

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07282

研究課題名(和文)概日リズム睡眠障害の解消を目指した体内時計制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Circadian Clock Regulation Mechanisms for Resolution of Circadian Rhythm Sleep Disorders

研究代表者

南陽一(Minami, Yoichi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授

研究者番号：40415310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では体内時計の調節による概日リズム睡眠障害の解消を目的とし、ヒトと似た概日リズム周期をもつラットを用いた研究を行った。この研究では、(1)時計遺伝子BMAL1の優生変異体を導入したモデル動物(BMAL1-DN TGラット)を作出して同調能に与える影響を評価した。また、(2)よりシビアに体内時計を障害した遺伝子改変ラット(Vipr2欠損ラット)を作出して、表現型を解析した。この研究により、(1)体内時計の頑強性を弱めることで新規環境への同調能を高められることを示し、(2)今後の研究に有用なモデル動物の作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は概日リズムを弱めることで睡眠障害の1つである時差ぼけ(Jet lag)を解消する、すなわち新規環境への適応を早めることができることを動物実験で示した研究である。また、これまで有用性があるにも関わらず、体内時計障害モデルの開発が進んでいなかった動物種であるラットで、新規に概日リズムを大きく障害するモデルを開発することに成功したものである。前者は一時的に体内時計の機能を弱めることが却って体内時計調節に有用である可能性を示すものであり新規の視点を与える発見であった。後者は今後、学界の発展に大きく寄与すると期待できる成果であった。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to cancelation of circadian rhythm sleep disorders by regulating the circadian clock, and used rats with a circadian rhythm length similar to that of humans. In this study, (1) we evaluated entrainment ability to new light conditions using model animals (BMAL1-DN TG rats) having a dominant negative mutant of the clock gene BMAL1 as a transgene. In addition, (2) genetically engineered rats with a more severely impaired biological clock (Vipr2-deficient rats) were generated and their phenotype was analyzed. We showed that (1) the ability to entrain to a novel light environment can be enhanced by attenuating the robustness of the internal circadian clock, and (2) we succeeded in establishing a useful model animal for future circadian/sleep research.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 体内時計 VIP 遺伝子改変ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

概日リズム睡眠障害は体内時計が発振する睡眠・覚醒リズムの異常である。体内時計は体の中に「1日」を作り出すメカニズムであり、視床下部視交叉上核(SCN)にその中枢がある。SCNからは液性・神経性に体内に情報が伝えられ、様々な生理機能に約1日周期のリズム(概日リズム)を作り出す。体内時計の調整を通じ、ヒト概日リズム睡眠障害を解消する方法は、十分に探求されていない。

マウスは24時間より短い周期の体内時計を持ち、夕刻の光で体内時計を外界の光環境に合わせる。一方、ラットは人型の体内時計で、24時間より長い周期の体内時計を持ち、朝の光を使って時刻を合わせる。加えてラットでは高血圧症や糖尿病、心血管障害など様々な病態モデルが確立しており、病態と体内時計の関係を研究する上で有用である。体内時計研究で、発光で概日時計機能を検討できる発光レポーター遺伝子をもつトランスジェニック動物の開発は、はじめラットで報告され(*Per1-Luc* TGラット, Yamazaki *et al.* Science, 2001)、次第にマウスのモデルに意向していった。これはラットでは遺伝子改変が難しく、遺伝子欠損モデルの開発が進まなかったのと対比的に、マウスでは様々な時計遺伝子改変モデルの開発が進んできたことが大きい。しかしCRISPR/Cas9法の急速な発展により状況が大きく変わり、研究室レベルで遺伝子欠損ラットを開発することが可能になり、体内時計障害モデルラットの開発も可能になってきた。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、体内時計の異常を簡便に検出するための技術開発を続けてきた(Ueda *et al.* PNAS, 2004; Minami *et al.* PNAS, 2009; Kasukawa *et al.* PNAS, 2012)。本研究では、ヒトへの応用を視野に、改めてラットに注目したモデル動物の開発と同調機構の解析を行った。

(1)時差ぼけに見られるように、内在性の時計機構が頑強であることが原因となり、外界の時間的変化への対応の遅れを導き、健康リスクとなることがある。申請者らは、BMAL1ドミナントネガティブ体を発現するトランスジェニックラット(BMAL1 DN(+))TGラットを開発した(基盤C 17K11021)。BMAL1ドミナントネガティブ体は、正常BMAL1を競合的に阻害して時計機能を障害する(Kiyohara *et al.* PNAS, 2006)。体内時計は頑強性(安定した振動を刻む性質)と柔軟性(外界の情報をいれ新しい環境に順応できる性質)のバランスで成り立つ精巧な仕組みであるが、頑強性を弱めることで柔軟性が高まる、すなわち時差ぼけを減少させることができると考えた。BMAL1 DN (+) Tgラットの解析を通じ、体内時計の機能を弱めて時差ぼけなどの概日リズム障害を克服する可能性に迫った。

(2)遺伝子欠損マウスの知見から、血管作動性腸管ペプチド(VIP)2型受容体(VIPR2)欠損は、体内時計の分子機構に直接影響しないが、SCNの個々の細胞を脱同期させ(時刻がバラバラにして)時計機能を弱めることが知られている(Harmer *et al.* Cell, 2002; Asnicar *et al.* Endocrinol. 2002)。体内時計をよりシビアに障害したモデルラットの作出を求め、CRISPR/Cas9法により*Vipr2* KOラットを作出し、表現型を解析した。

3. 研究の方法

(1) BMAL1 DN(+)) TGラットの表現型解析

BMAL1 DN(+)) TGラットは、*Per2*-dLuc TGラットにマウスプリオン遺伝子骨格を利用した転写調節カセットに組み込んだ*Bmal1* 変異体遺伝子を導入したトランスジェニックラットである。BMAL1 DN(+)) TGラットの行動リズムを確認し、新たな明暗環境を与えた場合の同調にかかる日数を追求した。

(2) *Vipr2* KOの作出

CRISPR/Cas9法を用い、ラット*Vipr2*遺伝子の翻訳開始点近傍を欠失させる遺伝子変異を導入した。動物はWistar/Imamichi系統のラットを用いた。この系統は、4日周期で安定した性周期を刻む系統として知られ、比較的小柄でハンドリングしやすいラットである。オフターゲットの候補としてgRNAの標的配列それぞれで3つ可能性がある領域があげられたため、配列を確認した。*Vipr2* KOラットは明暗サイクル及び恒常暗条件で飼育下に活動リズムを確認し、リズム性の有無を検討した。さらに体内時計の動きを発光リズムで観察できる*Per2*-dLucレポーター遺伝子をもつ遺伝子導入ラット(*Per2*-dLuc TGラット)と交配したラットを作出し、*Vipr2*欠損の体内時計の分子機構の動きに与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1) BMAL1 DN(+)) TGラットの行動リズムを観察した。BMAL1 DN(+))TGラットは明暗周期下で活動位相がやや前進し、明暗周期でも恒常暗周期でも、活動リズムの振幅が有意に減弱した。さらにSCNの発光リズムを検討したところ、BMAL1 DN(+))TGラットでは明瞭な概日リズムを刻むものの振幅が減弱することが確認された。BMAL1 DN(+))TGでは概日時計の振幅が小さくなっていたことから、概日時計の柔軟性が高まる方に変化していることを考え、まず光に対する応答性を検討した。この結果、BMAL1 DN(+))TGでは位相応答性が有意に高まっていることが確認された。最後

に、時差ぼけを模し、BMAL1 DN(+)*TG* の飼育環境の明暗サイクルを6時間後退、あるいは6時間前進させて、ラットの行動リズムの新しい明暗環境に対する応答性を検討した。この結果、BMAL1 DN(+)*TG* ラットは新しい環境に有意に早く順応することがわかった。(Minami *et al.* *Eur J Neuroscience*, 2020)

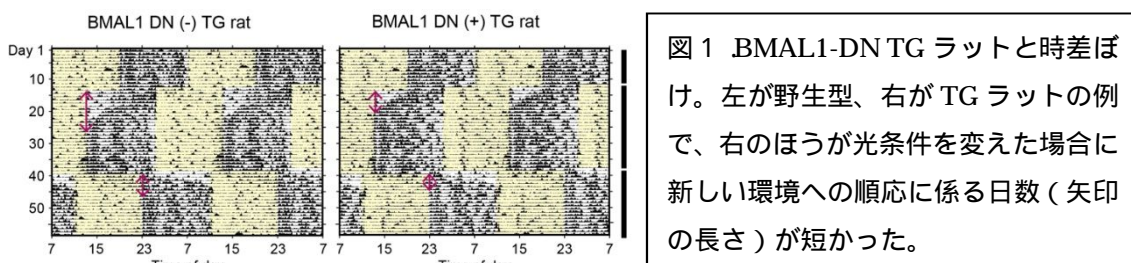


図1 BMAL1-DN TG ラットと時差ぼけ。左が野生型、右がTG ラットの例で、右のほうが光条件を変えた場合に新しい環境への順応に係る日数(矢印の長さ)が短かった。

(2) CRISPR/Cas9 システムを利用し、*Vipr2* KO ラットを作成した。*Vipr2* 遺伝子の翻訳開始点近傍の2箇所を認識するgRNAを設計し、Cas9タンパク質とともに初期胚に注入した。この結果、9匹の子を得たが、この内3匹の*Vipr2* 遺伝子に変異が導入され、うち2匹は標的としたgRNA2箇所での切断による同一の欠失であったことを確認した。オフターゲット変異は確認されなかった。このラットは翻訳開始点を含み約2kbを欠失し、正常な受容体が形成されない。以下、このラットの子孫を用いて検討を進めた。赤外線センサーを用いて行動リズムを観察したところ、明暗周期では正常な行動リズムを示したが、恒常暗条件では活動リズムが消失、もしくは非常に弱い短周期のリズムが形成された。明暗周期下で4時間毎に脳を採取し、DIG-*In situ* ハイブリダイゼーション法により*Per2* mRNA発現レベルの変化を検討した。VIPを発現する領域を腹外側部、それ以外を背内側部としてSCNを2つに分けて*Per2* mRNA発現レベルを検討した結果、腹外側部SCNは野生型も*Vipr2* KOラットも同様の発現リズムを示したが、背内側部SCNでは*Vipr2* KOラットの*Per2* mRNA発現リズムの位相が早いことがわかった。このことは、腹外側部SCNの振動が、VIP-VIPR2を介した連絡により背外側部SCNに伝えられ、SCN内で概日リズム発振細胞間で同期が達成されるというこれまでの知見を支持した。*Vipr2* KOラットと*Per2* dLuc TGラットを交配し、体内時計の状態を発光リズムで観察できるラットを作成した。このラットからSCNや末梢臓器を摘出して、器官培養下に発光量の時系列変化を観察した。野生型ではSCNの発光リズムは明瞭かつ持続的な概日リズムを示した。一方で*Vipr2* KOラットでは、概日リズムは示したものの急速な振動の減弱を示し、1週間程度で概日リズムはほぼ消失した。CCDカメラを用いた発光イメージングを行ったところ、野生型では概日リズムの位相がSCN全体で保たれたまま振動を継続したが、*Vipr2* KOでは領域間で位相に大きな違いがあった。末梢臓器の例として肺を採取して発光リズムを観察した。この結果、野生型に比べ*Vipr2* KOではやや位相が前進していた。末梢時計のリセットには、副腎から分泌されるグルココルチコイドが重要であると報告されている。私たちは*Vipr2* KOラットでは血漿中のコルチコステロンレベルが乱れることを確認しており、このことが肺の発光リズムが乱れた原因であると考えた。実際、合成ステロイドであるデキサメタゾン投与により位相差はほぼ消失した。以上のことから、私たちは*Vipr2* KOラットの作出に成功したと考える。このラットは新たな体内時計傷害モデルとして、睡眠研究に資することができる。

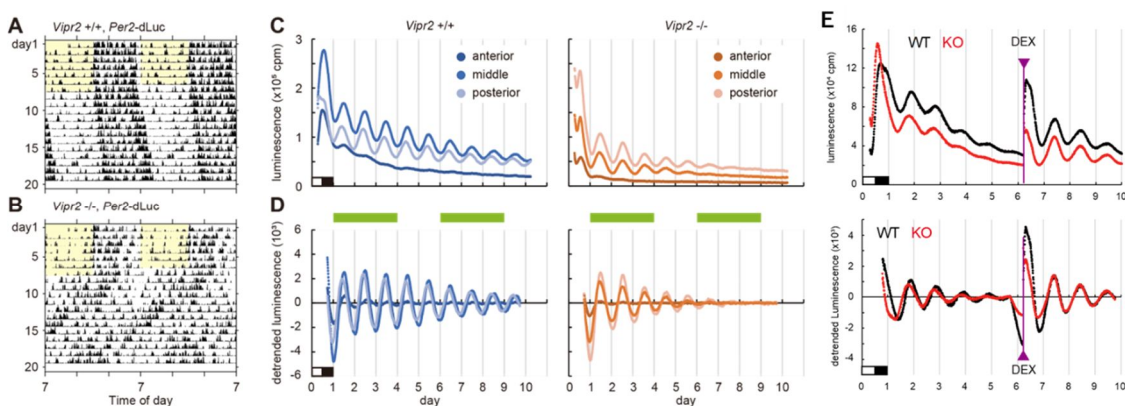


図2 .発光系を用いた検討。野生型と比べ *Vipr2*KO ラットでは活動リズムが乱れた(A, B)、またSCNの*Per2*発現リズムがすぐに減弱した(C, D)、KO肺の*Per2*発現リズムの位相は前進したが(赤)、デキサメタゾン(DEX)投与により野生型(WT)と変わらなくなった(E)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 1件）

1. 著者名 Minami Yoichi, Yuan Yufei, Ueda Hiroki R.	4. 巻 -
2. 論文標題 High-throughput Genetically Modified Animal Experiments Achieved by Next-generation Mammalian Genetics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/07487304221075002	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 Minami Yoichi, Yuan Yufei, Ueda Hiroki R.	4. 巻 13
2. 論文標題 Towards organism-level systems biology by next-generation genetics and whole-organ cell profiling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 1113 ~ 1126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-021-00859-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 -
1. 著者名 Sujino Mitsugu, Koinuma Satoshi, Minami Yoichi, Shigeyoshi Yasufumi	4. 巻 36
2. 論文標題 Heavy Water Lengthens the Molecular Circadian Clock Period in the Suprachiasmatic Nucleus of Mice In Vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 410 ~ 418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/07487304211012905	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 Minami Yoichi, Yoshikawa Tomoko, Nagano Mamoru, Koinuma Satoshi, Morimoto Tadimitsu, Fujioka Atsuko, Furukawa Keiichi, Ikegami Keisuke, Tatemizo Atsuhiko, Egawa Kentaro, Tamaru Teruya, Taniguchi Taizo, Shigeyoshi Yasufumi	4. 巻 53
2. 論文標題 Transgenic rats expressing dominant negative BMAL1 showed circadian clock amplitude reduction and rapid recovery from jet lag	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1783 ~ 1793
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.15085	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 Ikegami Keisuke, Nakajima Masato, Minami Yoichi, Nagano Mamoru, Masubuchi Satoru, Shigeyoshi Yasufumi	4. 巻 531
2. 論文標題 cAMP response element induces Per1 in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 515 ~ 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.105	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 南陽一、長野護、鯉沼聡、謝肖男、久保厚子、森本宰充、飯郷雅之、江川賢太郎、立溝篤宏、重吉康史
2. 発表標題 The circadian phenotype of newly developed Vipr2 knock-out rats.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minami Y, Nagano M, Koinuma S, Xie X, Kubo A, Morimoto T, Egawa K, Tatemizo A, Iigo M, and Shigeyoshi S.
2. 発表標題 The circadian phenotype of newly developed Vipr2 knock-out rats.
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	重吉 康史 (Shigeyoshi Yasufumi) (20275192)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	久保 厚子 (Kubo Atsuko) (70647792)	近畿大学・医学部・助教 (34419)	

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