

第2章

STZ 処置糖尿病モデルマウスの *mPer2* および *mPER2* 発現に対するインスリン投与の影響

2-1. 序論

糖尿病はインスリンの絶対的、相対的欠乏によりグルコースが細胞に取り込まれなくなる代謝障害を起因とする病気である。糖尿病にはインスリン産生が出来なくなるインスリン依存型（I型）と、インスリンの感受性が低下するインスリン非依存型（II型）に分類される。前述のように、糖尿病になるとインスリンによるグルコースの細胞への取り込みが阻害される。第1章で明らかになったように摂食による時計遺伝子同調を引き起こす因子は、グルコースである可能性が高い。また、近年の報告から糖尿病モデル動物では、末梢組織における時計遺伝子の発現が減弱し、位相が変化すると報告がある。そこで、本章では STZ 投与による I 型糖尿病モデルマウスを作成し、糖尿病下における時計遺伝子 *mPer2* および *mPER2* の発現を調べた。前章の研究結果から、グルコースによる時計遺伝子発現は *mPer1* より *mPer2* により特異的な現象である可能性が示されたので、*mPer2* および *mPER2* に焦点をあてて研究を行った。また、糖尿病モデルマウスにインスリン投与を行い、*mPer2* および *mPER2* 発現に対するインスリンの影響を調べた。また、薬物の投与時刻に依存して薬物の効果に差が見られるという報告が多々あり、この現象は時間薬理学としても知られている。本章の実験仮説概念を図 1.3. に示す。本章でもインスリンの投与時刻を明期の始めと暗期の始めに分け、インスリン投与時刻による時計遺伝子発現誘導に違いがあるかどうか、時間薬理的観点に立ち検証した。

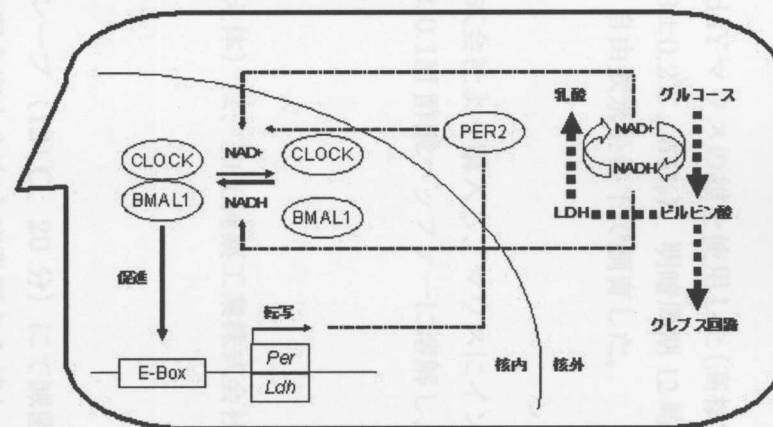
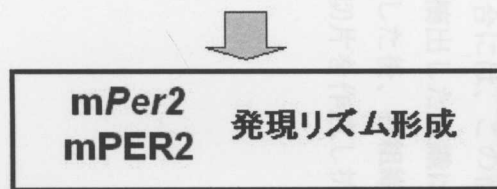
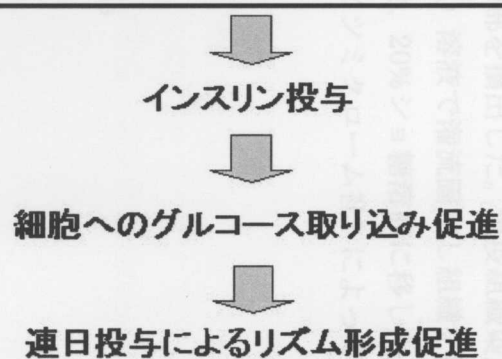
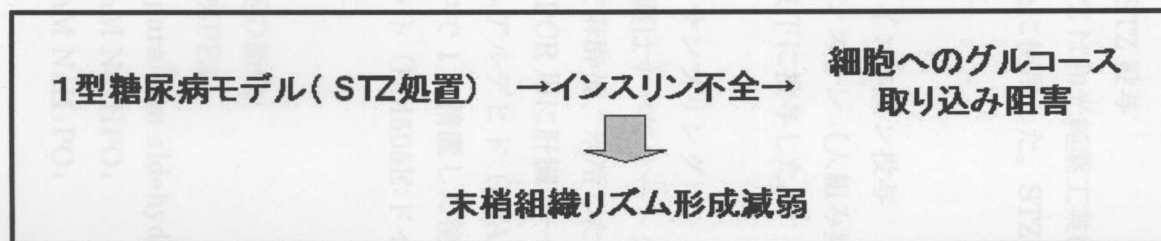


図13. 第2章の実験仮説

2-2. 実験方法

(1) 実験動物

実験には8-10週令の ddY マウスの雄を使用した(高杉実験動物株式会社より購入)。動物は全て恒温恒湿 (23±0.2°C、55%)、明暗周期 12 時間 : 12 時間で飼育した。また実験使用前は自由摂食、自由飲水条件下で飼育した。

(2) STZ 投与

STZ は和光純薬工業株式会社より購入し、マウスにインスリン依存型糖尿病を誘導する為に使用した。STZ は 0.1M 酢酸バッファーに溶解し、200mg/kg にて腹腔内に投与した。

(3) インスリン投与

インスリン (人組み換え体) は、和光純薬工業株式会社より購入し生理食塩水に溶解し皮下に投与した。

(4) サンプリング

試薬はすべてオートクレーブ (121°C、20 分) にて滅菌済みのものを用いた。エーテルで麻酔後、氷冷した生理食塩水を右心室動脈から流し、血液を出来る限り除いた後、RT-PCR 用に肝臓の一部を摘出した。免疫組織染色を行う場合には、この後 4%パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液で灌流固定し組織を摘出した。摘出した組織は 4%PFA 溶液中で 1 日精置した後、20%ショ糖溶液に移した。1 日静置した後、各組織をクリオスタット (HM505E:ドイツミクローム社) によって 30 μm の切片を作成し抗体反応に用いた。

試薬の組成

・ 4%PFA

4% paraformaldehyde

80mM Na₂HPO₄

80mM NaH₂PO₄

・ 20%ショ糖溶液

0.6M sucrose

80mM Na₂HPO₄

80mM NaH₂PO₄

(5) RNA 抽出

第1章に準じて行った。

(6) RT-PCR 法

第1章に準じて行った。

(7) 免疫組織染色法

1次抗体反応には Rabbit Anti-mouse PER2 IgG antibody (Alpha diagnostic) を、脳の染色では4000倍、肝臓の染色では2000倍の希釈率で、1% normal goat serum、0.3% TritonX-100を含む0.1M PBS (pH7.4)溶液に希釈して使用した。1次抗体反応は4℃下で48時間反応させた。1次抗体反応後、スライスを0.1M PBSで10分間洗浄し、それを3度繰り返した。その後2次抗体反応として、Biotinylated anti-rabbit goat antibody (Vectastain) を200倍の希釈率で1% normal goat serum、0.3% TritonX-100を含む0.1M PBS (pH7.4)溶液に希釈して室温で1時間反応させた。2次抗体反応後、スライスを再び0.1M PBSで10分間洗浄し、それを3度繰り返した。その後、avidin-biotin complex solution (ABC Kit; Vectastain)にて室温下で1時間反応させた。その後、DAB溶液にて10分間染色し、スライスを再び0.01M PBSで10分間洗浄し、それを3度繰り返した後、スライスをスライドガラス上に貼り付けた。スライスを貼り付けたスライドガラスは24時間の自然乾燥後、80%エタノール、90%エタノール、95%エタノールそして100%エタノールに各5分間浸し脱水処理後、キシレンに5分間浸したあと松脂で埋包し固定した。

試薬の組成

・0.1M PBS (pH7.4)

NaCl 9g

Na₂HPO₄ · 12H₂O 58g

NaH₂PO₄ · 2H₂O 5.92g

以上をNaOHでpH調整後、蒸留水で1000mlにメスアップした。

・DAB溶液

100mlの100mM Tris-HCl pH7.6に5mgDABを溶かし、0.1mlの0.3% hydrogen peroxideを加えた。

(8) SCNおよび肝臓スライスのmPER2-ir (陽性) 細胞カウント法

スライスのmPER2-ir (陽性) 細胞カウントには、Scion Image Beta 4.02を用いた。観察の際には、threshold value = 120、nuclear size = 最小10、最大40 pixelsにて行った。SCNにおいては1匹あたり5枚のスライスについてカウントを行い、その

平均値をそのマウスの mPER2-ir (陽性) 細胞数とした。

肝臓スライスの mPER2-ir (陽性) 細胞カウントの際には、中心静脈付近を撮影し、65 x 85 mm の写真としてプリントアウト後、40 x 50 mm の枠内の mPER2-ir (陽性) 細胞をカウントし、SCN 同様 1 匹あたり 5 枚のスライスについてカウントを行い、その平均値をそのマウスの mPER2-ir (陽性) 細胞数とした。

(9) 血糖値測定

エーテル麻酔下でマウス尾を剃刀により一部傷つけ、傷口より 50 μ l の血液を採取し、Novo Assist Plus (Novo Nordic Pharma) を用いて血糖値を測定した。

(10) 実験スケジュール

A. STZ 投与によるマウス肝臓・SCN における mPer2 と mPER2-ir 細胞発現への影響 (図 14. スケジュール 6 参照)

Day1 の ZT5 に 15 週令の ddY マウスに STZ(200 mg/kg) もしくは Vehicle (溶媒: 0.1M クエン酸バッファー) を腹腔内投与し (Day1)、自由飲水、自由摂食条件下で飼育し Day6 の ZT0、ZT6、12、18、にサンプリングした。

B. STZ 処置マウスの肝臓・SCN における mPer2 および mPER2 発現に対するインスリン連日投与の影響 (図 15 と 16. スケジュール 7 と 8 参照)

マウスに STZ(200 mg/kg) もしくは溶媒を腹腔内投与し (Day1)、自由飲水、自由摂食条件下で飼育した。

実験に用いるマウスは溶媒投与マウスに Day6-Day11 の ZT11.5 もしくは ZT23.5 に生理食塩水を皮下投与した Vehicle-saline 群、STZ 処置マウスに ZT11.5 もしくは ZT23.5 に生理食塩水を皮下投与した STZ-saline 群、各 ZT にインスリン 5UI/kg を皮下投与した STZ-insulin ZT11.5 群、STZ-insulin ZT23.5 群に分けた。各マウスは Day12 の ZT0、6、12、18 にサンプリングした。

C. STZ 処置マウスの肝臓における mPer2 および mPER2 発現に対するインスリン急性投与の影響 (図 17. スケジュール 9 参照)

15 週令の ddY マウスに STZ(200 mg/kg) を腹腔内投与し (Day1)、自由飲水、摂食下で飼育し Day6 の ZT11.5 にインスリン 5UI/kg (STZ-insulin 群) もしくは生理食塩水 (STZ-saline 群) を皮下投与した。それぞれ 2、4 時間後である ZT13.5、15.5 にサンプリングした。

(11) 統計解析

値は全て平均 \pm 標準誤差で表し、データの有意差検定は one-way ANOVA、two-way

ANOVAを用いた。有意差が見られた場合はStudent's *t*testにて更なる検討を行った。



図14. スケジュール6

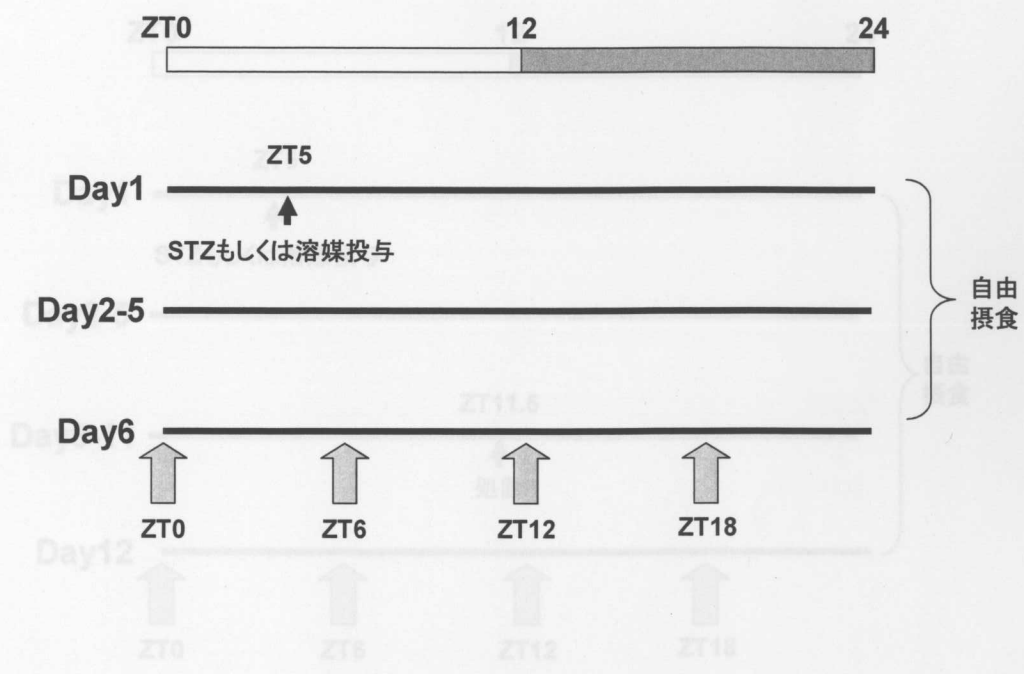


図14. スケジュール6

-5.0U/kg インスリン(皮下)
 -生理食塩水(皮下)

図15. スケジュール7

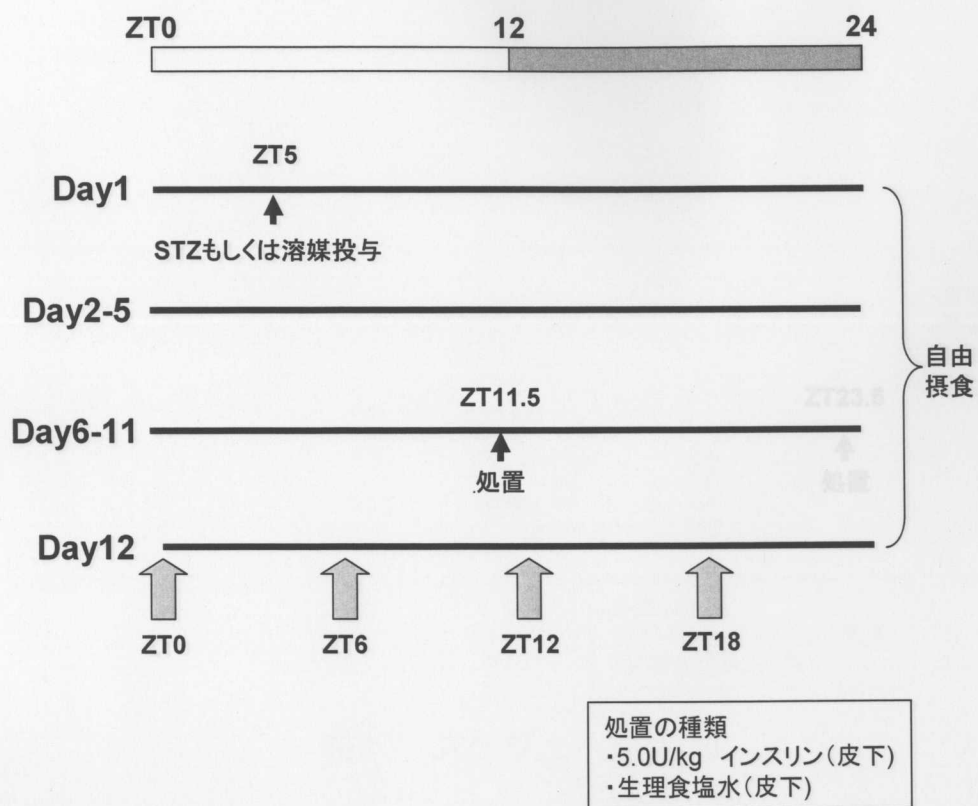


図15. スケジュール7

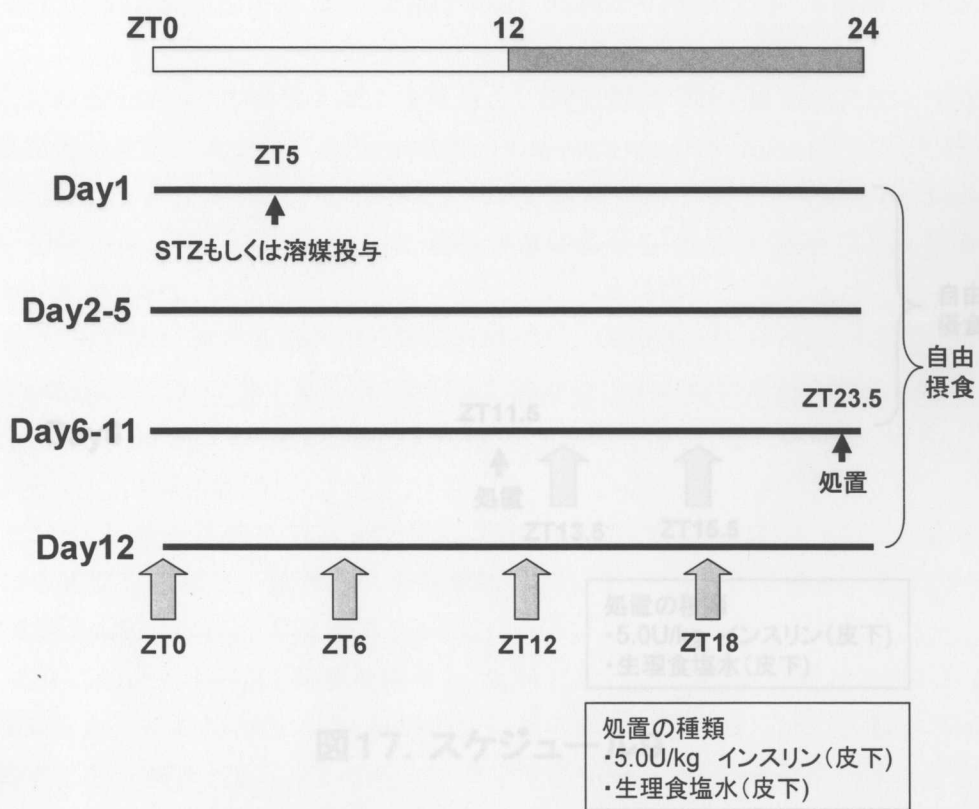


図16. スケジュール8

2-3. 結果

2-3-1. STZ 投与のマウス SCN および肝臓における *mPer2* と *mPER2-ir* 発現への影響

STZ 投与による糖尿病誘発の成否は、STZ 投与5日後における血糖値と体重を測定する事により確認した。投与5日後における体重は、Vehicle 群 (34 ± 0.69 , $n=12$)と比較して STZ 群(28 ± 0.10 , $n=12$)で著しく減少していた。血糖値は Vehicle 群 (151 ± 5 mg/100 ml)と比較して STZ 群(570 ± 13 mg/100 ml $P<0.01$, Student's *t*-test)で3-8倍高い数値を示した。

肝臓における *mPer2* の発現リズムを見ると、STZ 群は Vehicle 群と比較して ZT18 における発現が有意に減少しており ($p<0.05$, Student's *t*-test), Vehicle 群では ZT18 を、STZ 群では Day1 における発現が有意に減少している (Two-way ANOVA 分析から $F(3,20)=17.4$, $P<0.01$)。STZ 群は顯著に異なる *mPer2* 発現リズムを示した (Fig. 1-8A)。

次に SCN と肝臓における *mPER2* 発現を調べた。Vehicle 群の肝臓における *mPER2* 免疫陽性細胞は ZT18 に多く見られ、*mPER2* 陽性核は中心静脈周囲に多く観察された (Fig. 1-8C)。STZ 群は ZT11.5 における *mPER2* 陽性細胞数が著しく減少しており、統計的にも有意に減少している ($P<0.05$, ZT18: $P<0.01$ Student's *t*-test, 図 1-8D and E)。

次に SCN における *mPER2* 発現を調べた。SCN における *mPER2* 陽性細胞は ZT12 と ZT18 に多く観察され、その殆どは *mPER2* 陽性核からなる (Fig. 1-9)。STZ 群と Vehicle 群を比較すると、両群ともに ZT12 をピークとする明瞭な *mPER2* 発現リズムを示し、両群のリズムに有意な違いは見られなかった (図 1-9)。

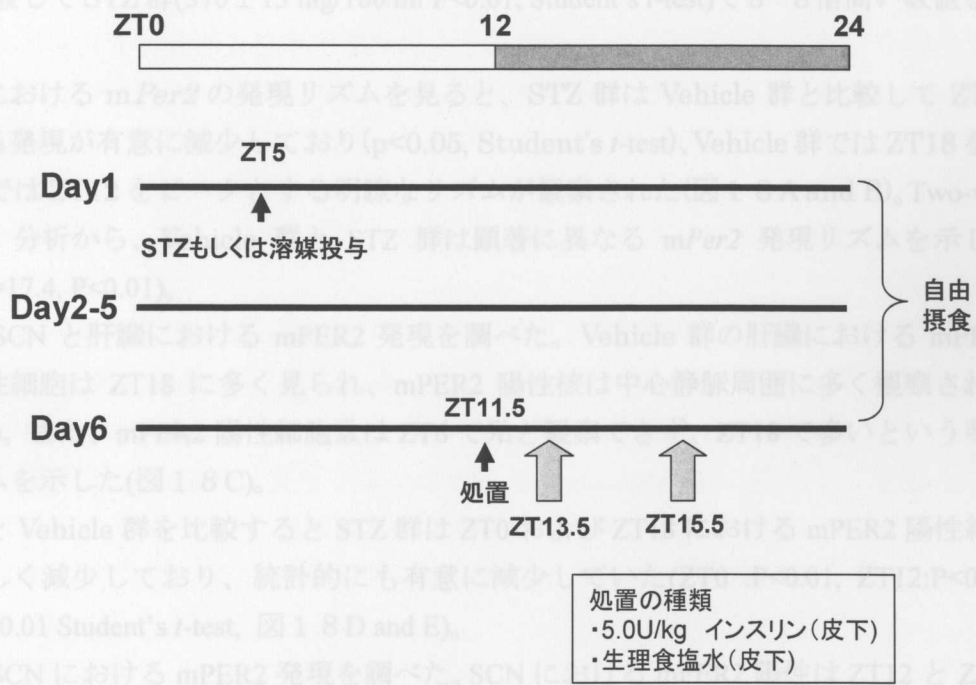


図17. スケジュール9

2-3-2. STZ 処置マウスの SCN および肝臓における *mPer2* および *mPER2* 発現に対するインスリン連日投与の影響

STZ 処置マウスに対する6日間連続のインスリン投与の、SCN および肝臓における *mPer2* と *mPER2* 発現への影響を調べた。この時インスリン投与時刻を明期終了直前の ZT11.5 と暗期終了直前の ZT23.5 に投与する2群に分け、投与時刻による有効性の差を調べた。

インスリンの効果は、投与後の血糖値により判断した。血糖値はそれぞれの投与時刻から30分後では大きく減少していたが (225 ± 61 mg/100 ml for ZT11.5 injection; 353 ± 10

2-3. 結果

2-3-1. STZ 投与のマウス SCN および肝臓における *mPer2* と *mPER2-ir* 細胞発現への影響

STZ 投与による糖尿病誘発の成否は、STZ 投与 5 日後における血糖値と体重を測定する事により確認した。投与 5 日後における体重は、Vehicle 群 (34 ± 0.69 , $n=12$) と比較して STZ 群 (28 ± 0.10 , $n=12$) で著しく減少していた。血糖値は Vehicle 群 (151 ± 5 mg/100 ml) と比較して STZ 群 (570 ± 13 mg/100 ml $P<0.01$, Student's *t*-test) で 3 - 8 倍高い数値を示した。

肝臓における *mPer2* の発現リズムを見ると、STZ 群は Vehicle 群と比較して ZT18 における発現が有意に減少しており ($p<0.05$, Student's *t*-test)、Vehicle 群では ZT18 を、STZ 群では ZT12 をピークとする明瞭なリズムが観察された (図 1 8 A and B)。Two-way ANOVA 分析から、Vehicle 群と STZ 群は顕著に異なる *mPer2* 発現リズムを示した ($F(3,20)=17.4$, $P<0.01$)。

次に SCN と肝臓における *mPER2* 発現を調べた。Vehicle 群の肝臓における *mPER2* 免疫陽性細胞は ZT18 に多く見られ、*mPER2* 陽性核は中心静脈周囲に多く観察された (Fig.1-C)。また、*mPER2* 陽性細胞数は ZT6 で殆ど観察できず、ZT18 で多いという明瞭なリズムを示した (図 1 8 C)。STZ 群と Vehicle 群を比較すると STZ 群は ZT0 および ZT18 における *mPER2* 陽性細胞数が著しく減少しており、統計的にも有意に減少していた (ZT0 : $P<0.01$, ZT12: $P<0.05$, ZT18: $P<0.01$ Student's *t*-test, 図 1 8 D and E)。

次に SCN における *mPER2* 発現を調べた。SCN における *mPER2* 陽性は ZT12 と ZT18 に多く観察され、その殆どは SCN 細胞の核に見られた (図 1 9)。STZ 群と Vehicle 群を比較すると、両群ともに ZT12 をピークとする明瞭な *mPER2* 発現リズムを示し、両群のリズムに有意な違いは見られなかった (図 1 9)。

2-3-2. STZ 処置マウスの SCN および肝臓における *mPer2* および *mPER2* 発現に対するインスリン連日投与の影響

STZ 処置マウスに対する 6 日間連続のインスリン投与の、SCN および肝臓における *mPer2* と *mPER2* 発現への影響を調べた。この時インスリン投与時刻を明期終了直前の ZT11.5 と暗期終了直前の ZT23.5 に投与する 2 群に分け、投与時刻による有効性の差を調べた。

インスリンの効果は、投与後の血糖値により判断した。血糖値はそれぞれの投与時刻から 30 分後では大きく減少していたが (225 ± 61 mg/100 ml for ZT11.5 injection; 253 ± 10

mg/100 ml for ZT23.5 injection)、6 時間後には戻っていた(464 ± 17 mg/100 ml for ZT11.5 injection; 484 ± 42 mg/100 ml for ZT23.5 injection)。

まず、STZ-saline 群は *mPer2* の発現振幅が減少しており (図 20A-D)、*mPER2* の発現リズムも減弱しており、図 18 のパターンが再び確認できた (図 20E)。

Two-way ANOVA 分析により STZ-saline 群と STZ-insulin 群の *mPer2* の発現を比較すると、STZ-insulin ZT11.5 群と STZ-saline 群間では(F(3,23)=34.0, P<0.01)となり、発現パターンは有意に異なった (図 20A and B)。また、Intact 群と STZ-insulin ZT11.5 群間で同様に比較した時、(F(3,23)=7.1, P>0.05)となり、顕著な違いは見られなかった。よって ZT11.5 にインスリンを連日投与する事により、STZ により変調した *mPer2* 発現リズムが回復したと考えられる。同様に two-way ANOVA 分析により STZ-saline 群と STZ-insulin ZT23.5 群の *mPer2* の発現を比較すると、2 群間は(F(3,23)=1.5, P>0.05)となり、発現パターンに有意な違いは見られなかった (図 20C and D)。よって ZT23.5 にインスリンを連日投与しても、STZ により変調した *mPer2* 発現リズムは回復しなかったと考えられる。

mRNA レベルで変化のあった ZT11.5 のインスリン投与群については、さらに肝臓における *mPER2* 発現も調べた。STZ-saline 群と比べて STZ-insulin ZT11.5 群では ZT18 における発現細胞数が増加していた(P<0.01, Student's *t*-test, 図 20E and F)。

SCN における *mPER2* の発現を STZ-saline 群、STZ-insulin ZT11.5 群そして STZ-insulin ZT23.5 群について調べると、全ての群で ZT12 をピークとする明瞭なリズムを示し、顕著な差は見られず、インスリン投与は SCN における *mPER2* の発現には影響を与えない事が判明した (図 21)。

2-3-3. 肝臓における *mPer2* および *mPER2* 発現に対するインスリン急性投与の影響

今までの結果から、インスリンは STZ により減弱した肝臓における *mPer2* 発現および *mPER2* 発現を投与時刻依存性に回復する事が分かった。そこで連日投与ではなく、インスリン単回投与でも同様の効果が得られるのかを確認した。

血糖値を見ると、インスリン急性投与 2 時間後(258 ± 74 mg/100 ml STZ-insulin 群; 604 ± 29, ml STZ-saline 群, P<0.01, Student's *t*-test)、4 時間後(417 ± 28 mg/100 ml インスリン投与群; 559 ± 7, ml 水投与群, P<0.01, Student's *t*-test)に血糖値は有意に減少したが、6 時間後には変化は見られず、高い数値に戻っていた(501 ± 6 mg/100 ml for insulin injection; 581 ± 40mg/100ml for saline injection)。

mPer2 の発現を見ると、STZ-insulin 群は 2 時間後に有意に発現が上昇していた(P<0.05, Student's *t*-test, 図 22A and B)。 *mPER2* の発現については、STZ-insulin 群は 2 時間後、4 時間後に有意に発現細胞数が増加していた(P<0.01, Student's *t*-test, 図 22C and D)。以

上のことからインスリンの単回投与は、STZ 処置により減弱した *mPer2* 発現および *mPER2* 発現を回復させる事が判明した。

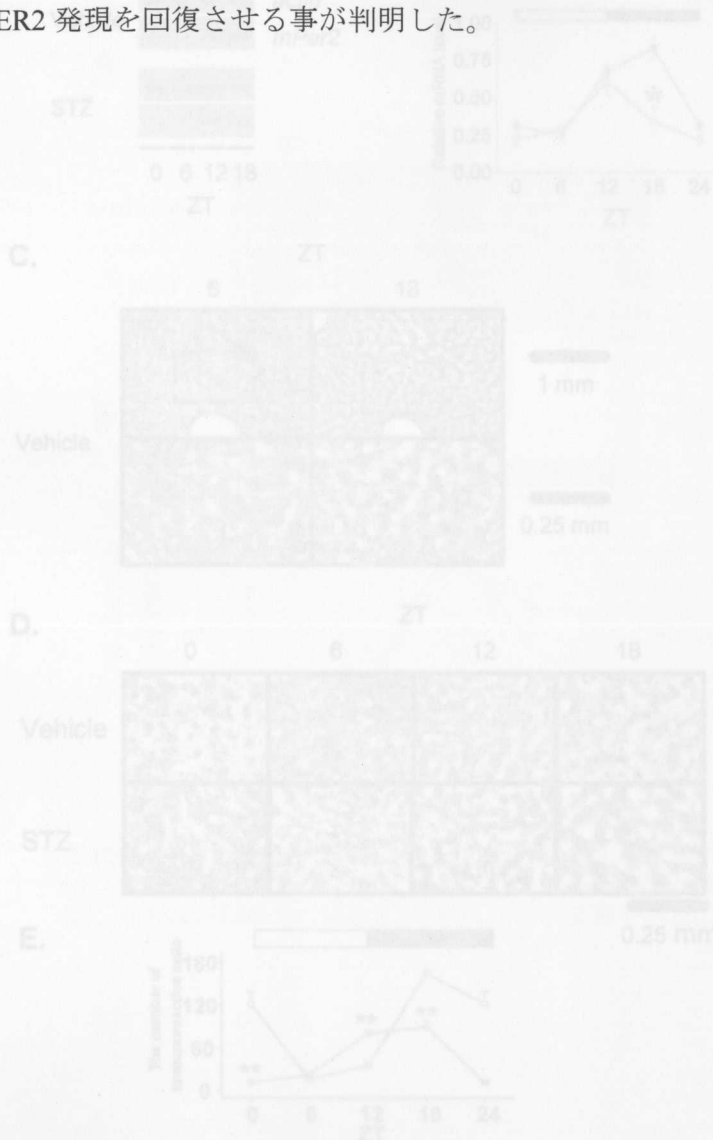


図18. STZ 処置のマウス肝臓における *mPer2* と *mPER2-ir* 細胞発現への影響
 18 週令の ddY マウスに STZ(200 mg/kg)もしくは Vehicle (溶媒:0.1M クエン酸バッファー)を腹腔内投与し(Day0)、自由飲水、自由採食条件下で飼育し Day6 の ZT0, ZT6, 12, 18, にサンプリングした。
 (A). RNA 抽出後、RT-PCR にて *mPer2*, β -actin の発現量を調べた。
 (B). *mPer2* の Relative mRNA levels は β -actin との比の日内変動グラフとして示した(Vehicle=○, STZ=●), * $P < 0.05$ vs. vehicle (Student's *t* test)
 (C). Vehicle 群の代表的な肝臓スライスにおける *mPER2-ir* 細胞。上枠のスケールは 40 × 60mm, 下枠は 4 倍拡大したものである。
 (D). Vehicle 群と STZ 群の肝臓スライスにおける *mPER2-ir* 発現タイムコース。
 (E). (D)の *mPER2-ir* 細胞数をカウントして日内変動グラフとしてまとめた。

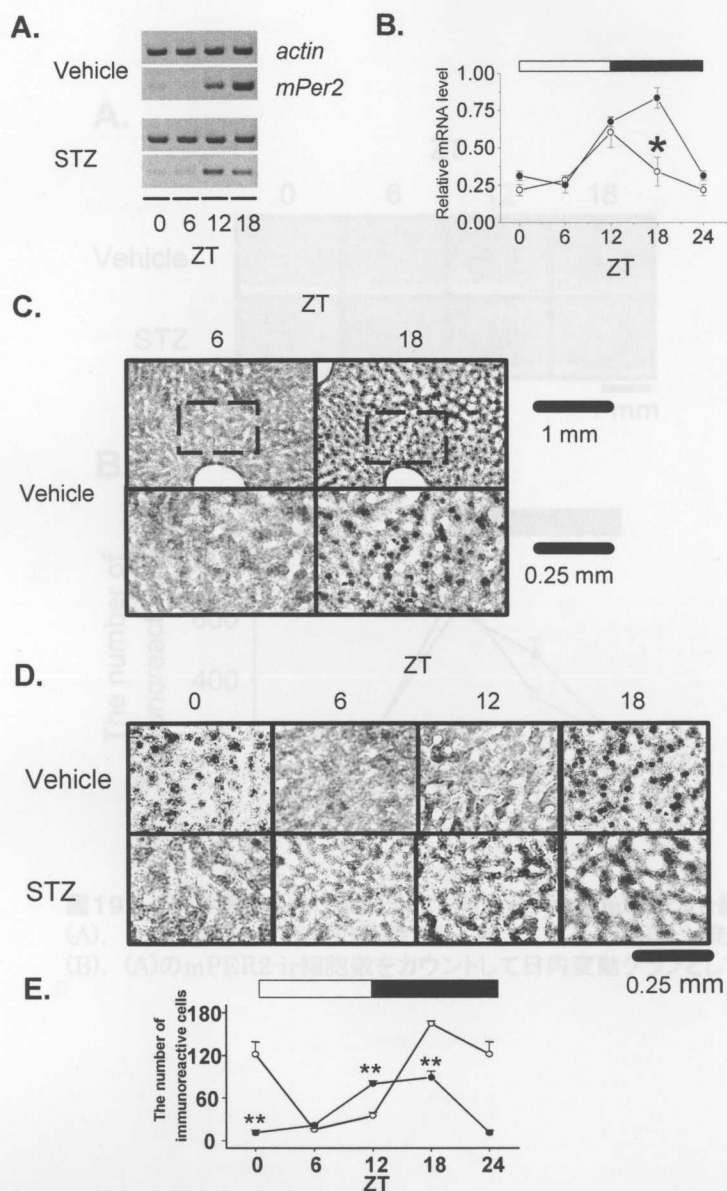


図18. STZ投与のマウス肝臓における *mPer2* と mPER2-ir 細胞発現への影響
 15週令の ddY マウスに STZ(200 mg/kg)もしくは Vehicle (溶媒:0.1M クエン酸バッファー)を腹腔内投与し(Day0)、自由飲水、自由摂食条件下で飼育し Day6 の ZT0、ZT6、12、18、にサンプリングした。
 (A). RNA 抽出後、RT-PCR にて *mPer2*、*β-actin* の発現量を調べた。
 (B). *mPer2* の Relative mRNA levels は *β-actin* との比の日内変動グラフとして示した(Vehicle=○、STZ=●)。* $P < 0.05$ vs. vehicle (Student's *t*-test)
 (C). Vehicle 群の代表的な肝臓スライスにおける mPER2-ir 細胞。上枠のスケールは 40×50mm。下枠は 4 倍拡大したものである。
 (D). Vehicle 群と STZ 群の肝臓スライスにおける mPER2-ir 発現タイムコース。
 (E). (D)の mPER2-ir 細胞数をカウントして日内変動グラフとしてまとめた。

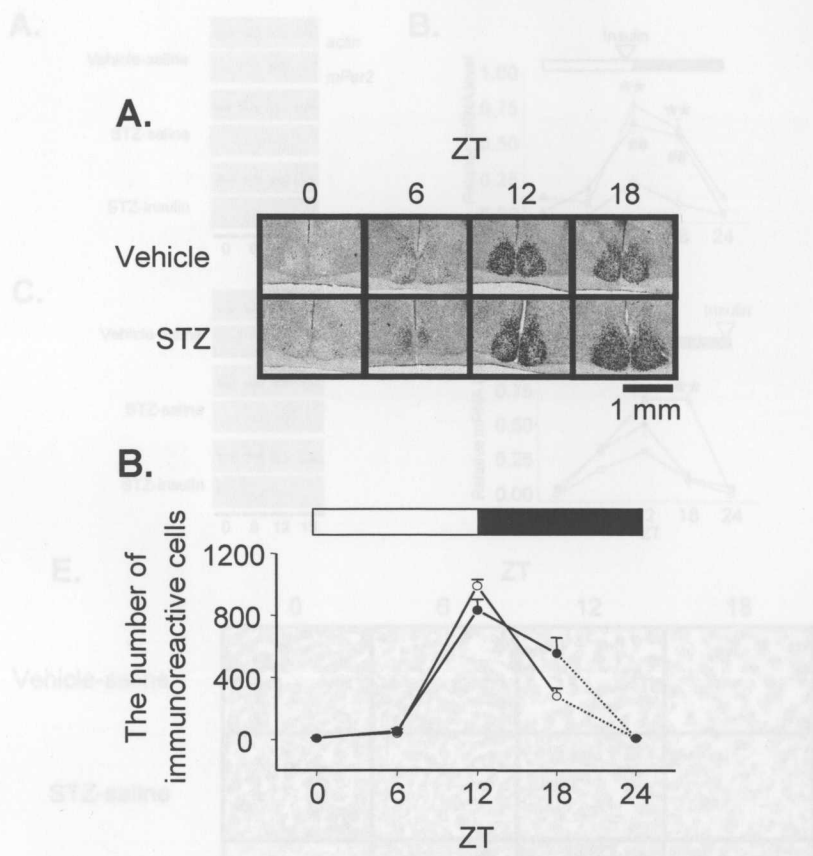


図19. STZ投与のマウスSCNにおけるmPer2とmPER2-ir細胞発現への影響
 (A). Vehicle群とSTZ群の肝臓スライスにおけるmPER2-ir発現タイムコース。
 (B). (A)のmPER2-ir細胞数をカウントして日内変動グラフとしてまとめた。

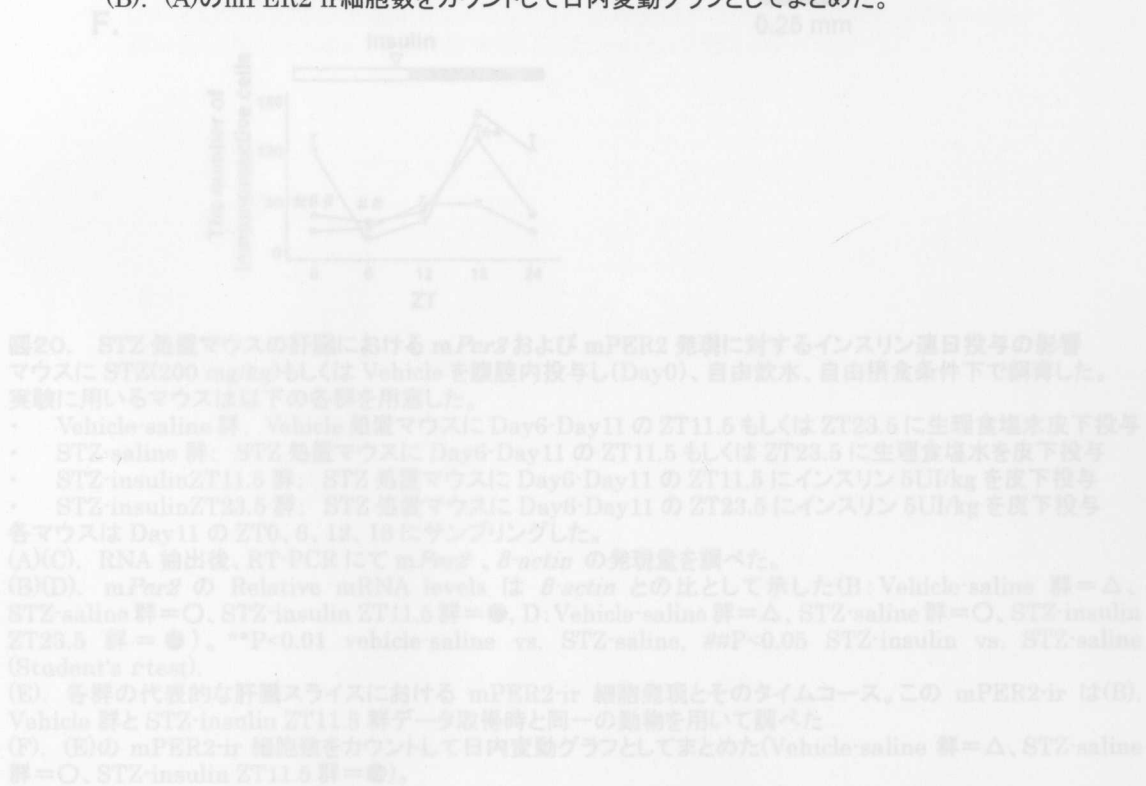


図20. STZ糖尿病マウスの肝臓における mPer2 および mPER2 発現に対するインスリン連日投与の影響
 マウスに STZ(200 mg/kg)もしくは Vehicle を腹腔内投与し (Day0)、自由飲水、自由摂食条件下で飼育した。
 実験に用いるマウスは以下の各群を用意した。
 ・ Vehicle-saline 群. Vehicle 糖尿病マウスに Day6-Day11 の ZT11.5 もしくは ZT23.5 に生理食塩水を皮下投与
 ・ STZ-saline 群. STZ 糖尿病マウスに Day6-Day11 の ZT11.5 もしくは ZT23.5 に生理食塩水を皮下投与
 ・ STZ-insulin ZT11.5 群. STZ 糖尿病マウスに Day6-Day11 の ZT11.5 にインスリン 5U/kg を皮下投与
 ・ STZ-insulin ZT23.5 群. STZ 糖尿病マウスに Day6-Day11 の ZT23.5 にインスリン 5U/kg を皮下投与
 各マウスは Day11 の ZT0, 6, 12, 18 にサンプリングした。
 (A)C). RNA 抽出後、RT-PCR にて mPer2、β-actin の発現量を調べた。
 (B)D). mPer2 の Relative mRNA levels は β-actin との比として示した (B: Vehicle-saline 群=△, STZ-saline 群=○, STZ-insulin ZT11.5 群=●, D: Vehicle-saline 群=△, STZ-saline 群=○, STZ-insulin ZT23.5 群=●). **P<0.01 vehicle-saline vs. STZ-saline, #P<0.05 STZ-insulin vs. STZ-saline (Student's t-test).
 (E). 各群の代表的な肝臓スライスにおける mPER2-ir 細胞発現とそのタイムコース。この mPER2-ir は(B), Vehicle 群と STZ-insulin ZT11.5 群データ取得時と同一の動物を用いて調べた。
 (F). (E)の mPER2-ir 細胞数をカウントして日内変動グラフとしてまとめた (Vehicle-saline 群=△, STZ-saline 群=○, STZ-insulin ZT11.5 群=●)。

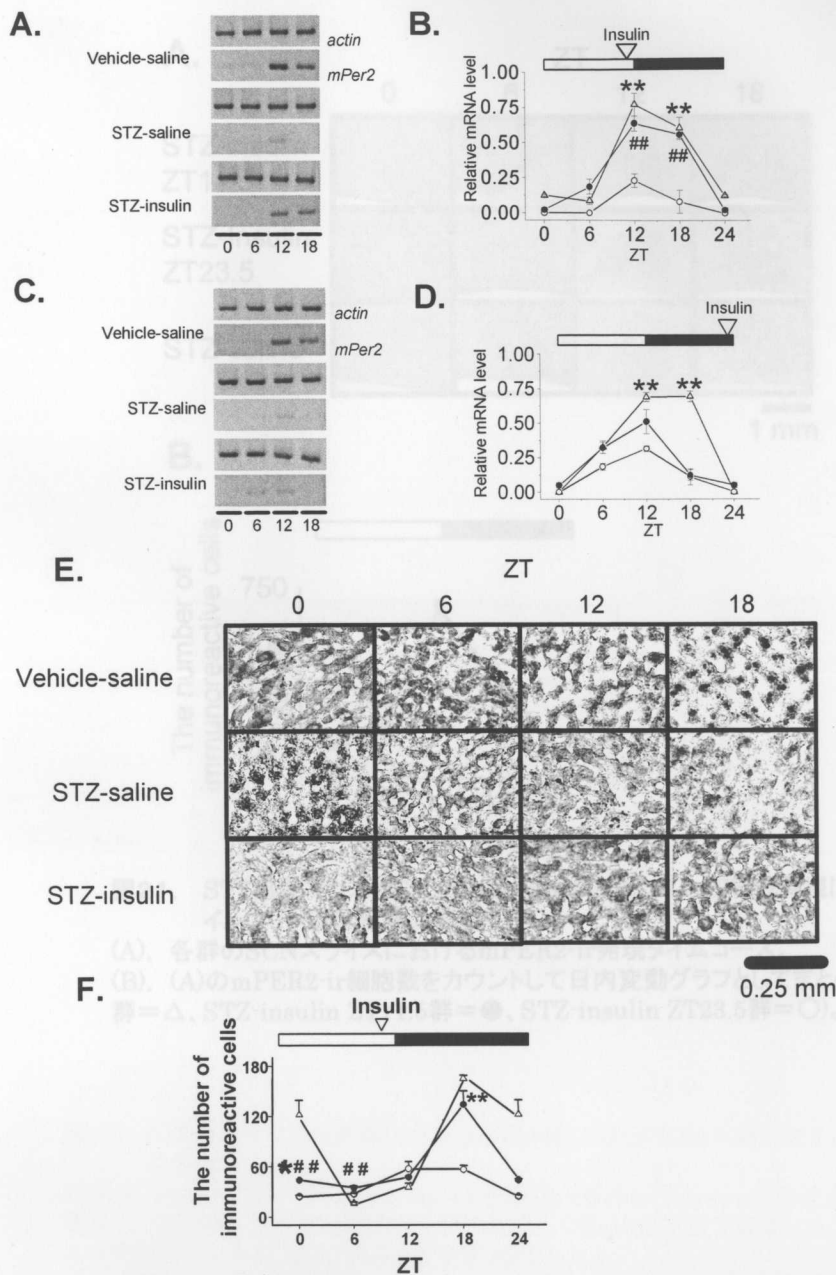


図20. STZ 処置マウスの肝臓における *mPer2* および *mPER2* 発現に対するインスリン連日投与の影響。マウスに STZ (200 mg/kg) もしくは Vehicle を腹腔内投与し (Day 0)、自由飲水、自由摂食条件下で飼育した。実験に用いるマウスは以下の各群を用意した。

- Vehicle-saline 群: Vehicle 処置マウスに Day 6-Day 11 の ZT 11.5 もしくは ZT 23.5 に生理食塩水皮下投与
 - STZ-saline 群: STZ 処置マウスに Day 6-Day 11 の ZT 11.5 もしくは ZT 23.5 に生理食塩水を皮下投与
 - STZ-insulin ZT 11.5 群: STZ 処置マウスに Day 6-Day 11 の ZT 11.5 にインスリン 5UI/kg を皮下投与
 - STZ-insulin ZT 23.5 群: STZ 処置マウスに Day 6-Day 11 の ZT 23.5 にインスリン 5UI/kg を皮下投与
- 各マウスは Day 11 の ZT 0, 6, 12, 18 にサンプリングした。

(A)(C). RNA 抽出後、RT-PCR にて *mPer2*、*β-actin* の発現量を調べた。

(B)(D). *mPer2* の Relative mRNA levels は *β-actin* との比として示した (B: Vehicle-saline 群 = △、STZ-saline 群 = ○、STZ-insulin ZT 11.5 群 = ●、D: Vehicle-saline 群 = △、STZ-saline 群 = ○、STZ-insulin ZT 23.5 群 = ●)。**P < 0.01 vehicle-saline vs. STZ-saline, ##P < 0.05 STZ-insulin vs. STZ-saline (Student's *t*-test)。

(E). 各群の代表的な肝臓スライスにおける *mPER2-ir* 細胞発現とそのタイムコース。この *mPER2-ir* は (B) Vehicle 群と STZ-insulin ZT 11.5 群データ取得時と同一の動物を用いて調べた。

(F). (E) の *mPER2-ir* 細胞数をカウントして日内変動グラフとしてまとめた (Vehicle-saline 群 = △、STZ-saline 群 = ○、STZ-insulin ZT 11.5 群 = ●)。

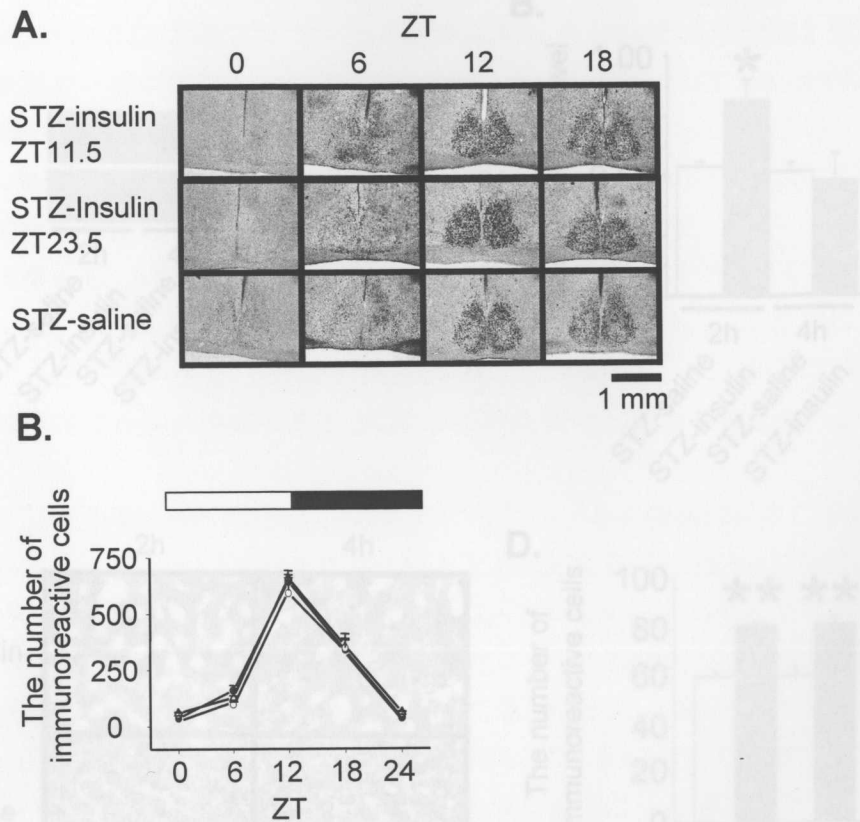


図21. STZ処置マウスのSCNにおけるmPer2およびmPER2発現に対するインスリン連日投与の影響

(A). 各群のSCNスライスにおけるmPER2-ir発現タイムコース。

(B). (A)のmPER2-ir細胞数をカウントして日内変動グラフとしてまとめた(STZ-saline群=△、STZ-insulin ZT11.5群=●、STZ-insulin ZT23.5群=○)。

図22. STZ処置マウスの肝臓におけるmPer2およびmPER2発現に対するインスリン急性投与の影響

18週齢の雄性マウスにSTZ(300 mg/kg)を腹腔内投与し(Day1)、自由飲水、自由摂食条件下で飼育し、Day6のZT11.30にインスリン5U/kgもしくはsalineを皮下投与した。それぞれの群は2、4時間待たせ、ZT18.5、18.30にサンプリングした。

(A). RNA電泳法、RT-PCRにてmPer2、β-actinの発現量を調べた。

(B). mPer2のrelative mRNA levelsはβ-actinとの比として示した。

(C). 各群の代表的な肝臓スライスにおけるmPER2-ir細胞。

(D). (C)のmPER2-ir細胞数をカウントしてグラフとして示した。

**P<0.05 STZ-saline vs. STZ-insulin (Student's t-test)

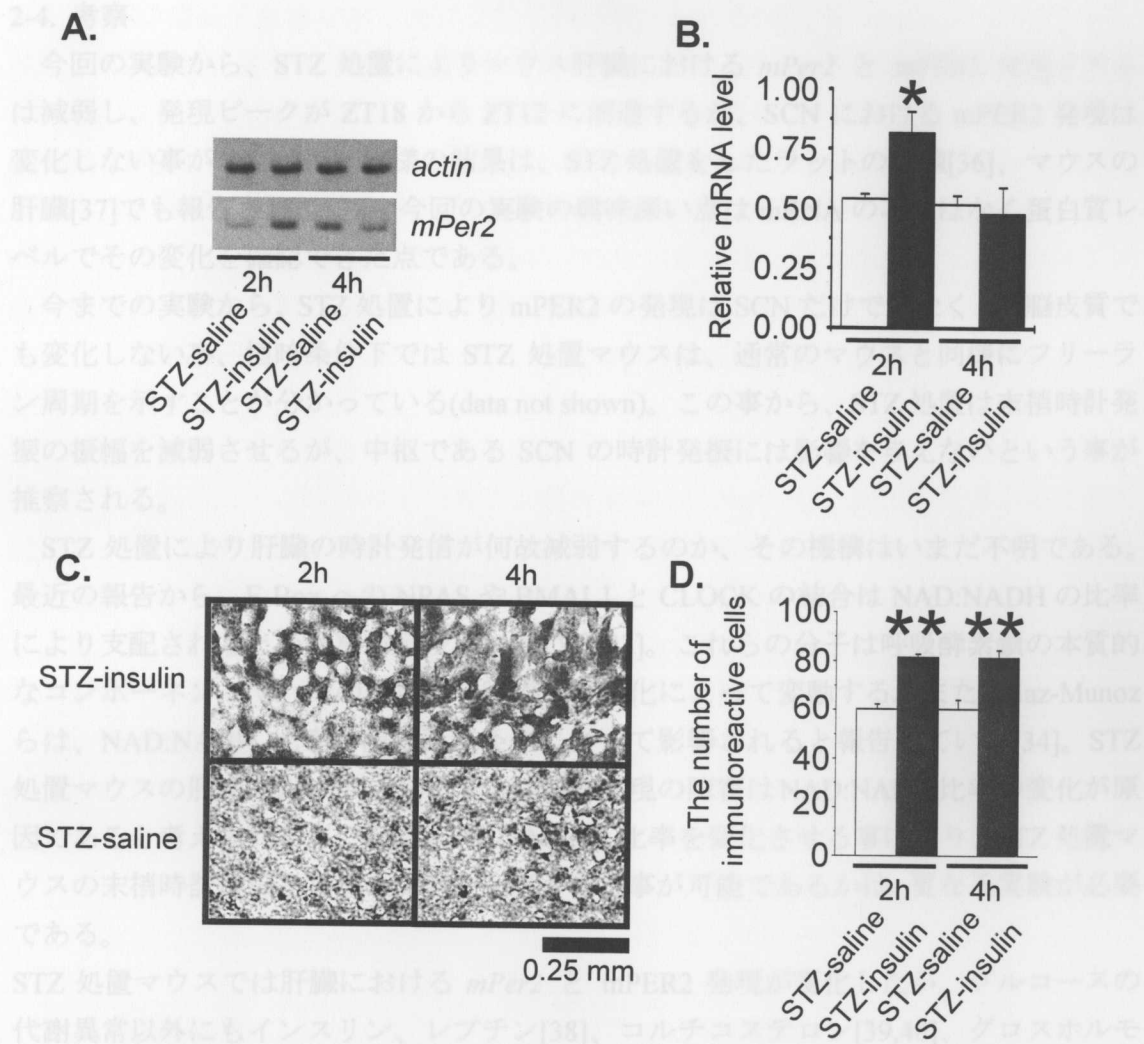


図22. STZ処置マウスの肝臓における*mPer2*およびmPER2発現に対するインスリン急性投与の影響

15週令のddYマウスにSTZ(200 mg/kg)を腹腔内投与し(Day1)、自由飲水、自由摂食条件下で飼育し、Day6のZT11.5にインスリン5UI/kgもしくはsalineを皮下投与した。それぞれの群は2、4時間後であるZT13.5、15.5にサンプリングした。

- (A). RNA抽出後、RT-PCRにて*mPer2*、 β -*actin*の発現量を調べた。
- (B). *mPer2*のRelative mRNA levelsは β -*actin*との比として示した。
- (C). 各群の代表的な肝臓スライスにおけるmPER2-ir細胞。
- (D). (C)のmPER2-ir細胞数をカウントしてグラフとして示した。

**P<0.05 STZ-saline vs. STZ-insulin (Student's *t* test)

は影響を与えない事も判明した。本家で得られた実験結果の概要を図23に示す。この結果は、インスリン連日投与が糖尿病の症状を減じただけでなく、末梢リズム調節機構を回復したことを強く示唆している。また本研究は、毎日定時の食事時間に合わせたインスリン投与によりヒトの糖尿病患者におけるリズム障害を軽減するなど、ヒト臨床に応用できる可能性を強く示唆するものであった。

インスリンと概日時計に関する報告としては、インスリンがRin-1繊維芽細胞の*Per1*

2-4. 考察

今回の実験から、STZ 処置によりマウス肝臓における *mPer2* と *mPER2* 発現リズムは減弱し、発現ピークが ZT18 から ZT12 に前進するが、SCN における *mPER2* 発現は変化しない事が分かった。同様の結果は、STZ 処置をしたラットの心臓[36]、マウスの肝臓[37]でも報告されている。今回の実験の興味深い点は mRNA のみではなく蛋白質レベルでその変化を確認できた点である。

今までの実験から、STZ 処置により *mPER2* の発現は SCN だけではなく、大脳皮質でも変化しない事、恒暗条件下では STZ 処置マウスは、通常のマウスと同様にフリーラン周期を示すことが分かっている(data not shown)。この事から、STZ 処置は末梢時計発振の振幅を減弱させるが、中枢である SCN の時計発振には影響を与えないという事が推察される。

STZ 処置により肝臓の時計発振が何故減弱するのか、その機構はいまだ不明である。最近の報告から、E-Box への NPAS や BMAL1 と CLOCK の結合は NAD:NADH の比率により支配されるという事が示唆されている[33]。これらの分子は呼吸酵素鎖の本質的なコンポーネントで、その比率は細胞の代謝変化によって変動する。また Diaz-Munoz らは、NAD:NADH 比率が制限給餌条件によって影響されると報告している[34]。STZ 処置マウスの肝臓における *mPer2* と *mPER2* 発現の障害は NAD:NADH 比率の変化が原因であると考えられるが、実際に NAD:NADH 比率を変化させる事により、STZ 処置マウスの末梢時計遺伝子発現の障害を回復させる事が可能であるかは、更なる実験が必要である。

STZ 処置マウスでは肝臓における *mPer2* と *mPER2* 発現が変化したが、グルコースの代謝異常以外にもインスリン、レプチン[38]、コルチコステロン[39,40]、グロソホルモン[41]のような I 型、II 型双方の糖尿病によって変化する因子が、末梢時計発振を同調させる可能性も考えられる。しかし、末梢時計遺伝子機構と糖尿病による機能不全の間の相互作用を解明するためには、更なる研究が必要である。

また今回の実験から、STZ 処置マウスの肝臓における *mPer2* と *mPER2* 発現の障害がインスリンの投与により回復させうる可能性、そして投与時期の重要性が示唆された。通常マウスの摂食開始時間である活動期の始まりにインスリンを投与する事により、糖尿病により悪化した肝臓における *mPer2* と *mPER2* 発現が改善された。さらに、活動期の始まり、もしくは終わりにインスリンを投与しても、SCN における *mPER2* 発現には影響を与えない事も判明した。本章で得られた実験結果の概要を図 2 3 に示す。この結果は、インスリン連日投与が糖尿病の症状を減じただけでなく、末梢概日リズム時計機能を回復したことを強く示唆している。また本研究は、毎日定時の食事時間に合わせたインスリン投与によりヒトの糖尿病患者におけるリズム障害を軽減するなど、ヒト臨床に応用できる可能性を強く示唆するものであった。

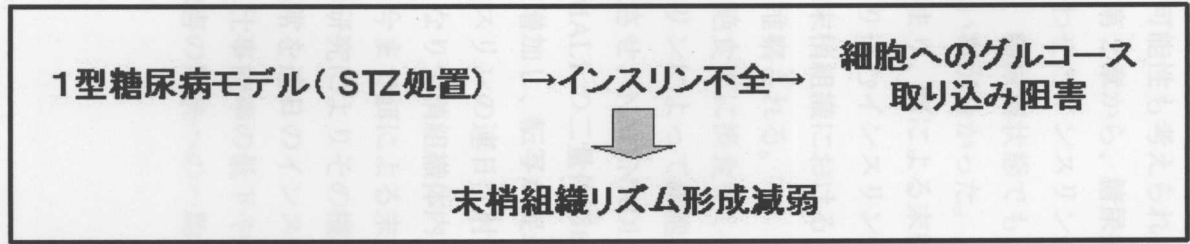
インスリンと概日時計に関する報告としては、インスリンが Rat-1 繊維芽細胞の *Per1*

および *Per2* 遺伝子発現を強く誘導したものが挙げられる[42]。よって、インシュリン投与により、直接正常なマウスレベルまで *mPer2* および *mPER2* の発現が増加する可能性もある。また、今回の結果から、インシュリン投与 2 時間後、4 時間後に *mPer2* および *mPER2* の発現が上昇するが、この際同時に摂食量も増加した(data not shown)。つまり、インシュリン投与による摂食上昇と第 1 章でいうところのグルコースの効果とが重なり、*mPer2* および *mPER2* の発現が増加するのではないかと考えられる。また、インシュリン連日投与マウスの行動リズムは水の連日投与マウスと同様であった(data not shown)ことから、行動は肝臓における *mPer2* と *mPER2* 発現には影響を受けないであろうと思われる。

また、インシュリン単回投与によって肝臓における *mPer2* と *mPER2* 発現が十分に回復したことから、一定時刻のインシュリン連日投与は *mPer2* と *mPER2* 発現上昇を引き起こし、それが連日繰り返される事によりリズム形成を強化して、更なるリズム回復効果の促進を引き起こしたと考えられる。



図23. 第2章の実験結果概観



暗期開始直後 (ZT11.5) インスリン投与
mPer2、mPER2発現上昇

摂食による血中グルコース濃度上昇
インスリンによる細胞へのグルコース取り込み促進

連日投与によるリズム形成促進

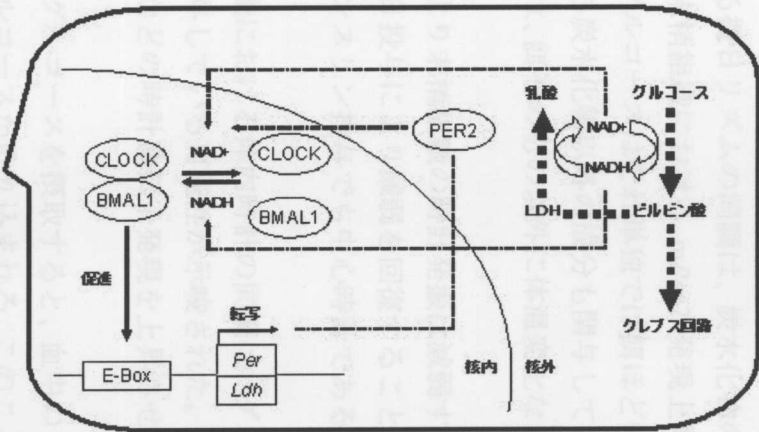
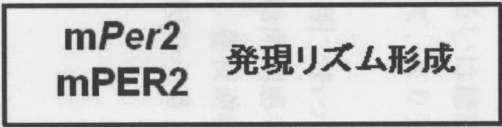


図23. 第2章の実験結果概要