

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591552
 研究課題名（和文） DNA トポイソメラーゼ I の転写制御の機序とイリノテカン感受性の検討
 研究課題名（英文） Transcriptional mechanism of DNA and TOP 1 and Irinotecan-sensitive examination.
 研究代表者
 小山 善久 (KOYAMA YOSHIHISA)
 公立大学法人 福島県立医科大学 医学部 講師
 研究者番号：90254036

研究成果の概要（和文）：トポイソメラーゼ 1（TOP1）のサーカディアンリズム解析による投薬効果の確認、クロノセラピーによる抗がん剤効果の検討を行った。これにより患者さんに負担のない薬剤選定を個別化し投薬する事によりオーダーメイド医療の実現を目指す研究である。初年度は、TOP 1 におけるサーカディアンリズムについて癌細胞を用いて実験をおこなった。その結果 TOP 1 に置いてサーカディアンリズムの変動を確認する事ができた。2 年目では抗がん剤投与を TOP 1 のサーカディアンリズムを利用した投薬が可能であるかの検討をおこなった。最終年度では、生体においてサーカディアンリズムを生かした投薬に置いて有用であるか実験を行う為に担癌動物による検討を行った。

研究成果の概要（英文）：There was the confirmation of the medication effect by the circadian rhythm analysis of topoisomerase 1 (TOP1) and examined the anticancer drug effect with the chrono therapy. It is thereby a study to aim at the realization of the personalized medicine by we individualize the drug choice without the burden, and giving medication to the patients. In the first year, we tested it using a cancer cell about circadian rhythm in TOP1. As a result, we put it in TOP1 and were able to confirm a change of the circadian rhythm. We conducted the examination that was available for the medication that used circadian rhythm of TOP1 by anticancer drug administration in the second year. In the last year, we performed the examination by the tumor bearing animal in a living body we put circadian rhythm for the medication that we made use of, and we were useful, or to test it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：Top1 イリノテカン 癌

1. 研究開始当初の背景

トポイソメラーゼ阻害剤にはIとIIがあり、IはDNAの一本鎖にIIはDNAの二本鎖に作用し、共にDNAの鎖の再結合を阻害することにより、DNA合成を阻害する。

細胞分裂期のS～G2期に作用する制限付き時間依存性薬物である。

トポイソメラーゼのはたらきを阻害することにより、薬剤が切断部位に入り込み再結合を阻止するため、DNAが切断されたままの状態となり、癌細胞が死滅する。

しかし、トポイソメラーゼについて詳細な報告はなされていない。本研究によってトポイソメラーゼ1の解析を行うとともにサーカディアンリズムを利用した新たな投薬療法の確立を行った。

2. 研究の目的

トポイソメラーゼ1遺伝子の解析をおこなうことにより、イリノテカンの感受性がどのような機序によるのか検討するとともに、ヒトの体内に置けるサーカディアンリズムを利用することにより効果的な投薬治療を行う事を目的とする。

3. 研究の方法

トポイソメラーゼ1のがん細胞におけるサーカディアンリズムの解明および生体動物によるがん細胞のサーカディアンリズムを経時的に調べる事により、投薬治療に有効的な遺伝子の発現検討を行った。

詳細実験方法については、研究結果にある論文参照。

4. 研究成果

Abstract

多くの行動プロセスは、細菌から哺乳類までほとんどすべての生物で日周期規則の下にある。

実質証拠が概日時計が抗癌療法の有効性を調整することができたという意見を裏づけるにもかかわらず、機序は明白でなかった。ここでは、我々はトポイソメラーゼI (top1) mRNAのその発現を示した、そして、そのプロモーター作用はHCT 116セルで血清の豊富な中程度の治療の後日周期振動を受けた。

さらに、ニッキング分析によって検出されてtop1とtop1毒(カンプトセシン(CPT))から成る裂開複合体の形成も、振動した。

コロニー形成能測定は、8時間-CPT治療の細胞毒性が20時間(p = 0.0289)により血清ショックの後の4時間に有意に高いことを示した。

加えて、デキサメタゾン治療も、HCT 116セルでtop1のサーカディアンリズムを誘発した。

これらの結果は、top1(それはデキサメタゾ

ンのようなある種の薬によって誘発される)のサーカディアンリズムがクリニックで化学療法を考慮されることができたという可能性を上げる。

Introduction

多くの生理的、生化学および行動プロセスは日周期規則の下にある。そして、それは細菌から哺乳類(1、2)までほとんどすべての生物で体内時計と呼ばれる体内の時間測定メカニズムによって発生する。

サーカディアンリズムは、クロック遺伝子(3-5)のセットを含んでいる転写翻訳フィードバックループのネットワークとして、遺伝的にねばるものによって制御される。

概日時計雲が罹患率を調整するという相当な証拠と抗癌療法の有効性は、提案された(6-9)。

薬物予定がサーカディアンリズムに適応したという観察は、1972年(6)のarabinosylシトシンに対する白血病マウスの増加した耐性であると判明する。

レビは、異なる薬理作用による30の異なる抗癌剤がマウスとラット(9)で薬物毒性に対する強いサーカディアンリズム依存的な効果を示すより多くのものを解説した。

これらの所見は、その日の適当な時間に薬の配送の変形である種の悪性患者の上で抗癌剤の効能を最適化するために、時間治療という着想につながった。

時治療的なアプローチが良い着想であるようで、更に奨励の結果(9)を示したにもかかわらず、それがクリニックで普及していかなくて、あった、おそらく、サーカディアンリズムに基づく治療の正確なmechanismは、まだ明白でないだろう。

近年では、Gorbachevaなどは、(10)野生型と日周期変異体マウスが抗癌剤シクロホスファミド(CY)に対するそれらの反応の著しい違いを示すことを証明した。

野生型マウスの感度が非常に変化する間、薬剤投与の時間によって、Clock変異体とBmal1ノックアウト・マウスは常に、テストされて治療に非常に影響される。

これに反して、Cme(cr倍ノックアウト)の機能喪失型変異をもつマウスは、それらの野生型同腹の子と比較してCYにより抵抗した。このように、時刻と化学療法に応答する対立形質の従属する変動は、日周期CLOCK/BMAL1トランス活性化複合体の機能的な状態と相関する。

しかしながら、抗癌薬物効果とサーカディアンリズムの関係の機序を述べている報告は、極めて少ない。

加えて、サーカディアンリズムの抗癌剤の分子目標の正確な分析は、まだ行われなかった。DNAトポイソメラーゼは、現在クリニックで

使われる最も活発な抗癌剤のいくつかの鍵となる目標と認められた。

通常は、薬はトポイソメラーゼ裂開複合体を安定させることによって酵素を細胞毒に変換する。そして、それは局所異性化反応(11)のための触媒中間型である。

細胞DNAトポイソメラーゼのうちの2つは、抗癌剤によって目標とされる。

トポイソメラーゼII (top2) の場合、裂開複合体はtop2分子(12,13)に5'-DNA終点の各々で連結されるDNA二本鎖切断から成るが、top1の場合、裂開複合体は3'□DNA終点(14-22)にリンクされる酵素によるDNA一本鎖切断である。

top1のリストについては、抑制薬(臨床使用のために承認される抑制薬の唯一の種類)はCPT誘導剤(20、23-28)である。

本研究の目的は、top1の関係、化学療法の重要な目標のうちの1つとサーカディアンリズムを解明することであった。

ここでは、我々はトポイソメラーゼI (top1) mRNAのその発現を示した、そして、プロモーター作用はHCT 116セルで血清の豊富な中程度の治療の後サーカディアンリズムに属していた。

我々も、top1とtop1毒で構成される裂開複合体、ニッキング分析によって検出されるキャンプトセシン(CPT)とキャンプトセシンの細胞毒性の形成がHCT116細胞でtop1のサーカディアンリズムにも依存しているとわかった。

Results

Circadian Rhythm of Top1 mRNA (Fig.1).

第一に、我々はtop1の発現が血清の豊富な媒体の処置の後結腸癌細胞系(HCT116細胞)で日周期振動を受けるかどうか調べた。

従来のPCR(図1A)とリアルタイムPCR(図1B)によるmRNAレベルの分析法は、top1 mRNAのレベルが著しく血清ショックの後8-12時間に減少して、20時間にピークに到達するために増加して、それから32-44時間の間に再び減少して、48時間にわずかに増加することを示した。

Perのような他の既知の概日時計遺伝子、そして、適切に振動させた(図1AとB)。

さらに、top1 mRNAの血清によって誘発された振動は、他の細胞系(例えばMCF7、SW 480とKB3-1細胞(図1C))でも観察された。

Circadian Rhythm of Top1 Promoter Activity by Transactivation of Clock and Bmal1 (Fig.2).

top1のプロモーター作用がサーカディアンリズムを受けたかどうかにかかわらず、top1 mRNAサーカディアンリズムの観察は我々に追従することを促した。

単細胞でtop1プロモーター作用を観察するために、ターボGFP/top1リポーター構造物はHCT116細胞にトランスフェクションした。そ

して、それは血清ショックの後蛍光顕微鏡検査法で観察された。

図2Aで示すように、GFP信号は、血清ショックの後明確な振動を示した;

それは8時間に減少して、20-28時間の間のピークになるために増加して、そして、再び減少した。そして、それはtop1 mRNA(図1)の日周期側面と類似していた。

信号強度が複数の細胞で計量されたとき、彼らは日周期fluctuations(図2B)の類似のパターンを示した。

次に、転写制御因子の病変を調査するために|| Clock and/、または、top1表現で、転写Bmal1は、検定するHCT 116セルの陽性対照としてper1リポーター構造物を使用して行った。

ClockとBmal1のどちらかまたは両方の同時トランスフェクションがper1-リユック・リポーター活動を上げたにもかかわらず、トランスフェクションのないそれらで、または、ClockまたはBmal1(図2C)のトランスフェクションで比較されるとき、両方の因子の同時トランスフェクションだけはtop1プロモーター作用(2.4倍、 $p < 0.05$)の有意の増加を示した。これらのデータはtop1発現のサーカディアンリズムが転写制御因子によって調整されることを示した。そして、それはtop1プロモーターでE箱と結合しているClockとBmal1を含む。

Dependence of Cytotoxicity of Camptotecin, Top1 Poison, On Circadian Rhythm of Top1.

top1のプロモーター作用がサーカディアンリズムを受けたかどうかにかかわらず、top1 mRNAサーカディアンリズムの観察は我々に追従することを促した。単細胞でtop1プロモーター作用を観察するために、ターボ

GFP/top1リポーター構造物はHCT116細胞にトランスフェクションした。そして、それは血清ショックの後蛍光顕微鏡検査法で観察された。図2Aで示すように、GFP信号は、血清ショックの後明確な振動を示した;それは8時間に減少して、20-28時間の間のピークになるために増加して、そして、再び減少した。そして、それはtop1 mRNA(図1)の日周期側面と類似していた。信号強度が複数の細胞で計量されたとき、彼らは日周期fluctuations(図2B)の類似のパターンを示した。次に、転写制御因子の病変を調査するために|| Clock and/、または、top1表現で、転写Bmal1は、検定するHCT 116セルの陽性対照としてper1リポーター構造物を使用して行った。ClockとBmal1のどちらかまたは両方の同時トランスフェクションがper1-リユック・リポーター活動を上げたにもかかわらず、トランスフェクションのないそれらで、または、ClockまたはBmal1(図2C)のトランスフェクションで比較されるとき、両方の因子の同時トランスフ

ェクションだけはtop1プロモーター作用 (2.4倍、 $p < 0.05$) の有意の増加を示した。ニックのDNAを形成する核抽出物の能力は、明らかな振動を示した;

4時間と28時間のピークと20時間と44時間 (図3AとB) のトラフ。

一本鎖がtop1によって壊す (単側波帯) DNAは、アルカリの彗星分析によって単細胞で更に確認された。

HCT116細胞は、HCT 116セルの血清の豊富な処置の後、4時間または20時間に10nMまたは30nMのCPTで治療された。

アルカリの彗星分析で、4時間の単側波帯の量がそれぞれ30nMと100nMのCPT ($p < 0.01$) (図C) 20時間のそれらより有意に高いことが分かった。

これらのデータは、top1タンパク質レベルも血清によって誘発された振動を示すことを示した。

次に、我々はCPTの細胞毒性がHCT 116セルで日周期振動を受けるかどうか調べた。

4時間に、または、コロニー形成の上の血清ショックの後の20時間に始まったCPTによる8時間-治療の効果は、検定された。

4時間の核抽出物がCPTによってかなりのニックのDNAを現したので、我々は2つの時点調べた、そして、20時間のそれらはニックのDNA (図3A及びB) で最も低い割合を示した。各状態の用量反応曲線は、4時間 ($8.61 + 1.40$) の8時間-CPT治療のIC50が血清ショック (図3C) の後の20時間 ($64.44 + 0.085$, $p = 0.017$) のそれより有意に低いことを明らかにした。

10nMのCPTのコロニー形成能測定の結果は図3Dに示された。CPTによる4時間-治療の多くのコロニーは20時間-治療のそれより有意に低かった (E; $p = 0.0289$) 。

これらのデータは、CPTの細胞毒性がHCT 116セルでtop1サーカディアンリズムに依存していることを強く示唆した。

Production of Top1 Circadian Rhythm by Dexamethasone.

患者の臨床応用血清の豊富な治療で、非常に難しい。

従って、デキサメタゾンがヒトに薬で治療されることができて、数種類の細胞系 (30) でサーカディアンリズムを生じることが報告された時から、我々は次にデキサメタゾンをサーカディアンリズムを作成するために選んだ。予想されるように、top1 mRNAのレベルは例えばクロック遺伝子とe□□Fig. 4の調整で100nMデキサメタゾンの処置の後28時間に8時間と減少で著しく増加した) 。

Discussion

本研究は、抗癌剤の重要な目標の1つとして、top1のサーカディアンリズムを報告する、影響力があるCPT (HCT116細胞のtop1毒) の細胞毒性の上で効果。

真核生物top1のサーカディアンリズムの機序と重要性は、以下の観察に基づく:

top1 (図1および2) のmRNAとプロモーター作用の(i) Circadianリズム、top1 (図2) プロモーターのE箱に対するそれらの結合を通してのClockとBmal1のトランスフェクションによるtop1の(ii) Upregulation、能力を盗んでいるtop1のサーカディアンリズムの上のCPTの細胞毒性の(iii) Dependence (それはDexamethasoneがHCT116細胞 (図4) の血清の豊富な中程度の処置としてよくサーカディアンリズムを生じるサーカディアンリズム (図3) 、 (iv) の調節中でもある) 。

生体内サーカディアンリズムと化学療法の関係の研究にもかかわらず、そして、クリニック (8、9) で、抗癌剤目標のサーカディアンリズムの研究は、生体外で非常にまれである。新しい抗癌剤の開発は、集中的に行われた。更に、悪性患者で、抗癌剤の効能を改善するために、巨大な腫瘍学者は、抗癌剤のために治療スケジュールとドラッグデリバリーシステムを調査している。

時間治療の目的は最も活発な治療スケジュールのうちの1つである。そして、サーカディアンリズムによって発生する24時間のリズムにドラッグデリバリーの調整に基づく。

異なる薬理作用による30以上の異なる抗癌剤は、マウスとラット(9)で薬物毒性に対するサーカディアンリズム依存的な効果に関連した可能性がある。

彼らも、トポテカン、ドキソルビシンとシスプラチンの処置の有効性が移植されたプラズマ細胞腫 (38) を運んでいるラットでサーカディアンリズムに依存していることを証明した。

時治療的なアプローチが良い着想であるようで、更に奨励の結果(9)を示したにもかかわらず、それはクリニックで普及していなかった。このように、本研究はCPTの細胞毒性がtop1の能力を盗むサーカディアンリズムでtop1のサーカディアンリズムに依存していることを同定する。

我々の知識の最高にとって、これらの所見は、抗癌剤に対する標的分子top1がヒトの細胞系でサーカディアンリズムを示すという第1の証拠である。

DNAトポイソメラーゼは、現在クリニックで使われる最も活発な抗癌剤のいくつかの鍵となる目標と認められた。

サーカディアンリズム、top1とマウスにおける毒があるtop1の効果の関係を述べている1つの以前の報告だけは、(39)に続く。

773匹の雄のマウスを用いて実験とirrinotecanは、irrinotecanの有効性が時間関連の治療に依存していることを明らかにした、結果として生じる割に薬剤投与 (明らかにより広範囲な

DNA損傷の修繕を代表する)の他の時間に対する19または23のHALOのイリノテカンの投与後の8倍より大規模なG2-M期停止に4。top1 mRNAとプロモーター作用のサーカディアンリズムの現在の証拠によってマウスでtop1のサーカディアンリズムの確認だけでなく現される我々の現在の検査、また、それを示さなかったtop1の細胞毒性がヒトの結腸癌HCT116細胞の才能を盗んでいるtop1のサーカディアンリズムに依存していたという趣旨。top1の主要な薬理作用は、裂開複合体がtop1によって3' DNA終点にリンクされる酵素によるDNA一本鎖切断であるということである。top1のリストについては、抑制薬(臨床使用のために承認される抑制薬の唯一の種類)はCPT誘導剤(20、23-28)である。このように、現在のデータは、top1によって媒介されるCPTの主要な薬理学的機序が人間の結腸癌HCT 116セルでサーカディアンリズムによって調整されると定める。最近の消耗した研究は、動物モデル、遺伝分析と分子アプローチ(3-5)を使用している分子レベルで、時間測定システムに関して中心フィードバックループのシステムを定義した。それらの間で、2つのbHLH-PAS含有転写制御因子(CLOCKとBMAL1)は3つの期間遺伝子(31)の転写を引き起こしている標的遺伝子のプロモーターでE箱エンハンサーと結合するヘテロ二量体を形成する、そして、2つの潜在クロム遺伝子(Cry1とCry2)は非常に重要である(40-43)。これらの2つの分子は、サーカディアンリズム(5)のフィードバックループを保つために不可欠である。PERとCRYタンパク質が細胞質で表現されたあと、彼らは自分自身の転写(4)を核に転座させて、阻害するヘテロ複合体を形成する。CRYは、直接CLOCK/BMAL1ヘテロ二量体(43)と相互作用することによって、この負のフィードバック・プロセスにおいて十字形の役割を果たす。真核生物top1は、top1(転写開始点からの-319~-314)(34)のプロモーター領域で、E箱を含む。本研究でも、Bmal1とClock雲がHCT116細胞でtop1の上方制御のために必要とされることが分かった。以前の所見と我々のデータと共にとられて、top1のプロモーター領域のE箱は、top1のサーカディアンリズムにとって不可欠である場合がある。クリニックで、レビ、彼の同僚とCancer Chronotherapyのための国際機構は、サーカディアンリズム(9)に基づく化学療法に関与した。この種の化学療法は、ある種の悪性患者の予後の改善の一因となった。

例えば、それは報告では転移性結腸直腸癌(44)患者の予後を改善した。サーカディアンリズムに基づく化学療法は、良い(しかしながら癌が明らかにまだそうでない1人のヒトにおける各細胞のサーカディアンリズムのプロフィール)ようである。top1サーカディアンリズムの我々の現在の観察は、生体外で、その臨床使用のための重大問題のうちの1つが方法であるという更なる疑問と抗癌剤雲がクリニックでそれらの標的分子の概日時間に調整される時を上げた。デキサメタゾンならびに細胞の血清の豊富な中程度の処置は、ある種の細胞系(30)で、サーカディアンリズムを生じることができる。従って、我々はデキサメタゾン雲がtop1のサーカディアンリズムを生じかどうか調べた。そして、HCT116細胞でデキサメタゾンの100nMによってtop1のサーカディアンリズムに帰着した。化学療法のより良い有効性を得るために、この結果は、top1毒雲の薬物の前のデキサメタゾンの処置がクリニックで化学療法の有効性を強化するという将来の可能性を上げた。結論として、我々は化学療法剤(top1)の目標のサーカディアンリズムがtop1毒(CPT)の細胞毒性に影響を及ぼすことを証明した。化学療法のための標的分子のサーカディアンリズムの臨床使用の我々の提案モデルを図5に示す。実際のところ、レベルがそうであったクロック遺伝子発現は、90のヒトの固形癌(未発表のデータ、Y. T.及びT. I.)で、クロック遺伝子発現の分析によって、細胞から細胞まで腫瘍と腫瘍(更なる)まで異なった。従って、それぞれ、ヒトの固形癌の各細胞は、独立クロックを持っている可能性がある。この仮説は、ほとんど、ヒトの固形癌の分子がヒトの固形癌の異型遺伝子性表現を明らかにするという事実によっても継続される。従って、概日時間の概念による化学療法の重要性は、1つの腫瘍のどんな癌細胞でも抗癌剤の目標の発現レベルで同じクロックを持っているということである場合がある。現在のデータに基づく可能性がある着想のうちの1つは、デキサメタゾン雲によるサーカディアンリズムの転送が日周期関連した遺伝子ならびにtop1のサーカディアンリズムを生じることである。この提案モデル雲がある、クリニック(概日時間に依存することがクリニック(図5)で改善されてよりある化学療法の有効性)で出した。

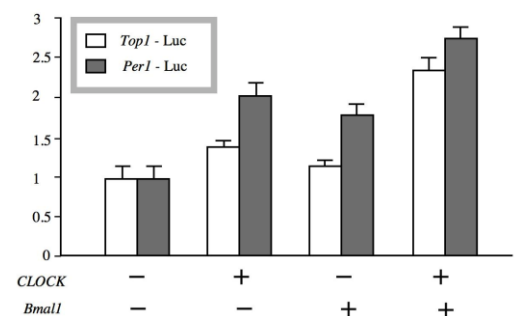


Fig1

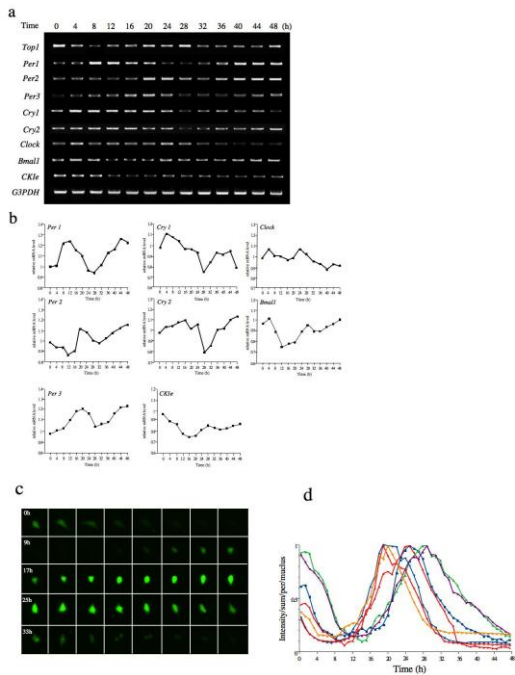
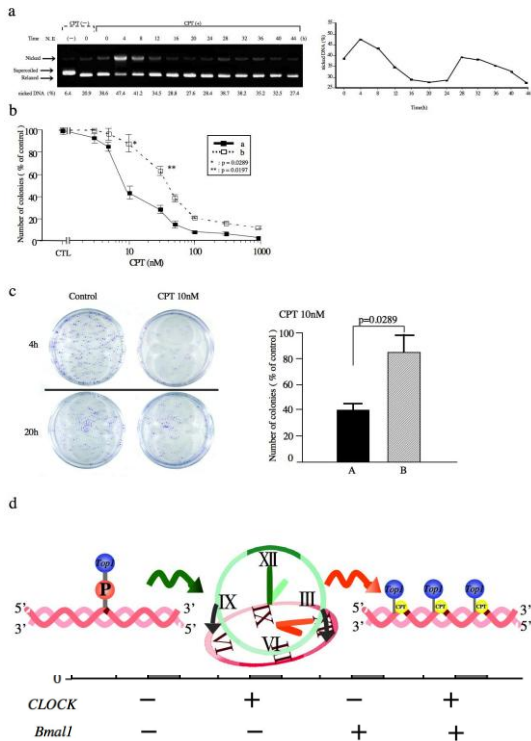
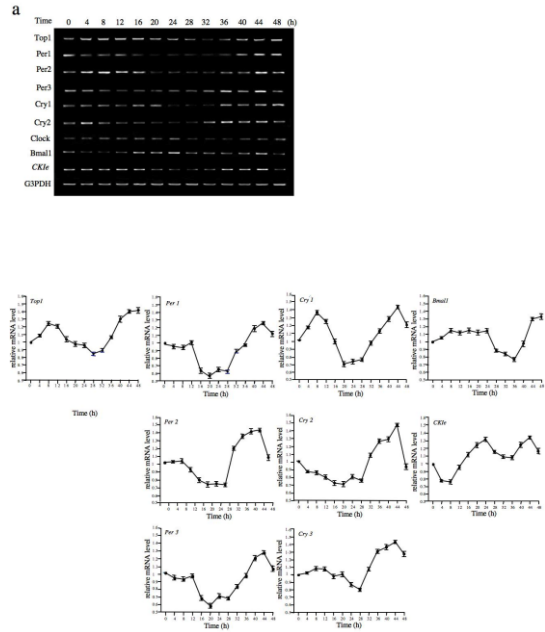


Fig2



Sup Fig2



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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 善久 (KOYAMA YOSHIHISA)
 公立大学法人 福島県立医科大学
 医学部 講師
 研究者番号: 90254036

(2) 研究分担者

竹之下 誠一 (TAKENOSHITA SEIITI)
 公立大学法人 福島県立医科大学
 医学部 病院長
 研究者番号: 10167489

(3) 連携研究者

なし