

### 概日リズムにおける HIF1 $\alpha$ の役割

池田正明<sup>1,3</sup>, 熊谷 恵<sup>1,3</sup>, 上野宗久<sup>2</sup>, 岡部尚志<sup>2,3</sup> (1)埼玉医科大学医学部生理学, (2)埼玉医科大学国際医療センター泌尿器腫瘍科, (3)埼玉医科大学ゲノム医学研究センタープロジェクト研究部門分子時計プロジェクト)

低酸素誘導因子 (HIF) 誘導性の血管新生因子は、腎細胞癌の治療において重要な標的となっています。一方、約 24 時間周期で変動する概日リズムは地球上の殆どの生物にみられ、哺乳類では *Per1/2/3*, *Cry1/2*, *Bmal1*, *Clock* などの時計遺伝子によってリズムの発振が生み出されています。これらの時計遺伝子は多くの細胞、臓器においてその発現が確認され、リズム発現する遺伝子がありますが、HIF と時計遺伝子の関連についてはほとんど報告がなく、本研究では腎癌細胞株において HIF1 $\alpha$  と時計遺伝子との関係について検討しました。

腎癌細胞株 8 種類を用い、細胞レベルでの *Per2* の概日リズム性発現の有無を確認しました。*Per2* の mRNA レベル、転写活性ともに Caki-2 においてのみ概日リズム性の発現を認めたものの、実験に用いた他の腎癌細胞では概日リズム性の発現は認めませんでした。Caki-2 細胞とその他の細胞の特性の違いを検討するため、各腎癌細胞における BMAL1, CLOCK, PER2, CRY1, HIF1 $\alpha$  蛋白の発現をウエスタンブロット法で検討したところ、CRY1 蛋白の発現は全ての細胞に認められ、BMAL1, CLOCK, HIF1 $\alpha$  蛋白のいずれも発現を認めたのは Caki-2 細胞のみでした。さらに、Caki-2 細胞において、HIF1 $\alpha$  とその結合因子である ARNT の発現バクターを共に一過性に細胞にトランスフェクションにより導入したところ、*Per2* プロモーターレポーターの概日リズム性発現の振幅は有意に上昇し、さらに HIF1 $\alpha$  の発現を低下させる作用のある天然フラボノイドであるクリシンは、*Per2* プロモーターの概日リズム性発現の振幅を有意に減弱させました。転写レベルでの発現調節を解析するため、ヒト、マウスの *Per2* のプロモーター領域を比較し、両者で配列が高度に保存されている領域内に 1 カ所 HIF1 $\alpha$  の結合配列である hypoxia response element (HRE) のあることを見出しました。さらに、ChIP アッセイによって HRE 配列に HIF1 $\alpha$  が結合することが示されました。

腎癌細胞である Caki-2 細胞においては、*Per2* は細胞レベルで概日リズム性発現を認め、また HIF1 $\alpha$  は *Per2* のプロモーター領域に結合することによって、その概日リズム性発現の振幅を増強

させることが示されました。腎癌細胞における時計遺伝子の概日リズム性発現の有無、また HIF1 $\alpha$  が時計遺伝子の概日リズムに与える影響が明らかになったことで、HIF1 $\alpha$  誘導性の低酸素経路を標的とする腎癌治療に対して、時間治療という新たな治療戦略がもたらされる可能性があり、今後の展開が期待されます。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

### 活性酸素ストレスに応答する概日時計リセットシグナルは細胞生存プログラムを制御する

田丸輝也 (東邦大学医学部生理学講座)

生命の本質の一つは、環境、ストレス、加齢等によって秩序 (健康、生) から無秩序 (未病、傷害、疾病、死) へと向かう時間の矢に抗うことであり、そのために様々な適応系を獲得してきた。なかでも概日 (体内時計) システムは、環境の日内変動に適応して、全身の生理機能のタイミングを最適化する系であり、内的日周性と変化に柔軟に対応する同調 (リセット) 能をもつ。

進化論的視点から観ると、オゾン層が形成される以前の太古の地球上には、日中、強い電離放射線等を含む太陽放射が降り注ぎ、様々な疾患の要因となる細胞傷害ストレスとなったと想像できる。このような致死性のストレスが淘汰圧となり、日内変動する防御系の進化を促したと考えられる。電離放射線等は細胞内活性酸素 (ROS; reactive oxygen species) の増加をもたらす。ROS や高熱は、細胞内の普遍的な秩序攪乱因子であり、これらによるストレスによる傷害 (未病) の蓄積が様々な疾患の要因になると考えられる。生命はこれらに抵抗するストレス防御システムを持っている。未病から疾患に至る際のストレス防護における概日システムの役割と中核となる分子機序を解明することは、予防医学・疾患治療に貢献すると考えられる。

このような視点を基盤に我々は、「時計の同期トリガーとなる最適強度のストレス (臨界ストレス) は、生体の防御系を賦活する」「臨界ストレスにおいてはたらくシグナルは、ストレスやそれによって引き起こされる疾患に対する抵抗性の中核を担っている」という独自の仮説を立てた。これに基づき、ヒートショックパルスによって時計リセットが起きること、ヒートショック (HSR) に関わる転写因子 HSF1 と時計制御転写因子 BMAL1 が、時計同調時に結合すること、すなわち概日システムと HSR システムのクロストークが起きることを示した [1]。また、同期ストレス

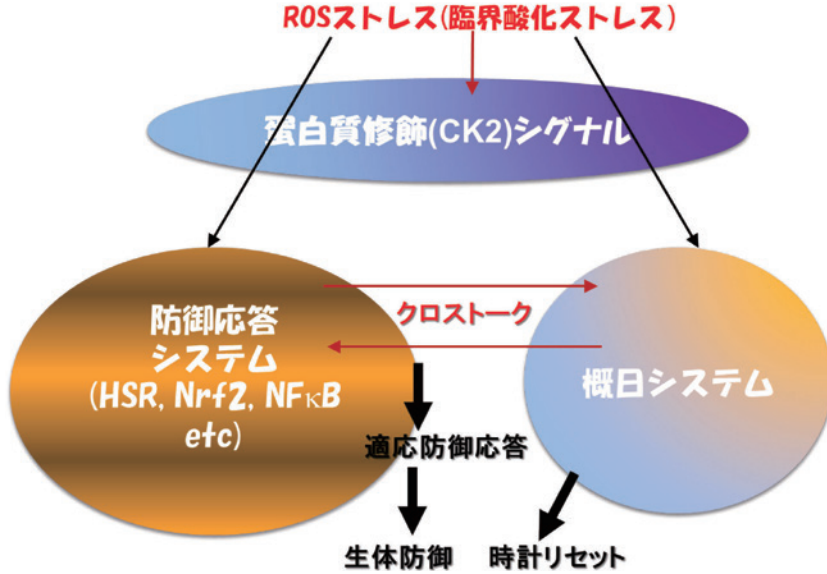


図 1

として、とくに普遍性と疾患との強い関連性から ROS に着目した。呼吸で得る酸素の～95% 以上は電子伝達系等で酸化されて最終的には水になるか水酸化反応によって酸化されるが、残りは完全には酸化されず、ROS が生成される。ROS の多くは、抗酸化系により還元・除去されるが、除去されずに残存した ROS は細胞内分子に損傷を与え、癌などの様々な疾患の要因となる。我々は、ROS による細胞の生死の境界となるようなストレス (臨界酸化ストレス) によって時計のリセットが起きることを発見した。その際の概日システムと HSR システムのクロストーク、すなわち HSR が時計リセットのトリガーとなり、概日システムは HSR を賦活することが、時計リセットとともに発動する細胞死抑制プログラムを賦活することを見出した [3]。このクロストークは、CK2 による BMAL1-S90 [2]、HSF1-T142 のリン酸化を介した BMAL1-HSF1 の相互作用の調節によって統御されることを明らかにした [3]。さらに、トランスクリプトーム解析により、CK2 シグナル、概日システム、HSR システムが中核となり、細胞生存のための防護系として抗酸化系 (Nrf2 を介する抗酸化酵素の転写など) や抗アポトーシス系 (NFκB を介する抗アポトーシス遺伝子の転写など) などが構成する複雑なネットワークを賦活し、細胞生存プログラムをコーディネートすることを解明した [3] (図 1)。

本研究により、ROS ストレスが概日システムのもつ適応防御機能として、細胞死抑制を賦活することを発見した。さらに、シビアな条件において「概日システムの同調性は細胞の生存に必須である」という新たな概念を示した。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Tamaru T et al: Synchronization of circadian Per2 rhythms and HSF1-BMAL1: CLOCK interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. PLoS One 6: e24521, 2011
2. Tamaru T et al: CK2α phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. Nat Struct Mol Biol 16: 446-448, 2009
3. Tamaru T et al: ROS stress resets circadian clocks to coordinate prosurvival signals. PLoS One 8: e82006, 2013

#### 癌生物時計の低酸素によるシフト

増淵 悟<sup>1</sup>, 八木田和弘<sup>2</sup>, 中村 渉<sup>3</sup>, 本間さと<sup>4</sup>, 本間研一<sup>4</sup> (<sup>1</sup>愛知医科大生理学 (旧生理学第 1), <sup>2</sup>京都府立医科大学生理学教室 (統合生理学部門), <sup>3</sup>大阪大学大学院歯学研究科口腔時間生物学, <sup>4</sup>北海道大学大学院医学研究科時間医学講座)

哺乳類生物時計は一群の時計遺伝子産物によって駆動される。転写促進因子 (CLOCK, BMAL1)

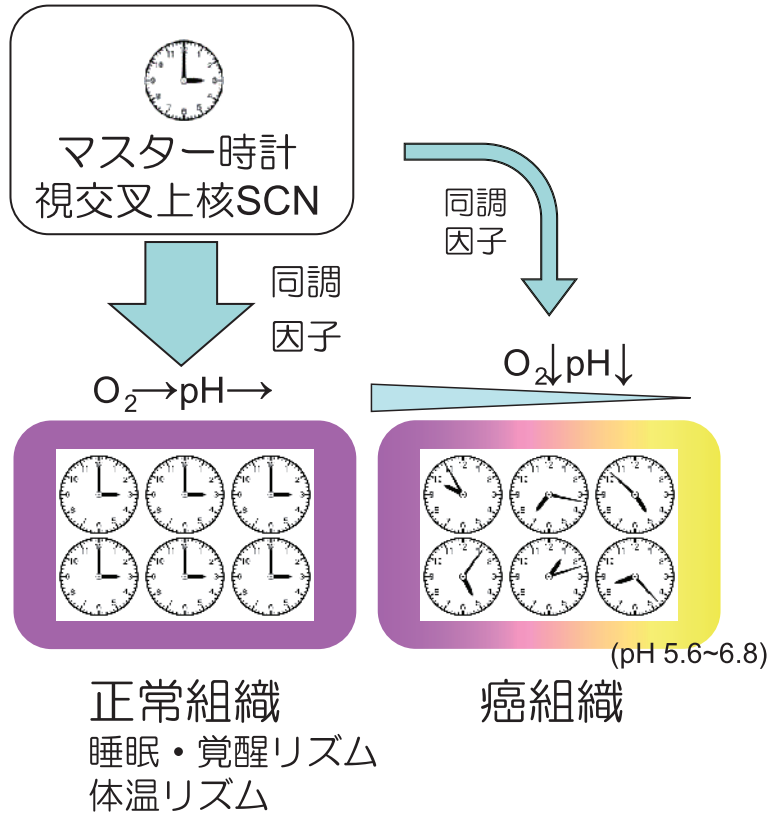


図 1

は抑制因子 (PER1, PER2, CRY1, CRY2, DEC1, DEC2) の遺伝子上流の E-box に結合, 転写を活性化し, その後産生された抑制因子は自身の転写を抑えることで約 24 時間の時計振動を作り出している (Trends Cell Biol **24**: 90-99, 2014). このネガティブフィードバックループからなるコアシステムは MAPK, CREB, cAMP などのシグナル伝達系や, SIRT1 のような細胞代謝感受性の HDAC, さらには Id2 (Masubuchi et al Curr Biol **19**: R298-R300, 2009 解説記事), PHLPP1 (Masubuchi et al PNAS **107**: 1642-1647, 2010) などの癌関連遺伝子を介して多彩な修飾を受けている.

視床下部視交叉上核 (SCN) には一群の時計遺伝子によりドライブされるマスター時計が存在する. 分子時計はセンター時計である SCN だけでなくほかの脳部位 (Masubuchi et al Euro J Neurosci **12**: 4206-4214, 2000) さらには全身の細胞に存在する. 正常個体において生物時計は SCN が全身の臓器にある下位の末梢時計を同調させる階層シス

テムを形成している. SCN によって自律神経活動リズム (神経性因子), ホルモンリズム (液性因子), 体温リズムが制御され, これら同調因子を介して全身の臓器, 細胞一つ一つに存在する末梢時計の時刻合わせが行われている (図 1). この末梢時計は給餌時刻の変化 (Front Neurosci **7**: 185, 2013), 薬剤投与 (Masubuchi et al **12**: 4206-4214, 2000) により行動や体温, ホルモンのリズムを伴い SCN から脱同調することが知られている. そのため末梢時計が生理機能をドライブするという作業仮説に基づき検証が進んでいる.

担癌個体において癌細胞はホストの生理環境下で生存しているため, 癌組織リズムも正常末梢組織と同様の同調因子でコントロールされていることが考えられる. しかし, 癌組織は正常組織とは異なり栄養血管の分布が不十分であるため SCN からの時計同調情報が伝わりにくく SCN と時計振動が同調しにくいことが考えられる. また血管からの距離に応じて組織内酸素濃度勾配, 低酸素

領域が生じておりこの厳しい環境下では、正常の末梢臓器にみられるような分子時計振動がなされていないことが考えられる。現在、癌治療の一つとして生体リズムに配慮し効果的な時刻に治療を行う「時間治療」が行われており一定の成果があがっている (Annals of Oncology 23: 3110-3116, 2012)。しかし、腫瘍組織内の低酸素領域は化学療法、放射線療法などの治療反応性が悪いことが知られており、より効果的な時間治療をデザインするためにもこの低酸素領域の時計振動を知ることが重要である。

我々は生物時計振動を示す癌細胞株に直接低酸素暴露を行い低酸素のタイミング、強さに応じて、生物時計が大きくリセットされることを見出した。この結果は実際の癌組織内において細胞時計の振動がかく乱されている、ないしは停止していることを示唆している (図1)。また、低酸素による培地の酸性化を抑えることで低酸素による癌細胞リズムのシフトが減弱されることを見出した。この結果は腫瘍組織においても低酸素環境で生じた代謝酸が腫瘍組織のリズムをかく乱していることを示唆している。

今後、我々は腫瘍の成長に伴う低酸素領域の拡大に対応した、腫瘍組織のリズム構築の時間的空間的な変化とそのメカニズムを明らかにすることを目標に研究を進める。その結果、腫瘍内のリズム振動が保たれているならば腫瘍への効果を重視した時間治療を、基礎実験から推測されるように腫瘍の時計振動に乱れが生じているならば宿主生体側のリズムに配慮し副作用の軽減をめざす時間治療を行うといった治療戦略が可能となる。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

### ヒト概日時計システムの個人特性

肥田昌子 (国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所精神生理研究部)

睡眠覚醒、体温、ホルモン分泌などの生理現象にみいだされる約1日を周期とする概日リズムは、個体のもつ内在性の概日時計に制御され、明暗サイクルなど環境因子に同調する [1, 2]。哺乳類では、視交叉上核に存在する時計 (中枢時計) が他の組織・器官の細胞に備わっている時計 (末梢時計) に階層的に作用して末梢時計リズムを統合しており、概日時計の発振機構には時計遺伝子群が構成する転写・翻訳制御のネットワークが深く関わっている [3-5]。そこで、皮膚切片から培養した細胞内で時計遺伝子の発現リズムを測定する方法を確立し、個人の概日時計機能の評価を試

みた [6, 7]。これまでヒトの概日リズムを正確に調べるには、特殊な施設、数週間におよぶ検査期間、生体試料の連続採取が必要であり、臨床研究に応用することは非常に困難であったが、生体試料の単回採取による測定法は簡便な概日時計機能評価法として期待される。

標準型生活者および夜型生活者の睡眠習慣を睡眠日誌と質問紙による主観的評価と活動量計記録による客観的評価を行い、さらに、各被験者から皮膚小切片を採取して初代線維芽細胞を樹立した。培養細胞に *Bmal1-luc* リポーター遺伝子 (時計遺伝子 *Bmal1* プロモーター-ルシフェラーゼ遺伝子) を導入し、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼの発光量の変化を記録したところ、培養細胞内において顕著な *Bmal1-luc* 発光リズムが観測された。この *Bmal1-luc* 発光リズムの周期を調べると、夜型生活者群は標準生活者群とくらべて長い周期を示した。さらに、*Bmal1* 遺伝子発現リズム周期の長さは、クロノタイプ (朝型夜型) をあらかず指標ならびに社会的制約を受けない休日の睡眠習慣 (入眠覚醒時刻) と有意に相関することが明らかとなった。一方、従来から生体リズムの指標とされてきたメラトニン分泌リズムに代表される生理機能リズムの周期は、クロノタイプや休日の睡眠習慣と相関しなかった。以上の結果から、内分泌リズムよりも培養細胞内時計遺伝子発現リズムの方が個人の概日時計機能を反映することが示された [7]。そこで、概日時計機能の異常や不適応から生じていると考えられている概日リズム睡眠障害患者を対象に各患者由来の末梢細胞における時計遺伝子発現リズムを測定し、患者個人の概日時計機能の評価を試みた。その結果、概日リズム睡眠障害の発症機序には時計周期の延長にくわえて周期長以外の概日機能障害が関わっていることが示唆された。

睡眠覚醒リズムの乱れ、不眠、過眠といった睡眠の問題には、一般の生活者から精神・神経疾患患者まで多くの人たちが悩まされており、特に、睡眠覚醒リズムの問題は、概日リズム睡眠障害をはじめ、うつ病などの気分障害において高い頻度でみとめられる。この昼夜逆転による生活リズムの乱れは患者の生活の質 (QOL) を低下させるのみならず精神疾患の再発をうながし社会復帰をさまたげる原因と考えられている。さらに、現代社会では、一般の生活者の多くも生活の夜型化やシフトワークなど不規則な生活リズムに悩まされている。このように睡眠覚醒リズムの問題は多くの人に關わる社会的な課題の一つであるが、正確な

診断法や根本的な治療法は確立していない。本研究で確立したヒトの生体試料を利用した概日リズム測定法は従来の方法とは異なり、簡便に個人の概日時計機能を評価する有用なシステムとなりうる。この測定法を活用することで、概日リズム睡眠障害や季節性感情障害など概日時計の障害によるさまざまな疾患の正確な診断ならびに有効な治療法の提供といった患者個人に合った医療の提供へつながることが期待される。また、不規則な生活リズムに悩まされている多くの一般生活者に関しても、その睡眠習慣の改善やQOLの向上に貢献できると考えられる。

本研究は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会により承認されており、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Pittendrigh CS: Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* **55**: 16-54, 1993
2. Reppert SM et al: Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**: 935-941, 2002
3. Yamazaki S et al: Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**: 682-685, 2000
4. Yoo SH et al: PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 5339-5346, 2004
5. Lowrey PL et al: Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **5**: 407-441, 2004
6. Brown SA et al: The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol* **3**: e338, 2005
7. Hida A et al: In vitro circadian period is associated with circadian/sleep preference. *Scientific reports* **3**: 2074, 2013

## ストレスと概日リズム

中尾みのり<sup>1,2</sup>, 内匠 透<sup>1,3</sup> (1)理化学研究所脳科学総合研究センター, (2)神戸大学大学院理学研究科, (3)JST, CREST)

概日リズムはシアノバクテリアから哺乳類に至るまで地球上ほぼ全ての生物に備わる約24時間周期のリズムであり、睡眠や覚醒、ホルモンの分

泌など種々の生理活動と深くかかわっている。概日リズムの環境応答として、光は最大と同調因子であるが、本シンポジウムでは、ストレスとの関連に関する未発表データを提示した。また最近ストレス反応と概日リズムをリンクする新規時計遺伝子を同定したので、本時計遺伝子に関して、ここに報告する。

概日リズムの分子機構として、時計遺伝子の転写・翻訳フィードバックループに基づく分子振動、中でも時計促進因子 *Bmal1*, *Clock* および時計抑制因子 *Per*, *Cry* が成す自己抑制型のループがそのコアとして機能することが知られているが、これら機構の全容は未だ明らかではなかった。

我々はクロマチン免疫沈降法 (ChIP) とマクロアレイおよび次世代シーケンサーを組み合わせた手法 (ChIP-Chip および ChIP-seq) より、コア時計遺伝子 BMAL1 の標的遺伝子を網羅的に解析し、新たに *Gm129* を同定し [1], この遺伝子を Chrono (ChIP-derived Repressor of Network Oscillator) と命名した [2]. *Chrono* mRNA は、概日時計の中核である脳視交叉上核 (SCN) と末梢組織 (肝臓, 心臓, 肺, 胃, 腎臓) において *Bmal1* とは逆位相の明確な振幅をもって発現していた。また ChIP-seq 実験より, *Chrono* プロモーター上の E-box 領域に BMAL1 が強く結合していることが確認された。加えて *Chrono* はタンパクレベルでも BMAL1 と逆位相の周期的な発現を示し, 免疫沈降 (IP) において CHRONO と時計構成因子 BMAL1, PER2, CRY2, DEC2 との結合が認められた。

時計機構の検討において、時計遺伝子の発現活性を可視化するレポーターアッセイが有効である。我々は、*Per2* プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したベクターを用い、NIH/3T3細胞内における *Per2* 発現活性を、*Chrono* およびコア時計遺伝子との共発現条件下にて比較した。*Chrono* の共発現は *Cry2* のそれと同様に *Per2* の活性を抑制し、また *Bmal1/Clock* により昂進された活性が *Chrono* または *Cry2* の共存によって消失した。これらの結果から *Chrono* は *Cry2* と同じく時計転写抑制因子として機能すると推察された。加えて細胞をヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤トリコスタチン A にて処置し同上のアッセイを実施したところ、*Cry2* は *Bmal1/Clock* 転写活性を抑制する一方、*Chrono* はこれを促進した。共免疫沈降より CHRONO と HDAC1 の結合が認められたことと合わせ、*Chrono* による転写抑制には HDAC を介したエピジェネティックな制御が関与すると推察された。

さらに NIH/3T3 細胞での ChIP-chip を用いた解析から, CHRONO が *Per2* のプロモーター E-box 領域へ周期的にリクルートされ, これは BMAL1 の周期と逆位相であることが確認された. 以上の結果より *Chrono* がコアの概日時計制御因子として機能することが示唆された.

また, *Chrono* の生理的機能の検証を目的とし, ジェントラップ法を用いて *Chrono* ノックアウト (KO) マウスを, また Cre-loxP システムを用いて Avp ニューロン特異的 *Chrono* KO マウスをそれぞれ作製し, これらの行動解析をおこなった. 恒暗条件において *Chrono* KO マウスおよび Avp ニューロン特異的 *Chrono* KO マウスは, 野生型 (WT) に比べて長い活動周期を示した. このことから *Chrono* が行動リズムの調節において重要な役割を担うと考えられた.

タンパクータンパク間の結合実験の結果から, CHRONO は他の抑制因子である CRY2, DEC2 と結合することが確認された. そこで我々は CHRONO が CRY2 または DEC2 と複合体を成して BMAL1/CLOCK の活性を抑制すると考え, *Cry2* KO および *Dec2* KO マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いてレポーターアッセイを実施した. しかし予想に反して, *Chrono* はこれらの細胞においても BMAL1/CLOCK 転写活性への抑制能を維持した. 加えて, *Chrono*, *Cry1* ダブルノックアウト (DKO) マウスを作製し行動解析をおこなったところ, 恒暗条件にて *Cry1*, *Cry2* DKO マウスにみられる行動周期の消失 [3] は認められなかった. 以上の結果から, CHRONO は CRY2, DEC2 と同様に BMAL1/CLOCK 複合体によって活性化される転写を抑制するが, CRY2, DEC2 とは独立していることが示唆された.

時計抑制因子 Cryptochrome はグルココルチコイド受容体 (GR) と結合し, その転写活性に影響を及ぼすことが知られている [4]. *Chrono* と *Cry2* の機能上の類似性を受け, 我々は *Chrono* のストレス応答に関する検証をおこなった. *Chrono* WT お

よび KO MEF に Dex 刺激を加えたところ, *Chrono* KO において *sgk1* mRNA 発現量が有意に増加した. また, *in vivo* でのストレス応答を検討する目的で, WT および *Chrono* KO マウスの拘束ストレス下における血清中コルチコステロン量を継時的に測定した. その結果, WT に比べて *Chrono* KO マウスにおいて, 拘束ストレス後 30 分, 1 時間のポイントでコルチコステロン量の有意な増加が見られた. IP-ウエスタンブロットから CHRONO と GR の内因的な結合が認められた. さらに拘束前と比べて, 拘束ストレス後 1 時間の時点で, *Chrono* mRNA 量が有意に上昇しており, この上昇は *Cry2* では見られなかった. 以上のことから *Chrono* はストレスに応答して発現上昇し, ストレス反応において抑制因子として寄与すると推察された.

本研究において, 我々は新規の時計遺伝子 *Chrono* を同定し, これが時計抑制因子として概日リズムの発振を担うとともに, ストレス刺激などによる代謝変動に関与することを明らかにした. *Chrono* はヒトを含む哺乳類にしか保存されていないことから, 精神機能など, より高次な機能との関連についての解明につながると期待される.

本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない.

1. Hatanaka F et al: Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism. *Mol Cell Biol* **30**: 5636–5648, 2010
2. Goriki A et al: A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the Mammalian circadian clock. *PLoS Biol* **12**: e1001839, 2014
3. van der Horst GT et al: Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **425**: 917–925, 1999
4. Lamia KA et al: Cryptochrome mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature* **480**: 552–556, 2011