

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06640

研究課題名（和文）低酸素誘導因子HIFに着目した抗がん剤暴露による日周リズム変動機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of circadian rhythm variations induced by anticancer drug exposure: Insights into hypoxia Inducible Factor (HIF)

研究代表者

岡崎 史泰 (Fumiyasu, Okazaki)

第一薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20610348

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）：時間薬物療法は、生体の日周リズムを考慮し薬の投薬時刻を設定することで治療効果を増大・副作用を軽減することを目的とした薬物療法である。しかし、投薬により日周リズムが変化し、時間薬物療法の有効性が低下することが指摘されている。本研究では、xCT阻害剤スルファサラジンを用い、低酸素誘導因子HIFに着目し日周リズム変動機構を解明を目的とした。本研究により、xCT阻害作用により日周リズムが誘導されることを確認した。また、日周リズムが維持される投与時刻、日周リズムが消失する投与時刻があることを明らかにした。以上より、反復投与を行う臨床への時間薬物療法の応用及び新たな治療戦略への発展につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、薬の投薬によって生体の日周リズムが変動することが確認されている。薬物療法は、一般的に単回投薬ではなく複数回投薬であるため、日周リズムの変動は時間薬物療法の有効性が消失することにつながる。低酸素誘導因子HIFは、日周リズムを制御する時計遺伝子と相互に影響する関係がある。また、抗がん剤は、酸化ストレスを増大させることから、酸化ストレスに関連するHIFにも影響することが知られている。本研究では、HIFに着目し酸化ストレスを増大させ抗腫瘍効果を示すxCT阻害剤を用いた日周リズム変動機構を解明した。以上より、日周リズム変動機構の解明と時間薬物療法の臨床への応用と治療戦略への発展が期待される。

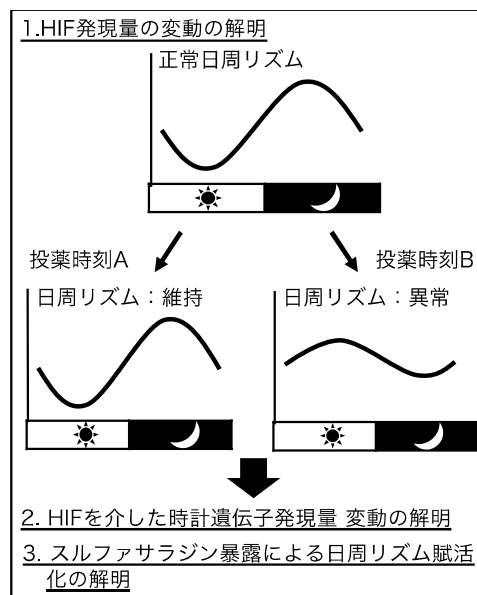
研究成果の概要（英文）：Chronotherapy can maximize the efficacy or minimize the side effects of therapies via the administration of selected drugs at specific time points depending on the circadian rhythms of the patients. However, drug administration can alter circadian rhythms, leading to reduced effectiveness of chronotherapy. This study focuses on elucidating the mechanism of circadian rhythm variation targeting the hypoxia-inducible factor HIF, using the xCT inhibitor sulfasalazine. We confirmed that xCT inhibition induces circadian rhythm changes. Moreover, we identified specific administration times where circadian rhythm is maintained or disrupted. These findings are expected to contribute to the clinical application of chronotherapy for repeated administration and the development of novel treatment strategies.

研究分野：時間薬理

キーワード：時間薬理

### 1. 研究開始当初の背景

新薬の開発期間を必要とせず、臨床に応用しやすい薬物療法として、投薬時刻を設定することで既存の薬のポテンシャルを引き出す時間薬物療法が発達してきている。日周リズムは、時計遺伝子によって制御されており、がん細胞もこの影響を受ける。がん細胞は活発に細胞分裂を繰り返し無秩序に増殖するが、時計遺伝子の存在により抗がん剤に対する感受性(薬力学)や血中濃度(薬物動態)に日周リズムを与えている。現在までに、薬力学や薬物動態に関わる遺伝子が時計遺伝子によって制御されており、抗がん剤の時間薬物療法が実験動物のみならず臨床試験においても有効であることが明らかになっている。しかし、抗がん剤により細胞周期や代謝酵素の日周リズムが変動し、時間薬物療法の有効性が減少することが指摘されている。



抗がん剤の投薬によって細胞周期および代謝酵素発現量の日周リズムが変動することが確認されている。がん化学療法は、一般的に単回投薬ではなく複数回投薬であるため、日周リズムの変動は時間薬物療法の有効性を減少させることにつながる。そのため、抗がん剤による日周リズムの変動およびその制御メカニズムの解明は、時間薬物療法を臨床に応用する上で重要なテーマであるが、未だ十分に明らかになっていない。今回着目する低酸素誘導因子 (HIF: hypoxia inducible factor) が時計遺伝子発現量に影響を与えていることは培養細胞で確認されているが、薬剤暴露後の HIF と時計遺伝子発現量の関係や生体内の日周リズムに関する研究は行われていない。

本試験の予備検討として、シスチントランスポーター-xCT をロックダウンさせた細胞では、時計遺伝子の 1 つ Cry (cryptochrome circadian regulator) 及び Per (period circadian regulator) 発現量が変動することを確認している。スルファサラジンは、xCT を阻害することで、がん幹細胞に対しても効果をもち新規抗がん剤として期待されている。申請者は、がん細胞の xCT 発現量に日周リズムがあることに着目し、スルファサラジンの抗腫瘍効果に対し時間薬物療法が有用であるだけでなく、グルタチオン代謝 (GSH 濃度、GSH/GSSG ratio) に対しても投薬時刻による差異を確認している (Okazaki F *et al.*, Cancer Res. 2017)。これらの結果から、スルファサラジンは、酸化還元ストレスを介し日周リズムを変動させ、抗腫瘍効果と同様に投薬時刻によって日周リズムに与える影響が異なる(日周リズムが維持または変動する)と考えられる。

今回着目する低酸素誘導因子 HIF は、酸化ストレス増大時に発現量が変動すること、更に時計遺伝子との関連が確認されている。本研究により、抗がん剤投与による日周リズムの変動メカニズムが解明されれば、複数回投薬する抗がん剤の時間薬物療法を実臨床へより近づけることができると考えられる。また、スルファサラジンを日周リズムの賦活化剤として着目し、抗腫瘍効果だけでなく日周リズムを維持し時間薬物療法を継続するための新たな治療戦略としての発展が提案できる。

### 2. 研究の目的

時間薬物療法は、生体の日周リズムを考慮し投薬時刻を設定することで効果を増大・副作用を軽減させることが可能である。これと同様に、日周リズムが維持・変動する投薬時刻が存在する可能性が考えられる。研究代表者は、がん幹細胞に対しても効果をもつ新規抗がん剤として期待されているスルファサラジンに時間薬物療法を応用することで抗腫瘍効果を増大させることを確認している。本研究では、低酸素誘導因子 HIF の発現量がこの効果増大のカギとなる可能性に着目し、スルファサラジン暴露による日周リズムの変動メカニズム及び日周リズムが賦活化するか解明する。

### 3. 研究の方法

方法 1. スルファサラジンの投薬後の HIF 発現量の変動を解明する

マウス結腸がん細胞 Colon 26 を移植した腫瘍移植マウスを作製し(明期 7:00-19:00)、スルファサラジンを各 6 時点 (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00) に投薬する。投薬後 4 時間おきに各 6 時点 (9:00 投薬群の場合: 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00, 9:00) に腫瘍

を採取する。採取後、western blot 法を用いて HIF 発現量を測定する。なお、未投薬の腫瘍移植マウスから各 6 時点に採取した腫瘍を正常日リズム群(コントロール群)とする。

#### 方法 2. HIF を介した時計遺伝子発現量の変動を解明する

##### 2-1. xCT ノックダウン時の HIF 発現量の変動を解明する

スルファサラジンの作用点および酸化ストレスに関与する xCT ノックダウン後、核内タンパク質を抽出し、細胞質中および核内中の HIF 発現量を western blot 法を用いて明らかにする。(予備検討は全タンパク質中の発現量)

##### 2-2. スルファサラジン暴露による HIF 発現量の変動を解明する

培養細胞にスルファサラジンを暴露させ HIF 発現量を western blot 法で用いて明らかにする。

##### 2-3. HIF による時計遺伝子発現量の変動を解明する

本研究で使用する Colon 26 細胞での HIF による時計遺伝子発現量の影響を検討する。HIF をノックダウンまたは塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) を培養細胞に暴露させ、時計遺伝子 mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて測定する。

#### 方法 3. スルファサラジン暴露によって日リズムが賦活化するか解明する

当研究室では、人工時計遺伝子応答配列を有するルシフェラーゼレポーターベクターの安定発現株を所有している。この安定発現株にスルファサラジンを暴露させ発光強度を継続的に測定する。

### 4. 研究成果

1) 低酸素誘導因子 HIF-1 には HIF-1 $\alpha$ と HIF-1 $\beta$ のサブタイプが存在しており、腫瘍組織中の HIF-1 $\alpha$ 、-1 $\beta$ 発現量共に日リズムが存在していることを確認した。今回着目するスルファサラジン投薬による日リズムの変動について、17:00 投薬群では日リズムが維持されたが、5:00 投薬群では、日リズムが消失していることが明らかになった。この変化に対して、HIF-1 $\alpha$ によって制御される遺伝子について、リアルタイム PCR を行ったところ HIF-1 $\alpha$ 発現量の日リズムと対応があることを確認した。

2) シスチントランスポーターxCT を阻害あるいは発現量を低下させた状態では、HIF-1 $\alpha$ と HIF-1 $\beta$ 発現量は細胞質及び核内共に増大することを確認した。Small interfering RNA を用い HIF-1 $\alpha$ あるいは HIF-1 $\beta$ のノックダウンを試みたが、タンパク質レベルで HIF-1 $\alpha$ と HIF-1 $\beta$ 発現量は低下しなかったため(なお、RT-qPCR を用い mRNA レベルでの HIF-1 $\alpha$ と HIF-1 $\beta$ の発現量低下は確認した) 低酸素状態を誘導する塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) を用いた実験を行った。CoCl<sub>2</sub> を暴露により HIF-1 $\alpha$ と HIF-1 $\beta$ の発現量が誘導されいることを確認し、時計遺伝子の Cry (cryptochrome circadian regulator) 及び Per (period circadian regulator) 発現量が増加した。この結果は、予備検討の xCT ノックダウンさせた場合と同様の結果であり、xCT ノックダウン時は HIF-1 $\alpha$ と HIF-1 $\beta$ 発現量が増大していたことから、これらの結果に対応があることが確認された。また、これらの結果は研究成果1の投薬時刻の違いによる HIF の日リズムの変動と対応があることが確認された。

3) 培養細胞にデキサメタゾン(合成ステロイド)を暴露あるいは無血清培地に一定時間培養した後高濃度血清培地に暴露させると生体と同様に培養細胞でも日リズムが形成される。前述の処置後にある抗がん剤を添加させると日リズムが消失することを確認した。この抗がん剤添加後にスルファサラジンを暴露させることで、日リズムが賦活化することを Bioluminescence assay を用いて確認した。この結果から、日リズムを消失させる薬剤の投薬あるいは日リズムを消失させる時間帯に薬剤を投薬せざるを得ない状況でも、適切な時間帯に xCT 阻害剤を投薬することで、日リズムを賦活化させることが可能となることが明らかになった。

以上のことから、xCT 阻害により低酸素誘導因子 HIF 発現量が増大し、さらに日リズムが維持または変動する投薬時刻があることが確認された。現在、論文投稿の準備を進めているとともに、本研究のさらなる発展のために、他臓器でも同様の現象が確認できるか追加で研究をおこなう予定である。これにより、時間薬物療法の適用範囲が広がり、より効率的な治療煎薬の構築が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡崎史泰、末村 誠也、瀬戸 祥弘、藤岡 孝志、友成 真理、高村 雄策、田畠 健治、小松 生明、辻 泰弘、藤 秀人
2. 発表標題 Chronomodulated chemotherapy using an xCT inhibitor controls circadian rhythm by NADPH
3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------