

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 3 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651031

研究課題名（和文）酸化ストレスによって惹起される体内時計の乱れと睡眠障害発症過程の解明

研究課題名（英文）Molecular basis of oxidative stress-induced circadian disruption and sleep disorder.

研究代表者

吉田 康一（YOSHIDA YASUKAZU）

独立行政法人産業技術研究所・健康工学研究部門・研究部門長

研究者番号：90358333

研究成果の概要（和文）：睡眠覚醒や体温、代謝などのサーカディアンリズムは体内時計遺伝子に制御されている。近年酸化ストレスに関わるカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどが日内変動を示す事が報告されており、体内時計による酸化ストレス状態の日内変動とその制御の可能性が示唆されている。一方、我々はリノール酸由来の酸化生成物ヒドロキシリノール酸（HODE）を哺乳動物の酸化ストレスレベルを評価するためのマーカーとし、独自の化学的前処理法によってリノール酸由来酸化生成物 HODE やコレステロール由来酸化生成物を定量する方法を確立している。そこで我々は、酸化ストレスの日内変化を知るため、HODE の血中日内リズムを調べ、酸化ストレスレベルの日内変動にアプローチすることとした。明暗条件下で自由摂食では血中 HODE は明期に低く暗期に高い日内リズムを示す事がわかった。このリズムは体内時計遺伝子ミュータントであるクロックマウスでも同様に認められた事から、体内時計遺伝子の制御とは異なる機構で酸化ストレスのリズムが形成されていると考えられた。HODE のリズムは給餌時刻を制限すると、給餌開始時刻の前後で HODE 量が最低値より最高値まで変動する事がわかった。このことから、摂食リズムに連動し大きな酸化ストレスの亢進が認められる事がわかった。さらにコレステロール由来酸化生成物である 7β -OHCh でも同様の日内変動パターンが認められた。このような酸化ストレスの日内変動と自由行動および摂食行動のリズムパターンと連動しており、HODE は食事行動を推測するためのよいバイオマーカーとなる事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oxidative stress is known to be involved in various diseases including cancer and cardiovascular diseases. Here, we explore whether circadian rhythmicity of oxidative stress can be monitored in mice by using one of oxidative stress marker, hydroxyoctadecadienoic acid (HODE). Mice exhibited robust diurnal rhythm of HODE, with lower in light period and higher in dark period, while a level of linoleic acid, a substrate of HODE, was constant. The rhythm was also observed in *Clock* mutant mice with comparative amplitude to control mice, suggesting this oscillation was independent of circadian clock system regulated by canonical clock genes. Under imposed

time of feeding, diurnal rhythm of HODE were tightly linked with feeding scheduled; HODE level was peaked at daytime under daytime feeding, while it peaked at nighttime under nighttime feeding. In mice fasted for 24hrs, HODE rhythm was completely abolished and drastically increased at 5hrs after refeeding. These results indicate that HODE can be a marker for monitoring feeding behavior.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目： 環境学 環境影響評価・環境政策

キーワード：健康影響評価

1. 研究開始当初の背景

概日リズム障害には、ストレス性精神疾患患者に見られる昼夜逆転などがあり、体内時計機構の破綻が関わっていると考えられる。酸化ストレスを伴う加齢は体内時計遺伝子発現の振幅を減少させ、リズムのメリハリがなくなる事により睡眠覚醒に影響を及ぼし、老人性うつを招く。一方、我々を含むいくつかのグループから、時計遺伝子の変異マウスでは睡眠覚醒パターンに異常が認められることや精神異常が認められることなどが報告されている。加齢や精神ストレスに伴う活性酸素種 (ROS) の産生はこれまで多く報告されているが、ストレス性リズム障害における ROS の関与についてはこれまで全く報告がない。

他方で我々は、生体内酸化ストレス評価として、生体中で代表的なリノール酸およびコレステロールの酸化物を網羅的にヒドロキシリノール酸 (HODE) およびヒドロキシコレステロール (OHCh) として測定する手法を確立した。さらに、この測定法を用いたストレス応答細胞・疾病モデル動物・糖尿病/動脈硬化症/腎症などヒト疾患患者および健常者血液を用いたマーカー検証試験を実施し、酸化ストレス応答性が内臓系疾患評価に利用できる事を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

脳内酸化ストレスが脳機能異常を生み出す他、生体内の酸化還元状態は体内時計遺伝子の機能に影響を与える事から、「脳内での酸化ストレスが体内時計機構に影響を与え

る事がリズム障害発症に関わるのではないか」との仮説に至り、酸化ストレスマーカーを指標としたリズム障害発症機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた体内時計リズムの測定

我々の研究室で保有している Per2-Luc マウス (Jackson Lab) の胎児由来のマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) は、ルシフェリン入り培地で培養すると、生物発光により約 24 時間のリズムで発光が増減変動することが観察できる。その培養細胞系に過酸化水素水による酸化ストレス誘導を起こし、培養細胞での発光リズムがどのように影響を受けるかを観察した。発光量は、クロノス (アトー) で 15 分ごとに計測し、その周期成分を解析した。

(2) マウスと採血

雄 ICR マウス (6 週齢、日本 SLC) および *Clock* 遺伝子に突然変異をもつ *Clock* ICR を通常食 (CE-2、日本クレア) および水道水を自由に与えて、2 週間馴化飼育を行った。マウスの飼育は、昼 12 時間/夜 12 時間 (点灯 8:00、消灯 20:00) の照明条件で行った。

時間制限給餌実験においては、明期給餌の場合 11:00-17:00、暗期給餌の場合 23:00-5:00 にのみ餌をマウスに提示した。飲水は 24 時間自由飲水とした。

絶食再給餌の実験では、自由摂食を 2 週間行ったマウスの餌を 8:00 から取り除き、24 時間の絶食を行った。24 時間後の 8:00 より再度、餌を与え 5 時間後に採血を行った。

グルコース投与実験においては、投与全日の17:00より絶食をおこない、15時間の絶食

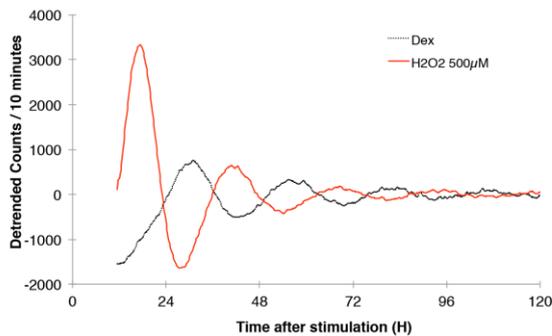


図1. Per2-Luc MEFの過酸化水素処理による日内リズム振動

後、10:00にグルコース(2g/kg)を腹腔投与した。

採血はいずれも指定された時刻に、マウスをセボフルランで吸気麻酔し開腹し、ヘパリンで高凝固処理したシリンジで後大動脈より採血した。血液は遠心分離で血漿として回収した。それと同時にマウスの肝臓を採取した。

(3) マウス肝臓における遺伝子発現解析

指定された時刻にマウスから肝臓を採取し、RNAiso(タカラバイオ)でRNAを精製した。RNAを鋳型としてcDNAを合成し、酸化ストレス応答遺伝子、抗酸化反応遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで定量した。

(4) マウス血液中における過酸化脂質分析
マウス血液を遠心分離することによって血漿を採取し、その50µlを用いて、前処理(還元・ケン化)後、LC-MS/MSによってHODEの分析を行った。

4. 研究成果

(1) 培養細胞によるサーカディアンリズム形成に及ぼす酸化ストレス反応の影響

Per2遺伝子の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したMEFを用いて、酸化ストレスが体内時計に及ぼす影響について評価した。細胞をルシフェリン入培地で培養する時に、細胞に酸化ストレスを与えるために汎用される過酸化水素水を添加して生物発光をリアルタイムで観察した。その結果、通常、体内時計の振動を駆動する事が出来るデキサメタゾン(Dex)で刺激をした場合と比較して過酸化水素水の添加により、従来示すサーカディアンリズムが逆位相で観察され、過酸化水素処理により体内時計が駆動されること、またこれまで知られてたMAPキナーゼなどのシ

グナル伝達により駆動されるメカニズムとは異なる様式で体内時計が駆動され、それは酸化ストレスが体内時計リズム発振に影響するためではないかと考えられた。

(2) 酸化ストレス応答遺伝子や抗酸化反応遺伝子の日内発現変動

酸化ストレスに反応して遺伝子発現が変化すると考えられている遺伝子についてその発現が日内変動するかどうかをリアルタイムPCRで定量した。標的遺伝子としてはCatalase, Peroxiredoxine(Prx2), Glutathione peroxidase(GPx), Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit(GCLC), Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit(GCLM), Heme oxygenase-1(HO-1), Superoxide dismutase(SOD1)を選択した。これらの遺伝子発現を自由摂食のマウスの肝臓において確認したところ、GCLC, GCLM, Prx2, GPx1が日内変動して発現している事がわかった。そのピーク時刻は、遺伝子により異なっていた。また、これらの遺伝子は、絶食条件下でも日内変動した。

(3) 血液中過酸化脂質の日内変動

マウスを用いて血液中の過酸化脂質の日内変動をLC-MS/MSで定量した。マウスからの採血は、照明点灯8:00 消灯20:00の飼育条件下で10:00、16:00、22:00、4:00の4時刻にそれぞれから全採血した。リノール酸酸化物であるHODEは明期に低く、暗期に高い明瞭な日内リズムを示す事が明らかとなった。7β-OHChも同様の応答性を示した。これらの変動はそれぞれの酸化反応の基質となるリノール酸やコレステロールなどの濃度に日内リズムがないにもかかわらず、大きく変化することから、生体内の酸化ストレス状態の変化を的確に捉えている可能性があった。しかしアラキドン酸由来の酸化物HETEやイソプロスタニンには明瞭なリズムは認められなかった。

さらにHODE日内リズムの変化は、体内時計遺伝子のクロックのミュータントマウスにおいても観察されたことから、体内時計遺伝子とは独立したメカニズムの下で酸化ストレスリズムが形成されている事がわかった。

(4) 血中過酸化脂質濃度変化と食行動リズムとの関係

酸化ストレスに大きく影響すると予想される摂食行動との関係を調べるために、明期6時間もしくは暗期6時間の給餌時間制限を

行って血液中 HODE の濃度変化を見たところ、暗期給餌では自由給餌と類似した日内変動

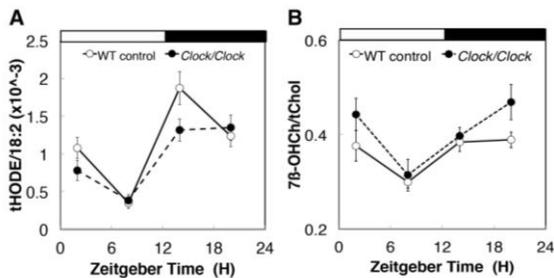


図 2. HODE および 7β-OHCh の日内変動

パターンを示す一方、明期給餌では明期に HODE が高くなり、暗期に低くなる反転のパターンを示した。これは、摂食行動による酸化ストレスリズムが認められる事を示唆しており、行動リズムを反映した時計遺伝子と異なる新規のバイオマーカーとしての HODE の利用に関して特許出願を行った（特願 2012-067165）。

(5) 栄養成分による血中 HODE 量の変化への影響

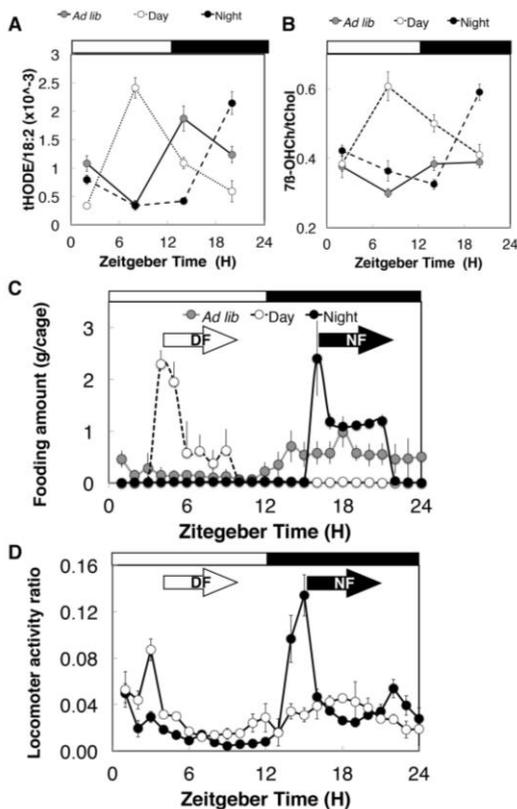


図 3. 血中過酸化脂質の接種時刻と血中 HODE (A) および 7β-OHCh (B) と接種時間制限による摂食量 (C) と自由行動 (D) の日内リズム
明期給餌 (DF) と暗期給餌 (NF) の時間帯を矢印で表示

血液中 HODE は絶食すると変化せず低値のままであるが、再給餌により高い濃度を示した。そこで、栄養成分により HODE 濃度変化

を観察した所、糖、アミノ酸のいずれの単独投与でも上昇は認められなかったことから、飼料に含まれる過酸化脂質が血中 HODE や 7β-OHCh の濃度上昇に関わっている可能性が考えられた。

(6) 睡眠障害モデルマウスにおける酸化ストレスマーカー HODE の血中濃度

私たちの研究室で樹立した環境要因による睡眠障害を引き起こしているマウス（睡眠障害モデルマウス）において、体内で酸化ストレス亢進が認められるかどうかを血中 HODE の日内濃度で評価した。予想と反し、ストレス性睡眠障害モデルではコントロールマウスよりも血中 HODE 濃度の低下が認められた。しかしながら、HODE 値がコントロールマウスおよび睡眠障害モデルマウスのいずれにおいてもこれまでの食事性で観察された値の数倍あったことから、マウスの系統の祭や異なる飼育環境条件がこれらの違いを引き起こしている可能性が高く、睡眠障害モデルマウスにおける体内酸化ストレスの亢進、有無を検証する事は出来なかった。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 宮崎歴、伊藤奈々子、七里元督、石田規子、梅野彩、吉田康一、大石勝隆、「酸化ストレスマーカー HODE の血中日内リズムと摂食の関連性について」第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012 年 5 月 20 日、東北大学 (宮城県)

② 富田辰之介、宮崎歴、吉田康一、大石勝隆、「PER2-Luc MEF を用いる酸化ストレス下における時計遺伝子の発現変動解析」第 35 回日本分子生物学会大会、2012 年 12 月 11 日、マリンメッセ福岡 (福岡県)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 行動リズムモニタリング用バイオマーカー

発明者: 宮崎歴、七里元督、大石勝隆、吉田康一

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2012-067165

出願年月日: 2012/2/23

国内外の別: 国内

[その他]

産総研オープンラボにおける情報発信
(2012.10.25-26) 「日内行動リズムをモニタリングする新規バイオマーカー」
<http://www.aist.go.jp/digbook/openlab/2012/#page=125>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 康一 (YOSHIDA YASUKAZU)
独立行政法人産業技術研究所・健康工学研究部門・研究部門長
研究者番号：90358333

(2) 研究分担者

七里 元督 (SHICHIRI MOTOTADA)
独立行政法人産業技術研究所・健康工学研究部門・主任研究員
研究者番号：20434780

宮崎 歴 (MIYAZAKI KOYOMI)
独立行政法人産業技術研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：70358125

富田 辰之介 (TOMITA TATSUNOSUKE)
独立行政法人産業技術研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：60415718

(3) 連携研究者

大石 勝隆 (OISHI KATSUTAKA)
独立行政法人産業技術研究所・バイオメディカル研究部門・グループリーダー
研究者番号：50338688