







## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 516 号	氏 名	小 山 淑 正
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	明田 淳一	
	副査氏名	岩田 哲子	
	副査氏名	長松 聖悟	
論文題目			
<p>Uncoupling of peripheral and master clock gene rhythms by reversed feeding leads to an exacerbated inflammatory response after polymicrobial sepsis in mice  ( 食餌リズムの逆転による中枢時計遺伝子リズムと末梢時計遺伝子リズムの不均衡はマウス敗血症モデルの炎症反応を悪化させる )</p>			
論文掲載雑誌名			
SHOCK			
論文要旨			
<p>概日リズムを制御する時計遺伝子が生体の生理機能の調節に深く関与している。食餌リズムの変化による中枢時計遺伝子と末梢時計遺伝子の不均衡がストレスに対する耐用能を低下させ種々の病態に関与していることが明らかとなっている。本研究では、食餌リズムの介入によって生じる中枢および末梢時計遺伝子の不均衡がマウス敗血症モデルの病態にどのような影響を与えるかについて検討した。</p> <p>C57BL/6マウスを明環境下（7-19時）で自由摂食できる昼摂食群と暗環境下（19-翌7時）で自由摂食できる夜摂食群の2群に分けて7日間飼育し、7日間の体重と餌の摂取量を計測した。8日目には時計遺伝子であるPeriod 1 (Per1)、brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1 (Bmal1)の肝臓と脳における発現を、また生存規定因子であるsirtuin-1 (SIRT1)、proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> coactivator-1<math>\alpha</math> (PGC-1<math>\alpha</math>)の肝臓における発現を測定した。さらに食餌リズム介入8日目にマウス敗血症モデル(CLP)を作成し、3日目の生存率、24時間後の肝臓と肺組織の傷害程度、および敗血症に関連する各種サイトカインを測定した。</p> <p>食餌リズム介入期間中の体重や餌摂取量は、夜摂食群に比して昼摂食群で有意に低値を示した。介入8日目の肝臓のPer1とBmal1の発現様式は昼摂食群と夜摂食群で逆の位相を示したが、脳内においては変化はみられなかった。また肝臓のSIRT1やPGC-1<math>\alpha</math>の発現は夜摂食群に比して昼摂食群で有意に減少した(p&lt;0.05)。CLPにおける生存率は夜摂食群54%に対して昼摂食群29%と有意に低下し(p&lt;0.05)、肝臓や肺組織障害スコアは昼摂食群で有意に高値を示した。また、CLP後の血清中のIL-6、TNF-<math>\alpha</math>、HMGB1などのサイトカイン値は昼摂食群で有意に高値であった(p&lt;0.05)。</p> <p>本研究は、食餌リズム介入によって生じる中枢と末梢時計遺伝子の不均衡が敗血症を悪化させること、また食餌による時計遺伝子リズムの調和が敗血症の生命予後改善に有用である可能性を示した重要な研究と考えられ、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第 516 号	氏名	小山 淑正
審査委員会委員	主査氏名	門田 淳一	
	副査氏名	岸田 哲子	
	副査氏名	是松 聖隆	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 中枢時計遺伝子と末梢時計遺伝子の不均衡によってどのようなことが生じるのか。</li> <li>2. 時差ぼけも中枢時計遺伝子と末梢時計遺伝子との不均衡によるとのことであるが、時差ぼけは東回りの方が西回りより症状が強く出ると言われている。その原因は何か。</li> <li>3. 時計遺伝子は中枢と末梢で同じ構造か。末梢時計遺伝子の臓器別の発現や機能の差はないのか。</li> <li>4. 抑制分子（SIRT1やPGC-1<math>\alpha</math>）も食事によってリセットされるのか。炎症抑制の機序はなにか。</li> <li>5. CLPをfastingの後にするのは何故か。feedingの後にしたときとの差異はあるのか。</li> <li>6. CLPによる敗血症の臓器障害を肺と肝臓で判定しているが、腎では検討しなかったのか。</li> <li>7. Fig. 3.におけるdensitometryは具体的にはどのように行ったのか。</li> <li>8. 4日目以降に摂食が減少していない理由とそれに反して体重が有意に減少している理由は何か。</li> <li>9. 介入開始直後には食欲と体重減少が顕著で1週間後には回復傾向を示していることから、昼夜逆転によって高血圧等の疾患が生じるという説明にはならないと思うが、どのように考えるか。</li> <li>10. 今回の結果は時計遺伝子の異常によるものだけでなく、体重減少に起因している可能性も否定できないのではないか。</li> <li>11. Fig. 6でCLPの時間帯による数値は、daytime-fed群、nighttime-fed群のどちらの数値なのか。</li> <li>12. SCNにおいて時計遺伝子のRT-PCRおよび定量はしていないのか。</li> <li>13. Th2サイトカインであるIL-4、IL-13や、自己免疫疾患を誘発するIL-17は測定しているのか。</li> <li>14. マウスの週数による結果の違いはあるのか。</li> <li>15. 同じ7時（もしくは21時）にCLPをしたマウスで、daytime-fed群とnighttime-fed群に結果の違いはないのか。</li> <li>16. Per1とBmal1がどのようにdaytime-fed群におけるsepsisの炎症増強と予後不良に関連しているのか。肺炎でも同様に考えられるのか。</li> <li>17. 末梢時計遺伝子は食事によってリセットされるため、咀嚼するという行為が末梢時計遺伝子のリセットに与える影響はどのようなものか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 小山 淑正

## 論 文 題 目

.....Uncoupling of peripheral and master clock gene rhythms by reversed feeding leads to an exacerbated inflammatory response after polymicrobial sepsis in mice.....

(食餌リズムの逆転による中枢時計遺伝子リズムと末梢時計遺伝子リズムの不均衡はマウス敗血症モデルの炎症反応を悪化させる)

## 要 旨

### 【緒 言】

近年、概日リズムを制御する時計遺伝子が生体の生理機能の調節に深く関与している事が明らかとなってきた。食餌リズムを変化させることで中枢時計遺伝子と末梢時計遺伝子の不均衡が生じるが、このことはストレスに対する耐容能を低下させる可能性がある。今回、食餌リズムの介入による中枢・末梢時計遺伝子の不均衡が重症病態の一つである敗血症に及ぼす影響について検討した。

### 【研究対象及び方法】

雄性 C57BL/6 マウス (週齢 5-6 週) を 12 時間毎の明暗環境下 (7-19 時 : 明, 19-翌 7 時 : 暗) で飼育し、以下の 2 群を作成した。両群ともに 24 時間自由飲水であるが、昼摂食群は明環境時に自由摂食、

夜摂食群は暗環境時に自由摂食とし、7日間連続で繰り返した。食餌リズム介入期間中の7日間の体重、エサ摂取量を計測した。8日目に全身麻酔下に犠死させ、時計遺伝子である Period 1 (Per1), brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1 (Bmal1) の肝臓、脳の視交叉上核での発現をそれぞれ RT-PCR, in situ hybridization で測定し、肝臓の sirtuin-1 (SIRT1), proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) の発現を Western blot で測定した。また、食餌リズム介入8日目に全身麻酔下に盲腸結紮穿孔刺 (CLP) を行い、敗血症モデルを作成した。モデル作成後3日間の生存率の検討、24時間後の肝臓・肺組織を HE 染色で臓器傷害スコアの評価を行った。CLP 12, 24, 48時間後の血清中の IL-6, TNF- $\alpha$ , high mobility group box-1 (HMGB1) を ELISA 法で測定し、CLP24時間後のその他サイトカイン、ケモカインを Bio-Plex<sup>®</sup>で測定した。

#### 【結果】

食餌リズム介入期間中の体重、エサ摂取量は昼摂食群で有意な減少を認めた。食餌リズム介入8日目の肝臓の Per1, Bmal1 の発現リズムの位相は昼摂食群で夜摂食群と比較して逆転したが、視交叉上核の発現リズムは変化しなかった。また、肝臓の PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 の発現は昼摂食群で有意に減少していた。CLP3日後の生存率は夜摂食群 54%に対して昼摂食群 29%と有意に低下した(P=0.03)。CLP24時間後の肝臓・肺組織傷害スコアは昼摂食群で有意に高値であった。CLP後の血清中の IL-6, TNF- $\alpha$ , HMGB1, IL-1 $\alpha$ , IL-9, Eotaxin, G-CSF 値は昼摂食群で有意に高値であった。

#### 【考察】

昼摂食群で時計遺伝子の中枢と末梢時計遺伝子の不均衡が生じた。この状態で、CLPによる敗血症を引き起こすと炎症性サイトカインの増加に伴い、肺、肝臓の臓器傷害が増悪し、生存率が低下した。この原因として時計遺伝子が制御している PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 の発現低下の関与が示唆された。

#### 【結語】

食餌リズム介入による中枢と末梢時計遺伝子の不均衡は敗血症モデルにおいて炎症反応を悪化させ、臓器傷害の増悪、生存率の低下につながった。これらの原因として PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 の発現低下の関与が示唆された。食餌による時計遺伝子リズムの調和は抗炎症作用も有すると考えられた。