

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792390

研究課題名（和文）

新規腫瘍進展性ケモカイン(BRAK)による抗腫瘍療法の研究開発

研究課題名（英文）

Research and development of anti-tumor therapy by anti-tumor chemokine BRAK

研究代表者

前畑 洋次郎 (YOJIRO MAEHATA)

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）：

これまでに我々は、いくつかの癌腫において CXCL14/BRAK が抗腫瘍作用を示すこと、また癌腫において BRAK の分泌が抑制されていることを報告してきた。一方、RhoA と ROCK は分泌過程の重要な制御因子であり、RhoA/ROCK 経路の活性化は腫瘍の進展や転移を促進することが報告されている。そこで、我々は線維肉腫細胞における ROCK 阻害剤 Fasudil の BRAK 分泌および抗腫瘍作用について検討した。我々は、TG-BRAK マウスに MC57 細胞を移植し、分泌された BRAK の抗腫瘍作用について検討した。さらに、我々は BRAK もしくは MOCK ベクターを用いて MC57-BRAK (or MC57-MOCK) 安定発現細胞を樹立した。MC57-BRAK 細胞において Fasudil 処理により有意に、かつ濃度依存的に BRAK の分泌が上昇した。Fasudil の腫瘍増殖への影響を検討するために MC57-MOCK, MC57-BRAK 細胞は WT マウスに移植された。Fasudil 処理により、MC57-BRAK 細胞移植群でのみ腫瘍増殖が阻害された。これらの結果から、Fasudil が BRAK の分泌促進を介して線維肉腫の増殖を抑制したことを示しており、Fasudil 療法の臨床領域における有用性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported that chemokine CXCL14/BRAK (BRAK) has antitumor activity in several carcinoma cells, and we also indicated that secretion of BRAK was suppressed in carcinoma cells. Meanwhile, Ras-homologous-small-GTPase (RhoA) and Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase (ROCK) are important regulators of secretory processes, and activation of the RhoA/ROCK signaling pathway also stimulates tumor invasion and metastasis. We investigated the effects of fasudil which is a specific ROCK inhibitor on BRAK secretion and tumor progression in mesenchymal fibrosarcoma cells (MC57). We demonstrated the antitumor activity of secreted BRAK using MC57 transplantation of BRAK in overexpressing transgenic mice. Further, to eliminate the influence of change in the mRNA expression of endogenous BRAK, we produced stable MC57 cell lines expressing BRAK (MC57-BRAK) or mock vector (MC57-MOCK). Fasudil significantly increased BRAK secretion by MC57-BRAK cells in a dose-dependent manner. To determine the effect of

fasudil on tumor growth, MC57-BRAK and MC57-MOCK cells were transplanted into wild-type mice. Fasudil treatment suppressed tumor growth only in mice that had received MC57-BRAK cell allografts. These results indicate that fasudil inhibits fibrosarcoma growth by stimulating BRAK secretion and suggests that fasudil therapy might have clinical efficacy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・口腔外科

キーワード：口腔癌, BRAK, Fasudil

1. 研究開始当初の背景

ケモカイン CXCL14/BRAK は、乳房と腎臓で初めて同定され、BRAK と呼称される。BRAK は血管新生抑制作用、NK細胞の遊走促進、そしてアポトーシスを誘導することが報告されている。一般的には、BRAK mRNA の発現は正常組織で発現しているが、特定の癌細胞株においては発現が抑制されているか発現していない。これまでに我々は、ヌードマウスもしくは SCID マウスにおいて移植された BRAK 強制発現 HNSCC 細胞の増殖が抑制されることを報告してきた。また、我々は、BRAK が分泌タンパク質であるにも関わらず、HNSCC 細胞において BRAK タンパクの分泌が抑制されていることも証明している。従って、BRAK 分泌の促進は腫瘍抑制を誘発する可能性がある。

RhoA は small GTPase ファミリーのメンバーであり、アクチン骨格の再構成を介して細胞の接着や運動を制御している。多くの腫瘍において、Rho キナーゼの過剰発現は RhoA/ROCK シグナル経路の制御不能な活性化を引き起こしている。小胞を含む分泌タンパクは RhoA/ROCK 経路の下流分子のよって制御され、微小管や

アクチン線維に沿って分泌部位まで輸送される。これらの知見は、RhoA/ROCK 経路が腫瘍細胞における分泌タンパク質の細胞内輸送において中心的な役割を果たしていることを示唆している。さらに、腫瘍細胞における RhoA/ROCK 経路の制御不能な活性化は、抗腫瘍ケモカイン BRAK の分泌抑制に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

ROCK の特異的な阻害剤である Fasudil は、平滑筋細胞においてミオシン軽鎖のリン酸化を修飾することが知られている。それは広く、くも膜下出血と関連する脳虚血症状が後に発生する脳の攣縮の臨床治療に使用されている。加えて、Fasudil はいくつかの癌腫において腫瘍増殖、転移、浸潤を抑制することも報告されている。しかしながら、Fasudil の BRAK 分泌における作用は証明されていない。そこで、我々は Fasudil を用いた RhoA/ROCK シグナルの阻害は抗腫瘍性ケモカイン BRAK の分泌促進を介して線維肉腫の成長を阻害するという仮説をたてた。本研究では、線維肉腫細胞における RhoA/ROCK 経路の阻害を介した Fasudil の BRAK 分泌および腫

瘍進展への効果について検討した。

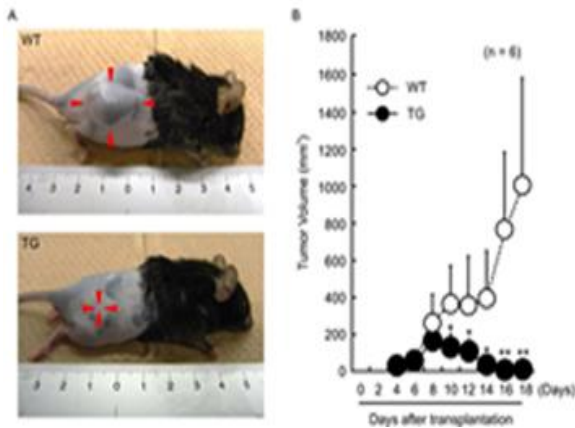
3. 研究の方法

マウス線維肉腫細胞株 (MC57) とマウス線維芽細胞における RhoA 活性を G-LISA 法を用いて比較検討した。また、MC 5 7 を用いて BRAK 安定発現細胞株 (MC57-BRAK) および BRAK 非発現細胞株 (MC57-MOCK) を作成し、MC57-BRAK および MC57-MOCK をマウス背部皮下に移植し、fasudil 投与群および非投与群間において腫瘍縮小率をそれぞれ検討した (n=8)。

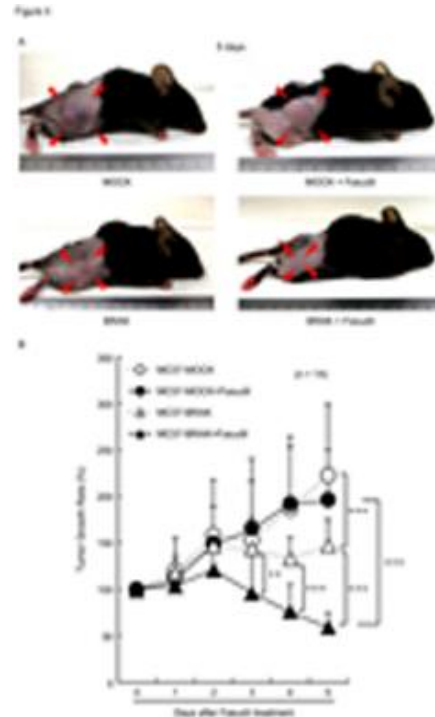
4. 研究成果

①BRAKTG マウスにけるマウス線維肉腫細胞の成長抑制

分泌された BRAK の抗腫瘍効果を検討するために、C57BL/6 由来 MC57 細胞を BRAK-TG, WT マウス背部皮下両側に自家移植した。BRAK-TG マウスに移植された腫瘍のサイズは、現在の細胞数と無関係に、細胞数 WT マウスと比較して小さかった (Fig1. A, B)。



[Fig.1 A,B]



[F.g2 A,B]

②BRAK 発現線維肉腫の Fasudil による腫瘍増殖抑制作用

BRAK mRNA 発現の変化の影響を排除するために、我々は BRAK 発現ベクターもしくは MOCK ベクターを用いて、内在性の BRAK を発現していない MC57-BRAK, MC57-MOCK 安定発現細胞を樹立した。さらに我々は、RT-PCR を用いて human BRAK, mouse BMAC (ヒト BRAK のアイソログ), mouse GAPDH の遺伝子発現プロファイルを測定した。Fasudil は線維肉腫細胞においてケモカイン BRAK の分泌を促進することから、我々は、BRAK の分泌を誘導する薬剤は、BRAK を介した抗腫瘍作用を示すという仮説を立てた。Fasudil の腫瘍増殖への影響を検討するために、MC57-MOCK, MC57-BRAK 細胞は 14 匹の雌 WT マウスの両側背部皮下に移植された。半数のマウスは Fasudil を (50mg/kg/day; i. p.) 投与した。BRAK を発現する MC57-BRAK 細胞の増殖は、空ベクターを導入した MC57-MOCK と比較して有意に抑制された。MC57-BRAK 移植群において Fasudil

投与は腫瘍増殖をさらに抑制した。一方、MOCK 細胞移植群では腫瘍増殖への有意な影響は観察されなかった(Fig. 2A, B)。結論として、RhoA の/ ROCK シグナル伝達の特異的阻害剤である Fasudil は、線維肉腫細胞で BRAK の分泌を増加させることを示している。また、ファスジルは BRAK の分泌を促進することにより、*in vivo* での抗腫瘍形成効果を示している。我々の研究の知見は、いくつかの種類の腫瘍の治療のために他の化学療法薬との併用でファスジルを用いる可能性を示唆している。

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)

Miyamoto C., Maehata Y.,(equal to 1st author) OZAWA S., Ikoma T., Kubota E., Izukuri K., K Kato., Hata R., Lee M-C.: Rho-Associated Coiled-Coil-Containing Protein Kinase Inhibitor Fasudil Suppresses Fibrosarcoma Growth by Stimulating Secretion of the Chemokine CXCL14/BRAK, Journal of Pharmacological Science, in press, 2012.

Ikoma T, Ozawa S, Suzuki K, Kondo T, Maehata Y., Lee MC, Hata R, Kubota E.: Calcium-calmodulin signaling induced by epithelial cell differentiation up regulates BRAK/CXCL14 expression via the binding of SP1 to the BRAK promoter region, Biochem Biophys Res Commun. 420(2):217-22. 2012.

[学会発表] (計 7 件)

Maehata Y., Ozawa S., Yoshino F., Kobayashi K., Miyamoto C., Kato Y., Hata R., Lee M-C: Reactive oxygen species reduce the production of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells . The EMBO meeting, Nice, France. 2012. 9. 22-25.

Miyamoto C., Maehata Y., Ozawa S., Ikoma T., Hata R., Lee M-C: ROCK Inhibitor Fasudil Suppresses Growth of Fibrosarcoma by Stimulating Secretion of Chemokine CXCL14/BRAK . The EMBO meeting, Nice, France. 2012. 9. 22-25.

Miyamoto C., Maehata Y., Ozawa S., Ikoma T., Komori R., Hata R.-I., Lee M-C.: Fasdil, a specific inhibitor of ROCK, stimulates secretion of CXCL14/BRAK and suppresses tumor growth *in vivo*. The EMBO meeting, Vienna, Austria. 2011. 9. 10-13.

前畑洋次郎, 宮本千央, 吉野文彦, 加藤靖正, 吉田彩佳, 高橋聡子, 高橋俊介, 畑 隆一郎, 李昌一: 頭頸部扁平上皮癌細胞において酸化ストレスは腫瘍抑制性ケモカイン BRAK/CXCL14 の発現を抑制する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 郡山, 2012. 9. 14-16.

宮本千央, 前畑洋次郎, 高橋俊介, 吉野文彦, 吉田彩佳, 徳富文彬, 高橋聡子, 畑隆一郎, 李昌一 ROCK 阻害剤 (fasudil) による抗腫瘍性ケモカイン (CXCL14/BRAK) の分泌促進作用を応用した新規抗腫瘍療法の研究開発. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 郡山, 2012. 9. 14-16.

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: ROCK 阻害剤 fasdil による CXCL14/BRAK 分泌促進を介した抗腫瘍効果の検討. 神奈川歯科大学学会 第 137 回 例会, 横須賀, 2012. 1. 12.

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: 選択的 ROCK 阻害剤 Fasudil による CXCL14/BRAK 細胞外分泌促進を介した抗腫瘍効果の検討. 第 125 回日本薬理学会関東部会, 船橋, 2011. 10. 15.

[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 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

前畑 洋次郎 (YOJIRO MAEHATA)

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80410009

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：