

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790238

研究課題名(和文) 加齢による概日リズム機能低下の神経機構の解明

研究課題名(英文) Neural mechanism of age-related decline 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトでは加齢に伴う睡眠の質と量の低下、睡眠障害が出現し年齢を重ねるごとに症状が顕著になってくる。これは体内時計中枢である脳・視床下部・SCNの機能低下が一因である。しかしながら、どのようにSCNが老化するのかわかっていない。そこで本研究では実験動物であるマウスを用い、SCNにおいて加齢によって増減するいくつかの分子を見いだした。発見された原因候補分子の解析が進めば、この分子をターゲットとした薬剤の開発につながり、高齢者の生活の質の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：Aging is associated with changes in sleep amount, sleep quality, and specific sleep pathologies and disorders in humans. The dysfunction of the central circadian oscillator (SCN; suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in mammals) is recognized as one of the central causes of age-related sleep disturbances. However, it is still unclear how the SCN become senescent. In this study, we investigated to discover age-related molecules in the mouse SCN by means of DNA microarray. In the result, we found some molecules that the amount of expression increased or decreased in the aged SCN. If it is confirmed that these molecules contribute to the dysfunction of SCN, it would be a candidate for new treatment strategies for sleep disturbances in the aging population and would potentially improve the quality of life for aged individuals.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：生体リズム 加齢 神経回路 視床下部 視交叉上核 時計遺伝子 電気生理

1. 研究開始当初の背景

多くの生体機能と同様に概日リズム機構も加齢による影響から免れることはできない。ヒトでは加齢に伴う睡眠の質と量の低下、睡眠障害が出現し、年齢を重ねるごとに症状が顕著になってくる。マウスを含むげっ歯類においても、加齢による行動リズムの断片化やリズム周期の短縮や延長が認められる。睡眠やその他の約 24 時間周期をもつ生体機能を駆動するのは、生物時計中枢である視床下部・SCN である。SCN は個々の細胞に分子時計と呼ばれる十数種類の時計遺伝子からなる転写・翻訳フィードバックループが存在し、概日リズムを生みだしていると考えられている。個々の細胞の分子時計は、細胞間の連絡を保ちそれぞれが同調し、SCN で一つの SCN 時計として神経・内分泌経路を介して生体機能のリズムを統制する。これまでの国内外の研究から、加齢が直接 SCN のリズム生成機構の低下を引き起こす可能性が示唆されてきたが、神経活動や時計遺伝子発現リズムの研究で一貫した結果が得られていなかった。しかし最近、我々は、自由拘束下マウスにおける *in vivo* マルチユニット神経活動記録法の確立 (Nakamura et al., Current Biology 2008) を行い、免疫組織化学、時計遺伝子発現リズムを測定するルシフェラーゼレポーターシステムなどの複数の実験系を用い、総合的にマウス SCN に対する加齢の影響を観察した。その結果、加齢の影響は、SCN 細胞の個々の分子時計には大きな影響を及ぼさないが、SCN 神経核としての神経活動リズムに顕著な影響を示すことが明らかとなった (Nakamura et al., J Neurosci. 2011; 図 1)。これらのことより、概日リズムの加齢機構は、「SCN の個々の細胞における分子時計ではなく、SCN という神経核からの出力系リズムの低下」であることが推測される。SCN は多くの異なった神経ペプチドを持つが、その中でも VIP (Vasoactive intestinal

peptide) は SCN の腹外側部の細胞に多く存在し、VIP 陽性細胞は SCN の背内側部や傍室傍核領域 (SPZ) に神経連絡を持つ。VIP 欠損マウスや VIP の主受容体である VPAC2 受容体欠損マウスの研究から、VIP は SCN 内での細胞間カップリングの同調因子として働き、概日活動リズムの周期や振幅に影響を与えることがわかっていた。

2. 研究の目的

上記の背景とこれまでの研究成果をもとに、本研究では、加齢がどのような分子・経路を介し SCN の出力系リズムの低下を引き起こしているかを明らかにする。具体的には以下の (1) ~ (3) に示すことを明らかにすることを本研究の目的とした。

- (1) 老齢 SCN における VIP 量の減少がどのレベルでおきているかを明らかにする。
- (2) 老齢 SCN における VIP 量の減少は VIP を特異的に切断するペプチダーゼに起因するか明らかにする。
- (3) 老齢 SCN で増減する分子を見いだす。

3. 研究の方法

- (1) 老齢 SCN における VIP 量の減少がどのレベルでおきているかを明らかにする。

我々の免疫組織化学法による予備データから、加齢により SCN 背外側部における VIP 量が減少することが確認された。しかしながら、VIP の減少が mRNA 発現レベルから引き起こされているか、細胞内含有量、放出量に差があるのか分かっていない。本実験では、老齢マウス (18 ヶ月齢以上) から切り出した SCN を用い、タンパク質を抽出し、EIA 法 (EIA kit, Phenix Pharmaceuticals, Inc.) を用い、若齢マウスと比較検討した。

- (2) 老齢 SCN における VIP 量の減少は VIP を特異的に切断するペプチダーゼに起因するか明らかにする。

我々の予備データで VIP を特異的に切断す

るエンドペプチダーゼが他の脳部位に比べ、SCN 付近に多く発現していることが認められた。本実験では、このペプチダーゼが SCN における概日リズム生成機構にどのような役割を果たしているかを調べるとともに、加齢によってこのペプチダーゼの発現量や機能が変化するかどうかを検討した。具体的には、このペプチダーゼが SCN の時計遺伝子発現に影響を及ぼすか検討した。時計遺伝子である PER2 の発現とともにルシフェラーゼが発現するレポーター遺伝子導入マウス (PER2::LUC マウス) を用い、SCN 切片をメンブレン上で培養し、*in vitro* にてこのペプチダーゼの PER2::LUC リズムに対する効果を検討した。

(3) 老齢 SCN で増減する分子を見いだす。

DNA マイクロアレイ (GeneChip® 発現解析) を用い、若齢、老齢 SCN で発現量に差が認められる分子を確認した。増減が顕著なものから順に再度リアルタイム PCR 法にて発現量の差を確認した。

4. 研究成果

研究目的の(1)および(2)に関しては、当初の仮説に反して、予想通りの結果を得ることができなかった。しかし、(3)に関しては、複数の分子が SCN の加齢に関わる分子であることが示され、本研究の主目的である「加齢がどのような分子・経路を介し SCN の出力系リズムの低下を引き起こしているか」を明らかにすることに対して、大きな成果が得られたと考えている。以下、項目ごとの成果を記す。

(1) 老齢 SCN における VIP 量の減少がどのレベルでおきているかを明らかにする。

本実験では、老齢マウス (18 ヶ月齢以上) から切り出した SCN を用い、培養下における VIP 放出量および SCN から抽出したタンパク質における VIP 含有量の測定を EIA 法にて行った。その結果、我々が用いた EIA キット (EIA

kit, Phenix Pharmaceuticals, Inc.) では、微量の VIP を検出することができず、若齢 SCN と老齢 SCN との間で VIP 量の差を見いだすことができなかった。

(2) 老齢 SCN における VIP 量の減少は VIP を特異的に切断するペプチダーゼに起因するか明らかにする。

我々が見いだした VIP を特異的に切断するペプチダーゼを用い、*in vitro* にて SCN の PER2::LUC リズムに対する効果を検討したところ、コントロールと比較して有意な影響は認められなかった。

(3) 老齢 SCN で増減する分子を見いだす。

DNA マイクロアレイ (GeneChip® 発現解析) を用い、若齢、老齢 SCN で発現量に差が認められる分子を確認した。その結果、約 3 万種類の遺伝子の中で 2 倍以上の差が認められたものが 1041 種類あり、その中でも発現量の高い 10 種類の既知遺伝子を選択し、再度リアルタイム PCR 法にて発現量の差を確認した。そのうち 7 種類の遺伝子は老齢 SCN において発現量の減少が認められ、3 種類に増加が認められた。また、これらの遺伝子の SCN における発現リズムを検討した。今まで報告があるように時計遺伝子 Per2 は若齢マウスと老齢マウスでの変化はみられなかった。しかし、3 種類の遺伝子においては若齢 SCN で概日リズムが認められ、老齢 SCN では概日リズムの消失が認められた。このように加齢は時計遺伝子発現リズムに大きな影響は及ぼさないが SCN における様々な遺伝子の発現量の増加や減少、概日リズムの消失を引き起こす事が示唆された。これらの分子が SCN 出力系低下の一因になると考えられ、今後はこれらの候補遺伝子をタンパク質レベルでの発現解析を行い、また役割を明確にしていく予定である。

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 6 件)

Goto Y, Ogawa K, Nakamura TJ, Hattori A, Tsujimoto M, TLR-Mediated Secretion of Endoplasmic Reticulum

Aminopeptidase 1 from Macrophages.

Journal of immunology (Baltimore,

Md. : 1950) 192, (2014) 4443-4452; DOI:

10.4049/jimmunol.1300935

中村孝博, 中村涉、体内時計概論、あたらしい眼科 31 (2014) 191-198

中村孝博、加齢による概日リズム機能低下の神経機構、薬事日報(医療と薬剤) 秋号 2013年、18-19

中村涉, 中村孝博、体内時計の加齢変化、アンチ・エイジング医学 9(2)、2013年、222-230

Tanaka M, Yamaguchi E, Takahashi M, Hashimura K, Shibata T, Nakamura W, Nakamura TJ, Effects of age-related dopaminergic neuron loss in the substantia nigra on the circadian rhythms of locomotor activity in mice., Neuroscience research 74 (2012) 210-5; DOI: 10.1016/j.neures.2012.09.005.

Nakamura TJ, Michel S, Block GD, Colwell CS, Neural Circuits Underlying Circadian Oscillations in Mammals:

Clocks in a Dish, Isolated Central Nervous System Circuits; Neuromethods 73 (2012) 183-210; DOI:

10.1007/978-1-62703-020-5_5

[学会発表] (計 5 件)

志賀健臣, 中村孝博, 小峰千亜希, 神島愛未, 後藤芳邦, 吉田緑, 近藤保彦, 溝口康, 川口真以子、生後 24 時間以内の ethinyl estradiol 曝露は成熟後の脳内

ER 発現量を減少させる、第 16 回日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会、2013 年 12 月 12-13 日、東京大学山上海館、東京

南景子, 中村涉, 中村孝博、加齢によってマウス視交叉上核で変化する分子の探索、第 20 回日本時間生物学会学術大会、2013 年 11 月 9 - 10 日、近畿大学、東大阪市

内田仁司, 中村孝博, 阪井丘芳, 中村涉、マウス顎下腺の時計遺伝子、時計制御遺伝子と機能分子 mRNA の概日リズム、第 20 回日本時間生物学会学術大会、2013 年 11 月 9 - 10 日、近畿大学、東大阪市
中村孝博、加齢による概日リズム機能低下の神経機構、第 19 回日本時間生物学会学術大会、2012 年 9 月 15 - 16 日、北海道大学、札幌市

中村孝博, 中村涉、加齢による概日リズム機能低下の神経機構、第 13 回日本抗加齢医学会総会、2012 年 6 月 28 - 30 日、パシフィコ横浜、横浜市

[図書] (計 1 件)

中村孝博、西村書店、トランスジェニック・ノックアウトマウスの行動解析 (翻訳本 ; 共訳者 : 高瀬 堅吉、柳井 修一、他 11 名 ; 担当 : 第二章ユニコーンとキメラ (ページ 7 - 25)、2012 年、総ページ数 407

[その他]

< ホームページ >

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

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