

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07702

研究課題名(和文) 時計遺伝子を基盤とした乳癌の微小環境制御と、MRI画像への臨床展開

研究課題名(英文) Breast cancer microenvironment control targeting clock gene and its development of MRI imaging

研究代表者

清野 浩子 (Seino, Hiroko)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30598727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト癌細胞において、TGF- β はDEC1の転写/翻訳レベルを増加させるが、DEC2の転写/翻訳は減少させ、DEC1とDEC2がTGF- β 誘導の上皮間葉転換(EMT)の制御に相補的に関わっていることが示された。また、放射線画像と外科切除標本との検討では、非侵襲的に癌の組織学的特性や治療効果を予測できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、癌細胞における時計遺伝子DECの機能解析(細胞増殖、血管新生、上皮間葉転換、低酸素応答など)を行うことで、癌微小環境の病態解明と、増殖制御機構の構築を目標とする。さらには時計遺伝子をターゲットとした新たな癌治療法の概念を構築するとともに、病理組織標本・細胞培養実験・放射線画像情報を統合した独創的な治療効果予測法の開発・確立を目指す。ヒト癌細胞におけるDECの機能解析、放射線画像と外科切除標本との比較検討などにより、時計遺伝子DECが癌治療の標的遺伝子としての可能性を持っていることや、画像診断を用いて非侵襲的に癌の特性を予測できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：DEC1 and DEC2 have opposite effects on TGF- β -induced EMT in human cancer cells. TGF- β increased DEC1 but decreased DEC2 expression, accompanied by the phosphorylation of Smad2, as well as an altered expression of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin. Investigation of the association between radiological images and the pathology indicate that the radiological images had some ability to determine the clinicopathological characteristics and treatment effect of cancer.

研究分野：放射線診断学

キーワード：時計遺伝子 微小環境 ヒト癌細胞 放射線画像

1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子 (Clock genes) は、およそ 24 時間周期で振幅発現する遺伝子で、その働きによって、生物の概日リズム (体内時計) が制御されている。申請者らの教室ではこれまでに、時計遺伝子 DEC (DEC1・DEC2) が癌の浸潤・増殖や微小環境、低酸素応答に重要な役割を果たすことを示している。

一方放射線画像診断は、腫瘍の良悪性鑑別や広がり診断のみならず、腫瘍機能情報に基づいた癌の治療効果予測や患者予後予測への新たな展開が有望視されているが、放射線画像と病理組織像との詳細な対比についてはまだ十分報告されているとは言えず、概日リズムに基づく放射線画像の臨床展開に至ってはほとんど報告がない。

乳癌は日本においても増加の一途を辿っており、その罹患年齢も 40-50 歳台と若く、人生の中で再発を余儀なくされることが多い。時計遺伝子により規定される乳癌の増殖進展や病態を解明し、癌診断・治療へ応用することは、乳癌の死亡率・再発率を下げ、また患者の QOL (quality of life) の向上につながる。

2. 研究の目的

本研究では、乳癌の増殖浸潤・微小環境に関わる時計遺伝子の分子生物学的基盤を明らかにし、生物時計を考慮した乳癌治療への応用を目指す。

時計遺伝子 DEC 機能解析に関する我々のこれまでの実績を生かし、概日リズム下で、時計遺伝子 DEC の発現に対応した癌細胞増殖・癌細胞-間質の相互作用・腫瘍血管新生の機序を証明することで、乳癌微小環境の病態を解明し、増殖制御機構を構築する。

また、時計遺伝子 DEC を基盤とした治療効果予測を解明する為、病理組織標本や細胞培養実験を用いた従来の研究手法に加え、放射線画像解析も行う。具体的には、臨床画像診断と病理組織像を詳細に対比し、放射線画像を用いた癌組織の機能情報 (腫瘍の間質や血流動態・代謝など) と治療効果の特性解析を行うことで、放射線画像を用いた病理組織像の推測や治療効果判定基準の確立を目指す。

3. 研究の方法

ヒト乳癌の培養細胞株 (MCF-7, MDA-MB-231 など複数の細胞株) を用いて、概日リズム下で DEC の過剰発現・ノックダウンを行い、培養細胞レベルで時計遺伝子発現の意義を明らかにする (発現変動はリアルタイム PCR・Western blot 法、細胞増殖能は MTS assay、浸潤能は Matrigel-invasion assay で比較する)。また間葉系幹細胞との共培養や低酸素環境下での細胞培養も試みる。放射線画像と病理組織標本との対比では、放射線画像診断を行いその後の手術で外科組織標本を得られたヒト癌症例 (術前治療施行例あるいは未施行例) を対象に、病理学的因子 (癌細胞密度や細胞増殖能、分化度、

微小環境など)や臨床経過との関係を検討する。癌関連繊維芽細胞(CAF)や微小血管密度などの検討については適宜免疫染色法で行う。また標本から抽出したリアルタイムPCRによる解析も試みる。研究目的を達成する為に、以下の事項を解析する。

- (1) 概日リズム下での血管新生を制御する時計遺伝子の発現解析
- (2) 乳癌微小環境(癌細胞・間質相互作用)の機序の解明
- (3) 乳癌微小環境の発育・進展に関わる時計遺伝子を介した分子相互作用機構の解明
- (4) 概日リズム下でのヒト乳癌培養細胞株へ対する時計遺伝子阻害剤の作用効果の解析
- (5) 放射線画像と病理組織の詳細な検討により、放射線画像による機能情報(腫瘍の間質や血流動態・代謝など)と臨床病理学的特徴(DEC、血管マーカー、VEGF、CAFの発現)との相関関係を解析

4. 研究成果

ヒト癌細胞株において、時計遺伝子DEC1, DEC2がTGF β 誘導の上皮間葉転換(EMT)の制御に相補的に関わっていることを示した。ヒト癌細胞株において、TGF β はDEC1の転写/翻訳レベルを増加させ、DEC2の転写/翻訳を減少させる。さらに、TGF β はSmad2のリン酸化シグナルを誘発し、続いてEカドヘリン(細胞接着因子)などの上皮マーカーを制御し、Nカドヘリン(細胞接着因子)およびビメンチン(細胞骨格物質)などの間葉系マーカーの活性化が惹起されることが証明された。ヒト癌細胞株において、TGF β による細胞形態変化と細胞運動性は、siRNA法でDEC1をノックダウンすることで抑制された。siRNA法でDEC2をノックダウンすると、DEC1ノックダウンと比べ、ヒト癌細胞株でのEMT関連マーカー発現において反対の変化が見られた。ヒト乳癌細胞では、DEC2が低酸素条件下での癌細胞のcell viabilityを促進することも示された。また、DEC2がHIF-2 β -Akt-c-myc経路における、Aktの下流因子として、細胞増殖に関わるc-myc遺伝子の転写を促進していることが明らかになった。ヒト乳癌細胞MCF-7とヒト間葉系幹細胞MSCの単層共培養で、MCF-7の形態が紡錘形に変化し、Spheroidで乳頭状の構造が失われるとともに、転写因子Snailなどの発現増加や上皮系マーカーの発現減少および間葉系マーカーの発現増加が認められ、MSCとの共培養によるMCF-7のEMT化が示された。

外科切除標本や放射線画像を用いた検討では、非侵襲的に癌の組織学的特性や治療効果を予測できる可能性が示された。乳癌組織における解析では、術前化学療法後の原発巣における腫瘍残存パターンとリンパ節転移との関係を解析し、化学療法後に原発巣での残存腫瘍の細胞密度が高い群は、そうでない群に比べて、リンパ節転移が残存している可能性が示された。直腸癌組織における解析では、化学療法施行前後での放射線画像(CT・MRI)を比較し、画像診断学上で高い縮小率を示す群と低い縮小率を示す群に

分けて、その臨床病理学的因子を比較検討した。高い縮小率を示す群は、そうでない群に比べて、cytokeratin AE1/AE3 に染色性を示す腫瘍細胞面積・核分裂・CT/MRI での化学療法後腫瘍面積のいずれにおいても低下が認められた。膵癌の組織学的特性と造影ダイナミックCTから作成された時間濃度曲線(TDC)との相関関係についての検討では、非造影相と動脈相間の傾きは微小血管密度と有意に正の相関を示した。動脈相と門脈相間の傾きは癌細胞の密度とCAFの密度とに有意に負の相関を示した。癌細胞の密度、CAFの密度、微小血管の密度と予後との間には有意な相関関係は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Goto S, Seino H, Yoshizawa T, Morohashi S, Ishido K, Hakamada K, Kijima H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Time density curve of dynamic contrast enhanced computed tomography correlates with histological characteristics of pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12537	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morohashi S, Morohashi H, Seino H, Yoshizawa T, Haga T, Goto S, Wu Y, Sakamoto Y, Hakamada K, Kijima H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Investigating the association between radiological images and the pathology of rectal cancer treated with neoadjuvant chemotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 573-579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2019.1931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki H, Morohashi S, Toba T, Seino H, Yoshizawa T, Hirai H, Haga T, Wu Y, Kijima H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Neoangiogenesis of gastric submucosa-invasive adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3895-3900
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.9116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Liu Q, Wu Y, Seino H, Haga T, Yoshizawa T, Morohashi S, Kijima H.	4. 巻 4
2. 論文標題 Correlation between DEC1/DEC2 and epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer PC-3 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 3859-3865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2018.9367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujita T, Miura H, Seino H, Ono S, Nishi T, Nishimura A, Hakamada K, Aoki M.	4. 巻 93
2. 論文標題 Anatomical classification of breast sentinel lymph nodes using computed tomography-lymphography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 487 ~ 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-018-0441-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishishita R, Morohashi S, Seino H, Wu Y, Yoshizawa T, Haga T, Saito K, Hakamada K, Fukuda S, Kijima H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Expression of cancer-associated fibroblast markers in advanced colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 6195-6202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hamano I, Hatakeyama S, Nakamura R, Fukuhara R, Noro D, Seino H, Yoneyama T, Hashimoto Y, Koie T, Yokoyama Y, Ohyama C.	4. 巻 28
2. 論文標題 Onco-testicular sperm extraction (Onco-TESE) from a single testis with metachronous bilateral testicular cancer: a case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Basic and Clinical Andrology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12610-018-0066-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	呉 雲燕 (Wu Yunyan) (40636586)	自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鬼島 宏 (Kijima Hiroshi) (90204859)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関