

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14379

研究課題名(和文) 時計異常による乳癌発症モデルの開発

研究課題名(英文) Development of mice model of breast cancer with abnormal clock

研究代表者

岡村 均 (Okamura, Hitoshi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60158813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体リズムの異常により発癌頻度が上がるとする疫学的データは多い。近年の研究で、時計遺伝子は全身の細胞で時を刻んでおり、生物時計が細胞代謝や細胞分裂など基本的な細胞機能と密接にリンクしていることが明らかになった。我々は高率に乳癌を発現する時計遺伝子改変マウスBreast Cancer Clock Gene Genetically Engineered Mouse 1(BCCM1)を開発した。このマウスモデルは高率で癌腫を発現し、乳癌のトランスクリプトーム解析の結果、BCCM1では前癌状態が乳腺組織で長期間続いていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Circadian clock oscillating machinery exists virtually in all cells of the body, linking its intimate relationship to basic metabolism. Accumulating epidemiological and genetic evidence indicates that the disruption of circadian rhythms might be directly linked to cancer. We developed a Breast Cancer Clock Gene Genetically Engineered Mice 1 (BCCM1) by the mice screening in clock gene mutated animals. Here we analyzed the development and progress of breast cancer in this animal model. Breast cancer was developed only in females and not in males. Transcriptome analysis of this tumor suggests that the BCCM1 mouse is in precancerous stage for a long time.

研究分野：時間生物学

キーワード：時計遺伝子 乳癌 トランスクリプトーム 免疫 マウス

1. 研究開始当初の背景

現在、人類は他の生物がこれまで経験したことのないような環境で暮らしている。地球に生まれた生物はすべて、地球の自転による昼夜の規則正しい明暗変動の中で、誕生し、生息し、進化してきた。そのため、24 時間の時間形成システム (生物時計 biological clock) は基本的な生命システムとして、ほとんどの生物に普遍的に組み込まれてきた。ところが、21 世紀に入ると交代性勤務、時差勤務、長時間労働が日常となった。コンビニエンスストアや街のネオンが明々と灯る現代のライフスタイルは、生命の基本的性質である生体 (概日) リズムシステムを大きく揺さぶっており、これが、生活習慣病、なかんずく発癌の増大原因の一つではないかと危惧されている。

癌に関しては、生体リズムの異常により発癌頻度が上がるとする疫学的データは多い。興味深いのは、乳癌の発症リスクである。乳癌の頻度は米国、西欧、日本などの西洋化が進み、人工照明下で暮らす傾向の強い先進国で高いが、途上国でも西洋化に伴ってリスクが上昇する傾向にある (Stevens Epidemiology 2005 等)。もっと興味深いのは、変則的な勤務時間を取る職業と乳癌の発症リスクの相関である。Haldorse らは (Int J Epidemiol 2001)、時差環境下で勤務する国際線航空乗務員に発症率が高いことを報告している。ただ、航空乗務員は放射線を浴びることが原因とも考えられるが、地上勤務でも、シフトワーキングが常態である病院勤務者に乳癌の発症率が高い傾向があることはやはり、生体リズム異常と発癌との関連を想起させる (Hansen : Epidemiology 2001)。また男性でも、シフトワーカーの男性では、前立腺がんの発症率が有意に高いとの報告がある (Kubo et al. Am J Epidemiol. 2006)。生体リズムは、癌の発症のみならず、癌の予後も左右する。Lis らは (Integr Cancer Ther, 2003)、生体リズムが正常な癌患者よりも、異常な患者のほうが癌の予後が悪いことを報告した。以上の報告は、Levi らの抗癌剤の時間治療 (Levi, Lancet Oncol, 2001) のみでなく、生体リズムが癌の発症、進展に深く関与していることを示唆している。

我々は、我々は哺乳類時計遺伝子のクローニング (Naure 1997、Cell 1997) からリズム生成の分子レベルの解明 (Science 1999, 2001) を先導し、生体内で時計が実際動いている事を明らかにした (Nature 2001; Science 2003a)。さらに、肝臓の部分切除後の再生系を用いて、時計遺伝子が細胞周期のうち G2→M の抑制性キナーゼである Wee1 を制御し、朝にのみ細胞分裂が起こることを証明した (Science 2003b)。さらに、生体リズムの完全に消失した Cry-null マウスでは、肝臓切除後の細胞再生が遅れることや明らかにしている。

2. 研究の目的

多くの臓器で細胞周期のタイミングは規定されており、また時計遺伝子には、細胞周期の抑制、cMyc の抑制、DNA 損傷からアポトーシスへの経路の促進など癌抑制機能をもつものがある。

今回、我々は、高率に乳癌を発現する時計遺伝子改変マウス Breast Cancer Clock Gene Genetically Engineered Mouse 1 (BCCM1) を開発した。この発癌マウスは高率で肺転移が起こり、癌の進展機構解明に画期的なモデルと言える。当該マウスのような、リズムに関係した発癌モデルマウスは、全く知られていない。また、このような高率で発症・転移するマウスのモデルも P53 欠損マウスを除いては稀である。今回、このマウスを分子レベルの解析も含め、より詳細に行ない、生体リズム異常による発癌・癌進展の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

1: 癌腫の基本病理

癌腫は雄性 BCCM1 には全く発症せず、雌性 BCCM1 のみに発現する。経過観察での発現経過では、妊娠をエピソードに癌腫が明らかになるものが多いが、離乳後雌雄別に飼育し、全く妊娠が無いものも、16 ヶ月後には大部分が癌腫を発生する。

Preliminary な実験の結果、発癌には妊娠のエピソードが多い個体が発症する頻度が高いことが分った。そこで、BCCM1 の乳癌が個別で発現するのか、多くの乳腺組織で同時に発現するのか、腫瘍の産生機構を検索する。この実験ではマウスの妊娠出産のエピソードも含めて繁殖条件下で行なう。

BCCM1 マウスを、生後 10 日 (授乳期)、生後 20 日 (Weaning 直前)、生後 30 日 (Weaning 後)、生後 60 日、生後 90 日、生後 120 日、以降 2 ヶ月毎 (16 ヶ月まで) 計 12 回癌腫の発現の有無にかかわらず、乳腺組織を採取して、パラフィン切片を作成して、病理学的に検索する。これにより、個別で発現するのか、同時多発的に発癌が起こるのか、腫瘍の発生機構を検索する。そこで、BCCM1 マウスの DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行なった。

4. 研究成果

BCCM1 マウスの遺伝子解析により、生体リズム異常による発癌・癌進展の分子機構を検討した。BCCM1 の癌腫は雄性では発癌せず、雌性のみに発症した。経過観察での発現経過では、妊娠をエピソードに癌腫が明らかになるものが多いが、離乳後雌雄別に飼育し、全く妊娠が無いものも、16 ヶ月後には大部分が癌腫を発生した。発癌には妊娠のエピソードが多い個体が発症する頻度が高い傾向が認められた。さらに、乳癌原発巣の腫瘍の大きさは種々あるが、大きなものには高率で肺転移が認められることが分かった。さらに、

分子機構特定のためのトランスクリプトーム解析を行った。BCCM1 乳腺（前癌状態）BCCM1 乳癌、BCCM1 転移癌の各群で、同じ方向に変動する遺伝子は少ないが存在した。

そのうち、PPAR-gamma とエストロゲン receptor、progesterone receptor は著明に発現制御されていた。PPAR-gamma の異常は抗炎症作用の減弱を生じる可能性を示唆する。すなわち BCCM1 乳腺では明らかな炎症現象が起きている。それも非特異的免疫反応ではなく、T 細胞、B 細胞がからむ特異的免疫反応がおきている。従って、このマウスは前癌状態であること、すなわち、癌細胞の出現と免疫による消去のせめぎあいが長期にわたって継続しており、この状態は恐らく遺伝子変異または epigenetic な変化を誘導する可能性を示唆する。

以上の今回の結果を、以前の時計遺伝子研究による発癌実験の結果から、どのような機構で、時計遺伝子が発癌と関与するのかを考察する。細胞周期（WEE1）・DNA 損傷応答（ATR/ATM, CHK1, CHK2）・p53 機能調節（SIRT1）・発癌遺伝子の増加（c-Myc）・分化遺伝子（C/EBP）との関与、交感神経系の活性化など、さまざまなレベルでの制御が知られている。

分子時計は“細胞時計”として糖代謝・脂質代謝などのエネルギー代謝、G 蛋白質シグナル、細胞周期の機能など、多岐にわたる細胞機能に時間秩序を与える。時計遺伝子の cis-element にある E-box、D-box、RORE 配列を介しての転写レベルで制御されている ccg は数千の遺伝子にのぼる。

著者らは部分切除後の再生肝を用いて、分子時計による細胞周期に関与する ccg を明らかにした。肝細胞の細胞周期はきわめて長く通常ではほとんど細胞分裂している細胞はないが、70%の肝切除後には大部分の残存した肝細胞は細胞増殖サイクルに入る。すなわち、再生肝は体内時計と細胞周期を同時に解析できる有用な実験系であるといえる。肝切除後は S 期は体内時計との相関はないが、M 期への流入は体内時計によって制御されていた。この M 期の動態に相関して動く遺伝子に CyclinB1, Cdc2, Wee1 があつた。このうち、細胞周期の M 期への流入を抑制する Wee1 遺伝子のプロモーター上の E-box には CLOCK/BMAL1 が働き転写が亢進し、WEE1 活性が上がり、これが CDC2 の活性変化を引き起こす。マウスにおいて、1 日のうち WEE1 活性のもっとも低い朝に、多くの組織で M 期があるのはこのためであろう。リズムは再生のタイミングだけでなく、再生の能力も制御する。すなわち、分子時計が動かない Cry1/Cry2 ダブルノックアウトマウスでは肝切除後の再生に遅延がみられる。他の ccg として、S から G1 期で働く

CyclinD1、p53 に結合する Mdm2、DNA 脱メチル化を促進する Gadd45a などがある。

体内時計は ccg を通してだけでなく、時計遺伝子産物が細胞周期関連蛋白質と相互作用して細胞周期を制御する可能性もある。たとえば、DNA の傷害によって活性化する ATR/ATM キナーゼが TIMELESS, PER1, PER2、CRY2 と結合することが示された。これらのキナーゼは DNA 修復に関する蛋白質をリン酸化することで DNA 修復を促す働きをもっており、PER との相互作用によりその活性化状態が維持されることが明らかとなっている。

また最近、時計遺伝子のひとつである Rev-erba が、ヒストンの脱アセチル化酵素である HDAC3 を介してエピジェネティックにリズムに遺伝子転写を制御する可能性も注目される。さらに最近、細胞内の代謝を介する生体リズムの制御の可能性が指摘されている。近年、NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 が時計蛋白質 BMAL1 を脱アセチル化し、転写活性化能を低下させることが明らかになった。一方、NAD 合成の律速酵素である NAMPT は BMAL1 により発現制御されているので、BMAL1, NAMPT, NAD, SIRT1 の間で代謝ループが形成されている。また、SIRT1 は PER2 を脱アセチル化してユビキチン・プロテアソーム系での分解を促進する。SIRT1 は p53 の脱アセチル化による調節酵素としても知られるので、SIRT1 を介する DNA 修復の障害や発癌制御も注目される。

細胞周期関連の遺伝子は Wee1 をはじめ ccg が数多いので、時計遺伝子変異マウスでは細胞周期の dysregulation が起こることが想定される。また、時計遺伝子が ATR/ATM キナーゼを活性化して、DNA の修復や、細胞周期の停止やアポトーシスを促進しているが、時計遺伝子不全によるこれらの経路の障害も発癌の誘引になることが考えられる。発癌遺伝子である c-Myc 発現が、分子時計の促進因子である CLOCK/BMAL1 により抑制される（Fu et al. Cell 2002）。Lee ら（2010）は、時計遺伝子の異常では交感神経系の調節不全が起こり、β アドレナリン受容体/AP-1/c-Myc 系が活性化することが発癌の要因であると推測している。これは、Per2 変異マウスにみられる骨芽細胞の過形成が β アドレナリン受容体を介する AP-1 を活性化し、それに伴う Cyclin D1 の増加によるという観察からである（Fu et al. Cell 2005）。交感神経系不全が癌の発育を増強するという説は、体内リズムの中核である視交叉上核（SCN）破壊マウスで腫瘍の成長は増強するという Levi グループの結果（Filipinski et al. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2004）も説明しうるかもしれない。なぜなら、交感神経系は SCN からのもっと

も主要な時間シグナルのアウトプット系であるからである。ただ現在までのところ、なぜ時計遺伝子欠損が交感神経系不全をきたすのか、その分子メカニズムは不明なままである。

また、Per2 がリンパ腫や骨髄性白血病の分化因子として知られる bZIP 蛋白質 C/EBP により直接誘導されることから、分化促進因子としての時計遺伝子の働きも注目される (Gerry et al. Integr. Cancer Ther.,2009)。興味深いことに、Per2 過剰発現は C/EBP と同様、癌細胞の増殖の抑制、アポトーシスの促進を引き起こす。乳癌、前立腺癌では、エストロゲン受容体やテストステロン受容体と Per 遺伝子産物の直接的な結合による活性低下が報告されている (Gerry et al. Oncogene 2007)。我々の開発した BCCM1 マウスで、今後、これらの実験データを検証していきたい。

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)

岡村均、総論：体内時計と疾患の関わり、MSD (メディカル・サイエンス・ダイジェスト) 査読無、41 巻、2015、380-381

〔学会発表〕(計 1 件)

岡村 均、生体時計と細胞周期、シンポジウム・細胞と時間、BMB2015 日本分子生物学会 (神戸国際会議場：神戸) 2015/12/3 国内

〔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〕
該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡村 均 (OKAMURA HITOSHI)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号：60158813

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し