

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月28日提出

対象研究テーマ：ケモカインを分子標的とした治療法の開発

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：ケモカイン BRAK/CXCL14 トランスジェニックマウスによる発癌と転移の抑制機構の研究：副作用のない癌のドーマントセラピーを目指して

研究代表者：神奈川県立大学 特任教授 畑 隆一郎

研究成果の概要：

我々が作製したケモカイン CXCL14/BRAK トランスジェニックマウス(Tg)は移植腫瘍の抑制ばかりでなく B16 メラノーマ細胞および LLC 細胞の肺への実験的転移を抑制し、かつ、マウスの寿命の延長がみられた。Anti-asialo GM1 抗体、あるいは anti-NK1.1 抗体でマウスを前処理することによりナチュラルキラー(NK)細胞を除去するとこの抑制はみられなくなることから、腫瘍抑制と転移抑制には NK 細胞が関与していることが示された。また、Tg マウスに α -Galactosylceramide であらかじめ処理し、NKT 細胞を活性化すると、肺への転移抑制作用と寿命延長作用はさらに顕著となった。

研究分野：癌の分子標的治療

キーワード：癌抑制性ケモカイン・CXCL14/BRAK・転移抑制・寿命延長

1. 研究開始当初の背景

A. 従来の癌標的治療法では副作用が障害となっている：

癌の分子標的治療法が多く行われているが、これまでに開発された薬の殆どが副作用により臨床応用不可能となっている。この理由は、分子標的療法において、癌化で上昇あるいは活性化する分子を、抑制あるいは不活性化する薬剤の開発を目的としていたためと考えられる。即ち、癌化で上昇する、あるいは活性化する分子は正常にも存在し、重要な機能を持っているため、抗癌剤が正常細胞の活性を阻害するため、副作用を示すと考えられる。我々は頭頸部癌の分子標的治療法開発に当たって、発想を転換し、正常細胞は癌の進展を抑制する分子を合成していることを仮定して、癌の悪性化の条件で発現が低下する分子を探索し、正常細胞で合成され、癌細胞で合性が低下する分子としてケモカイン BRAK/CXCL14 (以降 BRAK) を見いだした。

B. BRAK は *in vivo* で癌進展抑制作用を示す：

癌では上皮増殖因子(EGF)受容体(EGFR)の異常な活性化が多く見られるので、癌進展の *in vitro* のモデルとして、舌癌由来の細胞(HSC-3)を無血清下で培養し、この細胞をEGFで刺激し、発現の低下する分子を遺伝子チップ法などにより検索した。その結果、白血球の遊走を促進するケモカインの一種である BRAK の発現が顕著に低下することを見いだした。BRAK は正常細胞で多く発現され、ヒト頭頸部癌において低下することから、最初に仮定した癌進展抑制因子に該当すると考えた。そこで、HSC-3細胞にBRAK遺伝子を導入して発現を高めた癌細胞(HSC-3 BRAK)を作成し、Tリンパ球機能を欠損したヌードマウス(Ozawa *et al.*, 2006)、あるいはTリンパ球およびBリンパ球機能を欠損したSCIDマウスに移植した(Ozawa *et al.*, 2009)。対照のHSC-3は大きな腫瘍を形成するのに対して、HSC-3 BRAK細胞の移植腫瘍は1ヶ月後には消滅した。このことからBRAKは我々の体内に存在する腫瘍進展抑制因子である可能性が考えられた。

C. BRAK 遺伝子を導入したトランスジェニック

クマウスは腫瘍抑制作用を示す：

さらに、C57BL/6 マウスに BRAK 遺伝子を強制発現させ、血中 BRAK 値が野生型マウスの 10 倍高く発現するトランスジェニック (BRAK Tg) マウスを作製した。このマウスに Lewis Lung Carcinoma (LLC) 細胞あるいはメラノーマ細胞を移植すると、癌の増殖・進展抑制が見られたので、BRAK は生体内に存在する腫瘍進展抑制因子であることが確認された。移植腫瘍の増殖・進展の抑制は 2 系統の BRAK Tg マウスで観察されたので、腫瘍の進展抑制は BRAK 遺伝子導入によるホストマウスの腫瘍進展促進因子遺伝子の破壊の結果ではなく、高い BRAK の発現が腫瘍の増殖・進展抑制に効いていると考えられる。また、我々の結果は BRAK が頭頸部癌だけでなく、肺癌、メラノーマの癌進展抑制作用を示すことが明らかとなった

2. 研究の目的

本研究では、ケモカイン BRAK/CXCL14 を高発現する BRAK Tg マウスを用いて、移植癌の増殖抑制機構および癌転移抑制におけるナチュラルキラー (NK) 細胞の役割について検討する。

本共同研究は今後の“副作用のない新しい癌のドーマントセラピー”への展開のための基礎研究として非常に有用であると考え

3. 研究の方法

①ケモカイン CXCL14/BRAK トランスジェニックマウス(Tg)および、対照として野生型マウス(Wt)を用いて B16 メラノーマ細胞あるいはルイス肺癌細胞(LLC)の移植あるいは尾静脈からの注入後、移植癌の増殖速度及び肺の転移巣の数を測定する。

②一部のマウスについては癌細胞の移植あるいは注入前に anti-asialo GM1 抗体、あるいは anti-NK1.1 抗体でマウスを前処理し NK 細胞欠損状態にして NK 細胞の役割を解析する。

③さらに、 α -Galactosylceramide でマウスを前処理することにより NKT 細胞を活性化してその効果を調べる。

4. 研究成果

① BRAKTg マウス及び Wt マウスの背部皮膚に B16 メラノーマ細胞あるいは LLC 細胞を移植後日数を追って腫瘍の大きさを比較すると、どちらの細胞においても Tg マウスにおいて腫瘍の増殖が遅かった。血中の CXCL14/BRAK 発現量が Wt マウスの 8 から 14 倍発現している 3 系統の Tg マウスについて同様な結果が得られたので、Tg マウスで観察された腫瘍増殖抑制作用は Tg における CXCL14/BRAK の高発現によるものと考え

られた。尾静脈から B16 メラノーマ細胞、あるいは LLC 細胞を注入後、肺の転移巣数を調べると、Tg マウスにおいて

Wt マウスよりも有意に転移巣数が少なく、Tg マウスにおいて腫瘍の増殖だけでなく、腫瘍の転移も抑制していることが示された。また、担癌マウスにおいて Tg マウスの方が寿命が長かった。

②移植腫瘍の増殖実験及び転移実験において anti-asialo GM1 抗体、あるいは anti-NK1.1 抗体でマウスを前処理することによりナチュラルキラー(NK)細胞を除去すると、この抑制はみられなくなることから、腫瘍抑制と転移抑制には NK 細胞が関与していることが示された。

③Tg マウスに α -Galactosylceramide であらかじめ処理し、NKT 細胞を活性化すると、肺への転移抑制作用と寿命延長作用はさらに顕著となった。この結果も CXCL14/BRAK が NK 細胞の活性化を介して腫瘍の増殖抑制、転移抑制をしている事を支持している。今後、CXCL14/BRAK による NK 細胞の活性化機構を明らかにする予定である。

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 10 件)

1) Toshiharu Yamamoto, Anzu Yamashita, Kentaro Yamada, Ryu-Ichiro Hata Immunohistochemical localization of chemokine CXCL14 in rat hypothalamic neurons. *Neurosci Lett.* **487(3)**: 335-340 2011, 2010 Oct 23. [Epub ahead of print].

2) Nahoko Fukunishi, Iyoko Katoh, Yoshiya Tomomori, Kenichi Tsukinoki, Ryu-Ichiro Hata, Atsuhito Nakano, Yoji Ikawa, Shun-ichi Kurata Induction of dNp63 by the newly identified keratinocyte-specific transforming growth factor b signaling pathway with smad2 and Ikb kinase a in squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **12(12)**: 969-979 2010.

3) Nobuyuki Yajima, Kazuhito Izukuri, Ryu-Ichiro Hata Production of conditional knockout mice for chemokine *BMAC/cxcl14* gene by Cre/loxP system.—Inflammation and Regeneration **30(6)**: 536-541 2010

4) Yojiro Maehata, Shigeyuki Ozawa, Kyo Kobayashi, Yasumasa Kato, Fumihiko Yoshino, Chihiro Miyamoto, Kazuhito Izukuri, Eiro Kubota, Ryu-Ichiro Hata, Masaichi-Chang-il Lee

Reactive Oxygen Species (ROS) Reduce the Expression of BRAK/CXCL14 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. Free Radical Res **44(8)**: 913-924 2010

5) Kazuhito Izukuri, Shin Ito, Naohito Nozaki, Nobuyuki Yajima, Mariko Iwamiya, Sachiko Kawahara, Kenji Suzuki, Eiro Kubota, Ryu-Ichiro Hata Determination of serum BRAK/CXCL14 level in healthy volunteers. LabMed **41(8)**: 478-482 2010

6) Ito S, Ozawa S, Ikoma T, Yajima N, Kiyono T, Hata R. Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their proliferation *in vivo*. Biomedical Research **31**: 199-206, 2010

7) Izukuri K., Suzuki K., Yajima N., Ozawa S., Ito S., Kubota E., Hata R. Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth of carcinoma cell transplants. Transgenic Research **19(6)**: 1109-17 2010

8) Shigeyuki Ozawa, Shin Ito, Yasumasa Kato, Eiro Kubota, Hata R. Human p38delta MAP kinase mediates UV irradiation induced up-regulation of the gene expression of chemokine BRAK/CXCL14. Biochem Biophys Res Commun **396(4)**: 1060-1064 2010

9) Komori R., Ozawa S., Kato Y., Shinji H., Kimoto S, Hata RI. Functional characterization of proximal promoter of gene for human BRAK/CXCL14, a tumor-suppressing chemokine. Biomedical Research **31(2)**: 123-31 2010 (Received, International Association of Dental Research (IADR) Hatton Travel Award)

10) Sato K., Ozawa S., Kato Y., Hata R. Expression of tumor-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*. Cell Biology Int. **348(5)**: 513-22 2010.

[学会発表] (計 16 件)

[特別講演]

畑 隆一郎 BRAK に魅せられて. 第 42 回結合組織学会学術大会・第 57 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 秋田、2010 8. 19-8. 20.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

特願 2010-150125

畑 隆一郎

癌転移抑制剤及び医薬組成物

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神奈川歯科大学・特任教授 畑 隆一郎

(2) 研究分担者

神奈川歯科大学歯学部・助教 居作和人

(3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史