



体内時計の分子機構を基盤にした 抗がん剤の創薬・育薬研究

小柳 悟*

九州大学大学院薬学研究院薬剤学分野

哺乳動物における時計遺伝子が発見されて以降、体内時計の研究は分子レベルでのリズム発振機構の解析を中心に目覚ましい発展を遂げてきた。近年の研究から、時計遺伝子の機能異常と各種疾患（睡眠障害、肥満、糖尿病、がん、循環器疾患など）との関連性も明らかにされつつあり、体内時計機構の臨床医学的意義の解明に注目が集まっている。また、体内時計から発振される概日リズムは薬物の効果・副作用の発現にも影響を及ぼし、薬物治療の成否をも左右する。これまでに我々は、体内時計研究から得られた知見や技術を薬理学、薬剤学の研究分野へ応用し、疾患治療の標的となる新たな分子の探索（創薬）や、薬物治療の効果を高める至適投与法の開発（育薬）を行ってきた。本稿では、抗がん剤の標的分子および薬物動態関連分子のリズム発振メカニズムを中心に、体内時計の分子機構を基盤にした創薬・育薬研究について紹介する。

1. はじめに

古くから、ある病気の発症や症状に周期性の経過を示すものがあることが知られている。例えば高血圧や狭心症、喘息などはそれらの症状が一日の中で特定の時間帯に悪化する。また、抗がん剤など薬物に対する生体（細胞）の感受性も生体機能の日周リズムと関連して時刻依存的に変化する。時間薬物療法とは生体機能の日周リズムを考慮し、薬物の至適投薬タイミング（一日の中での時刻）を設定することで、その効果を最大に副作用を最小にすることを指向した薬物療法である。一方、1997年に哺乳動物における*Clock* 遺伝子が発見されて以降、時計遺伝子を中心とした分子レベルでの概日リズム発振機構の詳細が明らかになってきた。しかしながら、リズム発振の本体であるコアループから睡眠・覚醒サイクルやホルモン分泌などの「表現形リズム」が発振されるメカニズムについては未だ多く謎が残されており、疾患の発症に認められる概日リズムについても、その制御機構はほとんど解明されていない。

近年の研究から、体内時計の機能異常は睡眠障害のみならず、肥満や、糖尿病、がん、循環器疾患などを引き起こす引き金になることが指摘されている。

骨髄や小腸上皮など、分裂の活発な組織における細胞の増殖能には概日リズムが認められているが[1, 2]、時計遺伝子の変異や欠損によって細胞周期の制御に関わる複数因子の発現に変化が生じることから[3, 4]、細胞増殖のリズムも体内時計によって制御されていると考えられる。また、がん化した細胞は活発に分裂を繰り返し増殖するが、その増殖能にも一日の中の特定の時間帯に充進する概日リズムが認められる[5]。時計遺伝子は、がん細胞の増殖リズムも直接あるいは間接的に制御していると考えられており、そのメカニズムの解明は新たな創薬ターゲット分子の発見にも繋がる可能性がある。

一般に、静止期の細胞に比べ増殖状態の細胞は抗がん剤に対する感受性が高いと考えられている。抗がん剤の効果は、生体（細胞）の薬物に対する感受性のみならず、その体内動態によっても規定されるが、がん化学療法においては、がん細胞に対して殺細胞効果を最大に、正常細胞に対しては毒性を最小にすることが重要である。近年このような細胞の感受性や薬物動態と関連した生体機能の概日リズムを考慮し、抗がん剤の投薬タイミングを設定することで、その有効性や安全性を高めようとする試みも行

*koyanagi@phar.kyushu-u.ac.jp 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1 TEL: 092-642-6611 FAX: 092-642-6614

われている（がん時間薬物療法）。

2. 腫瘍細胞における血管内皮増殖因子の発現リズム制御機構[6, 7, 8]

腫瘍はその増殖に際し、自らの成長に必要な酸素

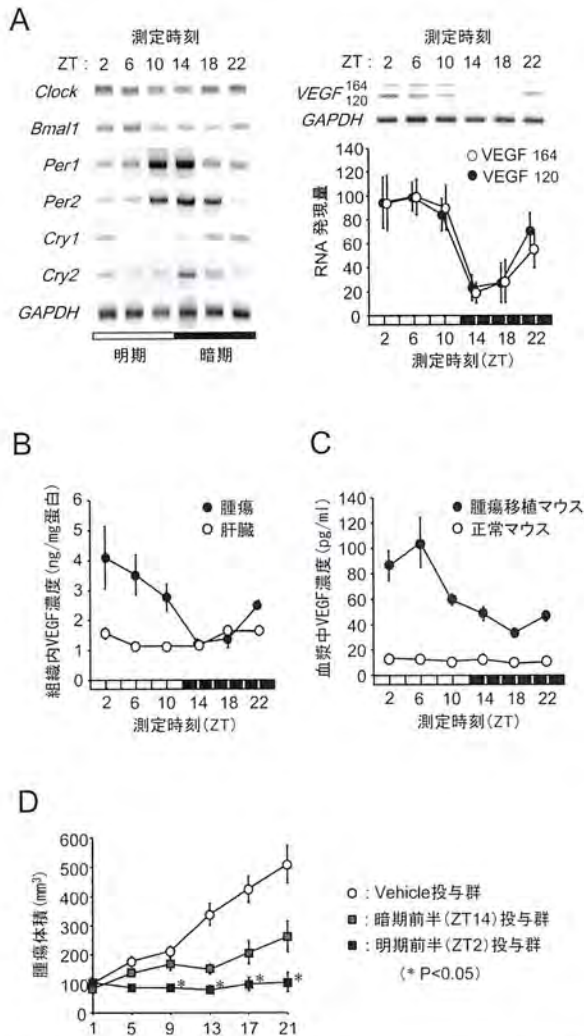


図1 VEGFの発現リズムを指標にした血管新生阻害薬の至適投薬タイミング設定

図Aは時計遺伝子（図左）およびVEGF遺伝子（図右）の発現リズムを示す。マウスにSarcoma180腫瘍細胞（ 10^6 cell）を移植し、2週間後（腫瘍体積 約200mm³）にTotal RNAを抽出、各遺伝子の発現量をRT-PCR法で測定した。データは平均±標準誤差（N=4-6）。ZT: Zeitgeber time. 図Bは腫瘍および肝臓内でのVEGF蛋白の発現量の日周リズムを示す。データは平均±標準誤差（N=4-6）。図Cは腫瘍移植マウスおよび正常マウスの血清中VEGF蛋白濃度の日周リズムを示す。データは平均±標準誤差（N=4-6）。図Dは抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害薬の投薬タイミングの影響を示す。明暗周期条件下で飼育したマウスのフットパットにSarcoma180腫瘍細胞を移植し、移植後3～5日目から各種の血管新生阻害薬（SU1498; 25 μg/匹）を明期前半（ZT2）または暗期前半（ZT14）のいずれかに隔日皮下投与した。対照群にはVehicle（10% DMSO/saline）を投与した。データは平均±標準誤差（N=8-10）。

や栄養素を獲得するため周辺組織に様々な因子を放出して新たな血管を形成する[9]。この過程において血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor: VEGF）は、血管透過性の亢進や内皮細胞の増殖を強力に促進する因子として、腫瘍血管新生の中心的な役割を担っている[10]。VEGFは内皮細胞膜上の受容体への結合を介して生理活性を発揮し、腫瘍組織内に新たな血管を形成させる。一般に、腫瘍細胞内におけるVEGF遺伝子の発現レベルは他の正常細胞内に比べ上昇しており、この発現レベルの上昇は疾病の予後にも影響を及ぼす。VEGFの発現には様々な因子の関与が報告されているが、低酸素環境は腫瘍細胞内でのVEGF遺伝子の発現を著しく亢進させる[11]。

血管新生阻害薬は腫瘍細胞を直接のターゲットとする従来の化学療法剤とは異なり、腫瘍の増殖に必要な酸素や栄養素を供給するための血管の新生を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する。2004年2月に、世界初の血管新生阻害薬であるベバシズマブが米国

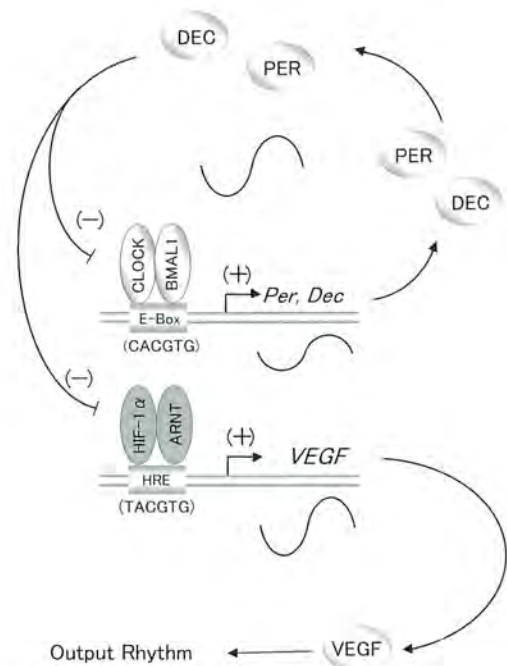


図2 腫瘍細胞内におけるVEGF遺伝子の発現リズム制御

時計遺伝子（PerおよびDec）のE-boxにCLOCK/BMAL1のヘテロ二量体が結合し、転写を促進する。産生したPERおよびCRY蛋白はCLOCK/BMAL1による自らの転写活性を抑制し、24時間周期で発現の増減を繰り返す。また、低酸素環境下にさらされた腫瘍細胞内ではHIF-1α蛋白が蓄積し、ARNTとヘテロ二量体を形成してVEGF遺伝子の転写活性を促進する。PER蛋白は、HIF-1α蛋白との相互作用を介してHIF-1α/ARNTによるVEGF遺伝子の転写活性を抑制する。

において承認され、現在では世界約100カ国で販売されている。ペバズマブはVEGFに対するヒト化モノクローナル抗体であり、わが国においても2007年6月に治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がんへの適応について販売が開始された。

我々はSarcoma180腫瘍細胞を移植したマウスを用いて、腫瘍細胞内におけるVEGFの発現には明期に高値を示す有意な日周リズムがあることを明らかにした(図1A)。マウスVEGF遺伝子の転写活性調節領域にはhypoxia response element (HRE)が存在し、低酸素環境に应答してVEGF遺伝子の転写活性を上昇させる。この転写活性の上昇にはHypoxia inducible factor (HIF) とARNTのヘテロ二量体が関与しているが、同様の機構はヒトVEGF遺伝子においても認められる[12]。ルシフェラーゼレポーターを用いた解析の結果から、PERIOD2とDEC2は、HIF1 α とのタンパク質間相互作用を介して、低酸素应答によるVEGF遺伝子の転写活性を抑制することが明らかになった。また、このタンパク質間相互作用には時刻依存的な変化が認められ、PERIOD2とHIF1 α との結合量が増大する時間帯ではVEGF遺伝子の転写活性は低下していた。このことから、腫瘍細胞内におけるVEGF遺伝子の発現は、図2に示すような体内時計のコアループが低酸素应答因子へ作用を繰り返すことによって引き起こされることが示唆された。

VEGFの蛋白濃度には腫瘍および血液中のいずれにおいても日周リズムが認められたことから(図1B、C)、次に、このリズムを指標にして血管新生阻害薬の至適投薬タイミングの設定を試みた。VEGFはその特異的受容体に結合し、チロシン残基のリン酸化を介してシグナルを伝達する。このシグナル伝達により内皮細胞の増殖やMatrix metalloproteinase (MMP)の活性化などが誘引され、腫瘍組織内に新たな血管が形成される[13]。Sarcoma180腫瘍細胞を移植したマウスにVEGF受容体リン酸化阻害剤(SU1498)をVEGFの発現が高値を示した明期前半(ZT2)、または低値を示した暗期前半(ZT14)のいずれかに隔日皮下投与した。対照群にはVehicle(10%DMSO saline)を投与した。図1Dに示すように、血管新生阻害薬による抗腫瘍効果は暗期前半投薬時に比べ明期前半投薬時において有意に増大した。また、データは示していないがSarcoma180以外の腫瘍細胞(Lewis lung carcinoma、B16melanoma)においても同様の結果が得られた。これらの検討から、血管新生阻害薬はVEGFの発現リズム

を指標にした投薬タイミングの設定によって、より高い抗腫瘍効果が期待できることが明らかとなった。同様の所見は、血小板由来増殖因子(Platelet-Derived Growth Factor:PDGF)においても認められ、PDGF受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブの抗腫瘍効果もPDGF発現の日周リズムに依存して変化した[14]。

抗がん剤の時間薬物療法においては、その至適投薬タイミングを設定するためのマーカーを同定することが有用であるが、作用機序の異なるいずれの血管新生阻害剤(MMP阻害剤、血管内皮細胞増殖阻害剤)においても血漿中のVEGF濃度が上昇する時間帯に投与することで高い抗腫瘍効果が認められた[6]。今後、ヒトを対象とした詳細な検討が必要ではあるが、血管新生阻害薬はVEGFを指標にした至適投薬タイミングの設定によって、より効率的な治療が行えることが期待される。

3. 肝臓における薬物代謝活性の日周リズム制御機構[15, 16]

抗がん剤の効果は生体(細胞)の薬物に対する感受性のみならず、その体内動態によっても規定される。薬物の体内動態は吸収、分布、代謝、排泄の各過程に関与する分子の機能によって規定されるが、それら薬物動態関連分子の発現にも日周リズムがあることが報告されている[17]。ヒトチトクロームP450の分子種のひとつであるCYP3A4は、現在市販されている医薬品の約半数(有効成分として約1,000種類)の代謝に関与する極めて重要な酵素であり、多くの抗がん剤の代謝にも関与する。CYP3A4による薬物代謝能には大きな個人差が認められており[18]、この原因を明らかにするため、その翻訳および非翻訳領域を含む遺伝子の多型解析に多くの労力が費やされてきた。しかしながら、本酵素活性の個人差を説明し得る変異は未だ発見されておらず、その発現調節や転写産物の安定性などに焦点をあてた研究も行われている。一方、CYP3A4の基質薬物の体内動態解析や尿中へのステロイド代謝物量の測定などから、本酵素の活性には日周リズムがあることが指摘されている[19, 20]。これまで、ヒトを対象にした生体リズム研究は、組織からの頻繁な細胞接種が制限されることから分子レベルでの解析が進んでこなかったが、我々は血清処理を施した培養ヒト肝細胞内において、CYP3A4遺伝子の発現は日周リズムを示すことを明らかにした[15]。CYP3A4遺伝子の転写活性調節領域にはPARbZIPタン

パクの結合配列が存在し、その転写活性はD-site binding protein (DBP) によって促進される。また、本サイトへのDBPの結合は、*CYP3A4* のmRNA量が上昇する際には高値を、減少する際には低値を示したことから、*CYP3A4* 遺伝子の発現リズムも時計によるコアルーブによって制御されていることが明らかになった。同様の所見は、*CYP2E1* など他のCYP分子種においても認められ、その基質となる薬物の代謝能も遺伝子の発現パターンと対応した日周リズムを示した[16]。

これらの研究は、同一個体内で薬物代謝酵素の活性が周期的に変動することの原因を示しているが、肝臓を含む末梢組織での時計機能は、明暗サイクルのみならず、食生活のパターンやストレスなどによっても影響を受け変化する。そのため、ヒトの末梢時計から発振されるリズムには大きな個人差があることが予想されるが、このことは体内時計の制御下にある薬物代謝酵素活性の個人差にも結びつく可能性もある。これまで薬物代謝活性の個人差は、主にSingle Nucleotide Polymorphism (SNP) を中心とした遺伝子多型にその原因を求めてきたが、今後は体内時計の機能変化なども考慮に入れた原因追求が必要になるかもしれない。

4. 消化管における薬物トランスポーターの日周リズム制御機構[21]

経口投与された薬物は、主に小腸から吸収され、門脈から肝臓を経て全身循環血に入る。小腸上皮細胞には種々の輸送担体(トランスポーター)が発現しており、効率的な栄養成分の吸収と生体にとって有害な物質の侵入を防ぐ働きがある。*ABC1B1* 遺伝子によってコードされるP糖タンパク質Mul-

tidrug resistance protein 1 (MDR1) は、免疫抑制剤であるシクロスポリンや、狭心症治療薬であるジゴキシンなど多くの薬物を基質とし、消化管腔側から小腸上皮細胞内に取り込まれた化合物を再び消化管内へ汲み出す排泄型トランスポーターとして機能している[22]。そのため、MDR1の機能変化は経口投与された薬物の吸収に大きな影響を及ぼす。マウスの小腸における*Abc1b1a* 遺伝子mRNAの発現およびジゴキシン取り込みには、いずれも有意な日周リズムが認められ、それらリズムは互いに逆位相を示した(図3)。一方、*Clock* ミュータント(*Clk*/*Clk*) マウスの小腸における*Abc1b1a* mRNAの発現量およびジゴキシン取り込みには日周リズムが認められず、いずれの測定時刻においても*Abc1b1a*の発現量は低値を、ジゴキシンの取り込み量は高値を示した(図3)。ルシフェラーゼアッセイおよびクロマチン免疫沈降による解析の結果から、*Abc1b1a* 遺伝子の転写活性リズムは、PARbZIP転写因子によって制御されていることが明らかになった。最近、PARbZIP転写因子はpeptide transporter 1をコードする*Slc15a1* 遺伝子など、他のトランスポーターの発現リズムの制御にも関わっていることが報告された[23]。これらの事実からも、消化管における時計遺伝子は*Abc1b1a* 遺伝子などの発現リズム制御を介して、トランスポーターの基質となる薬物の体内動態に影響を及ぼすことが示唆された。

一方、一部の腫瘍細胞においてはP糖タンパク質が高発現し、細胞内に取り込まれた薬物を細胞外へ排泄することで抗がん剤耐性を引き起こす[24]。興味深いことに、血清処理を施した培養マウス結腸癌細胞においても、*Abc1b1a* 遺伝子の発現には約

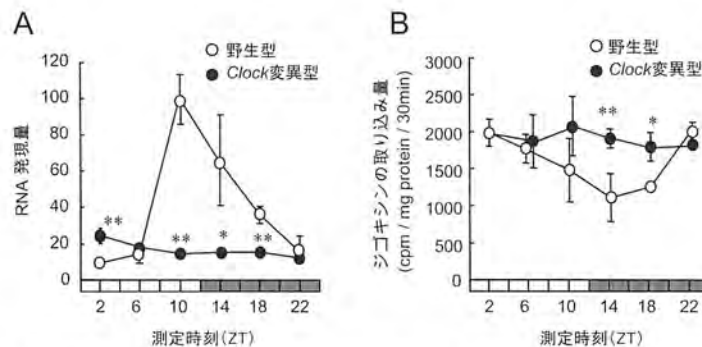


図3 *Clock* 変異マウスの小腸における*Abcb1a* 遺伝子の発現リズムの変容
 図Aは野生型および*Clock* 変異型マウスの小腸における*Abcb1a* 遺伝子の発現量を示す。マウスの小腸からTotal RNAを抽出、各遺伝子の発現量をRT-PCR法で測定した。データは平均±標準偏差 (N=3)。ZT: Zeitgeber time. **P<0.01, *P<0.05。図Bは野生型および*Clock* 変異型マウスの小腸への [³H]-ジゴキシンの取り込み量を示す。データは平均±標準偏差 (N=3)。ZT: Zeitgeber time. **P<0.01, *P<0.05。

24時間周期のリズミカルな変動が認められ、この発現リズムは*Clock* 遺伝子をノックダウンすることで消失した[21]。このことから、がん細胞内における時計遺伝子は、P糖タンパク質など薬物の排泄を担うトランスポーターの発現制御を介して、細胞の抗がん剤に対する感受性に影響を及ぼすことが示唆された。

5. おわりに

哺乳動物における最初の時計遺伝子が発見されて以降、体内時計の研究は分子レベルでのリズム発振機構の解明を目指す方向で目覚ましい発展を遂げてきた。一方、これら基礎研究から得られた成果を疾病の診断や治療に応用しようという試みは進歩が遅れており、今後の臨床応用への展開が期待される。本稿では体内時計の分子機構による抗がん剤の標的分子および薬物動態関連因子の発現リズム制御機構を中心に、抗がん剤の新たな創薬への可能性と、その治療効果を高める至適投与法の開発（育薬）について概説した。

分子生物学の発展に伴いヒトゲノムについての情報が蓄積されるなかで、従来までの集団の医療から個の医療（テーラーメイド医療）へとその重点が移りつつある。これまでのテーラーメイド医療を指向した研究の多くは、遺伝子の多型解析に基づいた薬物感受性の個人差を究明することが中心であった。しかしながら、遺伝子の変異だけでは薬効の個人差を十分に説明できないケースも数多く認められる。これは、多くの疾患の発症がそうであるように、薬効の個人差にも遺伝的な先天性の要因に加え、環境や生体機能の変化など後天的な要因の影響も大きいことを示唆している。体内時計機構は強固なリズム発振機能と周囲の環境変化への柔軟な対応力とを兼ね備えたシステムである。このようなシステムが疾病の病態や薬の効果を制御している事実は、これからの医療において、従来までの多型解析などによる遺伝子の「質」の評価に、体内時計システムに代表されるような遺伝子の「量」の変化をも加味することの必要性を意味している。体内時計による病態や薬効の制御に関わるメカニズムの解明と、それを体系化し臨床応用するための理論を構築することは今後ますます重要になるであろう。

謝辞

今回の日本時間生物学会奨励賞受賞の榮譽に接し、この総説を執筆する機会を頂きました。本稿で紹介

させていただいた研究は、多くの方々の協力なくして成し得ないものでした。特に、大学院時代から指導してくださいました九州大学の戸茂弘教授、福岡大学薬学部で研究への深いご理解と手厚い支援をいただきました古野廣司教授、添田泰司教授には、心から感謝申し上げます。また、福岡大学薬学部において、私がまだ指導面でも手探りあったにもかかわらず、現在の研究の基盤を築いてくれました中川博雄博士（現・長崎大学）、藏元佑嘉子博士（現・福岡大学）には、あらためてお礼申し上げます。最後になりましたが、生体リズム研究という昼夜を問わないハードな実験をいつも心強くサポートして下さいます九州大学の松永直哉博士と薬剤学分野の大学院生の皆さんに、この場を借りて深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Bjarnason GA, Jordan RC, Sothorn RB: Am J Pathol 154:613-622 (1999)
- 2) Granda TG, Liu XH, Smaaland R, Cermakian N, Filipski E, Sassone-Corsi P: FASEB J 19:304-306 (2005)
- 3) Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H: Science 302:255-259 (2003)
- 4) Fu L, Patel MS, Bradlev A, Waqner EF, Karsenty G: Cell 122:803-815 (2005)
- 5) Nakagawa H, Koyanagi S, Kuramoto Y, Yoshizumi A, Matsunaga N, Shimeno H, Soeda S, Ohdo S: J Pharmacol Sci 107:401-407 (2008)
- 6) Koyanagi S, Kuramoto Y, Nakagawa H, Aramaki H, Ohdo S, Soeda S, Shimeno H: Cancer Res 63:7277-7283 (2003)
- 7) Nakagawa H, Koyanagi S, Takiguchi T, Kuramoto Y, Soeda S, Shimeno H, Higuchi S, Ohdo S: Cancer Res 64:8328-8333 (2004)
- 8) Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Imanaka T, Imaizumi T, Kondo J, Noshiro M, Koyanagi S, Kusumi T, Kato Y, Kijima H: Genes Cells 13:131-144 (2008)
- 9) Folkman J. N Engl J Med 285:1182-1186 (1971)
- 10) Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel, A, Manseau, EJ, Van de Water L, Senger, DR: J Exp Med 174:1275-1278 (1991)
- 11) Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA: J

- Biol Chem 270:13333-13340(1995)
- 12) Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: Mol Cell Biol 16:4604-4613(1996)
 - 13) Liekens S, Clercq ED, Neyts J: Biochem Pharmacol 61:253-270(2001)
 - 14) Nakagawa H, Takiguchi T, Nakamura M, Furuyama A, Koyanagi S, Aramaki H, Higuchi S, Ohdo S: Biochem Pharmacol 72:1237-1245(2006)
 - 15) Takiguchi T, Tomita M, Matsunaga N, Nakagawa H, Koyanagi S, Ohdo S: Pharmacogenet. Genomics 17:1047-1056(2007)
 - 16) Matsunaga N, Ikeda M, Takiguchi T, Koyanagi S, Ohdo S: Hepatology 48:240-251(2008)
 - 17) Ohdo S: Drug Metab Pharmacokinet 22: 3-14(2007)
 - 18) Lown KS, Thummel KE, Benedict PE, Shen DD, Turgeon DK, Berent S, Watkins PB: Clin Pharmacol Ther 57:16-24(1995)
 - 19) Smith RB, Kroboth PD, Phillips JP: J Clin Pharmacol 26:120-124(1986)
 - 20) Min DI, Chen HY, Lee MK, Ashton K, Martin MF: Pharmacotherapy 17:457-463(1997)
 - 21) Murakami Y, Higashi Y, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S: Gastroenterology 135:1636-1644(2008)
 - 22) Stephens RH, Tanianis-Hughes J, Higgs NB: J Pharmacol Exp Ther 303:1095-1101(2002)
 - 23) Saito H, Terada T, Shimakura J, Katsura T, Inui K: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 295:G395-402(2008)
 - 24) Litman T, Druley TE, Stein WD: Cell Mol Life Sci 58:931-959(2001)