

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：科学研究費補助金 基盤研究 (C)
 研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度
 課題番号：19592162
 研究課題名（和文）新規癌進展抑制性ケモカイン(BRAK)遺伝子の口腔癌細胞における発現制御機構
 研究課題名（英文） Regulation of gene expression of BRAK, a human tumor progression suppressing chemokine
 研究代表者 畑 隆一郎(HATA RYUICHIROU)
 神奈川歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号： 10014276

研究成果の概要：

口腔癌の進展を抑制する因子としてケモカイン BRAK/CXCL14 を見いだした。腫瘍組織では BRAK/CXCL14 の発現量が低下しているが、腫瘍細胞に BRAK/CXCL14 を強制的に発現させると、腫瘍形成能が低下した。また、T 細胞を欠損したヌードマウスに腫瘍を移植後、上皮増殖因子受容体の阻害剤であるゲフィチニブ（イレッサ）を飲ませると腫瘍内の BRAK/CXCL14 の発現が上昇し、かつ腫瘍が小さくなった。BRAK/CXCL14 の発現が腫瘍抑制に重要であると考えられるのでその遺伝子の発現制御機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔癌, 腫瘍抑制因子, BRAK/CXCL14, 転写制御, ゲフィチニブ, 頭頸部癌, 上皮増殖因子阻害剤

1. 研究開始当初の背景

本研究は我々が最近見いだした *in vivo* で癌進展抑制作用を示すケモカイン BRAK/CXCL14 の発現制御の分子機構を明らかにする研究である。図参照

(1) 研究の学術的背景

- ① 多くの癌細胞で活性化している上皮増殖因子受容体の活性化により BRAK/CXCL14 遺伝子の発現は低下する。

我々は口腔癌を含む多くの癌で上皮増殖因子受容体が活性化していること

に着目して、口腔扁平上皮癌細胞を無血清下で培養し、上皮増殖因子で処理した際に（癌の悪性化条件）変化する遺伝子を遺伝子チップおよび RT-PCR 法で網羅的に解析し、ケモカイン BRAK/CXCL14 の mRNA が特異的に発現低下していることを見いだした。

②ケモカイン BRAK/CXCL14 は癌化で発現低下し、高発現させると *in vivo* で口腔癌細胞の増殖抑制作用を示す

ケモカイン（ケモタクティックサイトカイン）は白血球やリンパ球の遊走を誘導する一群の共通構造を持つタンパク質である。BRAK/CXCL14は最初に乳房と腎臓（Brest and Kidney）に発現していることからBRAKと命名され、ついでアミノ末端にCXCの配列を持つケモカイン類似の構造からCXCL14命名された新しいケモカインである（Hromas R, et al., 1999）。我々は7人の患者から得られた口腔癌細胞でも血清を含まない培養条件ではBRAK/CXCL14を発現しており、上皮増殖因子の存在（癌の悪性化のモデル）でその発現が低下することから、BRAK/CXCL14が *in vivo* の正常細胞、正常組織でホメオスタシス維持に重要な分子であると考え、口腔癌細胞にBRAK/CXCL14を強制発現させると、*in vitro*の増殖はMOCK（対照）と同じであるにも拘らず、マウス背部皮下に移植すると、ベクターのみを導入した癌細胞（MOCK）と比較して、BRAK/CXCL14遺伝子導入細胞が著明な癌進展抑制作用を持つことを明らかにした。（右図参照）

2. 研究の目的

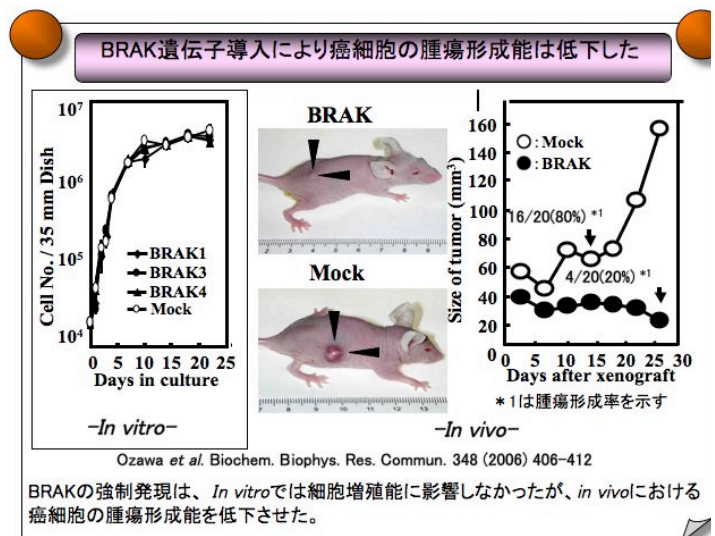
BRAK の遺伝子発現は MAP キナーゼの ERK により抑制され、p38 により促進されると考えられる。本研究ではこの分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ゲフィチニブによる BRAK の発現を介した腫瘍抑制機構（小澤重幸、加藤靖正）

ゲフィニチブ(イレッサ)は上皮増殖因子受容体(EGFR)の阻害剤であるが、非小細胞肺癌などにおいて腫瘍抑制作用を示すことが報告された。一方、間質性肺線維症などの副作用も強く問題となっている。我々はやはり EGFR の過剰発現が見られる口腔癌細胞の移植腫瘍がゲフィチニブの投与により消失し、同時に BRAK の発現促進が見られたことから、BRAK がゲフィニチブの腫瘍抑制作用に関与していると考えた(Ozawa et al., IADR Travel Award 受賞)。本研究ではこの考えを証明するために以下の実験を行う。

- ① BRAK の発現量が腫瘍抑制に関与するかどうかを証明するために BRAK の SiRNA 発現ベクターで BRAK の発現を低下させた HSC-3 口腔癌細胞クローンを確立し、ヌードマウスに移植し、腫瘍を作製し、*in vivo* の BRAK の発現量と腫瘍の大きさの相関を明らかにする。
- ②また、(HSC-2, HSC-4)腫瘍細胞を移植した



マウスにゲフィチニブ(50mg/Kg/day)を投与し、BRAK の発現促進と腫瘍抑制作用の逆相関の関係を解析し、ゲフィチニブの腫瘍抑制作用が BRAK を介していることを明らかにする。

(2)BRAK の転写制御機構の研究

小澤重幸、前畑洋次郎、小森令賀(大学院生)、加藤靖正

ヒト BRAK 遺伝子の上流の 3kb のプロモーター配列を含むホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子コンストラクト{pGVB2BRAK はすでにクローニングし、その塩基配列を確認してある。BRAK mRNA は 3'領域が長く、この領域にも制御配列が存在する可能性が考えられたのでこの領域を現在クローニング中である。

4. 研究成果

(1)研究結果 : BRAK mRNA レベルの低下は EGF 処理 3 時間後から顕著になった。一方、EGF 受容体 (EGFR) の阻害剤である gefitinib(Iressa、ZD1839)の共存により、EGF による BRAK mRNA の低下作用は阻害された。また、EGF の MAP キナーゼ系に対する影響を調べるために EGF 処理後の ERK, p38, JNK の活性化(リン酸化)を調べると、EGF 処理 10 分後から 30 分後にかけて ERK2 のリン酸化のみが促進された。EGF による ERK2 のリン酸化とそれに伴う BRAK mRNA とタンパク質レベルの低下は MEK 阻害剤(PD98059)の共存により阻害された。これらの結果より、EGF は EGFR に結合して MEK、ERK2 を活性化し、BRAK mRNA およびタンパク質レベルの低下作用を示すことが明らかになった。また、p38 阻害剤で処理すると BRAK 遺伝子の発現の低下が観察され、p38 が BRAK mRNA レベルの上昇に関与していることが示唆された。これらの結果から ERK および p38 MAP キナーゼにより BRAK mRNA レベルが調節されている

と考えられる。また、種々の頭頸部癌細胞をヌードマウスに移植後、マウスに EGFR の阻害剤であるゲフィチニブ (イレッサ) を与えると、腫瘍細胞の BRAK/CXCL14 の遺伝子発現が上昇するとともに腫瘍の縮小がおこった。一方、BRAK に対する SiRNA の発現ベクターを導入した癌細胞は同様な実験において BRAK の遺伝子発現は上昇せず、腫瘍の進展抑制がおこらなかった。

結論 : これらの結果から、頭頸部癌の進展抑制には BRAK/CXCL14 の発現回復が重要であることが判明した。

(2)ヒト BRAK/CXCL14 遺伝子の転写制御配列の決定

5'RACE 法により、従来報告されていた BRAK/ CXCL14 遺伝子の第一エキソン (+284)に転写開始点が存在することが判明した。また、転写開始点の上流配列とルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子とする発現ベクターを作成し、プロモーター領域の欠失あるいは変異させたプラスミドを HSC-3 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を解析した。この結果、プロモーター領域の TATTAA 配列が TATA box として機能し、転写因子の AP-1 結合配列。GC box 3,4 が BRAK/ CXCL14 遺伝子の転写制御に重要であることを明らかにした。さらに、プロテインホスファターゼ阻害剤のオカダ酸は AP-1 結合配列を介して遺伝子の転写活性化をしていることが明らかになった。

結論 :

頭頸部癌 (口腔癌) の進展抑制因子である BRAK/ CXCL14 遺伝子の発現制御に関与するシグナル伝達機構が明らかになり、また、転写制御機構配列が明らかになったことにより、BRAK/ CXCL1 遺伝子の転写制御の分子機構の解析への途が開けるとともに、口腔癌進展抑制の新しい方法への道が開けた。

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 6 件) 査読 (peer review) 有りのもののみを掲載

1. Maehata Y, Lee MC, Hata I. Roles of Collagen Molecules in Growth and Differentiation of Human Osteoblasts. *J Oral Bioscience*, 51(2), 72-80, 2009

2. Furue MK, Na J, Jackson JP, Okamoto T, Jones M, Baker D, Hata Moore HD, Sato JD, Andrews PW. Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008 105 (36) 13409-14.

3. Okuyama T, Kurata S, Tomimori Y, Fukunishi N, Sato S, Osada M, Tsukinoki K, Jin HF, Yamashita A, Ito M, Kobayashi S, Hata R.I, Ikawa Y, Katoh I.

p63 (TP63) elicits strong trans-activation of the MFG-E8/lactadherin/BA46 gene through interactions between the TA and DeltaN isoforms. *Oncogene*, 27, 308-317, 2008.

4. Hayashi Y, Furue MK, Okamoto T, Ohnuma K, Myoishi Y, Fukuhara Y, Abe T, Sato JD, Hata, Asashima M: Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal.

Stem Cells, 25(12): 3005-15, 2007.

5. Kato Y, Ozawa S, Tsukuda M, Kubota E, Miyazaki K, St-Pierre Y, Hata. Acidic extracellular pH increases

calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma.

FEBS J, 274(12): 3171-83, 2007.

6. Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, Izukuri K, Kato Y, Sato S, Lee MC, Kimura A, Hata. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative.

Matrix Biol, 26(5): 371-81, 2007.

[学会発表] (計 14 件) 国際学会のみを掲載

1. Hata R: The BRAK box is opening. Yokosuka Science Festa 2009, Shonan Village Center, June 4-7, 2009.

2. Nobuyuki Yajima, Ryu-Ichiro Hata :Production of BRAK knockout mice. Yokosuka Science Festa 2009, Shonan Village Center, June 4-7, 2009.

3. Kazuhito Izukuri, Kenji Suzuki, Shigeyuki Ozawa, Eiro Kubota, Ryu-Ichiro Hata : Suppression of growth of Lewis lung carcinoma cell xenografts in BRAK transgenic mouse: Production of cancer resistant mouse. Yokosuka Science Festa 2009, Shonan Village Center, June 4-7, 2009.

4. Shin Ito, Shigeyuki Ozawa, Naoto Shiiki, Keiichi Tsukinoki, Eiro Kubota, Yasumasa Kato, Takahide Taguchi, Yukari Imagawa-Ishiguro, Mamoru Tsukuda, and Ryu-Ichiro Hata Chemokine BRAK stimulates apoptosis elicited by gefitinib in oral squamous cell carcinoma Yokosuka Science Festa 2009, Shonan Village Center, June

4-7, 2009.

5. Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Shin Ito, Reika Komori, Kenji Suzuki, Keiichi Tsukinoki, Yojiro Maehata, Takahide Taguchi, Yukari Imagawa-Ishiguro, Mamoru Tsukuda, Eiro Kubota, and Ryu-Ichiro Hata :

Expression of BRAK/CXCL14 is associated with antitumor efficacy of gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma. Yokosuka Science Festa 2009, Shonan Village Center, June 4-7, 2009.

6. Reika Komori, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Hisaaki Shinji, Shigenari Kimoto, and Ryu-Ichiro Hata Functional analysis of promoter region of human BRAK/CXCL14, a tumor progression suppressor. Yokosuka Science Festa 2009, Shonan Village Center, June 4-7, 2009.

7. Reika Komori Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Hisaaki Shinji, Shigenari Kimoto, and Ryu-Ichiro Hata : Functional Analysis of Promoter of Human BRAK/CXCL14, A Tumor Suppressor. 87th General Session & Exhibition of the IADR. Miami, Florida April1-4, 2009.

8. Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Shin Ito, Reika Komori, Naoto Shiiki, Keiichi Tsukinoki, Satoru Ozono, Yojiro Maehata, Takahide Taguchi, Yukari Imagawa-Ishiguro, Mamoru Tsukuda, Eiro Kubota, and Ryu-Ichiro Hata : A new mechanism of tumor suppression by gefitinib in HNSCC. 87th General Session & Exhibition of the IADR, Miami, Florida April1-4, 2009.

9. Ryu-Ichiro Hata, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Shin Ito, Reika Komori, Yojiro Maehata, Eiro Kubota: Regulation of

BRAK/CXCL14 gene expression by MAP kinase signaling. AACR Special Conference: Chemical and Biological Aspects of Inflammation and Cancer, October 14 - 18, 2008. Oahu, Hawaii.

10. Ryu-Ichiro Hata, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Shin Ito, Reika Komori, Naoto Shiiki, Keiichi Tsukinoki, Satoru Ozono, Yojiro Maehata, Takahide Taguchi, Yukari Imagawa-Ishiguro, Mamoru Tsukuda, Eiro Kubota : Expression of BRAK/CXCL14 is a marker for gefitinib responsiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, San Diego, CA April 12-16, 2008

11. Reika Komori Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Hisaaki Shinji, Shigenari Kimoto, and Ryu-Ichiro Hata : Determination of transcription start-site of CXCL14/BRAK in squamous cell carcinoma. 86th International Association of Dental Research July 2-5, 2008, Toronto, Canada.

12. Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Shin Ito, Reika Komori, Yojiro Maehata, Eiro Kubota, and Ryu-Ichiro Hata : p38 signaling up-regulates BRAK expression in squamous cell carcinoma. 86th International Association of Dental Research July 2-5, 2008, Toronto, Canada.

13. Shigeyuki Ozawa Yasumasa Kato, Shin Ito, Reika Komori, Naoto Shiiki, Keiichi Tsukinoki, Satoru Ozono, Yojiro Maehata, Takahide Taguchi, Yukari Imagawa-Ishiguro, Mamoru Tsukuda, Eiro Kubota, and Ryu-Ichiro Hata : Gefitinib (ZD1839, Iressa) reduced tumor volume through BRAK/CXCL14 expression in head and neck

squamous cell carcinoma. KEYSTONE SYMPOSIUM on chemokine and chemokine receptors, January 13-18, 2008, Keystone, Colorado.

14. Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, Kato Y, Yoshino F, Kobayashi K, Takahashi S, Todoki K, Hata, Lee M-C.: Reciprocal Effects of Oxidative Stress on the Gene Expression of Il-8/CXCL8 and BRAK/CXCL14 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. The 4th Joint Meeting of the Society For Free Radical Research Australia and Japan. Kyoto, Japan. 2007. 12. 1-5.

15. Hata R, Ozawa S, Kato Y, Ito S, Komori R, Shiiki N, Tsukinoki K, Ozono S, Maehata Y, Taguchi T, Imagawa-Ishiguro Y, Tsukuda M, Kubota E: Gefitinib (ZD1839, Iressa) Reduces Tumor Volume Through BRAK/CXCL14 Expression. ASCB, Washington DC, USA, 2007. 12. 1-5.

16. Hata R, Ozawa S, Kato Y, Komori R, Maehata Y, Kubota E, Tsukuda M : Gefitinib stimulates expression of BRAK, a tumor suppressing chemokine and suppresses growth of tumor xenograft. GRC on Cancer Genetics & Epigenetics IL CIOCCO, Italy, 2007. 5. 20-25.

[その他]

畑 隆一郎、小澤重幸、加藤靖正、小森令賀、前畑洋次郎、久保田英朗：新しい発想による内在性癌進展抑制遺伝子の探索と発見～ケモカインBRAK/CXCL14 は in vivo において腫瘍抑制作用を示す～バイオアカデミックフォーラム、2007年6月20日～22日、東京ビッグサイト、東京テレビ

小森令賀が IADR Hatton Award で 2008 年度 Travel Award を受賞した。また、Yokosuka

Science Festa 2009 で Young Investigator Award を受賞した、前畑洋次郎が 2008 年度歯科基礎医学会賞を受賞した。また、2009 年度結合組織学会大高賞を受賞した。畑隆一郎が 2009 年度に本結合組織学会学術賞を受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑 隆一郎 (HATA RYUUCHIROU)
神奈川歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：10014276

(2) 研究分担者

小澤 重幸 (OZAWA SHIGEYUKI)
神奈川歯科大学・歯学部・特別研究員
研究者番号：40434394
前畑 洋次郎 (MAEHATA YOJIRO)
神奈川歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80410009
高垣 裕子 (TAKAGAKI YUKO)
神奈川歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：3270360227