

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2 5 年 5 月 2 9 日現在

機関番号：32703  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22390353  
 研究課題名（和文） 新規癌抑制性ケモカインBRAK/CXCL14の発現制御と腫瘍抑制の分子機構  
 研究課題名（英文） CXCL14/BRAK is a multifunctional tumor suppressor  
 研究代表者  
 畑 隆一郎 (HATA RYU-ICHIRO)  
 神奈川歯科大学・歯学部・特任教授  
 研究者番号：10014276

## 研究成果の概要（和文）：

癌は多段階で進展（悪性化）する。我々は口腔癌細胞を用いて、白血球をよびあつめる作用を持つ分子群（ケモカイン）の1つである BRAK/CXCL14(BRAK)が、口腔癌細胞の増殖を抑制する癌抑制分子であることを世界で初めて報告した。本研究では BRAK を野生型マウスの 10 倍量発現するトランスジェニック (Tg) マウスの癌進展過程における作用を調べ、Tg マウスが、発癌過程、癌細胞の増殖過程、及び転移過程のすべての段階で抑制作用を示すことを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Objectives: The aim of this study was to determine whether or not chemokine BRAK/ CXCL14 transgenic (Tg) mice would show resistance to carcinogenesis, tumor growth and tumor metastasis. Methods: Wild type C57BL/6 (Wt) or Tg mice were injected intraperitoneally with 12 mg/kg body weight azoxymethane followed by intermittent addition of 3 % dextran sodium sulfate in the drinking water. We also injected tumor cells subcutaneously or via a tail vein of the mice. Results: No difference of body weight was observed between Wt and Tg mice but the rate of colorectal cancer was nearly ten times higher ( $P<0.001$ ) in Wt mice than in Tg ones. Size of transplanted tumors and the number of metastatic foci on the lung of the animals were always significantly lower in the Tg than those in the Wt. Survival rates of the melanoma cell injected Tg mice were significantly higher than those of Wt. Conclusion: The Tg mice showed resistance to carcinogenesis, tumor growth and tumor cell metastasis, indicating BRAK/ CXCL14 has multifunctional effects on tumor suppression.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：腫瘍抑制機構

科研費の分科・細目：歯学・実験腫瘍学

キーワード：癌抑制因子、ケモカイン、転移抑制、副作用のない癌抑制法

## 1. 研究開始当初の背景

上皮増殖因子受容体 (EGFR) 阻害剤のゲフィチニブ (イレッサ) は BRAK の発現を介して腫瘍進展抑制をする :

BRAK の発現と腫瘍抑制の関係を明らかにするために、HSC-3 細胞をマウス背部に移植後、EGFR 阻害剤 (イレッサ) を飲ませると、腫瘍内の BRAK mRNA の発現上昇に伴って、腫瘍の縮小が起こった。一方、BRAK mRNA の上昇しない細胞の腫瘍は縮小しなかった。このことから正常細胞に見られるような BRAK 遺伝子の発現レベルの上昇は *in vivo* における癌細胞の増殖抑制を起こすことが明らかとなった (Ozawa, Kato, Hata et al., Cancer Sci. 2009)。

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 (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・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と考えられた。移植腫瘍の増殖・進展の抑制は 3 系統の Tg マウスで観察されたので、腫瘍の進展抑制は BRAK 遺伝子 導入によるホスト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る (鈴木健司, 居作和人, 畑隆一郎他, 第 54 回日本口腔外科学会学術大会発表)。また、我々の結果は BRAK が頭頸部癌だけでなく、肺癌, 悪性黒色腫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

新規癌抑制因子 BRAK の発現制御と腫瘍抑制

の分子機構:多機能分子である BRAK の腫瘍抑制, 転移抑制機構を明らかにするために以下の 3 つの項目に重点を絞って研究を行う。

- (1) BRAK の遺伝子発現制御の分子機構
- (2) 我々が作成した BRAKTg マウスの癌抑制機構、および(3) 癌の転移の抑制機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) BRAK の遺伝子発現制御の分子機構 : 頭頸部癌 (口腔癌) 細胞である HSC-2 あるいは HSC-3 細胞を用いて、種々の外部刺激に対する細胞の BRAK 遺伝子の発現とその機構、特に細胞内の腫瘍シグナル伝達系である MAP キナーゼの関与について調べた。

(2) BRAK/CXCL14 トランスジェニックマウスの癌抑制機構 :

BRAK を野生型 C57BL/6 (Wt) マウスの胚に導入し、野生型マウス (血中 BRAK 量およそ 1ng/mL) の 10 倍量 (8-14 ng/mL) の BRAK を発現している 3 系統のトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、癌の進展に対する作用を調べた。

(3) Tg マウスの癌転移抑制機構 : 癌細胞を尾静脈より注入し (実験的肺転移)、マウス肺の腫瘍数と、マウスの寿命への影響を調べ、さらに、その機構を調べた。

## 4. 研究成果

(1) BRAK の遺伝子発現制御の分子機構 : ERK MAP キナーゼの活性化 (リン酸化) は BRAK 遺伝子の発現を抑制し、一方、p38 MAP キナーゼの活性化は BRAK 遺伝子の発現を促進した。さらに ERK と p38 δ との相互作用が BRAK 遺伝子の発現制御に重要な働きをしていることが明らかになった (図 1)。

(2) BRAKTg マウスの癌抑制機構 : BRAKTg が、発癌過程、癌細胞の増殖過程、及び転移過程の 3 つのすべての過程を抑制することを明らかにした。

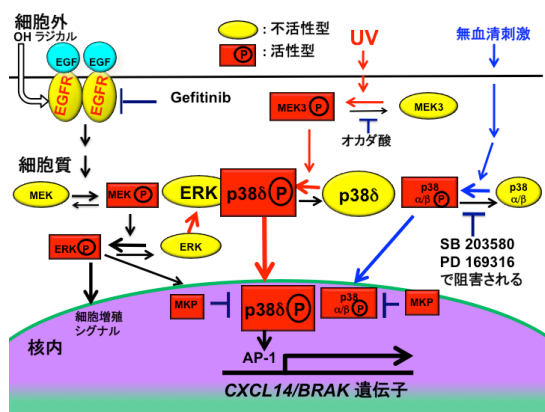


図 1. 種々の刺激による BRAK 遺伝子発現制御の分子機構

### (3) Tg マウスの癌転移抑制機構:

悪性黒色腫細胞を注入したすべて例において 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、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 千では Wt マウスの生存率が 50% に対して Tg マウスでは 100% であった。また、Tg マウスの肺転移抑制は NK 細胞の存在に依存していた。

BRAK<sup>Tg</sup> マウスは 2 年経過しても形態的、組織学的異常を示さないため、BRAK は癌の抑制分子として副作用のない治療法開発のための分子標的として有用であろう。

### 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 15 件)

主要なもののみを記載

1. 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*, 査読あり, 2012, ID797619, p1-12, 2012.

(<http://www.hindawi.com/isrn/otolar yngology/2012/797619/>)

2. 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*, 査読あり, 120, 241-249, 2012. ([https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/120/3/120\\_12177FP/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/120/3/120_12177FP/_article))
3. 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*, 査読あり, 420, 217-222, 2012. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.157>)
4. 畑 隆一郎: MAP キナーゼのサブタイプ特異的シグナルクロストークによるがん抑制性ケモカイン CXCL14/BRAK の発現制御. *生化学*, 査読あり, 83(8):731-736, 2011. ([www.jbsoc.or.jp/event/magazine/pdf/83-08-06.pdf](http://www.jbsoc.or.jp/event/magazine/pdf/83-08-06.pdf))
5. Yamamoto T, Yamashita A, Yamada K, Hata R.: Immunohistochemical localization of chemokine CXCL14 in rat hypothalamic neurons. *Neurosci Lett*. 査読あり, 487(3): 335-340, 2011. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.051>)
6. Fukunishi N, Katoh I, Tomomori Y, Tsukinoki K, Hata R, Nakano A, Ikawa

- Y, Kurata S: Induction of dNp63 by the newly identified keratinocyte-specific transforming growth factor  $\beta$  signaling pathway with smad2 and I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  in squamous cell carcinoma. *Neoplasia*, 査読あり, 12(12): 969-979, 2010. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003132/>)
7. Yajima N, Izukuri K, Hata R: Production of conditional knockout mice for chemokine BMAC/cxcl14 gene by Cre/loxP system. *Inflammation and Regeneration*, 査読あり, 30(6): 536-541, 2010. ([https://www.jstage.jst.go.jp/article/inflammregen/30/6/30\\_6\\_536/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/inflammregen/30/6/30_6_536/_article))
  8. Maehata Y, Ozawa S, Kobayashi K, Kato Y, Yoshino F, Miyamoto C, Izukuri K, Kubota E, Hata R, Lee MC: Reactive Oxygen Species (ROS) Reduce the Expression of BRAK/CXCL14 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Free Radical Research*, 査読あり, 44(8): 913-924, 2010. (<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10715762.2010.490836>)
  9. Izukuri K, Ito S, Nozaki N, Yajima N, Iwamiya M, Kawahara S, Suzuki K, Kubota E, Hata R: Determination of serum BRAK/CXCL14 levels in healthy volunteers. *Laboratory Medicine*, 査読あり, 41(8): 478-482, 2010. (<http://labmed.ascpjournals.org/content/41/8/478.full>)
  10. Ito S, Ozawa S, Ikoma T, Yajima N, Kiyono T, Hata R: Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their proliferation in vivo. *Biomedical Research*, 査読あり, 31(3): 199-206, 2010. ([https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/31/3/31\\_3\\_199/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/31/3/31_3_199/_article))
  11. Izukuri K, Suzuki K, Yajima N, Ozawa S, Ito S, Kubota E, Hata R: Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth of carcinoma cell transplants. *Transgenic Research*, 査読あり, 19(6): 1109-17, 2010. (<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11248-010-9384-7>)
  12. Ozawa S, Ito S, Kato Y, Kubota E, Hata R: Human p38delta MAP kinase mediates UV irradiation induced up-regulation of the gene expression of chemokine BRAK/CXCL14. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 査読あり, 396(4): 1060-1064, 2010. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10009630>)
  13. Komori R., Ozawa S., Kato Y., Shinji H., Kimoto S, Hata R.: Functional characterization of proximal promoter of gene for human BRAK/CXCL14, a tumor-suppressing chemokine. *Biomedical Research*, 査読あり, 31(2): 123-31, 2010. (Received, International Association of Dental Research (IADR) Hatton Travel Award) ([https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/31/2/31\\_2\\_123/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/31/2/31_2_123/_article))
  14. Sato K, Ozawa S, Izukuri K, Kato Y,

Hata R: Expression of tumor-suppressing chemokine BRAK/CXCL14 reduces cell migration rate of HSC-3 tongue carcinoma cells and stimulates attachment to collagen and formation of elongated focal adhesions in vitro. Cell Biology International, 査読あり, 348(5): 513-22, 2010. (<http://www.cellbiolint.org/cbi/034/0513/cbi0340513.htm>)

[学会発表] (計 43 件)

主要なもののみを記載

1. 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. 4. 2.
2. 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. 23.
3. 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.
4. 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.
5. 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. 24.
6. Hata R, Izukuri K, Kato Y. : Production of transgenic mice resistant to cancer cell growth and metastasis -Toward Cancer Therapy using Endogenous Tumor Suppressing Chemokines-. 2nd International Conference on Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring, Budapest, Hungary, 2011, 5.2-5. (Received: The Outstanding Abstract and Selected Oral Presentation Award)
7. Hata R, Izukuri K, Kato Y. : NK cell-dependent suppression of tumor growth and metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. Roche/Nature Medicine Symposium on Cancer Immunology and Immunotherapy, Nutley New Jersey, USA. 2011.9.11-13.
8. Miyamoto C., Maehata Y., Ozawa S., Ikoma T., Komori R., Hata R. Lee M-C: Fasudil, a specific inhibitor of ROCK, stimulates secretion of CXCL 14/BRAK and suppresses tumor growth in vivo. The EMBO meeting, Vienna, Austria. 2011.9.10-13.

9. Hata R, Izukuri K, Suzuki K, Yajima N, Ozawa S, Ito S, Kubota E: Chemokine BRAK/CXCL14 is a multifunctional tumor suppressor. 88th General Session & Exhibition of the IADR· 5th General Session of the Pan European Region of the IADR, Barcelona, Spain, 2010. 7. 14.
10. Hata R, Izukuri K, Suzuki K, Kato Y, Yajima N, Ozawa S, Ito S, Kubota E: Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth and metastasis of carcinoma cells. 14th International Congress of Immunology. 2010. 8. 23.
11. Kato Y, Ozawa S, Maehata Y, Maeda T, Kubota E, Tsukuda M, Miyazaki K, Hata R.: Gene expression signatures at acidic extracellular pH in metastatic melanoma cells. Joint MRS-AACR Conference: Metastasis and the Tumor Microenvironment. Philadelphia, PA. 2010. 9. 12-15.
12. Hata R, Izukuri K, Kato Y: NK cell-dependent suppression of tumor growth and metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. Tumor Immunology: Basic and Clinical Advances, Miami Beach, FL. 2010. 11. 30-12. 03.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：癌転移抑制剤及び医薬組成物

発明者：畑 隆一郎

権利者：神奈川歯科大学

種類：特許

番号：特開 2012-12330

出願年月日：22年6月30日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畑 隆一郎 (HATA RYU-ICHIRO)  
神奈川歯科大学・歯学部・特任教授  
研究者番号：10014276

### (2) 研究分担者

前畑 洋次郎 (MAEHATA YOUJIROU)  
神奈川歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：80410009  
居作 和人 (IZUKURI KAZUHITO)  
神奈川歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：90257296  
加藤 靖正 (KATO YASUMASA)  
奥羽大学・歯学部・教授  
研究者番号：50214408  
倉田 俊一 (KURATA SHUNICHI)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授  
研究者番号：60140901