

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791265

研究課題名(和文) 扁平上皮癌の発育進展および放射線感受性に関する時計遺伝子DECの機能

研究課題名(英文) Differentiated embryonic chondrocyte expressed gene regulates carcinogenesis and apoptotic pathway of squamous cell carcinoma.

研究代表者

清野 浩子 (Seino, Hiroko)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助手

研究者番号：30598727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：時計遺伝子DECは生体内で多彩な生理現象に関与する。DEC1はヒト扁平上皮癌手術標本で非腫瘍部と比較して高発現し、ヒト癌細胞において概日リズムを形成し細胞周期へ関与する。アポトーシスに関しては、HSC-3でDEC2がアポトーシス抑制作用を示し、DEC1はアポトーシス作用を示さなかったが、TE-10ではDEC1がアポトーシス促進作用を示し、DEC2はアポトーシス作用を示さなかった。TE-5やCA9-22ではDEC1・DEC2ともにアポトーシス作用を認めなかった。DECがヒト癌細胞の発育進展機能に重要な役割を果たしていることは明らかだが、アポトーシス作用は、細胞株によって異なる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Differentiated embryonic chondrocyte expressed gene 1 (DEC1; BHLHE40/Stra13/Sharp2) and differentiated embryonic chondrocyte expressed gene 2 (DEC2; BHLHE41/Sharp1) are basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional factors that are involved in the regulation of cell differentiation, circadian rhythms, response to hypoxia and carcinogenesis. DEC1 is overexpressed in various tumor regions. High levels of DEC1 mRNA are also detected in an array of cancer cell lines. We reported that DEC1 has pro-apoptotic effects, whereas DEC2 has no apoptotic effect on human esophageal cancer TE10 cells. DEC2 has anti-apoptotic effects, whereas DEC1 has no apoptotic effect on human oral cancer HSC-3 cells. DEC1 and DEC2 have no apoptotic effect in TE5 and CA9-22. These different apoptotic effects of DEC1 and DEC2 may depend on the differences of cell lines and/or gene expression. However, the mechanism of DEC in tumor apoptotic pathway is poorly understood, so further studies are needed.

研究分野：放射線学

キーワード：時計遺伝子 DEC 扁平上皮癌

## 1. 研究開始当初の背景

癌の増殖が時計遺伝子 (Clock genes, およそ 24 時間周期で振幅発現する遺伝子) 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、日内時刻を考慮した癌治療による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た。今後は、これらの医療への応用が期待されている。

ところで、扁平上皮癌は、日本においても罹患率・死亡率の高い癌の一つであるが、扁平上皮癌の日内リズム、時計遺伝子を考慮した研究は未だ少ない。また、癌細胞の増殖・進展などの病態進展を制御する時計遺伝子の分子機構も十分に解明されておらず、これらの解明は、時計遺伝子をがん治療 (放射線治療・抗癌剤治療等) に応用する上で重要な課題である。

## 2. 研究の目的

Differentiated embryonic chondrocyte gene (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。DEC 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。申請者は DEC が扁平上皮癌の増殖・浸潤および腫瘍血管新生の日内リズムを調節する因子として機能していると予想している。本研究では、時計遺伝子 DEC 高発現細胞、DEC ノックダウン細胞を用いて、扁平上皮癌の増殖・浸潤・アポトーシスに関わる日内リズムの分子機構を解析する。また、時計遺伝子の発現が癌細胞のアポトーシスに及ぼす影響を解析する。本研究で得られる成果は日内リズム制御下のもとで、扁平上皮癌の増殖・浸潤や抗癌剤や放射線への感

受性が制御されるという、新たな癌の進展機構の解明に繋がる。また、時計遺伝子を制御することで癌治療への感受性が増加し、従来よりも低濃度・低線量で同じ抗腫瘍効果が得られた場合は、扁平上皮癌以外の癌に対する効果的な癌治療への展開が期待される。

## 3. 研究の方法

培養細胞における日内リズムの解析は、同調因子として (50%) 血清刺激を用いる。ヒト扁平上皮癌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、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 を精製し、リアルタイム PCR で、タンパク質はウェスタンブロット法で時計遺伝子のリズム発現の変動を解析する。扁平上皮癌細胞株で、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、増殖能の比較を MTT-assay で比較する。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策として試薬の組み合わせ、およ比的配列の選択を当研究室では導入済みである。

ヒト扁平上皮癌組織における時計遺伝子の解析については、ヒト口腔癌組織は、当大学病院にて手術にて得られた外科切除標本を用いる。時計遺伝子の抗体を用いた免疫染色を施行し、放射線治療前と、治療後の標本における時計遺伝子の発現の解析を行う。

時計遺伝子発現が癌治療に及ぼす影響については、RNA 干渉法による時計遺伝子の特異的抑制により行い、扁平上皮癌における抗癌剤 cisplatin や放射線感受性の影響を、ヒト扁平上皮癌細胞の細胞増殖やアポトーシスについて解析する。

#### 4 . 研究成果

我々は、ヒト扁平上皮癌手術例標本において、DEC1 が、非腫瘍部と比較して高発現していることを免疫染色において示した。また、Invasion assay や Migration assay を用いて、ヒト癌細胞において、DEC1 が概日リズムを形成する知見も得た。これらの結果から、時計遺伝子である DEC1 がヒト癌細胞・ヒト組織の発育進展機能に重要な役割を果たしていることが示された。

次に、ヒト扁平上皮癌細胞株における DEC1 と DEC2 の発現・機能を、分子生物学的手法を用いて解析した。用いた細胞株は、分化度の異なるヒト食道扁平上皮癌細胞株 (TE-10 と TE-5) とヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3 と CA9-22) である。我々は、2 種類の食道癌細胞株に対し、DEC1 knockdown を行い 24 時間後にタンパクを回収しウェスタンブロットで確認したところ、DEC1 が cyclin D1 を制御していることが判明した。同様の結果は、舌癌細胞株 (HSC-3) においても認められた。これらの結果から、DEC1 が cyclin D1 を制御して、ヒト扁平上皮癌の概日リズムを制御していることが示唆された。さらに、これら 4 種類のヒト扁平上皮癌細胞株に対し DEC1 knockdown あるいは overexpression を行い、DEC1 がアポトーシスに及ぼす影響を検討した。この結果、HSC-3 では DEC2 はアポトーシス抑制性に働くのに対し、DEC1 は明らかなアポトーシス作用を示さないことが判明した。TE-10 では DEC1 はアポトーシス促進性に働くのに対し、DEC2 では明らかなアポトーシス作用は認められなかった。一方、TE-5 や CA9-22 では DEC1・DEC2 ともに明らかなアポトーシス作用は認められなかった。以上の結果から、癌細胞における DEC1・DEC2 のアポトーシス作用に関しては、分化度や遺伝的な違い、DEC1 と

DEC2 の構造の違いが起因する可能性が考察された。

#### 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 11 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 transcription of pancreatic cancer. (査読あり) *Int J Oncol.* 2012 Oct;41(4):1337-46. doi: 10.3892/ijo.2012.1559. Epub 2012 Jul 18.
2. 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 Apr;33(2):75-82.
3. 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. (査読あり) *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Mar 9;419(2):441-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.076. Epub 2012 Feb 20.
4. Ono M, Kijima H, Seino H, Hakamada K, Igarashi Y. Expression of

- cytokeratin 34E12 is a good indicator of tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomed Res.* 2012 Jun;33(3):183-9.
5. Seino H, Ono S, Miura H, Morohashi S, Wu Y, Tsushima F, Takai Y, Kijima H. Incidental prostate <sup>18</sup>F-FDG uptake without calcification indicates the possibility of prostate cancer. ( 査読あり ) *Oncol Rep.* 2014 Apr;31(4):1517-22. doi: 10.3892/or.2014.3011. Epub 2014 Feb 4.
  6. Kijima H, Wu Y, Yosizawa T, Suzuki T, Tsugeno Y, Haga T, Seino H, Morohashi S, Hakamada K. Pathological characteristics of early to advanced gallbladder carcinoma and extrahepatic cholangiocarcinoma. ( 査読あり ) *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014 Jul;21(7):453-8. doi: 10.1002/jhbp.72. Epub 2014 Mar 3.
  7. Yoshizawa T, Toyoki Y, Hirai H, Haga T, Toba T, Sakuraba S, Okano K, Wu Y, Seino H, Morohashi S, Hakamada K, Kijima H. Invasive micropapillary carcinoma of the extrahepatic bile duct and its malignant potential. ( 査読あり ) *Oncol Rep.* 2014 Oct;32(4):1355-61. doi: 10.3892/or.2014.3394. Epub 2014 Aug
  8. Miura H, Ono S, Shibutani K, Seino H, Tsushima F, Kakehata S, Hirose K, Fujita H, Kakuta A, Aoki M, Hatayma Y, Kawaguchi H, Sato M, Takai Y, Kaneko T, Sawamura D. Contribution of dynamic sentinel lymphoscintigraphy images to the diagnosis of patients with malignant skin neoplasms in the upper and lower extremities. *Springerplus.* ( 査読あり ) 2014 Oct 22;3:625. doi: 10.1186/2193-1801-3-625. eCollection 2014.
  9. Wu Y, Sato H, Suzuki T, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino H, Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Kijima H. Int J Mol Med. Involvement of c-Myc in the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells induced by bHLH transcription factor DEC2. ( 査読あり ) *2015 Mar;35(3):815-20.* doi: 10.3892/ijmm.2014.2042. Epub 2014 Dec 17.
  10. Kijima H, Haga T, Wu Y, Seino H, Hakamada K. Molecular pathology and carcinogenesis of biliary cancer. *Nihon Rinsho.* 2015 Mar;73 Suppl 3:449-53. Japanese. No abstract available.
  11. Seino H, Wu Y, Morohashi S, Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Takai Y, Kijima H. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 regulates the cisplatin-induced apoptotic pathway of human esophageal cancer cells. ( 査読あり ) *Biomed Res.* 2015;36(2):89-96. doi: 10.2220/biomedres.36.89.
- [学会発表](計 4 件)
1. Yunyan Wu, Hiroko Seino, Satoko Morohashi, Tadashi Yoshizawa, Yukio Kato, Hiroshi Kijima. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 negatively regulates pro-apoptotic factor Bim in cisplatin-treated human oral cancer cells. 2012年8月3日, 山口市
  2. Takahiro Suzuki, Yunyan Wu, Hiroko Seino, Satoko Morohashi, Toshihiro Haga, Yukio Kato, Hiroshi Kijima.

PERIOD is involved in the proliferation of human pancreatic MIA-PaCa2 cancer cells. 2012年8月3日, 山口市

3. Yunyan Wu, Hiroko Seino, Takahiro Suzuki, Satoko Morohashi, Tadashi Yoshizawa, Yukio Kato, Hiroshi Kijima. BHLH transcription factor DEC2 inhibits TGF- $\beta$ -induced tumor progression in BxPC-cells. 2013年6月6日~8日, 札幌市
4. Seino H, Ono S, Miura H, Shibutani K, Tsushima F, Kakehata S, Kakuta A, Fujita H, Takai Y, Morohashi S, Wu Y, and Kijima H. An examination of F-18 FDG PET/CT scans in thecoma fibroma group – What is a cause of false-positive? 第73回日本医学放射線学会総会 2014年4月10日~13日 横浜市

〔図書〕(計 1 件)

1. 清野浩子, 小野修一, 三浦弘行, 澁谷剛一, 対馬史泰, 掛端伸也, 角田晃久, 高井良尋 「舌下神経麻痺を来した特発性好酸球症の一例」 臨床放射線 58(8): 1103-1109, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

清野 浩子 (SEINO HIROKO)  
弘前大学・医学(系)研究科(研究室)  
研究者番号: 30598727

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: