

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09181

研究課題名（和文）転写因子BHLHE41/DEC2の発現制御機構の多角的解析と肺癌における臨床意義

研究課題名（英文）Multilateral analysis of the regulatory mechanism of transcription factor BHLHE41/DEC2 expression and its clinical significance in lung cancer.

研究代表者

永田 俊行（NAGATA, Toshiyuki）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：70611763

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、非小細胞肺癌におけるBHLHE41/DEC2（DEC2）発現の制御機構とその役割を明らかにし、早期診断への応用と治療標的としての可能性を検討することであった。  
in vitro実験とin vivo実験いずれにおいても、DEC2の発現が亢進すると腫瘍細胞の増殖が抑制されることが確認された。DEC2発現による腫瘍増殖抑制の機序解明として、アポトーシスは大きくは関与しておらず、Autophagy flux assayやFluorescence Associated with ftLC3 Expression等から、DEC2の発現によりオートファジーが誘導されるとの結果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BHLHE41/DEC2の発現制御機構に関して、アポトーシスが大きく関与しておらず、BHLHE41/DEC2の発現によりオートファジーが誘導されるとの結果を得、機序の一端を解明した。更に、肺癌進行過程の早期と中・後期ではBHLHE41/DEC2の発現が異なることが確認され、肺癌における悪性化進行過程を考慮したオートファジー研究につながる可能性を秘めた結果であった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the regulatory mechanism and role of BHLHE41/DEC2 expression in non-small cell lung cancer, and to examine its application to early diagnosis and potential as a therapeutic target.

First, both in vitro experiments using lung cancer cell lines and in vivo experiments using immunodeficient mice showed that increased expression of BHLHE41/DEC2 suppressed tumor cell growth. Next, to elucidate the mechanism by which DEC2 expression suppresses tumor growth, we examined the relationship with apoptosis, but found that it was not significantly involved. We found that autophagy is induced by BHLHE41/DEC2 expression in lung cancer cells based on Autophagy flux assay and Fluorescence Associated with ftLC3 Expression, and elucidated part of the mechanism.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：BHLHE41/DEC2 肺癌 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦での肺癌の罹患率は高く、死亡数は依然として第 1 位である。肺癌は早期発見が困難なために予後が非常に悪く、多くの場合、数年以内に再発や転移が起こることが知られている。しかし、早期肺癌( 期)に限れば 5 年生存率は 70%程度と高く、肺癌の早期発見と悪性化進展における機序解明は肺癌による死亡を減少させる重要な課題である。これまで肺癌患者の肺癌マーカーの探索が行われているが、有用なバイオマーカーは発見されていない。申請者らは BHLHE41/DEC2 に注目し、肺癌手術検体 177 例を用いた免疫組織化学染色の結果から肺癌において非浸潤癌から浸潤癌への進行に伴い BHLHE41/DEC2 が消失すること、BHLHE41/DEC2 の発現と予後が相関することを確認済である。また BHLHE41/DEC2 の強制発現によって軟寒天のコロニー形成が低下すること、発現上昇によりジェムシタピンの感受性が増強することを見いだしている。

2. 研究の目的

本研究では、BHLHE41/DEC2 の発現制御と薬剤感受性機構を解析し、肺癌の悪性化における BHLHE41/DEC2 の発現低下機構とその意義を明らかにして、肺癌の早期診断への応用と治療標的候補分子の同定を目的としている。

3. 研究の方法

BHLHE41/DEC2 の mRNA と蛋白質の発現の制御機構の解析

転写因子による発現制御の解析

既に BHLHE41/DEC2 の 5' 非転写領域 2kB をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポータープラスミドを作製しており、BHLHE41/DEC2 の高発現している正常扁平上皮細胞株 HaCat においてプロモーター活性部位を絞り込んでいる。その部位に結合する転写因子をデータベース( TRANSFAC 等)で検索し、候補転写制御分子について発現、抑制を行うことで BHLHE41/DEC2 の発現変化や CHIP アッセイなどを用いて BHLHE41/DEC2 の発現を制御する転写因子を同定する。

DNA メチル化による発現制御について解析

既に BHLHE41/DEC2 の低発現肺癌細胞株で DNA メチル基転移酵素阻害剤( 5 -アザシチジン)処理により BHLHE41/DEC2 の mRNA、タンパク発現上昇を確認している。細胞株においてバイサルファイトシーケンシング法により BHLHE41/DEC2 プロモーター領域のメチル化部位を同定する。BHLHE41/DEC2 プロモーター領域の明確なメチル化がない場合は、 で同定した転写制御分子の発現が低下している可能性が考えられるのでこれを検討する。

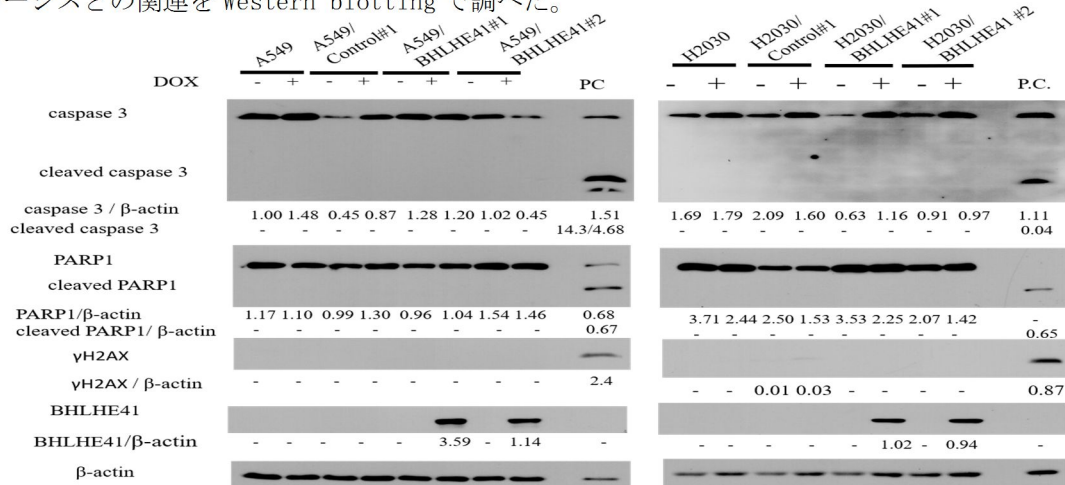
microRNA による発現制御の解析

既に臨床検体を用いた免疫染色から、BHLHE41/DEC2 の発現は正常肺・上皮内肺癌で高く、浸潤癌で著しく低いことを見いだしている。臨床検体で正常肺と浸潤肺癌を用いて microRNA アレイ解析を行い、BHLHE41/DEC2 発現を抑制している microRNA を絞り込む。データベース( microRNA.org 等)で BHLHE41/DEC2 の mRNA の 3' 側に結合する可能性のある microRNA も参照し、候補 microRNA を BHLHE41/DEC2 高発現細胞株に導入して、BHLHE41/DEC2 の発現低下を確認する。

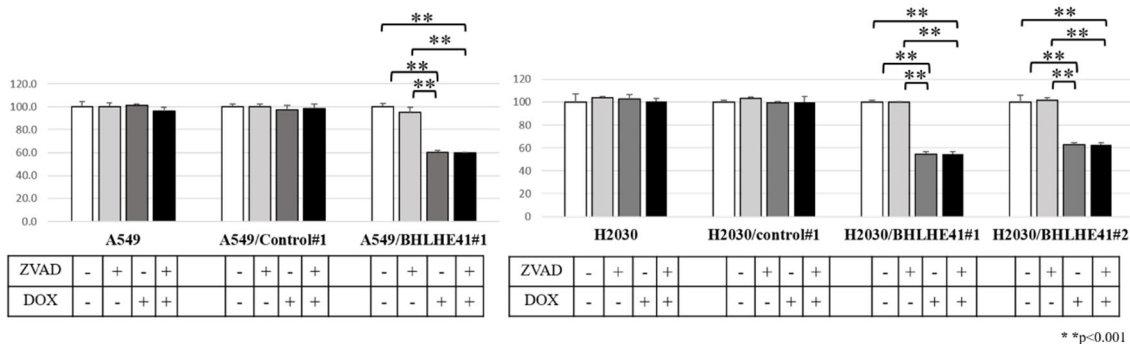
4. 研究成果

肺癌細胞株を用いた in vitro 実験と in vivo 実験いずれにおいても、BHLHE41/DEC2 の発現が亢進すると腫瘍細胞の増殖が抑制されることは確認されており、次に、BHLHE41/DEC2 発現による腫瘍増殖抑制の機序の解明を試みた。

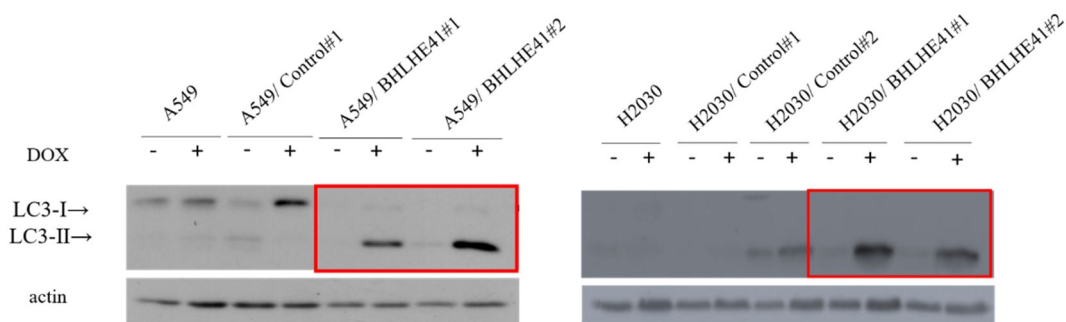
( 1 ) 内因性の遺伝子発現すなわち BHLHE41/DEC2 発現でのプログラム細胞死として、まずはアポトーシスとの関連を Western blotting で調べた。



A549 と H2030 細胞において、DOX を添加し BHLHE41/DEC2 の発現が誘導されても、アポトーシス実行過程における中心的酵素である cleaved カスパーゼ 3、核 DNA の断片化を引き起こし細胞死を誘導する cleaved PARP (ポリ ADP リボースポリメラーゼ) DNA ダメージの鋭敏なマーカーである H2AX は、いずれもアップレギュレーションは見られなかった。更に、DOX を添加し BHLHE41/DEC2 の発現を誘導し、細胞増殖が抑制されているところに、全カスパーゼ阻害剤 (アポトーシス阻害剤) である Z-VAD-FMK を処理しても、増殖抑制を改善することはできないとの結果も、アポトーシスが大きくは関与していないことを裏付けている。

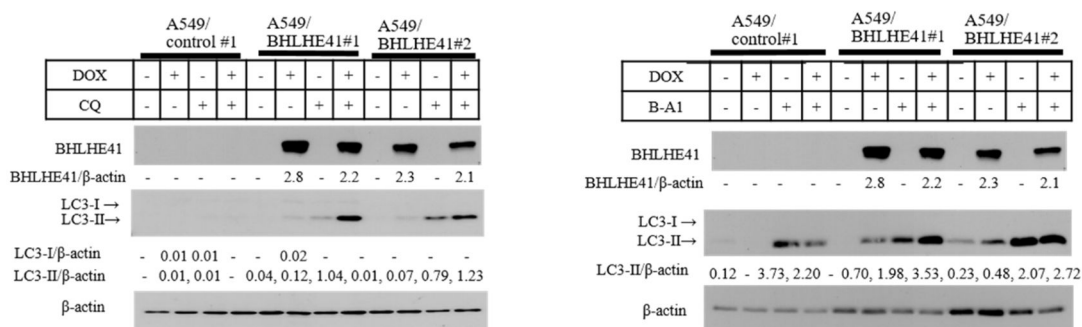


(2) 次に、BHLHE41/DEC2 発現でのプログラム細胞死が誘導された機序 (細胞増殖抑制の機序) として、オートファジーの可能性を考え、LC3 の発現を Western blotting で検討した。



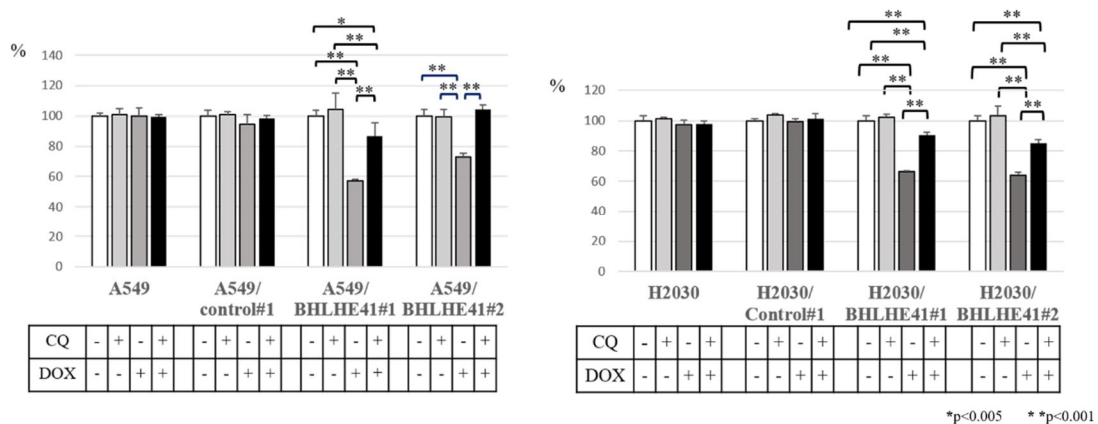
DOX を添加し BHLHE41/DEC2 の発現を誘導すると、LC3- のシグナルが低下し、 が上昇することが明らかとなり、オートファジーが誘導されていることが示唆された。

(3) 実際に BHLHE41/DEC2 がオートファジーを誘導することを裏付けるため、Autophagy flux assay を行った。



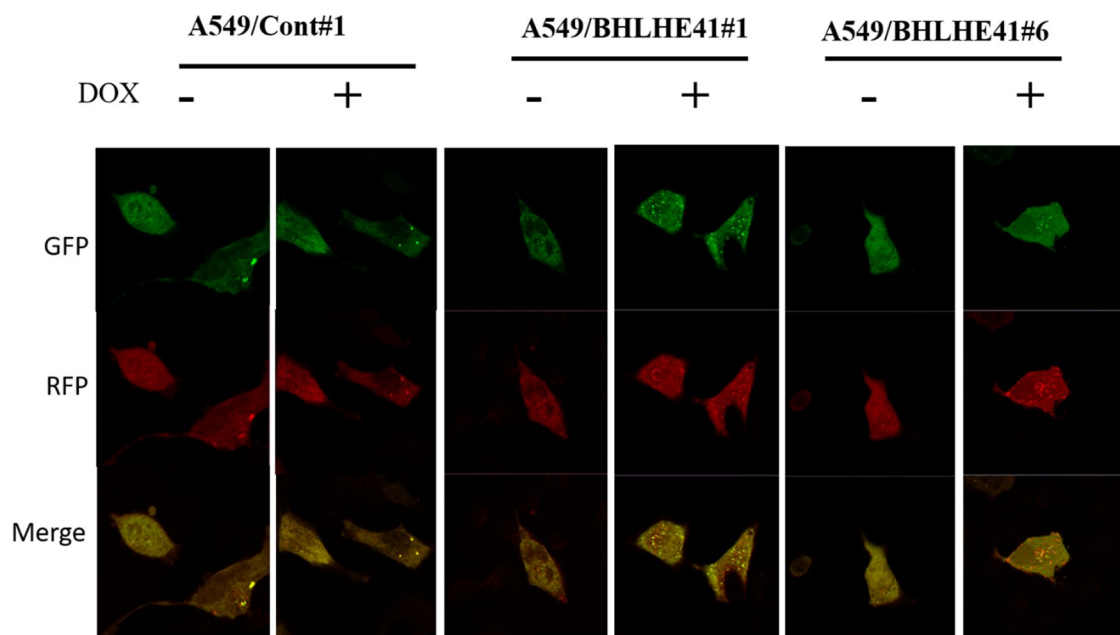
A549 の BHLHE41/DEC2 発現誘導細胞を用いて、DOX を添加して BHLHE41/DEC2 の発現を誘導すると、LC3- が増加しており、更にオートファジー阻害剤であるクロロキンを添加すると LC3- の蓄積量が増加することが確認された。同様にパフィロマイシン A1 を処理しても同様の結果であり、BHLHE41/DEC2 の発現により、オートファジーが誘導されることが示唆された。

(4) オートファジー阻害剤の処理により BHLHE41/DEC2 の発現による増殖抑制効果の変化を確認した。



A549 BHLHE41/DEC2 発現誘導細胞を用い、DOX を添加し細胞増殖を抑制されるところに、オートファジー阻害剤であるクロロキンを添加すると、細胞の増殖抑制効果が阻害された。パフィロマイシン A1 を処理しても同様の結果であり、BHLHE41/DEC2 の細胞増殖抑制はオートファジーが大きく関与していると考えられた。

(5) LC3 の発現を (ftLC3) プラスミドを用いて蛍光観察した。



赤の点状スポットはリソソームに融合した LC3 を、黄色の点状のスポットはリソソームと融合していない LC3 を示している。

A549/control 細胞では、DOX の添加の有無に関わらずスポット数に変化がないのに対して、A549 BHLHE41/DEC2 誘導細胞では、DOX の存在下で赤と黄の両方のスポットの数が非存在下に比べて増加した。この結果は、BHLHE41/DEC2 の発現によりオートファゴソームやオートリソソームの数が増加していることを示しており、肺癌細胞において BHLHE41/DEC2 の誘導によりオートファジーが誘導されるという仮説を支持するものであった。

肺癌細胞において、BHLHE41/DEC2 の発現によりオートファジーが誘導されることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagata Toshiyuki, Minami Kentaro, Yamamoto Masatatsu, Hiraki Tsubasa, Idogawa Masashi, Fujimoto Katsumi, Kageyama Shun, Tabata Kazuhiro, Kawahara Kohichi, Ueda Kazuhiro, Ikeda Ryuji, Kato Yukio, Komatsu Masaaki, Tanimoto Akihideo, Furukawa Tatsuhiko, Sato Masami	4. 巻 22
2. 論文標題 BHLHE41/DEC2 Expression Induces Autophagic Cell Death in Lung Cancer Cells and Is Associated with Favorable Prognosis for Patients with Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11509 ~ 11509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111509	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 Aoki Masaya, Ueda Kazuhiro, Kamimura Go, Iwamoto Yoshiyuki, Ikehata Mizuki, Tabata Keisuke, Sakagami Yuri, Morizono Shoichiro, Tokunaga Takuya, Umehara Tadashi, Harada-Takeda Aya, Maeda Koki, Nagata Toshiyuki, Kariatsumari Kota, Furukawa Tatsuhiko, Tsujikawa Kazutake, Sato Masami	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical significance of ALKBH4 expression in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2040 ~ 2049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tcr-22-39	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 Kogaki Takahiro, Ohshio Ikumi, Nagata Toshiyuki, Takeda Aya Harada, Aoki Masaya, Ueda Kazuhiro, Minami Kentaro, Yamamoto Masatatsu, Kawahara Kohichi, Furukawa Tatsuhiko, Sato Masami, Ueda Yuko, Jingushi Kentaro, Tozuka Zenzaburo, Saigusa Daisuke, Hase Hiroaki, Tsujikawa Kazutake	4. 巻 197
2. 論文標題 Development of a highly sensitive method for the quantitative analysis of modified nucleosides using UHPLC-UniSpray-MS/MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 113943 ~ 113943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2021.113943	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 Hase Hiroaki, Aoki Masaya, Matsumoto Kentaro, Nakai Shuichi, Nagata Toshiyuki, Takeda Aya, Ueda Kazuhiro, Minami Kentaro, Kitae Kaori, Jingushi Kentaro, Ueda Yuko, Yamamoto Masatatsu, Furukawa Tatsuhiko, Sato Masami, Tsujikawa Kazutake	4. 巻 45
2. 論文標題 Cancer type-SLC01B3 promotes epithelial-mesenchymal transition resulting in the tumour progression of non-small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 309 ~ 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7839	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	佐藤 雅美 (Sato Masami) (30250830)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  (17701)	
研究分担者	上田 和弘 (Ueda Kazuhiro) (90420520)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授  (17701)	
研究分担者	狩集 弘太 (Kariatumari Kouta) (20648050)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教  (17701)	
研究分担者	横枕 直哉 (Yokomakura Naoya) (00418857)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教  (17701)	

## 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	前田 光喜 (Maeda Kouki) (70795674)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教  (17701)	
研究分担者	武田 亜矢 (Takeda Aya) (80794700)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教  (17701)	
研究分担者	梅原 正 (Umehara Tadashi) (20837794)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教  (17701)	
研究分担者	上村 豪 (Kamimura Go) (80927187)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教  (17701)	

## 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