

令和元年6月20日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17112

研究課題名(和文)多機能癌抑制分子CXCL14の頭頸部癌幹細胞の分化促進による癌抑制機構の解明

研究課題名(英文)CXCL14, a unique multistep tumor suppressing chemokine, regulates expression of cancer stem cell markers

研究代表者

陽 暁艶 (Yang, Xiaoyan)

神奈川県大学・大学院歯学研究科・特別研究員

研究者番号：90744954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞の存在が癌の再発と転移の原因と考えられ、癌幹細胞を制御する方法の開発が望まれています。我々は副作用のない癌抑制法開発の研究過程で、ケモカインCXCL14が生体内に存在する副作用のない多段階かつ多機能癌抑制分子であることを明らかにしてきました。CXCL14の多段階癌抑制作用を明らかにするためにCXCL14を低レベルで発現する口腔癌細胞(HSC-3)とCXCL14遺伝子の発現を無くしたKO細胞を比較すると、KO細胞はより大きな腫瘍を形成し、かつ癌幹細胞マーカーの発現が高かった。CXCL14は癌幹細胞マーカーの発現などを介して癌幹細胞性を制御し、癌の抑制をしている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の結果は種々の癌に応用可能な普遍的な癌の抑制法の開発につながる可能性がある。癌幹細胞を標的とした普遍的な癌抑制機構については報告がない。CXCL14を用いた癌の治療法は個々の癌に対する対症療法でなく、自己の防御機構を高めるので、癌の予防に繋がり、将来、健康寿命の延長、医療費、介護費用の大幅な削減への道を拓く事が期待される。また、本研究結果により、将来、生体内の癌抑制機構の活性化による、副作用のない、種々の癌に適用可能な、患者に優しい、画期的な癌抑制法や予防法開発のためのデータを提供できる。

研究成果の概要(英文)：Cancer is a leading cause of death and disease worldwide, with a tremendous financial impact. Thus, the development of cost-effective novel approaches for suppressing tumor growth and progression is essential. We previously reported that the chemokine CXCL14 is a multistep tumor suppressor that suppresses carcinogenesis, tumor growth and metastasis. In order to clarify molecular mechanisms of this unique tumor suppression mechanisms by CXCL14, we investigated effects of CXCL14 on the expression of cancer stem cell factors.

When cells were injected into back skin of nude mice, CXCL14 knockout (KO) cells produced much larger tumors compared with parental HSC-3 cells and representative cancer stem cell factors such as CD44v3, CD44v6 and CD44v9 were higher in KO cells compared with parental oral carcinoma cells. These lines of evidence suggest that CXCL14 regulates cancer stemness in oral carcinoma.

研究分野：腫瘍制御学

キーワード：多機能癌抑制分子

1. 研究開始当初の背景

今後の癌治療において、治療法（薬）における副作用の軽減、および癌の再発・転移の阻止が重要です：

- (1) **逆転の発想による生体内癌抑制分子 CXCL14/BRAK の発見**：我々の研究室では副作用のない頭頸部癌扁平上皮癌（以下頭頸部癌）の治療法を開発する過程で、従来手法とは逆に、癌抑制分子を見出すために、正常細胞で合成されており、癌化で発現が低下する分子を探索し、ケモカイン CXCL14/BRAK (以下 CXCL14) を見出し、これが生体内 (*in vivo*) で頭頸部癌細胞の増殖抑制作用を示す事を見出した (畑 他 特許第 4805641 号, [Ozawa et al.](#), [Hata](#), *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, [Hata](#) 総説 *Otolaryngology*, 2012, 他). その後、肺癌細胞、肝癌細胞などで CXCL14 による癌抑制作用が報告された。
- (2) **CXCL14 は多段階、多機能の癌抑制分子である**：さらに、CXCL14 の治療標的分子としての有用性を調べるために、頭頸部癌以外の癌に対する作用、及び癌周囲細胞の CXCL14 の発現が癌の増殖と転移に対する作用を検討した。CXCL14 を野生型マウスの 10 倍程度発現するトランスジェニック (Tg) マウス (普遍性を見るために 3 系統作製) は CXCL14 の発現が高いこと以外は、出生率、寿命、形態、各種組織像、血清の生化学値がもとの野生型マウスと同等であった。癌は発癌、増殖、転移・浸潤など多くの遺伝子変異、活性変化により段階的に進展することが明らかにされている。意外にも Tg マウスは大腸癌 (腺癌) の化学発癌、メラノーマ、ルイス肺癌 (腺癌) の増殖、およびメラノーマ、ルイス肺癌の肺転移を抑制する事が明らかになり、CXCL14 は多段階癌抑制分子であること、及び、種々の異なった遺伝子異常を示す癌を抑制する事から、多機能癌抑制遺伝子と考えられた。さらにメラノーマ細胞数を変えて尾静脈から注入した場合、3 ヶ月後に野生型マウスが 50% 死亡した条件で、Tg マウスが 100% 生存したことから、担癌動物の寿命の延長を示すことが示された。 ([Hata](#), [Yang](#), *et al.*, *Scientific Reports*, 2015, [畑](#), [陽](#) 他 生化学 2015, [Yang](#) *et al.*, *J Oral Biosciences* 2016, [Yang](#) *et al.*, *Oncogenesis*, 2016, 他,)。CXCL14 の化学構造は系統発生的に維持されており、マウスとヒトにおいて非常に酷似しており、機能的にも同等で有り、また、発現レベルもヒトとマウスで同じレベルであった。さらに健常人中に平均の 10 倍近い、Tg マウスレベルの CXCL14 を常に発現しているヒトが存在したことから、CXCL14 の高い発現はヒトにおいても大きな副作用を示さない事が考えられる。

2. 研究の目的

癌の種類にかかわらず、また、癌細胞に CXCL14 を強制発現させても、Tg マウスのように癌周囲の細胞に CXCL14 を発現させても癌抑制作用を示すことから、CXCL14 は従来の癌抑制分子と異なり、癌細胞の基本的な性質を変化させていると考えられ、本申請の実験を考えた。

- (1) **CXCL14 は癌幹細胞を分化させて癌の進展を抑制する**：癌幹細胞は既存の抗癌剤などに対して高い抵抗性をもっており、癌幹細胞の存在が癌の治療後の再発、および転移の原因となっている可能性が報告されている。我々は CXCL14 の癌抑制機構の研究過程で、癌幹細胞を多く含み、CXCL14 を発現していない頭頸部癌細胞に CXCL14 遺伝子を導入して CXCL14 を強制発現させると、移植癌の増殖を抑制する ([Yang](#) *et al.*, *Oncogenesis*, 2016) と共に、培養系において高密度培養で正常扁平上皮細胞の分化を模倣することを見出した ([Ikoma](#), [Ozawa](#), [Hata](#) 他, 2012 および [Yang](#) 未発表データ)。この結果は CXCL14 が癌幹細胞の分化を促進して、癌の異常増殖を抑制している可能性を示している (図 1)。

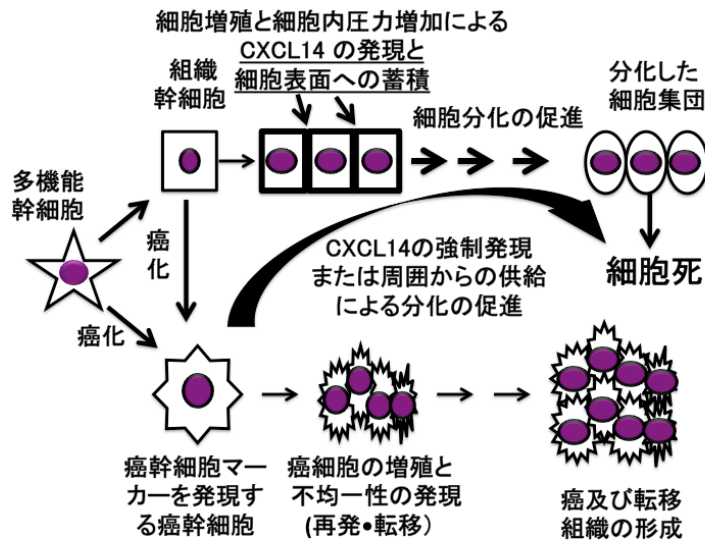


図1. (癌)幹細胞の分化におけるCXCL14の機能の作業仮説

図1. の説明：(組織)幹細胞は増殖するとCXCL14 遺伝子を発現し、次いで最終分化をする。癌幹細胞はCXCL14 遺伝子を発現できず、癌細胞として増殖を続けるが、CXCL14 の強制発現か、或いは周囲の細胞によるCXCL14 の供給により、分化の方向に進行し、増殖が抑制される。

- (2) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか： 本申請では頭頸部癌細胞と頭頸部癌幹細胞を多く含み、CXCL14 遺伝子を欠失、あるいは強制発現した細胞を用いて、培養系と細胞移植系を利用して、CXCL14 が癌幹細胞の分化を促進して癌の進展抑制をする分子機構を明らかにする。
- (3) 当該分野における本研究の学術的特色：
- a. 今後の癌研究における大きなテーマは、患者に負担の少ない、副作用のない治療法の開発と致死率を高める癌再発・転移を抑制する方法の開発である：我々が作成したTgマウスはCXCL14 の発現レベルが高く、癌の抑制作用を示す以外は野生型(Wt)マウスと差がなく、生後2年経過しても組織学的検索、生化学的検索で異常を示さなかった。健康なヒトも野生型マウスも血液中のCXCL14 レベルは0.9 ng/mLと同じであった。さらに健康人の平均の10倍近い(Tgマウスレベルの)CXCL14 を常に発現しているヒトが存在したことから、生体におけるCXCL14 の高い発現はヒトにおいても大きな副作用を示さない事が考えられる。また、CXCL14 は癌幹細胞の分化を促進して増殖抑制するので、炎症性分子などの流出が少なく、副作用がない事が期待される。
 - b. 独創的な点と予想される結果と意義及び本研究の波及効果：
 - 画期的な癌治療法・予防法の開発への道を拓く：CXCL14 は分泌タンパク質であるが細胞によって合成されたCXCL14 の90%は細胞膜表面に存在し、細胞同士の接着を強めている(未発表データ)ので、癌細胞のCXCL14 の発現上昇によっても、Tgマウスの場合のように、癌幹細胞周囲の細胞によるCXCL14 の発現上昇によっても、同様にCXCL14 による細胞同士の相互作用が強まって細胞分化が促進され癌の進展が抑制されると考えられる(研究目的、図1、参照)。この結果は種々の癌に応用可能な普遍的な癌の抑制法の開発につながる可能性がある。癌幹細胞の分化による普遍的な癌抑制機構については報告がない。

- CXCL14 を用いた癌の治療法は個々の癌に対する対症療法でなく、自己の防御機構を高めるので、癌の予防に繋がり、将来、健康寿命の延長、医療費、介護費用の大幅な削減への道を拓く事が期待される。

3. 研究の方法

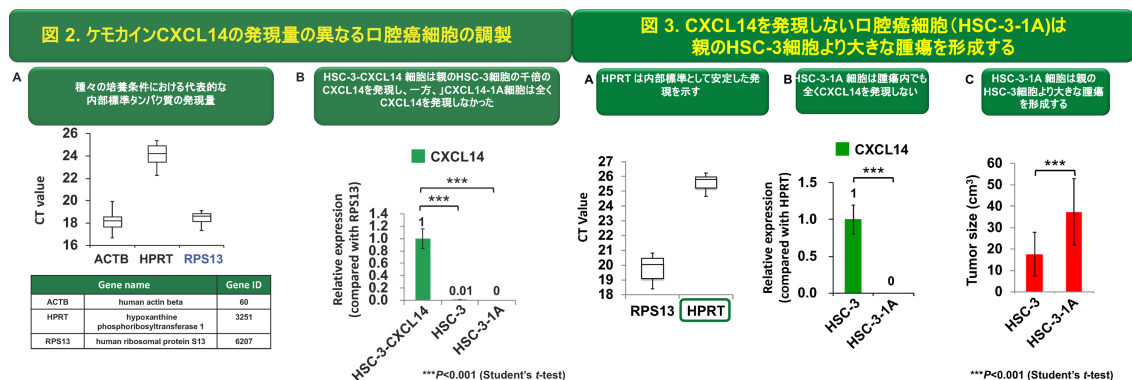
- (1) 種々のレベルの CXCL14 を発現する頭頸部（幹）癌細胞(HSAC-3)、CXCL14 遺伝子を導入した HSC-3 細胞(HSC-3-CXCL14)、および CXCL14 遺伝子の発現を欠損した HSC-3(HSC-3-1A)細胞を用いて、細胞培養系(*in vitro*)において CXCL14 の発現量と分化マーカーの TGM1,TGM3, その基質であるインボルクリンの発現増加、および、正常細胞で発現しているヒアルロン酸受容体(CD44S)、CD44 のバリエーションで癌幹細胞マーカーでもある CD44V3, CD44V6, CD44V10 の発現を調べる。
- (2) 上記の細胞をヌードマウスの皮下へ移植し(*in vivo*)、CXCL14 の発現が分化マーカーの発現促進と癌幹細胞マーカーの CD44 (V3, V6, 10)などの発現と、腫瘍の増殖速度との関係を明らかにする。
 - c. 細胞あるいは腫瘍からトリゾール法により RNA を精製し、RT-PCR 法により cDNA 量を測定する。

4. 研究成果

(1) ケモカイン CXCL14 の発現と移植腫瘍の大きさ

RT-PCR 法における cDNA の相対発現量を調べるために一般に使用されている内部標準タンパク質の種々の培養条件における発現量を調べると、目的遺伝子の発現量の高い時はリボソームタンパク質サブユニット 13(RPS13)を、発現量が低い時はヒポキサンチンフォスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) が適当であった(図 2 A)。HSC-3-CXCL14 は親の HSC-3 細胞の千倍の CXCL14 を発現し、HSC-3-1A 細胞は HSC-3 細胞の千分の 1 以下の発現であった(図 2 B)。培養系における CXCL14 の発現量と細胞増殖速度については全く相関性が見出されなかったため、CXCL14 の発現が直接細胞の増殖に関与する証拠はなかった。

HSC-3 細胞、あるいは HSC-3-1A 細胞を T 細胞欠損のヌードマウスの背部皮下に移植し、生成した腫瘍の大きさを測定すると、HSC-3-1A 細胞由来の腫瘍は HSC-3 細胞由来の腫瘍より常に大きかった(図 3 C)。腫瘍から RNA を精製し、CXCL14 の発現を確認すると HSC-3-1A 由来の腫瘍には培養系と同様に CXCL14 の発現が検出されなかった(図 3 B)。



HSC-3-1A および HSC-3-CXCL14 細胞において分化マーカーの TGM1,TGM3 は親細胞の HSC-3 より発現が低下しており、また、その基質であり、後期の分化マーカーであるインボルクリンの発現は親の HSC-3 細胞に比べて高い、あるいは低下しており、分化が異常に促進されている可能性も示された。

CXCL14 が発癌、腫瘍増殖、転移のすべての段階を抑制する多段階癌抑制機能を示したことから、癌の治療抵抗性、転移などの悪性化に関与する癌幹細胞に対する作用の可能性を調

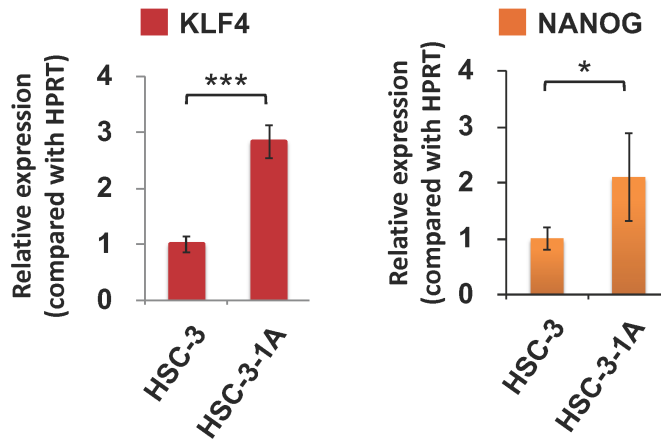
べた。

(2) ケモカイン CXCL14 の発現と幹細胞マーカーと癌幹細胞マーカーCD44V の発現

HSC-3 細胞由来の腫瘍が幹細胞様細胞を含んでいるかどうかを調べるために移植腫瘍内の幹細胞分子の発現を調べると、KLF4 と NANOG の発現が HSC-3-1A 細胞由来の腫瘍で親の HSC-3 細胞由来の腫瘍より有意に高く発現していた (図 4)。

図 4. CXCL14の発現を欠損するHSC-3細胞は、移植腫瘍内において幹細胞マーカー(KLF4,NANOG)の発現が親のHSC-3細胞より上昇していた

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test).



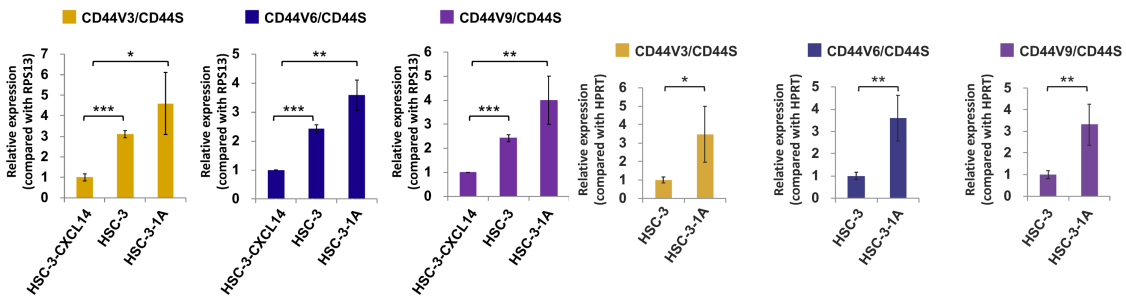
ケモカイン CXCL14 の発現が癌幹細胞マーカーの CD44Variant の発現 (補正のために CD44Standard との比を用いた) を調べると、培養系では CD44V3, V6, V9 のすべてにおいて HSC-3-CXCL14 細胞における発現量が HSC-3 細胞、HSC-3-1A 細胞より低下していた(図 5)。また、移植腫瘍における発現は CD44V3, V6, V9 のすべてで HSC-3-1A 細胞由来の腫瘍において HSC-3 由来の腫瘍より高い値を示した(図 6)。

図 5. CXCL14 は培養系において癌幹細胞マーカーである CD44Vの発現を抑制した

図 6. CXCL14の発現を欠損するHSC-3細胞は、移植腫瘍内において癌幹細胞マーカー(CD44Variants)の発現が親のHSC-3細胞より上昇していた

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test)

* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ (Student's *t*-test).



結論と今後の問題

CXCL14 は扁平上皮細胞のマーカーであり、分化の制御分子の一つと考えられる。特に

CXCL14 の発現は幹細胞マーカー、あるいは癌幹細胞マーカーの発現を抑制したことから、CXCL14 は口腔癌由来 HSC-3 細胞の幹細胞マーカー、あるいは癌幹細胞マーカーの発現を制御して癌の抑制をしている可能性が示された。この結果は、生体内の癌抑制機構の活性化による、副作用のない種々の癌に適用可能な、患者に優しい癌抑制法や予防法開発に役立つ可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Yang XY, Ozawa S, Kato Y, Maehata Y, Izukuri K, Ikoma T, Kanamori K, Akasaka T, Suzuki K, Iwabuchi H, Kurata SI, Katoh I, Sakurai T, Kiyono T, Hata RI.
C-X-C Motif Chemokine Ligand 14 is a Unique Multifunctional Regulator of Tumor Progression. (査読有り)
[Int J Mol Sci](#). 2019 Apr 16;20(8). pii: E1872. doi: 10.3390/ijms20081872.

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 畑隆一郎, 陽暁艶, 小澤重幸, 居作和人, 生駒丈晴, 金森慶亮, 鈴木健司, 前畑洋次郎, 服部俊治, 水野一乗, 清野透. 口腔癌細胞において癌抑制性ケモカイン CXCL14 の 発現は幹細胞マーカーの発現を制御する. 第 51 回日本結合組織学会学術大会, 東京, 2019. 5. 31-6. 1.
- (2) Ryu-Ichiro Hata, Xiaoyan Yang, Shigeyuki Ozawa, Kazuhito Izukuri, Takeharu Ikoma¹, Keisuke Kanamori, Kenji Suzuki, Yojiro Maehata, Tohru Kiyono. CXCL14, a unique multistep tumor suppressing chemokine, regulates expression of stem cell factors. Bit' s 12th Annual World Cancer Congress, Osaka, 2019, 5. 15-17.
- (3) Yang X-Y, Ozawa S, Ikoma T, Kanamori K, Suzuki K, Izukuri K, Maehata Y, Kiyono T, Hata R-I: CXCL14, a multistep tumor suppressing chemokine, regulates expression of stem cell factors. 第 50 回日本結合組織学会学術大会, 福岡, 2018. 6. 29-30.
- (4) Yang Xiao-Yan , Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress carcinogenesis, tumor growth and tumor cell metastasis. Forum [2F20]21 世紀における癌の分子予防医学の重要性: 次世代の研究者へのメッセージ. ConBio2017, 神戸, 12. 6-9.
- (5) Yang X-Y, Ozawa Y, Ikoma T, Kato Y, Hata R-I, p38delta 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, 塩尻, 2017. 9. 16-18.
- (6) 陽暁艶, 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. ヒト細胞の UV 照射による癌抑制分子 CXCL14 の発現上昇は p 38 δ 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, 津, 2017. 6. 16-18.