

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293414

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌のエピジェネティクス異常の解明と新規治療戦略

研究課題名(英文) Elucidation of Epigenetics in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

## 研究代表者

久保田 英朗 (Kubota, Eiro)

神奈川歯科大学・歯学部・その他

研究者番号：50170030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は多くの癌でメチル化を受ける抗腫瘍性ケモカインCXCL14のプロモーターを指標として、メチル化異常がセツキシマブの抗腫瘍効果に関与するかどうかを検討した。

セツキシマブはプロモーターがメチル化していない癌細胞(HSC3細胞)に対しては効果を示したが、メチル化している癌細胞(YCUH891細胞)に対しては効果を示さなかった。しかしながら脱メチル化剤である5アザデオキシシチジン(DAC)でメチル化を解除すれば、CXCL14のプロモーターがメチル化している細胞に対してもセツキシマブは効果を示すようになった。

研究成果の概要(英文)：We employed the CXCL14-expressing HSC-3 cells and the CXCL14-nonexpressing YCU-H891 cells as representatives of the two groups and compared their responses to cetuximab and their CXCL14 expression under various conditions. The growth of xenografted tumours initiated by HSC-3 cells, which expressed CXCL14 in vivo and in vitro, was suppressed by the injection of cetuximab into tumour-bearing mice, however neither the expression of the chemokine nor the cetuximab-dependent suppression of xenografted tumour growth were observed for YCU-H891 cells.

The inhibition of ERK MAP kinase signaling increased the levels of CXCL14 mRNA in HSC-3 cells, but not in YCU-H891 cells. We also found that the CXCL14 promoter region in YCU-H891 cells was hypermethylated, and that demethylation of the promoter by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine restored CXCL14 mRNA expression and in vivo cetuximab-mediated tumour-growth suppression.

研究分野：顎顔面外科

キーワード：CXCL14 BRAK 頭頸部癌 メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

従来、癌の発生・進展は、染色体を構成する遺伝子異常が関与すると報告されてきたが、実際の腫瘍で高率に変異を有する遺伝子は思いのほか少ない。近年、遺伝子変異を伴わず遺伝子の発現異常を生じるエピジェネティクス異常が注目され、DNAメチル化、ヒストンの修飾等の異常が癌の発生・進展に重要であることが明らかとなった。事実、エピジェネティクス異常をターゲットとした治療薬が臨床に取り入れられるようになり、脱メチル化剤であるアザシチジン（商標名：ビダーザ注射用）が骨髄異形成症候群に2011年1月に承認、同年3月に発売開始された。現在、薬の研究は、薬剤のもつ分子学的メカニズムから、悪性腫瘍をはじめとする各疾患への薬剤の適応拡大が見直されるようになった。この利点は、既に使用されている薬剤であるため、用法・用量及び副作用があらかじめ明らかになっていることであり、『育薬』と定義され、日本薬理学会をはじめとした各学会においても、その意義がホームページに掲載されるなど重要性が提唱されている。我々はこれまでに、頭頸部扁平上皮癌において、EGFR阻害剤の腫瘍縮小効果に、サイトカイン BRAK の発現回復が関与すること、EGFR阻害剤は BRAK のプロモーターがメチル化していない癌で腫瘍縮小効果を示すことを見出した。一方、メチル化している頭頸部扁平上皮癌では、EGFR阻害剤は抗腫瘍効果を示さなかった。その原因として、BRAK のプロモーターがメチル化によって不活化していると考えられた。

## 2. 研究の目的

頭頸部癌に大腸がんで使用されていたセツキシマブが適応拡大され我々、口腔外科領域にも EGF 受容体阻害剤の使用意義が示されるようになった。今回我々は BRAK を発現していない細胞に対してどのようにすれば EGF 受容体阻害剤が効果を示すかを検討すること目的とした。まず、EGF 受容体阻害剤に効果を示さない扁平上皮癌の特徴として、メチル化の異常活性化が確認されている。我々のターゲット遺伝子であり EGF 受容体阻害剤の抗腫瘍効果に関与する BRAK のプロモーターもメチル化によって不活化していることが明らかとなっている。今回の実験では BRAK にターゲットを絞り研究を進めることとした。BRAK の発現上昇に関与する転写因子を、効率よく BRAK のプロモーター領域に結合させるためには、まず、メチル化阻害剤を先行投与しメチルを化解除した後に、EGF 受容体阻害剤を投与すれば、BRAK の遺伝子発現は回復するとともに EGF 受容体阻害剤による抗腫瘍効果が期待できると仮定した。また、セツキシマブに

効果を示さない細胞に BRAK の強制発現ベクターを導入し、抗腫瘍効果が得られるかどうかで、セツキシマブの抗腫瘍効果に BRAK の発現回復が関与するかどうかを検討した。

## 3. 研究の方法

現在、頭頸部扁平上皮癌にセツキシマブが使用されていることから、今回は EGF 受容体阻害剤として、セツキシマブを用いることとした。これまでの研究で、我々は 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 であることが明らかにした。本研究結果に基づき、まずこれが普遍的な現象であるか検体数を増やし、以前の研究 (H20~H22年度 基盤研究 B) において確立したパイロシーケンス及び、メチル化特異的 PCR 法で確認を行った。BRAK を発現している細胞、発現していない細胞それぞれ代表的なものを使用し、マウスへの移植実験を試みた。腫瘍細胞定着後、セツキシマブとアザシチジンを併用し、抗腫瘍効果が得られるかどうか検討を行った。移植腫瘍内で BRAK の発現が回復しているかどうかは RT-PCR 法で検討した。セツキシマブとアザシチジン併用における BRAK の遺伝子発現回復が抗腫瘍効果と関係あるかどうかをドキシサイクリン依存性発現ベクターを使用し確認した。

## 4. 研究成果

セツキシマブは BRAK のプロモーターがメチル化していない癌細胞に対しては効果を示したが、メチル化している癌細胞に対しては効果を示さなかった。しかしながら脱メチル化剤である 5アザデオキシシチジン (DAC) でメチル化を解除すれば、CXCL14 のプロモーターがメチル化している細胞に対してもセツキシマブは効果を示すようになった。また、移植腫瘍内で BRAK の遺伝子発現を確認すると、アザシチジン単剤で BRAK の遺伝子発現は回復し、セツキシマブと併用することで、明らかな遺伝子発現の上昇を示した。強制発現ベクターを使用した実験結果として、強制的に BRAK の遺伝子発現を回復させるだけで、マウスへの移植腫瘍の増殖能は抑制された。このことから、頭頸部扁平上皮癌において BRAK のプロモーターのメチル化の有無はセツキシマブ投与前の効果判定マーカーとなり、BRAK のプロモーターがメチル化している癌細胞においては、アザシチジンとの併用が有効である可能性が示された。

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3件)

Oncogenesis in press 2016

吉田羊子, 生駒丈晴, 小澤重幸, 近藤忠雅, 鈴木健司, 久保田英朗: 新たな転写因子の検索法についての研究 - BRAK の発現上昇に關与する転写因子の検索 - . 神奈川歯学, 49, 2014 .

Miyamoto C, Maehata Y, Motohashi K, Ozawa S, Ikoma T, Hidaka K, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Yoshino F, Yoshida A, Kubota E, Hata R, Lee MC: Fasudil, a Rho kinase inhibitor, suppresses tumor growth by inducing CXCL14/BRAK in head and neck squamous cell carcinoma. Biomed Reserch.35(6): 381-82014; 35(6):381-8. (宮本千央, 前畑洋次郎, 小澤重幸, 生駒丈晴, 高橋聡子, 高橋俊介, 吉野文彦, 吉田彩佳, 久保田英朗, 畑隆一郎, 李昌一)

[学会発表](計7件)

生駒丈晴, 陽 暁艶, 小澤重幸, 鈴木健司, 岩淵博史, 前畑洋次郎, 畑隆一郎: Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for Cetuximab dependent tumour suppression . 第 57 回歯科基礎医学会 学術大会, 新潟市, 2015 . 9 . 12 .

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研究 . 日本口腔外科学会, 千葉, 2014 . 10 . 17-19 .

小澤重幸: 口腔癌分子標的治療・抗腫瘍性ケモカイン CXCL14 のエピジェネティック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 回歯科基礎医学会学術大会・総会 ,福岡 ,2014 . 9 . 25 .

Miyamoto C, Ozawa S, Ikoma T, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Yoshida A, Yoshino F, Hata R, Lee MC, Maehata Y: ROCK Specific Inhibitor Fasudil Suppresses Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Growth by Stimulating Gene Expression and Protein Secretion of the Chemokine CXCL14/BRAK. FEBS-EMBO 2014, Paris, FR. 2014. 8. 30 - 9.04

本橋一彦, 宮本千央, 前畑洋次郎, 吉田彩佳, 高橋聡子, 高橋俊介, 吉野文彦: Fasudil, a Rho kinase inhibitor, suppresses tumor growth by inducing CXCL14/BRAK in head and neck squamous cell carcinoma. 第 49 回 神奈川歯科大学学会・総会, 横須賀市, 神奈川, 2014.11.29.

宮本千央, 前畑洋次郎, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 李昌一: ROCK 阻害剤 Fasudil の頭頸部扁平上皮癌における CXCL14/BRAK を介した抗腫瘍効果の検討 . 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡市, 福岡, 2014.9. 25-17

宮本千央, 生駒丈晴, 小澤重幸, 高橋俊介, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 畑隆一郎, 李昌一, 前畑洋次郎: 頭頸部扁平上皮癌における ROCK 阻害剤による CXCL14/BRAK を介した抗腫瘍効果の検討 . 神奈川歯科大学学会 第 143 回例会, 横須賀, 2014.1.9.

[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

久保田 英朗 (KUBOTA EIRO)  
神奈川歯科大学・歯学部・その他  
研究者番号：50170030

### (2)研究分担者

近藤 忠稚 (KONDO TADANORI)  
神奈川歯科大学・歯学部・その他  
研究者番号：00587727

生駒 文晴 (IKOMA TAKEHARU)  
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：10638290

小澤 重幸 (OZAWA SHIGEYUKI)  
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：40434394

鈴木 健司 (SUZUKI KENJI)  
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：80350536

前畑 洋次郎 (MAEHATA YOUJIRO)  
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：80350536