

平成 21 年 06 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：平成 19 年 ～ 平成 20 年
 課題番号：19791355
 研究課題名(和文) ケモカイン (BRAK) の TET-ON 発現ベクターを用いた癌進展抑制機構の解析
 研究課題名(英文) Development of a TET-ON system for expression of chemokine (BRAK) and the killing of cancer cells
 研究代表者
 バワール ウジャール (Bhawal Ujjal)
 神奈川歯科大学・歯学部・特別研究員
 研究者番号：50433339

研究成果の概要：

BRAK/CXCL14 はどの正常細胞でも発現しているケモカインであり、種の異なるマウスとヒトの BRAK/CXCL14 のアミノ酸配列が非常に高い相同性を示すことから、非常に普遍的かつ重要な機能を持つ分子と考えられる。BRAK/CXCL14 の *in vivo* における腫瘍抑制機構を明らかにすることは、口腔癌ばかりでなく、種々の癌の進展機構の解明と、将来における癌のドーマント療法開発の分子標的として有望であり、また、全ての正常細胞で発現していることから将来における遺伝子導入等における治療において副作用の少ない新しい標的分子と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,400,000	0	2,400,000
平成 20 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：分子生物学、分子病理学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯学

キーワード：ケモカイン、BRAK/CXCL14、Tet-On、口腔扁平上皮癌細胞、進展、メチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの癌細胞で活性化している上皮増殖因子受容体の活性化により BRAK/CXCL14 遺伝子の発現は低下する。我々は口腔癌を含む多くの癌で上皮増殖因子受容体が活性化していることに着目して、口腔扁平上皮癌細胞を無血清下の培養で培養し、上皮増殖因子で処理した際に(癌の悪性化条件)変化する遺伝子を遺伝子チップおよび RT-PCR 法で網羅的に解析し、ケモカイン BRAK/CXCL14 の mRNA が特異的に発現低下していることを見いだした。

(2) ケモカイン BRAK/CXCL14 は癌化で発現低下し、高発現させると *in vivo* で口腔癌細胞の増殖抑制作用を示す。我々は 7 人の患者から得られた口腔癌細胞でも血清を含まない培養条件では BRAK/CXCL14 を発現しており、上皮増殖因子の存在(癌の悪性化のモデル)でその発現が低下することから、BRAK/CXCL14 が *in vivo* の正常細胞、正常組織でホメオスタシス維持に重要な分子であると考え、口腔癌細胞に BRAK/CXCL14 を強制発現させると、*in vitro* の増殖は MOCK(対照)と同じであるにも

拘らず、マウス背部皮下に移植すると、ベクターのみを導入した癌細胞(MOCK)を比較して、BRAK/CXCL14 遺伝子導入細胞が著明な癌進展抑制作用を持つことを明らかにした。

2. 研究の目的

BRAK/CXCR14 強制発現細胞は、腫瘍のリジエクシオン率が高く、また、残存腫瘍も縮小過程が早いので生着しないことからBRAK/CXCR14 が強力に腫瘍抑制効果を示す分子であることを示した。しかし、その腫瘍縮小メカニズムは腫瘍が生着しないことから、その過程、機構を明らかにすることが困難であった。本研究では BRAK/CXCR14 の発現をテトラサイクリン処理により発現するように操作した腫瘍細胞(Tet-ON 細胞)を移植し、腫瘍形成後にマウスにテトラサイクリン(実際にはその誘導体のドキシサイクリン)を与えて BRAK/CXCR14 遺伝子の発現を誘導し腫瘍縮小過程を(1) 腫瘍細胞のアポトーシスの有無、(2) 周囲の組織からの血管侵入の有無、および(3) NK 及び NKT 細胞の腫瘍抑制における関与、の面から検討する。これにより BRAK/CXCR14 の腫瘍縮小メカニズムを明らかにすることにより、BRAK/CXCR14 の抗腫瘍活性を生かした分子標的治療の基礎的研究を飛躍的に高めることができる。

3. 研究の方法

(1) Tet-ONベクターをFuGENE 6を用いてトランスフェクトし、G418を用いてTet-ONベクターの導入されたHSC-3細胞を選択する。
(2) pTRE-TightベクターにKpn1とSal1サイトを用いてBRAKのcDNA(既に作製済み)を導入し、pTRE-Tight BRAK発現ベクターを作製する。上記ベクターをpTK-Hygベクターと共に、上記aの細胞に同時にトランスフェクションし、ハイグロマイシン(Hyg)を用いてpTRE-Tight BRAK発現ベクターを導入したHSC-3細胞を得る。

(3) 対照細胞として、pTRE-Tight ベクターのみを導入した細胞をbと同様にして作製する。腫瘍縮小メカニズムの解析

I. 腫瘍縮小過程の計測。

BRAK発現腫瘍細胞と腫瘍細胞をそれぞれ1、3、7日後採取し、腫瘍径を計測しその経時的变化を明らかにする。

II. 腫瘍縮小過程の病理組織学的検討

採取した腫瘍のパラフィン包埋切片を作製し、病理形態学的に細胞消失の過程を検討する。

III. 免疫組織化学による細胞増殖能の検討。
抗Ki-67抗体を用いて、細胞増殖活性を検討し

BRAK発現腫瘍細胞と腫瘍細胞で増殖活性が腫瘍縮小メカニズム関与するか検討する。

IV. アポトーシスの検出

電子顕微鏡、DNAラダー、TUNEL法によるアポトーシスの発現を検討する。また、Apoptag kitを用いてアポトーシス陽性細胞を定量し細胞死が腫瘍縮小メカニズム関与するか検討する。

V. 宿主側の因子の検討

①:腫瘍組織にNK細胞,NKT細胞が浸潤するかどうか免疫組織化学的に検討し、陽性細胞数をカウントしBRAK発現腫瘍細胞と腫瘍細胞で違いを検討する。

②:血管およびリンパ管数の検討を血管に対するCD34抗体、リンパ管に対するDO-4抗体を用いて染色し画像解析により血管・リンパ管数を定量化し、腫瘍縮小メカニズムへの関与を検討する。

③:好中球の浸潤をHE染色で確認する。

4. 研究成果

(1) 我々は、pTet-On ベクターを目的細胞株(口腔扁平上皮癌: HSC-2, HSC-3; 子宮頸部癌: HeLa)へトランスフェクトし、ホストとなる安定なクローン細胞株を作製した。新しく作製した Tet-On ホスト細胞株内に、ハイグロマイシン選択性マーカーと共に目的遺伝子(BRAK)を組み込んだ pTRE-Tight をコトランスフェクトし、両方の発現ベクターを含む二重安定細胞株を作製した。続いてのドキシサイクリン(Dox)処理を行い、Western blot analysis により検討した結果、細胞株において BRAK の発現は認められなかったことから、マウスへの移植実験には至らなかった。

(2) 我々は、ヒト正常組織、白板症組織及び口腔扁平上皮癌組織を用い、免疫染色法にて BRAK と EGFR の発現を比較し、BRAK と EGFR に逆相関があることを確認した。さらに我々は口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、BRAK のメチル化解析を行い、細胞株に BRAK のメチル化が存在することを明らかにした。

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 13 件)

2008

1. Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Imanaka T, Imaizumi T, Kondo J, Noshiro M, Kusumi T, Kato Y,

- Kijima H. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates the expression of vascular endothelial growth factor. **Genes Cells**, 13(2), 131-144, 2008. 査読有り
2. Sasahira T, Kirita T, Oue N, **Bhawal UK**, Yamamoto K, Fujii K, Ohmori H, Yasui W, Bosserhoff AK, Kuniyasu H. High mobility group box-1-inducible melanoma inhibitory activity is associated with nodal metastasis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Science**, 99(9), 1806-1812, 2008. 査読有り
 3. **Bhawal UK**, Sugiyama M, Nomura Y, Kuniyasu H, Tsukinoki K. Loss of 14-3-3 Sigma Expression and Presence of Human Papillomavirus Type 16 E6 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery**, 134(10), 1055-1059, 2008. 査読有り
 4. Sasahira T, Oue N, Kirita T, Luo Y, **Bhawal UK**, Fujii K, Yasui W, Kuniyasu H. Reg IV expression is associated with cell growth and prognosis of adenoid cystic carcinoma in the salivary gland. **Histopathology**, 53(6), 667-675, 2008. 査読有り
 5. Nomura Y, **Bhawal UK**, Nishikiori R, Sawajiri M, Hirata I, Okazaki M. Effects of oral disinfectants on the cell cycle and viability of primary human gingival fibroblasts in vitro. **Dent Mater J** (In Press). 査読有り
- 2007**
6. Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: multiple mechanisms through E-box elements. Fujimoto K, Hamaguchi H, Hashiba T, Nakamura T, Kawamoto T, Sato F, Noshiro M, **Bhawal UK**, Suardita K, Kato Y. **Int J Mol Med** 19(6); 925-32: 2007. 査読有り
 7. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is important in the prediction of recurrence in human oral squamous cell carcinoma. Sasahira T, Kirita T, **Bhawal UK**, Yamamoto K, Ohmori H, Fujii K, Kuniyasu H. **Histopathology** 51(2); 166-72: 2007. 査読有り
 8. Methylation and intratumoral heterogeneity of 14-3-3 sigma in oral cancer. **Bhawal UK**, Tsukinoki K, Sasahira T, Sato F, Mori Y, Muto N, Sugiyama M, Kuniyasu H. **Oncol Rep** 18(4); 817-24: 2007. 査読有り
 9. High-risk human papillomavirus type 16 E7 oncogene associates with Cdc25A over-expression in oral squamous cell carcinomas. **Bhawal UK**, Sugiyama M, Tsukinoki K, Ikeda MA, Kuniyasu H. **Virchows Arch** 450(1); 65-71: 2007. 査読有り
 10. UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) induces apoptosis and G1 arrest of both primary and metastatic oral cancer cell lines in vitro. Otsubo A, **Bhawal UK** (co-first author), Nomura Y, Mitani Y, Ozawa K, Kuniyasu H, Sugiyama M. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 103(3); 391-7: 2007. 査読有り
 11. Apoptotic and necrotic influence of dental resin polymerization initiators in human gingival fibroblast cultures. Masuki K, Nomura Y, **Bhawal UK**, Sawajiri M, Hirata I, Nahara Y, Okazaki M. **Dent Mater J** 26(6); 861-9: 2007. 査読有り
 12. The expression of receptor for advanced glycation end products is associated with angiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. Sasahira T, Kirita T, **Bhawal UK**, Ikeda M, Nagasawa A, Yamamoto K, Kuniyasu H. **Virchows Arch** 450(3); 287-95: 2007. 査読有り
 13. Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. Sugiyama M, **Bhawal UK** (co-first author), Kawamura M, Ishioka Y, Shigeishi H, Kamata N. **Br J Oral Maxillofac Surg** 45(2); 116-22: 2007. 査読有り
- [学会発表] (計13件)
1. **Bhawal UK**, Sato F, Ikoma T, Dohi M, Honma Y, Kijima H, Kubota E: IL-1β mediated up-regulation of DEC in human gingival epithelium in a NF-kB and Cox-2 independent pathway. The 11th Meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science, Hirosaki, 2009.03.27 - 28
 2. **バワール ウジャール**, 生駒 丈晴、小澤 重幸、松本 剛一、畑 隆一郎、久保田 英朗: 口腔扁平上皮癌における BRAK と EGFR の発現. 口腔難治疾患研究センター報告会, 神奈川歯科大学, 平成 21 年 03 月 21 日
 3. **バワール ウジャール**, 生駒 丈晴、小澤 重幸、松本 剛一、畑 隆一郎、久保田 英朗: ケモカイン (BRAK) の Tet-On 発現ベクターを用いた癌進展抑制機構の解析・口腔扁平上皮癌における BRAK と EGFR の発現. 神奈川歯科大学

- 学会例会, 神奈川歯科大学, 平成 21 年 01 月 15 日
4. パワー ウジャール、生駒 丈晴、土肥 雅彦、小林 優、久保田 英朗: Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC1 regulates CyclinD1 expression through E-box elements. 神奈川歯科大学学会総会, 神奈川歯科大学, 平成 20 年 12 月 06 日
 5. パワー ウジャール、生駒 丈晴、松本 剛一、小林 優、久保田 英朗: 低酸素下における bHLH 型転写因子 DEC2 と Vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現の制御機構. 神奈川歯科大学学会総会, 神奈川歯科大学, 平成 20 年 12 月 06 日
 6. Bhawal UK, Sato F, Ikoma T, Kijima H, Kubota E: DEC2 negatively regulates VEGF expression in oral squamous cell carcinoma. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場, 平成 20 年 10 月 28 日 - 30 日
 7. Luo Y, Sasahira T, Bhawal UK, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H. TrkB and TrkC are associated with tumor progression, and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場, 平成 20 年 10 月 28 日 - 30 日
 8. Sasahira T, Kirita T, Oue N, Bhawal UK, Yamamoto K, Fujii K, Ohmori H, Luo Y, Yasui W, Bosserhoff AK, Kuniyasu H. HMGB1-inducible MIA is associated with nodal metastasis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場, 平成 20 年 10 月 28 日 - 30 日
 9. Kuniyasu H, Sasahira T, Luo Y, Bhawal UK, Morikawa Y, Shimamoto T, Ohmori H. Angiotensin activation system in HT29 colon cancer cells enhances liver metastasis. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場, 平成 20 年 10 月 28 日 - 30 日
 10. パワー ウジャール、生駒 丈晴、土肥 雅彦、小林 優、久保田 英朗: IL-1 β mediated up-regulation of HIF-1 α and DEC transcription factor in human gingival cell. 第 18 回日本口腔粘膜学会総会、東京、平成 20 年 9 月 19 日 - 20 日
 11. 生駒 丈晴、パワー ウジャール、土肥 雅彦、小林 優、久保田 英朗: 口腔粘膜上皮細胞の炎症性サイトカイン発

現における HMGB1 と HMGB1 レセプターとの関連. 第 18 回日本口腔粘膜学会総会、東京、平成 20 年 9 月 19 日 - 20 日

12. Bhawal UK, Sato F, Ikoma T, Kijima H, Kubota E: DEC2 negatively regulates VEGF expression in oral squamous cell carcinoma. 14th World Congress on Advances in Oncology, Greece, 2008.09.09 - 11
13. Bhawal UK, Sato F, Kijima H, Kubota E: DEC2 negatively regulates VEGF expression in oral squamous cell carcinoma. 86th General Session & Exhibition of the IADR, Canada, 2008.07.02 - 05

6. 研究組織

(1) 研究代表者

パワー ウジャール (Bhawal Ujjal)
神奈川歯科大学・歯学部・特別研究員
研究者番号: 50433339