

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24792256

研究課題名(和文) 口腔癌に対するクロノセラピーの応用 - 特にメラトニンを用いた人為的位相について -

研究課題名(英文) Study of the Circadian chronotherapy for oral cancer

研究代表者

大鶴 光信 (OTSURU, Mitsunobu)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：60384864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌細胞を明暗12時間周期で培養し時計遺伝子(Clock, Bmal, Period2, Cry)の発現をRT-PCRで測定したところCryのみで発現周期を認めた。明暗周期化で飼育した6週齢BALB/c-nu nude miceの背部に口腔扁平上皮癌細胞株を移植し時計遺伝子(Cry)の発現をRT-PCRで測定したところ明らかな発現周期は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Oral cancer cells clock gene (Clock, Bmal, Period2, Cry) were measured by RT-PCR revealed development cycle Cry alone. 6 weeks old BALB/c-nu nude mice transplanted oral squamous cell carcinoma cell lines. There was no obvious expression of the clock gene (Cry) was measured by RT-PCR expression cycle.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 クロノセラピー メラトニン

1. 研究開始当初の背景

生物には 24 時間を周期とする生命活動を行い、リズムを司っているのが時計遺伝子である。この時計遺伝子のなかに細胞分裂に関わるものがあることが明らかになった。時計遺伝子による細胞分裂周期は、正常な細胞のみならず悪性腫瘍にも影響を与えており、これを応用した癌治療の可能性が注目されている(クロノセラピー)。そのひとつに、概日リズムに影響を与えるホルモンであるメラトニンに注目した治療法が挙げられる。近年、メラトニン受容体アンタゴニスト：ラメルテオンが開発され臨床に用いられている。時計遺伝子により制御された悪性腫瘍の増殖周期をラメルテオンにより操作し、口腔悪性腫瘍の化学療法に活用できる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

人間は、外界と遮断され時計がない環境でも、覚醒と睡眠をほぼ 24 時間周期で繰り返す。これは、生物が 24 時間を周期とする生命活動(サーカディアンリズム)に基づく行動と考えられている。この生命活動周期リズムを司るのが時計遺伝子である。時計遺伝子は、1997 年に哺乳類で Clock が同定され、その後、Period、Cry 遺伝子が明らかにされた。この時計遺伝子には、正の因子と負の因子が存在し、サーカディアンリズムを制御している。つまり、細胞内に正の因子が増えると負の因子が作られ、正の因子を抑制する。逆に負の因子が増えると正の因子が作られ、負の因子を抑制する。このフィードバック反応がちょうど 24 時間周期になるよう調整されている。哺乳類では、正の因子の時計遺伝子として Clock、Bmal が、負の因子の時計遺伝子として Period、Cry が同定されている。この正負の因子により営まれる 24 時間周期の生命活動に、細胞分裂も影響を受けていることが明らかとなった。この細胞分裂における時計遺伝子の影響は、正常細胞のみならず悪性腫瘍の増殖にも及んでおり、悪性腫瘍の成長因子や増殖因子も時計遺伝子に制御されていることが判明した。このことは、悪性腫瘍が時刻依存的に増殖している可能性を示すものである。具体例として、時計遺伝子 Period2 のノックアウトマウスの発癌モデルがあげられる。Period2 ノックアウトマウスに線を照射すると、普通のマウスより早く癌化し死に至る。これは Period2 が合成されないことにより c-myc が活性化され、p-53 の機能低下をきたすためと説明されている。逆に Period2 を過剰発現させると癌発育抑制効果が認められることも明らかになった。近年、この性質をさまざまな疾患の治療に応用しようとする研究が行われ始め、その治療はクロノセラピーと呼ばれている。悪性腫瘍の治療にお

いては、時計遺伝子により発現量が上昇する前に分裂阻害薬を投与したり癌増殖因子が上昇する前にその増殖因子を標的とした分子標的薬を投与することで、より大きい抗腫瘍効果や副作用の軽減が期待できる。また、人為的に時計遺伝子を調整できれば、さらに抗腫瘍効果・効率のよい治療を行うことが可能と考える。そこで、今回、時計遺伝子の人為的位相において、メラトニンの応用に注目した。メラトニンは松果体から分泌されるホルモンのひとつで視交叉上核活動と外界の暗期情報を伝達する液状シグナルとして動物の生物リズムの調節に重要な役割を果たしており、メラトニン血中濃度は概日リズム/日内変動(サーカディアンリズム)を有している。特定の時間帯にメラトニンを投与することでヒトをはじめとした動物の概日リズム位相を変位させることが可能である。近年、メラトニン受容体アンタゴニスト：ラメルテオンが開発され臨床に用いられている。

メルテオンを用いて悪性腫瘍の増殖周期を操作し、口腔悪性腫瘍の治療(特に化学療法)に応用できる可能性が期待できる。また、メラチニンには抗酸化作用があり、これにより酸化ストレスを軽減させることができると考えられる。メラチニン投与により抗腫瘍作用や抗癌剤投与時に発生する活性酸素に対する抗酸化剤として副作用の軽減も期待できる。

哺乳類の時計遺伝子が発見されてからまだ日が浅く、解明されていない点や解決すべき課題が多い。そのため、これを利用したクロノセラピーも研究段階であるが、今後大きく発展が期待できる分野と考える。さらに、口腔外科領域(特に oral oncology)において、時計遺伝子・クロノセラピーの研究は進んでおらず、本研究が先駆的なものになると考える。本研究により、より効果的で患者への負担が少ない口腔癌治療を開発することを本研究の目的とする。

参考文献

King, DP et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. Cell 89: 641-653, 1997.

Fu, L et al. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. Cell 111: 41-50, 2002.

3. 研究の方法

Ohno らの方法に準じて明暗周期条件化で飼育したマウスに口腔がん細胞を移植し、癌関連遺伝子・時計遺伝子の時間による発現の変化を RNA・タンパクレベルで解析する。また、クロノセラピーを応用した化学療法が口腔悪性腫瘍に有用か検討する。さらに、メラトニンを用いた人為的時間位

相によるクロノセラピーの可能性を模索する。

1)7:00-19:00 を明期とした明暗周期条件下で飼育した6週齢 BALB/c-nu/nu nude mice の背部に口腔扁平上皮癌細胞株 OSCC を移植する。移植後も上記明暗周期条件下で飼育を行い腫瘍径が 200mm³ 以上になったことを確認後、6つのグループに分け4時間おきにマウスの腫瘍組織及びその対照組織(皮膚および肝臓)を摘出する。取り出した組織をホモジナイズして RNA・タンパクを調整する。

1. 取り出した組織ホモジナイズし、通法に従いフェノール・クロロフォルム抽出法により抽出・加工・調整した後、RT-PCR法を用いて cDNA を合成する。それぞれの組織の cDNA を用いて Real-timePCR法により時計遺伝子 (Clock・Bmal・Period2・Cry)、増殖因子 (VEGF、EGFR)、細胞周期関連因子 (Cyclin family(D・A・B)、Cdk、MET、Wee1) の発現量を測定する。

2. 時計遺伝子発現量の変化と増殖因子の発現量の変化を経時的に解析し、相関関係を明らかにする。

3. 時計遺伝子と、細胞周期関連因子の発現量の変化を経時的に解析し、細胞周期のどの時期に影響を与えるのか解析する。

2) 明暗周期条件下で飼育を行った口腔癌細胞株移植マウスを用いて実験を行う。

1. 明期初期である9時に抗腫瘍薬を腹腔内投与した群をA群、暗期初期の21時に投与した群をB群、何も投与しない control 群をC群とし、腫瘍径を経時的に計測し抗腫瘍効果を比較する。抗腫瘍薬には、VEGF 阻害剤 SU1498、血管内皮細胞増殖抑制薬 TNP-470、5-FU、CDDP を用いる。

2. 投与7日目にマウスより腫瘍と肝臓を摘出し、時計遺伝子、増殖因子、細胞周期関連因子を前年度同様に定量し、口腔癌の化学療法におけるクロノセラピーの有用性について検討する

3) 特定の時間帯にメラトニンを投与することでヒトをはじめとした動物の概日リズム位相を変位させることが可能である。最近発売されたメラトニン受容体アンタゴニスト：ラメルテオンを用いて悪性腫瘍の増殖周期を操作し、口腔癌化学療法のクロノセラピーへ応用が可能か明らかにする。今年度は、人為的クロノセラピーの先駆けになることを目指し、今後他分野に研究範囲を拡大する礎とする。

1. メラトニン受容体アンタゴニストを用いた時間位相による時計遺伝子の変化について

前年度と同様に明暗周期条件下で飼育を行った口腔癌細胞株移植マウスを用いて実験を行う。明期初期である9時にラメルテオンを腹腔内投与した群をA群、暗期初期の21

時にラメルテオンを投与した群をB群、何も投与しない control 群をC群とする。腫瘍径が 200mm³ 以上になったことを確認後、A,B,C群ともに6つのグループに分け4時間おきにマウスの腫瘍組織及びその対照組織(皮膚および肝臓)を摘出する。取り出した組織をホモジナイズして RNA・タンパクを調整する。

2. 取り出した組織の時計遺伝子 (Clock・Bmal・Period2・Cry) の発現量を RT-PCR法および Western blotting法を用いて定量する。

3. メラトニン受容体アンタゴニストの投与による時計遺伝子発現の変化を経時的に解析し、人為的クロノセラピーの可能性について検討する。

4. 時計遺伝子の人為的時間位相が可能であれば、化学療法のスケジュールに対応したクロノセラピーの研究に繋げる。

5. 前年度の実験結果の解析を踏まえ、次年度に向けて他分野への応用を模索する。

引用文献

Ohno,T et al:The negative transcription factor E4BP4 is associated with circadian clock protein PERIOD2. Res Commun 345:1010-1015,2007

Lee,CC:Tumor Suppression by the mammalian Period genes. Nature 389:525-530,2006

Fu,L et al:The circadian clock:Pacemaker and tumor suppressor. Nature Rev Cancer 3:350-361.2003

Ingber,D. et al:Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature 348:555-557,1990

Koyanagi,S et al:Optimizing the dosing of TNP-470 enhance its antitumor and antiangiogenic efficacies. Journal Pharmacol exp 304:669-674,2003

Koyanagi,S et al:A molecular mechanism regulating circadian express of VEGF in tumor cells. Cancer Res 63:7277-7283,2003

4. 研究成果

口腔癌細胞を明暗12時間周期で培養し時計遺伝子 (Clock,Bmal,Period2,Cry) の発現を RT-PCR で測定したところ Cry のみで発現周期を認めた。明暗周期化で飼育した6週齢 BALB/c-nu nude mice の背部に口腔扁平上皮癌細胞株を移植し時計遺伝子 (Cry) の発現を RT-PCR で測定したところ明らかな発現周期は認めなかった

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

大鶴 光信(OTSURU, Mitsunobu)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：60384864