

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：33920
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25460309
研究課題名(和文) 時間治療を目指した腫瘍細胞概日時計の多様性の解明

研究課題名(英文) Analysis of cancer cell clock for chronotherapy

研究代表者
増淵 悟 (Masubuchi, Satoru)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：80362771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：時間治療を考えると治療抵抗性である低酸素部位の癌細胞リズムを知ることは非常に重要である。そのため低酸素ががん細胞リズムに与える影響を明らかにする実験を行った。細胞を低酸素パルスに暴露したところ低酸素強度依存的に、かつ暴露タイミング依存的に細胞の時計位相がシフトすることが分かった。また、低酸素暴露による培地のpH低下を緩衝剤で抑えることで時計位相のシフトを抑制できることが分かった。また、低酸素暴露時にPer1, Dec1遺伝子発現の上昇がみられた。この時計遺伝子の上昇は緩衝剤によるpH低下抑制の影響を受けなかった。これらのことから腫瘍内低酸素環境での生物時計の状態を推定することができる。

研究成果の概要(英文)：When we consider the strategy of chronotherapy, it is important to know architecture of biological clock oscillation of treatment resistant hypoxic area in cancer tissue. In this project, the effects of hypoxia to cancer clock were examined. Oxygen concentration and timing dependently hypoxic pulse phase shifted cancer clock. Magnitude of phase shift of cancer clock by hypoxic pulse was attenuated by suppression of pH reduction by addition of buffer. Hypoxic pulse increased clock genes, Per1 and Dec1, expressions which were not affected by suppression of pH reduction. From these findings, we can speculate the condition of clock oscillation in hypoxic area of cancer tissue.

研究分野：時間生物学

キーワード：時計遺伝子 癌 低酸素

1. 研究開始当初の背景

哺乳類生物時計は一群の時計遺伝子産物によって駆動される。転写促進因子(CLOCK, BMAL1)は抑制因子(PER1, PER2, CRY1, CRY2, DEC1, DEC2)の転写を活性化し、その後産生された抑制因子は自身の転写を抑えることで約 24 時間の時計振動を作り出している。このネガティブフィードバックループからなるコアシステムは MAPK, CREB, cAMP などのシグナル伝達系や、SIRT1 のような細胞代謝が制御する HDAC、さらには Id2 (Masubuchi et al Curr Biol 19:R298-300 (2009)), PHLPP1 (Masubuchi et al PNAS 107:1642-7 (2010)) などの癌関連遺伝子を介して多彩な修飾を受けている。分子時計はセンター時計である視床下部視交叉上核(SCN)だけでなく全身の細胞に存在し、強力な時計遺伝子発現の概日振動がみられる。正常組織だけでなく癌細胞にも時計遺伝子発現のリズムがあることが知られているが、これが細胞周期、代謝のリズム、さらには抗がん剤、放射線療法に対する感受性の日内変動をもたらしていると考えられる。一方、癌には組織・細胞レベルから遺伝子レベルにまで及ぶ多様性があり、適切な時間に治療を行う「時間治療」を考える上でもこれらの多様性の情報が必要となる。

2. 研究の目的

癌細胞は増殖が制御されていないため癌組織内には血管分布が不十分になる低酸素部位が存在する。低酸素部位は治療に反応しにくく臨床的に重要である。一日のうち治療効果が最大、副作用が最低になる時間帯に治療を行う時間治療を考えるときにおいても治療抵抗性である低酸素部位の癌細胞リズムを知ることは非常に重要である。そのため低酸素ががん細胞リズムに与える影響を明らかにしさらにそのメカニズムを明らかにする目的で実験を行った。

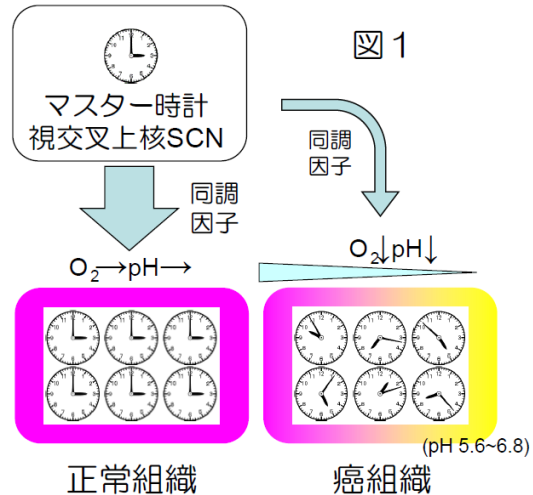
3. 研究の方法

大腸がん細胞株に分子時計によってドライブされる概日振動を発光でモニタリングするレポーターを安定導入した細胞株(HCT116:DBP-luc)を用いて実験を行った。培養皿上でコンフルエントとなった細胞をさらに5日間培養し血清刺激してリズム測定を行った。発光リズムはクロノス Dio(ATTO)で測定した。細胞への低酸素暴露は BIONIX 低酸素培養キット(スギヤマゲン)で行った。発光量データは 24 時間トレンド処理を行いリズムの下降相における直前のピーク値と直後のトラフ値の midpoint を取る位相を評価に用いた。

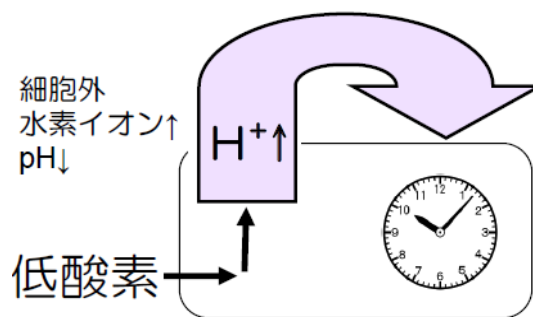
4. 研究成果

様々なタイミング(血清刺激後 12h 36h 後)に様々な強度の低酸素パルス(21% 5%、6h)に暴露したところ 21%、15%では時計位

相のシフトが見られなかったが 10%、5%では低酸素強度依存的に、かつ暴露タイミング依存的に細胞の時計位相がシフトすることが分かった。このことは腫瘍内低酸素部位においても時計位相のばらつきが見られること、すなわち担癌個体において正常組織は SCN の支配を受け SCN と同調したリズムを刻むが癌組織内では SCN の制御が及ばない細胞が存在する可能性を示唆している(図 1)



次に低酸素による細胞時計のシフトの原因の検索を行った。低酸素暴露により培地が酸性化されるがこの pH 低下を緩衝剤(HEPES)で抑えることで時計位相のシフトを抑制することが分かった。このことは癌細胞が低酸素により自ら産生した酸により自分の生物時計をシフトさせていることを意味している(図 2)。腫瘍組織内低酸素部位でも pH 低下があることが知られており、pH 低下の大きさが腫瘍内リズムの乱れと相関がある可能性がある(図 1)。



癌細胞特有の代謝異常が自らの時計を乱す。 図2

また、現在数種類のプロトン(水素イオン)受容体が知られているが HCT116: DBP-luc 細胞においてはその中で GPR4 が発現していた。GPR4 は cAMP をセカンドメッセンジャーとしている。cAMP は時計発振の中心である transcriptional translational feedback loop (TTRF) に働きかけるため、GPR4 は低酸

素による時計位相のシフトにも関与していることが示唆される。

また、低酸素暴露時の時計遺伝子発現の検索を行ったが *Per1*, *Dec1* の上昇がみられた。このことからこれらの時計遺伝子が TTRF に働きかけ低酸素による生物時計シフトに関与している可能性が示唆された。興味深いことに *Per1*, *Dec1* の上昇は低酸素による位相変異を抑制する HEPES による pH 低下の抑制の影響を受けなかった。このことは 低酸素は pH 低下を介するメカニズムに加えて *Per1*, *Dec1* を介するメカニズムで位相変異を起こしている可能性、低酸素は *Per1*, *Dec1* の発現を促しそれにより pH 低下が起こり位相変異を起こしている可能性があることを示唆している。

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 4 件)

増淵悟、サーカディアンリズムと自律神経、自律神経、査読有、53 巻、2016、22-26
Yamanaka Y, Hashimoto S, Masubuchi S, Natsubori A, Nishide SY, Honma S, Honma K. Differential regulation of circadian melatonin rhythm and sleep-wake cycle by bright lights and nonphotic time cues in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 査読有、307, 2014, R546-57.

Sahar S, Masubuchi S, Eckel-Mahan K, Vollmer S, Galla L, Ceglia N, Masri S, Barth TK, Grimaldi B, Oluyemi O, Astarita G, Hallows WC, Piomelli D, Imhof A, Baldi P, Denu JM, Sassone-Corsi P. Circadian control of fatty acid elongation by SIRT1 protein-mediated deacetylation of acetyl-coenzyme A synthetase 1. *J Biol Chem*. 査読有、289, 2014, 6091-7

Honma Kenichi, Hashimoto Satoko, Natsubori Akiyo, Masubuchi Satoru, Honma Sato, Sleep-wake cycles in Humans, *Indian Journal of Sleep Medicine*, 査読なし、Volume : 8, 2013, 51-57

[学会発表](計 9 件)

Satoru Masubuchi, Symposium29 Translational research on circadian rhythm S29-2 Circadian effect of hypoxia to mice locomotor activities, 第 93 回日本生理学会大会(招待講演) 2016 年

増淵悟、サーカディアンリズムと自律神経、第 68 回自律神経学会(招待講演) 2015 年

増淵悟 八木田和弘 中村涉 本間さと本間研一、低酸素によるがん細胞生物時

計の位相変化、第 12 回がんとハイポキシア研究会、2014 年

増淵悟 八木田和弘 中村涉 本間さと本間研一、低酸素は癌細胞時計の位相を変える、第 61 回中部日本生理学会、2014 年

増淵悟、行動の概日リズムを制御するしくみ、第 161 回日本体力医学会関東地方会(招待講演) 2014 年

Satoru Masubuchi, Kazuhiro Yagita, Wataru Nakamura, Sato Honma, Ken-ichi Honma, Cancer clock resetting by hypoxia, 生物リズムに関する札幌シンポジウム 30 周年記念大会、2014 年

増淵悟 八木田和弘 中村涉 本間さと本間研一、低酸素による癌細胞時計のシフト、第 91 回日本生理学会大会(招待講演) 2014 年

増淵悟 八木田和弘 中村涉 本間さと本間研一、低酸素による癌細胞時計のシフト、第 20 回日本時間生物学会大会(招待講演) 2013 年

増淵悟 八木田和弘 中村涉 本間さと本間研一、低酸素による癌細胞時計のシフト、第 93 回北海道医学大会生理系分科会(日本生理学会北海道地方会) 2013 年

[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]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増淵悟 (MASUBUCHI, Satoru)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 8 0 3 6 2 7 7 1

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：