

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293384

研究課題名(和文) 副作用のない癌抑制法の検討：活性型BRAKによる癌の転移抑制シグナルの解明

研究課題名(英文) Investigation of cancer therapeutic method without side effects: Suppression mechanisms of cancer metastasis on the lung by CXCL14/BRAK

研究代表者

畑 隆一郎 (Hata, Ryu-ichiro)

神奈川県大学・歯学研究科(研究院)・その他

研究者番号：10014276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の死亡原因は主に癌の再発、転移によっている。我々はケモカインCXCL14を野生型(Wt)マウスの10倍程度発現するCXCL14 トランスジェニック(Tg)マウスでは発癌率、移植癌の増殖速度、及び転移がWtマウスより抑制されていることを報告している。本研究では悪性黒色腫(メラノーマ)細胞の肺転移系、及び細胞培養系を用いてCXCL14の転移抑制機構を調べた。その結果、活性化ナチュラルキラー(NK)T細胞の分泌するインターフェロンガンマ、およびこれにより活性化されたNK細胞の分泌するインターフェロンガンマがCXCL14と共同して悪性黒色腫細胞の増殖を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The main cause of Japanese death is due to the recurrence of cancer, and metastasis. We have previously reported that the rate of carcinogenesis, the growth of tumor transplants and metastasis in CXCL14 over-expressed transgenic (Tg) mouse were significantly lower compared with that for isogenic wild type C57BL/6 (Wt) mice. Here we investigated suppression mechanisms of metastasis by CXCL14 using the pulmonary metastasis system of the malignant melanoma cell and the cell culture system. It was found that CXCL14 and interferon- γ (IFN- γ) secreted by the activated natural killer (NK)T cells, and also IFN- γ secreted by activated natural killer cells synergistically suppressed the metastasis of the cells on the lungs.

研究分野：腫瘍抑制機構

キーワード：癌抑制分子 ケモカイン 転移抑制 副作用のない癌抑制法 余命の延長

1. 研究開始当初の背景

がんの治療において解決すべき3つの大きな問題点がある。

治療による副作用の問題とがん細胞の多様性と不均一性、およびこれに起因する治療薬に対し抵抗を示すがんの再発、および転移による死亡率の増加である。

ケモカイン CXCL14 は副作用のない多段階・多機能癌抑制分子である

我々は2006年(Ozawa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res.*)に移植癌の系を用いて、ケモカイン CXCL14/BRAK(以下 CXCL14)が扁平上皮癌である口腔(頭頸部)癌の増殖抑制分子であることを報告した。その後、CXCL14を野生型(Wt)マウスの10倍量発現する、トランスジェニック(Tg)マウスを用いた解析から、腺癌である大腸癌の発癌、扁平上皮癌、腺癌、肉腫を含む種々のがんの増殖、転移を抑制し、悪性黒色腫細胞を注入したマウスの寿命を延ばすこと示した。これらの結果から CXCL14 は多段階・多機能のがん抑制分子であることを明らかにした(Hata *et al.*, *Scientific Repots*, 2015)。また、Tg マウスは、生後2年を経過しても腫瘍抑制作用以外には、形態学的、生化学的検査で Wt マウスと差が無かった。さらに、ヒトとマウスの CXCL14 はアミノ酸配列が酷似しており、機能的にも交換可能であること、健康人にも Tg マウスと同様に高い CXCL14 発現する個体が存在することから、CXCL14 の高い発現はヒトにおいても副作用を示さない癌抑制分子として機能している可能性がある。これらの点から、CXCL14 は、標記の3つの問題点を解決できる有望な分子標的である。

2. 研究の目的

生体内における癌の増殖抑制・転移抑制において、ナチュラルキラー(NK)細胞が重要な働きをしている間接的データは多くあるが、生体内におけるNK細胞による癌抑制の分子機構は不明である。我々はケモカイン CXCL14 が正常細胞に存在する新規の癌増殖抑制分子であることを明らかにしてきた。本研究申請では、CXCL14 を過剰に発現するトランスジェニック(Tg)マウスなどを用いて、CXCL14 がNK細胞の細胞障害作用を活性化して癌の増殖と転移を抑制している機構を明らかにする。特に担癌動物の寿命を決める転移に対する作用について悪性黒色腫(メラノーマ)細胞を用いて検討する。

3. 研究の方法

a. マウスを用いた研究:

1) Wt マウス、あるいは Tg マウスの尾静脈から種々の細胞数の悪性黒色腫細胞を注入し、3週間後の肺への悪性黒色腫の転移巣数を測定した。また、別の実験では細胞を注入後マウスを3ヶ月間飼育し、生存するマウスの匹数を測定した。2) マウスに抗アジアロ GM1 抗体

を注射し、NK細胞を除去したときの肺への転移巣数を測定する。3) マウスに α -Galactosyl-ceramide を注射し、NKT細胞を活性化した場合の転移巣数を測定する。

b. 細胞培養系を用いた研究: 悪性黒色腫(メラノーマ)細胞の CXCL14 遺伝子は完全に不活性化されている。そこで、ドキシサイクリン(Dox)添加により CXCL14 を発現するように細工した(B16-luc2-Tet/OnBRAK)細胞を作成し、Dox 存在下及び非存在下で培養し、さらにインターフェロン- γ (IFN- γ)の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

a. マウスを用いた研究:

1) Wt マウスに比較して Tg マウス肺の悪性黒色腫の転移巣数は、注入する悪性黒色腫細胞を変化させても常に有意に少なく、Tg マウスに於ける転移抑制効果が確認された。Lewis 肺癌細胞においても同様に転移抑制の結果が得られた。また、注入する細胞数を 3×10^3 にすると3ヶ月後の Wt マウスの半分は死亡したが、Tg マウスは100%生存しており、Tg マウスにおける生存率の上昇が見られた(図1)。

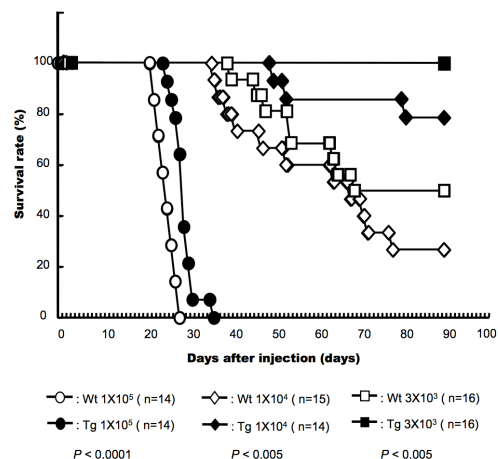


図1 悪性黒色腫細胞の数を変えて注入した時の野生型(Wt)とCXCL14トランスジェニック(Tg)マウスの生存率の比較

2) 抗アジアロ GM1 抗体を注射すると、Wt、Tg マウス共に肺が悪性黒色腫細胞で埋め尽くされ、多くが死亡したことから Tg マウスの転移抑制効果においても Wt マウスと同様にNK細胞が必要であると考えられた。

3) マウスに α -Galactosylceramide を注射し、NKT細胞を活性化すると、Wt マウスでも Tg マウスでも悪性黒色腫細胞の肺転移抑制効果が見られた。また、Tg マウスでは転移抑制効果、及び寿命の延長は α -Galactosylceramide の効果と相乗的であった(図2)。

b. 細胞培養系を用いた研究:

マウスに α -Galactosylceramide を注射すると NKT細胞を活性化し、転移抑制効果が見ら

れた。この際 NKT 細胞は IFN- γ を分泌し、NK 細胞を活性化する。活性化 NK 細胞も大量の IFN- γ を分泌するので、IFN- γ と CXCL14 の悪性黒色腫細胞の増殖に対する効果を調べた。その結果 IFN- γ と CXCL14 は悪性黒色腫細胞の増殖抑制に相乗的に働くことが明らかになった。マウスにおける NK 細胞と CXCL14 の相乗的転移抑制作用は IFN- γ の作用を介している可能性示された。

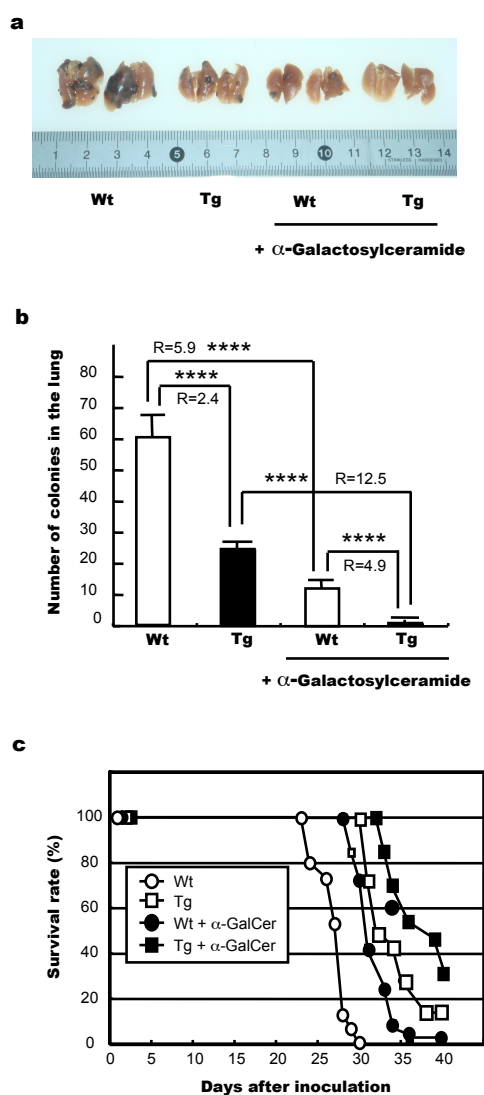


図2 悪性黒色腫細胞の肺への転移は CXCL14 トランスジェニック (Tg) マウスでは野生型 (Wt) マウスより有意に抑制される。 α -Galactosylceramide の注射による NKT 細胞の活性化と CXCL14 の抑制作用は相乗的に作用する。a. 悪性黒色腫細胞注入3週間後の肺の写真 b. 肺への転移巣数への効果 c. マウスの生存率、R は2つの値の比を示す。**** $P < 10^{-4}$

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)

- Kondo, T., Ozawa, S., Ikoma, T., Yang, X. Y., Kanamori, K., Suzuki, K., Iwabuchi, H., Maehata, Y., Miyamoto, C., Taguchi, T., Kiyono, T., Kubota, E. & Hata, R. Expression of the chemokine CXCL14 and cetuximab-dependent tumour suppression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogenesis in press*, doi:10.1038/oncsis.2016.43 (2016). (査読有)
 - Yang, X. Y., Miyamoto, C., Akasaka, T., Izukuri, K., Maehata, Y., Ikoma, T., Ozawa, S., Hata, R. Chemokine CXCL14 is a multistep tumor suppressor. *Journal of Oral Biosciences* **58**, 16-22 (2016). (査読有)
 - Katoh, I., Fukunishi, N., Fujimuro, M., Kasai, H., Moriishi, K., Hata, R. & Kurata, S. Repression of Wnt/beta-catenin response elements by p63 (TP63). *Cell Cycle* **15**, 699-710, doi:10.1080/15384101.2016.1148837 (2016). (査読有)
 - Hata, R., Izukuri, K., Kato, Y., Sasaki, S., Mukaida, N., Maehata, Y., Miyamoto, C., Akasaka, T., Yang, X., Nagashima, Y., Takeda, K., Kiyono, T. & Taniguchi, M. Suppressed rate of carcinogenesis and decreases in tumour volume and lung metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. *Scientific Report* **5**, 9083, doi:10.1038/srep09083 (2015). 査読有)
 - Hata, R., Yang, X. Y., Miyamoto, C., Maehata, Y., Ozawa, S. Production and characterization of cancer resistant mouse: Toward development of molecular preventive medicine of cancer. *The Journal of Japanese Biochemical Society* **87**, 591-596 (2015). (査読有)
 - Miyamoto, C., Maehata, Y., Motohashi, K., Ozawa, S., Ikoma, T., Hidaka, K., Wada-Takahashi, S., Takahashi, S. S., Yoshino, F., Yoshida, A., Kubota, E., Hata, R. & Lee, M. C. Fasudil, a Rho kinase inhibitor, suppresses tumor growth by inducing CXCL14/BRAK in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomedical Research* **35**, 381-388, doi:10.2220/biomedres.35.381 (2014). (査読有)
- [学会発表] (計 31 件)
- Ryu-Ichiro Hata, Kazuhito Izukuri, Yasumasa Kato, Soichiro Sasaki,

- Chihiro Miyamoto, Tetsu Akasaka, Xiaoyan Yang, Yojiro Maehata, Yoji Nagashima, Kazuyoshi Takeda, Tohru Kiyono, Naofumi Mukaida, Masaru Taniguchi: Chemokine CXCL14 is a multistep tumor suppressor. 2015 American Association of Cancer Research Annual Meeting, Philadelphia, PA, 14. 4. 18-4. 22
2. Ryu-Ichiro Hata, Tadanori Kondo, Shigeyuki Ozawa, Takeharu Ikoma, Kenji Suzuki, Hiroshi Iwabuchi, Yojiro Maehata, Chihiro Miyamoto, Xiaoyan Yang, Eiro Kubota: EXPRESSION OF THE CHEMOKINE CXCL14 IS A PREDICTIVE BIOMARKER FOR CETUXIMAB-DEPENDENT TUMOUR SUPPRESSION 1st *Nature Immunology - Cellular & Molecular Immunology* Joint Conference. Hefei, 2015, 6. 17-6. 20
 3. Xiaoyan Yang, Kazuhito Izukuri, Yasumasa Kato, Soichiro Sasaki, Naofumi Mukaida, Yojiro Maehata, Chihiro Miyamoto, Tetsu Akasaka, Ryu-Ichiro Hata: PRODUCTION OF CANCER RESISTANT MICE BY INTRODUCING CHEMOKINE CXCL14 GENE INTO THE WILD TYPE C57BL/6 (WT) MICE. 1st *Nature Immunology - Cellular & Molecular Immunology* Joint Conference. Hefei, 2015, 6. 17-20.
 4. Miyamoto C., Ozawa C., Ikoma T., Izukuri K., Hata R., Maehata Y.: Rho Kinase (ROCK) Inhibitor Fasudil Suppresses Head and Neck Squamous Carcinoma Growth by Stimulating Gene Expression and Protein Secretion of the CXCL14/BRAK. The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting, Bangkok, 2016. 2. 3
 5. Yojiro Maehata, Chihiro Miyamoto, Fumihiko Yoshino, Shigeyuki Ozawa, Shun-suke Takahashi, Satoko Wada-Takahashi, Ayaka Yoshida, Kazuhito Izukuri Ryu-Ichiro Hata, Keiichi Tsukinoki: Scavenger of reactive oxygen species is effective for the inhibition of angiogenesis and tumor proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma cells by regulation gene expression of chemokines. The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting, Bangkok, 2016. 2. 3.
 6. Xiaoyan Yang, Chihiro Miyamoto, Kazuhito Izukuri, Tetsu Akasaka, Yojiro Maehata, Yasumasa Kato, Ryu-Ichiro Hata: Synergistic effects of chemokine BRAK and NKT cells on the suppression of metastasis on the lung. 第47回日本結合組織学会学術大会, 東京, 150515-16.
 7. 陽暁艶, 宮本千央, 居作和人, 前畑洋次郎, 赤坂徹, 加藤靖正, 畑隆一郎: がんの肺転移抑制におけるケモカインBRAKとNKTとの相互作用. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2015. 9. 11-13.
 8. 生駒丈晴, 小澤重幸, 鈴木健司, 岩淵博史, 陽暁艶, 宮本千央, 前畑洋次郎, 畑隆一郎: ケモカインCXCL14の発現がセツキシマブ(抗上皮増殖因子受容体抗体)の腫瘍抑制活性を決定する. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2015. 9. 11-13.
 9. 加藤伊陽子, 畑隆一郎, 倉田俊一: p63はTCF/ β カテニンによる遺伝子発現を抑制する. 第74回日本癌学会 名古屋、2015. 10. 9.
 10. 倉田俊一, 畑隆一郎, 加藤伊陽子: p63 (TP63)はTCF/ β カテニンによる遺伝子発現誘導を制御する. 第88回日本生化学会(第38回日本分子生物学会との共同開催)
 11. 生駒丈晴, 小澤重幸, 鈴木健司, 岩淵博史, 陽暁艶, 宮本千央, 前畑洋次郎, 畑隆一郎: ケモカインCXCL14の発現がセツキシマブ(抗上皮増殖因子受容体抗体)の腫瘍抑制活性を決定する. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2015. 9. 11-13.
 12. 加藤伊陽子, 畑隆一郎, 倉田俊一: p63はTCF/ β カテニンによる遺伝子発現を抑制する. 第74回日本癌学会 名古屋、2015. 10. 9.
 13. 倉田俊一, 畑隆一郎, 加藤伊陽子: p63 (TP63)はTCF/ β カテニンによる遺伝子発現誘導を制御する. 第88回日本生化学会(第38回日本分子生物学会との共同開催)
 14. 畑隆一郎: 再生医療におけるビタミンC

- 誘導体の可能性. 第 160 回 FJ セミナー「プロビタミン C の未来」東京, 2014. 8. 26.
15. 畑隆一郎: 癌の分子標的治療から分子標的予防医学へ. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会シンポジウム (オーガナイザー: 畑隆一郎). 福岡, 2014. 9. 25.
 16. 畑隆一郎: 「癌に強いマウスの作成」第 87 回日本生化学会フォーラム「治療医学から分子予防医学へ」(オーガナイザー: 原孝彦, 畑隆一郎). 京都, 2014. 10. 18.
 17. Miyamoto C, Ozawa T, Ikoma T, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S, Yoshida A, Yoshino F, Hata R, Lee M-C, Maehata Y, ROCK specific inhibitor fasudil suppresses head and neck squamous carcinoma growth by stimulating gene expression and protein secretion of the CXCL14/BRAK, FEBS-EMBO 2014 Conference, Paris, France, 2014. 8. 30-9. 4.
 18. Hata R., Izukuri K., Kato Y., Maehata Y., Miyamoto C., Akasaka T., Kiyono T.: Expression of chemokine CXCL14/BRAK whether in melanoma cells or in non-tumor cells in the environment suppresses metastasis to the lung. Heidelberg. 2014. 6. 28-7. 1.
 19. 畑隆一郎, 居作和人, 加藤靖正, 前畑洋次郎, 宮本千央, 赤坂徹, 佐々木宗一郎, 向田直史: 微小環境が発癌, 癌の進展を制御する: 癌に強いマウスの作製. 第 46 回日本結合組織学会学術大会・第 61 回マトリックス研究会大会合同学術大会, 名古屋, 2014. 6. 5-7.
 20. 陽暁艶, 宮本千央, 赤坂徹, 居作和人, 前畑洋次郎, 畑隆一郎: ケモカイン CXCL14/BRAK は多段階癌抑制分子である: CXCL14/BRAK トランスジェニックマウスを用いた検討. 神奈川歯科大学学会第 143 回例会, 横須賀, 2014. 1. 9.
 21. 宮本千央, 生駒丈晴, 近藤忠雄, 小澤重幸, 畑隆一郎, 久保田英朗, 前畑洋次郎: 頭頸部扁平上皮癌における抗腫瘍ケモカイン CXCL14/BRAK の局在を標的とした新規多剤併用療法の研究開発. 神奈川歯科大学学会 第 143 回例会, 横須賀, 2014. 1. 9.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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
 25. 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.
 26. 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.
 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.
 28. Kato I. 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.
 29. 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, and 2013. 10. 3-5.
 30. 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寄与する. 神奈川歯科大学学会第 48 回総会, 横須賀, 2013. 11. 30.
 31. 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.

〔図書〕（計 1 件）

1. 畑隆一郎 活性持続型ビタミンC(Asc 2-P)による細胞分化と組織形成の制御. pp. 1-15. 伊東忍, 二木鋭雄, 畑隆一郎 (共著): プロビタミンC, フレグランスジャーナル, 東京, 2014.

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：頭頸部癌抑制剤及び医薬組成物

発明者：畑 隆一郎 他

権利者：神奈川歯科大学

種類：特許

番号：特許第 480561 号

取得年月日：平成 23 年 8 月 19 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑隆一郎 (HATA RYUI-ICHIRO)

神奈川歯科大学・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 YOJIROU)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：80410009

居作和人 (IZUKURI KAZUHITO)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：90257296

赤坂徹 (AKASAKA TETSU)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60316263

宮本千央 (MIYAMOTO CHIHIRO)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・

特別研究員

研究者番号：50633963

(3) 連携研究者

竹田和由 (TAKEDA KAZUYOSHI)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80272821

向田直史 (MUKAIDA NAOFUMI)

金沢大学・がん伸展制御研究所・教授

研究者番号：30182067