

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08710

研究課題名（和文）慢性腎疾患の進展に伴う時計遺伝子DEC1発現低下の意義と臨床応用に向けた基礎研究

研究課題名（英文）Basic research of the significance of clock gene DEC1 decreases in chronic kidney disease progression

研究代表者

佐藤 冬樹 (Sato, Fuyuki)

静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員

研究者番号：60400131

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）：慢性腎不全（CKD）における時計遺伝子DEC1の発現意義について解析した。ヒト剖検CKD症例の腎臓、高齢マウスやklo変異マウスなどでDEC1発現は減少したが、ASMA発現は上昇した。行動解析では、klo変異マウスは大きな日内リズムの乱れがみられ、klo変異マウスではDEC1の日内リズムは消失し、発現が減少した。一方でASMA発現は上昇した。腎尿細管培養細胞では高リン処理でDEC1発現は著明に減少したが、ASMA発現は上昇した。これらのことから、高齢マウスやCKDの腎ではDEC1発現減少とASMA上昇が、CKD進展と日内リズム異常に影響してい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

CKD進展における時計遺伝子DEC1の重要性を明らかにすることで、日内リズムの観点から、例えば、慢性的な睡眠不足の解消でDEC1発現が低下せず、CKD発症率が低下するなどを示せば、CKD発症の予防への展開も期待され、CKD患者に対し、睡眠の質の向上を目指した生活習慣の改善の意識改革にも繋がる。

研究成果の概要（英文）：We examined the significant role of clock gene DEC1 decreases in chronic kidney disease (CKD) progression. The DEC1 decreases was observed in kidneys of CKD case autopsy, aged and klotho (klo) mutant mice. On the other hand, ASMA expression was increased. In klo mutant mice, circadian rhythm was disturbed and the DEC1 expression was decreased, but ASMA was increased. The DEC1 decreases and ASMA increases were observed in human kidney cultured cells treated with hyperphosphatemia condition. These results suggest that DEC1 decreases and ASMA increases were closely associated with CKD progression and circadian rhythm disturbance.

研究分野：病理学

キーワード：時計遺伝子 慢性腎不全 DEC1 免疫染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子は日内リズムを制御する主要な因子で、約 24 時間周期の発現変動を示す。時計遺伝子の発現異常は、日内リズムの異常をきたし、睡眠障害やメタボリックシンドロームなど様々な疾患の発症・増悪に関与することが示唆されている。我々は、時計遺伝子の中でも DEC1 の機能解析に従事してきた。慢性腎不全 (CKD) と睡眠障害との関連性は示唆されているものの、具体的な機序は明らかでない。CKD モデルマウスの腎で DEC1 発現が低下するデータを得ているが、CKD が DEC1 に影響を及ぼす報告は国内外含めてない。申請者は、DEC1 が間質線維化を促進する ASMA を抑制することで、すなわち、高リン血症が DEC1 の発現低下をきたし、ASMA が上昇することで、腎間質線維化が促進されると考えていた。本研究では時計遺伝子 DEC1 と間質線維化マーカー ASMA を中心に CKD における病態進展の機序の解明を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 2 点である。

1. 慢性腎疾患モデルマウスにおける日内リズム異常の分子メカニズムを解明する
2. 慢性腎疾患における腎間質線維化に伴う DEC1 発現低下の意義を明らかにする

ことで、慢性腎疾患の病態進展の機序に DEC1 がどのように関わっているか詳細な分子機序を明らかにする。将来的に DEC1 発現低下を回復させることで、末期腎不全へ至ることを阻止する、もしくは日内リズムや睡眠異常を抑制することに繋げる基礎から臨床研究への展開を目指す。

3. 研究の方法

1. CKD モデルマウスの視交叉上核と腎臓における時計遺伝子発現の解析

- 1) 明暗条件下で飼育した 6 週齢コントロールマウスの 5/6 腎摘出を行い、高リン給餌したマウス (CKD モデル) の脳と腎を採取した。また、klo ホモ変異マウスの脳と腎も同様に採取した。自動免疫染色装置 VENTANA を用いて、時計遺伝子 DEC1 発現と間質線維化マーカー ASMA 発現を解析した。また、視交叉上核を punch out 法により採取し、時計遺伝子と ASMA 発現を real-time PCR で解析した。
- 2) CKD モデル (コントロールおよび DEC1 ノックアウト) や klo 変異マウスの血中リン濃度を測定し、日内リズムの活動やリン酸代謝に及ぼす影響を解析した。
- 3) 尿細管上皮細胞に高リン (2-3 mM) を処理し、DEC1、アポトーシスマーカーや ASMA 発現を Western blot や real-time PCR で解析した。

2. CKD 剖検症例における DEC1 発現の免疫組織化学的解析

剖検標本を用いて臨床的に CKD と診断されたもので、腎臓での DEC1 や ASMA などの免疫染色を行った。前回は症例数が少なかったため、より多くの症例数で検討した。病理学的所見における DEC1、アポトーシスマーカーや ASMA 発現の変化と、臨床的所見の CKD の有無との関連性を解析した。

3. DEC1 ノックアウトマウスを用いた CKD モデルの腎間質線維化の分子メカニズムの解析

CKD モデル (コントロールおよび DEC1 ノックアウト) の腎間質線維化を病理学的に解析した。

4. 研究成果

CKD モデルマウスの腎や脳で DEC1 やその他時計遺伝子の発現は変動した。下図は CKD 脳における DEC1 発現低下 (図 1)。CKD モデルマウスでの日内リズムの異常が時計遺伝子発現の異常によるものであることが示唆された。免疫染色で、CKD 剖検症例では DEC1 発現は非 CKD 症例と比べて減少した。一方で ASMA 発現は上昇した。(図 2)。これらのことから CKD 進展に伴う腎間質線維化に DEC1 による ASMA 制御が考えられた。尿細管上皮細胞に高リン (2-3 mM) を処理した細胞ではアポトーシスが誘導され、DEC1 発現が低下し、ASMA 発現が上昇した。DEC1 過剰発現で ASMA 発現の変動をウエスタン・プロットで検討したが、ASMA 発現に大きな変動はみられなかった。線維化の機序として、DEC1 が直接 ASMA を制御する分子機構を考えていたが、この点については DEC1 が直接的でなく、間接的に ASMA 発現を制御する可能性がある。DEC1 ノックアウトマウスを用いた CKD モデルでは腎線維化が抑制された。この機序については、DEC1 ノックアウトマウスは心臓で炎症や線維化を抑制することを示しており (Hue et al Int J Mol Sci 2019)、腎間質でも同様の現象がおこっていると推測される。今後は、DEC1 が未知の因子を介して ASMA 発現を制御する機序について、より詳細な検討が必要であると思われる。CKD では時計遺伝子発現異常はみられるので、時計遺伝子異常の回復が CKD 進展による睡眠異常や腎間質線維化の抑制をおこすことが示唆された。

図 1. Real-time PCR

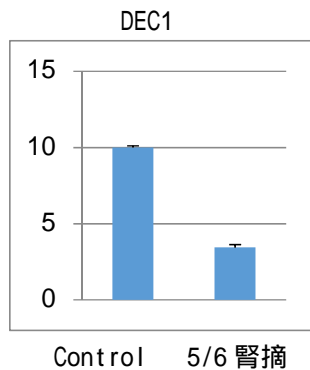
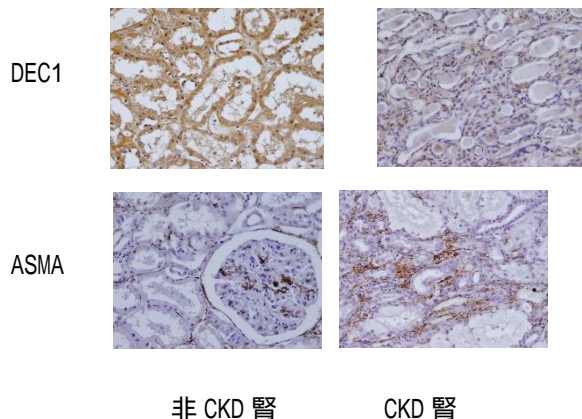


図 2. 免疫染色



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 8件）

1. 著者名 Sato F, Bhawal UK, Osaki S, Sugiyama N, Oikawa K, Muragaki Y	4. 巻 25
2. 論文標題 Differential immunohistochemical expression of DEC1, CK1epsilon, and CD44 in oral atypical squamous epithelium and carcinoma in situ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2022.12676.	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 Wang X, Sato F, Tanimoto K, Rajeshwaran N, Thangavelu L, Makishima M, Bhawal UK	4. 巻 22
2. 論文標題 The Potential Roles of Dec1 and Dec2 in Periodontal Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 10349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910349.	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 Wang C, Zhao N, Sato F, Tanimoto K, Okada H, Liu Y, Bhawal UK	4. 巻 12
2. 論文標題 The roles of Y-box-binding protein (YB)-1 and C-X-C motif chemokine ligand 14 (CXCL14) in the progression of prostate cancer via extracellular-signal-regulated kinase (ERK) signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioengineered	6. 最初と最後の頁 9128-9139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21655979.2021.1993537.	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 Oka S, Li X, Sato F, Zhang F, Tewari N, Kim IS, Zhong L, Hamada N, Makishima M, Liu Y, Bhawal UK	4. 巻 56
2. 論文標題 A deficiency of Dec2 triggers periodontal inflammation and pyroptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Periodontal Res	6. 最初と最後の頁 492-500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12849.	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 Oka S, Li X, Sato F, Zhang F, Tewari N, Chen C, Zhong L, Makishima M, Liu Y, Bhawal UK	4. 巻 9
2. 論文標題 Dec2 attenuates autophagy in inflamed periodontal tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immun Inflamm Dis	6. 最初と最後の頁 265-273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iid3.389.	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 Kamikawa Y, Yokota K, Oikawa K, Sato F, Muragaki Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Suppression of MKL1 promotes adipocytic differentiation and reduces the proliferation of myxoid liposarcoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol letters	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12232.	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 Li X, Le HT, Sato F, Kang TH, Makishima M, Zhong L, Liu Y, Guo L, Bhawal UK.	4. 巻 532
2. 論文標題 Dec1 deficiency protects the heart from fibrosis, inflammation, and myocardial cell apoptosis in a mouse model of cardiac hypertrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 513-519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.058.	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 Tamagawa S, Enomoto K, Gunduz E, Gunduz M, Sato F, Uchino S, Muragaki Y, Hotomi M.	4. 巻 20
2. 論文標題 MicroRNA 200b promotes mesenchymal-to-epithelial transition in anaplastic thyroid carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology letters	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11864.	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 Otsuka T, Le TH, Kohsaka A, Sato F, Ihara H, Nakao T, Maeda M.	4. 巻 432
2. 論文標題 Adverse effects of circadian disorganization on mood and molecular rhythms in the prefrontal cortex of mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 44-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.02.013.	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 Sato F, Bhawal UK, Sugiyama N, Osaki S, Oikawa K, Muragaki Y.	4. 巻 2
2. 論文標題 Potential role of DEC1 in cervical cancer cells involving overexpression and apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clocks & Sleep	6. 最初と最後の頁 26-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/clockssleep2010004.	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 Sato F, Bhawal UK, Tojyo I, Fujita S, Murata SI, Muragaki Y	4. 巻 20
2. 論文標題 Differential expression of claudin-4, occludin, SOX2 and proliferating cell nuclear antigen between basaloid squamous cell carcinoma and squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 1977-1985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2019.10417.	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 Sato F, Otsuka T, Kohsaka A, Le TH, Bhawal UK, Muragaki Y.	4. 巻 189
2. 論文標題 Smad3 suppresses epithelial cell migration and proliferation via the clock gene Dec1, which negatively regulates the expression of clock genes Dec2 and Per1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 773-783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.01.006	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hue Thi Le, Fuyuki Sato, Akira Kohsaka, Ujjal K Bhawal, Tomomi Nakao, Yasuteru Muragaki, Masanori Nakata.
2. 発表標題 Dec1 deficiency inhibits TAC-induced fibrosis in cardiac hypertrophy
3. 学会等名 第87回和歌山医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤冬樹, パワールウジャー, 及川恒輔, 村垣泰光
2. 発表標題 CK14 and CK17 are expressed in invasive cells in human pancreatic cancer tissues
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 口腔癌の発育・進展に関わる時計遺伝子DEC1とCK1 の新たな機能 とその意義
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	村垣 泰光 (Muragaki Yasuteru) (40190904)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	
研究分担者	藤本 勝巳 (Fujimoto Katsumi) (40294566)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	B h a w a l U j j a l (Bhawal Ujjal) (50433339)	日本大学・松戸歯学部・講師 (32665)	
研究分担者	及川 恒輔 (Oikawa Kohei) (70348803)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	

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
---------	---------