

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08592

研究課題名(和文)腎虚血再灌流障害のアポトーシスおよび線維化に対する時計遺伝子DEC1の役割

研究課題名(英文)Effect of DEC1 on renal fibrosis and apoptosis induced by ischemia reperfusion injury

研究代表者

中島 歩(Nakashima, Ayumu)

広島大学・医系科学研究科(医)・共同研究講座教授

研究者番号：40448262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：DEC1は、光刺激や低酸素によって発現が急激に増加して分子時計の位相をシフトさせる能力を持ち、環境の変化に生体の概日リズムを順応させるユニークな時計遺伝子である。本研究では、DEC1がアポトーシスを抑制する機序と生体内での役割について検討した。

冠動脈左前下行枝を結紮した心筋梗塞後の生存率は、野生型マウスと比較して、DEC1ノックアウトマウスで有意に高かった。DEC1ノックアウトマウスでは、心筋梗塞周囲のアポトーシス領域が拡大していたが、炎症細胞浸潤は減少していた。以上より、低酸素で誘導されたDEC1によるアポトーシスの抑制は、心筋梗塞後の心破裂や心不全を増加させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、血管平滑筋細胞において低酸素によって誘導されたDEC1がアポトーシスを抑制すること、さらに、心筋梗塞後のDEC1によるアポトーシスの抑制は、炎症細胞浸潤を増加させ、生存率を低下させる可能性があることを明らかにした。本研究は、低酸素によるアポトーシスにおける新しいメカニズムの提供に寄与するとともに、今後、DEC1をターゲットとする創薬に繋がる研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The basic helix-loop-helix protein, DEC1 is usually controlled by the molecular clock system, but can be induced by light exposure, hypoxia, and feeding. Recent studies have suggested the involvement of clock genes in the induction of apoptosis after tissue injury. The purpose of this study was to clarify the mechanism by which DEC1 induced by hypoxia suppresses apoptosis and its role in vivo.

Survival rate after myocardial infarction induced by ligation of the left anterior descending artery was significantly higher in DEC1 knockout mice than in wild-type mice. Compared with wild-type mice, DEC1-knockout mice had enlarged apoptotic regions around myocardial infarction but decreased inflammatory cell infiltration. These results suggest that suppression of apoptosis by DEC1 induced by hypoxia may increase cardiac rupture and heart failure after myocardial infarction.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：時計遺伝子 DEC1 アポトーシス 心筋梗塞 生存率 炎症細胞浸潤 p53 survivin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子時計の促進因子である CLOCK/BMAL1 は、抑制系の時計遺伝子 Per、Cry、Dec などのプロモーター上にある分子時計の調節領域である E-box (CACGTG) に結合して転写を促進し、合成されたこれらのタンパクは核に移行して CLOCK/BMAL1 の転写抑制を引き起こす。この転写の促進と抑制の繰り返しが 24 時間の周期を作り出す分子時計系の仕組みである。DEC1 は、光刺激 (Honma S, [Kawamoto T](#), Nature. 2002)、低酸素 (Miyazaki K, [Kawamoto T](#), J Biol Chem. 2002)、食事 ([Kawamoto T](#), J Biochem. 2006) で誘導され、増加した DEC1 は分子時計の位相をシフトさせることから ([Nakashima A](#), Mol Cell Biol. 2008)、外界の変化に生体の概日リズムを同調させることのできる特殊な時計遺伝子である。近年、時計遺伝子が分子時計の調節以外にも様々な役割を担っていることが報告されている。

PER および CRY が分子時計の転写調節領域である E-box に直接結合できないのに対して、DEC1 は E-box に直接結合できる。そこで、研究代表者はこの性質を利用して、ヒト胚性腎臓細胞株で、抗 DEC1 抗体を用いて Genome-wide chromatin immunoprecipitation (ChIP)-on-chip assay を行い、DEC1 が直接的に制御する遺伝子の網羅的な選定に成功した。研究代表者らは、解析結果から本態性高血圧症の主要な成因遺伝子の一つである Na⁺-K⁺-ATPase β1 遺伝子に着目し、DEC1 は Na⁺-K⁺-ATPase β1 を制御して血圧を調節することを報告している ([Nakashima A](#), Hypertension. 2018)。また、ChIP-on-chip assay の解析結果と、近年の報告から、DEC1 を含む時計遺伝子が、アポトーシスの制御にかかわっていることが示唆されている。

2. 研究の目的

アポトーシスは細胞数の減少により、臓器の機能低下につながると考えられてきたが、近年、アポトーシスはその他の細胞死と比較して、続発する炎症反応が非常に少ない細胞死であることが分かってきた。本研究では、心筋梗塞と腎虚血による急性腎症の低酸素状態によって誘導されたDEC1がアポトーシスを調節する機序と生体内での役割について、野生型マウスとDEC1ノックアウトマウスを用いて明確にすることを目的とする。さらに、低酸素で誘導されたDEC1によるアポトーシスの抑制は、生体にとって不利益であり治療ターゲットになりうるのか、障害を最小限にとどめるための生体の防御機構であるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

低酸素で引き起こされるアポトーシスにおける DEC1 の役割を明らかにするために、6 週齢の野生型マウスと DEC1 ノックアウトマウスより採取した血管平滑筋細胞を用いて、1%の低酸素下で誘導される cleaved caspase-3 および caspase の活性化に先立って生じる p53 およびアポトーシス関連タンパクの発現量を比較する。また、p53 のプロモーター領域には時計の調節領域である E-box (CACGTG) が存在しており、抗 DEC1 抗体を用いた ChIP assay により、p53 遺伝子プロモーター上の E-box に DEC1 が直接結合することを明らかにする。

左前下行枝の結紮による心筋梗塞モデルを作製後の生命予後と、心筋梗塞巣の大きさ・心筋細胞のアポトーシス・炎症細胞浸潤を評価して、野生型マウスと DEC1 ノックアウトマウスで比較

する。TUNEL 染色および抗 cleaved caspase 3 抗体を用いた免疫組織化学染色でアポトーシスの評価を、抗 CD3 抗体、抗 CD68 抗体を用いた免疫組織化学染色で炎症細胞浸潤の評価を行う。

4 . 研究成果

抗 DEC1 抗体を用いた ChIP assay により、p53 遺伝子プロモーター上の E-box に DEC1 タンパクが直接結合することを明らかにした。さらに、6 週齢の野生型マウスと DEC1 ノックアウトマウスより採取した血管平滑筋細胞を用いて、1% 酸素下での培養を継続すると、野生型マウスと比較して、DEC1 ノックアウトマウスの血管平滑筋細胞で cleaved caspase-3 および p53 タンパクの発現増加と、アポトーシス抑制タンパクである survivin の減少が認められた。

冠動脈左前下行枝の結紮による心筋梗塞後の生存率は、野生型マウスと比較して、DEC1 ノックアウトマウスで著明に高かった。経時的にサンプリングした心筋細胞を用いた検討によって、野生型マウスと比較して、DEC1 ノックアウトマウスでは心筋梗塞後に p53 および cleaved caspase-3 の発現が増強しており、アポトーシスの亢進が示唆された。一方、炎症細胞浸潤については、野生型マウスと比較して、DEC1 ノックアウトマウスでは CD3 陽性細胞数、CD68 陽性細胞数が著明に減少していた。さらに、p53 の阻害薬を前投与しておくこと、DEC1 ノックアウトマウスにおける心筋梗塞後の死亡率の低下が消失した。

以上から、心筋梗塞後の低酸素で誘導される DEC1 は、p53 の発現を低下させるとともに、アポトーシス抑制タンパクである survivin を増加させることで、アポトーシスを抑制する。DEC1 ノックアウトマウスでは DEC1 が消失しているため、アポトーシスが促進することを明らかにした。また、血流の完全途絶による心筋障害では、DEC1 が増加しないほうが、スムーズに心筋のアポトーシスが生じ、引き続いて生じる炎症細胞浸潤を遷延させないことで、心筋梗塞後の予後を改善させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	正木 崇生 (Masaki Takao) (30397913)	広島大学・病院(医)・教授 (15401)	
研究分担者	東 幸仁 (Higashi Yukihiro) (40346490)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401)	
研究分担者	河本 健 (Kawamoto Takeshi) (50224861)	広島大学・学術・社会連携室・特任教授 (15401)	
研究分担者	土井 盛博 (Doi Shigehiro) (80626127)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関