

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592717

研究課題名(和文) エピジェネティック解析および*in vivo*イメージングによるDEC2の分子機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic mechanism of transcription factor DEC2 regulation in cancer cells

研究代表者

Bhawal Ujjal (Bhawal, Ujjal)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：50433339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：DEC2の発現が消失している一部の口腔扁平上皮癌細胞株に、DNAメチル化阻害剤(5-アザ-2'-デオキシシチジン、以下5-Aza)やヒストン脱アセチル化阻害剤(trichostatin A、以下TSA)を処理することでDEC2発現が回復し、また、Human Methylation Bead Chipを用いてメチル化解析を行い、DEC2がエピジェネティックな制御を受ける遺伝子の候補となることが示唆された。さらに、口腔扁平上皮癌細胞株を移植したマウスに放射線照射し、低酸素領域および低酸素関連遺伝子の発現への放射線照射の影響を解析し、放射線照射によるDEC2の発現が増加することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 (BHLHB3/Sharp1) regulates cell proliferation and apoptosis. In this study, we showed that cell treatment with the demethylating agent 5-aza-2-deoxycytidine and histone-deacetylating agent TSA resulted in the recovery of DEC2 mRNA and protein expression in some oral cancer cell lines. Hypermethylated CpG island sequences encompassing the DEC2 gene promoter were identified. Furthermore, mice implanted with oral cancer cell lines induced the expression of DEC2 and other hypoxia-related genes. Thus, our data showed the state of hypermethylation of CpG islands in the DEC2 gene promoter region and the irradiation effect on DEC2 expression in oral cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：転写因子 DEC2 エピジェネティック解析 放射線照射

### 1. 研究開始当初の背景

bHLH (塩基性ドメイン - ヘリックス - ループ - ヘリックス) 型転写因子 DEC は、概日リズム調節に関与する時計遺伝子であると同時に、低酸素応答、免疫機能、分化、アポトーシス、癌と転移にも関与している。申請者らの最近の研究で、低酸素によって誘導された DEC2 が VEGF

(Vascular endothelial growth factor, 血管内皮増殖因子) 発現を負に制御することを報告した (Sato F, Bhawal UK et al. *Genes Cells* 13; 131-144: 2008)。低酸素条件下で誘導された HIF-1 は HRE (hypoxia response element) に結合することで VEGF の転写活性化を起こすが、そのとき DEC2 は HIF-1 への結合を介して HIF による転写活性化を抑制する機能を有する。

癌組織の増殖とともに、癌組織内部は低酸素状態にさらされている。そして癌進展において、低酸素により誘導された HIF-1 が VEGF の転写を促進する結果、癌組織内部の血管新生を促進し癌の浸潤・転移を引き起こしている。そこで、癌進展抑制の観点から、申請者らは、VEGF の転写を負に制御する DEC2 を標的とした分子治療を目指し、基礎的研究を行っている。DEC2 の発現は、正常組織に比べ癌組織では低いことが報告されており、それに関連し申請者は、DEC2 の発現が消失している一部の口腔扁平上皮癌細胞株に、DNA メチル化阻害剤 (5-アザ-2'-デオキシシチジン、以下 5-Aza) やヒストン脱アセチル化阻害剤 (trichostatin A、以下 TSA) を処理することで DEC2 発現が回復し、DEC2 がエピジェネティックな制御を受ける遺伝子の候補となる可能性を示唆する予備データを得ている。

### 2. 研究の目的

本研究は口腔癌における DEC2 のエピジェネティックな制御機構の解明、また *in*

*vivo* にて口腔癌における DEC2 を含む低酸素関連遺伝子の経時的な発現機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

1. DEC2 のエピジェネティックな制御機構の解明

(1) バイサルファイトシークエンシング法を用いて口腔扁平上皮癌細胞株およびヒト癌組織における DEC2 の DNA メチル化を明らかにする。

(2) Methylation Bead Chip を用いて口腔扁平上皮癌細胞株における DEC2 のメチル化を明らかにする。

(3) Chip-on-chip を用いて、口腔扁平上皮癌におけるメチル化、ヒストン修飾、DNA 複製/修飾/修復といった主要メカニズムを明らかにする。

2. *In vivo* 光イメージングを用いた低酸素領域および低酸素関連遺伝子の解析

(1) 低酸素応答レポーター

5HRE-Luciferase を用いて、*In vivo* 光イメージングより経時的な低酸素領域を明らかにする。また、それに伴う、低酸素関連遺伝子の発現を明らかにする。

(2) 融合タンパク質プローブを用いて、*In vivo* 光イメージングより経時的な低酸素領域を明らかにする。

3. 放射線照射による低酸素領域および低酸素関連遺伝子の解析

放射線照射による口腔扁平上皮癌の低酸素領域および低酸素関連遺伝子発現に及ぼす効果を、*In vivo* 光イメージングより明らかにする。

### 4. 研究成果

DEC2 の発現が消失している一部の口腔扁

平上皮癌細胞株に、DNA メチル化阻害剤 (5-アザ-2'-デオキシシチジン、以下 5-Aza) やヒストン脱アセチル化阻害剤 (trichostatin A、以下 TSA) を処理することで DEC2 発現が回復し、また、Human Methylation Bead Chip を用いてメチル化解析を行い、DEC2 がエピジェネティックな制御を受ける遺伝子の候補となることが示唆された。さらに、口腔扁平上皮癌細胞株を移植したマウスに放射線照射し、低酸素領域および低酸素関連遺伝子の発現への放射線照射の影響を解析し、放射線照射による DEC2 の発現が増加することが示唆された。

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 16 件)

1. Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. Sasahira T, Ueda N, Kurihara M, Bhawal UK (他 5 名) *Human Pathology* 2013; 44(6): 1098-1106. 査読有り
2. Expression of caveolin-1 in the early phase of beta-TCP implanted in dog mandible. Chou CT, Bhawal UK (他 5 名) *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2013; 101(5): 804-812. 査読有り
3. Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma. Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Bhawal UK (他 3 名) *Clinical and Experimental Metastasis* 2013; 30(2): 165-176. 査読有り
4. Silk fibroin-based scaffolds for bone regeneration. Kuboyama N, Kiba H, Arai K, Uchida R, Bhawal UK (他 5 名) *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2013; 101(2): 295-302. 査読有り
5. The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. Wu Y, Sato F, Yamada T, Bhawal UK (他 9 名) *International Journal of Oncology* 2012; 41(4): 1337-1346. 査読有り
6. The basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 inhibits TGF- $\beta$ -induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells. Sato F, Kawamura H, Wu Y, Sato H, Jin D, Bhawal UK (他 7 名) *International Journal of Molecular Medicine* 2012; 30(3): 495-501. 査読有り
7. IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of DEC1 in human gingiva cells via the Akt pathway. Bhawal UK (他 11 名) *Journal of Cellular Biochemistry* 2012; 113(10): 3246-3253. 査読有り
8. BHLH transcription factor DEC2 regulates pro-apoptotic factor Bim in human oral cancer HSC-3 cells. Wu Y, Sato F, Bhawal UK (他 7 名) *Biomedical Research* 2012; 33(2): 75-82. 査読有り
9. Smad3 and Snail show circadian expression in human gingival fibroblasts, human mesenchymal stem cell, and in mouse liver. Sato F, Sato H, Jin D, Bhawal UK (他 8 名) *Biochemical and Biophysical*

- Research Communications* 2012; 419(2): 441-446. 査読有り
10. Identification by DNA microarray of genes involved in *Candida albicans*-treated gingival epithelial cells. Ikuta T, Bhawal UK (他 4 名) *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2012; 41(10): 769-778. 査読有り
  11. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates CyclinD1. Bhawal UK (他 15 名) *Journal of Pathology* 2011; 224(3): 420-429. 査読有り
  12. Increased telomerase activity and hTERT expression in human salivary gland carcinomas. Shigeishi H, Sugiyama M, Tahara H, Ono S, Bhawal UK (他 8 名) *Oncology Letters* 2011; 2(5): 845-850. 査読有り
  13. PERIOD1 (PER1) has anti-apoptotic effects, and PER3 has pro-apoptotic effects during cisplatin (CDDP) treatment in human gingival cancer Ca9-22 cells. Sato E, Wu Y, Bhawal UK (他 5 名) *European Journal of Cancer* 2011; 47(11): 1747-1758. 査読有り
  14. Basic helix loop helix transcription factors DEC1 and DEC2 regulate the paclitaxel induced apoptotic pathway of MCF-7 human breast cancer cells. Wu Y, Sato E, Bhawal UK (他 6 名) *International Journal of Molecular Medicine* 2011; 27(4): 491-495. 査読有り
  15. Transcriptome analysis of beta-TCP implanted in dog mandible. Zhao J, Watanabe T, Bhawal UK (他 2 名) *Bone* 2011; 48(4): 864-877. 査読有り
  16. Down-regulation of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) associated with poor prognosis of adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland. Sasahira T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK (他 2 名) *Cancer Science* 2011; 102(2): 492-497. 査読有り
- [学会発表](計 21 件)
1. Bhawal UK. Transcription factor DEC1 and Epithelial-Mesenchymal Transition. 第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 6 日、神戸国際会議場、神戸、兵庫。
  2. Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. Prox1 and FOXC2 act as regulator of lymphangiogenesis and angiogenesis in oral cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜、横浜、神奈川。
  3. Bhawal UK, Kuboyama N, Abiko Y. Effect of protamine-hydrolysate peptide (DMX) in oral hygiene. FDI Annual World Dental Congress. 2013 年 08 月 30 日、Istanbul, Turkey.
  4. Bhawal UK, Fukuoka CY, Abiko Y. Epigenetic regulation of CXCL14 expression in oral cancer. IADR Asia-Pacific Region, 2013 年 8 月 21 日、Plaza Athenee, Bangkok, Thailand.
  5. Bhawal UK, Abiko Y. Transcription factor DEC1 and Epithelial-Mesenchymal Transition. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. 2013 年 03 月 23 日、

- Washington State Convention Center,  
Seattle, Washington, USA.
6. Bhawal UK, Abiko Y. Molecular mechanism of transcription factors DEC1 and DEC2 in cancer. 日本分子生物学会、2012年12月14日、福岡国際会議場、福岡。
  7. Bhawal UK, Abiko Y. IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of DEC1 in gingiva cells via Akt pathway. アメリカ歯周病学会共催 日本歯周病学会、2012年10月02日、Los Angeles Convention Center, Los Angeles, CA, USA.
  8. Sasahira T, Bhawal UK, Kurihara M, Ueda N, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H. Expression of TANGO in oral cancer. 日本癌学会学術総会、2012年09月21日、ホテルロイトン札幌、北海道。
  9. Bhawal UK, Ito Y, Sasahira T, Kuniyasu H, Abiko Y. Smad3 shows circadian expression in human gingival fibroblasts and human mesenchymal stem cells. 日本癌学会学術総会、2012年09月21日、ホテルロイトン札幌、北海道。
  10. Bhawal UK, He D, Hamada N, Kuboyama N, Abiko Y, Arakawa H. Micromolar level NaF promotes epithelial cell growth and reduces Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. FDI Annual World Dental Congress. 2012年09月01日、Hong Kong Convention and Exhibition Centre, Hong Kong, China.
  11. Bhawal UK, Abiko Y. Functional analysis of transcription factors DEC1 and DEC2 in tumor. 国際歯科研究学会議(IADR)、2012年06月23日、イグアスフォールズ、ブラジル。
  12. He D, Bhawal UK, Arakawa Y, Abiko Y, Arakawa H. Micromolar Fluoride Reduces Alveolar Bone Loss in Experimental Rat Periodontitis. 日本口腔衛生学会総会、2012年05月27日、神奈川歯科大学、横須賀、神奈川。
  13. Bhawal UK, He D, Arakawa Y, Arakawa H, Abiko Y. Identification by DNA microarray of genes involved in micromolar level NaF-treated epithelial cells. 日本口腔衛生学会総会、2012年05月27日、神奈川歯科大学、横須賀、神奈川。
  14. パワール ウジャール、伊藤由美、安孫子宜光。口腔扁平上皮癌における CXCL14 のエビジェネティクス機構を介した遺伝子発現制御。日本病理学会総会、2012年04月28日、京王プラザホテル、東京。
  15. Sato F, Wu Y, Bhawal UK, Kato Y, Kijima H. Functional analysis of BHLH transcription factor DEC1 and DEC2 in tumor. 第34回日本分子生物学会年会(招待講演)、2011年12月14日、パシフィコ横浜、横浜、神奈川。
  16. Bhawal UK, Sato F, Sasahira T, Ito Y, Kuniyasu H, Kijima H, Abiko Y. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC1 regulates CyclinD1 expression through E-box element. 第70回日本癌学会学術総会(招待講演)、2011年10月5日、名古屋国際会議場、名古屋、愛知。

17. Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H. Functional analysis of miR-126 in oral cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会(招待講演) 2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場、名古屋、愛知。
18. Fujii K, Luo Y, Bhawal UK, Yoshikawa M, Maruyama H, Chihara Y, Kuniyasu H. Anti-angiotensin and hypoglycemic treatments suppress liver metastasis of colon cancer cells. 第 70 回日本癌学会学術総会(招待講演) 2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場、名古屋、愛知。
19. Bhawal UK、伊藤由美、安孫子宜光。ヒト口腔扁平上皮癌における PERIOD (PER1) と PER3 の発現。第 53 回歯科基礎医学会(招待講演) 2011 年 10 月 2 日、長良川国際会議場、岐阜、愛知。
20. Bhawal UK, Tsushima K, Ikuta T, Abiko Y. IL-8 signaling pathway in gingival epithelial cells in response to Candida albicans. 第 59 回 国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術(招待講演) 2011 年 10 月 9 日、広島国際会議場、広島。
21. Bhawal UK、伊藤由美、安孫子宜光。炎症における DEC1 と DEC2 の役割。第 53 回歯科基礎医学会(招待講演) 2011 年 10 月 2 日、長良川国際会議場、岐阜、愛知。

〔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  
パワール ウジャール (Bhawal Ujjal)  
研究者番号：50433339  
日本大学・松戸歯学部・助教

(2)研究分担者  
佐藤冬樹 (Sato Fuyuki)  
研究者番号：60400131  
弘前大学・医学部・助教

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：