

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07327

研究課題名(和文) 体内時計による臓器特異的な遺伝子発現調節を応用した治療抵抗性がんの克服法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to overcome treatment-resistant cancers by applying organ-specific regulation of gene expression by the biological clock

研究代表者

牛島 健太郎 (Ushijima, Kentaro)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：70448843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：時計遺伝子Bmal1をゲノム編集によりノックアウトした膵臓がん細胞(MIA-BKO細胞)では、細胞接着関連分子群の発現量が増加していた。しかしながら、細胞増殖速度や細胞遊走能は対照の野生型細胞よりも小さい傾向であった。本研究の成果は、過去に報告されている膵臓腺がん細胞の成果と異なるものである。本研究で使用した膵臓がん細胞は細胞凝集を形成しやすいことから、幹細胞性が強い可能性がある。以上より、膵臓がん細胞であっても、時計遺伝子Bmal1の細胞悪性度に及ぼす影響は細胞によって正反対になることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内時計の破綻はがんの危険因子であることが指摘されている。しかしながら、時計遺伝子の欠損はがん細胞の悪性度を必ずしも高めるものではないことが、本研究により示された。さらに、時計遺伝子とがん細胞の関係には、時計遺伝子による従来の2次元的な転写調節ネットワークからでは理解できない、より高次元の遺伝子発現調節システムが寄与している可能性がある。早期発見が難しい膵臓がんは進行性で切除不能であることが多く、膵臓がんの生存率の低さは未だに顕著である。今後、時計遺伝子による細胞内恒常性調節機構を空間的および細胞依存的に解明することで、この課題に対する対策の一助になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We generated Bmal1-knockout pancreatic cancer cells (MIA-BKO cells) by genome editing. In these cells, the expression levels of a group of cell adhesion-related molecules were increased. However, cell proliferation rate and cell migration ability tended to be smaller than those of control wild-type cells. The results of the present study differ from previously reported results of pancreatic adenocarcinoma cells. The pancreatic cancer cells used in this study may have strong stem cell characteristics because they tend to form cell aggregates. These results suggest that even in pancreatic cancer cells, the effects of the clock gene Bmal1 on cellular malignancy are diametrically opposed from cell to cell.

研究分野：時間生物学

キーワード：時計遺伝子 膵臓がん 治療抵抗性 Bmal1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

平成 30 年 9 月に国立がん研究センターが発表した統計によると、がん種類別の 5 年生存率は男女共に膵臓がんが最も低く、全がんで平均 62% であるのに対し、膵臓がんでは 8% 以下である。一方、膵臓がんの 5 年後サバイバー (がんと診断されてから 5 年目の生存者) の 5 年生存率は高く、80% を超える。これは、難治性といわれる膵臓がんであっても、治療が奏功すれば良好な予後が得られることを示唆している。

1997 年に体内時計を構成する哺乳類で最初の時計遺伝子 Clock がクローニングされて以降、日内リズムの形成システムが細胞レベルで解明されつつある。そして近年では、生活リズムの破綻は不眠や生活習慣病だけでなく、がんの危険因子であることも指摘されている (Takahashi et al. Nat Rev Genet, 2008)。特に、時計遺伝子 Per2 の変異マウスが易発がん性であることが発表され (Fu et al, Cell, 2002)、細胞のがん化誘導因子や悪性化因子としての時計遺伝子の機能に関心が高まっている。

一方、研究成果の蓄積に伴い新たな課題が生じている。これまでに哺乳類の時計遺伝子として約 20 種類が報告されており、主要時計遺伝子の欠損や変異は共通して体内時計を破綻させる。しかし、その欠損や変異が総じて細胞の悪性化を加速するものではないことが判明した (Katamune et al. J Biol Chem, 2016; Hashikawa et al. Sci Rep, 2017)。さらに、前述の Per2 の変異マウスは易発がん性であるが、リンパ系組織でのがん発症が顕著であることから、時計遺伝子による細胞のがん化誘導および細胞の悪性化について統一的な解明に至っていないと言える。これらのことは、時計遺伝子を応用する新規がん治療法開発研究において、「体内時計」という機能単位で議論するのではなく、1 つの時計遺伝子、1 種類のがん細胞それぞれに焦点を絞った検討が必要であることを示している。したがって、体内時計を基盤として治療抵抗性の膵臓がんに対する新規治療法を開発するためには、膵臓がん細胞に特有の分子メカニズムを解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

研究代表者は米国研究室との国際共同研究において、時計遺伝子 Bmal1 の欠損が全ゲノムでクロマチンオープン領域を増加させること、この影響は膵臓由来細胞で認められるが肝臓由来細胞では認めないことを共同研究者と共に明らかにした (未発表データ)。さらに、Bmal1 欠損細胞は、細胞外からの化学刺激に対して反応が鈍化していることも明らかにした。

時計遺伝子は転写調節因子として機能するため、従来の研究ではその DNA 結合配列近傍の遺伝子や下流分子が主な解析対象であった。しかし、前述の Bmal1 欠損細胞のクロマチン構造変化は、時計遺伝子の転写調節領域から数万塩基離れた領域でも認められている。本研究の独創的な点は、時計遺伝子の転写調節配列に依存する発現調節ではなく、『時計遺伝子による空間的クロマチン構造調節による遺伝子発現制御』に着目することである。この研究手法は、時計遺伝子の結合部位に基づくクロマチン免疫沈降-シーケンス解析では解明できない、体内時計に支配される新たな細胞内機能を見出すことを可能にする。

本研究の作業仮説は、「時計遺伝子 Bmal1 の欠損は臓器特異的に DNA に対する転写因子の親和性を変容させ、その結果クロマチン 3 次元構造の変化を来す。これにより臓器特異的に遺伝子発現の変化が生じて、薬物耐性獲得が引き起こされる」である。これらの機序を明らかにし、治療抵抗性膵臓がんの克服法を開発することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1). 膵臓がん細胞の比較 (BMAL1 タンパク質発現量およびゲムシタピン感受性)

実験には、ヒト膵臓がん細胞 (Panc-1 細胞、MIA-Paca2 細胞、BxPC-3 細胞および AsPC-1 細胞) を用いた。RIPA buffer を用いてそれぞれの細胞の Lysate を作製し、BMAL1 タンパク質発現量を SDS-PAGE ならびに western blot 法により測定した。

培養したそれぞれの細胞を 96-well plate に播種し、その 24 時間後に終濃度 1 nM ~ 1 mM 濃度のゲムシタピンを曝露した。ゲムシタピン曝露 72 時間目に WST-1 アッセイにより細胞増殖活性を測定し、ゲムシタピンに対する各細胞の感受性を評価した。

#### (2). Bmal1 ノックダウン細胞を用いた検討

実験には、前述 4 種類の膵臓がん細胞に加えて、ヒト肝臓がん細胞 (HepG2 細胞) を使用した。Bmal1 遺伝子の転写開始点から 806、1044 または 1984 番目の塩基を含む 21 塩基を標的とする siRNA をそれぞれ合成し、リポフェクション法を用いて細胞にトランスフェクトした。遺伝子発現抑制効果は western blot 法により確認した。また、siRNA トランスフェクト 48 時間後にゲムシタピンを曝露し、その 72 時間後に WST-1 アッセイにより薬物感受性の変化を評価した。

### (3) . Bmal1 ノックアウト細胞を用いた検討

#### . Bmal11 ノックアウト細胞作製および網羅的遺伝子解析

ヒト膵臓がん細胞のうち MIA-Paca2 細胞を用いて、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集を利用した Bmal1 ノックアウト細胞 (BKO 細胞) の作製を行った。ガイド RNA を含むプラスミドおよび Cas9 タンパク質を、エレクトロポレート法により MIA-Paca2 細胞にトランスフェクトし、抗生物質耐性獲得によるセレクションおよび限外希釈により BKO 細胞を作製した。Bmal1 遺伝子をノックアウトした MIA-BKO 細胞および対照の MIA-Paca2 細胞において、遺伝子発現の変化を網羅的に解析するため、次世代シーケンサーによる RNA-シーケンス解析を行った。

#### . MIA-BKO 細胞の特性解析

MIA-Paca2 細胞および MIA-BKO 細胞を培養用プレートに播種し、経日的に細胞数を数えて細胞増殖速度を測定した。また、細胞遊走能および創傷治癒能を評価するためにスクラッチアッセイを行った。2 種類の細胞をそれぞれ 24-well プレートに播種し、コンフルエントの状態になるまで培養した。コンフルエント確認後、マイクロチップの先端で培養プレート底を削り細胞間に隙間を作成した。その後、経日的に顕微鏡下で観察し細胞が隙間を埋める速度を測定した。

さらに、ゲムシタピンに対する感受性を細胞間で比較した。それぞれの細胞を 96-well plate に播種し、その 24 時間後に終濃度 1 nM ~ 1 mM 濃度のゲムシタピンを曝露した。ゲムシタピン曝露 72 時間目に WST-1 アッセイおよび MTT アッセイにより細胞増殖活性を評価した。

## 4 . 研究成果

### (1) . 各膵臓がん細胞の比較 (BMAL1 タンパク質発現量およびゲムシタピン感受性)

4 種類の膵臓がん細胞を用いた検討において、Bmal1 タンパク質発現量は大きく異なり、Panc-1 細胞における発現量が最も低かった。また、WST-1 アッセイで細胞増殖活性を評価したところ、BMAL1 発現量に依存してゲムシタピンに対する感受性が高くなる傾向を認めた。

### (2) . Bmal1 ノックダウン細胞を用いた検討

使用した 3 種類の siRNA による遺伝子発現抑制効果を比較した結果、最も Bmal1 遺伝子発現を抑制した siRNA は 806 番目の塩基を標的とするものであった。この siRNA を用いて、膵臓がん細胞の Bmal1 遺伝子をノックダウンさせ、ゲムシタピン感受性の変化を評価した。Bmal1 遺伝子ノックダウンの影響の程度は細胞間で異なるが、概して Bmal1 遺伝子発現を抑制するとゲムシタピンに対する感受性が低下する傾向であった。

一方、肝臓がん細胞である HepG2 細胞において Bmal1 遺伝子をノックダウンしたところ、ゲムシタピンに対する感受性が高くなる傾向を認めた。以上より、Bmal1 遺伝子ノックダウンの影響は、膵臓がん細胞と肝臓がん細胞で異なることが示唆された。

### (3) . Bmal1 ノックアウト細胞を用いた検討

#### . Bmal11 ノックアウト細胞作製および網羅的遺伝子解析

Western blot により、MIA-BKO 細胞では BMAL1 タンパク質が欠損していることを確認した。この MIA-BKO 細胞と対照の MIA-Paca2 細胞を用いて RNA-シーケンス解析を行った結果、発現量に細胞間で 2 倍以上の差を認めたものは 2985 遺伝子であった。そのうち、MIA-BKO 細胞において発現量が 2 倍以上であったものは 1771 遺伝子、50%未満であったものは 1214 遺伝子であった。KEGG データベースをもとにパスウェイ解析を行ったところ、MIA-BKO 細胞では細胞接着関連分子群の発現量が増加し、Hippo シグナルパスウェイや Notch シグナルパスウェイでの発現量が減少していることが示された (表 1 および 2)。

表 1 . パスウェイ解析の結果 (MIA-BKO 細胞で発現が上昇)

Term	Count	%	P-Value
Cell adhesion molecules	26	2.2	1.9E-08
Antigen processing and presentation	16	1.4	2.4E-06
Phagosome	20	1.7	0.000077
Calcium signaling pathway	20	1.7	0.017
Cytokine-cytokine receptor interaction	23	2	0.02
NOD-like receptor signaling pathway	16	1.4	0.025
Regulation of actin cytoskeleton	18	1.5	0.026
MAPK signaling pathway	22	1.9	0.034
Nitrogen metabolism	4	0.3	0.042
Focal adhesion	16	1.4	0.048

表 2 . パスウェイ解析の結果 (MIA-BKO 細胞で発現が減少)

Term	Count	%	P-Value
Hippo signaling pathway	15	1.7	0.00048
Calcium signaling pathway	19	2.2	0.00065
cAMP signaling pathway	17	2	0.0019
cGMP-PKG signaling pathway	13	1.5	0.0071
Breast cancer	12	1.4	0.0073
Notch signaling pathway	7	0.8	0.011
Basal cell carcinoma	7	0.8	0.015
Gastric cancer	10	1.2	0.049

#### . MIA-BKO 細胞の特性解析

MIA-BKO 細胞では対照の MIA-Paca2 細胞と比較して、培養中に認めるコロニー形成様細胞凝集が少なかった。また、細胞増殖速度やスクラッチアッセイによる細胞遊走能も MIA-BKO 細胞の方が小さい傾向であった。さらに、ゲムシタピンに対する感受性はいずれの細胞も良好で、細胞間に顕著な差は認めなかった。

これまでに、他の膵臓がん (BxPC-3) 細胞では、Bmal1 遺伝子をノックダウンすると細胞増殖速度が低下することが報告されている。この知見は MIA-Paca2 細胞を用いた本研究の成績と相反するものである。MIA-Paca2 細胞は通常培養条件下でもコロニー形成様細胞凝集を形成しやすいことから、幹細胞性が強い可能性がある。既報で使用された BxPC-3 細胞は膵臓がん細胞であり、通常培養条件下でコロニー形成様細胞凝集はあまり認めない。以上より、膵臓がん細胞であっても、時計遺伝子 Bmal1 の細胞悪性度に及ぼす影響は細胞によって正反対になることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tsurudome Y, Akamine T, Horiguchi M, Wada Y, Fujimura A, Ushijima K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Potential mechanism of hepatic lipid accumulation during a long-term rest phase restricted feeding in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chronobiol Int	6. 最初と最後の頁 1132-1143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/07420528.2022.2077746	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4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牛島 健太郎
2. 発表標題 研究は孤独にあらず。医学部・附属病院での研究生活で得たもの
3. 学会等名 第14回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牛島健太郎、大柿景子、大友慎也
2. 発表標題 ファーマコメトリクスの展開と臨床薬理学研究者
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴留優也、堀口道子、藤村昭夫、牛島健太郎
2. 発表標題 不適切な食事タイミングが引き起こす肝臓脂質異常症の解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牛島健太郎、鶴留優也、和田由喜世、堀口道子、藤村昭夫
2. 発表標題 不適切な食事タイミングが引き起こす肝臓内脂質蓄積に、マイクロRNA発現異常が関与する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap webページ <a href="https://researchmap.jp/ken_ushijima">https://researchmap.jp/ken_ushijima</a> 山口東京理科大学薬学部 薬剤学・製剤学分野ホームページ <a href="http://pharmaceutics.rs.socu.ac.jp/">http://pharmaceutics.rs.socu.ac.jp/</a>
---

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	鶴留 優也  (Tsurudome Yuya)		
研究協力者	堀口 道子  (Horiguchi Michiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------