

氏名	ふくおか やすし 服 岡 泰 司
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第511号
学位授与年月日	平成17年 3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ヒト末梢血単核球を用いた時計遺伝子発現に対するグルココルチコイドの影響
学位論文審査委員	(主査) 清水英治 (副査) 中島健二 渡邊達生

## 学位論文の内容の要旨

時計遺伝子は、呼吸機能、血圧、体温、ホルモン分泌などの多くの生命現象に関わっており、約24時間の周期で変動している。主な時計遺伝子には *Clock*、*Bmal1*、*Period* (*Per1*、*Per2*、*Per3*)、*Cryptochrome* (*Cry1*、*Cry2*) などがある。これらの周期的発現のメカニズムは、ネガティブフィードバックループによる転写/翻訳の促進・抑制がその本体である。ヒト生体において、薬剤投与により時計遺伝子の発現がどのように影響を受けるのかは未だ明らかにはされていない。本研究では、末梢血単核球を用いてヒト末梢時計遺伝子 *hPer1*、*hPer2*、*hClock* mRNA を測定し、グルココルチコイド投与によりそれぞれの発現量がどのように変化するかを定量的に測定した。

## 方 法

同意の得られた健常人男性6人が本研究に参加した(平均年齢  $27.0 \pm 2.4$  歳、平均  $\pm$  S.D.)。被験者はいずれもこれまでにグルココルチコイド投与の既往はなかった。

*In vitro* での実験では、6人の被験者からそれぞれ朝9時に60mlの静脈採血を行い、密度勾配遠心分離法により末梢血単核球を抽出した。抽出された単核球は、さらに単球とリンパ球に分離したのち、内因性の刺激を除くため24時間無血清培地にて静置保存した。得られた単球とリンパ球はそれぞれ無刺激・溶媒刺激(0.001%エタノール)・ $10^{-7}$ M プレドニゾロン刺激にて1時間処理のち、時計遺伝子 *hPer1*、*hPer2*、*hClock* mRNA の発現をRT-PCR法およびReal time-PCR法にて測定した。*In vivo* での実験では、前述の6人のうち3人が参加した(平均年齢  $27.3 \pm 2.5$  歳)。2日間に渡り9時、10時、12時、21時の4時点で各10mlの採血を行い、時計遺伝子の日内変動を調査した。第2日目には、9時にプレドニゾロン20mgを静脈内投与し、その後の日内

変動への影響を調査した。いずれの検体も単核球を分離し、その末梢時計遺伝子発現を Real time-PCR 法にて定量的に測定した。

## 結 果

*In vitro* では、単球・リンパ球ともに、溶媒 (0.001% エタノール) のみの刺激では *hPer1*・*hPer2*・*hClock* mRNA とも有意な発現の誘導は認めなかった。一方、プレドニゾロン  $10^{-7}$ M による 1 時間刺激では、単球では無刺激のものと比較した場合、*hPer1* mRNA は  $5.97 \pm 2.71$  倍、*hPer2* mRNA は  $1.08 \pm 0.67$  倍、*hClock* mRNA は  $1.42 \pm 1.02$  倍の発現量の変化を認めた。リンパ球では *hPer1* mRNA は  $2.95 \pm 1.13$  倍、*hPer2* mRNA は  $1.05 \pm 0.33$  倍、*hClock* mRNA は  $0.92 \pm 0.35$  倍の発現量の変化であった。*In vivo* におけるプレドニゾロン投与前日の各時計遺伝子の日内変動は、9 時と 21 時で比較した場合、*hPer1* mRNA と *hPer2* mRNA では若干ながら、朝に発現が強い傾向があった (*hPer1* mRNA: 1.54 倍、*hPer2* mRNA: 1.40 倍) が、*hClock* mRNA では明らかな差は認めなかった。プレドニゾロン 20mg 静脈内投与後の変化は、投与前日の 9 時を基準値として 1 とすると、*hPer1* mRNA は、9 時に  $0.89 \pm 0.06$  倍、10 時に  $3.61 \pm 0.66$  倍、12 時に  $1.18 \pm 0.78$  倍、21 時に  $0.42 \pm 0.03$  倍と、プレドニゾロン投与 1 時間後に *hPer1* mRNA 発現の強い誘導が認められた。*hPer2* mRNA では、9 時に  $1.08 \pm 0.14$  倍、10 時に  $1.25 \pm 0.18$  倍、12 時に  $0.99 \pm 0.82$  倍、21 時に  $0.81 \pm 0.19$  倍であった。*hClock* mRNA は、9 時に  $1.52 \pm 0.89$  倍、10 時に  $1.46 \pm 0.76$  倍、12 時に  $1.59 \pm 0.55$  倍、21 時に  $0.74 \pm 0.29$  倍であった。これらの結果から、プレドニゾロン 20mg の静脈内投与では、投与後 1 時間以内に急速に *hPer1* mRNA の発現が誘導されるが、約 3 時間後にはこの誘導効果は減弱し、12 時間後には前日値と同等まで復帰することが明らかになった。また、生体内でもプレドニゾロン投与において *hPer2* および *hClock* mRNA 発現はほとんど影響されなかった。

## 考 察

本研究は、グルココルチコイドが時計遺伝子の *hPer1* mRNA をヒト末梢血単核球において *in vitro* および *in vivo* で誘導することを初めて明らかにした。*in vitro* で単球とリンパ球両者に対してプレドニゾロンが *hPer1* mRNA の発現を誘導するが、*hPer2* と *hClock* mRNA の発現は誘導しなかった。*in vivo* でプレドニゾロン 20mg を静脈内投与したところ、1 時間後、末梢血単核球において *hPer1* mRNA の相対値が増加したが、12 時間後には前日の相対値まで復帰した。*hPer2* と *hClock* mRNA の相対値はプレドニゾロン 20mg の静脈内投与により変化しなかった。ヒト生体内でグルココルチコイドは *hPer1* mRNA を末梢血単核球で速やかに誘導するが、時間とともに減弱する。ヒト末梢血単核球は、ヒト時計遺伝子に対する薬剤の影響を簡便に調べる測定系として、有用な生体材料である。

## 結 論

今後さらに検討し中枢での時計遺伝子群との関係を考慮する必要があるが、ヒト末梢血単核球において時計遺伝子 *hPer1* mRNA 発現の日内変動およびグルココルチコイドによる発現量の変動が認められたことから、末梢血単核球を用いることにより簡便にヒト生体内の末梢時計遺伝子の変化を観察できる可能性がある。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、薬剤投与による生体リズムへの影響を簡便にモニタリングするために、プレドニゾン投与による時計遺伝子発現への経時的変化を検討したものである。その結果、ヒト末梢血単核球においてプレドニゾン刺激により *hPer1* mRNA の発現が強く誘導された。また、*in vivo* においてはプレドニゾン静脈投与後 1 時間以内に *hPer1* mRNA の発現が強く誘導され、3 時間後には急速に発現減弱へ向かい、12 時間後には投与前日の同時刻の発現量と同程度まで復帰した。本研究から、ヒトにおいても生体への薬剤投与により時計遺伝子発現に変動をきたすことが明らかとなり、今後薬剤の副作用として時計遺伝子への影響をみるうえで末梢血単核球を用いた末梢時計遺伝子発現のモニタリングが可能かつ有用であることが示唆された。

本論文の内容は、生体リズムにおける時計遺伝子研究の分野で、臨床的病態・治療への応用の可能性を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。