

令和元年6月14日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15574

研究課題名(和文)哺乳類網膜におけるゲートの分子機構と活動リズムの位相反応への作用解析

研究課題名(英文)Analysis of regulatory mechanism in retinal circadian rhythm

研究代表者

池上 啓介(Ikegami, Keisuke)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：10709330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：網膜の光感受性リズムといった約24時間の概日リズムの詳細な実態や、その概日制御機構は不明なままであった。我々は、マウスの網膜の概日リズムは環境光よりも概日中枢である視交叉上核による同調機構が優位であることを世界で初めて発見した。さらに、それは副腎コルチコステロンを介して、網膜神経節細胞の概日時計を制御し、その網膜時計により網膜概日リズムが直接制御されていることを明らかにした。さらに、我々は網膜の時計は抑制性神経伝達物質GABA関連遺伝子の概日発現を制御し、GABA関連遺伝子が昼間発現上昇することで、主観的昼における光感受性を抑制している可能性を示唆できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜からの光情報は概日中枢である視交叉上核に伝達され、体全体の体内時計を統御している。網膜概日リズムは、視交叉上核から誘導された同調因子だけでなく強い同調因子、すなわち環境光の入力も受けるので同調機構は不明のままであったが、本研究により視交叉上核由来の因子が優位であることが判明した。これは、わずかなまたは不規則な光刺激が中枢時計と網膜時計との間の内部非同期を誘発し、視交叉上核へ光信号が不安定になる問題を回避するシステムであると考えられる。さらに、主観的昼にのみ光感受性を低下させる概日リズムの詳細も判明したが、これは昼の日光から網膜が変性して細胞死を起こさないように目を保護すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The retina transmits light signals to entrain the central circadian clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN). Although the SCN regulates the peripheral circadian physiological function, the detail in the retina remains unclear since ambient light is also involved. We first found circadian sensory system to light in the inner retina. Its phase was shifted slowly like the SCN in jet lag, and its pattern were disrupted by adrenalectomy and rescued by glucocorticoid administration, indicating that the SCN rather than ambient light regulates retinal rhythm through glucocorticoid. Expression analysis of neurotransmitter-related genes revealed that diurnal change of GABA-related gene in the RGC mediate retinal photosensitivity rhythm, which is disrupted by retina specific clock deletion. Thus, SCN may regulate GABA-mediated photosensitivity rhythm. This study first demonstrates the entrainment regulatory pathway of retinal circadian rhythm by the SCN.

研究分野：動物生理学

キーワード：網膜 概日時計 光応答反応 視交叉上核 コルチコステロン 光感受性

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

1. 研究開始当初の背景

環境光は眼球の網膜で受容され、脳視床下部に位置する体内時計の中枢である SCN に伝達され、時計遺伝子の発現を誘導することで位相を変化させる。その結果、哺乳類では昼行性夜行性問わず暗期初めの光により位相が後退し、後半の光では前進する。しかし、明期における光刺激では位相は大きく変化せず光不応期“Dead zone”となっている (Johnson, 1992)。これは、概日時計の位相変化が光により 1 日のいつでも起きてしまうと、いつでもだけ光を帯びるかにより日ごとに位相変化が大きく異なってしまい、環境光への同調が困難になってしまうため、そうならないように防ぐための重要なメカニズムであると考えられる。

これまで多くの研究者は、明期に閉じ暗期に開ける Dead zone を決める光情報のゲート機構が SCN のみにあると考え研究してきたが、その詳細は分かっていた (Colwell and Foster, 1992; Hamada et al., 2001; Kornhauser et al., 1990, 1993; Shigeyoshi et al., 1997)。SCN へ光情報を伝達する網膜には光感受性に日内変動があることが知られていたため、網膜のゲート機構が SCN のゲート機構の形成に寄与しているのではないかと考えた。近年、申請者らは、網膜においても神経活性化マーカーの光誘導性の cFOS 発現に概日リズムがあり、光刺激に対するゲート機構が存在することを発見した。しかし、網膜の概日時計は環境光によるシフトと SCN からの概日リズムの伝達の両方で制御されている可能性があり、その二つの因子を分離することが困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、飼育光環境と各刺激を制御することでその問題を解決し、網膜における概日時計の制御機構と、その概日時計による光感受性リズムの分子制御機構を解明し、活動リズムの位相反応への作用およびを明らかにすることを目的とする。さらには、光位相反応を示さない Deadzone への関与を明らかにすることで、臨床応用に展開するための基盤の創出を目指した。

3. 研究の方法

我々がこれまでの研究で発見した網膜の光感受性リズム (光照射による cFOS 発現リズム) を網膜の概日リズムのマーカーとして用いて、正常網膜マウスおよび網膜変性マウスで検証した。12 時間明期 12 時間暗期の明暗サイクルを 10 時間後退させる時差ぼけ実験を実施することで、環境光の同調刺激と、SCN からの液性・神経性刺激を分離した。時差ぼけ下では、SCN およびその支配下の活動リズムは再同調に 7 週間ほどかかる (Nagano et al., Brain Res 2019)。もし光が優位な刺激であれば、時差ぼけ下ではすぐに網膜のリズムがシフトするはずである。

さらに、上頸神経節除去、時刻依存的な制限給餌、副腎除去により SCN からの制御経路を同定し、薬理学的手法により同定経路のメカニズムを *in vivo* や培養下で検証を行った。

加えて、網膜発生時に発現する Chx10 遺伝子プロモーターの下流に cre リコンビナーゼ配列を組み込んだコンストラクトを遺伝子導入した Chx10cre マウスと、時計遺伝子の中で最も重要だと考えられている Bmal1 の Flox マウスを掛け合わせて、網膜特異的な時計遺伝子 Bmal1 欠損マウスを作成し (Storch et al., 2007)、網膜の概日時計が網膜の光感受性リズムに及ぼす影響を検証した。

4. 研究成果

網膜の光感受性リズムといった約 24 時間の概日リズムの詳細な実態や、その概日制御機構は不明なままであった。我々は、マウスの網膜の概日リズムは環境光よりも概日中枢である視交叉上核による同調機構が優位であることを世界で初めて発見した。さらに、それは副腎コルチコステロンを介して、網膜神経節細胞の概日時計を制御し、その網膜時計により網膜概日リズムが直接制御されていることを明らかにした。さらに、我々は網膜の時計は抑制性神経伝達物質 GABA 関連遺伝子の概日発現を制御し、GABA 関連遺伝子が昼間発現上昇することで、主観的昼における光感受性を抑制している可能性を示唆できた。詳細を下記に記載する。

1) 光受容器による網膜概日時計の制御機構

まず、cFOS にみられる光応答性が感受性マーカーとして使えるかを検証した。網膜神経節細胞では視細胞への光刺激によるシグナルにより脱分極し Ca^{2+} 流入が起こり CaMK が活性化される。リン酸化 CaMKII を経時的に解析したところ、cFOS 発現リズム同様、夜間高くなるリン酸化リズムがあることが分かり、光応答性だけでなく感受性にもリズムがあることが分かった。

網膜の概日時計は光により強力に制御される。光への同調に重要な非イメージ形成機能を担う光受容体は網膜の内顆粒層と神経節細胞 (RGC) 層にある Opn4 (青色認識) と Opn5 (紫外線認識) のみである (Buhr et al., 2015; Hattar et al., 2003; Kojima et al., 2011; Panda et al., 2003; Tarttelin et al., 2003; Yamashita et al., 2014)。光により直接、網膜の概日時計を介して光感受性を制御する仕組みを解明するため、光受容タンパク質と時計タンパク質との共局在を検証したと

ころ、光る誘導性の cFOS は OPN5 や OPN4 と共発現していた。これらの光受容細胞の光感受性の制御により、網膜の光感受性リズムが制御されている可能性が示唆された。

2) 光以外による網膜概日時計の制御機構

網膜の概日時計は中枢である SCN の影響を受けると考えられているが、その介在因子は全く分かっていない。実際、培養網膜のリズムを時計遺伝子 *Per2* のプロモーターにルシフェラーゼを導入した PER2::LUC マウスでモニタリングしたところ、培養網膜に光を 3 時間照射すると位相が後退することが分かった。そこで、時差ぼけ実験を実施し網膜リズムを解析したところ、予想とは反して活動リズムのようにゆっくり新しい明暗環境に再同調することが分かり、網膜は環境光よりも SCN に優位に制御されていることが示唆された (図 1)。これは、3.5 時間明期 3.5 時間暗期のウルトラディアンリズム環境でマウスを飼育しても網膜の PER2::LUC リズムが約 24 時間リズムを維持していたことから証明された。

SCN の概日シグナルは上頸神経節を介した交感神経、副腎を介した糖質コルチコイド、摂食リズムにより伝達される可能性がある (Balsalobre et al., 1998; Mohawk et al., 2012; Sujino et al., 2012; Yamazaki et al., 2000)。そこで、SCN による同調機構を同定するため、上頸神経節除去、副腎除去、制限給仕により、神経活性化マーカーの cFOS や時計遺伝子および時計関連遺伝子の発現解析により、光以外による網膜概日時計の制御因子の解明を試みた。その結果、上頸神経節除去では網膜の光感受性リズムに影響が生じなかったため、神経経路による同調機構ではないことが判明した。そこで SCN に制御された摂食リズムを介した、代謝リズムが制御している可能性を検証するため、本来夜行性マウスでは逆位相の昼間に摂食させる制限給餌をしたところ、網膜の時計遺伝子発現リズムや光感受性リズムに逆位相のピークが出現し、摂食リズムの影響を受ける副腎を除去すると、そのリズムが消失した (図 2A)。これらは、摂食リズムが副腎グルココルチコイドリズムに変換され、網膜に作用することを示唆する。そこで副腎除去マウスに生理的ピークとは逆位相の明け方にコルチコステロンを連続 5 日間腹腔内投与すると、逆位相のリズムが回復し、コルチコステロンがカギとなっていることを発見した (図 2A)。また網膜の視細胞層が欠損した網膜変性マウスでも検証したところ、同様の変動を確認し、網膜内層で制御されていることが判明した。

その後、網膜培養下でグルココルチコイド受容体の阻害剤 Mifepristone を投与することで、その後のコルチコステロン投与による網膜の時計タンパク質 PER1 および PER2 の発現誘導が抑制され、コルチコステロンの直接的な作用が示唆された。さらに、この阻害剤は網膜における cFOS にみられる光感受性リズムを減衰させ (図 2B)、グルココルチコイドの概日パターンが網膜の概日生理機能を制御していることが分かった。これらの結果は学会で発表し、現在論文投稿準備中である。

3) 光感受性リズムにおける網膜概日時計の寄与

その網膜生理機能が SCN からの直接的なシグナルによる制御ではなく、網膜時計の制御を介していることを証明するために、網膜特異的に時計遺伝子 *Bmal1* をノックアウトさせたマウス

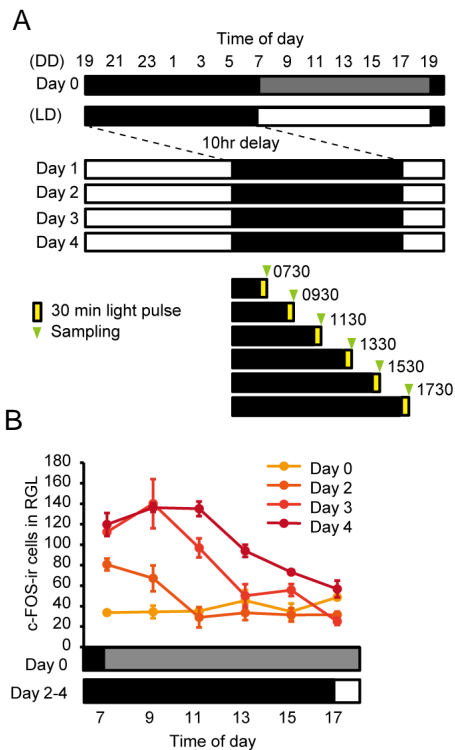


図 1 10 時間時差ぼけ実験における網膜光感受性リズムの位相変化。

(A) 12 時間 12 時間明暗周期を 10 時間後退させ暗期に 30 分光照射後サンプリング。(B) 時差ぼけの前と後ろ 2, 3, 4 日目における網膜 cFOS 発現リズムの位相変化。Means \pm SEM, N=4.

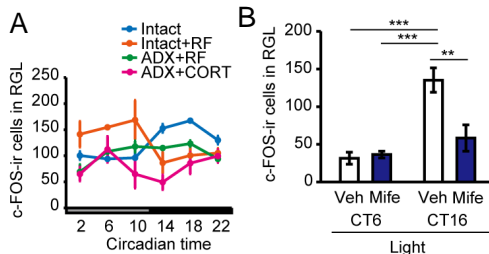


図 2 副腎グルココルチコイドによる網膜光感受性リズムへの影響。

(A) 主観的昼 (灰色バー) に 5 日間制限給餌 (RF) すると昼に cFOS が上昇し、副腎除去 (ADX) するとリズムが消失した。ADX マウスに朝コルチコステロン (CORT) を 5 日間腹腔内投与すると昼間にピークが生じた。(B) グルココルチコイド受容体阻害剤 (Mifepristone; Mife) を腹腔内投与すると夜間の上昇が抑制された。Means \pm SEM, n=3-6. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Two-way ANOVA, $P < 0.001$ Veh vs. Mife, Tukey's multiple comparison test)

(cKO) を、網膜特異的に発現する *Chx10* 遺伝子のプロモーターに Cre リコンビナーゼ配列を導入したマウス (RIKEN マウスバイオリソース) を導入し申請者がすでに保有する *Bmal1^{fllox}* マウスと掛け合わせて作成した。cKO マウスは網膜特異的に BMAL1 発現が抑制されていることを免疫組織化学で確認し、網膜における時計遺伝子の発現リズムも消失していることを確認した。cKO マウスでは、明暗環境下や恒暗条件下での活動リズムの周期に異常はなかったが、光照射による cFOS 発現誘導リズムは消失していた (図 3)。このマウスにける SCN や行動リズムにおける光位相反応への影響を検証したところ、光照射による活動リズムの位相反応は正常であり、SCN における光照射後の急性期遺伝子 *cFos* と *Per1* の発現誘導も正常であった。これらの結果は、網膜時計は網膜光感受性リズムを制御するが、その光感受性リズムは SCN の光感受性に影響しないことを示唆する。これは、つまり網膜のゲート機構は SCN ゲート機構の形成に関与しないことを意味する。この発見は、上記の網膜の光感受性リズムが消失する副腎除去マウスの SCN における *cFos* および *Per1* 発現が正常であり、そのマウスの活動リズムの光位相反応が正常であることから裏付けられた。

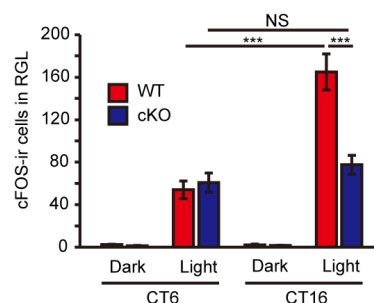


図 3 網膜特異的 *Bmal1* 欠損マウスにおける光感受性リズムへの影響。

網膜特異的 *Bmal1* 欠損マウス (cKO) は主観的夜 (CT16) における光感受性の上昇が抑制されて、昼 (CT6) 夜 (CT16) 差がなくなった。Means \pm SEM, n=4. ***P < 0.001 (Two-way ANOVA, P < 0.001, Tukey's multiple comparison test).

4) 網膜の概日時計による光感受性制御機構の解明

Opn4・*Opn5* は日内変動をほとんどしないことは予備実験で確認しており、光感受性リズムが光受容細胞の神経興奮がチャンネルタンパク質か神経伝達物質の合成・分泌・再取り込み・分解により制御されている可能性が考えられる。そこで真昼と真夜中における網膜のチャンネルタンパク質や神経伝達物質の合成分泌、分解、輸送、取り込み、受容体、シグナル伝達経路に関連する遺伝子 123 個を qPCR アレイで探索したところ主観的昼に発現亢進する GABA 受容体関連 X 遺伝子を発見した。この遺伝子はウェスタンブロット解析でも主観的昼に高くなった。プロモーター解析したところ、非常に短い領域のプロモーターでも自立振動発現することが分かった。この X タンパク質は神経節細胞に主に発現し、OPN4 や OPN5、光誘導性の cFOS および PER1 と共発現していた。薬理的手法により X タンパク質機能を低下させたところ、光感受性が変動した。これらの結果はグルココルチコイドにより制御される網膜時計が X タンパク質のリズムを制御し、光受容細胞の感受性を低下させている可能性が示唆している。そこで cKO マウスで検証したところ、X 遺伝子・タンパク質発現リズムが消失していたため、網膜時計は X 遺伝子発現を概日制御することで、網膜の概日リズムを制御すると考えられた。現在、網膜特異的 X 遺伝子欠損マウスを作成することで、X 遺伝子が網膜光感受性だけでなく、それが影響する視覚機能の概日リズムへも実際に影響があるかを視覚試験により検証中である。まとめ次第、論文で発表する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Ikegami K, Yoshimura T. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis and biological rhythms: the discovery of TSH's unexpected role using animal models. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 31, 475-485 (2017).
- 2) Nagano M, Ikegami K, Minami Y, Kanazawa Y, Koinuma S, Sujino M, & Shigeyoshi Y. Slow shift of dead zone after an abrupt shift of the light-dark cycle. *Brain Res*, 1714, 73-80 (2019).
- 3) Ikegami K, Refetoff S, Van Cauter E, & Yoshimura T. Interconnection between circadian clocks and thyroid function. *Nat Rev Endocrinol* (2019) (in press).

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 池上啓介「マウスにおける SCN によるコルチコステロンを介した網膜概日光感受性リズムの制御機構の解明」第 24 回日本時間生物学会 ポスター発表 2017 年 10 月
- 2) 池上啓介、重吉康史 「マウス網膜の概日光応答リズムは副腎コルチコステロンを介して視交叉上核に制御されている」第 13 回環境生理プレコンgres 口頭発表 2018 年 3 月

- 3) Keisuke Ikegami, Mamoru Nagano, Noriki Sugimoto, Kazumasa Saigoh, Yasufumi Shigeyoshi 「Gating systems of responses to light in mouse inner retina」第 94 回日本生理学会 ポスター発表 2018 年 3 月
- 4) 池上啓介、毛利彰宏、野田幸裕、増淵悟、重吉康史 「Pineal humoral factors suppress striatal glutamate signal transduction to avoid autism-like mental disorder in mice.」第 25 回日本時間生物学会 ポスター発表 2018 年 10 月
- 5) 池上啓介、増淵悟、重吉康史 「網膜概日リズムは概日時計中枢視交叉上核に影響を及ぼさない」第 14 回環境生理プレコングレス 口頭発表 2019 年 3 月
- 6) Keisuke Ikegami, Mamoru Nagano, Satoru Masubuchi, Yasufumi Shigeyoshi 「Retinal circadian rhythm is entrained by the SCN via corticosterone secretion from the adrenal gland」FAOPS2019 ポスター発表 2019 年 3 月

〔図書〕(計 件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。