

平成30年度 ほくぎん若手研究者助成金 研究実績報告書

氏名	所属・職名	助成金額
岡崎 史泰	大学院医学薬学研究部(薬学) 医療薬学研究室・助教	900,000 円
研究課題名	Sirt1 に着目した抗がん剤投薬による日周リズム変動メカニズムの解明	
研究の概要	<p>スルファサラジンは酸化還元ストレスを増大させ、がん幹細胞に対しても効果をもつ新規抗がん剤として期待されている。申請者は、時間薬物療法を応用することでスルファサラジンの抗腫瘍効果を増大させることを確認している。しかし、抗がん剤は一般的に日周リズムを変動させることが報告されており、そのメカニズムを解明することは時間薬物療法を臨床で使用する上で重要なテーマである。本研究では、酸化還元反応に関わる NAD(H)依存的に活性を示すヒストン脱アセチル化酵素 Sirt1 が時計遺伝子に Clock のヒストンアセチル化作用に拮抗することに着目し、①日周リズムを維持および変動させるスルファサラジンの投薬時刻の決定と②そのメカニズムを解明する。</p>	
研究の成果	<p>①日周リズムを維持および変動させるスルファサラジンの投薬時刻の決定</p> <p>申請者は既報 (Okazaki F <i>et al.</i>, Cancer Res. 2017) で、スルファサラジンの抗腫瘍効果の作用点であるシスチントランスポーター-xCT は、時計遺伝子応答配列 E-box を介し標的遺伝子の発現量を増大させる Clock によって制御されることを明らかにしている。そこで、E-box に作用し時計遺伝子の中核である Bmal1, Clock, Per2, Cry1 に着目し、xCT をノックダウンさせた細胞中の時計遺伝子発現量を qRT-PCR を用い測定した。その結果、コントロール群と比較し xCT ノックダウン細胞では、転写促進因子である Bmal1 及び Clock 発現量は減少し、転写抑制因子である Cry1 及び Per2 は増加した。</p> <p>Colon 26 移植マウス(明期 7:00-19:00)の腫瘍組織では、Bmal1 及び Clock 発現量は、17:00-21:00 に低値、Per2 及び Cry1 は 17:00-1:00 に高値を示す日周リズムが存在する。xCT ノックダウン細胞での時計遺伝子発現量の変動結果から、時計遺伝子の日周リズムの位相が対応する 17:00 と位相が対応しない 5:00 にスルファサラジンを投薬した後の時計遺伝子発現量を qRT-PCR を用い測定した。その結果、17:00 投薬群では時計遺伝子発現量の位相に変動はなく、Cry1 及び Per2 については発現量の低値と高値の振幅幅が約 2 倍増大した。一方、5:00 投薬群では、Bmal1 及び Clock の位相がマイナス 4-8 時間ずれ、Cry1 及び Per2 は振幅幅が 1.5-3 倍減少した。</p> <p>②メカニズムの解明</p> <p>NAD⁺ 合成の律速酵素である Nampt 発現量は、腫瘍組織中では有意な日周リズムは存在しなかった。また、スルファサラジンは Nampt 発現量にも影響を与えなかったため、NAD⁺ の合成には影響を与えないことが示唆された。そこで、ヒストンアセチル化状態が投薬時刻によって維持・変動するか確認することを目的として実験を行なっている。ヒストンは、通常のタンパク質抽出方法では採取できないため、難溶性核分画を抽出する方法を選択した。また、ヒストンのアセチル化は、Lys 残基の部位によって制御する因子が異なる。そのため、Lys 残基ごとのアセチル化量を測定するために western blot 法で測定することとした。現在まで、ヒストン H3 量の測定を完了しており、今後ヒストン H3 アセチル化量を Lys 残基ごとに測定する。</p>	

<p>研究成果発表状況</p>	<p>該当なし</p>		
<p>経費の執行状況</p>	<p>区分</p>	<p>執行額(円)</p>	<p>備考</p>
	<p>実験動物・飼育費</p>	<p>116,196</p>	
	<p>遺伝子実験</p>	<p>396,579</p>	
	<p>Western blot 関連</p>	<p>135,192</p>	
	<p>培養実験</p>	<p>128,680</p>	
	<p>その他</p>	<p>123,353</p>	
	<p>計</p>	<p>900,000</p>	