

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660236

研究課題名(和文) 時計遺伝子を基盤とした癌幹細胞ヒエラルキー形成の分子解析

研究課題名(英文) Molecular analysis for the hierarchical organization of cancer stem cells based on clock genes

研究代表者

大森 啓太郎 (Ohmori, Keitaro)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：20466915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌には癌幹細胞を頂点とするヒエラルキーが存在し、様々な癌の特性が作り出されている。本研究の目的は、概日リズムの分子基盤である時計遺伝子が癌ヒエラルキー形成メカニズムにおいて果たす役割を解明することである。ヒト乳癌細胞株を用いた解析から、概日リズムの同調因子の1つである副腎由来グルココルチコイドおよび時計遺伝子Per1が癌幹細胞の機能を維持するために重要であることが明らかとなった。本研究結果から、ヒトや動物の癌に対して新しい時間治療の概念を確立し応用していくことができる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cancers are hierarchically organized by cancer stem cells, thereby creating various features of cancers. The purpose of this study was to elucidate the role of clock genes that function as molecular networks for circadian rhythms in the hierarchical organization of cancers. Analysis for a human breast cancer cell line revealed that glucocorticoids from the adrenal glands and a clock gene, per1, were crucial factors to maintain the functions of cancer stem cells. The present study provides the possibility that a new concept of chronotherapy could be established and applied to cancers in humans and animals.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：腫瘍

1. 研究開始当初の背景

癌細胞においては、癌幹細胞を頂点とするヒエラルキーが存在する。癌幹細胞は、「自己複製能」および「多分化能」を持つ細胞集団で、癌細胞の長期間にわたる生存と、1つの癌における多様性の原因となっている。癌幹細胞の特性の1つに、抗癌剤に対して高い抵抗性を有することが挙げられる。抗癌剤により癌を治療しようとしても、癌幹細胞を殺滅することができなければ癌はいずれ再発し、さらに再発した癌はこれまでに使用した抗癌剤に対しても抵抗性を示すようになる。近年行われた研究により、癌幹細胞の細胞表面マーカーとその細胞学的特性が明らかになりつつあるが、癌幹細胞と下層癌細胞のヒエラルキー形成メカニズムは全く解明されていない。そのため、癌幹細胞を標的とした有効な癌治療法の開発には至っていない。

サーカディアンリズム(概日リズム)とは、約24時間周期で変動する生理現象で、地球上の全ての生物に存在している言わば体内時計である。動物の生命機能は、生体内に存在する概日リズムによって厳密に制御されている。近年の研究から、概日リズムは癌やアレルギーなどの様々な疾患にも存在し、臨床症状の発現や薬剤に対する反応性が24時間周期で変動することが指摘されている。また、概日リズムの乱れから、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病や癌などが起こりやすくなることも、疫学調査や時計遺伝子欠損マウスを用いた研究において報告されている。そのため、病気の発症メカニズムと概日リズムは密接に関連していると考えられている。

概日リズムの分子基盤は、個々の細胞に存在する約20個の時計遺伝子により形成されている。それぞれの時計遺伝子が互いの遺伝子発現を厳密に調節し合いながら24時間のリズムを作り出している。時計遺伝子は細胞周期にも関与し、細胞周期チェックポイントタンパク質を制御している。

本研究で着目している癌幹細胞の特徴の

1つは、癌細胞であるにもかかわらず、細胞周期が静止期(G0期)にとどまるため、癌組織内で長期間生存し抗癌剤に対して抵抗性を示すことである。これまでに明らかになっている時計遺伝子と細胞周期の関連性から、時計遺伝子が作り出すリズムと時計遺伝子により制御される細胞周期が、癌幹細胞を頂点とする癌のヒエラルキー形成に重要である可能性が考えられる。しかしながら、これまでにその分子メカニズムは全く解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌幹細胞を頂点とする癌ヒエラルキー形成メカニズムにおいて、時計遺伝子が果たす役割を解明することである。具体的には、生体内において時計遺伝子の発現リズムを同調させる因子として重要な副腎由来のグルココルチコイドに着目し、グルココルチコイドにより誘導される時計遺伝子がどのようにして癌幹細胞の機能を制御しているのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 乳癌細胞株におけるグルココルチコイドを介した時計遺伝子の発現リズム解析：

ヒト乳癌由来細胞株であるMCF-7をグルココルチコイドで刺激した後、MCF-7から継時的に遺伝子を抽出し、時計遺伝子の発現レベルをリアルタイムPCR法により評価した。

(2) 時計遺伝子の発現量を調節した乳癌細胞株の作製：

(1)の実験において解析したグルココルチコイドにより産生が誘導される時計遺伝子に対して、その発現量をsiRNAにより抑制した乳癌細胞株を作成した。

(3) 乳癌細胞株におけるスフィア形成能の評価：

乳癌細胞は、非接着条件で培養するとほとんどの細胞は死滅するが、癌幹細胞はスフィ

ア（塊）を形成して生育する。癌幹細胞における時計遺伝子の役割を *in vitro* で解析するため、(2)の実験で作成した時計遺伝子の発現量を抑制した乳癌幹細胞を用いて、スフィア形成能（数）を評価した。

4. 研究成果

(1) 乳癌細胞株におけるグルココルチコイドを介した時計遺伝子の発現リズム解析：

内因性グルココルチコイドであるヒドロコルチゾンで MCF-7 を刺激すると、時計遺伝子の1つである *Period1(Per1)* の遺伝子発現量がヒドロコルチゾンの濃度依存性に増加した(図1)。合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンで MCF-7 を刺激しても同様の効果が認められた。*Per1* の発現量は、ヒドロコルチゾンで刺激後6時間をピークに上昇し、その後低下した。

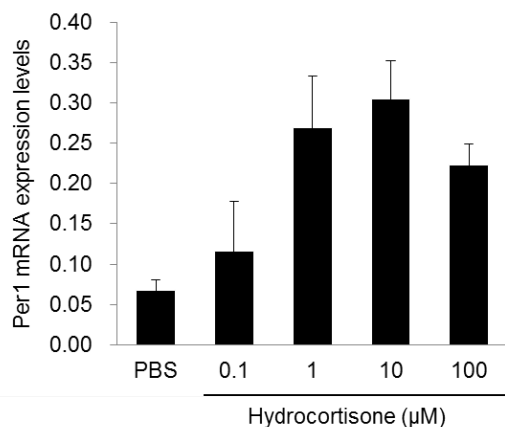


図1. ヒドロコルチゾンで刺激した MCF-7 における *Per1* 遺伝子の発現量

MCF-7 を様々な濃度のヒドロコルチゾンで4時間刺激した後、*Per1* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。

(2) 時計遺伝子の発現量を調節した乳癌細胞株の作製：

MCF-7 に siPer1 を遺伝子導入すると、*Per1* の発現量が siPer1 の濃度依性に低下した。また、siPer1 および陰性対照となるコントロール siRNA を遺伝子導入した MCF-7 をヒドロ

コルチゾンで刺激すると、*Per1* 遺伝子発現量は、コントロール siRNA に比べ siPer1 を遺伝子導入した MCF-7 において低下していた。

(3) 乳癌細胞株におけるスフィア形成能の評価：

ヒドロコルチゾン存在下で MCF-7 を培養すると、*Per1* 発現量が上昇するとともに、MCF-7 のスフィア形成数が増加した(図2)。一方、siPer1 により *Per1* の発現量を低下させた MCF-7 においては、スフィア形成数が低下していた(図3)。

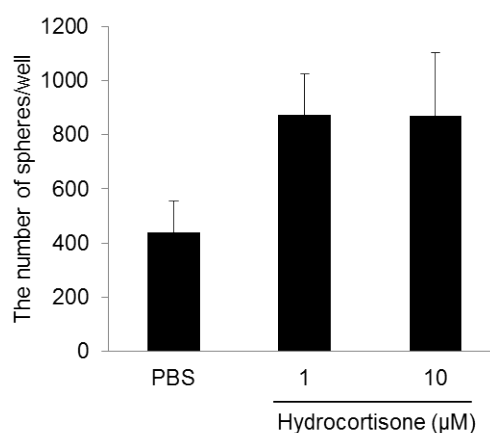


図2. ヒドロコルチゾンで刺激した MCF-7 のスフィア形成能

MCF-7 をヒドロコルチゾン(1 μM)とともに非接着条件で培養し、形成されたスフィアの数計測した。

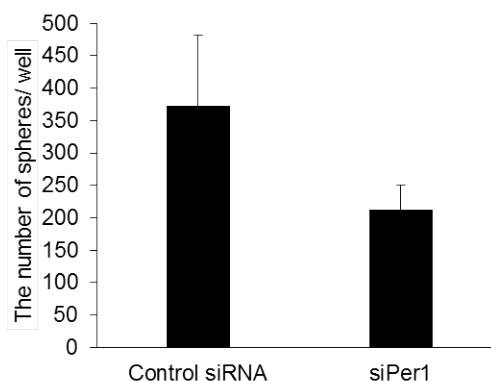


図3. siPer1 により *Per1* 発現量を減少させた MCF-7 のスフィア形成能

MCF-7 に control siRNA または siPer1 を遺伝子導入した後、非接着条件で培養し、形成

されたスフィアの数計測した。

以上の研究結果から、乳癌細胞も生体内で産生されるグルココルチコイドのリズムを感知し、時計遺伝子 *Per1* を発現することが明らかになった。さらに、*Per1* の発現リズムが、乳癌細胞において癌幹細胞を維持するために重要な因子の1つであることが明らかとなった。癌幹細胞は癌の治療標的となることから、癌幹細胞を頂点する癌ヒエラルギー形成メカニズムを時計遺伝子という側面からさらに詳細に解明していくことで、癌に対する新しい時間治療の概念を確立し応用していくことができる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Ohmori K, Minamide K, Goto S, Nagai M, Shirai J, Oku K. Time-of-day-dependent variations of scratching behavior and transepidermal water loss in mice that developed atopic dermatitis. *J. Vet. Med. Sci.* 76(11):1501-1504, 2014. 査読有

(2) Ohmori K, Nishikawa S, Oku K, Oida K, Amagai Y, Kajiwara N, Jung K, Matsuda A, Tanaka A, Matsuda H. Circadian rhythms and the effect of glucocorticoids on expression of the clock gene *period1* in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. J.* 196(3):402-407, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.10.010.

〔学会発表〕(計4件)

(1) Ohmori K. Possible involvement of circadian rhythms in the development of allergic diseases. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health. 2014年9月24日. 北海道大学(北海道)

(2) 後藤瞬、清水直、渡邊美和、佐々木一昭、下田実、長井誠、白井淳資、伊藤博、大森啓

太郎. 犬におけるヒスタミン皮内反応の時刻依存性変化 第157回日本獣医学会学術集会. 2014年9月11日. 北海道大学(北海道)

(3) Ohmori K, Hosokawa M, Ohsuga K, Tanaka T, Matsunaga T, Arakaki A. Detection of circulating mast cells from peripheral blood in dogs with mast cell tumors by using microcavity arrays. The 3rd Asian Meeting of Animal Medicine Specialties. 2013年12月14日. Bogor (インドネシア)

(4) 大森啓太郎. アトピー性皮膚炎自然発症モデルマウスの引っ掻き行動におけるサーカディアンリズム解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 2013年09月21日. 岐阜大学(岐阜県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 啓太郎 (OHMORI, Keitaro)
東京農工大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号: 20466915