

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590334

研究課題名(和文)：膵・胆道癌の増殖と腫瘍血管新生を制御する時計遺伝子

研究課題名(英文)：Clock genes regulates tumor growth and tumor angiogenesis of human pancreato-biliary cancer.

研究代表者

鬼島 宏 (KIJIMA HIROSHI)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90204859

研究成果の概要(和文)：膵癌および胆道癌は、難治性癌の代表とされている。これらの病態には、癌細胞増殖および抗アポトーシスの特性が関与する。概日リズムを制御する時計遺伝子は、癌細胞では細胞増殖やアポトーシス(プログラム細胞死)を防ぐ作用として機能している。抗癌剤や抗腫瘍性サイトカインを投与することで細胞はアポトーシスに陥るが、アポトーシスに抵抗する癌細胞では時計遺伝子の制御系が重要な役割を担っている。

研究成果の概要(英文)：Pancreato-biliary cancer is one of the most aggressive malignancies of human. Its aggressiveness is thought to be associated with rapid cell growth and resistance to apoptosis (programmed cell death). Clock genes regulate not only circadian rhythm (biological clock) of human bodies, but also cell growth and anti-apoptotic property of the cancer cells. The clock genes play important roles in resistance to apoptosis of the cancer cells treated by anticancer agents or antitumor cytokines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：癌、膵臓、胆道、時計遺伝子、血管新生、遺伝子制御

1. 研究開始当初の背景

膵癌(その大部分を占める浸潤性膵管癌)ならびに胆道癌(特に胆管癌・胆嚢癌)は、

生命予後がきわめて不良で、難治性癌の代表とされている。

(1) これら膵・胆道癌は、いまだに早期発

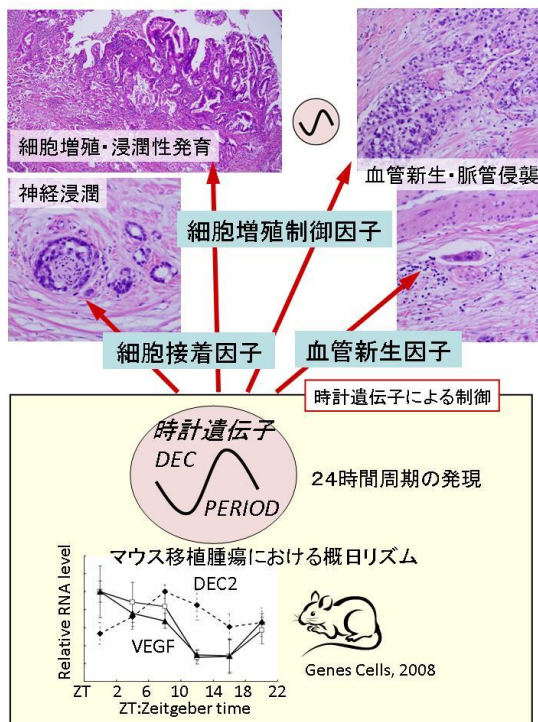
見例が少なく、大半は周囲組織へ浸潤をした進行癌で発見される例が多いのが現状である。我々は、癌細胞の増殖や転移にかかわる因子として、血管内皮増殖因子 (VEGF) が関与する腫瘍血管新生が重要と考えているが、その病態は十分には解明されたとは言い難い。

(2) 生物の生理機能・代謝・行動は、脳の視床下部で駆動されている生物時計が刻む約 24 時間周期の概日リズムにより調節されている。この生物時計 (概日リズム) は時計遺伝子の発現により制御され、その機能解析が進みつつある。我々は、DEC をはじめとする時計遺伝子の機能解析で実績を上げ、病的状態でも時計遺伝子が重要な機能をしていることを示してきた。

2. 研究の目的

難治性癌の代表である膵癌・胆道癌の病態には、癌細胞増殖および血管新生の特性が関与する。生物時計が制御する概日リズムの下で、癌の細胞増殖や腫瘍血管の新生が行われるとの作業仮説に基づき、これを個体レベルで証明することで膵・胆道癌における高悪性度の病態を解明する。

本研究の目標は、*in vivo* マウス異種移植系を用いて、時計遺伝子の発現に対応した癌増殖と血管新生の機序を個体レベルで解明し、さらにこれら癌増殖抑制と血管新生制御を試みることにある。



3. 研究の方法

ヒト膵・胆道癌などを用いて、癌細胞における時計遺伝子 (生物時計) の制御機構を明らかにする。培養細胞レベルでは、概日リズム下における細胞増殖や腫瘍血管新生に関与する発現調節機構を DEC および VEGF を中心に分子生物学的に解析する。対象とする時計遺伝子の発現検討は、我々が機能解析を行った DEC 遺伝子 (DEC1, DEC2) にとどまらず、CLOCK, BMAL, PER, CRY といったその他の時計遺伝子を含む。

(1) 概日リズム下での癌細胞の増殖・浸潤を制御する時計遺伝子の発現解析

生物時計が刻む概日リズム解析は、培養細胞レベルでは同調因子として、高濃度 (50%) 血清刺激を用いる。ヒト膵・胆道癌の細胞株に高濃度血清刺激を与えて、個々の細胞のリズムを同調させることにより、日内リズムを誘導させる。刺激してから4時間おきに最大48時間まで、細胞から mRNA とタンパク質を回収する。回収した mRNA およびタンパク質を用い、リアルタイム PCR、ウエスタン・ブロット法で各種の時計遺伝子のリズム発現の変動を解析する。

機能発現の高い時計遺伝子を明らかにし、以下の実験を行うことで、癌細胞の増殖・浸潤に及ぼす時計遺伝子発現の影響を検討する。膵・胆道癌細胞株で、コントロール (scrambled siRNA) による RNA 干渉と、時計遺伝子の RNA 干渉による発現抑制を行い、48~72 時間後に、細胞を回収し、コントロールと時計遺伝子で RNA 干渉による発現抑制を行った場合の増殖能の比較を MTT assay で比較する。癌細胞の浸潤能は matrigel invasion assay で比較する。RNA 干渉による発現抑制の解析を効率良く遂行する方法として、当研究室では、複数の標的配列および複数の試薬を用いた検証系をすでに導入済みである。

(2) 膵・胆道癌細胞の時計遺伝子と血管新生遺伝子との関連解析

クロマチン免疫沈降法を用いて以下の実験を行う。膵・胆道癌細胞株に、DEC1 発現プラスミドを導入してから、血清刺激を4時間おきに最大48時間までを行い、その後 CLOCK と BMAL の抗体で免疫沈降し、細胞から DNA を回収する。回収した DNA を精製し、VEGF の primer を用いて、以下の目的のため PCR を行う。すなわち、VEGF 遺伝子上の E-box に CLOCK と BMAL タンパク質が結合する活性を、DEC1 発現プラスミド導入時とコントロール導入時とで比較する。これにより、癌細胞の浸潤・増殖などの病態の概日リズムを制御している分子機構は、VEGF 遺伝子発現と CLOCK, BMAL, DEC1 タンパ

ク質発現の相互作用が重要であることが明らかになる。

(3) 抗腫瘍性サイトカイン・抗癌剤が時計遺伝子発現・癌細胞増殖に及ぼす影響
 抗腫瘍性サイトカイン (TNF- α , IFN- α , β , γ など) が概日リズム下で発現している時計遺伝子にどのように影響を及ぼすのかを解明することは、膵・胆道癌における時間薬物療法の基礎研究として重要と判断される。このため、癌細胞株に抗腫瘍性サイトカイン導入してから、血清刺激を行い、概日リズム下における癌細胞の時計遺伝子の位相の変化を解析する。

4. 研究成果

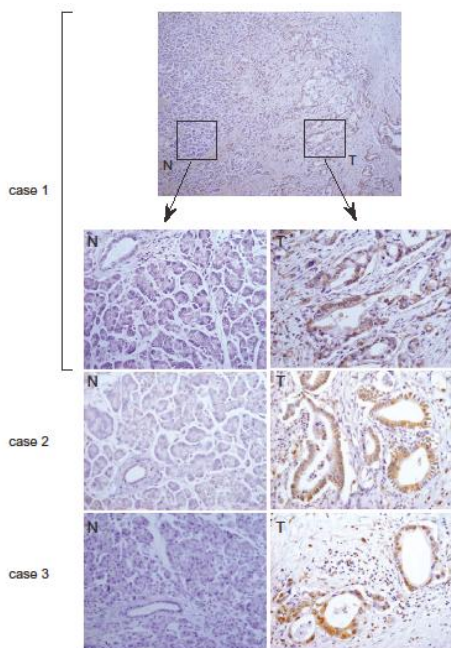
ヒト膵・胆道癌などを用いて、癌細胞における時計遺伝子 (生物時計) の制御機構の一部を明らかにすることができた。培養細胞レベルでは、時計遺伝子の制御下で細胞増殖が行われており、その主要な機序は抗アポトーシス制御であることが証明された。一方、今回の研究成果は培養細胞レベルが主体であり、個体レベルでの成果は十分にあげることができず、今後の課題となった。

以下に、今回の研究成果を提示する。

(1) 癌細胞における時計遺伝子の発現解析

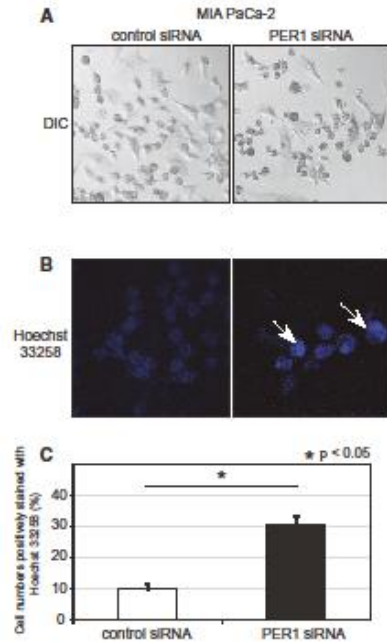
時計遺伝子は、正常の細胞・組織のみならず、癌 (悪性腫瘍) においても広く発現しており、高濃度 (50%) 血清刺激により、個々の細胞のリズムを同調させ、日内リズムを誘導させることで証明ができた。

膵臓では正常細胞に比較して、癌細胞では、時計遺伝子産物 (タンパク質) が過剰発現していることが示された。



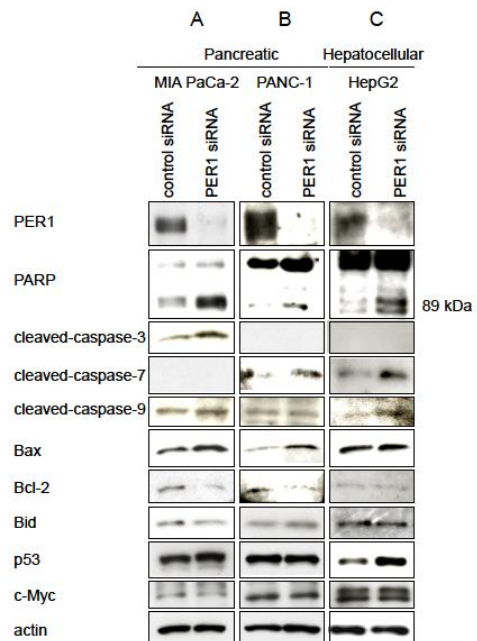
(2) 癌細胞増殖を制御する時計遺伝子

DEC, PER などの時計遺伝子発現の多寡で、癌細胞の増殖が制御されることが解明された。特に MIA-PaCa-2 膵癌細胞では、PER1 遺伝子が、細胞増殖制御に関連していることが解明された。



(3) 時計遺伝子の抗アポトーシス効果

癌細胞に時計遺伝子標的 siRNA を投与することで、細胞増殖が制御されるとともに、アポトーシス関連遺伝子発現が制御された。つまり、時計遺伝子がアポトーシス機序を介して、細胞増殖を制御していることが明らかにされた。



(4) 抗腫瘍性サイトカイン・抗癌剤が時計遺伝子発現・癌細胞増殖に及ぼす影響

抗腫瘍性サイトカイン・抗癌剤投与による癌細胞増殖抑制には、アポトーシスの機序を介した細胞死が大きく関与していた。このアポトーシス機構にも、時計遺伝子による制御が直接的に作用しており、病的状態での細胞死にも時計遺伝子による制御機構が重要であることが示された。

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 20 件)

- ① Sato F, Wu Y, Bhawal UK, Liu Y, Imaizumi T, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. PERIOD1 (PER1) has anti-apoptotic effects, and PER3 has pro-apoptotic effects during cisplatin (CDDP) treatment in human gingival cancer CA9-22 cells. *Eur J Cancer*. 2011 Apr 1. [Epub ahead of print].
- ② Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Umezawa A, Kijima H, Fukuda S, Saijo Y. Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth Through the Enhancement of Neovascularization. *Mol Med*. 2011 Mar 11. [Epub ahead of print]
- ③ Tsutsumi S, Morohashi S, Kudo Y, Akasaka H, Ogasawara H, Ono M, Takasugi K, Ishido K, Hakamada K, Kijima H. L1 Cell adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2011; 103: 669-673.
- ④ Wu Y, Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 regulate the paclitaxel-induced apoptotic pathway of MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2011; 27: 491-495.
- ⑤ Hara S, Kijima H, Okada K, Igarashi Y. Invasive micropapillary variant of the gallbladder adenocarcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis. *Biomed Res*. 2010; 31: 89-95.
- ⑥ Liu Y, Sato F, Kawamoto T, Fujimoto K, Morohashi S, Akasaka H, Kondo J, Wu Y, Noshiro M, Kato Y, Kijima H.

Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. *Genes Cells*. 2010; 15: 315-325.

- ⑦ Akasaka H, Sato F, Morohashi S, Wu Y, Liu Y, Kondo J, Odagiri H, Hakamada K, Kijima H. Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells. *BMC Cancer*. 2010; 10: 548 (online publication).
- ⑧ Sato F, Nagata C, Liu Y, Suzuki T, Kondo J, Morohashi S, Imaizumi T, Kato Y, Kijima H. PERIOD1 is an anti-apoptotic factor in human pancreatic and hepatic cancer cells. *J Biochem*. 2009; 146: 833-838.
- ⑨ Ohashi M, Kusumi T, Sato F, Kudo Y, Jin H, Akasaka H, Miyamoto K, Toyoki Y, Hakamada K, Kijima H. Expression of syndecan-1 and E-cadherin is inversely correlated with poor patient's prognosis and recurrent status of extrahepatic bile duct carcinoma. *Biomed Res*. 2009; 30: 79-86.
- ⑩ Kondo J, Sato F, Kusumi T, Liu Y, Motonari O, Sato T, Kijima H. Claudin-1 expression is induced by tumor necrosis factor-alpha in human pancreatic cancer cells. *Int J Mol Med*. 2008; 22: 645-649.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 佐藤冬樹、赤坂治枝、諸橋聡子、Wu Yunyan, 鬼島 宏. Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells. 第 100 回日本病理学会総会. 2010 年 4 月 29 日 (横浜).
- ② 呉 雲燕、佐藤冬樹、諸橋聡子、加藤幸夫、鬼島 宏. Pro- and anti-apoptotic effects of DEC1/DEC2 in paclitaxel-treated human breast cancer MCF-7 cells. 第 100 回日本病理学会総会. 2010 年 4 月 29 日 (横浜).
- ③ 佐藤冬樹、劉 洋、近藤 潤、諸橋聡子、加藤幸夫、鬼島 宏. Expression of DEC1 in tumor progression. 第 99 回日本病理学会総会. 2010 年 4 月 29 日 (東京).
- ④ 近藤 潤、佐藤冬樹、劉 洋、呉 雲燕、諸橋聡子、鬼島 宏. 腺癌細胞における細胞接着因子 claudin-1 と浸潤との関連性の検討. 第 99 回日本病理学会総

- 会. 2010年4月28日(東京).
- ⑤ 佐藤冬樹、永田千姫良、鈴木貴弘、劉洋、楠美智巳、加藤幸夫、鬼島宏. 膀胱癌細胞のアポトーシスおよび増殖に関わる PERIOD1 遺伝子. 第98回日本病理学会総会. 2009年5月2日(京都).
- ⑥ 劉洋、佐藤冬樹、近藤潤、楠美智巳、加藤幸夫、鬼島宏. BHLH transcription factor DEC2 is involved in the regulation of apoptosis of MCF-7 cells. 2009年5月1日(京都).

[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

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~patho2/>
(弘前大学大学院医学研究科病理生命科学講座)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼島 宏 (KIJIMA HIROSHI)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 90204859

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 冬樹 (SATO FUYUKI)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 60400131

諸橋 聡子 (MOROHASHI SATOKO)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 90569592