

Thesis

掲載論文は学位論文(Thesis)であり原著論文ではない。

従って掲載論文を他論文で引用することを禁止する。

腎癌細胞におけるHIF1 α と*Per2*概日リズムの関連

臨床医学研究系 泌尿器科学

岡部 尚志

【目的】血管新生は腫瘍増殖や転移に深く関連しており、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る。一方、24時間周期で変動する生理現象であ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*, *Cry 1/2*, *Bmal1*, *Clock*などの時計遺伝子により調節されている。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ているが、HIFと時計遺伝子の関連はほとんど報告がなされていない。本研究では腎癌細胞株においてHIF1 α と時計遺伝子との関係について検討した。

【方法・結果】まず、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た。その結果、*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を認め、他の腎癌細胞では概日リズムを認めなかった。Caki-2細胞とその他の細胞の特性の違いを検討すべく、各腎癌細胞におけるBMAL1, CLOCK, PER2, CRY1, HIF1 α 蛋白の発現をウエスタンブロット法で検討した。その結果、CRY1蛋白の発現は全ての細胞に認められ、BMAL1, CLOCK, HIF1 α 蛋白のいずれにおいても有意な蓄積を認めたのはCaki-2細胞のみであった。さらに、Caki-2細胞において、HIF1 α とその結合因子であるARNTの発現ベクターを共に細胞移入することで、*Per2*の転写活性の概日リズムの振幅は有意に上昇し、さらにHIF1 α 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*転写活性の概日リズムの振幅を有意に減弱させた。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 α の結合配列であるhypoxia response element (HRE)を同定した。さらに、ChIPアッセイによってHRE配列にHIF1 α が結合することが示された。

【結論】腎癌細胞であるCaki-2細胞において、*Per2*は細胞レベルで自律的に概日リズム性発現を認め、またHIF1 α は*Per2*のプロモーター領域に結合することで概日リズムの振幅を増強させることが示された。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 α 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 α 誘導性の低酸素経路を標的としている腎癌治療に、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る。

緒言

腎細胞癌は、腎に発生する原発性腫瘍のうち約90%を占めており、またすべての悪性腫瘍の約2%を占めている¹⁾。Von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子の変異は腎細胞癌の多くに認められ²⁾、腎細胞癌の発症との関係が報告されている³⁾。正常細胞において、VHL遺伝子は転写調節因子である低酸素誘導因子(HIF; hypoxia inducible factor)の分解に関与しており、HIF1は2つのサブユニット、すなわち低酸素応答に直接関係するHIF1 α と恒常的なA核内タンパクであるHIF1 β またはAryl hydrocarbon Receptor

Nuclear Translocator (ARNT) から構成される⁴⁾。HIF1 α は、正常組織において正常の酸素濃度分圧下ではVHL蛋白によりユビキチン化され、プロテアソームにより速やかに分解される⁵⁾が、低酸素またはVHL遺伝子の変異はこの経路を抑制し、HIF1 α の急速な蓄積が生じる。HIF1 α は、結合領域であるhypoxia responsive element (HRE) に結合することで血管新生因子であるVascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の転写を誘導し^{6,7)}、腫瘍血管の増殖を促すことで腫瘍進展に関与している⁸⁾。したがって、HIF1に誘導される遺伝子経路は腎細胞癌治療の重要な標的となっている³⁾。

24時間周期で変動する生理現象である概日リズムは地球上の殆どの生物にみられ^{9,10)}、哺乳類では*Per1/2/3*,

Cry 1/2, *Bmal1*, *Clock*などの時計遺伝子の転写フィードバックループにより調節されている¹¹⁾。具体的には、BMAL1/CLOCKヘテロダイマーがE-box (CACGTG)と呼ばれる配列に結合することにより転写促進因子として働き¹⁹⁾, *Per*, *Cry*などの発現・転写を促進する。生じたPER, CRY1タンパクの複合体が抑制因子として働き, BMAL1/CLOCKヘテロダイマーを抑制し, 自らの転写活性を抑制する。この転写, 翻訳の周期が約24時間であり, 細胞の概日リズムを規定している¹²⁾。これら時計遺伝子の中でも*Per2*遺伝子は, 概日リズム形成に必須である¹³⁾ばかりではなく, 癌抑制遺伝子としての機能や, 乳癌における変異や発現低下が報告されている^{14, 15)}。諸家の報告から, *Per2*の発現低下や変異は種々の癌において腫瘍進展のリスクファクターとなる可能性が示唆されているが, 腎癌における*Per2*の機能, また腎癌治療の重要な標的であるHIF1 α と*Per2*の関連に関してはほとんど報告がなされていない。本研究では, 腎癌細胞株8種類のうちCaki-2細胞においてのみ*Per2*の転写レベルでの概日リズム発現を認め, HIF1 α は*Per2*プロモーター領域に存在するHRE配列に直接結合することで概日リズムの振幅を増強することを明らかにした。

材料と方法

細胞培養と薬剤

腎癌細胞株であるA704, ACHN, 786-O, A498, 769-P, and Caki-2はAmerican Type Culture Collection (ATCC)より購入し, RCC4+vector alone, RCC4+VHLはSigmaより購入した。これらの細胞は, 10%ウシ胎児血清(FBS; Life Technologies), 24 U/mLペニシリン, 25 μ g/mLストレプトマイシン(Gibco)を加えたRoswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 (Kojin Bio)を用い37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂環境下で培養した。さらに, 培養細胞における自律的な概日リズム発現のモデルである¹⁷⁾マウス繊維芽細胞NIH3T3とヒト骨肉種細胞U2OSを使用した。これらの細胞は, 10% FBS, ペニシリン (24 U/mL), ストレプトマイシン (25 μ g/mL)を加えたDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用い37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂環境下で培養した。天然フラボノイドであるクリシンはSigmaより購入し, ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し4 $^{\circ}$ Cで保存した。

マウス*Per2*プロモーターのクローニングと変異体の作成

マウス*Per2*プロモーターはマウスゲノム由来DNA (Novagen)を鋳型として, プロモーター領域(-2882 ~ +112 bp)に設定したプライマーを用いてPCRを行い, 得られたPCR産物はpGL3 Basic (Promega)に導入した。HREの変異体は, KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo)を用いて作成した。

*Per2*プロモーター活性のリアルタイム計測

トランスフェクション2日前に各細胞を35 mmプレートに播種し, lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用い

てトランスフェクションした。24時間後, 細胞は0.1 μ M デキサメサゾン (Nakalai Tesques)で2時間処理し, 10% FBS, 10 mM HEPES バッファー (pH 7.2), 0.1 mM ルシフェリン (Toyobo), 24 U/mLペニシリン, 25 μ g/mL ストレプトマイシンを含む培地で置き換え, Kronos Dio (AB-2550; ATTO)によって10分間隔で発光量を測定した。各々の実験は4回以上繰り返し行った。生物発光は, relative light units (RLUs)として表示し, 得られた波形のリズム性と振幅は, それぞれCosinor, Acro (Circadian Rhythm Laboratory)を用い測定した³¹⁾。

リアルタイムRT-PCRによるRNAの定量

各細胞はデキサメサゾンで2時間処理し, 処理から24時間経過した時点から4時間間隔で24時間にわたって, 各タイムポイントにおいてそれぞれ6プレートからRNAを抽出した。RNA抽出にはISOGEN (日本ジーン)を用いた。RNAは逆転写酵素で1本鎖DNAを合成後, *Per2*および*Gapdh*特異的プライマー, One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Takara)を用いてABI 7300 (Applied Biosystems)により定量化した。プライマーは, 以下の組合せを用いた。

Per2 (GenBank accession no. NM_022817, amplicon 85 bp): sense primer

5'-CACACACAGAAGGAGGAGCA-3' and antisense primer

5'-AGTAATGGCAGTGGGACTGG-3'

Gapdh (GenBank accession no. M33197, amplicon 185 bp): sense primer

5'-GAGTCAACGGATTGGTCGT-3' and antisense primer

5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

ウエスタンブロット

培養細胞を剥離し, 溶解緩衝液で溶解した後全細胞溶解液を4 $^{\circ}$ C, 10,000 x g, 15分間遠心後, 上清をウエスタンブロットに用いた。全細胞抽出液(20 μ g)は, SDS-ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し, ニトロセルロース膜に転写後, 各々の抗体を用いてウエスタンブロットを行い, ECL detection kit (Amersham Bioscience)にて検出した。以下の抗体を一次抗体として使用した。抗PER2抗体, 抗CRY1抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗CLOCK抗体 (Thermo Scientific), 抗GAPDH抗体 (Sigma), 抗HIF1 α 抗体 (BD Transduction Laboratories), 抗BMAL1マウスモノクローナル抗体 (自家製抗体)。

ルシフェラーゼアッセイ

レポーターコンストラクトおよび一過性細胞発現コンストラクトはLipofectamine 2000 (Invitrogen)によってNIH3T3細胞に導入した。NIH3T3細胞は24 wellプレートにトランスフェクションの前日に1 wellあたり5万個となるように播種した。発現効率の補正のため内部標準としてphRG-TK (Promega)を共発現させた。1 wellあたり60 ngのレポーターベクター, 50 ngの発現ベクター, 6 ngのphRG-TKベクターを混合し, さらに最終のDNA濃度を一定にするためpcDNA3を加えて合計260 ngとした。

トランスフェクション後 24 時間経過した時点において、細胞は PBS で洗浄後、Passive Lysis buffer (Promega) を用いて溶解し、Dual Luciferase Assay kit (Promega) によってホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。測定には Fluoroskan Ascent FL ルミノメーター (Labsystems) を使用した。

ChIP アッセイ

ChIP アッセイキット Magna-ChIP (Millipore) を使用し、プロトコルに従って行った。Caki-2 細胞を 100 mm プレートに 6×10^6 細胞になるよう播種し、24 時間後、最終濃度 1% となるように 16% パラホルムアルデヒド (和光純薬) を加え室温で 15 分間インキュベートし、タンパク質・DNA の架橋を行った。氷冷した $1 \times$ PBS で二回洗浄した後、プロテアーゼインヒビターカクテルを含む 1 mL の PBS を加え細胞を回収し、プロトコルに従い細胞の溶解を行った後、Branson 2510 Ultrasonic Cleaner (Branson) を用い超音波処理によってクロマチン DNA の断片化を行った。抗 HIF1 α 抗体 (Novus Biologicals) とネガティブコントロールとして抗マウス IgG 抗体 (ミリポア) を用い免疫沈降 (IP) を行った後、プロトコルに従って DNA の脱架橋と精製を行った。断片化されたクロマチン DNA の 10% も同様に脱架橋と精製を行い、得られた DNA は Input control として使用した。ヒト *Per2* 遺伝子のプロモーター領域に存在する HRE 配列に特異的なプライマー (− 417 ~ − 290 bp, sense primer: 5'-TCCATTGAGGAACCGACGAG-3', antisense primer: 5'-CGTCTCATCTGCATACATGAGGG-3') を用い、PCR 法を用い増幅した。

統計分析

結果は平均 $\pm$ 標準誤差にて表記し、統計学的有意差は t 検定, one-way ANOVA によって計算した。

結 果

Per2 プロモーターおよび mRNA は Caki-2 細胞で概日リズムを発現する

まず、腎癌細胞株における *Per2* のプロモーター活性の概日リズム発現の有無を検討するために、各細胞で Kronos Dio を用いプロモーター活性を継続的に測定した。その結果、*Per2* のプロモーター活性は Caki-2 細胞においてのみ概日リズムを認め、その他の細胞では概日リズムの発現を認めなかった (Fig. 1a)。次にリアルタイム RT-PCR によって各細胞における *Per2* mRNA の発現を解析したところ、デキサメサゾン刺激終了後 24 時間目より発現の増加がみられ、約 28 時間目でその発現はピークに達し、その後 48 時間までの間に徐々に低下した (Fig. 1b)。統計解析 (one-way ANOVA) ではこの発現変動に有意差 ($p < 0.01$) があることが示された。

Per2 のプロモーター領域配列の解析

過去の報告より、*Per2* の転写レベルでの概日リズム発現には、E-box 様配列 (CACGTT) が必須であること

が報告されている²⁸⁾。マウスの *Per2* プロモーター領域をゲノムデータベースより抽出し、転写因子結合部位を MatInspector (Genomatix) を用いて解析したところ、HRE のコンセンサス配列 (ACGTG)²³⁾ に極めて近い配列 (ATGTG) との E-box 様配列 (CACGTT) が転写開始点より上流に存在することが明らかになった (Fig. 1c)。マウスの *Per2* プロモーター領域をヒトの同領域と比較すると、この領域には両者間で高い相関性があることを確認した。特に、HRE 配列を含む領域 28 bp と E-box 様配列を含む領域 16 bp は両種で 100% 一致することが示され、HIF1 α 結合配列、時計遺伝子結合配列は極めて高く保存されていることが明らかになった (Fig. 1d)。リアルタイムプロモーター活性の測定解析の結果を合わせると、この領域は強いプロモーター活性を示すとともに、ヒト細胞株においてもリズム発現のための必要かつ十分な領域が含まれていることが裏付けられた。

腎癌細胞における時計遺伝子と HIF1 α の蛋白発現

Caki-2 細胞とその他の細胞との相違点を検討すべく、主要な時計遺伝子の蛋白発現をウエスタンブロットにて検討した。Caki-2, 786-O, A498 において BMAL1 蛋白の発現を認め、CLOCK, CRY1 蛋白は全ての細胞で発現を認めたが、PER2 蛋白はいずれの細胞においても発現が認められなかった (Fig. 2a)。さらに、HIF1 α 蛋白の発現についても検討を加えたところ、Caki-2 と RCC4+vector alone において HIF1 α 蛋白の発現を認めた (Fig. 2b)。これらの結果から、BMAL1, CLOCK に加え、HIF1 α も高発現である Caki-2 細胞においてのみ *Per2* の概日リズムが認められることが明らかになり、腎癌細胞における *Per2* の概日リズム発現には HIF1 α が関与している可能性が示唆された。

Per2 プロモーター活性に対する HIF1 α の影響

各細胞において、HIF1 α /ARNT の強制発現が *Per2* プロモーター活性の概日リズムに与える影響を検討すべく、NIH3T3 細胞に HIF1 α と ARNT の発現ベクターを共にトランスフェクションし、*Per2* のプロモーター活性を継続的に測定した。すると、その振幅はコントロールと比較し有意に増強されることが明らかになった (Fig. 3a, b)。U2OS 細胞でも同様の結果が得られた (Fig. 3c, d)、腎癌細胞においても Caki-2 細胞において同様の結果が得られた (Fig. 3e, f)。これら結果より、HIF1 α は *Per2* のプロモーター活性の概日リズムの振幅を増強することが示された。

HIF1 α の抑制が *Per2* 概日リズムに与える影響

天然フラボノイドであるクリシンは、蛋白合成と安定性を抑制することで HIF1 α 発現を特異的に抑制する作用があることが報告されている¹⁸⁾。HIF1 α 蛋白発現の抑制が *Per2* のプロモーター活性の概日リズムに及ぼす影響について検討するために、Caki-2 細胞を異なる濃度のクリシンで 2 時間処理した。その結果、HIF1 α 蛋白の発現は用量依存性に抑制され (Fig. 4a)、*Per2* のプロモーター

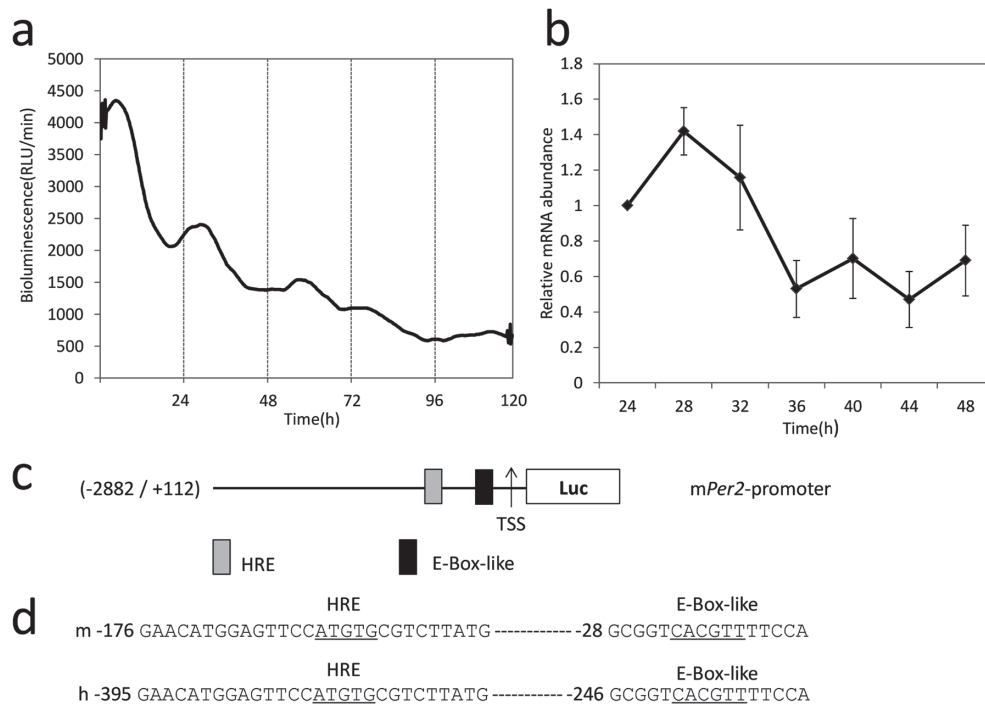


Fig. 1. Caki-2 細胞における *Per2* 概日リズムの発現. (a) マウス *Per2* プロモーターレポーターをCaki-2 細胞にトランスフェクションし, Kronos Dioによって10分間隔で継続的にプロモーター活性を計測した. 同調には100 nMデキサメサゾンを経時的に添加した. (b) *Per2* のmRNA発現レベルをリアルタイムPCRによって解析した. RNAはデキサメサゾン刺激24時間後に4時間毎に6プレートから抽出し, *Per2* mRNAを定量した. エラーバーは標準誤差を示す. リズム性発現は, 継続的にサンプリングしたデータをone-way ANOVAにより解析 ($n=6$, $p<0.01$) した. (c) マウス *Per2* プロモーター構造の模式図. マウス *Per2* のプロモーター配列はマウスゲノムDNAを鋳型にしてPCRによって得た. 2,994 bpの配列には1箇所のHRE配列とE-box様配列があることがMatInspectorによる解析から示された. (d) マウスとヒトの *Per2* プロモーター領域の比較. HRE配列とE-box様配列および周辺配列は両者間で, 図に示す領域の28 bp, 16 bpにおいて100%保存されていることが示された.

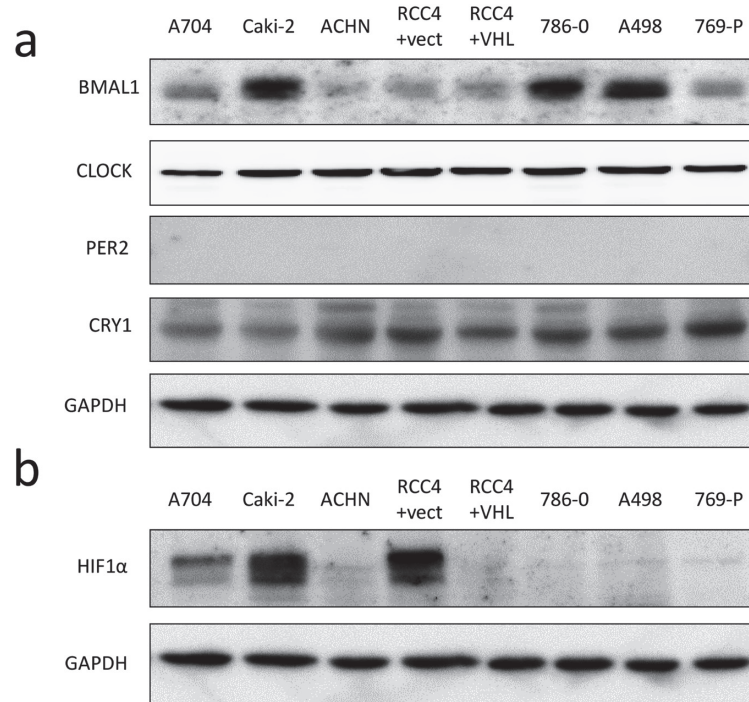


Fig. 2. 腎癌細胞における時計遺伝子およびHIF1αの蛋白発現. (a) 各腎癌細胞における抗BMAL1, CLOCK, PER2, CRY1, GAPDH抗体によるウエスタンブロットを示す. (b) 各腎癌細胞における抗HIF1α, GAPDH抗体によるウエスタンブロットを示す.

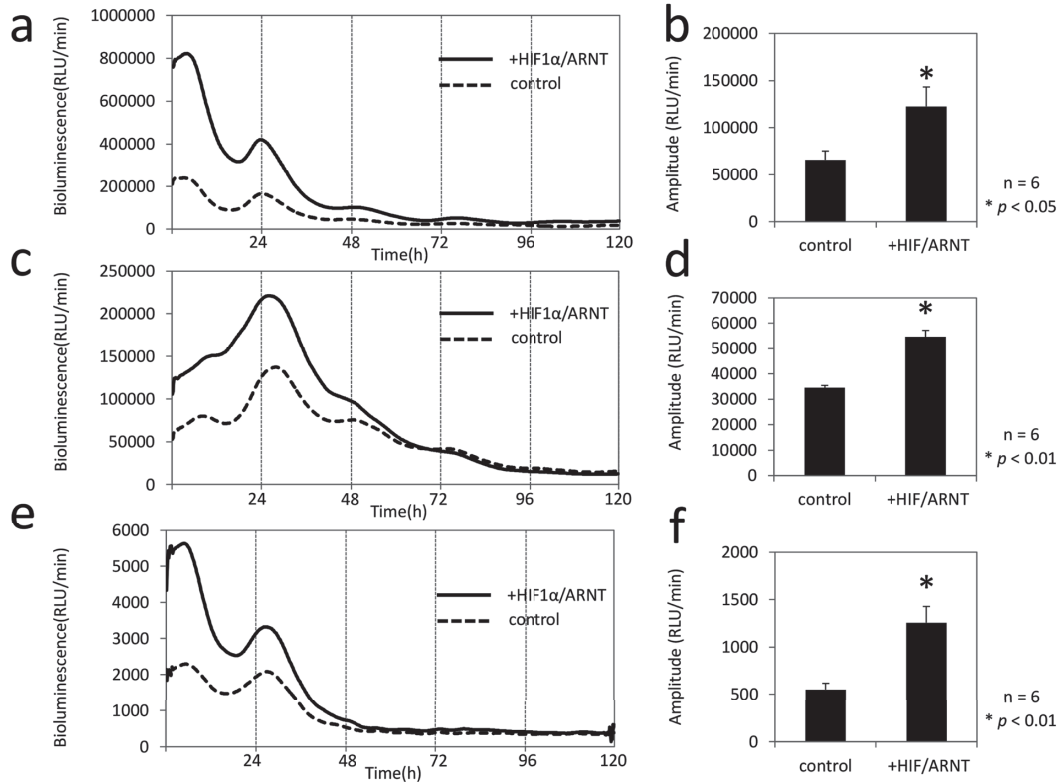


Fig. 3. HIF1 α /ARNTの過剰発現が*Per2*の概日リズムに及ぼす影響. (a) NIH3T3細胞に*Per2*プロモーターレポーターとpcDNA3または*Per2*プロモーターレポーターとHIF1 α とARNTの発現ベクターを共にトランスフェクションし、デキサメサゾンによる同調刺激を加えた後、Kronos Dioにより継続的にプロモーター活性を計測した. Control (点線)は*Per2*プロモーターレポーターとpcDNA3, +HIF1 α /ARNT (実線)は*Per2*プロモーターレポーターに加えHIF1 α とARNTの発現ベクターとトランスフェクションしたものを示す. (b) デキサメサゾン添加後24時間後以降の振幅をオンラインソフトウェアAcro (Circadian Rhythm Laboratory)を用いて解析した. エラーバーは標準誤差を示し、HIF1 α とARNTの発現ベクターを共にトランスフェクションすると概日リズムの振幅は有意に増強した ($n=6$, $p<0.05$). (c) U2OS細胞に*Per2*プロモーターレポーターとpcDNA3または*Per2*プロモーターレポーターとHIF1 α とARNTの発現ベクターを共にトランスフェクションし、デキサメサゾンによる同調刺激を加えた後、Kronos Dioにより継続的にプロモーター活性を計測した. Control (点線)は*Per2*プロモーターレポーターとpcDNA3, +HIF1 α /ARNT (実線)は*Per2*プロモーターレポーターに加えHIF1 α とARNTの発現ベクターとトランスフェクションしたものを示す. (d) デキサメサゾン添加後24時間後以降の振幅をオンラインソフトウェアAcro (Circadian Rhythm Laboratory)を用いて解析した. エラーバーは標準誤差を示し、HIF1 α とARNTの発現ベクターを共にトランスフェクションすると概日リズムの振幅は有意に増強した ($n=6$, $p<0.01$). (e) Caki-2細胞に*Per2*プロモーターレポーターとpcDNA3または*Per2*プロモーターレポーターとHIF1 α とARNTの発現ベクターを共にトランスフェクションし、デキサメサゾンによる同調刺激を加えた後、Kronos Dioにより継続的にプロモーター活性を計測した. Control (点線)は*Per2*プロモーターレポーターとpcDNA3, +HIF1 α /ARNT (実線)は*Per2*プロモーターレポーターに加えHIF1 α とARNTの発現ベクターとトランスフェクションしたものを示す. (f) デキサメサゾン添加後24時間後以降の振幅をオンラインソフトウェアAcro (Circadian Rhythm Laboratory)を用いて解析した. エラーバーは標準誤差を示し、HIF1 α とARNTの発現ベクターを共にトランスフェクションすると概日リズムの振幅は有意に増強した ($n=6$, $p<0.01$).

活性のリズムの振幅も有意差をもって用量依存性に減弱した (Fig. 4b, c). U2OS細胞においても同様の結果が得られた (Fig. 5a-c).

HIF1 α は*Per2*プロモーター領域のHRE配列に直接結合する

さらに、ルシフェラーゼアッセイによって*Per2*プロモーターがHIF1 α によってHREを介した転写制御を受ける可能性を検索した. NIH3T3細胞に*Per2*プロモーターレポーターコンストラクトとHIF1 α /ARNT発現コンストラクトを同時にトランスフェクションし、ルシフェ

ラーゼ活性を測定したところ、野生型*Per2*プロモーター活性は、HIF1 α /ARNTのトランスフェクション量依存的に増加がみられた. さらにHRE配列の1か所に変異を導入した*Per2*プロモーターでは、HIF1 α /ARNTのトランスフェクションはプロモーター活性に影響を及ぼさなかった (Fig. 6a, b). 塩化コバルト (CoCl_2) は、PASドメインと結合することによりHIF1 α 発現を誘発し、さらにHIF1 α -pVHL結合の阻害とそれによるHIF1 α の安定化をもたらすことが報告されている^{29, 30}. 本研究では、 CoCl_2 により誘発されたHIF1 α 過剰発現が*Per2*のプ

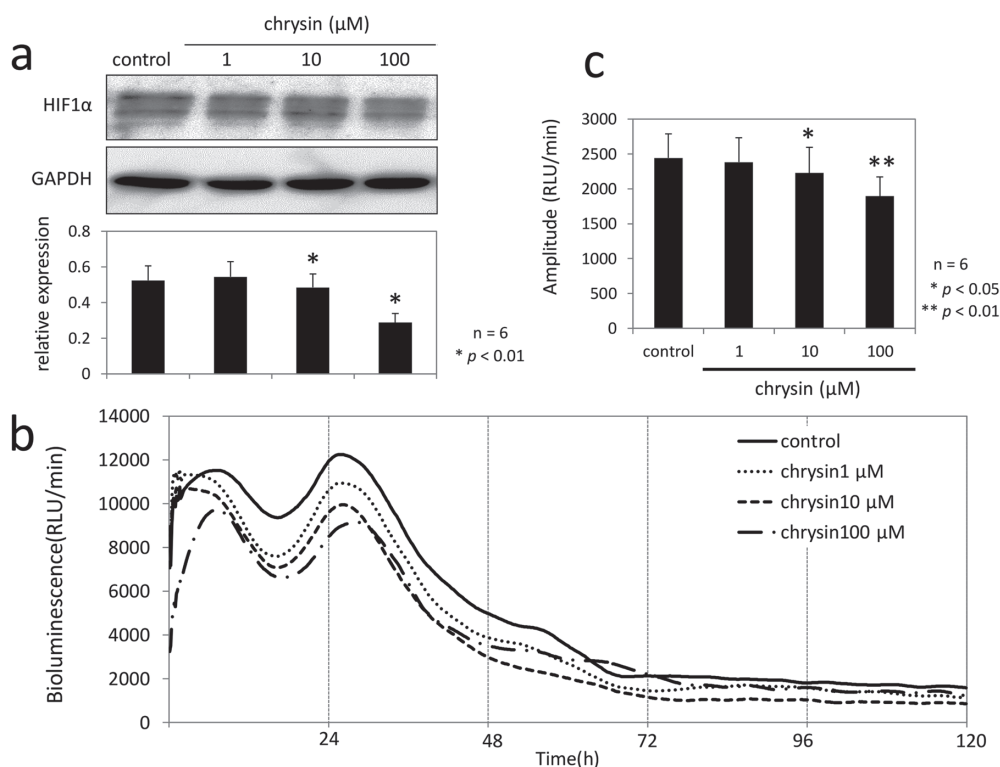


Fig. 4. Caki-2 細胞においてHIF1α蛋白発現の抑制が*Per2* の概日リズムに及ぼす影響. (a) Caki-2 細胞を異なる濃度のクリシン (1, 10, 100 μM) で 2 時間処理した後, HIF1α蛋白発現をウエスタンブロットで検出した. イメージングソフトによる解析で得られた光学濃度をGAPDHで標準化した相対蛋白レベル (relative expression) を平均±標準誤差でグラフ化した. HIF1α蛋白の発現はクリシンにより用量依存性に抑制された ($n=6$, $p<0.01$). (b) Caki-2 細胞に*Per2* プロモーターレポーターをトランスフェクションした 24 時間後, 異なる濃度のクリシン (1, 10, 100 μM) で 2 時間処理し, Kronos Dioによって 10 分間隔で継時的にプロモーター活性を計測した. (c) 測定開始後 24 時間後以降の振幅をオンラインソフトウェア Acro (Circadian Rhythm Laboratory) を用いて解析した. エラーバーは標準誤差を示し, 10, 100 μMのクリシン処理により振幅は有意に減弱した ($n=6$, $p<0.05$, $p<0.01$).

ロモーター活性に及ぼす効果を検討した. CoCl_2 処理により*Per2* プロモーター活性は増加したが, HRE-変異体*Per2* プロモーターではプロモーター活性の増加がみられなかった (Fig. 6c). 以上の結果から, *Per2* プロモーター領域に存在するHRE配列はHIF1α過剰発現に反応することが示された. さらに, HIF1αが生体内で*Per2* プロモーター領域内のHRE配列と直接結合する可能性についてChIPアッセイにより検討した. 蛋白質・DNAの架橋を行ったCaki-2 細胞を, 抗HIF1α抗体または抗normal rabbit IgG抗体で免疫沈降を行った. 得られたDNAを鋳型とし, *Per2* プロモーター領域内のHRE配列を含む領域 (− 417 ~ − 290) に対するプライマーを用いPCR法で増幅した. 増幅産物を示すバンドは, 抗HIF1α抗体で免疫沈降したサンプルで観察された. これらの結果から, HIF1αはHRE配列と直接結合することによって*Per2* プロモーター活性を増加し, その概日リズムの振幅を増強する可能性が示された.

考 察

本研究においては, Caki-2 細胞において*Per2* 遺伝子

が概日リズムを発現することが明らかになった. また, ヒト, マウスの*Per2* プロモーター領域の解析の結果からは, BMAL1/CLOCK, HIF1αの結合領域はともに両者間で極めて保存されていることが明らかになった. 本研究において使用したマウスゲノム由来の*Per2* プロモーターレポーターは, ヒト由来の細胞において概日リズム性の発現を示し, またHIF1αの影響を検討するのに必要なHIF1α結合領域を含んでいることが示された. さらに, その他 7 種類の細胞株では*Per2* はプロモーター, mRNAともに概日リズムを発現しなかったことから, Caki-2 には*Per2* のリズム発現に関与してその他の細胞と異なる特性があることが予想された. そこで各時計遺伝子, またVHL遺伝子の変異により腎癌の多くで高発現となっている²⁰⁾ HIF1αの蛋白発現を検討した. その結果*Per2* の転写を制御するBMAL1/CLOCKに加え, HIF1αも高発現であるのはCaki-2 細胞のみであった. このことから, Caki-2 細胞における*Per2* の概日リズムの発現にはBMAL1/CLOCKだけでなくHIF1αも関与している可能性が考えられた. また, Caki-2 細胞において*Per2* のmRNAの概日リズムは認められているもののPER2蛋白の発現は認められてい

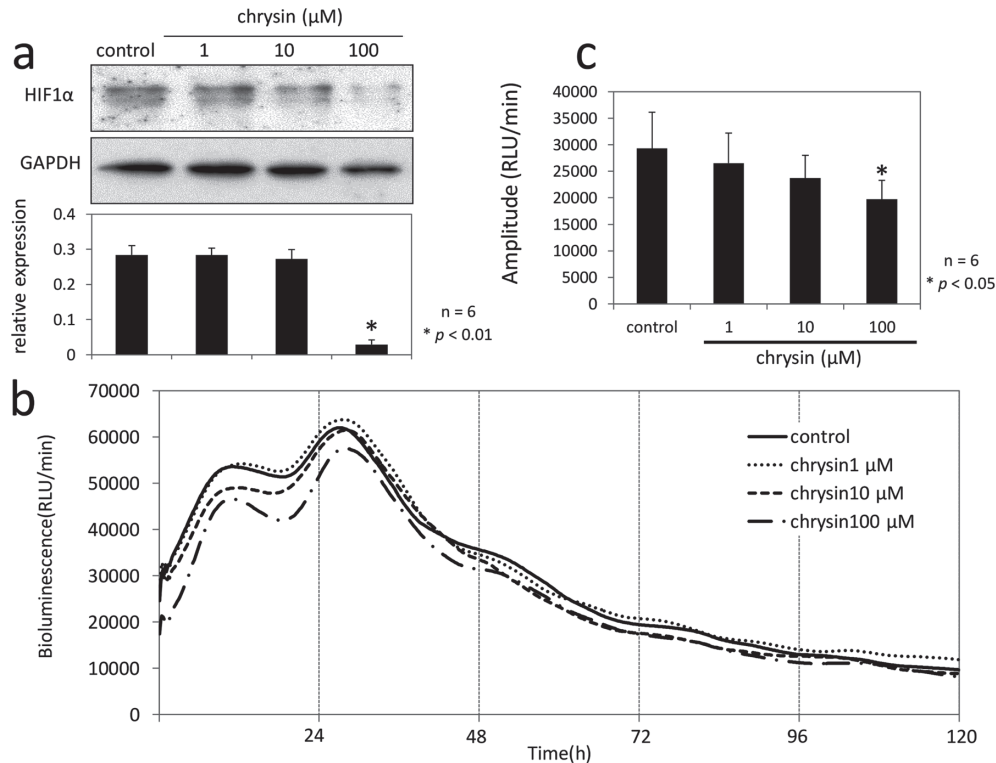


Fig. 5. U2OS細胞においてHIF1 α 蛋白発現の抑制が*Per2*の概日リズムに及ぼす影響. (a) U2OS細胞を異なる濃度のクリシン (1, 10, 100 μ M) で2時間処理した後, HIF1 α 蛋白発現をウェスタンブロットで検出した. イメージングソフトによる解析で得られた光学濃度をGAPDHで標準化した相対蛋白レベル (relative expression) を平均 $\pm$ 標準誤差でグラフ化した. HIF1 α 蛋白の発現は100 μ Mのクリシン処理により抑制された ($n=6$, $p<0.01$). (b) U2OS細胞に*Per2* プロモーターレポーターをトランスフェクションした24時間後, 異なる濃度のクリシン (1, 10, 100 μ M) で2時間処理し, Kronos Dioによって10分間隔で継続的にプロモーター活性を計測した. (c) 測定開始後24時間後以降の振幅をオンラインソフトウェアAcro (Circadian Rhythm Laboratory) を用いて解析した. エラーバーは標準誤差を示し, 100 μ Mのクリシン処理により振幅は有意に減弱した ($n=6$, $p<0.05$).

ない. この理由については, 今後検討する予定である. 過去の文献では, *Per2* はHIF1 α /ARNTによるVEGFの転写を抑制すると報告されているが^{21,22)}, 本研究においては, Caki-2細胞においてHIF1 α は*Per2*の概日リズムを増強することが示された. クリシンによるHIF1 α 蛋白発現の抑制によって*Per2*の概日リズムの振幅は有意に減弱し, この結果は腎癌における*Per2*の概日リズムに対するHIF1 α の関与を支持するものである. HRE変異体を用いた実験からは, HIF1 α は*Per2*プロモーター領域に存在するHRE配列を介してプロモーター活性を増強していることが示唆され, さらにChIPアッセイからはHIF1 α はHREに直接結合していることが証明された. 以上の結果から, 腎癌細胞において*Per2*の概日リズムの発現には, BMAL1/CLOCKに加えHIF1 α も関与していることが想定される. しかし, HIF1 α による*Per2*概日リズムの増強に関する詳細な機序については今後さらなる検討が必要である.

本研究において, *Per2*の概日リズム発現は7種類のうち1種類の細胞株においてしか認められず, またCaki-2におけるプロモーターの概日リズムはNIH3T3やU2OSで認められるリズムと比較するとその生物発光は著しく

低いことが明らかになった. このことから, 腎癌細胞においては*Per2*の概日リズムは欠如していることが多いと考えられる. 癌と時計遺伝子が関連していることは過去の報告からも明らかであり, 概日リズムの欠如はヒトの悪性腫瘍に関連があると考えられている¹⁶⁾. これらの中でも特に*Per2*は, リズム発現に重要である¹³⁾だけでなく癌抑制遺伝子としての機能も報告されている²⁷⁾. これらの報告によれば, *Per2*は腫瘍細胞でのDNA傷害・応答経路を調節しており, また*Per2*欠損マウスにおいては放射線照射後の悪性腫瘍の増殖が促進することが報告されている²⁵⁾. また, *Per2*遺伝子の変異はヒト大腸癌や乳癌において同定されており¹⁵⁾, 動物においても培養細胞においても*Per2*の強制発現によって腫瘍進展が抑制されることが報告されている^{26,27)}. 本研究からは, ほとんどの腎癌細胞において*Per2*の概日リズムが観察されず, すべての細胞でPER2蛋白の発現が認められなかった. これらのことから, *Per2*概日リズムの欠如とPER2蛋白の欠如が腎癌の発生や腫瘍増殖に関連している可能性が考えられるが, 詳しい機序は明らかになっていない. 腎癌と*Per2*遺伝子の関連を明らかにするために, 腎癌細胞における*Per2*

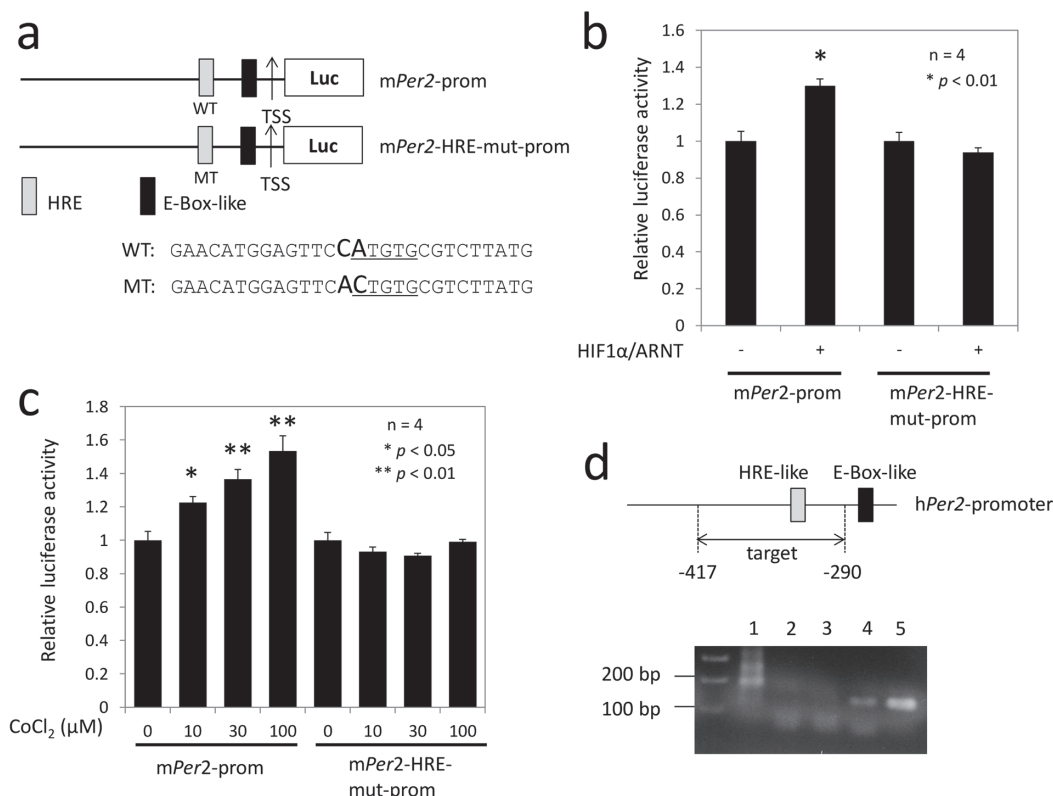


Fig. 6. *Per2* プロモーター上のHRE配列に対するHIF1αの結合。(a) マウス*Per2* プロモーター構造の模式図。上段は野生型マウス*Per2* プロモーター、下段はHRE-変異型マウス*Per2* プロモーターを示す。(b) ルシフェラーゼアッセイにより、*Per2* プロモーターのHIF1α/ARNTによる転写調節を解析した。野生型マウス*Per2* プロモーターではHIF1α/ARNT発現ベクターのトランスフェクション量に依存してプロモーター活性が増加したが、HRE-変異型マウス*Per2* プロモーターにおいてはHIF1α/ARNT発現ベクターのトランスフェクションはプロモーター活性に影響を与えなかった($n=4$, $p<0.01$)。 (c) NIH3T3 細胞を異なる濃度のCoCl₂ (10, 30, 100 μM) で6時間処理し、24時間後ルシフェラーゼアッセイを行った。野生型マウス*Per2* プロモーターではCoCl₂の濃度依存性にプロモーター活性が増加したが、HRE-変異型マウス*Per2* プロモーターにおいてはプロモーター活性に影響を与えなかった($n=4$, $p<0.05$, $p<0.01$)。 (d) HIF1αのHRE配列に対する結合をChIPアッセイにより検討した。Caki-2細胞を用い、抗HIF1α抗体、ネガティブコントロールとして抗マウスIgG抗体を用いChIPを行った。得られたDNAサンプルは*Per2* プロモーター上のHRE配列を含むプライマーセット(-417/-290)を用いPCR法で増幅した。抗HIF1α抗体でChIPを行ったサンプル(lane 4)とInput DNA (lane 5)でPCR増幅産物を示すバンドが検出された。DNAを加えずPCRを行ったコントロール(lane 1)、抗体を加えずChIPを行ったサンプル(lane 2)、抗マウスIgG抗体でChIPを行ったサンプル(lane 3)ではバンドは検出されなかった。

概日リズム発現の機序や、*Per2* とHIF1αとの関連についてさらなる検討が必要である。

結 語

本研究によって、*Per2* はCaki-2細胞において細胞レベルでリズム発現すること、プロモーターが自律的にリズム発現すること、HIF1αが*Per2* プロモーター領域の結合配列に直接結合することでその概日リズムの振幅を増強することが明らかになった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導を賜りました埼玉医科大学生理学 池田正明教授、埼玉医科大学国際医療センター泌尿器腫瘍科 上野宗久前教授、小山政史教授に深謝いたします。また、実験の実施に多大なご協力を頂き

ました埼玉医科大学生理学 熊谷恵さん、プロモーターレポーター作成に多大なご助力を頂きました産業技術総合研究所 健康工学研究部門生体機能制御研究グループ 中島芳浩先生、ChIPアッセイの実施に際しご助言を頂きました埼玉医科大学内分泌内科・糖尿病内科 竹中康浩先生に心より感謝致します。

引用文献

- McLaughlin JK, Lipworth L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin Oncol* 2000;27:115-23.
- Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1α and HIF-2α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157:411-21.

- 3) Shinojima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M, et al. Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1 α expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2 α . *Carcinogenesis* 2007;3:529-36.
- 4) Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996;271:17771-8.
- 5) Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9:677-84.
- 6) Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
- 7) Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47.
- 8) Thelen P, Hemmerlein B, Kugler A, Seiler T, Ozisik R, Kallerhoff M, et al. Quantification by competitive quantitative RT-PCR of VEGF121 and VEGF165 in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19:1563-5.
- 9) Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 2002;417:329-35.
- 10) Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002;418:935-41.
- 11) Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 2001;63:647-76.
- 12) Cermakian N, Boivin DB. A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2003;42:204-20.
- 13) Wilkins AK, Barton PI, Tidor B. The *Per2* negative feedback loop sets the period in the mammalian circadian clock mechanism. *PLoS Comput Biol* 2007;3:e242.
- 14) Chen ST, Choo KB, Hou MF, Yeh KT, Kuo SJ, Chang JG, et al. Deregulated expression of the *PER1*, *PER2* and *PER3* genes in breast cancers. *Carcinogenesis* 2005;26:1241-6.
- 15) Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006;314:268-74.
- 16) Wood PA, Du-Quito J, You S, Hrushesky WJ. Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2023-33.
- 17) Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U, et al. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 2004;119:693-705.
- 18) Fu B, Xue J, Li Z, Shi X, Jiang BH, Fang J. Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1 α through reducing hypoxia-inducible factor-1 α stability and inhibiting its protein synthesis. *Mol Cancer Ther* 2007;1:220-6.
- 19) Cavadini G, Petrzilka S, Kohler P, Jud C, Tobler I, Birchler T, et al. TNF- α suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *PNAS* 2007;104:12843-8.
- 20) Rini BI, Jaeger E, Weinberg V, Sein N, Chew K, Fong K, et al. Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and Von Hippel-Lindau gene status. *BJU Int* 2006;98:756-62.
- 21) Fujita S, Koyama Y, Higashimoto M, Ono K, Ono T, Watanabe K, et al. Regulation of circadian rhythm of human vascular endothelial growth factor by circadian rhythm of hypoxia inducible factor-1: Implication for clinical use as anti-angiogenic therapy. *Ann Cancer Res Ther* 2010;18:28-36.
- 22) Koyanagi S, Kuramoto Y, Nakagawa H, Aramaki H, Ohdo S, Soeda S, et al. A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. *Cancer Res* 2003;63:7277-83.
- 23) Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 2005;65:9047-55.
- 24) Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 2003;3:350-61.
- 25) Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 2002;111:41-50.
- 26) Gery S, Virk RK, Chumakov K, Yu A, Koeffler HP. The clock gene *Per2* links the circadian system to the estrogen receptor. *Oncogene* 2007;26:7916-20.
- 27) Hua H, Wang Y, Wan C, Liu Y, Zhu B, Wang X, et al. Inhibition of tumorigenesis by intratumoral delivery of the circadian gene *mPer2* in C57BL/6 mice. *Cancer Gene Ther* 2007;9:815-8.
- 28) Akashi M, Ichise T, Mamme T, Takumi T. Molecular mechanism of cell-autonomous circadian gene expression of *Period2*, a crucial regulator of the mammalian circadian clock. *Mol Biol Cell* 2006;17:555-65.
- 29) Kanaya K, Kamitani T. pVHL-independent ubiquitination of Hif1 α and its stabilization by cobalt ion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:750-5.
- 30) Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalts inhibit the interaction between hypoxia inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct

- binding to hypoxia inducible factor- α . J Biol Chem 2003;278:15911-6.
- 31) Sherman H, Frumin I, Gutman R, Chapnik N, Lorentz A, Meylan J, et al. Long-term restricted feeding alters circadian expression and reduces the level of inflammatory and disease markers. J Cell Mol Med 2011;12:2745-59.