

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791243

研究課題名（和文） ヒト乳癌における時計遺伝子発現の意義と治療への応用

研究課題名（英文） Clock genes analysis in human breast cancer

研究代表者

諸橋 聡子（MOROHASHI SATOKO）

弘前大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：90569592

研究成果の概要（和文）：ヒト乳癌細胞株 MCF-7 において、Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) によりアポトーシスを誘導し時計遺伝子 DEC1, DEC2 の発現を解析した。DEC1, DEC2 の発現は、TNF- $\alpha$  により濃度依存性に上昇し、TNF- $\alpha$  で誘導されるアポトーシスに関連していることを証明した。また、RNA 干渉法 (siRNA) により DEC2 の発現を低下させた乳癌細胞では、Bax の発現、PARP の発現、Caspase-7 の発現がそれぞれ上昇していることを確認し、DEC2 はヒト乳癌細胞株 MCF-7 において、アポトーシス・増殖能において、重要な制御機構を持つことを証明した。

また、抗癌剤 paclitaxel 処理によるアポトーシス誘導に対して DEC1 遺伝子は pro-apoptotic effect として重要な機能を担っている一方で、DEC2 は anti-apoptotic effect として機能を有していることを解明した。

研究成果の概要（英文）：Expression of clock genes, DEC1 and DEC2 were up-regulated in the MCF-7 human breast cancer cells by TNF- $\alpha$  in a concentration-dependent manner. TNF- $\alpha$  induced the apoptosis of MCF-7 cells. We also demonstrated that siRNA-mediated DEC2 knockdown, but not DEC1, increased the Bax expression, cleavage PARP and cleavage caspase-7 in MCF-7 cells. In conclusion, we speculated that DEC2 plays an important role in the regulation of both apoptosis and proliferation of the MCF-7 cells.

In human breast cancer MCF-7 cells, paclitaxel increased the expression of DEC1 and DEC2. However, DEC1 and DEC2 exhibited opposite effects in paclitaxel inducing apoptosis, That is DEC1 has pro-apoptotic, while DEC2 has anti-apoptotic function. Both the two transcription factors play important roles in regulating paclitaxel induced apoptosis pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本における乳癌患者は増加傾向の一途を辿っている。乳癌患者の罹患年代は、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。再発患者の多くは抗がん剤の治療をすることとなる。患者のQOL (quality of life) を下げずに、治療を継続することは非常に重要かつ急務である。本研究では、再発乳癌を副作用の少ない状態で治療可能にするために、乳癌細胞のもつ特徴を生かした抗がん剤使用への応用を目指す。

癌の増殖が時計遺伝子 (Clock gene, 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、一日の周期をもつ生物の活動がコントロールされる) 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、抗がん剤の投与時刻を考慮することにより、効果の増加や副作用の軽減が可能になることが明らかにされはじめ、医療への応用が期待されている。しかし、癌細胞の増殖・浸潤などの病態進展を制御する時計遺伝子の分子機構は十分に解明されておらず、今後の重要な課題である。

## 2. 研究の目的

Differentiated embryonic chondrocyte gene 1 (DEC1, BHLHE40/Stra13/Sharp2) および DEC2 (BHLHE41/Sharp1) はいずれも bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子であり、当初は軟骨分化促進因子とし

て同定された。DEC1 および DEC2 は、時計中枢である視交差上核から末梢に至る全身の組織および細胞で、概日リズムを形成する時計遺伝子として機能する一方で、免疫応答系や種々の組織分化の制御、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る。

乳癌は、生活習慣の欧米化に伴い増加する癌の代表として注目されており、その約 90% は乳管から発生する。乳癌患者の約 30% では初診後 10 年以内に遠隔転移が認められ、転移を伴う患者の生存期間は約 3 年との報告がある。このため、乳癌細胞の増殖進展・抗アポトーシスの機序解明は、医学・医療における大きな課題である。パクリタキセル (paclitaxel) は、乳癌治療における代表的抗癌剤の 1 つであるが、癌細胞のアポトーシスとの関連性は十分に解明されていない。また、乳癌細胞における DEC1 および DEC2 の発現の意義も、未だ明らかにされていない。

本研究では、paclitaxel を投与してヒト乳癌細胞株 MCF-7 細胞における、DEC1 および DEC2 の細胞増殖や抗アポトーシスに関連した機能解析を目的とする。

## 3. 研究の方法

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 細胞を DMEM で培養して、抗癌剤 paclitaxel を濃度依存的 (10, 20, and 50  $\mu$ M) に 2h および 24h 処理し、アポトーシスを誘導した後、real-time PCR

及び Western blot によって、DEC1 と DEC2 の発現変化を検討した。また RNA 干渉法 (siRNA) により DEC1 または DEC2 の発現制御 (knockdown) を行い、アポトーシスに対する影響や、p53, Bcl-2 の発現変化について検討を行った。さらに、paclitaxel 処理による DEC1 と DEC2 の局在変化を免疫蛍光染色法により検討した。アポトーシスと DEC の直接効果を見るため、paclitaxel 処理と DEC1 または DEC2 siRNA の combination 処理による Hoechst 染色法で、アポトーシスを解析した。

#### 4. 研究成果

ヒト乳癌 MCF-7 細胞で、paclitaxel を 24h 処理することによりアポトーシス関連因子 (cleaved PARP, cleaved caspase-8, p53, Bcl-2) が誘導された。さらに、DEC1 および DEC2 の発現も上昇した。

MCF-7 細胞において DEC1 siRNA と paclitaxel の combination 処理により、アポトーシスが抑制し、p53 の発現が減少、Bcl-2 の発現が上昇した。一方、DEC2 siRNA と paclitaxel の combination 処理によって、アポトーシスが誘導され、p53 の発現が上昇した。

免疫蛍光染色法では、paclitaxel 処理により、DEC1 のタンパク質量が核内で上昇した。一方、DEC2 のタンパク質量は核および細胞質の両方で上昇した。

Paclitaxel と DEC1 siRNA の combination 処理では、アポトーシス (nuclear condensation) の頻度が減少した。一方、paclitaxel と DEC2 siRNA との combination 処理では、アポトーシスの頻度が上昇した。

#### 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 12 件)

1. Wu Y, Sato F, Yamada T, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Seino H, Morohashi S, Hakamada K, Abiko Y, Kato Y, Kijima H. The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. (査読あり) *Int J Oncol.* 41. pp1337-1346. 2012. doi:10.3892/ijo.2012.1559. [Epub ahead of print]
2. Sato F, Kawamura H, Wu Y, Sato H, Jin D, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Seino H, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. The basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 inhibits TGF- $\beta$ -induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells. (査読あり) *Int J Mol Med.* 2012;30(3):495-501. doi: 10.3892/ijmm.2012.1037. Epub 2012 Jun 19.
3. Wu Y, Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Seino H, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. BHLH transcription factor DEC2 regulates pro-apoptotic factor Bim in human oral cancer HSC-3 cells. (査読あり) *Biomed Res.* 2012;33(2):75-82.
4. Sato F, Sato H, Jin D, Bhawal UK, Wu Y, Noshiro M, Kawamoto T, Fujimoto K, Seino H, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. Smad3 and Snail show circadian expression in human gingival fibroblasts, human mesenchymal stem cell, and in mouse liver. *Biochem*

- Biophys Res Commun. (査読あり) 2012 Mar 9;419(2):441-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.076. Epub 2012 Feb 20.
5. Fukuda W, Morohashi S, Fukuda I. Intimal sarcoma of the pulmonary artery--diagnostic challenge. *Acta Cardiol.* (査読あり) 2011 Aug;66(4):539-41. Review.
  6. Kudo Y, Morohashi S, Takasugi K, Tsutsumi S, Ogasawara H, Hanabata N, Yoshimura T, Sato F, Fukuda S, Kijima H. Histopathological phenotypes of early gastric cancer and its background mucosa. *Biomed Res.* (査読あり) 2011 Apr;32(2):127-34.
  7. 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.* (査読あり) 2011 Jul;47(11):1747-58. doi: 10.1016/j.ejca.2011.02.025. Epub 2011 Apr 1.
  8. 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.* (査読あり) 2011 Jun 1;103(7):669-73. doi: 10.1002/jso.21880. Epub 2011 Feb 28.
  9. 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. (査読あり) *Int J MolMed.* 2011 ;27(4):491-495. doi: 10.3892/ijmm.2011.617. Epub 2011 Feb 14.
  10. 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.* (査読あり) 2010;10:548. doi: 10.1186/1471-2407-10-548.
  11. Jin H, Morohashi S, Sato F, Kudo Y, Akasaka H, Tsutsumi S, Ogasawara H, Miyamoto K, Wajima N, Kawasaki H, Hakamada K, Kijima H. Vimentin expression of esophageal squamous cell carcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis. *Biomed Res.* (査読あり) 2010;31(2):105-112.
  12. 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.* (査読あり) 2010;15(4):315-25. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01381.x. Epub 2010 Mar 4.

〔学会発表〕（計 7 件）

1. 諸橋 聡子, 異型濾胞上皮の結節性増生を示した Graves 病甲状腺の一例, 2011 年 11 月 18 日, 東京
2. 諸橋 聡子, ヒト乳癌細胞株 MCF-7 における bHLH 型転写因子 DEC2 のアポトーシス制御機構の解析, 日本乳癌学会, 2011 年, 2011 年 9 月 3 日, 仙台市
3. 諸橋 聡子, 肺動脈内膜肉腫の 1 剖検例, 日本病理学会, 2011 年 4 月 28 日, 横浜市
4. 諸橋 聡子, 診断が困難であった乳腺症型繊維腺腫の 1 例の病理学的検討, 臨床外科学会, 2010 年 11 月 21 日, 横浜市
5. 諸橋 聡子, 乳腺に発生した腺脂肪腫の 1 例, 日本乳癌学会, 2010 年 6 月 25 日 札幌市

〔図書〕（計 2 件）

1. 諸橋 聡子, 文光堂, 腫瘍病理鑑別診断アトラス 食道癌, 2012 年, pp59-66.
2. 諸橋 聡子, 文光堂, 腫瘍病理鑑別診断アトラス 大腸癌, 2011 年, pp112-125.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸橋聡子 (MOROHASHI SATOKO)  
弘前大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・  
助教  
研究者番号 : 90569592

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :