

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17575

研究課題名(和文) 時計遺伝子発現に基づく乳癌の浸潤性増殖機構とその制御

研究課題名(英文) Functional analysis of clock genes in invasive breast carcinoma

研究代表者

呉 雲燕 (Wu, Yunyan)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：40636586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト癌細胞において、時計遺伝子によるがん微小環境への制御機構を解明した。ヒト癌細胞におけるリンパ管マーカーであるpodoplaninの発現では、DEC1の過剰発現により上昇させ、DEC2の過剰発現により抑制させた。DEC1は、E-cadherinを抑制することによって、低酸素による誘導された上皮-間葉転換を促進した。DEC1、DEC2は、TGF- $\beta$ -Smad経路を制御することによりEMTへ影響する。三次元組織モデルを用いて、癌細胞が間質にあるリンパ管へ浸潤する際の形態変化を、透過電子顕微鏡で観察し、癌細胞がfibroblast様な形態的な変化を伴いながら間質への浸潤が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の悪性形質を制御する時計遺伝子(DEC1、DEC2)の機能を解明することにより、DEC1とDEC2を標的とする新たながん治療法(時計遺伝子DEC阻害剤)の開発と臨床応用研究への発展の可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The present study declares the mechanisms that clock genes, DEC1 and DEC2, regulate the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process.

First, DEC1 overexpression upregulated podoplanin expression in carcinoma cells whereas DEC2 overexpression inhibited podoplanin. Second, the expression of DEC1 was induced when exposed to hypoxic environment. Subsequently, DEC1 promoted the EMT process by inhibiting the expression of epithelial marker E-cadherin. Third, DEC1 and DEC2 functioned as regulators of the TGF- $\beta$ -Smad signaling pathway to affect EMT process in carcinoma cells. Finally, we analyzed the morphological changes by observing under transmission electron microscope (TEM). Carcinoma cells were applied on the three-dimensional tissue models and were collected at different time points. A fibroblast-like change was observed when carcinoma cells infiltrating to the stromal lymphatic vessel.

研究分野：人体病理学

キーワード：時計遺伝子 がん微小環境 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子 DEC (DEC1 および DEC2) は、basic Helix-Loop-Helix (bHLH) 型転写因子であり、視交叉上核のみならず、全身末梢組織および細胞内に発現している。また、免疫応答や組織分化の制御・癌化・低酸素応答など、生体内におけるさまざまな機能を発揮している。

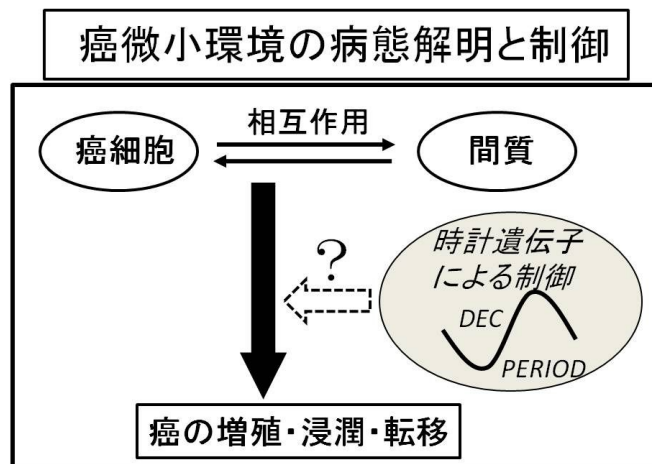
癌の増殖・浸潤・転移といった生物学的な特性は、癌実質がおかれた微小環境との相互作用が影響していると考えられている。癌間質に存在する線維芽細胞やマクロファージから分泌される脈管新生因子 (VEGF, bFGF, podoplanin など) が癌微小環境形成に重要であり、細胞外マトリックス成分とともに癌増殖・進展に寄与することが示唆されている。癌微小環境を考慮した発育進展制御の解析は、従来の細胞解析法に比べ、より生体に近い環境を反映し、新たな癌増殖制御機構の構築に繋がると考えられる。

申請者は、「生物時計が関与する微小環境の下で、乳癌の浸潤性増殖や腫瘍脈管新生が行われている」との仮説に基づき、この分子機序を解析することで乳癌の浸潤性増殖機構の解明または時計遺伝子特異的阻害剤作製への応用を考えるに至った。乳癌における生物時計(概日リズム)を考慮した研究課題は、我々の研究以外に全く報告されない。本研究では、乳癌増殖・浸潤機構における時計遺伝子の役割を、癌微小環境レベルで解析することにより、従来まで報告されている乳癌の病態機序をより深く追求できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、癌細胞増殖・癌細胞と間質の相互作用・腫瘍脈管新生機序における時計遺伝子の役割を解析し、癌の浸潤性増殖機構の解明とその増殖制御を目的とする。

申請者らは、癌微小環境特性が、概日リズムを形成する時計遺伝子の制御を基盤とした、癌細胞増殖・腫瘍脈管新生によって生じると考えている。また、時計遺伝子の発現異常が乳癌発症に関与していることが注目される。この考えに基づき、乳癌の悪性形質を制御する時計遺伝子の機構を解明し、その特異的阻害剤を作製することを目指す。



癌微小環境は癌の進展とともにダイナミックに変動している。時計遺伝子と癌微小環境との直接的な関連性を示す報告はほとんどない。

## 3. 研究の方法

ヒト癌細胞株を用いて、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、時計遺伝子の過剰発現・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。研究目的を達成するため、以下の事項を解析する。

- (1) 時計遺伝子 DEC の発現制御と細胞増殖能・浸潤能との関連を解析する
- (2) 乳癌細胞で時計遺伝子と脈管新生因子との関連を解明する
- (3) 間葉系幹細胞との間接共培養における乳癌細胞増殖・浸潤・血管新生能の解析

(4) 三次元培養法による浸潤性癌微小環境モデルを用いて、癌細胞の形態学的変化を解析する。

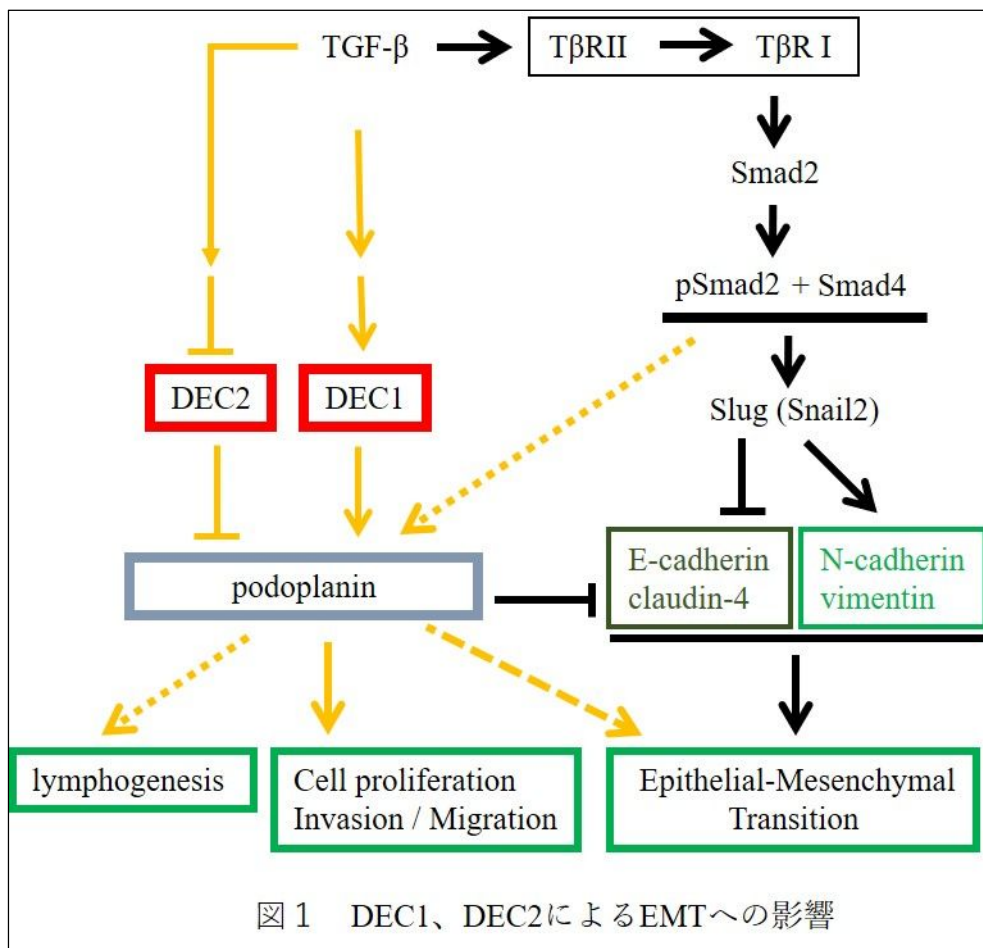
#### 4. 研究成果

ヒト培養癌細胞において、DEC1 および DEC2 が上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) やアポトーシスの制御に関わっていること示した。

(1) ヒト癌細胞で、時計遺伝子発現制御を行い、脈管新生関連因子の発現変動、細胞増殖能、浸潤能への影響を検討することによって、時計遺伝子と脈管新生因子との関連を解明した。ヒト癌細胞において、DEC1 過剰発現では、リンパ管新生関連因子である Podoplanin の発現を促進した。一方、DEC2 過剰発現では、Podoplanin の発現を抑制することが判明した。

(2) 時計遺伝子による癌微小環境指標のひとつである EMT への作用機構を明らかにすることができた。DEC1 は、E-cadherin の発現を抑制することによって、低酸素による誘導された EMT を促進することを証明した。また、DEC1 は Smad2 のリン酸化活性を制御することによって、transforming growth factor (TGF)- の添加により誘導された EMT をさらに促進することが証明された。一方 DEC2 は TGF- による誘導された EMT への抑制効果が示された。

上記 (1) (2) の結果によって、時計遺伝子 DEC1、DEC2 による上皮間葉転換 EMT の制御メカニズムを図1で示す。



(3) DEC1 および DEC2 によるアポトーシスへの作用機構を明らかにすることができた。ヒト癌細胞 (LNCaP clone FGC) で、DEC1 はミトコンドリアタンパク質である Bcl-xL の発現を抑制することによってアポトーシス効果を示した。DEC2 は、抗アポトーシス効果を示すとともに、抗がん剤 paclitaxel による抑制された細胞活性 (cell viability) が回復する作用を有することが証明された。

(4) 三次元組織モデルで、培養ヒト胆管癌細胞 (TFK-1) 浸潤する際に形態学的な変化を観察できた。H&E (hematoxylin and eosin) 染色および透過電子顕微鏡観察の結果により、添加 48h 後、TFK-1 細胞がリンパ管内への浸潤が認められた。また、透過電子顕微鏡観察していた結果、癌細胞がリンパ管に浸潤した後、リンパ管内皮に接して腺管構造を示す胞巣が形成され、一部で癌細胞より分泌した粘液成分も認められた。添加 72h 後、リンパ管内に浸潤していた癌細胞が、リンパ管外間質への浸潤をはじめ、癌細胞の一部が胞巣より離れ、fibroblast 様な形態的な変化を伴いながら間質への浸潤が認められた。

(5) 外科切除術で得られたヒト乳癌組織材料の H&E 標本を用いて、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。原発巣における残存した癌細胞の細胞密度 (cell density) を評価したところ、細胞密度の高い群は、細胞密度の低い群と比較して、化学療法後もリンパ節転移が残存している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Tsugeno Y, Yoshizawa T, Wu Y, Goto S, Haga T, Suzuki T, Seino H, Morohashi S, Kijima H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Type I Collagen Induces DEC Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Human Breast Cancer MCF-7 Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research Journal	6. 最初と最後の頁 125-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Goto S, Ishido K, Yoshizawa T, Haga T, Morohashi S, Wu Y, Seino H, Hakamada K, Kijima H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Histopathological Characteristics of Pancreatic Cancer Stroma Induced by Neoadjuvant Chemotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research Journal	6. 最初と最後の頁 61-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yunyan Wu, Hiroshi Kijima	4. 巻 2
2. 論文標題 BHLH Transcription Factors DEC1 and DEC2: From Structure to Various Diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research Journal	6. 最初と最後の頁 28-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Qiang Liu, Yunyan Wu, Hiroko Seino, Tadashi Yoshizawa, Toshihiro Haga, Satoko Morohashi, Hiroshi Kijima	4. 巻 1
2. 論文標題 DEC1 and DEC2 Regulate Apoptosis of Human Prostate Adenocarcinoma LNCap Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioMed Research Journal	6. 最初と最後の頁 6-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Liu Qiang, Wu Yunyan, Seino Hiroko, Haga Toshihiro, Yoshizawa Tadashi, Morohashi Satoko, Kijima Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Correlation between DEC1/DEC2 and epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer PC-3 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 3859-3865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2018.9367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Hanae, Morohashi Satoko, Toba Takahito, Seino Hiroko, Yoshizawa Tadashi, Hirai Hideaki, Haga Toshihiro, Wu Yunyan, Kijima Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Neoangiogenesis of gastric submucosa-invasive adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3895-3900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishishita Rie, Morohashi Satoko, Seino Hiroko, Wu Yunyan, Yoshizawa Tadashi, Haga Toshihiro, Saito Kensuke, Hakamada Kenichi, Fukuda Shinsaku, Kijima Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Expression of cancer-associated fibroblast markers in advanced colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 6195-6202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hidenobu, Wu Yunyan, Kato Yukio, Liu Qiang, Hirai Hideaki, Yoshizawa Tadashi, Morohashi Satoko, Watanabe Jun, Kijima Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 DEC2 expression antagonizes cisplatin-induced apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Med Rep.	6. 最初と最後の頁 43 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.6571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Keishu, Wu Yunyan, Imaizumi Tadaatsu, Aoki Yuka, Liu Qiang, Yan Xu, Seino Hiroko, Yoshizawa Tadashi, Morohashi Satoko, Kato Yukio, Kijima Hiroshi	4. 巻 38
2. 論文標題 DEC1 promotes hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human hepatocellular carcinoma cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 221-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.38.221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Liu Qiang, Imaizumi Tadaatsu, Murakami Keishu, Tanaka Hiroshi, Wu Yunyan, Yoshizawa Tadashi, Morohashi Satoko, Seino Hiroko, Kijima Hiroshi	4. 巻 38
2. 論文標題 DEC1 negatively regulates the expression of CXCL10 and CCL5 induced by poly IC in normal human mesangial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 249-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.38.249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 MIURA TAKUYA, YOSHIZAWA TADASHI, HIRAI HIDEAKI, SEINO HIROKO, MOROHASHI SATOKO, WU YUNYAN, WAKIYA TAIICHI, KIMURA NORIHISA, KUDO DAISUKE, ISHIDO KEINOSUKE, TOYOKI YOSHIKAZU, KIJIMA HIROSHI, HAKAMADA KENICHI	4. 巻 37
2. 論文標題 Prognostic Impact of CD163+ Macrophages in Tumor Stroma and CD8+ T-Cells in Cancer Cell Nests in Invasive Extrahepatic Bile Duct Cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 183 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.11304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizawa Tadashi, Ishido Keinosuke, Saito Kensuke, Haga Toshihiro, Seino Hiroko, Wu Yunyan, Morohashi Satoko, Hakamada Kenichi, Kijima Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Prognostic Impact of Extracapsular Lymph Node Invasion and Myofibroblastic Activity in Extrahepatic Bile Duct Cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Med Insights Pathol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1179555717729652	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wu Y
2. 発表標題 BHLH transcription factors DEC1 and DEC2: From structure to various diseases.
3. 学会等名 International Conference on Biomedical and Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yunyan Wu, Qiang Liu, Hiroko Seino, Shintaro Goto, Toshihiro Haga, Tadashi Yoshizawa, Hiroshi Kijima
2. 発表標題 DEC1 and DEC2 regulate apoptosis in human prostate cancer cells
3. 学会等名 第107回 日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Qiang Liu, Tadaatsu Imaizumi, Hiroshi Tanaka, Yunyan Wu, Tadashi Yoshizawa, Satoko Morohashi, Hiroko Seino, Hiroshi Kijima
2. 発表標題 DEC1 negatively regulates expression of CXCL10 and CCL5 induced by poly IC in human mesangial cells
3. 学会等名 第106回 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tadashi Yoshizawa, Satoko Morohashi, Toshihiro Haga, Hiroko Seino, Yunyan Wu, Hiroshi Kijima
2. 発表標題 Dedifferentiated liposarcoma of the pancreas: A case report
3. 学会等名 第106回 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Satoko Morohashi, Masanori Tanaka, Tadashi Yoshizawa, Hiroko Seino, Yunyan Wu, Hiroshi Kijima
2. 発表標題 Morphological analysis of the residual rectal mucosa in 12 postoperative ulcerative colitis patients
3. 学会等名 第106回 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----