質として白内障や脂肪過多が報告され、臨床的には、リウマチ関節炎の進行や糖尿病との関連などが指摘されている。しかしながら、その機能の詳細については未だ不明な点が多いため、本研究では、骨や脂肪に分化可能なマウス骨髄由来の間葉系細胞株である ST2細胞を用い、SPARC の役割とその制御機構について検討した。

【方法】 ST2細胞の SPARC ノックアウトした株を作成し、RT-qPCR, western blot, alizarin red S 染色, oil red O 染色, promoter assay にて表現型を解析した。また、リコンビナントタンパクは *Brevibacillus* にて作成し、*in vitro* で EMSA, far-western blot を用い解析した。

【結果】 SPARC ノックアウトは、スタチンによる石灰化の促進を完全に消去し、脂肪分化誘導下で、脂肪滴の蓄積が有意に増加した。AP-1プロモーター活性は有意に増加した。ノックアウト細胞に SPARC でレスキューすると、AP-1活性は野生型と同等まで低下した。また、SPARC 強制発現株の培養上清を添加するだけでも、有意な AP-1活性の低下が認められた。さらに、EMSA では、SPARC が AP-1 の DNA 結合を抑制すること、far-western では、SPARC の c-Fos への直接的な結合が示された。

【結論】 野生型の細胞では、分泌された SPARC が細胞内に取り込まれ、細胞質で c Fos と直接結合することで、AP-1活性を低い状態に保っている可能性が示唆された。

2) 酸性細胞外pH長期暴露による癌細胞形質の変化に関する研究

○須藤 周作

(奥羽大・大学院・口腔生理・生化)

【緒言】 がん細胞の細胞外環境は、旺盛なグルコース代謝による大量の二酸化炭素と乳酸の排泄により酸性を示す。以前の研究では、細胞外の酸性 pH 短期暴露により MMP-9 分泌促進を伴う上皮間葉系移行 (EMT) が促進されることがわかっている。本研究では、酸性 pH の長期暴露の影響を調べるため、低転移性のマウス Lewis 肺癌細胞垂株 LLCm1細胞より酸性 pH 耐性株 (LLCm1A) を樹立し、転移能について比較検討した。

【方法】 遺伝子発現は RT-qPCR, 培地中に分泌された MMP 活性を zymography, 細胞運動能を Wound healing assay, 浸潤能は Boyden chamber assay にて評価した。転移能の検討は、実験的肺転移モデルにより行った。

【結果】 LLCm1細胞と比較して、LLCm1A 細胞では MMP9 と MMP2 の分泌が遺伝子レベルで亢進していること、さらには *Mmp3* と *Mmp13* 遺伝子発現の亢進も明らかとなった。また、LLCm1A は、高い運動能や高い浸潤能を有し、その性質は中性 pH で長期間継代培養しても維持されていた。さらにマウスにおける実験的肺転移モデルにより、LLCm1A 細胞が LLCm1 に比べ、肺でのコロニー形成が有意に増加し、高い転移能を有することが明らかとなった。

【まとめ】 酸性細胞外 pH への適応は、恒常的な転移性獲得に寄与し、中性 pH における継代の繰り返しでも高い浸潤活性は維持されていた。これらの結果から、酸性細胞外 pH は転移を亢進する微小環境であり、ある種のがんにおいて酸性 pH に対する馴化は、安定的な転移能の獲得に寄与することが示唆された。