

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590196

研究課題名(和文)慢性肝炎時の組織間コミュニケーションリズム変容機構の解明と新規時間制癌剤の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the communication rhythm alteration mechanism between organizations at the time of the chronic hepatitis and development of the new anticancer medicine

研究代表者

松永 直哉(門田直哉)(Naoya, Matsunaga)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10432915

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文):慢性肝炎時の組織間コミュニケーションリズム変容機構の解明と新規時間制癌剤の開発を目的とし、研究を遂行した。本研究結果をもとに、新規の抗炎症薬を創製し、特許を出願した(特願2015-014829)。将来的に、慢性肝炎の治療薬として世の中にできる可能性がある。今後、薬物動態や薬効を見極めるなどさらに研究を進め本薬剤を臨床で使用可能にしたい。

研究成果の概要(英文):I accomplished a study for the development of the anticancer medicine in elucidation and new time for communication rhythm transformation mechanism between organizations at the time of the chronic hepatitis. Based on these findings, I found a new anti-inflammatory agent and applied for a patent. I may appear in the world as a therapeutic drug of the chronic hepatitis in the future.

研究分野：医療薬学

キーワード：慢性肝炎 肝癌 体内時計

1. 研究開始当初の背景

肝癌は、慢性肝炎・肝硬変といった慢性的な炎症による肝疾患を背景に発症し、その多くの原因として、感染症などによるウイルス発癌があげられる。ウイルス発癌過程において重要な経路は、組織の炎症（免疫）経路と細胞の増殖アポトーシス反応、細胞運動に影響する経路にあると考えられている (Williams et al., *Hepatology*, 2006)。しかしながら、その機序については未だ不明な点が多い。また、慢性炎症は癌や生活習慣病などの様々な疾患に共通する病態として着目されている。慢性炎症は、急性炎症と違い長期間にわたるストレスが影響し、炎症組織の細胞間に種々の相互作用が生じる。健全な生体の各組織は、恒常性を保つようにコミュニケーションし生命活動を支えている。しかし慢性炎症による慢性的なストレスは、炎症組織のリモデリングを促すのみならず、やがて炎症組織以外の他の組織へ影響し、機能不全や癌の転移促進をもたらす。近年、慢性炎症研究により、様々な因子（サイトカイン、ケモカイン、転写因子など）が、慢性炎症の進展に重要な分子として明らかとされている (Scott AC et al., *Eur Heart J*, 2004)。しかしながら、慢性肝炎における組織間コミュニケーション破綻機構を解明するには至っていない。その一方で、生体リズムは生物界に広く普遍的に存在する生命現象であり、一連の遺伝子群（時計遺伝子）が約 24 時間周期で発現の増減を繰り返すことが、リズム発振の中心機構であることが明らかになってきた。哺乳類動物における生体リズム中枢は視床下部の視交叉上核に位置し、神経の活動性やホルモン分泌、免疫、代謝機能など多くの組織機能の恒常性（組織間のコミュニケーション維持）を制御している (Matsunaga N et al., *Hepatology*, 2008 ; Murakami Y et al., *Gastroenterology*, 2008 ; Takiguchi T et al., *Pharmacogenetics and Genomics*, 2007 ;)。最近では分子時計の変容が、癌、生活習慣病など多岐にわたる疾患発症のリスクとの関連性が明らかとされている。しかしながら、肝炎から肝癌にいたる過程において、分子時計と組織間コミュニケーション破綻機構との関連性については未だ明らかとされていない。また、薬物の効果や副作用の程度も、投薬する時刻によって変化することが認められ、各病態の分子時計を理解した投薬時刻の設定はより有用な薬物治療を実施する上で重要である (Ohdo S et al., *Nature Med*, 2001)。我々はこれまでに炎症モデルとして、アセトアミノフェン (APAP) による急性肝炎症性モデル (Matsunaga et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 2004) また、ジエチルニトロソアミン (DEN) を用いた慢性肝炎モデル (Matsunaga N et al., *Toxicology*, 2011) を対象に炎症臓器における遺伝子発現解析を網羅的に行い、急性炎症および慢性炎症時における、遺伝子発現の比較

解析をした。その結果、両炎症における違いとして、小胞体ストレス因子 (Chop, ATF など) 及び分子時計 (Per2, Bmal など) に関連した遺伝子群の発現の変化を明らかとした。また、これら因子に着目し、炎症組織における発現リズムを測定した。その結果、慢性炎症モデルにおいて顕著にこれら遺伝子発現リズムが変容する事を世界で初めて明らかとした。しかし、これら遺伝子群に影響を及ぼすシグナルリズム X は明らかとされておらず、また慢性肝炎から肝癌に至る過程においての組織間コミュニケーション破綻に及ぼす影響は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、分子時計に着目した慢性肝炎から肝癌発症する過程における組織間コミュニケーション破綻機構を解明する。また、解明した機構を応用した、肝臓癌発症および転移を治療する、新規時間制癌剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

実験 1-1 ; DEN 誘発性肝癌モデルマウスを使用した、各組織を対象とする網羅的遺伝子発現解析による組織機能評価
慢性肝炎において、肝臓以外の組織の遺伝子発現量に変容するか否かを解析する。そこで、DEN 誘発慢性肝炎モデルマウスを用い、DEN 飲水投与後 2 週間目にコントロール群および DEN 飲水投与群を対象に 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 に、肝臓、腎臓、心臓、肺、脳 (SCN) などの各組織を採取する。9:00 および 21:00 の各組織より total RNA を抽出し機能分子の発現量をマイクロアレイにより測定し、慢性肝炎における多組織の遺伝子発現変容を解析する。また変容した遺伝子に関して変容時期を特定するため、DEN 暴露後経時的に上記 2 時点を対象に上記組織と血液を採取し、血漿中炎症マーカー ALT、AST 活性と、変容遺伝子発現量を解析し関連性を検証する。

実験 1-2 ; DEN 誘発性肝癌モデルマウスを対象とした、各組織における慢性炎症特異的変容遺伝子の発現リズムの測定および、慢性炎症特異的変容遺伝子の発現調節転写因子 X の探索

我々は、既に DEN 誘発性肝癌モデルにおいて、慢性肝炎時に変容する特徴的な遺伝子群（慢性炎症特異的変容遺伝子）を確認している。実験 1 で採取した上記 6 時点の各組織サンプルを対象 total RNA を抽出し、慢性炎症特異的変容遺伝子の発現リズムに変容が認められるか否かを、realtime RT-PCR により検討する。また、変容した遺伝子に関し、いつ変容したかを実験 1-1 経時的採取サンプルを対象に発現量を解析し、炎症との関連性について検証する。慢性炎症特異的変容遺伝子の promoter について、転写因子結合配列の種類を確認する。また、実験 1 のマイクロア

レイの結果を組織間で解析し、各組織における慢性炎症特異的変容遺伝子の転写に関連のある転写因子を抽出する。抽出した転写因子 X に関して、同上のサンプルを用い各組織における発現リズム解析を行い変容確認する。また慢性炎症特異的変容遺伝子の promoter をクローニングし、luciferase vector を作製後、転写因子 X の影響を Luciferase assay により確認する。その後 Promoter の delation, mutation を行いまた、転写因子 X-promoter 結合量を X-chip assay により確認する。

実験 2-1；慢性炎症特異的変容遺伝子の転写調節因子 X の転写制御機構解明

実験 1-2 において抽出した慢性炎症特異的変容遺伝子の転写調節因子 X のプロモーター解析を行い、転写因子を調節するシグナルを探索する。慢性炎症特異的変容遺伝子の転写調節因子 X の転写因子結合領域を解析する。また、実験 1 のマイクロアレイの結果を組織間で解析し、各組織における慢性炎症特異的変容遺伝子の転写調節因子の転写調節に関連のある因子 Y (コミュニケーションシグナル Y) を抽出する。抽出したコミュニケーションシグナル Y に関して、同上のサンプルを用い各組織におけるコミュニケーションシグナル Y リズム解析を行い変容確認する。変容確認後、慢性炎症特異的変容遺伝子の転写調節因子 X の promoter をクローニングし、luciferase vector を作製後、同定したコミュニケーションシグナル Y の影響を Luciferase assay により確認する。その後、Promoter delation、mutatio による解析、promoter へのシグナル Y 制御転写因子結合を X-chip assay により確認し同定する。

実験 2-2；コミュニケーションシグナル Y 阻害剤または、ノックアウトマウスを用いた、慢性炎症特異的変容遺伝子発現に及ぼす影響解析

培養細胞にコミュニケーションシグナル Y またはコミュニケーションシグナル Y の阻害剤を暴露または非暴露し、0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 時間目に細胞を回収し、total RNA を抽出後、慢性炎症特異的変容遺伝子の発現量を realtime RT-PCR により検証する。また同様に、シグナル Y ノックアウトマウスを用い、慢性炎症特異的変容遺伝子の発現量を realtime RT-PCR により検証する。*シグナル Y ノックアウトマウス (KO) は現在飼育中であり、実験に使用可能である。

実験 3-1；コミュニケーションシグナル Y の結合ペプチド作製と、Y 結合ペプチド付加リポソーム作製

これまでに我々は、癌や炎症部位に発現する特定の分子リズムを標的とする新規時間薬物送達方法 (Chrono-DDS) を確立している。平成 24、25 年度 実験計画課題より明らかとしたコミュニケーションシグナルリズム Y

を標的とする、時間薬物送達方法を構築する。コミュニケーションシグナル Y のリガンドペプチドを作製する。作製した Y ペプチドは、PEG6000 脂質に結合した後にリポソームに挿入し、製剤 (Y-PEG-Lipo) を作製する。また、Y-Lipo の体内動態を検証するために、蛍光物質を封入し、Y-PEG-Lipo-Fluo を作製する。*本研究室においては、リポソーム作製技術および製剤学的な安定性の検証は可能な状況にある。

実験 3-2；慢性肝炎モデルマウスを用いた、Y 結合ペプチド付加リポソーム (Y-PEG-Lipo) の体内動態の解析および時間薬物送達方法への応用

DEN 誘発慢性肝炎モデルマウスを対象に、血漿中のコミュニケーションシグナル Y 発現リズムを ELISA 法により測定する。また、慢性肝炎モデルマウスを対象に、血漿中コミュニケーションシグナルリズム Y をリズムマーカーとして投薬時刻設計をし、Y-Lipo-Fluo を投与する。体内動態の測定は、in vivo 蛍光・発光イメージング装置 (IVIS spectrum) を用い測定する。コミュニケーションシグナル Y リズムに対応した、炎症組織への蛍光物質の蓄積が確認できた後に、蛍光物質の代わりに、コミュニケーションシグナル Y 阻害剤、転写因子 X siRNA を封入した新規薬剤を作製する。薬効評価は上記手法を用い検証し、抗炎症性新規時間薬物送達法の開発を行う。

4. 研究成果

分子時計機構を基盤とした肝炎肝癌の解析により、新しい炎症関連因子の同定と新薬候補化合物の同定ができた。

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)

特許出願のため未発表

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：肝炎又は肝臓癌の治療又は予防剤

発明者：大戸茂弘、松永直哉

権利者：国立大学法人九州大学

番号：特願 2015-014829

出願年月日：平成 27 年 1 月 28 日

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 直哉 ()

研究者番号 :

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :