

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463101

研究課題名(和文) DNAメチル化阻害による抗腫瘍因子BRAKの発現制御を介した新規口腔癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of a new oral cancer treatment via regulation of the anti-tumor factor BRAK expression with DNA methylation inhibitors.

研究代表者

前畑 洋次郎(MAEHATA, YOJIRO)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80410009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔扁平上皮癌(HNSCC)を用いてDNAメチル化阻害作用を持つエピガロカテキンガレート(EGCG)による、抗腫瘍ケモカインCXCL14/BRAKの発現上昇作用を検討した。その結果、EGCGは有意なBRAKの発現上昇を示さなかった。そこで、より強力なメチル化阻害剤であるデシタピンを用いて検討した。その結果、BRAKの発現上昇に伴いHNSCCの増殖抑制作用がin vivoで確認された。本研究結果から、メチル化阻害剤もしくはメチル化阻害作用をもつ天然由来成分を用いてBRAK遺伝子発現を上昇させ腫瘍増殖の抑制を期待することは、口腔癌治療戦略において非常に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effect of anti-tumor activity via upregulation of CXCL14/BRAK expression by treatment of the epigallocatechin gallate (EGCG) in oral squamous cell carcinoma (HNSCC). As a result, EGCG did not show significantly increased expression of BRAK. Therefore, we examined the effects of DAC on expression of BRAK by using a potent methylation inhibitor decitabine. As a result, we confirmed the inhibitory effect of tumor growth via upregulation of BRAK in vivo. These data indicate that it is very useful in oral cancer treatment strategy by using the methylation inhibitors or natural products with a methylation inhibitory effect.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：口腔癌 CXCL14/BRAK

1. 研究開始当初の背景

癌細胞では癌抑制遺伝子の DNA がメチル化を受け発現が抑制されることが広く報告されており発癌や癌進展の重要な因子と考えられている。(Wood, L. D. *et al.*; Science, 2007) 我々は、口腔扁平上皮癌細胞 (HNSCC) において新規ケモカイン BRAK が抗腫瘍作用を有するが、多くの HNSCC においては DNA メチル化により BRAK の遺伝子発現が抑制されていることから、BRAK の遺伝子発現回復による新たな遺伝子治療の可能性を報告してきた (Y. Maehata, *et al.*: Free Radical Res., 2010)。

従来、メチル化阻害薬は米国などで口腔癌治療にも応用されたが、消化器毒性や骨髄毒性などの重篤な副作用があることから、現在ではほとんど癌治療に使われていない。近年、抗酸化作用および抗炎症作用を持つ緑茶由来のエピガロカテキンガレート (EGCG) が抗腫瘍作用も示すことが報告された (Lu J *et al.*, Semin Cancer Biol, 2007)。さらに扁平上皮癌細胞において EGCG は DNA メチル化阻害作用により癌抑制遺伝子の発現を回復し抗腫瘍作用を発揮することも明らかとなっている。(ijayalakshmi *et al.*, carcinogenesis, 2011)

2. 研究の目的

本研究課題では、重篤な副作用が無く、DNA メチル化阻害作用をもつ EGCG を用いて抗腫瘍因子 BRAK の遺伝子発現を回復させ、口腔扁平上皮癌に対しての抗腫瘍効果を期待する新規癌治療の開発を目的としている。

3. 研究の方法

平成 25 年度は口腔扁平上皮癌細胞 (HNSCC) における BRAK 遺伝子の発現低下と DNA のメチル化の関係を詳細に検討し、平成 26 年度以降に実施する

EGCG による BRAK 遺伝子発現回復作用および腫瘍進展への影響の検討で使用する BRAK 遺伝子がメチル化された HNSCC 細胞を樹立した。

実験 25-1: 種々の HNSCC における BRAK 遺伝子のメチル化の測定

歯肉、舌および口腔底由来の種々の HNSCC を培養後に、DNA を回収し、Methylamp™ Global DNA methylation Quantification kit を用いて DNA の総メチル化レベルを測定した。

実験 25-2: BRAK のメチル化に關与するメチルトランスフェラーゼ活性の測定

実験 25-1 で BRAK 遺伝子のメチル化による発現抑制が確認された HNSCC を播種し、細胞を回収し DNA のメチル化に關与する Total DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) 活性を Epigenetic DNMT Activity Assay Kit を用いて測定した。

実験 26-1 : HNSCC における EGCG 処理による BRAK 発現回復作用の検討

実験 25-1 で BRAK 遺伝子のメチル化による発現抑制が確認された HNSCC を播種し、EGCG を 24-72 時間処理後に BRAK の遺伝子発現を qPCR 法を用いて検討した。また、タンパク質レベルでの検討として細胞内外の BRAK タンパク質について ELISA 法を用いて検討した。(以降、EGCG 処理により BRAK の発現回復に有意差が認められなかったため、当初の改善策に従い、より強力なメチル化阻害作用をもつデシタピン (DAC) を用いて、メチル化の阻害による BRAK の発現回復が腫瘍の増殖抑制に寄与するか検討した。)

実験 26-1 : HNSCC における DAC 処理による BRAK 発現回復作用の検討

実験 25-1 で BRAK 遺伝子のメチル化による発現抑制が確認された HNSCC を播種し、DAC を 24-72 時間処理後に BRAK の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

実験 26-2 : DAC 処理による BRAK 遺伝子発現回復メカニズムの検討

実験 26-1 で DAC 処理により BRAK 遺伝子の発現が確認された HNSCC を培養後に細胞を回収し, DNMT タンパク質レベルを qPCR 法および Western Blot 法を用いて測定する。さらに, HNSCC 細胞の BRAK 遺伝子のメチル化レベルをメチル化特異的 PCR 法にて検討し, DAC が BRAK 遺伝子のメチル化を回復することを確認した。

4 . 研究成果

平成 25 年度は, 口腔扁平上皮癌細胞 (HNSCC) における BRAK 遺伝子の発現低下と DNA のメチル化の関係性を詳細に検討し, 平成 26 年度以降に実施する EGCG による BRAK 遺伝子発現回復作用および腫瘍進展への影響の検討で使用する BRAK 遺伝子がメチル化された HNSCC 細胞 (mBRAK 細胞) を樹立した。

平成 26 年度は, mBRAK- Cells における EGCG のメチルトランスフェラーゼ阻害作用および BRAK の発現回復作用を検討したところ, 有意なメチルトランスフェラーゼ活性の抑制および BRAK 遺伝子の発現回復は確認できなかった。EGCG 等の天然由来成分のメチル化阻害作用があることが報告されているが, 本研究では有意な効果が得られなかった。そこで, 実験が計画通り進行しなかった場合の対策として, 強力なメチル化阻害作用を持つデシタピン (DAC) などを用いて, 本研究の仮説が適切であったか検討を行うことを想定していた。そこで, mBRAK 細胞における DAC のメチル化阻害時の BRAK の発現, および腫瘍増殖に及ぼす影響を検討し, DAC 添加によりメチルトランスフェラーゼ阻害作用に伴い BRAK の遺伝子発現の有意な回復作用, および *in vivo* において DAC 投与により BRAK 遺伝子の発現回復作用に伴い腫瘍増殖が有意に抑制することを見出し

た。平成 27 年度は, mBRAK 細胞 を用いて BRAK 遺伝子発現回復作用を持つ DAC が, BRAK 遺伝子発現抑制の主要な経路と考えられる上皮成長因子 (EGFR) シグナル経路の阻害剤を併用した際にその作用を増強するか検討した。その結果, 口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2,3,4) において, EGFR シグナル経路の阻害剤 (iAkt, iMEK, iERK) の BRAK 遺伝子の発現促進作用を優位に増強することが確認された。今後は, セツキシマブ等の口腔癌治療に用いられる EGFR 経路の阻害剤を用いて, *in vivo* で BRAK 遺伝子の発現回復, 腫瘍増殖抑制作用の増強が確認されるか引き続き検討が必要である。本研究を通して, EGCG 等の天然由来成分にメチル化阻害作用は DAC 等のメチル化阻害剤と比べて弱いため, 本研究では有意な効果が得られなかった。EGCG の添加時の試薬調整, 添加方法の幅広い再検討, 他のカテキン類誘導体を用いた検討, およびイソフラボン等のメチル化阻害作用を持つ他の天然由来成分の検討が必要である。しかし, メチル化阻害により BRAK 遺伝子発現を回復させ腫瘍増殖の抑制を期待する戦略は, DAC を用いた実験結果から口腔癌治療において非常に有用であると考えられる。

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)

Kondo T, Ozawa S, Takeharu Ikoma T, Yang Xiao-Yan, Knamori K, Suzuki K, Iwabuchi H, Maehata Y, Miyamoto C, Taguchi T, Kiyono T, Kubota E, Hata R-I, Miyamoto2,3, Takahide Taguchi, Tohru Kiyonos, Eiro Kubota, and Ryu-Ichiro Hata :Expression of the chemokine CXCL14 and cetuximab-dependent tumor suppression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogenesis, in press, 2016.*

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 Reports 2015 Mar 13;5:9083.

Miyamoto C, **Maehata Y** (equal to 1st author, Corresponding author), Motohashi K, Ozawa S, Ikoma T, Kouki H, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S, Yoshino F, Yoshida A, Kubota E, Hata R-I, 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(6): 381-388, 2014.

Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, **Maehata Y**, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. Cancer Cell Int. 2013 Sep 3;13(1):89.

〔学会発表〕(計7件)

宮本千央, **前畑洋次郎**, 小澤重幸, 生駒文晴, 畑隆一郎, 李昌一: 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 神奈川歯科学会総会 横須賀, 2014. 11.30

C Miyamoto, S Ozawa, SS Takahashi, SW Takahashi, F Yoshino, MC Lee, RI Hata, **Y Maehata**: Fasudil Suppresses Head and Neck Squamous Carcinoma Growth by Stimulating Gene Expression and Secretion of the Chemokine CXCL14/BRAK, Phamavology 2013, London, 2013.

Maehata Y, Kobayashi k, Miyamoto C, Takahashi S-S, Yoshino F, Takahashi-wada S, Yoshida A, Masaichi C.-I. Lee, The novel collagen peptide reduced the photo-aging induced by UVA irradiation, FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 2014.8.30-9.4.

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.

宮本千央, **前畑洋次郎**, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 李昌一: ROCK 阻害剤 Fasudil の頭頸部扁平上皮癌における CXCL14/BRAK を介した抗腫瘍効果の検討. 第56回 歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡市, 福岡, 2014.9. 25-17.

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, 2016.2.1-3.

Maehata Y, Miyamoto C, Yoshino F, Ozawa S, Takahashi SS, Wada-Takahashi S, Yoshida A, Izukuri K, Hata R, Tsukinoki K, 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, 2016.2.1-3.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：