

機関番号：32703

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791816

研究課題名(和文) 口腔癌におけるケモカインの相互作用を応用した新規抗腫瘍ペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of CXCL14/BRAK-derived anti-tumour peptide in head and neck squamous cell carcinoma.

研究代表者

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

研究成果の概要(和文):

BRAK/CXCL14 は抗腫瘍作用を示すケモカインであるが、その受容体を含め作用機序は完全に解明されていない。本研究課題では、BRAK は細胞外で血管新生促進性因子である IL-8 や VEGF と直接結合し 2 量体形成を阻害するという仮説の基、BRAK の IL-8 および VEGF と結合領域を同定し BRAK と他のケモカインの相互作用を解明し新規抗腫瘍療法を構築することを最終目的としている。平成 22 年度は、BRAK および IL-8、VEGF の結合を確認するために FLAG 発現システムを用いて FLAG-BRAK ベクターの作成後、口腔扁平上皮癌細胞(HSC-3)に遺伝子導入し FLAG-BRAK 安定発現細胞株を作成した。平成 23 年度は、FLAG-BRAK 安定発現細胞株に IL-8、VEGF 添加後回収し、培養上清を免疫沈降法にて精製して IL-8、VEGF との結合について検討した。その結果 本実験条件において細胞外に分泌された BRAK は IL-8 との結合することが確認された。また、BRAK は血管内皮細胞の遊走を抑制することが報告されていることから BRAK は IL-8 の 2 量体形成を抑制し血管新生抑制作用をことが示唆される。これらの結果から、BRAK と IL-8 の結合様式を詳細に検討し、結合配列に相同性のあるペプチドを用いた血管新生阻害剤に応用することが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文):

BRAK, one of a non-ELR motif CXC chemokine, is also known as CXCL14. We previously reported that BRAK has a potent anti-tumor activity in head and neck squamous cell carcinoma cells (HNSCC), but the mechanism of action nor receptor for it is not known. In order to clarify the mechanism of tumor suppression by the BRAK we hypothesized that BRAK inhibits action of angiogenic cytokines such as IL-8 by directly binding to these cytokines. In the first year, we constructed FLAG-BRAK and FLAG-MOCK vectors and transfected these vectors into HSC-2 cells and obtained stably expressing these constructs, and named HSC-2/FRAG-BRAK, and HSC-2/FRAG-MOCK cells. Next year, in order to investigate binding capability of BRAK with these cytokines, we added recombinant proteins IL-8 or VEGF to the culture medium of HSC-2/FRAG-BRAK cells or HSC-2/FRAG-MOCK cells, and collected the culture medium. Following immunopurification of the culture medium, we investigated binding of BRAK with these cytokines and found that BRAK secreted

into the culture medium bound with IL-8. Our results raise the possibility to develop angiogenesis inhibitory peptides by use of IL-8-binding peptides derived BRAK.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯科薬理学

1. 研究開始当初の背景

過去 50 年間で口腔癌に起因する死亡者数は約 7.2 倍に増加しており，口腔癌のより詳細な分子機構の解明に基づく新たな治療法の確立は急務である。口腔癌の治療には外科手術療法のみならず，化学療法，放射線療法などの補助療法を加えた包括的な治療が必要である。しかし，化学療法，放射線療法は全ての患者に奏功する訳ではなく，特に化学療法では重篤な副作用を生じることが懸念される。そこで近年，その作用が癌細胞に限局しているため，従来の化学療法薬と比較して副作用の少ない分子標的治療の開発が進められている。これまでに我々は，口腔扁平上皮癌細胞において腫瘍の悪性化を惹起する上皮成長因子(EGF)，および腫瘍関連性マクロファージ(TAM)が産生する活性酸素種(ROS)が，血管新生促進性ケモカイン IL-8/CXCL8 の発現上昇に伴い，血管新生抑制性ケモカイン BRAK/CXCL14 の発現低下をさせ腫瘍進展を促進する機構を解明し，また BRAK の発現が低下している口腔扁平上皮癌細胞の BRAK 発現を回復させると腫瘍形成が低下

することを見出し，新たな分子標的治療の可能性を示してきた。血管新生は腫瘍進展に重要なプロセスであり，血管新生抑制を目的とした抗腫瘍薬（分子標的治療薬）が既に臨床応用されている。BRAK は 1999 年に Hromas R らによって見出された新規ケモカインで，血管新生抑制作用を示すこと，また口腔癌において発現が低下していることが明らかにされている。

一方，口腔癌において IL-8 は血管内皮細胞の増殖および遊走性を亢進させ血管新生を促進し，悪性化を惹起する腫瘍進展促進因子のひとつであることが報告されている。(Watanabe H, et al., Oral Oncol. 2002 : 38(7):670-9) そして 2004 年に BRAK と IL-8 が結合することを示す実験結果が報告された。(Thomas D. Shellenberger, et al., Cancer Reserch 64, 8262 8270, 15, 2004.) IL-8 は 2 量体を形成し CXC 受容体(CXCR1, CXCR2)に結合して作用することが知られている血管新生促進性ケモカインであるが，先の報告から BRAK は IL-8 の 2 量体形成を阻害し血管新生を抑制することが示唆される。そこで，口腔癌細胞から分泌される

血管新生促進性ケモカイン IL-8 と血管新生抑制性ケモカイン BRAK の結合配列をアミノ酸単位で同定し、結合配列に相同的なペプチド（新規 IL-8 機能阻害ペプチド）を構築すること。そして、新規 IL-8 機能阻害ペプチドを *in vivo* で適用し血管新生抑制作用による新たな抗腫瘍分子標的療薬を構築するための基礎的検討を行うことを着想するに至った。

2 . 研究の目的

本研究課題では、口腔癌細胞から分泌される血管新生促進性ケモカイン IL-8 と血管新生抑制性ケモカイン BRAK の結合配列をアミノ酸単位で同定すること。そして、同定された配列結合に相同的なペプチド(新規 IL-8 機能阻害ペプチド)を構築し、IL-8の2量体形成阻害による *in vivo* における血管新生抑制作用による新たな抗腫瘍分子標的療薬を開発するための基礎的検討を行うことを目的としている。

3 . 研究の方法

平成21年度は、IL-8を高レベルで発現し、かつ BRAK を発現していないヒト口腔癌細胞(KB細胞)に BRAK(全長、部分欠失、部分変異)発現ベクターを遺伝子導入する。その後、培養上清を回収し免疫沈降法、Western Blot 法および Biacore システムを用いて IL-8 と BRAK の結合様式を解析することで IL-8 と BRAK の結合に必要な配列を同定し、IL-8 と BRAK の結合配列に相同的なアミノ酸(新規 IL-8 阻害ペプチド)を合成(外部受託を利用)する。平成 22 年度は、ヒト口腔癌細胞と血管内皮細胞の共培養系を用い、新規 IL-8 阻害ペプチドが血管内皮細胞の細胞増殖および走化性を抑制するかを検討する。また、ヌードマウスにヒト口腔癌細胞を移植し、尾静脈内注射およびカチオニックゼラチン(陽電子荷電ゼラチン)を用いて IL-8 阻害ペプチドを

適用し、腫瘍縮小作用を示すか否かを腫瘍径測定および免疫組織化学法を用いて検討する。

4 . 研究成果

BRAK および IL-8、VEGF の結合を確認するために FLAG 発現システムを用いて FLAG-BRAK ベクターの作成後、口腔扁平上皮癌細胞(HSC-3)に遺伝子導入し FLAG-BRAK 安定発現細胞株を作成した。次に、FLAG-BRAK 安定発現細胞株に IL-8、VEGF 添加後回収し、培養上清を免疫沈降法にて精製して IL-8、VEGF との結合について検討した。その結果、本実験条件において細胞外に分泌された BRAK は IL-8 との結合することが確認された。また、BRAK は血管内皮細胞の遊走を抑制することが報告されていることから BRAK は IL-8 の 2 量体形成を抑制し血管新生抑制作用をことが示唆される。これらの結果から、BRAK と IL-8 の結合様式を詳細に検討し、結合配列に相同性のあるペプチドを用いた血管新生阻害剤に応用することが可能になると考えられる。

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2件)

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 Sci.*, Nov. **100** (11): 2002-9. 2009.

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 Res.*, 2010 Aug; **44**(8):913-24.

〔学会発表〕(計 12 件)

MIYAMOTO C., MAEHATA Y., YOSHINO F., KOBAYASHI K., LEE M.C.-I.: Reactive oxygen species reduce the production of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells. SFRBM's 16th Annual Meeting, San Francisco, California USA. 2009.11.18-22

MAEHATA Y., OZAWA S., MIYAMOTO C., KOBAYASHI K., KATO Y., YOSHINO F., LEE M.C.-I., HATA R.: Reactive oxygen species reduce the expression of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells. 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR) 56th Annual Meeting of the Japan Matrix Club (JMC), Yokosuka, Kanagawa, Japan. 2009.6.4-7.

前畑洋次郎, 小澤重幸, 小林 杏, 吉野文彦, 宮本千央, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李 昌一: 口腔扁平上皮癌細胞において Gefitinib(Iressa) は酸化ストレスに誘導される抗腫瘍性ケモカイン BRAK/CXCL14 の発現低下を抑制する. 第 121 回日本薬理学会 関東部会. 新宿区, 東京. 2009.10.10.

宮本千央, 前畑洋次郎, 吉野文彦, 小林 杏, 吉田彩佳, 杉山秀太, 高橋聡子, 高橋俊介, 前谷崇志, 川村陽介, 小松知子, 岡田永三, 岡田康江, 辻村 傑, 大野晃教, 李 昌一: 頭頸部扁平上皮癌細胞種における酸化ストレスによる腫瘍抑制ケモカイン BRAK/CXCL14 の発現抑制制御機構の検討. 第 9 回日本抗加齢医学会総会, 港区, 東京. 2009.5.28-29

MAEHATA Y., OZAWA S., MIYAMOTO C., KOBAYASHI K., KOMORI R., HATA R.-I., LEE M.C.-I.: Oxidative stress reduce expression of CXCL14/BRAK in human cells. IADR General Session, San Diego, Calif., USA. 2011.3.16-19.

MIYAMOTO C., MAEHATA Y., KOMORI R., KOBAYASHI K., HATA R.-I., LEE M.C.-I.: Fasdil, an inhibitor of ROCK, suppresses tumor growth *in vivo*. IADR General Session, San Diego, Calif., USA. 2011.3.16-19.

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. 江戸川, 東京.

2010.12.11.

宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 生駒丈晴, 居作和人, 小林 杏, 高橋聡子, 高橋俊介, 吉野文彦, 杉山秀太, 吉田彩佳, 畑隆一郎, 李 昌一: 選択的 ROCK 阻害剤による抗腫瘍性ケモカイン BRAK/CXCL14 を介した腫瘍進展抑制の検討. 神奈川歯科大学学会 第 45 回総会. 横須賀, 神奈川. 2010.12.04.

宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 生駒丈晴, 小森令賀, 居作和人, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李 昌一: ROCK 阻害剤 Fasudil による抗腫瘍性ケモカイン BRAK/CXCL14 の細胞外分泌促進と腫瘍進展抑制の検討. 第 123 回日本薬理学会関東部会. 自治医大, 栃木. 2010.10.23

宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 生駒丈晴, 居作和人, 畑隆一郎, 李 昌一: 選択的 ROCK 阻害剤による抗腫瘍性ケモカイン BRAK/CXCL14 の腫瘍進展抑制の検討. 神奈川歯科大学学会 第 133 回例会. 横須賀, 神奈川. 2010.10.14

宮本千央, 前畑洋次郎, 高橋聡子, 高橋俊介, 杉山秀太, 徳富文彬, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李 昌一: ROCK 阻害剤はケモカイン BRAK/CXCL14 の細胞外分泌を促進し抗腫瘍効果を発揮する. 第 52 回 歯科基礎医学学会 学術大会・総会. 江戸川, 東京. 2010.9.20-22.

宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 加藤靖正, 畑隆一郎, 李 昌一: ROCK 阻害剤 Fasudil はケモカイン BRAK/CXCL14 の細胞外分泌を促進し抗腫瘍効果を発揮する. 第 42 回日本結合組織学会・第 57 回マトリックス研究会 合同学術集会, 秋田, 秋田. 2010.8.19-20

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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