

アドメノート

薬物投与設計の新技术：オーダーメイド医療、  
性差医療、時間治療・薬理(第4回)  
生体リズムと治療

九州大学大学院薬学研究院薬剤学分野

大戸茂弘(写真上), 小柳 悟(写真中), 松永直哉(写真下)



1. はじめに

近年、医薬品適正使用の向上を目指し、薬物治療の個別化を指向した研究が活発に行われている。これまで薬物動態の個体差に関する研究は、個体間の変動に着目した遺伝子診断や薬物代謝酵素の多型に関する研究が活発に行われ、薬物動態の個体差に着目した投薬設計は確立されつつあるが、遺伝子診断のみでは説明できない現象もある。また個体間変動要因の整理・体系化が進むことによりクローズアップされるのは個体内変動である。したがって、医薬品適正使用のさらなる充実を図るには、個体間変動に加えて個体内変動に着目した研究の充実は必至である。こうした状況の中で、医薬品の添付文書などに服薬時刻が明示されるようになってきた。その背景として生体

機能や疾患症状に日周リズムが存在するため投薬時刻により薬の効き方が大きく異なることがあげられる(時間薬理学: Chronopharmacology)<sup>1,2)</sup>。また薬の効き方を決定する薬の体内での動き方や薬に対する生体の感じ方も生体リズムの影響を受ける。したがって投薬タイミングを考慮することにより薬の有効性や安全性を高めることも可能となる。体内時計の本体は、視神経が交差する視交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)に位置し、時計遺伝子により制御されている。時計遺伝子の機能と役割が生理学的側面より明らかにされつつあるが、今後の重要な課題として臨床応用があげられる。そこで、体内時計の分子機構を基盤にした創薬・育薬・医薬品適正使用の可能性について紹介する。

2. 生体リズムと医薬品適正使用

2.1 生体リズムと疾患

起床時にコルチゾールの急激な上昇により、ヒトは眠り

からさめて行動ができるように身体の状態が準備される<sup>1,2)</sup>。引き続き交感神経の活動が活発になり、眠りに付く頃には副交感神経の活動が活発になる。またホルモン分泌や神経活動の日周リズムと関連して様々な疾患に日周リズムが認められる。例えば、高血圧症患者では、1日の中で血圧が最高に達する午後に高血圧症状を示す。血圧および血液の凝固能の日周リズムとも関連して、脳梗塞および心筋梗塞のリスクは早朝に高まる。コレステロールの生合成は夜間に高まる。喘息発作による呼吸困難の増加および最大気流量の低下は深夜に起こる。消化性潰瘍時の胃酸分泌増加は夜間に起こる。歯などの痛みは夜間から早朝に発現する。以上のように喘息、高血圧、高脂血症、内分泌疾患などでは、症状が悪化する時間帯が決まっており、投薬タイミングを設定することが比較的容易である。一方、病型が多岐にわたり一律に疾患症状の日周リズムを規定できない場合もある。また、睡眠障害などのいわゆる生体リズム障害は、生体リズムが変容していることが問題であり、まさに時間治療の核心に迫るものである。したがって、病気の診断および検査データの判読に際し、生体機能や検査値の1日の中での時間経過と変動を考慮することが重要である。

2.2 生体リズムと薬物活性

疾患症状や生体機能に日周リズムが存在するため添付文書などに至適投薬時刻が記載されている。一方で、疾患症状の日周リズムの存在の有無にかかわらず多くの薬物の効果、副作用および薬物動態が、投薬時刻により異なる。その機序としてレセプター機能、神経伝達物質などの生体の感受性や吸収、分布、代謝、排泄などの薬物動態の日周リズムが関与している(図1)<sup>1,2)</sup>。

健常人では呼吸機能は夜間から早朝にかけて低下するが、それが喘息患者においてはさらに低下するため夜間から早朝にかけて喘息発作による呼吸困難の頻度が高まる。その機序として、夜間における交感神経機能の低下、コー

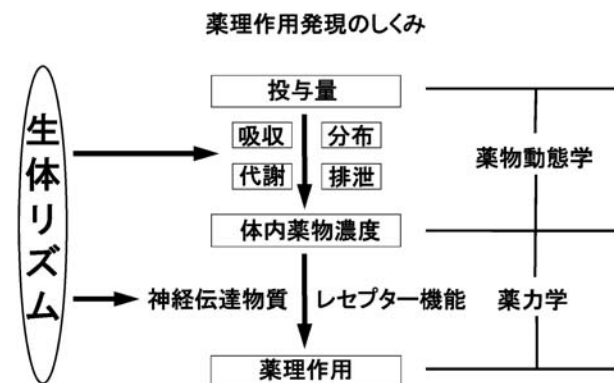


図1 薬理作用発現機構

チゾール濃度の低下、ヒスタミン濃度の上昇などがあげられる。また喘息患者を対象として、テオフィリンの最大気流量上昇作用に及ぼすテオフィリンの投薬時刻の影響について報告されている<sup>3)</sup>。テオフィリンを20:00時に投与した場合、08:00時と比較して夜間における気流量の低下が軽減できる。その機序として、薬物動態学的側面よりテオフィリンを20:00時に投与した場合、夜間の血中濃度を高く維持することができ、夜間における気流量の上昇が可能となる。一方、テオフィリンを08:00時に投与した場合、昼間は血中濃度を高く維持できるが、夜間に血中濃度が下降し、夜間における気流量の低下に対し効果が認められない。気流量の低下や喘息発作による呼吸困難の頻度が高まる夜間に、テオフィリン濃度を高く維持することにより疾患発症リスクが軽減できる。

大腸癌患者を対象としたフルオロウラシル、オキサリプラチン、ロイコボリンの併用療法に関する臨床試験成績について報告されている<sup>4)</sup>。投与方法は、一般治療において点滴速度を一定にした場合(24時間を通して一定量)と時間治療において点滴速度を不定にした場合(フルオロウラシル、ロイコボリンを午前04:00に最大量、オキサリプラチンを午後16:00に最大量とした時間薬物治療)で比較検討している。50%以上の腫瘍の縮小を示す奏効率は、時間治療で有意に高い。また重篤な消化器障害や神経障害のため治療を中断あるいは中止した症例は、時間治療で有意に軽減される。毒性の標的臓器である骨髄および消化管粘膜のDNA合成能には、活動期に最高値を示す有意な日周リズムが認められる<sup>5)</sup>。DNA合成リズムと関連して合成能が低下する時間帯にはS期特異性薬剤であるフルオロウラシルの毒性が軽減できるため増量が可能である。またフルオロウラシルを代謝する酵素(ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ)の活性は、深夜に高まるためフルオロウラシルの毒性が軽減できるため深夜の増量が可能である。一方、シスプラチンによる吐き気や腎毒性は、朝投与時と比較して夕投与時に軽減できる。その機序として、シスプラチンの腎からの排泄量の投薬時刻による差異が関与している<sup>6)</sup>。

上記の薬物の他に副腎皮質ホルモン、向精神薬、解熱鎮痛薬、免疫抑制薬、局所麻酔薬、抗潰瘍薬など多くの薬物で時間薬理学的所見が報告されている。

### 2.3 生体リズムと薬物動態

薬の効果や副作用の発現には、作用部位の薬物に対する感受性のみならず作用部位の薬物動態が関与している。薬物動態の日周リズムは、吸収、分布、代謝、排泄の時間的变化により生じる。各過程は、生理機能の日周リズムにより制御されている<sup>1,2)</sup>。

経口投与時の薬の吸収過程は、薬の物理化学的性質、生体膜の面積と構造、胃内通過時間および消化管のpH、運

動および血流量などの要因により支配されている。これらの要因のいくつかには、日周リズムが存在することが知られており、薬の吸収の日周リズムの機序と考えられている。経口投与以外の投与経路に関しても時間的変化が知られている。薬は血中蛋白と結合するため、血中蛋白濃度や薬の蛋白結合率に影響を及ぼす血中遊離脂肪酸などの生体内物質の日周リズムにより遊離型の薬の濃度が変動し、そのため薬の組織への移行性が変化することが考えられる。このような変化は、蛋白結合率が高く、見かけの分布容積の小さい薬で認められる。また生体膜を介した薬の移行性に日周リズムが認められる。薬の肝代謝は、一般に肝酵素活性および肝血流量により制御されている。両者ともに日周リズムを示し、薬の代謝の日周リズムの機序として考えられる。酵素活性の日周リズムに関して、肝臓、腎臓、脳などで報告されているが、全て動物を対象とした研究である。肝代謝は、高い抽出率の薬では、肝臓の血流量に支配される。健康人を対象とした研究で肝血流量は、朝、最高値を示すことが知られている。間接的ではあるが、親化合物とその代謝物を評価することにより、ヒトにおいていくつかの薬で酸化、還元、抱合などの過程に日周リズムが存在することが報告されている。大部分の薬が腎臓を介して排泄される。糸球体ろ過、腎臓の血流量、尿のpHおよび尿細管の再吸収は、活動期に高まる有意な日周リズムを示す。これが主として腎から未変化体として排泄される親水性薬物の排泄の日周リズムの機序と考えられる。例えば、薬の腎排泄は、イオン化率と関連があり、尿のpHの日周リズムにより支配されている。

薬物治療の有効性と安全性を高めるために薬物動態学の理論に基づき投与量・投与間隔を科学的に調節することが可能になってきた。しかしながら、現在行われている投薬設計法は、その基礎となる個々の患者の薬物動態値ならびに薬物に対する反応性が、時刻により変動しないという前提の上に成り立っている。一方、時間薬理学に関する研究の発展により、至適な投薬時刻設定の必要性、その科学的根拠が解明されつつある。従来の投薬設計法に投与時刻も加味して設計することが望まれる。現在、TDMではベイズ推定法による薬物動態値の推定および血中濃度の予測などが行われている。これに用いる薬物動態値は、朝ないし昼間に行われた試験から得られたものである。しかし、TDM対象薬物のテオフィリン、バルプロ酸、アミノグリコシド系抗生剤などの薬物動態値は有意な日周リズムを示す<sup>7-9)</sup>。このように薬物動態値に日周リズムの認められる薬物に関して、投薬時刻を考慮した薬物動態解析が検討されている。

### 3. 生体リズムと創薬

#### 3.1 生体リズム障害と生体リズム調整薬

生体リズムは、生活パターン、治療状況、疾患の症状など様々な要因により影響される<sup>10)</sup>。例えば、栄養液の投与方法によりコーチゾールの日周リズムのパターンは変化する<sup>11)</sup>。通常の食事リズムにあわせて栄養液を昼間投与した場合、コーチゾールは早朝に最高値を示し、夜に最低値を示す有意な日周リズムを示す。一方、栄養液を夜間投与した場合、コーチゾールは夕に最高値を示し、深夜に最低値を示す有意な日周リズムを示す。1日中連続投与した場合には、コーチゾールの日周リズムは変容する。またインターフェロンの副作用として、うつ状態、不眠などが報告されているが、その機序としてコーチゾールおよびリンパ球数などの生体リズムが変容することが一部関与しているものと思われる<sup>12-14)</sup>。したがって、副作用、合併症の防止という点からも生体の恒常性を維持しながら治療していくことが望まれる。種々の薬物が、体内時計に作用し、生体リズムの位相を変化させる。メラトニンは松果体から分泌されるホルモンで、その分泌は夜に高まる日周リズムを示す<sup>15-17)</sup>。メラトニンはトリプトファンからセロトニンを経て、松果体で合成される。合成酵素の一つN-アセチル転移酵素の活性は、視交叉上核により制御され、夜間に高く、昼間に低い日周リズムを示す。アメリカでは、メラトニンはサプリメントとして、時差ぼけ対策に飲まれている。また睡眠障害などの生体リズム障害に対し有効性が確認されている<sup>18-20)</sup>。ラメルテオン(ロゼレム)は、従来の不眠症治療剤とは作用メカニズムが異なる薬剤で、薬物依存性を示さない不眠症治療剤として、2005年7月にFDAから販売許可された<sup>21)</sup>。日本では2010年4月に承認され、同7月発売された。適応は「不眠症における入眠困難の改善」で、用法・用量は「成人に1回8mgを就寝前に投与」である。ラメルテオンは、脳の松果体のホルモンであるメラトニン受容体アゴニストで、メラトニンの2つの受容体(MT1/MT2受容体)の両方にメラトニンよりも高い親和性を示す。睡眠覚醒サイクルを正常に調節する働きがあり、睡眠パターンは自然睡眠に近いといわれている。

#### 3.2 生体リズムと時間薬物送達システム学(Chrono-DDS: Chrono-drug delivery system)

DDSが機能する目的にしたがって、放出制御型、障壁透過改善型、標的指向型のように分類される。多くの薬の薬物動態に日周リズムが存在し、たとえ一定速度で投与しても、一定の血中濃度は期待できない。また、病気や薬の効果に日周リズムが認められるため、薬の治療における投与のタイミングや休薬の必要性に関する時間薬理学的所見が数多く蓄積されている<sup>1,2)</sup>。現在、臨床で使用されてい

る時間の要因を考慮したDDSとして、時間により注入速度を変えることの可能なクロノポンプが抗癌剤の時間治療に使用されている。経口剤として、狭心症・早朝血圧上昇予防には、就寝前に投与して早朝の効果を期待する製剤が合理的であると考えられる。米国では、ベラパミルを含む遅延・持続放出錠が使用されている。用法用量は、1日1回就寝前投与であり、投与後に遅れて放出を開始し、以後徐放性を示すので、投与後4時間後に血中ベラパミルが上昇し、約10時間後にピーク濃度を示してから徐々に減少する。睡眠中の肺機能が最も低下し、喘息発作が好発する時間帯に高い薬の血中濃度を維持して、気管支喘息などの予防効果を期待する製剤が使用されている。テオフィリン徐放錠は、内服約数時間後に血中テオフィリン濃度を最高にするようデザインされた製剤で、1日1回夕食後内服するよう指示されている。経皮治療システムとして、 $\beta_2$ -刺激薬ツロブテロール経皮吸収製剤が、気管支喘息の治療に使用されている。

### 4. 生体リズムと時計遺伝子

生体には体内時計が存在し、生体リズムを制御している<sup>22,23)</sup>。その本体は、視神経が交差する視交叉上核(SCN)に位置している。ラットのSCNを破壊すると生体リズムは消失するが、SCNを移植するとリズムが再現されたことから概日リズムを駆動する振動体はSCNに存在することが明らかになった。SCNには様々な脳部位からの神経が投射している<sup>1,2)</sup>。一方、生体リズムは時計遺伝子により制御され、この遺伝子は中枢のみならず末梢組織でも発現しておりローカル時計として機能している<sup>1,2)</sup>。すなわち、生体は体内時計の階層構造をうまく利用し、生体のホメオスタシス機構を維持している。体内時計の発振周期は、24時間ではなく、ヒトの場合約24.2~25.1時間である。つまり体内時計は正確に24時間周期で変動するのではなく、短い場合や長い場合が存在する。環境サイクルのない、いわゆる恒常環境下での約1日の変動リズムを「概日リズム(Circadian rhythm)」という。このような変動を24時間のサイクルに合わせることを「同調」といい、光が最も強力な作用を示す。また、体内時計が発する概日リズム振動のことを「発振」という。その信号が例えば松果体のメラトニン分泌を調節するような機構を「出力」という。つまり、生体リズム機構は同調、発振、出力から成り立っている。

マウスにおける概日振動体機構として、Per遺伝子の転写はCLOCKとBMAL1のヘテロ二量体がPer遺伝子上流に存在するE-box配列(CACGTG)に結合することにより活性化される(図2)<sup>1,2)</sup>。Per1, Per2, Per3の転写はゆっくりと増加し、主観的明期にいずれもピークに達する。PER蛋白質はPer mRNAよりも6~8時間の遅れでピー

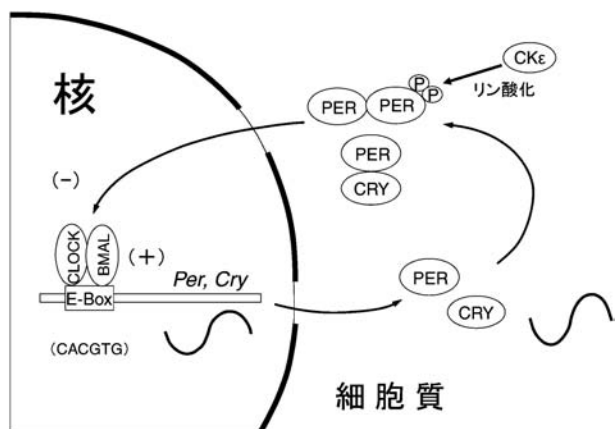


図2 哺乳類における体内時計の分子機構<sup>1,2)</sup>

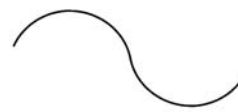
時計振動遺伝子の転写は負のフィードバック機構で制御されている。例えば、Per 遺伝子の転写はポジティブ因子である CLOCK と BMAL1 のヘテロ二量体が Per 遺伝子上流に存在する E-box 配列 (CACGTG) に結合することによって活性化される。また Per 遺伝子産物がネガティブ因子となり、自らの転写を抑制する。

クに達し、PER 蛋白質は PER 蛋白質間 (PER1-PER3 および PER2-PER3) もしくは PER 蛋白質と CRY 蛋白質との間でヘテロ二量体を形成し核内に移行する。核内で PER/CRY 蛋白質は CLOCK/BMAL1 との間で複合体を形成して、CLOCK/BMAL1 の転写活性化作用を阻害し、Per 遺伝子自身の転写を抑制し、Per 遺伝子の発現を減少させる。その結果、PER 蛋白質量が減少し CLOCK/BMAL1 による Per 遺伝子の転写が再び活性化される。PER 蛋白質と二量体を形成し、核に移行させる働きがある CRY 蛋白質は、クリプトクロームと呼ばれる。マウスには 2 種類の Cry 遺伝子 (Cry1, Cry2) が存在している。CRY1 のプロモーター領域には Per1 同様、E-box 配列が存在し、CLOCK/BMAL1 複合体によって活性化され、その蛋白 (CRY1) 自身で抑制される。すなわち、哺乳類では PER と CRY がともに抑制因子として同様な機能を果たしている。

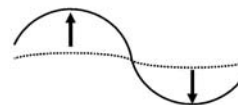
## 5. 体内時計の分子機構と時間治療法

現在、添付文書などに投薬時刻が明示されるに至っているが、時間治療をさらに展開させる上で、生体リズムに個体差が存在する点が大きな支障となっている。そのため、これまで蓄積された時間薬理学的所見を整理して体系化していくことが必要となる。このような背景から、時計遺伝子に関する最新の情報に基づき体内時計の分子機構と時間治療法について、リズム診断、リズム障害の回避、リズム操作法および時間薬物送達システムの側面から紹介する (図3)<sup>1,2)</sup>。

### リズムの診断



### リズムの障害回避



### リズムの操作

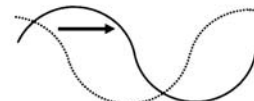


図3 リズムの診断、リズム障害の回避、リズムの操作による治療戦略<sup>1,2)</sup>

### 5.1 リズム診断

ヒトの時計遺伝子を診断する方法として、口腔粘膜や血液による測定などが主流で、煩雑で精度が低かったが、頭髪やひげなどの根元に付いている細胞を採取し、時計遺伝子の活動を計測する手法が生み出された<sup>24)</sup>。比較的簡単に計測でき、精度も高い。ヒトの生体内物質を診断する方法として、血中のメラトニンやコルチゾールの濃度に基づいて体内時刻を判定することが行われていた。しかし、いずれも被験者を長期間拘束し、血液を連続採取する必要があるため負担が大きい。そこで、ヒトの血液中に含まれる代謝物質を網羅的に測定することで、体内時刻を簡便に判定する方法が開発された<sup>25)</sup>。ヒトの血中で24時間周期の変動を示す代謝物質を同定するために、被験者は室温や光量が一定の環境下において36時間断眠状態で、食事は2時間おきに1日の必要摂取量を分割した分を摂取し、血液も2時間おきに採取された。これにより、摂食サイクルや生活サイクルといった外部環境の影響を排除し、内在的な体内時計に従って変動する血中物質だけを抽出できる。採取した血液の代謝物質を LC-MS 法で網羅的に解析し、24時間周期で変動する物質を数十種類同定された。これらの物質量と時刻の関係性を示す分子時刻表を作成し、従来法とほぼ同じ時刻を示すことが分かり、その誤差は最大でも3時間程度に収まっていた。これらの結果から、将来、時差ぼけや一部の睡眠障害にみられる体内時計の異常を簡便に診断できるようになる可能性がある。

癌細胞の増殖および血管新生に関わる血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に日周リズムが存在し、時計遺伝子により制御されている<sup>26)</sup>。種々の癌細胞を移植したマウスを対象に、血管新生阻害薬は、明期 (休息期) 開始時刻である 7:00 投薬において、暗期 (活動期) 開始時刻である 19:00 投薬と比較してより高い血管新生阻害効果および抗腫瘍効果を示す。その機序として、血管新生阻害薬の標的分子の一つ

である VEGF の発現量は、腫瘍組織内で日周リズムを示し、その発現量が高まる 7:00 投薬で、19:00 投薬と比較して腫瘍増殖が有意に抑制される。VEGF mRNA の転写は、時計遺伝子により制御されている。

肝臓は薬物代謝や解毒を行う重要な臓器である。肝臓では多くの遺伝子が日周リズムを示す。ラットの肝臓を対象としたマイクロアレー解析の結果、3906 の対象遺伝子の中で約 30% の遺伝子が明瞭な日周リズムを示す<sup>27)</sup> その中で約 90% の遺伝子の振幅強度は 1.5 倍以下であり、67 の遺伝子が明瞭な日周リズムを示す。これらは、遺伝子の転写、薬物代謝酵素、トランスポーター、シグナル伝達および免疫関連の遺伝子である。PAR-domain basic leucine zipper (PAR bZip) 転写因子 DBP, HLF および TEF のトリプルノックアウトマウスを対象として、PAR bZip タンパクが cytochrome P450 enzymes, carboxylesterases, aminolevulinic acid synthase (ALAS1), P450-oxidoreductase (POR), sulfotransferases, glutathione-S-transferase (GST), aldehyde dehydrogenases, UDP-glucuronosyltransferases, members of drug transporter families および constitutive androstane receptor (CAR) のような薬物代謝および解毒に関わる多くの酵素の発現を制御していることが明らかとなった<sup>28)</sup>。

Abcb1 遺伝子によりコードされる P 糖タンパク質 Multidrug resistance protein 1 (MDR1) は、消化管において、小腸上皮細胞内に取り込まれた化合物を消化管の管腔側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。マウス小腸からのジゴキシンの吸収は日周リズムを示し、その成因として Abcb1a 遺伝子の発現リズムが関与している<sup>29)</sup>。また、ルシフェラーゼアッセイおよびクロマチン免疫沈降法による解析で、Abcb1a 遺伝子の発現リズムは、PAR bZip 転写因子 (DBP, HLF, TEF) を介した体内時計の分子機構により制御されていた。同様の所見は、他のトランスポーターおよび CYP 分子種でも認められ、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す<sup>30,31)</sup>。今後、種々の薬物代謝酵素、トランスポーター、受容体および標的分子などの日周リズムの成因を体内時計の分子機構の側面より解明することにより、薬物活性リズムマーカーを抽出することも可能となる。

## 5.2 リズム障害と回避

リズム障害とその回避方法に関して、インターフェロン (IFN) は癌や肝炎の治療に幅広く使用されているが、中枢性の副作用、うつ病や自殺を引き起こすことから厚生省より警告がなされていた<sup>12,13)</sup>。その機序としてコルチゾールおよびリンパ球数などの生体リズムが変容することが一部関与しているものと思われる。また休息期に IFN を投与することで、コルチゾールや白血球のリズム障害を回避できることも知られていた。マウスを対象とした実験で、時

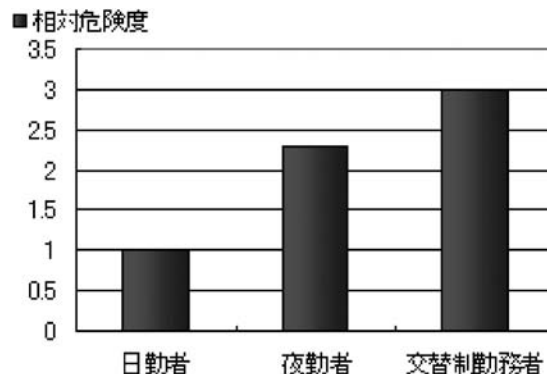


図 4 生存分析による男性労働者の勤務時間スケジュールと前立腺がんにかかるリスクの関連<sup>33)</sup>

働く時間が昼夜決まっていない交替制勤務者では、仕事の時間が昼間に限られる日勤者に比べて前立腺がんにかかりやすい。仕事の時間が夜間のみの夜勤者については日勤者に比べて 2.3 倍のリスクが上昇する。

計遺伝子の日周リズムが末梢のみならず SCN でも IFN により障害されることが明らかとなった<sup>14)</sup>。一方、IFN により誘導される時計機能障害は投薬時刻を考慮することで回避できる。

リズムの障害の健康への影響としては、ヒトにおける疫学調査において、夜間のシフトワーカーは生活リズムが変容するため乳癌の発癌リスクが高まることが明らかとなった<sup>32)</sup>。そのリスクは、夜に勤務する年間あたりの回数および週間あたりの時間数と関係して増加する。さらに約 8 万名の女性を対象とした 10 年間にわたる研究で、乳癌の発癌リスク要因として、日周リズムが家族歴以上に重要な要因であることが判明した。

約 14,000 人の男性労働者を解析対象として、生存分析を用い、勤務時間帯と前立腺がんにかかるリスクの関連が検討された。昼間だけ働く「昼間勤務」、夜間だけ働く「夜間勤務」、昼夜交替で働く「交替制勤務」の 3 グループで比較された。その結果、働く時間が昼夜決まっていない交替制勤務者では、仕事の時間が昼間に限られる日勤者に比べて前立腺がんにかかりやすい。仕事の時間が夜間のみの夜勤者については日勤者に比べて 2.3 倍にリスクが上昇する (図 4)<sup>33)</sup>。

Per2 変異マウスの行動リズムは、野生型のマウスと比較して周期が短縮し、恒暗条件下では日周リズムが障害されている。DNA 損傷に対する反応性は、Per2 変異マウスにおいて、 $\gamma$  線照射による発癌リスクが高まる<sup>34)</sup>。Per2 変異が  $\gamma$  線照射後の p53 によるアポトーシスを部分的に障害し、遺伝的な不安定性や損傷細胞の増加を導き細胞が癌化する。Per2 変異が Bmal1 の発現を減少させ、それと関連して c-Myc を抑制している Bmal1 / Clock, Bmal1 / Npas2 が減少し、結果的に c-Myc の発現が増加し、遺伝

的な不安定性や損傷細胞の増加を導き細胞が癌化する。

マウスにおいて、Cry1, Cry2, Bmal1等の時計遺伝子の機能を欠損させると、活動休息リズムが消失し、活動期が短縮する<sup>35,36</sup>。一方、Per3の遺伝的多型と関連して朝型指向性のヒトは、夜型指向性のヒトと比較して、持続覚醒時に生じる眠気がより強くなる<sup>37</sup>。また睡眠相前進症候群(advanced sleep phase syndrome: ASPS)は、朝の早すぎる時刻に覚醒し、夕方や夜の早すぎる時刻に眠くなる疾患である。睡眠、体温、メラトニンの各周期が正常より4時間進んでいる「早起き」型を示す。患者は夜の早すぎる時刻での強い眠気や朝の不眠を訴える。米国で、ASPSが常染色体性優性形式で家族内に多発する家系が複数発見された<sup>38,39</sup>。

血圧および心拍数は昼間に高値を示し、夜間に低値を示す<sup>40</sup>。心筋梗塞、不安定狭心症、心臓突然死などの急性冠症候群、脳梗塞あるいは冠動脈スパズムは、早朝に多発する。この原因として、早朝に血液凝固能が亢進することも一因として考えられる。プラスミノゲンアクチベータ(tPA)の活性が早朝に低下し、プラスミノゲンアクチベータインヒビターI(PAI-1)の活性が上昇し、線溶系の活性が早朝に低下し、血栓ができやすい状態になる。さらに、tPAの活性低下はPAI-1の活性上昇によるものと考えられ、活性の日周リズムが血液凝固能の日周リズムを調節している。Pai-1遺伝子発現の日周リズムは、時計遺伝子の制御下にある。一方、Cry1およびCry2の両遺伝子を欠損するCry nullマウスは、中枢時計および末梢時計のリズムが消失し、マウスを3%食塩負荷給餌にすると血圧は1週間後に30 mmHg上昇する<sup>41</sup>。血漿アルドステロン濃度は、野生型マウスは弱い概日リズムを示すが、Cry nullマウスは1日を通して数倍以上の高値を示す。Cry nullマウスでは、血漿レニン活性は低下しており低レニン高アルドステロン性の原発性アルドステロン症のモデルといえる。Bmal1欠損マウスもCry nullマウス同様に、活動休息リズムおよび血圧のリズムは消失するが、平均血圧は野生型よりも低くなる<sup>42</sup>。

遊離脂肪酸の血中濃度に日周リズムが存在することから脂肪細胞における時計遺伝子の存在が示唆されてきた。脂肪細胞で時計遺伝子が発現していること、時計遺伝子の一つであるBMAL1が脂肪細胞の分化に必須である<sup>43</sup>。BMAL1は脂肪細胞における脂肪酸およびコレステロール合成を活性化し、その一方で脂肪酸分解を抑制して細胞内における脂質の蓄積を増大させる。またClock点変異ミュータントマウスは、休息期である明期でも摂食し、高カロリー食を与えると体重増加が加速されメタボリックシンドローム症状を示す<sup>44</sup>。Per2ミュータントマウスは、休息期である明期にも摂食行動が盛んである。Bmal1は、脂肪細胞の分化を制御したり、糖代謝にも深く関わってい

る<sup>43</sup>。Bmal1やClockを膵臓特異的に欠損させたマウスでは、ランゲルハンス島の形成が不全になり糖尿病を発症する<sup>45</sup>。糖尿病モデルマウスの肝臓でCryを過剰発現させると、高血糖およびインスリン感受性を改善する<sup>46</sup>。一方、ヒトにおいても、Bmal1やClockは、糖尿病の発症と関連している<sup>45,47</sup>。またヒトのPer2遺伝子の多型が肥満に関連し、間食が多く、朝食を食べない傾向にある<sup>48</sup>。

その他の時計遺伝子の変異により生体リズムが障害されることも明らかにされている。今後、個体内変動の個体差に着目して、種々の時計遺伝子の遺伝的多型解析を実施することにより、日周リズムの変容の有無を遺伝子診断から推定することや時計遺伝子と疾病の関係も明らかになるであろう。

### 5.3 リズム操作法

種々の薬物が、体内時計に作用し、生体リズムの位相を変化させる。光刺激は主観的暗期に特異的に体内時計の位相を変化させるが、多くの非光刺激は明期に作用して体内時計をリセットする。このような非光同調因子としては、薬物、制限給餌などが知られている。例えば、マウスのSCNにおける時計遺伝子の転写促進作用は、ハロペリドールを投与する時刻に依存してその反応パターンが変化する<sup>1,2</sup>。また摂食条件を繰り返して操作することにより、末梢での時計遺伝子の日周リズムが摂食時間帯に応じて変化する<sup>49</sup>。逆に薬物や摂食条件を操作することにより、生体リズムを調整したり、意図的に変化させることも可能である。すなわち、先に記載した生体リズム診断に基づき生体リズムに応じて至適投薬タイミングを設定する従来の時間治療に対し、生体リズムを積極的に操作することにより至適投薬タイミングを容易に設定可能な新規時間治療法の開発につながるものと思われる。一方、分子標的抗癌剤であるイマチニブは、bcr-ablや血小板由来増殖因子(PDGF)受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害するため、慢性骨髄性白血病やKIT(CD117)陽性消化管間質腫瘍の治療薬として用いられている。マウスに移植した癌細胞および正常骨髄細胞の細胞動態の日周リズムに及ぼすPDGF受容体チロシンキナーゼ阻害薬(AG1295)の影響について検討したところ、AG1295は癌細胞に特異的に作用し、細胞動態の日周リズムの位相をシフトさせた<sup>50</sup>。すなわち癌細胞特異的に感受性リズムを制御することにより、次に投与する抗癌剤の至適投薬タイミングを容易に設定できる。以上のように薬物や摂食条件により生体内環境、すなわち生体リズムを操作することにより積極的な時間治療を展開できる。

1例として、高齢者は、加齢により生体リズムが障害される。多くの高齢者は外出の必要性が減り、光を浴びる機会も少なくなる。視覚だけでなく、多くの感覚機能が低下

していくために、同調因子が入ってきてうまく受け取れない。健康な高齢者、不眠の高齢者、光照射を行った後の高齢者のメラトニン血中濃度を比較すると、不眠で悩む高齢者がいちばん低いが、光療法を行った後は、健康な高齢者よりも高くなった<sup>51)</sup>。また、健康な高齢者と認知症の高齢者のメラトニンの血中濃度を調べた結果、健康な高齢者はメラトニンのピークが午前0時に来るが、認知症の高齢者ではメラトニンの分泌リズムに振幅の幅があまりなく、ピークが明瞭でない。これは、メラトニンの分泌機能の低下というよりも受光量が減少していることがメラトニンの分泌低下の原因となり、高齢者の不眠を引き起こしている可能性を示唆するものである。したがって、高齢者の不眠対策としては、生活習慣を見直し、光を浴びることが望ましい。

#### 5.4 時間薬物送達システム学 Chrono-DDS (drug delivery system)

薬を薬理活性発現部位に選択的に送達することを標的指向化(ターゲティング)という。受容体や酵素などが標的分子となるが、癌細胞では、種々の受容体が過剰発現しており、癌細胞への選択的な薬物送達における分子として注目されている。これらの標的分子にも日周リズムが存在するため、そのリズムを考慮した投薬スケジュールが必要となる。鉄は癌細胞の増殖にとって重要な栄養素の一つであり、その取り込みはトランスフェリン受容体1(TfR1)を介して行われる。現在、TfR1を介した鉄輸送を標的とした抗癌剤の開発が各国で行われている。こうした状況の中で、我々は、結腸癌細胞を移植したマウスを対象にTfR1発現には21:00(マウス活動期)に高値を示す有意な日周リズムが存在することを明らかにした<sup>52)</sup>。また、TfR1発現リズムは癌遺伝子であるc-Mycにより制御されていることを明らかにした。次に、癌細胞のTfR1発現リズムを指標に、TfR1のリガンドであるトランスフェリンを結合したりポソームにオキサリプラチンを封入したりポソーム製剤の抗腫瘍効果に及ぼす投与時刻の影響について検討した。その結果、21:00投与群において抗腫瘍効果が増強し、また腫瘍内L-OHPの取り込み量も21:00投薬群で上昇することを明らかにした。これらの結果より、癌細胞の分子リズムを標的とした創薬・育薬は、より有用性の高い癌化学療法構築につながるものと思われる。

#### 6. おわりに

生体は体内時計の階層構造をうまく利用し、生体のホメオスタシス機構を維持している。生理的ホメオスタシスや薬効に日周リズムが存在することが、時間薬理学の基盤になっている。薬物活性リズムの成因を少なくとも薬物動態と生体の感受性の両側面から検討し、投薬設計に応用していくことが重要である。TDMの領域では少数の測定値か

らでも種々のパラメータを算出可能なベイズ理論に基づく母集団薬物動態解析が使用されており、リズム解析法に基づく時間投薬設計に応用されることが望まれる。また、薬物治療を支えている重要な柱である製剤学的側面の一つにDDSが存在する。DDSの特色の一つである放出制御の工夫は時間薬物治療を臨床の場に導入する際、極めて魅力的であり有用な手段と考えられる。治療において、これまで蓄積された時間薬理学的所見を体内時計の分子機構の側面より整理・体系化していくことが必要となる。具体的には、時計遺伝子を基盤にした薬の代謝酵素、受容体機能などの日周リズムの成因解明、新規副作用(体の恒常性の破綻)を克服するための投薬設計の構築、至適投与タイミングの設計を容易にする生体のリズム操作方法の開発などを目的とした研究が重要である。これまで経験的に行われていた1日2回あるいは3回均等分割する投薬設計を、生体リズムを考慮して治療効果が望まれる時間帯に高用量、不必要な時間帯には投与量を減量するといった試みだけでも医薬品適正使用の向上につながるのではないだろうか。多くの生体の機能や病気に日周リズムが認められるため、個々の生体リズムにマッチした投薬タイミング、投与方法、製剤の工夫が望まれる。

#### 参考文献

- 1) Ohdo, S.: Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**: 859–875 (2010).
- 2) Ohdo, S., Koyanagi, S. and Matsunaga, N.: Chrono-drug-delivery focused on biological clock: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**: 885–897 (2010).
- 3) Reinberg, A., Pauchett, F., Ruff, F., Gervais, A., Smolensky, M. H., Levi, F., Gervais, P., Chaouat, D., Abella, M. L. and Zidani, R.: Comparison of once-daily evening versus morning sustained-release theophylline dosing for nocturnal asthma. *Chronobiol. Int.*, **4**: 409–419 (1987).
- 4) Levi, F., Zidani, R. and Misset, J. L.: Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer. *Lancet*, **350**: 681–686 (1997).
- 5) Bjarnason, G. A. and Hrushesky, W. J. M.: Cancer chronotherapy, Hrushesky, W. J. M. ed.: Circadian Cancer Therapy. CRC Press Inc., Boca Raton, Ann Arbor, London and Tokyo, 241–263, 1994.
- 6) Hrushesky, W. J. M., von Roemeling, R. and Sothorn, R. B.: Circadian chronotherapy: from animal experiments to human cancer chemotherapy, Lemmer, B. ed.: Chronopharmacology: Cellular and Biochemical Interactions. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 439–473, 1989.

- 7) Ohdo, S., Nakano, S. and Ogawa, N.: An influencing factor to predict plasma valproate concentrations: circadian stage-dependent kinetics. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **21**: 747–754 (1990).
- 8) Ohdo, S., Nakano, S. and Ogawa, N.: Circadian stage-dependent changes in valproate kinetics and application to dosage adjustment. *Clin. Pharmacol.*, **6**: 108–112 (1990).
- 9) Chrystyn, H., Ellis, J. W., Mulley, B. A. and Peake, M. D.: Bayesian derived predictions for twice daily theophylline under outpatient conditions and an assessment of optimal sampling times. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **27**: 215–221 (1989).
- 10) Duncan, W. C.: Circadian rhythms and the pharmacology of affective illness. *Pharmacol. Ther.*, **71**: 253–312 (1996).
- 11) Nishimura, K., Kato, H. and Saito, M.: Effects of cyclic and continuous total enteral nutrition on 24-h rhythms of body temperature and urinary excretions. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38**: 117–125 (1992).
- 12) Abrams, P. G., McClamrock, E. and Foon, K. A.: Evening administration of alpha interferon. *N. Engl. J. Med.*, **312**: 443–444 (1985).
- 13) Bocci, V.: Administration of interferon at night may increase its therapeutic index. *Cancer Drug Deliv.*, **2**: 313–316 (1985).
- 14) Ohdo, S., Koyanagi, S., Suyama, H., Higuchi, S. and Aramaki, H.: Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nature Med.*, **7**: 356–360 (2001).
- 15) Arendt, J., Aldhous, M. and Marks, V.: Alleviation of jet-lag by melatonin: preliminary results of controlled double blind trial. *Br. Med. J.*, **292**: 1170 (1986).
- 16) Dahlitz, M., Alvarez, B., Vignau, J., English, J., Arendt, J. and Parkes, J. D.: Delayed sleep phase syndrome response to melatonin. *Lancet*, **337**: 1121–1124 (1991).
- 17) Lewy, A. J., Ahmed, S., Latham Jackson, J. M. and Sack, R. L.: Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol. Int.*, **9**: 380–392 (1992).
- 18) Siebler, M., Steinmetz, H. and Freund, H. J.: Therapeutic entrainment of circadian rhythm disorder by melatonin in a non-blind patient. *J. Neurol.*, **245**: 327–328 (1998).
- 19) Zaidan, R., Geoffriau, M., Brun, J., Taillard, J., Bureau, C., Chazot, G. and Claustrat, B.: Melatonin is able to influence its secretion in humans: description of a phase-response curve. *Neuroendocrinology*, **60**: 105–112 (1994).
- 20) Reppert, S. M., Weaver, D. R., Rivkees, S. A. and Stopa, E. G.: Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science*, **242**: 78–81 (1988).
- 21) 平井圭介, 加藤浩紀, 西川久夫, 行弘信仁, 西山啓次, 宮本政臣: メラトニン受容体作動薬ラメルテオン(ロゼレム錠 8 mg)の薬理作用と臨床試験成績. *日本薬理学雑誌*, **136** (1): 51–60 (2010).
- 22) Aschoff, J.: Comparative physiology: diurnal rhythms. *Ann. Rev. Physiol.*, **25**: 581–600 (1963).
- 23) Moore, R. Y. and Eichler, V. B.: Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.*, **42**: 201–206 (1972).
- 24) Akashi, M., Soma, H., Yamamoto, T., Tsugitomi, A., Yamashita, S., Yamamoto, T., Nishida, E., Yasuda, A., Liao, J. K. and Node, K.: Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**(35): 15643–15648 (2010).
- 25) Kasukawa, T., Sugimoto, M., Hida, A., Minami, Y., Mori, M., Honma, S., Honma, K., Mishima, K., Soga, T. and Ueda, H. R.: Human blood metabolite timetable indicates internal body time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**(37): 15036–15041 (2012).
- 26) Koyanagi, S., Kuramoto, Y., Nakagawa, H., Aramaki, H., Ohdo, S., Soeda, S. and Shimeno, H.: A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. *Cancer Res.*, **63**: 7277–7283 (2003).
- 27) Desai, V. G., Moland, C. L., Branham, W. S., Delongchamp, R. R., Fang, H., Duffy, P. H., Peterson, C. A., Beggs, M. L. and Fuscoe, J. C.: Changes in expression level of genes as a function of time of day in the liver of rats. *Mutation Res.*, **549**: 115–129 (2004).
- 28) Gachon, F., Olela, F. F., Schaad, O., Descombes, P. and Schibler, U.: The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab.*, **4**: 25–36 (2006).
- 29) Murakami, Y., Higashi, Y., Matsunaga, N., Koyanagi, S. and Ohdo, S.: Circadian clock-controlled intestinal expression of the multidrug-resistance gene *mdr1a* in mice. *Gastroenterology*, **135**: 1636–1644 (2008).
- 30) Takiguchi, T., Tomita, M., Matsunaga, N., Koyanagi, S. and Ohdo, S.: Molecular basis for rhythmic expression of CYP3A4 in serum-shocked HepG2 cells. *Pharmacogenet. Genomics*, **17**: 1047–1056 (2007).
- 31) Matsunaga, N., Ikeda, M., Takiguchi, T., Koyanagi, S. and Ohdo, S.: The molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of CYP2E1 expression in the mouse liver. *Hepatology*, **48**: 240–251 (2008).
- 32) Schernhammer, E. S., Laden, F., Speizer, F. E., Willett, W. C., Hunter, D. J., Kawachi, I. and Colditz, G. A.: Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**: 1563–1568 (2001).
- 33) Kubo, T., Ozasa, K., Mikami, K., Wakai, K., Fujino, Y., Watanabe, Y., Miki, T., Nakao, M., Hayashi, K., Suzuki, K., Mori, M., Washio, M., Sakauchi, F., Ito, Y., Yoshimura, T. and Tamakoshi, A.: Prospective cohort study of the risk of



- prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan Collaborative Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.*, **164**: 549–555 (2006).
- 34) Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P. and Lee, C. C.: The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, **111**: 41–50 (2002).
  - 35) Laposky, A., Easton, A., Dugovic, C., Walisser, J., Bradfield, C. and Turek, F.: Deletion of the mammalian circadian clock gene *BMAL1/Mop3* alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation. *Sleep*, **28**(4): 395–409 (2005).
  - 36) Wisor, J. P., O'Hara, B. F., Terao, A., Selby, C. P., Kilduff, T. S., Sancar, A., Edgar, D. M. and Franken, P.: A role for cryptochromes in sleep regulation. *BMC Neurosci.*, **3**: 20 (2002).
  - 37) Viola, A. U., Archer, S. N., James, L. M., Groeger, J. A., Lo, J. C., Skene, D. J., von Schantz, M. and Dijk, D. J.: *PER3* polymorphism predicts sleep structure and waking performance. *Curr. Biol.*, **17**(7): 613–618 (2007).
  - 38) Jones, C. R., Campbell, S. S., Zone, S. E., Cooper, F., DeSano, A., Murphy, P. J., Jones, B., Czajkowski, L. and Ptacek, L. J.: Familial advanced sleep-phase syndrome: a short-period circadian rhythm variant in humans. *Nature Med.*, **5**: 1062–1065 (1999).
  - 39) Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptacek, L. J. and Fu, Y. H.: An *hPer2* phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, **291**: 1040–1043 (2001).
  - 40) Maemura, K., de la Monte, S. M., Chin, M. T., Layne, M. D., Hsieh, C. M., Yet, S. F., Perrella, M. A. and Lee, M. E.: *CLIF*, a novel cycle-like factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *J. Biol. Chem.*, **275**: 36847–36851 (2000).
  - 41) Doi, M., Takahashi, Y., Komatsu, R., Yamazaki, F., Yamada, H., Haraguchi, S., Emoto, N., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Kanematsu, A., Ogawa, O., Todo, T., Tsutsui, K., van der Horst, G. T. and Okamura, H.: Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient *Cry*-null mice involves dysregulated adrenal *Hsd3b6*. *Nature Med.*, **16**(1): 67–74 (2009).
  - 42) Curtis, A. M., Cheng, Y., Kapoor, S., Reilly, D., Price, T. S. and Fitzgerald, G. A.: Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**(9): 3450–3455 (2007).
  - 43) Shimba, S., Ishii, N., Ohta, Y., Ohno, T., Watabe, Y., Hayashi, M., Wada, T., Aoyagi, T. and Tezuka, M.: Brain and muscle *Arnt*-like protein-1 (*BMAL1*), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 12071–12076 (2005).
  - 44) Shibata, S., Tahara, Y. and Hirao, A.: The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**(9–10): 918–927 (2010).
  - 45) Marcheva, B., Ramsey, K. M., Buhr, E. D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C. H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M. H., Lopez, J. P., Philipson, L. H., Bradfield, C. A., Crosby, S. D., JeBailey, L., Wang, X., Takahashi, J. S. and Bass, J.: Disruption of the clock components *CLOCK* and *BMAL1* leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, **466**(7306): 627–631 (2010).
  - 46) Zhang, E. E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P. Y., Liu, A. C., Hirota, T., Nusinow, D. A., Sun, X., Landais, S., Kodama, Y., Brenner, D. A., Montminy, M. and Kay, S. A.: Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nature Med.*, **16**(10): 1152–1156 (2010).
  - 47) Woon, P. Y., Kaisaki, P. J., Bragança, J., Bihoreau, M. T., Levy, J. C., Farrall, M. and Gauguier, D.: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (*BMAL1*) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**(36): 14412–14417 (2007).
  - 48) Garaulet, M. and Madrid, J.: Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**(9–10): 967–978 (2010).
  - 49) Damiola, F., Minh, N. L., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F. and Schibler, U.: Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.*, **14**: 2950–2961 (2000).
  - 50) Nakagawa, H., Koyanagi, S., Kuramoto, Y., Yoshizumi, A., Matsunaga, N., Shimeno, H., Soeda, S. and Ohdo, S.: Modulation of circadian rhythm of DNA synthesis in tumor cells by inhibiting platelet-derived growth factor signaling. *J. Pharmacol. Sci.*, **107**: 401–407 (2008).
  - 51) Mishima, K., Okawa, M., Shimizu, T. and Hishikawa, Y.: Diminished melatonin secretion in the elderly caused by insufficient environmental illumination. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**(1): 129–134 (2001).
  - 52) Okazaki, F., Matsunaga, N., Okazaki, H., Utoguchi, N., Suzuki, R., Maruyama, K., Koyanagi, S. and Ohdo, S.: Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Res.*, **70**(15): 6238–6246 (2010).