

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293163

研究課題名(和文) 異常環境と薬物が体内時計に及ぼす影響の解明と法医診断への応用

研究課題名(英文) Analysis of the effects of abnormal environments and drugs on the biological clock and its application to forensic diagnosis

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) 9,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、視交叉上核に存在する中枢時計に影響を及ぼす熱中症や低体温症および薬物等が抹消の体内時計に及ぼす影響を解析し、法医実務に還元することを目指したものである。当初の計画では熱中症と低体温症のマウスモデルでの解析を行う予定であったが、安定した結果を得ることが出来なかった。そこで、確実に再現性良く脳浮腫を誘起出来る水中毒モデルとアセトアミノフェン急性中毒モデルに切り替えて心臓や腎臓の時計遺伝子の発現について解析を行い、水中毒および肝性脳症による脳浮腫が、心臓における時計遺伝子の発現に強く影響を及ぼす事を明らかにした。更に敗血症においても心臓および腎臓の体内時計が強く変調する事を見出した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to analyze the effects of heat stroke, hypothermia and drugs affecting the central biological clock in the suprachiasmatic nucleus on peripheral biological clocks.

At the start point, we planned to analyze in the mouse model of heat stroke and hypothermia, but we could not obtain stable results. Therefore, we switched to water intoxication model which can induce cerebral edema reproducibly, and acetaminophen acute fulminant hepatic injury model for analysis of modulation of clock gene expression in the heart and kidney. We found that cerebral edema due to water poisoning and hepatic encephalopathy strongly alters the expression of the clock gene in the heart. Furthermore, we found that the biological clock in the heart and kidneys were strongly modulated by cecal ligation and puncture-induced sepsis.

研究分野：法医学

キーワード：biological clock clock gene cerebrum edema

1. 研究開始当初の背景

近年の体内時計に関する研究の進歩は著しく、内分泌・代謝や免疫等の調節に体内時計が深く関わり、生体の恒常性の維持に必須の機構とし機能していることが様々な研究により示されている(図 1)。従って、疾患と時刻、投薬と時刻あるいは生活習慣病と生活パターンの関係等が臨床医学の領域で大きな注目を集めている。研究代表者らは、世界に先駆けて法医学の領域にいち早く体内時計の概念を導入し、マウスを用いて時計遺伝子発現の解析に関する基礎的研究を行い、得られた結果を基に体内時計に基づく死亡時刻の推定法を確立して法医実務への応用の道を拓いた(Kimura A et al. 2011. Estimating time of death based on the biological clock. Int J Legal Med 125:385-391)。更に研究代表者らは、法医実務において体内時計に基づく死亡時刻の推定を法医解剖に伴う検査の一環として行っており、その有用性を示すデータが蓄積しつつある。しかし、これまでの実務的研究の過程で、死亡時刻が明らかな事例において死亡時刻と死者の体内時計が著しく乖離する事例に遭遇することも稀ではない。

2. 研究の目的

体内時計は全身の臓器に存在し、視交叉上核に存在する中枢の体内時計により制御を受けると共に、食事や労作のタイミング等の影響下にローカルな時刻を刻むことが知られている。よって、中枢時計に強く影響を及ぼす高体温、低体温、薬物等は中枢時計はもとより各臓器のローカルな体内時計にも変調を来すことが考えられる。そこで、本研究では、視交叉上核の中枢体内時計に強く影響を及ぼすことが想定される異常環境や薬物が抹消の体内時計に及ぼす作用を明らかにする事で、体内時計に基づく死亡時刻推定法の精度の向上を目指すものである。

3. 研究の方法

当初はマウスを用いて熱中症(高体温)、低体温症および薬物中毒モデルを作成し、種々の臓器における体内時計(時計遺伝子の発現)を解析する予定であったが、解析可能な安定した結果を得ることが出来なかった。よって、中枢時計に確実に作用する脳浮腫モデルおよび敗血症モデルを用いて解析した。

1) 急性水中毒モデル: 雄 8-10 週齢の C57BL/6 マウスに対して、バソプレシン(0.4mg/kg body weight)を含む蒸留水(19% body weight)を腹腔内投与した。投与から二時間後、麻酔薬を過量投与した後、脳と心臓の組織を採取し、脳浮腫の程度および心臓における時計遺伝子の発現について解析した。対照として処置マウスと同時刻に死亡した未処置マウスの臓器を採取して処置群と同様に解析した。

2) アセトアミノフェン肝性脳症モデル: 雄の 8-10 週齢の C57BL/6 マウスに対して、一日絶食状態にしたのちに腹腔内にアセトアミノフェンを体重当たり 600 mg/kg 投与

した。アセトアミノフェン投与から 24 時間後の血中 ALT 値と AST 値、そして肝臓の HE 標本から肝障害の程度を評価した。脳と心臓をアセトアミノフェン投与 24 時間後に採取し、脳浮腫および心臓における時計遺伝子の発現について解析した。対照として処置マウスと同時刻に死亡した未処置マウスの臓器を採取して処置群と同様に解析した。

3) 盲腸結紮穿刺(敗血症ショック)モデル: イソフルラン深麻酔下に雄 8-10 週齢の C57BL/6 マウスの盲腸を取り出して、盲腸根部を 3-0 縫合糸により結紮し、20ゲージ注射針を用いて盲腸壁全層にわたり穿刺して盲腸結紮穿刺をおこなった。閉腹 24 時間後に心臓と腎臓を採取し、それぞれの臓器における時計遺伝子の発現を解析した。対照として処置マウスと同時刻に死亡した未処置マウスの臓器を採取して処置群と同様に解析した。

4) Real-time RT-PCR: ISOGENE (Nippon Gene)を用いて組織サンプル(100 mg)より total RNA を抽出し、その 1 ug を PrimeScript RT reagent Kit (TAKARA) を用いて cDNA とした。Actb, Per2 および Bmal1 に対する特異 primer を用いて SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II kit (TAKARA) にて real-time PCR による分析を行った。

4. 研究成果

研究代表者らの教室では、死亡時刻の推定に死者の体内時計に基づく推定法を日常業務として行っている。死亡時刻の指標として時計遺伝子、Rev-Erb α (Nr1d1), Bmal1 (Arntl) の発現比(Rev/Bmal1 ratio)を用いている。死亡時刻が明らかな 226 例の心臓における体内時計(Rev/Bmal1 ratio)を死亡時刻に対してプロットすると Fig.1 の様になる。

未明から朝にかけての死亡は Rev/Bmal1 ratio は高く、夕方の死亡は低い Rev/Bmal1 ratio を示す。しかし、脳ヘルニアや低酸素

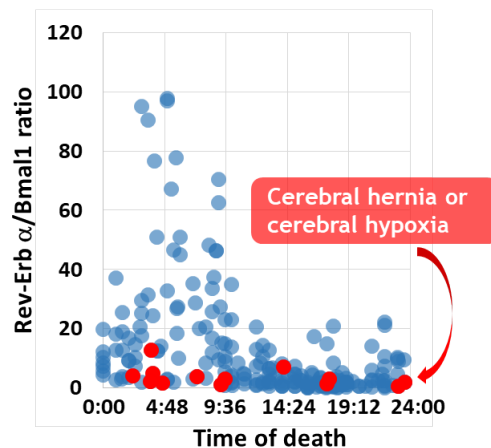


Fig. 1. Relation of Rev-Erb α /Bmal1 ratio (Rev/Bmal1 ratio) and the time of death in 226 autopsy cases in our department. ●: death by cerebral hernia or cerebral hypoxia.

脳症の事例には未明のピークを認めない。こ

の事は中枢の体内時計の変調が末梢の体内時計の変調を誘起する可能性を示唆する。よって、本研究では水中毒による脳浮腫、アセトアミノフェン肝性脳症および強い全身性炎症である敗血症ショックが心臓の体内時計に及ぼす影響を検討した。

1) 水中毒の体内時計への影響

体重の19%の蒸留水を腹腔に注入すると全てのマウスは20分以内にふらつきや四肢の痙攣を呈し、その後昏睡に陥った。2時間以内で死亡したマウスは死亡時刻に、生存したマウスは2時間後に脳と心臓を採取して脳浮腫率と心臓における時計遺伝子の発現を解析した。

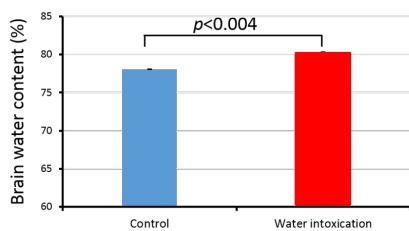


Fig. 2. Water intoxication-induced cerebrum edema.

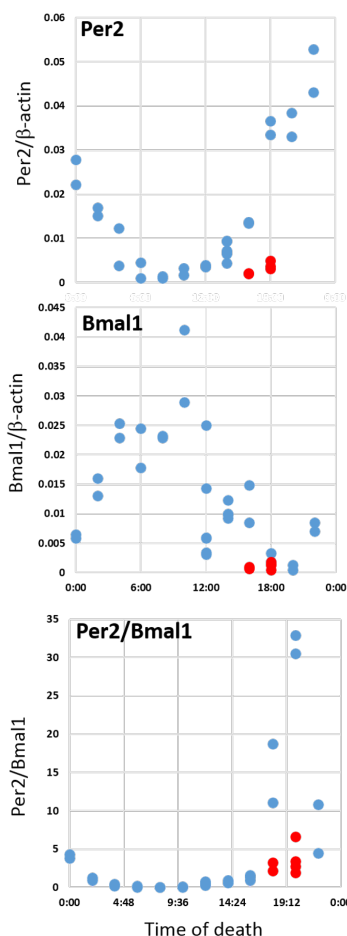


Fig. 3. Water intoxication-induced alteration of clock gene expression. Gene expression for *Per2* and *Bmal1* was plotted against to the time of death. ●: control. ●: water intoxication (n=5).

死亡したマウスおよび蒸留水投与2時間後のマウスの脳組織の水分含量は対照マウスのそれに比較して有意に高く、高度な脳浮腫を呈している事が示された(Fig. 2)。これらのマウスの心臓において *per2* の遺伝子発現は対照マウスと比較して著しく低下し、一方 *Bmal1* の発現レベルは対照マウスと有意な差を認めなかった(Fig. 3)。従って、死亡時刻の指標となる *Per2/Bmal1* ratio は著明に減少した。このことは、脳浮腫による中枢時計の変調が心臓の時計遺伝子発現を変化させることを表している。

2) アセトアミノフェン肝性脳症モデル

アセトアミノフェン腹腔内投与により、投与後24時間で80%のマウスが死亡した。死亡したマウスは著明な血清ALTとAST値の上昇を認(Fig. 4a and b)と肝組織で高度な小葉中心性壊死(Fig. 4c)を認めたことから、劇症肝炎による死亡であることが確認された。これらのマウスの脳組織の水分含量は対照マウスの脳組織に比較して有意に高く(Fig. 4d and e)、肝性脳症による脳浮腫を示唆すると考えられた。

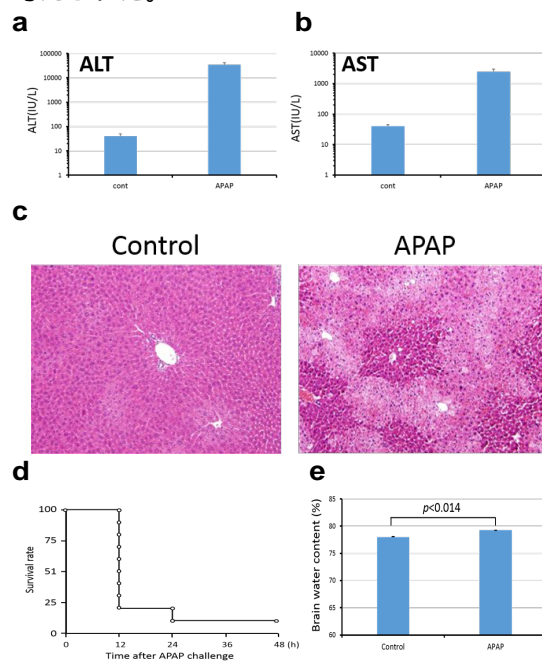


Fig. 4. Acetaminophen (APAP) induced fulminant hepatic failure and hepatic encephalopathy. Serum ALT (a) and AST (b) level 24 h after APAP challenge. APAP-induced centrilobular necrosis was evident by HE staining of hepatic tissue (c). Survival rate of APAP treated mice (d). APAP challenge induced significant increase of brain water content (n=8) (e).

アセトアミノフェン投与により死亡したマウスの心臓における時計遺伝子の発現を解析すると、*Per2*の発現は対照マウスと比較して低い傾向を示し、特に発現が大きく上昇する時刻付近で発現の上昇が著しく抑制され

ていた(Fig.5)。一方、*Bmal1*の発現レベルは対照マウスと比較して明らかに高い傾向を示した(Fig.5)。このことにより、死亡時刻の指標となる *Per2/Bmal1* ratio は著明に減少した。

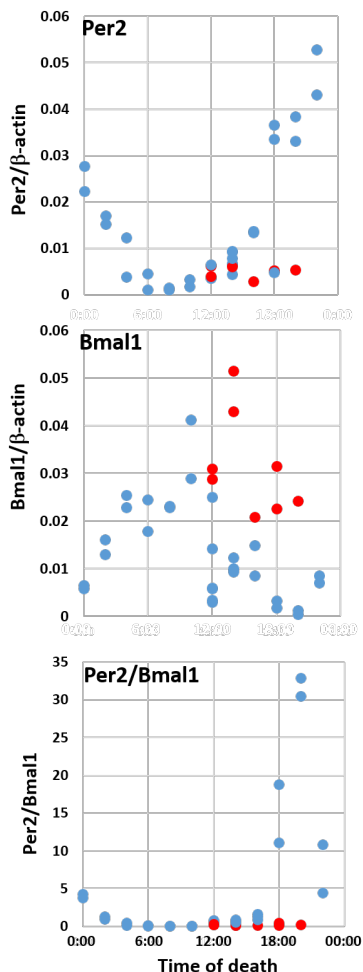


Fig. 5. APAP-induced alteration of clock gene expression. Gene expression for *Per2* and *Bmal1* was plotted against the time of death.

●: control. ●: APAP (n=8).

水中毒による脳浮腫とアセトアミノフェン中毒による脳浮腫で誘起される *Per2* と *Bmal1* 各遺伝子発現の変異にはパターンに違い認められたが、水中毒による脳への影響は水分の貯留による単純なものであるが、アセトアミノフェン中毒では、脳浮腫に加えて肝不全に伴う血中アンモニアレベルの上昇も強く作用している可能性が考えられる。

3) 盲腸結紮穿孔刺(CLP) (敗血症ショック)モデル

盲腸結紮穿孔刺 24 時間後 (19 時) の心臓と腎臓における時計遺伝子の発現を解析すると、心臓では対照マウスと比較して *Bmal1* の遺伝子発現が有意に高く、一方 *Per2* は対照マウスと同程度であった(Fig.6)。これにより死亡時刻の指標となる *Per2/Bmal1* ratio は有意に低下していた(Fig.6a)。また、腎臓における *Per2/Bmal1* ratio も心臓と同様に対照

マウスと比較して著しく低い値を示したが、その原因は心臓とは異なり、*Per2* の発現が対照マウスと比較して低下しているためであった(Fig.6b)。

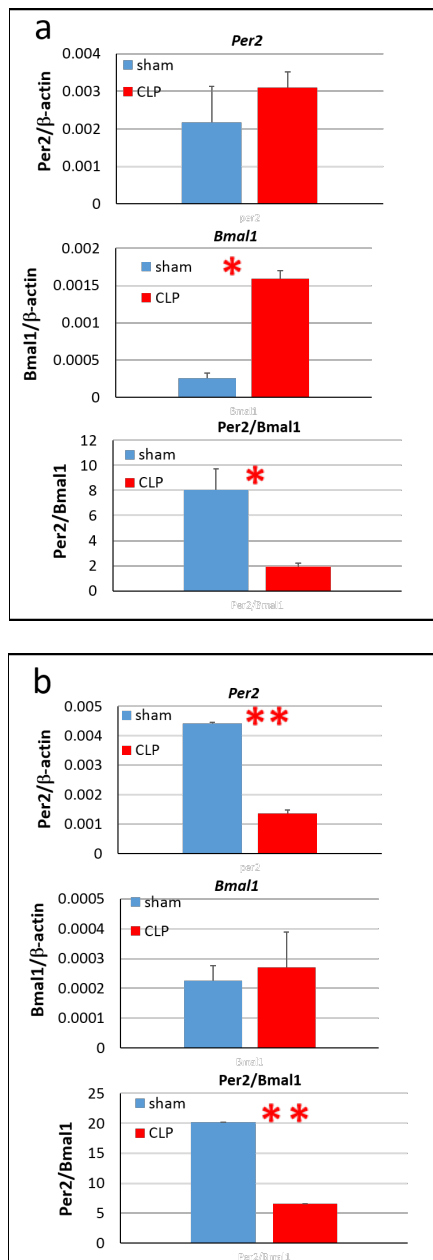


Fig. 6. CLP-induced alteration of clock gene expression in the heart and kidney. Gene expression of *Per2* and *Bmal1* at 19 o'clock in the heart (a) and kidney (b) of mice 24 hr after CLP. All values represent means ±SEM (n=6). **p*<0.05, ***p*<0.01.

これらの結果は、敗血症などの強い炎症が時計遺伝子の発現に強く影響する事を示唆している。実際、炎症性サイトカインの TNF-α が *Bmal1* の遺伝子発現を増強し(Yoshida K. TNF-α induces expression of the circadian clock gene *Bmal1* via dual calcium-dependent pathways in rheumatoid synovial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;495:1675-1680)、一

方、Per2 の遺伝子発現を抑制する事(Cavadini G et al. TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104:12843-8)も報告されている。従って、CLP による敗血症の心臓においては TNF- α の影響により Bmal1 の発現が上昇し、腎臓では Per2 の発現が減少するものと思われる。これら遺伝子発現の変化は結果的にはいずれも Per2/Bmal1 ratio の低下を誘起する。

以上本研究では、視交叉上核にある中枢時計に影響を及ぼす水中毒や肝性脳症による脳浮腫は心臓の末梢対内時計の変調を強く誘起することを明らかにした。更に、敗血症等の全身性炎症の状態では炎症性サイトカインが時計遺伝子の発現に強く影響して末梢の体内時計に変調を誘起することを見出した。これらの結果は脳浮腫や低酸素脳症による死亡と全身性の炎症を伴う死亡においては体内時計の基づく死亡時刻の推定に注意を要する事を示唆するものと考えている。

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 5 件)

1. Kimura A, Ishida Y, Furuta M, Nosaka M, Kuninaka Y, Taruya A, Mukaida N, Kondo T. Protective Roles of Interferon- γ in Cardiac Hypertrophy Induced by Sustained Pressure Overload. J Am Heart Assoc, 7(6). pii: e008145. 2018
2. Zhao J, Nishimura Y, Kimura A, Ozawa K, Kondo T, Tanaka T, Yoshizumi M. Chemokines protect vascular smooth muscle cells from cell death induced by cyclic mechanical stretch. Sci Rep, 7(1):16128. 2017
3. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Yamamoto H, Kato T, Kuninaka Y, Shimada E, Kondo T. Detection of intrathrombotic endothelial progenitor cells and its application. Int J Legal Med, 131:1633-1638. 2017
4. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Hama M, Kawaguchi T, Sakamoto S, Shinozaki K, Iwahashi Y, Takayasu T, Kondo T. Exaggerated arsenic nephrotoxicity in female mice through estrogen-dependent impairments in the autophagic flux. Toxicology, 339:9-18. 2016
5. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Shiraki M, Hama M, Kawaguchi T, Kuninaka Y, Shimada E, Yamamoto H, Takayasu T, Kondo T. Autophagy in skin wounds: a novel marker for vital reactions. Int J Legal Med, 129(3):537-41. 2015

[学会発表](計 6 件)

1. Kimura A, Yamamoto H, Ozaki M, Hata S, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Hashizume Y, Kondo T. Acetaminophen-induced fulminant hepatic failure altered the biological clock in mouse heart.

10th International Symposium Advances in Legal Medicine. Düsseldorf (2017)

2. Yamamoto H, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Shimada E, Kawaguchi M, Kimura A, Kondo T. Molecular toxicological study on the influence of circadian rhythms on acetaminophen hepatotoxicity. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine. Düsseldorf (2017)
3. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Kimura A, Yamamoto H, Shimada E, Kawaguchi M, Kondo T. The absence of CCL3 exaggerated CaCl₂-induced aortic aneurysm. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine. Düsseldorf (2017)
4. Taruya A, Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kondo T. The absence of Spi-B exaggerates acute aortic dissection in mice. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine. Düsseldorf (2017)
5. 木村章彦 ノーベル賞と法医学と私. 第 63 回日本法医学会学術近畿地方集会 (招待講演)(2016)
6. 木村章彦, 石田裕子, 野坂みずほ, 國中由美, 近藤稔和. 皮膚創傷治癒における autophagy の役割. 第 45 回日本創傷治癒学会 (2015)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村章彦(KIMURA AKIHIKO)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60136611

(2)研究分担者

近藤稔和 (KONO TOSHIKAZU)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70251923

石田裕子 (ISHIDA YUKO)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：10364077

野阪みずほ (NOSAKA MIZUHO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00244731

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()