

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：15K21455

研究課題名(和文) 抗腫瘍タンパクの局在に着目した新規悪性腫瘍治療薬を『育薬』する

研究課題名(英文) The new malignant tumor therapeutic drug which paid its attention to localization of the antitumor protein

研究代表者

宮本 千央 (MIYOTO, CHIHIRO)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・特任講師

研究者番号：50633963

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)：本研究課題は血管新生抑制因子CXCL14/BRAKの作用機序の解明を目的として解析を進めた。CXCL14/BRAKと血管新生促進因子であるVEGF-Aとの結合に関して解析を進めたが、有意な結果は得られなかった。よってCXCL14/BRAKの作用にVEGF-Aが関与していることは当研究課題では証明できなかった。

研究成果の概要(英文)：This research theme pushed forward analysis for the purpose of elucidation of the action mechanism of vascularization inhibitor CXCL14/BRAK. I pushed forward analysis about combination with VEGF-A which was CXCL14/BRAK and a vascularization promotion factor, but the meaningful result was not provided. Thus, I was not able to prove that VEGF-A participated in BRAK action by this research theme.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：CXCL14/BRAK VEGF-A

1. 研究開始当初の背景

近年の悪性腫瘍治療においては、多数の抗癌剤および分子標的治療薬が開発され、化学療法における治療薬の選択肢が広がっている。また薬剤の従来への適応症になかった疾患についての効果も積極的に検討されるようになってきている。例として、大腸癌治療薬として用いられている EGFR 抗体薬セツキシマブ (商品名: アービタックス) は試験により現在では頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) への効果も証明され、わが国では 2012 年に厚生労働省により頭頸部癌臨床適応の認可が下りた。

このように現在の悪性腫瘍治療薬の開発においては、ゼロから新薬を開発するのではなく、既に臨床応用されている薬品の適用を拡大し、有用性および安全性の高い治療薬をより短時間で患者に提供するということがひとつのムーブメントとなっている。この手法は、使用濃度や副作用が予測できる点、試験にかかる時間を大幅に短縮できる点からも非常に有用である。この手法は「**育薬**」と定義され、日本薬理学会・日本薬学会などにおいてもその定義および手法の有用性が提唱されている。

申請者はこれまでに、生体の持つ抗腫瘍分泌タンパクである BRAK が HNSCC においては細胞内に貯留していることに着目し、この BRAK が血管攣縮治療薬として臨床応用されているファスジル (商品名: エリル点滴静注液 30mg) により分泌促進されることを初めて見出した (*Miyamoto et al. J. of Pharmacological Sci. 2012*)。さらにファスジルが HNSCC において Rho/ROCK 経路の阻害により BRAK の分泌を促進し、腫瘍抑制効果を発揮することを証明した (*Miyamoto et al. Biomedical Res. 2014 in press*)。これはファスジルが BRAK 分泌促進を介した悪性腫瘍治療薬に育薬できる可能性を示すものである。

また一方で、BRAK 高発現モデルマウス (BRAK トランスジェニックマウス) を作製し腫瘍移植を行い解析を行った結果、BRAK が細胞外に高レベルで存在するトランスジェニックマウスでは、移植腫瘍周囲の血管新生が抑制されることが確認されている (*Izukuri et al. Transgenic Res. 2010*)。これらの知見から BRAK が腫瘍周囲で血管内皮細胞または血管新生促進因子を介して血管新生を阻害している可能性が示唆される。しかし BRAK は未だ受容体の特定されていないタンパクであり、BRAK の血管新生抑制における詳細なメカニズムに関しては未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

腫瘍より分泌された BRAK の血管内皮細胞への影響の解析と血管新生阻害作用の詳

細なメカニズムの解明を行い、ファスジルを BRAK 分泌促進を介した悪性腫瘍治療薬として新たに頭頸部癌治療薬に育薬することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) BRAK 発現ベクターを頭頸部扁平上皮癌細胞株 (HSC-3) に導入後、BRAK の細胞外分泌を促進するためファスジルの添加培養をおこない培養上清および細胞を回収、それぞれを anti-BRAK 抗体で免疫沈降後、BRAK と血管新生促進因子が結合しているか否かを Western blot を用いて検討を行った。
- (2) HSC-3 にコントロールベクターと BRAK 発現ベクターをそれぞれ導入し、血管内皮細胞 (HUVEC) の三次元的共培養を行った。セルカウントおよび MTT アッセイにて血管内皮細胞の増殖能を評価した。

4. 研究成果

(1) Western blot の結果から BRAK と結合しているタンパクの大きさを予測し解析を行う予定であったが、BRAK とその他タンパクの結合は確認できなかった。頭頸部扁平上皮癌細胞株より分泌された BRAK を用いた免疫沈降を行い解析をする予定であったが、BRAK の分泌量が極端に少なく良好な結果を得ることができなかった。そのため BRAK の発現ベクターを HSC-3 細胞株に導入し、BRAK 安定発現株の作成を行った。安定発現細胞株を用いた血管新生結合因子との結合の解析をおこなった。血管新生促進因子リコンビナント添加により解析を行った結果、有意差は認められなかった。

(2) HSC-3 と HUVEC の共培養系においては HUVEC が死滅してしまい解析が不能であった。そのため HSC-3 を HUVEC 培養系に移行して解析を行う予定であったがその過程で HSC-3 の形質が変化し、HSC-3 の BRAK 遺伝子発現が消失してしまったため解析が不能であった。これらの結果よりこの実験系においては有意な結果を得ることができなかった。

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 6 件)

- (1) 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*. 2016 11;5(7):e240.
- (2) Yang X-Y, **Miyamoto C**, Akasaka T, Izukuri K, Maehata Y, Ikoma T, Ozawa S, Hata R-I: Chemokine CXCL14 is a multistep tumor suppressor. *Journal of Oral Biosciences*, 58, 16-22, 2016.
- (3) 畑隆一郎, 陽暁艶, **宮本千央**, 前畑洋次郎, 小澤重幸: がん強いマウスを作る: がんの分子標的予防医学の開発に向けて. *生化学*, 87(5), 591-596, 2015.
- (4) Maehata Y, **Miyamoto C**, Tsukinoki K, Takahashi S-S, Yoshino F, Wada-Takahashi S, Yoshida A, Tanaka A, Adachi T, Igoshi N, Shiba T, Kishikawa N, Imazato T, Suzuki I, Ihara H, Shimomura J, Okabe H, Yanagisawa T, Hosho A, Maehata E: Foresight of physical development indicated by the National Health and Nutrition Survey in Japan: An approach in terms of biomedical sciences. *International Journal of Analytical Bio-Science*, 3(3), 63-72, 2015.
- (5) Funaki S, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Yoshino F, Yoshida A, Maehata Y, **Miyamoto C**, Toyama T, Sato T, Hamada N, Lee M-C, Takahashi S-S: Porphyromonas gingivalis infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Microbial Pathogenesis*, 92, 36-42, 2016.
- (6) Tanaka Y, Toyama T, Wada-Takahashi S, Sasaki H, **Miyamoto C**, Maehata Y, Yoshino F, Yoshida A, Takahashi S-S, Watanabe K, Lee M-C, Todoki K, Hamada N: Protective effects of (6R)-5, 6, 7, 8-tetrahydro-L-biopterin on local ischemia/reperfusion-induced suppression of reactive hyperemia in rat gingiva. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 58(1), 69-75, 2016.

〔学会発表〕(計 19件)

1. **Miyamoto C**, Ozawa S, Ikoma T, Izukuri K., Ryu-Ichiro Hata, and Yojiro Maehata: Rho Kinase (ROCK) Inhibitor Fasudil Suppresses Head and Neck Squamous Carcinoma (HNSCC) Growth by Stimulating Gene Expression and Protein Secretion of the CXCL14/BRAK. The 13th Meeting of the Asia Pacific Federation of Pharmacologists, Bangkok, Thai 2016.2.1-3.
2. 日高恒輝, **宮本千央**, 高橋聡子, 齊田牧子, 河田亮, 川俣亮太, 前畑洋次郎, 三辺正人, 高橋俊介, 高垣裕子: ラ Laser Doppler 血流系を用いた抜歯モデルラットの血流測定. 第 8 回日本口腔検査学会総会・学術大会, 横須賀, 2015.10.3-4.
3. Maehata Y, **Miyamoto C**, Tsukinoki K : Scavenger of oxidative stress effective for the inhibition of angiogenesis and tumor proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma cells by regulation gene expression of chemokines, *Pharmacology* 2016, London, 2016.12.13-15.
4. **Miyamoto C** and Maehata Y.: Rock inhibitor fasudil suppresses growth of tumor by stimulating gene expression and secretion of CXCL14/BRAK, *Pharmacology* 2016, London, 2016.12.13-15.
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.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

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

取得状況(計 0件)

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

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 千央 (MIYAMOTO, Chihiro)

神奈川歯科大学 歯学研究科 (研究院)

研究員

研究者番号：50633963

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：