

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 27 日現在

機関番号：32703
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792156
 研究課題名（和文）ケモカインBRAKの血管新生抑制による抗腫瘍効果発生メカニズムの網羅的解析
 研究課題名（英文）Exhaustive analysis of the antitumor effect by suppression of vascularization that is a function of chemokine BRAK
 研究代表者
 鈴木 健司（SUZUKI KENJI）
 神奈川歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号：80350536

研究成果の概要（和文）：人は生きるために、酸素や栄養が必要であり、血管はそれらを運搬したり吸収する大事な役割を演じている。癌も同じであり、血管を盛んに創りながら大きくなると考えられている。つまり、癌の発育を止めるためには、酸素や栄養を運搬する血管を創らないようにすればよいのである。我々の研究グループはすでに、癌の発育を抑える蛋白質を発見しており、本研究ではその蛋白質と血管新生との関わりを解明した。

研究成果の概要（英文）：Human needs oxygen and nourishment to live, and the blood vessel plays an important role that carries and absorbs oxygen and nourishment. Cancer is the same, and it is thought that cancer grow while forming blood vessel actively. In other words, prevention of the formation of blood vessel carrying oxygen and nourishment may stop the growth of cancer. The study group of us already discovered the protein which suppresses the growth of cancer, and it is clarified that the relations of the protein and forming blood vessel in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：ケモカインCXCL14/BRAK、免疫沈降法、HUVECの細胞増殖能、DIVAAシステム

1. 研究開始当初の背景
 近年、医療の世界ではゲノム解析の進歩とともに分子レベルでの治療が可能となっている。テーラーメイド医療の開発はその一つで

あり、それぞれ個人の特性に応じた治療を遺伝子レベルで診断し、個人にあわせた治療を行うことが可能となった。この医療が従来のものと比較し優れている点は、医療品の有効

性や副作用の少ない量を選択することが可能であり、より個人差を考慮した治療を遂行することができる点である。癌治療においても同様で、分子標的治療法の導入により、テーラーメイド医療の開発が行われている。乳癌の遺伝子診断に基づく検診や、ゲフィチニブ（商標名：イレッサ 対象は非小細胞肺癌）の奏功に関与する上皮増殖因子受容体(EGFR)の変異の調査が良い例である。

(1) 我々の研究室では頭頸部扁平上皮癌に対する分子標的治療の標的分子として、ケモカイン CXCL14/BRAK が頭頸部扁平上皮癌に対して腫瘍縮小効果を有することを初めて見出した。

(2) ゲフィチニブの腫瘍縮小効果に BRAK の発現上昇に関与することを明らかにした。

(3) しかしながら、これらの抗腫瘍効果のメカニズムについてはいまだ不明であった。そこで抗腫瘍効果に対するメカニズム解明のため、全身で BRAK を高発現するトランスジェニックマウスを作製し、昨年度 *in vivo* の実験系でメカニズムの解明を行った。結果として、BRAK のトランスジェニックマウスでは移植腫瘍塊における新生血管が乏しく、腫瘍が増殖しにくいことが明らかとなった。

2. 研究の目的

(1) 扁平上皮癌における BRAK 発現調節機構を明らかにすること。(2) BRAK による血管新生抑制機序を詳細に解明することを目的とする。

(1) これまでに我々は BRAK の発現上昇及び発現低下に関与する既知の刺激を癌細胞

である HSC-3 に暴露させ、BRAK と同時に変動する遺伝子をマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果をデータマイニングし、BRAK の発現変動に直接関与する可能性がある転写因子を複数スクリーニングすることに成功した。今回は BRAK の発現上昇に関する転写因子に着目し、複数のスクリーニングされた転写因子の中から、カギとなる遺伝子を同定することを目的とした。

(2)

(a) これまでに ELISA 法で間接的に BRAK が血管新生因子である VEGF や IL-8 に直接結合する可能性があることが報告されている。そこで我々は免疫沈降法を用いて BRAK の VEGF、IL-8 に対する結合能及び血管新生抑制効果について明らかにする。

(b) リコンビナント BRAK を用いて血管内皮細胞に対するの効果（影響）について検討を行う。

3. 研究の方法

(1)

(a) BRAK の発現変動に関与する転写因子のスクリーニングは調査済みであった。そこでそれぞれの転写因子に対する SiRNA を HSC-3 細胞に導入し、BRAK の発現変化を確認することで発現上昇に関与する転写因子の同定を試みた。

(b) 上記結果から、BRAK の発現上昇に関与する転写因子が SP-1 である可能性が示されたため、実際に BRAK のプロモーター領域に結合するかどうか ChIP アッセイを用いて検討した。

(2)

(a) *in vitro* の実験系：Flag を付加した BRAK

強制発現ベクターを用いて、頭頸部扁平上皮癌細胞に導入後、anti-Flag抗体で免疫沈降を行い、BRAKと血管新生因子として知られる VEGF、IL-8及びbFGFが結合しているかどうかについて検討を行う。またさらに血管内皮細胞であるHUVECにリコンビナントBRAK とリコンビナントVEGF、IL-8及びbFGFを添加し、HUVECの細胞増殖能（セルカウント及びMTTアッセイ）について検討する。

(b) In vivoの実験系：DIVAAシステムを用いて、リコンビナント蛋白(BRAK、VEGF) を含有するコラーゲンゲルを移植用微小チューブに充填し、そのチューブをマウスの背部皮下へ移植することでBRAK単体の血管新生抑制効果について検討する。また、血管新生因子であるIL-8に関しても同様な実験系を行う。

4. 研究成果

(1)

(a) SP-1 に対する SiRNA を HSC-3 細胞に導入すると著しい BRAK の発現低下が確認された（すなわち BRAK の発現上昇を SP-1 が調節している可能性を示す。）。

(b) 高密度培養は BRAK の発現を上昇させる刺激である。そこで、HSC-3 細胞に SP-1 に対する SiRNA を導入後、高密度培養を行ったところ、発現上昇が抑制される結果を得た（この結果により、細胞密度による BRAK の発現上昇が SP-1 を介していることを証明した。）。

(c) 高密度培養刺激を行った後、細胞から核を抽出し、ChIP アッセイを行ったところ、BRAK のプロモーター領域に SP-1 が結合していることが明らかとなった。

(2)

(a) in vitro の実験系：免疫沈降の結果、BRAK と VEGF は結合することが明らかとなった。また、リコンビナント BRAK を血管内皮細胞である HUVEC に添加したが、明らかな細胞増殖能（セルカウント及び MTT アッセイ）に変化は認められなかった。

(b) In vivoの実験系：VEGF、IL-8およびBRAKリコンビナント蛋白において、血管新生抑制効果には明らかな差は確認されなかった。

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1件)

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 and biophysical Research Communications、査読有、420(2)、20122、17-222

DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.01.157.

[学会発表] (計2件)

①Maehata Y、Reactive oxygen species reduce the production of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells、The EMBO meeting、2012年09月22日～2012年09月22日、Nice

②小澤重幸、変異したP53による抗腫瘍性ケモカインBRAKの発現調節、第66回日本口腔科学会学術集会、2012年05月17日～2012年05月18日、広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 健司 (SUZUKI KENJI)

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80350536