

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792261

研究課題名(和文) 抗腫瘍性ケモカイン BRAK を標的分子とする口腔癌へのテーラーメイド医療の導入

研究課題名(英文) chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

小澤 重幸(Ozawa, Shigeyuki)

神奈川県大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40434394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：セツキシマブ(抗体薬)は頭頸部癌患者に使用され、一部の患者に対し良好な結果を示している。セツキシマブの効果にBRAKの発現が関与するかどうか確認するため、セツキシマブの効果を示す細胞HSC-3と(BRAKの発現あり)、示さない細胞YCU-H891細胞(BRAKの発現なし)を使用し実験したところ、YCUH891細胞のBRAK発現消失にメチル化が関与し、メチル化解除後はセツキシマブの効果を示すようになったことが明らかとなった。本研究結果よりBRAKはセツキシマブ投与前の効果判定マーカーになる可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cetuximab, a monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor, has been successfully applied in some patients with HNSCC. For effective treatment, it is essential to first identify Cetuximab-responsive patients. When we compared the expression of chemokine BRAK in HNSCC cells, both Cetuximab responsive HSC-3 and non-responsive YCU-H891 cells, we found expression of this chemokine only in the responsive HSC-3 cells. We also found that the promoter region of YCU-H891 cells were hyper methylated, and demethylation of this promoter recovered BRAK mRNA expression together with in vivo tumour-growth suppression by Cetuximab. Additionally, YCU-H891 cells were engineered to express BRAK in the presence of doxycycline in mice. Cetuximab-dependent tumour suppression was observed in vivo by doxycycline administration in the drinking water of the mice. These results indicate that BRAK expression would be a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumour suppression.

研究分野：歯学

キーワード：頭頸部癌 テーラーメイド医療 メチル化

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、肺癌に対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関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。まず我々は頭頸部扁平上皮癌細胞を (1) BRAK を発現している癌と、(2) 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、(1) 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、(2) メチル化を受けている癌細胞ではデシタビン(骨髄異形成症候群に使用されている脱メチル化剤)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

頭頸部癌における BRAK のプロモーターの異常メチル化の有無と EGFR 阻害剤の効果について検討を行い、さらに異常メチル化により BRAK を発現していない癌細胞におけるデシタビン(メチル化阻害剤)と EGFR 阻害剤との併用療法の意義について解明することを目的とする。

3. 研究の方法

我々は、EGFR 阻害剤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ことが明らかとなっている。本研究結果に基づき、BRAK のプロモーター領域に結合する転写

因子について検討を行う。SP-1 及び Oct-1 に対する Si-RNA を癌細胞に導入し、BRAK の発現が低下するかどうかについて検討を行った。また、SP-1 に関しては SP-1 に対する Si-RNA の導入によって BRAK の発現が低下したため、BRAK の発現上昇に関与する転写因子の可能性が示されたため、抗 SP-1 抗体を用いて ChiP アッセイを行った。BRAK の発現上昇に関与するプロモーター領域の二つの GC Box のメチル化の有無と割合をパイロシーケンスで解明し、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。*In vivo* の実験系でメチル化している癌細胞におけるデシタビンと EGFR 阻害剤の併用の意義を、近年、頭頸部がんに適応となったセツキシマブを使用して検討した。メチル化している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ビンとセツキシマブを投与し、抗腫瘍効果について検討を行った。

4. 研究成果

以前に我々は BRAK の発現上昇に関与する転写因子の検索を行った結果、複数の候補転写因子が抽出されてきた。それぞれの転写因子について検討を行ったところ、SP-1 が BRAK のプロモーター領域に結合すること、さらには BRAK の発現上昇に関与する転写因子であることが明らかとなった。一方 Oct-1 は BRAK の発現上昇には関与しないこともあわせて明らかとなった。また、BRAK の転写開始領域上流に 2 つの GC Box が存在し、BRAK の発現消失している細胞ではこの部位がメチル化していることが証明された。*In vivo* の実験系で、プロモーターがメチル化している癌細胞に BRAK の発現ベクターを導入すると抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。そこで、発現消失している癌細胞に脱メチル化剤であるデシタビンを投与した後にセツキシマブを投与するとセツキシマブの効果が増強するかどうか検討したところ、メチル化している細胞においてデシタビンは、BRAK の発現を回復させ、セツキシマブによってさらに BRAK の遺伝子発現は上昇し、抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。一方、メチル化していない癌細胞では、デシタビンは BRAK の発現に変化を示さず、セツキシマブ単剤で BRAK の発現上昇効果があるため、メチル化阻害剤との併用が不要であることが証明された。本研究結果から、事前に BRAK の発現有無を調査することが EGFR 阻害剤投与前の効果予測マーカーとなる可能性があることが明らかとなり、メチル化している癌細胞に対してはデシタビンとの併用が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 4 件)

Miyamoto C, Maehata Y (equal to 1st author, Corresponding author), Motohashi K, Ozawa S, Ikoma T, Hidaka K, Wada-Takahashi S, Takahashi S, Yoshino F, Yoshida A, Kubota E, Hata R, Lee M-C. Fasudil, a Rho kinase inhibitor, suppresses tumor growth by inducing CXCL14/BRAK in head and neck squamous cell carcinoma., *Biomedical Res*, 2014 35(6):381-8. doi: 10.2220/biomedres.35.381.

Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int*. 2013 Sep 3;13(1):89. doi: 10.1186/1475-2867-13-89.

Miyamoto C, Maehata Y, (equal to 1st author), Ozawa S, Ikoma T, Kubota E, Izukuri 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*, 2012;120(3):241-9.

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. *Biochem Biophys Res Commun*. 420(2):217-22. 2012.

〔学会発表〕(計 6 件)

近藤 忠雅、小澤 重幸、生駒 丈晴、鈴木 健司、久保田 英朗. CXCL14 のメチル化異常に着目したセツキシマブの抗腫瘍効果判定のための基礎的研究 第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2014年10月17-19日 千葉 千葉市 幕張メッセ

小澤 重幸. 抗腫瘍性ケモカイン CXCL14 のエピジェネティクス異常を指標としたセツキシマブ投与前評価の基礎的研究 第 56 回歯科基礎医学会外術大会・総会 2014年9月25-27日 福岡県 福岡市 福岡国際会議場

小澤 重幸、近藤 忠雅、生駒 丈晴、鈴木 健司、久保田 英朗. セツキシマブに脱メチル化剤を併用する意義についての基礎的研

究 第 68 回日本口腔科学会学術集会 2014年5月7-9日 東京 新宿 京王プラザホテル

小澤 重幸、近藤 忠雅、生駒 丈晴、鈴木 健司、久保田 英朗. セツキシマブによる抗腫瘍性ケモカイン BRAK の発現上昇メカニズムの解明 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2013年10月11-13日 福岡県 福岡市 福岡国際会議場

小澤 重幸、生駒 丈晴、鈴木 健司、久保田 英朗. 変異した p53 による抗腫瘍性ケモカイン BRAK の発現調節 第 66 回日本口腔科学会学術集会 2012年5月17-18日 広島 広島市 広島国際会議場

生駒 丈晴、小澤 重幸、鈴木 健司、久保田 英朗. ケモカイン BRAK/CXCL14 は上皮細胞の分化に伴って発現し転写因子 SP-1 がその発現調節の関与する 第 66 回日本口腔科学会学術集会 2012年5月17-18日 広島 広島市 広島国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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：
出願年月日：
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

小澤重幸 (OZAWA, Shigeyuki)
神奈川歯科大学・歯学研究科・助教
研究者番号：40434394

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：