

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870028

研究課題名(和文) 乳癌の微小環境を制御する時計遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of clock genes in regulating the microenvironment of breast cancer

研究代表者

呉 雲燕 (Wu, Yunyan)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：40636586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト乳癌細胞において、時計遺伝子DEC2は、低酸素条件下での癌細胞のcell viabilityを促進することが明らかにした。DEC2はHIF-2^α-Akt-c-myc経路における、Aktの下流因子として、細胞増殖に関わるc-myc遺伝子の転写を促進した。

また、ヒト食道癌細胞において、DECが、EMT (epithelial-mesenchymal transition) 誘導因子の一つであるTGF- β のエフェクターとして働いていることを明らかにした。一方、DEC1過剰発現では、リンパ管マーカーであるpodoplaninと正の相関を有し、DEC2では、負の相関を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on analyzing the roles of clock genes in human breast cancer. The expression of DEC2 as well as the cell viability was upregulated when exposed MCF-7 cells to hypoxia (3% O₂). Hypoxia caused the phosphorylation of Akt. DEC2 functioned as a target of the PI3K/Akt pathway and regulated the expression of c-Myc and contributed to the hypoxia-induced proliferation of MCF-7 cells.

In human esophageal carcinoma cells, DEC1 and DEC2 functioned as effectors of TGF- β , an EMT (epithelial-mesenchymal transition) inducer. Additionally, DEC1 overexpression positively related to the expression of a lymphatic vessel marker podoplanin, but DEC2 exhibited an opposite effect.

研究分野：医歯薬学

キーワード：時計遺伝子 乳腺 癌微小環境 血管新生

1. 研究開始当初の背景

(1) 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血管新生因子 (VEGF, bFGF, ephrin 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。

(2) 一方、生物の生理機能・代謝・行動は、脳視床下部 (視交叉上核) で駆動されている中枢性生物時計が刻む約 24 時間周期の概日リズムにより調節されている。この生物時計 (概日リズム) は時計遺伝子の発現により制御され、その機能解析が進みつつある。申請者らは、DEC 遺伝子 (DEC1 および DEC2) が時計遺伝子ファミリーに属することを解明し、さらに変異型 DEC 遺伝子を用いて時計遺伝子のフィードバック機構について明らかにするなど、DEC 遺伝子解析に関しては世界に先駆けた研究を行い、評価を受けている (Int J Mol Med, 2006; Eur J Biochem, 2004; Nature, 2002)。さらに申請者らは、DEC が概日リズム (生物時計) の調節に加えて、血管新生・アポトーシス制御や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, 2010; Genes Cells, 2008)。

(3) 国内外を含め、癌細胞において時計遺伝子が発現しているとの報告が散見された段階であり、癌微小環境と時計遺伝子との直接的な関連性を示す報告はほとんど無い。さらに DEC については時計遺伝子の中で、最も新しい遺伝子であるため、他グループによる DEC の機能解析は極めて限られている。

2. 研究の目的

ヒト乳癌浸潤性増殖と腫瘍血管新生における時計遺伝子の機能を明らかにする。

- (1) ヒト乳癌細胞において、時計遺伝子の発現リズムに対応した癌細胞増殖・腫瘍血管新生の機序を解明する。
- (2) 癌細胞 - 間質の相互作用の機序を解明するため、乳癌細胞株と間葉系幹細胞の共培養を行い、癌細胞の増殖

における時計遺伝子の関与を明らかにする。

- (3) マウス異種移植モデルを用いて、癌微小環境の解析系を確立して、時計遺伝子発現リズムと腫瘍細胞増殖・腫瘍血管新生との関連を動的に解析する。

3. 研究の方法

ヒト乳癌の培養細胞株およびマウス異種移植モデルを用い、時計遺伝子の発現リズムによって癌細胞増殖・腫瘍血管新生を解析することで、癌微小環境の機序を解明する。

- (1) 概日リズム下で、時計遺伝子および血管新生関連因子の発現変動を解析する。
- (2) 時計遺伝子 DEC 過剰発現またはノックダウンを行い、乳癌細胞の増殖・浸潤・血管新生に対する時計遺伝子の作用機序を明らかにする。
- (3) 乳癌細胞と間葉系幹細胞との共培養での解析により、癌微小環境の解明を試みる。

4. 研究成果

- (1) ヒト乳癌細胞において、時計遺伝子 DEC2 は、低酸素条件下での癌細胞の cell viability を促進することが明らかにした。DEC2 は HIF-2 α - Akt - c-myc 経路における、Akt の下流因子として、細胞増殖に関わる c-myc 遺伝子の転写を促進した。
- (2) ヒト食道癌細胞において、時計遺伝子 DEC が、EMT (epithelial-mesenchymal transition) 誘導因子の一つである TGF- β のエフェクターとして働いていることを明らかにした。一方、DEC1 過剰発現では、リンパ管マーカーである podoplanin と正の相関を有し、DEC2 では、負の相関を有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 14 件: すべて査読あり)

1. 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.* 2016, 38(6):1727-33.
2. 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: 3154-60.
 3. 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.* 2016, 36(3):1251-7.
 4. Morohashi S, Morohashi H, Yoshizawa T, Tanaka M, Mikami T, Kagiya T, Saito T, Hirai H, Haga T, Wu Y, Hakamada K, Kijima H. Morphological analysis of the residual rectal mucosa in 12 postoperative ulcerative colitis patients. *Hirosaki Med. J.* 2016, 67(1):92-101.
 5. 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.* 2016, 37(2):77-84.
 6. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Tanaka M, Inokuchi S, Yoshizawa T, Morohashi S, Kijima H. Podoplanin-mediated TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and its correlation with bHLH transcription factor DEC in TE-11 cells. *Int J Oncol.* 2016, 48(6):2310-20.
 7. Seino H, Ono S, Miura H, Morohashi S, Wu Y, Tsushima F, Takai Y, Kijima H. Hypoxia is important in F-18 FDG accumulation in thecoma-fibroma tumors on F-18 FDG PET/CT scans. *Mol Med Rep.* 2016, 13(5):3821-7.
 8. 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, 35(5):2592-8.
 9. 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.
 10. 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):815-20.
 11. Yoshizawa T, Toyoki Y, Hirai H, Haga T, Toba T, Sakuraba S, Okano K, Wu Y, Seino H, Morohashi S, Hakamada K, Kijima H. Invasive micropapillary carcinoma of the extrahepatic bile duct and its malignant potential. *Oncol Rep.* 2014, 32(4):1355-61.
 12. Seino H, Ono S, Miura H, Morohashi S, Wu Y, Tsushima F, Takai Y, Kijima H. Incidental prostate ^{18}F -FDG uptake without calcification indicates the possibility of prostate cancer. *Oncol Rep.* 2014, 31(4):1517-22.
 13. Kijima H, Wu Y, Yoshizawa T, Suzuki T, Tsugeno Y, Haga T, Seino H, Morohashi S, Hakamada K. Pathological characteristics of early to advanced gallbladder carcinoma and extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014, 21(7):453-8.
 14. Takasugi K, Morohashi S, Haga T, Toba T, Seino H, Wu Y, Suzuki T, Hanabata N, Sasaki Y, Fukuda S, Kijima H. Histopathological characteristics of laterally spreading tumor (LST) type early colorectal cancer. *Hirosaki Med J.* 2014, 64: 158-69.
- 〔学会発表〕(計7件)
1. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Seino H, Morohashi S, Kijima H. TGF- β -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-2016年10月8日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 2. Kijima H, Wu Y, Yoshizawa T, Seino H, Goto S, Haga T, Morohashi S. The bHLH transcription factor DEC plays an important role in epithelial-mesenchymal transition (EMT). 21th World Congress on Advances in Oncology and 19th International Symposium on Molecular Medicine. 2016年10月6日 (Athens, Greece)
 3. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Seino H,

- Morohashi S, Kijima H. TGF- β 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)
4. Wu Y, Liu Q, Yan X, Kato Y, Yoshizawa T, Seino H, Morohashi S, Kijima H. Podoplanin-mediated TGF- β -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)
5. Wu Y, Liu Q, Hirai H, Yoshizawa T, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. DEC1 induced by E2-ER α 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)
6. Kijima H, Wu Y, Yoshizawa T, Seino H, Goto S, Haga T, Morohashi S. Clock gene product DEC, as a bHLH transcription factor, negatively regulates angiogenesis factor VEGF. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine. 2014年10月9日 (Athens, Greece)
7. Wu Y, Sato H, Murakami K, Hirai H, Yoshizawa T, Seino H, Suzuki T, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. Involvement of c-Myc in DEC2-induced cell proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. 第103回日本病理学会 2014年4月26日 広島国際会場(広島県・広島市)

〔図書〕(計1件)

1. 呉 雲燕, 鬼島 宏, 医学書院, 泌尿器病理診断トレーニング, 2016年 pp219-222

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

呉 雲燕 (WU YUNYAN)
 弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 40636586

(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

()