

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：ケモカイン CXCL14/BRAK による発癌抑制と転移抑制の分子機構の研究

研究代表者：神奈川県大学 特任教授 畑 隆一郎

研究成果の概要：

我々が作成したケモカインCXCL14/BRAK (BRAK) を過剰発現するトランスジェニック (BRAKTg) マウスと野生型 (Wt) マウスを用いて化学発癌に対する応答と、悪性黒色腫細胞の実験的肺転移に対する応答を調べた。BRAK Tgマウスの大腸癌の数はWtの 1/10 であり有意 ($P < 0.001$) に少なかった。また、悪性黒色腫の数を変えて注射すると、すべての細胞数においてBRAKTgマウスの方がWtマウスより肺への転移数が有意に少なく、かつ、生存率が高かった。さらに、注入腫瘍細胞数が減少するほど両者の生存率の差は大きくなり、注入細胞数 3×10^3 ではWtマウスの生存率が 50% に対してTgでは 100% であった。また、NK細胞活性の阻害によりTgマウス、Wtマウスともに転移腫瘍数が激増し、両者における肺転移にNK細胞が関与している事が明らかにされた。健康人でもBRAKTgレベルの発現をしているヒトが存在したため、ケモカインCXCL14/BRAK は今後の副作用のない新しい癌の治療法開発のための有望な標的分子と考えられる。

研究分野：癌の分子標的治療法の開発

キーワード：癌抑制性ケモカイン・CXCL14/BRAK・発癌抑制・転移抑制

1. 研究開始当初の背景

A. ケモカイン 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。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 処理した時に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ており、ヒト頭頸部癌において低下することから、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.*, 2009b)。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。また、BRAK の発現制御は ERK マップキナーゼと p38 マップキナーゼのシグナルクロストークによることを明らかにした (Ozawa *et al.*, 2009b, 2010, 畑, 2011)

B. BRAK 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは腫瘍抑制作用、転移抑制作用を示す：

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) 細胞あるいは悪性黒色腫細胞を移植すると、癌の増殖抑制・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 3 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 遺伝子導入による宿主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た (Izukuri *et al.*, 2010)。我々の結果は BRAK が頭頸部癌だけでなく、LLC 細胞、悪性黒色腫細胞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 CXCL14/BRAK を高発現する BRAK Tg マウスを用いて、

I. BRAK Tg マウスの移植癌の増殖抑制だけでなく、発癌に対する抵抗性を示す事を明らかにし、II. 癌転移抑制におけるナチュラルキラー(NK)細胞の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

I. BRAK Tg マウスと野生型マウスの腹腔にアゾキシメタン (12mg/kg body weight) を注射後、3%のデキストラン硫酸ナトリウムを間欠的に飲料水に加えることにより実験的大腸癌を発生させた。

II. BRAK TgマウスとWtマウスの尾静脈より 3×10^3 – 2×10^5 の悪性黒色腫の細胞を注入し、一定期間後に肺の黒色腫の数を数えた。また、一部のマウスについてはanti-asialoGMI 抗体、あるいはanti-NK1.1 抗体を注入しNK細胞活性を阻害した。

4. 研究成果

I. アゾキシメタン注射 56 日後のマウスでは BRAK Tg マウスの腫瘍数は Wt マウスの 1/10 であり有意 ($P < 0.001$) に少なかった。

II. すべての細胞数においてBRAK Tgマウスの方がWtマウスより肺への転移数が有意に少なく、かつ、生存率が高かった。また、NK細胞活性の阻害によりTgマウス、Wtマウスともに転移腫瘍数が激増し、両者における肺転移にNK細胞が関与している事が明らかにされた。さらに、注入腫瘍細胞数が減少するほど両者の生存率の差は大きくなり、注入細胞数 3×10^3 ではWtマウスの生存率が50%に対してBRAKTgでは100%であった。ケモカイン CXCL14/BRAK は正常細胞で大量に合成されており、健康人でも BRAKTg レベルの発現をしているヒトが存在したので、今後の副作用のない新しい癌の治療法開発のための有望な分子標的と考えられる。

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)

1. Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Ikoma T, Kubota E, Izukur K, Kato Y, Hata R, Lee M-C: Fasudil suppresses fibrosarcoma growth by stimulating secretion of the chemokine CXCL14/BRAK. Journal of Pharmacological Sciences, 120,

241-249, 2012.

2. Hata R: A new strategy to find targets for anticancer therapy: Chemokine CXCL14/BRAK is a multifunctional tumor suppressor for head and neck squamous cell carcinoma. ISRN Otolaryngology, 2012, ID797619, p1-12, 2012.

[学会発表] (計 11 件)

1. Hata R, Izukur K, Kato Y, Takeda K, Kiyono T, Mukaida N, Taniguchi M: NK cells are indispensable for suppression of tumor growth and metastasis in transgenic mice over-expressing chemokine CXCL14/BRAK. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2012, Chicago, USA, 2012. 3. 31-4. 4.

2. Hata R: A new strategy to find targets for anticancer therapy: Chemokine CXCL14/BRAK is a multifunctional tumor suppressor. Bit's 5th Annual World Cancer Congress, Beijing, China, 2012. 5. 18-20.

3. Hata R, Izukur K, Kato Y: Expression of chemokine CXCL14/BRAK suppresses tumor cell metastasis. 90th International Association for Dental Research, Iguassu Falls, Brazil, 2012. 6. 20-23.

4. 畑隆一郎, 居作和人, 加藤靖正: ケモカイン CXCL14/BRAK は癌細胞の肺転移を抑制する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 郡山, 2012, 9. 14-16.

5. 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.

6. 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.

7. Katoh I, Fukunishi N, Fujimuro M, Hata R, Kurata S: p63 (TP63) activates Wnt target gene expression by directly interacting with TCF. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 2012. 9. 19-21.

8. Hata R, Kato Y, Takeda K, Kiyono T, Mukaida N, Taniguchi M: Expression of CXCL14/BRAK suppresses tumor growth and metastasis and prolongs the life span of tumor-burden mice. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 2012. 9. 19-21.

9. 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.

10. 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.

11. Hata R, Izukuri K, Kato Y, Takeda K, Kiyono T, Mukaida N, Taniguchi M: Expression of chemokine BRAK/CXCL14 suppresses tumor growth and metastasis NK cell dependently and increases survival rate of tumor-bearing mice. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Maui, Hawaii, USA, 2013. 2. 21-24.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

特開2012-12330「癌転移抑制剤および医薬組成物」

○取得状況(計1件)

特許第4805641号 頭頸部癌抑制剤および医薬生成物

〔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・講師 居作和人

(3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史