

令和元年6月19日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09624

研究課題名(和文)慢性腎不全における時計遺伝子DEC1の発現異常が日内リズムに及ぼす影響

研究課題名(英文)The effect of clock gene DEC1 abnormalities in CKD

研究代表者

佐藤 冬樹 (Sato, Fuyuki)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60400131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CKDモデルマウスの腎において、時計遺伝子DEC1発現は高リン処理により減少した。また他の時計遺伝子Per1発現も変動した。この結果は、CKDモデルマウスがsuperMexにおいて、日内リズムの異常が見られたことから、時計遺伝子発現の変動によるリズム異常と考えられる。培養細胞では、高リンを処理することで、DEC1発現が減少した。一方で間質の線維化マーカーであるalphaSMAの発現は上昇した。すなわち、時計遺伝子が腎間質線維化と相互作用する可能性があり、慢性腎不全でも、間質線維化の進行しているものは、より時計遺伝子発現の異常がきたしやすいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究内容は、現在論文作成中であり、完成次第、投稿する予定である。また関連する学会などで発表し、社会や国民に公表をする予定である。本研究は、慢性腎不全が時計遺伝子に影響を及ぼす現象やメカニズムを示した内容であり、将来的には時計遺伝子の発現異常を制御することで、慢性腎不全の進展抑制に繋げることを期待する。

研究成果の概要(英文)：We showed that DEC1 expression decreased in CKD mice kidneys compared to control mice. Also, the Per1 expression decreased in CKD mice kidneys. These results suggest that abnormalities of circadian rhythm depends on the disturbance of clock genes expression. In cell culture, DEC1 expression decreased in the high concentration phosphorus treatment. On the other hand, alphaSMA increased. We speculate that clock genes link to renal interstitial fibrosis, suggesting induce severe abnormalities of clock genes expression.

研究分野：病理学

キーワード：時計遺伝子 DEC1 CKD 高リン 日内リズム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全 (CKD) は国民病の一つであり、近年、罹患患者は増加している。CKD は、血漿中のリン濃度が高く、突然死を招くことがしばしばある。また、睡眠障害の悪化は、病態をより進展させると考えられているが、その分子機序は明らかでない。睡眠や代謝などの日内リズムを制御する主要な因子は時計遺伝子である。本研究では、CKD が日内リズムを制御する時計遺伝子に焦点をあて、分子生物学的手法や免疫組織化学的手法などを用いて解析した。

### 2. 研究の目的

申請者は、転写因子 DEC1(Differentiated embryonic chondrocyte gene1)が時計遺伝子であることを発見し、DEC1 の発現異常が様々な生理現象に關与することを報告してきた。最近、申請者は予備実験により、CKD 症例で DEC1 発現が減少する新知見を得たことから、本研究の目的は以下の2点である。

1. CKD における時計遺伝子 DEC1 の発現様式を解析する
2. 高リン血症における DEC1 の発現意義を明らかにする

ことで、CKD における DEC1 の発現異常が日内リズムに及ぼす影響を解明し、さらにその分子メカニズムを構築する。

### 3. 研究の方法

#### 1. 腎尿細管上皮細胞における DEC1 発現の意義に関する研究

尿細管上皮細胞に、高濃度のリンを処理し、DEC1 発現や日内リズムの変動を検討した。DEC1 発現解析は、培養細胞から抽出したサンプルを用いて、real-time PCR や Western blotting を行った。

#### 2. CKD 症例における DEC1 発現解析

病理解剖標本を用いて、DEC1 と間質の線維化マーカーである alpha-SMA の免疫組織化学的解析を行った。CKD 症例は、臨床的に BUN やクレアチニンが高く、病理学的には腎間質に線維化があるものを選んだ。免疫染色は、自動免疫染色装置 Ventana を用いたことによって、安定した結果が得られた。

#### 3. CKD モデルマウスにおける日内リズムの解析

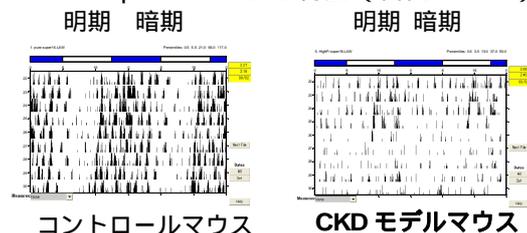
CKD モデルマウスが、日内リズムに影響を及ぼすかどうかの行動解析を行った。CKD モデルは、コントロールマウスの 5/6 腎摘出を行い、高リン給餌を 4 週間行った。コントロールは通常食とした。それらのマウスを専用の個室で明暗/恒暗条件下で SuperMex により、1 カ月、行動解析を行った。解析は専用のソフト CLOCK Lab を用いた。

### 4. 研究成果

コントロールマウスと比べて、CKD モデルマウスは日内リズムに異常が生じた (図 1)。特に高リン給餌の時間経過とともに、異常が顕著になった傾向が見られた。また、western blotting により、CKD モデルマウスの腎において、時計遺伝子 DEC1 発現は高リン処理によって減少した (図 2)。加えて他の時計遺伝子 Per1 発現も変動した。一方で alpha-SMA 発現は上昇した。培養細胞でも、western blotting により、高リンを処理することで、DEC1 発現が減少した。一方で alpha-SMA の発現は上昇した。さらに、剖検標本において、CKD 患者の腎は、コントロール腎と比べて DEC1 発現が減少し、alpha-SMA 発現が上昇していた。これらの結果は、CKD 進展に伴う腎間質線維化と時計遺伝子発現の異常が関係している可能性を示唆した。

## 図 1. CKD モデルマウスの日内リズムの消失

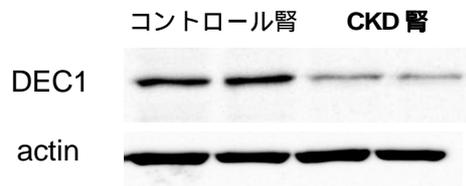
SuperMex による行動 (日内リズム) 解析



↓  
明期と暗期での行動異常

## 図 2. CKD モデルマウス腎における DEC1 発現の減少

Western blot による DEC1 発現解析



DEC1 発現の減少

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Sato F, Bhawal UK, Tojyo I, Fujita S, Murata SI, Muragaki Y. Differential expression of claudin-4, occludin, SOX2 and proliferating cell nuclear antigen between basaloid squamous cell carcinoma and squamous cell carcinoma. Mol Med Rep 2019, in press.
2. Sato F, Otsuka T, Kohsaka A, Le TH, Bhawal UK, Muragaki Y. Smad3 suppresses epithelial cell migration and proliferation via the clock gene Dec1, which negatively regulates the expression of clock genes Dec2 and Per1. Am J Pathol, 2019; 189(4): 773-783.
3. Zhang F, Kim I, Kobayashi R, Hamada N, Sato F, Bhawal UK. Transcription factor DEC1 is required for maximal experimentally induced periodontal inflammation. J Periodontal Res, 2018; 53(5): 883-893.
4. Sato F, Kohsaka A, Muragaki Y. Potential roles of *Dec* and *Bmal1* genes in interconnecting circadian clock and energy metabolism. Int J Mol Sci, 2018;19 (3): 781. Review.
5. Nakao T, Kohsaka A, Otsuka T, Thein LZ, Le HT, Waki H, Gouraud SS, Ihara H, Nakanishi M, Sato F, Muragaki Y, Maeda M. Impact of heart-specific disruption of the circadian clock on systemic glucose metabolism in mice. Chronobiol Int, 2018;35 (4): 499-510.
6. Sato F, Kohsaka A, Takahashi K, Otao S, Kitada Y, Iwasaki Y, Muragaki Y. Smad3 and Bmal1 regulate p21 and S100A4 expression in myocardial stromal fibroblasts via TNF-alpha. Histochem Cell Biol, 2017;148 (6): 617-624.
7. Oikawa K, Mizusaki A, Takanashi M, Ozaki T, Sato F, Kuroda M, Muragaki Y. PRG4 expression in myxoid liposarcoma maintains tumor cell growth through suppression of an anti-tumor cytokine IL-24. Biochem Biophys Res Commun, 2017; 485 (1): 209-214.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 佐藤冬樹, パワールウジャー, 及川恒輔, 村垣泰光. CK14 and CK17 are expressed in invasive cells in human pancreatic cancer tissues. 第108回日本病理学会総会 2019.5.9 東京都.

2. 尾崎祥子, 佐藤冬樹, 杉山奈生, パワールウジャー, 村田晋一, 村垣泰光. 口腔癌の発育・進展に関わる時計遺伝子 DEC1 と CK1-epsilon の新たな機能とその意義. 第 108 回日本病理学会総会 2019.5.11 東京都.
3. 杉山奈生, 佐藤冬樹, 杉山奈生, パワールウジャー, 及川恒輔, 村垣泰光. 子宮頸癌において BHLH 型転写因子 DEC1 発現は幹細胞マーカー SOX2 と c-MYC 発現を制御する. 第 108 回日本病理学会総会 2019.5.11 東京都.
4. パワールウジャー, 笹平智則, 佐藤冬樹, 國安弘基. CXCL14 のエピジェネティクス制御機構は口腔癌の病態生理に關与する. 第 108 回日本病理学会総会 2019.5.11 東京都.
5. 佐藤冬樹, パワールウジャー, 及川恒輔, 村垣泰光. 時計遺伝子 DEC1 は、子宮頸癌において癌幹細胞マーカー SOX2 と c-MYC 発現を制御する. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018.9.27 大阪市.
6. Sato F, Muragaki Y. Clock genes DEC1 and BMAL1 regulate the expression of stem cell marker genes Sox2 and c-Myc in cervical cancer. AACR 2018.4.17, Chicago, USA.
7. Sato F, Muragaki Y. Functional analysis of DEC1 and DEC2 in cancer cell metabolism. AACR 2017.4.2, Washington DC, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：向阪彰

ローマ字氏名：Kohsaka Akira

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00458051

研究分担者氏名：村垣泰光

ローマ字氏名：Muragaki Yasuteru

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：40190904

研究分担者氏名：藤本勝巳

ローマ字氏名：Fujimoto Katsumi

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究院

職名：助教

研究者番号（8桁）：40294566

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。