

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670317

研究課題名(和文)体内時計の機能強化によるがん予防法の開発

研究課題名(英文)Development of preventive strategy against oncogenesis by strengthening circadian clock function

研究代表者

小柳 悟 (Koyanagi, Satoru)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60330932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：社会活動の24時間化によって引き起こされる体内時計の機能異常は、がんの発症リスクを増大させることが指摘されている。しかしながら、体内時計の機能異常に伴う発がんに対する予防法なく、そのメカニズムについても十分に解明されてない。本研究では体内時計の機能を活性化させることで、がんに対する新しい予防法を開発することを目的に検討を行った。その結果、体内時計の機能異常に伴う細胞のがん化は、時計分子機構がどのように壊れるかによって左右されることが明らかになり、その見極めが発がんの予防に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although disruption of circadian clock machinery is thought to increase the risk of cancer development, there is no preventive strategy against oncogenesis which is caused by circadian clock disruption. Circadian rhythms in physiological function are generated by a molecular oscillator driven by transcriptional-translational feedback loop consisting of negative and positive regulators. Genetic ablation of either negative or positive transcriptional regulators of the circadian clock leads to disrupted rhythms in physiological functions, but we found that negative and positive transcriptional regulators of circadian feedback loop had different roles in oncogene-induced neoplastic transformation. Our findings suggest that appreciation of the mechanism for circadian clock disruption is important for prevention of cancer development.

研究分野：時間生物学

キーワード：時計遺伝子 発がん

## 1. 研究開始当初の背景

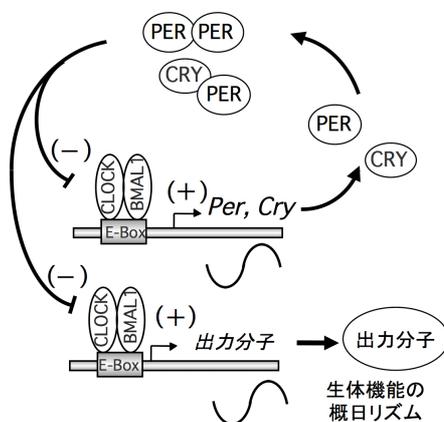
社会活動の24時間化によって引き起こされる体内時計の機能異常は、がんの発症リスクを増大させることが指摘されている。しかしながら、時計機能を強化することで「発がん」を予防・治療しようとする試みはない。これは体内時計の機能異常のメカニズムが不明であったこと。また、時計機能を回復させる有効な手段がなかったためである。

生体機能の概日リズムは、個々の細胞内で時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群が、約24時間周期で発現の増減を繰り返すことで引き起こされる。そのため、細胞レベルでの時計遺伝子の機能強化（体内時計の活性化）は、がん化を抑制する新しい予防法の開発に繋がる可能性がある。

## 2. 研究の目的

生体機能の概日リズムを制御する「時計遺伝子」は、これまでに20種類近くが同定され、それら遺伝子の変異・欠損動物はいずれも生体リズムに変調をきたす。一方で、生体リズムの乱れによる発がん率の増大については種々のメカニズムが提唱されているが、未だ統一した見解は得られていない。我々は、この主な原因は「時計遺伝子が相互に発現や機能を制御し合うため、各々の因子の機能が区別されてないため」と考えた。

時計遺伝子は、主に「転写促進因子(CLOCK、BMAL)」と「転写抑制因子(PER、CRY)」が互いの発現を制御し合うことでリズムを発振する(下図)。そこで「体内時計の機能低下によ



時計遺伝子による概日リズム発振機構

る細胞がん化のメカニズム」を解明するため、

時計遺伝子を機能別（促進系と抑制系）に分け、各機能別に時計遺伝子を欠損させた細胞を用いて悪性形質転換率（がん化率）を検討した。また、以前の研究で、我々はcAMP依存性転写因子である Activating Transcription Factor-4 (ATF4、別名 CREB2) の発現は時計遺伝子によって制御されるが、本因子が概日時計から発振されるリズムを維持する機能も有していることを見出し、体内時計の機能保持において重要な役割を担っていることを明らかにしている (Koyanagi et al., J Biol Chem, 2011)。本研究では時計遺伝子の機能別欠損細胞のがん化率の違いについて評価を行い、細胞のがん化における各因子の役割について検討を行った。また、ATF4の機能に着目し、時計遺伝子の低下による細胞がん化に対して、ATF4がどのような働きを担っているかについても検討した。

## 3. 研究の方法

① 野生型および時計遺伝子 *Period2*、*Bmal1* のノックアウトマウス (*Per2<sup>m/m</sup>*、*Bmal1<sup>-/-</sup>*) から、胎児線維芽細胞 (MEF) を調整し、各細胞を H-Rav<sup>V12</sup> および SV40LT を発現するレトロウイルスベクターに感染させ、がん化を誘導した。

*In vitro* における細胞のがん化については、二次元培養時における増殖速度、足場非依存性の増殖能の獲得を評価することで行った。また、がん化した MEF 細胞の腫瘍形成能は、各細胞をヌードマウスの背部皮下に移植して腫瘍体積を測定することで評価した。マウスは自由摂食・摂水、明暗周期 (明期 7:00-19:00) 条件下で飼育し、各々の実験に使用した。ウイルスベクターの作成および動物実験は、それぞれ九州大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の許可のもとに実施した。

② がん遺伝子の導入による細胞の老化については p53、p16Ink4a、ARF の各細胞老化因子の発現量、β-ガラクトシダーゼの発現を測定することで評価した。細胞老化因子のタンパク発現は Western blot 法で、RNA の発現量は RT-PCR 法にて測定した。

③ *Per2<sup>m/m</sup>*、*Bmal1<sup>-/-</sup>*細胞のがん化に対する ATF4 の機能評価は、各細胞に ATF4 を強制発現、または siRNA を用いた ATF4 の発現抑制を行い、それら細胞の足場非依存性の増殖能を測定することで評価した。

④ *Per2<sup>m/m</sup>*、*Bmal1<sup>-/-</sup>*マウスの行動リズムの解析には Clock Lab Software (Actimetrics 社製) を用いた。多群間比較には one-way ANOVA および Tukey-Kramer テストを用い、有意水準は 5% 以下で判定を行った。

#### 4. 研究成果

##### ① 細胞のがん化に及ぼす概日時計遺伝子「転写抑制因子」と「転写促進因子」の影響

野生型マウスの行動リズムを解析した結果、明暗周期環境下では暗期に活動量が上昇する有意なリズムが認められ、恒暗環境下においても約 23.5 時間周期の概日性的リズムが観察された。一方、*Per2<sup>m/m</sup>* (転写抑制因子) および *Bmal1<sup>-/-</sup>* (転写促進因子) マウスの行動には明暗周期下および恒暗環境下のいずれにおいても明瞭な概日リズムを示さなかった。

次に各遺伝子型における雌雄のマウスを交配させ、既報に従って MEF 細胞を調整した。調整した各細胞にはがん遺伝子 (H-Ras<sup>V12</sup> および SV40LT) を導入し、がん化率を評価した。野生型および *Per2<sup>m/m</sup>* 細胞では、がん遺伝子の導入によって増殖速度の増加、足場非依存性増殖能の獲得が観察され、同細胞をヌードマウスの背部皮下に移植した際には腫瘍の形成が認められた。また、野生型細胞に比べ、*Per2<sup>m/m</sup>* 細胞はより顕著な腫瘍径の増大を示した。一方、*Bmal1<sup>-/-</sup>* 細胞にがん遺伝子を導入した際、H-Ras<sup>V12</sup> および SV40LT は、野生型および *Per2<sup>m/m</sup>* 細胞とほぼ同レベルの発現を示したが、増殖速度の増加、足場非依存性増殖能の獲得は観察されず、ヌードに移植した際の腫瘍形成も認められなかった (図 1)。また、がん遺伝子を導入した *Bmal1<sup>-/-</sup>* 細胞では p16INK4a、ARF の発現増加と共に β-ガラクトシダーゼの発現亢進が認められ、細胞老化の誘導が観察された。

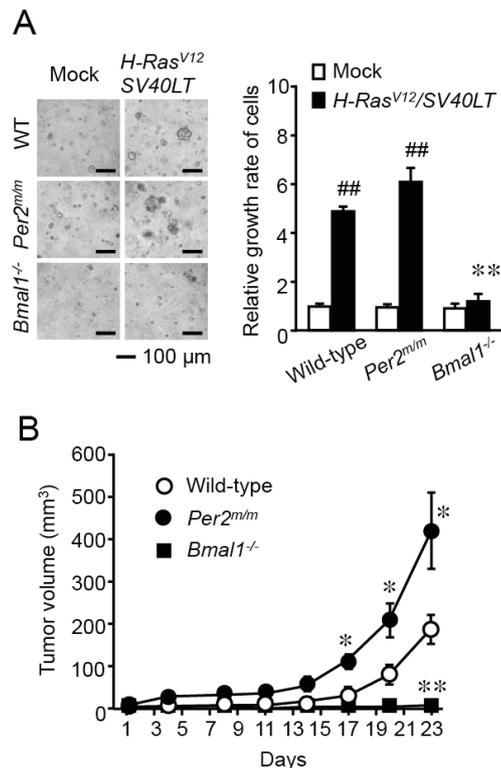


図 1 がん遺伝子を導入した野生型、*Per2<sup>m/m</sup>*、*Bmal1<sup>-/-</sup>* 細胞の足場非依存増殖能 (A) および腫瘍形成能 (B) の差異。各図の値は平均値±標準誤差を示す。## P<0.01, 各細胞種における Mock 群の差を示す。\*\* P<0.01, 野生型細胞群との差を示す。

##### ② 時計遺伝子の機能不全細胞のがん化における ATF4 の役割

がん遺伝子を導入した野生型および *Per2<sup>m/m</sup>* 細胞では ATF4 の発現上昇と共に、pRB タンパク質のリン酸化が観察され、細胞周期の亢進と一致した見解が得られたが、これら細胞に ATF4 に対する siRNA を導入したところ、足場非依存性増殖能の低下が認められた。一方、*Bmal1<sup>-/-</sup>* 細胞ではがん遺伝子を導入しても ATF4 の発現上昇は観察されなかったが、同細胞に ATF4 を強制発現させたところ、足場非依存性増殖能の亢進が認められた。

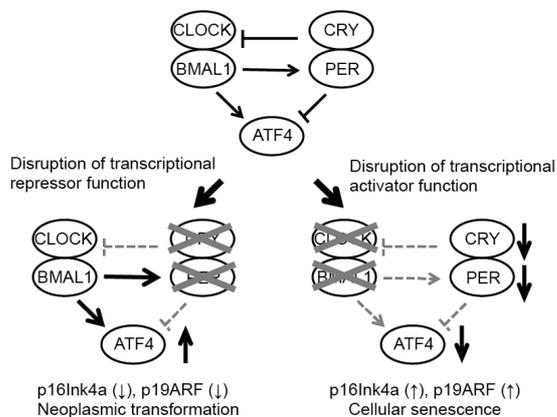
##### ③ 細胞のがん化過程における時計遺伝子および ATF4 の発現変化

がん遺伝子を導入後の野生型細胞内において、時計遺伝子の発現には有意な変化は認められなかったが、ATF4 の発現は経日的に上昇した。また、ATF4 の発現上昇も同遺伝子のプロモーター領域における E-box を介して時計遺伝子によって制御されていることが明らかになった。

以上の結果から、時計遺伝子 *Per2<sup>m/m</sup>* および *Bmal1<sup>-/-</sup>* は、いずれの機能が欠損した場合も行動の概日リズムに乱れが生じるが、*H-Rav<sup>V12/SV40LT</sup>* 導入によるがん化に対しては異なる反応を示し、*Per2<sup>m/m</sup>* 細胞ではがん化の促進、*Bmal1<sup>-/-</sup>* 細胞では老化因子の発現が増大することが明らかになった。

同様の所見は *Cryptochrome* 遺伝子のノックアウト細胞 (*Cry1/2<sup>-/-</sup>*: 転写抑制因子) および *Clock* 遺伝子の機能不全細胞 (*Clock/Clock*: 転写促進因子) でも観察された。そのため、時計遺伝子の転写抑制因子が機能不全になった場合はがん化の促進、転写促進因子が機能不全になった場合は、がん化に対して抵抗性を示すが、細胞老化が誘発され易くなることが明らかになった (図2)。

また、このような細胞のがん化・老化を左右する因子として *ATF4* が同定され、本因子の機能を適切に調整することが、生体リズムの乱れによるがん化の抑制に繋がること示唆された。



**図 2 時計遺伝子の機能不全細胞におけるがん化・老化誘導のメカニズムの概念図。** 時計遺伝子の転写抑制因子 (Per, Cry) が機能不全の状態において、細胞にがん化刺激が加わった場合、*ATF4* の発現が上昇し、細胞老化因子の発現が抑制されることで、がん化は促進される。一方、時計遺伝子の転写促進因子 (*Bmal1*, *Clock*) が機能不全の状態においては、がん化の刺激によっても *ATF4* の発現は上昇せず、細胞老化因子 (*p16INK4a*, *ARF*) の発現が誘導される。

## 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Katamune C, Koyanagi S, Shiromizu S, Matsunaga N, Shimba S, Shibata S, Ohdo S. Different roles of negative and positive components of the circadian clock in oncogene-induced neoplastic transformation. *J Biol Chem* 291:10541-10550, 2016.

[学会発表] (計 3 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

<http://yakuzai.phar.kyushu-u.ac.jp/publications.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 悟 (KOYANAGI Satoru)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：60330932

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし