

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861982

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌における新規分子検索法を用いたサイトカインBRAKの転写因子解析

研究課題名(英文) Search of transcription factor for BRAK by using new method in Head and neck carcinoma

研究代表者

生駒 丈晴 (Ikoma, Takeharu)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10638290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでにサイトカインBRAKの遺伝子発現にはBRAKのプロモーター領域に存在するCpG islandが重要であると報告してきた。また転写因子SP1がCpG islandに結合することでBRAKの遺伝子発現上昇することを明らかにした。今回我々はBRAKの遺伝子発現低下に関与する転写因子の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that CpG island in the BRAK promoter region are associated with the expression of BRAK. In addition, we revealed that binding of transcription factor SP1 to a CpG island upstream of the BRAK transcription start site. In this research, we analyzed that the transcription factor of down-regulate the expression of BRAK.

研究分野：歯学

キーワード：BRAK 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

近年細胞生物学分野の発展は目覚ましく、分子生物学・生化学的手法の導入により発生や疾患などの現象を細胞内での遺伝子発現調節メカニズムで証明するまでに至っている。細胞は主にたんぱく質によって発現調節を受けており、そのたんぱく質の発現に直接関与する分子が転写因子である。従来の転写因子の検索は、まず、ターゲットとなる分子の転写開始点数千～数万bp上流までの配列を認識し、プロモーター領域を段階的に欠如させた無数のプロモーターベクターを作製後、転写因子結合配列の領域を狭めていくものであった(転写因子結合配列の変異実験を含め)。その後その配列からChIPアッセイなどで結合しうる転写因子の同定を行う非常に根気の要する研究であった。

我々は頭頸部扁平上皮癌が細胞接着により一過的に増殖能低下を示すとき、サイトカインCXCL14/BRAK(以下CXCL14)の発現は上昇し、発現上昇に関与する転写因子SP1が結合する部位は転写開始領域より約15bp上流に存在するCpG islandであることを見出した。子の転写因子検索では、マイクロアレイによる網羅的解析をナラプロテクノロジーによるデータマイニングを応用して、効率の良い発現調節に関与する転写因子の検索法の開発に成功した。一方、我々は頭頸部扁平上皮癌細胞にEGFを添加し培養すると、癌細胞は著しい増殖と同時にCXCL14発現低下を示した。発現低下に関与するシグナル伝達経路はMEK-ERKもしくはAKTの経路であることまでは明らかになったが最終的な転写因子に関しては通常の転写因子検索法では抽出できないのが現状である。我々は頭頸部扁平上皮癌に対してCXCL14のプロモーター領域のメチル化有無のマーカーとした新たな分子標的治療法の開発を目的としている。

これまでの研究結果から、頭頸部扁平上皮癌でCXCL14の発現頻度を検討すると、約65%の割合でCXCL14の発現は消失していた。消失の原因はCXCL14のプロモーターであるCpG islandのメチル化による不活性化であるため、EGF受容体阻害剤を投与してもCXCL14の発現回復は確認されなかった。一方、メチル化している癌細胞はすべてEGF受容体阻害剤でCXCL14の発現は回復し、CXCL14の抗腫瘍効果を示す結果を同研究チームにおいて以前に報告している。また我々はこれまでの研究でCXCL14のプロモーター領域がメチル化している頭頸部扁平上皮癌細胞に、脱メチル化剤であるアザシチジンが抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。さらに脱メチル化剤による転写因子の結合が可能となったCXCL14のプロモーターへ発現低下に関与する転写因子の結合を防ぐためゲフィチニブ(EGF受容体阻害剤)でEGF受容体シグナルを遮断したところアザシチジン単剤と比較し、CXCL14の発現上昇に伴い著しい腫瘍縮小効

果が確認された。我々の最終目標は頭頸部扁平上皮癌に対して、アザシチジンとEGF受容体阻害剤を用いた新たな併用療法を開発することであり、この研究は我々のターゲットとするCXCL14の分子メカニズムの解明を担う重要なものである。

## 2. 研究の目的

エピジェネティクスの研究が進むにつれて、その異常の蓄積が癌の発生、進展に深く関与することが明らかになっている。我々はこれまでに、頭頸部扁平上皮癌に対しサイトカインCXCL14/BRAKが抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。さらにCXCL14が発現している細胞としていない細胞を群分けし、EGFR阻害剤の効果を検討したところ、CXCL14の遺伝子発現が確認される癌細胞ではEGFR阻害剤で抗腫瘍効果が得られた。CXCL14が発現していない理由としては、CXCL14のプロモーターであるCpG islandのメチル化が原因であり、同部位に結合する転写因子はSP1であることを見出した。一方EGFによって発現低下する転写因子はいまだに不明である。我々はCXCL14のプロモーター領域のメチル化及び発現に関与する転写因子に着目した新たな抗がん剤の併用療法を目的としておりEGF受容体シグナルで発現低下に関与する転写因子の解明が、今後我々が行うべき課題である。

## 3. 研究の方法

EGF受容体シグナルによるCXCL14遺伝子発現低下に関与するサイレンサーの候補分子のスクリーニング：これまでに我々はCXCL14の遺伝子発現上昇に関与する転写因子の結合配列が、転写開始点より上流15bpに存在するCpG islandであることを見出した。癌形成に寄与するエピジェネティクス異常の一つである異常メチル化は、今回我々が取り組むCXCL14プロモーター領域においても確認されている。CXCL14が発現している。CXCL14が発現している頭頸部扁平上皮癌(プロモーターがメチル化していない細胞)であるHSC-3を用いて、CXCL14のプロモーター領域に結合し発現上昇に寄与する転写因子がSP1であることをナラプロテクノロジーとの共同研究で明らかにした。そこで同様の方法を用いてCXCL14の遺伝子発現低下に関与する転写因子の検索を行った。具体的な検索方法としてはCXCL14のプロモーターがメチル化していない頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて、無血清培養下でEGFを培地に添加し、6、9さらに24時間後と時間経過を追いRNAを回収する。その後ドラゴンジェネミクスセンター(タカラバイオ株式会社)の受託サービスにてマイクロアレイ解析を行う。マイクロアレイ結果を時間経過でクラスタリング解析し、CXCL14と共に時間依存的に発現変化を示す遺伝子の抽出・群分けを行う。クラスタリング解析

のデータに基づき、ナラプロテクノロジーズとの共同で、論文などより収集した既知のシグナル回路からCXCL14の発現低下に関わる可能性のあるシグナル伝達経路を統計処理で予測を行う(例として：分子A及び分子BがEGFによりCXCL14と同様の時間的発現変動を示し、この2つの分子を制御するシグナル経路を収集した情報より割り出した後、共通しているシグナル部分がCXCL14の発現調節にも関与している可能性がある)。得られた情報からの各遺伝子発現状態についてリアルタイムPCR法を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

頭頸部扁平上皮癌細胞株 HSC-3 を、CXCL14 の遺伝子発現低下させる刺激(EGF 刺激)を加え、培養した。その後 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析及び BRAK の遺伝子発現低下に関与する転写因子を同定するためのデータマイニングを行うこととした。マイクロアレイの解析結果としては、EGF 刺激による培養で発現上昇を示す遺伝子は 473 個、発現が低下する遺伝子は 442 個存在した。また EGF 刺激による培養刺激で遺伝子発現が変動した遺伝子群を癌関係(295, 284)、細胞増殖(18, 11)、細胞骨格(25, 22)、細胞接着(23,17)、転写因子(78, 34)、細胞周期(55, 14)、アポトーシス誘導因子(29, 32)、ネクローシス誘導因子(1, 2)に群分けした(各項目前者は発現が上昇した遺伝子数、後者は発現が低下した遺伝子数を示す)。それぞれの遺伝子の発現制御に関わるシグナル伝達経路を、KEGG PATHWAY 等を参考にした上で BRAK のプロモーター領域に結合しうる転写因子を抽出した。ナラプロテクノロジーズのデータマイニングによる転写因子の抽出結果が正しいかどうかを検討するため、抽出された転写因子に特異的な Sh-RNA を HSC-3 細胞に導入することで確認を行っている。現在論文作成中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Miyamoto C, Maehata Y(equal to 1st author, Corresponding author), Motohashi K, Ozawa S, Ikoma T, Hidaka K, Wada-Takahashi S, Takahashi 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 Res*, 2014 35(6):381-8. doi: 10.2220/biomedres.35.381.

〔学会発表〕(計5件)

近藤忠雅、小澤重幸、生駒丈晴、鈴木健司、久保田英朗. CXCL14のメチル化異常に着目したセツキシマブの抗腫瘍効果判定のための基礎的研究第59回日本口腔外科学会総会・学術大会2014年10月17-19日千葉千葉市幕張メッセ

Miyamoto C, Ozawa S, Ikoma T, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Yoshida A, Yoshino F, Hata RI, Lee MC, Maehata Y: ROCK Specific Inhibitor Fasudil Suppresses Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Growth by Stimulating Gene Expression and Protein Secretion of the Chemokine CXCL14/BRAK. *FEBS-EMBO* 2014. 8. 30 -9.04 Paris, FR.

小澤重幸、近藤忠雅、生駒丈晴、鈴木健司、久保田英朗. セツキシマブに脱メチル化剤を併用する意義についての基礎的研究第68回日本口腔科学会学術集会2014年5月7-9日東京新宿京王プラザホテル

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.

小澤重幸、近藤忠雅、生駒丈晴、鈴木健司、久保田英朗. セツキシマブによる抗腫瘍性ケモカイン BRAK の発現上昇メカニズムの解明第58回日本口腔外科学会総会・学術大会2013年10月11-13日福岡県福岡市福岡国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：無  
発明者：無  
権利者：無  
種類：無  
番号：無  
出願年月日：無  
国内外の別：無

取得状況(計0件)

名称：無  
発明者：無  
権利者：無  
種類：無  
番号：無  
出願年月日：無

取得年月日：無  
国内外の別：無

〔その他〕

ホームページ等：無

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

生駒丈晴 (IKOMA, Takeharu)  
神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・助教  
研究者番号：1 0 6 3 8 2 9 0

### (2) 研究分担者

無  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

無  
研究者番号：