

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：32511

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890173

研究課題名（和文） 性腺ステロイドホルモンによる概日リズム変化の神経制御機構の解明

研究課題名（英文） Neural mechanisms of gonadal steroid hormone effects in circadian rhythmicity

研究代表者

中村 孝博（NAKAMURA TAKAHIRO）

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：00581985

研究成果の概要（和文）：卵巣ステロイドホルモンが生理機能リズムに与える影響を分子レベルから理解し、女性特有の概日リズム変化（睡眠障害）メカニズムの解明を最終目標として掲げ本研究課題を計画した。具体的な研究目的である「エストロゲンが直接作用する脳内・従属振動体（エストロゲン感受性従属振動体）を同定する」ことを達成するため、マウスを用い免疫組織化学法と時計遺伝子発現リズムをリアルタイムでモニターすることができるルシフェラーゼ遺伝子導入マウスを用い、候補神経核における時計遺伝子発現リズムを *in vivo*, *in vitro* の両方から検討した。その結果、視床下部内側視索前野（POA）がエストロゲン感受性従属振動体である可能性を示すデータを得ることができた。本研究課題の実行により、女性特有の睡眠障害メカニズムの解明が前進し、新しい治療法の確立につながる成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Women suffer from a range of sleep disorders with insomnia and hypersomnia being particularly common. In many cases, these sleep disorders are tightly associated with endocrine changes including menstruation, pregnancy, and menopause. It has been long speculated that variations of gonadal steroid hormone levels that occur during these times are closely related to these sleep-wake disturbances. Our goal is to determine the neural mechanisms that underlie gonadal steroids, especially, estrogen driven changes in the circadian timing system. In this study, we tried to identify estrogen sensitive oscillator(s) which estrogen directly influences and lead to change circadian behavioral rhythm in female rodents. We examined rhythms of clock gene expression (PER2) in several target regions in the brain using immunohistochemistry (*in vivo*) and luminescent recording methods to measure circadian rhythms of PER2 expression in tissue explant cultures from cycling PER2::LUCIFERASE (PER2::LUC) knockin mice (*in vitro*). We found that PER2::LUC rhythm in preoptic area (POA) of the hypothalamus was directly influenced by estrogen treatments. Ultimately, our findings will result in new therapeutic approaches for sleep disorders in women and improve the quality of life for women throughout their lifecycle.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,260,000 | 378,000 | 1,638,000 |
| 2011年度 | 1,160,000 | 348,000 | 1,508,000 |
| 総計     | 2,420,000 | 726,000 | 3,146,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：生物時計、生殖生理学、睡眠・覚醒、時計遺伝子、神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

女性（雌性）では概日リズムに影響を与える卵巣ステロイドホルモンのエストロゲンとプロゲステロンはライフサイクルのステージごと、さらには月経周期（性周期）に伴って分泌量に変化する。エストロゲンの分泌量は思春期に上昇し、更年期には成熟期の半分以下になる。いわゆる更年期障害（のぼせ、発汗、倦怠感など）はエストロゲンの激減のため引き起こされる。更年期、妊娠期、そして月経周期に伴って精神・身体症状の出現する月経前緊張症、月経前不快気分障害の症状の中に、不眠や過眠などの睡眠障害が報告されているが、この原因も卵巣ホルモンの分泌量の変化によるものと考えられている。雌性げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター）においては、活動リズムの位相が4-5日間の性周期に伴って変化することが知られている。エストロゲンの血中濃度は発情前期の明期の始め頃から急激に上昇し、それに合わせるように行動リズムは発情前期から発情期にかけて行動量は亢進し活動期の位相が前進する。この現象はスカラップ運動と呼ばれ、発情前期・発情期にのみ行動量の亢進、位相の前進がみられ、他のステージでは見られない。卵巣を摘除した動物にエストロゲンを慢性投与すると自由継続リズムの周期は短縮することから、エストロゲンが直接行動リズム周期の短縮を引き起こすと考えられている。

生物時計の機能発現の分子メカニズムとして、転写翻訳フィードバックループと呼ばれる時計遺伝子の転写制御が考えられている（分子時計）。時計振動体遺伝子はポジティブ因子により発現が促進され、自身のコードするタンパク質がネガティブ因子となり自身の転写を制御する。哺乳類の時計遺伝子の中でも *Period (Per) 1*, *Per2*, *Cryptochrome (Cry) 1*, *Cry2* は転写翻訳フィードバックループの中心を担う遺伝子であり、それぞれの遺伝子の欠損動物は概日リズム周期の短縮、延長もしくは概日リズムの消失がみられることが報告されている。

視床下部・視交叉上核 (SCN) は概日リズムの生物時計中枢として知られているが、近年、時計遺伝子発現をマーカーにすることにより、主振動体・SCN 以外の神経核や末梢組織においても減衰性振動機能を持つことが明らかとなった。従来の仮説では主

振動体が末梢リズムを駆動することが提唱されていたが、末梢自体の自律的振動機能が明らかとなったことから、主振動体が従属振動体を同調させ支配機能の調和を図っていると想定される。

## 2. 研究の目的

上記の背景により、卵巣ステロイドホルモンが生理機能リズムに与える影響を分子レベルから理解し、女性特有の概日リズム変化（睡眠障害）メカニズムの解明を最終目標とした。その中でも、本研究課題では、ヒトのモデルとして研究が進んでいるげっ歯類の概日リズム機構を利用し、時計遺伝子発現リズムの解析を行い、卵巣ステロイドホルモンである エストロゲンが直接作用する従属振動体（神経核）の同定 を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

研究目的である「エストロゲンが直接作用する従属振動体（エストロゲン感受性従属振動体）を同定する」ことを達成するために2つの実験系を用いて検討を行った。実験1として、*in vivo* 実験系にてエストロゲンが脳内時計遺伝子発現リズムに与える影響を免疫組織化学的手法（ICC法）を用い網羅的な検討を行った。実験2として、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いた培養神経組織における時計遺伝子発現リズムを観察し、エストロゲンが *in vitro* にて、直接候補神経核の時計遺伝子発現リズムに影響を与えるか検討した。具体的な実験方法を以下に記す。

### 実験1：免疫組織化学法による候補神経核における時計遺伝子 PER2 発現リズム

時計遺伝子である PER2 発現リズムをマーカーにし、候補神経核と SCN についてエストロゲン投与群とコントロール群を比較検討する。候補神経核としては、SCN からの出力線維が投射している傍室傍核領域（SPZ）、室傍核（PVN）や情動行動や内分泌に深く関わる扁桃核（Amygdala）、分界条床核（BNST）視床下部背内側核（DMH）、さらにエストロゲン受容体が豊富な視床下部内側視索前野（POA）、視床下部弓状核（ARC）なども候補として網羅的な検討を行う。

### 実験2：ルシフェラーゼレポーターシステムを用いた候補神経核における PER2 発光リズム

## ムの測定

エストロゲンが直接、その神経核に作用することが、エストロゲン感受性従属振動体の条件となる。培養神経組織にて時計遺伝子発現リズムをリアルタイムでモニターできるルシフェラーゼレポーターシステムを用い、エストロゲンが直接時計遺伝子発現リズムに影響を与えるかを検討する。具体的には、卵巣を摘出した成熟雌性もしくは PER2::LUC マウスを用い、組織培養した候補神経核のルシフェラーゼ発光リズムを光電子倍增管にて1週間にわたり計測する。このとき、エストロゲン投与群とコントロール群で比較し、エストロゲンの影響を検討する。

## 4. 研究成果

### 実験1：免疫組織化学法による候補神経核における時計遺伝子 PER2 発現リズム

これまでに、抗 PER2 抗体を用いて生物時計中枢である SCN での PER2 発現リズムを観察することはできたが、他の神経核において、PER2 発現リズムがこの方法により観察できるかどうかわかっていなかった。まず、我々は、様々な抗 PER2 抗体を用いて、マウス脳における PER2 発現リズムの検出を試みた。その結果、Alpha Diagnostic 社製の PER21-A 抗体が、候補神経核（扁桃核 (Amygdala)、分界条床核 (BNST) 傍室傍核領域 (SPZ)、室傍核 (PVN)、視床下部背内側核 (DMH)、視床下部内側視索前野 (POA)、視床下部弓状核 (ARC)) の細胞における PER2 とよく反応し、PER2 発現を単一細胞単位で判別でき、細胞数のカウントが可能であることが分かった。さらに進んだ検討から、候補神経核において PER2 発現リズムを検出することができた。特に、POA と ARC では、SCN の PER2 発現リズムのピーク位相から 1-2 時間遅れたリズム位相で PER2 発現リズムを示していた。

### 実験2：ルシフェラーゼレポーターシステムを用いた候補神経核における PER2 発光リズムの測定

時計遺伝子である PER2 の発現と同時にルシフェラーゼ融合タンパク質が発現する PER2::LUC マウスを本研究室に導入し、PER2 発光リズム測定に対する設備のセットアップを行った。成熟雌性マウスから採取した POA 培養組織において PER2 発現リズムは、エストロゲンの影響を直接受けることがわか

った。他の部位についてもこのような検討を繰り返す必要があるが、この結果は、視床下部内側視索前野 (POA) がエストロゲン感受性従属振動体である可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 枝川義邦、中村孝博、「生体リズムと時間薬理学—時間治療への展望—」、早稲田大学高等研究所紀要、第3号、2011年3月
- ② Takahiro J. Nakamura, Shizufumi Ebihara, Kazuyuki Shinohara, Reduced light response of neuronal firing activity in the suprachiasmatic nucleus and optic nerve of Cryptochrome-deficient mice, PLoS One 6 (2011) E28726 (DOI: 10.1371/journal.pone.0028726)
- ③ Takahiro J. Nakamura, Wataru Nakamura, Shin Yamazaki, Takashi Kudo, Christopher S. Colwell, and Gene D. Block, Age-related decline in circadian output, J Neurosci. 31 (2011) 10201-5.
- ④ Dawn H. Loh, Joanna M. Dragich, Takashi Kudo, Analyne M. Schroeder, Takahiro J. Nakamura, James A. Waschek, Gene D. Block, and Christopher S. Colwell, Effects of vasoactive intestinal peptide genotype on circadian gene expression in the suprachiasmatic nucleus and peripheral organs, J Biol Rhythms. 26 (2011) 200-9.

[学会発表] (計3件)

- ① 中村孝博、The neural mechanisms of age-related decline in circadian rhythmicity: the role of dopaminergic neuron in the substantia nigra、第89回日本生理学会大会、2012年3月31日、信州大学、松本
- ② 田中真登、中村孝博、パーキンソン病モデルマウスにおける概日リズム異常、第18回日本時間生物学会、2011年11月25日、名古屋大学、名古屋
- ③ 中村孝博、加齢によるマウス視交叉上核 (SCN) リズム機能の低下、第17回日本時間生物学会、2010年11月21日、早稲田大学、東京

[図書] (計1件)

- ① 中村孝博、化学同人、時間生物学 (海老原史樹文、吉村崇編)、2012年、総ペ

ページ数 1

[その他]

<ホームページ>

<http://researchmap.jp/tjnakamura/>

<報道関連情報>

千葉日報、平成 23 年 9 月 27 日に研究代表者の研究成果が紹介される。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 孝博 (NAKAMURA TAKAHIRO)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：00581985