OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	E-cadherin and claudin-4 expression has circadian rhythm in adult rat kidney
Author(s)	倭, 成史
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54081
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【28】

氏名	倭（やまと）　成史（まさふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　２３４５０　号
学位授与年月日	平成22年１月28日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	E-cadherin and claudin-4 expression has circadian rhythm in adult rat kidney （ラット腎尿細管細胞において、E-cadherinとclaudin-4の発現量は、日内リズムを有する）
論文審査委員	（主査） 教　授　楽木　宏実 （副査） 教　授　金倉　譲　　教　授　下村伊一郎

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕

地球上の生命がほぼ普遍的に備える概日時計は、光や温度など1日周期で変動する外部環境に生命が積極的に適応するため獲得した生理機構であり、多くの遺伝子発現や睡眠・覚醒、血圧・体温調節、ホルモン分泌といった生理活動に日内リズムが認められる。哺乳類において、日内リズムを支配する中枢時計は視交叉上核(SCN)に存在するが、肝臓、腎臓といった末梢組織にも各々時計が存在している。

日内リズムは、per1,per2,cry,clock,Bmal1などの遺伝子が転写、翻訳のオート、フィードバックループ（中核ループ）により制御する細胞内現象と考えられているが、制限給餌により明暗サイクルやSCNから独立した時相で時計遺伝子の発現が制御され、それらの時間位相が変位することも知られている。

腎臓における尿中イオン排泄は主に、尿細管における細胞内輸送によって調節されるが、尿中ナトリウム排泄もまた、日内リズムを有することは広く知られている。

そこで、本研究では以下の仮説を検証することを目的とした。

１）尿中ナトリウム排泄が、細胞内輸送のみならず、細胞間輸送によっても影響を受けている。

２）細胞間輸送を制御する細胞接着因子の発現の日内変動もまた、尿細管細胞におけるナトリウムイオン輸送の日内リズムにおいて大切な働きをしている。

細胞接着機構は、tight junction 密着結合、adherens junction接着結合、desmosome デスモゾームから成り立っているが、ラット腎において、接着結合因子cadherinカドヘリンファミリーの主要因子E-cadherinは主に、遠位尿細管と集合管細胞に存在している。一方、密着結合は頂端部に存在しており、細胞間の小分子の輸送を調整している。密着結合を形成する接着因子claudin familyの一つ、claudin-4は、主に集合管細胞に存在しているが、in vitroにおいてナトリウムイオン勾配輸送の制御をしており、その発現量と、ナトリウムイオンのparacellular pathway：細胞間輸送を介した透過性は反比例することが知られている。

また、接着結合は密着結合の機能形成にも影響を与えるため、密着結合同様に、細胞間輸送の調節に関わっている可能性がある。

そこで、上記仮説を検証するため、ラット腎尿細管細胞において、E-cadherinとclaudin-４の発現量が、日内リズムを有するか、さらに尿中ナトリウム排泄の日内変動にどのように関連しているかについて検討した。

〔　方法ならびに成績その１　〕

8時am (ZT0) light on、8時pm(ZT12) light offの環境下でAdult SDラットを、以下

A群：2週間自由摂食(ad libitum)群

B群：2週間明期制限給餌(daytime restricted feeding)群

C群：2週間ad libitum下で飼育したのち、3日間絶食管理（飲水free）した群の3群に分けた。

そして、各々ZT0, ZT6, ZT12, ZT18と6時間毎に屠殺し、腎臓全体から、RNA並びにタンパクを抽出し、real-time PCR法並びに、Western blotting法にて、各時刻でのper2, E-cadherin, claudin-4の発現量を、また各々同時にスポット尿を採取し、尿中ナトリウム排泄量を測定した。

その結果、E-cadherinとclaudin-4のmRNA発現量は、A群、B群とも日内変動を示し、制限給餌によって、位相変位を認めた。ただし、時計遺伝子per2の制限給餌による位相変位のパターンとは一致しなかった。

一方、摂食のそのもの及び時間の影響を除いたC群の絶食条件下においては、per2の日内リズムは一日を通して、認められたが、E-cadherinとclaudin-4に関しては、部分的に認められるのみであった。

また、A群、B群とも給餌条件によらず、E-cadherinとclaudin-4のタンパク発現量も日内変動を示し、共にタンパク発現量が高い時相で尿中ナトリウム排泄量の低下を認めた。

〔　方法ならびに成績その２　〕

集合管細胞においてE-NaCやNa-K-ATP aseを介しての細胞内Na輸送を制御しているアルドステロンが、日内リズムを有していることが知られている。そこで、アルドステロンはclaudin-4の発現量も制御し、細胞間輸送へ関与している可能性について検討した。ラットのアルドステロン血中濃度の日内リズム（朝方に低く、夜方に高い）を利用し、ZT0にアルドステロンを3日間連続、腹腔内投与し、同様に各々ZT0, ZT6, ZT12, ZT18と6時間毎に屠殺し、腎臓全体から、RNAを抽出し、real-time PCR法にて各時刻でのclaudin-4の発現量を測定したが、アルドステロンによるclaudin-4のmRNA発現の制御は認めなかった。

〔　総　　括　〕

ラット腎尿細管細胞において、E-cadherinとclaudin-4の発現量は、日内リズムを有する。

制限給餌および、絶食実験の結果から、これらのmRNA発現量は腎における、末梢のcircadian clockの直接的な制御ではなく、食事の影響を受ける消化管ホルモンなどの制御を受けている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

哺乳類のさまざまな生理活動に日内リズムを認め、その中枢時計は視交叉上核に存在するが、腎臓など末梢組織にも各々時計が存在している。また制限給餌により、中枢時計から独立して末梢時計の発現が制御され、時間位相の変位を認める。申請者は、細胞間輸送を制御する細胞接着因子E-cadherinとclaudin-４のmRNAが、制限給餌や絶食実験により時計遺伝子per2の位相パターンとは独立した日内変動を示すとともに絶食による影響を認めた。この日内変動は末梢のcircadian clockの直接的な制御ではないことが示された。また E-cadherinとclaudin-４の蛋白発現量も同様に日内変動を呈し、発現量が高い時相で尿中ナトリウム排泄量の低下を認めることを確認し、尿中ナトリウム排泄が、細胞内輸送のみならず、細胞間輸送によっても影響を受けていることを示し、尿細管細胞におけるナトリウムイオン輸送の日内リズムにおいて大切な働きをしていることを検証した。本研究は、細胞接着の制御メカニズムとその生理的役割に対し新たな観点を示したものとして意義が大きく、学位に値するものと認める。