

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16371

研究課題名(和文)概日時計プログラムによる炎症性掻痒の日内変動の分子基盤と時間薬理への応用

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying circadian pruritic behavior for chronopharmacology

研究代表者

三宅 崇仁(Miyake, Takahito)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70836866

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)：概日時計プログラムによる炎症性掻痒の日内変動の分子基盤の解明とその時間薬理への応用に向け、マウスの概日生理リズムを多角的に観察可能なシステムを開発し(Shimatani et al, PLoS ONE, 2021)、体内時計周期長調節を司るGPCR Gpr176の発現量がN型糖鎖修飾で制御されることを見出し(Wang et al, Sci Rep, 2020)。かゆみと同じく末梢器官の局所変化が病態に結びつくマイボーム腺機能不全において、NAD+を介したマイボーム腺局所ステロイド合成量の変化が本病態増悪に結びつくことを明らかにした(Sasaki et al, Nat Aging, 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでかゆみをはじめとした末梢器官の機能異常が引き金となる疾患に関する多くの研究では、末梢器官に発現する分子に焦点を当てるものが多く、そこに時間の概念は無かった。生体内の時間を形成する体内時計の制御機構に関しては、体内時計コア遺伝子mRNAの発現リズム調節を介した機構がこれまで明らかになってきたが、非転写型の調節機構にはまだ未解明な部分が残されている。そのような中本研究では、体内時計制御分子の発現量が翻訳後修飾によって制御されること、眼瞼における低分子NAD+量の概日振動がマイボーム腺機能の維持に重要であることを見出した。時間薬理学を行う上での重要な基礎を築くことができたといえる。

研究成果の概要(英文)：In the course of elucidating the molecular mechanisms underlying circadian pruritic behavior for chronopharmacology, we found that the N-type glycosylation of Gpr176, an orphan GPCR that sets the pace of the circadian clock, plays an important role in the regulation of its protein expression level (Wang and Nakagawa et al, Sci Rep, 2020), developed a system that enables us to observe a number of circadian rhythms in physiology simultaneously (Shimatani et al, PLoS ONE, 2021), and found that in meibomian gland dysfunction, in which local changes in peripheral organs are associated with the development of its pathogenesis like itch, an age-related decrease in NAD+ leads to a decrease in local steroid synthesis, which result in an exacerbation of the disease (Sasaki, Hamada, and Yarimizu et al, Nat Aging, 2022).

研究分野：生化学

キーワード：体内時計 発現制御機構 翻訳

1. 研究開始当初の背景

生物時計 Biological Clock は、地球の自転にともなう昼夜の規則正しい変動に基づき形成された、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みである。本研究では『かゆみ』という神経感覚が一日のなかで消長する仕組みを解明する。アトピー性皮膚炎をはじめとした慢性的かゆみは、夜間に増強し、不眠等の原因となる。しかし、かゆみ強度の日内変動の本態に迫った本格的な基礎研究は国際的にみても皆無に等しい。そこで本研究では、生物時計や TRP チャネルなどの分子の細胞内発現制御機構やその連環に着目した検討を展開する。具体的には、所属研究室が所有する Per1/2/3・Cry1/2・Bmal1 の欠損 (KO) マウスや時計遺伝子発現レポーターマウス等を用いて、生化学的アプローチ・行動実験を組み合わせ、TRP チャネルや生物時計振動の制御分子の発現及び翻訳後修飾の日内変動とかゆみ等による炎症との関係を分子レベルまで明らかにする。本研究は、生物時計を基盤とした分子プログラムによるかゆみ症状の日内変動機構を明らかにし、将来的にヒトにおけるかゆみ時間症状の実体の解明とその緩和治療法の確立に資する知見を得ることを目標とする。

2. 研究の目的

従来までの数多くのかゆみの研究は、末梢から脳へのかゆみ情報の伝達経路にのみ焦点を当て、そこには時間の概念がなかった。そこで本研究では、生体内の時間を形成する生物時計に着目し、生物時計によるかゆみ強度制御メカニズムの解明を目的に研究を進める。細胞実験・動物実験に基づいたアプローチにより、各時計遺伝子が TRP チャネルやその制御分子の発現を制御するメカニズムの原点を明らかにし、今までに存在しなかった、ステロイドに頼らない全身作用性のかゆみ治療薬の創成につながる足掛かりとなる基礎的な知見を提供する。本研究で得られた成果は、新規かゆみ治療薬の創成に繋がるだけでなく、既存かゆみ治療薬の使用方法に対して、かゆみの日内変動リズムに合わせた時間薬理学的な改良を行うきっかけを提供できる。このように本研究は、基礎科学的にかゆみ強度が時刻依存的に変化する分子メカニズムを解明するだけでなく、臨床の場に対しても重要な発展をもたらす可能性があると考えられている。

3. 研究の方法

所属研究室でこれまでに用いてきた中核時計タンパク質 Per2 への特異的抗体や、ゲノム内 Per2 のコーディング領域の終末にレポーター遺伝子ルシフェラーゼを融合させたマウス (Per2::Luc マウス) を用いて、時計遺伝子発現の日内変動を観察した。また、暗条件の下でマウスの体温や行動を非侵襲に長期にわたり観察するために、赤外線ビデオサーモグラフィー (FLIR Systems 社製サーモグラフィー用長波長赤外線カメラ Tau 2) を用いたマウス体表面温度計測を行った。In vitro における生化学実験に関しては常法に従って行った。なお、本研究における遺伝子改変体 (動物・細胞等) を用いる実験は、京都大学 (所属機関) において組換え DNA 実験計画書を提出し承認を得て行っており、本研究におけるすべての動物実験に関しては、京都大学において策定された動物実験倫理規定に従ったプロトコルの下、動物実験委員会による承認を得た後に実施している。

4. 研究成果

本研究を始めるにあたり申請者は、末梢神経の形態的性質、すなわちゲノムのある細胞体とタンパク質が機能する神経終末とは物理的距離として大きくかけ離れているということ気が付いた。そこで申請者は、従来提唱されてきたようなゲノムからの mRNA 転写に依存したようなタンパク質量制御ではなく、リン酸化などによるタンパク質の翻訳後修飾の過程に、かゆみの概日性制御の鍵があるのではないかと仮説を立て、検証を行った。

かゆみ信号は、ヒスタミン受容体や Mas 関連 G タンパク質共役受容体 (Mrgpr) などの GPCR の活性化によって発生し、これがイオンチャネルである TRPV1/TRPA1 等によって電気信号へ変換され、神経伝達系を介して脳へと伝達されると考えられている。そこで申請者らは GPCR の膜上発現量制御機構に着目し、GPCR のひとつ Gpr176 に着目し検討を行った。Gpr176 のアミノ酸配列をデータベースより取得し、その中からリン酸化酵素・糖鎖修飾酵素の認識配列を探索した。する

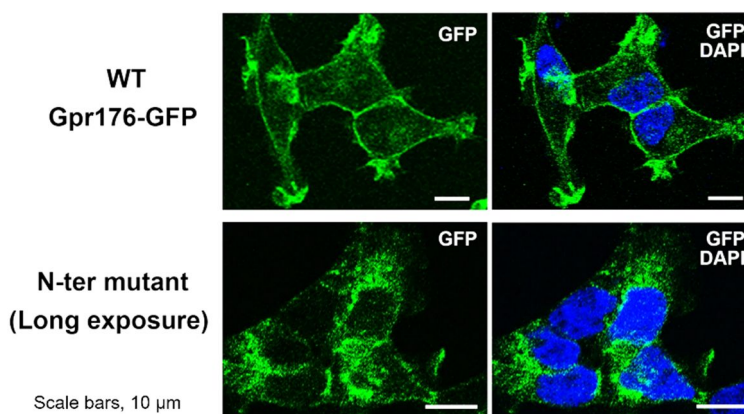


図1 N型糖鎖修飾による Gpr176 膜上発現制御

と、Gpr176 の N 末端側細胞外領域に、複数の N 型糖鎖修飾部位が存在することが示唆された。そこで実際に N 型糖鎖修飾を受けると推定されたアスパラギン (N) をアラニン (A) に置換した変異体 (Gpr176-N-ter-mutant) を作製したところ、Gpr176-N-ter-mutant は通常の Gpr176 と比較して細胞膜上発現量が顕著に減少することが明らかになった (図 1, Wang & Nakagawa *et al.*, *Scientific Reports*, 2019 より転載 (一部改変))。細胞膜に発現している Gpr176 の N 型糖鎖修飾を、N 型糖鎖分解酵素 PNGase F で分解しても Gpr176 の GPCR 活性に影響はなかったことから、当該 N 型糖鎖修飾は主として、Gpr176 タンパク質の細胞膜上への移行過程に関与することがわかった (Wang & Nakagawa *et al.*, *Scientific Reports*, 2019)。

マウスや我々ヒトをはじめとした哺乳類は恒温動物である。恒温動物の「恒」は「恒久」に使われるように長期に不変な様子を示すが、その実は異なる。恒温動物の体温は、1~3 の振幅で、一日の中で活発な活動期に上昇し、休息期に低下するという規則的な概日変動を示す。この概日体温振動リズムは脳内にある生物時計中枢視交叉上核によって制御されており、全身に散在する末梢細胞時計の時刻の調律に重要な役割を果たすと考えられている。そのような背景から、申請者は、TRP チャンネルが温度によって活性化調節を受けることから、皮膚表面における概日体温振動リズムがかゆみ強度を変化させる可能性に気付いた。そこで申請者は、非侵襲的にマウス体表面温度を計測できる赤外線ビデオサーモグラフィーを用いたマウス体温行動同時測定法の開発を行った。背面を除毛したマウスの表面温度を自由行動下で測定したところ、マウス体表面には温度が高い部位 (眼など) が存在するため、マウスの姿勢によってその部位の見え方が変わり、マウス体表面温度の最高値は大きくばらつくことがわかった。そこで申請者は姿勢による変動を最小限に抑えるため、最高温度から数えて 200 番目のピクセルが示す表面温度をマウスの体温と定義することにした。これにより適切な体温観察が可能となり、既報で示されるような概日体温変動 (二峰性の顕著な体温リズム) を申請者らの方法によってとらえることに成功した (図 2, Shimatani *et al.*, *PLOS ONE*, 2021 より転載 (一部改変))。

赤外線ビデオサーモグラフィーにより得られた動画において、温度の高い領域をマウスと定義してやれば、本動画の情報から、マウスの体表面温度だけではなく、マウスの行動量も評価することができる。これを行うために申請者は、Density-based Spatial Clustering of Applications with Noise (DBSCAN) と呼ばれるクラスター解析の手法を用いて、マウスの身体全体の位置情報を 1 つのクラスターとして抜き出し、その面積の重心をマウスの位置として定義した。この重心位置を動画の各フレームにおいて算出し、連続するフレーム間における重心位置の差分距離を計算することによって、マウスの行動量を評価した。この方法によって、活動リズムと体温リズムを同時計測することが可能になった。さらに申請者は、AI 画像解析技術 DeepLabCut アルゴリズムを用いた機械学習を組み合わせ、サーモグラフィー画像からマウスの鼻先を含めた身体各部分位置を自動的に判定することに成功した。このマウス各部分の

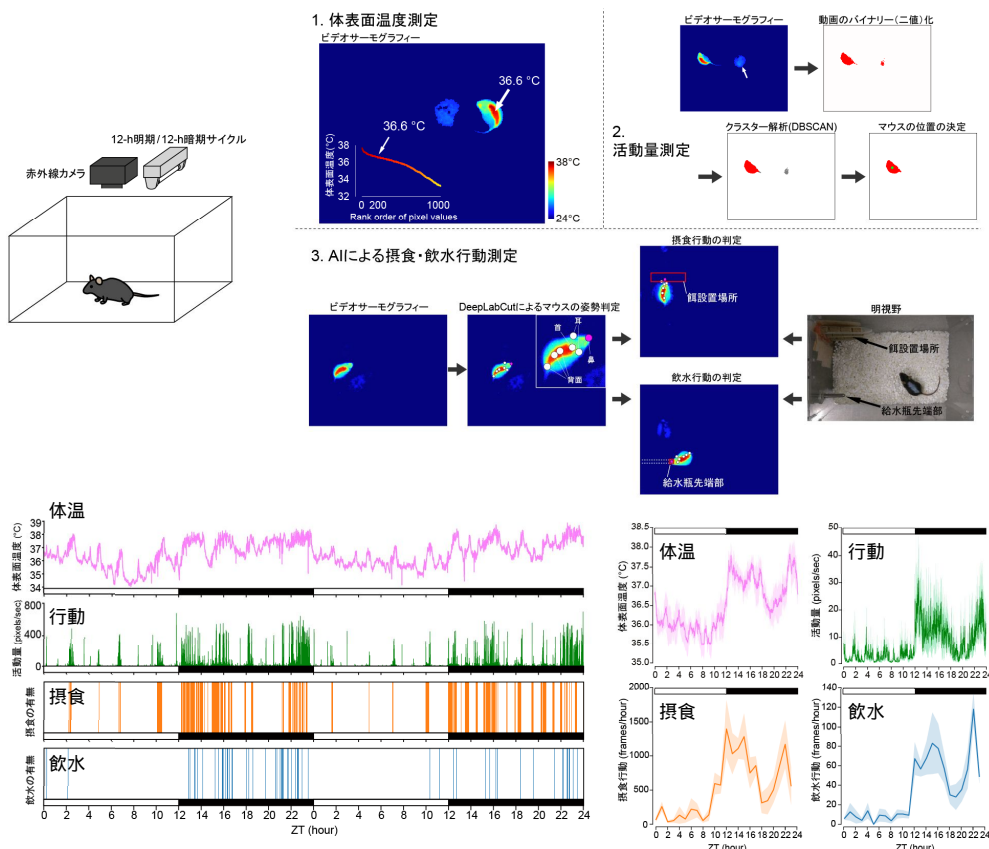


図 2 赤外線ビデオサーモグラフィーを用いたマウス体温・行動・摂食・飲水の概日リズム測定

位置情報を元に、マウスの鼻部が給水瓶の先あるいは給餌場所にある時間を求めることにより、申請者らは飲水・摂食においても体温・歩行と同様の二峰性の顕著な概日活動リズムがあることを見出した(図2, Shimatani *et al.*, *PLoS ONE*, 2021より転載(一部改変))。これまで申請者らを含む多くの研究者は、赤外線センサーや飼育ケージ内に設置した回し車を用いてマウスの行動量を評価してきた。これらの方法は、比較的簡便なマウス活動測定法であり、なおかつマウスの内因性サーカディアン周期や、マウス体内時計の光等の刺激に伴う位相変化の量を求める上で最も信頼度の高い方法である。しかし、これらの方法では多くの空間的情報が検出の過程で除かれてしまい、例えば、飲水・摂餌など、特定の場所で行う活動を他と区別して記録することは不可能である。また、これまで体温の連続計測に用いられてきた小型インプラント温度センサーに関しては、装着時に開腹手術を要するためマウスに対して侵襲性が高いこと、また電力が限られることから長期にわたる測定は不可能であることなど、いくつかの改良すべき点が残っていた。本研究で新たに開発した赤外線ビデオサーモグラフィーを用いたマウス体温行動同時測定法は、このような課題を克服し、これまでより高い時間分解能(申請者らのシステムでは 30 fps)および空間分解能でマウス体表面温度変化や行動変化や、それらの概日周期性を観察することを可能にした。本法は今後、特定の研究領域ではなく幅広い研究領域において、わが国の科学研究の発展に貢献できる可能性が高いと、申請者らは考えている。

かゆみは老化に伴い皮膚の乾燥によって生じることが知られている。皮膚表面は通常、皮脂腺等による皮膚表面への脂質の分泌により乾燥から守られているが、老化によりこの機構が減衰することで、皮膚が乾燥してしまうと考えられる。しかし、どうして老化に伴い脂質の分泌が変化するのか、その詳細は明らかになっていない。そのような中申請者らは、皮脂腺と同じく脂質を分泌するマイボーム腺に着目し、その老化に伴う機能変遷について検討した。するとマイボーム腺は老化に伴い、ヒトでもマウスでも顕著に委縮することがわかった(Sasaki, Hamada & Yarimizu *et al.*, *Nature Aging*, 2022)。また興味深いことに、時計遺伝子 *Bmal1*-KO マウスにおいても、老化マウスに見られるようなマイボーム腺の委縮が起きていることがわかった。そこでマイボーム腺での時計遺伝子発現リズムを確かめるため、時計遺伝子 *Per2*-ルシフェラーゼレポーターマウス(*PER2::LUC* マウス)よりマイボーム腺切片を作製し、その発光の様子を CCD カメラを用いて観察した。すると、マイボーム腺切片は、体外へ切り出された影響で視交叉上核をはじめとした上流の概日リズム制御器官からの制御を受けられないにもかかわらず、5 日以上も続く自律的な 24 時間周期の *Per2* タンパク質発現振動を示すことが明らかになった(図3, Sasaki, Hamada & Yarimizu *et al.*, *Nature Aging*, 2022より転載(一部改変))。さらに申請者らは、*PER2::LUC* マウスと *Bmal1*-KO マウスとを交配させることで *PER2::LUC Bmal1*-KO マウス(*PER2::LUC Bmal1*^{-/-})を作製し、同様の検討を行ったところ、上記のような概日性の *Per2* タンパク質発現振動はほとんど観察されないことがわかった。このことから、マイボーム腺は他の器官に頼らず自立した概日時計遺伝子発現リズムを示すことが明らかになった。さらに申請者らは、この *Per2* タンパク質発現振動がマイボーム腺内のどこで起きているのかをより詳細に確かめるために、*PER2::LUC* の発光像を撮像した後、同一切片をその場で脂質染色剤 Nile Red (1 μg/mL, MP biomedical) により染色し、赤色蛍光像を撮像した。その後、これらの 2 つの像を重ね合わせてみると、*PER2::LUC* の発光は、Nile Red で染色された脂質を取り囲むように存在することが明らかになった(図3, Sasaki, Hamada & Yarimizu *et al.*, *Nature Aging*, 2022より転載(一部改変))。マイボーム腺は全分泌を行う器官であり、基底細胞が分化に伴い脂質を蓄え、その後細胞自身が破裂することによって脂質を外へ分泌することが知られている。上述の結果から、マイボーム腺における基底細胞は自律的に振動する細胞時計を有しており、老化に伴いこの時計の振動が弱くなることで、腺としての脂質分泌能が減衰し、老化に伴うマイボーム腺機能障害等が発症することが明らかになった(Sasaki, Hamada & Yarimizu *et al.*, *Nature Aging*, 2022)。

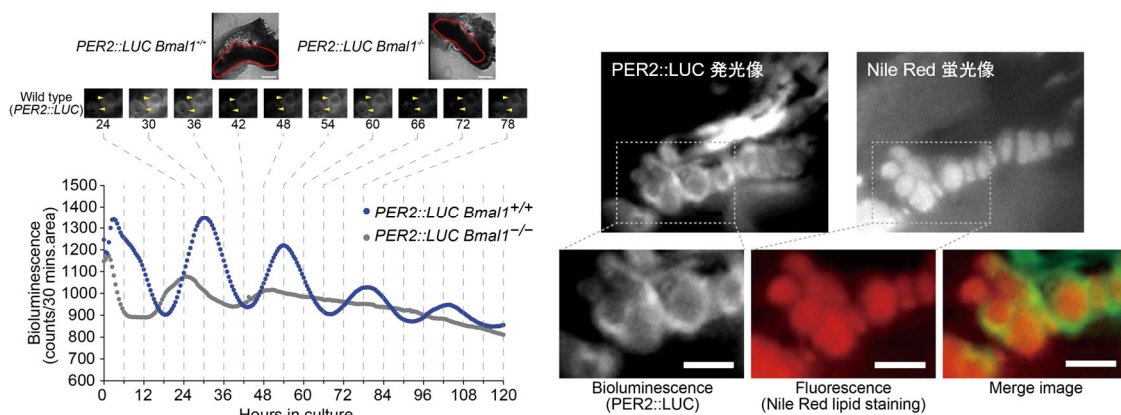


図3 マウスマイボーム腺基底部分における自律した概日時計遺伝子発現リズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahito Miyake, Masao Doi	4. 巻 30
2. 論文標題 Reconstitution of Organismal Liver Clock Function Requires Light.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in endocrinology and metabolism	6. 最初と最後の頁 569-571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tem.2019.07.017	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 Tianyu Wang, Shumpei Nakagawa, Takahito Miyake, Genzui Setsu, Sumihiro Kunisue, Kaoru Goto, Akira Hirasawa, Hitoshi Okamura, Yoshiaki Yamaguchi, Masao Doi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification and functional characterisation of N-linked glycosylation of the orphan G protein-coupled receptor Gpr176	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61370-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 -
1. 著者名 Yamaguchi Yoshiaki, Murai Iori, Goto Kaoru, Doi Shotaro, Zhou Huihua, Setsu Genzui, Shimatani Hiroyuki, Okamura Hitoshi, Miyake Takahito, Doi Masao	4. 巻 11
2. 論文標題 Gpr19 is a circadian clock-controlled orphan GPCR with a role in modulating free-running period and light resetting capacity of the circadian clock	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01764-8	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 Shimatani Hiroyuki, Inoue Yuichi, Maekawa Yota, Miyake Takahito, Yamaguchi Yoshiaki, Doi Masao	4. 巻 16
2. 論文標題 Thermographic imaging of mouse across circadian time reveals body surface temperature elevation associated with non-locomotor body movements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0252447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0252447	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 三宅 崇仁、土居 雅夫	4. 巻 74
2. 論文標題 特集 温度を感じる脳と身体の科学 体温の日内リズム制御における概日時計機構の役割	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 159 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416202001	査読の有無 無
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 Sasaki L, Hamada Y, Yarimizu D, Suzuki T, Nakamura H, Shimada A, Nguyen Pham KT, Shao X, Yamamura K, Inatomi T, Morinaga H, Nishimura EK, Kudo F, Manabe I, Haraguchi S, Sugiura Y, Suematsu M, Kinoshita S, Machida M, Nakajima T, Kiyonari H, Okamura H, Yamaguchi Y, Miyake T, Doi M	4. 巻 2
2. 論文標題 Intracrine activity involving NAD-dependent circadian steroidogenic activity governs age-associated meibomian gland dysfunction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 105 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-021-00167-8	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 シャオ シンイェン、三宅 崇仁、土居 雅夫
2. 発表標題 Circadian PER2 protein oscillations do not persist when de novo translation is inhibited in cultured mouse embryonic fibroblasts
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井ノ上 雄一、三宅 崇仁、土居 雅夫
2. 発表標題 体内時計の温度同調機構：生理的な範囲の温度変化が培養マウス繊維芽細胞の分子時計に与える影響について
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅 崇仁、井ノ上 雄一、土居 雅夫
2. 発表標題 微小な温度変化がもたらすmRNA翻訳速度調節と概日時計制御
3. 学会等名 Biothermology Workshop - 2021's Annual Workshop
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅 崇仁、井ノ上 雄一、土居 雅夫
2. 発表標題 翻訳速度制御を介した体内時計のパラメトリック制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅 崇仁、井ノ上 雄一、土居 雅夫
2. 発表標題 生理的体温変化による体内時計のパラメトリック制御
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 グエン ファム カン ティエン、三宅 崇仁、土居 雅夫
2. 発表標題 A robust and sustained circadian rhythm of Per2:: <i>Luc</i> expression in the mouse meibomian gland acinar cells
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	土居 雅夫 (Doi Masao) (20432578)	京都大学・大学院薬学研究科・教授 (14301)	
研究協力者	山口 賀章 (Yamaguchi Yoshiaki) (30467427)	京都大学・大学院薬学研究科・講師 (14301)	

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
---------	---------