

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21390543

研究課題名（和文） 頭頸部扁平上皮癌への新たな多剤併用療法の試み

研究課題名（英文） Study on a new combination chemotherapy for head and neck squamous cell carcinomas

研究代表者

久保田 英朗 (KUBOTA EIRO)

神奈川歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50170030

研究成果の概要（和文）：BRAK /CXCL14 は、多くの正常組織で発現しているケモカインで生体のホメオスタシス維持に重要と考えられている。BRAK には血管新生抑制作用や単球、マクロファージの遊走活性などの機能があることが報告されている。また、頭頸部扁平上皮癌細胞（HNSCC）では、上皮細胞増殖因子（EGF）刺激により BRAK の発現が抑制されることがわかっており、通常 BRAK の発現が低下または消失している。このことが、癌の増殖・進展に密接に関与していることが示唆されている。さらに、遺伝子導入により BRAK を高発現させた細胞や BRAK 高発現トランスジェニックマウスを用いた腫瘍移植実験から、BRAK が抗腫瘍効果を示す標的分子として注目されている。本研究では、頭頸部扁平上皮癌で見られる BRAK の発現低下が、BRAK 遺伝子のプロモーター領域のメチル化による変異により引き起こされていること、BRAK 低発現細胞はメチル化阻害剤処理によりその発現が回復できること、BRAK を発現した扁平上皮癌細胞は EGF 受容体阻害剤（ゲフィチニブ）処理によりその発現がさらに増強され、他の抗腫瘍薬剤との併用で相乗的な抗腫瘍効果が期待できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：BRAK/CXCL14 is a chemokine that is expressed in normal tissues, and is important for maintaining homeostasis. BRAK has many functions such as inhibition of angiogenesis and chemotaxis of monocytes as well as macrophages. BRAK is absent from or expressed at very low levels in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), and this is closely correlated with tumorigenesis and progression of HNSCC. Forced expression of BRAK chemokine by the gene transfection into HNSCC or BRAK transgenic mice reduced the tumorigenicity of the cells in xenografts, and BRAK was considered to be a target molecule for the cancer treatment. In the present study, we elucidated that low expression of BRAK in HNSCC was due to mutation of BRAK promoter region by methylation. The low expression level of BRAK in HNSCC is restored by treatment of the cells with anti-methylation drug. HNSCC overexpressed BRAK by EGF receptor antagonist (gefitinib) and anti-methylation drug gave rise to susceptible to tumor regression. The anti-tumor effect using gefitinib and anti-cancer drugs is thus feasible for combination chemotherapy in HNSCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・外科系歯学

キーワード：ケモカイン・BRAK・メチル化・EGFR 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

患者の個人差を考慮した治療法であるテーラーメイド医療は、分子標的治療法の導入により開発が進められている。乳癌の遺伝子診断に基づく検診や、ゲフィチニブ（商標名：イレッサ 対象は非小細胞肺癌）の奏功に關与する上皮増殖因子受容体(EGFR)の変異検出が良い例である。我々が取り扱う頭頸部扁平上皮癌においても、EGFR からのシグナルが癌の病態悪化に關与することが明らかとなっており、EGFR 阻害剤の投与が試験的に行われている。

我々はこれまでに、抗腫瘍効果を示す分子 BRAK が EGFR シグナルによって制御されていることを見出した。さらに EGFR 阻害剤で腫瘍縮小効果を示す頭頸部扁平上皮癌細胞の共通点として、BRAK の遺伝子発現が確認される癌であることを明らかにした。

そこで、我々は頭頸部扁平上皮癌細胞を BRAK を発現している癌と、していない癌に大別した。さらにそれぞれの群より代表的な癌細胞を複数選出し、ヌードマウスに移植後、EGFR 阻害剤の投与を行った結果、BRAK を発現している群では、移植腫瘍内で BRAK の遺伝子発現が顕著に上昇し、腫瘍縮小効果を示すことを見出した。一方、BRAK の遺伝子発現が確認できない癌細胞群では、その理由として、BRAK のプロモーター領域がメチル化によって不活化しており、EGFR 阻害剤投与においても、BRAK の遺伝子発現回復による抗腫瘍効果は期待できないことが考えられた。事実、このような細胞株では *in vivo* の実験系で、EGFR 阻害剤を投与しても BRAK の遺伝子発現は回復せず、抗腫瘍効果を示さない結果を得た。この結果は、BRAK のプロモーター領域のメチル化をマーカーとした、メチル化を受けていない頭頸部扁平癌細胞では EGFR 阻害剤単剤、メチル化を受けている癌細胞ではデシタピン（脱メチル化剤）と EGFR 阻害剤の併用療法を行うといったテーラーメイド医療の可能性を示す。

2. 研究の目的

ケモカイン BRAK/CXCL14 のプロモーター領域のメチル化をマーカーとした頭頸部扁平上皮癌への新たな多剤併用療法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究結果より、BRAK のプロモーター領域である CpG island が遺伝子発現の上昇に重要であり、またその領域に結合する転写因子が SP1 と Oct-1 である可能性が高いと推測している。本研究結果に基づき、実際に SP1 と Oct-1 が BRAK のプロモーター領域に結合するか、chip アッセイ及び免疫沈降法を用いて検討を行った。さらにマーカー分子となる BRAK のプロモーター領域のメチル化の頻度をパイロシーケンスを用いて解明し、メチル化検出を容易にするためメチル化特異的 PCR 法の確立を行った。メチル化検出法確立によってスクリーニングされた癌細胞をヌードマウスに移植し、メチル化阻害剤であるデシタピンと EGFR 阻害剤を投与し、病理学的所見を含め抗腫瘍効果について検討を行った。

4. 研究成果

頭頸部扁平上皮癌細胞 18 株中 8 株で BRAK の遺伝子発現が確認された。また 8 株すべてにおいて、EGF 受容体阻害剤は BRAK の遺伝子発現を回復することが明らかとなった（図 1）。

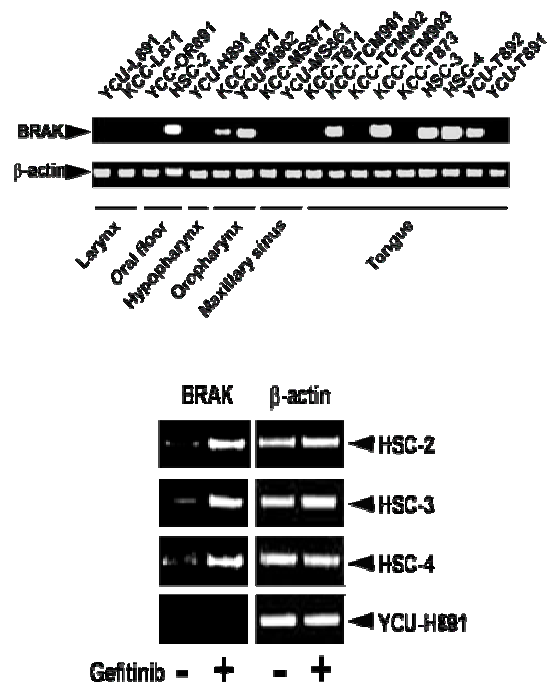


図 1

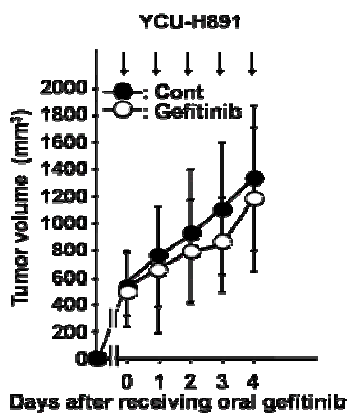
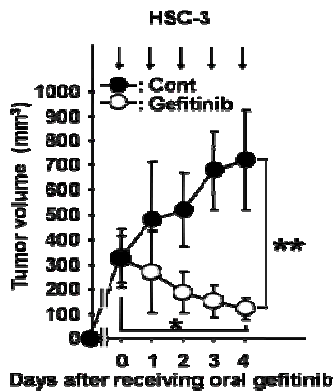


図 2

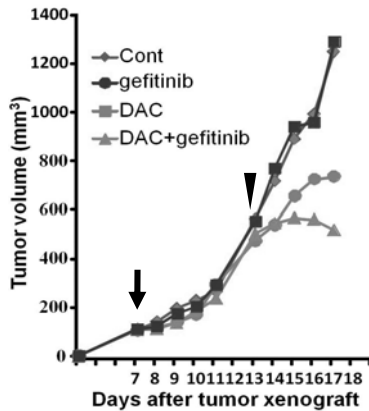


図 3

さらに、BRAKのプロモーター領域がメチル化しておらず、BRAKの発現が確認される癌細胞 (HSC-3) では、EGF 受容体阻害剤による抗腫瘍効果の増強が確認された。一方、BRAKの遺伝子発現が確認できない癌細胞株 (YCU-H891) においては、BRAKの転写開始領域上流に存在する GC ボックスにメチル化が確認され、そのような癌細胞ではEGF 受容体阻害剤による腫瘍縮小効果は確認されなかった (図 2)。メチル化を受けていない頭頸部扁平癌細胞を用いた移植実験で、EGFR 阻害剤

(gefitinib)単剤、脱メチル化剤であるデシタピン (DAC)単剤、あるいは両者の混合で処理したマウスの腫瘍抑制効果を比較すると、DAC と gefitinib の併用で高い抗腫瘍効果を示した (図 3)。

本研究結果から、BRAKのプロモーター領域のメチル化をメチル化特異的 PCR で検出すれば、EGF 受容体阻害剤投与前の抗腫瘍効果予測の判断基準となる可能性が示された。また、EGFR 阻害剤と脱メチル化剤であるデシタピンの併用療法は、BRAKを分子標的とする癌治療に有効であることが示唆された。

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 8 件)

査読があるもののみを記載している。

平成 21 年度

1、Ozawa S, Kato Y, Ito S, Komori R, Shiiki N, Tsukinoki K, Ozono S, Maehata Y, Taguchi T, Imagawa-Ishiguro Y, Tsukuda M, Kubota E, Hata R: Restoration of BRAK/CXCL14 gene expression by gefitinib is associated with antitumor efficacy of the drug in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 100, 2202-2209, 2009
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01281.x

2、Ozawa S, Kato Y, Kubota E, Hata R: BRAK/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse. *Biomedical Research*, 30(5), 315-318, 2009
DOI: 10.2220/biomedres.30.315

平成 22 年度

3、Sato K, Ozawa S, Izukurri K, Kato Y, Hata R: Expression of tumour-suppressing chemokine BRAK/CXCL14 reduces cell migration rate of HSC-3 tongue carcinoma cells and stimulates attachment to collagen and formation of elongated focal adhesions in vitro. *Cell Biology International*, 34(5):513-22, 2010.
DOI: 10.1042/CBI20090108

4、Ozawa S, Ito S, Kato Y, Kubota E, Hata R: Human p38 delta MAP kinase mediates UV irradiation induced up-regulation of the gene expression of chemokine BRAK/CXCL14. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(4):1060-4, 2010.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.072

5、Izukuri K, Suzuki K, Yajima N, Ozawa S, Ito S, Kubota E, Hata R: Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth of carcinoma cell transplants. Transgenic Research, 19(6):1109-17, 2010. DOI: 10.1007/s11248-010-9436-z

6、Ito S, Ozawa S, Ikoma T, Yajima N, Kiyono T, Hata R: Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their proliferation in vivo. Biomedical Research, 31(3):199-206, 2010 DOI: 10.2220/biomedres.31.199

7、Maehata Y, Ozawa S, Kobayashi K, Kato Y, Yoshino F, Miyamoto C, Izukuri K, Kubota E, Hata R-I, Lee M-C: Reactive Oxygen Species (ROS) Reduce the Expression of BRAK/CXCL14 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. Free Radical Research, 44(8):913-24, 2010. DOI: 10.3109/10715762.2010.490836

平成 23 年度

8、Ikoma T, Ozawa S, Suzuki K, Kondo T, Maehata Y, Lee MC, Hata R, Kubota E: Calcium-calmodulin signaling induced by epithelial cell differentiation upregulates BRAK/CXCL14 expression via the binding of SP1 to the BRAK promoter region. Biochemical and biophysical Research Communications, 420(2), 217-22, 2012 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.157

〔学会発表〕(計 32 件)

平成 21 年度

1、Komori R, Ozawa S, Kato Y, Shinji H, Kimoto S, Hata R: Functional Analysis of Promoter of Human BRAK/CXCL14, A Tumor Suppressor. 87th General Session & Exhibition of the IADR. 38th Annual Meeting of the AADR. 33rd Annual Meeting of the CADR, Miami Beach Convention Center, Miami, Florida

2、Ozawa S, Kato Y, Ito S, Komori R, Shiiki N, Tsukinoki K, Ozono S, Maehata Y, Taguchi T, Imagawa-Ishiguro Y, Kubota E, Hata R: A New Mechanism of tumor suppression by gefitinib in HNSCC. 87th General Session & Exhibition of the IADR. 38th Annual Meeting of the AADR. 33rd Annual Meeting of the CADR, Miami Beach Convention Center, Miami, Florida

3、Maehata Y, Ozawa S, Miyamoto C, Kobayashi K, Kato Y, Yoshino F, Lee M, Hata R: Reactive oxygen specific reduce the expression of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells. Yokosuka Science Festa, Shonan Village Center, Hayama

4、Izukuri K, Suzuki K, Ozawa S, Kubota E, Kato Y, Hata R: Suppression of growth of Lewis lung carcinoma cell xenografts in BRAK transgenic mouse. Yokosuka Science Festa, Shonan Village Center, Hayama

5、Ito S, Ozawa S, Shiiki N, Tsukinoki K, Kubota E, Kato Y, Taguchi T, Imagawa-Ishiguro Y, Tsukuda M, Hata R: Chemokine BRAK stimulates apoptosis elicited by gefitinib in oral squamous cell carcinoma. Yokosuka Science Festa, Shonan Village Center, Hayama

6、Ozawa S, Kato Y, Ito S, Komori R, Suzuki K, Tsukinoki K, Maehata Y, Taguchi T, Imagawa-Ishiguro Y, Tsukuda M, Kubota E, Hata R: Expression of BRAK/CXCL14 is associated with antitumor efficacy of gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma. Yokosuka Science Festa, Shonan Village Center, Hayama

7、Komori R, Ozawa S, Kato Y, Shinji H, Kimoto S, Hata R: Functional analysis of promoter region of human BRAK/CXCL14, a tumor progression suppressor. Yokosuka Science Festa, Shonan Village Center, Hayama

8、Hata R, Ozawa S, Kato Y, Ito S, Komori R, Shiiki N, Tsukinoki K, Maehata Y, Kubota E: Expression of BRAK/CXCL14 is associated with antitumor efficacy of gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma. ECCO15 and 34th ESMO Multidisciplinary Congress, Berlin

9、Hata R, Izukuri K, Suzuki K, Yajima N, Ito S, Ozawa S, Kubota E: BRAK/CXCL14 transgenic mice suppress growth of tumor cell xenografts. Boston

10、畑隆一郎, 加藤靖正, 小森令賀, 小澤重幸: 頭頸部癌進行抑制因子 BRAK/CXCL14 遺伝子の発現制御配列の解析. 第 51 回歯科基礎医学会、新潟

11、居作和人, 鈴木健司, 久保田英朗, 畑隆

一郎：BRAK/CXCL14 遺伝子強制発現トランスジェニックマウスの腫瘍抑制機構の解明．第 51 回歯科基礎医学会、新潟

12、鈴木健司、小澤重幸、久保田英朗、畑隆一郎：トランスジェニックマウスを用いた BRAK/CXCL14 の腫瘍抑制機構の解明．第 54 回日本口腔外科学会総会・学術大会、札幌

13、小澤重幸、生駒丈晴、鈴木健司、久保田英朗：EGF 受容体阻害剤とデシタピンを用いた併用療法の基礎的研究．第 54 回日本口腔外科学会総会・学術大会、札幌

14、小澤重幸、加藤靖正、伊藤慎、小森令賀、椎木直人、槻木恵一、前畑洋次郎、田口亨秀、石黒 - 今川由香利、佃守、畑隆一郎、久保田英朗：ケモカイン BRAK/CXCL14 をマーカー分子とした頭頸部扁平上皮癌への新たな併用療法の試み 第 19 回日本口腔粘膜学会総会、横須賀

平成 22 年度

15、Hata R, Izukuri K, Suzuki K, Yajima N, Ozawa S, Ito S, Kubota E: Chemokine BRAK/CXCL14 is a multifunctional tumor suppressor . 88th General Session & Exhibition of the IADR• 5th General Session of the Pan European Region of the IADR, Barcelona

16、Hata R, Izukuri K, Suzuki K, Kato Y, Yajima N, Ozawa S, Ito S, Kubota E: Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth and metastasis of carcinoma cells . 14th International Congress of Immunology, Kobe

17、Maehata Y, Ozawa S, Miyamoto C, Kobayashi K, Komori R, Hata R-I, LEE M.C: Oxidative stress reduce expression of CXCL14/BRAK in human cells . IADR General Session, San Diego

18、Komori R, Ozawa S, Kato Y, Maehata Y, Shinji H, Hata R-I, Kimoto S: Analysis of promoter region of human BRAK/CXCL14 in SCC cells . IADR General Session, San Diego

19、前畑洋次郎、宮本千央、小澤重幸、吉野文彦、小林 杏、高橋聡子、高橋俊介、畑隆一郎、李昌一：新規抗腫瘍性ケモカイン BRAK/CXCL14 の発現および分泌制御機構の解明 ~ 酸化ストレスは BRAK の発現と細胞外分泌を抑制する ~ . 第 25 回 日本酸化ストレス学会 関東支部会、東京

20、小澤重幸、鈴木健司、生駒丈晴、久保田英朗：In vivo における EGF 受容体阻害剤とデシタピンを用いた併用療法の研究．第 64 回日本口腔科学会学術集会、札幌

21、生駒丈晴、小澤重幸、鈴木健司、久保田英朗：BRAK/CXCL14 の発現制御に関する転写遺伝子の解析．第 64 回日本口腔科学会学術集会、札幌

22、小澤重幸、鈴木健司、生駒丈晴、近藤忠稚、畑隆一郎、久保田英朗：BRAK 発現制御機構と口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果についての基礎的研究．第 55 回日本口腔外科学会総会・学術大会、千葉

23、久保田英朗、小澤重幸、鈴木健司、生駒丈晴、近藤忠稚、畑隆一郎：CXCL14/BRAK の口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果について．第 55 回日本口腔外科学会総会・学術大会、千葉

24、生駒丈晴、小澤重幸、鈴木健司、久保田英朗：ケモカイン CXCL14/BRAK 発現を制御する転写因子の解析．第 55 回日本口腔外科学会総会・学術大会、千葉

平成 23 年度

25、Ikoma T, Kubota E: Cell adhesion contact up-regulates the expression of chemokine CXCL14/BRAK with concomitant increase in cell differentiation markers for squamous epithelium. The 3rd EMBO meeting, Vienna

26、Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Ikoma T, Komori R, Hata R-I, LEE M-C: Fasudil, a specific inhibitor of ROCK, stimulates secretion of CXCL14/BRAK and suppresses tumor formation in fibrosarcoma cells. The 3rd EMBO meeting, Vienna

27、生駒丈晴、小澤重幸、鈴木健司、久保田英朗：口腔扁平上皮癌におけるケモカイン CXCL14/BRAK の発現制御についての検討．第 65 回日本口腔科学会学術集会、東京

28、生駒丈晴、久保田英朗：ケモカイン CXCL14/BRAK と扁平上皮組織における細胞分化レベルの関連性．第 53 回歯科基礎医学会学術大会、岐阜

29、生駒丈晴、小澤重幸、鈴木健司、近藤忠稚、久保田英朗：扁平上皮組織の分化とサイトカイン CXCL14/BRAK の関連．第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪

30、小澤重幸，鈴木健司，生駒丈晴，久保田英朗：新規抗腫瘍効分子ケモカイン CXCL14/BRAK の発現機構に関する検討．第 65 回日本口腔科学会学術集会，東京

31、小澤重幸，生駒丈晴，鈴木健司，近藤忠稚，久保田英朗：BRAK の p38δ を介した発現調節機構の解析．第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会，大阪

32、小澤重幸，生駒丈晴，鈴木健司，近藤忠稚，久保田英朗：ケモカイン BRAK はカルモジュリンからのシグナルを介して上皮分化マーカーと共に発現上昇する．第 21 回日本口腔粘膜学会総会，鹿児島

〔図書〕(計 2 件)

1、久保田英朗 他：SIMPLE TEXT 口腔外科の疾患と治療第 3 版、総数 pp554、永末書店、2011

2、久保田英朗 他：歯科臨床研修マニュアル起こりうる問題点と解決法 第 2 版、総数 pp381、永末書店、2012

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

1、名称：頭頸部癌抑制剤および医薬組成物
発明者：畑隆一郎、加藤靖正、小澤重幸、
権利者：学校法人神奈川歯科大学
種類：特許
番号：特許第 4805641 号
取得年月日：平成 23 年 8 月 19 日

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

久保田 英朗 (KUBOTA EIRO)
神奈川歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50170030

(2) 研究分担者

前畑 洋次郎 (MAEHATA YOJIRO)
神奈川歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：80410009

鈴木 健司 (SUZUKI KENJI)
神奈川歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：80350536

小澤 重幸 (OZAWA SHIGEYUKI)
神奈川歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：40434394

近藤 忠稚 (KONDO TADANORI)
神奈川歯科大学附属病院・医員
研究者番号：00587727

加藤 靖正 (KATO YASUMASA)
神奈川歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：50214408

伊藤 慎 (ITO SHIN)
神奈川歯科大学・歯学部・特別研究員
研究者番号：00460139

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号：