

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890002

研究課題名（和文）低酸素領域への効果的時間治療を目的とした
腫瘍内細胞時計振動分布の解明研究課題名（英文）Analysis of clock oscillation in cancer tissue
for effective chronotherapy to hypoxic area.

研究代表者

増淵 悟 (MASUBUCHI SATORU)

北海道大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：80362771

研究成果の概要（和文）：大腸癌細胞株にリズムモニターのために DBPpromoter-luciferase 遺伝子コンストラクトを導入した細胞株において、この細胞株の発振する概日リズムは、ヒートショック(43°C1h)によってシフトしないことを見出した。さらにこの細胞を基にして癌組織内酸素勾配および概日リズムを同時にモニターするために細胞株を樹立した。これは大腸癌細胞株にまずリズムモニターのために DBPpromoter-luciferase 遺伝子コンストラクトを、次に低酸素をモニターするための hypoxia responsive element(HRE)-GFP 遺伝子コンストラクトを導入した単クローン由来のステーブルセルラインである。また、DBPpromoter-luciferase と HRE-GFP を一度にひとつの細胞に導入するための遺伝子コンストラクトをデザイン、作製した。癌組織低酸素を模した 3 次元培養を作製、観察するために低接着培養皿上での培養技術を樹立した。

研究成果の概要（英文）：To monitor cancer circadian rhythm, DBPpromoter-luciferase (DBP-luc) stably introduced colon cancer cell line was established. We found heat shock (43°C 1h) did not affect rhythm phase of DBP-luc cell. Additionally, hypoxia responsive element (HRE)-GFP was introduced to DBP-luc cell to monitor hypoxia and circadian rhythm simultaneously. To make DBP-luc / HRE-GFP stably introduced cell line by single transfection, we designed and made new gene constructs. We established the 3D in vitro DBP-luc cell culture system which mimics hypoxia of cancer tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：概日リズム、癌、低酸素

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。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 のような細胞代謝が制御する HDAC、さらには Id2 (Masubuchi et. al. *Curr Biol.* 19, R298-R300, (2009)), PHLPP1 (Masubuchi et. al. *PNAS.* 107, 1642-1647, (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)だけでなく全身の細胞に存在し、強力な時計遺伝子発現の概日振動がみられる。正常組織だけでなく癌細胞にも時計遺伝子発現のリズムがあることが知られているが、これが細胞周期、代謝のリズム、さらには抗がん剤、放射線療法に対する感受性の日内変動をもたらしていると考えられる。近年、固形癌組織が必ずしも均一な細胞によって構築されているわけではないということが明らかになってきた。腫瘍組織内には血管からの距離により組織酸素濃度の勾配が存在するが、このうちの腫瘍組織内の低酸素部位は抗がん剤、放射線療法に対する抵抗性を示しその後の転移、再発の原因となるためその克服が治療上の課題となっている (*Adv Drug Deliv Rev.* 61:623-32. (2009))。そのため適切な時間に治療を行う「時間治療」を考える上でもこれまでのような腫瘍全体のリズムを知ることに加えて、この癌組織のヘテロな細胞構築全体、特に治療抵抗性の低酸素細胞群のリズムを知ることが重要となる。近年、レポーター遺伝子を導入することで時計遺伝子発現のリアルタイムモニタリングが可能となり、時計発振の分子メカニズムだけでなく生物時計の生理機能を細胞レベルで解明するための強力なツールとなっている (Inagaki et. al. *PNAS.* 104:7664-9. (2007))。

2. 研究の目的

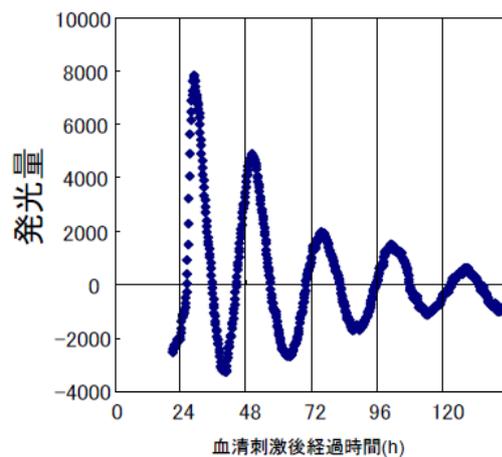
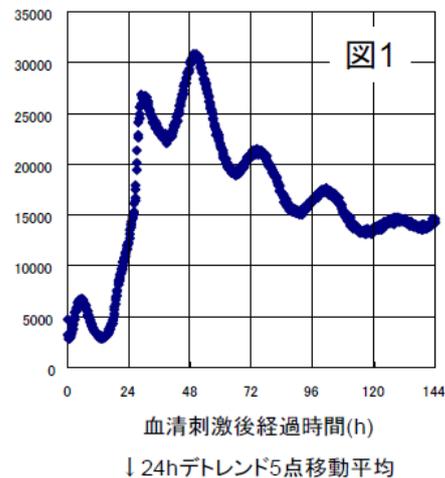
一群の時計遺伝子産物からなる生物時計振動は中枢時計である視床下部視交叉上核だけでなく、全身の臓器さらにはそこから生じる悪性新生物(癌)においても存在する。近年、固形癌の組織は均一ではなくヘテロな細胞構築になっていることが明らかになってきた。特に組織内低酸素部位は治療抵抗性、転移再発の原因と考えられている。そのため癌の時間治療を考える上でもこの領域のリズムを知ることが重要である。本研究においては遺伝子発現のリアルタイムイメージング技術を用いて細胞レベルでの癌の時計振動を明らかにする。それにより癌組織のヘテロな時間構築が明らかとなる。さらにこの知見、技術をもとに、組織低酸素が時計振動に及ぼす影響の分子機構、人工的な癌時計のコントロール、ホストの時計による癌時計の制御機構が明らかとなる。

3. 研究の方法

癌細胞時計振動をモニターするために、分子時計のマーカである DBP 遺伝子のプロモーターにホタルルシフェラーゼをつないだコンストラクトを構築したベクター (Nucleic Acids Res. 2008 Mar;36(4):e23.) 上にさらにネオマイシン耐性遺伝子をつなぎヒト大腸癌細胞株(HCT116)に導入、G418 でセレクションレステーブルセルラインを作製した (HCT116:DBP-luc)。35mmdish で 100% まで増殖した HCT116:DBP-luc をさらに 6 日間培養し、血清刺激 (50%ウマ血清培地、1 時間) を行いルシフェリン入りの培地に交換しリズム測定を行った。5%CO₂ 条件での発光リズムの連続測定は Kronos Dio (ATTO) で行った。

4. 研究成果

単クローン由来の HCT116:DBP-luc 細胞株は血清刺激によって 4 サイクル以上持続する発光リズムを示した (図 1)。



HCT116:DBP-luc 細胞株において、発光リズムの様々な位相(血清刺激 38-56h 後)でヒートショック(43°C 1h)を与え、その後のリズム

位相を評価した。その結果、リズムこの細胞株の発振する概日リズムは、この条件のヒートショックには位相シフトしないことを見出した。

癌組織内酸素勾配および概日リズムを同時にモニターする目的で HCT116:DBP-luc に hypoxia responsive element(HRE)-GFP-Puromycin 耐性遺伝子コンストラクトを導入した単一クローン由来のステーブルセルラインを作成した。

また、DBPpromoter-luciferase と HRE-GFP を一度にひとつの細胞に導入するための遺伝子コンストラクトをデザイン、作製した。

癌組織低酸素を模した 3 次元培養を作製、観察するために低接着培養皿(poly-HEMA コート)上での培養技術を樹立した。100um 以上のスフェロイドを作成することに成功した。

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 3 件)

- ① Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-Mahan K, McManus M, Crimi M, Waymire K, Lin CS, Masubuchi S, Friend N, Koike M, Chalkia D, MacGregor G, Sassone-Corsi P, Wallace DC.
Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition.
Cell、査読有、2012;151:333-43.

- ② 増渕悟
哺乳類の行動リズムと時計遺伝子.
時間生物学、査読有、2012;18:15-21

- ③ 増渕悟, 鈴木陽子, 本間さと
中枢体内時計と末梢体内時計のクロストーク.
日本臨牀、査読なし、2012 ; 70 :
1127-32

[学会発表] (計 9 件)

- ① 増渕悟
概日リズムの制御機構
弘前大学大学院セミナー
弘前大学大学院医学研究科
2013. 1. 9

- ② Satoru Masubuchi
Monitoring of circadian gene expression in human colon cancer cell line, HCT116 :
"The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care" Sapporo, 2012.10

- ③ 増渕悟、本間さと、本間研一
ヒト大腸癌細胞株 HCT116 の概日遺伝子発現モニタリング
第 19 回時間生物学会 北海道大学学術交流会館 札幌 2012 9 月

- ④ 増渕悟
低酸素と生物時計
第 56 回未来医療イノベーションセミナー
北海道大学大学院医学研究科
2012. 4. 11

- ⑤ 増渕悟、本間さと、本間研一
Monitoring of circadian gene expression in human colon cancer cell line, HCT116
89 回日本生理学会 長野県松本文化会館、松本市総合体育館、信州大学松本キャンパス 松本 2012 3 月

- ⑥ 増渕悟
時計遺伝子と行動リズム
第 18 回 病理生命科学セミナー
弘前大学大学院医学研究科
2011.11.11

- ⑦ Satoru Masubuchi
Protein phosphatase PHLPP1 controls the light-induced resetting of the circadian clock. :
International Symposium on Photonic Bioimaging and Satellite Symposium of Worldsleap 2011 on Human Circadian Clock - the 50th anniversary of temporal isolation study- 京王プラザホテル札幌 Sapporo, 2011.10

- ⑧ Satoru Masubuchi
Phosphatase in suprachiasmatic nucleus, PHLPP1/SCOP, controls period change after light-induced phase shift, 'After-Effect of Phase-Shift' :
Symposium 1. Molecular and Network Properties of the Suprachiasmatic Nucleus. THIRD WORLD CONGRESS OF CHRONOBIOLOGY, Cultural Centre BUAP, Puebla, México.

2011. 5

- ⑦ 増渕悟
やわらかい時計
第 98 回ニューロサイエンス談話会
北海道大学大学院医学研究科
2011. 1. 18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増渕 悟 (MASUBUCHI SATORU)

研究者番号 : 80362771