

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19763

研究課題名(和文) 扁平上皮癌の増殖・糖代謝の制御に関わる時計遺伝子DECの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of clock genes in regulating the cancer progression and glucose metabolism in squamous cell carcinoma

研究代表者

清野 浩子 (Seino, Hiroko)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：30598727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト食道扁平上皮癌細胞株を用いた検討では、ポドプランリン発現をDEC1が促進しDEC2が抑制するといった、DECのリンパ管新生制御機構が示された。またDECが、上皮間葉転換EMT誘導因子であるTGF- $\beta$ のエフェクターとして働き、増殖浸潤に関わることも明らかとなった。FDG陽性集積・陰性集積症例の手術摘出から抽出したRNAや免疫染色を用いた検討では、FDG陽性集積例でHIF-1 $\alpha$ ・VEGF・GLUT1発現の上昇が見られた。DEC1はE-cadherinの発現を制御し、低酸素誘導性EMTに関与することも、ヒト肝細胞癌を用いた実験で明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present work was to analyze the roles of clock genes in human squamous cell carcinoma. In human esophageal cancer cells, DEC1 promoted podoplanin expression, whereas DEC2 inhibited its expression, indicating they might have opposite effects on lymphangiogenesis. Additionally, DEC1 and DEC2 functioned as effectors of TGF- $\beta$ , an EMT inducer. The expressions of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and GLUT1 in FDG positive cases were increased on immunohistochemical examination and PCR using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. DEC1 was involved in hypoxia-induced EMT processes via negatively regulating E-cadherin expression in HepG2 cells.

研究分野：放射線診断学

キーワード：時計遺伝子 食道癌 扁平上皮癌 癌浸潤 糖代謝

## 1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子(Clock genes)は、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、生物の概日リズム(体内時計)が制御されている。時計遺伝子として、現在 CLOCK・BMAL・PER・CRY・DEC が知られている。時計遺伝子 DEC (DEC1 と DEC2) は、全身のあらゆる臓器で発現しており、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。

申請者らの教室では、DEC がヒト癌細胞において概日リズムを調節することに加えて、血管新生・アポトーシス制御・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)。論文の中で我々は、DEC2 が HIF (Hypoxia-inducible factor, 低酸素誘導因子) -1 $\alpha$ /ARNT1 を介して VEGF (Vascular endothelial growth factor, 血管内皮増殖因子) 遺伝子発現を制御することを報告している。HIF-1 $\alpha$  は細胞に低酸素状態が生じると誘導され、VEGF・各種解糖系酵素・グルコース輸送体・エリスロポイエチンなどの発現を誘導する。ところで、現在の癌診療において用いられている <sup>18</sup>F-FDG PET/CT 検査において、腫瘍部への FDG 集積に関わる最も重要な因子は GLUT1 (glucose transporter) であるが、GLUT1 もまた HIF-1 $\alpha$  の下流遺伝子である。このことから、HIF-1 $\alpha$  を介した DEC の糖代謝制御機構が存在し、更には実地臨床の FDG 集積と DEC の発現量に何らかの相関があることが予想される。

しかし国内外を含め、扁平上皮癌における生物時計(概日リズム)を考慮した研究報告はほとんど無い。時計遺伝子により規定される癌細胞の増殖進展や病態解析、糖代謝の特性・機構が解明されることは、時計遺伝子を利用した分子標的治療薬および抗癌剤・放射線治療への応用へもつながるものと期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、扁平上皮癌の増殖浸

潤・糖代謝に関わる時計遺伝子の分子生物学的基盤を明らかにすることである。すなわち、ヒト癌細胞株(主にヒト扁平上皮癌細胞株)において、時計遺伝子の発現リズムに対応した癌細胞の増殖浸潤・HIF1 の感受性・糖代謝の機序を解明する。また実地臨床での <sup>18</sup>F-FDG PET/CT 検査における FDG 集積 (SUVmax: Maximum standardized uptake value) と臨床病理学的意義を解析することで、概日リズム下での時計遺伝子による FDG 集積の制御機構・意義を解析する。

## 3. 研究の方法

ヒト癌培養細胞株(主にヒト食道扁平上皮癌)を用いて、概日リズム下で DEC の過剰発現・ノックダウンを行い、癌細胞の増殖浸潤の機序を解明する(発現変動はリアルタイム PCR・Western blot 法、細胞増殖能は MTS assay、浸潤能は Matrigel-invasion assay で比較する)。また、間葉系幹細胞との共培養や低酸素環境下での細胞培養による、時計遺伝子と癌細胞の増殖浸潤の解明も試みる。実地臨床として、<sup>18</sup>F-FDG PET/CT を施行し、その後の手術で外科切除標本を得られたヒト癌症例を対象に、FDG 集積、病理学的因子(細胞増殖能や分化度など)臨床経過との関係を、免疫染色法や標本から抽出した RNA によるリアルタイム PCR による解析も踏まえて検討する。

## 4. 研究成果

3 種類の分化度の異なるヒト食道扁平上皮癌細胞株(TE5, TE10, TE11)のうち、ポドプラニン発現は TE11 で強く、TE5 では弱かった。一方、TE10 ではポドプラニン発現は認められなかった。TE11 における DEC1 過剰発現では、ポドプラニン発現が促進された。逆に、TE11 における DEC2 過剰発現ではポドプラニン発現は抑制された。これらの結果から、DEC はポドプラニン制御を介して、ヒト食道癌細胞株のリンパ管新生を制御していることが示された。DEC がヒト食道癌細胞において、上皮間葉転換 EMT 誘導因子である TGF- $\beta$  のエフェクターとして働いていることも明らかとなった。実

地臨床においては、扁平上皮癌における FDG 集積 (SUVmax) とリンパ節転移との間に相関関係が見られた。FDG 陽性集積・陰性集積症例の手術摘出から抽出した RNA や免疫染色を用いた検討では、FDG 陽性集積例で HIF-1 $\alpha$ ・VEGF・GLUT1 発現の上昇が明らかとなった。低酸素誘導因子 HIF-1 については、ヒト肝細胞癌を用いた実験により、DEC1 が E-cadherin の発現を制御し、低酸素誘導 EMT に関与することが証明された。

#### 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 14 件)

以下、全て査読有り。

1. Fujita T, Miura H, Seino H, Ono S, Nishi T, Nishimura A, Hakamada K, Aoki M. Anatomical classification of breast sentinel lymph nodes using computed tomography-lymphography. *Anat Sci Int*. 2018.
2. Nishishita R, Morohashi S, Seino H, Wu Y, Yoshizawa T, Haga T, Saito K, Hakamada K, Fukuda S, Kijima H. Expression of cancer-associated fibroblast markers in advanced colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2018;15(5):6195-6202.
3. Yoshizawa T, Ishido K, Saito K, Haga T, Seino H, Wu Y, Morohashi S, Hakamada K, Kijima H. Prognostic impact of extracapsular lymph node invasion and myofibroblastic activity in extrahepatic bile duct cancer. *Clin Med Insights Pathol*. 2017;10:1179555717729652.
4. Liu Q, Imaizumi T, Murakami K, Tanaka H, Wu Y, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino H, Kijima H. *Biomed Res*. 2017;38(4):249-255.
5. Murakami K, Wu Y, Imaizumi T, Aoki Y, Liu Q, Yan X, Seino H, Yoshizawa T, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. *Biomed Res*. 2017;38(4):221-227.
6. Miura T, Yoshizawa T, Hirai H, Seino H, Morohashi S, Wu Y, Wakiya T, Kimura N, Kudo D, Ishido K, Toyoki Y, Kijima H, Hakamada K. *Anticancer Res*. 2017;37(1):183-190.
7. Liu Q, Wu Y, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino H, Kato Y, Kijima H. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 functions as an anti-apoptotic factor during paclitaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Int J Mol Med*. 2016;38(6):1727-1733.
8. Takatsuna M, Morohashi S, Yoshizawa T, Hirai H, Haga T, Ota R, Saito K, Wu Y, Seino H, Aoyagi Y, Terai S, Kijima H. Myofibroblast distribution is associated with invasive growth types of colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2016;36(6):3154-3160.
9. Aoki M, Akimoto H, Sato M, Hirose K, Kawaguchi H, Hatayama Y, Seino H, Kakehata S, Tsushima F, Fujita H, Fujita T, Fujioka I, Tanaka M, Miura H, Ono S, Takai Y. *J Radiat Res*. 2016;57(5):533-540.
10. Seino H, Ono S, Miura H, Morohashi S, Wu Y, Tsushima F, Takai Y, Kijima H. Hypoxia is important in F18 FDG accumulation in thecoma fibroma tumors on F18 FDG PET/CT scans. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):3821-3827.
11. Morohashi S, Yoshizawa T, Seino H, Hirai H, Haga T, Ota R, Wu Y, Yoshida E, Hakamada K, Kijima H. A new histological therapeutic classification system to predict eradicated and residual lymph nodes in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Rep*. 2016 May;35(5):2592-2598.
12. Kakuta A, Shibutani K, Ono S, Miura H, Tsushima F, Kakehata S, Basaki K, Fujita H, Seino H, Fujita T, Takai Y. *Hepatol Res*. 2016;46(5):468-476.
13. 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. *Biomed Res*. 2015;36(2):89-96.
14. Wu Y, Sato H, Suzuki T, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino H, Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Kijima H. Involvement of c-Myc in the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells induced by

bHLH transcription factor DEC2.  
Int J Mol Med. 2015;35(3):815-820.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Liu Q, Imaizumi T, Tanaka H, Wu Y, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino H, Kijima H. DEC1 negatively regulates expression of CXCL10 and CCL5 induced by poly IC in human mesangial cells. 第 106 回日本病理学会総会 2017 年 4 月 27 日 ~ 4 月 29 日 京王プラザホテル(東京都新宿区)
2. Yoshizawa T, Morohashi S, Haga T, Seino H, Wu Y, Kijima H. Differentiated liposarcoma of the pancreas: A case report. 第 106 回日本病理学会総会 2017 年 4 月 27 日 ~ 4 月 29 日 京王プラザホテル(東京都新宿区)
3. Morohashi S, Tanaka M, Yoshizawa T, Seino H, Wu Y, Kijima H. Morphological analysis of the residual mucosa in 12 postoperative ulcerative colitis patients. 第 106 回日本病理学会総会 2017 年 4 月 27 日 ~ 4 月 29 日 京王プラザホテル(東京都新宿区)
4. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Seino H, Morohashi S, Kijima H. TGF- $\beta$ -induced podoplanin expression is associated with EMT of human esophageal carcinoma TE-11 cells. 第 75 回日本癌学会 2016 年 10 月 6 日 ~ 10 月 8 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
5. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Seino H, Morohashi S, Kijima H. TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition via podoplanin in human esophageal carcinoma TE-11 cells. 第 13 回日本病理学会カンファレンス 2016 年 7 月 29 日 六甲山ホテル(兵庫県・神戸市)
6. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Yoshizawa T, Seino H, Morohashi S, Kijima H. Podoplanin-mediated TGF- $\beta$ -induced EMT and its correlation with bHLH transcription factor DEC in TE-11 cells. 第 105 回日本病理学会 2016 年 5 月 12 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
7. Wu Y, Sato H, Murakami K, Hirai H, Yoshizawa T, Seino H, Suzuki T, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. DEC1 induced by E2-ER signaling promotes the EMT process of breast cancer cells. 第

104 回日本病理学会 2015 年 5 月 1 日 名古屋国際会場(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 清野浩子, 吉澤忠司, 羽賀敏博, 諸橋聡子, 呉雲燕, 後藤慎太郎, 鬼島宏. 医学図書出版株式会社, 胆と膵, 2018 年, p.201-210.

〔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  
清野 浩子 (Seino Hiroko)  
弘前大学・医学研究科 助教  
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:

(4)研究協力者  
( )