

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860160

研究課題名(和文)加齢による概日時計機能低下原因分子の同定

研究課題名(英文)Identification of age-related molecules in the circadian clock

研究代表者

中村 孝博(NAKAMURA, TAKAHIRO)

明治大学・農学部・講師

研究者番号：00581985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトでは歳を取ると睡眠の質と量の低下、睡眠障害が出現してくる。我々は、これは体内時計中枢である脳・視床下部・SCNの神経活動リズムの低下が原因であると突き止めたが(J. Neurosci. 2011)、その細胞レベルでの解析は行っていなかった。本研究では、SCN細胞レベルでの加齢の影響を解析し、加齢によるSCNの神経ネットワークの低下を見出した(eNeuro 2015)。さらに、加齢に伴う不妊症状が光環境と体内時計の不一致によって引き起こされることを見出した(Cell Rep. 2015)。これらの結果は、日中の適切な光受容が加齢に伴う睡眠障害や不妊症状の改善に重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：With age, humans experience decreased duration and quality of sleep. While our group reported an age-related decline of the neuronal activity rhythms in the master circadian clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of hypothalamus (Nakamura et al., J. Neurosci. 2011), the cellular mechanism was unclear. In the present study, we demonstrated an effect of aging at the cellular level. This shows that the neural connections between SCN cells are weakened (Nakamura et al., eNeuro 2015). Furthermore, our group reported that infertility symptoms accompanying aging are caused by which a light environment is incompatible with the biological clock (Takasu et al., Cell Rep. 2015). The result of the present research study, that "mismatch between the light environment and the internal clock promotes aging of the biological clock" shows proper amounts of daytime light are important for age-related changes in female reproductive functioning and older individuals' physiological functioning.

研究分野：時間生物学

キーワード：加齢 生体リズム 睡眠障害 視交叉上核

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などの睡眠障害が出現し、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、概日時計中枢である視床下部・SCN である。SCN は第三脳室を挟んで左右一対で構成される神経核であり、左右あわせて約 2 万個の神経細胞が存在する。SCN の個々の細胞には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。個々の細胞は、細胞間の連絡を保ちそれぞれが同期し、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結果から、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、申請者らは、無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及ぼすことが明らかとなった (Nakamura et al., J Neurosci. 2011; 図 1)。

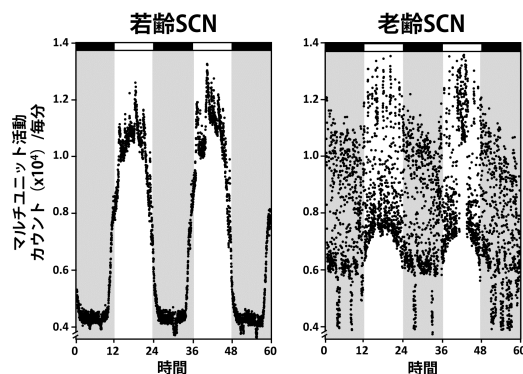


図1：無拘束下マウスSCNにおける神経活動リズムの加齢による影響。老齢SCNでは、神経活動のリズムの振幅が小さくなっている。

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時刻生成機構への直接的な影響ではなく、SCN 神経ネットワークによる出力系リズムの低下」であることが推測される。図 2 に示すモデルが想定され、特に細胞同士のカップリングに関わる分子が加齢による影響を受け、SCN 神経核としてのリズムが減弱していると考えられる。

研究代表者らは、加齢による SCN

機能低下の原因分子の同定を行うべく、DNA マイクロアレイを用い、加齢によって SCN にて増減する分子を網羅的に解析した。その結果、約 3 万種類の遺伝子の中で、若齢と老齢 SCN で 2 倍以上の発現量の差が認められた遺伝子は 1041 種類あり、その中で SCN において発現量が高いものから順に 10 種類の既知遺伝子を選び、候補分子として、再度リアルタイム PCR 法にて mRNA 発現量の差を確認した。10 種類中 3 種類の遺伝子は老齢 SCN で有意な発現量の増加が認められ、4 種類の遺伝子は減少していた。また、3 種類の遺伝子発現には、若齢 SCN で概日リズムが認められ、老齢 SCN ではそのリズムが消失していた。これらの分子は、加齢による SCN 出力系低下の一因を担っていることが考えられる。本研究では、これら加齢で増減する分子の概日時計機構における機能解析を行う。

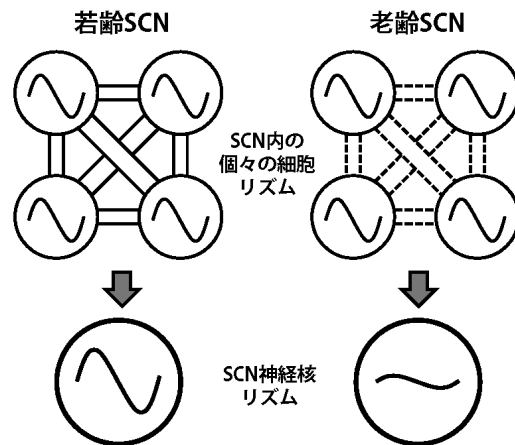


図2：SCNでのリズム形成における細胞間カップリング。老齢SCNでは、破線で示すように、細胞同士の結びつきが弱くなりSCN全体としてのリズムが減弱していると考えられる。

2. 研究の目的

研究開始当初は研究期間内で以下の 3 項目を具体的な目的としていた。

候補分子について、SCN での同在および発現細胞種を明らかにする。

候補分子それぞれの特異的な抗体を用いた免疫組織化学を行い、SCN での局在および細胞内の局在を明らかにする。

候補分子について、SCN での概日リズムの有無を明らかにする。

若齢 SCN において 4 時間ごと 24 時間のサンプリングを行い、ウェスタンブロット法にて SCN における概日リズムの有無を明らかにする。

候補分子の SCN に対する影響を明らかにする。

In vivo、in vitro において候補分子の組み換え体や阻害剤を用い、当該分子の SCN に対する影響を検討する。

3. 研究の方法

本研究の目的である加齢による SCN 機能低下の原因分子の同定を実現するために、これまでの研究成果によって導かれた候補分子のデータを基に、研究開始当初は以下の ~ の研究を遂行する計画を立てていた(図3)。しかしながら、本研究では候補分子の SCN における有意な発現が認められず、実験 と を実行するに至らなかった。

候補分子の SCN での同在および発現細胞種の同定する。

候補分子の SCN での概日リズムの有無の確認する。

In vivo および in vitro における候補分子の SCN に対する効果を観察する。

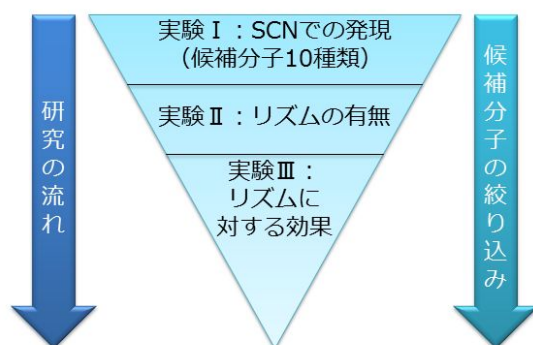


図3：本研究の流れ

4. 研究成果

当初計画していた「加齢による SCN 機能低下の原因分子の同定」には至らなかった。理由として、すべての候補分子のタンパク質発現が SCN において顕著ではなかったため、実験 と を実行することができなかった。しかしながら、研究代表者らは、当該研究に関連する成果として、以下のようなインパクトのある結果を報告した。個々の SCN 細胞における時計遺伝子発現を解析した結果、**(1) 加齢は個々の細胞よりも SCN ネットワークに影響を及ぼすことを明らかにした**(Nakamura TJ et al. eNeuro, 2015)。神経核としての SCN の活動が減弱していることから、加齢は SCN の出力系の低下を引き起こし、種々の概日リズム機能を低下させている結論を導いた。

また、研究代表者のグループは、**(2) 早期老齢雌性マウス(10-12ヶ月齢)に光環境を操作した社会的時差ボケを強いると性周期を乱し不妊になることを明らかにした**(Takasu NN et al., Cell Rep. 2015)。このことは、光環境の変化に老化した SCN が正しく時を刻めなくなり、生殖機能への時刻出力が正確に行われていないと推測される。概日時計の加齢は多くの生命機能に変化をもたらしていることを示唆する結果である。

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9件)

Nakamura TJ, Takasu NN, Nakamura W. The suprachiasmatic nucleus: age-related decline in biological rhythms. J Physiol Sci. 2016 Feb 25. PMID: 26915078
Shiga T, Nakamura TJ, Komine C, Goto Y, Mizoguchi Y, Yoshida M, Kondo Y, Kawaguchi M. A Single Neonatal Injection of Ethinyl Estradiol Impairs Passive Avoidance Learning and Reduces Expression of Estrogen Receptor in the Hippocampus and Cortex of Adult Female Rats. PLoS One. 2016 Jan 7;11(1):e0146136. doi:10.1371/journal.pone.0146136. eCollection 2016. PMID: 26741502

Uchida H, Nakamura TJ, Takasu NN, Todo T, Sakai T, Nakamura W. Cryptochrome-dependent circadian periods in the arcuate nucleus. Neurosci Lett. 2016 Jan 1;610:123-8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.071. Epub 2015 Nov 2. PMID: 26542738

Nakamura TJ, Nakamura W, Tokuda IT, Ishikawa T, Kudo T, Colwell CS, Block GD. Age-Related Changes in the Circadian System Unmasked by Constant Conditions. eNeuro. 2015 Sep 22;2(4). pii: ENEURO.0064-15.2015. doi:10.1523/ENEURO.0064-15.2015. eCollection 2015 Jul-Aug. PMID: 26464996

Takasu NN, Nakamura TJ, Tokuda IT, Todo T, Block GD, Nakamura W. Recovery from Age-Related Infertility under Environmental Light-Dark Cycles Adjusted to the Intrinsic Circadian Period. Cell Rep. 2015 Sep 1;12(9):1407-13. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.049. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26299967

Goto Y, Ogawa K, Nakamura TJ, Hattori A, Tsujimoto M. Substrate-dependent nitric oxide synthesis by secreted endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in macrophages. J Biochem. 2015 Jun;157(6):439-49. doi: 10.1093/jb/mvv001. Epub 2015 Jan 9. PMID: 25577645

Goto Y, Ogawa K, Nakamura TJ, Hattori A, Tsujimoto M. TLR-mediated secretion of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 from macrophages. J Immunol. 2014 May 1;192(9):4443-52. doi:

10.4049/jimmunol.1300935. Epub 2014 Mar 31. PMID: 24688025

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

中村孝博、「卵巣ステロイドホルモンが概日リズムに与える影響」自律神経 52, (2015) 7-12

[学会発表](計 15 件)

中村孝博、「視交叉上核：加齢の影響」, 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22 日~24 日、札幌コンベンションセンター

水田習斗、大野琴美、中村渉、徳田功、中村孝博、「性周期発現には視交叉上核からの神経時刻情報が必須である」, 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22 日~24 日、札幌コンベンションセンター

伊藤寿々花、武井美濤、中野まりな、中村渉、下村和宏、中村孝博、「CBA 垂系統における概日行動リズム特性」, 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22 日~24 日、札幌コンベンションセンター

水田習斗、大野琴美、中村渉、徳田功、中村孝博、「視交叉上核の外科的隔離が雌性マウスの性周期に及ぼす影響」, 第 11 回環境生理学プレコンgres 2016 年 3 月 21 日、北海道大学大学院医学研究科フラテ会館

伊藤寿々花、武井美濤、中野まりな、中村渉、下村和宏、中村孝博、「CBA 垂系統における概日リズムの垂系統差」, 第 11 回環境生理学プレコンgres 2016 年 3 月 21 日、北海道大学大学院医学研究科フラテ会館

水田習斗、大野琴美、中村渉、中村孝博、「視交叉上核からの神経投射は性周期を維持するために必須である」, 第 22 回日本時間生物学会学術大会 2015 年 11 月 21 日~22 日、東京大学本郷キャンパス

伊藤寿々花、中野まりな、武井美濤、中村渉、下村和宏、中村孝博、「CBA 垂系統における概日行動リズム特性」, 第 22 回日本時間生物学会学術大会 2015 年 11 月 21 日~22 日、東京大学本郷キャンパス

高須奈々、中村孝博、草野慎之介、中西祐一郎、徳田功、中村渉、「マウス概日行動リズムの加齢変化と“社会的”時差ボケ」, 第 22 回日本時間生物学会学術大会 2015 年 11 月 21 日~22 日、東京大学本郷キャンパス

Mizuta S, Ohno K, Nakamura W, Nakamura TJ, The neural connection from suprachiasmatic nucleus is necessary for estrous cyclicity Asian Forum on Chronobiology in 2015, Sapporo, 2015 年 9 月

Nakamura TJ, Tokuda IT, Nakamura W, Ishikawa T, Kudo T, Colwell CS, and Block GD, Aging Dissociates Circadian PER2 Oscillations of Individual Cells in the Suprachiasmatic Clock, 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月

吉田尚起、高須奈々、松本光平、徳田功、中村孝博、中村渉、マウス輪回し行動リズムの加齢変化、第 10 回環境生理学プレコンgres、2015 年 3 月

Nakamura TJ, Tokuda IT, Nakamura W, Ishikawa T, Kudo T, Colwell CS, and Block GD, Aging Affects Circadian PER2 Oscillation of Individual Cell in the Suprachiasmatic Clock, 第 21 回日本時間生物学会学術大会、2014 年 11 月

Shiga T, Nakamura TJ et al., Neonatal exposure to ethinyl estradiol decreased the learning performance and the expression levels of ER alpha in adult female rats, Neuroscience 2014, 2014 年 10 月

中村孝博、卵巣ステロイドホルモンが概日リズムに与える影響、第 67 回日本自律神経学会、2014 年 10 月 (招待講演)

中村渉、中村孝博、体内時計の光受容と反応性、第 14 回日本抗加齢医学会総会プレシンポジウム、2014 年 6 月 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

<http://www.isc.meiji.ac.jp/~chrono/index.html>

<http://gyoseki1.mind.meiji.ac.jp/mjuhp/KgApp?kyoinId=ymdggogiggy>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 孝博 (NAKAMURA, Takahiro)

明治大学・農学部・専任講師

研究者番号：00581985