

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890180

研究課題名 がん細胞における分化度と体内時計の相関関係の解明

研究課題名 Disruption of circadian rhythm in malignant cancer cells

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

研究成果の概要（和文）：分化させた細胞から、ES 細胞に近い性質を持つ人工多能性幹 (iPS) 細胞を作ると、体内時計のリズムが消え、細胞の分化と体内時計の形成が密接に関係していることが明らかにされている。本研究では、悪性度の高い未分化ながん細胞ほど、体内時計が喪失しているのか検証した。その結果、正常細胞に比べ、ヒト神経膠芽腫では、概日リズムが大きく乱れている細胞株から、あまり乱れていない細胞株まで様々であることがわかった。さらに、これらの細胞をレチノイン酸処理し、概日リズム成分の変化を測定した。

研究成果の概要（英文）：Previously, it has been shown that there is no detectable circadian rhythm in mouse embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells derived from somatic cells with circadian oscillation. This suggests that cellular differentiation has a highly correlation with organization of circadian rhythm. In this study, I investigated whether disruption of circadian rhythm in human cancer cell lines is correlated with its degree of malignancy. As a result, the circadian rhythmicity was varied based on cell lines comparing with human U2OS cells, osteosarcoma cell lines. Furthermore, I examined the effect of retinoic acid treatment to the circadian rhythm in these human glioblastoma cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：がん、体内時計、ES 細胞

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、疫学調査によれば、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、大腸がんもまた (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」という考えを基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、このような一部のがん細胞を「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が、その概念は、未だ成熟しきっておらず、絶対的な分子マーカーの同定すらできていないのが現状である。しかしながら、悪性腫瘍では、遺伝的不均一性が広範に認められることは確かであり、分化度の低いものほど転移後の増殖も早く、治療予後も不良であることは常識となっている。従って、がん細胞で、その細胞分化度を知ることは、治療する上で、非常に重要である。

さらに、八木田ら (2010) は、あらゆる細胞を作ることができる胚性幹 (ES) 細胞が、別の細胞に分化する過程で体内時計が発生すること、逆に、分化させた細胞から、ES細胞に近い性質を持つ人工多能性幹 (iPS) 細胞を作るとリズムは消えることを示し、細胞分化を可逆的に誘導すると、体内時計も可逆的に自己組織化されることを明らかにした (Yagita et al., PNAS 2010)。

そこで、本研究では、未分化細胞であるES細胞が、体内時計のリズムを刻んでいないのと同様に、悪性度の高い未分化ながん細胞ほど、体内時計が喪失しているのか検証する。

2. 研究の目的

本研究では、未分化細胞であるES細胞が、体内時計のリズムを刻んでいないのと同様に、悪性度の高い未分化ながん細胞ほど、体内時計が喪失しているのか明らかにする。この研究により、体内時計の形成度が、がん細胞の悪性度を測る一つの指標になりえ、さらに、体内時計形成の解明が、がん細胞を含めた「分化・発生」の統合的理解の糸口になる可能性がある。

3. 研究の方法

数種類の分化度の違うヒト神経膠芽腫において、体内時計の形成度を長時間リアルタイム発光イメージング法で調べた。膠芽腫は星状細胞系腫瘍の中で、最も悪性で予後不良の腫瘍といわれている。

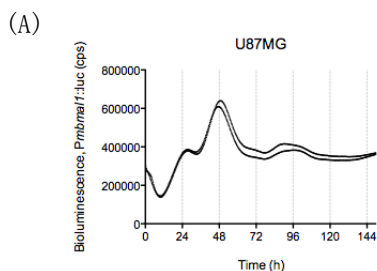
体内時計の機能をつかさどる時計遺伝子で、代表的な遺伝子の一つであるBmal1のプロモーターの下流に、ホタルの発光酵素「ルシフェラーゼ」の遺伝子を融合したものを細胞に導入した。安定な発現細胞株を作製するために、メダカのトランスポゾンベースの発現ベクターを用い、ゲノムに組み込んだ。その発光の強弱によって体内時計が機能しているか測定し、統計的にリズム解析を行った。発光測定には、多細胞レベルでの長時間発光測定に加えて、オリンパス発光イメージング顕微鏡LV200を用いて、1細胞レベルのリズム解析も行った。

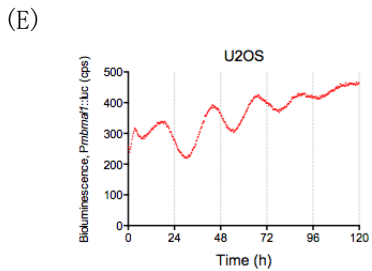
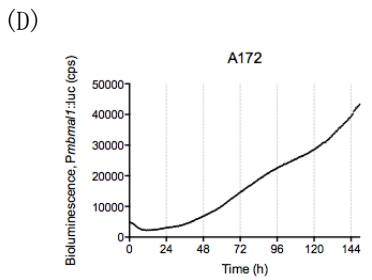
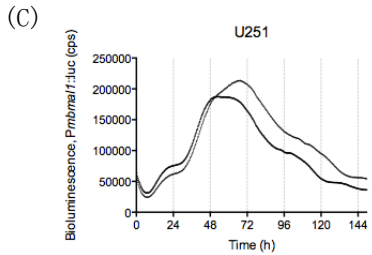
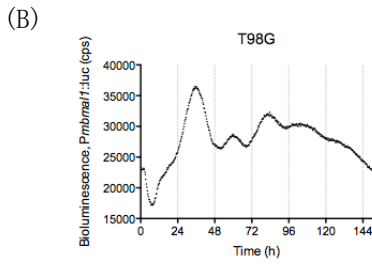
次に、ホルモンでありビタミンA代謝産物でもあるレチノイン酸処理をこれらの細胞に対して、概日リズム測定を行った。レチノイン酸は、細胞分化、細胞分裂周期の停止、またはアポトーシスを促進する作用が最も良く知られており、抗がん剤としても提案されているものである。

4. 研究成果

(1) 数種類の膠芽腫において、概日リズム形成度を調べた。光電子増倍管を用いた多細胞レベルの観察と冷却CCDカメラと顕微鏡を用いた1細胞レベルの観察により明らかにした。リズム度を定量するためには、スペクトル解析を行った。その結果、正常細胞(U2OS細胞)を用いた。概日リズムを示す細胞として世界中で用いられているヒトの細胞。図1E)に比べ、ヒト神経膠芽腫では、大きく乱れている細胞株から、あまり乱れていない細胞株まで様々であることがわかった。

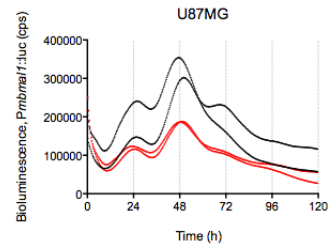
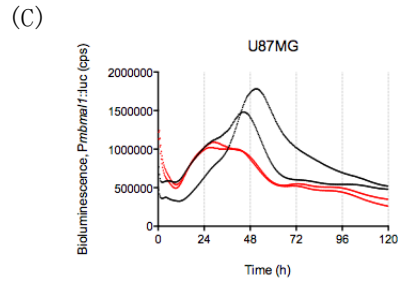
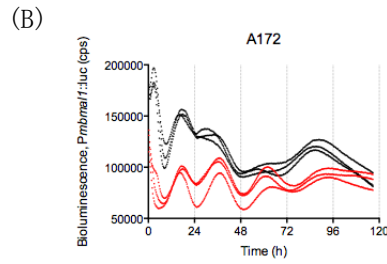
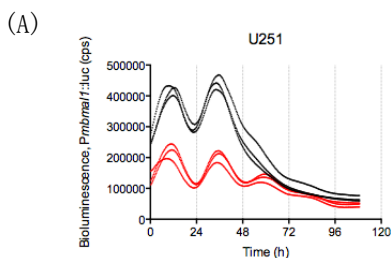
図1 (A) U87MG細胞、(B) T98G細胞、(C) U251細胞、(D) A172細胞、(E) U2OS細胞、光電子増倍管を用いた多細胞レベルの観察データ。発光測定は、20分に1回測定した。





(2) 次に、概日時計機能が障害されていることが明らかとなったヒト神経膠芽腫に、レチノイン酸を投与して分化誘導を行い、概日時計機能が回復するかどうかを観察した。定量的な概日リズム度を評価するために、スペクトル解析を行った (図2)。

図2 (A) U251細胞、(B)A172細胞、(C) U87MG細胞 (2回行っている)、光電子増倍管を用いた多細胞レベルの観察データ。発光測定は、20分に1回測定した。黒：未処理、赤：レチノイン酸処理を行った。



レチノイン酸処理により、概日リズム成分が大きくなった細胞株も存在した。しかし、これらの細胞株は測定をするたびに、概日リズム成分を示すときとそうでないときがあり (図2C)、結果の解釈にはさらなる検討が必要である。

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)

[学会発表] (計2件)

① Yasuhiro Umemura “Effect of cellular reprogramming factors on circadian molecular oscillation in mammals.” Society of Research on Biological Rhythm, 2012年5月16日～2012年5月25日, Sandestin Golf and Beach Resort Destin (Florida, America)

② Yasuhiro Umemura “Effect of cellular reprogramming factors on circadian molecular oscillation in mammals.” 日本時間生物学会, 2012年9月15日～2012年9月16日, 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：