

概日時計分子の機能低下による細胞がん化のメカニズムの解析

片宗, 千春

<https://hdl.handle.net/2324/2236160>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名 : 片宗千春

論文題名 : 概日時計分子の機能低下による細胞がん化のメカニズムの解析

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

悪性新生物「がん」は、日本人の死亡率の約 30%を占め、平成 28 年度における死亡者数は 37 万人に達している。また、推計の罹患者数も 150 万人以上に及び、画期的な治療法や予防策の開発が続けられている。がんは遺伝的な要因や環境的な要因が相まって発症するが、不規則な生活パターンの繰り返しにより、その発症リスクが増大することが指摘されている。

一方、ヒトをはじめとする哺乳類動物には、様々な生体機能に 24 時間を 1 周期とした概日リズムが認められ、それらリズムは時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群が転写・翻訳フィードバックを構成することにより制御されている。転写因子である CLOCK と BMAL1 がヘテロダイマーを形成し、E-box を介して、*Period (Per)* 遺伝子や *Cryptochrome (Cry)* 遺伝子の転写を促進する。これら遺伝子の産物である PER および CRY タンパクは CLOCK/BMAL1 による自らの転写活性を抑制する。最近の研究成果により、生体リズムの慢性的な変調によって発がんリスクが増大することが認識されつつあるが、時計遺伝子の転写促進因子と転写抑制因子の欠損動物においては、いずれも生体機能の概日リズムに異常が生じるものの、放射線照射後の発がん率が大きく異なることが指摘されている。また、時計遺伝子は正常細胞のみならず、がん細胞内にも発現し、生存シグナルの伝達や抗がん剤の感受性にも影響を及ぼしている。この所見は、生体機能の概日リズムの破綻の仕方やその原因によって細胞のがん化や抗がん剤感受性が左右されることを示唆しているが、そのメカニズムは未だ解明されていない。

本研究では、概日時計を構成する転写促進因子 (*Bmal1*, *Clock*) の機能不全細胞と転写抑制因子 (*Per2*, *Cry*) 機能不全細胞に、がん遺伝子を導入することで、概日リズムの変調と細胞がん化および抗がん剤感受性との関連性を検討した。

1 細胞のがん化における概日時計の転写促進因子と転写抑制因子の機能的差異の解析

時計遺伝子の転写促進因子および転写抑制因子の機能不全マウスから調製した胚線維芽細胞を用い、がん遺伝子 (*H-Ras^{v12}*, *SV40LT*) を導入することで、細胞のがん化における概日時計分子の転写促進因子と転写抑制因子の役割について検討を行った。転写抑制因子である *Per2* と *Cry1/2* の機能不全細胞では、がん遺伝子の導入によってがん化が誘導されたが、転写促進因子である *Bmal1* と *Clock* の機能不全細胞では、がん化に対して抵抗性を示すことが明らかになった。*Per2* 機能不全細胞と *Cry1/2* 機能不全細胞では、がん遺伝子の導入により Activating Transcription Factor-4 (ATF4) が誘導され、細胞老化因子である *p16Ink4a* や *p19Arf* の発現上昇が抑制されることにより細胞のがん

化が促進された。一方、*Bmal1* 機能不全細胞や *Clock* 機能不全細胞では、がん遺伝子を導入しても、ATF4 が誘導されず、*p16Ink4a* や *p19Arf* の発現が上昇して細胞老化が引き起こされることが明らかになった。

2 がん遺伝子を導入した *Per2* 機能不全細胞における抗がん剤耐性獲得のメカニズム解析

がん遺伝子 (*H-Ras^{v12}*, *SV40LT*) の導入によって悪性形質転換させた野生型および *Per2* 機能不全細胞に Methotrexate (MTX), Gemcitabine (GEM), Etoposide (VP-16), Oxaliplatin (L-OHP), Vincristine (VCR) の各抗がん剤を曝露し、48 時間後の生存率を測定したところ、*Per2* 機能不全細胞において、これら 5 種の抗がん剤の殺細胞効果に対し抵抗性が認められた。抗がん剤の殺細胞効果は細胞内への取り込み量と細胞の薬剤に対する感受性によって決定されるが、野生型と *Per2* 機能不全細胞内への各種抗がん剤の取込み量には有意な差異は認められなかった。一方、がん化した *Per2* 機能不全細胞内で高発現していた Aldehyde dehydrogenase 3a1 (ALDH3A1) の発現を shRNA で抑制したところ、各抗がん剤に対する感受性が野生型細胞と同程度にまで回復した。また、がん化した *Per2* 機能不全細胞では野生型細胞に比べて *Aldh3a1* 遺伝子の転写開始部位付近におけるヒストンの脱アセチル化が低減しており、その修飾状態が転写を活性化させる方向に変容していることが明らかとなった。

過去に行われた疫学的調査や遺伝子改変動物を用いた研究から、概日時計の機能低下による生体リズムの乱れは、発がんリスクを増大させることが指摘されてきたが、本研究の結果から概日時計の機能低下は細胞がん化の促進のみならず、抗がん剤の抵抗性獲得にも繋がることが明らかになった。これまで、がん細胞の多剤耐性能の獲得は薬物排泄型トランスポーターの高発現やストレス耐性の増大などが主なメカニズムと考えられてきた。しかしながら、本研究で明らかにした *Per2* 機能不全細胞における ALDH3A1 の機能亢進は、薬物排泄型トランスポーターの発現変容など、従来まで提唱されていた機構とは異なる新たなメカニズムを明示しており、*Per2* の機能不全がより悪性度の高いがん細胞を出現させる危険性を示唆している。本研究で得られた成果や方法論が有効な薬剤の開発に繋がり、難治性がん治療の一助になることが期待できる。