

令和元年6月17日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00394

研究課題名(和文)概日リズムと相互作用する細胞周期のモデル化によるガンの時間治療戦略策定

研究課題名(英文) Design of chronotherapeutic strategy against tumorigenesis based on modeling of cell cycle interacting with circadian clock

研究代表者

中尾 光之 (Nakao, Mitsuyuki)

東北大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：20172265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計機構が障害されるとガンの発生率や進行が有意に高まることが報告されており、ガンの時間療法には一定の合理性がある。本研究では、概日時計の支配を受ける正常・ガン細胞増殖のオートマトンモデルを構築して、代謝選択と増殖をシミュレーションした。これにより、代謝系の修飾を通してガン増殖を抑制できる可能性が示された。さらに、胆汁酸(BA)濃度異常から肝ガンへの移行メカニズムに対象を絞り、概日リズム制御下にあるBAのリサイクル、産生の制御機構をモデル化し、BAの生産/取込みと分解/排出の時間的秩序が変化することでBAの異常な濃度上昇が起こり、それがガン化へと至る可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日時計機構が障害されるとガンの発生率や進行が有意に高まることが知られているが、そのメカニズムは知られていない。本研究では、概日時計の制御を受ける細胞周期確率オートマトンモデルに代謝系を組み込み、栄養環境や細胞内概日時計の周期に依存して代謝経路選択や増殖率が異なることを明らかにした。さらに、概日リズム制御下にある肝臓胆汁酸(BA)のリサイクル、産生の制御機構をモデル化し、BA濃度フィードバックシステムが概日時計の変調を受けることによって、生産/取込みと排出の時間的秩序を保ち、それが変容することで異常な濃度上昇が起こり、それがガン化へと至る可能性を示した。これらはガンの時間療法の最適化に役立つ。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that tumorigenesis and progression increase significantly when the circadian rhythms are impaired. Therefore, the chronotherapy of cancer has naturally been conducted. In this study, we constructed an automaton model of normal and cancer cell proliferation under the control of the circadian clock, and simulated their metabolic selection and proliferation. This indicates that the growth of cancer can be suppressed through metabolic modification. Furthermore, we focused on the transition mechanism from bile acid (BA) concentration abnormality to liver tumorigenesis, and modeling of the control mechanism of BA recycling and production under circadian rhythm control. The modeling indicates that changes in temporal order of BA production/uptake and degradation/excretion could cause an abnormal increase in the hepatic BA concentration, which leads to tumorigenesis.

研究分野：生命情報学

キーワード：確率オートマトン 代謝経路選択 胆汁酸 腸肝循環 肝臓ガン

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、生物時計に従わずに生活・就労する機会が一般化している。それが様々な病弊の誘因となることが明らかになってきており、特にガン罹患率が交代勤務者で高まっていることを多くの疫学的調査が報告している。また、実験レベルではこれを裏付けるように、生物時計機構を障害した動物でガンの発生率や進行が有意に高まることが報告されている。これを担う分子的なメカニズムとして生物時計機構から細胞周期への作用が明らかにされつつある。例えば、分子時計機構のコア・タンパク質である CLOCK-BMAL1 や PER1,2 が細胞周期の進行を調節していることが分かっている。さらに、DNA 修復や細胞死は概日リズム依存性に調節されているが、一方で、それに関わる p53 の活性化によって時計機構のコア遺伝子である Per2 の転写が抑制されることが知られており、一定の割合で生起する DNA 損傷時に概日時計と細胞周期は同時に制御を受けると言えよう。以上のような概日リズムと細胞周期の相互作用の存在はガンの時間療法に一定の合理性を与えている。もし両者の関係を適切に構造化した数理モデルが存在すれば時間療法の戦略策定に役立つだろう。

(2) 細胞および組織レベルでの代謝の再プログラミングは、ガンの特徴であり、ガン細胞代謝への注目が高まっている。ガンにおける代謝の重要な役割と相まって、生化学的および分子生物学的手段の最近の進歩は新たな発見をもたらしてきた。さらに、代謝はすべての生細胞にとって重要なプロセスであり、それが破壊されれば死に至る。ガン治療に使用できる標的可能な弱点を見つけることが求められている。細胞代謝は多数のタンパク質、酵素および反応の複雑なネットワークである。細胞は様々な入力分子の利用可能性に応じてネットワークの一部を再編成する。さらに、増殖細胞の代謝が細胞周期相に基づいて異なる産物をもたらすことが示唆されている。しかしながら、ネットワークにおける分子レベルの修飾の全体的な影響をみることは困難であった。

(3) 肝臓における胆汁酸(BA)濃度の異常は、核内異物認識受容体 CAR の活性化を通して肝細胞ガン(HCC)を誘発することが知られている。腸肝循環する BA 量はフィードバック機構により維持されており、それには BA 受容体 (FXR)が重要な役割を果たす。FXR は BA によって活性化され、BA の合成や輸送を担う分子群の存在量を調節する。また、BA 調節分子群は概日リズムの影響下にあり、BA は概日リズムを呈することが知られている。概日時計機構によって調節される BA 調節フィードバック系に対して、中枢時計と末

梢時計の振動そのものや同調関係への擾乱、循環する BA の生化学的機能の阻害などにより、制御系の特性が実験的に調べられてきた。このうち、中枢および末梢の時計機構の振動や同調関係を修飾した場合には HCC が誘発されることが示されている。しかしながら、概日リズムの同調異常から HCC に至るメカニズムは未だ解明には至っていない。その解明のために、腸肝循環の BA 制御への概日リズムの影響を考慮した数理モデルの必要性が高まっている。

2. 研究の目的

(1) 確率オートマトンにより細胞周期をモデル化する。概日リズムから細胞周期へ進行制御に加えて、DNA 損傷時に生起する概日時計機構の位相反応をモデルに導入する。またガン化を、細胞周期の伸縮や増殖制御の破綻としてモデル化する。細胞集団において概日位相依存性に变化する細胞周期各ステージの滞在分布、細胞死確率、増殖ダイナミクスを明らかにする。また、細胞周期ステージ依存性に作用する抗ガン剤の効果をシミュレーションし、正常細胞とガン細胞の生存確率を比較することで治療効果を定量化する。以上により、時間治療の効果を評価する枠組みを提案する。

(2) 複雑な微小環境をモデル化し、代謝反応の修正/再プログラミングや細胞間相互作用を確率オートマトン細胞周期モデルに組み込み、微小環境と代謝経路選択の関係を明らかにする。また、細胞周期の伸縮の増殖率への影響をシミュレーションで明らかにする。

(3) 腸肝循環する BA 制御機構を中枢および末梢時計機構からの影響を考慮しながら分子レベルで数理モデル化する。摂食リズム反転状態(RF)と BA 不活性化(BAS)状態のシミュレーションを行い、実験データと比較することで、モデルの妥当性を検証する。また、RF 時の肝臓内 BA の一過性上昇現象のメカニズムについてモデルの動作から推論する。また、これにより、概日リズムへの同調状態がどのように BA 制御システムを変容させるのかをモデル論的に明らかにし、HCC を含む病態との関連性について議論する。

3. 研究の方法

(1) 細胞は内部や周辺環境に応じてその状態を変化させる。図 1A に示したモデルでは、「増殖 (Proliferation)」、「休止 (Quiescence)」、「細胞死 (Apoptosis)」、「運動性 (Motility)」の 4 状態を考えた。図 1B に状態遷移図を示す。各状態での動作は以下の通り。

増殖 (Proliferation)

細胞は細胞周期を進行させ増殖する。細胞周期の進行中は一定確率で DNA 損傷を受け、

チェックポイントで修復されなければ、細胞死状態へ移行する。また、細胞内グルコース量 G が一定値 ($G_{(p \rightarrow q)}$) を下回った場合には、増殖に必要なグルコースが十分に無いとし、休止状態へ移行する。

休止 (Quiescence)

細胞は細胞周期を進行させずにその場に留まる。細胞内グルコース量 G が一定値 ($G_{(q \rightarrow p)}$) より多くなると、細胞の栄養状態が回復したとみなし、増殖状態へ移行して細胞周期を進行させる。また、増殖状態の場合と同確率で DNA 損傷を受け、速やかに細胞死状態へ移行する。ガン細胞のみ、休止状態から運動性状態に移行でき、時間ステップ毎に確率 $P_{(q \rightarrow m)}$ で状態遷移の判定が行われる。

細胞死 (Apoptosis)

増殖・休止状態にある細胞が DNA 損傷を受け修復されなかった場合、細胞死状態に移行し、速やかに空間内から取り除かれる。

運動性 (Motility)

この状態はガン細胞のみが取りうる。細胞は空間のグルコース濃度に沿って移動し、グルコースが豊富な場所を目指す。この移動は

血管へ向けての移動と同義であり、ガン細胞の転移プロセスを模しているともいえる。運動性状態からは、時間ステップ毎に確率 $P_{(m \rightarrow q)}$ で休止状態への遷移判定が行われる。細胞内グルコース量が一定以上になった場合には、栄養状態が改善されたとして、休止状態を経て増殖状態へ遷移する。

シミュレーションでは、3次元空間における栄養物質の拡散は拡散方程式に従うとし、Crank-Nicolson法とADI法(Alternating Direction Implicit Method, 交互方向陰解法)を用いて解いた。抗ガン剤2種(5-Fluorouracil, Cisplatin)の拡散係数はそれぞれ 2.77×10^4 , 1.48×10^4 [$\mu\text{m}^2/\text{min}$]、グルコースの拡散係数は 4.02×10^3 [$\mu\text{m}^2/\text{min}$]を用いた。

ガン細胞は上皮間葉転換によって高い運動性を獲得し、転移・浸潤を実現している。この特性を表すため、運動性状態に移行したガン細胞は周囲のグルコース濃度を感知し、濃度の濃い方向に移動するとした。細胞内部のグルコース状態が改善された場合には、休止状態へ移行する。また、ガン細胞の細胞周期は極端に短縮・伸長しているという知見に基づき、細胞周期のG1期の長さを変えた。ガン細胞には、細胞周期短縮または伸長の2種類があるとし、それぞれG1期の長さを4時間、14時間とした(正常細胞は9時間、G1期以外の長さは共通)。すなわち、G1期短縮ガン細胞の細胞周期長は17時間、伸長ガン細胞は27時間、正常細胞は22時間となる。

(2) 代謝を伴う細胞周期モデル(図2)の連続部分は、概日リズムと栄養伝達であり、離散部分は、環境に基づいて動作を決定するエージェントである。それは、概日時計、細胞周期、細胞代謝、栄養伝達の4つの異なるサブモデルで構成される。栄養分は血管から組織に供給され、組織を通して拡散する。各細胞は環境から栄養物を取り込む。細胞代謝は、取込んだ栄養をATPおよびバイオマスに変換する。細胞は各タイムステップであらかじめ決められた量のATPとバイオマス消費する。細胞代謝の目標レベルおよびエネルギー

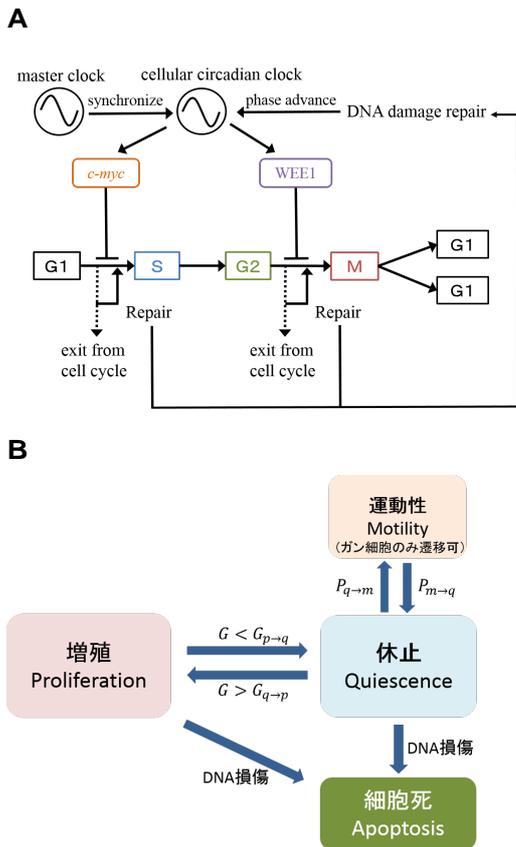


図1 A細胞周期モデルの構成 B細胞周期モデルの状態遷移図

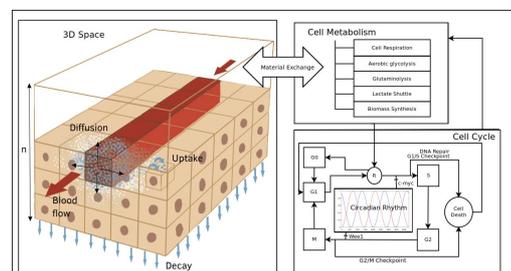


図2 代謝を伴う細胞周期モデル

ーとバイオマスの必要量は細胞周期ステージに依存して決まる．栄養の利用可能性は，チェックポイントの R 点を通過するかどうかを決定する条件となる．三次元空間に位置する細胞への栄養供給は，同じ空間に位置する血管を通して行われる．血管は三次元グリッドを直線的に占める．各物質の拡散量はそれぞれの拡散定数を用いて計算される．拡散方程式は ADI 法 (f-factor) を用いて数値的に解いた．

(3) 腸肝循環する BA は FXR によって BA 合成分子や輸送分子の発現をネガティブフィードバック制御することで恒常性を維持している．構築した BA 制御モデルの概略図を図 3 に示す．本モデルでは，肝臓，胆管，小腸，門脈の 4 領域に存在する BA を区別し，その 4 領域を循環させた．BA 制御システムは末梢時計と摂食リズムの 2 つの経路による支配を受けている．中枢時計 (SCN) 存在下において，摂食タイミングを自由に選択できる状態では末梢時計と摂食リズムは SCN に引き込まれ，両振動子は SCN 位相に依存した一定の位相を保つ．しかし，摂食リズムを強制的に反転させ，摂食位相を SCN 位相から乖離させると，末梢時計は SCN からの同調入力にも拘らず，漸近的に摂食リズムの方に引き込まれ，最終的に末梢時計の位相も反転する．また，このときの SCN からの同調入力は末梢時計の摂食リズムへの同調速度を減速させる．これら末梢時計と摂食リズムのダイナミクスは位相振動子系で表現した．

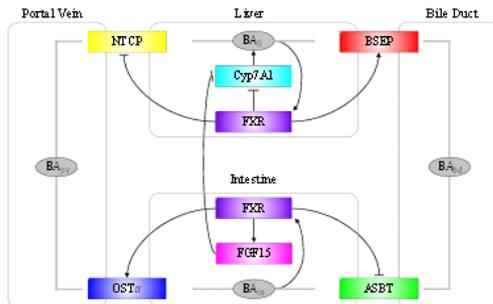


図 3 腸肝循環する BA のモデル

4. 研究成果

(1) 構築した正常細胞とガン細胞のモデルを用いて，2 種類の抗ガン剤の投与をシミュレートし，時間治療計画の検討を行った．5-Fluorouracil (5-FU, 5-フルオロウラシル) は S 期特異的に毒性を示す細胞周期分子標的薬である．もう 1 つは Cisplatin (シスプラチン) で，これは G1 期特異的に細胞毒性効果を示す．これら 2 種類の抗ガン剤を 12 時間間隔で交互に投与する治療法を想定し，ど

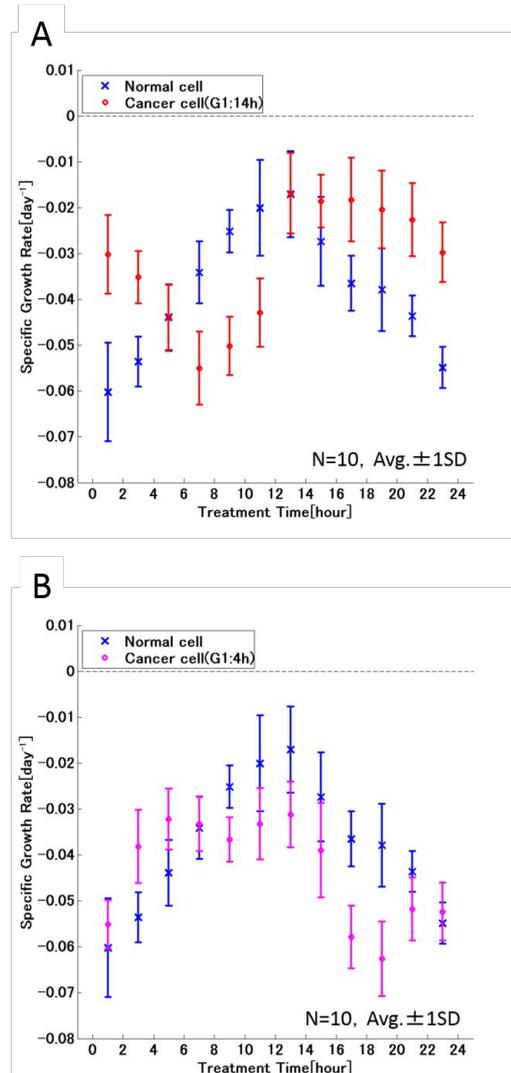


図 4 薬剤投与タイミングと比増殖速度の関係．横軸の Treatment Time は，5-FU を投与する時間を表している．シスプラチンはその 12 時間後に投与される．**A**：正常細胞と G1 期伸長ガン細胞集団に対しての投与シミュレーション結果．**B**：正常細胞と G1 期短縮ガン細胞集団に対しての投与シミュレーション結果．

のタイミングの投与が最も効果的で，副作用を抑えることが出来るかをシミュレーションによって評価した．薬剤は血管を通して投与され空間に拡散する．投与時間の前後 1 時間にわたって血管に供給されるとした．図 4 に時間治療シミュレーションの結果を示す．同図 **A** は正常細胞と G1 期伸長ガン細胞に対し薬剤を投与した結果である．これより，7 ~ 11 時の投与では正常細胞の比増殖速度がガン細胞を大きく上回っている．すなわち，この時間の投与を続けると，ガン細胞の方を早く死滅させることができ，結果として正常細胞へのダメージが抑えられることを示している．特に 9 時の投与は，比増殖速度の差

が大きく開いており、効果が高くかつ副作用を抑えることが出来るような投与時間であることを示唆している。逆に 15~23 時の投与ではガン細胞の比増殖速度が高く、この時間の投与が効果的でないことが示唆される。同図 B は正常細胞と G1 期短縮ガン細胞に対する投与の結果を示している。こちらは、9~19 時の投与が有効であることが分かる。特に 17 時の投与が最も比増殖速度の差が開いており、高い効果を示すことが示唆される。

(2) ガン細胞は、正常酸素条件下でも解糖系を優先する傾向がある。これは Warburg 効果として知られている。解糖フラックスの増加で過剰なピルビン酸は乳酸に変換され、細胞外に分泌される。ガン組織における乳酸濃度の上昇は、大部分のガンで実験的に確認されている。これは、ATP 産生反応における解糖系の優先順位を変えることによってモデル化される。ガン細胞が非効率的な ATP 産生過

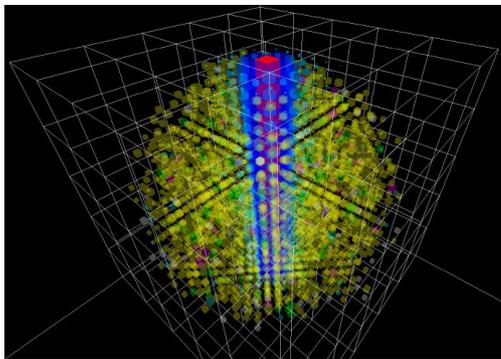


図5 3D 細胞空間における血管周辺の解糖系優先細胞と乳酸分泌細胞の棲み分け

程を好む背後には、グルコース源にアクセスでき乳酸を分泌するガン細胞と、グルコース源から離れており代謝の燃料として乳酸を使用するガン細胞の協調関係が考えられており、シミュレーション結果はこれと一致する(図5)。全く同じ栄養条件下で、解糖系を優先しない正常細胞(図6A)を、解糖系を優先するように修正された細胞(図6B)と比較すると、後者の方が、生存性が高かった。さらに、乳酸からバイオマスへの変換効率が高くなると、ガン細胞は低グルコース領域でも増殖することができる。バイオマス産生効率が低い場合、ガン細胞は、正常細胞では生存できないような領域でも生存することができるが、バイオマス不足のために増殖することはできない。これらの結果は、ガン組織に対する乳酸輸送体阻害剤の有効性を示す研究と一致している。ガン細胞のより短い細胞周期は増殖率を向上させなかった。これは、短期の G1 期におけるバイオマス生産の不足に関連していた。

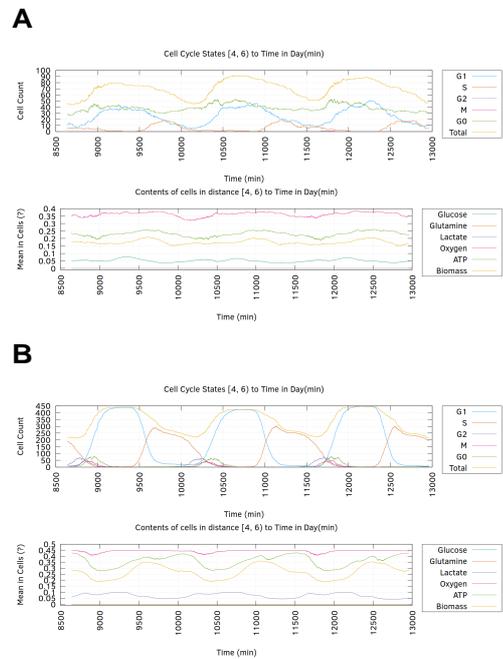


図6 低グルコース条件における A 正常細胞、および B ガン細胞の増殖ダイナミクス

(3) ad lib 状態から位相摂食位相を反転させた時(RF)、肝臓内 BA は一週間後に一過性に上昇し、その後、徐々に元のレベルに戻る。これは、概日時計への同調が乱れた場合の BA 制御機構の特異的な反応性を示唆する。ここでは、摂食位相反転状態の BA 制御機構の反応性をシミュレーションし、そのメカニズムについてモデル構造から明らかにする。シミュレーションでは、位相後退しながら再同調する場合は BA の上昇は観測されなかったが、位相前進しながら再同調する場合は BA の急

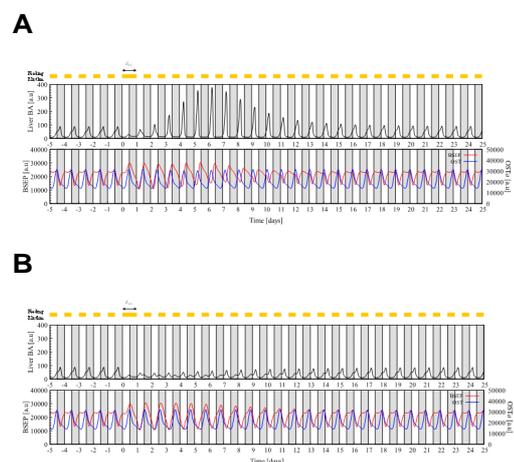


図7 RF 状態の肝臓内 BA のシミュレーション結果。時刻 0 日目から摂食リズムを反転させている。A 末梢時計は位相前進しながら再同調している。B 末梢時計は位相後退しながら再同調している。

激な上昇が観測された。また、RF 後 7 日目で BA スパイクの振幅がピークに達した後は徐々に元の状態に戻っていく様子が観測され、実験結果を再現していた。実際、RF 状態における末梢時計は位相前進しながら同調することが確認されている。図 7 に肝臓内 BA と併せて BSEP と OST の発現量をプロットした。BSEP のリズムは摂食リズムに由来しているため、摂食位相の反転に追従して急激に位相反転する。一方で、ASBT, OST のリズムは末梢時計に由来しているため、両者は数日をかけて徐々に位相反転する。BSEP と OST の位相を観察すると、位相後退再同調では OST は同調過程で BSEP と同位相関係を経て再同調する。一方で、位相前進再同調では OST は同調過程で BSEP と逆位相関係を経て再同調する。BSEP と OST が同位相になる場合、OST が最大で、小腸から肝臓への輸送が最大となる時刻に、BSEP も最大となるので、肝臓から胆管への輸送も最大となる。この場合には肝臓において BA の輸送が滞ることがない。一方で、BSEP と OST が逆位相となる場合は、小腸から肝臓への輸送が最大となる時刻に肝臓から胆管への輸送は最小となるため、この時刻付近においては肝臓の BA は急激に増加する。これが RF における BA の一過性上昇のメカニズムであると考えられる。

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 8 件)

- (1) R.Amano, A.Karashima, I.Motoike, N.Katayama, K.Kinoshita, M.Nakao. Relationship between Dynamics of Physiological Signals and Subjective Quality of Life and Its Lifestyle Dependency. Proc. IEEE EMBC 2019, in press. (査読有)
- (2) 外川龍之介, 奥畑大悟, 吉田侑冬, 中尾光之, 片山統裕. 眼位・瞳孔径変動を考慮した内因性光信号イメージングに基づく覚醒時マウス脳視野地図の推定. 生体医工学 56, 158-163, 2018. (査読有)
DOI: <https://doi.org/10.11239/jsmbe.56.157>
- (3) Y.Yoshida, M.Nakao, N.Katayama. Resting-state functional connectivity analysis of the mouse brain using intrinsic optical signal imaging of cerebral blood volume dynamics. Physiol. Meas. 39, Number 5, 054003, 2018. (査読有)
DOI: <https://doi.org/10.1088/1361-6579/aac033>
- (4) H.Inokawa, N.Katayama, M.Nakao. Evaluation of multidrug cancer chronotherapy based on cell cycle model under influences of circadian clock. Proc. IEEE EMBC 2016, 16395687, 2016. (査読有)

DOI: 10.1109/EMBC.2016.7590979

[学会発表] (計 45 件)

- (1) Y.Morisaki, N.Katayama, M.Nakao. Modeling of hepatic bile acid regulation under circadian clock influences in relation to carcinogenesis. Sapporo Sympo. Biol. Rhythms, 2018.
- (2) 辛島彰洋, 益田幸輝, 片山統裕, 坪川宏, 中尾光之. 睡眠—覚醒状態に依存した海馬神経回路におけるシナプスホメオスタシス. 日本睡眠学会第 42 回定期学術集会, 2017.
- (3) 吉岡亜由美, 中尾光之, 片山統裕. 視交叉上核の日長依存性同期ダイナミクスのネットワークモデル. 電子情報通信学会技術研究報告 MBE116, 2016.
- (4) H.Inokawa, N.Katayama, M.Nakao. Model-based evaluation of multidrug cancer chronotherapy. XIV European Cancer Chronotherapy. XIV European Biol. Rhythm Soc. (EBRS) & IV World Cong. Chronobiol. (WCC), 2015.

[図書] (計 2 件)

- (1) 中尾光之. 睡眠覚醒の数学モデル. 三島編「睡眠科学」, 化学同人, 324(76-96), 2016.
- (2) M.Nakao, A.Karashima, N.Katayama. Sleep models. In “Sleep Medicine: A Comprehensive Guide to Its Development, Clinical Milestones, and Advances in Treatment”, S.Chokroverty, M.Billiard eds., 584(511-516), 2015.