

令和元年6月21日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10448

研究課題名(和文) 時計遺伝子を標的とした乳癌微小環境制御とその臨床応用

研究課題名(英文) Breast cancer microenvironment control targeting clock gene and its clinical application

研究代表者

諸橋 聡子 (Morohashi, Satoko)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：90569592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト癌細胞において、時計遺伝子DEC1、DEC2が、podoplaninを介した上皮間葉転換(Epithelial Mesenchymal transition; EMT)の制御に関わっていることが証明された。また、ヒト癌細胞において、抗癌剤シスプラチンを添加した場合、時計遺伝子DEC2は、anti-apoptotic因子として機能する可能性が示唆された。さらに、ヒト癌細胞株において、TGF $\beta$ がDEC1の転写/翻訳レベルを増加させ、DEC2の転写/翻訳を減少させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、概日リズムの下で、時計遺伝子の発現に対応した癌細胞増殖・癌細胞-間質の相互作用・腫瘍血管新生の機序を証明することで、癌微小環境の病態解明と、増殖制御機構の構築を目標とす。さらには、概日リズムおよび微小環境を考慮した新たな時計遺伝子をターゲットとした抗がん剤(分子標的治療薬を含む)の概念を構築することに挑んだ。時計遺伝子が、ヒト癌細胞において、アポトーシスや上皮間葉転換(EMT)に関与していることを示すことができた。このことは、時計遺伝子(DEC)が抗がん剤(分子標的治療薬)としての可能性を有していることと理解される。

研究成果の概要(英文)：Podoplanin is significantly associated with EMT of human cancer cells, and may be directly or indirectly regulated by bHLH transcription factors DEC1 and DEC2. DEC2 exhibits anti-apoptotic effects in human cancer cells. Reversal of DEC2 expression may have therapeutic potentials for the treatment of esophageal cancer, in combination with cisplatin. DEC1 and DEC2 have opposite effects on TGF $\beta$  induced EMT in human cancer cells.

研究分野：外科病理学

キーワード：時計遺伝子 微小環境 ヒト癌細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、日本における乳癌患者は増加の一途を辿っている。乳癌患者の罹患年代は、40-50歳台と若く、人生の中で再発を余儀なくされることが多い。再発患者の多くは抗がん剤の治療をすることとなる。患者のQOL (quality of life) を下げずに、治療を継続することは非常に重要かつ急務である。本研究では、乳癌の微小環境と概日リズムを考慮した時計遺伝子を基盤とした抗がん剤(分子標的治療薬を含む)適応の応用を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、乳癌の微小環境と概日リズムを考慮した時計遺伝子を基盤とした抗がん剤(分子標的治療薬を含む)適応の応用を目指す。

申請者はこれまでに、生物時計(概日リズム)下で、時計遺伝子が、癌の浸潤性増殖や腫瘍血管新生に関与していることを示してきた。一方、癌の増殖・進展には、癌細胞に加え、間質細胞や細胞外マトリックスなどを含めた微小環境が重要である。本研究では、概日リズムの下で、時計遺伝子の発現に対応した癌細胞増殖・癌細胞-間質の相互作用・腫瘍血管新生の機序を証明することで、乳癌微小環境の病態解明と、増殖制御機構の構築を目標とする。さらには、概日リズムおよび微小環境を考慮した新たな時計遺伝子をターゲットとした抗がん剤(分子標的治療薬を含む)の概念を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト乳癌の培養細胞株(MCF-7, MDA-MB-231など複数の細胞株)を用いて、培養細胞レベルで、時計遺伝子発現の意義を明らかにするとともに、間葉系幹細胞との共培養も試みる。対象とする時計遺伝子の発現検討は、我々が機能解析を行った時計遺伝子(DEC1, DEC2)にとどまらず、CLOCK, BMAL, PER, CRYといったその他の時計遺伝子を含む。最終的には*in silico*で複数の時計遺伝子阻害薬の作製に挑み、ヒト乳癌細胞株へ作用させ抗腫瘍効果を判定する。研究目的を達成するために、以下の事項を解析する。

- (1) 概日リズム下での血管新生を制御する時計遺伝子の発現解析
- (2) 乳癌微小環境(癌細胞・間質相互作用)の機序の解明
- (3) 乳癌微小環境の発育・進展に関わる時計遺伝子を介した分子相互作用機構の解明
- (4) 乳癌微小環境下における時計遺伝子(阻害剤の有用性の検討)乳癌細胞増殖・浸潤・血管新生の解析
- (5) 概日リズム下でのヒト乳癌培養細胞株へ対する時計遺伝子阻害剤の作用効果の解析

4. 研究成果

ヒト癌細胞において、時計遺伝子DEC1, DEC2が podoplaninを介した上皮間葉転換(Epithelial Mesenchymal transition; EMT)の制御に関わっていること示した。さらに、乳癌組織(外科切除標本)における解析では、術前化学療法後の原発巣における腫瘍残存パターンとリンパ節転移との関係を解析した。原発巣における腫瘍残存では、細

胞密度の高い群は、残存腫瘍の細胞密度が高くない群に比べて、化学療法後もリンパ節転移が残存している可能性を示した。

ヒト癌細胞において、抗癌剤シスプラチンの添加により、時計遺伝子DEC2の発現は抑制され、時計遺伝子DEC1の発現が上昇することが示された。さらに、シスプラチンを添加した状態で、ヒト癌細胞にDEC2を過剰発現させると、pro-apoptotic factorであるBimの発現が抑制されると共に、anti-apoptotic factorであるBcl-xLの発現が上昇した。このことから、ヒト癌細胞において、抗癌剤シスプラチン存在下では、時計遺伝子DEC2は、anti-apoptotic因子として機能していることが示された。

ヒト癌細胞において、低酸素下で時計遺伝子DEC1は、HIF1- とE-cadherinを転写因子レベルで負に制御することが示された。時計遺伝子DEC1は、E-cadherinの発現を抑制することで、低酸素下で誘導される上皮間葉転換に関与していることが解明された。

ヒト癌細胞株において、TGF $\beta$ がDEC1の転写/翻訳レベルを増加させ、DEC2の転写/翻訳を減少させることが示された。さらに、TGF $\beta$ はSmad2のリン酸化シグナルを誘発し、続いてEカドヘリン(細胞接着因子)などの上皮マーカーを抑制し、Nカドヘリン(細胞接着因子)およびビメンチン(細胞骨格物質)などの間葉系マーカーの活性化が惹起されることが証明された。ヒト癌細胞株において、TGF $\beta$ による細胞形態変化と細胞運動性は、siRNA法でDEC1をノックダウンすることで抑制された。一方、siRNA法でDEC2をノックダウンするとヒト癌細胞株は、DEC1ノックダウンと比べ、EMT関連マーカー発現において反対の変化が見られた。つまり、DEC1およびDEC2が、ヒト癌細胞においてTGF $\beta$ 誘導の上皮間葉転換に対して相補的な役割を担っていることが証明された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Sasaki H, Morohashi S, Toba T, Seino H, Yoshizawa T, Hirai H, Haga T, Wu Y, Kijima H. Neovascularization of gastric submucosa invasive adenocarcinoma. *Oncology Letters* 査読有り 2018, 16: 3895-3900 DOI : 10.3892/ol.2018.9116.
2. Liu Q, Wu Y, Seino H, Haga T, Yoshizawa T, Morohashi S, Kijima H. Correlation between DEC1/DEC2 and epithelial mesenchymal transition in human prostate cancer PC3 cells. *Molecular Medicine Reports* 査読有り 2018, 18: 3859-3865 DOI : 10.3892/mmr.2018.9367.
3. Nishishita R, Morohashi S, Seino H, Wu Y, Yoshizawa T, Haga T, Saito K, Hakamada K, Fukuda S, Kijima Hiroshi. Expression of cancer-associated fibroblast markers in advanced colorectal cancer, *Oncol Lett* 査読有り 2018, 15: 6195-6202 DOI : 10.3892/ol.2018.8097.
4. Okano K, Yoshizawa T, Miura T, Ishido K, Kudo D, Kimura N, Wakiya T, Wu Y, Morohashi S, Hakamada K, Kijima H. Impact of the histological phenotype of extrahepatic bile duct carcinoma. *Mol Clin Oncol* 査読有り 2017, 8: 54-60 DOI : 10.3892/mco.2017.1472.
5. 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 査読有り 2017, 10: 1-7. DOI : 10.1177/1179555717729652.

6. Sato H, Wu Y, Kato Y, Liu Q, Hirai H, Yoshizawa T, Morohashi S, Watanabe J, Kijima H. DEC2 expression antagonizes cisplatin-induced apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma. Mol Med Rep 査読有り 2017, 16: 43-48 DOI : 10.3892/mmr.2017.6571.
7. 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. Prognostic Impact of CD163+ Macrophages in Tumor Stroma and CD8+ T-Cells in Cancer Cell Nests in Invasive Extrahepatic Bile Duct Cancer. Anticancer Res 査読有り 2017, 7: 183-190 DOI : 10.21873/anticancer.11304.
8. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Tanaka M, Inokuchi S, Yoshizawa T, Morohashi S, Kijima H. Podoplanin-mediated TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition and its correlation with bHLH transcription factor DEC in TE-11 cells. Int J Oncol 査読有り 2016, 48: 2310-2320 DOI : 10.3892/ijo.2016.3445.
9. Liu Q, Wu Y, Yoshizawa T, Yan X, 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 査読有り 2016, 38: 1727-1733 DOI : 10.3892/ijmm.2016.2798.
10. 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 査読有り, 2016 36: 3154-3160. DOI : 10.3892/or.2016.5202.
11. Takatsuna M, Morohashi S, Yoshizawa T, Hirai H, Haga T, Ota R, Wu Y, Morohashi H, Hakamada K, Terai S, Kijima H. Myofibroblasts of the muscle layer stimulate the malignant potential of colorectal cancer. Oncol Rep 査読あり 2016, 36: 1251-1257. DOI : 10.3892/or.2016.4932.
12. 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 査読あり, 2016, 35: 2592-2598. DOI : 10.3892/or.2016.4635.
13. Hirai H, Yoshizawa T, Morohashi S, Haga T, Wu Y, Ota R, Takatsuna M, Akasaka H, Hakamada K, Kijima H. Clinicopathological significance of gastric poorly differentiated medullary carcinoma. Biomed Res 査読有り, 2016, 37: 77-84. DOI : 10.2220/biomedres.37.77.
14. Kimura Y, Morohashi S, Yoshizawa T, Suzuki T, Morohashi H, Sakamoto Y, Koyama M, Murata A, Kijima H, Hakamada K. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor, thymidine phosphorylase and microvessel density in colorectal cancer. Mol Med Rep 査読有り, 2016, 13: 1551-1557. DOI : 10.3892/mmr.2015.4687.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 諸橋聡子. 乳腺疾患の現状について. 青森県臨床細胞学会 教育講演 (招待講演), 2019.
2. Morohashi S, Yoshizawa T, Seino H, et al. Utility of residual carcinoma pattern in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. 第105回日本病理学会総会. 2016.

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：鬼島 宏

ローマ字氏名：Kijima Hiroshi

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁): 90204859

研究分担者氏名：呉 雲燕

ローマ字氏名：Wu Yunyan

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学研究科

職名：助教

研究者番号 (8桁): 40636586

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。