

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：25503
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16972
研究課題名(和文) 網膜血管新生に対する時計遺伝子の関与と、VEGF関連眼疾患予防への応用

研究課題名(英文) Influence of clock gene on angiogenesis in retina

研究代表者
楠瀬 直喜 (Kusunose, Naoki)
山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：10725964
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムの制御機構の障害によって、ガンや肥満・高血圧といった多くの疾患の発症頻度・重症度が高まることが示されている。今回、VEGF関連眼疾患のモデルマウスとしてOxygen-induced retinopathy (OIR) マウスを用いて検討を行った結果、時計遺伝子DEC2が網膜においてHIF1の細胞内蓄積量の増加に寄与することでVEGFの発現上昇を引き起こすことが明らかになった。すなわち、VEGF関連眼疾患の発症に時計遺伝子の発現変容が関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

時計遺伝子はがん細胞における血管新生制御因子VEGFの発現制御に関与するため、時計遺伝子の働きによってがんの悪性度が一部規定されるといわれている。本研究では時計遺伝子が網膜におけるVEGFの発現調節に関与すること、すなわち、時計遺伝子が網膜においても疾患の発症に寄与することが明らかになった。このことから概日リズムの障害を回避することで網膜疾患の発症リスクを軽減できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Malfunction of clock genes, components of the molecular clock, is thought to increase the risk of numerous diseases including cancer. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has a pivotal role in angiogenesis, and its expression levels are controlled by clock genes in tumor cells. Ophthalmic diseases such as age-related macular degeneration, proliferative diabetic retinopathy, and neovascular glaucoma are also associated with abnormal angiogenesis followed by upregulation of VEGF in the eye. Our present study partly uncovered the role of the clock gene DEC2 in retina, and our results suggest that disturbance of DEC2 expression induced by hypoxia might associate with exacerbation of VEGF-related retinal diseases. Hence, normalization of the circadian clock by mitigating associated risk factors with novel drugs might help to sustain retinal health and/or to reduce the severity of retinal disease.

研究分野：時間生物学

キーワード：時計遺伝子 網膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの遺伝子の発現には、約 24 時間を 1 周期とする変動 (概日リズム) が認められ、そのリズムは「時計遺伝子」と呼ばれる約 20 種類の転写因子群によって制御されている。近年、免疫機構をはじめとする生体防御や異物排泄に関与する遺伝子の多くが、時計遺伝子の制御下にあり、その発現に概日リズムが認められることが明らかになってきている。また、時計遺伝子の改変動物では、生体防御機構の破綻にともない、ガンや肥満・高血圧といった多くの疾患の発症頻度・重症度が高まることが示されている。一方、加齢黄斑変性症や血管新生緑内障の病因は、眼内の病的な血管新生で、Vascular endothelial growth factor (以下 VEGF) がキーファクターであると考えられている。現在、これらの疾患の治療には、VEGF に対する分子標的薬が用いられる。しかしながら、これら分子標的薬は、薬価が非常に高価 (注射 1 本あたり約 14~16 万円) で、医療費の高騰を後押ししている。そのため、より安価な医薬品の開発が望まれているものの、新薬の開発には十数年の時間と数百億円の予算が必要となる。それに対して、予防に関する知見は、禁煙や食生活の改善などの例からわかるように、大規模な予算を割くことなく即座に臨床応用が可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、網膜内の VEGF 発現が時計遺伝子によって制御されているか否かを明らかにし、不規則な生活に伴い生じる「概日リズム異常」が VEGF 関連眼疾患の発症リスクを高める要因となる可能性を示すことである。本研究の最終目標は、これまで報告が少ない眼内における時計遺伝子の意義・役割の解明を通じて、「概日リズム機構の正常化による VEGF 関連眼疾患の予防法」を提案することである。

3. 研究の方法

VEGF 関連眼疾患のモデルマウスとして Oxygen-induced retinopathy (OIR) マウスを作成した。培養細胞における擬似的低酸素環境は deferoxamine を暴露することで再現した。タンパク質の発現量は Western blotting によって測定した。HIF1 の細胞内局在は免疫染色によって評価した。mRNA の発現量は real time PCR によって測定した。

4. 研究成果

OIR マウスの網膜において既報と一致して VEGF の発現が一過性に上昇することが確認できた。また、OIR マウスの網膜における時計遺伝子の発現を評価したところ、DEC2 の発現が VEGF と同じタイミングで一過性に上昇することが明らかになった。そこで、網膜における VEGF 産生細胞の 1 種であるミュラー細胞の株化細胞 MIO-M1 に DEC2 に対する siRNA を導入した結果、VEGF の発現が有意に抑制された。また、DEC2 に対する siRNA を導入した MIO-M1 細胞では VEGF の転写を促進する転写因子 HIF1 の発現が有意に抑制されていた。さらに、DEC2 が HIF1 の細胞内蓄積量を増加させるメカニズムを明らかにするための検討を行った。DEC2 を強制発現した結果、MIO-M1 細胞における HIF1 の発現が有意に上昇した。しかしながら、翻訳阻害薬シクロヘキシミドを曝露し、HIF1 タンパク質の分解速度を測定した結果、DEC2 は HIF1 タンパク質の分解速度に有意な差異は認められなかった。

これらの結果から DEC2 は網膜において HIF1 の細胞内蓄積量の増加に寄与することで VEGF の発現上昇を引き起こすと考えられる。すなわち、VEG 関連眼疾患の発症に時計遺伝子の発現変容が関わる可能性が示された。本研究の成果は概日リズム機構の正常化による VEGF 関連眼疾患の予防法の提案につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kanado Yuki, Tsurudome Yuya, Omata Yuji, Yasukochi Sai, Kusunose Naoki, Akamine Takahiro, Matsunaga Naoya, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 519
2. 論文標題 Estradiol regulation of P-glycoprotein expression in mouse kidney and human tubular epithelial cells, implication for renal clearance of drugs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 613 ~ 619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shiromizu Shoya, Yamauchi Tomoaki, Kusunose Naoki, Matsunaga Naoya, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Dosing Time-Dependent Changes in the Anti-tumor Effect of xCT Inhibitor Erastin in Human Breast Cancer Xenograft Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1921 ~ 1925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsunaga Naoya, Yoshida Yuya, Kitajou Naoki, Shiraishi Akira, Kusunose Naoki, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 513
2. 論文標題 Microcurrent stimulation activates the circadian machinery in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 293 ~ 299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Katamune Chiharu, Koyanagi Satoru, Hashikawa Ken-ichi, Kusunose Naoki, Akamine Takahiro, Matsunaga Naoya, Ohdo Shigehiro	4. 巻 294
2. 論文標題 Mutation of the gene encoding the circadian clock component PERIOD2 in oncogenic cells confers chemoresistance by up-regulating the Aldh3a1 gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 547 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.004942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kusunose Naoki, Akamine Takahiro, Kobayashi Yoshiyuki, Yoshida Shigeo, Kimoto Kenichi, Yasukochi Sai, Matsunaga Naoya, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro, Kubota Toshiaki	4. 巻 62
2. 論文標題 Contribution of the clock gene DEC2 to VEGF mRNA upregulation by modulation of HIF1 protein levels in hypoxic MIO-M1 cells, a human cell line of retinal glial (Müller) cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 677 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-018-0622-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Hinako, Matsunaga Naoya, Kakimoto Keisuke, Watanabe Miyako, Tsuruta Akito, Kusunose Naoki, Shiromizu Shoya, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 503
2. 論文標題 Epithelial cell adhesion molecule expression in hepatic stem/progenitor cells is controlled by the molecular clock system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1063 ~ 1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.06.117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akamine Takahiro, Kusunose Naoki, Matsunaga Naoya, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 503
2. 論文標題 Accumulation of sorbitol in the sciatic nerve modulates circadian properties of diabetes-induced neuropathic pain hypersensitivity in a diabetic mouse model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 181 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiromizu Shoya, Kusunose Naoki, Matsunaga Naoya, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 136
2. 論文標題 Optimizing the dosing schedule of L-asparaginase improves its anti-tumor activity in breast tumor-bearing mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 228 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2018.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsunaga Takashi, Matsunaga Naoya, Kusunose Naoki, Ikeda Eriko, Okazaki Hiroyuki, Kakimoto Keisuke, Hamamura Kengo, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 498
2. 論文標題 Angiotensin-II regulates dosing time-dependent intratumoral accumulation of macromolecular drug formulations via 24-h blood pressure rhythm in tumor-bearing mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 86 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashikawa KI, Katamune C, Kusunose N, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S	4. 巻 7
2. 論文標題 Dysfunction of the circadian transcriptional factor CLOCK in mice resists chemical carcinogen-induced tumorigenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 9995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-10599-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanemitsu T, Tsurudome Y, Kusunose N, Oda M, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S	4. 巻 292
2. 論文標題 Periodic variation in bile acids controls circadian changes in uric acid via regulation of xanthine oxidase by the orphan nuclear receptor PPAR .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of biological chemistry	6. 最初と最後の頁 21397 ~ 21406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.791285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dilixiati A, Koyanagi S, Kusunose N, Matsunaga N, Ohdo S	4. 巻 134
2. 論文標題 Dietary supplementation with essence of chicken enhances daily oscillations in plasma glucocorticoid levels and behavioral adaptation to the phase-shifted environmental light?dark cycle in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of pharmacological sciences	6. 最初と最後の頁 211 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2017.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naoki Kusunose, Kengo hamamura, Akito Tsuruta, Yuya Tsurudome, Yuya Yoshida, Naoya Matsunaga, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo
2. 発表標題 cAMP response element binding protein (CREB) modulates circadian oscillation of Glycoprotein 2 (Gp2) gene expression in Peyer's patches of mice.
3. 学会等名 EBRS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠瀬直喜
2. 発表標題 神経障害性疼痛の概日リズム制御機構を基盤とした病態解明と創薬への応用
3. 学会等名 日本薬学会第138年回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoki Kusunose, Satoru Koyanagi, Naoya Matsunaga, Shigehiro Ohdo
2. 発表標題 Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies circadian exacerbation of neuropathic pain
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 時計遺伝子DEC2による網膜VEGFの発現制御
2. 発表標題 楠瀬直喜、小林義行、吉田茂生、木許賢一、久保田敏昭、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神経障害性疼痛の概日リズム制御機構と治療・創薬研究への応用
2. 発表標題 楠瀬直喜
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2017
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----