

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月19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：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：ケモカイン CXCL14/BRAK による発癌と転移の抑制機構の研究：CXCL14/BRAK のNK細胞の活性制御の分子機構

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：

ウイルスベクターを用いてドキシサイクリン存在下でのみ CXCL14/BRAK を発現する B16 メラノーマ細胞を作成し、メラノーマ細胞における CXCL14/BRAK の発現が、転移に及ぼす影響を種々の遺伝的背景を持つマウスを用いて調べた。野生型 C57BL/6 マウス、および T 細胞と B 細胞を欠損する SCID マウスの場合、ドキシサイクリンを飲料水に添加してメラノーマ細胞に BRAK を発現させると、肺への転移がドキシサイクリンを添加しない場合より有意 ($P < 0.01$) に抑制された。一方、NK 細胞を欠損する NOG マウスの場合は、転移巣の数が野生型マウスの 10 倍に上昇し、さらに BRAK の発現は転移巣の数に影響を与えなかった。昨年度の結果を含めて、BRAK の発現レベルが、腫瘍を移植される宿主のマウスで高くても、メラノーマ細胞で高くても、腫瘍の肺転移が抑制され、この抑制は NK 細胞に依存している事が明らかにされた。

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

1. 研究開始当初の背景

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。

2. 研究の目的

今年度は癌細胞 (B16 メラノーマ細胞) にケモカイン CXCL14/BRAK を発現させた時に癌細胞のマウス肺への実験的転移が抑制されるかどうか、および抑制する場合はNK細胞が関与するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

ウイルスベクターを用いてドキシサイクリン存在下でのみ CXCL14/BRAK を発現する B16 メラノーマ細胞を作成し、この細胞を種々の遺伝的背景を持つマウスの尾静脈より注入し、転移巣の数をかぞえた。

4. 研究成果

野生型 C57BL/6 マウスではドキシサイクリンを飲料水に添加してメラノーマ細胞に BRAK を発現させると、肺への転移がドキシサイクリンを添加しない場合より有意 ($P < 0.01$) に抑制された。T 細胞および B 細胞を欠損する SCID マウスの場合、転移巣の数はともに上昇したが、やはり、BRAK の発現により転移が抑制された。一方、NK 細胞を欠損する NOG マウスの場合は、転移巣の数が野生型マウスの 10 倍に上昇し、さらに BRAK の発現は転移巣の数に影響を与えなかった。以上のことから、BRAK の発現レベルが、腫瘍を移植される宿主のマウスで高くても、メラノーマ細胞で高くても、腫瘍の肺転移が抑制され、この抑制はNK細胞に依存している事が明らかにされた。

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2件)

1) 畑 隆一郎: MAPキナーゼのサブタイプ特異的シグナルクロストークによるがん抑制性ケモカインCXCL14/BRAKの発現制御. 生化学 83(8):731-736, 2011.

2) 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. *Biochemical Biophysical Research Communications*: 420(2):217-22,2012. Feb 20. [Epub ahead of print].

[学会発表] (計 14 件)

[受賞講演]

1) Ryu-Ichiro Hata, Kazuhito Izukuri, Yasumasa Kato : Production of transgenic mice resistant to cancer cell growth and metastasis -Toward Cancer Therapy using Endogenous Tumor Suppressing Chemokines-. 2nd International Conference on Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring, Budapest, Hungary, 2011, 5.2-5. (Outstanding Abstract and Selected Oral Presentation Award)

[一般発表・国際学会]

2) Ryu-Ichiro Hata, Kazuhito Izukuri, Yasumasa Kato: NK cell-dependent suppression of tumor growth and metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. Roche/Nature Medicine Symposium on Cancer Immunology and Immunotherapy, Nutley New Jersey, USA. 2011.9.11-13.

3) Miyamoto C., Maehata Y., Ozawa S., Ikoma T., Komori R., Hata R. -I., Lee M-C: Fasudil, 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.

[一般発表・国内学会]

4) 畑 隆一郎. 佐藤-楠畑かおり. 小澤重幸. 加藤靖正. 古江-楠田美保 : ケモカイン CXCL14/BRAKは幹細胞分化因子か? 第43回日本結合組織学会学術大会・第58回マトリックス研究会大会合同学術集会. 別府ビーコンプラザ. 2011.6.10.~6.11.

5) Ryu-Ichiro Hata, Kaori Sato-Kusubata, Shigeyuki Ozawa, Yasumasa Kato, Miho Kusuda Furue: Chemokine CXCL14/BRAK stimulates differentiation of cancer stem cells. *Connective Tissue* 53(1). 70-71,2012.

6) 畑 隆一郎. 居作和人. 加藤靖正. 小澤重幸. 鈴木健司. 生駒丈晴. 前畑洋次郎. 宮本千央. 椎木直人. 矢島伸之. 久保田英朗. 李昌一. 槻木恵一: 癌に強いマウスを作る副作用のない癌の治療法を目指してー. バイオアカデミックフォーラム. 東京ビッグサイト 2011 6. 29-7. 1.

7) 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. 日本大学薬学部. 千葉. 2011.10.15

8) 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: ROCK阻害剤(Fasudil)は抗腫瘍性ケモカイン(CXCL14/BRAK)の細胞外分泌促進を介して腫瘍進展を抑制する. 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会. 岐阜, 岐阜. 2011.9.30-10.2.

9) 加藤靖正. 前畑洋次郎. 前田豊信. 畑隆一郎: オステオネクチンノックアウトマウスの肺における遺伝子発現プロファイリング. 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会. 岐阜, 岐阜. 2011.9.30-10.2.

10) 加藤伊陽子. 福西菜穂子. 畑隆一郎. 井川洋二. 倉田俊一: 扁平上皮癌での p63 による核内 GSK-3 β シグナルを介した β -cateninの制御. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 2011.10.3-5.

11) 加藤靖正. 畑隆一郎. 佃守. 宮崎香. 長嶋洋治: TRPM-5 は. 酸性細胞外pHシグナルに関与し. メラノーマの肺転移に関与する. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 2011.10.3-10.5.

12) Ryu-Ichiro Hata, Yasumasa Kato, Kazuyoshi Takeda, Masaru Taniguchi: NK cell-dependent suppression of tumor growth and metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 2011.10.3-10.5.

13) 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 fasudil 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. 神奈川, 横須賀. 2011.12.3.

14) 居作和人, 畑 隆一郎: ケモカイン CXCL14/BRAK遺伝子トランスジェニックマウスの腫瘍抑制・転移抑制機構の解明. 神奈川歯科大学学会 第137回例会. 神奈川, 横須賀. 2011.12.3.

[図書] (計1件)

畑 隆一郎 (編集代表). 高橋信博. 宇田川信之. 東 俊文. 上條竜太郎. 石崎 明. 加藤靖

正 [編著] 早川太郎, 須田立雄, 木崎治俊[監修]: 口腔生化学, pp.1-352. 第5版. 医歯薬出版. 東京. 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

特願 2010-150125 癌転移抑制剤及び医薬組成物

○取得状況 (計1件)

特許取得 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