

# 研究報告書

## 2019年度：A課題

2021年 4月 15日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 公立小松大学保健医療学部 臨床工学科

住 所 〒923-0961 石川県小松市向本折町へ14番地1

研究者氏名 平山 順



(研究課題)

癌を誘発するストレスシグナルが体内時計を破綻に導く分子機構

2020年 4月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

### 1. 研究の背景と目的

体内時計は、睡眠や代謝といった多様な生理機能に観察される約 24 時間の周期変動を作り出す生体の恒常性維持機構である。「光を利用し、自然界の昼夜の変化に対し体内環境を最適化する」という重要な役割を担っている。2007年に、「体内時計の障害を伴う交替性勤務」が、国連WHOにより発癌のリスク因子として提唱され、体内時計の障害が発癌に関連することが認知されている。また、癌を誘発する放射線や酸化ストレスが体内時計の障害を引き起こすことが報告されている。しかしながら、癌を誘発するストレスシグナルが体内時計を破綻させる分子機構に関しては解明されていない点が存在する。

体内時計は、生物個体の全身の各細胞に内在する細胞時計が基本単位である。これまでの研究は、ヒトと共通の体内時計を有する実験モデル動物を用いた解析より、ストレス応答性リン酸化酵素カスケードと活性酸素種（ROS）を介したシグナルが細胞時計の制御を担うことを報告している。本研究は、遺伝子改変実験動物を用いて、これらシグナル経路が体内時計の障害の誘発に関わるかを検証した。

## 2. 方法

2.1. 個体レベルの体内時計の評価； 個体レベルの体内時計は、ゼブラフィッシュ稚魚の行動量の日周変動（行動リズム）を指標として評価した。この行動リズムは、行動解析装置 DanioVision により解析した。この装置の下部は温度と照明条件を一定に保つインキュベーターである。ここに、稚魚を multi-well plate に入れ飼育し、機器の上部に設置された赤外線カメラで稚魚を追跡し、経時的にそれらの 10 分間あたりの移動距離を同時測定した。この測定値に基づいて、行動解析ソフト ActgramJ によりアクトグラムを作成し、行動リズムの有無の判定と行動リズムの周期と位相の算出を行った。

2.2. 遺伝子改変ゼブラフィッシュの作出； 遺伝子改変個体は、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 法を用いて作出した。

## 3. 結果と考察

体内時計の重要な特性の一つは、光刺激を利用して自然界の昼夜の変化に対し、位相（時刻）を同調（光同調）させることである。これまでの研究は、ヒトと共通の体内時計の光同調機構を有するゼブラフィッシュを用いて研究を進めてきた。その結果、体内時計の光同調を制御する光誘導型の時計制御分子 *zPER2* と *zCRY1a* を同定した。また、*zPER2* と *zCRY1a* の光誘導が、光により細胞内に誘導される ROS と ROS により活性化される MAPK/ERK シグナル経路に依存することを見出してきた。

本研究では、*zPer2* と *zCry1a* の両遺伝子を機能阻害した遺伝子改変ゼブラフィッシュの解析より、ゼブラフィッシュ稚魚をストレスを誘発するレベルの ROS で処理すると個体レベルの体内時計が障害されること、ならびにこの障害が *zPer2* と *zCry1a* の遺伝子発現の過度な増加に起因することを見出した。次に、*zPER2* と *zCRY1a* が、ROS 存在下で、発現量に影響を与える遺伝子および細胞内シグナル経路の候補を同定した。同定した候補遺伝子がコードするタンパク質には、ストレス応答に関わる膜受容体などが含まれていた。現在、同定した候補遺伝子を機能阻害したゼブラフィッシュの作出を進めている。今後、作出した遺伝子改変個体の体内時計とその ROS に対する応答を解析することで、ROS によるストレスが *zPer2* と *zCry1a* の遺伝子発現を介して体内時計の障害を誘発する機構を理解していきたい。

## 4. 謝辞

本研究は、公益財団法人 がん研究振興財団による研究助成金により行われたものです。助成していただきましたがん研究振興財団に深謝いたします。