

癌組織と宿主個体の概日リズム相互作用の解明

愛知医科大学

生理学講座 教授 増渕悟

大阪大学歯学研究科

口腔時間生物学研究室 准教授 中村渉

1. 背景

癌組織には血流からの酸素供給が乏しい低酸素領域があり、この領域にある細胞が治療抵抗性であると考えられている¹⁾。また、組織内低酸素の影響で癌細胞の時計遺伝子概日リズムが不整であることが考えられる。一方、癌患者の概日リズムに乱れが生じることが知られており予後不良の因子とされている²⁾。担癌動物においても行動リズムの不整が知られている³⁾。癌組織の低酸素が癌のリズム、ひいてはホストの行動リズム異常を引き起こし、病態との悪循環につながることを考えられる。この作業仮説で実験を行うため、その前段階として低酸素自体のマウス個体の行動への影響を評価する実験を行った。

2. 目的

哺乳類において睡眠覚醒、行動、体温、内分泌・代謝といった様々な生理機能に24時間のリズムがある。これらリズムは視床下部の神経核である視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) に存在する生物時計によりドライブされる⁴⁾。SCNには時計遺伝子群が作り出す1サイクル約24時間の転写翻訳のネガティブフィードバックループが存在しリズム発振を行っている⁵⁾。その一方、SCN以外の脳部位、さらには全身の末梢臓器にも時計遺伝子のリズムが存在する。このことから細胞・分子レベルのリズム発振は階層的に上位の生物時計システムをドライブし自律神経やホルモンなどを介して下位の生物時計をコントロールすることで個体としてのリズム発振につながると考えられる。SCNのリズムは網膜を介した外界の光入力によりリセットされる。そのため、生物時計は外界の光周期を感知し睡眠覚醒をはじめとする生理機能のピークを適切な時刻に合わせることができる。また、SCN外の末梢時計はSCNの支配を受けながらも食事や薬剤投与などによりリセットされる

性質がありこれら非光同調因子も環境への適応に重要と考えられる⁶⁾。

ヒトが登山などで急激に酸素濃度の低い環境に移動すると頭痛、消化器症状、疲労感、めまい、不眠といった症状からなる急性高山病「Acute Mountain Sickness」の症状を呈することがある。急性高山病は進行すると高地脳浮腫、高地肺水腫といった生命に危険が及ぶ病態に移行する⁷⁾。近年、多くの登山者が夜間登山を行っているが休息を取らずに短時間で登頂する夜間登山は失敗率が高いことが示されている⁸⁾。これは急性高山病によるものも多いと考えられる。生理学的にも4000m相当の低酸素環境下では昼間に比べて夜間の血中酸素飽和度が低下することが知られており夜間（休息期）登山での影響が考えられる⁹⁾。

今回、低酸素の影響の時間による違いを想定し、様々な時間帯にマウスを低酸素暴露し行動への影響を評価した。その結果低酸素暴露の時間帯によってその後の行動量に異なる影響が見られることが分かった。明期の低酸素暴露終了後の行動量変化（低下）が15時間後にまで及ぶことより、「遅い」生物学的反応としての時計遺伝子変動を考え低酸素暴露時の時計遺伝子脳内発現量の変化、及び時計遺伝子変異マウスでの低酸素反応の解析を行った。

3. 方法

動物個体の概日リズム測定はすでに報告した実験系^{10,11)}を愛知医科大学動物実験部門に作成し行った。マウスを個別に飼育ケージに移動しケージ上に設置した焦電型赤外線センサー（PS-3241、EK JAPAN）を用い活動量を検出した。さらにChronobiology kit (Stanford Software Systems)にてデータ収集を行った。明暗環境の制御は電子式タイムスイッチ（TB2301K、Panasonic）で行った。低酸素暴露実験は明期12時間、暗期12時間（約100lux）条件下及び恒常暗条件下で行った。低酸素暴露は行動測定中のマウスをケージごと透明な高気密のバックに移動し窒素ガスを注入することで行った。酸素濃度調整はバック内に設置した酸素モニター（OXY-1、ジコー）でモニタリングしながら行った。酸素濃度はハムスターにおいて主観的昼の時間帯に3時間の酸素濃度8%を暴露する先行研究¹²⁾があるため本研究でも8%とした。

4. 結果

マウス（ICR マウス）への低酸素暴露は明期 12 時間、暗期 12 時間の環境下で明期開始点、明期の midpoint、暗期の開始点、暗期の midpoint からそれぞれ 9 時間、8%の酸素濃度で行った。3 時間ごと（明期 4 点、暗期 4 点）の活動量データを低酸素暴露前の 1 周期（24 時間）の総活動量を 1 として相対値に変換、暴露前の 1 周期の値と比較して低酸素暴露の効果を評価した（two way ANOVA）。明期開始から 9 時間の（Daytime）低酸素暴露（n=8）によりそれに続く暗期の活動量が 12 時間にわたり低下した（ $P < 0.001$ ）。この低酸素暴露条件はそれに続く明期の活動量、次の暗期の活動量には影響を与えなかった。明期の midpoint（明期開始から 6 時間後）から 9 時間（Dusk）の低酸素暴露（n=8）は直後の暗期の活動量には影響を与えなかった。またそれに続く明期の活動量、次の暗期の活動量にも影響を与えなかった。暗期開始から 9 時間の（Nighttime）低酸素暴露（n=8）は暴露直後 3 時間の活動量の上昇をもたらした。またそれに続く明期の活動量、次の暗期の活動量には影響を与えなかった。暗期の midpoint（暗期開始から 6 時間後）から 9 時間の（Dawn）低酸素暴露（n=8）は 2 相性の効果が見られた。暴露直後 3 時間の活動量の上昇をもたらす一方、それに続く暗期の活動量を 9 時間にわたり抑制した。以上のことから低酸素暴露の効果に時刻依存性があることが明らかとなった。そして低酸素暴露は効果がみられるときは活動期の活動量を抑制すること、活動下降期の活動量を逆に上昇させることが分かった。

低酸素暴露は長時間、最大 18 時間後まで活動量に影響を与えるため、遅い生物学的プロセスの関与が考えられた。時計遺伝子は約 24 時間の周期で時計発振を行うためこの遅いプロセスを担っている可能性が考えられた。Daytime 低酸素暴露は長期（15 時間後まで）に 1 相性（抑制のみ）の行動変化を起こすことからこの条件で低酸素暴露を行い直後にサンプリングした脳（前脳全体）の mRNA を抽出し qPCR を行った（低酸素暴露：n=4、対照群：n=4）。その結果、分子時計を構成する転写抑制因子である *Per1*, *e4bp4* mRNA に約 2 倍の上昇、転写促進因子である *Bmal1*, *Dbp* mRNA に約 1/2 への低下が見られた。このことは低酸素暴露が時計遺伝子発現に影響を与え行動反応を起こす可能性を示唆していた。

そのため分子時計発振に必須の転写抑制因子である *Cry1* 及び *Cry2* のダブルノックアウトマウス¹³⁾を用いて低酸素暴露の影響を検証した。野生型（C57BL/6 マウス）においては ICR マウスと同様に Daytime 低酸素暴露（n=8）によりそれに続く暗期の活動量が低下した（ $P < 0.005$ ）。また Nighttime 低酸素暴露（n=8）によりそれに続く 3 時間、暗期の活動量が低下しその後 3 時間、活動下降期の活動量の増加がみられた（ $P < 0.0001$ ）。これは ICR マウ

スでの結果と同等の結果であった。一方 Cry1, Cry2 ダブルノックアウトマウス (C57BL/6 バックグラウンド) においては恒常暗環境下に移行すると行動リズムが消失し活動量のピークは存在しなくなるが明暗環境下では暗期移行直後にピークを持つ活動量の日内変動がみられる¹³⁾。最初に明暗条件下での活動量のピークへの低酸素の影響を評価した。野生型と同様に Daytime 低酸素暴露 (n=4) により暗期の活動量ピークが抑制され、さらに興味深いことに抑制された活動量ピークの後、暗期の最後 3 時間において活動量が上昇するという 2 相性の影響が見られた ($P < 0.0001$)。また、Nighttime 低酸素暴露ではその後の有意な活動量の変化はみられなかった。以上の結果を統合すると Cry1, Cry2 ダブルノックアウトマウスにおいては低酸素により夜間の活動期の活動量が抑制されるが、活動期自体の時間が短く野生型に比べ早く活動下降相に移行するため低酸素反応による活動量増加も野生型に比べて早く見られたといえる。

Cry1, Cry2 ダブルノックアウトマウスにおいては恒常暗条件下で活動量の日内変動が消失するためそれに対する低酸素暴露の効果を評価した。明期 12h、暗期 12h から消灯のタイミングで恒常暗へ移行後 36 時間後、明暗条件下では明期開始に相当する時刻から 9 時間 (Daytime corresponding) 低酸素暴露を行った。野生型においては恒常暗移行後も活動量の昼夜変動は維持されていた。Daytime corresponding 低酸素暴露 (n=4) は恒常暗条件下でも休息期に相当し直後の活動期の活動量を抑制した。また活動下降期である低酸素暴露 15 時間後から 3 時間の活動量の増加ももたらした ($P < 0.05$)。この結果は低酸素が活動期の活動量抑制、活動下降期の活動量促進をもたらすという点で明暗条件下での結果と同等といえる (図 2A)。一方 Cry1, Cry2 ダブルノックアウトマウスにおいてはすでに報告されているように恒常暗移行後は、明暗条件下で見られる活動量の日内変動が消失した。また野生型と同様、恒常暗へ移行後 36 時間後、9 時間 (Daytime corresponding) 低酸素暴露 (n=4) を行ったが、活動量ピークの消失に伴い低酸素への反応も消失していた。このことは活動ピークの有無と低酸素への活動量の反応が関連していることを示している。

5. 考察

一日のうちの様々な時刻での急性低酸素暴露がその後の活動量に与える影響を評価したところ低酸素の効果に時刻による差があることが明らかとなった。マウスでは休息期に相当する明期の低酸素暴露の効果が最も大きかったことはヒトでの休息期 (暗期) において

低酸素暴露の影響が大きい可能性を示唆する。近年、富士山登山などで問題になっている休息を取らずに夜を徹して行われるいわゆる「弾丸登山」の危険性との関連も考えられる。

明期の低酸素暴露により前脳で時計遺伝子発現が変化することから分子時計の関与を考え時計遺伝子変異マウス (Cry1, Cry2 ダブルノックアウトマウス) を用いた解析を行った。Cry1, Cry2 ダブルノックアウトマウスにおいて明暗条件下で暗期に活動量のピークが存在するときこの活動量のピークは低酸素暴露により影響を受ける。野生型と同様、活動期の活動量の抑制、活動下降期の活動量の上昇がみられたことより生物時計以外のシステムがこの活動量の低酸素反応を担っていると言える。さらに、恒常暗条件下で活動量のピークが存在しない時には活動量は低酸素暴露により影響を受けない。これらの結果から分子時計に制御されかつ時計遺伝子変異マウスにおいては明暗サイクルにより直接制御される Daily activity rising system が想定され、低酸素はここに働きかけ行動変化を引き起こすことが考えられた。このシステムの実態を解明することが生体の低酸素反応を知る、さらには急性高山病の病態を解明するうえで重要と考えられる。

謝辞

この研究は愛知医科大学医学部生理学、矢野多佳子助手、小松紘司助教、愛知医科大学医学部生物学、武内恒成教授、愛知医科大学医学部睡眠科、塩見利明教授、大阪大学大学院医学研究科放射線基礎医学、藤堂剛教授の協力により行われました。ここに深謝いたします。この研究成果は日本生理学会シンポジウム 29 概日リズム研究におけるトランスレーショナル・リサーチにおいて発表されました (演題: S29-2 低酸素によるマウス行動量変化の日内変動)。

参考文献

- 1) Kizaka-Kondoh S, Tanaka S, Harada H, Hiraoka M : The HIF-1-active microenvironment: an environmental target for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 61, 623-32, 2009.
- 2) Innominato PF, Lévi FA, Bjarnason GA : Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology. *Adv Drug Deliv Rev.* 62, 979-1001, 2010.
- 3) Mormont MC, Lévi F : Circadian-system alterations during cancer processes: a review. *Int J Cancer.* 70, 241-7, 1997.

- 4) Nakamura TJ, Takasu NN, Nakamura W : The suprachiasmatic nucleus: age-related decline in biological rhythms. *J Physiol Sci*. 2016 in press
- 5) Lowrey PL, Takahashi JS : Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. *Adv Genet*. 74, 175-230, 2011.
- 6) 増渕悟 : サーカディアンリズムと自律神経 自律神経 53 巻 1 号 2016 年
- 7) Taylor AT : High-altitude illnesses: physiology, risk factors, prevention, and treatment. *Rambam Maimonides Med J*. 2, e0022, 2011.
- 8) 山本 清龍, 荒牧 重雄 Kiyotatsu YAMAMOTO and Shigeo ARAMAKI : 富士山における登頂断念からみた山岳遭難事故に対するリスク管理と高山病 Risk Management Regarding Mountain Climbing Accident and Acute Mountain Sickness analyzed using Abandonments of Climbing Mt. Fuji. *環境情報科学 学術研究論文集* 26, 319-324, 2012.
- 9) Silva-Urra JA, Núñez-Espinosa CA, Niño-Mendez OA, Gaitán-Peñas H, Altavilla C, Toro-Salinas A, Torrella JR, Pagès T, Javierre CF, Behn C, Viscor G : Circadian and Sex Differences After Acute High-Altitude Exposure: Are Early Acclimation Responses Improved by Blue Light? *Wilderness Environ Med*. 26, 459-71, 2015.
- 10) Masubuchi S, Kataoka N, Sassone-Corsi P, Okamura H : Mouse Period1 (mPER1) acts as a circadian adaptor to entrain the oscillator to environmental light/dark cycles by regulating mPER2 protein. *J Neurosci*. 25, 4719-24, 2005.
- 11) Masubuchi S, Gao T, O'Neill A, Eckel-Mahan K, Newton AC, Sassone-Corsi P : Protein phosphatase PHLPP1 controls the light-induced resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 1642-7, 2010.
- 12) Stephenson R, Mohan RM, Duffin J, Jarsky TM : Circadian rhythms in the chemoreflex control of breathing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 278, R282-6, 2000.
- 13) Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, Hitomi K, Thresher RJ, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi JS, Sancar A : Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96,12114-9,1999.