

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11274

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の悪性度を規定する転写因子DEC-Twist分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of DEC-Twist transcription factors in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

Bhawal Ujjal (BHAWAL, Ujjal)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：5043339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DEC1強制発現によるTwist1転写制御機構の解析を行った。プロモーターはE-boxを含むTwist1プロモーターを使用した。DEC1発現プラスミドは濃度依存的にTwist1転写活性を抑制した。E-boxに変異を作製し、ルシフェラーゼレポーターアッセイでDEC1強制発現によっても、Twist1転写活性に影響を受けなかった。DEC1およびTwist1の発現をウエスタンブロットイング法で明らかにした。さらに、クロマチン免疫沈降アッセイを用いてDEC1がTwist1のE-boxに影響を及ぼすか調べた。DEC1強制発現によりTwist1のprecipitateする量が増加した。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed Twist1 transcriptional regulatory mechanism by forced expression of DEC1 using Luciferase reporter assay. Twist1 promoter including E-box was used. Twist1 transcriptional activity was gradually suppressed with DEC1 expression plasmid in a concentration-dependent manner. Mutation in the E-box did not affect Twist1 transcriptional activity. Protein expression of Twist1 and DEC1 was evaluated using Western blotting. Furthermore, we have investigated the binding of DEC1 with the E-box of Twist1 using Chromatin immunoprecipitation (ChIP assay). Compared with the control, the precipitate amount of Twist1 was increased due to forced expression of DEC1. In addition, the amount of precipitating Twist1 was suppressed by introducing DEC1 siRNA into cancer cells using the ChIP assay.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔扁平上皮癌 転写因子 DEC1 Twist1

## 1. 研究開始当初の背景

Basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子である DEC1 および DEC2 は、細胞分化や概日リズム調節に関与する時計遺伝子であると同時に、低酸素応答、細胞周期、細胞増殖、アポトーシスおよび癌化にも関与している。一方、EMT は、上皮細胞が間葉系細胞様に形態変化する現象で、EMT の獲得は細胞の運動性・浸潤性を促進することから、癌細胞の浸潤・転移に関与することが示唆される。我々はすでに DEC1 が TGF- $\beta$  を介した膀胱癌の EMT 機構に影響を及ぼし、癌細胞の増殖能を抑制することを報告した (Wu Y, Sato F, Bhawal UK *et al. International Journal of Oncology* 2012; 41: 1337-1346)。また、DEC2 のプロモーター領域の上流にある smad binding element (SBE) に TGF- $\beta$  によって活性化した Smad3 が結合し転写を亢進し、誘導された DEC2 が間葉系マーカーの Slug の遺伝子上の E-box と結合することで、Slug 発現を抑制することにより、ヒトの膀胱癌の進行を抑制することを。( Sato F, Bhawal UK *et al. International Journal of Molecular Medicine* 2012; 30: 495-501 )。

一方、間葉系マーカーの Twist は bHLH 型転写因子で、Seathre-Chotzen syndrome の原因遺伝子として知られている。Weinberg らは乳癌細胞から高頻度に肺転移する細胞をクローン化し、マウスの肺転移巣における Twist の特異的発現上昇を明らかにした (*Cell* 2004; 117: 927-939)。そこで、申請者は癌増殖抑制の観点から、Twist の転写を DEC1 と DEC2 が、負に制御することを想定し、DEC を介した Twist の発現制御機構の解明を目指して基礎的研究を行った。すなわち、Twist 上流にある E-box を含む Twist プロモーターレポーターを作製し、DEC1 および DEC2 発現ベクターと co-transfection を行い Twist の活性化を検討した結果、DEC1 および DEC2 が Twist の活性を制御するという予備的なデータを得た。まず、口腔扁平上皮癌組織に比べ癌転移組織では、DEC1 および DEC2 の発現

が、低下していることを明らかにした。それに関連して、DEC1KO (ノックアウト) および DEC2KO (ノックアウト) マウスにマウスメラノーマ B16 細胞を移植して癌転移モデルを作製し、DEC1KO や DEC2KO マウスにおいて Twist の発現が増加し、DEC1 および DEC2 が癌転移を制御抑制する候補となる可能性を示唆するデータも得ている。

また、ヒト歯肉線維芽細胞および間葉系幹細胞で、DEC1, DEC2, Snail, および Smad3 が概日リズムを示すこと (Sato F, Bhawal UK *et al. Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 419: 441-446)、さらに、C57BL/6 マウス肝で、DEC と Twist が、概日リズムを示し、逆相関しているデータも得ている。以上のことより、口腔癌組織でも、DEC と Twist は、逆相関のリズムを有し、DEC が、Twist を負に制御していることが予想された為、口腔癌の発生進展に関わる DEC-Twist 機構の解明研究を立案した。

## 2. 研究の目的

転写因子である Differentiated embryonic chondrocyte (DEC) 1 と DEC2 は、全身に発現しており、様々な生理現象に関与することが報告されている。申請者は、これまでに、癌の発育進展過程における DEC の分子機能の解析およびその重要性を報告している。一方、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行) の獲得が運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、癌細胞の浸潤や線維症との関連も示唆されている。本研究では、口腔扁平上皮癌の発育進展に関わる DEC と EMT のマーカーである Twist の機構に焦点を置き、新たな口腔癌の進展機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

1. DEC1 および DEC2 による Twist 制御機構の解明

(1) ルシフェラーゼアッセイ

Twist プロモーターレポーター上の E-box

mutant を作製し、DEC1 および DEC2 発現ベクターと co-transfection を行い、ルシフェラーゼアッセイにより Twist プロモーターの活性化を比較して、応答配列を同定する。リアルタイム RT-PCR 法および Western blot 法により、トランスフェクションの 24 時間後に DEC1 および DEC2 の発現を確認する。

#### (2) クロマチン免疫沈降法(ChIP)による転写因子結合の解析

ChIP を用いて DEC1 および DEC2 の Twist の E-box に対する直接結合の有無を調べる。これらの結果より DEC1 および DEC2 が E-box を介して Twist の発現を制御していることを明らかにする。

#### (3) ヒト口腔扁平上皮癌組織を用いた DEC1、DEC2、および Twist の発現の解析

ヒト口腔癌組織における DEC1、DEC2、および Twist の発現を免疫染色法により明らかにする。

#### 2. 実験的癌転移モデルの作成および癌細胞の解析

(1) C57BL/6 マウス、DEC1KO、DEC2KO および DEC1/DEC2 double KO マウス、4 週間後のものに B16 メラノーマ細胞 (約  $1 \times 10^6$  cells) を腹部の皮下組織に 18G のエラストナー針を用いて注入し移植する。経時的にマウスを安楽死させ、メラノーマ組織および肺を摘出する。メラノーマ組織ホモジネート上清中に含まれるタンパクを測定し、DEC1、DEC2 および Twist の発現を免疫染色法、Western blot 法による明らかにする。

(2) メラノーマ感染マウスの脾臓内における NK 細胞の動態(CD3-NK1.1+)、活性化マーカー(NKp46)、ケモカイン、ケモカインレセプター、サイトカインの発現について、免疫組織染色(共焦点顕微鏡、現有)、フローサイトメトリー法(現有)により解析を行う。

#### 3. Twist の概日リズム解析、DEC1 と DEC2 のダブルノックアウトマウス(DEC1/DEC2 double KO マウス)の病態解析

(1) 6 週齢の C57BL/6 および DEC1KO、DEC2KO、および DEC1/DEC2 double KO マウ

スを明暗条件下で飼育し、4 時間おきに脳、肝、心、腎をそれぞれ摘出し、リアルタイム RT-PCR 法、Western blot 法、免疫染色法にて、DEC1、DEC2、および Twist のリズムの変化を解析する。

#### 4. 研究成果

Luciferase assay で DEC1 強制発現による Twist1 転写制御機構の解析を行った。Promoter は E-box を含む Twist1 promoter を使用した。DEC1 発現 plasmid は濃度依存的に Twist1 転写活性を抑制した。また、E-box に mutation を作製し、luciferase assay で DEC1 強制発現によっても、Twist1 転写活性に影響を受けなかった。DEC1 および Twist1 の発現を Western blot 法で明らかにした。さらに、ChIP assay を用いて DEC1 が Twist1 の E-box に影響を及ぼすか調べた。コントロールと比べ、DEC1 強制発現により Twist1 の precipitate する量が増加した。また、ChIP assay を用いて癌細胞に DEC1 siRNA 導入することによって Twist1 の precipitate する量が抑制した。

#### 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 10 件)

1. Sato F, Kohsaka A, Bhawal UK, Muragaki Y. Potential roles of Dec and Bmal1 genes in interconnecting circadian clock and energy metabolism. International Journal of Molecular Sciences 2018; 19(3). 査読有り
2. Kim IS, Zhang F, Bhawal UK. The role of the hypoxia responsive gene DEC1 in periodontal inflammation. Journal of Hard Tissue Biology 2018 査読有り
3. Arikawa K, Zhang F, Taguchi C, Bhawal UK. Circadian expression of differentiated embryonic chondrocytes expressed genes 1 and 2 in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells. International Journal of Oral-Medical Sciences 2018 査

読有り

4. Nakayama R, Arikawa K, Bhawal UK. The epigenetic regulation of CXCL14 plays a role in the pathobiology of oral cancers. *Journal of Cancer* 2017; 8(15): 3014-3027. 査読有り
5. Ujjal K, Bhawal, 吉田清美, 荒川浩久. フッ化物の新たな視点 - 歯周病予防に関する研究の進展 - . *歯界展望* 2017; 130(6): 1031-1034. 査読有り
6. Fukuoka CY, Simões A, Uchiyama T, Arana-Chavez VE, Abiko Y, Kuboyama N, Bhawal UK. The effects of low-power laser irradiation on inflammation and apoptosis in submandibular glands of diabetes-induced rats. *PLoS One* 2017;12(1): e0169443. 査読有り
7. Kurita-Ochiai T, Hashizume-Takizawa T, Kobayashi R, Bhawal UK, Hosono A, Kinukawa N, Oguchi S. *Porphyromonas gingivalis* promotes low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Journal of Oral Biosciences* 2016; 59: 44-49. 査読有り
8. Bhawal UK, Uchida R, Kuboyama N, Asakura T, Hiratsuka K, Nishiyama N. Effect of the surface morphology of silk fibroin scaffolds for bone regeneration. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2016; 27(4): 413-424. 査読有り
9. Fujita Y, Makishima M, Bhawal UK. Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) is a novel negative regulator of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21) in aging mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016; 469(3): 477-482. 査読有り
10. Sato F, Bhawal UK, Yoshimura T, Muragaki Y. DEC1 and DEC2 crosstalk between circadian rhythm and tumor progression. *Journal of Cancer* 2016; 7(2): 153-159. 査読有り

〔学会発表〕(計 23 件)

1. Sato F, Bhawal UK, Oikawa K, Muragaki Y. BHLH transcription factors DEC1 and DEC2 crosstalk between circadian rhythm and tumor progression. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 6 日、神戸ポートアイランド、神戸
2. Bhawal UK. Low level fluoride stimulates epithelial-mesenchymal interaction in oral mucosa. 8th AADT Conference, 2017 年 11 月 17 日, Bangkok, Thailand
3. Bhawal UK. Involvement of microRNA-153 in Korean red ginseng-treated kanamycin-induced hearing loss by targeting forkhead box O1. Korean Society of Ginseng 2017, 2017 年 9 月 26 日, Daejeon, Korea
4. パワール ウジャール, 有川 量崇, 内山 敏一, 平塚 浩一, 久保山 昇, 渋谷 鑛. 低出力レーザー照射による STZ 誘発糖尿病ラットの AGE-RAGE 系に及ぼす影響、第 17 回日本大学口腔科学会、2017 年 9 月 3 日、松戸、千葉
5. Bhawal UK, Uchiyama T, Arikawa K, Oka S, Hiratsuka K, Arakawa H, Nasu I, Shibutani K. The effects of low-power laser irradiation in submandibular glands of diabetes-induced rats. IUPS 38th World Congress, 2017 年 8 月 1 日, Rio de Janeiro, Brazil.
6. Bhawal UK, Suzuki M, Uchiyama T, Arikawa K, Hiratsuka K, Shibutani K. Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 modulates *P. gingivalis*-induced inflammation. Penn Periodontal Conference 2017, 2017 年 6 月 25 日, Philadelphia, USA
7. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Uchiyama T, Hiratsuka K, Arakawa H, Nasu I. Micromolar levels of sodium fluoride promote osteoblast differentiation through

- Runx2 signaling. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会、2017 年 5 月 31 日、山形テルサ、山形
8. Bhawal UK, Suzuki M, Arakawa H, Shibutani K, Nasu I, Hiratsuka K. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. 95<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2017 年 3 月 22 日, San Francisco, California, USA.
  9. Nakashima C, Kirita T, Kurihara M, Matsushima S, Bhawal UK, Yamamoto K, Sasahira T, Kuniyasu H. Role of malic enzyme in oral squamous cell carcinomas. 第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日、パシフィコ横浜、横浜、神奈川県
  10. Bhawal UK, 鈴木 正敏、藤田 裕、内山 敏一、有川 量崇、渋谷 鑛、平塚 浩一. DEC1 が示す老化マウス肝臓における FGF21 の抑制作用. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 24 日、札幌コンベンションセンター、北海道、札幌
  11. Bhawal UK, Hiratsuka K. Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) is a novel negative regulator of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21) in aging mice. 94<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2016 年 6 月 22 日, Seoul, Republic of Korea.
  12. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Nakayama R, Nasu I, Arakawa H, Hiratsuka K. Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) is a novel negative regulator of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21) in aging mice. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会; The 12<sup>th</sup> International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2016 年 5 月 27 日、東京医科歯科大学、M&D タワー 鈴木章夫記念講堂、文京区、東京
  13. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Nakayama R, Nasu I, Arakawa H, Hiratsuka K. MicroRNA expression profiling and inhibition of inflammation of Korean red ginseng extract in rats on kanamycin-induced hearing loss. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会; The 12<sup>th</sup> International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2016 年 5 月 27 日、東京医科歯科大学、M&D タワー 鈴木章夫記念講堂、文京区、東京
  14. Bhawal UK, Arikawa K, Taguchi C, Nakayama R, Nasu I, Arakawa H, Hiratsuka K. DNA microarray and microRNA analysis in low-level laser therapy (LLLT)-treated diabetic rat salivary glands. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会; The 12<sup>th</sup> International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2016 年 5 月 27 日、東京医科歯科大学、M&D タワー 鈴木章夫記念講堂、文京区、東京
  15. Bhawal UK, Rodriguez I, Kang TH. MicroRNAs as biomarkers for Korean red ginseng-treated kanamycin-induced hearing loss in rats. 2016 International Conference on Ginseng, 2016 年 2 月 22 日, Jeju Island, Korea.
  16. Bhawal UK, Kobayashi R, Ochiai T, Hiratsuka K. 老化の病因の基礎となる生物学的解析. 第 9 回日本大学先端バイオフォーラム、2016 年 1 月 27 日、日本大学会館、千代田区、東京
  17. Bhawal UK, Nam YH, Rodriguez I, Kim K, Ji MG, Hong BN, Kang TH. MicroRNA expression profiling and inhibition of inflammation of Korean Red Ginseng extract in rats on kanamycin-induced hearing loss. 2015 Autumn Ginseng Conference, 2015 年 11 月 27 日, Sungkyunkwan University, Suwon, Korea.
  18. Bhawal UK, Fukuoka CY, Simoes A, Kuboyama N. DNA microarray and microRNA analysis in low-level laser therapy (LLLT)-treated diabetic rat salivary

- glands. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology, 2015 年 10 月 25 日、ウェスティン都ホテル京都、京都
19. Kurihara M, Kirita T, Nakajima C, Sasahira T, Bhawal UK, Sasaki T, Kuniyasu H. Expression of isozymes of pyruvate kinase in oral and esophageal squamous cell carcinoma. 第 74 回日本癌学会、2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場、名古屋、愛知
20. Sato F, Bhawal UK, Oikawa K, Muragaki Y. BHLH transcription factor DEC2 negatively regulates TWIST1 and VEGF under hypoxia. 第 74 回日本癌学会、2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場、名古屋、愛知
21. Fujita Y, Bhawal UK, Shimosaka M, Ishikawa M, Kusama H, Suzuki M, Hiratsuka K, Shibutani K. Crosstalk between DEC1-Twist1: Distinct responses to senescence and implications for aging. 2015 FDI Annual World Dental Congress, 2015 年 9 月 22 日, Bangkok, Thailand.
22. Bhawal UK, Arikawa K, Hamada N, Hiratsuka K, Nasu I, Arakawa H. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. 2015 FDI Annual World Dental Congress, 2015 年 9 月 22 日, Bangkok, Thailand.
23. Bhawal UK. Distinct responses of transcription factor DEC1 to senescence and implications for aging. Cold Spring Harbor Conferences Asia, 2015 年 9 月 14 日, Grand Dushulake, Suzhou, China

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

パワール ウジャール (BHAWAL, Ujjal)

研究者番号：50433339

日本大学・松戸歯学部・助教

(2) 研究分担者

谷本 圭司 (TANIMOTO, Keiji)

研究者番号：90335688

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：