

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390047

研究課題名(和文) 細胞の脱分化・アポトーシスの時計機構を基盤にした抗癌剤の創薬・育薬

研究課題名(英文) Discovery and development of antitumor drugs focused on the molecular clock of dedifferentiation and apoptosis during carcinogenesis

研究代表者

大戸 茂弘 (Ohdo Shigehiro)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：00223884

研究成果の概要(和文):

マウスより単離した肝初代培養細胞を対象に、細胞が未分化に変容する過程(脱分化)についての研究を行ない細胞の脱分化を制御する因子を見出した。その因子の発癌に及ぼす影響を、ジエチルニトロソアミン(DEN)を用いた多段階発癌モデルマウスを用いて検討した結果、その因子を制御することで発癌の頻度を低下させることを明らかにした。以上の結果は、発癌メカニズムの一端を解明する重要な所見であり、癌の予防、早期診断、治療の標的として応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文):

Circadian clock systems have been related in cell cycle and carcinogenesis. The expression of molecular clock genes is altered in cancer patients. However, the influence of an alteration of molecular clock works during carcinogenesis has not been investigated yet. In this study, the hepatocarcinogenesis by diethylnitrosoamine (DEN) in mice was inhibited by the down-regulation of cellular dedifferentiation related genes expression. These findings suggest that the control of cellular dedifferentiation related genes expression is important in carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：体内時計、がん、分化、アポトーシス、創薬

1. 研究開始当初の背景

生体機能には、地球の自転、公転と関連した昼夜や季節のような外部環境の周期的変化に伴った多くの周期的現象(リズム)が存在する。ヒトの場合、生体リズムは健康を保持・増進させる上でも重要で、その破綻が不眠や精神疾患などの慢性疾患を生じる。体内時計の本体は、視神経が交差する視交叉上核(SCN)に位置し、時計遺伝子により制御されている。

この遺伝子は中枢のみならず末梢組織でも発現しており、このような階層構造をうまく利用し、生体はホメオスタシス機構を維持している。例えば、生体内で細胞は常に外的ストレスにさらされ、DNAが障害を受けている。それに対し細胞はDNA修復機構とアポトーシスにより発癌から自己を保護する機構を備えているが、一旦これらの機構が破綻を来し、細胞が脱分化の方向に向かうと癌が発症する

ものと思われる。しかしながら、発癌の過程に体内時計の分子機構が如何に関与しているのか不明であった。疫学調査から生体リズムの変化が発癌のリスクを高めること、時計遺伝子がアポトーシス関連遺伝子や細胞周期の制御に関わっていること、癌細胞で時計遺伝子の発現が変容していることが明らかにされつつある。しかし、DNA 修復や細胞の脱分化に時計遺伝子が如何にかかわっているのか明らかではなかった。

このような状況の中で申請者は、10 年間にわたり一貫して研究主題を、「生体リズムと時計遺伝子」の研究に力を注いできた。我々は薬物による生体の恒常性の破綻機構の解明、末梢時計遺伝子の制御機構の解明、体内時計の分子機構の操作に成功した。また発癌に関わる遺伝子、癌細胞の増殖に関わる遺伝子や抗癌剤の代謝酵素およびトランスポーターに日周リズムが存在し、そのリズムを診断することにより、抗癌剤の抗腫瘍効果を増強できることを明らかにしつつある。これらの成果は、幸運にも薬学会賞、臨床薬理学会賞、日本経済新聞、NHK テレビでとりあげられるなど社会的にも高く評価されつつある。

現在、我々は、体内時計の分子機構を基盤にした時間薬物送達方法の構築および体内時計に作用する薬の探索と創薬を通して、時間生物学の実践的臨床応用への道を切り開くことを目指し、以下の研究を実施している。

(A)体内時計の分子機構を基盤にした発癌機構の解明。

(B)体内時計の分子機構を基盤にした抗癌剤の創薬・育薬。

(C)体内時計の分子機構を基盤にした新規時間薬物送達システムの開発。

この研究過程で、我々は、薬物活性リズムの体内時計の分子機構を解明し報告した。同様の実験手技を用い DNA 修復因子が時計遺伝子により制御されていること、そして時計遺伝子の変異により DNA 修復因子の機能が変容し抗癌剤の感受性が変化することを明らかにした。同様の所見は、アポトーシス因子でも見出している。しかし、癌発症を方向付ける細胞の脱分化に時計遺伝子が如何にかかわっているのか明らかではない。一般に、マウス初代肝培養細胞は、細胞の脱分化の機序を解析するための有用な培養細胞系である。肝臓より単離後から細胞は脱分化の方向に形態的機能的変化を生じるが、ジメチルスルホキシド (DMSO) を暴露することで、脱分化は抑制される。細胞が脱分化するにつれ、肝臓に多く発現する転写因子群の発現量が変化し、細胞の機能に変化をもたらす。これらの実験系を用い、我々は、脱分化の方向性を左右するいくつかの因子を明らかにし、脱分化因子がリズムを刻むことを少数例ではあるが発見した。

2. 研究の目的

本研究では、上記全体構想の(A)、(B)と関連して、体内時計の分子機構を基盤に脱分化因子のリズムの制御機構を解明し、発癌機構との関連を明らかにする。また抽出された因子を標的として新規抗癌剤の創薬を目指す。この目的を達成するために、以下の実験を実施した。

(1)マウス初代培養肝細胞の脱分化マーカー、脱分化因子および時計遺伝子の発現量に及ぼす脱分化の影響。

(2)脱分化の体内時計の分子機構の解析。

(3)脱分化の体内時計の分子機構を基盤にした創薬。

以上の実験を通して、時計遺伝子による転写制御を基盤にした細胞の脱分化リズムの制御機構とそれと関連した発癌機構が明らかとなり、新規抗癌剤の創薬につながる。

3. 研究の方法

分化肝細胞が脱分化すると、幼若期に多く存在する フェトプロテイン (AFP) が、高発現する。細胞の脱分化の程度を測定する目的とし、AFP 発現量を測定した。マウス初代培養肝細胞は脱分化の方向に向かうため細胞調整後、経時的に細胞を回収した。細胞から total RNA を抽出し、AFP の mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法で測定し評価した。

初代培養肝細胞にジメチルスルホキシド (DMSO) を暴露すると、脱分化が抑制され分化した状態を保持できる。そこで、初代培養肝細胞を対象に DMSO 暴露群および未暴露群を設定し、脱分化の過程で、脱分化マーカー、脱分化因子および各種時計遺伝子が如何に変容しているかを検討し、それらの相互関連を明らかにした。初代培養肝細胞を対象に DMSO 暴露群および未暴露群の細胞を経時的に回収した。細胞より Trizol reagent で total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作製後、リアルタイム PCR を利用した RT Profiler PCR array system を用い、各遺伝子の発現量を網羅的に定量し解析した。これらの実験から、脱分化因子における重要な役割を担う遺伝子を抽出した。また、mRNA 発現量に変化が認められた脱分化因子について、タンパク発現量をウエスタンブロットング法により測定した。さらに同様の指標を用い、Clock 変異マウスと Wild type マウスで比較検討した。

細胞内の様々な遺伝子は、時計遺伝子の転写翻訳のリズムによりリズムカルに発現調節されている。そこで、正常なマウス肝臓において、上記より明らかにした脱分化因子の発現量に日周リズムが存在するか否かを確認した。自由摂食摂水・明暗周期 (明期 : 07:00 - 19:00) 条件下で飼育したマウスを対象に、

09:00、13:00、17:00、21:00、01:00、05:00 の 6 時点に肝細胞を採取した。採取した肝臓より total RNA を抽出し、脱分化因子および時計遺伝子の mRNA 発現リズムを real-time RT-PCR 法で、タンパク発現リズムをウエスタンブロット法で測定した。さらに同様の指標を用い、Clock 変異マウスと Wild type マウスで比較検討した。

上記で抽出された脱分化因子が、各種時計遺伝子により如何に制御されているかを Luciferase reporter assay により検討した。マウス DNA を鋳型とし脱分化因子プロモーター領域をクローニングし、非翻訳領域 (約 1.3kbp) を pGL3 Basic Vector に導入し、コントロールベクター (pRL TK Vector) と共にマウス初代培養肝細胞にトランスフェクションした。各種時計遺伝子の全長鎖 cDNA はそれぞれ pcDNA3.1Vector にサブクローニングし、上記と同様の方法でトランスフェクションした。48 時間培養後 Luciferase 活性を測定し、脱分化因子の発現調節機構について検討した。これらの実験より抽出された時計遺伝子 (転写因子) の応答配列を基準にプロモーター領域の deletion を行い、重要な役割を担う転写領域を同定した。その領域に含まれる時計遺伝子結合配列を mutation し、各種遺伝子の転写制御に関する責任配列を同定した。

上記の実験で得られた責任配列を対象に、クロマチン免疫沈降法とアレイ技術を融合させた Chip-on-chip アレイ法を用い、脱分化因子と各種時計遺伝子間の転写相互関係を網羅的に明らかにした。初代培養肝細胞を対象に、ホルムアルデヒドにより細胞を固定し、ソニケーションによりクロマチンを断片化した。各種時計遺伝子、AcH3 (ヒストンアセチル化) および RPB (Pol II) の抗体を添加し免疫沈降後 DNA を精製し Cy3 で標識し、また免疫沈降前の DNA を Cy5 により標識した。標識した DNA を DNA チップとハイブリダイゼーションし解析した。

初代培養肝細胞を対象に 50% horse serum を添加することにより時計遺伝子など周期的変動遺伝子のリズムを形成させた。すなわち生体で認められるリズムを in vitro で再現する実験系を構築した。上記実験で抽出された脱分化因子および時計遺伝子の mRNA のリズムを RT-PCR 法で測定した。siRNA による RNA 干渉法により各種時計遺伝子を knock down させた場合、脱分化因子のリズムが如何に変容するかを明らかにし、時計遺伝子との相互関係を明らかにした。以上の実験をとおして脱分化因子の転写制御に関する時計遺伝子の役割を明らかにした。

上記の実験より明らかにした脱分化因子および、その発現調節時計遺伝子の発現ベクターおよび siRNA が、脱分化因子および時計遺伝子に対する siRNA および発現ベクターを作

製し、癌細胞にトランスフェクションした。その後、経時的に細胞を回収し生細胞数を測定した。回収した細胞より total RNA を抽出し、脱分化マーカーである AFP 発現量を real-time RT-PCR 法で測定し評価した。

上記の実験より明らかにした脱分化因子および時計遺伝子の発現ベクターおよび siRNA が、DEN 誘発肝癌マウスにおける抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した。DEN 誘発肝癌マウスを対象に、上記の実験より明らかにした時計遺伝子の発現ベクターや siRNA を、尾静脈より投与後、腫瘍の増殖に及ぼす時計遺伝子の影響を検討した。また、腫瘍を採取し、アポトーシスおよび脱分化の程度を各マーカーの発現量を測定し検討した。

4. 研究成果

本研究は、体内時計の分子機構を基盤に脱分化因子リズムの制御機構を解明し、発癌機構との関連を明らかにすることを目的とした。まず、マウス初代培養肝細胞の脱分化マーカー、脱分化因子および時計遺伝子の発現量に及ぼす脱分化の影響について検討した。マウス初代培養肝細胞の脱分化マーカーとして、フェトプロテイン (AFP) 発現量を測定した。マウス初代培養肝細胞に脱分化誘導剤であるメチルスルホキシド (DMSO) を添加後、経時的に AFP を測定したところ、DMSO 暴露群で、未暴露群と比較して有意に高値を示した。また、脱分化の過程で、脱分化因子および各種時計遺伝子が如何に変容しているかを検討したところ、いくつかの遺伝子が脱分化の状態と関連して変化することが明らかとなった。次に、マウス肝臓における脱分化因子および時計遺伝子の発現リズムを解析する目的で、正常なマウス肝臓において、上記で抽出された脱分化因子の発現量に日周リズムが存在するか否かを in vivo で検討した。その結果、脱分化因子の mRNA に、有意な日周リズムが存在することが明らかとなった。さらに時計遺伝子の mRNA およびタンパクの日周リズムを測定したところ、両者の相互関連が示唆された。また、対象遺伝子の転写制御領域に着目し、データベースより時計関連遺伝子の結合配列の存在を明らかにした。これを検証する目的で、in vitro の系で、対象遺伝子の転写制御領域の遺伝子配列を、deletion および mutation することで、時計関連遺伝子が転写に参与していることを明らかにした。高濃度の血清処理後、in vivo の日周リズムを in vitro で再現する系を構築し、抽出された転写促進遺伝子および転写抑制遺伝子を siRNA による RNA 干渉法で knock down させ、時計遺伝子がそれらの転写制御に参与していることを検証した。その後、再び in vivo の系で、クロマチン免疫沈降法を用い、in vitro で抽出された転写制御因子が、転写に参与してい

ることを明らかにした。

次に、肝初代培養細胞を用い、発癌過程における時計関連遺伝子の役割について検討した。自由摂食摂水、明暗周期（明期；7:00-19:00）条件下で飼育した野生型マウス（Wild type）および *Clock* 遺伝子変異マウス（*Cik/Cik*）から肝細胞を採取した。細胞採取4時間後に発癌物質ジエチルニトロソアミン（DEN）を含む培地に交換し24時間培養後、アポトーシス（TUNEL染色、Caspase-3/7活性）を測定した。DEN代謝活性化酵素、DNA修復関連因子、アポトーシス関連因子および脱分化関連因子のmRNA発現量をRT-PCR法で測定した。また、細胞採取4時間後にDENを含む培地に交換し24時間培養後、生細胞数を測定した。DEN曝露24時間後のTUNEL染色細胞数およびCaspase-3/7活性は、Wild typeマウスと比較しDEN曝露群において高値を示した。一方、*Cik/Cik*マウスでは、コントロール群およびDEN曝露群間に有意な差異は認められなかった。また、細胞採取4時間後のDEN代謝酵素およびアポトーシス促進因子のmRNA発現量は、Wild typeマウスと比較して*Cik/Cik*マウスで有意に低下していた。DEN曝露24時間後の生細胞数は、Wild typeマウスと比較しDEN曝露群において濃度依存的に減少した。しかし、*Cik/Cik*マウスでは、コントロール群およびDEN曝露群間に有意な差異は認められなかった。以上より、Wild typeマウスと比較し、*Cik/Cik*マウスの初代培養肝細胞では、DENの代謝活性化能およびアポトーシス関連因子の発現の低下により、DENによる細胞毒性に対する感受性が低下していることが示された。

次に、体内時計の分子機構を基盤に脱分化関連因子の発現リズムの制御機構を解明し、発癌機構との関連を明らかにすることを目的として検討した。まず脱分化関連因子の体内時計の分子機構を詳細に検討し、発癌過程における脱分化関連因子の役割を明らかにした。次に、その分子を標的とした創薬の可能性について検討した。これまでに得られた脱分化の体内時計の分子機構を詳細に解析する目的で、マウス肝臓における脱分化関連因子および時計関連遺伝子の発現リズムを解析し、正常なマウス肝臓において、脱分化関連因子の発現量に日周リズムが存在することを明らかにした。その機序として分子時計をはじめ種々の転写因子が関与していることを明らかにした。すなわち、リズムの成因を、*in vivo*において検証するため、マウスを対象に肝臓を採取し、クロマチン免疫沈降法などを用い脱分化関連因子のプロモーター領域における時計関連遺伝子タンパクの結合量の変化を明らかにした。一方、発癌の過程で、脱分化関連因子の発現量の日周リズムおよび分子時計の制御機構が変容する

ことを明らかにした。すなわち、発癌物質DEN誘発肝癌動物モデルを作成した。モデルマウスを対象に肝臓を採取し、上記と同様の手法を用い、発癌過程においてプロモーター領域における時計関連遺伝子タンパクの結合量の時間的変化を測定し、*intact*マウスと比較し変容が確認された。さらに、これまでの実験より明らかにした脱分化関連因子、その発現調節時計関連遺伝子の発現ベクターおよびsiRNA、あるいはそれらに作用する化学物質を用い、DEN誘発肝癌動物モデルを対象に癌細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。脱分化関連因子に対するsiRNAおよび脱分化関連因子に作用する化学物質は、発癌を有意に抑制することを明らかにした。また創薬シーズとなるアポトーシス関連因子を見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]（計9件）

（原著論文）

Kim J, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Clock gene mutation modulates the cellular sensitivity to genotoxic stress through altering the expression of N-methylpurine DNA glycosylase gene. *Biochem Pharmacol* 78(8),1075-1082, 2009.

Fujioka T, Matsunaga N, Okazaki H, Koyanagi S, Ohdo S. Hypoxia-response plasmid vector producing bcl-2 shRNA enhances the apoptotic cell death of mouse rectum carcinoma. *J Pharmacol Sci* 113(4), 353-361, 2010.

Horiguchi M, Kim J, Matsunaga N, Kaji H, Egawa T, Makino K, Koyanagi S, Ohdo S. Glucocorticoid-dependent expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene modulates dacarbazine-induced hepatotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 333(3), 782-787, 2010.

Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Res* 70(15), 6238-6246, 2010.

Matsunaga N, Kohno Y, Kakimoto K, Hayashi A, Koyanagi S, Ohdo S. Influence of CLOCK on cytotoxicity induced by diethylnitrosamine in mouse primary hepatocytes. *Toxicology* 280(3),144 -151, 2011.

Horiguchi M, Koyanagi S, Okamoto A, Suzuki SO, Matsunaga N, Ohdo S. Stress-regulated transcription factor ATF4 promotes neoplastic transformation by suppressing expression of the INK4a/ARF

cell senescence factors. Cancer Res 72(2), 395-401, 2012.

(総説)

Ohdo S. Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. Adv Drug Deliv Rev 62(9-10), 859-875, 2010.

Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N. Chronopharmacological strategies: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. Adv Drug Deliv Rev 62(9-10), 885-897, 2010.

Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N, Hamdan A. Molecular basis of chronopharmaceutics. J Pharm Sci 100(9), 3560-3576, 2011.

[学会発表] (計 12 件)

大戸茂弘. 薬物・栄養投与の時間治療学的戦略 ~ 体内時計の分子機構を基盤として ~. 特別講演. 日本薬学会主催 第 10 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム (東京) 2009 年 6 月 19-20 日.

Ohdo S, Matsunaga N, Koyanagi S. Molecular clock mechanisms of drug metabolism. Symposium "Functional genomics" 16th International Conference on Cytochrome P450. Japan(Okinawa), 2009 年 6 月 21-25 日.

大戸茂弘、松永直哉、小柳悟. 抗がん剤の時間薬理. シンポジウム 4「PK/PD 解析から見た抗がん剤の効果・副作用」(オーガナイザー: 鈴木 洋史、桂 敏也). 医療薬学フォーラム 2009 第 17 回クリニカルファーマシーシンポジウム (京都) 2009 年 7 月 11-12 日.

大戸茂弘. 時間治療による薬物治療の最適化. 特別講演. 第 24 回長崎 DDS 研究会 (長崎) 2009 年 12 月 18 日.

大戸茂弘. 分子時計を基盤にした創薬・育薬. 第 5 回 DDS 熊本シンポジウム (熊本) 2010 年 2 月 15 日.

大戸茂弘、小柳悟、松永直哉. 時間薬理学とは. シンポジウム「時間薬理学と時間栄養学による新しい治療戦略の開拓」(オーガナイザー: 柴田重信、大戸茂弘). 第 83 回 日本薬理学会年会 (大阪) 2010 年 3 月 16-18 日.

大戸茂弘、小柳悟、松永直哉. 癌の時間治療と今後の展望. シンポジウム「体内時計を利用した創薬から治療戦略まで」(オーガナイザー: 柴田重信、守屋孝洋). 日本薬学会第 130 年会 (岡山) 2010 年 3 月 28 - 30 日.

大戸茂弘、小柳悟、松永直哉. 創薬・育薬を指向した時間薬理学的研究. 第 47 回薬理学懇談会研究討論会「新技術・新素材が切り拓く薬剤開発」岐阜県飛騨高山(高山グリーンホテル、天領閣) 2010 年 6 月 24 日.

小柳悟、松永直哉、大戸茂弘. 体内時計の分子機構を基盤にした薬物投与設計. シン

ポジウム 1 「薬物療法を支える基礎研究と臨床研究の糸口、進め方と成果の活用」(オーガナイザー: 冨田一郎、大戸茂弘). 医療薬学フォーラム 2010 第 18 回クリニカルファーマシーシンポジウム (広島) 2010 年 7 月 10-11 日.

大戸茂弘. 創薬・育薬を指向した時間薬理学的研究. 特別講演 第 28 回製剤設計研究会 (東京薬科大学) 2010 年 10 月 23 日.

大戸茂弘、小柳悟、松永直哉. 時間薬理による副作用低減. シンポジウム「副作用低減のための新しい薬理学的アプローチ」(オーガナイザー: 植田真一郎、大石了三). 第 84 回日本薬理学会年会 (横浜) 2011 年 3 月 22-24 日.

大戸茂弘、小柳悟、松永直哉. 分子時計を基盤にした時間治療. シンポジウム「生命現象を担う生体分子に着目した創薬と臨床応用」(オーガナイザー: 荒牧弘範、前仲勝実). 日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月 28 - 31 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大戸茂弘 (Shigehiro Ohdo)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 00223884

(2) 研究分担者

小柳悟 (Satoru Koyanagi)
九州大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号: 60330932
松永直哉 (Naoya Matsunaga)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 10432915