

平成30年6月9日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19008

研究課題名(和文) ヒト低分化型がん細胞における体内時計抑制遺伝子ネットワークの探索

研究課題名(英文) Investigation of the gene network regulating the development of circadian clock in human cancer cell lines

研究代表者

梅村 康浩 (Umemura, Yasuhiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40612734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：様々なヒトがん細胞株において、体内時計の有無を調べた結果、概日周期の遺伝子振動が破綻している細胞とそうでない細胞が存在することがわかった。次に、これらの細胞を用いて、体内時計の破綻を示す未知のメカニズムが存在するか探索を試みた。最初に、先行研究によって同定されている時計遺伝子群を調べた。その結果、どの細胞株においても、どの時計遺伝子も発現量に差はあるものの発現はしており、これだけで概日周期の遺伝子振動の破綻を説明するには不可能と思われた。次に、網羅的な遺伝子発現解析を行った。これまでの申請者自身によるマウスES細胞を用いて抽出した遺伝子セットと比較検討している。

研究成果の概要(英文)：In various human cancer cell lines, some cell lines showed the robust circadian rhythms and other cell lines showed the disruption of the circadian rhythms. Next, I investigated the mechanisms that disrupt circadian rhythms in these human cancer cell lines. The gene expressions of core circadian clock genes showed the similar expression levels in these cell lines, which cannot explain the mechanisms of the circadian clock disruption. Next, I analyzed the whole gene expression levels in these cell lines. The gene expression levels are compared with our previous extracted gene set by using mouse ES cells.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 がん 細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

体内時計は、全身のほぼすべての細胞に備わっており、睡眠や血圧などの生理機能に重要な役割を果たしているだけでなく、発がんとも関係があると考えられてきた。例えば、疫学調査により、シフトワークの労働者では、前立腺がんの発がんリスクが3倍 (Kubo et al., 2006)、乳ガンでは1.5~1.7倍高いこと (Hansen et al., 2001)、さらに、大腸がんも (Schernhammer et al., 2003) そのリスクが高まると報告されている。

一方で、近年、「がん幹細胞」という考えを元にした研究が盛んに行われている。全体のごく一部のがん細胞は、自らと全く同じ細胞を作り出す自己複製能と、多種類の細胞に分化しうる多分化能という、胚性幹 (ES) 細胞などの幹細胞に共通して見られる二つの特徴を持ち、このような一部の幹細胞を「がん幹細胞」と呼ぶ。がんが、この幹細胞様の細胞から発生・進行すると考えられるようになってきた (Visvader et al., Nat Rev Cancer 2008)。また、がん幹細胞の遺伝子発現特性は、ES細胞と非常に似ていることが明らかにされた (Kim et al., Cell 2010)。

ES細胞が、別の細胞に分化する過程で体内時計の概日リズムが発生すること、逆に、分化させた細胞から、リプログラミングしてES細胞に近い性質を持つ人工多能性幹 (iPS) 細胞を作ると、体内時計のリズムは消失することが示され、細胞分化を可逆的に変化させると、体内時計も可逆的に細胞自律的に形成されることが明らかにされ、細胞分化が体内時計の形成と強く共役していることがわかっていく (Yagita et al., PNAS 2010)。

### 2. 研究の目的

申請者は、これまで、個体発生に伴って形成される体内時計の分子メカニズムについて研究してきた。ES細胞を用いた *in vitro* 分化誘導法による体内時計の再構成系を確立し (Umemura et al., PLoS One 2013) 様々な変異体 ES細胞から、体内時計が形成されるか調べた。その過程で、Mycの過剰発現によって、時計形成が破綻することを見出した (Umemura et al., PNAS 2014)。これは、がん発生のモデル系となりうると考えた。RNA-sequencing (RNA-seq) やマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析の結果、概日時計形成の破綻と関連する数百の遺伝子を抽出した。本研究では、これらの遺伝子セットが、個体発生による概日時計形成と関連するだけでなく、ヒトのがん細胞においても当てはまるのか明らかにする。

### 3. 研究の方法

細胞分化という観点から、がん細胞における体内時計の有無の統合的理解を目指し、以下の3点を行う。

(1) 様々なヒトがん由来の培養細胞株の概日時計を発光レポーターを用いて測定する。

(2) これらの体内時計の有無がはっきりしたヒトがん細胞で、網羅的遺伝子解析を行い概日リズム形成を抑制する遺伝子を抽出する。

(3) これまでにマウス ES細胞を用いた実験により申請者らによって抽出された概日時計形成抑制状態と関連する遺伝子セットと比較する。

### 4. 研究成果

これまで、様々なヒトがん細胞株において、体内時計の有無、すなわち、時計遺伝子の発現が時系列に沿って概日周期で振動するかどうかを調べてきた。そのためには、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を用いた時計遺伝子発現の発光長時間測定を行った。これには、メダカのトランスポゾンを用いた発現ベクターを用いていた。多細胞レベルの振動解析によると、明瞭な概日周期の遺伝子振動が観察される細胞と、微弱な概日周期の遺伝子振動を示すもの、全く概日周期の遺伝子振動を示さないものが観察された。同調刺激を少なくとも3種類を試した。それでも、全く概日周期の遺伝子振動を示さない細胞株に関しては、発光顕微鏡を用いた1細胞レベルの空間分解能で発光長時間測定を行なった。これにより、同調刺激への応答の有無を考慮することなく、概日周期の遺伝子振動の有無を判定することができる。その結果、多くの細胞において、多細胞レベルでの結果と、1細胞レベルでの測定結果は一致することがわかった。すなわち、1細胞レベルで、概日周期の遺伝子振動が破綻している細胞とそうでない細胞が存在することがわかった。

次に、これらの調べた細胞全てを用いて、体内時計の破綻を示す未知のメカニズムが存在するか探索を試みた。最初に、概日周期の遺伝子発現振動を作り出す、時計遺伝子群の発現解析を行なった。先行研究によって同定されている時計遺伝子 (*CLOCK*, *BMAL1*, *CRY1*, *CRY2*, *PER1*, *PER2*) を調べた。その結果、どの細胞株においても、どの時計遺伝子も発現量に差はあるものの、発現はしており、これだけで、概日周期の遺伝子振動の破綻を説明するには、不可能と思われた。また、時計遺伝子の発現ではなく、時計タンパク質の存在の有無について調べることができていないので、これらについても検討する必要があることが今後の課題である。

次に、これらの申請者自身によって判定した概日時計の有無がわかった細胞群における網羅的な遺伝子発現解析を行うことにした。一部の細胞については、マイクロアレイ解析を行ったが、すべての細胞群の遺伝子発

現を評価するためには、オープンデータベースの遺伝子発現データを使用することにした。前年度に調べていた時計遺伝子群の発現傾向はおおよそ一致していたため、網羅的な遺伝子発現解析データに信頼性があると考えた。これまでの申請者自身によるマウスES細胞を用いた系によって抽出した遺伝子セットと比較検討した結果、すべての細胞を統合的に理解するような結果を見出すことが現時点ではできていない。今後も解析を続ける予定である。また、それ以外のこれまでに、概日時計との関わりが報告されていない、発現レベルに差のある遺伝子として、数百個の遺伝子を抽出することも行なった。これらにどのような意味があるのかパスウェイ解析や Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) などをして、重要な遺伝子ネットワークの同定を試み、今後、さらに詳細な解析を行っていく予定である。

#### <引用文献>

Kubo T, Ozasa K, Mikami K, Wakai K, Fujino Y, Watanabe Y, Miki T, Nakao M, Hayashi K, Suzuki K, Mori M, Washio M, Sakauchi F, Ito Y, Yoshimura T, Tamakoshi A. Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan collaborative cohort study. *Am J Epidemiol.* 2006 Sep 15;164(6):549-55.

Hansen J. Light at night, shiftwork, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Oct 17;93(20):1513-5.

Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Fuchs CS, Colditz GA. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jun 4;95(11):825-8.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008 Oct;8(10):755-68.

Kim J, Woo AJ, Chu J, Snow JW, Fujiwara Y, Kim CG, Cantor AB, Orkin SH. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell.* 2010 Oct 15;143(2):313-24.

Yagita K, Horie K, Koinuma S, Nakamura W, Yamanaka I, Urasaki A, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Shimada S, Takeda J, Uchiyama Y. Development of the

circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Feb 23;107(8):3846-51.

Umemura Y, Koike N, Matsumoto T, Yoo SH, Chen Z, Yasuhara N, Takahashi JS, Yagita K. Transcriptional program of Kpna2/Importin-2 regulates cellular differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Nov 25;111(47):E5039-48.

Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, Takeda J, Inokawa H, Horie K, Yagita K. An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2 as an endogenous clock regulator. *PLoS One.* 2013 Jun 28;8(6):e67241.

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計2件)

Ohashi M, Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, Inada Y, Watanabe H, Tanaka T, Minami Y, Ukimura O, Miki T, Tajiri T, Kondoh G, Yamada Y, Yagita K. Disruption of circadian clockwork in in vivo reprogramming-induced mouse kidney tumors. *Genes Cells.* 査読有. 23. 2018. 60-69. DOI: 10.1111/gtc.12552.

Umemura Y, Koike N, Ohashi M, Tsuchiya Y, Meng QJ, Minami Y, Hara M, Hisatomi M, Yagita K. Involvement of posttranscriptional regulation of Clock in the emergence of circadian clock oscillation during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有. 114. 2017. E7479-E7488. DOI: 10.1073/pnas.1703170114.

##### [学会発表](計2件)

梅村康浩, 小池宣也, 土谷佳樹, 八木田和弘 Involvement of post-transcriptional regulation of Clock in the emergence of circadian clock during cell differentiation., 第24回時間生物学会, 2017年

梅村康浩, 小池宣也, 土谷佳樹, 八木田和弘 Involvement of post-transcriptional regulation of Clock in the emergence of circadian clock during cell differentiation., 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40

回日本分子生物学会年会・第 90 回日本  
生化学会大会), 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/seiri2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅村 康浩 (Umemura, Yasuhiro)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40612734

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし