

expression of DEC1 did not affect the migration of cells (data not shown). dnDEC1 thus prevented the metastasis of JygMC(A) cells through loss of resistance to apoptosis and not through reduction of cancer cell motility.

Several molecules have been reported to be involved in the metastasis induced by TGF- $\beta$ . Blockade of TGF- $\beta$  signaling by dnT $\beta$ R-II results in decrease in the secretion of parathyroid hormone-related protein and prevention of bone metastasis (43). Multiple secreted and cell surface proteins, including CTGF and interleukin 11, have been shown to coordinately regulate the osteolytic metastasis of breast cancers (44). In addition to these secreted and cell surface molecules, the homeodomain transcription factor CUTLI/CDP/Cux-1 was shown to be induced by TGF- $\beta$  and to affect the motility and invasion of breast carcinomas (45). Yang et al. (46) also reported that the transcription factor Twist induces EMT and plays an essential role in the metastasis of breast carcinoma. In our microarray experiment (Supplementary Table S1), however, only CTGF, but not other candidate genes, was significantly regulated by TGF- $\beta$  signaling. Metastases are induced in multiple steps, and different molecules may be involved in organ-specific metastases (47). Our findings suggest that DEC1 may

participate in the process of metastasis of breast cancers through induction of cell survival.

In conclusion, the findings of the present study show that activation of endogenous TGF- $\beta$  signaling in cancer cells is in certain conditions important for their survival and metastasis. TGF- $\beta$  mediates survival signals through its downstream target DEC1, suggesting that suppression of DEC1 function may be a novel strategy for treatment of lung and liver metastasis of breast cancer.

## Acknowledgments

Received 4/25/2007; revised 7/13/2007; accepted 8/7/2007.

Grant support: Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Dr. H. Azuma (Osaka Medical College, Takatsuki, Japan) for the JygMC(A) cell line; Drs. Y. Hamashima, T. Kajimoto, and M. Node (Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, Japan) for A-44-03; Dr. S. Horie (Teikyo University, Tokyo, Japan) for valuable discussion; and Dr. H. Meguro (University of Tokyo, Tokyo, Japan) for microarray analysis; M. Takahata, N. Kanenawa, E. Kobayashi, and Y. Yunki for technical assistance; and all members of the Biochemistry Laboratory of the JFCR.

## References

- Mehlen R, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006;6:449-58.
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 2003;425:577-84.
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.
- Wakefield LM, Roberts AB. TGF- $\beta$  signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:22-9.
- Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGF $\beta$ : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:506-20.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF- $\beta$  receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268:1336-8.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-3.
- Sanchez-Capelo A. A dual role for TGF- $\beta$ 1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:15-34.
- Perleman R, Schlemmer WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF- $\beta$ -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 2001;3:708-14.
- Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF- $\beta$  signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:1011-22.
- Bandyopadhyay A, Agyin JK, Wang L, et al. Inhibition of pulmonary and skeletal metastasis by a transforming growth factor- $\beta$  type I receptor kinase inhibitor. *Cancer Res* 2006;66:6714-21.
- Ge R, Rajeev V, Ray R, et al. Inhibition of growth and metastasis of mouse mammary carcinoma by selective inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  type I receptor kinase *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2006;12:4315-30.
- Ehata S, Hanyu A, Fujime M, et al. K126894, a novel transforming growth factor- $\beta$  type I receptor kinase inhibitor, inhibits *in vitro* invasion and *in vivo* bone metastasis of a human breast cancer cell line. *Cancer Sci* 2007;98:127-33.
- Azuma H, Ehata S, Miyazaki H, et al. Effect of Smad7 expression on metastasis of mouse mammary carcinoma JygMC (A) cells. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1734-46.
- Currie MJ, Hanrahan V, Gunningham SP, et al. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) and the HIF-1 $\alpha$  target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2004;57:829-34.
- Chakrabarti J, Turley H, Campo L, et al. The transcription factor DEC1 (stra13, SHARP2) is associated with the hypoxic response and high tumour grade in human breast cancers. *Br J Cancer* 2004;91:954-8.
- Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, et al. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor- $\beta$ . *Cancer Sci* 2005;96:791-800.
- Matsuyama S, Iwadate M, Kondo M, et al. SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor- $\beta$ -induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res* 2003;63:7791-8.
- Takeda M, Mizukida M, Oka M, et al. Interaction with Smad4 is indispensable for suppression of BMP signaling by *c-Ski*. *Mol Biol Cell* 2004;15:963-72.
- Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF- $\beta$  signaling. *J Cell Sci* 2000;113:1101-9.
- Bruno A, Darken RS, Rojo F, et al. High TGF $\beta$ -Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* 2007;11:147-60.
- Lei X, Bandyopadhyay A, Le T, Sun L. Autocrine TGF $\beta$  supports growth and survival of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Oncogene* 2002;21:7514-23.
- Wieser R, Attisano L, Wrana JL, Massagué J. Signaling activity of transforming growth factor  $\beta$  type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic region. *Mol Cell Biol* 1993;13:7239-47.
- Sato F, Kawamoto T, Fujimoto K, et al. Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1. *Eur J Biochem* 2004;271:4409-19.
- Shin I, Bakin AV, Rodeck U, Brunet A, Arteaga CL. Transforming growth factor  $\beta$  enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHRL1. *Mol Biol Cell* 2001;12:3328-39.
- Horowitz JC, Lee DY, Waghay M, et al. Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor- $\beta$ 1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J Biol Chem* 2004;279:1359-67.
- Ivanova AV, Ivanov SV, Danilkovitch-Mitkova A, Lerman MI. Regulation of STRA13 by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, hypoxia, and the UBC9/ubiquitin proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* 2001;276:15306-15.
- Turley H, Wykoff CC, Troup S, Watson PH, Gatter KC, Harris AL. The hypoxia-regulated transcription factor DEC1 (Stra13, SHARP-2) and its expression in human tissues and tumors. *J Pathol* 2004;203:806-13.
- Sun H, Lu B, Li RQ, Flavell RA, Thesja R. Defective T cell activation and autoimmune disorder in Stra13-deficient mice. *Nat Immunol* 2001;2:1040-7.
- Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, et al. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 2002;419:841-4.
- Iwata T, Kawamoto T, Sasabe E, et al. Effects of overexpression of basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Eur J Cell Biol* 2006;85:423-31.
- Zawel L, Yu J, Torrance CJ, et al. DEC1 is a downstream target of TGF- $\beta$  with sequence-specific transcriptional repressor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2848-53.
- Wykoff CC, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe FJ. Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene* 2000;19:6297-305.
- Yoon DY, Buchler P, Saarikoski ST, Hines OJ, Reber HA, Hankinson O. Identification of genes differentially induced by hypoxia in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:882-6.
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. DEC1 (STRA13) protein expression relates to hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  and carbonic anhydrase-9 overexpression in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2003;200:222-8.
- Preusser M, Birner P, Ambros IM, et al. DEC1 expression in 1p-aberrant oligodendroglial neoplasms. *Histol Histopathol* 2005;20:1173-7.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Polychronidis A, et al. Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. *Cancer Sci* 2006;97:582-8.
- Li Y, Zhang H, Xie M, et al. Abundant expression of Dec1/stra13/sharp2 in colon carcinoma: its antagonizing role in serum deprivation-induced apoptosis and

- selective inhibition of procaspase activation. *Biochem J* 2002;367:413-22.
39. Shen M, Kawamoto T, Yan W, et al. Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:294-8.
40. Li Y, Xie M, Song X, et al. DEC1 negatively regulates the expression of DEC2 through binding to the E-box in the proximal promoter. *J Biol Chem* 2003;278:16899-907.
41. Yamada K, Ogata-Kawata H, Matsumura K, Miyamoto K. SHARP-2/Stral3/DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *FEBS Lett* 2005;579:1509-14.
42. Li Y, Xie M, Yang J, et al. The expression of antiapoptotic protein survivin is transcriptionally up-regulated by DEC1 primarily through multiple *sp1* binding sites in the proximal promoter. *Oncogene* 2006; 25:3296-306.
43. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, et al. TGF- $\beta$  signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 1999; 103:197-206.
44. Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al. A mitogenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;3:537-49.
45. Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, et al. CUTL1 is a target of TGF $\beta$  signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 2005;7:521-32.
46. Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-39.
47. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest* 2005;115:44-55.

## 軟骨/骨/脂肪/他組織での転写因子 DEC1/DEC2 の役割

加藤 幸夫

DEC1 (Differentiated Embryonic Chondrocyte expressed gene-1) はヒト軟骨で発現が亢進する遺伝子として、サブトラクシヨンの変法でクローニングした bHLH とオレンジドメインをもつ転写因子である<sup>1,2)</sup>。一方、オルソログであるマウス STRA13, ラット SHARP2 も独立して報告されたものの、われわれの DEC1 の報告が最も早かった。われわれはさらに、bHLH ドメインがほとんど同一であるが他領域の配列が異なる DEC2 のクローニングにも成功した<sup>3,4)</sup>。SHARP1 は DEC2 と類似しているが、SHARP1 は DEC2 の短い minor transcript あるいはクローニング中のアーティファクトであることがわかった<sup>3)</sup>。さらにわれわれは命名委員会と協議して、DEC1 を BHLB2, DEC2 を BHLH3 と番号化した<sup>5)</sup>。さらに DEC1 遺伝子は HES/Hairy 遺伝子らとも構造類似性を示した<sup>5)</sup>。DEC1/DEC2 はヒストン脱アセチル化酵素である HDAC や Sirt1 などと結合し、したがって一部の標的遺伝子への転写抑制作用はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA) により減少する。

本総説では、軟骨/骨/脂肪/筋肉での DEC1/DEC2 の作用を中心に紹介し、転写因子としての一般的な特徴についても簡潔に述べる。

### 1 成長板, 静止軟骨での軟骨分化に 及ぼす DEC の作用

ATDC5 軟骨細胞培養系および間葉系幹細胞の

軟骨分化系で、DEC1 の発現レベルは分化を促進するインスリン、TGF- $\beta$ 、BMP2 により上昇して、ATDC5 の分化を抑制する PTH/PTHrP により低下した<sup>1)</sup>。また DEC1 の強制発現は、アグリカン軟骨基質の合成を促進するのみならず、肥大化(アルカリホスファターゼ、X 型コラーゲン)と石灰化をも促進した。しかし静止軟骨細胞培養系では、DEC1 はアグリカン合成を促進したものの、肥大化と石灰化を誘導しなかった(Iwata ら)。つまり、発生過程の成長軟骨や成長板では DEC1 は内軟骨性骨形成の全体を促進するものの、永久軟骨では基質合成のみを促進して異所性に石灰化を誘起しなかった。

軟骨は本来血管が乏しく、代謝が低酸素に順応できる。また低酸素応答転写因子である HIF-1 $\alpha$  は軟骨細胞の分化、生存に重要な役割を果たしている<sup>6-8)</sup>。培養系で低酸素はアグリカン合成を促進したが、肥大化を抑制した<sup>9)</sup>。この低酸素の作用の一部は sox9 が仲介していると推察されているが<sup>9)</sup>、一方で HIF-1 $\alpha$  は DEC1/DEC2 プロモータ上の低酸素応答エレメント (HRE) に結合して、DEC1/DEC2 の発現を誘導する<sup>10)</sup>。したがって、低酸素による軟骨分化の促進にも DEC1/DEC2 が関与していると考えられる(図 1)。ただしインスリン存在下では、低酸素はむしろインスリンの軟骨分化促進作用を抑制した。これは両者の軟骨促進作用が ARNT を必要として、ARNT に対して競合的に作用するためでないかと示唆されている<sup>8,11)</sup>。

Role of DEC1/DEC2 in cartilage, bone, adipose tissue and other tissues

Yukio Kato : 広島大学 大学院医歯薬学総合研究科 口腔生化学 (〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3)

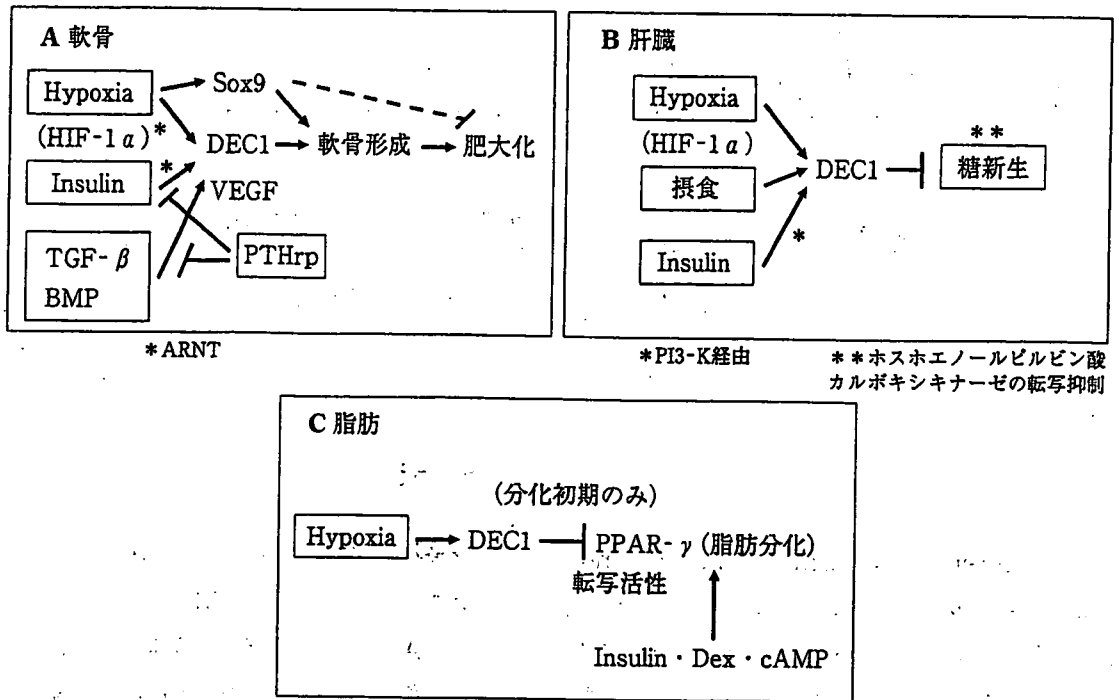


図1 低酸素とインスリンはDEC1を仲介して共通作用を誘導する

マウス<sup>12)</sup>, ウサギ, ヒトのほか, ゼブラフィッシュでもDEC1は軟骨/脊索で高レベルに発現しており, 脊椎動物の軟骨発生/形成にはDEC1が関与していると推察される。しかしDEC1ノックアウトマウスで骨成長障害が観察されないことから, 骨格でのDEC1の作用は, DEC2または他の転写因子と重複している可能性がある。

## 2 軟骨代謝の概日リズムにおけるDECの役割

われわれは成長板で200以上の遺伝子が概日リズム発現を示すことを明らかにした<sup>13)</sup>。これらの遺伝子の多くは, 時計エレメントであるCACG-TG-E-box, D-box, RREを時計時刻依存性に有している。また, DEC1はこれらの概日リズム遺伝子のCACGTG-E-boxに結合して転写を制御することが, Chipアッセイ系およびレポータアッセイ系などで判明した。つまり, 他の時計遺伝子とともにDEC1/DEC2は軟骨細胞の分裂, 基質合成, 肥大化, 石灰化, アポトーシスの概日リズムに関与していることが明らかになった。

## 3 脂肪, 筋肉分化におけるDECの役割

間葉系幹細胞では, 線維芽細胞よりもDEC1/DEC2の発現レベルは5-10倍高い。これは間葉系幹細胞の増殖, 老化, 分化にDEC1/DEC2が関与していることを示唆している。軟骨, 骨分化の過程でDEC1の発現レベルは上昇して, 脂肪分化では初期のみ減少<sup>14)</sup>, 筋肉分化過程では変化しなかった。

軟骨/骨分化誘導培地の存在下で間葉系幹細胞でのDEC1の強制発現は, 軟骨分化を顕著に促進するとともに骨分化を助長した。しかし, DEC1の強制発現のみで軟骨, 骨分化を誘導しなかった<sup>1,14)</sup>。つまりDEC1/DEC2は分化の決定因子ではなく, 分化速度の制御因子である。しかし間葉系幹細胞でのDEC1の強制発現は, 脂肪分化と筋肉分化を抑制した<sup>14,15)</sup>。すなわちDECは脂肪, 筋肉分化を抑制することで, 軟骨, 骨への分化決定を容易にする。

DEC1あるいは低酸素によるPPAR- $\gamma$ 転写活性および脂肪分化の抑制は分化初期のみ観察され, 分化後期ではインスリンでDEC1が誘導されると予想されるにもかかわらずDEC1は分化に影響しなかった(図1)。またDEC1の発現レベルは脂肪分化の初期のみ低下した<sup>14)</sup>。さらにDEC1

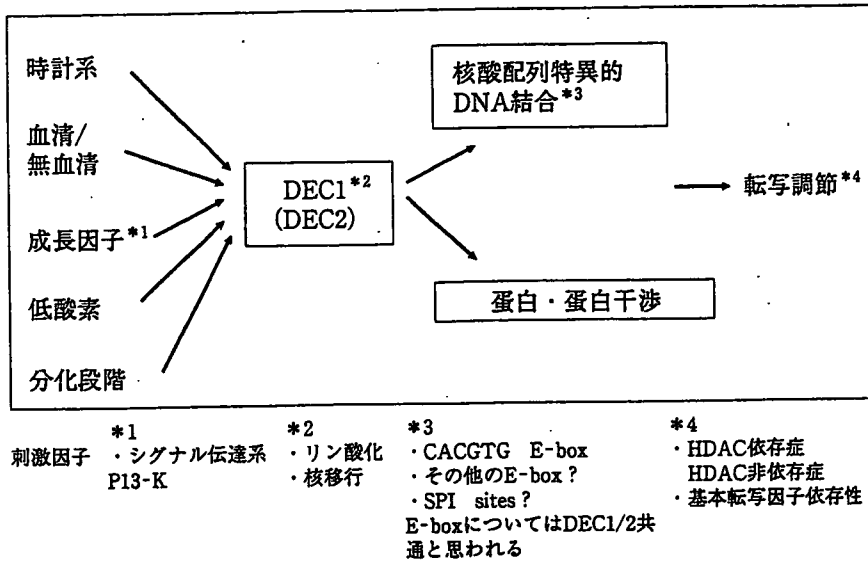


図2 DEC, DEC2の誘導因子と転写調節機構

による脂肪分化の抑制には HDAC への結合が関与しておらず, DEC1 は HAT(ヒストンアセチルトランスフェラーゼ)の補充を抑制するのではないかと推察されている<sup>16)</sup>。

一方, DEC1/DEC2 はともに MyoD と結合することにより, C2C12 細胞での MyoD/E47 の muscle creatin kinase プロモータへの結合と活性化および内在性の muscle creatin kinase mRNA の発現を抑制した<sup>15)</sup>。なおこの抑制にも HDAC は不必要であった。

#### 4 低酸素応答と DEC の作用

低酸素は HIF-1 $\alpha$  蛋白を安定化することにより, 低酸素応答配列(HRE)を介して, 低酸素関連遺伝子(CA9, VEGF, Glut-1 など)の発現を促進する。DEC1/DEC2 プロモータにも HRE が存在して, 低酸素により誘導される。しかしヒト各種組織において DEC1, HIF-1 $\alpha$ , VEGF 蛋白の発現分布は一致していなかった。がん組織の周囲でも HIF-1 $\alpha$ , CA9 が壊死組織に隣接する細胞に発現しているのに対して, DEC1 は壊死組織から離れた細胞にも発現していた。このように低酸素応答は DEC1 発現の要因の一つであるものの, 各種組織での DEC1 発現を低酸素応答だけで説明できなかった<sup>17,18)</sup>。

表1 Dec1 の作用

概日リズム制御	視交差上核, 全身の多くの細胞
増殖抑制	NIH3T3, 上皮細胞株
分化促進	軟骨, 骨, 神経
分化抑制	脂肪, 筋肉
アポトーシス	マウス T 細胞では促進
促進/抑制	(一部は STAT3 との結合, STAT1 発現抑制による) (一部は survivin 発現促進による)
免疫制御	T 細胞, B 細胞

#### 5 低酸素とインスリン応答

低酸素もインスリンも各組織(軟骨, 肝臓など)で初期に類似した遺伝子(Dec1, VEGF, Glut-1 など)を誘導する。インスリンは HIF-1 $\alpha$  に影響することなく Arnt と未知の転写因子を介して, HRE をもつこれらの低酸素遺伝子群を誘導する。また肝臓で, インスリン, 摂食, 低酸素はともに DEC1 の誘導を介して phosphoenolpyruvate carboxykinase を抑制して糖新生系を阻止する<sup>19,20)</sup>。もっとも最終的にはインスリンと低酸素は反対の作用をする(たとえばインスリンは脂肪分化と脂肪合成の促進, 低酸素はそれらの抑制)。つまり, 低酸素とインスリンへの共通応答系にのみ DEC1 が関わっていると推察される。

#### 6 DEC の多様な作用とそのメカニズム

表1に DEC の主要な作用とその標的細胞を示

した。DEC1 蛋白はリンパ節や脾臓で発現がほとんど検出できないにもかかわらず、ノックアウトマウスあるいはトランスジェニックマウスでは胸腺と脾臓で最も顕著な肉眼的変化が観察された<sup>21,22)</sup>。DEC1 は T 細胞, B 細胞の初期分化, B 細胞の後期活性化と最終分化に関与している<sup>21,22)</sup>。これには STAT への作用が関係しているかもしれない。また図 2 に, DEC の発現を制御する上流の因子と DEC の転写制御作用(下流)の基本的なメカニズムを示した。これらの詳しい説明は別の機会に行う。

#### おわりに

DEC1/DEC2 は軟骨/骨の発生, 成長に促進的に作用して, かつ成長後の概日リズムの制御にも関与している。また低酸素応答系, cAMP 系, PI 3-K 系, JAK/STAT 系と相互作用する。さらに DEC1/DEC2 は分子時計系のマスター転写因子である。つまり高次元の生体機能統合に DEC1/DEC2 が関わっていると推察される。臨床的には, DEC1/DEC2 をターゲットとした骨, 軟骨治療薬, 再生医療, 癌治療, 時間薬理学の展開が期待される。なお分子時計系での DEC1/DEC2 の役割と蛋白-蛋白間相互作用については, 本誌(生体の科学)の 58 巻 5 号で紹介する予定である。

#### ●文献

- 1) Shen M, Yoshida E, Yan W et al : *J Biol Chem* 277 : 50112-50120, 2002
- 2) Kawamoto T, Noshiro M, Sato F et al : *Biochem Biophys Res Commun* 313 : 117-124, 2004
- 3) Fujimoto K, Shen M, Noshiro M et al : *Biochem Biophys Res Commun* 280 : 164-171, 2001
- 4) Kondo J, Sato F, Fujimoto K et al : *Int J Mol Med* 17 : 1053-1056, 2006
- 5) Teramoto M, Nakamasu K, Noshiro M et al : *J Biochem* 129 : 391-396, 2001
- 6) Schipani E, Ryan HE, Didrickson S et al : *Genes Dev* 15 : 2865-2876, 2001
- 7) Pfander D, Cramer T, Schipani E, Johnson RS : *J Cell Sci* 116(Pt 9) : 1819-1826, 2003
- 8) Chen L, Fink T, Ebbesen P, Zachar V : *Connect Tissue Res* 47 : 119-123, 2006
- 9) Robins JC, Akeno N, Mukherjee A et al : *Bone* 37 : 313-322, 2005
- 10) Miyazaki K, Kawamoto T, Tanimoto K et al : *J Biol Chem* 277 : 47014-47021, 2002
- 11) Yim S, Choi SM, Choi Y et al : *J Biol Chem* 278 : 38260-38268, 2003
- 12) MacLean HE, Kronenberg HM : *Gene Expr Patterns* 4 : 633-636, 2004
- 13) 加藤幸夫, 河本 健, 本田清昌 : *Clin Calcium* 16 : 118-125, 2006
- 14) Iwata T, Kawamoto T, Sasabe E et al : *Eur J Cell Biol* 85 : 423-431, 2006
- 15) Fujimoto K, Hamaguchi H, Hashiba T et al : *Int J Mol Med* (in press)
- 16) Kim KH, Song MJ, Chung J et al : *Biochem Biophys Res Commun* 333 : 1178-1184, 2005
- 17) Preusser M, Birner P, Ambros IM et al : *Histol Histopathol* 20 : 1173-1117, 2005
- 18) Ivanova A, Liao SY, Lerman MI et al : *J Med Genet* 42 : 565-576, 2005
- 19) Kawamoto T, Noshiro M, Furukawa M et al : *J Biochem* 140 : 401-408, 2006
- 20) Yamada K, Ogata-Kawata H, Matsuura K, Miyamoto K : *FEBS Lett* 579 : 1509-1514, 2005
- 21) Seimiya M, Wada A, Kawamura K et al : *Eur J Immunol* 34 : 1322-1332, 2004
- 22) Sun H, Lu B, Li RQ et al : *Nat Immunol* 2 : 1040-1047, 2001

|||||  
シンポジウム  
|||||

## 再生医療 現在と未来 (Part 2)

— 歯科での再生医療の実現と普及への取り組み —

広島大学大学院医歯薬学総合研究科探索医科学講座 (口腔生化学)  
\*株式会社 ツーセル

加藤 幸夫 邵 金昌 桂 由紀\* 坂井 将典\*  
坂井 裕大\* 久保 裕嗣\* 辻 紘一郎\*

|||||  
シンポジウム  
|||||

## 再生医療 現在と未来 (Part 2)

### — 歯科での再生医療の実現と普及への取り組み —

広島大学大学院医歯薬学総合研究科探索医科学講座 (口腔生化学)

\*株式会社ツーセル

加藤 幸夫 邵 金昌 桂 由紀\* 坂井 将典\*  
坂井 裕大\* 久保 裕嗣\* 辻 紘一郎\*

#### A. 細胞治療はどのような疾患に有効か

現在の医療は薬剤に大きく依存しているが、a) 大きな欠損/傷害のために再生用細胞がない場合、b) 血管などの障害のために再生用細胞が傷害部位へ遊走できない場合、c) 老齢や病気のために再生用細胞の数が減少している場合、薬剤による治療は困難である。薬剤の標的細胞そのものが欠乏しているからである。

欠損部が大きい場合に臓器移植のオプションもあるが、脳死判定を受けたドナーの数は極端に少ない。したがってアジア各国で臓器 (腎臓など) の違法な売買が横行している。また移植手術は数千万円かかる。そのうえ移植したとしても免疫抑制剤を一生服用しつづけないといけない。

では希望はないかというところが細胞治療である。単純な組織 (骨、軟骨など) に対しては細胞移植だけでも効果があるが、組織工学の技術が進化すれば、細胞と担体から複雑な臓器そのものを造れるようになる。

骨の欠損の場合、自家骨移植がよく用いられているが、自家骨を切除した健康部の痛みが激しく患者が苦しんでいる。

多くの疾患に対して、MSCの移植治療は有望であるが、とくに骨欠損、関節症、歯周病、抜歯後の顎堤、心筋梗塞、脳梗塞などでは大規模な組織欠損あるいは細胞壊死があるので、再生用細胞の移植が必要である。

要約すると、細胞治療法の開発は、社会的な要請が大きいうえに、科学、医学の立場からも臓器移植から細胞治療への転換は合理的であると考えられる。

#### B. 再生用細胞の種類

再生用細胞として、軟骨細胞 (軟骨欠損)、皮膚上皮細胞 (熱傷)、線維芽細胞 (熱傷) など一定の方向に分

化した細胞がすでに広く用いられている。しかしこれらの細胞は他疾患には利用できない。一方、幹細胞を用いれば、多種類の分化が可能なので、対象疾患の範囲が広がる。

幹細胞には、胎生幹細胞 (Embryonic stem cells : ES細胞) と組織 (成体) 幹細胞がある。ヒト ES細胞は、すべての組織へと分化できる万能細胞であり、研究者からは最も注目されているが、a) 癌化しやすい、b) 患者自身から採取できない、c) ES細胞を作製するために他人の卵子や胚を利用するなどの問題がある。わが国では基礎研究においてもヒト ES細胞の使用は厳しく規制されている。

一方、組織幹細胞 (成体幹細胞あるいは体性幹細胞ともいわれる) は、成人患者の各組織から分離でき、自家細胞であるかぎり倫理的問題が少ない。また癌化リスクも低い。組織幹細胞の中では、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells : MSC)、造血幹細胞、神経幹細胞、血管前駆細胞、皮膚幹細胞などが移植用細胞としてとくに注目されている。

#### C. MSCの多分化能とMSC移植治療

MSCは、最初は主として骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化すると考えられていたが、その後、セメント芽細胞、歯根膜細胞、筋肉細胞、神経細胞、血管細胞、肝臓細胞など多種類の細胞へと分化できることが示された<sup>1)~11)</sup>。当初予想されたよりも分化範囲が広く、かつ患者自身の骨髓や脂肪から容易に分離できるので、多くの疾患に対してすでに臨床試験が行われている。日本では2006年度までに、100人以上の患者に対してMSC移植が行われており、おおむね良好な結果が得られている。感染や癌化その他の副作用は報告されていない。MSCを移植した患者のなかで、最も多いのが関節症であり、ついで顎堤造成、歯周病、骨欠損、慢性心筋梗塞などで



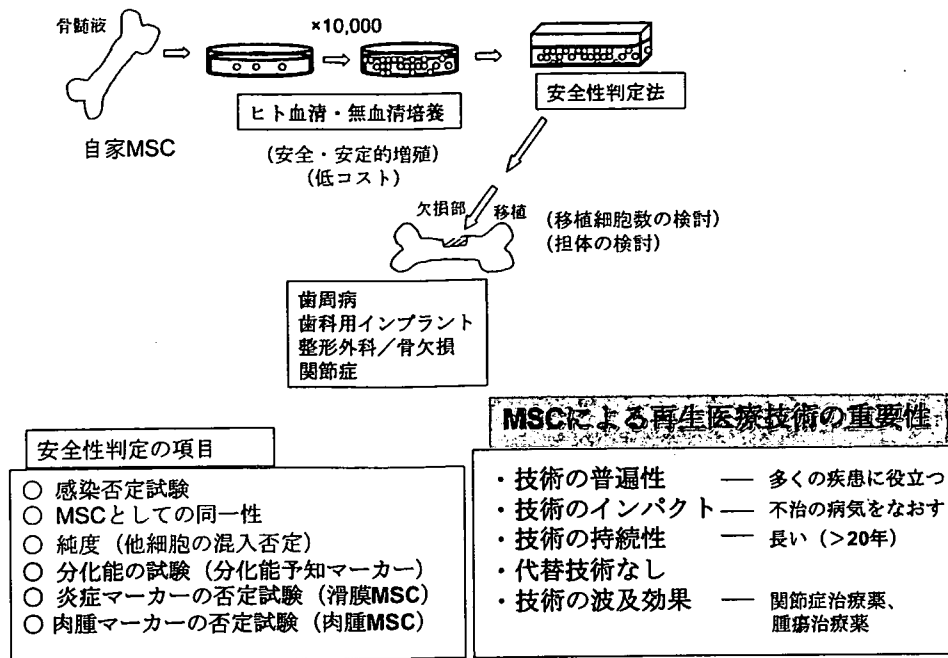


図1 MSC移植療法の概略

ある。海外では、より多数の患者がMSC移植を受けている。なお図1に、MSC移植治療の概略を示した。

#### D. MSC移植による歯周病の治療とインプラント埋入のための顎造成

名古屋大学の上田実教授らは、顎堤再建のために多くの歯科患者に自家MSCを移植して良好な結果を得ている。また神戸の株式会社アルプラストも10名の患者にMSCを移植して顎堤再建を行っている。一方、広島大学の歯周病科では栗原英見教授のもとで、10名の歯周病患者にMSC移植が行われている。今後の問題点は、臨床効果の評価方法を確立することおよびより速い治療効果を得ることである<sup>12~15)</sup>。

#### E. 確認申請と許認可

MSC治療を普及するには、会社の存在が不可欠であり、病院だけで細胞培養や品質管理を行うことは困難であり現実的でない。しかしMSC治療の事業化には、患者が治ればそれでよいのではなく、厚生労働省の許認可が必要である。まず「歯周病/顎堤欠損に対するMSC治療」を行う旨の確認申請をして臨床試験を行い、得られた結果が、安全性、効果、リスクの点から評価される。

しかしMSCの治療が国内だけで100名以上に行われているにもかかわらず、細胞治療に関して認可を受けて

表1 必要とされる移植用細胞の品質検査

1) 規格化	★①目的細胞であること
	★②仕様 (MSC特有の遺伝子発現パターン)
	★③純度
	★④同一性 (本人のものであるかどうか) → パソコン管理 (富士通)
2) 病的リスク	★①感染 (ウイルス・細菌・真菌, etc.) (BML)
	★②癌化・炎症
3) 性能 (再生能・分化能) …	★分化能予知マーカー

いる会社は未だない。皮膚の再生医療 (熱傷など) についても臨床例が多いのに (世界で数千件) 日本ではまだ認可されていない。

#### F. 移植用細胞の品質管理技術

許認可の大きな障害となっているのは、移植用細胞の品質管理が未完成であることである。これまでのMSC移植の臨床研究では、移植用の規格、病的リスク、性能などが検討されることなく移植されていた。

つまり今後必要とされる品質管理技術は、規格化試験、病的リスクの否定試験、および性能試験である (表1)。

規格化については4項目があるが、本人のもの (細胞)

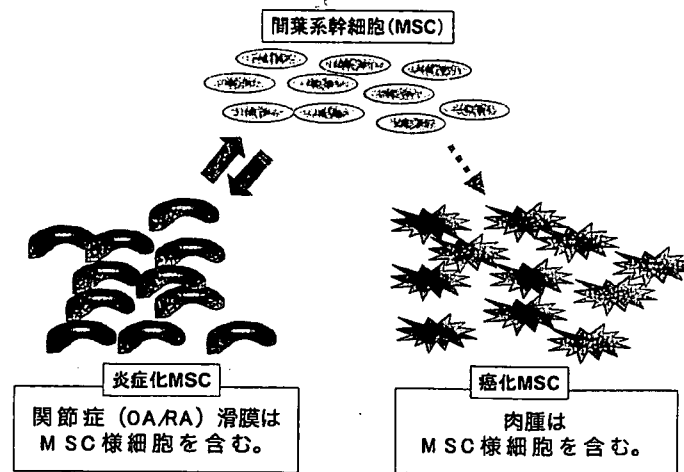


図2 MSCの病的変化

であることについては（同一性），コンピュータ管理によって取り違えを防ぐことが可能である（富士通との共同）。バーコードの不一致が警報を鳴らすようなシステムが望ましい。

また病原体（細菌，真菌，マイコプラズマ，ウイルス）の感染がないことについては，臨床検査会社（ピーエムエル社）と共同して，移植の日程に間に合うように迅速に検査結果がでるようシステムを構築した。

しかし，規格化の3項目，1) 目的の細胞であること，2) 細胞製品の仕様，3) 純度（均質性）については，MSCの分子マーカーが必要である（表1）。

これまでのMSCの分子マーカーはMSCと骨髄の造血系の細胞とを区別できても線維芽細胞とは区別できなかった。

そこでわれわれは，まずDNA microarrayを用いて，線維芽細胞，骨芽細胞，軟骨細胞，脂肪細胞と比較してMSCでのみ高レベルに発現している遺伝子を同定した。これらは広島大学での臨床研究で，移植細胞が目的の細胞であることをテストするのに有用であった<sup>10)</sup>。さらに，これらのMSCの分子マーカーは，MSCの仕様の決定方法，純度試験にも役立った。

ただし問題は残っている。今後，患者年齢の影響，MSCを採取した骨の場所による影響，植継ぎや培養系での増殖がマーカーの発現レベルに及ぼす影響，個体差，MSCにおける発現の亢進の程度を考慮して，信頼性の高いMSCマーカー（陽性マーカー，陰性マーカー）に絞る作業が必要である。あまり多くのマーカーを使うことは経済的にも時間的にも無駄となるからである。

次にMSCの病的リスクに関して，炎症，癌化の問題がある。MSCは変形性関節症（OA），リウマチ性関節症（RA）の滑膜組織で，炎症性に変化する。とくにリウマチでは炎症変化したMSCは軟骨や骨の破壊の主

要因となる。一方，確率は低いものの，MSCは骨肉腫，軟骨肉腫，脂肪肉腫に変化する可能性がある（図2）。したがって，これらの病的変化がないことを検査しなければならない。

そこでわれわれは，MSCの遺伝子プロファイルをもつMSCと同様に多分化能（骨，軟骨，脂肪）をもつ変形性関節症および関節リウマチの滑膜細胞と比較した。その結果，いくつかのMSC関連遺伝子がOA，RAあるいは両者の滑膜細胞で発現が亢進することが判明した。また同様な方法で，骨肉腫，軟骨肉腫，脂肪肉腫に共通するマーカー分子を同定できると考えている。

一方，移植用細胞の性能試験であるが（表1），MSCの分化能と相関する分化能予知マーカーをすでに同定している。

これらの試験法を完成すれば，厚生労働省からの許認可を得ることが可能になると考えている。

## G. 株式会社ツースルの設立

わたしたちは平成14年に広島大学歯学部発のベンチャー会社ツースルを設立した（社長，辻紘一郎）。現在，資本金1億1千万円である。MSC移植治療の歯科での適用（歯周病，顎堤再建），整形分野での骨欠損への適用のための確認申請が，ツースルの現在の最も重要な課題である。上記のように安全性判定法を確立することにより，許認可を得ることを目標としている。

本研究開発のために，広島大学歯周病科（栗原英見教授ら），広島大学補綴科（西村正宏講師ら），広島大学口腔外科（鎌田伸之教授ら），広島大学口腔保健学科口腔保健衛生学（杉山勝教授ら）はじめ，広島大学歯学部，医学部の各教室に多大なご協力をいただいたことに感謝します。

## 文 献

- 1) 加藤幸夫, 辻紘一郎: 再生医療の潮流と歯科への応用, *Dental Diamond* 31: 70~73, 2006.
- 2) 加藤幸夫, 久保裕嗣, 清水正和, 他: 間葉系幹細胞の基礎, (2) 間葉系幹細胞の性質, 腎と骨代謝 19: 307~312, 2006.
- 3) 加藤幸夫, 加家壁正知, Pan Haiou, 他: 軟骨修復に用いられる間葉系幹細胞の基本的性質, 関節外科, 25 (4) 増刊号: 63~69, 2006.
- 4) 加藤幸夫, 五十嵐晃: 間葉系幹細胞の増幅技術, *化学と工業* 14: 502~506, 2004.
- 5) 加藤幸夫: これからの再生用細胞 第7章 幹細胞 4 間葉系幹細胞: 笹義人監修 再生医療工学の最先端, 231~235, シーエムシー出版, 東京, 2002.
- 6) 加藤幸夫, 五十嵐晃, 金輪真佐美: ヒト細胞材料最新活用法 ヒト間葉系幹細胞 (MSC), *バイオテクノロジージャーナル*, 印刷中.
- 7) 加藤幸夫: ジョーカー: 成人幹細胞をいかにうまく医療に使うか, *ミクروسコピア* 19(3): 175~180, 2002.
- 8) Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., et al.: Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288: 413~419, 2001.
- 9) Matsubara, T., Suardita, K., Ishii, M., et al.: Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells, *JBMR* 20(3): 399~409, 2005.
- 10) Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., et al.: Molecular Markers Distinguish Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts, *Biochem Biophys Res Commun* 332(1): 297~303, 2005.
- 11) Umemura, T., Nishioka, K., Igarashi, A., et al.: Autologous bone marrow mononuclear cell implantation induces angiogenesis and bone regeneration in a patient with compartment syndrome, *Circulation Journal* 70: 1362~1364, 2006.
- 12) 河口浩之, 林 秀昭, 水野智仁, 他: 自家骨髄間葉系幹細胞移植による歯周組織再生療法の開発, *再生医療* 4(1): 69~77, 2005.
- 13) 河口浩之, 林 秀昭, 水野智仁, 他: 歯周組織の細胞移植法 骨髄間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生療法, *CINICAL CALCIUM* 15(7): 1197~1202, 2005.
- 14) Kawaguchi, H., Hirachi, A., Hasegawa, N., et al.: Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells, *J Periodontol* 75(9): 1281~1287, 2004.
- 15) Hasegawa, N., Kawaguchi, H., Hirachi, A., et al.: Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects, *J Periodontol* 77(6): 1003~1007, 2006.

## 6 間葉系幹細胞の遊走能、癌化リスク、病的変化

■加藤 幸夫<sup>1)</sup>, 坂井 裕大<sup>2)</sup>,  
 本田 清昌<sup>1)</sup>, 五十嵐 晃<sup>2)</sup>,  
 辻 紘一郎<sup>2)</sup>, 西村 正宏<sup>3)</sup>

- 1) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔生化学  
 2) 株式会社ツーセル  
 3) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 歯科補綴学



加藤 幸夫  
 1973年大阪大学歯学部。77年同大学大学院歯学研究科修了。90年同大学助教授歯学部。91年広島大学教授歯学部。  
 研究テーマは幹細胞と再生医療、生体時計と時計医学。  
 趣味は山登り、ヨット。

Key words : MSC, tumor, migration, stem cells

### Abstract

間葉系幹細胞 (MSC) は、骨髄などから動員されて傷害組織へ遊走し生着する。この過程が順調に進行するかどうか組織再生の正否を決定する大きな要因である。一方、再生用細胞としてMSCを使用するには、MSCの癌化リスクやその他の病的リスクの検討が必要である。本稿ではこれらの問題を中心にMSC研究の最近の進歩について紹介する。

### はじめに

ヒトMSCは、患者に大きな苦痛を及ぼすことなく骨髄や脂肪組織などから容易に分離できる。またMSCは、軟骨、骨、靭帯、脂肪、筋肉、血管、神経、肝臓、腎臓などに分化できるので、多くの組織の再生を促すと期待されている。実際に、多くの疾患に対して(骨欠損、顎骨欠損、変形性関節症、歯周病、口蓋裂、難治性皮膚潰瘍、心筋梗塞など)、MSCの移植療法が実施されているし、対象疾患は今後さらに拡大すると予想される。このようにMSC移植治療は有望であるが、生体内での組織再生におけるMSCの生理的役割や、

癌を含む各種の病気の発症とMSCとの関係はいまだ不明である。

### 1. 癌化リスク

細胞治療に幹細胞を用いる際に、移植した幹細胞が腫瘍化するリスクが高いか低いかわかることは、臨床的に重要である。胚性幹細胞(ES細胞)を未分化状態のままあるいは異所性移植すると、ほぼ確実に腫瘍化することが知られている。問題は、ES細胞以外での幹細胞(MSCを含む)でも癌リスクが分化細胞よりは高いか否かである。ここで考えるべき点は、ES細胞は自然状態の細胞というよりは不死化した細胞ラインであり、その維持にはteromerase(TERT), c-myc, oct4などの癌関連遺伝子の発現が必要であるのに対して、MSCは有限な細胞分裂回数を示す非不死化細胞であることである。すなわち、MSCの癌化リスクはES細胞より低い。

MSCの癌化の頻度は非常にまれである。すでに多くの患者に対して(日本だけで120人以上、世界的にはおそらく1000人以上)MSCが移植されているが、移植により癌になった

*Migration, tumor risk and pathological changes of mesenchymal stem cells*: Yukio Kato<sup>1)</sup>, Yuhiro Sakai<sup>2)</sup>, Kiyomasa Honda<sup>1)</sup>, Hikaru Igarashi<sup>2)</sup>, Kouichiro Tsuzi<sup>2)</sup>, Masahiro Nishimura<sup>3)</sup>, 1) Department of Dental and Medical Biochemistry, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 2) Two Cells, 3) Department of Dental Prosthesis, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

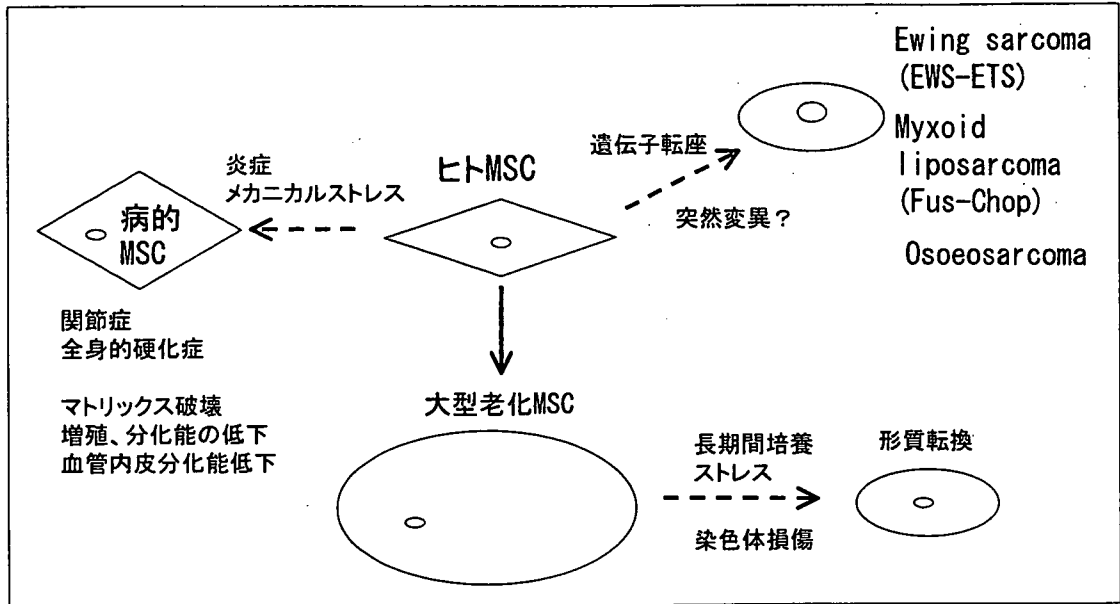


図1 MSCの病的変化と癌リスク

という報告はない。骨髓液にはMSCも存在しているが、骨髓移植は数万件以上実施されていると思われるが、骨髓移植後に癌発症率が亢進することはなかった。骨髓移植を経験していない対象集団とがん発症率は同じであった。

体外で細胞を増幅することが癌リスクを高める可能性があるが、多くの分裂回数をへて増殖させた皮膚ケラチノサイト（ケラチノサイト幹細胞を含む）もすでに数千名の熱傷の患者に移植されているにもかかわらず癌化の報告はない。したがって通常の培養操作では、成体幹細胞の癌化リスクが高まることはないようである。

ただし、ヒト脂肪由来MSCを培養して、増殖停止して大型の扁平老化細胞に変化した後、さらに長期間培養しつづけると腫瘍化したという報告がある<sup>1)</sup>。クライシスを超えて老化した細胞を培養つづけることは細胞へ多大な培養ストレスを与えることであり、このような条件では遺伝子変異のリスクが高まる可能性はある（図1）。一般に、MSCは5代

以上植え継ぐ前に患者に移植されるので、癌化を誘発するような長期培養ストレスを移植用MSCに負荷させることは通常ない。老化する前に（細胞増殖の停止前に）MSCを移植すれば、癌化リスクは高くないと考えてよいのではないか。

MSCに複数個（3-5個以上、TERT、活性型Rasなど）の癌遺伝子を導入すると、その分化能を部分的に維持したまま癌化する。しかしMSCが通常の線維芽細胞よりもより少ない導入癌遺伝子数で癌化することはなかった。つまりMSCは幹細胞だからといって線維芽細胞よりも癌化しやすいことはなかった（図1）<sup>2)</sup>。むしろMSCはある種の癌の増殖を抑制する作用がある<sup>3)</sup>。

小児の肉腫であるEwing sarcomaはEWSとETS遺伝子ファミリー間の転座により発症するMSC由来の腫瘍ではないかと示唆されている。その結果、EWS転写因子の転写活性化ドメインとETS転写因子のDNA結合領域をもつ新規の転写因子が発現することとなる。Ewing sarcomaのEWS-ETS癌遺伝子の発現をノック

ダウンすると、MSCに類似した多分化能を有する細胞へと変化して、その遺伝子発現プロファイルはMSCのプロファイルに近づいた<sup>4)</sup>。さらに脂肪肉腫や骨肉腫はMSCがまれな遺伝子転座 (Fus-Chop) や突然変異により起こるのではないかと示唆されている (図1)<sup>5), 6)</sup>。

非常にまれであるが、移植用MSCがEwing sarcomaやその他の肉腫へと変化するリスクはまったくないわけでない。したがって、これらの肉腫で誘導されている遺伝子が移植用細胞では亢進していないことを確認する必要があるかもしれない。

## 2. 各種の疾患でMSCは病的な変化をおこすか

変形性関節症由来の骨髄MSCは正常MSCよりも増殖能、軟骨分化能、脂肪分化能が低下している<sup>7)</sup>。また全身性硬化症では、骨髄MSCの血管内皮への分化能が低下していると示唆されている<sup>8)</sup>。一方、変形性関節症やリウマチ関節炎では、滑膜MSC (滑膜線維芽細胞) のマトリックス分解能が著しく亢進する。骨粗鬆症では骨髄MSCの骨分化能力は低下しないとの報告もあるが低下するとの報告もあり (Rodriguez-JP et al. 1999), 上記の知見は、ある種の病気で骨髄MSCの性質が変化しうること、MSCの病的変化が病気の発症/進展に関与することを示唆している (図1)。

## 3. 移植用MSCの検査

体外で増幅した移植用MSCが本当に目的の細胞であるか、線維芽細胞の混入がないか、均質かどうかについて、移植前に検査できれば医師は自信をもって移植できる。しかし細

胞の形態、外見ではこれらを判断することはできない。したがってMSCマーカーが求められるが、これまで報告のあったMSCマーカー (細胞表面抗原など) は、線維芽細胞でも同レベルに発現していたため、本当の意味でのマーカーでなかった<sup>9)</sup>。われわれはマイクロアレーを用いてMSCで選択的に発現が亢進している遺伝子を見いだして、これらをマーカーとして移植用MSCの検査に役立てている<sup>10)</sup>。この点については、われわれの最近の数編の総説ですでに詳しく述べた。正常MSCマーカーに加えて、われわれはMSCの癌化リスクおよび病的変化のリスクを評価するマーカーを探索している。澤田らもMSCの癌マーカーの探索をおこなっている<sup>11)</sup>。

## 4. MSC移植による免疫抑制

MSCは組織再生を促進する他に、免疫抑制作用があり臓器移植 (骨髄移植など) での拒絶反応を抑える。また自己免疫疾患 (encephalomyelitis, lupus) を抑制する。MSCの腹腔への一回注射は2型コラーゲン注射によるリウマチ関節炎による軟骨、骨破壊を抑制した。血中TNF-alphaレベルも低下させた。この効果は、抗原刺激に対して特異的であった。初代から2代目のMSCは組織特異的自己反応T細胞クローンの活性化と増殖を抑制した。一方、MSCの移植はregulatory T細胞 (CD4+, CD25+, CD27+, Foxp3+) の比率を *in vivo* で増加させた。これは移植したMSCの死滅した後の免疫抑制作用の持続に関係しているかもしれない。しかもすでに関節症の症状がはじめたマウスにMSCを腹腔注射しても、免疫応答を誘導すると同時にMSCを注射したときと同等に関節症を抑制した<sup>12)</sup>。しか

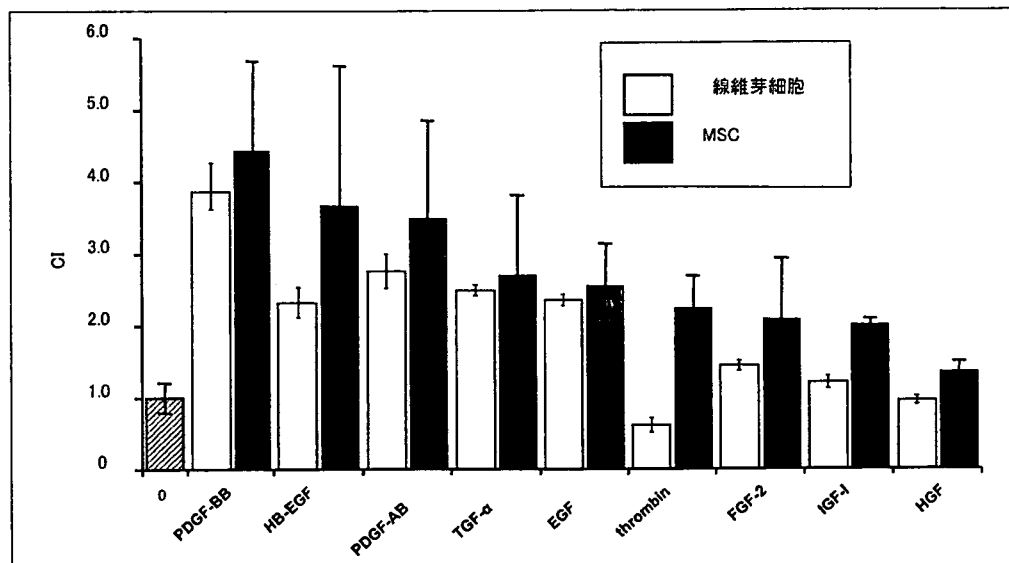


図2 各種の成長因子とサイトカインによる細胞の遊走能  
各因子において最大の遊走効果を示す濃度での歯肉線維芽細胞とMSCに対する遊走能を示す。歯肉線維芽細胞のこれらの因子に対する遊走能はMSCのそれと本質的に同等であった。ただし、トロンピンに対する遊走のみは違いが観察された。CI (ケモタキシスインデックス) : 成長因子非存在下での自発的移動能に対する成長因子により誘引された細胞移動能の比を示す。

し株化したマウスMSCは関節症を抑制しなかった。この知見は、株化したMSCでは *in vivo* での免疫抑制効果が低下することを示唆している。

### 5. MSCの遊走能 (低酸素とサイトカインの影響)

各種の組織傷害モデルでMSCが傷害部へと選択的に遊走して生着することが観察されている。また骨髄由来のMSCが骨折部やBMP2移植部の新生骨形成部へと血流をへて遊走することが報告されている<sup>13)</sup>。一方、低酸素により骨髄のMSCが血流中へ放出されて血流中のMSCの数が増加することも報告されている。これらの知見は、傷害や低酸素に反応して組織から血流中に放出される因子が、骨髄あるいはその他の組織からMSCを動員することを示唆している。

われわれは、ヒトMSCとヒト歯肉線維芽細胞

の遊走能をボイデンチャンバー法にて比較したが、MSCが幹細胞であるがゆえに特別強力な遊走能をもっているとは考えられなかった。両者の遊走能力はほぼ同等であった。また各種の成長因子とサイトカインによるケモタキシスも、多くの場合MSCと歯肉線維芽細胞とで本質的な違いを見いだせなかった。唯一トロンピンに対するケモタキシスにおいて両者の違いが観察された (図2)<sup>14)</sup>。

われわれの研究では、いくつかの成長因子 (PDGF-BB, EGF, FGF-2など) はMSCのケモタキシスを誘導したものの各種のケモカインはMSCの遊走を促進しなかった。しかし一部の報告では、ケモカインがMSCの遊走を促進した。この食い違いは、TNF-alphaあるいは低酸素で一時的に刺激したMSCを用いた最近の研究によって説明できるようになった。つまり通常のMSCは各種のケモカインに反応しないものの、刺激したMSCは数種類のケモカインに反応して遊走した。このようなTNF-

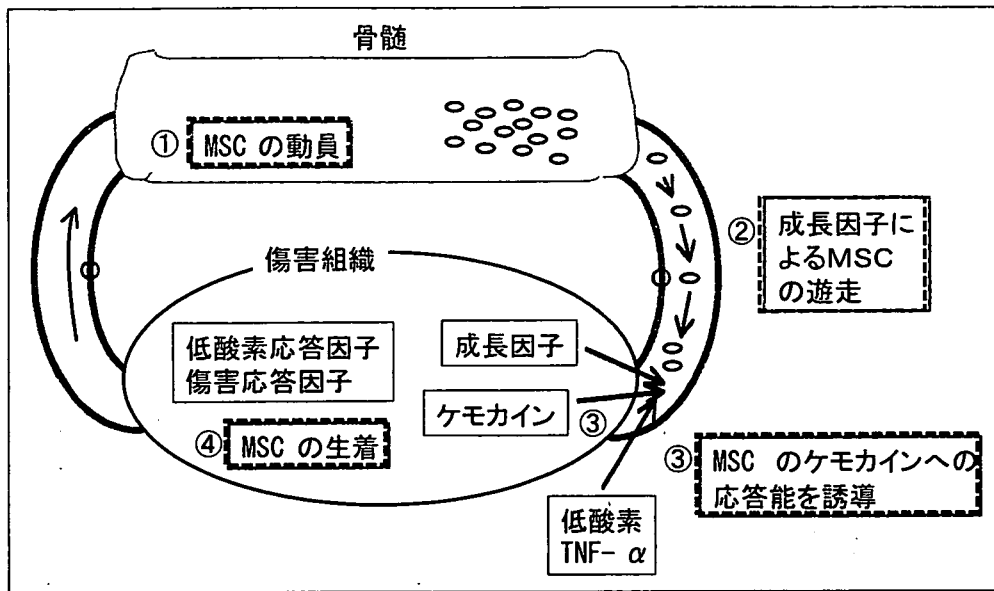


図3 骨髄からのMSCの動員および傷害組織への遊走に及ぼす低酸素、TNF- $\alpha$ 、ケモカインおよび成長因子の作用

傷害組織は、低酸素あるいは炎症に反応してMSCの動員促進因子を分泌する。次いでMSCは傷害組織が産生する成長因子により遊走能が亢進する。さらに傷害組織の低酸素とTNF- $\alpha$ はMSCのケモカイン受容体を活性化する（仮説）。

alpha<sup>15</sup>）あるいは低酸素<sup>16</sup>）の作用の一部は、ケモカイン受容体レベルの増加によって説明された。

これらの知見を総合すると、骨髄あるいは他組織のMSCは、傷害組織から放出された動員因子により刺激されて血流へ出て、血管から組織内へ侵入する。まず各種の成長因子が刺激されていないMSCの遊走能を高める。そして炎症性サイトカインや低酸素の刺激によりMSCが活性化されるとケモカインにも応答して炎症部位へとさらに集積するものと推察される（図3）。

## 6. 宿主組織へのMSCの生着

傷害組織を再生させるには、移植したMSCが目的組織へ遊走するのみならずそこで生着して生存すること(engraftment)が必要である。ただMSCが分泌する成長因子やサイトカイン

が組織修復を強力に促進する場合は、生着は必ずしも必須ではない（一時的なサイトカイン効果による組織再生）。このように移植したMSCが短期間で死滅するか長期間にわたって傷害組織で生存するかどうかは、病気の種類や実験モデルによって異なるようである。多くの組織傷害実験の動物モデルでは、最初の数日間MSCの生存が確認されても生存細胞数はその後著しく減少して最終的には検出できなくなる。移植したMSCは移植場所から他組織へと広く移動することもあり、またアポトーシスで死ぬ。

一方われわれは、Concanavalin Aにて短期間処理したMSCは、接着能が高くかつ機械的刺激や蛋白分解酵素による傷害に対して大きな耐性を獲得することを報告した<sup>17)</sup>。いずれにせよ、移植したMSCが宿主組織内で生存するための最適な条件を明らかにすることは今後の重要な課題である。



おわりに

## 7. 遺伝子導入の担体細胞としての MSC

MSCは癌組織へと遊走する性質があり、しかもMSCにはある種の癌の増殖を抑制する作用もある<sup>3)</sup>。ただしMSC株の一部が乳癌細胞の増殖に促進的に作用することも報告されている。また制癌作用をもつ遺伝子を導入したMSCは制癌剤のドラッグデリバリーの担体細胞として役立つことが報告されている。

## 8. 他家MSC

MSCの免疫抑制作用は、ドナーでもホストでもない第三者由来のMSCで同等の免疫抑制効果が得られる。また動物実験では2型主要組織適合性抗原 (MHC) のサブタイプが異なっても有効であった。このことは、リウマチや自己免疫疾患、臓器移植の患者に対して、他家MSCの免疫抑制作用が有効であることを示唆している。さらに拒絶反応が少ないことから、組織再生不全の疾患に対しても、他家MSCが使用できると期待できる。移植したMSCが長期間ホスト組織で生存しなくても再生促進効果が得られる場合はとくに他家MSCは有望かもしれない。また病気の種類によっては自家MSCの分化能が低下するためその使用が困難な場合がある。さらに加齢もMSCの分化能に影響するとの報告もあり、その場合は若い他家MSCが再生用細胞としてより有効かもしれない。

MSCを再生医療に利用するには、臨床効果が高ければそれでよいのではなく、有効性の科学的根拠がもとめられる。MSCの起源、生体内分布、幹細胞としてのシステムを維持するためのメカニズムの理解も必要である。最近これらについての研究も始められたが、いまだ不明なことが多い。MSCの起源、実体、可塑性については別の機会でレビューしたい。

### 参考文献

- 1) Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC *et al.*: *Cancer Res* 65:3035-3039, 2005
- 2) Funes JM, Quinero M, Henderson S *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 6223-6228, 2007
- 3) Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, *et al.*: *J Exp Med.* 203:1235-1247, 2006.
- 4) Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, *et al.*: *Cancer Cell.* 11:421-429, 2007.
- 5) Riggi N, Cironi L, Provero P *et al.*: 66:7016-2703, 2006.
- 6) Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, *et al.*: *Neoplasia.* 7:967-976, 2005.
- 7) Murphy JM, Dixon K, Beck S, *et al.*: *Arthritis Rheum.* 46:704-713, 2002.
- 8) Cipriani P, Guiducci S, Miniati I *et al.*: *Arthritis Rheum.* 56:1994-2004, 2007.
- 9) Ishii M, Koike C, Igarashi A, *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun.* 24:332:297-303, 2005.
- 10) Igarashi A, Segoshi K, Sakai Y *et al.*: *Tissue Eng.* in press, 2007.
- 11) 澤田留美, 伊藤友美, 土屋利江: *Yakugaku Zasshi* 127, 851-856, 2007
- 12) Augello A, Tasso R, Negrini SM *et al.*: *Arthritis Rheum.* 56:1175-1186, 2007.
- 13) Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun.* 354:453-458, 2007.
- 14) Ozaki Nishimura, M, Sekiya K *et al.*: *Stem Cells Dev.* 16:119-129, 2007
- 15) Ponte AL, Marais E, Gally N *et al.*: *Stem Cells.* 25:1737-1745, 2007.
- 16) Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC *et al.*: *PLoS ONE.* ;2:e416, 2007.
- 17) Nishimura H, Nishimura M, Oda R *et al.*: *Exp Cell Res* 295:119-127, 2004.

## Differential regulation of *DEC2* among hypoxia-inducible genes in endometrial carcinomas

MAYU YUNOKAWA<sup>1,2</sup>, KEIJI TANIMOTO<sup>1</sup>, HIDEAKI NAKAMURA<sup>1</sup>, NOBUTAKA NAGAI<sup>2</sup>,  
YOSHIKI KUDO<sup>2</sup>, TAKESHI KAWAMOTO<sup>3</sup>, YUKIO KATO<sup>3</sup>, EISO HIYAMA<sup>4</sup>,  
KEIKO HIYAMA<sup>1</sup> and MASAHIKO NISHIYAMA<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Translational Cancer Research, Research Institute for Radiation Biology and Medicine; <sup>2</sup>Obstetrics and Gynecology, and <sup>3</sup>Dental and Medical Biochemistry, Graduate School of Biomedical Sciences; <sup>4</sup>Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University, Hiroshima 734-8553, Japan

Received November 10, 2006; Accepted December 22, 2006

**Abstract.** In this study, we demonstrate an important role of activation of the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) pathway in endometrial carcinogenesis and tumor phenotype development of endometrial carcinoma, and suggest a unique role of the HIF-1-target gene, differentiated embryo chondrocyte 2 (*DEC2*), in carcinogenesis. Hypoxia caused an increase in HIF-1 $\alpha$  protein expression in 4 endometrial carcinoma cell lines. The expressions of its 5 target genes - *DEC1*, *DEC2*, carbonic anhydrase-9 (*CA9*), vascular endothelial growth factor (*VEGF*), and solute carrier family 2, member 1 (*SLC2A1*) - also reactively increased in most of the cell lines, except for *DEC2* in the SNG-M cells. The expression levels of *DEC2*, *CA9*, and *SLC2A1* were significantly higher in the 4 atypical hyperplasia tissues and 82 endometrial carcinomas compared with those in the 21 normal endometria. Clinicopathological analyses of carcinoma patients revealed a significant correlation of the *VEGF* and *SLC2A1* expression with the status of lymph-vascular involvement and lymph node metastasis. The expression levels of *CA9* and *VEGF* were significantly higher in the tumors of post- as opposed to pre-menopausal patients. The *SLC2A1* expression was also related to the FIGO stage, but the *DEC2* expression was inversely related to the FIGO grade. The activation of the

HIF-1 pathway could be related to endometrial carcinogenesis, and the component, *DEC2*, could have different expression-regulatory mechanisms and unique roles in carcinogenesis.

### Introduction

Endometrial carcinoma is one of the most common gynecological malignancies in the world (1-3). Even though the overall 5-year survivals for all the stages are ~80%, many women die from the cancer each year, and existing screening and therapeutic modalities are unlikely to substantially decrease mortality. These unsatisfactory conditions have promoted research for novel biomarkers and targets for the prevention and/or therapy of this carcinoma, and the factors involved in cellular hypoxic reaction are increasingly highlighted as possible candidates.

Tissue hypoxia is now known to contribute to biologically aggressive tumor phenotypes and the emergence of therapeutic resistance (4-8). In solid tumors, including endometrial carcinomas, cancer cells are often exposed to low oxygen tension (hypoxia), low pH, and low nutrition due to inadequate vasculature, which cause a variety of biological changes through the alterations of various gene expressions (5-7). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is a key transcription factor regulating a variety of hypoxia-inducible genes: The protein rapidly degrades in the cells under normoxic conditions but is strikingly induced by hypoxia (4-7). Hypoxic stabilization of the HIF-1 $\alpha$  protein leads to the multiple-step activation of the HIF-1 $\alpha$  function involving its nuclear translocation and heterodimerization with HIF-1 $\beta$  [also called aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)] to form transcription factor HIF-1. HIF-1 then interacts with the cognate hypoxia-response elements (HRE) of target promoters, followed by the recruitment of transcriptional coactivators (4-7). To date, dozens of HIF-1-target genes have been identified, and their functional significances have been analyzed in a variety of cancers (5-7).

Previously, we found the functional HRE in the promoter region of the differentiated embryo chondrocyte 1 (*DEC1*)/*BHLHB2* and *DEC2/BHLHB3* genes which identified them

---

**Correspondence to:** Dr K. Tanimoto, Department of Translational Cancer Research, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima 734-8553, Japan  
E-mail: ktanimoto@hiroshima-u.ac.jp

**Abbreviations:** DEC, differentiated embryo chondrocyte; bHLH, basic helix-loop-helix; *CA9*, carbonic anhydrase-9; *VEGF*, vascular endothelial growth factor; *SLC2A1*, solute carrier family 2, member 1; HIF-1, hypoxia-inducible factor-1

**Key words:** endometrial carcinoma, differentiated embryo chondrocytes, hypoxia, gene expression

Table I. Clinicopathological characteristics of endometrial carcinomas.

Characteristics	n (%)
All	82 (100)
Menopausal status	
Pre	36 (43.9)
Post	46 (56.1)
Histological subtype	
Endometrioid	77 (93.9)
Adenocarcinoma	68 (82.9)
Adenocarcinoma with squamous differentiation	9 (11.0)
Serous	1 (1.2)
Clear cell	1 (1.2)
Mucinous	1 (1.2)
Mixed	2 (2.4)
FIGO <sup>a</sup> grade (endometrioid adenocarcinoma)	
1	47 (69.1)
2	14 (20.6)
3	7 (10.3)
MI <sup>b</sup>	
None	28 (34.1)
<50%	35 (42.7)
≥50%	19 (23.2)
LVI <sup>c</sup>	
Absent	37 (45.1)
Present	45 (54.9)
LN <sup>d</sup> status	
Negative	61 (74.4)
Positive	10 (12.2)
Undetermined	11 (13.4)
FIGO stage	
IA	12 (14.6)
IB	32 (39.0)
IC	10 (12.2)
IIA	5 (6.1)
IIB	4 (4.9)
III	17 (20.7)
IV	2 (2.4)
Recurrence status	
Negative	74 (90.2)
Positive	8 (9.8)
Survival	
Surviving	78 (95.1)
Deceased	4 (4.9)

<sup>a</sup>International Federation of Gynecology and Obstetrics, <sup>b</sup>depth of myometrial invasion, <sup>c</sup>lymphovascular invasion, <sup>d</sup>lymph node.

differentiated embryo chondrocytes (10), and *DEC2* was cloned from the human DNA database of EST as a member of the DEC subfamily (11). Several reports have suggested that DEC subfamily proteins could play a role in tissue development and regulation of the circadian rhythm at the transcriptional level (9-15). Several hypoxia-inducible genes, including carbonic anhydrase-9 (*CA9*), vascular endothelial growth factor (*VEGF*), and solute carrier family 2, member 1 (*SLC2A1*), have been well-characterized in various cancer tissues. However, little is known about DEC in cancer tissues, and almost nothing about *DEC2* (16-23).

In this study, we evaluated the expression of *DEC1* and *DEC2*, along with the well-known hypoxia-inducible genes *CA9*, *VEGF*, and *SLC2A1* in endometrial carcinoma, complex atypical endometrial hyperplasia, and adjacent normal endometria, in order to clarify the clinical significance of DEC in carcinogenesis in anticipation of their being novel biomarkers or targets for the prevention and/or therapy of endometrial carcinomas.

### Materials and methods

**Chemicals.** All chemicals were of analytical grade and were purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) and Sigma (St. Louis, MO, USA).

**Cell culture.** A cervical carcinoma cell line, HeLa, and three endometrial carcinoma cell lines, HEC-1, SNG-II, and SNG-M, were obtained from the Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan). The Ishikawa (3-H-12 No. 117) cell line was kindly provided by Dr M. Nishida (Tsukuba University, Japan) (24). The cell lines were maintained in Eagle's minimal essential medium (MEM; Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) or Dulbecco's MEM (DMEM; Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; BioWhittaker, Verviers, Belgium) plus penicillin (50 IU/ml) and streptomycin (50 µg/ml) with passage every 3 days. The cells were incubated for 12-24 h under normoxic (21% pO<sub>2</sub>) or hypoxic (1% pO<sub>2</sub>) conditions prior to analysis. The cells were collected after washing with PBS and the cell pellets were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

**Tissue samples.** Fresh specimens of 82 endometrial carcinomas, 21 adjacent normal endometria, and 4 complex atypical endometrial hyperplasia were surgically obtained from 91 patients, who had not received any treatment before tumor sampling, at the Department of Obstetrics and Gynecology in Hiroshima University Hospital between 1992 and 2004. The specimens were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Clinicopathological diagnosis was determined according to the classification of the International Federation of Obstetrics and Gynecology (FIGO) (Table I). Histological subtypes were classified according to the pathological criteria of the World Health Organization (WHO) (1994). Written informed consent was obtained from all the patients, and the study protocol was approved by the institutional ethics committees.

**RNA preparation and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR).** Total RNAs

as HIF-1-target genes (9). The *DEC1* coding basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor was originally identified as the molecule expressed in cAMP-dependently

were prepared from frozen cell pellets or tissue specimens using the RNeasy® mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and stored at -80°C until use. All RNA samples were qualified using Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Total RNA (2 µg) was reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Archive™ kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with random primers according to the manufacturer's instructions. The two hundredth aliquot of the cDNA (equivalent to 10 ng total RNA) was subjected to real-time RT-PCR. Real-time PCR was performed using TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems). Each reaction was carried out in triplicate for all the cell lines and tissues, using the ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems). These triplicate measurements were averaged, and the relative gene expression levels were calculated as the ratio to the expression level of *ACTB* ( $\beta$ -actin). A cDNA mix, consisting of 17 various cell lines, was used to create a standard curve of gene expressions.

**Immunoblot analysis.** After incubation in a 10-cm diameter dish, the cells were collected by scraping, washed with cold-PBS, and the cell pellets were stored at -80°C until use. Whole cell extracts were prepared by sonication with the lysis buffer (7 M Urea, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% Glycerol) supplemented with 1x Complete mini® protease inhibitor cocktail, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF. Fifty micrograms of extracts were subjected to 7% SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose filters. Anti-HIF-1 $\alpha$  (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) or anti- $\beta$ -actin (Sigma) antibody was used as the primary antibody, diluted 1:500 or 1:5000 in TBS containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and 1% non-fat milk at room temperature for 1 h. After several washes, a 1:1000 dilution of anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (Amersham Life Science) was used as the secondary antibody and incubated for 1 h at room temperature. After extensive washing with TBS-T buffer, immunocomplexes were visualized using the enhanced chemiluminescence reagent, ECL Plus (NEN Life Science Product, Inc., Boston, MA, USA).

**Immunohistochemical staining.** Immunohistochemical staining was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. For HIF-1 $\alpha$  staining, 1:500 diluted anti-HIF-1 $\alpha$  mouse monoclonal antibodies (H1 $\alpha$ 67, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) and the CSA system (Dako, Carpinteria, CA, USA), were employed. The sections were initially immersed in Target Retrieval Solution (Dako) at 97°C for 45 min, and subsequent steps were performed according to the manufacturer's instructions.

The expression of the HIF-1 $\alpha$  protein was defined as positive if distinct nuclear and/or cytoplasmic staining was observed in normal and/or tumor cells in any optical field (Fig. 2). Stained intensity was compared between the normal and cancer cells.

**Statistics.** All statistical tests were performed using StatView® version 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and the Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* test were used to determine the *P*-value.

## Results

**Hypoxic induction of HIF-1 $\alpha$  protein in vitro.** In order to clarify whether a hypoxic signaling pathway was active in the endometrial carcinoma cells, the protein levels of HIF-1 $\alpha$  were evaluated under normoxic or hypoxic conditions in 4 human endometrial carcinoma cell lines (Fig. 1A). After incubation under normoxic (21% pO<sub>2</sub>) or hypoxic (1% pO<sub>2</sub>) conditions for 12 h, the cells were harvested and whole cell extracts were prepared. HeLa, a cervical carcinoma cell line, was used as the positive control for HIF-1 $\alpha$  induction (25). Immunoblot analysis showed that hypoxia caused an increase in HIF-1 $\alpha$  protein expression in endometrial carcinoma cell lines, although the reaction to hypoxia significantly varied among the cell lines. Compared with the control HeLa cells, HIF-1 $\alpha$  induction was greater in the Ishikawa cells, less in the SNG-M and HEC-1 cells, and least in the SNG-II cells. The expression of the HIF-1 $\alpha$  protein was barely detected in the hypoxic SNG-II cells, although there was a slight increase compared to its expression in the normoxic cells.

**Hypoxic inductions of *DEC1*, *DEC2* and known hypoxia-inducible genes in endometrial carcinoma cell lines.** The downstream activity of the HIF-1 signaling pathway after hypoxic treatment was investigated by expression analyses of the target genes, including *DEC1* and *DEC2*. The cells were incubated under the same hypoxic conditions used for the HIF-1 $\alpha$  protein analyses, and then total RNAs were extracted from the cell pellets. Real-time RT-PCR analyses revealed that all of the 5 HIF-1 target genes responded to hypoxia in at least some of the cell lines (Fig. 1B). Hypoxic treatment significantly increased the expression of *DEC1*, *VEGF*, and *SLC2A1* in all endometrial carcinoma cell lines, as it did in HeLa ( $P < 0.001$ ), and with the exception of the SNG-M cells, the *CA9* expression was also increased in 4 of the 5 cell lines ( $P < 0.001$ ). However, the reaction of *DEC2* to hypoxia varied among the cell lines: Hypoxic treatment significantly increased the expression of *DEC2* in both the Ishikawa and HEC-1 cell lines ( $P < 0.001$ ), although it did not affect the expression in the SNG-II cells and further reduced it in the SNG-M cells ( $P < 0.001$ ).

**Expression of HIF-1 $\alpha$  protein in endometrial carcinoma tissues.** In order to clarify whether the HIF-1 $\alpha$  signaling pathway was active in the tumor tissues, we then performed immunohistochemical analyses for the HIF-1 $\alpha$  protein using tissue sections obtained from 37 endometrial carcinoma patients: In 32 of the 37 tissues (85%), immunoreactivity for the HIF-1 $\alpha$  protein was detected in both the normal and carcinoma cells. We found that there were certain differences in reactivity between the carcinoma and normal stromal cells, suggesting the specific role of HIF-1 $\alpha$  in carcinoma cells (Table II). In 27 tissue sections, the staining intensity of the carcinoma cells was stronger than that of normal stromal cells, and the positive stain was observed in both the cytoplasm and nucleus of carcinoma cells (Fig. 2). However, in normal stromal cells, the protein was mainly stained in the nucleus.

**Expressions of hypoxia-inducible genes in normal, complex atypical endometrial hyperplasia, and endometrial carcinomas.**