

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08454

研究課題名（和文）大腸がん組織内での概日周期多様性とその治療への応用

研究課題名（英文）Circadian heterogeneity of colorectal cancer tissues

研究代表者

松浦 徹（MATSUURA, Toru）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60415297

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト大腸癌とヒト骨肉腫細胞を用いた研究により、幹細胞性が高い細胞は、概日周期が弱いことを発見した。また通常の細胞では概日周期により細胞周期が制御されているが、幹細胞性の高い細胞では逆に細胞周期によって概日周期が制御されていることを示唆する結果をクロマチン免疫沈降と細胞周期阻害剤による実験によって得ることができた。更に正常細胞では化学療法薬投与により、細胞障害を受けやすい時間帯が存在するが、癌幹細胞ではないことから、正常細胞に対して影響の少ないタイミングで化学療法を行うことで、体細胞への副作用を抑え、がん幹細胞へは効果の高い治療を行うように応用することが可能と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんに対する化学療法では様々な副作用が予後不良につながるものが広く知られている。これは化学療法薬が細胞分裂を行う細胞をターゲットとすることで、がん細胞のみならず体内の正常幹・プロジェニター細胞にも細胞毒性を発揮することに起因すると考えられている。体細胞の分裂は一般的に夜間に起こることが知られているが、報告者らの研究ではがん幹細胞の細胞分裂は一日中起きている。そのことから体内での半減期の短い化学療法薬（5-FU）などを、体細胞の分裂しない日中に投与することで、体細胞への副作用を抑え、がん幹細胞へは効果の高い治療を行うように応用することが可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using human colorectal cancer cells and human osteosarcoma cells, we found that cancer stem cells have less robust circadian rhythm. The circadian rhythm regulates the cell cycle in somatic cells. However, experiments with cell cycle inhibitors and chromatin immunoprecipitation revealed that the cell cycle is regulating the circadian rhythm in cancer stem cells. Treatments of a chemotherapy drug, Doxycyclin, show that the cytotoxicity to somatic cells are dependent on the timing of treatment in a day. On the other hand, the cytotoxicity to cancer stem cells was not dependent on the timing. These results suggest that cancer chemotherapy avoiding the critical timing to somatic cells can be a therapy with low side effect to somatic cells.

研究分野：概日リズム

キーワード：概日周期 がん 幹細胞 細胞周期 時計遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は大腸(盲腸・結腸・直腸・肛門)に発生する癌で、日本人の癌罹患率・死亡率ともに第2位(2016年度統計)、米国においても癌罹患率において第5位(2018年統計)である。概日周期の乱れは癌の発生リスクを高めることが示唆されており、2007年に国際癌研究機関は交代制勤務などによる概日周期の乱れを発癌性が高まる要因として分類した。概日周期と細胞周期は様々な細胞において共役している。報告者はオルガノイドを用いて、小腸上皮幹細胞の細胞増殖に日周期があり、それが概日周期によって制御されていることを明らかにした(Matsu-ura, 2016, Mol Cell)。概日周期は細胞周期を止める方向に制御するため、概日周期の乱れにより細胞増殖の歯止めが利かなくなることが癌化の機構の一つと考えられる。しかしマウス内で増殖させた腫瘍や、患者癌細胞から確立された癌細胞株において概日周期が観察されており、癌と概日周期の関係について懐疑的な見解もある。

2. 研究の目的

胚性幹細胞などの多能性幹細胞では概日周期が弱く、分化するにつれて周期が獲得されるということが明らかになっている(Yagita, 2010, PNAS)。がん組織中にも幹細胞は存在し、がん幹細胞から分化する過程において多様な概日周期の強度を持った集団が存在することが予想される。本研究では特にがん幹細胞における概日周期に着目し、がん組織内の概日周期の多様性の存在を調べ、その原因を明らかにする。また正常細胞の増殖には日周期があり、癌幹細胞にはないとすると、その差を利用した治療戦略を開発できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん細胞を用いたがん幹細胞と分化したがん細胞の概日周期頑健性の比較

ヒト大腸がん由来の培養細胞であるCaco-2細胞を用いて、培養方法による幹細胞化と分化細胞化により概日周期の違いを調べる。超低吸着プレートで培養すると培養がん細胞の肝細胞性が高まり、がん幹細胞としての研究に使用することができる。またCaco-2細胞は細胞接着プレート上で長期間高密度で培養すると分化し、上皮細胞層を作ることが知られている。これらの培養条件下で細胞の性質を比較する。概日周期を調べるために時計遺伝子であるBmal1のプロモータを用いてルシフェラーゼ(Bmal1-LUC)を発現させ、発光イメージングを行う。また細胞周期を調べるために発光を用いた細胞周期センサーであるGreenLuc-hGeminin(Matsu-ura, 2016, Mol Cell)を用いて発行イメージングを行う。

(2) Caco2細胞を用いた時計遺伝子のクロマチン解析

上述のように細胞周期が概日周期によって制御されていることが知られているが、糸状菌であるNeurospora crassaでは、時計遺伝子であるFrqのプロモータ領域のクロマチン構造が細胞周期により制御されており、細胞周期による概日周期制御がなされているということが報告されている(Liu, 2017 Mol Cell)。がん細胞での細胞周期と概日周期の関係を調べるため、クロマチン免疫沈降法を用いて、細胞周期に伴う時計遺伝子のプロモータのクロマチン状態を調べる。

(3) Caco2細胞とマウス正常細胞を用いた化学療法薬作用の概日周期依存性解析

マウス小腸から陰窩を採取し、マトリゲル中で培養し、オルガノイドを作製し、マウス正常細胞として使用する。Caco-2細胞とマウス正常細胞はそれぞれ50%血清で処理することにより、概日周期を合わせて実験に使用する。血清処理後4時間おきに化学療法薬であるDoxycyclinを投与し、細胞に対する障害性の違いを検出する。

また概日周期に対して作用する小分子を用いて、Doxycyclinの効果調べる。概日周期を頑健にする小分子としてNobiletin、概日周期を阻害する小分子としてKL001やSR9011が知られている。これらをDoxycyclinと共に投与し、概日周期と細胞障害性について調べる。

4. 研究成果

ヒト大腸癌由来の Caco-2 細胞とヒト骨肉腫由来の U2OS 細胞の概日周期を Bmal1-LUC を用いて比較すると、Caco-2 細胞では U2OS に比べて優位に概日周期が弱いことを発見した (図 1A, B)。そこで U2OS 細胞を超低接着プレートで培養することでがん幹細胞化し、また Caco-2 細胞を接着プレート上で高密度で 4 週間培養することにより、分化状態に至らせた。すると分化した Caco-2 細胞では概日周期が頑健になり、逆にがん幹細胞化した U2OS 細胞では概日周期の頑健性が低下した (図 1C, D)。これらの実験結果からがん細胞では分化状態によって概日周期の頑健性が変化し、がん幹細胞の概日周期は弱いことが明らかとなった。

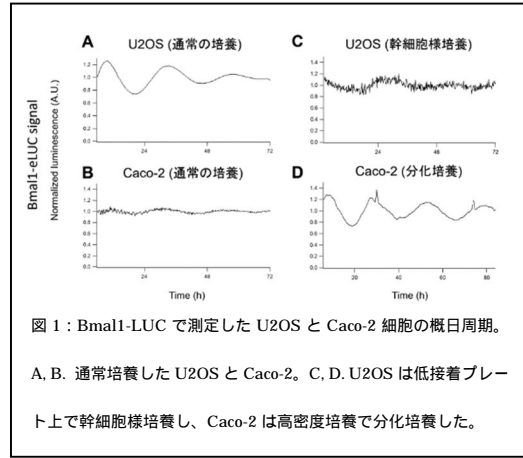


図 1: Bmal1-LUC で測定した U2OS と Caco-2 細胞の概日周期。
A, B. 通常培養した U2OS と Caco-2。C, D. U2OS は低接着プレート上で幹細胞様培養し、Caco-2 は高密度培養で分化培養した。

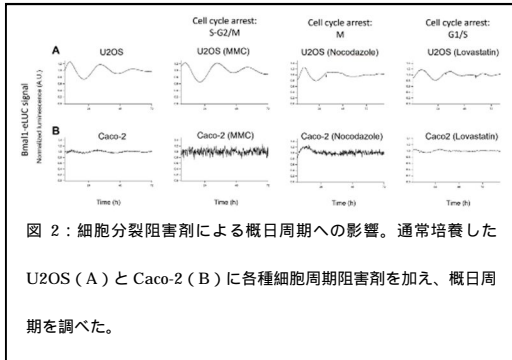


図 2: 細胞分裂阻害剤による概日周期への影響。通常培養した U2OS (A) と Caco-2 (B) に各種細胞周期阻害剤を加え、概日周期を調べた。

次に Caco-2 や U2OS 細胞に細胞周期の阻害剤であるマイトマイシン C、ノコダゾールや Lovastatin を投与すると、分化状態では概日周期には影響はないが、がん幹細胞様培養条件下では弱く観察される概日周期がほとんど観察されないほど抑制された (図 2)。更にヒストンシャペロンである FACT の阻害剤である CBL0132 を投与することでもがん幹細胞の概日周期が大きく影響を受けることが明らかとなった (図 3)。このことから細胞周期に依存したヒストンのリモデリングががん幹細胞での概日周期制御に関与することが示

唆された。そこで概日周期を制御する時計遺伝子の一つである Per1 のプロモータ領域をヒストン H3 に対するクロマチン免疫沈降法により解析した。分化状態とがん幹細胞様培養条件では、がん幹細胞様培養条件での Per1 プロモータはクロマチンが密集しており、遺伝子発現がしにくい状況である。また分化した状態では細胞周期によらず、Per1 プロモータは開いているが、幹細胞条件では G1 期に最もプロモータが閉じた状態であり、S-G2/M 期にはプロモータがある程度開いた状態になっている (図 4)。通常の細胞は概日周期によって細胞周期が制御を受けることが知られている。それに対してがん幹細胞の概日周期は細胞周期によって制御を受けることが明らかになった。

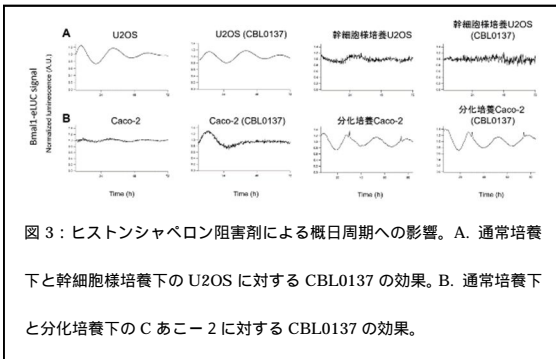


図 3: ヒストンシャペロン阻害剤による概日周期への影響。A. 通常培養下と幹細胞様培養下の U2OS に対する CBL0137 の効果。B. 通常培養下と分化培養下の Caco-2 に対する CBL0137 の効果。

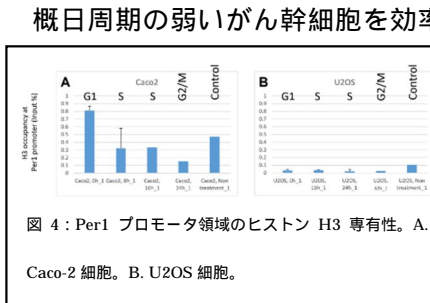


図 4: Per1 プロモータ領域のヒストン H3 専有性。A. Caco-2 細胞。B. U2OS 細胞。

概日周期の弱いがん幹細胞を効率的に化学療法によって除去する方法を検討するため、概日周期に影響を与える小分子と化学療法剤である Doxycyclin (Dox) を同時に投与した。分化したがん細胞では概日周期を活性化する Nobiletin (NOB) を投与することで Dox の効果を増大させ、また概日周期を阻害する KL001 の投与で Dox の効果を弱めた (図 5A, B)。それに対してがん幹細胞様の細胞ではこれら概日周期に影響を与える小分子は Dox の効果に影響を与えない (図 5C, D)。つまりもともと概日周期がほとんどないがん幹細胞に対しては概日周期を惹起することができないということを示唆する。そこで正常細胞とがん幹細胞様細胞との間で、Dox 投与するタイミングによる効果の差を比較した。正常細胞としてマウスの小腸由来のオルガノイドを用いて、血清ショック後 4 時間おきに Dox を投与し、細胞障害を測定した。その結果、個体であれば夜間—早朝となる血清ショック後 8-12 時間で細胞障害が増大した (図 6A)。それに対してがん幹細胞様細胞では細胞障害に対する時間依存性は観察さ

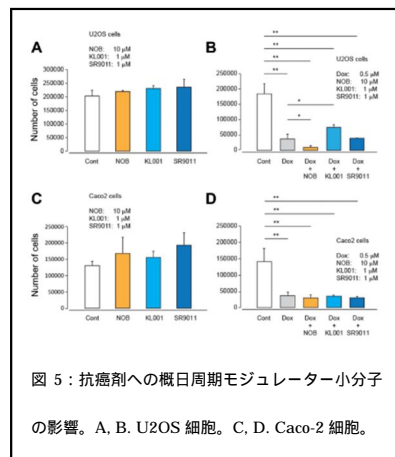


図 5: 抗癌剤への概日周期モジュレーター小分子の影響。A, B. U2OS 細胞。C, D. Caco-2 細胞。

れなかった(図6B)。

以上の結果から、体内での半減期の短い化学療法薬(5-FU)などを、体細胞の分裂しない日中に投与することで、体細胞への副作用を抑え、がん幹細胞へは効果の高い治療を行うように応用することが可能と考えられる(図6C)。また本研究では新たな概日周期制御機構の一端を明らかにすることができた。一般的に概日周期が細胞周期を制御することが知られているが、がん幹細胞では細胞周期依存的なクロマチン構造の変化が見られ、細胞周期自身が概日周期に影響を与えるという、これまで知られている制御とは逆向きの制御が行われていることが示唆された。

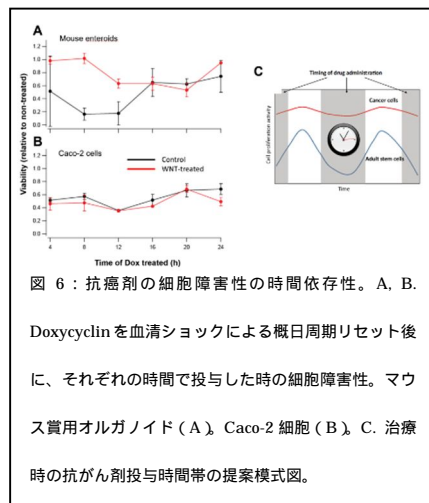


図6：抗癌剤の細胞障害性の時間依存性。A, B. Doxycyclinを血清ショックによる概日周期リセット後に、それぞれの時間で投与した時の細胞障害性。マウス賞用オルガノイド(A)、Caco-2細胞(B)。C. 治療時の抗がん剤投与時間帯の提案模式図。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chan C, Ooashi N, Akiyama H, Fukuda T, Inoue M, Matsu-Ura T, Shimogori T, Mikoshiba K, Kamiguchi H	4. 巻 23
2. 論文標題 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 3 Regulates Neuronal Growth Cone Sensitivity to Guidance Signals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.100963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Lee KK, Matsu-ura T, Rosselot AE, Broda TR, Wells JM, Hong CI	4. 巻 15
2. 論文標題 An integrated microfluidic bubble pocket for long-term perfused three-dimensional intestine-on-a-chip model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 14110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0036527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Rosselot AE, Park M, Kim M, Matsu-ura T, Wu G, Flores DE, Subramanian KR, Broda TR, McCauley HA, Hawkins JA, Chetal K, Salomonis N, Shroyer NF, Helmuth MA, Wells JM, Hogenesch JB, Moore SR, Hong CI	4. 巻 41
2. 論文標題 Ontogeny and function of the circadian clock in intestinal organoids.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 e106973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020106973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松浦 徹
2. 発表標題 A new metabolic pathway of phosphoinositides
3. 学会等名 分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsu-Ura T, Shirakawa H, Suzuki KGN, Miyamoto A, Sugiura K, Michikawa T, Kusumi A, Mikoshiba K
2. 発表標題 Dual-FRET imaging of IP3 and Ca2+ revealed Ca2+-induced IP3 production maintains long lasting Ca2+ oscillations in fertilized mouse eggs
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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