

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 7 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792023

研究課題名（和文） 新規腫瘍抑制因子 BRAK/CXCL14 の転写制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of promoter of human BRAK/CXCL14, a tumor suppressor

研究代表者

小森 令賀（KOMORI REIKA）

神奈川歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40555281

研究成果の概要（和文）：本研究は口腔癌において発現が低下している BRAK/CXCL14 を分子標的治療のターゲットとし、BRAK/CXCL14 の制御機構、特に転写制御について明らかにすることで BRAK/CXCL14 の発現をコントロールし、口腔癌の分子標的治療の臨床応用へ発展させることが目的である。今回その基礎的研究として、BRAK/CXCL14 のプロモーター領域の解析を行った。その結果、BRAK/CXCL14 のプロモーター領域に存在する TATA-like sequence (TATTAA 配列) が遺伝子発現に必須のプロモーター、AP-1 結合配列と重なった配列である GC Box3,4 が BRAK/CXCL14 の遺伝子発現の発現上昇に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：BRAK/CXCL14 is a chemokine that is absent from or expressed at very low levels in head and neck squamous cell carcinoma. We set to this gene as molecular target therapy. In order to study the regulatory mechanisms governing the expression of this gene, we determined the promoter motifs of the expression of this gene. The results of that, TATA-like sequence, TATTAA was essential for stimulating the expression of the gene and the AP-1 binding sequence and tandem GC Box3,4 were necessary for stimulating the expression of the gene in human squamous epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・口腔外科学一般

キーワード：癌

1. 研究開始当初の背景

申請者らは CXCL サブファミリーに属する

ケモカインである BRAK/CXCL14 が口腔扁平上皮癌において腫瘍進展抑制作用を持つこ

とを報告してきた(Ozawa S., Kato Y., Komori R. et al Biochem Biophys Res Commun 2006)。この BRAK/CXCL14 は多くの正常細胞で高い遺伝子発現が見られるが、ほとんどの癌細胞株において発現が低下もしくは消失していることが報告されている。我々は多くの癌において EGFR (上皮増殖因子受容体)が活性化していることに注目し、EGF(上皮増殖因子)で舌癌由来の細胞株 HSC-3 を刺激した際に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、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。そこで HSC-3 細胞株に BRAK/CXCL14 を強制発現させてヌードマウスの皮下に移植した結果、control と比較して有意に腫瘍の縮小が認められた。更に EGFR 阻害剤の添加により *in vitro* において低下していた BRAK/CXCL14 の遺伝子発現が上昇すること、*in vivo* においても HSC-3 を移植したヌードマウスに EGFR 阻害剤を服用させると control と比較して有意に腫瘍の縮小が認められ、移植した HSC-3 において BRAK/CXCL14 の遺伝子発現の上昇が見られた(Ozawa S., Kato Y., Ito S., Komori R. et al Cancer Sci 2009)。

これらの事から我々は BRAK/CXCL14 が腫瘍増殖の抑制に関与しており、分子標的治療における新規癌抑制遺伝子となり得ると考えた。

2. 研究の目的

癌細胞において低下もしくは消失している BRAK/CXCL14 の遺伝子発現をコントロールし、腫瘍増殖を抑制することが最大の目的である。このコントロールを行うにはまず腫瘍増殖抑制作用を持つ BRAK/CXCL14 がどのようなメカニズムで遺伝子発現の低下や上昇をしているかを解明しなければならず、BRAK/CXCL14 の遺伝子発現に必須のプロモーター領域や転写制御機構の解析が必要である。これまでに我々はこの遺伝子の転写開始点を明らかにし、報告してきた。しかし詳しいプロモーター領域や転写制御の解析は明らかになっていない。そこで我々は BRAK/CXCL14 を新たな分子標的治療の標的分子として臨床応用に発展させるための基礎的研究として、プロモーター領域に存在する転写因子結合配列の探索や転写制御の解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BRAK/CXCL14 のプロモーター領域には上流から GC Box1, GC BOX2, AP-1 結合配列、プロモーターとなり得る配列である TATA-like sequence(TATTAA 配列)、重なり合った GC Box3,4 が存在した。ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とするベクターにこれらを挿入したベクターを構築した。更に BRAK/CXCL14 の転写因子結合配列を欠損させたベクターと、転写因子結合配列を人工的に変異させたベクターを構築した。これらのベクターを舌癌由来の細胞株である HSC-3 にトランスフェクションし、プロモーター活性を計測した。

(2) Okadaic acid と高密度培養が BRAK/CXCL14 の遺伝子発現を上昇させることから、これらの刺激因子を用いてプロモーター活性を測定した。更に(1)で構築した転写因子結合配列を欠損させたベクターとそれらを変異させたベクターを用いてどの転写因子結合配列がプロモーター活性の上昇に関与しているかを測定した。

4. 研究成果

(1) プロモーターとなり得る配列である TATA-like sequence、AP-1 結合配列、GC Box1,2,3,4 を欠損させたプロモーターベクターを HSC-3 にトランスフェクションしてプロモーター活性を測定した結果、上流の GC Box1,2 を欠損させてもプロモーター活性に変化はなかったが、AP-1 結合配列を欠損させるとプロモーター活性が有意に低下した。更に TATA-like sequence を欠損させるとプロモーター活性はほとんど消失した。また GC Box3,4 を単体で変異させてもプロモーター活性の低下はあまり見られなかったが、AP-1 結合配列を変異させたベクター、TATTAA 配列を変異させたベクター、GC Box3,4 両方を変異させたベクターではプロモーター活性が有意に低下した。これらの結果から TATTAA はプロモーターとして機能する配列と考えられ、AP-1 結合配列と GC Box3,4 はエンハンサーとして機能する配列と考えられた。

(2) A. BRAK/CXCL14 の遺伝子発現を上昇させる因子としてセリン/スレオニンホスファターゼ 1,2A 阻害剤である Okadaic acid を用いた。(1)と同様のベクターを用いて Okadaic acid で刺激してプロモーター活性

を計測した結果、TATA-like sequence、AP-1 結合配列、GC Box3,4 を含む領域ではプロモーター活性がコントロールと比較し有意に上昇した。AP-1 結合配列を欠損させるとプロモーター活性の上昇は全く見られず、AP-1 結合配列を変異させた場合もプロモーター活性は上昇しなかった。一方で GC Box3,4 を変異させるとプロモーター活性は有意に上昇した。これらの結果から Okadaic acid の刺激による BRAK/CXCL14 の遺伝子発現上昇には AP-1 結合配列が関与していると示唆された。

B. BRAK/CXCL14 の遺伝子発現を上昇させる他の方法として HSC-3 の細胞密度を高くし培養を行った。細胞密度を高くするとプロモーター活性はコントロールと比較し有意に上昇した。A. と同様にプロモーター活性を測定したところ、重なっている GC BOX3,4 に変異を加えるとプロモーター活性の上昇を抑制した。GC Box3,4 の上流にプロモーター活性の上昇に必須の配列である TATA-like sequence が存在することから欠損ベクターを用いた計測は行わなかった。この結果から高密度の細胞培養による BRAK/CXCL14 の遺伝子発現上昇は GC Box3,4 が関与している示唆された。

これら A. B. の結果から BRAK/CXCL14 の遺伝子発現上昇にはプロモーター領域に存在する AP-1 結合配列と GC Box3,4 が関与していると考えられた。

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1件)

1. Reika Komori, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Hisaaki Shinji, Shigenari Kimoto, and Ryu-ichiro Hata. Functional characterization of proximal promoter of gene for human BRAK/CXCL14, a tumor-suppressing chemokine. Biomedical Research. 査読有, 31(2), 2010, 123-131

[学会発表](計3件)

1. 小森令賀、大久保孝一郎、松澤光洋、木本茂成: ケモカイン BRAK/CXCL14 の転写制御機構の解析 第26回小児歯科学会関東地方会, 千葉, 2011. 10. 16.

2. Yojiro Maehata, Shigeyuki Ozawa, Chihiro Miyamoto, Kyo Kobayashi, Reika Komori, Ryu-ichiro Hata, Masaich Chang-il Lee: Oxidative stress reduce expression of CXCL14/BRAK in human cells. 89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, USA, 2011. March. 16-19

3. Reika Komori, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Yojiro Maehata, Hisaaki Shinji, Ryu-ichiro Hata, Shigenari Kimoto: Analysis of promoter region of human BRAK/CXCL14 in SCC cells. 89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, USA, 2011. March. 16-19.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 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

小森 令賀 (KOMORI REIKA)
神奈川歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 40555281

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：