

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06770

研究課題名（和文）哺乳類概日リズム獲得のエピジェネティック制御

研究課題名（英文）Epigenetic analysis for emergence of mammalian circadian rhythms

研究代表者

小池 宣也（Koike, Nobuya）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：00399685

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類概日時計は、発生過程で細胞分化が進むまでリズムを刻まないような仕組みが備わっている。本研究では、マウスES細胞の*in vitro*分化過程におけるクロマチン解析から、分化誘導後3週間にわたってステージ特異的なクロマチンリモデリングが観察された。さらに、概日リズム形成に必要なCLOCK/BMAL1タンパク質が発生初期に機能すると、ステージ特異的なクロマチンリモデリングに干渉することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類では全身のほとんどの細胞で概日リズムが観察されるが、ES細胞や胎生10日目までのマウス胎仔では概日リズムが形成されておらず、細胞分化の進行によって時計遺伝子の発現概日リズムが細胞自律的に出現する。本研究の結果は、発生過程で細胞分化が進むまでリズムを刻まないよう厳密に制御されていることの重要性を支持するものである。

研究成果の概要（英文）：In mammals, the emergence of circadian rhythm is strictly suppressed during early developmental stages as well as in pluripotent stem cells. In this study, we analyzed the chromatin accessibilities of mouse ES cells during *in vitro* differentiation. We found that the early expression of functional CLOCK, which is post-transcriptionally repressed in the early developmental stages, interferes with stage-specific chromatin remodeling. These findings suggest the importance of the late emergence of circadian clock during ontogenesis in mammals.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 概日時計 クロマチンアクセシビリティ

1. 研究開始当初の背景

地球上の多くの生物に備わる概日リズムは明暗サイクルなどの外部環境変化を正確に予測し生理活動を 24 時間周期に適応させている。哺乳類の概日リズム形成分子機構は時計遺伝子発現の転写翻訳フィードバックループで構成されており、CLOCK と BMAL1 が *Per* (*Per1*, *Per2*) 及び *Cry*(*Cry1*, *Cry2*)の発現を誘導し、その後 PER、CRY タンパク質が CLOCK/BMAL1 複合体を抑制するというサイクルで約 24 時間を刻んでいる。哺乳類では体中のほとんどすべての細胞にこの分子時計が備わっており、線維芽細胞などの培養細胞でも時計遺伝子の発現に約 24 時間周期の振動が観察できる。一方、ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞では概日時計の振動がみられないが、*in vitro* 分化誘導により細胞分化が十分に進行すると、細胞自律的に時計が形成される。申請者らは、マウス ES 細胞で転写因子 cMyc の過剰発現や DNA メチル化酵素(*Dnmt1*)の欠失株を用いた *in vitro* 分化誘導実験から、不完全な細胞分化では概日リズムが形成されないことを明らかにし、エピジェネティックプログラムによる遺伝子発現ネットワークの変化が概日時計形成に重要であることを発見した (Umemura, PNAS, 2014)。さらに、マウス個体発生においても、胎生 10 日目では概日転写リズムが形成されておらず、これには、ES 細胞分化誘導系と共通して *Clock* の転写後翻訳抑制が関与していることを明らかにしている (Umemura, PNAS, 2017)。このように、ES 細胞の分化誘導系と個体発生では共通のメカニズムが概日リズム形成に機能していることが示されたが、概日リズム獲得に関連するエピジェネティック制御機構の全容解明には至っていない。細胞分化や個体発生過程においてほとんどすべての細胞が獲得する概日時計機構と細胞機能発現がどのように関連しているのかという問いについて知見を得ることは、環境変化をあらかじめ予測し生理機能を最適化する概日時計発振プログラムの成立や、それが破たんする仕組みの理解につながる重要な課題である。現代の 24 時間社会ではシフトワーク等の急激な環境変化の繰り返しが様々な疾患リスクの上昇につながる事が指摘されており、その解決のためには、まず概日時計システム形成の本質的な理解が不可欠である。

2. 研究の目的

ES 細胞の分化誘導による多様な細胞種への分化や異なる細胞機能の獲得は、エピジェネティック制御によって細胞内で形成される転写ネットワークの違いに起因する。また、遺伝子制御部位(エンハンサー)の活性化は一連の遺伝子発現の変化に先行して起こるとされているため、細胞分化に伴うエンハンサーの活性化を比較解析することで、概日時計のリズム形成と細胞機能の連動を明らかにすることができる。ゲノム DNA は塩基性タンパク質のヒストンに巻かれてヌクレオソーム構造をつくっているが、その巻き付きはゲノム全体で均一ではなく、ヒストンタンパク質が巻き付いていないヌクレオソームフリーの領域(NFR)が存在し、転写因子の可触性が高い部位である。ヌクレオソームフリーの領域は ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing) によってクロマチンアクセシビリティ(転写因子の可触性が高い部位)として特定することができる。本研究では、クロマチンアクセシビリティの解析から、細胞分化と共役した概日リズム獲得過程におけるクロマチンリモデリングの変動を明らかにすることを目的とした。

3 . 研究の方法

我々の研究室で確立した ES 細胞の *in vitro* 分化誘導による概日リズム評価系は、細胞分化に伴った概日リズムの形成過程が非常に再現性良く追跡可能であり、明瞭な概日リズム出現には、2 週間以上を要する。この系を用いて、マウス ES 細胞を *in vitro* 分化誘導し、ES 細胞と分化誘導後 7, 14, 21, 28 日目の細胞を使って ATAC-seq を実施し、概日リズム獲得前後のクロマチンアクセシビリティの変化を解析した。さらに、ドキシサイクリン誘導性 CLOCK/BMAL1 発現 ES 細胞を用いて、本来 ES 細胞では機能していないはずの CLOCK/BMAL1 タンパク質を機能させた際のクロマチンアクセシビリティの変化も検討した。

4 . 研究成果

マウス ES 細胞と分化誘導後 7, 14, 21, 28 日目の細胞を使って ATAC-seq を実施し、クロマチンアクセシビリティの解析を行った結果、分化誘導後 7 日目には未分化状態の維持に関わる転写因子として知られる *Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2* 遺伝子周辺のクロマチンアクセシビリティの低下が見られ、RNA 発現量の低下と一致していた。それぞれの細胞分化過程においてクロマチンアクセシビリティの変化がみられたゲノム部位を抽出し比較したところ、ES 細胞から分化誘導後 7 日目では 9888、7~14 日目では 7410、14~21 日目では 1300 か所が同定され、クロマチンアクセシビリティは細胞分化過程においてゲノムワイドにダイナミックな変化を示していた。明瞭な概日リズムが出現する分化誘導後 21 日目以降のクロマチンアクセシビリティの変化はほとんど見られなかった。分化誘導後 7 日目でクロマチンアクセシビリティが減少した部位では、*Oct3/4*, *Sox2* の結合サイトが濃縮しており、また増加した部位では中胚葉系譜への分化に重要な転写因子の濃縮がみられるなど、クロマチンアクセシビリティの増減した部位のシーケンスモチーフ解析からは、ステージ特異的な転写因子の活性化が示唆された。さらに、ドキシサイクリン誘導性 CLOCK/BMAL1 発現 ES 細胞を用いて、ES 細胞では発現していない CLOCK タンパク質を発現させて分化誘導を行った結果と比較すると、分化誘導後 7 日目では約 49%、14 日目では約 24%、21 日目では約 26% の部位で、クロマチンアクセシビリティ変動量の有意な減少がみられた。これらの結果は、細胞分化過程において本来機能していない CLOCK タンパク質が早期に機能すると、ステージ特異的なクロマチンリモデリングに干渉することを示しており、哺乳類において、細胞分化が十分に進行するまで遅れて概日リズムが形成されることの重要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Mosig Rebecca A., Castaneda Allison N., Deslauriers Jacob C., Frazier Landon P., He Kevin L., Maghzian Naseem, Pokharel Aarati, Schrier Camille T., Zhu Lily, Koike Nobuya, Tyson John J., Green Carla B., Takahashi Joseph S., Kojima Shihoko	4. 巻 35
2. 論文標題 Natural antisense transcript of Period2, Per2AS, regulates the amplitude of the mouse circadian clock	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 899 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.343541.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ono Ryutarō, Abe Makoto, Koike Nobuya, Inokawa Hitoshi, Tsuchiya Yoshiki, Umemura Yasuhiro, Sasawaki Yuh, Yamamoto Toshiro, Wakisaka Satoshi, Kanamura Narisato, Yagita Kazuhiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Quantitative morphometric analysis of molar teeth and alveolar bone using micro-computed tomography in aged mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 265 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.07.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Umemura Yasuhiro, Koike Nobuya, Tsuchiya Yoshiki, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Kageyama Ryoichiro, Yagita Kazuhiro	4. 巻 119
2. 論文標題 Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2114083119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114083119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wirianto Marvin, Wang Chih Yen, Kim Eunju, Koike Nobuya, Gomez Gutierrez Ruben, Nohara Kazunari, Escobedo Gabriel, Choi Jong Min, Han Chorong, Yagita Kazuhiro, Jung Sung Yun, Soto Claudio, Lee Hyun Kyoung, Morales Rodrigo, Yoo Seung Hee, Chen Zheng	4. 巻 36
2. 論文標題 The clock modulator Nobiletin mitigates astroglial associated neuroinflammation and disease hallmarks in an Alzheimer's disease model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101633R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kim Hee Kee, Lee Sun-Yeul, Koike Nobuya, Kim Eunju, Wirianto Marvin, Burish Mark J., Yagita Kazuhiro, Lee Hyun Kyoung, Chen Zheng, Chung Jin Mo, Abdi Salahadin, Yoo Seung-Hee	4. 巻 10
2. 論文標題 Circadian regulation of chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain and the underlying transcriptomic landscape	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70757-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Benkli Barlas, Kim Sun Young, Koike Nobuya, Han Chorong, Tran Celia K., Silva Emma, Yan Yuanqing, Yagita Kazuhiro, Chen Zheng, Yoo Seung-Hee, Burish Mark J.	4. 巻 100
2. 論文標題 Circadian Features of Cluster Headache and Migraine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e2224 ~ e2236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000207240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mawatari Kazuaki, Koike Nobuya, Nohara Kazunari, Wirianto Marvin, Uebanso Takashi, Shimohata Takaaki, Shikishima Yasuhiro, Miura Hiroyuki, Nii Yoshitaka, Burish Mark J., Yagita Kazuhiro, Takahashi Akira, Yoo Seung Hee, Chen Zheng	4. 巻 67
2. 論文標題 The Polymethoxyflavone Sudachitin Modulates the Circadian Clock and Improves Liver Physiology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition & Food Research	6. 最初と最後の頁 e2200270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mnfr.202200270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakai Hiroko, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Asano Taiki, Ueno Morio, Umemura Yasuhiro, Sasawaki Yuh, Ono Ryutaro, Hamuro Junji, Sotozono Chie, Yagita Kazuhiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Comprehensive Analysis Identified the Circadian Clock and Global Circadian Gene Expression in Human Corneal Endothelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 16 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.63.5.16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inokawa Hitoshi, Umemura Yasuhiro, Shimba Akihiro, Kawakami Eiryō, Koike Nobuya, Tsuchiya Yoshiki, Ohashi Munehiro, Minami Yoichi, Cui Guangwei, Asahi Takuma, Ono Ryutaro, Sasawaki Yuh, Konishi Eiichi, Yoo Seung-Hee, Chen Zheng, Teramukai Satoshi, Ikuta Koichi, Yagita Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Chronic circadian misalignment accelerates immune senescence and abbreviates lifespan in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59541-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ono Ryutaro, Koike Nobuya, Inokawa Hitoshi, Tsuchiya Yoshiki, Umemura Yasuhiro, Yamamoto Toshiro, Kanamura Narisato, Yagita Kazuhiro	4. 巻 52
2. 論文標題 Incremental Growth Lines in Mouse Molar Dentin Represent 8-hr Ultradian Rhythm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.19017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Maho, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Umemura Yasuhiro, Inokawa Hitoshi, Togashi Yuichi, Maniwa Junnosuke, Higashi Mayumi, Fumino Shigehisa, Tajiri Tatsuro, Yagita Kazuhiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Enhanced metastatic growth after local tumor resection in the presence of synchronous metastasis in a mouse allograft model of neuroblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1403 ~ 1411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04568-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umemura Yasuhiro, Maki Izumi, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Yagita Kazuhiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Human Circadian Molecular Oscillation Development Using Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 525 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0748730419865436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Ryosuke, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Umemura Yasuhiro, Inokawa Hitoshi, Ono Ryutaro, Inoue Maho, Sasawaki Yuh, Grieten Tess, Okubo Naoki, Ikoma Kazuya, Fujiwara Hiroyoshi, Kubo Toshikazu, Yagita Kazuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 REV-ERB and REV-ERB function as key factors regulating Mammalian Circadian Output	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46656-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小池宣也, 梅村康浩, 井之川仁, 笹脇ゆふ, 土谷佳樹, 八木田和弘
2. 発表標題 Systematic phenotyping in presymptomatic state of circadian rhythm disorders
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小池宣也, 梅村康浩, 井之川仁, 笹脇ゆふ, 土谷佳樹, 八木田和弘
2. 発表標題 , 階層を超えた包括的フェノタイプ解析による概日リズム障害成立プロセスの解明
3. 学会等名 第113 回近畿生理学談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小池宣也, 梅村康浩, 八木田和弘
2. 発表標題 Chromatin accessibility dynamics across in vitro cellular differentiation
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池宣也, 梅村康浩, 八木田和弘
2. 発表標題 慢性的概日リズム不適合による病態成立プロセス
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎熙成、小池宣也、八木田和弘
2. 発表標題 明暗シフト環境暴露に伴う腸内細菌叢の変容プロセス
3. 学会等名 第114回近畿生理学談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎熙成、小池宣也、八木田和弘
2. 発表標題 明暗シフト環境暴露に伴う腸内細菌叢の変容プロセス
3. 学会等名 第12回4大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎熙成、小池宣也、八木田和弘
2. 発表標題 長期間明暗シフト環境暴露に伴う腸内細菌叢の時系列変容プロセス
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 被験者の概日リズムを提示するための提示装置、提示方法、及び提示プログラム	発明者 八木田和弘、小池宣也、笹脇ゆい	権利者 京都府公立大学法人
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-557592	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	UTHealth Houston	Virginia tech	