

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860179

研究課題名(和文) 悪性腫瘍の分化度と概日リズム形成不全の関係

研究課題名(英文) Circadian rhythm disruption in human cancers

研究代表者

梅村 康浩 (Yasuhiro, Umemura)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40612734

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)：がん細胞の分化度とその体内時計形成度の関係を明確にするために、ヒト癌細胞株において、正常な概日リズムを刻むかを解析した結果、明瞭な概日リズムを観察できなかった。次に、これらの細胞を用いて、遺伝子発現を網羅的に調べた結果、時計遺伝子群において、明確な発現量の差は示されなかった。そこで、当初の計画を変更し、Myc過剰発現マウス胚性幹細胞株を作製し、それらを*in vitro*で分化させ、概日リズム形成破綻モデル系を形成した。その結果、Mycの過剰発現をして、分化させると、概日リズム振動が顕著に阻害された。RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析の結果、時計形成を阻害する遺伝子ネットワークを同定した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the correlation between circadian clock development and differentiation stage of cancer cells, the circadian clock in the several human cancer cell lines were investigated. The circadian clock rhythm of these human cancer cell lines was not detected. However, the clock gene set in these cell lines was expressed. Next, the model of cancer development cell lines by myc overexpression using mouse embryonic stem cells (ESCs) was established. The *in vitro* differentiated ES cells during the induction of myc showed no circadian rhythm oscillation. The global gene expression analysis by RNA-seq identified the gene network inhibiting clock formation.

研究分野：体内時計

キーワード：体内時計 がん 細胞分化

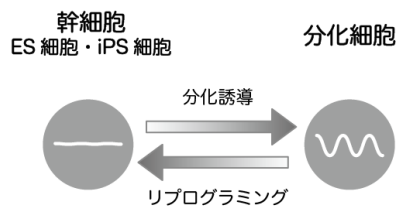
1. 研究開始当初の背景

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、疫学調査により、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 (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」という考えを元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 (ES) 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 (Visvander et al., Nat Rev Cancer 2010)。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。

また、近年、がん幹細胞の遺伝子発現特性は、ES細胞と非常に似ていることが明らかにされた (Kim et al., Cell 2010)。

本研究室では、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) 細胞を作ると体内時計のリズムは消失することを示し、細胞分化を可逆的に誘導すると、体内時計も可逆的に形成されることを明らかにした (下図: Yagita et al., PNAS 2010)。



2. 研究の目的

すでに行っている実験では、数種類の低分化型のヒト癌細胞で体内時計のリズムが大きく乱れているのが観察された。さらに、がん治療法の一つでもある分化誘導を行うと、一部の細胞で、正常に近い概日リズムを刻むようになった。そこで、本研究では、がん細胞分化度と概日時計機能との相関関係をさらに明確にし、そのリズム形成阻害機構を分子レベルで明らかにする。具体的には、以下の2点を行う。

(1) 数種類の分化度の異なるヒトがん細胞において、体内時計の形成度とがん悪性度を詳細に調べる。

これらの細胞を用いて、体内時計の機能をつかさどる時計遺伝子のプロモーター下流に、ホタル発光酵素「ルシフェラーゼ」遺伝子を導入し、発光の強弱によって体内時計の形成度を長時間・リアルタイムで観察する。リズム振動が観察されないものについては、リズム同調機構が破綻しているために、見かけ上概日リズムが観察されない可能性があるため、顕微鏡を用いて、1細胞レベルの長時間発行測定を行う。

(2) 未分化ながん細胞で、概日リズムが阻害される機構を明らかにする。

概日リズムは、時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群による遺伝子ネットワークによって、形成されると考えられている。私が行った実験で、これらの未分化な癌細胞において、時計遺伝子の発現解析をした結果、すべての時計遺伝子が発現していることがわかった。さらに、がん治療法の一つでもある分化誘導を未分化な癌細胞にも行うと、概日リズムが回復することがわかった。このことは、未分化な癌細胞であっても、正常なリズムを刻む機構を秘めていることを示唆する。これは、ES細胞において、時計遺伝子群は発現しているにも関わらず、リズムが刻まれない状態と非常によく似ている (Yagita et al., PNAS 2010)。従って、本研究は、癌細胞における分化と体内時計の関係だけでなく、正常な発生における細胞分化と体内時計形成の関係についても、深い示唆を得られる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) がんの分化度と概日時計機能との相関解析をおこなう。

分化度の違うヒトがん細胞で、体内時計が機能しているか測定する。体内時計の形成度を測定するためには、時計遺伝子プロモーター下流に、ホタル発光酵素「ルシフェラーゼ」遺伝子に融合したものをレポーターとして用い、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う。このレポーターは、メダカのトランスポゾンベースのベクターでできており、非常に簡単にどんな細胞でも安定発現株を得ることができている。発光測定には、多細胞レベルの発光測定に加えて、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をする。

(2) 未分化な癌細胞で体内時計形成を阻害するキー分子の同定をする。当初の研究計画を変更し、がん細胞分化度とその体内時計形成の破綻の関係を明らかにするために、概日リズム形成破綻モデル系として、ドキシサイクリン誘導性 Myc 過剰発現マウス胚性幹細胞株 (ES細胞) を作製し、それらを in vitro で分化させ、体内時計形成の様子をルシフェラーゼレポーターを用いた発光測定により観察

した。

これらの遺伝子解析には、定量 PCR 法、ミクロアレイ解析、RNA-seq を用いた。その他、時計タンパク質の解析には、免疫染色法とウェスタンブロットを行った。

4. 研究成果

がん細胞の分化度とその体内時計形成度の相関関係を明確にするために、いくつかのヒトがん細胞において、正常な概日リズムを刻むかを詳細に解析した。はじめに、時計遺伝子 *Bmal1* のプロモーター下流にルシフェラーゼ発光レポーターを組み込んだものを用いて、発光強度の長時間観察を行い、その細胞の概日リズムを観察した。安定にレポーターを細胞のゲノムに組み込むために、メダカのトランスポゾンベースのベクターを用いて、安定発現株を樹立した。PMT を用いた多細胞レベルの測定において、正常な概日リズムを刻むヒト細胞(広く概日リズム研究で使用されている U2OS 細胞)に比べ、明確な概日リズムを観察することは出来なかった。次に、一つ一つの細胞は、リズムを刻んでいるが、細胞間の同期が出来ていない可能性を考え、EMCCD カメラを用いた 1 細胞レベルで発光強度の長時間観察を行った。これらの Fast Fourier Transform (FFT) 周波数解析の結果、当初の予想通り、明確な概日リズムを観察することは出来なかった。

次に、これらの細胞株を用いて、遺伝子発現を網羅的に調べた。その結果、驚くべきことに、これまでに報告のある多くの時計遺伝子群において、明確な発現量の差は示されず、概日リズム形成には、時計遺伝子群の発現レベルは、それほど重要でないことがわかった。

これらのことから、新規時計遺伝子の存在や、時計遺伝子群の翻訳後修飾の変化などを詳細に検討する必要があると考えられる。

当初の研究計画を変更し、がん細胞分化度とその体内時計形成の破綻の関係を明らかにするために、概日リズム形成破綻モデル系として、ドキシサイクリン誘導性 Myc 過剰発現マウス胚性幹細胞株(ES 細胞)を作製し、それらを *in vitro* で分化させ、体内時計を形成させることにした。そのために、まず、*in vitro* 分化誘導による体内時計形成の方法を確立する必要性が出てきた。その結果、非常に、再現性良く安定して、体内時計の振動を形成させることができる方法を確立させることに成功した (Umemura et al., PlosOne 2013)。

次に、この方法を用いて、Myc の過剰発現をしながら、*in vitro* で分化誘導をすると、概日リズムの振動が顕著に阻害されるということがわかった (Umemura et al., PNAS 2014)。これは、細胞を分化させた後に、Myc の過剰発現を誘導しても、概日リズムの振動は、阻害されなかったことと、大きく異なっていた。また、この時計形成の破綻は、Myc

の過剰発現を停止すると、徐々に時計が形成されるということもわかった (Umemura et al., PNAS 2014)。Myc の直接的な影響によって、時計形成が阻害されるわけではないことが示唆された。これらの現象を詳細に調べるために、定量 PCR 法によって、時計遺伝子群の発現量を定量的に解析した結果、発現量に大きな差は観察されなかった (Umemura et al., PNAS 2014)。これらのモデル系を用いて、RNA sequencing (RNA-seq) による網羅的な遺伝子発現解析も行った。その結果、体内時計が破綻している細胞全てにおいて、時計遺伝子は発現しており、発現量に差がないことがわかった。さらに、遺伝子発現解析した結果、時計形成の破綻を誘発する数百の遺伝子ネットワークを同定した。

そこで、さらに、時計タンパク質の状態を調べるために、免疫染色とウェスタンブロットを行った。抗体は、時計遺伝子ノックアウトマウスから樹立した線維芽細胞株を用いて、時計タンパク質を特異的に認識することを確認したものを用いた。その結果、時計形成が破綻している細胞では、時計タンパク質が、細胞を分化させる前の ES 細胞のときの状態と非常に類似していることがわかった (Umemura et al., PNAS 2014)。今後、これらの詳細な分子機構を解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Umemura Y, Koike N, Matsumoto T, Yoo S-H, Zhen C, Yasuhara N, Takahashi JS, Yagita K. Transcriptional Program of *Kpna2* /Importin- α 2 Regulates Cellular Differentiation-Coupled Circadian Clock Development in Mammalian Cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 111, E5039-5048, 2014. 10.1073/pnas.1419272111

Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, Takeda J, Inokawa H, Horie K, Yagita K. "An *in vitro* ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2 as an endogenous clock regulator." *PLoS One*, 査読有, 2013 Jun 28;8(6):e67241. 10.1371/journal.pone.0067241

〔学会発表〕(計 5 件)

八木田和弘, 小池宣也, 梅村康浩, 大橋宗洋, 「発生過程における概日時計の成立機構の解明」新学術領域研究「ゲノム支援」(ポスター発表), 国立京都国際会館(京都府・京都市), 2015年8月27日

梅村康浩, *Kpna2*/Importin-2 は、哺乳類における細胞分化と共役した体内時計形成を制御する, 第 25 回京都府立

医科大学学友会青蓮賞受賞講演，京都府立医科大学（京都府・京都市），2015年3月6日

梅村康浩，細胞分化センサーとしての生物時計，細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会，自然科学研究機構生理学研究所（愛知県・岡崎市），2014年12月4日

梅村康浩，小池宣也，安原徳子，八木田和弘細胞分化に伴う哺乳類概日時計の発生分子メカニズム第87回日本生化学会，（口頭、ポスター両方），国立京都国際会館（京都府・京都市），2014年10月17，18日

Umemura Y and Yagita K. ES cell-based evaluation system of circadian phenotypes in mammals. The 16th MEMBRANE RESEARCH FORUM, Kyoto, 2013.

〔図書〕（計1件）

梅村康浩，八木田和弘，Kpna2/Importin-2による転写プログラムは，哺乳類における細胞分化と共役した体内時計形成を制御する，秀潤社，細胞工学，2015，vol.34，No.3，298-299.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

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

なし

(3) 連携研究者

なし