

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15005

研究課題名(和文)病態時の分子時計機構に及ぼすエクソソームの役割

研究課題名(英文)The role of exosome on molecular clock in organ dysfunction

研究代表者

大戸 茂弘 (Ohdo, Shigehiro)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：00223884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、まず慢性腎臓障害時の肝臓では、Cypおよびその転写制御因子の発現低下による肝薬物代謝機能障害が生じることを明らかにした。次に肝臓のDBP発現量の日周リズムの変容は、肝臓由来のエクソソームにおけるDBP発現量の日周リズムの変容に対応していた。血中エクソソーム中の時計遺伝子の発現量を解析することで、病態時の臓器リズム障害の指標となる時計遺伝子の発現リズム変容を非侵襲的に診断できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) increases the disease risk of liver dysfunction, apoplexy, cardiac failure, cardiac infarction and neurological complications. However, the role of exosome on molecular clock in organ dysfunction remain unclear. Here, we showed the disruptive effect of chronic renal failure in 5/6 nephrectomy mice on the 24-hr rhythm of clock gene expressions regulating cytochrome P450 (CYPs) in liver. These disruptive effects of clock genes were reflected by the alteration of molecular clock in exosome.

研究分野：時間薬剤学

キーワード：薬学 分子時計 エクソソーム 病態

## 1. 研究開始当初の背景

生体は、分子(タンパク質)、細胞、組織、器官そして個体として、多階層性を持ちシステムとして生体の恒常性を維持している。その巧みな多階層性の制御機構として体内時計機構は存在する。体内時計の本体は、視神経が交差する視交叉上核(SCN)に位置し、時計遺伝子により制御されている。SCNが中枢時計として、ホルモンや自律神経の日周リズムを制御し、末梢の分子時計を制御している。生体リズムは、健康を保持・増進させる上でも重要で、その破綻が睡眠障害、精神疾患のみならず三大死因疾患(心・脳・癌)の高リスクにつながる。こうした状況の中で我々は、インターフェロンによる分子時計破綻機構を世界で初めて明らかにした(Ohdo S, Nature Med 2001, Proc Natl Acad Sci USA 2003, JBC 2005)。また分子時計の変容により薬物代謝・輸送機能が障害されることを突き止めた

(Hepatology 2008, Gastroenterology 2008, JBC 2011, JBC2012, J Invest Dermatol 2014)。さらに癌細胞の増殖・修復・アポトーシスにリズムが認められ、正常時とは異なった分子時計機構により制御されていることを明らかにした(Cancer Res 2003, 2004, 2005, 2012, 2013, 2014)。これらの研究成果は、日本経済新聞、NHKテレビ、Wall Street Journalなどでとりあげられるなど国際的・社会的に高く評価されている。しかしながら、分子時計を基盤とした細胞や組織間の階層性制御機構は未だ不明な点が多い状況にあり、これら機構を解明することは各種疾患の新規診断法と医薬品の創出に貢献できると考えられる。

一方、慢性腎臓病(Chronic kidney disease)は、腎機能が50%以下の状態が慢性的に続く病態の総称を指す。一般に、CKD患者に薬物を投与する際、腎排泄型薬物の血中濃度上昇等を考慮する必要がある。近年、これらの薬物動態学的変化に影響を及ぼす因子として、腎臓のみならず肝臓の薬物代謝を担う酵素であるシトクロムP450(CYPs)の発現量が健常時と比較して顕著に減少することが報告されている。その中でもCKD時に発現量が減少するCYPs分子種のCYP3A4は臨床で使用されている医薬品の50%以上の代謝に関与する代表的な分子種である。これらの問題点として、腎機能低下と肝臓CYP3A4の代謝能低下の因果関係が臨床レベルで認識されていないこと、CYP3A4の発現量を回復させる有効な手法が確立されていないことが挙げられる。したがって臨床現場では、副作用が出現してから投与量を調節するという後ろ向きの投薬設計がなされている。CKD患者の代謝能力を超えた、薬物過剰な投与による副作用防止の観点からも、CKD時における肝臓薬物代謝酵

素CYP3A4発現量低下機構の解明が望まれている。ヒトを初めとする多くの哺乳動物には、概日周期で生体機能を制御する体内時計が備わっている。体内時計の本体は、時計遺伝子*Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry*が構築する転写/翻訳フィードバックループであり、D-site binding protein (DBP)に代表される時計出力遺伝子を介してさまざまな生体機能の概日リズムを制御している。時計出力遺伝子により制御される分子には、異物の代謝に関わる多くの代謝酵素が含まれている。そのため、薬物の効果や副作用も投薬時刻により変化する。

これまでに、CKDの腎機能に関する予測分子(バイオマーカー)が数多く発見、報告されている。しかしながら、CKD時における肝臓薬物代謝能を予測するマーカーの同定、また予測方法は構築されていない状況にある。

生体内のエキソソームは、生体内の新しい情報伝達物質として注目されている。エキソソームは、脂質二重膜により構成されたベシクルであり、最近注目されている創剤デバイスのリポソームのような物質である。エキソソーム内には、miRNA、mRNAなどの核酸やタンパク質が含まれ、外は脂質二重膜により強固に守られている。近年の研究により、生体内ではこれらのエキソソームが各種細胞や組織間の情報伝達物質として機能していることが示唆されているが、生体内での動態やその制御機構は未だ不明な点が多い状況である。

最近我々はエキソソームが新規分子時計として生体内で機能している可能性を示唆する所見を見出した。本結果は生物学的にも、創薬治療の点でも非常に興味深い所見であり、体内時計の分子機構とエキソソームとの相互作用についてその分子機構を解明し、全く新しい視点から新たな生体機能の多階層性制御機構を探索し、新規病態診断法と創薬を目指すに至った。

本研究の学術的な特色は体内時計の分子機構とエキソソームとの連関についてその分子機構を解明し、分子時計機構を基盤とした新規の生体多階層性制御機構の提案またその機構を応用した病態時のリズム診断法の確立と創薬を目指している点が、世界的にも類を見ない極めて新規性の高いアプローチといえる。

## 2. 研究の目的

本研究では、まずCKDモデルマウスを対象に、分子時計機構を基盤として肝臓薬物代謝酵素発現低下機構の解明を行った。また、肝臓のCYPsは多くの生理活性分子の合成、代謝に関わっている。これまでに、CKDの腎機能に関する予測分子(バイオマーカー)が数多く発見、報告されている。しかしながら、CKD

時における肝臓薬物代謝能を予測するマーカーの同定、また予測方法は構築されていない状況にある。この課題を解決するため、血清エキソソームを用いて、エキソソーム中に含まれる時計遺伝子 DBP 発現低下機構の解明を行なった。

### 3. 研究の方法

実験動物としては、ICR 雄性野生型マウス、ICR 雄性 Circadian locomotor output cycles kaput (*Clock*) mutant (*Cik/Cik*) マウス (C57BL/6J*Clock*<sup>m1Jt/J</sup>) は、自由摂食・摂水、12 時間の明暗周期 (明期: 7:00-19:00) で飼育した。またビタミン A 欠損食は、日本クレア株式会社にて特別注文して作成した。

血中のビタミン A (レチノール) 量は、HPLC により測定した。また TGF- $\beta$ 1 発現量は、各モデルマウスから血液を採取し、3000g 15 分で遠心後の血清成分を対象に ELISA を用い測定した。

CKD モデルマウス (5/6 nephrectomy; 5/6Nx) の作製としては、野生型または *Cik/Cik* マウスを対象に 7 週齢時に左腎を 2/3 摘出、翌 8 週齢時に右腎を全摘出手術後、さらに 8 週間飼育した 16 週齢マウスを CKD モデルマウス (5/6Nx) として使用した。

遺伝子発現解析としては、9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 の 6 時点において採取した臓器および培養細胞から、各遺伝子のタンパク質発現量は western blotting 法で測定した。mRNA の発現量は microarray 法もしくは Total RNA を、リボトラエース (TOYOBO) を用い逆転写反応した後に SYBR Green I 法 (サンダーバード: TOYOBO) を用い real-time PCR を用い定量した。

腎機能評価方法としては、血清クレアチニン値 (SCr)、血中尿素窒素 (BUN) をキットプロトコールに従い測定することで評価した。また、組織の線維化の評価として、マッソントリクローム染色 (MT) を行い、青色に染色された部位を線維化領域として解析した。

病理組織の解析は、HS オールインワン蛍光顕微鏡 - BZ-9000 シリーズを用い観察した後に、解析を行った。

エキソソーム抽出方法としては、マウス血清中エキソソームの抽出は ExoQuick™ exosome precipitation solution (System Biosciences 社) を用いた。培養細胞培地中エキソソームの抽出は ExoQuick-TC™ exosome precipitation solution を使用し、それぞれキットプロトコールに従い単離した。

肝臓特異的なエキソソームの単離精製は、肝臓特異的な抗原である Asialoglycoprotein receptor 1 (ASGPR1) 抗体を用い、ダイナビーズを用いた免疫沈降法により ASGPR1 に結

合した肝臓由来のエキソソームを分離した。これら肝臓由来のエキソソームを、RNAiso を用いた Total RNA 抽出を行い遺伝子発現の変化を観察した。また細胞溶解・タンパク質抽出 (CellLytic) (Sigma-Aldrich) を用いエキソソームを溶解し、溶解したサンプルを 12000g で 10 分遠心分離した上清をたんぱく質サンプルとして用い測定した。

統計解析としては、独立多群の比較には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および Tukey's post-hoc tests を用いた。また、日内変動の解析には cosinor analysis を使用し、有意水準は 5% 以下を有意な差とした。

### 4. 研究成果

まず CKD モデルマウスにおける肝 CYP3A11、CYP26A1 発現低下機構を解明する目的で、腎臓を 5/6 摘出することにより作成した CKD モデルマウス (5/6Nx) の肝臓において、遺伝子発現変化の網羅的解析をマイクロアレイ法で行った。その結果、5/6Nx の肝臓において多くの薬物代謝に関わる遺伝子の発現量が低下することが明らかとなった。その中から生体で重要な役割を演じるレチノール代謝の変容に着目した。CYP3A11 は、ヒトでは CYP3A4 に相当する分子種の 1 つであり、CYP26A1 はレチノール代謝の律速酵素の一つであることから、以降ではこの 2 つに着目した。

CYPs 転写因子発現量に及ぼす腎障害の影響としては、CYP3A の基本転写因子である *Pxr*、*Car*、*Hnf1*、*Hnf4* 発現量に着目したが、腎障害時において変化は認められなかった。先のマイクロアレイ解析の結果から、時計遺伝子の変化が示唆されたことから発現量を測定したところ、転写促進因子の DBP 発現量が有意に低下していることを見出した。

ヒト CYP3A4 発現に日周リズムが存在することは明らかにされているが、マウス CYP3A11 および CYP26A1 発現では不明であった。そこで正常時における *Cyp3a11*、*Cyp26a1* 遺伝子発現の日内変動制御機構の解析を行った結果、これら mRNA 発現に日内変動が存在し、このリズムは CYP3A4 と同様、時計遺伝子で転写促進因子の DBP、転写抑制因子の E4 promoter binding protein 4 (E4BP4) によりリズムカルに制御されていることを明らかにした。次に、5/6Nx 肝臓における *Cyp3a11*、*Cyp26a1* mRNA 発現量の日内変動を測定したところ、5/6Nx マウスでは有意に発現量が減少しており、Sham-operated 群でみられた発現日内変動が消失していることを見出した。また、CYP3A11、及び CYP26A1 の発現リズム制御因子である DBP の発現量を測定したところ、有意に低下していることを見出した。

次に CKD モデルマウスにおける血清エキソソーム中 DBP 発現低下機構を解明する目的で、

まず正常マウスを対象に、肝臓の時計遺伝子の発現リズムを測定した結果、肝臓の時計遺伝子 DBP 発現量および DBP により転写制御されている薬物動態関連遺伝子 (*Cyp3a11*、*Cyp26a1*) の発現量に日周リズムが認められることを明らかにした。一方、慢性腎不全モデルマウスを対象に、肝臓の時計遺伝子の発現リズムを測定した結果、肝臓の時計遺伝子 DBP 発現量および DBP により転写制御されている薬物動態関連遺伝子 (*Cyp3a11*、*Cyp26a1*) の発現量の日周リズムが変容していることを明らかにした。

正常マウスを対象に、血清中エキソソームを採取し、エキソソーム中の DBP の発現量に日周リズムが認められることを明らかにした。一方、慢性腎不全モデルマウスを対象に、エキソソームの時計遺伝子の発現リズムを測定した結果、エキソソームの時計遺伝子 DBP 発現量の日周リズムが変容していることを明らかにした。

さらにどの臓器由来のエキソソームであるかを検証するために、肝臓の特異的抗原 Asialoglycoprotein receptor 1 (ASGPR1) 抗体を用いた免疫沈降法によりエキソソームを精製しエキソソーム中の DBP 発現量を測定した結果、リズムの変容が認められた。肝臓由来のエキソソームにおける DBP の発現量の日周リズムの変容は、肝臓における DBP の発現量の日周リズムの変容に対応していた。

以上の結果より、病態時に認められる生体リズム障害の指標となる時計遺伝子の発現リズムの変容を血中エキソソーム中のタンパク質発現量を解析することで非侵襲的リズム診断ができる可能性が示唆された。また血中エキソソームを各種臓器の特異的なレセプターや抗原を用い免疫沈降で精製することで、確認したい臓器のリズム変容を検証できる技術の開発につながる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. 大戸茂弘. 体内時計の分子機構を基盤にした創薬・育薬. 生体の科学 67 (6), 574-578, 2016. 12 月 (査読無)
2. 大戸茂弘. 体内時計を基盤にした時間薬理学. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 46 (12), 837-845, 2015. 12 月 (査読無)
3. 大戸茂弘. 時間治療 現状と展望 生体リズムを基盤にした治療. 小児科臨床

68 (9), 7-16, 2015. 9 月 (査読無)

[学会発表](計 10 件)

1. 大戸茂弘. がんの時間治療. シンポジウム「時間治療の現状」第 37 回日本臨床薬理学会 (鳥取) 2016 年 12 月 1-3 日
2. 大戸茂弘. 時間薬理学を基盤にした創薬と育薬. シンポジウム「時間治療の動向と成長戦略 2016」, 第 23 回日本時間生物学学会学術大会 (名古屋) 2016 年 11 月 12-13 日
3. 大戸茂弘. 患者にやさしい生体リズムにマッチした時間治療. 第 49 回日本漢方交流会全国学術総会 福岡大会 (福岡) 2016 年 10 月 9 日
4. 大戸茂弘. 生体リズムを基盤にした創薬・育薬. 教育講演. 第 33 回日本 TDM 学会・学術大会 (栃木) 2016 年 5 月 28 日
5. Shigehiro Ohdo. Chronopharmacology of antitumor drugs focused on biological clock. Chronopharmacology in cancer, shift work sleep disorder and beyond (Chair: Francis Lévi) SRBR 2016, May 22, 2016
6. 大戸茂弘. 生体リズムを基盤にした創薬・育薬. 特別講演. 第 64 回質量分析総合討論会 (大阪) 2016 年 5 月 19 日
7. 大戸茂弘. 特別講演 2「患者に優しい生体リズムにマッチしたクロノセラピー」第 48 回日本薬剤師会学術大会 (鹿児島) 2015 年 11 月 22 日
8. 大戸茂弘. 教育講演 8「がんの時間薬理学を考えた効果的な緩和薬物治療」第 9 回日本緩和医療薬学会年会 (横浜) 2015 年 10 月 4 日
9. 大戸茂弘. 時間薬理学 患者さんにやさしい時間治療. 第 26 回日本緑内障学会 招待講演 (名古屋). 2015 年 9 月 12 日
10. 大戸茂弘. 時間制御による新たな創薬ストラテジー. 日本薬剤学会 創立 30 周年記念シンポジウム 創薬・創剤の新たな方向性を探る. 日本薬剤学会第 30 年会 (長崎) 2015 年 5 月 20 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大戸茂弘 (OHDO SHIGEHIRO)  
九州大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号: 00223884