

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20864

研究課題名（和文）昼行性霊長類を用いた生体リズム解析系の確立

研究課題名（英文）Establishment of an analyzing system on the biological rhythm of diurnal primates

研究代表者

富永 恵子（Tominaga, Keiko）

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：60256196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトの体内時計のしくみや破綻の理解につなげるために、ヒトと同様の昼行性動物を用いた生体リズム解析系の確立が求められてきた。本研究では、小型昼行性霊長類コモンマーモセットの生体リズムを長期間に亘り安定して計測できる実験系を確立した。この実験系により、コモンマーモセットの行動、体温、睡眠覚醒リズムはいずれもヒトにきわめて類似した特徴を示すことが分かった。今後、本実験系により昼行性霊長類の体内時計システムの理解が進むだけでなく、ヒトの生体リズム疾患のモデル系開発やその予防法・治療法の探索へと応用されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した、ヒトの生体リズムにきわめて類似した特徴を示す昼行性霊長類マーモセットの生体リズム解析系は、ヒトでは実施が困難な実験へと応用可能である。生体リズム障害モデルの確立、生体リズム障害の発症機構解明、さらにその治療法・予防法の探索、などを分子レベルで検討する研究へと発展が期待される。本実験系は、ヒトの生体リズム障害の機構解明に多くの手がかりを提供できると期待され、その社会的・医学的意義はきわめて大きい。

研究成果の概要（英文）：Establishing a biological rhythm analysis system using diurnal animals similar to humans has been a long wait for understanding the mechanism of the human biological clock and diseases. In this study, we established an experimental system that can stably measure biological rhythms in small diurnal primates, common marmosets, over a long period. Using this experimental system, we found that the marmoset's behavior, body temperature, and sleep-wake rhythm are all very similar to those of humans. This experimental system is expected to advance our understanding of the internal clock system of diurnal primates and to be applied to the development of model systems for human biological rhythm diseases and the search for methods of prevention and treatment of such diseases.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 睡眠覚醒リズム 体内時計 マーモセット 昼行性霊長類

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体内時計は環境の昼夜変動への適応のために生物に備わった仕組みで、単細胞生物から多細胞生物、そしてヒトへと受け継がれてきた。ヒトの体内時計システムは、数十兆個もの臓器にある末梢時計とそれを束ねる脳の視交叉上核にある中枢時計からなり、中枢時計と末梢時計の関係を統合して捉えることが、生体リズム(概日リズム)の理解には必要である。食事や睡眠・覚醒などの安定した生体リズムに基づく社会生活が、心身の健康の基盤となる。しかし現代社会においては、シフトワークや夜型生活といったライフスタイルの変容により、生体リズムシステムが脅かされている。これまで、哺乳類の体内時計研究には、ハムスターやマウスなどの夜行性齧歯類が広く用いられ、多くの重要な現象やメカニズムが見出されてきた。一方で、昼行性であり長時間の単相性睡眠を示すヒトのリズム障害やそれに起因する生活習慣病の理解のためには、昼行性霊長類を用いた実験系の確立が喫緊の課題となっていた。本研究で用いたコモンマーモセットは200~300gと小型の昼行性霊長類で、全ゲノム配列が決定されており、共感行動や音声コミュニケーションなどヒトとよく似た行動も観察され、睡眠と社会行動研究の相関などの研究材料としても期待されている。

生体リズムの解析には、個体レベルなら、自由行動下で非侵襲的に、かつ安定した長期間の観察が必要である。これまでにもつばら、齧歯類では輪回し行動や自発活動(光電センサー、感熱センサー)、ヒトではメラトニン分泌量や深部体温が指標として用いられてきた。しかし、睡眠覚醒リズムを脳活動から正確に解析・評価するためには、脳活動記録である脳波(electroencephalogram: EEG)の測定が不可欠である。したがって、これまで自由行動下での大きなノイズや、駆動バッテリーの大きさの制限などが問題となり、ほとんど検討されなかったEEGによる生体リズム解析系を確立することには大きな意義がある。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトの体内時計と生体リズムの理解に繋げるために、小型昼行性霊長類コモンマーモセット(以下、マーモセット)を用いた生体リズム解析系の確立を目的とするものである。すなわち、独自開発したウェアラブルセンサーによる行動量の測定と、体温やEEGの同時測定を可能とする実験系を確立し、マーモセットの生体リズムの特徴を記載することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と飼育条件: 実験には成熟マーモセット(*Callithrix jacchus*)を用いた。飼育ケージはマーモセットの行動が制限されない広さのもの(高さ73cm、幅38cm、奥行73cm)で、ケージ天井から休息用のハンモックを吊るし、ケージ内に止まり木も設置した。恒常環境飼育室は 28 ± 2 ℃を保ち、飼育室前室(別室)には明暗環境(照度、日長)調節用のタイマーや電源装置、測定データ取得用のパソコンを設置した。照明はLEDを用い、明期は照度30~100 Lux、暗期は照度0 Luxとした。周期的明暗条件下(14時間明期: 10時間暗期)または、恒常明(照度30~100 Lux)条件下で実験を行った。

(2) 生体リズムの測定システム: 首から下げる仕様で、非侵襲に行動リズムを計測できるウェアラブル角速度センサー(アクティビティ・リング)を開発した(下図左)。アクティビティ・リングには角速度センサー、アンプ、送信器が搭載されている。計測データはアクティビティ・リングより部屋天井に吊り下げた受信器にワイヤレスで送信された後、受信器と有線でつながったパソコンへ保存された。一部のマーモセットには、体内埋め込み型運動量(加速度)・体温計測装置(ナノタグ: キッセイコムテック)を腋下の皮下に埋め込み計測を行った。

(3) EEGとEOG測定: EEGおよび眼電位(Electrooculogram, EOG)測定のために、成熟マーモセットの頭蓋骨に電極を次の位置に留置した(基準電極: 大泉門(bregma)から吻側8mm、右側2mm、EEG測定用電極: bregmaから吻側3mm、左側2mmの位置と尾側5mm、右側2mmの位置に各1本、EOG測定用電極: 右上部眼窩に2本)。各電極と接続した電線は束ねて、頭蓋骨上にデンタルセメントで固定した。電線先端にあるコネクタ部分のみセメント表面から露出させた。EEG、EOGの各信号はコネクタとの接続が着脱可能な専用アンプにより増幅されて、ワイヤレスで受信器へ送られた。この専用アンプには角速度センサーも搭載されており、マーモセットに背負わせ角速度(活動量)も同時に測定した(上図右)。EEGデータの周波数分析にはFFT法を用い、求めた α 波、 β 波、 θ 波、 δ 波の4つの周波数成分のパワー値から、 α 波・ β 波と θ 波・ δ 波の2群間の優位性の変動を観察した。 α 波・ β 波のパワー値と θ 波・ δ 波のパワー値の2群間の優位性と、活動量、EOGのデータを総合的に用いて、WAKE、REM睡眠、NREM睡眠を評価した。



(4) 皮膚採取と遺伝子発現の解析：明暗周期下で飼育しているマーモセットから 3 mm 角の表皮を麻酔科で眼科用ハサミにより採取し、切開部は縫合した。明期の midpoint (ZT6) と暗期の midpoint (ZT18) の試料について、CXCL14 の遺伝子発現量を定量性 PCR により測定した。

4. 研究成果

今回のマーモットの行動リズムの計測に用いた角速度センサーは、加速度センサーと比較し高い感度で活動量を検出できた。これは、ケージ内を激しく動きまわる時の活動量だけでなく、静止時にしばしば首を回す微細な動きも検出できるからと考えられ、活動期（覚醒期）を知る指標の一つとして有効であることが分かった。また、マーモセットの負担にならない重さ（16 g）のため、非侵襲で動物にとってストレスフリーな実験手法といえる。この手法で自由行動下でのマーモセット個体の活動量（行動量）を測定すると、14 時間明期・10 時間暗期の明暗周期下では、明期に活動量が上がり、暗期には活動量が下がるという、典型的な昼行性リズムを示した（図 1 A）。また、皮下に埋め込んだナノタグによる活動量と体温の同時計測を行うと、明期の活動開始に先行して体温上昇が始まり、暗期には体温が急速に減少していくことが分かった（図 1 B）。

外界の周期変動を完全に除き、時刻の手がかりのない恒常環境下においてもなお、当該生理現象が持続的に約 24 時間の周期変動を示す時、体内時計に駆動される現象であるといえる。マーモセットをはじめ霊長類では、数日以上暗黒下におくと脳の認知能力が障害され機能不全に陥るため、マウスのように恒常暗条件下での測定はできない。そこで、本研究では恒常明条件下で行動リズムを観察した。その結果、約 23.7 時間の周期でフリーランする明瞭な概日リズムが観察された。この結果は、マーモセットに概日リズムを生み出す体内時計が存在していることを明確に示している。また、高照度光による位相変位を調べると、ヒトと同様の位相反応が起こった。さらに、位相の異なる明暗周期下で飼育したマーモセット 2 個体を同居させると、両者の行動リズム位相が同調した。この社会性同調現象はマウスでは起こらないことから、哺乳類ではマーモセットやヒトなどの社会性動物に特徴的である可能性が高い。

次に EEG、EOG、活動量の同時測定を行い、24 時間に脳波がどのように変動するかを調べた。すなわち、明期の覚醒時には、 α 波、 β 波が優位で、覚醒開始後 13 時間で睡眠波形である θ 波や δ 波が出現してきた。睡眠開始後は、 θ 波・ δ 波が優位となる NREM 睡眠が 50~60 分持続した後、10~20 分の α 波、 β 波を優位とし EOG の高値が確認される REM 睡眠が規則的に出現した。これが 8 回前後続き、不明瞭な脳波をへて朝の覚醒が確認された（図 2）。また、明期の終了前に、脳波上は覚醒状態にあるにもかかわらず、ほとんど活動はせず、EOG から REM 睡眠でもない判断される状態が数時間続いた後に、睡眠が開始することを見出した。この状態と体内時計との関係は現時点では不明だが、活動量と EEG・EOG を同時に計測することの必要性が示された。

また、黄色ブドウ球菌からの防御に、表皮にあるケラチノサイト（角化細胞）の生体リズムが関与する分子機構を明らかにした（岡村均博士、種子島幸祐博士、原孝彦博士との共同研究）。自然免疫で働くケモカイン CXCL14 のケラチノサイトにおける発現は、夜行性マウスでは昼に高く夜に低かったが、昼行性マーモセットでは昼に低く夜に高かった。CXCL14 は黄色ブドウ球菌の DNA に強く結合し、皮膚の樹状細胞で TLR9（細菌 DNA のセンサー）を活性化する。すなわち、自然免疫は睡眠中に発動し、皮膚から侵入した病原性黄色ブドウ球菌から個体を保護しており、睡眠覚醒リズムと免疫機能リズムの関係が明らかとなった（図 3）。

本研究により、自由行動下のマーモセットの明瞭な生体リズムを高感度で安定して計測できる実験系を確立した。マーモセットの行動量、睡眠覚醒、体温の昼行性リズムの特徴はヒトの生体リズムの特徴ときわめて類似性が高かった。本解析系は、ヒトの生体リズム異常の発症メカニズムの解明や、その治療法・予防法の探索への応用が期待される。一方で、社会性同調など齧歯類ではみられない現象も発見し、今後、ヒトの生体リズムとの関連を明らかにしたい。

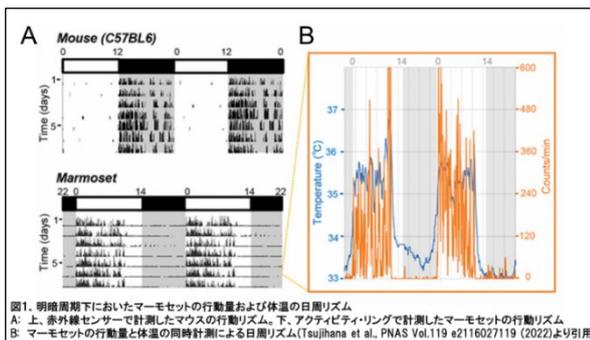


図1. 明暗周期下におけるマーモセットの行動量および体温の日周リズム
A: 上、赤外線センサーで計測したマウスの行動リズム。下、アクティビティリングで計測したマーモセットの行動リズム
B: マーモセットの行動量と体温の同時計測による日周リズム(Tsujihana et al. PNAS Vol.119 e2116027119 (2022)より引用)

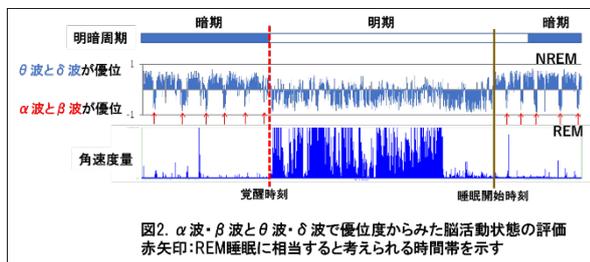


図2. α 波・ β 波と θ 波・ δ 波で優位度からみた脳活動状態の評価
赤矢印: REM睡眠に相当すると考えられる時間帯を示す

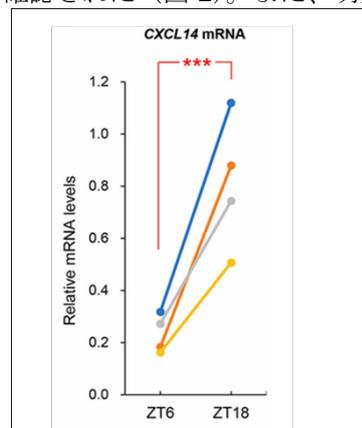


図3. マーモセットの昼夜のCXCL14遺伝子発現
(Tsujihana et al. PNAS Vol.119 e2116027119 (2022)より引用)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomimaga Keiko, Okamura Hitoshi	4. 巻 Chapter 10
2. 論文標題 Circadian Clock Signals in Endocrine Glands	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chronobiology and Chronomedicine (Book, Royal Society of Chemistry)	6. 最初と最後の頁 246 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/BK9781839167553-00246	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 岡村均、山口賀章、富永恵子	4. 巻 94
2. 論文標題 時差ぼけがストレス神経系を動かすとき	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 科学	6. 最初と最後の頁 248-253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 山口賀章、富永恵子、岡村均	4. 巻 6
2. 論文標題 時差ぼけはなぜ起こるのか～生物が初めて直面したリズム異常～	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 26-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 富永恵子、岡村均	4. 巻 6
2. 論文標題 時計遺伝子と体内時計システム (アトラス)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tsujihana K, Tanegashima K, Santo Y, Yamada H, Akazawa S, Nakao R, Tominaga K, Saito R, Nishito Y, Hata RI, Nakamura T, Murai I, Kono Y, Sugawa M, Tanioka M, Egawa G, Doi M, Isa T, Kabashima K, Hara T, Okamura H.	4. 巻 119
2. 論文標題 Circadian protection against bacterial skin infection by epidermal CXCL14-mediated innate immunity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2116027119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2116027119.	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 Tominaga Yoshino Keiko, Urakubo Tomoyoshi, Ueno Yukiko, Kawaai Katsuhiko, Saito Shinichi, Tashiro Tomoko, Ogura Akihiko	4. 巻 30
2. 論文標題 Transient appearance of Ca ²⁺ permeable AMPA receptors is crucial for the production of repetitive LTP induced synaptic enhancement (RISE) in cultured hippocampal slices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hippocampus	6. 最初と最後の頁 763 ~ 769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hipo.23206	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 Matsuo Masahiro, Seo Kazuyuki, Mizuguchi Naoki, Yamazaki Fumiyoshi, Urabe Shoichi, Yamada Naoto, Doi Masao, Tominaga Keiko, Okamura Hitoshi	4. 巻 461
2. 論文標題 Role of 2 3 in Cellular Synchronization of the Suprachiasmatic Nucleus Under Constant Light Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2021.02.016	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 富永恵子
2. 発表標題 昼行性霊長類を用いた生体リズム解析系の確立
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上温美、岸川友佳、岡村均、富永恵子
2. 発表標題 マウス母性行動の概日リズムは母マウスの概日時計によって駆動される
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡村均、富永恵子
2. 発表標題 哺乳類と霊長類の体内時計：過去からの遺産と新たな獲得
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 岡村均、藤永輝明、尾上浩隆、伊佐かおる、伊佐正、富永恵子
2. 発表標題 マーモセットの自由行動下の日周睡眠覚醒脳波解析
3. 学会等名 第11回日本マーモセット研究会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤永輝明、富永恵子、尾上浩隆、伊佐かおる、伊佐正、岡村均
2. 発表標題 自由行動下のマーモセットの長期間にわたる脳波測定
3. 学会等名 第10回日本マーモセット研究会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤村正典、尾上浩隆、藤永輝明、富永恵子、Chen Chih-Yang、伊佐かおる、伊佐正、岡村均、高橋良輔
2. 発表標題 シヌクレインの嗅覚系脳内伝播によるレビー小体病モデルマーマモセットはRBD様睡眠障害を生じる
3. 学会等名 第10回日本マーマモセット研究会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Clete Kushida	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 4010
3. 書名 Encyclopedia of Sleep and Circadian Rhythms, 2nd Edition	

1. 著者名 岡村均、富永恵子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 712
3. 書名 「睡眠覚醒リズムと時計遺伝子」 睡眠学 (第2版) p211-217	

〔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	岡村 均 (Okamura Hitoshi) (60158813)	京都大学・医学研究科・研究員 (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
---------	---------