



Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes.

福家, 啓起

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3826

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003826>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 2 7 】

氏 名・(本 籍) 福家 啓起 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1825号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes.
(ヒト末梢白血球中の時計遺伝子の概日発現)

審 査 委 員

主 査 教 授 横野 浩一

教 授 秋田 穂束

教 授 尾原 秀史

序文

概日時計システムは生理学的または行動学的過程に広く関与している。現在、哺乳類の概日時計機構に8つの必要不可欠な遺伝子が同定されている。これらの遺伝子の産物は転写・翻訳フィードバックに基づいた分子振動体モデルを構築している。哺乳類の中樞のペースメーカーは脳の視床下部にある視交叉上核に位置している。しかし、時計遺伝子のクローニングによって概日振動体は末梢組織にも存在していることが明らかになった。中樞のペースメーカーは神経または液性因子によって末梢組織の概日遺伝子発現を同調させていると考えられる。

私たちは末梢白血球中の時計遺伝子発現が概日時計システムで制御されているのか、もしそうなら人での概日時計システムを評価するのに用いるかを検討した。本研究では最初に野生型マウスと概日時計機能が欠損している *Cry1*/*Cry2* のホモ接合体欠損マウスと末梢白血球の時計遺伝子発現を比較し、次いでヒト末梢白血球にて *Per1*、*Per2* および *Bmal1* mRNA の発現を調べた。

材料および方法

動物

オスの C57BL/6J マウスと *Cry1*/*Cry2* の二重ホモ接合体欠損マウス（生後6週間）を3週間の明（300ルクス蛍光灯）暗（LD）サイクルに置き、その後継続して2日間完全な暗闇を保った。時計遺伝子の発現は概日時間（CT）0で始まる4時間毎に調べられた。心臓穿刺で全血（0.6~0.9ml）が得られ、直ちに安定剤を含む PAXgene Blood RNA チューブ（PreAnalytiX 社製）に移された。動物の管理および使用は神戸大学医学部動物実験施設のガイドラインを順守した。

研究参加者

8人の健康な男性被験者がインフォームドコンセント様式に署名の上研究が行われた。平均年齢は29.6歳であった。睡眠の平均開始時間は午前0時11分で、平均覚醒時間は7時45分であった。平均の食事時間は朝食が8時32分、昼食が午後13時12分、そして夕食が午後20時12分であった。被験者は水以外、ほかの食物を摂らないようにした。

ヒト血液サンプル収集

2.5mlの末梢血を前腕からシリンジで採血し、直ちに PAXgene Blood RNA チューブに移した。末梢血の採血は午後12時または16時から開始とし、12、16、20、0、4、8時に行われた。

RNA 精製および定量的 RT-PCR 法

末梢血は24時間室温で保存され、RNA は PAXgene Blood RNA キット（PreAnalytiX 社製）のプロトコールによって抽出された。RNA 濃度を測定し、定量的 RT-PCR 法を行った。プライマーとプローブはヒトおよびマウスの GenBank 中の使用可能な配列に基づいて設計された。ヒトの GAPDH は既製の TaqMan Assay Reagent（Applied Biosystems 社製）を用いた。

統計学的解析

mRNA 発現はコントロールとの相対的な比として標準化されたデータを用いてシングルコサイン法で概日リズムが解析された。コサインカーブの近似前後の剰余の比較から P 値を決定し、0.01 以下はリズムを検知していることを示唆している。それぞれの変数のリズム特徴（mesor：リズム補正中央値、振幅、頂点位相）をグループごとに対応のある T 検定で比較した。

結果

マウス末梢白血球中の *Per1* および *Per2* mRNA の発現を定量的リアルタイム RT-PCR 法で野生型と *Cry1*/*Cry2* ホモ接合体欠損マウスで比較した。高度に有意な ($P < 0.001$) 24時間周期の *Per1* および *Per2* mRNA の変化が野生型マウスに見られた。*Per1* mRNA 発現の mesor は *Per2* のその約3倍高かった。末梢白血球中の *Per1* および *Per2* 発現のピークは CT（概日時間）4 の周辺であった。対照的にコサイン分析では *Cry1*/*Cry2* の二重ホモ接合体欠損マウスでは *Per1*、*Per2* ともに有意な概日変化を示さなかった。これらのデータはマウス末梢白血球での *Per1* および *Per2* 遺伝子発現は概日時計システムで制御されている明らかな遺伝学的証拠を提供するものである。

続いて私たちは8人の健康な被験者から得られたヒト末梢白血球中の24時間通しでの *Per1*、*Per2* および *Bmal1* の相対的な RNA 発現を検討した。私たちはヒト末梢白血球中の *Per1* 発現の高度に有意な ($P < 0.001$) 概日変化を7時34分をピークにして認めた。対照的にコサイン分析では末梢白血球の *Per2* および *Bmal1* 発現では有意な概日リズムが存在しないことを示した。振幅、mesor

とも Per1 が Per2 より有意に高値であった。これらの観察は Per1 が Per2 や Bmal1 と異なり、Per1 の mRNA がヒト末梢白血球中において明らかな概日リズムを示していることを示唆する。

考察

本研究において、私たちはマウスの末梢白血球中の Per1 および Per2 mRNA の概日発現が概日時計システムによって制御されている遺伝学的な証拠を提供した。加えて、ヒト白血球中の Per1 mRNA は Per2 や Bmal1 と異なり、明らかな 24 時間周期の振動を有することを示した。

以前、ラット末梢単核球中の Per2 遺伝子の発現が他の組織と同様、視交叉上核と同じ位相関係を示すことが報告された。しかし、Per2 mRNA 発現が概日時計システムによって制御されていることは直接示されたことはなく、本研究において私たちはマウス末梢白血球において Per2 mRNA の概日発現が以前の研究の結果を再確認できることを示し、加えて Per1 mRNA も発現に明らかな概日パターンがあることを発見した。さらに、それぞれの遺伝子の発現は中枢のペースメーカー機能が消失する Cry1/Cry2 のホモ接合体欠損マウスにて妨げられていることを発見した。これらの観察は末梢白血球中の時計遺伝子の概日時計システムのコントロール下にあるという考えをさらに支持するものである。

しかし、異なる見方をすると本研究で重要な発見は健常者のヒト末梢白血球では Per1 mRNA は概日リズムを示している一方、Per2 および Bmal1 では発現にリズムが見られなかったことである。これらの観察はヒトの白血球には分子振動体は有しているが、循環血液中では振動をしておらず厳密には視交叉上核の中枢振動対と同調していない可能性を示唆する。哺乳類で末梢時計の振動が自己では継続しないことを考えると、循環している末梢の白血球では骨髄から離れた後速やかに振動は低下している可能性がある。また、社会活動のような不完全な明暗条件がヒト末梢白血球中の時計遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性もある。にもかかわらず、私たちが末梢白血球中の Per1 mRNA 発現が概日時間を反映していると考え理由は、1) ヒトの皮膚および口腔粘膜で Per1 mRNA 発現を調べた (Bjarnason ら) 研究によるピークの時間が似ていること、2) Per2 や Bmal1 と異なり Per1 では 8 人の被験者の Per1 mRNA 発現のピークが同じであったこと、3) 統計学的には有意でなかったが、Bmal1 の位相が Per1 のそれと反対である傾向があったこと、である。

薬剤代謝など薬理学的要素に加えて心筋梗塞、心臓突然死、脳梗塞などの重篤な疾患の発生は日内変動を有意に示すことが知られている。これらは概日時

間に基づいた治療、または時間医療の重要性を示唆するものであり、たとえば肺癌の化学療法では時間医療がフェーズ 2 まで進行している。また、インターフェロンは時計遺伝子発現に影響を与えることも報告されており、投与時間を考慮することによりその神経心理学的副作用を減弱させることが報告されている。このように薬剤投与の時間スケジュールが治療の利益を最大化させ、副作用を最小化させることを示唆している。しかし、これまで皮膚の生検で時計遺伝子の概日リズムを求めうることは報告されていたが、通常臨床検査として行うには現実的に難しく、ヒト個人での「時間」を評価する方法が存在しなかった。私たちのヒト末梢白血球の Per1 遺伝子発現定量法は臨床医学に時間医療を導入するのに有用で、この方法を用いて時間治療の有用性をさらに評価することが可能である。加えて、ヒトの概日リズムの分析方法を確立することは時差、シフトワーカーの慢性疾患のようなリズム障害の病態生理を理解するのに必要不可欠なステップとなるであろう。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第1843号	氏 名	福家 啓起
論文題目 Title of Dissertation	<p>Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes.</p> <p>ヒト末梢白血球中の時計遺伝子の概日発現</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 横野 浩一 Chief Examiner</p> <p>副 査 秋田 稔夫 Vice-examiner</p> <p>副 査 辰原 秀史 Vice-examiner</p>		
審査終了日	平成 19 年 2 月 21 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

<p>概日時計システムは生理学または行動学の過程に広く関与し、現在、哺乳類の概日時計機構に8つの必要不可欠な遺伝子が同定されている。これらの遺伝子の産物は転写・翻訳フィードバックに基づいた分子振動体モデルを構築している。哺乳類の中枢のペースメーカーは脳の視床下部にある視交叉上核に位置している。しかし、時計遺伝子のクローニングによって概日振動体は末梢組織にも存在していることが明らかになった。中枢のペースメーカーは神経または液性因子によって末梢組織の概日遺伝子発現を同調させていると考えられる。そこで本研究者は末梢白血球中の時計遺伝子発現が概日時計システムで制御されているのか、もしそうなら人での概日時計システムを評価するのに用いるかを検討した。本研究では最初に野生型マウスと概日時計機能が欠損している Cry1/Cry2 のホモ接合体欠損マウスとで末梢白血球の時計遺伝子発現を比較し、次いでヒト末梢白血球にて Per1、Per2 および Bmal1 mRNA の発現を調べている。</p> <p>まずマウス末梢白血球中の Per1 および Per2 mRNA の発現を定量的リアルタイム RT-PCR 法で野生型と Cry1/Cry2 ホモ接合体欠損マウスで比較した。mRNA 発現はコントロールとの相対的な比として標準化されたデータを用いてシングルコサイン法で概日リズムが解析された。コサインカーブの近似前後の剰余の比較から P 値を決定し、0.01 以下はリズムを検知していることを示している。それぞれの変数のリズム特徴 (mesor: リズム補正中央値、振幅、頂点位相) をグループごとに対応のある T 検定で比較した。その結果、高度に有意な (P<0.001) 24時間周期の Per1 および Per2 mRNA の変化が野生型マウスに見られた。Per1 mRNA 発現の mesor は Per2 のその約 3 倍高かった。末梢白血球中の Per1 および Per2 発現のピークは CT4 の周辺であった。対照的にコサイン分析では Cry1/Cry2 の2重ホモ接合体欠損マウスでは Per1、Per2 とともに有意な概日変化を示さなかった。これ</p>
--

506

らのデータはマウス末梢白血球での Per1 および Per2 遺伝子発現は概日時計システムで制御されている明らかな遺伝学的証拠を提供するものである。
続いて研究者は 8 人の健常な被験者から得られたヒト末梢白血球中の 24 時間通しでの Per1, Per2 および Bmal1 の相対的な RNA 発現を検討した。そして高度に有意な ($P < 0.001$) 概日変化が 7 時 34 分をピークにしてヒト末梢白血球中の Per1 発現を認めた。対照的にコサイナー分析では末梢白血球の Per2 および Bmal1 発現では有意な概日リズムが存在しないことを示した。振幅、mesor とも Per1 が Per2 より有意に高値であった。これらの観察は Per1 が Per2 や Bmal1 と異なり、その mRNA がヒト末梢白血球中において明らかな概日リズムを示していることを示唆している。
本研究において、研究者はマウスの末梢白血球中の Per1 および Per2 mRNA の概日発現が概日時計システムによって制御されている遺伝学的な証拠を提供した。加えて、Per1 は Per2 や Bmal1 と異なり、ヒト白血球中の mRNA が明らかな 24 時間周期の振動を有することを示した。以前、ラット末梢単核球中の Per2 遺伝子の発現が他の組織と同様、視交叉上核と同じ位相関係を示すことが報告された。しかし、Per2 mRNA 発現が概日時計システムによって制御されていることは直接示されたことはなく、本研究において研究者はマウス末梢白血球において Per2 mRNA の概日発現が以前の研究の結果を再確認できることを示し、加えて Per1 mRNA も発現に明らかな概日パターンがあることを発見した。さらに、それぞれの遺伝子の発現は中枢のペースメーカー機能が消失する Cry1/Cry2 のホモ接合体欠損マウスにて妨げられていることを発見した。これらの観察は末梢白血球中の時計遺伝子の概日時計システムのコントロール下にあるという考えをさらに支持するものと考えられる。
しかし、異なる見方をすると本研究で重要な発見は健常者のヒト末梢白

血球では Per1 mRNA は概日リズムを示している一方、Per2 および Bmal1 では発現にリズムが見られなかったことである。これらの観察はヒトの白血球には分子振動体は有しているが、循環血液中では振動をしておらず厳密には視交叉上核の中核振動対と同調していない可能性を示唆する。哺乳類で末梢時計の振動が自己では継続しないことを考えると、循環している末梢の白血球では骨髓から離れた後速やかに振動は低下している可能性がある。また、社会活動のような不完全な明暗条件がヒト末梢白血球中の時計遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性もある。にもかかわらず、研究者が末梢白血球中の Per1 mRNA 発現が概日時間を反映していると考え理由は、1) ヒトの皮膚および口腔粘膜で Per1 mRNA 発現を調べた (Bjarnason ら) 研究によるピークの時間が似ていること、2) Per2 や Bmal1 と異なり Per1 では 8 人の被験者の Per1 mRNA 発現のピークが同じであったこと、3) 統計学的には有意でなかったが、Bmal1 の位相が Per1 のそれと反対である傾向があったこと、である。
薬剤代謝など薬理学的要素に加えて心筋梗塞、心臓突然死、脳梗塞などの重篤な疾患の発生には日内変動を有意に示すことが知られている。これらは概日時間に基づいた治療、または時間医療の重要性を示唆するものであり、たとえば肺癌の化学療法では時間医療がフェーズ 2 まで進行している。また、インターフェロンは時計遺伝子発現に影響を与えることも報告されており、投与時間を考慮することによりその神経心理学的副作用を減弱させうることが報告されている。このように薬剤投与の時間スケジュールが治療の利益を最大化させ、副作用を最小化させうること示唆している。しかし、これまで皮膚の生検で時計遺伝子の概日リズムを求めうことは報告されていたが、通常臨床検査として行うには現実的に難しく、ヒト個人での「時間」を評価する方法が存在しなかった。

本研究は、従来ほとんど行われなかったヒト末梢白血球の時計遺伝子の発現機構を明らかにするとともに Per1 遺伝子の定量法を確立し、臨床医学に時間医療を導入する端緒を開き、時間治療の有用性を評価する可能性を示したものであると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。