

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4 月 25 日現在

機関番号：17102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659084
 研究課題名（和文） 臓器障害時の臓器間コミュニケーションにおける分子時計の役割と合併症の機序解明
 研究課題名（英文） Role of molecular clock on the communication between each organ in organ dysfunction
 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

研究成果の概要（和文）：

慢性腎臓病(CKD)の合併症を発症させる機構は未だ明らかにされていない。本研究では、CKD時に血液中で増加する因子Xに着目し、肝臓における薬物代謝能および中枢障害に及ぼす影響を明らかにした。すなわち、腎不全時の肝臓では、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および中枢障害として鬱症状が生じることを明らかにした。これら症状の発症機構として腎障害時に血漿中で高値を示す因子Xが関与していることが示めされた。

研究成果の概要（英文）：

Chronic kidney disease (CKD) increases the disease risk of apoplexy, cardiac failure, cardiac infarction and neurological complications. However, the mechanisms of these neurological complications remain unclear. Here, we showed the disruptive effect of chronic renal failure in 5/6 nephrectomy mice on the 24-hr rhythm of dopamine receptor and clock gene expressions in the striatum and cytochrome P450 (CYPs) in liver. These disruptive effects were induced by abnormal signal transduction in high Factor X expression from the kidney.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：生体リズム、分子時計、臓器障害、合併症

1. 研究開始当初の背景

生体機能には、地球の自転、公転と関連した昼夜や季節のような外部環境の周期的変化に伴った多くの周期的現象（リズム）が存在する。ヒトの場合、生体リズムは健康を保持・増進させる上でも重要で、その

破綻が不眠や精神疾患などの慢性疾患を生じる。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。

一方で、疾患と分子時計の研究も進められ、疾患の日周リズムを分子時計が制御していることも明らかにされつつある。心血管系の転写因子 KLF5 が日内変動と脂肪代謝、エネルギー代謝との関連 (Oishi Nature Med 2008)、睡眠障害と時計遺伝子との関連 (Toh, Science 2001)、Per2 変異マウスにおいて、γ線照射による発癌リスクが高まること (Fu, Cell 2002)、さらに癌細胞など障害を有する細胞において、時計遺伝子の発現が変容していることが明らかにされた。しかし、障害を有する臓器が、他の臓器とどのようなコミュニケーションを行い、合併症を引き起こすのか不明である。

こうした状況の中で申請者は、体内時計の分子機構を基盤にした創薬および適正使用を通して、時間生物学の実践的臨床応用への道を切り開くことを目的とし、研究を実施している。これらの研究過程で、抗癌剤の効果の側面より癌関連遺伝子にリズムが認められ時計遺伝子により制御されていること (Cancer Res 2003, Cancer Res, 2004, Cancer Res 2005, Pharmacogenetics and Genomics 2007)、副作用の側面より薬を持続的に与えると生体や細胞の恒常性が破綻すること、必要ときにだけ薬を与えることで生体や細胞の恒常性の破綻を回避できることを明らかにした (Nature Med 2001, Proc Natl Acad Sci USA 2003, JBC 2005)。最近、薬物活性リズムの体内時計の分子機構を解明し報告した (Hepatology 2008, Gastroenterology 2008)。また癌細胞のトランスフェリン受容体の日周リズムにあわせたトランスフェリンリポソーム製剤の新規時間薬物送達方法の開発に成功した (Cancer Res 2010)。こうした状況の中で、ある臓器を特異的に傷害したにもかかわらず、他の臓器の分子時計の制御機構が影響されることを見出した。生物学的にも、合併症の予防および治療といった点でも非常に興味深い所見であり、詳細な機序を解明し、合併症の予防薬および治療薬の開発を目指すに至った。

本邦での慢性腎臓病 (CKD) 患者は約 1300 万人存在し成人人口の約 8 人に 1 人を占め、年々透析患者数は増加している状況である。このため、腎不全に至る前に腎障害を診断し、重症化を抑制する新規の診断法と治療法が望まれている。CKD は腎機能の低下のみならず、腎臓、肝臓、小腸の薬物代謝に関与するチトクローム P450 (CYP) やトランスポーターの発現を変化させ、薬物治療を困難とさせる。また CKD は心血管イベントや様々な精神神経疾患の合併症を引き起こすことが知られている。現在、基礎研究レベルで CKD 重症化の機構が解明されつつあるが、合併症を発症させる機構は未だ明

らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、慢性腎不全という病態下における各種臓器の時計遺伝子発現リズムを解析し、各臓器における時計遺伝子発現リズムが変化する分子機構を解明する。すなわち、腎不全時の各臓器間のコミュニケーションに関わる細胞外因子および細胞内因子を同定する。また合併症の予防および治療といった点から、詳細な機序を解明する。

本研究の学術的な特色は、生体の恒常性の維持に最重要な体内時計の分子機構を指標に、病態時の特殊生体環境下における臓器間のコミュニケーションといった全く新しい視点から、合併症および発病の機構を解明し、予防薬、治療薬の開発を目指している点が、新規性の高いアプローチといえる。

3. 研究の方法

自由摂食摂水、明暗周期 (明期 7:00~19:00) 条件下で 2 週間飼育した ICR 雄性マウス 6 週齢に対し、片方の腎臓を 2/3 摘出した。さらに 1 週間後 (7 週齢) に残り一方の腎臓を全摘出した。その後、8 週間自由摂食摂水、明暗周期下で飼育し 16 週齢マウスを腎不全モデルマウスとして使用した。Sham マウスとして、手術の際 ope 群と同じだけの切り口を入れ縫合した。腎 5/6 摘出手術後、血漿中クレアチニンのレベルおよび血漿中因子 X のレベルを測定した。マウスの肝臓から total RNA を抽出し、Real time-PCR 法を用いて薬物代謝酵素、受容体およびその転写因子の発現量を測定した。腎 5/6 摘出手術後、6 週目から 8 週目まで経日的に因子 X 阻害剤を経口投与した。因子 X 阻害剤投与 14 日目に、血漿中クレアチニンのレベルおよび血漿中因子 X のレベルを測定した。因子 X 阻害剤投与 14 日目のマウスの肝臓から total RNA を抽出し、Real time-PCR 法を用いて薬物代謝酵素、受容体およびその転写因子の発現量を測定した。

因子 X 阻害剤の投与: 腎 5/6 摘出手術後、6 週目から 8 週目まで経日的 (14 日間、9:00) に因子 X 阻害剤を経口投与した。

血漿中クレアチニンレベルの測定: 腎 5/6 摘出手術後、1、2、3、4、6、8 週目にマウスから血液を採取し、血漿中クレアチニンのレベルを測定した。

血漿中因子 X レベルの測定: 腎 5/6 摘出手術後、1、2、4、6、8 週目および因子 X 阻害剤投与 14 日目のマウスから血液を採取し、血漿中因子 X のレベルを、

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay により測定した。

mRNA の発現量の測定：因子 X 阻害剤投与後 14 日目のマウスの肝臓から total RNA を抽出し、Real time-PCR 法を用いて薬物代謝酵素 Cyp およびその転写因子の発現量を測定した。内部標準は β -actin を使用した。

TST (tail-suspension test) テストによる鬱状態の評価：因子 X 阻害剤投与 14 日目のマウスを対象に、尾を固定し無動時間を計測した。

統計：独立多群間の比較には、分散分析法 (ANOVA) を用いた。また、独立 2 群間の比較には、Scheffe' tests を使用し、有意水準 $P < 0.05$ を有意な差とした。

4. 研究成果

5/6Nx 後のマウス血漿中クレアチニン量の経時的変化：術後より血漿中のクレアチニンレベルはシャム群と比較し 5/6Nx 群において高値を示した。この結果より、5/6Nx により慢性腎不全が発症していることが示唆された。

5/6Nx 後のマウス血漿中の因子 X 量の経時的変化：血漿中の因子 X 量はシャム群と比較し 5/6Nx 群において、術後 6 週目から高値を示し、8 週目においては有意に高値を示した。この結果より、腎不全の進行に伴い、因子 X の発現が高値を示すことが明らかとなった。

5/6Nx 後のマウスの代謝障害および中枢障害：5/6Nx マウスの肝薬物代謝酵素および転写因子発現量は、シャム群と比較し有意に低下した。5/6Nx マウスを対象に尾懸垂テストを行った結果、シャム群と比較し有意に無動時間が延長した。

5/6Nx マウスの血漿中クレアチニンおよび因子 X の量に及ぼす因子 X 阻害剤の影響：5/6Nx マウスの血漿中クレアチニンおよび因子 X の量に及ぼす因子 X 阻害剤 14 日間投与後の影響を検討した結果、血漿中のクレアチニン量および因子 X の量は 5/6Nx の CMC 投与群と比較し、因子 X 阻害剤投与群において、有意に低値を示した。この結果より、因子 X 阻害剤投与により腎不全の改善が認められ、また腎不全の進行に伴い増加する因子 X の発現を抑制することを明らかとした。

5/6Nx マウスの肝薬物代謝酵素 Cyp、受容体およびその転写因子の発現量に及ぼす因子 X 阻害剤の影響：5/6Nx マウスの肝薬物代謝酵素 Cyp およびその転写因子の発現量に及ぼす因子 X 阻害剤の影響を検討した。Cyp、受容体およびその転写因子の発現量は、5/6Nx によりシャム群と比較し有意に低下した。また、因子 X 阻害剤投与群において

は、シャム CMC 投与群と比較し有意な差異は認められなかった。この結果より、因子 X 阻害剤投与により腎不全時に認められる肝薬物代謝酵素 Cyp、受容体およびその転写因子の発現低下を抑制することが示唆された。

5/6Nx マウスの無動時間に及ぼす因子 X 阻害剤の影響：5/6Nx マウスの無動時間に及ぼす因子 X 阻害剤の影響を検討した。尾懸垂テスト (TST) による無動時間の延長は鬱状態を反映し、抗鬱薬の評価に用いられる。慢性腎不全患者は、不眠、鬱を伴う精神疾患を発症するリスクが非常に高いことが知られている。そこで、5/6Nx マウスを対象に TST を行った結果、シャム群と比較し有意に無動時間が延長した。その一方、因子 X 阻害剤投与群は、シャム群と比較し有意な差異は認められなかった。この結果より、因子 X 阻害剤投与により腎不全時に認められる鬱症状の発症を抑制することが示唆された。

本研究結果より、術後より血漿中のクレアチニンレベルはシャム群と比較し 5/6Nx 群において高値を示した。5/6Nx により慢性腎不全が発症していることが示唆された。血漿中の因子 X はシャム群と比較し 5/6Nx 群において、術後 6 週目から高値を示し、8 週目においては有意に高値を示した。この結果より、腎不全の進行に伴い、因子 X の発現が高値を示すことが明らかとなった。5/6Nx マウスの肝薬物代謝酵素および転写因子発現量は、シャム群と比較し有意に低下した。5/6Nx マウスを対象に尾懸垂テストを行った結果、シャム群と比較し有意に無動時間が延長した。本研究結果より、腎不全時には、肝薬物代謝酵素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および中枢障害が生じることを明らかにした。

5/6Nx マウスの血漿中クレアチニンおよび因子 X の量に及ぼす因子 X 阻害剤 14 日間投与後の影響を検討した結果、血漿中のクレアチニン量および因子 X の量は 5/6Nx の CMC 投与群と比較し因子 X 阻害剤投与群において、有意に低値を示した。この結果より、因子 X 阻害剤投与により腎不全の改善が認められ、腎不全の進行に伴い増加する因子 X の発現を抑制することを明らかとした。また、因子 X 阻害剤投与により腎不全時に認められる肝薬物代謝酵素、受容体およびその転写因子の発現低下を抑制することが示唆された。さらに、因子 X 阻害剤投与により腎不全時に認められる中枢障害を抑制することが示唆された。本研究結果より、腎不全時の肝薬物代謝機能障害および中枢障害の発症機構として因子 X が原因であることが示めされた。

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 1 件)

Ikeda E, Matsunaga N, Kakimoto K, Hamamura K, Hayashi A, Koyanagi S, Ohdo S. Molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of dopamine d3 receptor expression in mouse ventral striatum. Mol Pharmacol 83(5), 959-967, 2013.

doi:10.1124/mol.112.083535

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