

令和元年9月5日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15193

研究課題名(和文)CRISPR/Cas9法を用いたニューロン機能改変による概日リズム機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of mice modified with genes controlling the amplitude of circadian rhythm by CRISPR / Cas9 method

研究代表者

池田 正明 (IKEDA, MASAAKI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80232198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：死後脳研究では背外側前頭前野や前帯状皮質で、時計遺伝子の概日リズム性の発現が減弱していたとの報告(Li et al, PNAS 2013)があり、うつ病に脳レベルで概日リズムの不全のあることが明らかにされた。本研究ではうつ病発症と関連する脳領域において概日リズムの振幅を低下させたうつ病モデルマウスを作成することを最終目標とした。作成に先がけて概日リズムの振幅を増強させる因子であるp160ファミリーのSRC1のノックアウト細胞を作成しリズム機能を解析したところ、SRC1のノックアウト細胞は、Bmal1およびPer2プロモーターリズムの振幅を低下させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日リズムの機能が中枢神経系で減弱することは、感情障害の発症要因となることが想定されている。私たちは概日リズムの振幅を制御する因子を探索している。その過程でp160因子が振幅の増強に関わっていることを発見した。今回、この因子の発現を増強あるいは低下させたモデル細胞を作成し、概日リズム振幅の増減が細胞機能に及ぼす影響を解析した。今後はp160の機能を改変し、時計遺伝子発現リズムの振幅をうつ病発症と関連するとされる領域の神経細胞で減弱させたマウスを作成し、中枢神経系におけるリズム振幅減弱化と感情障害との関連を解析する計画であり、これらの成果はうつ病の解明や新しい治療法開発につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Postmortem brain studies reported that the circadian rhythmic expression of clock genes was attenuated in the dorsolateral prefrontal cortex and anterior cingulate cortex (Li et al, PNAS 2013). This report suggested that depression has circadian rhythm dysfunction in the brain. The goal of this study was to create a depression model mouse with reduced amplitude of circadian rhythm in the brain region associated with the cause of depression. As a preparatory step for creating a model mouse, knockout cells of SRC1 of the p160 family, a factor that enhances the amplitude of the circadian rhythm, were created. The SRC1 knockout cells were shown to reduce the amplitude of Bmal1 and Per2 promoter rhythms.

研究分野：時間生物学

キーワード：時計遺伝子 概日リズム Bmal1 視交叉上核 ゲノム編集 うつ病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 気分障害の研究と時計遺伝子 *Bmal1* の発見

私はうつ病の病因には概日リズム不全が関係しているとの考えから、国立精神神経センター研究所疾病研究第3部に所属した1991年から時計遺伝子を発見することを目指したプロジェクトを開始し、新規のbHLH-PAS型転写因子を発見、BMAL1と命名(Ikeda & Nomura, *Biochem Biophys Res Commun* 1997)して報告した。さらに*Bmal1*がSCNで夜間にピークのあるリズム発現すること(Honma, Ikeda et al, *Biochem Biophys Res Commun* 1998)、*Bmal1*のプロモーターを同定(Yu et al, *Biochem Biophys Res Commun* 2002)し、これがマウス個体全身でリズム振動することを報告した(Nishide et al, *Gene to Cells* 2006)。死後脳研究では背外側前頭前野(DLPFC)や前帯状皮質で、時計遺伝子の概日リズム性の発現が減弱化していたとの報告(Li et al, *PNAS* 2013)があり、うつ病に脳レベルで概日リズムの不全のあることが明らかにされた。

(2) SCNと気分障害の責任脳領域との動的ネットワークから病態を読み解く

気分障害にみられるリズム不全は、SCNやDLPFCなどのうつ病責任領域の「リズム発振不全」や、SCNから、室傍核(PVN)やDLPFCなど脳内各領域への「リズム指令(出力)不全」による同調不全によって惹起されるのではないかと想定される。本研究では、特に「リズム指令不全」に着目し、SCNからの出力ニューロンの機能をCRISPR法による遺伝子(編集)操作で改変し、この操作で得られたリズム指令不全マウスの、行動、認知、情動への影響を解析して、「リズム指令不全仮説」を検証する。

2. 研究の目的

気分障害には気分の日内変動や睡眠障害など概日リズムの不全を伴うことが多く、この不全は気分障害の重要な症状であるばかりでなく、病因とも関連すると考えられてきた。こうした中、時計遺伝子が発見され概日リズムの分子メカニズムが解明された現在、概日リズム中枢である視交叉上核(SCN)と行動や認知、情動など脳機能を司る領域とのネットワークについて、分子やニューロンレベルでの解析が可能となっており、気分障害の病因・病態解明のための基盤が整ってきている。本研究では、2013年にゲノム編集技術として報告されたCRISPR/Cas9法を、特定の遺伝子発現量を改変する技術として応用し、哺乳類の概日リズム中枢であるSCNを構成する出力ニューロン機能の改変を行うことによって、認知、情動、行動を制御する領域とSCNとのネットワークシステムの役割を明らかにし、気分障害の発症メカニズムを解明する糸口となる研究を目指す。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9法によるSCN出力ニューロン特異的遺伝子改変コンストラクトの構築

CRISPR/Cas9法による培養細胞レベルでの遺伝子破壊が成功する中、Hung(南京大学)、aenisch(MIT)らのグループが受精卵に応用し、ゲノム改変マウスの作出に成功している。まだ新しい手法であるが、短期間に低コストでしかもゲノムの複数部位で同時に改変が可能であることが報告されている(Fujii et al, *Biochem Biophys Res Commun* 2014)。通常のノックアウトマウス作成にはES細胞の維持や相同組み替えのためのベクター構築に熟練や多くの時間がかかるが、この新しい技術は、工程ステップが少なく、技術の習熟度にもあまり依存しないため、導入への障壁は低い。

本研究では、SCN出力ニューロンに発現する遺伝子の発現を改変するコンストラクトを作成し利用する。

(2) 細胞レベルでCRISPR/Cas9法による遺伝子ノックアウトの影響の検討

時計遺伝子には*Bmal1*、*Per1*、*Cry1*など、概日リズム性発現するものがある。これらの遺伝子のプロモーター下流にルシフェラーゼ・レポーター遺伝子をつないだコンストラクトと時計遺伝子発現リズムを改変させる候補遺伝子のCRISPR/Cas9ノックアウトコンストラクトを同時にトランスフェクションし、概日リズム発現への影響を検討する。

4. 研究成果

概日リズムは周期、位相、振幅の要素からなっており、うつ病脳では複数の時計遺伝子のリズム発現の低下があると推定され、これらの知見はうつ病には全般的な概日リズム発現する分子の振幅低下があることを示唆している。時計遺伝子の中で概日リズム性発現が認められるのは*Bmal1*、*Per1-2*、*Cry1-2*である。これらの時計遺伝子プロモーター下流にルシフェラーゼ・レポーターをつないだコンストラクトを細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性の変動を発光量変化としてKronos(アト-社製)によってリアルタイムで測定することにより、時計遺伝子発現のリズムを計測可能となっている。

また、時計遺伝子発現リズムの振幅を増強あるいは減弱させる因子のスクリーニングを継続しているが、その過程で複数の該当する機能のある遺伝子を見いだしている。その中でp160ファミリーに属するSRC1が時計遺伝子リズムの振幅を増大させることを上記のKronosによる計測で確認している。SRC1遺伝子のノックアウトが可能なCRISPR/Cas9コンストラクトと*Bmal1*あるいは*Per2*プロモーターレポーターコンストラクトを同時にNIH3T3細胞にトランスフェクションし、リズム発現に対する影響を検討した。その結果、CRISPR/Cas9コンストラクトを導

入した細胞は位相には大きな変化を示さなかったが、振幅が低下した。これにより、NIH3T3 細胞における SRC1 遺伝子のノックダウンは *Bmal1* および *Per2* プロモーターリズムの振幅を低下させることが明らかになった。また、本研究で使用した SCR1 遺伝子をノックアウトする CRISPR/Cas9 コンストラクトは振幅を低下させる効果があることから、中枢神経系での SCR1 機能を改変できる可能性が示された。次のステップとして、CRISPR/Cas9 コンストラクトを脳スライスに導入し、脳スライスにおける *Bmal1* リズムに対する影響を検討する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Oshima T, Niwa Y, Kuwata K, Srivastava A, Hyoda T, Tsuchiya Y, Kumagai M, Tsuyuguchi M, Tamaru T, Sugiyama A, Ono N, Zolboot N, Aikawa Y, Oishi S, Nonami, A, Arai F, Hagihara S, Yamaguchi J, Tama F, Kunisaki Y, Yagita K, Ikeda M, Kinoshita T, A Kay AS, Itami K, Hirota T: Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth.

Science Advances, 5(1), eaau9060, 2019 (査読有)

DOI: 10.1126/sciadv.aau9060

Takenaka Y, Inoue I, Nakano T, Ikeda M, Kakinuma Y, Ikegami Y, Shimada A, Noda M: Evaluation of Teneligliptin Effects on Transcriptional Activity of PPAR in Cell-Based Assays. J Nippon Medical School, 85:95-101, 2018 (査読有)

Ikarashi R, Akechi H, Kanda Y, Ahmad A, Takeuchi K, Morioka E, Sugiyama T, Ebisawa T, Ikeda M, Ikeda M: Regulation of molecular clock oscillations and phagocytic activity via muscarinic Ca²⁺ signaling in human retinal pigment epithelial cells.

Scientific Reports, 7: 44175, 2017 (査読有)

DOI: 10.1038/srep44175

池田 正明:

時計遺伝子の機能と疾患研究の最前線

昭和大学学術会雑誌、77(4), 397-408, 2017 (査読無)

Tamaru T, Ikeda M:

Circadian adaptation to cell injury stresses: a crucial interplay of BMAL1 and HSF1.

J Physiological Sciences, 66 (4), 303-306, 2016 (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

Masaaki Ikeda, Megumi Kumagai, Yasutsuna Sasaki, Yoshihiro Nakajima, Ken-ichi Fujita: Cellular and molecular basis of chronotherapy for cancer

Daily /adaptable Yin-Yang transitions in diverse physiological processes coordinated by multi-cellular Chrono-molecular signal

FAOPS 2019, Mar 30, 2019, Kobe

Masaaki Ikeda:

Discovery of the Bmal1 gene (Landmark lecture,Invited)

International Symposium on Biological Rhythms, "20 Years since Discovery of mammalian Clock Genes" Oct 19, 2018, Nagasaki University, Nagasaki

池田 正明:

ノーベル賞研究に貢献した時計遺伝子 BMAL1 の発見 (招待講演)

シンポジウム「時間栄養学を健康に活かす」

第5回 時間栄養科学研究会、2018年8月28日 女子栄養大学、坂戸

池田 正明, 熊谷 恵, 中島 芳浩, 佐々木 康綱, 藤田 健:

がん分子標的薬の時間治療に向けて基盤解明 がん分子標的薬の時間治療に向けて基盤解明 (招待講演)

第95回日本生理学会大会、2018年3月30日、高松

Megumi Kumagai, Yoshihiro Nakajima, Masaaki Ikeda:

Role for p160 coactivators in amplitude of circadian oscillation

EBRS Congress 2017, July 30-August 3, 2017, Amsterdam

池田正明、熊谷 恵、中島 芳浩：
概日リズムの分子機構（招待講演）
「時間毒性学」～古くて新しい毒性学～
第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月 11 日、横浜

池田正明、熊谷恵：
時計遺伝子発見と進歩-発見 20 年を振り返って（招待講演）
第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 30 日、浜松

熊谷恵、千葉康、中島芳浩、池田正明：
時計遺伝子の概日リズム性発現の振幅とコアクティベーターの関与（招待講演）
第 23 回日本時間生物学会学術大会、2016 年 11 月 12 日、名古屋

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/seiri2/Masaaki%20Ikeda2.html>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：熊谷 恵
ローマ字氏名：（KUMAGAI, megumi）

研究協力者氏名：中島 芳浩
ローマ字氏名：（NAKAJIMA, yoshihiro）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。