

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：37107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19167

研究課題名(和文)mTORを介した生体時計機構の操作によるがん時間治療法の構築

研究課題名(英文)Construction of cancer chronotherapy by manipulation of biological clock via mTOR signal pathway.

研究代表者

岡崎 裕之(Okazaki, Hiroyuki)

第一薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50734125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内におけるmTORシグナルの日周リズムと体内時計機構との相互作用について解明すると共に、その日周リズムを操作することで、癌を始めとしたmTOR関連疾患に対する新たな治療戦略を見出すことを目的として研究を実施した。本研究の遂行により、癌の増殖と体内時計機構に関する学術論文を2報報告した。また、生体内におけるmTORシグナルの日周リズムとその阻害による体内時計機構への影響についてその相互作用の一部を解明した。今後、癌を始めとした各種疾患の病態解明、治療におけるmTORシグナルの影響について新たな標的として応用の可能性を見出すものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the interaction between the diurnal rhythm of mTOR signal and the circadian clock system, and to find a new therapeutic strategy for cancer and other mTOR related diseases by manipulating mTOR diurnal rhythm, this research was carried out. Two reports on cancer proliferation and biological clock mechanism were published. I also clarified a part of the interaction of the effect of the diurnal rhythm of the mTOR signal and its inhibition on the internal clock mechanism. These findings will find the possibility of application as a new target on the influence of mTOR signal in elucidation and treatment of various diseases such as cancer.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：mTOR がん 時計遺伝子 体内時計

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生体には体内時計が存在することが知られている。近年の研究の中で、転写-翻訳のフィードバックループ機構に始まり、mRNA の安定化やタンパク分解の調節など様々な段階で巧妙な制御を受けていることが明らかとされてきている。これら体内時計機構によって、様々な生体の機能に日周リズムが生じており、疾患の発症や薬物の効果に時刻による差が存在していることから、近年医療分野からも注目されている。

mTOR はリン酸化活性を有するプロテインキナーゼの一種であり、各種栄養因子・成長因子などにより活性化されるシグナルの一部である。免疫機能・脳機能・糖代謝・細胞周期調節など、実に多岐にわたる因子の制御に寄与しており、mTOR 調節機構が破たんすることで各種疾患(糖尿病・感染症・がんなど)の発症・重症化につながると考えられている。健常なマウス生体内において、この mTOR シグナル活性には時刻依存的な日周リズムが存在していることが一部報告されてきている(Cao R., et al., *J. Neurosci.*30(18): 6302-6314, 2010; Khapre RV., et al., *Aging.* 6(8): 675-689, 2014)。しかしその中でも、mTOR と分子時計機構との関与については未だ不明瞭な部分も多く、特に病態時における mTOR シグナルの日周リズム、及びそのリズムが治療に及ぼす影響については明らかとされていないところである。申請者は過去の研究において、マウス移植腫瘍における mTOR の日周リズム、及び抗がん剤である mTOR 阻害薬の抗腫瘍効果が投薬時刻によって受ける影響について明らかにした(Okazaki H., et al., *Cancer Res.*74(2): 543-551, 2014)。

## 2. 研究の目的

本研究は上記の背景を基盤とし、mTOR と体内時計機構との相互作用の解明と生体リズムのコントロールを目指す。mTOR はその翻訳調節能や各種シグナル経路の活性化能か

ら、様々な遺伝子の転写・翻訳の制御に寄与している。従って、腫瘍モデルにおける mTOR シグナルの日周リズム・活性レベルの変化は、抗がん剤の薬効に直結する因子(薬物排泄輸送体や細胞周期制御因子など)に影響を及ぼすことが強く示唆される。そこで、正常組織・並びに腫瘍組織における mTOR シグナルの日周リズムが、生体内の概日時計機構調節に寄与しているか これらの日周リズムが治療標的因子の活性に影響しうるか、mTOR シグナルの日周リズムを食事や薬物など外的要因にて操作しうるか、mTOR シグナルの日周リズムを調節することで、mTOR 制御下の因子の発現を調節し、薬物療法の効果を改善できるか、という段階で検討を行う。本研究は、これらの検証によって、mTOR-概日時計機構の相互作用と病態との関連を明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、mTOR シグナルの活性の調節が生体に及ぼす影響の中でも、タンパク翻訳の制御やリン酸化シグナルの活性化を介した体内時計機構への影響に主眼を置き、正常組織・腫瘍組織における生理機能のリズム操作を指向する。

実験 1: mTOR シグナル阻害による正常・腫瘍組織に対する時刻依存的な影響の検討

A: 腫瘍モデルマウスにおける mTOR シグナル・時計遺伝子日周リズムの組織比較

本検討では、腫瘍モデルマウスとしてマウス乳がん細胞 4T1 を右足底部に移植したものを使用する。腫瘍モデルマウスより、腫瘍・肝臓・小腸・腎臓・視交叉上核(SCN)各組織を 4 時間間隔で 6 時点において採取し、total RNA を抽出する。Real time RT-PCR によって、各時計遺伝子群の発現レベル、並びに mTOR 活性の日周リズムを測定する。

B: mTOR 阻害薬の投与による体内時計機構への影響の検討

本検討では、mTOR 阻害薬の投与によって、

生体内での体内時計機構に変化が見られるか否かを検討する。血清刺激により時計遺伝子の同調を行った *in vitro* モデルにおいて、同調から 22 時間後に mTOR 阻害薬を曝露し、同調後 24-48 時間後まで 4 時間ごとの遺伝子発現量を real time RT-PCR により解析する。腫瘍モデルマウスに対して mTOR 阻害薬である Everolimus を単回投与後、13 時と 1 時の 2 時点で各組織を採取し、Real time RT-PCR により、時計遺伝子群の発現に影響を及ぼすか否かを検討する。さらに、コントロールでは両時刻において発現に差が見られた遺伝子の中で、mTOR 阻害薬投与群では両時刻間での発現の差が消失している遺伝子についてマイクロアレイ解析により同定を行う。この操作により、細胞増殖や薬物輸送など、抗がん剤の薬効に直接関わるような因子(以下、標的 X)に着目し、その時刻依存的な発現の変化と、mTOR シグナルの阻害による影響を検出する。実験 1-A で得られたサンプルを利用し、標的 X の日周リズムを測定する。

#### 実験 2. 栄養因子・薬剤を利用した生体機能の日周リズム操作

mTOR シグナルはその特性から、種々の成長・栄養因子や各種プロテインキナーゼ活性化剤により活性化を受けることが知られている。本検討では、特定の時刻のみの給餌(時間制限摂食)、mTOR 活性化剤 MHY1485 の投与、内因性カンナビノイド類縁体 MF-AEA の投与、の 3 種類の方法により生体機能の日周リズム調節を試みる。(MF-AEA については、脂肪酸様構造を有する生理物質であり、mTOR の活性化に寄与すると考えられている。) 以下、- の処理を腫瘍モデルマウスに施し、実験 1-B にて同定された標的 X、及び mTOR の日周リズムを Real time RT-PCR により測定する。

#### 実験 3. 体内時計の操作による抗がん剤への感受性の変化の検討(実験 1,2 の結果に応じて

実施)

実験 2 の - の結果を解析し、mTOR 及びその下流の日周リズムについて変化が得られた方法(時間操作法)を用いて検討を行う。すなわち、腫瘍モデルマウスに対して時間操作法の実行により、標的 X の日周リズムを変化させ、抗がん剤(ドセタキセル)の投与による抗腫瘍効果/副作用の発現が変化するか否かを検討する。操作法を実行した腫瘍モデルマウスに対し、一定の時刻でドセタキセルを投与、腫瘍体積変化、腫瘍組織の形態学的変化、体重変化、血球数変化、死亡率を測定することにより、薬効・副作用の両面から解析を行う。

#### 4. 研究成果

これまでに、腎細胞がん腫瘍モデルにおける mTOR シグナルの活性に日周リズムが存在することを見出している。また、腫瘍細胞における鉄のレベルの制御には体内時計機構が関与していることを見出した(雑誌論文)。mTOR シグナルは生体内における鉄の恒常性維持に寄与している (*Cell Metab*, 2012) ことから、腫瘍組織における mTOR シグナルの日周リズムが腫瘍細胞の増殖活性の制御に寄与していることが示唆された。一方で、正常組織における mTOR シグナルの活性について検討を行った結果、腫瘍組織とは異なる周期で日周リズムを示すことを見出した。これら mTOR の日周リズムと体内時計機構との関連について明らかとすべく、*in vitro* において血清同調を用いたサンプルにて mTOR シグナルを測定したところ、mTOR シグナルの活性は約 24 時間周期の変動を示していた。この *in vitro* モデルにおいて mTOR シグナルを阻害し、時計遺伝子発現への影響を測定した結果、時計遺伝子の発現の減弱、及び発現周期の変容が確認された。本研究により、mTOR と体内時計機構との相関の一部とその機序について明らかとなったことから、今後の mTOR を標的とした疾患の病態解明と治

療法の開発における体内時計機構の重要性が示唆されたものである。

#### 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 2 件 )

Takeda S, Himeno T, Kakizoe K, Okazaki H, et al. Cannabidiolic acid-mediated selective down-regulation of c-fos in highly aggressive breast cancer MDA-MB-231 cells: Possible involvement of its down-regulation in the abrogation of aggressiveness. *J Nat Med.* 71; 286-291. 2016.

Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, et al. Circadian clock in a mouse colon tumor regulates intracellular iron levels to promote tumor progression. *J Biol Chem.* 291: 7017-7028. 2016.

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

該当なし

取得状況 ( 計 0 件 )

該当なし

[ その他 ]

ホームページ等

<http://210.151.112.51/kenkyu/sites/bunsi/>

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 裕之 ( HIROYUKI OKAZAKI )

第一薬科大学・薬学部・助教

研究者番号 : 50734125