

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 5月 10日現在

機関番号：14301
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012 ～ 2012
課題番号：24650217
研究課題名（和文）高齢疾患早期診断の為に微量末梢血シングルセル PCR を用いた概日リズム診断法の開発
研究課題名（英文）Detection of circadian rhythms from peripheral blood samples in the diagnosis of diseases of elderly people
研究代表者
岡村 均 (OKAMURA HITOSHI)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：60158813

研究成果の概要（和文）：

ヒトリンパ球由来細胞系を用いてシングルセルでの時計遺伝子発現検出系の構築を行った。培養中の細胞をセルソーターを用いてシングルセルレベルで分取し、これを1ステップでRNA抽出および逆転写によるcDNAの合成を行った。その結果、このヒト細胞に発現するすべてのヒト時計遺伝子群をシングルセルレベルで検出することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

We established a sensitive method for detecting clock genes at single cell levels in cells derived from human lymphocyte. We collected cells by cell sorter, and RNA isolation and reverse transcription to make cDNA at single step. We have established a method to detect all clock genes at the level of single cells in the peripheral blood.

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：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：遺伝子、循環器・高血圧、トランスレーションリサーチ、バイオテクノロジー

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

1. 研究開始当初の背景

近年、Microfluidic Genetic Analysis System が確立された。これは、超微量スケールでの PCR を活用し、細胞 1 個レベルからの PCR を可能とするものである。この技術と、マルチマーカーによる血球の分類法を確立し、各種血球の遺伝子発現の概日リズムを網羅的に測定し、概日リズム分子パスウェイマーカーを決定する。

2. 研究の目的

高齢者がかかりやすい疾患に、高血圧やアルツハイマー病があり、いずれも、発病初期に概日リズム異常が認められる。しかるに、ヒトでは概日リズムの簡便な測定法が無いため、その応用が遅れている。今回我々は、通常の日常診断で使われる末梢血から身体の時間（概日リズム）を測定する手法を開発する。具体的には、シングル細胞 PCR およびデジタル PCR 技術に基づいて、微量血液に含まれる血球の遺伝子発現解析を血球種ごとに行い、最もリズム測定に適切な血球種の同定と、各血球が示す日周性の遺伝子発現および機能的変動のモニターシステムを構築し、概日リズム分子パスウェイマーカーを決定することを目的としている。この数 μ l 以下の血液で概日血球機能リズムを把握し、臨床における概日リズム測定法確立による体内リズムの正確なモニタリングが可能に

なれば、体内時計が生活習慣病のリスク・進行を早期検出するための優れた新規マーカーともなり得る。このため、今回の検索では、末梢細胞に発現する時計遺伝子のきわめて微量の RNA を検出する検出法の確立を行なった。

3. 研究の方法

ヒトの時計遺伝子として次の 20 遺伝子, Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Clock, Npas2, Arntl1, Arntl2, Dbp, Tef, Hlf, Nfil3, Rora, Rorb, Rorc, Nr1d1, Nr1d2, Bhlhe40, Bhlhe41, およびコントロール遺伝子として Rplp0 と Actb の発現を定量化するため、各遺伝子に対して Taqman realtime PCR 用の primer と probe を設計・合成した。さらに、培養中の細胞をセルソーターBD FACSAria II Cell Sorter を用いてシングルセルレベルで分取し、これを直接 CellsDirect にかけることにより 1 ステップで RNA 抽出および逆転写による cDNA の合成を行った。さらにこの微量な cDNA を解析するあたり、ナノリットルレベルで定量的 PCR を行うことのできる超微小流体制御遺伝子解析装置 BioMark-I システムを用いてアッセイを行った。

4. 研究成果

ヒトリンパ球由来細胞系を用いてシングルセルでの時計遺伝子発現検出系の構築を

行った。検索した Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Clock, Npas2, Arntl1, Arntl2, Dbp, Tef, Hlf, Nfil3, Rora, Rorb, Rorc, Nr1d1, Nr1d2, Bhlhe40, Bhlhe41, Rplp0, Actb の発現を全て確認できた。従って、このヒト細胞に発現するすべてのヒト時計遺伝子群を、シングルセルレベルで検出することに成功した。

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)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Negoro H, Kanmatsu A, Doi M, Suadicani SO, Matsuo M, Imanura M, Okinami T, Nishikawa N, Oura T, Matsuji S, Seo K, Tainaka M, Urabe S, Kiyokage E, Todo T, Okamura H*, Tabata H, Ogawa O* (*Corresponding authors): Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. Nature Communications, 3:809, 2012. DOI(10.1038/ncomms1812). 査読有.
- ② Fustin J-M, Doi M, Yamada H, Komatsu R, Shimba S, Okamura H: Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: Temporal segregation of metabolites. Cell Reports, 1:341-349, 2012. DOI(10.1016/j.celrep.2012.03.001.)

- ③ Negoro H, Kanematsu A, Matsuo M, Okamura H, Tabata Y, Ogawa O. Development of diurnal micturition pattern in mice after weaning. J. Urol. 189:740-746, 2012. DOI(10.1016/j.juro.2012.07.140.) 査読有.
- ④ 山田 裕之、岡村 均: 体内時計概論、Bio Clinica 27、532-537、2012. 査読無.

[学会発表] (計1件)

岡村 均、生体リズム異常と疾病：臓器の時計とその異常、第21回日本小児泌尿器科学術総会、2012年7月5日、岡山コンベンションセンター (岡山市)

[図書] (計1件)

永井良三編、羊土社、臓器円環による生体恒常性のダイナミクス～神経・免疫・循環・内分泌系の連関による維持、ライフステージに応じた変容と破綻 (実験医学増刊 Vol. 31-5)、2013、222頁.

[その他]

ホームページ等 <http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-biology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 均 (OKAMURA HITOSHI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60158813

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無