

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860183

研究課題名(和文) 時計遺伝子発現変動と糖尿病性血管障害との相互関係の解明

研究課題名(英文) Analysis of clock gene expression in diabetic vascular disorder with diabetes model mouse

研究代表者

室富 和俊 (Kazutoshi, Murotomi)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：40635281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計を制御する時計遺伝子発現を低下させると、血管内皮細胞の拡張機能や血管新生能は低下すると報告されているが、時計遺伝子発現と高血糖等のストレスに対する血管の抵抗性との関連は不明である。本研究では糖尿病性血管障害発生に時計遺伝子発現が関与するか明らかにする。まず2型糖尿病モデルTSODマウスが11週齢で糖尿病病態を呈することを示した。正常マウスと比較して、このマウスの活動量は著しく低下し、活動位相は前進傾向であった。さらにTSODマウスの大動脈における時計遺伝子Per2およびBmal1発現量は減少傾向であった。以上の結果、糖尿病発症後の血管では時計遺伝子発現が低下することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It has been indicated that the decrease in clock gene expression level is involved in the decreased function of vasodilation and angiogenesis in vascular endothelial cell. However, little is known about the association of clock gene expression with resistance to stress in endothelial cell. In the present study, we investigate the association of clock gene expression with diabetic vascular damage. At first, we revealed that type 2 diabetes model TSOD mice exhibited diabetic phenotypes around 11 weeks of age. Compared with control mice, locomotor activity was markedly lowered and the phase of wheel-running activity tended to be advanced in diabetic TSOD mice. In addition, vascular clock genes Per2 and Bmal1 expression levels were decreased in TSOD mice. Our results indicated that vascular clock gene expression levels are decreased in type 2 diabetes model, and suggest that plasma component in diabetic mice may be involved in the reduction of clock gene expression.

研究分野：薬理学

キーワード：糖尿病 時計遺伝子 体内時計 血管障害 マウス

1. 研究開始当初の背景

慢性的な高血糖状態である糖尿病は血管を障害し、全身臓器の機能障害、いわゆる糖尿病合併症を引き起こす。この糖尿病に起因する血管合併症が、日本人の糖尿病患者の寿命を約 10 歳短くしている原因と考えられており、血糖調節、血圧管理等の対策が行われている。しかし、糖尿病患者のうち約 4 割が糖尿病による合併症を併発しており(平成 19 年国民健康・栄養調査)、高血糖による血管障害発生メカニズムの更なる解明が望まれている。

体内時計は生体機能に周期性を与え、周期的に変動する外部環境に生体機能を適応させる機能をもつ。そのため、体内時計を制御する時計遺伝子が病気の発症や重篤化に関与することが多数報告されており、糖尿病モデルマウスの肝臓では時計遺伝子発現量が低下する(Kohsaka et al., 2007 Cell Metab.)。さらに、時計遺伝子変異マウスの血管内皮細胞の拡張機能や血管新生能は低下するため、時計遺伝子が血管の恒常性維持に寄与すると考えられている。しかし、糖尿病性血管障害の原因として、時計遺伝子発現低下が関与するかは不明である。そこで、本研究では血管に存在する代表的な時計遺伝子 Per2 及び Bmal1 に焦点を当て、糖尿病時の血管障害の発生に時計遺伝子発現変化が関与するかを検証する。

2. 研究の目的

時計遺伝子 Per2 あるいは Bmal1 変異によって、血管内皮細胞の拡張機能は低下することが明らかにされており、時計遺伝子は血管の恒常性維持に寄与すると示唆されている。しかし、時計遺伝子発現が糖尿病時の慢性的な高血糖等のストレスに対する血管内皮細胞の抵抗性に関与するかは不明である。本研究では糖尿病性血管障害発生時の時計遺伝子発現変化を明らかにするとともに、時計遺伝子発現を維持することで、糖尿病性血管障害に対して血管内皮細胞が抵抗性を獲得できるか明らかにすることを目的とする。

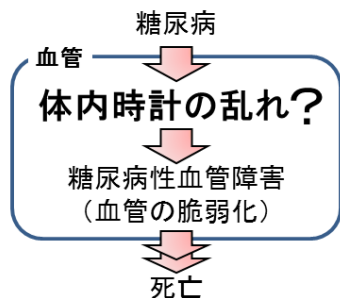


図1 本研究で検証する事象

3. 研究の方法

糖尿病発症前後の時計遺伝子発現を解析するために、2 型糖尿病モデル TSOD マウス

を用いて、血糖値、インスリン抵抗性、耐糖能異常を指標に糖尿病発症週齢の判定を行った。TSOD マウスの体内時計が乱れているか検証するために、TSOD マウスの行動リズムを回し車の回転数を指標に解析し、行動リズムが異常と判定されたマウスの大動脈における時計遺伝子発現量を real-time PCR 法で測定した。次に、糖尿病に罹ったマウスの血漿成分が時計遺伝子発現に直接影響を及ぼすか検証するために、時計遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼを連結したコンストラクトを導入したマウス繊維芽細胞株に糖尿病発症前後の TSOD マウス血漿を添加し、周期、位相、振幅、発光減衰率を解析した。

4. 研究成果

まず、血糖値、インスリン抵抗性、耐糖能を指標に TSOD マウスの糖尿病発症週齢を判定した。コントロールである TSNO マウスと比較した結果、5 週齢では全パラメーターは TSNO マウスと同程度で、8 週齢では高血糖、インスリン抵抗性および軽度耐糖能異常が観察され、11 週齢では高血糖、インスリン抵抗性および耐糖能異常を呈することが示された(図 1)。従って、TSOD マウスはおよそ 11 週齢で糖尿病フェノタイプを呈することが示された。

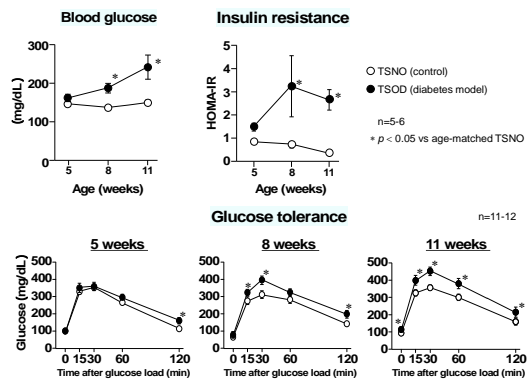


図2 TSOD マウスの糖尿病病態解析

次に、回し車の回転数を指標に TSOD マウスの活動量を測定した結果、TSNO マウスと比較して活動量はおよそ 10% 程度であった。回し車の回転パターンから 1 日のうちどの時間帯に自発運動量が高いかを明らかにするために、明期開始時刻を zeitgeber time (ZT) 0、1 日辺りの回し車回転数を 1 とした時の 3 時間間隔の回転数の割合を解析した。その結果、TSNO マウスの回転割合のピークは ZT15-18 (23-2 時) であるのに対し、TSOD マウスのピークは ZT12-15 (20-23 時) であり、活動位相が前進傾向であることが示され(図 1)。正常マウスと比較して糖尿病に罹った TSOD マウスは体内時計が乱れていることが示唆された。

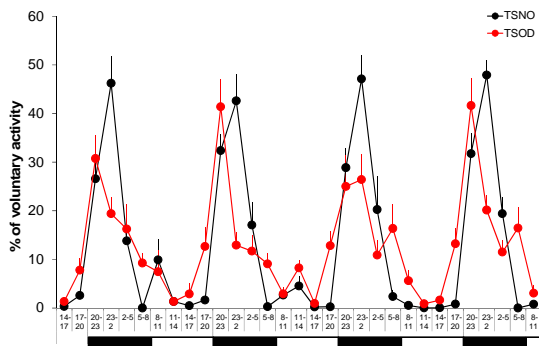


図3 3時間ごとの回し車回転数の割合
(1日の回転数を100%とする)

次に、マウスの ZT2 および ZT14 における大動脈の時計遺伝子 *Per2* および *Bmal1* 発現量を real-time PCR にて解析した。TSNO マウスと比較した結果、TSOD マウスの肝臓における *Per2* 発現量は両時刻とも3倍以上増加し、*Bmal1* 発現量は ZT14 において約半分に減少した。一方、大動脈では *Per2* および *Bmal1* ともに各々のピーク時間にあたる ZT14 及び ZT2 で減少傾向であり、糖尿病モデルマウスの血管では時計遺伝子発現が低下することを明らかにした(図4)。続いて、*Per2* 及び *Bmal1* プロモーターの下流に発光レポーター(ルシフェラーゼ)を連結したコンストラクトを導入したマウス繊維芽細胞に糖尿病発症前後のマウス血漿を添加した結果、正常マウス及び糖尿病発症前の TSOD マウス血漿を添加しても、*Per2* 及び *Bmal1* の周期、位相、振幅、減衰率には影響はなかった。しかし、興味深いことに、糖尿病発症時の TSOD マウス血漿では、周期及び位相は変化しないものの、*Per2* 発現の振幅低下、*Bmal1* 発現の減衰促進が観察され、糖尿病モデルマウスの血中成分が時計遺伝子発現を低下させる可能性が示された。以上の結果、糖尿病モデルマウスの血管における時計遺伝子発現は低下し、糖尿病発症に関わる血中成分がその原因である可能性が示唆された。

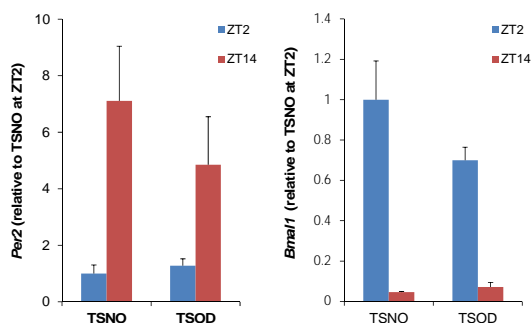


図4 大動脈における時計遺伝子発現解析
(TSNO マウスの ZT2 時点の発現量を1とする)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Murotomi K, Umeno A, Yasunaga M, Shichiri M, Ishida N, Abe H, Yoshida Y, Nakajima Y. "Switching from singlet-oxygen-mediated oxidation to free-radical-mediated oxidation in the pathogenesis of type 2 diabetes in model mouse." *Free Radic Res.* 2015, 49(2):133-138. 査読有

Murotomi K, Umeno A, Yasunaga M, Shichiri M, Ishida N, Abe H, Yoshida Y, Nakajima Y. Type 2 diabetes model TSOD mouse is exposed to oxidative stress at young age. *J Clin Biochem Nutr.* 2014, 55(3):216-220. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

室富和俊, 梅野彩, 安永茉由, 七里元督, 石田規子, 安部博子, 吉田康一, 中島芳浩, "2型糖尿病モデルマウスの糖尿病発症過程における酸化ストレス状態の解析"第68回日本酸化ストレス学会、2015年6月11日、鹿児島

室富和俊, 梅野彩, 吉田康一, 中島芳浩, "TSOD マウスを用いた糖尿病発症過程における酸化ストレスの解析"第10回 TSOD(肥満・糖尿病)マウス研究会情報交換会、2015年3月6日、つくば

室富和俊, 梅野彩, 安永茉由, 七里元督, 石田規子, 安部博子, 吉田康一, 中島芳浩, "2型糖尿病モデル TSOD マウスの糖尿病発症過程における脂質酸化物量の解析"第29回日本糖尿病・肥満モデル動物学会年次学術集会、2015年2月14日、京都

室富和俊, 梅野彩, 安永茉由, 七里元督, 石田規子, 安部博子, 吉田康一, 中島芳浩, "Increases in oxidative stress precedes hyperglycemia in type 2 diabetic model TSOD mouse" 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、横浜

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 活動量の低下及び/又は不安の改善用組成物

発明者: 室富和俊, 中島芳浩, 吉田康一, 小池泰介, 松尾俊輝

権利者: 同上

種類: 特許

番号：特願 2015-010545
出願年月日：2015 年 1 月 22 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
<https://unit.aist.go.jp/hri/>
(産業技術総合研究所 健康工学研究部門)

6．研究組織

(1)研究代表者

室富 和俊 (Murotomi Kazutoshi)
産業技術総合研究所 健康工学研究部門
研究員
研究者番号：40635281