

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659843

研究課題名(和文) 癌の治療から予防法の確立へ：癌に強いマウスの癌増殖抑制と転移抑制機構の解明

研究課題名(英文) From cancer therapeutics to cancer prevention: Investigation of suppression mechanisms of tumor growth and metastasis in cancer resistant mouse

研究代表者

畑 隆一郎 (Hata, Ryu-Ichiro)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：10014276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：国民の2人に1人が癌に罹患し、3人に1人が癌で死亡する。この現実に対処するためには従来の考えによらない画期的な方法が必要である。我々は生体内存在するCXCL14/BRAKという分子が癌を抑制する分子であることを見出し、この分子を過剰に発現するトランスジェニックマウスを作製し、このマウスの発癌抑制、増殖抑制および転移抑制機構を明らかにすることにより、新しい癌の予防法への道を拓いた。

研究成果の概要(英文)：Cancer progression involves carcinogenesis, increases in tumour size, and metastasis. Here, we investigated the effect of overexpressed CXC chemokine ligand 14 (CXCL14) on these processes by using CXCL14 transgenic(Tg) mice. Further, the survival rates after tumor cell injection were significantly increased for the Tg mice, and these mice showed no obvious abnormality. Thus, we propose CXCL14 to be a promising molecular target for cancer suppression/prevention.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学 癌抑制分子 ケモカインCXCL14/BRAK 発癌抑制 実験的発癌 転移抑制

1. 研究開始当初の背景

(1). ケモカイン BRAK は *in vivo* で癌進展抑制作用を示す:

癌では上皮増殖因子(EGF)受容体(EGFR)の異常な活性化が多く見られる。癌進展の *in vitro* のモデルとして、舌癌由来の細胞(HSC-3)を無血清下で培養し、この細胞をEGF処理した時に発現の低下する分子を遺伝子チップ法などにより検索した。その結果、白血球の遊走を促進するケモカインの一種である BRAK の発現が顕著に低下することを見いだした。BRAK は正常細胞で多く発現されており、ヒト頭頸部癌において低下することから、癌進展抑制因子に該当すると考えた。そこで、HSC-3細胞に BRAK 遺伝子を導入して発現を高めた癌細胞(HSC-3 BRAK)を作成し、Tリンパ球機能を欠損したヌードマウス(Ozawa *et al.*, 2006),あるいはTリンパ球およびBリンパ球機能を欠損した SCID マウスに移植した(Ozawa *et al.*, 2009b)。対照の HSC-3 は大きな腫瘍を形成するのに対して、HSC-3 BRAK 細胞の移植腫瘍は1ヶ月後には消滅した。このことから BRAK は我々の体内に存在する腫瘍進展抑制因子である可能性が考えられた。また、BRAK の発現制御はERK マップキナーゼとp38 マップキナーゼのシグナルクロストークによることを明らかにした(Ozawa *et al.*, 2009b, 2010, 畑, 2011)

(2) BRAK 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは腫瘍抑制作用、転移抑制作用を示す:

さらに、C57BL/6 マウスに BRAK 遺伝子を強制発現させ、血中 BRAK 値が野生型マウスの 10 倍高く発現するトランスジェニック(BRAK Tg)マウスを作製した。このマウスに Lewis Lung Carcinoma (LLC)細胞あるいは悪性黒色腫細胞を移植すると、癌の増殖抑制・進展抑制が見られたので、BRAK は

生体内に存在する腫瘍進展抑制因子であることが確認された。移植腫瘍の増殖・進展の抑制は3系統の BRAK Tg マウスで観察されたので、腫瘍の進展抑制は BRAK 遺伝子導入による宿主マウスの腫瘍進展促進因子遺伝子の破壊の結果ではなく、高い BRAK の発現が腫瘍の増殖・進展抑制に効いていると考えられた(Izukuri *et al.*, 2010)。我々の結果は BRAK が頭頸部癌だけでなく、LLC細胞・悪性黒色腫細胞の癌進展抑制作用を示すことが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、ケモカイン CXCL14/BRAK を高発現する BRAK Tg マウスを用いて、

(1) BRAK Tg マウスの移植癌の増殖抑制だけでなく、発癌に対する抵抗性を示す事を明らかにし、(2) 癌転移抑制におけるナチュラルキラー(NK)細胞の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BRAK Tg マウスと野生型マウスの腹腔にアゾキシメタン(12mg/kg body weight)を注射後、3%のデキストラン硫酸ナトリウムを間欠的に飲料水に加えることにより実験的大腸癌を発生させた。

(2) BRAK Tg マウスと Wt マウスの尾静脈より 3×10^3 - 2×10^5 の悪性黒色腫の細胞を注入し、一定期間後に肺の黒色腫の数を数えた。また、一部のマウスについては anti-asialoGM1 抗体、あるいは anti-NK1.1 抗体を注入しNK細胞活性を阻害した。

4. 研究成果

(1) アゾキシメタン注射 56 日後のマウスでは BRAK Tg マウスの腫瘍数は Wt マウスの 1/10 であり有意($P < 0.001$)に少なかった。

(2) すべての細胞数において BRAK Tg マウスの方が Wt マウスより肺への転移数が有意に少なく、かつ、生存率が高かった。また、

NK 細胞活性の阻害により Tg マウス、Wt マウスともに転移腫瘍数が激増し、両者における肺転移に NK 細胞が関与している事が明らかにされた。さらに、注入腫瘍細胞数が減少するほど両者の生存率の差は大きくなり、注入細胞数 3×10^3 では Wt マウスの生存率が 50% に対して BRAKTg では 100% であった。ケモカイン CXCL14/BRAK は正常細胞で大量に合成されており、健康人でも BRAKTg レベルの発現をしているヒトが存在したので、今後の副作用のない新しい癌の治療法開発のための有望な分子標的と考えられる。

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 4 件)

畑 隆一郎：再生医療、癌治療とビタミン C。ビタミン 87(11), 査読なし、639-641, 2013.

DOI, URL なし

Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Ikoma T, Kubota E, Izukuri K, Kato Y, Hata R, Lee M-C: Fasudil suppresses fibrosarcoma growth by stimulating secretion of the chemokine CXCL14/BRAK. Journal of Pharmacological Sciences, 査読有り、120, 241-249, 2012.

DOI:10.1254/jphsa.12177FP

Hata R: A new strategy to find targets for anticancer therapy: Chemokine CXCL14/BRAK is a multifunctional tumor suppressor for head and neck squamous cell carcinoma. ISRN Otolaryngology, 査読有り、2012, ID797619, p1-12, 2012.

DOI/10.5402/2012/797619

Ikoma T., Ozawa S., Suzuki K., Kondo T., Maehata Y., Lee MC., Hata R., Kubota E.: Calcium-calmodulin signaling induced by

epithelial cell differentiation upregulates BRAK/CXCL14 expression via the binding of SP1 to the BRAK promoter region. Biochemical Biophysical Research Communications. 査読有り、420,217-222,2012

DOI:10.1016/j.bbrc.2012.01.157

〔学会発表〕(計 21 件)

宮本千央, 生駒丈晴, 小澤重幸, 高橋俊介, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 畑隆一郎, 李 昌一, 前畑洋次郎: 頭頸部扁平上皮癌における ROCK 阻害剤による CXCL14/BRAK を介した抗腫瘍効果の検討. 神奈川歯科大学学会 第 143 回例会, 横須賀, 2014.1.9.

Miyamoto C., Ozawa S., Takahashi S-S., W-Takahashi S., Yoshino F., Lee M-C., Hata R-I., Maehata Y.: Fasudil Suppresses Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Growth by Stimulating Gene Expression and Secretion of the Chemokine CXCL14/BRAK. Pharmacology 2013, London, England, 2013. 12.17-19

近藤忠雄, 小澤重幸, 生駒丈晴, 鈴木健司, 前畑洋次郎, 宮本千央, 畑隆一郎, 久保田英朗: CXCL14 のプロモーターのメチル化は頭頸部扁平上皮癌に対するセツキシマブの抗腫瘍効果に関与する. 神奈川歯科大学学会第 48 回総会, 横須賀, 2013.11.30

畑 隆一郎：再生医療、癌治療とビタミン C 日本ビタミン学会市民公開講座、秋田, 2013.10.19.

Hata R. Sasaki S. Kato Y. Mukaida N: CXCL14/BRAK is a multifunctional tumor suppressor. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10.3-5.

Fukunishi N. Fujimuro M. Hata R. Kurata S: A novel mechanisms of Wnt/beta-catenin

signal activation by p63. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10.3-5.

Hata R, Izukuri K, Kato Y: Tumor-Suppressing Chemokine CXCL14/BRAK is a Cell-Surface Associated Matrix Component. 9th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hong Kong, 2013.9.24-27.

畑 隆一郎, 居作 和人, 加藤 靖正: ケモカイン CXCL14/BRAK は多段階癌抑制分子である. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013.9.20-23

畑 隆一郎, 居作 和人, 加藤 靖正, 佐々木 宗一郎, 向田 直史 : 癌に強くなる遺伝子の 発見 . 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 2013 . 9 . 11-13 .

畑隆一郎, 居作和人, 加藤靖正: PubMed を過信してはいけない . 第 4 5 回日本結合組織学会学術大会・第 6 0 回マトリックス研究会大会合同学術大会, 和歌山, 2013 . 6 . 28-29 .

Hata R, Izukuri K, Kato Y, Takeda K, Kiyono T, Mukaida N, Taniguchi M: Expression of chemokine BRAK/CXCL14 suppresses tumor growth and metastasis NK cell dependently and increases survival rate of tumor-bearing mice. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Maui, Hawaii, USA, 2013. 2. 21-24.

Miyamoto C., Maehata Y, Ozawa S., Ikoma T., Hata R, Lee M-C: ROCK Inhibitor fasudil suppresses growth of fibrosarcoma by stimulating secretion of chemokine CXCL14/BRAK. The EMBO Meeting, Nice, France. 2012. 9. 22-25.

Maehata Y, Ozawa S, Yoshino F, Kobayashi K, Miyamoto C, Kato Y., Hata R, Lee M-C: Reactive oxygen species reduce the production of BRAK/CXCL14 in human head and

neck squamous cell carcinoma cells. The EMBO Meeting, Nice, France, 2012. 9. 22-25.

Hata R, Kato Y, Takeda K, Kiyono T, Mukaida N, Taniguchi M: Expression of CXCL14/BRAK suppresses tumor growth and metastasis and prolongs the life span of tumor-burden mice. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 2012. 9. 19-21.

Katoh I, Fukunishi N, Fujimuro M, Hata R, Kurata S: p63 (TP63) activates Wnt target gene expression by directly interacting with TCF. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 2012. 9. 19-21.

畑隆一郎, 居作和人, 加藤靖正: ケモカイン CXCL14/BRAK は癌細胞の肺転移を抑制する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 郡山, 2012, 9. 14-16.

宮本千央, 前畑洋次郎, 高橋俊介, 吉野文彦, 吉田彩佳, 徳富文彬, 高橋聡子, 畑隆一郎, 李昌一 ROCK 阻害剤(fasudil)による抗腫瘍性ケモカイン(CXCL14/BRAK)の分泌促進作用を応用した新規抗腫瘍療法の研究開発 . 第 54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 郡山, 2012.9.14-16.

前畑洋次郎, 宮本千央, 吉野文彦, 加藤靖正, 吉田彩佳, 高橋聡子, 高橋俊介, 畑隆一郎, 李昌一: 頭頸部扁平上皮癌細胞において酸化ストレスは腫瘍抑制性ケモカイン BRAK/CXCL14の発現を抑制する . 第 54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 郡山, 2012. 9. 14-16.

Hata R, Izukuri K, Kato Y: Expression of chemokine CXCL14/BRAK suppresses tumor cell metastasis. 90th International Association for Dental Research, Iguassu Falls, Brazil, 2012. 6. 20-23.

Hata R: A new strategy to find targets for anticancer therapy: Chemokine CXCL14/BRAK is a multifunctional tumor suppressor. Bit's 5th Annual World Cancer Congress, Beijing, China, 2012.5.18-20.
② Hata R, Izukuri K, Kato Y, Takeda K, Kiyono T, Mukaida N, Taniguchi M: NK cells are indispensable for suppression of tumor growth and metastasis in transgenic mice over-expressing chemokine CXCL14/BRAK. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2012, Chicago, USA, 2012.3.31-4.4.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑 隆一郎 (HATA, Ryu-ichiro)
神奈川県大学・大学院歯学研究科・特任教授
研究者番号：10014276

(2) 研究分担者

前畑 洋次郎 (MAEHATA, Yojiro)
神奈川県大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：80410009

(2) 研究分担者

居作 和人 (IZUKURI, Kazuhiro)
神奈川県大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：90257296

(3) 連携研究者

竹田 和由 (TAKEDA, Kazuyoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：80272821