

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861767

研究課題名(和文) 口腔癌の癌微小環境における時計遺伝子DECの分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the clock gene expression's DEC in tumor microenvironment of oral cancer

研究代表者

古舘 健 (Furudate, Ken)

弘前大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50638898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞と口腔癌を共培養すると、個々の遺伝子特異的に時計遺伝子の概日リズム発現は変化することが明らかになった。今回の結果は、口腔癌の時計遺伝子の概日リズム発現が癌微小環境の相互作用において重要な役割を果たすことを示した。共培養による影響は大きく次の3つに分類された。1つ目はリズムカルな振幅が、共培養によって変化する時計遺伝子群、2つ目は共培養によってリズムカルに振幅する時計遺伝子群、3つ目は共培養によってリズムカルな発現が消失する時計遺伝子群である。線維芽細胞のDec1のリズム発現は口腔癌の存在下で変化した時計遺伝子Dec-1の過剰発現はさまざまな腫瘍で見つかり、関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our findings indicate that both human oral squamous cell carcinoma and fibroblasts mutually influenced the expression of clock genes in tumor microenvironment. Dec1, 2 genes which have basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor and are known to be involved in circadian oscillation, were not expressed in single-cultured fibroblasts. This result is akin to the past study that Dec1, 2 double knockout mice is almost normal at a circadian rhythm. This research is the first study to focus on the clock gene expression of component cells in tumor microenvironment. In conclusion, this study provides new and important information of the mutual effects of clock genes expression in tumor microenvironment. To achieve normalization of the expression of clock genes could have the potential of new cancer treatment because tumor microenvironment contributes to tumor development, tumor angiogenesis, invasion, and metastasis of the tumor cells.

研究分野：癌微小環境

キーワード：時計遺伝子 口腔癌 癌微小環境

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは、視床下部の視交叉上核に存在する中枢時計の時計遺伝子により制御されている。時計遺伝子は 24 時間周期で振幅発現する遺伝子で、生物の活動を 24 時間周期でコントロールしている。時計遺伝子が、生物の概日リズムを刻むだけでなく、細胞増殖・血管新生・免疫反応などを制御している。

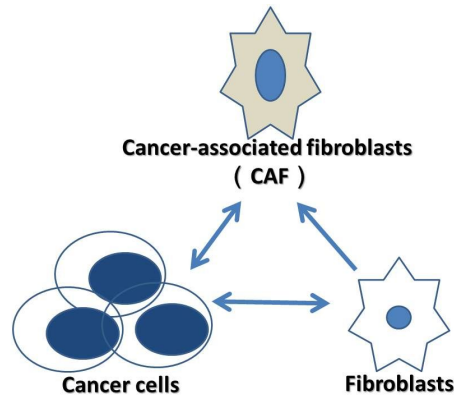
申請者の所属している研究グループは、時計遺伝子 DEC (Differentiated embryo chondrocyte) が全身の細胞で概日リズムを形成する時計遺伝子の一つであることを世界に先駆けて研究し、癌細胞にも概日リズムが存在することを示してきた (Int J Mol Med 17, 1053-1056, 2006; Eur J Biochem 271, 4409-4419, 2004; Nature 419, 841-844, 2002)。

時計遺伝子 DEC は Basic-helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子であり、組織分化の制御、癌化、低酸素応答、アポトーシスの制御、免疫応答など、生体内における多彩な制御機能をもつとともに、正常細胞よりも癌細胞で高発現している。一方、癌細胞は自律的なシグナル伝達に加え、周囲の癌微小環境に大きな影響を受けることが知られてきた。例えば、前癌細胞に隣接する非癌細胞 (正常上皮細胞) が、前癌細胞の細胞死や細胞層からの逸脱を引き起こすことが報告されていた。そこで本研究では、ヒトの口腔癌細胞と非癌細胞 (正常口腔粘膜上皮細胞) 両者が存在する癌微小環境において、時計遺伝子 DEC が癌細胞 / 非癌細胞間の相互作用に及ぼす影響を明らかにする。

本申請は、時計遺伝子を基盤とした癌微小環境における制御機構を解明し、非癌細胞が癌細胞の増殖を抑制する可能性を探求することで新しい癌治療法の開発に発展する基礎的研究であった。

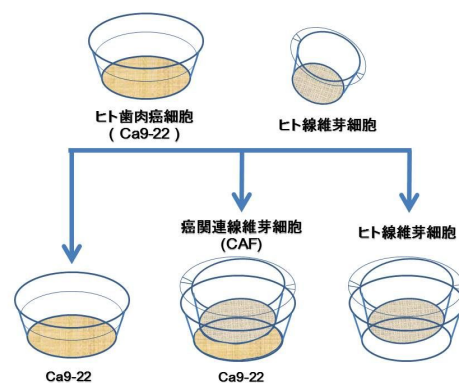
2. 研究の目的

癌微小環境において、癌関連線維芽細胞と癌細胞の相互作用は時計遺伝子発現に重要な役割を担っているにも関わらず、未だほとんど明らかにされていない。今回、私は時計遺伝子の発現を線維芽細胞と癌細胞を共培養の影響を評価した



3. 研究の方法

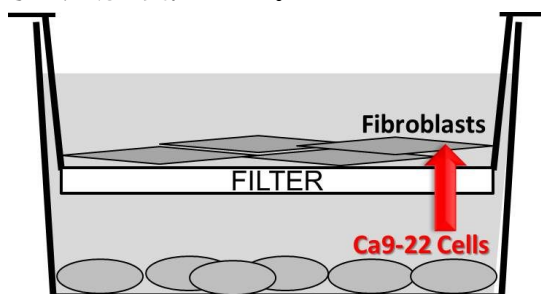
線維芽細胞と口腔癌細胞を培養した。健康な歯肉組織をもつ患者からヒト歯肉線維芽細胞 (Fibroblasts) は採取された。またヒト口腔扁平上皮癌 (Ca9-22) は JCRB 細胞バンクから入手した。Fibroblasts と Ca9-22 の共培養は、半透膜のフィルターで細胞間の物質伝達が可能なディッシュを用いた。



血清ショックで概日リズムを同期させた。血清ショックは、50%馬血清で行った。5%ダルベッコ改良イーグル培地に変え、その時点から 4 時間毎に 48 時間まで細胞を採取した。RNA を抽出し、定量リアルタイム PCR で時計遺伝子を解析した。

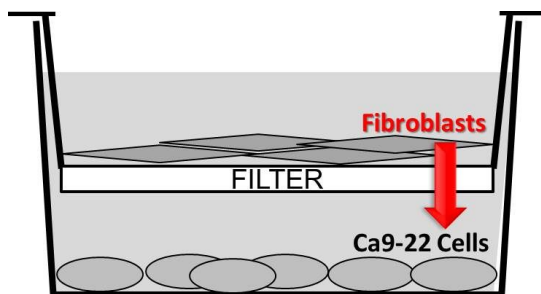
4. 研究成果

共培養されたヒト口腔癌細胞 (Ca9-22) は、ヒト線維芽細胞 (Fibroblasts) の時計遺伝子の発現を変化させた。



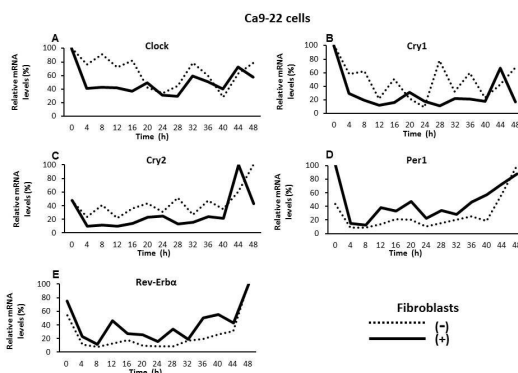
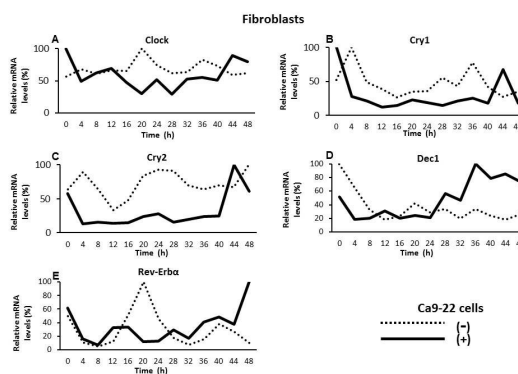
Ca9-22 の非存在下で、Fibroblasts の時計遺伝子はリズムカルな振幅を認めた。Fibroblasts の時計遺伝子 Clock と Rev-Erb のリズムカルな振幅は、Ca9-22 存在下で 20 時間毎から 12 時間毎と 14 時間毎にそれぞれ変化した。また、Fibroblasts の時計遺伝子 Dec1 の発現は、Ca9-22 の存在下において、時間依存的に増強された。一方、時計遺伝子 Cry1/2 のリズム発現は消失した。

ヒト線維芽細胞 (Fibroblasts) の共培養によって、ヒト口腔癌細胞 (Ca9-22) の時計遺伝子発現は、影響を受けた。



Fibroblasts の非共培養下で、Ca9-22 の時計遺伝子 Clock、Cry1/2 のリズムカルな振幅は 8 時間毎であった。Ca9-22 の時計遺伝子 Cry2 と Per1 の振幅は弱く、Rev-Erb の振幅はほとんど観察されなかった。Fibroblasts の共培養下で、Ca9-22 の Rev-Erb 発現は約 12 時間間隔に延長された。さらに Ca9-22 の時計遺伝子 Per1 と Rev-Erb のリズム発現は、Fibroblasts の共培養下で増強された。対照的に、Ca9-22 の Cry1/2 の mRNA 発現は Fibroblasts の共培養下で低下し、リズム振幅は減弱された。

ヒト線維芽細胞 (Fibroblasts) とヒト口腔癌細胞 (Ca9-22) の共培養による影響は大きく次の 3 つに分類された。1 つ目は、リズムカルな振幅が、共培養によって変化する時計遺伝子群である。2 つ目は、共培養によって、リズムカルに振幅する時計遺伝子群である。3 つ目は、共培養によって、リズムカルな発現が消失する時計遺伝子群である。



1 つ目、リズムカルな振幅が、共培養によって変化する時計遺伝子群には、Clock、Rev-Erb、Dec1 が分類された。Fibroblasts と Ca9-22 は、相互に時計遺伝子 Clock のリズム発現に影響を与えた。また、Fibroblasts の共培養下で、Ca9-22 の Rev-Erb 発現は明らかに短縮した。これは、癌と癌間質の相互作用に時計遺伝子が重要な役割をもつことを示した。Fibroblasts の Dec1 のリズム発現は Ca9-22 の存在下で変化した。時計遺伝子 Dec-1 の過剰発現はさまざまな腫瘍で見つかっており、関連が示唆された。

2 つ目、共培養によって、リズムカルに振幅する時計遺伝子に Per と Rev-Erb は分類

された。概日リズムの乱れは、癌発生に関与することが知られている。例えば、腫瘍抑制の性質をもつ Per2 の異常な発現は、直腸癌や肺癌を引き起こす。今回の結果では、Per1 および Rev-Erb の発現は、Ca9-22 において概日リズムを示さなかった。しかし、Fibroblasts と共培養すると、概日リズムを示すことが明らかになった。これは、癌細胞と癌間質細胞の間で、時計遺伝子の発現が制御されることを示唆した。

3 つ目、共培養によって、リズムカルな発現が消失する時計遺伝子に Cry1/2 は分類された。Fibroblasts と Ca9-22 を共培養すると、時計遺伝子 Cry1/2 のリズム発現は Fibroblasts と Ca9-22 のいずれも消失した。

留意すべきは、今回の研究で用いた共培養のシステムは Fibroblasts と Ca9-22 が直接接触していないということである。それゆえに、一方の細胞から分泌されたある液性因子が、もう一方の細胞の時計遺伝子の概日リズム発現に影響を与えている可能性がある。今回の研究ではその因子は明らかにできなかったが、次回の研究で明らかにする予定である。

結論として、Fibroblasts と Ca9-22 を共培養すると、個々の遺伝子特異的に時計遺伝子の概日リズム発現は変化することが明らかになった。今回の結果は、口腔癌の時計遺伝子の概日リズム発現が癌微小環境の相互作用において重要な役割を果たすことを示した。

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1件)

CLOCK GENE EXPRESSIONS ARE ALTERED BY CO-CULTURE OF GINGIVAL FIBROBLASTS AND ORAL CANCER CELLS

Hirosaki Medical Journal 査読あり 66 巻 2-4 号 (2016 年 3 月) Ken Furudate, Tomoh

Matsumiya, Ryo Hayakari, Fei Xing, Kosei Kubota, Hirotaka Sakaki, Yoshihiro Tamura, Hiroshi Kijima, Tadaatsu Imaizumi, Wataru Kobayashi

[学会発表](計1件)

Ken Furudate, Molecular Mechanism of Clock Genes in Tumor, International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (ICOMS 2015), 2015 October 27-30th, Melbourne (Australia)

[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:古舘 健 (Furudate Ken)

弘前大学医学部附属病院 医員 研究者番号:50638898

(2)研究分担者

() 研究者番号:

(3)連携研究者

() 研究者番号: