

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791553  
 研究課題名(和文) 分子標的治療薬に対するオーダーメイド医療のための基礎研究  
 研究課題名(英文) Combination chemotherapy for head and neck squamous cell carcinoma  
 研究代表者  
 小澤重幸(OZAWA SHIGEYUKI)  
 神奈川歯科大学・歯学・特別研究員  
 研究者番号：40434394

## 研究成果の概要：

我々は BRAK の遺伝子発現が確認できない癌細胞を、デシタビン処理すると BRAK の遺伝子発現が回復することを見出した。BRAK のプロモーター領域はメチル化によって不活化しており、ゲフィチニブ処理においても、BRAK の遺伝子発現回復による抗腫瘍効果は期待できない。BRAK のメチル化をマーカー分子として、①メチル化を受けていない場合はゲフィチニブ単剤、②メチル化を受けている場合はデシタビンとゲフィチニブの多剤併用療法が期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3520000

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌、CXCL14/BRAK、テーラーメイド医療、メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

テーラーメイド医療とは、それぞれ個人の特性に応じた治療を遺伝子レベルで診断し、個人にあわせた治療及び予防を行うことを目的とする。この医療が従来のもものと比較し優れている点は、医療品の有効性や副作用の少ない治療法を選択することができる

ため、より個人差を考慮した治療を遂行することができる。癌治療においても同様に、分子標的治療法の導入により、テーラーメイド医療の開発が行われている。乳癌の遺伝子診断に基づく検診や、ゲフィチニブ(商標名：イレッサ 対象は非小細胞肺癌)の奏功に関与する上皮増殖因子受容体

(EGFR)の変異検出等が良い例である。特にゲフィチニブは開発当初、癌細胞の増殖抑制を行うことを期待された薬剤であるが、患者の遺伝子を調べ EGFR に変異のある非喫煙患者においては高い奏効率を示すことが報告されている。我々が取り扱う頭頸部扁平上皮癌においても、EGFR からのシグナルが癌細胞の病態の悪化に関与することが明らかとなっており、ゲフィチニブの投与が試験的に行われている。興味深いことに、頭頸部扁平上皮癌においては、EGFR の変異は、肺の非小細胞癌ほど高い頻度では確認されないが、変異が無くともゲフィチニブによって著しい腫瘍縮小傾向を示す例がある。我々の研究結果から、ゲフィチニブで腫瘍縮小効果を示す頭頸部扁平上皮癌細胞の共通点としては、ケモカイン CXCL14/BRAK の遺伝子発現が確認される癌であるという点である。今回我々は上記の研究データを背景に研究を行った。

## 2. 研究の目的

近年癌治療は分子標的治療法の導入により大変革を遂げつつある。我々は分子標的治療薬の一つであるゲフィチニブの効果にケモカインBRAK/CXCL14が関与しており、BRAK/CXCL14が発現していない癌細胞においてはゲフィチニブが効果を示さない結果を得た。癌細胞でBRAK/CXCL14が消失する原因としてプロモーター領域のメチル化が関与しており、メチル化を簡便に特定するための手法の一つとして、メチル化特異的PCR法が挙げられる。我々の目的は、BRAK/CXCL14のメチル化領域の決定を行うことにより、BRAK/CXCL14に対するメチル化特異的PCR法を確立することである。このことからBRAK/CXCL14のメチル化を検出することが、ゲフィチニブ投与前の効果

予測のマーカー分子として、オーダーメイド医療の指標となりえるものと期待される。

## 3. 研究の方法

- ① BRAK のプロモーター領域を決定するために 5'RACE 法を用いて転写開始点の検討を行った。
- ② 転写開始点を含む上流領域をクローニングし、プロモーターアッセイを行った。
- ③ BRAK の mRNA に対する siRNA 発現ベクターを構築後、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞である HSC-3 細胞に導入し、BRAK 遺伝子発現が上昇しない細胞株を作製した。siRNA 発現ベクター導入安定細胞株をヌードマウスの背部皮下へ移植し、ゲフィチニブの効果を検討した。
- ④ BRAK の発現が確認できない YCU-H891 細胞株をヌードマウスの背部皮下へ移植し、ゲフィチニブの効果を検討した。
- ⑤ YCU-H891 細胞株をヌードマウスの背部皮下へ移植し、ゲフィチニブと脱メチル化剤であるデシタビンの併用療法を試みた。

## 4. 研究成果

我々は BRAK の遺伝子発現が確認できない癌細胞を、*in vitro* で 5 アザシチジン (脱メチル化剤) 処理をすると、BRAK の遺伝子発現が誘導されることを見出した。本結果は BRAK のプロモーター領域がメチル化によって不活化しており、ゲフィチニブ処理においても、BRAK の遺伝子発現回復による抗腫瘍効果は期待できないことを意味する。事実、このような細胞株では BRAK の遺伝子発現は回復せず、*in vivo* においてもゲ

フィチニブが腫瘍縮小効果を示さない結果を得た。この結果は、BRAK のメチル化をマーカー分子として、①メチル化を受けていない頭頸部扁平癌細胞においては、ゲフィチニブ単剤、②メチル化を受けている癌細胞においてはデシタビン（骨髄異形成症候群に使用されている脱メチル化薬）とゲフィチニブの多剤併用療法を行うテーラーメイド医療の可能性が期待される。そこで我々は、ゲフィチニブが単剤で効果を示す癌かどうかを投与前に判定し、メチル化を受けている癌（効果が期待できない例）においてはデシタビンとの併用を考慮するといったテーラーメイド医療の開発を目的とした。我々は RT-PCR 法で BRAK の遺伝子発現が確認できない頭頸部扁平上皮癌細胞 YCU-H891 をヌードマウスの背部皮下に移植し、腫瘍の定着後、ゲフィチニブ単剤の経口投与（50mg/kg/day）を行った場合では腫瘍縮小効果を示さないが、デシタビンとの併用療法において著しい腫瘍縮小効果を示す結果を得た。一方、ポジティブコントロールとして用いた BRAK プロモーターがメチル化していない複数の癌細胞では、ゲフィチニブ単剤で腫瘍縮小効果を示した。これらのことから BRAK プロモーターのメチル化の検査はゲフィチニブの投与前の効果判定マーカーとして非常に有望であり、テーラーメイド医療への応用の可能性を示す。

#### 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 2 件）

①FEBS J. 2007 Jun;274(12):3171-83.

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.

Kato Y, Ozawa S, Tsukuda M, Kubota E, Miyazaki K, St-Pierre Y, Hata R.

②Matrix Biol. 2007 Jun;26(5):371-81. Epub 2007 Jan 19.

Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, Izukuri K, Kato Y, Sato S, Lee MC, Kimura A, Hata R.

Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative.

〔学会発表〕（計 4 件）

①小澤重幸, 加藤靖正, 伊藤 慎, 小森令賀, 鈴木健司, 前畑洋次郎, 李昌一, 久保田英朗, 畑隆一郎. CXCL14/BRAK の発現調節機構 第 43 回総会. 横須賀, 神奈川. 2008. 12. 6.

②Ozawa S., Kato Y., Ito S., Komori R., Maehata Y., Kubota E., Hata R.: p38 signaling up-regulates BRAK expression in squamous cell carcinoma. 86th General Session and Exhibition of the IADR · 32nd Annual Meeting of the CADR. Toronto, Canada. 2008.7.2-5.

③Komori R., Ozawa S., Kato Y., Shinji H., Kimoto S., Hata R.: Determination of transcription start-site of CXCL14/BRAK in squamous cell carcinoma. International Association for Dental Research.. Toronto. Canada. 2008. 7. 2

④Maehata Y., Takamizawa S., Ozawa S., Izukuri K., Kato Y., Sato S., Yoshino F., Lee

M-C., Hata R.: Type III collagen regulates growth of human osteoblastic cells. 86th General Session and Exhibition of the IADR • 32nd Annual Meeting of the CADR. Toronto, Canada. 2008.7.2-5.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：