

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650446

研究課題名（和文）体内時計の活性化による成人性疾患の予防・治療法の開発

研究課題名（英文）Development of preventive strategy for lifestyle-related diseases by activation of circadian clock

研究代表者

小柳 悟（KOYANAGI, SATORU）

九州大学・薬学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：60330932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円、（間接経費） 810,000 円

研究成果の概要（和文）：加齢、老化に伴う体内時計の機能低下は糖尿病、がん、循環器障害など様々な成人性疾患の原因になることが指摘されている。しかしながら、時計機能を強化することで、これら疾患を予防または治療しようとする試みはなかった。本研究では申請者らが発見した体内時計の機能維持遺伝子（ATF4）が、細胞のがん化や抗がん剤の感受性に深く関与すること見出し、本因子の機能を制御することで、発がんの予防に繋がることを明らかにした。また、ATF4はアミノ酸代謝や細胞老化にも関与していたことから、本因子の機能調節は体内時計の活性化を通じた生活習慣病の予防・治療に役立つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Dysfunction of circadian clock along with aging is implicated with development of lifestyle-related diseases, such as diabetes, cancers, and cardiovascular diseases. However, there was no preventive strategy for lifestyle-related diseases by activation of circadian clock. In this study, we found that ATF4, a circadian clock-regulatory factor, regulates cellular oncogenic transformation and the sensitivity of tumor cells. In addition, control of the activity of ATF4 enabled to prevent oncogenesis. Since ATF4 was also involved in the regulation of amino acid synthesis and cellular senescence, control of the activity of ATF4 may lead to develop the preventive method for lifestyle-related diseases through activating the circadian clock.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：応用健康科学

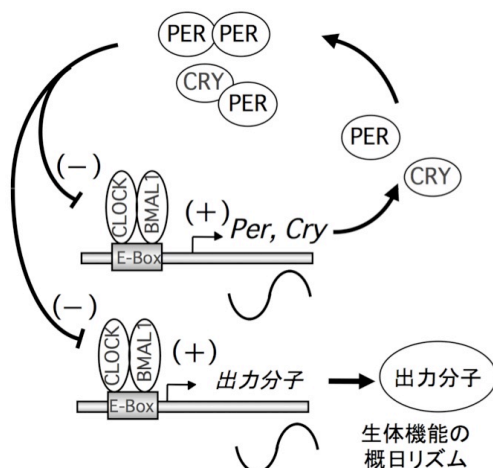
キーワード：体内時計 生活習慣病 加齢・老化 発がん

1. 研究開始当初の背景

加齢、老化に伴う体内時計の機能低下は糖尿病、がん、循環器障害など様々な成人性疾患の原因になることが指摘されている。しかしながら、時計機能を強化することで、これら疾患を予防または治療しようとする試みはない。これは体内時計の機能低下のメカニズムが不明であったこと。また、時計機能を回復させる有効な手段がなかったためである。そのため、体内時計の機能強化法の開発は、成人性疾患に対する新たな予防・治療に繋がることが考えられる。

2. 研究の目的

生体機能の概日リズムは時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群が約 24 時間周期で発現の増減を繰り返すことで引き起こされる。時計遺伝子群は「転写促進因子(CLOCK、BMAL1)」と「転写抑制因子(PER, CRY)」が互いの発現を調整することでリズムを発振するが(下図)、この機構から永続的にリズムが発



時計遺伝子による概日リズム発振機構

振されるためには、時計遺伝子の発現を保持する「第三の因子」が必須であると指摘されていた。申請者らは、cAMP response element binding (CREB) 蛋白のひとつである Activating transcription factor 4 (ATF4、別名 CREB2)が、時計遺伝子の発現を保持する因子として機能し、体内時計のリズム発振機能を維持していることを明らかにしていた(Koyanagi et al., J Biol Chem, 2011)。本研究では体内時計の活性化による成人性疾患の予防・治療法を開発することを目的に、がん細胞内における ATF4 の機能と抗がん剤に対する感受性の概日変動について検討を行った。

3. 研究の方法

① 野生型および Atf4 のノックアウトマウス (Atf4^{-/-}) から、胎児線維芽細胞 (MEF) を調整し、各細胞を H-Rav^{V12} および SV40LT を発現するレトロウイルスベクターに感染させ、がん化を誘導した。これら MEF 細胞およびマウス線維芽細胞由来の腫瘍 (UV. BAL-5. 4G) は 10% FBS 入りの DMEM 培地中で培養した。がん化した MEF 細胞および UV. BAL-5. 4G 細胞の腫瘍形成能は、各細胞をヌードマウスの背部皮下に移植して腫瘍体積を測定することで評価した。マウスは自由摂食・摂水、明暗周期 (明期 7:00-19:00) 条件下で飼育し、各実験に使用した。ウイルスベクターの作成および動物実験は、それぞれ九州大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の許可のもとに実施した。

② p53, MDM2, ATF4, p19ARF および ACTIN のタンパク発現量はウエスタンブロット法で測定した。また、これら因子の mRNA 発現量はリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。

③ ATF4 の発現ベクターおよび ATF4 に対する shRNA の発現ベクターは、pcDNA3.1 および pDON-AI2 ベクターを用いて作成した。

④ MDM2 と p19ARF および p53 のタンパク間相互作用は免疫沈降法によって評価した。また、p53 の分解阻害剤 (Nutlin-3) および各種抗がん剤 (Bleomycin, Dancarbazine) による殺細胞効果は、マウスに移植した各腫瘍細胞を明期または暗期のいずれかに取り出し、シングルセル状態のサスペンション (細胞懸濁液) を調整することで検討した。細胞懸濁液に抗がん剤を添加した後の殺細胞効果は、ATP 活性を指標に評価した。

⑤ 他群間比較の統計解析には分散分析法および Bonferroni テストを用い、有意水準は 5%以下で判定を行った。

4. 研究成果

① 腫瘍細胞内の p53 タンパクの安定性制御における ATF4 の役割

正常細胞において、p53 タンパクは、DNA の損傷時や細胞周期が過剰に亢進した際などに蓄積し、細胞周期の停止やアポトーシス、細

胞老化などを引き起こす。一方、腫瘍細胞内を抗がん剤に暴露した際などにも p53 は誘導され、細胞死を決定する因子として重要な働きを行っている。UV. BAL-5. 4G 細胞内における ATF4 の発現を shRNA を用いてノックダウンさせたところ、p53 の mRNA の発現レベルに変化は認められなかったが、そのタンパク発現量は有意に上昇した。この際、ATF4 のノックダウンによって、p53 タンパクの分解半減期が約 9 倍に延長していたことから、ATF4 は p53 タンパクの安定性を制御することで、その発現量をコントロールしていることが示唆された。

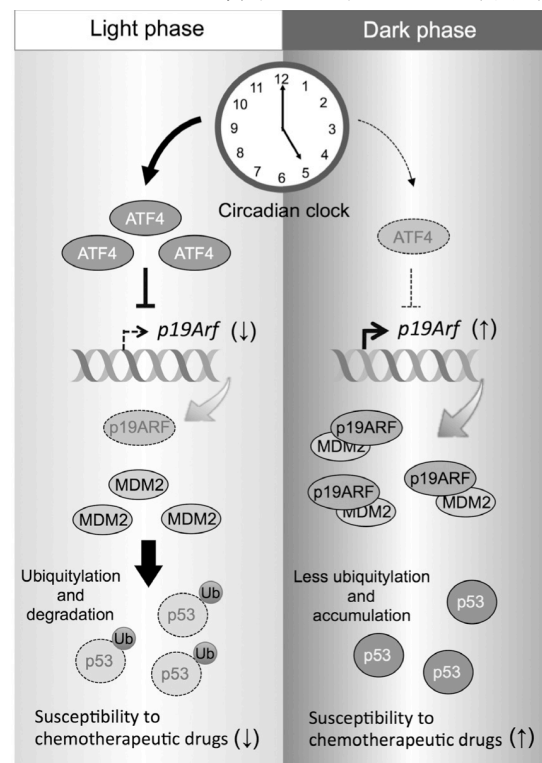
細胞内において p53 タンパクはユビキチン経路によって分解される。この際、E3 リガーゼである MDM2 が p53 タンパクのリン酸化部位のユビキチン化において主要な働きを担っている。マウスにおいて p19ARF (ヒトでは p14ARF) は、内因性の MDM2 抑制因子であるが、我々は過去に ATF4 が p19ARF の転写を抑制的に制御することを明らかにしている (Horiguchi et al., Cancer Res., 72, 395-401, 2012)。腫瘍細胞内で ATF4 をノックダウンした際、p19ARF の発現レベルが上昇するとともに、MDM2 のユビキチンリガーゼ活性は低下した。また、Atf4^{-/-}細胞においても p19ARF および p53 の発現レベルの上昇が確認されたが、これらタンパクの発現量は ATF4 を強制発現させることで減少した。これらの結果、ATF4 は p19ARF-MDM2 経路を介して p53 タンパクの細胞内量を制御していることが明らかになった。

② ATF4 による腫瘍細胞内での p53 タンパク発現の概日リズム制御

マウスに移植した UV. BAL-5. 4G 腫瘍細胞内において、ATF4 の発現は明期前半に高値を示す概日リズムを示した。一方、p19ARF および p53 タンパクの発現は ATF4 とは逆位相の暗期前半に高値を示した。しかしながら、ATF4^{-/-}腫瘍細胞内において、p53 タンパクの発現リズムは観察されず、その発現レベルはいずれの時刻でも高値を示した。このことから、ATF4 は腫瘍細胞内における p53 タンパクの発現リズム制御因子であることが示唆された。

①で明らかにした所見に基づき、ATF4 による p53 の発現リズム制御メカニズムについて検討したところ、ATF4 の発現が亢進する明期前半には p19ARF の発現レベルが低下し、MDM2

のユビキチンリガーゼ活性が亢進する結果、p53 のタンパクレベルは減少することが明らかになった。一方、ATF4 に発現が低下する暗期前半においては p19ARF の発現レベルは上昇し、MDM2 のユビキチンリガーゼ活性が減弱する結果、p53 のタンパクの分解速度が低下して細胞内量が上昇すると考えられた (下図)。



ATF4 による腫瘍細胞の抗がん剤感受性の概日リズム制御機構

③ p53 タンパク発現の概日リズムと腫瘍細胞の抗がん剤感受性との関係

腫瘍細胞内における p53 タンパクの発現量に概日リズムが認められたことから、その変動と抗がん剤感受性との関係について検討を行った。p53 タンパクの発現レベルが上昇する暗期前半と低下する明期前半のいずれかに、マウスに移植した UV. BAL-5. 4G 腫瘍細胞を分離し、抗がん剤に暴露した。その結果、抗がん剤の殺細胞効果は、p53 の発現量が高値を示す時間帯 (暗期前半) に暴露することで、より増強することが明らかとなった。一方、Atf4^{-/-}腫瘍細胞を用いて同様の検討を行ったところ、UV. BAL-5. 4G 腫瘍細胞および野生型腫瘍細胞で認められたような抗がん剤の殺細胞効果における時刻依存的な変化は観察されなかった。以上の結果から ATF4 は p53 の安定性制御を介して、腫瘍細胞の抗がん剤感受性をコントロールしていることが示唆された。

④ 細胞がん化、アミノ酸代謝における ATF 4 の役割

ATF4 は腫瘍細胞内における p53 タンパクの発現レベルを制御し、抗がん剤に対する感受性に概日変動を引き起こすことを明らかにしたが、これ以外にも ATF4 は正常細胞のがん化においても重要な役割を担っていることが明らかになった。また、ATF4 は種々のアミノ酸代謝にも深く関与しており、Atf4^{-/-}細胞に DNA ストレスなどを負荷した場合には細胞老化が容易に誘導された。これらの結果から、本因子の機能調節は体内時計の活性化を通じた成人性疾患の予防・治療に役立つことが示唆された。

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 1 件)

Horiguchi M, Koyanagi S, Hamdan AM, Kakimoto K, Matsunaga N, Yamashita C, Ohdo S. Rhythmic control of the ARF-MDM2 pathway by ATF4 underlies circadian accumulation of p53 in malignant cells. Cancer Res. 73(8):2639-2649, 2013.

[学会発表] (計 2 件)

小柳 悟, 松永直哉, 大戸茂弘. 転写因子 ATF4 によるトランスポーター発現リズムと抗がん剤感受性の制御. 第 8 回トランスポーター研究会 (熊本大学)

小柳 悟, 松永直哉, 大戸茂弘. 概日時計因子 ATF4 によるトランスポーター発現リズムと抗がん剤感受性の制御. 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (東京大学)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

http://www.phar.kyushu-u.ac.jp/bbs/view2.php?S_Publ_Year=2013&word=&page=1&B_Code=156

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 悟 (KOYANAGI Satoru)

研究者番号 : 60330932

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

研究者番号 :