

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：32703

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15697

研究課題名(和文)分子標的予防医学への挑戦：BRAK遺伝子のin vivo導入による癌の肺転移抑制

研究課題名(英文)A way to molecular targetting preventive medicine:Suppression of lung metastasis of cancer by BRAK gene

研究代表者

畑 隆一郎 (Hata, Ryu-Ichiro)

神奈川県大学・大学院歯学研究科・特任教授

研究者番号：10014276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：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、新しいビタミンC誘導体が悪性黒色腫の肺転移を抑制する事が判明した。また、マウスへのヒトの癌細胞の細胞培養系及び移植系においてBRAKの発現制御機構を明らかにすると共に、BRAKの発現が移植腫瘍の抑制に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The main cause of Japanese death by cancer is due to the recurrence 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 confirmed that anticancer drugs such as cetuximab and gefitinib stimulated expression of BRAK and this is essential for tumor growth suppression.

研究分野：がん抑制法

キーワード：がん抑制法 癌抑制性ケモカイン 分子標的予防医学

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年に移植癌の系を用いて、ケモカイン CXCL14/BRAK(以下 BRAK)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(Ozawa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*)。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化学発癌、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 BRAK 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 BRAK 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 BRAK を発現する個体が存在することから、BRAK 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、BRAK 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と考えられる。

2. 研究の目的

これまでの研究においてケモカイン BRAK が化学発癌、癌の増殖、及び転移抑制作用を示す事が明らかになり、生体内における癌の抑制分子として有望であることが明らかにされたので、BRAK を標的とした癌の分子標的予防法を開発するために、生体に於ける BRAK の発現制御機構を明らかにし、分子標的予防法開発のための情報を得る。

3. 研究の方法

A. マウスを用いた研究:Wt マウスにヒト BRAK 発現ベクター (pLIVEhBRAK)の導入による肺における BRAK 発現の最大時期の決定:発現ベクター-pLIVEhBRAK は 吸着カラムを用いて精製し、その10マイクログラムを1mLの *in vivo* 導入試薬と混合してマウスの尾静脈より注入した。3日後,および1,2,3週間後に肺を取り出し、直ちに液体窒素中で凍結後、クライオプレスを用いて粉碎後組織粉末をトリゾール液に溶解し、mRNAを精製し、cDNAを作成した。さらに種々の試薬をマウスの尻尾から注入し、日にちを変えて黒色腫細胞

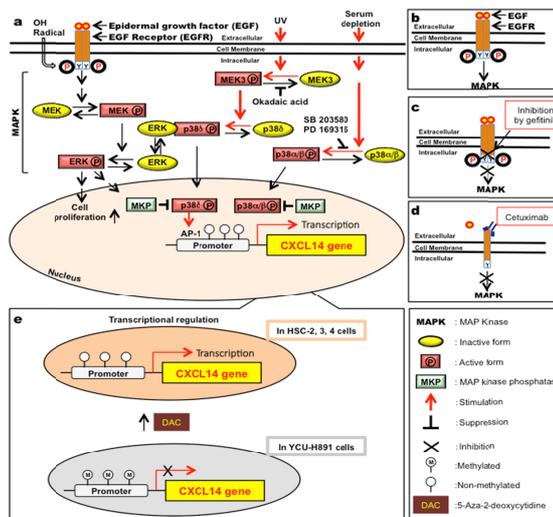
を注入し、3週間後に肺への悪性黒色腫細胞の転移率を測定し、転移抑制作用を検定した。

B. CXCL14/BRAK 遺伝子の発現制御機構:将来のヒトへの応用を見据えて、種々のヒト細胞およびマウスへの細胞移植系を用いて CXCL14/BRAK 遺伝子の発現制御機構について検討した。

4. 研究成果

A. CXCL14/BRAK の発現ベクターの投与3日後には肺の CXCL14/BRAK mRNA の発現上昇が見られた。将来的にヒトへの応用を考えて、ヒトへの投与が可能な試薬を種々試みた結果、活性持続型ビタミンCの投与により、メラノーマの肺への投与が有意に抑制された。さらに連続投与7日間で最大の抑制効果が見られた。

B. CXCL14/BRAK の発現制御系の検討:我々は口腔癌を含む種々の癌において上皮増殖因子(EGF)及びその受容体(EGFR)の発現が異常に活性化している事から、細胞培養系を用いてEGFの添加により発現が低下する分子を遺伝子チップ法とRT-PCR法により検索し、CXCL14/BRAKを見出した。



図の説明 CXCL14/BRAK遺伝子の発現制御機構

実際に癌細胞に BRAK 遺伝子を導入し、マウス皮下に移植すると腫瘍抑制作用を示した。また、OH ラジカルは EGFR を活性化し、BRAK 遺伝子の発現を抑制した(図 a,b)。本実験では OH ラジカルの活性を阻害する新しいビタミン誘導体を用いて、EGFR の活性化を阻害し、BRAK 遺伝子の発現促進が出来ることを見出した。また、セツキシマブ(EGFR に特異的なヒト型モノクローナル抗体)や、EGFR の活性化阻害剤のゲフィチニ(gefitinib) は EGFR の活性化を阻害して下流の ERK マップキナー

ゼ(MAPK)の活性化を阻害し、結果として BRAK 遺伝子の発現をし、腫瘍抑制を示した(Kondo *et al.*, *Oncogenesis*, 2016, 図 c,d)。また、BRAK 遺伝子のプロモーター部分がメチル化により CXCL14/BRAK 遺伝子の発現が不活性化している場合はアザデオキシシチジンの併用は有用であることが判明した(図 e)。この実験系を利用して細胞毒性を示さない濃度で BRAK 遺伝子の発現を促進する分子を見出した。今後、マウスの実験系を利用して、腫瘍増殖抑制作用、転移抑制作用を検討し、BRAK を分子標的とした癌の予防法の開発を行う。

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 4 件)

1. 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*, 2016 July 11;5(7):e240 doi:10.1038/oncsis.2016.43 (2016). (査読有)
 2. 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)
 3. 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)
 4. 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)
- [学会発表](計 16 件)
1. 加藤伊陽子, 畑隆一郎, 倉田俊一: p63 は p300 ヒストンアセチル基転移酵素およびアデノウイルス E1a と結合する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016.10.6-8.
 2. Yang X-Y, Ozawa S, Ikoma T, Suzuki K, Kanamori K, Kiyono T, Kubota E, Hata R-I.: Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for cetuximab-dependent tumor suppression. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016.10.6-8.
 3. 倉田俊一, 畑隆一郎, 加藤伊陽子: p63 とヒストンアセチル基転移酵素 p300 及びアデノウイルス E1a の相互作用. 第 89 回日本生化学会大会, 2016.9.25-27. 仙台
 4. 生駒丈晴, 陽暁艶, 小澤重幸, 前畑洋次郎, 畑隆一郎: 多段階癌抑制分子のケモカイン CXCL14/BRAK は扁平上皮の分化制御因子か? 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌, 2016.6.24-26.
 5. 陽暁艶, 近藤忠稚, 小澤重幸, 生駒丈晴, 鈴木健司, 岩淵博史, 前畑洋次郎, 宮本千央, 久保田英朗, 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)による腫瘍抑制活性を決定する. 第 48 回日本結合組織学会学術大会, 長崎, 2016.6.24-25.
 6. 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, PRC, 2015,6.17-6.20
 7. 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 mice. 1st *Nature Immunology - Cellular & Molecular Immunology* Joint Conference. Hefei, PRC, 2015,6.17-20.
 8. 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, Thailand, 2016.2.3
9. 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, Thailand, 2016.2.3.
 10. 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.
 11. 陽曉艶, 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.
 12. 生駒丈晴, 小澤重幸, 鈴木健司, 岩淵博史, 陽曉艶, 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. 加藤伊陽子, 畑隆一郎, 倉田俊一: p63 は TCF/ カテニンによる遺伝子発現を抑制する. 第 74 回日本歯学会 名古屋, 2015. 10.9.
 13. 倉田俊一, 畑隆一郎, 加藤伊陽子: p63 (TP63) は TCF/ 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. 生駒丈晴, 小澤重幸, 鈴木健司, 岩淵博史, 陽曉艶, 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.
 15. 加藤伊陽子, 畑隆一郎, 倉田俊一: p63 は TCF/ カテニンによる遺伝子発現を抑制する. 第 74 回日本歯学会学術総会, 名古屋, 2015.10.8-10.
 16. 倉田俊一, 畑隆一郎, 加藤伊陽子: p63 (TP63) は TCF/ カテニンによる遺伝子発現誘導を制御する. 第 88 回日本生化学会大会 (第 38 回日本分子生物学会との共同開催)
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
- 陽曉艶 (YANG XIAOYAN)
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: 90744954