

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14947

研究課題名(和文) NADP(H)に着目した抗がん剤による日周リズムの維持・変動メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of maintenance and fluctuation of circadian rhythm by anticancer drugs focusing on NADP(H)

研究代表者

岡崎 史泰 (Okazaki, Fumiyasu)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：20610348

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)：スルファサラジンは、がん幹細胞に対しても効果をもつ新規抗がん剤として期待されている。しかし、抗がん剤は一般的に日周リズムを変動させることが報告されており、そのメカニズムを解明することは時間薬物療法を臨床で使用する上で重要なテーマである。本研究で、培養細胞にスルファサラジンを暴露させると日周リズムが発振されることを確認した。また、スルファサラジンの投薬時刻によって日周リズムが維持される時刻が存在し、NADPHが関与することが確認された。本研究成果は、時間薬物療法を臨床応用する上で重要な知見になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スルファサラジンを用いた時間薬物療法は、スルファサラジンの抗腫瘍効果を増大させるだけでなく、他の抗がん剤の抗腫瘍効果を増大させる。がん化学療法では、一般的に複数の薬剤を併用することから、日周リズムの維持・変動のメカニズムや日周リズムが回復するまでの休薬期間の解明は、抗がん剤の投薬スケジュールを決定する上で重要なエビデンスになると考えられる。また、日周リズムの異常は、鬱や代謝異常、循環器異常など様々な疾患の原因になることから、今後抗がん剤投薬によって生じる副作用のメカニズム解明にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Sulfasalazine, an xCT inhibitor, has recently attracted attention as a potential novel anticancer drug that is able to affect cancer cells and drug-resistant cancer cells, such as cancer stem-like cells (CSC). However, previous reports suggested that anticancer drugs change the circadian rhythm, and elucidation of the mechanism is an important theme for clinical use of chronomodulated chemotherapy. In this study, it was confirmed that sulfasalazine oscillates the 24-hour variations of clock genes in culture cells. In addition, circadian rhythm is maintained depending on dosing time of sulfasalazine, and that NADPH/NADP is involved. These results of this study may be considered to be important findings for clinical use of chronomodulated chemotherapy.

研究分野：時間薬理

キーワード：時間薬理 体内時計

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

時間薬物療法は、投薬時刻を設定することで既存の薬のポテンシャルを引き出すため、新薬の開発期間を必要とせず、臨床に応用しやすい薬物療法である。日周リズムは、時計遺伝子によって制御されている。この時計遺伝子は、がん細胞にも存在し抗がん剤に対する感受性に日周リズムを与えている。現在までに、薬力学や薬物動態に関わる遺伝子が時計遺伝子によって制御されており、抗がん剤の時間薬物療法が、実験動物のみならず臨床試験においても有効であることが明らかになっている。しかし、抗がん剤により細胞周期や代謝酵素の日周リズムが変動し、時間薬物療法の有効性が減少することが指摘されている。

酸化還元ストレスに関与する NADP(H)が、時計遺伝子の標的遺伝子の転写調節領域への結合量を増大させ、日周リズムに影響を与えることが報告されている。抗がん剤は、抗酸化活性物質であるグルタチオン代謝に影響を与え、グルタチオン代謝は NADP(H)と密接な関係がある。そのため、抗がん剤投薬による日周リズムの変動は、NADP(H)を介していると考えられる。

本試験の予備検討として、シスチントランスポーター-xCT をノックダウンさせた細胞では、時計遺伝子の 1 つ Cry 発現量が変動することを確認している。スルファサラジンは、xCT を阻害することで、がん幹細胞に対しても効果をもち新規抗がん剤として期待されている。申請者は、がん細胞の xCT 発現量に日周リズムがあることに着目し、スルファサラジンの抗腫瘍効果に対し時間薬物療法が有用であるだけでなく、グルタチオン代謝 (GSH 濃度、GSH/GSSG ratio) に対しても投薬時刻による差異を確認している (Okazaki F et al., Cancer Res. 2017)。これらの結果から、スルファサラジンは、酸化還元ストレスを介し日周リズムを変動させ、抗腫瘍効果と同様に投薬時刻によって日周リズムに与える影響が異なる (日周リズムが維持または変動する) と考えた。

そこで、本研究では、NADP(H)が時計遺伝子 Bmal1/Clock の転写調節領域結合量を変動させることに着目し、日周リズムを維持・変動させるスルファサラジンの投薬時刻の決定とそのメカニズムを解明する。また、抗腫瘍効果との兼ね合いで日周リズムが変動することが止むを得ない場合を考慮し、休薬期間を設定することで日周リズムを回復させ時間薬物療法の有効性を維持する投薬スケジュールを提案することを目的に日周リズムが回復するまでの休薬期間を決定する。

2. 研究の目的

本試験では、下記の 3 点を目的に研究を行う。

1. 日周リズムが維持・変動するスルファサラジン投薬時刻の決定
 2. スルファサラジン (xCT 阻害) による日周リズムの変動メカニズムの解明
 3. スルファサラジン投薬後、日周リズムが回復するまでの休薬期間の決定
- 時間薬物療法を行う上で懸念されている抗がん剤による日周リズムの変動メカニズムを解明することは、時間薬物療法を実臨床へ応用する重要なポイントである。酸化還元ストレスが、時計遺伝子 Bmal1 および Clock の発現量ではなく、Bmal1/Clock の転写調節領域への結合量に影響を与えることに着目する。本試験では、直接酸化還元ストレスに影響を及ぼし、且つ、新規抗がん剤として期待されているスルファサラジンをを用い研究を行う。また、日周リズムが変動してから正常日周リズムに回復するまでの期間を明らかにすることで、抗腫瘍効果の日周リズムに着目した休薬期間を決定する。

3. 研究の方法

- (1) 日周リズムを維持・変動させるスルファサラジン投薬時刻の決定
マウス結腸がん細胞 Colon 26 を移植した腫瘍移植マウスを作製し (明期 7:00-19:00)、スルファサラジンを各 6 時点 (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00) に投薬する。投薬後 4 時間おきに各 6 時点 (9:00 投薬群の場合: 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00, 9:00) に腫瘍を採取する。採取後、qRT-PCR および western blot 法を用いて時計遺伝子発現量を測定する。なお、未投薬の腫瘍移植マウスから各 6 時点 (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00) に採取した腫瘍を正常日周リズム群 (コントロール群) とする。

- (2) スルファサラジン (xCT 阻害) による日周リズムの変動メカニズムの解明
(2-1) スルファサラジン投薬によって E-box に対する Bmal1/Clock の結合量の日周リズムの変動を解明する

NADP(H)によって E-box に対する Bmal1/Clock 結合量が変動する。研究方法 1 と同様にスルファサラジンを各 6 時点に投薬後、継続的に腫瘍を採取する。NADP(H)濃度について蛍光検出キットを用い測定する。また E-box に対する Bmal1/Clock の結合量を ChIP assay を用い測定する。

- (2-2) xCT が日周リズムに影響を及ぼすか解明する
高濃度血清またはデキサメタゾンを暴露させると培養細胞も生体と同様に日周リズムを刻む。本試験では、スルファサラジンの作用点である xCT の機能が日周リズムに影響を与えているか解明する。xCT をノックダウン細胞に高濃度血清またはデキサメタゾンを暴露させ、時計遺伝子 mRNA 発現量および E-box に対する Bmal1/Clock 結合量を qRT-PCR および ChIP assay を用いて継続的に測定する。

- (2-3) スルファサラジン暴露によって培養細胞で時計遺伝子の日周リズムが再構築されるか解

明する

高濃度血清またはデキサメタゾンに暴露させる場合と同様に、スルファサラジンが時計遺伝子発現量の日周リズムを再構築させるか解明する。スルファサラジンに培養細胞に暴露させた後、qRT-PCR を用いて時計遺伝子 mRNA 発現量を測定する。なお、スルファサラジンの作用点である xCT をロックダウンさせた場合、日周リズムが再構築しないことを同様の実験を行い明らかにする。

(3) スルファサラジン投薬後、日周リズムが回復するまでの休薬期間の決定

Colon 26 を移植した腫瘍移植マウスを作製し、スルファサラジン投薬後継日的に 1 日 6 時点 (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00) に腫瘍を採取する。qRT-PCR を用いて時計遺伝子 mRNA 発現量を測定し、時計遺伝子の日周リズムが未投薬群の日周リズムと同等になる休薬期間を決定する。

4 . 研究成果

検討の結果、スルファサラジンの抗腫瘍効果がより増大する投薬時刻群では時計遺伝子の日周リズムが維持されていた。一方、抗腫瘍効果が弱い投薬時刻群では時計遺伝子の日周リズムが消失していることが確認された。NADPH/NADP の日周リズムもこれと同様な結果が得られ、スルファサラジン投薬による時計遺伝子の日周リズム変動は NADPH/NADP を介していると考えられる。培養細胞にスルファサラジンに暴露させると時計遺伝子に 24 時間を 1 周期とする日周リズムが確認され、生体の日周リズムを考慮しスルファサラジンの投与時刻を設定することで、投与後の日周リズムを制御できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡崎 史泰、濱村 賢吾、瀬戸 祥弘、辻 泰弘、藤 秀人
2. 発表標題 Dosing time-dependent antitumor effect of sulfasalazine in tumor bearing mice
3. 学会等名 第41回 日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎 史泰、濱村 賢吾、辻 泰弘、藤 秀人
2. 発表標題 日周リズムを基盤としたxCT阻害剤による 抗腫瘍効果の影響
3. 学会等名 公益財団法人 日本薬剤学会 第34年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学大学院 薬学部 医療薬学研究室 http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphy2/Publications.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------