

Title	Modulation of Circadian Expression of D-Site Binding Protein by the Schedule of Parenteral Nutrition in Rat Liver
Author(s)	小川, 淳宏
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41127
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	お 小 川 淳 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 4 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 5 月 29 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Modulation of Circadian Expression of D-Site Binding Protein by the Schedule of Parenteral Nutrition in Rat Liver (静脈栄養投与スケジュールによるラット肝のD部位結合蛋白発現の日内リズムの修飾)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 岡 田 正 教 授 宮 崎 純 一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】 今日、中心静脈栄養 (TPN) は消化器外科の術前、術後管理に多用されている。長期間の TPN の施行時には肝機能障害がみられることか多く、その原因の一つとして24時間持続的に栄養を投与する非生理性があげられている。一方、間欠的に TPN を行うことにより、肝障害の発症が減少すると報告されている。近年、分子生物学的手法の進歩により、肝におけるアルブミンなどの蛋白や酵素の合成は、遺伝子転写レベルで制御され、それには数種の肝特異的転写因子が関与していることが明らかになってきた。アルブミン遺伝子プロモーターのD部位に結合する転写因子として発見された DBP (D-site binding protein) は肝特異的転写因子の一つであり、胆汁酸合成の律速酵素である cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7) 遺伝子などの転写も制御し、明瞭な日内リズムを持つことを特徴としている。私は TPN の投与スケジュールが肝の酵素や蛋白合成を遺伝子発現のレベルで制御していると仮説し、日内リズムを持つ肝特異的転写因子である DBP に対する影響に着目した。本研究において、ラットを用いて持続的 TPN および間欠的 TPN モデルを作製し、肝における DBP 及びアルブミン、CYP7 遺伝子発現を調べた。

【方法】 6週令雄性ドンリュウラット (n=48) を3群に分け、持続的 PN 群、夜間間欠的 PN 群 (夜間 PN 群)、昼間間欠的 PN 群 (昼間 PN 群) とした。TPN はネンブタール麻酔下にカテーテルを右頸静脈より挿入し、中心静脈栄養 (250 kcal/kg/day, 1.78 gN/kg/day) を施行した。持続 PN 群は投与メニューを24時間持続的に投与し、夜間 PN 群は同メニューを20時から8時までの12時間に、昼間 PN 群は8時から20時までの12時間に投与した。また、コントロール群として自由摂食モデル (n=16) を用意した。各群4匹ずつ6時間おき (4, 10, 16, 22時) に犠死せしめ血液と肝の採取を行った。肝より RNA を抽出し、転写因子である DBP, C/EBP α , C/EBP β とアルブミン, CYP7 の mRNA 量の日内変動をノーザンプロット法にて測定した。また、肝の核抽出液の DBP, C/EBP α , C/EBP β の蛋白量の日内変動をウェスタンプロット法にて測定した。さらに、DBP のプロモーター結合部位であるアルブミン D-site と CYP7 FP2-site への結合蛋白量をゲルシフトアッセイにて測定し、CYP7 FP2-site への DBP 蛋白結合量をゲルシフトウェスタン法にて測定した。また、血中コルチコステロン値の日内変動を測定した。

【成績】 夜間 PN 群では自由摂食ラットと同様に22時に最大となる DBP mRNA の日内リズムを認めた。これに対し、

昼間 PN 群では10時に最大となり、夜間はほとんど発現せず、日内リズムの逆転を認めた。持続 PN 群でも22時に最大となる日内リズムを認めたが22時における発現量はコントロール群の約半分であった。C/EBP α および C/EBP β mRNA 量には全群において有意な日内変動を認めなかった。ウェスタンブロット法により、DBP の日内リズムの変化が mRNA レベルだけでなく蛋白レベルでもみられることが証明された。CYP7 mRNA 量の日内変動は全群において DBP mRNA 量のそれとよく一致したがアルブミン mRNA 量には日内変動はみられなかった。ゲルシフト分析では CYP7 遺伝子プロモーター FP2 site へ結合する核内蛋白量が夜間 PN 群で夜間に多くなる日内リズムを示したが、昼間 PN 群では日内リズムが明らかではなかった。アルブミン D-site では昼間 PN 群、夜間 PN 群ともに日内変動を認めなかった。CYP7 FP2-site への DBP の結合量をみるためゲルシフトウェスタン分析を施行したが、夜間 PN 群でのみ日内リズムを認めた。血中コルチコステロン値も夜間 PN 群でのみ日内リズムを認めた。

【総括】 DBP の日内リズムは生理的栄養摂取スケジュールを模した夜間間欠的中心静脈栄養群で維持された。栄養投与スケジュールによって DBP の日内リズムが影響を受けることが明らかになった。グルココルチコイドは DBP の発現の制御に関与することが知られているが、血中コルチコステロン値と DBP mRNA 発現とは完全には相関せず、単独の regulator とは考えられなかった。アルブミンとは異なり CYP7 の遺伝子発現は DBP のみにより制御されていた。栄養投与スケジュールは肝特異的転写因子 DBP の日内リズムに影響を与え、活動時に間欠的 TPN を行うことは生理的日内リズムの維持に有用であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

長期間の持続的中心静脈栄養(TPN)により肝機能に異常が生じることが知られている。本研究は、TPN の間欠的投与によって TPN に起因するこの肝代謝変化が是正しうる可能性について、特に日内リズムを持つ肝特異的転写因子 DBP に着目し、栄養投与スケジュールが DBP 並びに DBP に制御される蛋白や酵素の遺伝子発現に与える影響を解析したものである。ラット TPN モデルにおいて、生理的栄養摂取リズムを模した夜間間欠的 TPN では DBP や胆汁酸合成の律速酵素 CYP7 は自由摂食時の日内リズムを維持しているのに対し、持続的 TPN ではその日内リズムが減弱し、昼間間欠的 TPN では日内リズムの逆転がみられることを明らかにした。

以上、栄養投与スケジュールは肝特異的転写因子 DBP の日内リズムに影響を与え、活動時に間欠的 TPN を行うことが生理的日内リズムの維持に有用であることを明らかにした研究であり、学位の授与に値すると考えられる。