

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18866

研究課題名（和文）交替勤務従事者に生じる概日リズム障害の改善を目指した新たな動物モデルの確立

研究課題名（英文）Establishment as Shift Work Sleep Disorder Mouse Models: Toward the Investigation of Molecular Mechanism

研究代表者

後藤 元秀 (GOTO, MOTOHIDE)

産業医科大学・産業生態科学研究所・助教

研究者番号：90461558

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）：本研究では、85As2ヒト胃がん細胞株移植マウスを、交替勤務従事者の概日リズム障害を想定した概日リズム障害モデルとして確立し、その病態生理の解明を行うことを目的とした。85As2を含むMKN45系統ヒト胃がん細胞株移植マウスでは、光環境の周期に同調せず活動開始～終了位相が逆転し、さらにマウス固有の自由継続周期も短縮していた。また、MKN45系統ヒト胃がん細胞株移植マウスのSCNにおける細胞活動は通常のマウスと同様であることから、がん細胞移植がSCNからの投射先に存在し、マウスの昼行性/夜行性を規定する神経領域に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果から、マウスへのヒト胃がん細胞株移植はSCNからの投射を受け昼行性/夜行性を規定する神経領域に影響を与えている可能性が示唆された。昼行性ラット(ナイルグラスラット)でも、SCNの細胞活動日内変動パターンは、夜行性マウスと同様であることが報告されている。現時点では、マウスを含めた生物の昼行性/夜行性を規定するメカニズムの詳細は不明である。ヒト胃がん細胞株移植マウスを用いて、SCNからの投射を受けマウスの昼行性/夜行性を規定する神経領域を特定することができれば、生物の概日リズムに関する生理学的メカニズムの解明が進み、ひいては効果的な概日リズム睡眠障害治療薬の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Shift Work Sleep Disorder (SWSD) is one of the important health effects which could be a company's liability. As the mice model of circadian rhythm disorder already reported differences in pathophysiological phenotype, we tried to establish a new mice model of SWSD, using cancer-induced cachexia model mice in which we have preliminarily found a change in active phase under normal light/dark cycle and also examined the pathophysiological mechanisms of this mice. Human stomach cancer cell lines implanted in mice demonstrated the reverse of day-night variation without synchronization of photoperiod and shortened free-running period. In both cancer-implanted mice and nocturnal mice, the number of c-Fos positive cells in the SCN peaked in the diurnal period and decreased in the nocturnal period. These results suggest that the cancer implantation may directly affect the possible regions which are received efferent signals of SCN and determine the diurnal/nocturnal behavior of mice.

研究分野：産業医学

キーワード：概日リズム障害 交替勤務 動物モデル がん悪液質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血圧、心拍数、ホルモン分泌など、様々な生理機能や行動・睡眠を制御する概日リズム(サーカディアンリズム)は、殆ど全ての生物が持ち合わせている生体内機能であり、約 24 時間周期のリズム(自由継続性)と、ヒトでは明期に活動し暗期に睡眠をとる明暗周期に同調する(同調性)性質を持っている。近年、概日リズムが崩れ様々な健康影響が発生することが問題となっており、その一因として、ライフスタイルの多様化と生活環境の利便性を求める消費者が増え、製造業だけでなくサービス業においても交替勤務に従事する労働者が増加している事が挙げられる。世界的には先進国の 5 人に 1 人は交替勤務に従事し、交替勤務が様々な健康障害ならびに生活の質(QOL)の低下に関連すると報告されている(Chest.151(5): 1156-1172, 2017)。本邦でも、交替勤務従事者の推計は 13.3%(平成 9 年)から 21.8%(平成 24 年)に増加しており(J.UOE.36(4):273-276,2014)、交替勤務従事が原因と考えられる概日リズム障害の報告も散見されることから、職域での概日リズム障害への対策は喫緊の課題となっている。

概日リズム障害の発症は、個人の健康影響(高血圧、糖尿病、発がんリスクの増大等)(Diabetes Care. 2010; 33: 414-20)だけでなく、職域においても業務安全性や生産性の低下といった労働安全衛生上の問題をはらんでいる。睡眠障害の国際分類には、概日リズム睡眠関連疾患の交替勤務型というカテゴリーが存在するが、その病態の理解や健康被害の予防に対して講じるべき対策が十分備わっているとは言えない。その理由として概日リズム障害の病態生理解明や治療薬の開発に適したモデルが少ないことが考えられる。

これまでに報告されている概日リズム障害モデル動物は、強制的に飼育環境の明暗リズムをずらすことで規則的な概日リズムの周期を変えるモデルや、時計遺伝子を欠損させる遺伝子改変モデルなどが知られている。生体においては、中枢の視床下部視交叉上核(suprachiasmatic nucleus; SCN)がいわゆる体内時計と呼ばれる働きをしており、概日リズムを作り出している(Nature.409,684,2001)。中枢以外にも、末梢の各臓器の細胞ひとつひとつに存在する末梢時計が生体内時計を調節する分子として存在する。SCN は、光の明暗リズムによって生体内時計を約 24 時間周期に調節する。一般的に概日リズム障害の研究では、光の明暗のリズムに同調するこの SCN の働きを利用して、飼育環境の明暗のリズムをずらした、ジェットラグに類似した状態を再現するモデルが使用されている。ジェットラグは、時差の異なる地域へ移動した場合、到着した地域の外界時計つまりその地域の明暗環境に瞬時に適応するが、これまでに形成された自身の生体内時計のリズム位相は急には変動しないため、外界時計と生体内時計がずれ、不眠や身体的愁訴が出現する状態である。しかし、交替勤務従事者では生体内時計と外界時計は全く同じ環境下で生活しており、昼に覚醒し夜は睡眠を取るという生理的な概日リズムに逆らって準夜帯、深夜帯勤務を行う。したがって、交替制勤務従事者において観察される概日リズム障害は、前述した自由継続性を保持しながらも明暗環境に対する同調性が失われる状態であり、ジェットラグを再現した動物モデルとは病態表現型が異なる。加えて、末梢時計である細胞の概日リズムの分子基盤となる時計遺伝子に着目し、転写因子 Brain and muscle arnt-like molecule-1 (BMAL1)欠損マウス、時計タンパク質 CryPtochrome (CRY)欠損マウス、CLOCK 欠損マウス等が開発されているが、これらの遺伝子改変マウスは生物時計そのものを欠損させることで活動位相シフトを生じさせており、交替勤務型概日リズム障害とは病態形成の過程が異なる。これらの概日リズム障害モデル動物は、ヒトの臨床像を再現したモデルとはいえないことから、概日リズム障害研究においてはヒトの臨床症状に類似した自由継続性を保ち、同調性が失われた病態表現型をもつモデルの確立が重要な課題となっている。

2. 研究の目的

申請者の研究グループでは、ヒト胃がん細胞株 85As2 をラットまたはマウスの皮下に移植することにより、摂食量低下、体重減少、筋肉量減少を伴う除脂肪量低下などのヒトと類似したがん悪液質症状を呈するモデルを確立した(Am J Physiol Endocrinol Metab. 306: E373-387, 2014)。我々は、このモデルを使用した行動量の測定データから、通常明期-暗期の飼育環境下にもかかわらず、健常なマウスと比べて明期での活動量が増加し暗期での活動量が減少していることを見出した。85As2 がん悪液質マウスは、交替勤務従事者の概日リズム障害に近い病態表現型を示していることから、申請者はこのモデルを概日リズム障害モデルとして確立し、その病態生理について解析することで、概日リズム障害の発症メカニズムの解明、ひいてはその治療薬開発に応用できると考えた。そこで本研究では、85As2 がん悪液質モデルを概日リズム障害モデルとして応用するために、がん細胞の移植量を含めたモデルの条件設定を行い、自由継続性を保ちながらも同調性が失われた、交替勤務従事者における概日リズム障害を想定したモデルとして確立し、その病態生理を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)動物モデルの作製および移植細胞量の適正化

がん悪液質モデルマウスはセボフルラン吸入麻酔下にて 7 週齢雄性 BALB/cAJcl-nu/nu マウスの

皮下に 85As2 細胞を 2×10^6 cells/匹移植して作製している。そこで、交替勤務型概日リズム障害モデルとして適正化する目的で、移植細胞量を 1 匹当たり 2×10^5 cells、 4×10^5 cells、 1×10^6 cells に減らしたマウスを作製し、細胞移植後 2 週目よりケージ内での行動量測定を行った。

(2)活動位相の変化と光環境が与える影響の検討

85As2 移植マウスを飼育環境の光のリズムを消失させた状態、すなわち恒明条件下および恒暗条件下で飼育した際の活動開始-終了位相について検討した。7 週齢雄性 BALB/cAJcl-nu/nu マウスを通常の明期(7:00-19:00)および暗期(19:00-7:00)の環境下(LD)に飼育した。1 週間馴化後に対照群およびがん移植群に群分けし、がん移植群は 85As2 がん細胞を右腹皮下に移植(2×10^5 cells/匹)した。移植後 2 週目よりケージ内活動量の測定を開始した。移植後 3 週目から 24 時間の恒明条件下(LL)及び恒暗条件下(DD)にマウスを飼育した。

(3)がん悪性度が活動位相変化に与える影響の検討

がん細胞株の悪性度の違いによる SCN への影響を確認するため、MKN45 移植マウス及び 85As2 移植マウスの活動開始-終了位相の変化について比較検討した。7 週齢雄性 BALB/cAJcl-nu/nu マウスを通常の明期(7:00-19:00)および暗期(19:00-7:00)の環境下に飼育した。1 週間馴化後に対照群およびがん移植群に群分けし、がん移植群は MKN45 がん細胞を右腹皮下に移植(2×10^5 cells/匹)した。移植後 2 週目よりケージ内活動量の測定を開始した。

(4)がん細胞移植マウスにおける視交叉上核(SCN)の活動性評価

MKN45 および 85As2 移植マウスの SCN について日内の活動パターンを検討した。7 週齢雄性 BALB/cAJcl-nu/nu nude マウスを通常の明期(7:00-19:00)および暗期(19:00-7:00)の環境下に飼育し、対照群(control)・がん移植群に群分けし、移植群は 85As2 ヒト胃がん細胞株および MKN45 ヒト胃がん細胞株を右腹皮下に移植 (2×10^5 cells/匹) した。移植後 8 週目まで活動量を測定し、その後サンプリングを行った。サンプリングは明期のうちの 2 ポイント(ZT=4、ZT=8)、および暗期のうちの 2 ポイント(ZT=16、ZT=20)の計 4 回のタイミングに分けて行った。それぞれの脳サンプルを免疫組織染色により染色し、SCN における Fos 陽性細胞の発現を検討した。

4. 研究成果

(1)動物モデルの作製および移植細胞量の適正化

85As2 細胞移植マウスは、通常の飼育条件下でも活動位相が逆転しており、交替性勤務型概日リズム障害の病態表現型に近いモデルとなる可能性が考えられた。移植細胞量の条件の検討では、がん悪液質モデル作製時の 1/10 移植細胞量(2×10^5 cells/匹)でも、移植後 5 週以降に活動位相が逆転した。

ケージ内活動量をアクトグラムで解析したところ、活動開始-終了位相は次第に前進し、移植後 5 週目以降には明期に活動し暗期に休息するという、非移植マウスの活動位相と完全に逆転した状態になることが明らかとなった。

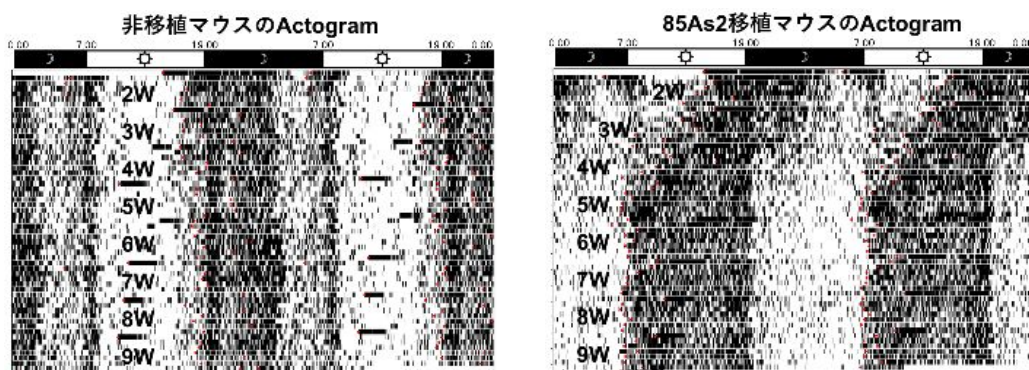


図1 非移植マウスと 85As2 ヒト胃がん細胞株移植マウスのアクトグラム

(2)活動位相の変化と光環境が与える影響の検討

外部環境を LD 環境から DD 環境にすることで、対照群の活動開始-終了周期は 24 時間より短縮した。また、85As2 群の活動開始-終了周期は対照群よりもさらに短縮していた。

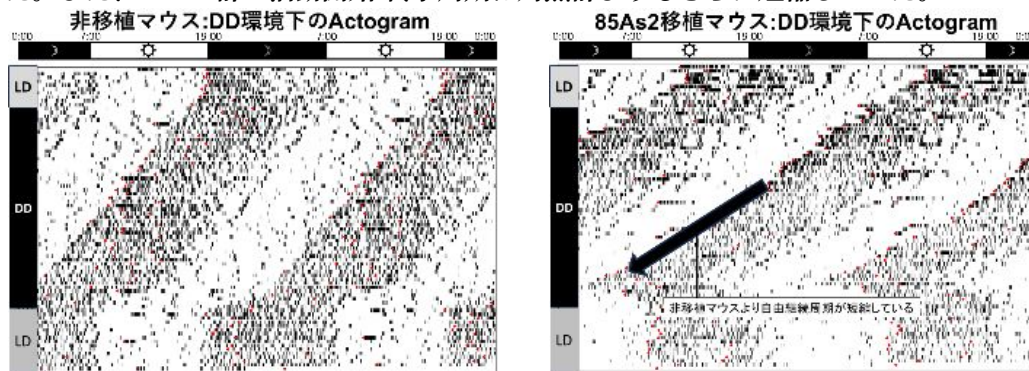


図2 DD 環境下での非移植マウスと 85As2 ヒト胃がん細胞株移植マウスのアクトグラム

外部環境を LD 環境から LL 環境にすると、対照群の活動開始-終了周期は 24 時間より延長した。また、85As2 群も活動開始-終了周期は同様に延長していたが、その程度は小さく、対照群よりも有意に短縮していることが明らかとなった。

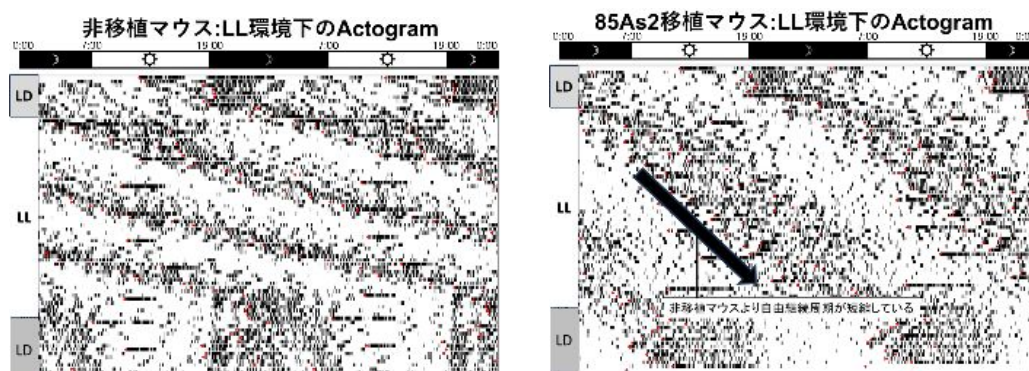


図3 LL 環境下での非移植マウスと 85As ヒト胃がん細胞株 2 移植マウスのアクトグラム

LL/DD の光環境から LD 環境下での飼育に戻したところ、全ての群で活動開始-終了周期はほぼ 24 時間周期となったが、85As2 群は明期に活動量が増加し暗期に減少するという、活動位相が逆転している状態を維持していた。

(3)がん悪性度が活動位相変化に与える影響の検討

MKN45 を移植したマウスにおいても、85As2 移植マウスと同様に、移植後 5 週目以降に活動位相の逆転が出現した。MKN45 がん細胞移植でも、85As2 がん細胞移植マウス同様の活動位相逆転が出現したことから、この活動位相逆転がん悪液質症状の出現には依存していないことが考えられた。

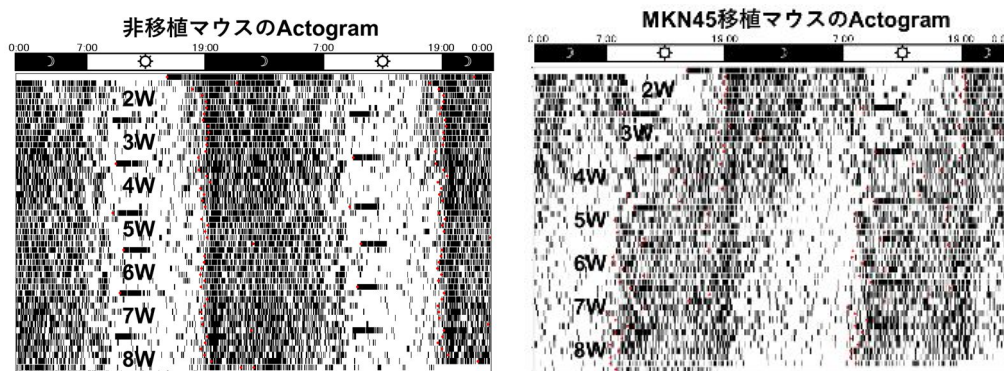


図4 非移植マウスと MKN45 ヒト胃がん細胞株移植マウスのアクトグラム

(4)がん細胞移植マウスにおける視交叉上核(SCN)の活動性評価

SCN における細胞活動の検討から、85As2 移植マウス及び MKN45 移植マウスの SCN における細胞活動は、通常のマウスと同様の日内活動パターンを示した。このことから、MKN45 系統ヒト胃がん細胞株は、神経路としては SCN よりも下流に存在すると考えられる、マウスの昼行性/夜行性を規定する神経領域に影響を与えている可能性が示唆された。

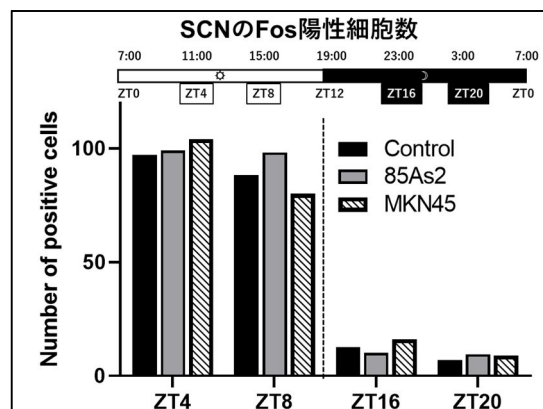


図5 SCN における非移植マウス・85As2 移植マウス・MKN45 移植マウスの cFOS 陽性細胞数

考察

85As2 移植マウスでは、光環境の周期に同調せず活動開始一終了位相が逆転することが判明した。さらにマウス固有の自由継続周期も短縮しており、85As2 細胞の移植が概日リズムの形成に影響を及ぼしていることが示唆された。また、昼夜逆転という概日リズム異常は MKN45 系統ヒト胃がん細胞株に特異的な表現型である可能性が考えられた。SCN における細胞活動の検討から、MKN45 系統ヒト胃がん細胞株移植マウスの SCN における細胞活動は、通常のマウスと同様の日内活動パターンを示した。このことから、MKN45 系統ヒト胃がん細胞株は、SCN からの投射を受け、マウスの昼行性/夜行性を規定する神経領域に影響を与えている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤元秀, 野中美希, 上園保仁, 上野 晋
2. 発表標題 ヒト胃がん細胞移植マウスに出現する活動位相の変化と光環境が与える影響
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤元秀, 野中美希, 上園保仁, 上野晋
2. 発表標題 ヒト胃がん細胞株移植マウスに出現する概日リズム障害の検討
3. 学会等名 第93回日本産業衛生学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤元秀, 野中美希, 上園保仁, 上野晋
2. 発表標題 ヒト胃がん細胞株移植マウスに出現する概日リズム障害の検討
3. 学会等名 第38回産業医科大学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤元秀, 野中美希, 上園保仁, 上野晋
2. 発表標題 ヒト胃がん細胞移植マウスに出現する活動位相の変化と光環境が与える影響
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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