

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590386

研究課題名(和文) 膵・胆道癌の高悪性度形質を規定する時計遺伝子の機能

研究課題名(英文) Functional analysis of clock genes in highly aggressive pancreato-biliary cancer

研究代表者

鬼島 宏 (Kijima, Hiroshi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90204859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：難治性癌の代表である膵癌・胆道癌の病態には、癌細胞の上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)を伴う浸潤性増殖および脈管侵襲を介した転移が関与している。生物時計が制御する概日リズムの下で、癌細胞の浸潤性増殖や脈管侵襲を惹起する血管新生が行われる。つまり、時計遺伝子の発現に対応した癌細胞増殖・上皮間葉転換・腫瘍血管新生によって、膵・胆道癌における高悪性度形質が規定されている。

研究成果の概要(英文)：Pancreato-biliary cancer is one of the most aggressive malignancies of human. Its aggressive phenotypes are thought to be associated with invasive tumor growth via epithelial-mesenchymal transition (EMT), as well as vascular permeation via tumor angiogenesis. Clock genes regulate not only circadian rhythm (biological clock) of human bodies, but also tumor cell growth, EMT, and tumor angiogenesis of the pancreato-biliary cancer.

研究分野：医歯薬学

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 時計遺伝子 血管新生 遺伝子制御

1. 研究開始当初の背景

膵癌ならびに胆道癌は、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) 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、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。我々はこれまでに、膵・胆道癌を中心にヒトの癌における悪性形質とその制御を遺伝子レベルで行い、実績を上げてきた (Int J Oncol 24: 559-564, 2004; Cancer Cell 2: 289-300, 2002)。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 (vascular endothelial growth factor, VEGF) が関与する腫瘍血管新生の解析も行ってきた (Int J Oncol 26: 1517-1524, 2005)。しかし、膵・胆道癌における高悪性度の病態は、十分に解明されたとはいえない。
- (2) 生物の生理機能・代謝・行動は、脳の視床下部 (視交叉上核) で駆動されている中枢性の生物時計が刻む約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 遺伝子 (DEC1 および DEC2) が時計遺伝子ファミリーに属することを解明し、さらに変異型 DEC 遺伝子を用いて時計遺伝子のフィードバック機構について明らかにするなど、DEC 遺伝子解析に関しては世界に先駆けた研究を行い、評価を受けている (Int J Mol Med 17: 1053-1056, 2006; Eur J Biochem 271, 4409-4419, 2004; Nature 419, 841-844, 2002)。さらに我々は、DEC が概日リズム (生物時計) の調節に加えて、血管新生・アポトーシス制御や腫瘍細胞増殖などの病態機序と関連していることを報告している (Genes Cells 15: 315-325, 2010; Genes Cells 13: 131-144, 2008)。

2. 研究の目的

膵・胆道癌の浸潤性増殖と腫瘍血管新生に関わる時計遺伝子の重要性を個体レベルで証明する。

- (1) ヒト膵・胆道癌の細胞株を用いて、培養細胞レベルおよび個体レベルで、時計遺伝子発現の意義を解明する。このために、培養細胞レベルでは高濃度血清刺激による細胞同調を用い、マウスモデル系では概日リズム下飼育により、ヒト膵・胆

道癌細胞の高悪性度形質に関わる時計遺伝子の発現解析を行う。対象とする時計遺伝子は、我々が機能解析を行った DEC 遺伝子にとどまらず、CLOCK, BMAL, PER, CRY などの時計遺伝子も含む。

- (2) 時計遺伝子の制御下での膵・胆道癌の増殖機構を明らかにするため、概日リズム環境における (a) 時計遺伝子タンパク質発現と、細胞増殖因子・血管新生因子との相互作用を探索し、(b) 培養細胞における時計遺伝子と浸潤性増殖・上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) との関連を解析する。

3. 研究の方法

ヒト膵・胆道癌の培養細胞株を用い、培養細胞レベルおよびマウス個体レベルで、時計遺伝子発現に対応した腫瘍増殖機序を解析する。(1) 培養細胞レベルでは、概日リズム下における癌細胞の上皮間葉転換・浸潤性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/HIF-1 を中心に分子生物学的に解析する。(2) マウスモデルを用いた個体レベルでは、上皮間葉転換を伴う浸潤性増殖・腫瘍間質反応および血管新生を組織学的に定量化、概日リズム下における癌細胞の増殖・浸潤機構を明らかにする。

- (1) 概日リズム下での癌細胞の増殖・上皮間葉転換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、概日リズムを誘導させる。各種の時計遺伝子の概日リズム発現の変動を、リアルタイムPCR、ウエスタン・プロット法で解析する。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、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、細胞増殖能を MTS assay で比較する。癌細胞の上皮間葉転換については、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) との共培養、ないしは collagen coated dish, fibronectin coated dish での培養で検討する。癌細胞の浸潤能は、Matrigel-Invasion assay にて比較する。
- (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、DEC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時間まで行い、その後CLOCKとBMALの抗体で免疫沈降し、細胞から回収したDNAを精製し、VEGFのprimerを用いて、以下の目的のためPCRを行う。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。VEGFと同様にHIF (hypoxia-inducible factor)-1 遺伝子でも行う。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/HIF-1 遺伝子発現とCLOCK, BMAL, DEC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) 概日リズム下で飼育したヌードマウスの移植腫瘍における時計遺伝子：個体レベルの概日リズム解析では、同調因子として明暗条件下で光刺激を用いる。ヌードマウス移植腫瘍(ヒト膵・胆道癌の培養細胞株および異種移植株のヌードマウス皮下への移植腫瘍)を、明暗条件下で飼育し、光刺激してから時間依存的(4時間ごとに48時間まで)に、ヌードマウス移植腫瘍から腫瘍部組織およびその周辺の非腫瘍性組織における時計遺伝子のリズム発現の変動を、リアルタイムPCR、ウエスタン・プロット法で用いて解析し、個体レベルで、腫瘍部位における時計遺伝子発現の意義を明らかにする。上皮間葉転換を伴う浸潤性増殖・腫瘍間質反応および血管新生を組織学的に定量化して解析する。さらに、メンブレンチャンバーを介して移植腫瘍の血管新生を顕微鏡モニター下で経時的に観察する。
- (4) 抗腫瘍性サイトカインが時計遺伝子発現・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。さらに概日リズム下での抗腫瘍性サイトカイン投与による効果を、癌細胞の増殖能はMTS assay、上皮間葉転換にはhMSC 共培養、浸潤能はMatrigel-Invasion assayで検討する。
- (5) ヌードマウス転移モデルにおける時計

遺伝子と腫瘍血管新生の関連解析：個体レベルにおける概日リズムは、同調因子として明暗条件下での光刺激を用いる。ヌードマウス膵・胆道領域に、膵・胆道癌細胞を移植し、肝転移モデルを作成する。転移成立後、時間依存的(4時間ごとに48時間まで)に、ヌードマウス移植腫瘍から腫瘍部位およびその周辺の正常部位をとりだし、組織学的な腫瘍血管新生と時計遺伝子のリズム発現の変動とを解析する。経時的な腫瘍血管新生と時計遺伝子発現との関連を解析することで、個体レベルでの腫瘍部位における時計遺伝子制御による腫瘍血管新生を明らかにする。

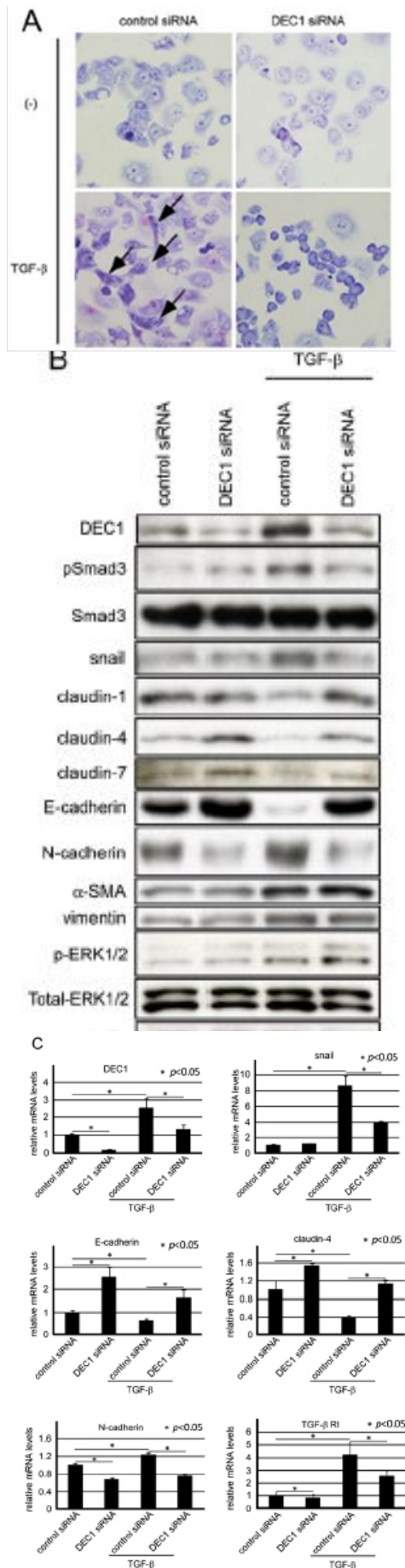
4. 研究成果

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癌細胞の浸潤性増殖・上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)との関連が証明された。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。
- (2) 上皮間葉転換を制御する時計遺伝子：時計遺伝子(DEC, PERなど)発現の多寡により、癌細胞の上皮間葉転換が制御されることが解明された。特にPANC-1膵癌細胞では、DEC1発現と、TGF-により誘導される上皮間葉転換(phosphorylated Smad3, snail, claudin-4, N-cadherin発現上昇)とが関連していることが解明された。
- (3) 細胞内シグナル伝達系を制御する時計遺伝子：癌細胞に時計遺伝子標的siRNAを投与することで、細胞内シグナル伝達系(phosphorylated Smad3など)介した上皮間葉転換が抑制された。つまり、時計遺伝子が上皮間葉転換を介して、癌細胞の浸潤性増殖を制御していることが明らかにされた。
- (4) 時計遺伝子による上皮間葉転換の誘導と細胞形質への影響：DEC1発現とTGF-を同時に導入することにより、細胞増殖のみならず細胞浸潤能が大きく変化した。この細胞浸潤能などの癌細胞形質にも、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25件:全て査読有り)

- Hiratsuka S, Ishibashi S, Tomita T, Watanabe A, Akashi-Takamura S, Murakami M, Kijima H, Miyake K, Aburatani H, Maru Y. Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci. *Nat Commun.* 2013; 4: 1853.
- Yonaiyama S, Toyoki Y, Morohashi S, Sakuraba S, Yoshizawa T, Suzuki T, Wu Y, Kijima H, Hakamada K. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression is correlated with malignant potentials of intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) of the pancreas. *Biomed Res.* 2013; 34: 87-95.
- Kondo J, Sato F, Wu Y, Seino H, Morohashi S, Kijima H. Claudin-1 is associated with invasive growth of human pancreatic cancer. *Hirosaki Med J.* 2012; 63: 127-135.
- Masuda R, Kijima H, Imamura N, Aruga N, Nakazato K, Oiwa K, Nakano T, Watanabe H, Ikoma Y, Tanaka M, Inokuchi S, Iwazaki M. Laminin-5γ2 chain expression is associated with tumor cell invasiveness and prognosis of lung squamous cell carcinoma. *Biomed Res.* 2012; 33: 309-317.
- Ito E, Ozawa S, Kijima H, Kazuno A, Miyako H, Nishi T, Chino O, Shimada H, Tanaka M, Inoue S, Inokuchi S, Makuuchi H. Clinicopathological significance of laminin-5γ2 chain expression in superficial esophageal cancer. *Dis Esophagus.* 2012 Sep 14. [Epub ahead of print]
- Masuda R, Kijima H, Imamura N, Aruga N, Nakamura Y, Masuda D, Takeichi H, Kato N, Nakagawa T, Tanaka M, Inokuchi S, Iwazaki M. Tumor budding is a significant indicator of a poor prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. *Mol Med Report.* 2012; 6: 937-943.
- Okada K, Kijima H, Imaizumi T, Hirabayashi K, Matsuyama M, Yazawa N, Dowaki S, Tobita K, Ohtani Y, Tanaka M, Inokuchi S, Makuuchi H. Clinical significance of wall invasion pattern of subserosa-invasive gallbladder carcinoma. *Oncol Rep.* 2012; 28: 1531-1536.

8. 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. *Int J Oncol.* 2012; 41: 1337-1346.
9. Ono M, [Kijima H](#), Seino H, Hakamada K, Igarashi Y. Expression of cytokeratin 348E12 is a good indicator of tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomed Res.* 2012; 33: 183-189.
10. Ito E, Ozawa S, [Kijima H](#), Kazuno A, Nishi T, Chino O, Shimada H, Tanaka M, Inoue S, Inokuchi S, Makuuchi H. New invasive patterns as a prognostic factor for superficial esophageal cancer. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 1279-1289.
11. [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- β -induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells. *Int J Mol Med.* 2012; 30: 495-501.
12. 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. *Biomed Res.* 2012; 33:75-82.
13. [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.* 2012; 419: 441-446.
14. Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R, Itoh J, Ishiguro A, [Kijima H](#), Mimura J, Itoh K, Fukuda S, Saijo Y. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2012; 12: 66.
15. Washiya K, Kanno T, Tone K, Kojima K, [Kijima H](#), Watanabe J. Three-dimensional nuclear luminance analysis in well-differentiated adenocarcinoma of the lung. *Acta Cytol.* 2011; 55: 350-356.
16. Ohshika S, Ishibashi Y, Kon A, Kusumi T, [Kijima H](#), Toh S. Potential of exogenous cartilage proteoglycan as a new material for cartilage regeneration. *Int Orthop.* 2012; 36: 869-877.
17. Washiya K, Sato T, Miura T, Tone K, Kojima K, Watanabe J, [Kijima H](#). Cytological difference between benignity and malignancy in suspicious cases employing urine cytodiagnosis using a liquid-based method. *Anal Quant Cytol Histol.* 2011; 33: 169-174.
18. Kubo N, Narumi S, [Kijima H](#), Mizukami H, Yagihashi S, Hakamada K, Nakane A. Efficacy of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Fulminant Hepatitis in Mice Induced by Concanavalin A. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jun 7. [Epub ahead of print]
19. 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.* 2011; 32: 127-134.
20. Bhawal UK, Sato F, Arakawa Y, Fujimoto K, Kawamoto T, Tanimoto K, Ito Y, Sasahira T, Sakurai T, Kobayashi M, Kashima I, [Kijima H](#), Kuniyasu H, Abiko Y, Kato Y, Sato S. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates cyclin D1. *J Pathol.* 2011; 224: 420-429.
21. [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; 47: 1747-1758.
22. 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; 17: 579-587.
23. 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.
24. 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.

25. Imaizumi T, Sato F, Tanaka H,
Matsumiya T, Yoshida H,
Yashiro-Aizawa T, Tsuruga K, Hayakari
R, Kijima H, Satoh K.
Basic-helix-loop-helix transcription
factor DEC2 constitutes negative
feedback loop in IFN- β -mediated
inflammatory responses in human
mesangial cells. Immunol Lett. 2011;
136: 37-43.

〔学会発表〕(計10件)

1. 鬼島 宏、吉澤忠司、呉 雲燕、羽賀敏博、清野浩子、諸橋聡子。胆嚢の前癌病変・早期癌の病理。(ワークショップ：膵臓・胆道癌の発癌機構と病理診断の展望)第102回日本病理学会総会。2013年6月6日(札幌)
2. 呉 雲燕、清野浩子、鈴木貴弘、諸橋聡子、吉澤忠司、加藤幸夫、鬼島 宏。bHLH transcription factor DEC2 inhibits TGF- β -induced tumor progression in BxPX-3 cells. 第102回日本病理学会総会。2013年6月6日(札幌)。
3. 羽賀敏博、吉澤忠司、諸橋聡子、呉 雲燕、清野浩子、鬼島 宏。胆嚢の前癌病変および早期病変に関する病理形態学的解析。第102回日本病理学会総会。2013年6月8日(札幌)。
4. Kijima H, Wu Y, Yoshizawa T, Suzuki T, Haga T, Seino H, Morohashi S. Pathological characteristics of early to advanced gallbladder carcinoma and extrahepatic cholangiocarcinoma. International Symposium on Cholangiocarcinoma. 2013年2月9日(東京)。
5. 鬼島 宏。腫瘍における血管新生因子の発現調節。(レクチャー3)第9回日本病理学会カンファレンス。2012年8月3日(山口)。
6. Wu Y, Seino H, Morohashi S, Yoshizawa T, Kato Y, Kijima H. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 negatively regulates pro-apoptotic factor Bim in cisplatin-treated human oral cancer cells. 第9回日本病理学会カンファレンス。2012年8月3日(山口)。
7. Suzuki T, Wu Y, Seino H, Morohashi S, Yoshizawa T, Haga T, Kato Y, Kijima H. PERIOD is involved in

the proliferation of human
pancreatic MIA-PaCa2 cancer cells.
第9回日本病理学会カンファレンス。
2012年8月3日(山口)。

8. Wu Y, Sato F, Tugeno Y, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. DEC1 has pro-apoptotic, and DEC2 has anti-apoptotic effects in paclitaxel-treated MCF-7 cells. 第8回日本病理学会カンファレンス。2012年8月5日(松本)。
9. 佐藤冬樹、赤坂治枝、諸橋聡子、呉 雲燕、鬼島 宏。Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated breast cancer MCF-7 cells. 第100回日本病理学会総会。2011年4月28日(横浜)。
10. 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。2011年4月28日(横浜)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔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