

機関番号：32703

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792037

研究課題名 (和文) ケモカイン BRAK を指標とした頭頸部扁平上皮癌に対するテーラーメイド医療の開発

研究課題名 (英文) BRAK is a new type marker for development of tailor made medicine in head and neck squamous cell carcinoma.

研究代表者

小澤 重幸 (OZAWA SHIGEYUKI)

神奈川歯科大学 歯学部 助教

研究者番号：40434394

研究成果の概要 (和文):

BRAK は頭頸部扁平上皮癌で発現が低下もしくは消失している遺伝子である。私は BRAK の発現消失にプロモーター領域のメチル化が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文):

BRAK is not expressed or negligible level in head and neck squamous cell carcinoma. We cleared that methylation of BRAK promoter regulates the expression of BRAK as a negative regulator.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ケモカイン、BRAK、扁平上皮癌

## 1. 研究開始当初の背景

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、頭頸部扁平上皮癌細胞は BRAK を発現している癌と、していない癌に大別され、発現している群において、ゲフィチニブは BRAK の遺伝子発現を上昇させながら、腫瘍縮小効果を示すことを明らかにした。

## 2. 研究の目的

BRAK の発現していない理由として、プロモーター領域がメチル化によって不活化しており、ゲフィチニブ処理においても、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。発現調節にメチル化が関与しているかどうかを明らかに

することで、ゲフィチニブを含む EGF 受容体阻害剤使用前の効果判定マーカーとなり、口腔扁平上皮癌に対するテーラーメイド医療の可能性が期待される。

## 3. 研究の方法

我々はゲフィチニブ投与に対するテーラーメイド医療 (指標は BRAK プロモーターのメチル化) の開発を目的とする。これまでに我々は、複数の癌細胞株を用いて、BRAK の発現の有無について検討を行ってきた。平成21年度は発現頻度の実験に基づき、メチル化により BRAK 遺伝子発現が抑制されている YCU-H89 1 細胞を用いて、メチル化阻害剤と EGFR 阻害剤の併用療法の有用性について検討を行った。H22年度はメチル化部位を

特定することで、その部位を標的としたメチル化特異的PCR法を確立し、設計したプライマーによりメチル化部位におけるメチル化頻度の解析を進めた。

#### 4. 研究成果

(1) BRAK のプロモーターアッセイを行い、BRAK の mRNA 転写開始点を明らかにした。さらに、その転写開始点より上流約 20bp 程度の領域に存在する、TATA like 配列及び GC box が発現に関与することを明らかにした。

(2)

BRAK の発現を上昇させる上で、p38 と ERK の相互作用が非常に重要であることを明らかにした。

(3)

In vivo の実験系で、メチル化阻害剤であるデシタピン投与後、EGFR 阻害剤を投与すると BRAK を発現していない癌細胞においても、抗腫瘍効果が期待できることを明らかにした。

(4)

21 年度に解明した GC box のメチル化が、BRAK の発現抑制に関与していることをパイロシーケンス、及びメチル化特異的 PCR 法を用いて明らかにした。

#### 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 10 件)

すべて査読あり

1) Reactive oxygen species (ROS) reduce the expression of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells. Maehata Y, Ozawa S, Kobayashi K, Kato Y, Yoshino F, Miyamoto C, Izukuri K, Kubota E, Hata R, Lee MC. (equal first) Free Radic Res, 44(8):913-24, 2010.

2) Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth of carcinoma cell transplants. Izukuri K, Suzuki K, Yajima N, Ozawa S, Ito S, Kubota E, Hata R. Transgenic Res.2010

3) Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their

proliferation in vivo. Ito S, Ozawa S, Ikoma T, Yajima N, Kiyono T, Hata R.

Biomed Res. 31(3):199-206. 2010.

4) Human p38 delta MAP kinase mediates UV irradiation induced up-regulation of the gene expression of chemokine BRAK/CXCL14. Ozawa S, Ito S, Kato Y, Kubota E, Hata R.

Biochem Biophys Res Commun. 396(4):1060-4. 2010.

5) Functional characterization of proximal promoter of gene for human BRAK/CXCL14, a tumor-suppressing chemokine. Komori R, Ozawa S, Kato Y, Shinji H, Kimoto S, Hata R.

Biomed Res. 31(2):123-31. 2010.

6) 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. Sato K, Ozawa S, Izukuri K, Kato Y, Hata R.

Cell Biol Int. 34(5):513-22. 2010.

7) BRAK/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse. Ozawa S, Kato Y, Kubota E, Hata R.

Biomed Res. 30(5):315-8. 2009.

8) Restoration of BRAK / CXCL14 gene expression by gefitinib is associated with antitumor efficacy of the drug in head and neck squamous cell carcinoma. 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.

Cancer Sci. 100(11): 2202-9. 2009

[学会発表](計 14 件)

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

- Barcelona , 2010 . 7 . 14 .
- 2) 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 , 2010 . 8 . 23 .
  - 3) Kato Y, Ozawa S, Maehata Y, Maeda T, Kubota E, Tsukuda M, Miyazaki K, Hata R: Gene expression signatures at acidic extracellular pH in metastatic melanoma cells. Joint MRS-AACR Conference Metastasis and the Tumor Microenvironment , Philadelphia , 2010 . 9 . 12-15 .
  - 4) 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 , 2011 . 3 . 16-19 .
  - 5) 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 , 2011 . 3 . 16-19 .
  - 6) Reika Komori, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Hisaaki Shinji, Shigenari Kimoto, Ryu-Ichiro Hata : Functional Analysis of Promoter of Human BRAK/CXCL14, A Tumor Suppressor. 87<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR• 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the AADR• 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the CADR, Miami Beach Convention Center, Miami, Florida 2009.4.1-4.
  - 7) Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Shin Ito, Reika Komori, Naoto Shiiki, Keiichi Tsukinoki, Satoru Ozono, Yojiro Maehata, Takahide Taguchi, Yukari Imagawa-Ishiguro, Mamoru Tsukuda, Eiro Kubota, Ryu-Ichiro Hata: A new mechanism of tumor suppression by gefitinib in HNSCC. 87<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR• 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the AADR• 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the CADR, Miami Beach Convention Center, Miami, Florida 2009.4.1-4
  - 8) Yojiro Maehata, Shigeyuki Ozawa, Chihiro Miyamoto, Kyo Kobayashi, Yasumasa Kato, Fumihiko Yoshino, Masaichi-Chang-il Lee, Ryu-Ichiro Hata: Reactive oxygen species reduce the expression of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells. Yokosuka Science Festa, Shonan Village Center, Hayama, 2009. 7.5.
  - 9) Kazuhito Izukuri, Kenji Suzuki, Shigeyuki Ozawa, Eiro Kubota, Ryu-Ichiro Hata: Suppression of growth of Lewis lung carcinoma cell xenografts in BRAK transgenic mouse: Production of cancer resistant mouse. Yokosuka Science Festa, Shonan Village Center, Hayama, 2009. 7.6.
  - 10) Shin Ito, Shigeyuki Ozawa, Naoto Shiiki, Keiichi Tsukinoki, Eiro Kubota, Yasumasa Kato, Takahide Taguchi, Yukari Imagawa-Ishiguro, Mamoru Tsukuda, and Ryu-Ichiro Hata: Chemokine BRAK stimulates apoptosis elicited by gefitinib in oral squamous cell carcinoma. Yokosuka Science Festa, Shonan Village Center, Hayama, 2009. 7.6.
  - 11) Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Shin Ito, Reika Komori, Kenji Suzuki, Keiichi Tsukinoki, Yojiro Maehata, Takahide Taguchi, Yukari Imagawa-Ishiguro, Mamoru Tsukuda, Eiro Kubota, and Ryu-Ichiro Hata: 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, 2009. 7.6.
  - 12) Reika Komori, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Hisaaki Shinji, Shigenari Kimoto, and Ryu-Ichiro Hata: Functional analysis of promoter region of human BRAK/CXCL14, a tumor progression suppressor. Yokosuka Science Festa, Shonan Village Center, Hayama, 2009. 7.6.
  - 13) Ryu-Ichiro Hata, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Shin Ito, Reika Komori, Naoto Shiiki, Keiichi Tsukinoki, Yojiro Maehata, Eiro Kubota: Expression of BRAK/CXCL14 is associated with antitumor efficacy of gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma. ECCO15 and 34<sup>th</sup> ESMO Multidisciplinary Congress, Berlin, 2009.9.20-24.

14) Ryu-Ichiro Hata, Kazuhito Izukuri,  
Kenji Suzuki, Nobuyuki Yajima, Shin  
Ito, Shigeyuki Ozawa, Eiro Kubota:  
BRAK/CXCL14 transgenic mice suppress  
growth of tumor cell xenografts.  
Boston, 2009.11.15-19.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小澤 重幸 (OZAWA SHIGEYUKI )  
神奈川歯科大学 歯学部 助教  
研究者番号 : 40404394