

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10135

研究課題名(和文)炎症による体内時計の変調とその分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of biological clock alteration by inflammation

研究代表者

木村 章彦(Kimura, Akihiko)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60136611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症が体内時計の変調を来すとの想定のもとに腸管穿孔敗血症(CLP)マウスモデルを作製し、心臓と腎臓における時計遺伝子の発現を解析して、CLPによる強い炎症が時計遺伝子の発現に強い摂動を与えることを明らかにした。時計遺伝子産物Bmal1やPeriodの活性にacetyl化が関与することが知られていたため、炎症で活性化される脱acetyl化酵素Sirtuin1とBmal1やPeriodのCLPモデルにおける相互作用およびBmal1やPeriodのacetyl化レベルを解析し、強い全身性の炎症が、Sirtuin1による脱acetyl化を介して体内時計を変調させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

死亡時刻の推定は法医学実務において重要且つ困難な課題であり、世界中の法医学研究者によって様々な方法が報告されているが、現在においても不十分と言わざるを得ない。研究代表者らは体内時計に基づく新規な死亡時刻推定法を確立し実務への応用を進めているが、本法による死亡推定時刻と実際の死亡時刻に齟齬を認める事例を敬遠する。特に重症感染症等々の強い炎症を伴う事例ではその頻度が高い。本研究では炎症に伴って活性化される脱acetyl化酵素Sirtuin1により体内時計の駆動機構が摂動を受けることを明らかにした。このことは体内時計に基づく死亡時刻推定法の適用範囲を決定する科学的根拠となる重要な知見と考えている。

研究成果の概要(英文)：Assuming that inflammation may cause modulation of the biological clock, we made a mouse model of cecal ligation and puncture (CLP) for analysis the expression of clock genes in the heart and kidneys. I found that severe inflammation caused by CLP perturbed clock gene expression in the heart and kidney. Since it was known that acetylation is involved in regulation of Bmal1 activity, I analyzed the interaction between the inflammation-activated deacetylase Sirtuin1 and Bmal1 in the CLP model. The results obtained in the present study revealed that Sirtuin1 reduced acetylation of Bmal1 indicating that systemic inflammation modulates the biological clock through deacetylation of Bmal1 by Sirtuin1.

研究分野：法医学

キーワード：体内時計 死亡時刻推定法 時計遺伝子 sirtuin1 Bmal1 Period

1. 研究開始当初の背景

死亡時刻の推定は法医学における永遠の課題であり、より精度が高い推定法を開発するために世界中で多くの研究が行われている。死亡時刻の推定法の殆どは、死後経過時間推定法であり、死後経過時間から逆算することで死亡時刻を推定するものである。死後経過時間推定は、死亡時刻を起点として始まる死後変化に基づくものであり、死者の内的要因や環境要因の影響を強く受けるために推定精度の低下は免れない。一方、死亡時刻で停止した心臓の体内時計を時計遺伝子の発現量に基づいて読む研究代表者らが開発した方法は、環境要因の影響はほとんど考慮する必要が無いが、死者の生活パターンや死因等が体内時計に影響を与える可能性がある。この体内時計に基づく方法を実務に応用してその実用性について検証を進めているところであり、これまでに脳ヘルニアや低酸素脳症等の中樞の体内時計に対するダメージが抹消の体内時計を変調させることを見出している。更に、重度の肺炎等に認められる全身性の炎症が抹消の体内時計を変調させることを示唆する結果を得ている。体内時計の炎症増悪や抑制への関与に関する研究が世界中の研究者により広く行われているが、法医学的には炎症が及ぼす体内時計への影響に関する研究は殆ど行われていない現状にあった。法医学的には炎症が体内時計に及ぼす影響とその分子メカニズムの解明は極めて重要であり、且つ世界的に欠落した研究課題であることから、法医学の研究者である研究代表者が自ら研究することとした

2. 研究の目的

炎症と体内時計を結ぶ分子とその作用機構を明らかにすることが、本研究の直接的な目的である。体内時計は発現が概日性振動する時計遺伝子の transcriptional feedback loopにより制御されている。それぞれの時計遺伝子は特定の時計遺伝子、例えば Bmal1 は Clock とダイマーを形成して、Per1, Per2, Cry, Rev-erb- α および ROR- α の転写を誘起する。Per1 は Cry とダイマーを形成して、Bmal1/Clock ダイマーの活性を抑制することが知られている。近年、この transcriptional feedback loop を更に調節する機構として Bmal1 や Per のアセチル化の関与が報告されている。更に deacetylase 活性を有する sirtuin1 が Bmal1 や Per のアセチル化を調節するという報告がなされている。一方、炎症組織においては抗炎症性因子として sirtuin1 の発現が上昇することが知られている。研究代表者はこの sirtuin1 が炎症と体内時計を結びつける鍵分子とする仮説を立て、マウスの敗血症モデルを用いた実験により、炎症による心臓と腎臓における sirtuin1 の活性変化と Bmal1, Per のアセチル化の変化を解析することで、炎症による体内時計変調の分子機構を明らかにする事が目的である。

3. 研究の方法

Balb/c マウス (8 週齢雌雄) を用いてイソフルラン麻酔下に盲腸を結紮した後 21G の注射針を刺入して腸管穿孔腹腔炎 (CLP) モデルを作製した。CLP 施術後 6 時間で腎臓及び心臓を採取し、各臓器試料から抽出した RNA を用いて、時計遺伝子 (Bmal1, Per2, Rev-erb- α , β -actin) の発現を real-time RT-PCR により解析した。また、各試料から deacetylase 阻害剤存在下にタンパクを抽出して、Bmal1, Per2 の発現量およびアセチル化のレベルを Western blotting より解析した。更に real-time RT-PCR、Western

blotting、およびELISAを用いてsirtuin1 の遺伝子発現、タンパク発現、リン酸化レベルおよび脱アセチル化活性を測定してsirtuin1 の発現および活性化の変化を解析した。更に免疫沈降を用いてsirtuin1とBmal1の相互作用を解析した。CLPマウスは0時から24時まで2時間間隔で作製し、同時刻にシャム手術を行ったマウスからも試料を採取した。

4. 研究成果

時計遺伝子発現に対する CLP の影響

CLP 施術 6 時間後(午後 7 時)に採取した心臓および腎臓から RNA を抽出し、real-time RT-PCR により *Bmal1*、*Per2* の遺伝子発現を解析し、シャム群と比較すると、心臓では

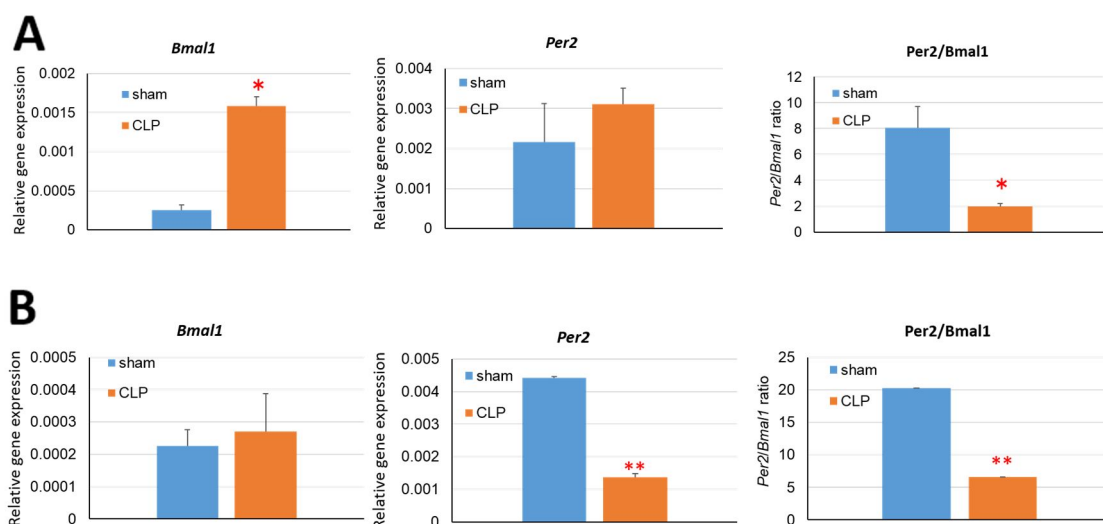


図 1. マウス心臓および腎臓における時計遺伝子発現に及ぼす CLP の影響。CLP 施術 6 時間後(午後 7 時)での心臓 (A) と腎臓(B)における *Bmal1* および *Per2* 遺伝子発現および *Per2/Bmal1* ratio。*, p<0.05; **, p<0.01 (n=4)

シャム群に比較して *Bmal1* の発現は有意に発現が亢進し、*Per2* の発現は有意差を認めなかった(図.A)、一方、腎臓では *Bmal1* の発現はシャム群と同程度であったが、*Per2* の遺伝子発現はシャム群と比較して有意に低下していた。研究代表者は法医実務において死亡時刻の推定を *Per2/Bmal1* ratio に基づいて行っており、*Per2/Bmal1* ratio は心臓、腎臓何れにおいてもシャム群に比較して有意に低い値を示した。従って、重症敗血症等の高度な全身性炎症事例においては体内内時計に基づく死亡時刻の推定は正確性を欠く可能性が強く示唆される。

CLP マウスモデルの心臓における Sirtuin1 の発現

CLP 施術マウスの心臓における Sirtuin1 の遺伝子発現はシャム群と CLP 群で有意差を認めなかったが(図 2A)、タンパクレベルでは CLP 群の心臓に有意に高い発現を認めた(図 2B, 2C)。Sirtuin1 の遺伝子発現は有意な変化を認めないが、タンパクレベルでは有意な増加が認められたことは sirtuin1 の proteasome を介した分解が強く抑制された結果と考えられる。

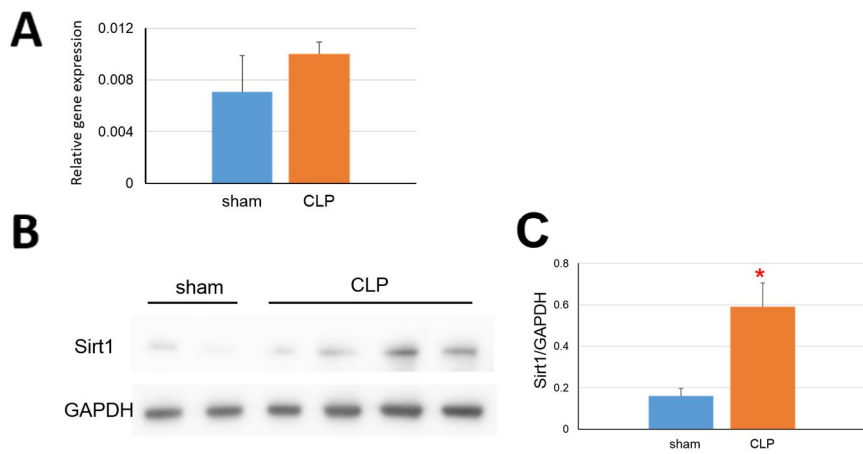


図2. CLPによるマウス心臓における sirtuin1 の発現変化。CLP 施術6時間後(午後7時)のマウス心臓における sirtuin1 遺伝子発現(A)とタンパク発現(B, C)。*, $p < 0.05$ (n=4)

CLP マウスモデルの心臓 acety-Bmal1 の変化

Sirtuin1 の心臓におけるタンパクレベルでの増加は acety-Bmal1 の脱 acetyl 化を引き起こす可能性が示唆される。そこで CLP 施術6時間後の心臓における Bmal1 の acetyl 化を Western blotting により解析した。図3に示す様に CLP 施術6時間後における Bmal1 の acetyl 化レベルは有意に低下し、これにより時計遺伝子の発現に変化が生じた可能性を示唆する結果を得た。

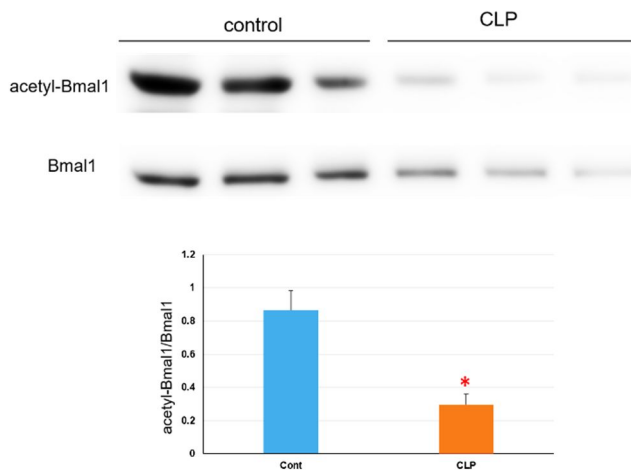


図3. CLPによるマウス心臓における acetyl-Bmal1 の変化。CLP 施術6時間後(午後7時)の心臓における acetyl-Bmal1 の変化。*, $p < 0.05$ (n=4)

CLP マウスモデルの心臓における Sirtuin1 と Bmal1 の相互作用

CLP 施術により Bmal1 の脱 acetyl 化を認めたことから、Sirtuin1 と Bmal1 の相互作用を免疫沈降による解析を行った。図4に示す様にシャムマウスにおいても sirtuin1 と Bmal1 の共沈が認められたが、CLP 施術6時間後では明らかに Bmal1 共沈の増加を認めた。従って、CLP により惹起された敗血症により Sirtuin1 が全身性にタンパクレベルが上昇することで Bmal1 との相互作用が増し、acetyl-Bmal1 を基質とする脱 acetyl 化が亢進するものと考えられる。

結語

強い炎症を伴う重症感染症等で死亡した事例において、体内時計に基づいて推定した死

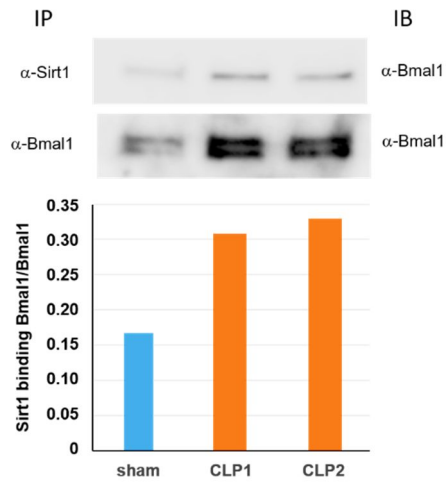


図4 .CLPによるマウス心臓におけるSirtuin1とBmal1の相互作用。CLP 施術6時間後（午後7時）の心臓から抽出したタンパクを試料として抗 Sirtuin1 抗体あるいは抗 Bmal1 抗体による免疫沈降(IP)を行い、沈降物を抗 Bmal1 抗体を用いて immunoblotting (IB)により解析した。

亡時刻が実際の死亡時刻との一致しない事を経験してきた。このことから炎症は体内時計を変調させるとの仮説を立て、本研究を行ったが、CLPにより惹起される炎症により全身性に脱 acetyl 酵素 Sirtuin1 のタンパクレベルが上昇し、Bmal1 や Period 等の時計遺伝子産物を基質とする脱 acetyl 化が亢進してそれぞれの分子の機能に変化を引き起こし、結果として体内時計を変調させる可能性が示された。本研究においては詳細な分子機構の解明までを目指したが、研究終了時点では当初の目的を達成したとは言い難い、しかし、本研究により法医実務における鑑定の基盤となる新たな知見が得られたことで、より精度の高い死亡時刻の推定に寄与するものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Taruya A, Ozaki M, Tanaka A, Mukaida N, Kondo T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Crucial Involvement of IL-6 in Thrombus Resolution in Mice via Macrophage Recruitment and the Induction of Proteolytic Enzymes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 3150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.03150.	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 Kuninaka Y, Ishida Y, Nosaka M, Shimada E, Kimura A, Ozaki M, Hata S, Michiue T, Yamamoto H, Furukawa F, Eisenmenger W, Kondo T	4. 巻 134
2. 論文標題 Forensic pathological study on temporal appearance of dendritic cells in skin wounds.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Legal Med	6. 最初と最後の頁 597-601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00414-019-02185-z.	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 Zhao J, Nakahira K, Kimura A, Kyotani Y, Yoshizumi M	4. 巻 21
2. 論文標題 Upregulation of iNOS Protects Cyclic Mechanical Stretch-Induced Cell Death in Rat Aorta Smooth Muscle Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 8660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21228660	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 T. Kondo, Y. Ishida, Y. Kuninaka, M. Nosaka, S. Hata, M. Kawaguchi, H. Yamamoto, S. Sakamoto, E. Shimada, A. Kimura.
2. 発表標題 The involvement of CX3CR1 in stress-induced thymic atrophy.
3. 学会等名 99th Annual Conference German Society of Legal Medicine（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M Nosaka, Y Ishida, Y Kuniinaka, A Ishigami, H Yamamoto, A Kimura, N Mukaida, T Kondo.
2. 発表標題 ABSENCE OF CCL5/CCR5 AXIS EXAGGERATES THROMBUS FORMATION THROUGH REDUCED UPA, TPA AND VEGF EXPRESSION IN MURINE DVT MODEL.
3. 学会等名 8th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2020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

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