

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K12696

研究課題名(和文) 末梢時計の時刻を調節する匂い物質の探索

研究課題名(英文) Search for odorants that regulate the peripheral clock

研究代表者

中村 整 (Nakamura, Tadashi)

電気通信大学・情報理工学(系)研究科・教授

研究者番号：50217858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計とは一日周期の体内時計であり、昼夜の交代勤務などにより概日時計の時刻が周囲の環境とずれた時差ぼけ状態の続くことが、様々な疾病の一因となるとされている。概日時計は脳の視交叉上核の中枢時計に加えて、ほぼ全ての末梢組織にも存在する。時差ぼけによる体調不良の一因は、この中枢と末梢の時計の時刻のずれであることがわかってきた。本研究では、効果的に末梢時計を調節し、体内時差ぼけ状態を効果的に解消する匂い物質を見つけることを目指した。まず時差ぼけマウスを作製し、自動的に匂いを与える装置を作製した。複数種の匂い物質を与えて、マウスの肝臓の時計の時刻を調べたが、匂い投与の影響を観察するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The circadian clock has an about 24 hour periods. Chronic desynchronization of circadian clock from the environmental rhythms is possibly thought to cause many diseases. The central circadian clock is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus, and controls many circadian rhythms. The circadian clock also reside throughout the body, and these peripheral clocks are entrained by the signals from the SCN. Desynchronization between SCN and peripheral clocks has been found to cause health problems. In this study, we aimed to search for odorants which effectively control the phase of the peripheral clocks. To address this, we induced jet lag in mice, and constructed apparatus to automatically give odor stimuli to them. We gave two odorants to mice, but could not observe any effects on the clock in liver.

研究分野：動物生理学 神経科学

キーワード：概日時計 匂い物質 時差ぼけ 疾患予防

1. 研究開始当初の背景

(1) 概日時計とは？

概日時計と疾患との関連 昼夜交代勤務の労働者において、心筋梗塞や高血圧、糖尿病や癌の発症率が高くなるのが臨床疫学的調査などにより以前から指摘されている。これらの原因として、我々が体内に持つ約 24 時間周期の体内時計である「概日時計」と、周囲の環境とがずれた時差ぼけ状態が続くことが一因であるとされてきた。概日時計とは約 24 時間周期の体内時計であり、睡眠・覚醒、種々のホルモンや体温、血圧などの様々な生理現象の約 1 日周期のリズムを制御している。

中枢時計と末梢時計 概日時計の中核は脳の視床下部の視交叉上核 (SCN) と呼ばれる神経核に存在するが、体中のほとんどすべての細胞が約 24 時間の時を刻んでいる。通常、中枢時計は末梢組織の時計を制御し、体内の時計全体を正常な状態に保っているが、中枢と末梢の時計の時刻にずれが生じると、いわゆる時差ぼけの状態となり、様々な疾病の一因となっていることが明らかになってきた。これまでに開発された概日時計を調整するとされる薬剤はわずかであり、メラトニン等、いずれも中枢時計に作用するものである。末梢時計の時刻を調整する薬の開発も重要であるが、これまでそのような報告はなかった。

(2) 匂いの生理機能について

匂いが生理機能に及ぼす仕組みについては近年ようやく研究が進み、匂い刺激が嗅球から視床下部へ至る経路を活性化し、様々な影響を及ぼすことが科学的に証明されてきた。匂い刺激による自律神経系への影響や、匂い刺激による食欲の変化と摂食関連ペプチド濃度の明確な変化を示した研究は重要と考えられた。

2. 研究の目的

(1) 研究目的

本研究では、末梢時計の時刻をモニターできる遺伝子改変マウスを用いて、概日時計に影響を及ぼす可能性のある、いくつかの匂い物質をマウスに与えることにより、末梢時計の時刻を変化させる匂い物質を同定することを目指す。

(2) 本研究の予想される成果

本研究の成果が、昼夜交代勤務者の健康促進に大幅に寄与することは言うまでもない。匂いが生理機能に及ぼす影響は、ようやく近年科学的に解明が始まったばかりであり、本研究の成果は「匂いによる概日時計の時刻合わせ」という全く新しい匂い物質の機能を、予防医療と結びつけて示すことが出来るという意味で、概日時計研究、及び嗅覚研究の両方に大きなインパクトを与えると予想している。

3. 研究の方法

(1) 時差ボケマウスの作製

交代勤務を模倣するため、時差ぼけマウスを作製する。先行研究によりよく用いられる条件は、マウスを飼育している光条件を 6 時間前に、あるいは後ろにシフトさせる方法である。

(2) マウスへの匂い刺激

光条件を変化させた翌日に匂い刺激を行う。まず暗期の前半および後半の 4 つの時間帯を検討する。匂い刺激を与える時間の長さは、これまで多くの知見の存在する光刺激による時刻調節の研究を参考に、1 時間とする。

(3) 対象とする組織

末梢時計解析に用いる組織は、様々な疾患との関連が多く示されている臓器の一つである肝臓を主に用いる。末梢時計の先行研究において、最も知見が蓄積しており、食餌の影響を強く受けることがわかっている点でも、最も解析に適した組織であると言える。

(4) 生物発光による概日時計リズムの解析 概日時計リズムを解析するには、リズムを容易にモニタリングするための遺伝子改変動物の利用が最も効率的である。*Per1* のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いたモニタリングシステムを用いて、匂い刺激を与えたマウスと刺激なしの対照マウスの組織を培養し、匂い刺激を与えたマウスにおいて、体内時差ぼけ状態が軽減されているかを比較検討する。

(5) RT-PCR による概日時計リズムの解析 概日時計リズムを解析するための(4)の手法の代替法として、匂い刺激を与えたマウスから肝臓を摘出し、複数の概日時計関連遺伝子の発現量を RT-PCR によって定量化した。この発現量を、予め通常マウスより取り出した肝臓における時計関連遺伝子の発現量と比較することにより、肝臓の時刻を決定した。この手法により、匂い刺激ありのマウスとなしのマウスの間で、肝臓の時刻に差がみられるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 匂い刺激装置の作製

マウスは一般的なケージを用いて飼育したが、一日の決まった時間に匂い刺激を行うこととし、明暗のコントロールの時間に同期して一定時間、自動的に匂いを含んだ空気を飼育ケージに与える装置を作製して、用いた。この装置自体は狙い通りの動作を示すものを得ることができた。

(2) 概日時計リズム解析

生物発光による概日時計リズムの解析 *Per1* ルシフェラーゼマウスより、視交叉上核と肝臓のスライスを調製し、それぞれの細胞でルシフェラーゼの発光を継続的にモニターできる光学装置を持つ培養システム内に置いて、数日にわたる培養を行った。視交叉上核を含む脳切片においては、ほぼ一日周期

の Per 1 の発現量変化を記録し、いわゆるその組織の時刻を決定することができた。しかし、次に肝臓のスライスについて同様の培養を試みたところ、培養した際の時刻はその肝臓を取り出した生体マウスの時刻を反映しておらず、培養開始時刻に依存してしまうことがわかった。そこで、このマウスの使用を断念した。

RT-PCR による概日時計リズムの解析
複数の時計関連遺伝子の発現量を RT-PCR により求めて、時刻を決定する方法を新たに確立した。この方法では、実験の作業量は増え、時刻決定の精度に多少粗さは見られるものの、時刻の決定のために数日間培養する必要はない。また、サンプル数もある程度増やすことが可能なため、初期の匂い物質の絞り込みには十分効果的であると考えられる。

(3) 匂い刺激の効果

複数の異なる種類の匂いについて、夜の前半に刺激を行ったが、刺激の有無で肝臓時刻に変化は見られなかった。今後は、実験系はある程度確立できたので、さらに様々な匂い物質を種々の条件で与えて、効率的に探索していくことが可能であると考えている。

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3件)

Yoshikawa T, Nakajima Y, Yamada Y, Enoki R, Watanabe K, Yamazaki M, Sakimura K, Honma S, Honma K, Spatiotemporal profiles of arginine vasopressin transcription in cultured suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.*, 査読有, vol.42, 2015, pp. 2678-2689, DOI:10.1111/ejn.13061

Yoshikawa T, Sellix M, Jia SS, Honma S, Honma K, Menaker M, Phase control of the ovarian clock and its function in timed ovulation, *J. Physiol. Sci.*, 査読有, vol. 66, 2016 pp.S37

Yoshikawa T, Nakajima Y, Yamada Y, Enoki R, Watanabe K, Yamazaki M, Sakimura K, Honma S, Honma K, Monitoring of circadian rhythm in arginine vasopressin expression by a bioluminescence reporter. *J. Physiol. Sci.* 査読有, vol.65, 2015, pp.S293

[学会発表](計7件)

吉川朋子, Michael T. Sellix, 賈書生, 本間さと、本間研一、Micael Menaker, Phase control of the ovarian circadian clock and its function in time ovulation, 第93回日本生理学会大会、2016年03月22日~2016年03月24日

札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

中村整、視覚から始めた嗅覚・味覚研究、慶應義塾大学講演会「味覚・嗅覚研究への提言」(招待講演)、2016年01月22日、慶應義塾大学(神奈川県・横浜市)

吉川朋子、中島芳浩、山田淑子、榎木亮介、渡辺和人、山崎麻耶、藤村健司、本間さと、本間研一、Circadian rhythm in arginine vasopressin expression monitored by a bioluminescence reporter, 第22回日本時間生物学会学術大会、2015年11月21日~2015年11月22日、東京大学(東京都・文京区)

中村整、昆虫の味覚および関連する神経機構、京都大学ミニシンポジウム「動物生理現象の分子論的研究」(招待講演)、2015年11月08日、新都ホテル、(京都府・京都市)

中村整、昆虫における苦味と甘味の対立的受容、日本動物学会第86回大会、(招待講演)、2015年09月17日~2015年09月19日、朱鷺メッセ、(新潟県・新潟市)

吉川朋子、黒田茂、高木清二、上田哲男、本間さと、本間研一、マウス視交叉上核に存在する複概日振動体システムと光周期により変化する行動リズム、日本動物学会第86回大会、2015年09月17日~2015年09月19日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

吉川朋子、本間研一、本間さと、Analysis of bioluminescence rhythm from whole mouse brain slices by an ex vivo macro imaging, Asian Forum on Chronobiology, 2015年09月07日~2015年09月08日、北海道大学(北海道・札幌市)

[図書](計3件)

中村整、光と生命の事典、朝倉書店、2016、2(264-265)

中村整、研究者が教える動物実験第1巻「感覚」、共立出版、2015、8(34-41)

Honma S, Ono D, Enoki R, Yoshikawa T, Kuroda S, Honma K, Circadian Clocks, Hokkaido University Press, 2016, 253

[その他]

ホームページ等

<http://kaeru.pc.uec.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 整 (NAKAMURS TADASHI)

電気通信大学・大学院情報理工学研究所・教授

研究者番号：50217858

(2) 研究分担者

仲村 厚志 (NAKAMURA ATSUSHI)

電気通信大学・大学院情報理工学研究所・

助教

研究者番号：50361829

(3) 研究分担者

仲村 朋子(吉川朋子)(NAKAMURA TOMOKO)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)

特任助教

研究者番号：30451397