

## 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)

## 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

薬剤学分野 3PS15017M 片宗 千春

## 【序論】

ヒトをはじめとする哺乳類動物の様々な生体機能には約 24 時間を 1 周期とする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形成することで制御されている (Fig. 1)。近年の疫学調査の結果から国際がん研究機関 IARC は、時計遺伝子の発現が慢性的に異常をきた

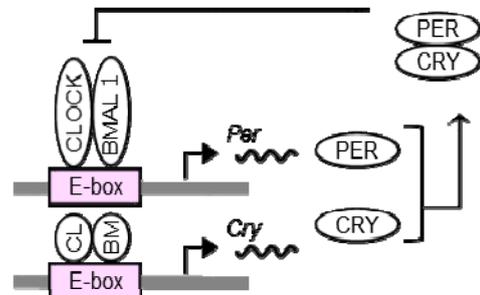


Figure 1. Schematic image of transcriptional and translational feedback loop consisting of clock genes

す環境への暴露は「発がん」リスクを増大させることを指摘している。一方、概日時計の転写促進因子または転写抑制因子の欠損動物では、いずれも生体リズムに異常が生じるものの、がんの発症率が大きく異なることが報告されている。この所見は生体リズムの乱れ自体が発がんのリスクを上昇させるのではなく、「概日時計がどの様に壊れるか」によって、細胞のがん化が左右されていることを示唆している。しかしながら、「概日時計の壊れ方の違い」によって、なぜ発がんリスクが変化するのか、その機構は不明である。

本研究では、時計遺伝子の転写促進因子と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にがん遺伝子 (*H-Ras<sup>v12</sup>*, *SV40LT*) を導入することで、細胞がん化および抗がん剤の感受性に及ぼす時計遺伝子の機能的差異について検討を行った。

## 【方法】

## 細胞培養

*Per2* 機能不全 (*Per2<sup>m/m</sup>*) マウスと *Bmal1* 機能不全 (*Bmal1<sup>-/-</sup>*) マウスから、定法にて胚線維芽細胞を調製し、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地中で 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

がん遺伝子 (*H-Ras<sup>v12</sup>*, *SV40LT*) 導入

がん遺伝子 *H-Ras<sup>v12</sup>* と *SV40LT* の翻訳部位を導入した pBABE-puro retroviral vector (RTV-001-PURO) を RetroPack PT67 細胞 (Clontech) にトランスフェクトすることでウイルス液を作成し、各細胞に 2 週間曝露した。

## 細胞増殖能の測定

足場非依存性増殖能の測定には、CytoSelect™ 96-Well Cell Transformation Assay Kit (日本医化機械) を使用した。また、生体内での腫瘍形成能はがん遺伝子を導入した細胞をマトリゲルと混合し、NOD/SCID マウスの背部皮下に移植し、腫瘍体積を経時的に測定した。

## 細胞老化

がん遺伝子導入し、1 週間後の β-ガラクトシダーゼ (β-gal) 陽性細胞を Senescence Detection Kit (Bio Vision) を用いて検出した。

## 抗がん剤による殺細胞効果の測定

96well プレートにがん化した各細胞液を  $1 \times 10^3$  cell/well ずつプレーティングし、24 時間後に Methotrexate (MTX), Gemcitabine (GEM), Etoposide (VP-16), Vincristine (VCR), Oxaliplatin (L-OHP) を添加した。48 時間後の生細胞数を CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 試薬 (Promega) を用いて測定した。

## *Aldh3a1* 遺伝子の転写開始領域付近におけるヒストン修飾状態の測定

抗 Histone H3(Acethyl K9)抗体(Abcam: ab10812), 抗 Histone H3(Tri methyl K27)抗体(Abcam: ab6002) を用いてクロマチン免疫沈降を行い、ヒストン H3 のアセチル化およびトリメチル化状態を測定した。

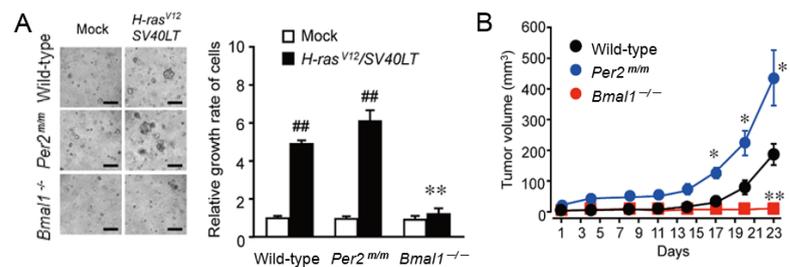
## 【結果・考察】

### 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

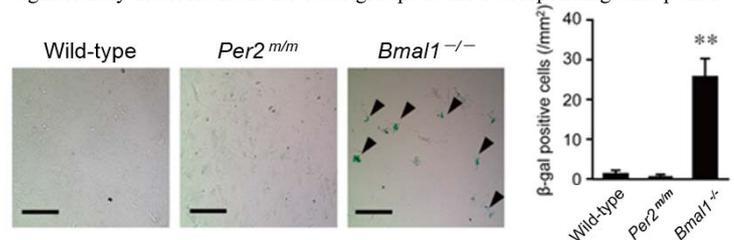
がん遺伝子導入による細胞の形質転換の差異について検討を行ったところ、野生型および *Per2<sup>m/m</sup>* 細胞では、足場非依存性の増殖能や生体内での腫瘍形成能の亢進が観察されたが、*Bmal1<sup>-/-</sup>*細胞では、これらのがん遺伝子導入による影響は認められなかった (Fig. 2A, B)。細胞老化は、細胞周期が不可逆的に停止する現象であり、がん化に対する抑制機構のひとつとも考えられているが、がん遺伝子を導入した *Bmal1<sup>-/-</sup>*細胞は、野生型および

*Per2<sup>m/m</sup>* 細胞に比べて細胞老化が顕著に誘導されていることが観察された (Fig. 3)。

Activating transcription factor-4 (ATF4) は、時計遺伝子によって発現が制御されている転写因子のひとつであり、細胞老化因子である *p16Ink4a*, *p19Arf* の発現を抑制することが知られている。がん遺伝子の導入により野生型細胞および *Per2<sup>m/m</sup>* 細胞では ATF4 の発現が上昇したのに対し、*Bmal1<sup>-/-</sup>*細胞では ATF4 の発現変化は認められなかった。がん遺伝子を導入した野生型および *Per2<sup>m/m</sup>* 細胞に *Atf4* の siRNA を導入してその発現レベルを低下させたところ、pRb の過リン酸化状態の減少が認められ、



**Figure 2. Different oncogenic phenotypes of *Per2<sup>m/m</sup>* and *Bmal1<sup>-/-</sup>* cells after introduction of *H-Ras<sup>V12</sup>* and *SV40LT*.** A, Anchorage-independent growth of wild-type, *Per2<sup>m/m</sup>*, and *Bmal1<sup>-/-</sup>* cells after the concomitant introduction of *H-ras<sup>V12</sup>* and *SV40LT*. Cells infected with oncogenes were subjected to a soft-agar colony assay, and their colony formation and viability were assessed 14 days after seeding. Control cells were infected with mock vectors. Left panels show representative microscopic photographs of colony-formation in each type of cells. The scale bars indicate 100  $\mu$ m. Right panel shows viability of cells. Values are shown as means  $\pm$  S.E. (n = 3-6). Mean values of mock-transfected wild-type cells were set at 1.0. ##,  $P < 0.01$  significantly different from the mock-transfected group. \*\*,  $P < 0.01$  significantly different from oncogene-transfected wild-type and *Per2<sup>m/m</sup>* cells. B, Tumor formation by oncogene-introduced wild-type, *Per2<sup>m/m</sup>*, or *Bmal1<sup>-/-</sup>* cells. Equal numbers of cells ( $5 \times 10^6$  cells) were implanted into the dorsal air sacs of NOD/SCID mice. Values are means  $\pm$  S.E. (n = 4). \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$  significantly different from the other groups at the corresponding time points.



**Figure 3. Induction of cellular senescence in oncogene-introduced *Bmal1<sup>-/-</sup>* cells.**  $\beta$ -Gal staining of wild-type, *Per2<sup>m/m</sup>*, or *Bmal1<sup>-/-</sup>* cells infected with *H-ras<sup>V12</sup>* and *SV40LT*. Arrows in the microscopic photograph indicate  $\beta$ -gal-positive cells. The scale bars indicate 50  $\mu$ m. Values are means  $\pm$  S.E. (n = 3). \*\*,  $P < 0.01$  significantly different from other oncogene-introduced cells.

足場非依存性増殖能も低下した。一方, *Bmal1*<sup>-/-</sup> 細胞に ATF4 を強制発現させたところ, p16INK4a の発現減少と pRb の過リン酸化状態の増加に伴い, 足場非依存性増殖能の亢進も認められた。

これらの結果から, 概日時計分子の転写抑制因子である *Per2* の機能不全細胞では, がん遺伝子の導入により ATF4 が誘導され, 細胞老化因子である *p16Ink4a* や *p19Arf* の発現が抑制されることにより細胞のがん化が促進されたと考えられた。一方, 転写促進因子である *Bmal1* の機能不全細胞では, がん遺伝子を導入しても, ATF4 が誘導されず, *p16Ink4a* や *p19Arf* の発現が恒常的に上昇して細胞老化が引き起こされ, 細胞がん化に対して抵抗性を示すことが明らかになった (Fig. 4)。

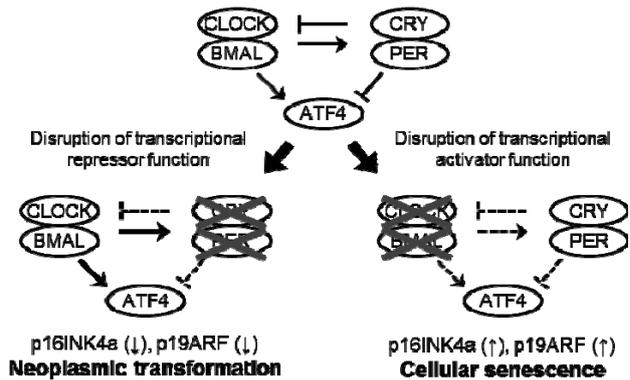


Figure 4. Possible mechanisms for the promotion of oncogenicity by disruptions in the molecular circadian clock.

### がん遺伝子を導入した *Per2*<sup>m/m</sup> 細胞における抗がん剤耐性獲得のメカニズム解析

がん化した野生型および *Per2*<sup>m/m</sup> 細胞に MTX, GEM, VP-16, VCR, L-OHP 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*<sup>m/m</sup> 細胞の生存活性は野生型細胞に比べて有意に高値を示し, これら 5 種の抗がん剤の殺細胞効果に対して抵抗性を示した (Fig. 5)。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とによって決定されるが, 野生型と *Per2*<sup>m/m</sup> 細胞内への各種抗がん剤の取り込み量には有意な差異は認められなかった。一方, マイクロアレイ解析により, がん化した *Per2*<sup>m/m</sup> 細胞内では *Aldh3a1* 遺伝子の発現が著しく上昇していることが明らかになった。shRNA を用いてがん化した *Per2*<sup>m/m</sup> 細胞内での *Aldh3a1* の発現を抑制したところ, 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 (Fig. 5)。

また, がん化した *Per2*<sup>m/m</sup> 細胞では *Aldh3a1* 遺伝子の転写開始部位付近への Histone deacetylase (HDAC) の結合量が低下しており, ヒストン 3 の 9 番目のリジン残基のアセチル化量が高値を示していた。がん化した *Per2*<sup>m/m</sup> 細

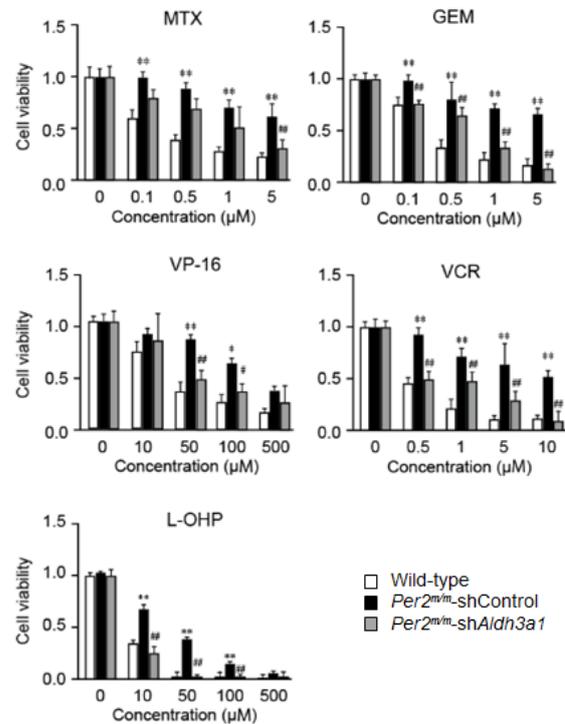


Figure 5. Down-regulation of ALDH3A1 relieves the resistance of oncogene-transformed *Per2*<sup>m/m</sup> cells against chemotherapeutic drugs. Effects of chemotherapeutic drugs on viability of *Aldh3a1* down-regulated neoplastic *Per2*<sup>m/m</sup> cells. Cell viability was assessed 48 h after the initiation of drug treatment. Values shown means with S.D. (n=3-4). \*\**P* < 0.01, \**P* < 0.05 significantly different from wild-type cells. ##*P* < 0.01, #*P* < 0.05 significantly different from control shRNA-transfected neoplastic *Per2*<sup>m/m</sup> cells (*Per2*<sup>m/m</sup> Control shRNA).

胞では *Aldh3a1* 遺伝子の転写開始部位付近におけるヒストン脱アセチル化酵素のリクルート量が低減しており、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になった。

これらの結果から、*Per2<sup>m/m</sup>* 細胞における抗がん剤抵抗性は、ヒストン修飾の変化によって生じる *Aldh3a1* 遺伝子の著しい発現上昇によって引き起こされていることが示唆された。

### 【結論】

本研究での検討において、概日時計を構成する転写抑制因子 *Per2* と転写促進因子 *Bmal1* は、細胞のがん化および抗がん剤の感受性制御においては異なる機能を有していることが明らかとなり、細胞のがん化には ATF4 の発現変動の有無が、抗がん剤への感受性制御には ALDH3A1 の発現誘導が深く関わっていることが示唆された (Fig. 6)。*Per2* および *Bmal1* の機能不全マウスはいずれも生体機能の概日リズムに異常をきたすが、本研究の結果は概日リズムの変調自体が必ずしも細胞のがん化を促すのではなく、どのような分子メカニズムに基づいてリズムの異常が引き起こされるかによって、発がんリスクが左右されることを示唆している。また、*Per2* の機能不全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、本研究で明らかになった *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に基づいており、

*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有していることが示唆された。本研究で得られた成果や方法論が、有効な薬剤の開発を通じて、難治性がん治療の一助になることを期待したい。

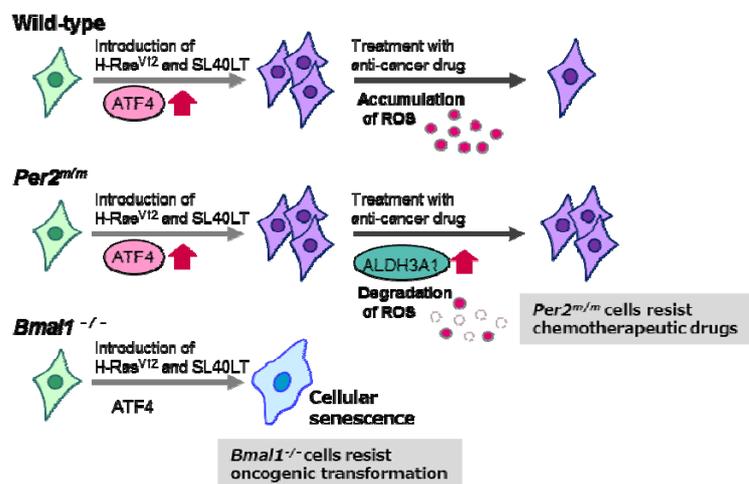


Figure 6. Difference in the oncogenic malignancy of *Per2<sup>m/m</sup>* and *Bmal1<sup>-/-</sup>* cells after introduction of *H-Ras<sup>V12</sup>* and *SL40LT*.

### 【発表論文】

1. **Katamune C**, Koyanagi S, Shiromizu S, et al., Different roles of negative and positive components of the circadian clock in oncogene-induced neoplastic transformation. *J Biol Chem.* 291: 10541–10550, 2016.
2. **Katamune C**, Koyanagi S, Hashikawa KI, et al., Mutation of the gene encoding the circadian clock component PERIOD2 in oncogenic cells confers chemoresistance by up-regulating the *Aldh3a1* gene. *J Biol Chem.* 294: 547–558, 2019.