

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20567

研究課題名(和文) 選択的幼弱血管阻害分子BRAKの臨床応用に向けて

研究課題名(英文) Clinical application of BRAK that is anti-angiogenic agent

研究代表者

生駒 丈晴 (Ikoma, Takeharu)

神奈川県立大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：10638290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はBRAK/CXCL14ノックアウトHSC-3細胞をすでに獲得済みである。そこで HSC-3細胞、CXCL14ノックアウトHSC-3細胞の培養上清を使用しHUVECに作用させた際の遺伝子発現の変動についてマイクロアレイ解析を行う。本研究とかかわる可能性のある遺伝子群を抽出後、最終的にはBRAK/CXCL14ノックアウトHSC-3細胞に発現ベクターを導入し、遺伝子発現変化が逆の動きをするかどうかを検討した。この遺伝子変動についてはデータマイニングを行い整理を行った結果、データ解析では血管の発生や分化に関連するもの、糖代謝に関連するもの、癌に関連するもの等いくつかのカテゴリーに分類された。

研究成果の概要(英文)：We already prepared knock-out BRAK/CXCL14 HSC-3 cell. Then, We analyzed about gene expression in HUVEC cell. We selected Gene related anti-angiogenic agent, and implemented to Data-mining. In consequence of Data-mining, We searched relation to cardiovascular development, carbohydrate metabolism, tumor progression etc.

研究分野：口腔外科

キーワード：CXCL14 BRAK 血管新生阻害 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

我々の研究チームは、BRAC/CXCL14 トランスジェニックマウスを用いて、発癌、癌の増殖そして転移に至るまで、各段階で CXCL14 が癌に対して抑制的に働くことを証明している (Scientific Reports-Nature. 13;5 9083. 2015)。我々以外の他の研究チームも CXCL14 による強力な癌抑制作用を解明に対して精力的であり、サイトカイン同士の結合について研究が盛んである。Thomas D. Sheilenger らは、VEGF をはじめとしたいいくつかの血管新生因子に対して CXCL14 が抑制的に働くことを見出したが、そのメカニズムについては詳細に報告されていなかった。癌の血管新生メカニズムは、癌細胞自身が栄養不足を認識すると血管新生因子を放出することで、周囲に存在する血管内皮細胞のみが異常増殖する。結果として相対的に血管内皮細胞と取り巻く血管周皮細胞が少なくなり幼弱な新生血管で癌組織は発育することとなる。この幼弱な新生血管は都合よくできており、血管周皮細胞が少ないため、物質透過性が亢進し組織間圧が高まる。結果として酸素や糖などの栄養分は癌組織に到達するが抗癌剤は到達しにくい状況となり我々臨床家を悩ませることとなる。血管新生抑制に着目した癌治療の理想は、血管内皮細胞の増殖能のみ減弱させ新生血管を選択的に退縮させること、すなわち癌組織内の血管を正常化させることである。近年使用されている VEGF の選択的阻害薬ベバシズマブの目的は、まさに血管の正常化を図ることで、乳癌や大腸癌に対し従来の抗癌剤と併用することで効果があると報告がある。しかし血管新生に関わる分子は VEGF のみならず複数あり、それらをまとめて阻害することは困難である。そこで我々は VEGF のみならず複数の血管新生因子に非特異的に結合する CXCL14 の血管新生抑制効果に着目しそのメカニズムを解明することを目的とした。また、我々の研究チームはセツキシマブが癌組織内で CXCL14 の発現を上昇させることを明らかにしている。(Oncogenesis 11;5(7) 2016) 癌の新生血管を正常化させることは、抗がん剤の癌組織への移行性に重要であり、従来の抗がん剤とセツキシマブ併用療法の有用性を証明する手掛かりにもなると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、2006年にサイトカイン CXCL14 が強力な癌抑制性ケモカインであることを初めて明らかにしてから (Biochem Biophys Res Commun. 348. 406-412 (2006))。現在

に至るまで、CXCL14 の抗腫瘍効果メカニズムの解明について研究を続けている。一言で癌の抑制といってもそのメカニズムは多岐にわたるため、CXCL14 トランスジェニックマウス及びノックアウトマウスを作成することで検討することとした。(Transgenic Res. 19. 1109-1117 (2010))。興味深いことに、CXCL14 トランスジェニックマウスに頭頸部扁平上皮癌細胞を移植した場合、定着するものの腫瘍組織は大きくならず、病理学的検討の結果、腫瘍内における血管が少ないことが明らかとなった。この研究結果から CXCL14 には血管新生を阻害する作用があり、癌組織の成長を抑制する重要な分子であることが証明された。CXCL14 には受容体が存在せず、癌の増悪化にかかわる何らかのサイトカインに結合し機能を発揮するとの意見もある。このことから、我々はいくつかの血管新生に関与する分子との結合に着目し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

癌組織に対して CXCL14 が血管新生阻害を示すことについては報告したが、そのメカニズムについてはいまだ解明していない。今回申請者は、CXCL14 の血管新生因子への結合に着目し、新たな血管新生阻害機構を解明することを目的とする。既にヒト正常細胞が産生する CXCL14 が血管内皮細胞へ及ぼす影響については解明済みである。このデータをもとに、平成29年度は頭頸部扁平上皮癌細胞に CXCL14 を強制発現させ、精製した培養上清を HUVEC へ作用させ、HUVEC へ及ぼす影響を遺伝子変化で網羅的に検討する。使用する細胞は CXCL14 ノックアウト HSC-3 細胞を用いる。平成30年度は、CXCL14 の血管新生因子との結合能を免疫沈降法で検討する。また、HUVEC に対するそれぞれの血管新生因子の機能を CXCL14 が阻害しているかどうかは、スクラッチアッセイ及び3D培養を用いて確認する。最終年度は DIVVA システムを使用し CXCL14 による血管内皮細胞の遊走能を in vivo で検討する。血管内皮細胞に対する CXCL14 の作用を網羅的に解析する。販売しているリコンビナント CXCL14 は大腸菌に作成させたヒト CXCL14 であり、たんぱく質の修飾が十分でないためか CXCL14 の活性を有するものがほとんど販売されていない。そこで我々は、HEK293 細胞に CXCL14 を過剰発現させたものを使用し、HUVEC に作用させることで血管新生や、免疫に関係する遺伝子の発現が上昇する結果を得ている。我々は CXCL14 ノックアウト HSC-3 細胞をすでに獲得済みである。そこで、HSC-3 細胞、CXCL14 ノックアウト HSC-3 細胞の培養上

清を使用しHUVECに作用させた際の遺伝子発現の変動についてマイクロアレイ解析を行う。本研究とかかわる可能性のある遺伝子群を抽出後、最終的にはCXCL14ノックアウトHSC-3細胞に発現ベクターを導入し、遺伝子発現変化が逆の動きをするかどうかを検討する。この遺伝子変動についてはデータマイニングを行い整理する。

4. 研究成果

販売しているリコンビナント CXCL14 は大腸菌に作成させたヒトCXCL14であり、たんぱく質の修飾が十分でないためか CXCL14の活性を有するものがほとんど販売されていない。そこで我々は、HEK293細胞にCXCL14を過剰発現させたものを使用し、HUVECに作用させることで血管新生や、免疫に関係する遺伝子の発現が上昇する結果を得ている。

我々はCXCL14ノックアウトHSC-3細胞をすでに獲得済みである。そこでHSC-3細胞、CXCL14ノックアウトHSC-3細胞の培養上清を使用しHUVECに作用させた際の遺伝子発現の変動についてマイクロアレイ解析を行う。本研究とかかわる可能性のある遺伝子群を抽出後、最終的にはCXCL14ノックアウトHSC-3細胞に発現ベクターを導入し、遺伝子発現変化が逆の動きをするかどうかを検討した。この遺伝子変動についてはデータマイニングを行い整理を行った結果、データ解析では血管の発生や分化に関連するもの、糖代謝に関連するもの、癌に関連するもの等いくつかのカテゴリーに分類された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kondo T, Ozawa S, Ikoma T, Yang XY, Kanamori K, Suzuki K, Iwabuchi H, Maehata Y, Miyamoto C, Taguchi T, Kiyono T, Kubota E, Hata RI, Expression of the chemokine CXCL14 and cetuximab-dependent tumour suppression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogenesis*, 5(7):e240, 2016.

〔学会発表〕(計3件)

Hata R, Kondo T, Ozawa S, Ikoma T, Suzuki K, Iwabuchi H, Maehata Y,

Miyamoto C, Yang X, Kubota E :
EXPRESSION OF THE CHEMOKINE CXCL14 IS A PREDICTIVE BIOMARKER FOR CETUXIMAB-DEPENDENT TUMOUR SUPPRESSION : 1st Nature Immunology - Cellular & Molecular Immunology Joint Conference: Inflammation, Stress and Immune Homeostasis, China, 2015. 6. 17-19

生駒丈晴, 陽 暁艶, 小澤重幸, 鈴木健司, 岩淵博史, 前畑洋次郎, 畑隆一郎 :
Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumour suppression. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟市, 2015. 9. 12.

Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for cetuximab-dependent tumour suppression.

Xiaoyan Yang, Shigeyuki Ozawa, Takeharu Ikoma, Kenji Suzuki, Keisuke Kanamori, Tohru Kiyono, Eiro Kubota, Ryu-ichiro Hata
第75回日本癌学会学術総会(横浜)2016年10月6日~8日

〔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・助教
研究者番号：10638290

(2) 研究分担者

無

研究者番号：

(3) 連携研究者

無

研究者番号：