

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860178

研究課題名(和文) がん抑制遺伝子pRbによる概日リズムの制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism by which tumor suppressor regulate the circadian rhythm

研究代表者

三木 貴雄 (Miki, Takao)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30452345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌と概日リズムの関連は、疫学研究や分子生物学的研究により徐々に明らかとなっているが、未だ直接的な関連は不明である。そのため我々は、がん抑制遺伝子pRbによる概日リズム遺伝子の制御機構の解明を目的とした。

マウス概日リズムの行動解析を行うために、脳視交叉上核特異的にpRbを欠損するVgat-Cre; Rbflox/floxマウスを作製したが、このマウスは生後まもなく死亡し、解析には不向きであった。制御機構の解析では、培養細胞にpRbを発現させ、概日リズム遺伝子の発現量をqPCR法により定量した結果、転写抑制遺伝子の発現が減少していることにより、Per2プロモーター活性が上昇するという知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Accumulating epidemiological evidence suggests that cancer and the circadian clock have close interplay, although direct molecular evidence in mammalian systems remains scarce. The circadian clock is the daily oscillation of biological processes and believed to have close interplay with many fundamental cellular pathways including metabolism. Previous studies have shown that mice lacking Period 2 (Per2), a critical component of circadian clock, was cancer prone, suggesting that clock genes could be involved in tumor suppression and hence, PER2 and other tumor suppressors may function in an integrated network. We screened several tumor suppressors for their possible clock functions and identified two major tumor suppressors, p53 and PML. We also found that p53 and PML exert their clock functions by regulating Per2. Here, we expand our finding to other tumor suppressor and try to understand the direct connection between tumor suppressors and the circadian rhythm.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん抑制遺伝子 概日リズム

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは、日々の睡眠サイクルを含む、生体の一日約 24 時間のリズムを制御している生物の基本的な機構である。長期的なリズムの欠失は、がん、糖尿病等の疾患と関連することが疫学研究において報告されている。一方、がん患者では、睡眠リズム障害が見られることや、糖尿病患者では、インスリン代謝リズム障害等が見られ、がんの罹患率も高いことが報告されている。上記の知見は、がんと概日リズムには、緊密な関連性があることを示唆している。しかし、その分子機構は不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々は、がんと概日リズムの関連を、がん抑制遺伝子による概日リズムの分子レベルでの制御という視点から解明することを目的とした。現在までの研究で、我々は概日リズムの形成に必須の中樞時計とよばれる脳の *Sprachiasmatic Nucleus* (SCN) において、がん抑制遺伝子 *Promyelocytic Leukemia* (PML) が *PER2* の核局在を制御することにより概日リズムの制御を担うこと、また、*p53* は *PER2* を介して概日リズムを制御することも明らかとしている。そのため、本研究では、*PML*、*p53* と関連の深いがん抑制遺伝子 *pRb* の概日リズムに対する影響を分子的に解明することを目的としている。

3. 研究の方法

視交叉上核に比較的特異的なプロモーターとして *Vesicular GABA Transporter* (*Vgat*) が概日リズムの解析に使用されている。我々は、*Vgat-cre* マウス (Jackson laboratory #016962) と *pRb flox/flox* マウス (NCI #01XC1) を用い、視交叉上核特異的 *pRb* 欠損マウスを作成し、概日リズム行動解析を行った。

Pml 欠損 MEF 細胞と種々の遺伝子発現

ベクターを用いて *Per2* プロモーターのルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、*Pml* の *pRb* 制御における関わりを検討した。

pRb は *E2F* 等の転写因子と結合し、その活性を制御する (Dyson *Genes Dev.* 1998)。そのため、*pRb* が *Per2* の主な転写因子である *BMAL1/CLOCK* のヘテロダイマーの転写活性に影響を与える可能性を、*E2F* を過剰発現させた場合に *Per2* プロモーターのルシフェラーゼレポーターアッセイを行うことにより検討した。期待された結果が上記 1 - 3 のアプローチでは得られなかったため、異なるアプローチとして、他の概日リズム制御因子への *pRb* の影響を検討するために、*pRb* 欠損マウス MEF 細胞に、*pRb* を強制発現させ、24 時間後に細胞を回収し、概日リズム関連遺伝子の発現量を *qPCR* 法を用いて定量した。

4. 研究成果

まず *Vgat-Cre* マウス (Jackson Laboratory) と *Rbflox/flox* マウスを掛け合わせ、*Vgat-cre;Rbflox/+* マウスを得た。さらに得られた *Vgat-Cre;Rbflox/+* マウスと *Rbflox/flox* マウスを掛け合わせ、*Vgat-Cre;Rbflox/flox* マウスを作製しようと試みた。掛け合わせの結果、*Vgat-Cre;Rbflox/flox* マウスをメンデルの法則に従い得た。しかし、これらのマウスは生後まもなく致死となり、成体になるマウスは得られなかった。

Pml 欠損 MEF 細胞に種々の遺伝子発現ベクターをトランスフェクションし、*Per2* プロモータールシフェラーゼアッセイを行った結果、野生型と比べて、*pRb* による *Per2* プロモーター活性化程度に違いは見られなかった。

野生型 MEF 細胞に、*BMAL1/CLOCK* と

E2F1、E2F4、E2F6 を発現させ、Per2 プロモーター活性の変化を観察したが、pRb による転写促進効果には影響を与えなかった。

qPCR 法を用いて mRNA 量の解析を行った結果、pRb 強制発現に伴い Per2 の発現の上昇を確認した。さらに、面白いことに概日リズム制御の転写抑制因子の発現が有意に減少していた。

今後はこの転写抑制因子と pRb の関連を深く掘り下げて研究していく計画である。

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 2 件)

T. Miki, M. Tomoko, Z. Zhao, C.C. Lee. p53 regulates *Period2* expression and the circadian clock. **Nature Communications**. 4:2444. 2013. 査読有

T. Miki, M. Chen-Goodspeed, Z. Zhao, C.C. Lee. Circadian behavior of mice deficient in PER1/PML or PER2/PML. **Journal of Circadian Rhythm**. 11(1):9. 2013. 査読有

[学会発表](計 5 件)

三木貴雄 「癌抑制遺伝子 p53、PML と概日リズムの関連」 解剖・生理学会合同大会 招待講演 2015 年 3 月 22 日 (神戸)

三木貴雄 「がん抑制遺伝子による概日リズム制御」 金沢大学がん進展研究所 2014 年 12 月 10 日

三木貴雄 「がん抑制遺伝子による概日リズム制御機構」日本時間生物学会 シンポジウム 2014 年 11 月 9 日 (九州大学)

三木貴雄 「がん抑制遺伝子による概日リズム制御機構」日本癌学会

口頭発表 2014 年 9 月 26 日 (横浜)

三木貴雄 「がんと概日リズム」 京都薬科大学 2014, 4 月 9 日

[図書](計 2 件)

三木貴雄 「がんと概日リズム」『日本臨床』73 巻増刊号 2015 p793-798

三木貴雄 「がん抑制遺伝子による概日リズムの制御機構」『医学のあゆみ』

Vol. 251, p1150-1151, 2014. 12. 27

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-014/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三木 貴雄 (Takao Miki)

京都大学医学研究科・特定助教

研究者番号：30452345

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：