

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08532

研究課題名(和文) 時間治療のための腫瘍内低酸素と生物時計の相互作用の解明

研究課題名(英文) Identification of interrelationships between hypoxia in tumor and biological 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍低酸素とホスト個体リズムの関連を知るためにまずマウス個体に様々な時間帯に低酸素を暴露し概日リズムの変化を評価した。リズムの反応は休息期(明期)の低酸素が最も強く低酸素暴露に続く活動期(暗期)の活動量の低下と活動終了期の活動量の上昇という2相性の反応であった。この反応は時計遺伝子に依存しない波様の反応が活動期に重なることで生じることが分かった。また休息期低酸素によって脳内で上昇する睡眠関連物質がこの波様の反応に関与していること、そして休息期低酸素で誘導される別の因子がこの波様の反応に対抗することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

休息期の低酸素により行動の2相性の変化、波様反応が起こることを初めて明らかにした。これは休息期の低酸素による病態(睡眠時無呼吸症候群、高山病の睡眠後の悪化)を理解するために有用である。特に治療抵抗性である睡眠時無呼吸症候群(Co-Morbid Insomnia and Sleep Apnea, COMISA)ではマウスの行動に対応した昼間の強い眠気と夜間の不眠が起こることから我々の研究結果から得られる示唆が多いと思われる。

研究成果の概要(英文)：To know relationships between tumor hypoxia and behavior rhythm of host, mice were exposed to hypoxia of different timings in a day. The largest response were observed by daytime hypoxia (DHx). DHx reduced activity of active phase and increased activity ending phase. This biphasic response was occurred by overlap between active phase and clock gene independent wave like response by DHx. In addition, this biphasic response was involved in sleep substance increased by DHx. And, another factor increased by DHx acted against the effect of DHx.

研究分野：時間生物学

キーワード：circadian sleep hypoxia

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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)の遺伝子上流の E-box に結合、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 (Trens Cell Biol 24:90-99,2014)。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 のような細胞代謝感受性の HDAC、さらには Id2 (Masubuchi et al Curr Biol 19:R298-300, 2009), PHLPP1 (Masubuchi et al PNAS,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。分子時計振動はセンター時計である視床下部視交叉上核(SCN)だけでなく他の脳部位(Masubuchi et al Europ J Neurosci 12: 4206-14,2000)さらには全身の細胞に存在し、SCN の支配をうけて同調したリズムを刻んでいる。そしてこれら末梢時計が生理機能のリズムをドライブすると考えられている。

生体由来する癌組織の生物時計も正常組織の末梢時計同様、SCN の影響下にあると考えられる。しかし固形癌組織においては腫瘍の成長が早くまた制御されていないことにより栄養血管からの酸素供給が不十分となる低酸素領域があり(Adv Drug Deliv Rev 61:623-632, 2009)、その厳しい生存環境からの酸素濃度勾配が存在する実際の固形癌組織内での細胞間のリズムの不整、乱れが予想された。また癌細胞では低酸素暴露により培地の pH が低下する (J Cell Mol Med. 14:771-94, 2010)が、組織内低酸素により細胞から生じる酸が自らの生物時計のシフトを起こしていることが予想された。

転移性大腸癌、乳癌などの患者において睡眠、体温などの生理機能リズムの振幅低下、不明瞭化が知られている(Adv Drug Deliv Rev 62:979-1001,2010)。この癌による生理機能リズムの乱れは担癌動物のリズム解析においても示されている(Int J Cancer 70:241-247,1997)。この現象の原因は不明であるがリズム異常のある低酸素腫瘍細胞群が癌由来の代謝物を介して (乳酸 Science 293:510-4,2001) また宿主からの反応性のホルモン (糖質コルチコイド Science 289:2344-7,2000) サイトカイン (インターフェロン Nat Med. 7:356-60, 2001) などによってホストリズムを乱していることが予想された。

2. 研究の目的

腫瘍低酸素と宿主個体リズムの関連を知るためにまずマウス個体に様々な時間帯に低酸素を暴露しその後の概日リズムの変化を評価した。

3. 研究の方法

明暗 12h : 12h (~100lux)環境下でマウス(ICR、c57BL/6J)の活動量を焦電型赤外線センサーで継続的にモニタリング、データ収集した(クロノバイオロジーキット Stanford Software Systems 社, Masubuchi et al J Neurosci 25:4719- 4724, 2005)。低酸素暴露前の 1 日の活動量が一定になるように個体別に補正を行った後、活動量の変動を定量的に解析した。

低酸素暴露による forebrain の mRNA の変動は qPCR (QuantStudio® 3 Real-Time PCR systems (ABI))及びマイクロアレイ(Mouse Gene Expression 4 × 44K Microarray chip (G4846A, Agilent Technologies))にて評価した。

4. 研究成果

明暗環境下で様々なポイントで 8%、9h の低酸素を暴露したところ明期 (休息期) の低酸素 (daytime hypoxia; DHx)の影響が最大であることが分かった。明期の低酸素は活動期の活動量を低下させ活動終了期の活動量を増加させる 2 相性の反応を起こした (図 1 a)。この反応はタイミング依存性であることから生物時計の関連を示唆しており、DHx による forebrain のいくつかの時計遺伝子 mRNA の変化はこの可能性を示唆していた。そのため明暗条件下で暗期の活動期が生じる時計遺伝子 Cry1 及び Cry2 のノックアウトマウス(CryDKO; c57BL/6J)に DHx を暴露したところ興味深いことに野生型(c57BL/6J)と同様の 2 相性の反応が見られた。この結果は夜間の活動期上昇さえあれば 2 相性の反応が生じることを示唆していた (図 1 b)。この仮説を検証するためマウスを恒常暗環境(DD)に移行させ DHx を暴露した。野生型では DD 移行後も夜間の活動期上昇は存在し DHx に対しても行動は 2 相性の反応を示した (図 1 c)。一方、CryDKO は DD では夜間の活動期上昇は消失し無周期となり DHx に対しても行動は反応を示さなかった (図 1 d)。しかし、DD 移行と同時に DHx を暴露すると活動量は down and up の波様反応を示した (図 1 e)。以上の結果から DHx は直前の夜間活動量上昇依存的に時計遺伝子に依存しない活動量の波様反応を生じ、それが時計遺伝子にドライブされる夜間活動量上昇に重なり行動の 2 相性の反応を起こすことが分かった。続けて DHx が行動の 2 相性の反応を起こす機構を明らかにするために DHx 直後の forebrain のマイクロアレイ及び qPCR を行い mRNA 変動の解析を行った。mRNA 発現解析及び続く解析により DHx により脳内で上昇する睡眠関連物質が行動の 2 相性の反応を引き起こすことが分かった。また DHx で誘導される別の因子が DHx によるこの波様の反応に対抗することが明らかとなった。

本研究は休息期の低酸素により行動の 2 相性の変化、波様反応が起こることを初めて明らかにした。その後の解析よりそのメカニズムの一端が明らかとなったがこれらは休息期の低酸素による病態 (睡眠時無呼吸症候群、高山病の睡眠後の悪化) を理解するために有用である。特に

治療抵抗性である睡眠時無呼吸症候群(Co-Morbid Insomnia and Sleep Apnea, COMISA)ではマウスの行動に対応した昼間の強い眠気と夜間の不眠が起こることから我々の研究結果から得られる示唆が多いと思われる。

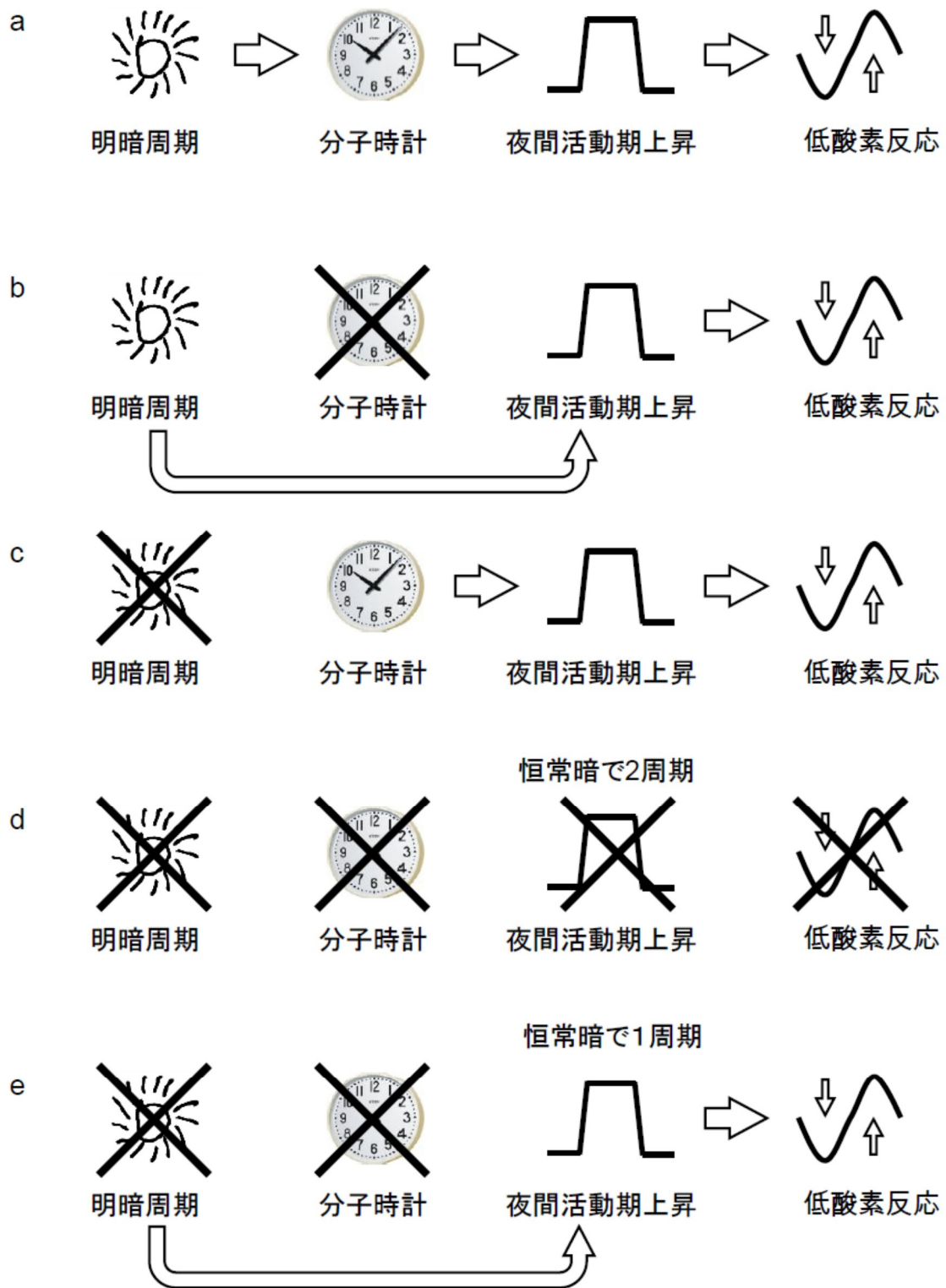


図1 DHxによる行動の2相性反応は夜間活動期に依存する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Komatsu Kouji, Iwase Akira, Murase Tomohiko, Masubuchi Satoru	4. 巻 136
2. 論文標題 Ovarian Tissue Culture to Visualize Phenomena in Mouse Ovary	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e57794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/57794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komatsu Kouji, Masubuchi Satoru	4. 巻 99
2. 論文標題 Mouse oocytes connect with granulosa cells by fusing with cell membranes and form a large complex during follicle development †	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 527 ~ 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioy072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komatsu Kouji, Masubuchi Satoru	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Mouse oocytes connect with granulosa cells by fusing with cell membranes and form a large complex during follicle development †	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 0(0), 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioy072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kouji Komatsu, Satoru Masubuchi	4. 巻 16
2. 論文標題 Observation of the dynamics of follicular development in the ovary	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 21-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kouji Komatsu, Satoru Masubuchi	4. 巻 Released 2017/03/17
2. 論文標題 The concentration-dependent effect of progesterone on follicle growth in the mouse ovary.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 1-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2016-154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Ikegami, Kazumasa Saigoh, Atsuko Fujioka, Mamoru Nagano, Ken Kitajima, Chihiro Sato, Satoru Masubuchi, Susumu Kusunoki, Yasufumi Shigeyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of Expression Alteration in Flanking Genes on Phenotypes of St8sia2-deficient Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50006-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 増淵悟
2. 発表標題 休息期の低酸素による活動期行動量変動の異常
3. 学会等名 日本睡眠学会第44回定期学術集会 シンポジウム21 基礎医学から時間医療を考える (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増淵悟 近藤孝男 成瀬拓郎 糸和彦 本間さと 西野精治
2. 発表標題 機械時計から体内時計と睡眠を考える
3. 学会等名 日本睡眠学会第44回定期学術集会 市民公開講座 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Satoru Masubuchi
2 . 発表標題 Hypoxia effect on circadian activity is molecular clock independent but daily activity dependent wave like response in mice
3 . 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2018 (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Satoru Masubuchi , Takako Yano , Kouji Komatsu , Wataru Nakamura , Akinobu Ota, Sivasundaram Karnan, Kosei Takeuchi , Yoshitaka Hosokawa, Takeshi Todo, Kazuo Umezawa, Toshiaki Shiomi
2 . 発表標題 Hypoxia effect on circadian activity is molecular clock independent but daily activity dependent wave like response in mice
3 . 学会等名 Asian Forum on Chronobiology in 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Satoru Masubuchi , Takako Yano , Kouji Komatsu , Wataru Nakamura , Akinobu Ota, Sivasundaram Karnan, Kosei Takeuchi , Yoshitaka Hosokawa, Takeshi Todo, Kazuo Umezawa, Toshiaki Shiomi
2 . 発表標題 Hypoxia effect on daily activity is molecular clock independent but daily activity dependent wave like response in mice
3 . 学会等名 International Symposium on Biological Rhythms “20 Years since Discovery of mammalian Clock Genes ” (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Satoru Masubuchi , Takako Yano , Kouji Komatsu , Wataru Nakamura , Akinobu Ota, Sivasundaram Karnan, Kosei Takeuchi , Yoshitaka Hosokawa, Takeshi Todo, Kazuo Umezawa, Toshiaki Shiomi
2 . 発表標題 Hypoxia effect on daily activity is daily activity dependent wavelike response in mice
3 . 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 増淵悟
2. 発表標題 環境因子による行動リズムの制御
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会 シンポジウム2：周生期に始まる光環境と生体周期・疾病発症の関係を読み解く（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増淵悟
2. 発表標題 体内時計と運動
3. 学会等名 第23回日本体力医学会東海地方会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増淵悟
2. 発表標題 時計遺伝子と病気の関係
3. 学会等名 【市民公開講座】がんにならない生活習慣を考える会～睡眠と生活習慣病・長寿遺伝子の関係を学ぼう～（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増淵悟
2. 発表標題 低酸素によるマウス活動期活動量の変化は時計遺伝子によらない波様の反応が決定している。
3. 学会等名 第65回 中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増淵悟
2. 発表標題 低酸素によるマウス活動期活動量の変化は時計遺伝子に依存しない波様の反応が決定している。
3. 学会等名 第16回 がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増淵悟 矢野多佳子 小松紘司 中村渉 太田明伸 シバスダラン・カルナン 武内恒成 細川好孝 藤堂剛 塩見利明
2. 発表標題 マウス活動量低酸素反応の日内変動の制御
3. 学会等名 第24回 日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoru Masubuchi, Takako Yano, Kouji Komatsu, Wataru Nakamura, Akinobu Ota, Sivasundaram Karnan, Kosei Takeuchi, Yoshitaka Hosokawa, Takeshi Todo, Kazuo Umezawa and Toshiaki Shiomi
2. 発表標題 Effects of hypoxia on the daily locomotor activities of mice
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Masubuchi
2. 発表標題 Circadian effect of hypoxia to mice locomotor activities
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2016（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Satoru Masubuchi
2. 発表標題 Circadian hypoxia response to locomotor activity of mouse.
3. 学会等名 第23回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Satoru Masubuchi
2. 発表標題 Circadian effect of hypoxia on locomotor activities
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小松 紘司 (Komatsu Kouji) (40456893)	愛知医科大学・生理学・講師 (33920)	