

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度

課題番号：20791368

研究課題名(和文) 口腔癌の病態進展に関わる日内リズムの分子機構の確立

研究課題名(英文) The establishment of molecular mechanisms of circadian rhythm in oral cancer cells

研究代表者 佐藤 冬樹 (SATO FUYUKI)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60400131

研究成果の概要(和文)：口腔癌における転写因子 DEC の意義は、未だ明らかでない。本研究では、口腔癌細胞で、DEC が日内リズムを形成し、血管新生因子 VEGF と細胞増殖制御因子 cyclinD1 を negative に制御することを示した。また、口腔癌手術標本で、DEC1 は非腫瘍部位よりも、腫瘍部位で有意に発現が高かった。これらの結果から、口腔癌の発育進展機構に DEC が関与し、今後の口腔癌の治療において、新たな分子標的となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has not been well understood about the significance of the transcription factor DEC expression in oral cancer. We showed that DEC has circadian rhythm in oral cancer cells, and negatively regulates VEGF and cyclinD1 expression. In addition, the protein expression of DEC1 was intensely stained in the tumor regions compared with those in non-tumor regions. These results suggest that DEC1 plays important roles of the tumor development, and would be new molecular target in oral cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：口腔癌、概日リズム、DEC、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、癌の増殖が時計遺伝子や VEGF (vascular endothelial growth factor) の日内リズムを利用することが見出された。抗腫瘍薬の投与時刻を考慮することにより、効果の増加や副作用の軽減が可能となることが知られ、医療への応用が期待されている。しかし、癌における時計遺伝子発現の意義は、未だ明らかでない。本研究では、時計遺伝子の中でも、BHLH 型転写因子 DEC に焦点をあて、口腔

癌における発育進展機構について、分子生物学的手法を用いて解析した。

2. 研究の目的

口腔癌の増殖・浸潤に関わる日内リズムの分子生物学的基盤を解明すること。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌細胞における VEGF との相互作用解析。口腔癌細胞における VEGF 発現に DEC が関与しているか解析するため、DEC1 または DEC2 発現プラスミドによる transient transfection や、siRNA

knockdown 法による DEC 発現抑制を行った。24~48 時間後に、細胞抽出液を回収した。DEC や VEGF 発現は Western blotting, real time PCR, ELISA で解析し、VEGF promoter 活性は、Luciferase assay で、タンパク質-DNA 結合は、Chip-assay により解析した。

(2) 腫瘍における日内リズム解析。ヌードマウス移植腫瘍に、マウス骨肉腫細胞を移植し、4 時間ごとに腫瘍組織をサンプリングし、半定量 PCR を行った。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞(HSC-3)細胞で高濃度血清刺激法により、日内リズムを解析した。

(3) 口腔癌手術標本における DEC タンパク質発現。口腔癌手術標本 126 症例を用い、免疫組織学的に DEC1 タンパク質発現を、非腫瘍部位および腫瘍部位で検討した。

4. 研究成果

(1) ヌードマウス移植腫瘍および口腔癌細胞で、DEC2 と VEGF は日内リズムを形成した。

(2) DEC2 が HIF-1alpha と結合し、VEGF promoter 上の HIF-1alpha の結合を解離させることで、VEGF 発現を negative に制御することを明らかにした。一方で、DEC1 の VEGF に対する影響は、ほとんど見られなかった。

(3) ヒト口腔癌組織で、免疫組織学的に、DEC1 は、非腫瘍部位よりも腫瘍部位で発現が高かった。

(4) DEC1 は、cyclinD1 の promoter 上の E-box に結合することで、cyclinD1 発現を negative に制御することを示した。

本研究の成果として、癌の発育進展における DEC の意義について、数多くの論文を報告した。申請者の DEC の機能解析の報告は、国外のグループも含めて、先進的である。近年、国外のグループから、DEC 発現が、大腸癌や肺癌、乳癌の悪性度と相関することが示唆されている。今後の口腔癌のさらなる発育進展機構の解明に、DEC を介する詳細な分子制御機構の解明が必要と考えられる。

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)

1. Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells. Akasaka H, Sato F et al,

BMC Cancer, 10, 548, 2010. 査読有。

2. Salmon cartilage proteoglycan suppresses mouse experimental colitis through induction of Foxp3+ regulatory T cells. Mitsui T, Sashinami H, Sato F et al, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 402, 209-215, 2010. 査読有。

3. Vimentin expression of esophageal squamous cell carcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis. Jin H, Morohashi S, Sato F et al, **Biomedical Research**, 31, 105-112, 2010. 査読有。

4. Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. Liu Y, Sato F et al, **Genes to Cells**, 15, 315-325, 2010. 査読有。

5. PERIOD1 (PER1) is an anti-apoptotic factor in human pancreatic and hepatic cancer cells. Sato F et al, **The Journal of Biochemistry**, 146, 833-838, 2009. 査読有。

6. Expression of syndecan-1 and E-cadherin is inversely correlated with poor patient's prognosis and recurrent status of extrahepatic bile duct carcinoma. Ohashi M, Kusumi T, Sato F et al, **Biomedical Research**, 30, 79-86, 2009. 査読有。

7. Liver X receptors (LXRalpha and LXRbeta) are potent regulators for hepatic Dec1 expression. Noshiro M, Usui E, Kawamoto T, Sato F et al, **Genes to Cells**, 14, 29-40, 2009. 査読有。

8. *In vivo* chemotherapeutic profile of human gallbladder small cell carcinoma.

- Nishime C, Ohnishi Y, Suemizu H, Tamaoki N, Kusumi T, Sato F et al, **Biomedical Research**, 29, 251-256, 2008. 査読有。
9. Claudin-1 expression is induced by tumor necrosis factor-alpha in human pancreatic cancer cells. Kondo J, Sato F et al, **International Journal of Molecular Medicine**, 22, 645-649, 2008. 査読有。
10. Immunohistochemical detection of carcinoma in radical prostatectomy specimens following hormone therapy. Kusumi T, Koie T, Matsumoto K, Tanaka M, Sato F et al, **Pathology International**, 58, 687-694, 2008. 査読有。
11. Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in sophageal squamous cell carcinoma. Miyamoto K, Kusumi T, Sato F et al, **Biomedical Research**, 29, 71-76, 2008. 査読有。
12. Establishment of transplantable murine osteosarcoma cell line with endochondral ossification. Nishi T, Kusumi T, Tanaka M, Sato F et al, **Anticancer Research**, 28, 1627-1631, 2008. 査読有。
13. Period is involved in the proliferation of human pancreatic MIA-PaCa2 cancer cells by TNF-alpha. Suzuki T, Sato F et al, **Biomedical Research**, 29, 99-103, 2008. 査読有。
14. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression. Sato F et al, **Genes to Cells**, 13, 131-144, 2008. 査読有。
- [学会発表] (計 6 件)
1. PERIOD1 (PER1) has an anti-apoptotic, and PER3 has a pro-apoptotic effect by cisplatin in human gingival cancer cells. 佐藤冬樹、第 69 回日本癌学会学術総会 (2010 年 9 月 24 日)、大阪。
 2. Expression of DEC in tumor progression. 佐藤冬樹、第 99 回日本病理学会総会 (2010 年 4 月 29 日)、東京。
 3. Expression of clock genes and tumor progression. 佐藤冬樹、第 32 回日本分子生物学会 (2009 年 12 月)、横浜。
 4. 膵癌細胞のアポトーシスおよび増殖に関わる *PERIOD1* 遺伝子。 佐藤冬樹、第 98 回日本病理学会総会 (2009 年 5 月)、京都。
 5. BHLH transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression. 佐藤冬樹、第 67 回日本癌学会学術総会 (2008 年 10 月)、名古屋。
 6. 低酸素下における bHLH 型転写因子 DEC2 と Vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現の制御機能。 佐藤冬樹、第 97 回日本病理学会総会 (2008 年 5 月)、金沢。
- [図書] (計 10 件)
1. 虫垂の腫瘍。 諸橋聡子、佐藤冬樹、他。 **G. I. Research** (出版社：先端医学社) 第 18 巻、77-82, 2010。
 2. 生体肝移植術が施行された成人発症 II 型シトルリン血症の 1 例。 羽賀敏博、諸橋聡子、佐藤冬樹、他。 **診断病理** (出版社：日本病理学会) 第 27 巻、100-104, 2010。
 3. 甲状腺混合性髄様・濾胞細胞癌の 1 例。 赤坂治枝、諸橋聡子、神 寛之、堤伸二、大橋大成、工藤康之、原 精一、佐藤冬樹、他。 **診断病理** (出版社：日本病理学会) 第 27 巻、115-118, 2010。
 4. 前癌病変の病理 胆道癌の前癌病変の病理。 堤 伸二、小笠原紘志、原 精一、赤坂治枝、神 寛之、工藤康之、諸橋聡子、佐藤冬樹、他。 **胆肝膵画像** (出版社：医学書院) 第 12 巻、151-159, 2010。
 5. 代謝異常の病理。 佐藤冬樹、他。 **検査と技術** (出版社：医学書院) 第 37 巻、1234-1237, 2009。
 6. 消火器癌外科切除材料の取り扱いと肉眼診断。 原 精一、諸橋聡子、大橋大成、神 寛之、赤坂治枝、工藤康之、佐藤冬樹、他。 **臨床消化器内科** (出版社：日本メディカルセンター) 第 24 巻、615-618, 2009。
 7. 消火器癌外科切除材料の取り扱いと肉眼

- 診断。原 精一、諸橋聡子、大橋大成、神 寛之、赤坂治枝、工藤康之、佐藤冬樹、他。**臨床消化器内科**（出版社：日本メディカルセンター）第24巻、501-508, 2009.
8. 早期胃癌の病理—生検材料の取り扱いと病理診断に際しての留意点。工藤康之、原 精一、赤坂治枝、神 寛之、大橋大成、佐藤冬樹、他。**胃と腸**（出版社：医学書院）第44巻、472-478, 2009.
9. 腫瘍血管新生—VEGFに関する最近の知見—佐藤冬樹、他。**病理と臨床** 第26巻、516-517, 2008.
10. 胆道生検の読み方。大橋大成、神 寛之、赤坂治枝、工藤康之、佐藤冬樹、他。**G. I. Research** 第16巻、63-72, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~patho2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 佐藤 冬樹 (SATO FUYUKI)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60400131

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：