



Title	Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats
Author(s)	岡田, 一幸
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48877
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	おか だ かず ゆき 岡 田 一 幸
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 2 1 6 0 0 号
学位授与年月日	平成 19 年 9 月 26 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	Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats (LPS 投与はラットの体内時計を一過性に抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 福澤 正洋 教授 真下 節

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

体内時計は、体温、血圧、睡眠覚醒リズム、ホルモン分泌といった多くの生体機能に認められるサーカディアンリズムの構築に関与するとともに、体内外の環境変化に应答し、生命維持に必要なホメオスタシスを制御する体内機構である。体内時計は時計遺伝子により制御されているが、最近の研究では時計遺伝子に同調して発現する clock controlled genes (CCGs) の同定も行われ、代謝、免疫、細胞周期といった多くの生体機能に体内時計が関与すると考えられている。

一方で、手術や重症感染症といった侵襲下では、生体は外的刺激のみならず神経内分泌反応や高サイトカイン血症といった内的刺激にも曝される。このような環境下では、ときに不眠やせん妄といったサーカディアンリズム異常を示唆する臨床所見を示す患者が認められる。このことから、全身炎症反応下では体内時計は何らかの影響を受ける可能性が示唆される。今回、ラット侵襲モデルを用いて、侵襲下での体内時計の反応を遺伝子レベルで検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

12 時間毎の明暗サイクル下で飼育された SD 系雄性ラットを、無作為に LPS (Lipopolysaccharide) 投与群と Control 群に分けた。明期 1 時間目の ZT01 (=Zeitgeber time 01、午前 8 時) に、LPS 投与群には LPS (1 mg/kg) を、Control 群には生食 0.3 ml を尾静脈から投与した。注射後 1 時間目の ZT02 (午前 9 時) からは、4 時間毎に計 12 ポイント (ZT02、ZT06、ZT10、ZT14、ZT18、ZT22 を 2 日間) でサンプリングを行った。1 ポイントあたり各群 4 匹ずつから血液 8 ml を採取し、灌流固定した後に脳及び肝臓を摘出した。血液サンプルについては、全身性炎症反応の程度を評価するために、炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6 及び副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンの血中濃度を測定した。脳サンプルについては、体内時計の中核である SCN (視交叉上核) における時計遺伝子 *rPer2* 及び CCGs である *rDBP* の発現量を in situ hybridization 法にて測定し、2 群間の日内変動を比較した。肝臓サンプルについては、RNA を抽出した後に、定量的 RT-PCR 法にて時計遺伝子 *rPer1*、*rPer2* 及び CCGs である *rDBP*、*rPPAR α* 、*rFKBP51* の発現量を測定し、2 群間の日内変動を比較した。尚、*rDBP* は蛋白合成、*rPPAR α* は脂質代謝、*rFKBP51* は免疫機能に関与する遺伝子である。次に、各群 4 匹ずつを対象に、注射前 2 日間、注射後 5 日間の行動リズムを自動測定器 (SUPERMEX[®]; 動物から放射される赤外線を感知し、観察エリア間の移動回数を計測する装置) にて測定した。

LPS 投与群において炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6 の血中濃度はそれぞれ注射後 1 時間目及び 5 時間目にピー

クを示した。コルチコステロンは Control 群に認められた日内リズムは消失し、注射後 1 時間目から血中濃度は上昇し、21 時間目まで遷延した。このことから、本実験の LPS 投与量で全身炎症反応は十分に惹起されることが確認された。次に、SCN（視交叉上核）における *rPer2* 及び *rDBP* の発現量は、Control 群ではそれぞれ ZT06、ZT10 をピークとする日内リズムが認められたが、LPS 投与群ではともに Day1 で発現量の抑制が認められ、日内リズムの消失が認められた。しかしながら、Day2 にはともに発現量は増大し、日内リズムの回復が認められた。一方、肝臓における時計遺伝子 *rPer1*、*rPer2* の発現量は、Control 群ではともに ZT14 をピークとする日内リズムが認められたが、LPS 投与群では Day1 で発現量は抑制され、日内リズムの消失が認められた。しかしながら、Day2 には発現量は増大し、日内リズムの回復が認められた。また、CCGs である *rDBP*、*rPPAR α* 、*rFKBP51* の発現については時計遺伝子と同様の変化が認められ、Control 群では明らかな日内リズムが認められたが、LPS 投与群では Day1 で一過性の発現量の抑制が認められ、Day2 には回復傾向が認められた。行動リズムについては、Control 群では暗期に活動が活発化し、明期にはそれが低下する明らかな日内リズムが認められたが、LPS 投与群では Day1 で暗期での活動が完全に低下し、日内リズムの消失が認められた。しかしながら、Day2 には暗期の活動量の増加が認められ、Day3 には完全に Control 群と同様の活動リズムに回復した。

[総 括]

LPS 投与により時計遺伝子 *rPer2* およびその下流にある CCGs (*rDBP*、*rPPAR α* 、*rFKBP51*) の一過性の発現抑制がみられた。このことは、体内時計本体が侵襲下で影響を受けること、また、その影響は蛋白合成、脂質代謝、免疫機能といった生体機能にも及ぶ可能性があることを示唆している。行動リズムの検討からは、遺伝子レベルでの変化と合致したサーカディアンリズムの一過性抑制が認められた。すなわち、サーカディアンリズムを有するさまざまな生体機能は、全身炎症反応下での時計遺伝子の一過性の発現抑制により、一過性のリズム異常が惹起される可能性がある。

従来から手術や重症感染症によって生じる生体反応は、副腎皮質ホルモンに代表される神経・内分泌反応やサイトカインネットワークといった免疫反応が複雑に絡み合って生じると考えられてきた。しかしながら今回の検討結果から、生体反応の中には体内時計のリズム異常に起因する反応も含まれていることが示唆された。侵襲に対する生体反応のメカニズムをより深く理解するためには、神経・内分泌反応やサイトカインネットワークに体内時計機構を絡めた新しい観点から検討することが必要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

体内時計は、自律性に発振し、睡眠覚醒リズム、ホルモン分泌といった多くの生体機能に認められるサーカディアンリズムの構築に関与するとともに、体内外の環境変化に应答し、時計の位相を変えることで生体を環境変化に同調させる機能を持っている。その結果、生命維持に必要なホメオスタシスが維持されている。リズムの発振は時計遺伝子の feedback loop 機構により制御されている。最近の研究ではそれらに同調して発現する clock controlled genes (CCGs) の同定も行われ、代謝、免疫、細胞周期といった生体機能におけるサーカディアンリズムの発振機構が遺伝子レベルで明らかになった。一方で、手術や重症感染症といった侵襲下では、ときに不眠やせん妄といったリズム異常を示唆する患者が認められる。これまで侵襲に対して体内時計がどのような応答をするかは明らかにされていない。本研究では LPS 投与ラット侵襲モデルを作製し、侵襲下での体内時計の反応を遺伝子レベルで検討した。結果は、脳の SCN（視交叉上核、体内時計の中核）及び肝臓（末梢時計）での時計遺伝子及び CCGs の発現には、LPS 投与 1 日目に一過性の発現抑制が認められ、日内リズムの消失が認められた。この結果から、体内時計本体が侵襲下で影響を受けることが示唆された。また、本研究で測定した CCGs は蛋白合成、脂質代謝、免疫機能に関与する遺伝子であったことから、その影響はこれらの生体機能にも及ぶ可能性が示唆された。従来から手術や重症感染症によって生じる生体反応は、神経・内分泌反応やサイトカインネットワークといった免疫反応が複雑に絡み合って生じると考えられてきた。今回の検討結果から、生体反応の中には体内時計の変化も関与することが示唆された。

本研究は、侵襲に対する生体反応のメカニズムをより深く理解するためには、神経・内分泌反応やサイトカインネットワークといった免疫反応に体内時計機構を絡めた新しい観点から検討することが必要であることを示唆しており、侵襲学の新しい知見に寄与するものであり、学位に値する業績と考えられる。