

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790924
 研究課題名 (和文) サーカディアンリズムを利用した新たな癌放射線療法の確立
 研究課題名 (英文) Establishment of new spiculation beam radiation therapy using Circadianrhythm.
 研究代表者
 岩館 学 (IWADATE MANABU)
 公立大学法人 福島県立医科大学 医学部 助教
 研究者番号：00381393

研究成果の概要 (和文)：サーカディアンリズムを利用した新たな癌放射線療法の確立を行うため、放射線治療前に行う抗がん剤投薬による腫瘍縮小効果を、患者さんに負担のない薬剤選定を個別化し投薬する事によりオーダーメイド医療の実現を目指す研究を行った。
 初年度ではサーカディアンリズムの解析を行い、2年目ではサーカディアンリズムを利用した薬剤感受性試験をがん細胞を用いて行い、抗がん剤の効果がサーカディアンリズムによって変化する事を実証した。最終年度に置いては生体実験として担癌させたマウスにおける抗がん剤感受性試験の実施をサーカディアンリズムに基づいた実験を行う検討を行った。

研究成果の概要 (英文)：We performed a study to aim at the realization of the personalized medicine by we individualized the drug choice that there was not of the burden, and giving the cytoreductive effect with the anticancer drug medication to give before radiotherapy to the patients to establish new cancer radiotherapy using circadian rhythm.
 We analyzed the circadian rhythm in the first year and underwent test for drug sensitivity using circadian rhythm using a cancer cell in the second year and demonstrated that the effect of the anticancer drug changed by circadian rhythm.
 Was based on circadian rhythm by enforcement of the anticancer drug sensitivity testing in the mouse which made a cancer bearing as vivisection when put it in the last year; test it; examined it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：サーカディアン、癌、時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

人間の身体の中には体内時計が存在し、さまざまな身体の中の働きは体内時計に基づいて1日24時間の日内リズムを刻む。たとえば、1日のうちで体温や血圧がもっとも低下するのは早朝だが、昼になるにつれ高まっていく。最高になるのは夕方、その後、低下し、再び朝方に最低になる。

正常細胞が分裂・増殖する日内リズムも体内時計に基づき、朝から昼に向かって活発化し、夕方から夜にかけて低下し、真夜中にもっとも沈静化する。一方、がん細胞の分裂・増殖リズムは一定しないが、真夜中、寝ているときは盛んになり、昼間は低下することのほうが多い。この時間のずれを上手に利用すれば、正常細胞への毒性を極力抑え、抗がん剤の投与量を増やしてがん細胞により大きなダメージを与えることができる。

このサーカディアンリズムを生かした投薬方法と放射線治療を組み合わせたクロノセラピーは、がん療法において重大なカギになる事が示唆される。

2. 研究の目的

本研究においてヒトの体内に置けるサーカディアンリズムを利用することにより効果的な投薬治療による化学療法と放射線治療を融合させた新たな治療法により、患者さんに負担の少ない新たな治療法の開発を行う。

これによって癌患者さんの QOL の向上をはかる事を目的とする。

3. 研究の方法

がん細胞におけるサーカディアンリズムの解明および生体動物によるがん細胞のサーカディアンリズムを経時的に調べる事により、放射線治療に有効的な遺伝子の発現を検討を行った。その結果については研究成果における論文にて説明を行う。

(研究成果参照)

4. 研究成果

Abstract

多くの生理的、生化学および行動プロセスは日周期規則の下にある。そして、それは細菌から哺乳類までほとんどすべての生物で体内時計と呼ばれる体内の時間測定メカニズムによっている。

概日時計が罹患率を調整することができたという相当な証拠と抗癌療法の有効性が提案されたにもかかわらず、時間治療のために機序の基礎をなすことは十分に説明されるだけできなかった、そして、それはクリニックで普及していなかった。

本研究の目的は、KB-C2細胞でP糖蛋白質

(P-gp) /MDR1 (それは抗癌薬物抵抗の重要な分子のうちの1つである) とサーカディアン

リズムの発現の関係を決定することになっていた。

本研究は、MDR1発現レベルとそのプロモーター作用がウシ胎児血清の高濃度で治療の後振動することを証明した。

さらに、taxolの細胞毒性効果は、MDR1の変動されたレベルに依存していた。

これらの結果は、それを暗示するMDR1のサーカディアンリズム抗癌剤の細胞毒性に影響力のある影響を及ぼす可能性があって、そして、クリニックで化学療法に使えること示唆される。

Introduction

多くの生理的、生化学および行動プロセスは日周期規則の下にある。そして、それは細菌から哺乳類までほとんどすべての生物で体内時計と呼ばれる体内の時間測定メカニズムによって発生する。

サーカディアンリズムは、クロック遺伝子(1-9)のセットを含んでいる転写翻訳フィードバックループのネットワークとして、遺伝的にねばるものによって制御される。

概日時計が罹患率を調整することができたという相当な証拠と抗癌療法の有効性は、提案された [10-12]。

薬物予定がサーカディアンリズムに適応したという観察は、1972の[13]の arabinosyl シトシンに対する白血病マウスの増加した耐性であると判明する。

レビは、異なる薬理作用による30の異なる抗癌剤がマウスとラット [14] で薬物毒性に対する強いサーカディアンリズム依存的な効果を示すより多くのものを解説した。

これらの所見は、その日の適当な時間に薬の配送の変形である種の悪性患者の上で抗癌剤の効能を最適化するために、時間治療という着想につながった。

時治療的なアプローチが良い着想であるようで、更に奨励の結果を示したにもかかわらず、それはクリニックで普及していなかった。

ベースの載って日周期リズムがまだそうでない治療の機序は、クリアになる。

近年では、Gorbachevaなどは、野生型と日周期変異体マウスが抗癌剤シクロホスファミド (CY) [15] に対するそれらの反応の著しい違いを示すことを証明した。

野生型マウスの感度が非常に変化する間、薬剤投与の時間によって、Clock 変異体と Bmal1 ノックアウト・マウスは常に、テストされて治療に非常に影響される。

これに反して、Cryptochrome (Cry1-/Cry2-/は、ノックアウトを2倍にする) の機能喪失型変異をもつマウスは、それらの野生型同腹の子と比較してCYにより抵抗した。

このように、時刻と化学療法に応答する対立形質の従属する変動は、日周期CLOCK/BMAL1 トランス活性化複合体の機能的な状態と相関する。

しかしながら、抗癌薬物効果とサーカディアンリズムの関係の機序を述べている報告は、わずかである。

加えて、サーカディアンリズムの抗癌剤の分子目標の正確な分析は、まだ行われなかった。ある種の癌腫患者における多剤耐性の発達は、成功した癌化学療法に対する大きな障害を意味する。

調査される薬物抵抗の多くのモデルのうち、P糖蛋白質 (P-gp/MDR1) (MDR1 遺伝子によってヒトにコード化される) の過剰発現は、ヒト癌細胞系、ヒトの固形腫瘍と血液学的な悪性腫瘍 [16-20] で MDR 表現型の獲得に、しばしば関係する。

P-gp の増加したレベルは、アントラサイクリン (例えば、ドキソルビシン)、ビンカルカロイド類、表層ポドフィロトキシンと抗生物質 [18] を含む種々の構造的に、そして、機能的に無関係な抗腫瘍薬の細胞内蓄積を減少させることによって、腫瘍細胞に抵抗をもたらす。

一方では、抗癌剤の効能が体内時計で調整されることができた概念は、時間治療 [10-12] として提案された。

レビは、異なる薬理作用による 30 の異なる抗癌剤がマウスとラット [3] で薬物性毒性に対する強いサーカディアンリズム依存的な効果を示すより多くのものを解説した。

しかしながら、化学療法の標的分子のサーカディアンリズムについての正確な機序は、説明されない。

本研究の目的は、P-gp/MDR1 とサーカディアンリズムの関係を説明することであった。

本研究において、我々は MDR1 の mRNA 発現レベルとプロモーター作用が P-gp/MDR1 を過剰発現させている KB-C2 細胞でサーカディアンリズムを現すことを証明した。

さらに、P-gp/MDR1 のための新しい基質である taxol の細胞毒性効果と蓄積は、[18] が KB-C2 細胞で P-gp/MDR1 のサーカディアンリズムにも依存していた。

これらの結果は、サーカディアンリズムと抗癌剤に対する反応の間に重要な機序の一部を提供する可能性がある。

Results

Circadian Rhythm of MDR1 Expression and Promoter Activity (Fig. 1 and 2)

我々は、MDR1 の発現が P-gp/MDR1 を過剰発現させる KB-C2 細胞で血清ショックの後変動するかどうか調べた。

細胞はウシ (血清ショック) から血清の 50% を含んでいるメディアで供給された、そして、

細胞全体の RNA は 48 時間 (図 1A) 4 時間ごとに抽出された。

MDR1 発現は振動を示した。そして、それは確立したクロック遺伝子、Per1 と Cry 1 (図 1B) の発現に関連があるように見えた。

類似の結果は、定量的 PCR (図 1C) によっても得られた。

次に、我々は KB-C2 細胞で MDR1 プロモーター作用を調べた。

MDR1/ルシフェラーゼ・リポーター構造物、-1202 から +118 までプロモーター配列を含むことと pGL3B (プロモーターのないルシフェラーゼ媒体動物) は、KB-C2 細胞にトランスフェクションした。

血清ショックの後、彼らは 24 時間 4 時間ごとに溶解して、ルシフェラーゼ分析 (図 2B) を受けた。

実質的にルシフェラーゼ活性の変化が制御 pGL2B ベクトル (図 2C) を含んでいる形質移入体で観察されない間、MDR1 プロモーター作用は血清ショックの後明らかな振動を示した。

12 時間の MDR1 プロモーター作用は、0 または 20 時間に、2 倍にそれを増加させた。

これらの所見は、MDR1 の発現が KB-C2 細胞でサーカディアンリズムを示したという第 1 の証拠である。

Circadian Rhythm of Cytotoxicity for Taxol in KB-C2 Cells (Fig. 3 and 4)

我々は、KB-C2 細胞で次に MDR1 の機能性側面を測定した。

taxol (図 3A-a) が P-gp/MDR1 のための基質であるので、我々は蛍光顕微鏡分析によって血清ショックの後 0 と 12 時間に GFP のラベルが付いた taxol、Flutax-2 (図 3A-b) と正確に計った細胞内 GFP 信号を使用した。

0 時間 (図 3B-a) に taxol を含んでいる細胞の比率は、血清ショックの後の 12 時間 (図 3B-b) のそれより低い傾向があった。

taxol を含んでいる細胞の数は計数された、そして、各割合はグラフ (図 3C) の中でプロットされた。

それは、血清ショックの後の 12 時間 (24.5 + 6.8) に、0 時間 (9.3 + 3.5) ($P = 0.048$) (図 3C) のそれより有意に高かった。

MDR 発現が 0 時間に高かったおよび 12 時間に低かったので、これらのデータは細胞内蓄積が taxol の水平になることがサーカディアンリズムによって変動する MDR1 発現に依存していることを示唆した。

次に、taxol の蓄積が細胞障害効果に反映されるかどうかにかかわらず、調査するために、下位 G1 の細胞の比率は、血清ショックの後 flowcytometric 分析によって 0 時間と 12 時間で測定された。

KB-C2 細胞は、KB-C2 細胞 (図 4) の血清の豊富な処置の後、洗練された 2 時間に、taxol で洗練された 2 時間で治療された。12 時間 (15.2 + 0.78) の下位 G1 ピークの比率は KB-C2 細胞 (p < 0.0001) (図 4B) の 0 時間 (6.9 + 0.47) のそれより有意に高かった。そして、taxol の細胞毒性効果が MDR1 発現に依存していることを示した。そして、それはサーカディアンリズムの制御下である。

Discussion

多剤耐性が癌の臨床治療における大きな障害のうちの 1 つであるにもかかわらず、その下にある機構は不明なままである。

この研究において、我々は MDR1 発現とそのプロモーター作用が KB-C2 細胞で血清ショックの後振動することを明らかにした。

さらに、この変動は、抗癌剤 (taxol) の cytotoxicity の上で、いずれが P-gp/MDR1 のための基質であるかについて影響を与えた。

時間治療が動物試験 [21] で肝臓であると報告されたので。

本研究は、いくつかの肝臓増量転写制御因子 (すなわち、HNF1 α 、HNF4 α 、C/EBP α と C/EBP β) が明白な日周期 mRNA パターンを持つことを示す。

彼らが多くの DPG の発現を管理すると考えられるので、これらの転写制御因子のサーカディアンリズムは注目に値する。

例えば、多くの酵素と輸送体の mRNA 発現は、HNF1 α -ヌル・マウス肝臓 [22] で著しく減らされる (Cyp1a2、Cyp2e1、Oat2、Oatp1a1 と Oatp1b2) か、増加する (Cyp4a14、Cyp7a1、Oct2、Mrp4、Mdr1a と Mdr2)。

概日時計が薬-処理遺伝子 (DPG) 発現を直接制御することができることは、注目に値する。最近の検査において、Dbp を含むクロックを対照とした転写制御因子のノックアウトは第 I 相 (Cyp2b、Cyp2c、Ces3 と Cpr) (第 II 相 (Gstt1 と Gsta3)) に関係する多くの肝 DPG の発現を変えた、そして、輸送 (Abcg2) は [23] を処理する。

まとめると、生体異物に反応および日周期転写制御因子は、空腹時の～給送であるか小さい～暗い移行に反応して、肝 DPG の日周期発現と一緒に調整する可能性がある。

しかしながら、報告が抗癌剤と MDR1 との関係を示すためにない。

ある種の癌腫患者における多剤耐性の発達は、成功した癌化学療法 [7] に対する大きな障害を意味する。

ファイルされるこの次のチャレンジは、我々が標的分子がヒトの悪性腫瘍でサーカディアンリズムによって調整されるのを見つける方法である。

それが可能でありえる場合、時間治療 (それ

は治療を改善するために生物学的時間を考慮に入れる) の研究は癌 [22] の治療のために新しい治療的なアプローチを考案することにおいて重要な役割を果たす。

Fig1

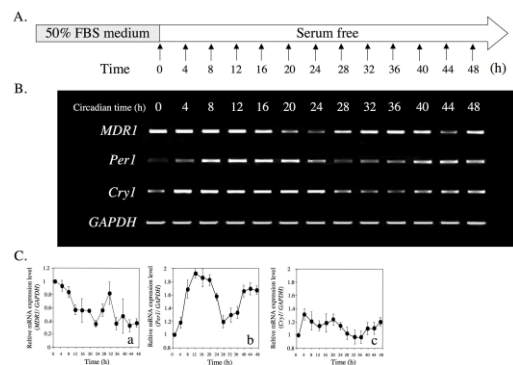


Fig2

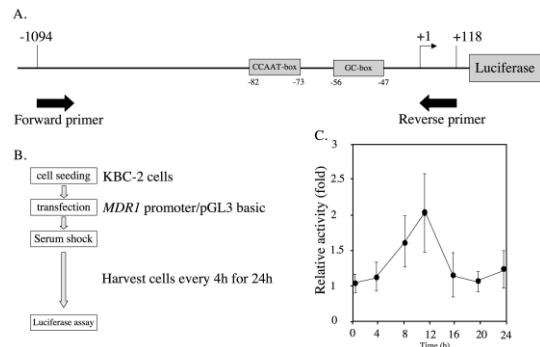


Fig3

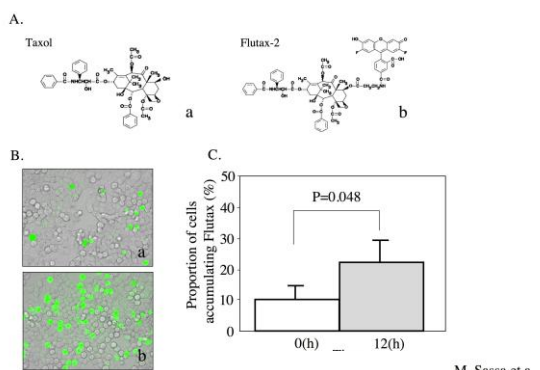
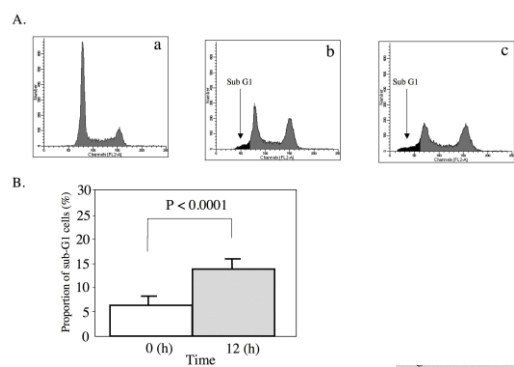


Fig4



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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩館 学 (IWADATE MANABU)
公立大学法人 福島県立医科大学
医学部 助教
研究者番号：00381393

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし