

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791801

研究課題名(和文) 時計遺伝子 DEC2 高発現ベクターと shRNA を用いた癌における VEGF の機能解析

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of DEC2 and VEGF in cancer

研究代表者

パワール ウジャール (Bhawal Ujjal)

神奈川歯科大学・歯学部・プロジェクト研究員

研究者番号：50433339

研究成果の概要(和文): bHLH 型転写因子 DEC1 および DEC2 は、時計中枢である視交叉上核から末梢に至る全身の組織および細胞で、概日リズムを形成します。また、免疫応答系や種々の組織分化の制御、癌化や低酸素応答、アポトーシスの制御など、生体内における様々な生理現象に関与することが報告されています。我々は、DEC1 および DEC2 の強制発現により細胞の増殖、移行、および浸潤を低減することを明らかにした。これらの結果から、口腔癌の発育進展機構に DEC が関与し、今後の癌の治療において、新たな分子標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文): Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factors DEC1 (BHLHB2/Sharp2/Stra13) and DEC2 (BHLHB3/Sharp1) are significantly up-regulated in various types of cancers, and transfection with DEC1 or DEC2 decreases cell proliferation, apoptosis of tumor cells. We showed that DEC overexpression exhibits delayed wound healing and reduces cell proliferation, migration and invasion. Therefore, DEC is considered to be an attractive target for anticancer therapy.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学、分子病理学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯学

キーワード：時計遺伝子、DEC、VEGF、口腔扁平上皮癌、低酸素

1. 研究開始当初の背景

近年、癌の増殖は時計遺伝子 (Clock gene; およそ 24 時間周期で働く遺伝子で、一日の周期をもつ生物の行動・生理機能を制御する) や VEGF (Vascular endothelial growth factor, 血管内皮増殖因子) の日内リズムを利用することが見出された。したがって、抗腫瘍薬の至適時刻の投与によりそれらのリズムを制御することが可能となれ

ば、抗腫瘍効果の増強や副作用の軽減が得られるものと臨床的にも期待されている。ほとんどの時計遺伝子は bHLH (塩基性ドメイン - ヘリックス - ループ - ヘリックス) 構造を含む転写制御因子であり、特に BMAL1、CLOCK、PER1、PER2 は癌の病態進展に関与する重要な因子である。これまでに、申請者は以下の点を明らかにした。

DEC1とDEC2はE-box配列(CACGTG)およびBMALタンパク質と直接結合し、標的時計遺伝子の発現を抑える(図1左)。この転写抑制はヒストン脱アセチル酵素(HDAC)阻害薬により阻害されることからクロマチンのヒストン脱アセチル化の関与が示唆される(Fujimoto K, Sato F, Bhawal UK et al. *Int J Mol Med* 19: 925-932; 2007)。

マウスに移植した肉腫細胞でDEC2は日内リズムを形成し、VEGFと逆位相であった。また、*In vitro*の肉腫細胞では、転写因子HIF-1 α /ARNT1を介するVEGF遺伝子発現をDEC2が制御しており、肉腫細胞のリズム機構におけるDECの重要性が示唆された(Sato F, Bhawal UK et al. *Genes Cells* 13:131-144; 2008)。

2. 研究の目的

DECタンパク質を用いた分子レベルでの結果を踏まえ、本研究課題では、特に、ヒト口腔扁平上皮癌に焦点を絞り、組織学的にDEC2とVEGFの相関性を明らかにする。

DEC2高発現細胞をマウスに移植し、組織内のVEGFの発現を通常の腫瘍細胞と比較する。

時計遺伝子の発現制御が抗癌剤の感受性に及ぼす影響を解析する。

本研究は、上記の研究結果に基づき、口腔扁平上皮癌細胞におけるDEC2とVEGFの関連性を形態学的に明らかにする研究である。DEC1とDEC2は全身のあらゆる臓器で発現し、日内リズム、免疫や癌化、低酸素応答、アポトーシス、組織分化の制御など、多彩な制御機能をもつ。また、正常組織よりも癌組織で高発現していることから、DEC2は少なくとも一部にはVEGFを介して口腔癌の増殖・浸潤および腫瘍血管新生の日内リズムを調節していることが予想される。

3. 研究の方法

ヒト口腔扁平上皮癌組織におけるDEC2とVEGFの相関性、ヒトのDEC高発現細胞とDECノックダウン細胞を作製する。次年度以降では、マウスの組織内でのVEGFの発現を検討するとともに時計遺伝子発現と抗癌剤投与に及ぼす影響の解析を行う。

ヒト口腔扁平上皮癌組織を用いたDEC2とVEGFの発現の解析

患者から正常組織及び癌組織を採取。それぞれパラフィン切片を作製する。免疫染色を行い、正常組織と癌組織におけるDEC2とVEGFの発現を確認する。

ヒト口腔扁平上皮癌株に対して、Real-time PCR法、ウエスタン・プロット法

を用いてDEC2とVEGFの発現を解析する。

口腔扁平上皮癌株の作製DEC2高発現細胞とDEC2ノックダウン細胞の解析

DEC2ベクターをFuGENE 6を用いて導入し、G418を用いてDEC2ベクターの導入された口腔扁平上皮癌細胞を選択する。T細胞機能欠損ヌードマウス(Balb/c nude 5週令)を10匹用意する。マウスの背部皮下にDEC2高発現 clone やDEC2 shRNA clone を一ヶ所につき1 \times 10⁶移植する。また、MOCKとして空のベクターを用いる。

4. 研究成果

Luciferase assayでDEC強制発現によるCyclinD1転写制御機構の解析を行った。PromoterはE-boxを含む約1.9kbpのCyclinD1 promoterを使用した。CyclinD1転写活性が約4倍抑制され、その抑制された活性はDEC発現 plasmid を濃度依存的に強制発現しても抑制がみられた。またCyclinD1遺伝子上流のE-boxにmutationを作製し、luciferase assayでDEC強制発現によっても、CyclinD1転写活性は影響を受けなかった。DEC強制発現によってCyclinD1, CDK4, CDK6, Phospho-Akt, Phospho GSK-3 β の発現をWestern blot法で明らかにした。さらに、Chromatin immunoprecipitation (ChIP assay)を用いてDECがCyclinD1のE-boxに影響を及ぼすか調べた。コントロールと比べ、DEC強制発現によりCyclinD1のprecipitateする量が増加した。また、ChIP assayを用いて癌細胞にDEC siRNA導入することによってCyclinD1のprecipitateする量が抑制した。PI-3K経路を阻害して、RadiationによるDECの発現の増加とAktのリン酸化がみられた。DEC強制発現によるAktの活性化がROSによるものであることが示唆された。これらの結果よりDECがE-boxを介してCyclinD1の発現を制御していることが示唆された。

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5件)

2010

1. Zhao J, Watanabe T, Bhawal UK, Kubota E, Abiko Y. Transcriptome analysis of beta-TCP implanted in dog mandible. *Bone* 48(4): 864-877.
2. Sasahira T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. Down-regulation of runt-related transcription factor 3 (RUNX3)

associated with poor prognosis of adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland. **Cancer Science** 102(2): 492-497.

3. Sasahira T, Kirita T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK, Bosserhoff AK, Kuniyasu H. MIA-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer** 46(12): 2285-2294.
4. Nomura Y, Bhawal UK, Nishikiori R, Sawajiri M, Hirata I, Okazaki M. Effects of oral disinfectants on the cell cycle and viability of primary human gingival fibroblasts in vitro. **Dental Materials Journal** 29(1): 75-83.

2009

5. Low concentration fluoride stimulates cell motility of epithelial cells *in vitro*. Arakawa Y, Bhawal UK, Ikoma T, Kimoto K, Kuroha K, Kubota T, Hamada N, Kubota E, Arakawa H. **Biomedical Research** 30(5): 271-277.

[学会発表](計 13 件)

1. Bhawal UK. Effects of PER1 and PER3 in human gingival cancer. **89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, USA** 2011.03.15 - 19
2. 笹平智則、栗原 都、山本一彦、バワール・ウジャール。MIA3 は口腔扁平上皮癌の脈管新生を誘う。第 21 回日本消化器癌発生学会総会、「ワークショップ 1 癌の発生と進展」、軽井沢 2010. 11.18 - 19
3. Bhawal UK. BHLH transcription factor DEC regulates CyclinD1 expression through E-box element. **第 69 回日本癌学会学術総会、大阪** 2010.09.22 - 24
4. Sato F, Bhawal UK. PERIOD1 (PER1) has an anti-apoptotic, and PER3 has a pro-apoptotic effect by cisplatin in human gingival cancer cells. **第 69 回日本癌学会学術総会、大阪** 2010.09.22 - 24
5. 笹平智則、栗原 都、バワール・ウジャール。口腔癌における MIA3 の役割 **第 69 回日本癌学会学術総会、大阪** 2010.09.22 - 24

6. Bhawal UK. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates cyclinD1. **第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会、東京** 2010.09.20 - 22
7. Bhawal UK. Molecular mechanism of hypoxia inducible gene DEC in oral inflammation and cancer. **第 99 回日本病理学会総会、東京** 2010.04.27 - 29
8. Sato F, Bhawal UK. Expression of DEC in tumor progression. **第 99 回日本病理学会総会、東京** 2010.04.27 - 29
9. 笹平智則、栗原 都、山本一彦、バワール・ウジャール。唾液腺腫瘍における RUNX3 の発現およびメチル化。 **第 99 回日本病理学会総会、東京** 2010.04.27 - 29
10. 笹平智則、栗原 都、山本一彦、バワール・ウジャール。口腔癌における MIA3 の役割。 **第 99 回日本病理学会総会、東京** 2010.04.27 - 29
11. Sato F, Bhawal UK. Expression of clock genes and tumor progression. **第 32 回日本分子生物学会、横浜** 2009.12.09 - 12
12. 笹平智則、栗原 都、バワール・ウジャール。大腸癌における TrkB、TrkC の発現の意義。 **第 68 回日本癌学会総会、横浜** 2009.10.1 - 3
13. 國安弘基、笹平智則、Luo Y、バワール・ウジャール。トランス脂肪酸であるエラノイジン酸は大腸癌の転移を促進する。 **第 68 回日本癌学会総会、横浜** 2009.10.1 - 3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

バワール ウジャール (Bhawal Ujjal)
神奈川歯科大学・歯学部・プロジェクト研究員

研究者番号 : 50433339