

令和元年6月19日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11707

研究課題名(和文) EGFRシグナル阻害作用をもつ天然由来成分を応用した口腔癌治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a therapeutic agent for oral cancer applying a naturally derived component with EGFR signal inhibitory effect.

研究代表者

前畑 洋次郎 (MAEHATA, YOJIRO)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・特任講師

研究者番号：80410009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌における脂肪酸アセトゲニンによるBRAKの発現促進作用の解明を目的としたが、BRAK発現促進作用に有意差が認められず、より効率的なBRAK発現制御機構の解明と促進物質の検索に研究計画を変更した。そこで、口腔癌細胞(HSC-3)、作成したBRAK強制発現細胞、BRAKノックアウト細胞を用い癌幹細胞因子の発現への影響を検討した。その結果、BRAK強制発現により癌幹細胞因子の発現低下に伴い腫瘍増殖が抑制された。この実験結果から、BRAKは癌幹細胞因子の発現制御を介して腫瘍進展を制御している可能性が示された。今後はより詳細な機序の解明と、癌幹細胞におけるBRAK発現促進物質の検索を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの癌組織中には、自己複製能、多分化能および無制限な増殖能を併せ持つ癌幹細胞が存在することが報告されている。また、癌幹細胞は癌の再発、転移および薬剤耐性の獲得に関与する事が知られている。口腔癌においても、癌幹細胞マーカー(CD44V)陽性の口腔癌幹細胞の存在が報告されている。本研究結果から、口腔癌において、発癌、癌細胞増殖および転移を抑制する多段階癌抑制因子であるCXCL14/BRAKの発現上昇により、CD44Vおよび幹細胞因子NANOG、KLF4の発現が抑制されることが示された。口腔癌におけるBRAKの発現を上昇させる分子の検索は、口腔癌の分子標的治療に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：At the beginning of this study, we planned to find regulation mechanisms of CXCL14/BRAK by fatty acid acetogenins in head and neck squamous cell carcinoma cell (HSC-3), but we could not find conditions that regulates BRAK expression in the cells. Therefore, the research program has been changed to investigate effect of BRAK on the gene expression of oral carcinoma cells. Because we found that BRAK transgenic mice suppressed various types of cancer, we examined the effects BRAK on the stem cell factors and cancer stem cell factor expression using HSC-3 cells and BRAK over expressed HSC-3 cells and BRAK knock downed cells. As a result, we found that BRAK over expression suppresses tumor progression, together with the decreased expression in stem cell factors and cancer stem cell factor. These results indicate that BRAK may regulate tumor progression through regulation of cancer stem cell factor expression. These data are useful for future development of cancer progression by use of BRAK.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：口腔癌 CXCL14/BRAK 癌幹細胞

## 1．研究開始当初の背景

(1) 口腔扁平上皮癌 (HNSCC) では、細胞表面上皮成長因子受容体 (EGFR) を高発現する細胞の割合が多いことが報告されており、発癌や癌進展の重要な因子と考えられている。

これまでに我々は、HNSCC において多段階癌抑制因子である CXCL14/BRAK の作用を検討し、BRAK が血管新生抑制作用および腫瘍免疫の活性化により抗腫瘍作用を示すこと、また EGFR シグナルの活性化により BRAK の発現が低下していることを明らかにしてきた。さらに、EGFR 阻害剤は BRAK の遺伝子発現を回復させ HNSCC の腫瘍進展を抑制することを報告してきた。これらの知見から、BRAK は口腔癌治療において有用な標的分子であり、その発現を上昇させる分子の検索は、分子標的治療薬の開発に有用であると考えられた。

(2) アボガド由来の脂肪酸アセトゲニン(AA)が抗炎症作用、抗酸化作用による抗腫瘍作用を示すことが示唆されていたが、2011年にHNSCC細胞においてEGFRのチロシンキナーゼのリン酸化阻害作用 [Tyr1173] EGFR 下流分子の Ras/Raf/MEK/ERK シグナルの阻害作用 [c-RAF (Ser338) および ERK1/2 (Thr202/Tyr204)] 口腔癌細胞の増殖抑制作用が報告された。従って、生体安全性があり天然成分由来の AA は、EGFR およびその下流分子の活性化を抑制する口腔癌分子標的治療薬に発展する可能性があることが示唆される。

## 2．研究の目的

(1) 近年、天然成分由来の AA が HNSCC において、EGFR シグナルの阻害作用を持つことが報告され、新規抗腫瘍物質として着目されている。HNSCC における EGFR シグナルの活性化は腫瘍進展に密接に関与しており、EGFR 阻害薬により BRAK の発現促進作用を介して腫瘍進展および転移を抑制する知見を得ている。

(2) EGFR 阻害抗体薬 (セツキシマブ) は口腔癌治療にも応用されており、その有用性や安全性が評価されているが、インフュージョンリアクション (輸注反応) や経口投与が不可能など改善余地も残る。本研究では、重篤な副作用が無く、EGFR シグナル活性化阻害作用をもつ AA を用いて多段階癌抑制因子である BRAK の遺伝子発現を回復させ、HNSCC に対しての経口投与可能な新規口腔癌治療薬の開発を目的としている。

## 3．研究の方法

(1) AA の BRAK 発現に及ぼす影響の検討: 舌由来の HNSCC 細胞株 HSC-3 を  $2.0 \times 10^5$ /35mm Dish の密度で播種し、DMEM-10 培地で培養し 24 時間後に DMED-0 に置換した。その後、EGF で前処理し AA を  $0 \mu\text{M}$  ~  $120 \mu\text{M}$  の濃度で添加して経時的に細胞および培養上清を回収した。回収した細胞はフェノール抽出法を用いて mRNA を抽出し、SuperScript® III 用いて cDNA を精製した。サンプルは SYBR™ Green Master Mixes を用いリアルタイム PCR 法で BRAK の遺伝子発現を検討した。また同様に回収した培養上清のサンプルを、冷アセトンにて濃縮後に RIPA Buffer に溶解し、Western Blot 法にて BRAK タンパクの量を測定した。

(2) BRAK 強制発現細胞 (HSC-3 BRAK-OE)、BRAK ノックアウト細胞 (HSC-3 BRAK-KO) の作成: HSC-3 に CRISPER/Cas9 システムを用いて BRAK 遺伝子の発現抑制を行い、BRAK ノックアウト細胞 (HSC-3 BRAK-KO) を作成した。また、BRAK 強制発現ベクターを作成しリポフェクション法を用いて遺伝子導入を行い BRAK の強制発現細胞 (HSC-3 BRA-OE) を作成した。その後、遺伝子発

現の内部標準として hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HRPT) がこれらの細胞で安定して発現することを確認した。

(3) HSC-3 BRAK-OE および HSC-3 BRAK-KO の BRAK 発現に及ぼす影響の検討：HSC-3, (2) で作成した BRAK-OE 細胞および HSC-3 BRAK-KO を  $1.0 \times 10^5$  /35mm Dish に播種し DMEM-10 培地で培養後、プレコンフレントの状態に細胞を回収した。回収した細胞は (1) に示す方法で癌幹細胞因子 CD44v3, CD44v6, CD44v9 の CD44 との発現比率, および幹細胞因子 NANOG および KLF-4 の発現の遺伝子発現を検討した。

(4) HSC-3 BRAK-OE および HSC-3 BRAK-KO の腫瘍進展への影響の検討：DMEM-10 にて培養した HSC-3, HSC-3 BRAK-OE および HSC-3 BRAK-KO はプレコンフレントの状態に細胞を回収した。細胞を PBS (-) に  $1.0 \times 10^7$  /100  $\mu$ l の濃度に懸濁し, Hairless SCID マウスのガス麻酔後に背部皮下に移植し経日的に腫瘍径を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では, EGFR シグナル阻害作用をもつ AA の HNSCC 細胞における多段階癌抑制因子である BRAK の発現促進作用を検討し, 口腔癌治療薬に応用するための機序や有用性の検討を目的に研究を行った。その結果, HNSCC において細胞障害性を示さない最大濃度の AA 前処理を行ったサンプルにおいても, EGF シグナル阻害作用, および BRAK 発現回復作用の傾向は確認されたが, 有意差は認められなかった。そこで, 様式 S-1-8 の「中間評価時に実験が計画通り進行していない場合の対応」に従い, より効率的な BRAK 発現促進機構の解明と促進物質のスクリーニングに主眼をおき, 研究計画の変更を行った。

(2) ヒトの癌組織中には, 自己複製能, 多分化能および無制限な増殖能を併せ持つ癌幹細胞が存在することが解明されている。また, 癌幹細胞は癌の再発, 転移および薬剤耐性の獲得に関与する事が知られている。さらに, 口腔癌においても癌幹細胞マーカー (CD44<sub>v</sub>) 陽性の口腔癌幹細胞の存在が報告されている。そこで, HNSCC を用いて癌幹細胞因子と BRAK の発現について相互関係を検討し, この結果から得られた発現制御メカニズムを応用した BRAK 発現促進分子の探索を行った。

HSC-3 を用いて過剰量の BRAK を強制発現する HSC-3 BRAK-OE 細胞, BRAK の発現が全く無い HSC-3 BRAK-KO 細胞を作成した。これらの細胞の癌幹細胞因子 CD44v3, CD44v6, CD44v9 の CD44s との発現比率 (CD44s: 正常細胞に恒常的に発現している) および幹細胞因子 NANOG および KLF4 の発現を検討した。その結果, HSC-3 BRAK-OE では, HSC-3 および HSC-3 BRAK-KO と比較して, 癌幹細胞マーカー CD44v3, CD44v6, CD44v9 の CD44s との発現比率, NANOG および KLF4 の遺伝子発現が低下していた。

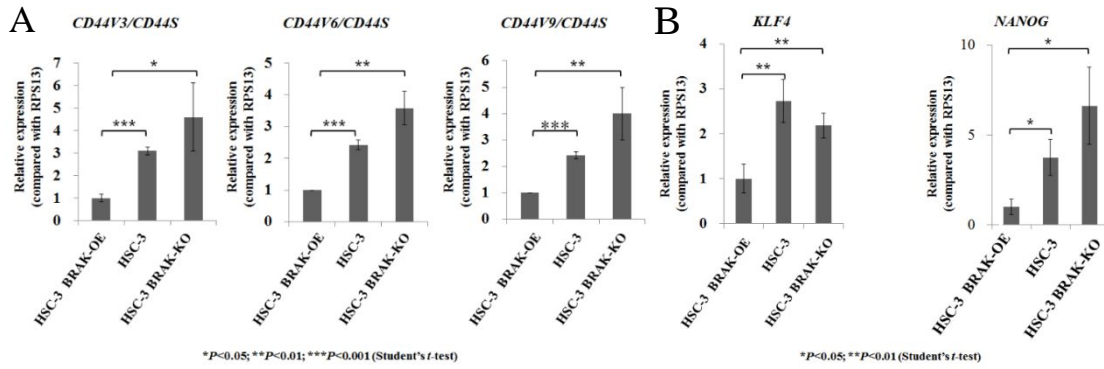


図1： HSC-3, HSC-3 BRAK-OE および HSC-3 BRAK-KO における癌幹細胞因子(CD44V), 幹細胞因子 (KLF4, NANOG) の発現レベルの検討

(3) また, 幹細胞のモデルとして iPS 細胞と比較したところ, NANOG および KLF4 のなどの幹細胞因子の発現は上昇していたが, CD44v3, CD44v6, CD44v9 の発現は検出されなかった。これらの結果から, HSC-3 において BRAK の発現は癌細胞の癌幹細胞因子, 幹細胞因子の発現を抑制ないし癌幹細胞の数を減少させている可能性が考えられた。

(4) BRAK の癌細胞因子の発現抑制機構を介した腫瘍進展抑制作用の検討をするため, 作成した HSC-3, HSC-3 BRAK-OE および HSC-3 BRAK KO を Hairless SCID マウス背部皮下に移植し, 腫瘍進展に及ぼす影響について検討した。その結果, HSC-3 BRAK-KO 移植群は HSC-3 移植群, HSC-3 BRAK-OE 群と比較して有意に腫瘍進展が促進していた。一方, HSC-3 BRAK-OE 群では HSC-3 群, および HSC-3 BRAK-OE 群と比較して有意に腫瘍進展が抑制されていた。

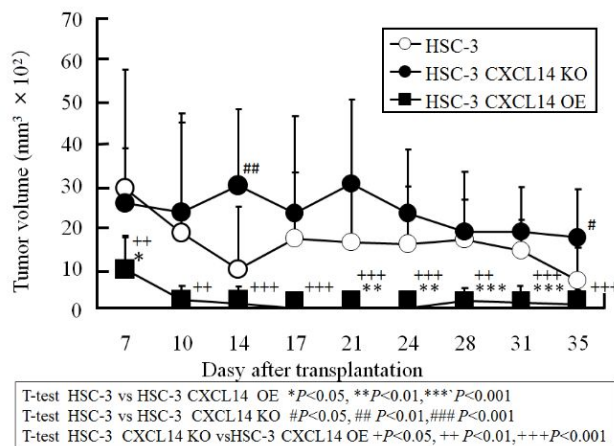


図2： BRAK の発現レベルが腫瘍進展に及ぼす影響の検討

(5) これらの結果から, BRAK 癌幹細胞因子の発現制御を介して腫瘍進展を制御している可能性が示された。今後は, 口腔癌細胞および口腔癌幹細胞におけるより詳細な BRAK 発現機構の解明とその機序を応用した BRAK 促進物質の検索, これらを応用した口腔癌分子標的治療薬の開発を進めていく予定である。

#### < 引用文献 >

Ang KK, *et al*, Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma, *Cancer Res*, DEC 15;62(24), 2002, 350-6

Y Maehata, *et al*, Reactive oxygen species (ROS) reduce the expression of BRAK/CXCL14

in human head and neck squamous cell carcinoma cells, AUG:44(8), *Free Radical Res*, 2010, 913-24

Ozawa S, Maehata Y, *et al*, Restoration of BRAK / CXCL14 gene expression by gefitinib is associated with antitumor efficacy of the drug in head and neck squamous cell carcinoma, NOV:100(11), *Cancer Sci*, 2010, 2202-9

D'Ambrosio SM, *et al*, Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway, Jun 10;409(3), *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 465-9

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ](計3件)

Yang X-Y, Ozawa S, Kato Y, Maehata Y, Izukuri K, Ikoma T, Kanamori K, Akasaka T, Suzuki Iwabuchi H, Kurata S, Kato I, Sakura T, Kiyono T, Hata R-I, C-X-C Motif Chemokine Ligand 14 is a Unique Multifunctional Regulator of Tumor Progression, *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 20, 2019, 1872, DOI: 10.3390/ijms20081872

Maeda T, Suzuki A, Koga K, Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Ikoma T, Hata R-I, Nagashima Y, Nabeshima K, Miyazaki K, Kato Y, TRPM5 mediates acidic extracellular pH signaling and TRPM5 inhibition reduces spontaneous metastasis in mouse B16-BL6 melanoma cells, *Oncotarget*, 査読有, 8(45), 2017, 78312-78326,

URL;[http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=20826&pubmed-linkout=1](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=20826&pubmed-linkout=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 R-I, Expression of the chemokine CXCL14 and cetuximab-dependent tumor suppression in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncogenesis*, 査読有, 5(7), 2016, e240, DOI : 10.1038/oncsis.2016.43.

### [ 学会発表 ](計7件)

陽 暁艶, 小澤 重幸, 生駒丈晴, 金森 慶亮, 鈴木健司, 居作 和人, 前畑 洋次郎, 清野 透, 畑 隆一郎, 口腔癌細胞において癌抑制性ケモカイン CXCL14 の発現は癌幹細胞因子の発現を制御する, 第50回日本結合組織学会学術大会, 福岡, 2018, 6.29-30

Yang X-Y, Ozawa Y, Ikoma T, Maehata Y, Kato Y, Hata R-I, MAP kinase specific pathway stimulates gene expression of chemokine CXCL14, a multistep tumor suppressor, 第59回歯科基礎医学会学術大会, 松本, 2017, 9.16-18

陽 暁艶, 小澤 重幸, 生駒 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, ヒト細胞のUV 照射による癌抑制分子CXCL14の発現上昇はp38 特異的シグナル経路による, 第49回日本結合組織学会学術大会, 三重, 2017, 6.16-17

Miyamoto C, Maehata Y, 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

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

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は扁平上皮組織の分化制御分子か? 第58回歯科基礎医学会学術大会, 札幌 2016, 8.24-26

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 . 研究組織

(1) 研究分担者：畑 隆一郎

ローマ字氏名：(HATA, Ryu-Ichiro)

所属機関名：神奈川歯科大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：特任教授

研究者番号：10014276

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。