

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670079

研究課題名(和文) 分子時計を基盤にした体内金属元素の日周リズムの成因解明：金属と分子時計の相互作用

研究課題名(英文) The molecular clock mechanism underlying the circadian rhythm of cellular metal level: interaction between molecular clock and cellular metal

研究代表者

大戸 茂弘 (Ohdo, Shigehiro)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00223884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、colon26腫瘍移植モデルマウスを対象に、がん組織中において鉄代謝機構に日周リズムが認められた。また、TfR1(Transferrin Receptor 1)を介して、細胞内の鉄量を調節しているIRP2(Iron Regulatory Protein 2)の発現量には、鉄量と相関する日周リズムが認められた。さらに、IRP2による転写後調節により発現量が安定化される、TfR1の発現量にも同様の日周リズムが認められ、TfR1発現の日周リズムにIRP2による安定化が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Iron is an important biological catalyst and is critical for DNA synthesis during cell proliferation. Cellular iron uptake is enhanced in tumor cells to support increased DNA synthesis. In this study, we identified a 24-hr rhythm in iron levels in colon-26 tumors implanted in mice and the expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). Furthermore, IRP2 regulated the 24-hr rhythm of transferrin receptor 1 (TfR1) mRNA expression post-transcriptionally by binding to RNA stem-loop structures known as iron-response elements. The transcription of IRP2 mRNA was promoted by circadian clock genes, including BMAL1 and CLOCK heterodimer. The expression of IRP2 in tumor cells was affected by the circadian organization of the molecular clock. Our findings suggest that circadian organization contributes to cell proliferation by regulating iron metabolism and may play a role in the circadian rhythm of other metals.

研究分野：時間薬理学

キーワード：薬学 生体リズム 体内時計 時計遺伝子 金属元素

1. 研究開始当初の背景

生体リズムは進化の過程で獲得された巧妙な仕組みである。体内時計の本体は、視神経が交差する視交叉上核 (SCN) に位置し、時計遺伝子により制御されている。SCN が中枢時計として、ホルモンや自律神経の日周リズムを制御し、末梢の分子時計を制御している。生体リズムは、健康を保持・増進させる上でも重要で、その破綻が睡眠障害、精神疾患のみならず三大死因疾患 (心・脳・癌) の高リスクにつながる。こうした状況の中で我々は、インターフェロンが末梢のみならず中枢の分子時計を変容させ、光による体内時計の調節機能等を傷害させることを世界で初めて明らかにした。また分子時計の変容により薬物代謝・輸送機能が障害されることを突き止めた。さらに癌細胞の増殖・修復・アポトーシスにリズムが認められ、正常時とは異なった分子時計機構により制御されていることを明らかにした。

21 世紀は微量金属元素の時代と言われている。生体内金属といえば、メチル水銀による水俣病、ヒ素ミルク事件、重金属の発ガン性、重金属の内分泌攪乱性 (環境ホルモン) などが注目されてきたが、欠乏症と過剰症の問題も健康維持に重要である。最近、健康の維持や、疾病との関連で、金属元素を含む医薬品やサプリメントが市販され、元素の1日必要量や身体の中での役割への関心が高まっている。通常、元素は、酵素、タンパク質あるいはホルモンにより調節され、ある一定の濃度範囲で存在

する。金属元素の日周リズムは、Ca や Zn など、また金属元素の体内時計に及ぼす影響は Li、Ca など知られているが、詳細な作用機序は不明である。

生体内金属は、酵素やタンパク質の構成成分として必須であり生体の恒常性維持に重要な働きをしている。生体内金属の一つである鉄は、酸素運搬やミトコンドリアにおけるエネルギー産生のみならず、DNA 合成に必須なリボヌクレオチド還元酵素をはじめとした、多くの酸化還元酵素の活性に必要な生体に不可欠な金属である。また、がん細胞中では過剰な DNA 合成及び細胞増殖のため、鉄代謝機構が亢進しており、がん細胞中における鉄量の調節はがん細胞の増殖において非常に重要である。しかし、この鉄代謝機構と概日時計機構との関連については未解明である。こうした状況の中で、癌細胞のトランスフェリン受容体の日周リズムにあわせたトランスフェリンリボソーム製剤の新規時間薬物送達方法の開発に成功した。また細胞内で Fe の日周リズムが認められ、分子時計の関与を示唆する所見を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、col on26 腫瘍移植モデルマウスを対象に、がん細胞中の鉄量の日周リズムの存在とその制御機構の解明を目的として、鉄代謝機構関連因子である IRP2 に着目し検討した。また、がん細胞中の鉄代謝機構に及ぼす分子時計の影響を明らかとし、鉄代謝機構を介した細胞増殖に及ぼす分子時計の影響について検討した。

3. 研究の方法

実験動物及び細胞：実験には自由摂食摂水、明暗周期(明期 7:00-19:00)条件下で2週間飼育した、5週齢 BALB/c 雄性マウスを使用した。また、マウス結腸癌細胞として colon26 細胞を使用した。

colon26 腫瘍移植モデルマウスを対象に、がん細胞中の鉄量の日周リズムの存在とその制御機構の解明を目的として、鉄代謝機構関連因子である IRP2 に着目し検討した。がん細胞中の鉄代謝機構に及ぼす分子時計の影響を明らかとし、鉄代謝機構を介した細胞増殖に及ぼす分子時計の影響を明らかにした。時計遺伝子 CLOCK の exon19 を変異させ転写活性機能が失活した CLOCK 19 を安定発現させた colon26 細胞(colon26 19)をマウスに移植し、同様に鉄、及び鉄代謝機構関連因子の発現リズムを検討した。さらに、colon26 細胞と colon26 19 細胞の細胞増殖能に及ぼす Holo-Transferrin の影響を評価した。

鉄量、mRNA 及び蛋白質発現量の定量：BALB/c 雄性マウスの右足底部に腫瘍細胞を移植することで、腫瘍モデルマウスを作製した。腫瘍モデルマウスより、異なる時刻(9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, または 5:00)で腫瘍組織を採取し、原子吸光光度法により鉄量を、Real-time RT-PCR 法により mRNA 発現量を、Western-blot 法により蛋白質発現量を測定した。

ルシフェラーゼアッセイ：IRP2 遺伝子のプロモーター領域を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成した。作成

したレポーターベクターを各転写因子の発現ベクターと共に colon26 細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

免疫沈降法：IRP2 プロモーター領域に存在する、時計遺伝子応答配列に対する時計遺伝子の結合を、2時点(9:00 or 21:00)において ChIP(Chromatin immunoprecipitation)アッセイにより評価した。

細胞増殖能の測定：腫瘍細胞に Holo-Transferrin を暴露後 48hr、37 °C でインキュベートした。その後、細胞生存率を ATP アッセイにより測定した。

統計解析：統計解析には分散分析法(ANOVA), Scheffe ' s test を用い、有意水準を 5%とした。

4. 研究成果

まず、本研究では、colon26 腫瘍移植モデルマウスを対象に、がん細胞中の鉄量の日周リズムの存在とその制御機構の解明を目的として、鉄代謝機構関連因子である IRP2 に着目し検討した。

がん組織中における鉄量には、暗期前半に高値を示す有意な日周リズムが認められた。がん組織中において鉄代謝機構に日周リズムがあることが示唆された。そこで、TfR1 を介して、細胞内の鉄量を調節している IRP2 に着目してそのメカニズムを検討した。その結果、IRP2 の発現量には鉄量と相関する日周リズムが認められた。また、IRP2 による転写後調節により発現量が安定化される、TfR1 の発現量にも同様の日周リズムが認められ、TfR1 発現の日周リズムに IRP2 による安

定化が重要であることが明らかとなった。さらに、IRP2 の日周リズム制御機構を明らかにするため IRP2 遺伝子のプロモーター領域を対象としてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、IRP2 遺伝子の発現リズムが、時計遺伝子である BMAL1/CLOCK により転写レベルで制御されていることを明らかにした。

次に、がん細胞中の鉄代謝機構に及ぼす分子時計の影響について検討し、鉄代謝機構を介した細胞増殖に及ぼす分子時計の影響を明らかにした。時計遺伝子 CLOCK の exon19 を変異させ転写活性機能が失活した CLOCK 19 を安定発現させた colon26 細胞をマウスに移植し、同様に鉄、及び鉄代謝機構関連因子の発現リズムを検討した。その結果、それらの日周リズムの消失と、発現量の低下が認められた。このことから、鉄代謝機構は時計遺伝子により転写レベルで制御されていることが示唆された。さらに、colon26 細胞と colon26 19 細胞の細胞増殖能を評価したところ、colon26 19 細胞では増殖能が有意に低下していたが、Holo-Transferrin を暴露することでその増殖能が回復した。この結果より、時計遺伝子の変異が鉄代謝機構の低下を引き起こし、細胞増殖能の低下を引き起こしていることが示唆された。本研究の結果から、鉄代謝機構に日周リズムが存在し、この日周リズムは時計遺伝子による転写レベルの制御に加え、mRNA の安定化という新規機序での制御により生じることが明らかとなった。また、鉄代謝機構を介して分子時計が細胞増殖を制御している

可能性が示唆された。

現在、その他の金属および細胞についても検討を進めており、これまでに得られた成果を基盤に、さらに発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1.Wada E, Koyanagi S, Kusunose N, Akamine T, Masui H, Hashimoto H, Matsunaga N, Ohdo S. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor- activity by bile acids causes circadian changes in the intestinal expression of Octn1/Slc22a4 in mice. *Mol Pharmacol* 87(2), 314-322, 2015. doi: 10.1124/mol.114.094979.
- 2.Okamura A, Koyanagi S, Dilxiat A, Kusunose N, Chen JJ, Matsunaga N, Shibata S, Ohdo S. Bile acid-regulated peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR) activity underlies circadian expression of intestinal peptide absorption transporter PepT1/Slc15a1. *J Biol Chem* 289(36), 25296-25305, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.577023.
- 3.Matsunaga N, Itcho K, Hamamura K, Ikeda E, Ikeyama H, Furuichi Y, Watanabe M, Koyanagi S, Ohdo S. 24-hour rhythm of aquaporin-3 function in the epidermis is regulated by molecular clocks. *J Invest Dermatol* 134(6), 1636-1644, 2014. doi: 10.1038/jid.2014.13.
- 4.Oda M, Koyanagi S, Tsurudome Y, Kanemitsu T, Matsunaga N, Ohdo S. Renal circadian clock regulates the dosing-time dependency of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Mol Pharmacol* 85(5), 715-22, 2014. doi: 10.1124/mol.113.089805.

5. Okazaki H, Matsunaga N, Fujioka T, Okazaki F, Akagawa Y, Tsurudome Y, Ono M, Kuwano M, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian regulation of mTOR by the ubiquitin pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 74(2), 543-551, 2014. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3241.

6. 小柳 悟、大戸茂弘. 薬物動態の概日リズムと DDS 開発. *Drug Delivery System* 29(5), 439-446, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大戸茂弘 (OHDO SHIGEHIRO)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：00223884