

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	心筋及び肝組織培養モデルにおける概日リズム導入と薬物応答解析
Title(English)	Introduction of circadian rhythm and analysis of drug responses in cardiomyocyte and hepatic culture models
著者(和文)	Qi Zhen
Author(English)	Zhen Qi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12065号, 授与年月日:2021年9月24日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田川 陽一,山村 雅幸,廣田 順二,立花 和則,秦 猛志
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12065号, Conferred date:2021/9/24, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

Introduction of circadian rhythm and analysis of drug responses in cardiomyocyte and hepatic culture models

(心筋及び肝組織培養モデルにおける概日リズム導入と薬物応答解析)

Zhen Qi

指導教員: 田川 陽一

第一章「Introduction」 概日リズムは動物にとって重要な役割を示す。代謝を含む生理機能は、概日リズムの影響を受ける。薬物代謝は概日システムによって制御され、動物に時間依存的な薬物毒性をもたらす。動物実験は細胞実験に比べて費用がかかるが、時間依存的な薬物毒性試験は動物実験でのみ実施される。本論文では、化学的刺激因子（フォルスコリン）またはリガンド依存性人工転写因子により、遺伝子発現だけでなく薬物代謝においても概日リズムのある培養モデルの確立を得ることを目的とした。

第二章「Synchronization of circadian rhythm for mouse ES cell-derived cardiomyocytes」 マウス ES 細胞（ST1、BALB/cA マウス由来）由来心筋組織に、24 時間ごとのフォルスコリン刺激により、心筋組織の概日リズムを同期することを調べた。その結果、一回のみのフォルスコリン刺激は概日リズムの同期に不十分だったが、4 時間ごとのフォルスコリンの連続刺激は ES 細胞由来心筋組織の概日リズムを同期できた。時計遺伝子の振動は個体と同様なパターンを示した。遺伝子発現に止まらず、概日リズムが心筋の拍動率変化までに至った。この心筋の拍動率の周期は 24 時間より短く、16 時間まで制御できた。つまり、個体動物と同様な概日リズムを培養系の ES 細胞由来心筋組織に導入することに成功した。

第三章「Hepatic function upregulated hepatoma cell culture model with circadian rhythm and time-dependent drug toxicity」 Tet-On システムを有する細胞株 Hepa8f5 に対して、24 時間ごとのフォルスコリン刺激により、培養系に概日リズム

ムを有する肝細胞培養モデルの構築することを調べた。その結果、Hepa8f5 が 24 時間ごとのフォルスコリン刺激により概日リズムを示した。時計遺伝子 *Per1* と *Bmal1* は逆位相の振動的な発現を示し、フォルスコリンの連続刺激により 72 時間維持できた。さらに、薬物代謝遺伝子 *Cyp2e1*, *Cyp2a4* と *Cyp2b10* は 3 回目のフォルスコリン刺激後から 24 時間の振動的な発現を示した。この概日リズムを導入した Hepa8f5 が、薬物アセトアミノフェン、クマリン、シクロホスファミドの毒性に対して時間依存的な結果を示した。以上の結果から培養系の概日リズムを導入した高肝機能を有する培養モデルの構築に成功した。

第四章「Study of circadian rhythm development in embryoid body differentiation processes」 リガンド依存性人工転写因子 (*DD-ZF-NLS-VP64-HA/pCMVneo*) と AcGFP ベクター *pCAGAcGFP* を同時にマウス ES 細胞 E14.1 (129/Ola マウス由来) に導入し (ES^{ATF})、ES^{ATF} 細胞から肝組織まで分化する段階において、概日リズムの発生を検討した。結果として、ES 細胞と 7 日分化した細胞の段階において、人工転写因子のリガンド Shield1 を投与することでも、時計遺伝子 *Per1* の発現が有意義な振動が観察されなかった。しかし、20 日分化した肝組織において、Shield1 を投与すると周期性振動する *Per1* の発現が見られた。以上の結果から、ES 細胞の分化段階において概日リズムの発生は ES 細胞のときなしから肝組織分化まで出現することがわかった。

第五章「Liver culture model with circadian rhythm for drug screening」 ES^{ATF} 由来肝組織に 24 時間ごとの繰り返す Shield1 添加と除去することにより、概日リズムの導入することを調べた。結果として、条件検討により得た 1 μ M Shield1 (0.5 時間刺激) を 24 時間ごと二回添加除去することで *Per1* が 24 時間の振動を示した。その他の時計遺伝子 *Per2*, *Bmal1* が同様に 24 時間の振動を示し、個体と同様なパターンを示した。さらに、肝細胞特異遺伝子、薬物代謝遺伝子も 24 時間の周期を示し、薬物アセトアミ

ノフェンとシクロホスファミドの毒性に対して時間依存的反応していた。以上の結果から、概日リズムを導入した肝組織培養モデルに構築するに成功した。

第六章「Conclusion and Forecast」 新たな手法により培養系の心筋及び肝組織モデルに個体動物と同様な概日リズムを導入した。概日リズムの関連病、薬物の時間依存的な毒性を調べるモデルを確立し、病理と薬理などに関する知見を蓄積行った。