

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590645

研究課題名(和文) 抗がん剤による時間治療の分子基盤確立をめざして一細胞モデルシステムの樹立と応用一

研究課題名(英文) Establishment of cellular models for investigating of cancer chronotherapy

研究代表者

池田 正明 (IKEDA, Masaaki)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80232198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤の時間治療の分子メカニズムを解明するため、抗癌剤標的因子や抗癌剤のトランスポーターや代謝酵素と概日リズムの関係を明らかにする必要がある。そこで私たちは、時計遺伝子と、これら抗癌剤の標的因子等の、抗癌剤関連因子発現、時計遺伝子発現への影響などの関係を細胞レベルで解析可能な細胞モデルを樹立することとした。細胞モデル樹立のため、抗癌剤としては、トポイソメラーゼIを標的とするイリノテカンとHIF1を標的とするものを選択した。イリノテカンに関しては、マルチカラーシステムを応用し、トポイソメラーゼI、ABCB1およびUGTA1と時計遺伝子のリズムを同時に発現解析可能な細胞システムを樹立した。

研究成果の概要(英文)：Chronotherapy for cancer has improved therapy for cancer. Dosing time of anticancer drugs is appeared to be influencing to effectiveness and toxicity of chemotherapy for cancer. But no precise mechanisms of cancer chronotherapy are elucidated, so far. To clarify the molecular basis of chronotherapy for cancer, we have been trying to establish a cell model system for chronotherapy. Irinotecan is an agent for targeting topoisomerase I and inhibit its enzymatic activity. It is known that genes of irinotecan related factors, such as topoisomerase I, ABCB1 and UGTA1 are oscillated in circadian manner. We cloned promoter region of topoisomerase I, ABCB1 and UGTA1 and constructed reporters using multicolor luciferase system, established by Nakajima et al. The application of these reporters to this study will be helpful to understand the coordination of clock genes and irinotecan related factors in cancer cells and the reactions to the treatment of irinotecan.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学 応用薬理学

キーワード：概日リズム 時計遺伝子 抗癌剤 時間治療 腫瘍細胞 プロモーター ルシフェラーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍治療に用いられる化学療法剤の細胞毒性は、主に細胞分裂時に発現すると考えられている。これは腫瘍細胞に対しては有効であるが、造血細胞や粘膜、消化器、皮膚などの正常細胞に対して強い細胞毒性として作用し、造血細胞であれば顆粒球減少症などの副作用を起こす。細胞毒性はある一定の細胞周期位相で発現することが知られており、たとえば、腫瘍に対する化学療法剤としてよく用いられる 5-FU やイリノテカン (irinotecan) の毒性は、DNA 合成期(S-phase) に発現する (Goldwasser F et al, Cancer Res.1998)。化学療法剤の細胞毒性に起因する副作用は、薬物の代謝や解毒、細胞周期や DNA 修復に関連する因子など複数の因子によって決まってくるが、実はこれらの因子の多くは概日リズム性の制御を受けていることが知られるようになり、腫瘍の治療の視点から時間治療学として、最近特に注目されるようになってきている (総論 Ohdo Drug Metab Pharmacokinet. 2007)。

また、腫瘍の増殖には腫瘍周辺の血管増殖による酸素や栄養素の供給が必須である。私たちは、腫瘍の増殖と時計遺伝子の関連を明らかにし、腫瘍の時間治療を確立することを目指した研究を実施して来ているが、時計遺伝子や時計遺伝子によって発現制御される因子の発現制御を解析する過程で、これらの遺伝子の中に、低酸素反応によってその発現が誘導され、しかもその発現誘導に HIF1 が直接関与している遺伝子があることを見出している。本研究では、低酸素反応や HIF1 などの低酸素制御因子と、時計遺伝子や時計遺伝子によって発現制御される因子の発現との関連を解析し、HIF1 を標的にした腫瘍治療とその時間治療の可能性についても明らかにすることを目指している。

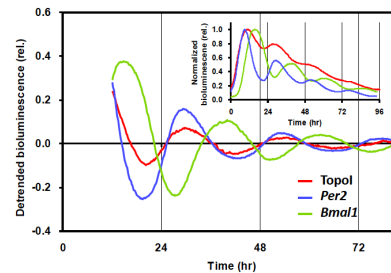
### 2. 研究の目的

(1) トポイセラゼ I (topoisomerase I, 以下 *TopoI*) の阻害剤イリノテカンを抗がん剤として用いると、投与時刻によって効果や副作用に相違のあることが知られている。*TopoI* は細胞レベルで概日リズム性発現を示すこと、プロモーターの解析から転写レベルで時計遺伝子によって転写制御されていることを見だしている。本研究ではこれらの知見を基盤にして、*TopoI* の概日リズム性発現と細胞増殖、細胞周期との関連、*TopoI* 阻害剤の効果発現との関連、腫瘍増殖性との関連を明らかにするとともに、*TopoI* の阻害剤イリノテカンによる時間治療のモデル細胞系を、マルチカラーレポーターシステムを応用して樹立し、癌時間治療の分子細胞基盤を確立することを目指す。

(2) 血管新生は腫瘍増殖や転移に深く関連

しており、低酸素誘導因子 (HIF) 誘導性の血管新生因子は、癌の治療において重要な標的となっている。時計遺伝子は多くの細胞、臓器においてその発現が確認されているが、HIF と時計遺伝子のリズム発現との関連はほとんど報告がなく、また、癌細胞における時計遺伝子と HIF との関係も明らかになっていないことから、HIF1 と時計遺伝子との関係について検討する。

### The phase of oscillation both *TopoI* and *Per2* are almost inphase in the NIH3T3 cells.



### 3. 研究の方法

(1) 本研究では、*TopoI* の発現増加が腫瘍の増殖性や悪性度、抗がん剤の1つで *TopoI* の阻害剤として知られているイリノテカンの有効性などとの関連性が高いとする報告があることから、*TopoI* リズム発現と細胞増殖性との関連を、時計遺伝子と *TopoI* プロモーターレポーター活性のリアルタイム解析とリアルタイムで細胞増殖を解析するシステムを組み合わせて、分子細胞レベルで解析した。また、イリノテカンのプレリミナリーな時間治療の治験から、その有効性と副作用に概日リズム性の大きな差異があることから、マルチカラーレポーターシステム系を応用して、時間治療の細胞モデル系を樹立するため、イリノテカンの標的因子以外に、トランスポーター、代謝酵素などのプロモーターをクローニングし、多色のルシフェラーゼを用いたマルチカラーシステムによって、時計遺伝子とイリノテカン関連因子のプロモーターリズムを同時に解析するシステムの構築を行った。このモデルシステムを用いることにより、時間治療の分子基盤を確立するとともに、癌の時間治療をテーラーメイド医療として進展させるためのマーカーを検索し確立する研究に用いる予定である。

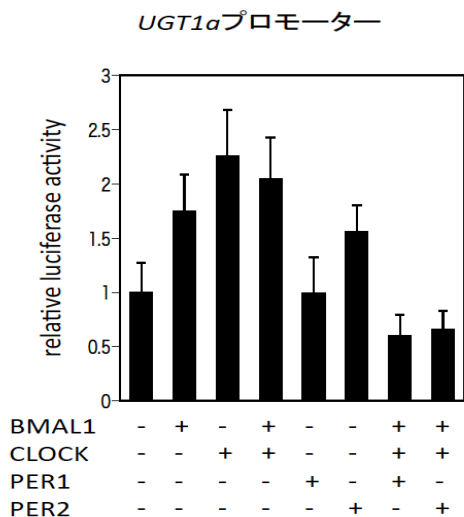
(2) 低酸素刺激は概日リズムに影響があることが示唆されているが、分子メカニズムについては明らかになっていない。本研究では、リアルタイムで時計遺伝子のプロモーター活性を解析可能なシステム (クロノス) を用いて時計遺伝子 *Bmal1*, *Per2* のリズム発現に

対する低酸素やHIFの影響を検討した。また、時計遺伝子のプロモーターに対するHIF1などのHIF関連因子について、転写活性に及ぼす影響について、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討している。更に、HIFの作用がプロモーターに対する直接作用の可能性を検討するためChIPアッセイにより解析を実施した。

#### 4. 研究成果

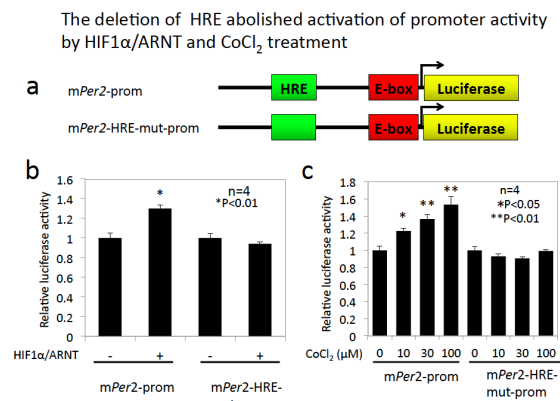
(1) シークエンスの結果、PCRによってヒトMDR1 (*hMDR1*)、ヒトUGT1a (*hUGT1a*)プロモーター配列を取得できている事が示されたので、それぞれの配列をレポーターベクターにサブクローニングした。本研究で使用したヒト*hUGT1a*プロモーターは全長約2.3kbで、MatInspector (Genomatix; ドイツ)により結合する転写因子を予測したところ、3種類の時計遺伝子結合配列である、E-box、ROR-RE、D-boxがそれぞれ存在することが示された。具体的には、E-box (CACGTG)は転写開始点の近傍に1カ所、ROR-REは転写開始点より上流約2kb、1kbに2カ所、D-boxは約2kb上流に2カ所、1kb上流に1カ所、転写開始点近傍に1カ所存在する事が示された。

ルシフェラーゼアッセイにより、これらのプロモーターの時計遺伝子による転写調節機構について解析したところ、*hMDR1*プロモーターはDBPによって転写が活性化され、BMAL1/CLOCKでは転写が抑制傾向のあることが示された。これはBMAL1/CLOCKのプロモーターへの直接の影響かどうか今後の検討を要する。次に、*hUGT1a*の時計遺伝子による転写調節機構について検討すると、*hUGT1a*プロモーターはBMAL1/CLOCKによって転写が活性化され、PER1、PER2によってその活性化は抑制された。



(2) 腎癌由来細胞株 8 種類を、また、リズム

性発現を検証するための対照細胞として、NIH3T3 細胞、U2OS 細胞を用いて、細胞レベルでの *Per2* の概日リズム性発現の有無を確認した。その結果、*Per2* の mRNA レベル、プロモーターを用いた転写活性ともに Caki-2 においてのみ概日リズムを認め、他の腎癌由来細胞では概日リズムを認めなかった。Caki-2 細胞とその他の細胞の特性の違いを検討すべく、各腎癌由来細胞における BMAL1, CLOCK, PER2, CRY1, HIF1 蛋白の発現をウエスタンブロット法で検討した。その結果、CRY1 蛋白の発現は全ての細胞に認められ、BMAL1, CLOCK, HIF1 蛋白のいずれにおいても有意な蓄積を認めたのは Caki-2 細胞のみであり、PER2 蛋白は何れの細胞でも有意な発現が見られなかった。さらに、Caki-2 細胞において、HIF1 とその結合因子である ARNT の発現ベクターを共に細胞移入することで、*Per2* の転写活性の概日リズムの振幅は有意に上昇し、さらに HIF1 の発現を低下させる作用のある天然フラボノイドであるクリシンは、*Per2* 転写活性の概日リズムの振幅を有意に減弱させた。転写レベルでの発現調節を解析するため、ヒト、マウスの *Per2* のプロモーター領域を比較し、両者で配列が高度に保存されている領域内に1カ所HIF1の結合配列である hypoxia response element (HRE)を同定した。この配列に変異を導入すると、HIF1 /ARNT による転写活性化が消失した。さらに、ChIPアッセイによってHRE配列にHIF1が結合することが示された。HIF1 /ARNT による *Per2* 遺伝子の転写活性化は、このHREを介していることが明らかとなった。HIF1 によって、*Per2* 発現とそのリズムの振幅が直接制御されていることが示された。



#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1) Takenaka Y, Inoue I, Nakano T, Shinoda Y, **Ikeda M**, Awata T, SKatayama S: A Novel Splicing Variant of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (Ppar $\gamma$ 1sv) Cooperatively Regulates

Adipocyte Differentiation with Ppar $\gamma$ 2.  
**PLoS ONE**, 査読有、8(6): e65583, 2013

2) Hida A, Kitamura S, Ohsawa Y, Enomoto M, Katayose Y, Motomura Y, Moriguchi Y, Nozaki K, Watanabe M, Aritake S, Higuchi S, Kato M, Kamei Y, Yamazaki S, Goto Y, **Ikeda M**, Mishima K: In vitro circadian period is associated with circadian/sleep preference. **Scientific Reports**, 査読有、3:2074, 2013

3) Yang F, Inoue I, **Kumagai M**, Takahashi S, Nakajima Y, **Ikeda M**: Real-Time Analysis of the Circadian Oscillation of the Rev-Erb  $\beta$  Promoter.

**J Atheroscler Thromb.** 査読有、20:267-76, 2013

4) Noguchi T, **Ikeda M**, Ohmiya Y, Nakajima Y: A Dual-Color Luciferase Assay System Reveals Circadian Resetting of Cultured Fibroblasts by Co-Cultured Adrenal Glands  
**PLoS ONE**, 査読有、7(5): e37093. doi:10.1371/journal.pone.0037093, 2012

[学会発表](計11件)

1) **池田正明**、**熊谷恵**、**上野宗久**、**岡部尚志**: Role of HIF1 $\alpha$  factor on mammalian circadian system. シンポジウム: 環境適応と時計シグナル~環境・ストレスへの応答系としての概日システム. The 91st Meeting for the Physiological Society of Japan, Mar. 16-18, 2014, Kagoshima

2) **Ikeda M**: Understanding the circadian signalosome to establish a basis for cancer chronotherapy. 2nd Swiss Chronobiology Meeting, Sep. 5, 2013, Fribourg, Swiss

3) Okabe T, **Kumagai M**, **Ikeda M**, Shirotake S, Kodaira K, Oyama M, Ueno M: The impact of HIF1 $\alpha$ /ARNT on the Per2 transcriptional activity in renal cancer cells. AUA Annual Meeting, May 4-8, 2013, San Diego, USA

4) **Ikeda M**: Understanding the circadian signalosome to establish a basis for cancer chronotherapy. Symposium: "Circadian Signalosome: Capturing Chrono-biosignal, toward Chrono-Molecular Medicine" The 90th Meeting for the Physiological Society of Japan, Mar 29, 2013, Funabori, Japan

5) **岡部尚志**、**熊谷恵**、**城武卓**、**古平喜一郎**、

**小山政史**、**上野宗久**、**池田正明**: 腎癌細胞における HIF1 $\alpha$ /ARNT による Per2 転写活性の促進. 第 22 回泌尿器科分子・細胞研究会, 2013 年 3 月 9 日、高知県

6) **肥田昌子**、**北村真吾**、**片寄泰子**、**榎本みのり**、**大澤要介**、**渡邊真紀子**、**野崎健太郎**、**有竹清夏**、**樋口重和**、**加藤美恵**、**守善也**、**亀井雄一**、**池田正明**、**三島和夫**: 末梢時計機能は個人の概日/睡眠特性を反映する. 第 35 回 日本神経科学会、2012 年 9 月 18 日、名古屋市

7) Okabe T, **Kumagai M**, Shirotake S, Kodaira K, Oyama M, Ueno M, **Ikeda M**: HIF1 $\alpha$ /ARNT may affect the Per2 transcriptional activity. 29th Japan-Korea Urological Congress 2012 年 9 月 15 日、鹿児島県

8) **肥田昌子**、**北村真吾**、**大澤要介**、**片寄泰子**、**野崎健太郎**、**榎本みのり**、**有竹清夏**、**樋口重和**、**加藤美恵**、**亀井雄一**、**池田正明**、**三島和夫**: 末梢リズムは個人の睡眠特性・生物時計特性を反映する. 第 19 回 日本時間生物学会、2012 年 9 月 15 日、札幌市

9) **Ikeda M**: Molecular mechanism underlying resetting of the circadian oscillation of Bmal1. 1st Swiss Chronobiology Meeting, Sep. 6, 2012, Fribourg, Swiss

10) **熊谷恵**、**岡部尚志**、**上野宗久**、**池田正明**: 腫瘍の時間治療の分子基盤確立を目指して-トポイソメラーゼ I の発現動態の解析を中心として-. 第 14 回応用薬理シンポジウム 2012 年 9 月 3-4 日、甲府市

11) **Kumagai M**, Piao C, Yang F, Chiba Y, Nakajima Y, **Ikeda M**: Effects of USF1 on the circadian oscillation of clock genes. XII Congress of the European Biological Rhythms Society. 2011.08.20-26, Oxford, England

[その他]

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/seiri2/Masaaki%20Ikeda2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

**池田正明** (IKEDA, Masaaki)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80232198

(2) 研究分担者

熊谷 恵 ( KUMAGAI,  
Megumi )  
埼玉医科大学・医学部・助手  
研究