

機関番号：34419

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790230

研究課題名 (和文) 末梢時計の制御機構の解明および末梢時計操作の試み

研究課題名 (英文) An examination of entrainment mechanisms of the peripheral clock

研究代表者

筋野 貢 (SUJINO MITSUGU)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30460843

研究成果の概要 (和文)：

末梢時計の位相制御におけるグルココルチコイドと摂食時刻の関与を調べるために、副腎除去ラットを用いて給餌時刻の制限とグルココルチコイドの投与を行い、肝臓、腎臓、肺の時計遺伝子発現に与える影響を調べた。その結果から、グルココルチコイドの日内変動が腎臓、肺の末梢時計の位相調節に関与することが示唆された。また、肝臓の末梢時計は摂食時刻により強い影響を受けることが明らかとなり、臓器による同調因子の影響力の違いが示された。

研究成果の概要 (英文)：

To elucidate the entrainment mechanisms of the peripheral clock, we carried out a series of experiments using the glucocorticoid injection and restricted feeding with a relationship of a reverse phase mutually. The results indicated the differences of the dominant timing factor among kinds of organs. The peripheral clock of the kidney and lung entrained to the time of corticosterone administration. In contrast, the liver clock was synchronized to the time of feeding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：生物時計

1. 研究開始当初の背景

体内時計は、動物の生命活動に時間的秩序を与える。つまり、一日の中でいつ活動し、いつ眠るのか、ある生理機能をいつ上昇させ、いつ抑えるのかを決定する。摂食や代謝の効率化だけでなく、捕食者との時間的すみわけなど、生存にきわめて重要な意味を持つ機能である。体内時計は、時計遺伝子と呼ばれる

遺伝子群が、発現のカスケードを形成し、その遺伝子産物が時計遺伝子発現を調節するというフィードバックループを形作ることで、約 24 時間周期のリズムを生み出している。時計遺伝子はほぼ全身の細胞に発現して機能しているが、哺乳類の体内時計は階層性を持っており、脳の視床下部にある一対の神経核、視交叉上核 (SCN) がその中枢である。

SCN は網膜からの情報を直接受け取っており、明暗の変化に反応することで、環境のサイクルに同調する。そして、SCN の時計機構（中枢時計）から発信される時刻情報に全身の各臓器組織の時計機構（末梢時計）が同調することで、体内の時間的秩序が保たれている。SCN からの時刻情報は、睡眠覚醒のパターン、摂食時刻の調節、自律神経、ホルモン、体温の変動などさまざまな要素によって伝達される。また、これらの要素が外的要因によって攪乱された場合、たとえば睡眠をとるべき時間帯に食事をすると、末梢時計の時刻が変化することが知られている。こうした中枢時計-末梢時計の情報伝達機構は、動物の生理機能が環境に正しく適応するために重要であるが、明らかになっていない部分が多く、詳細な研究が必要とされている。

2. 研究の目的

末梢時計の制御機構を解明することを目的とする。特に、臓器特異的な制御機構を解明することが本研究の主な目的である。SCN からの時刻情報伝達因子はさまざまなものがあるが、どのような生理活性物質がどの臓器を制御しているかという対応関係について究明して、中枢時計から伝わって来る位相情報の伝達経路を明らかにする。また、それを用いて、末梢時計を人為的に効果的に制御する技術を目指す。

3. 研究の方法

本研究において、我々はまず末梢時計に対して強い影響力を持つことが知られているグルココルチコイドを用いて実験を行った。その結果、時刻同調因子としてのグルココルチコイドと摂食との関係で、興味深い現象が発見されたので、そこに焦点を当てて研究を進めた。

(1) 血中グルココルチコイド濃度の日内リズムが末梢時計に与える影響

ラットを用いて実験を行った。内因性グルココルチコイドが失われた場合の、末梢時計への影響を調べるために、副腎を除去 (ADX) したラットを作成した。ADX ラットおよびコントロールとなる Sham Operation ラットを、明期 12 時間、暗期 12 時間の条件化で飼育し、一日を通して径時的にサンプリングして、脳、肝臓、腎臓を得た。また、赤外線モーションセンサーを使って、日内活動パターンを測定した。

脳は 3%パラホルムアミド溶液にて固定し、ミクロトームを用いて SCN を含む切片を作成した。RI 標識した時計遺伝子配列 (*Per1*, *Per2*) の cRNA プローブを用いて RI in situ hybridization を行い、SCN 内での時計遺伝

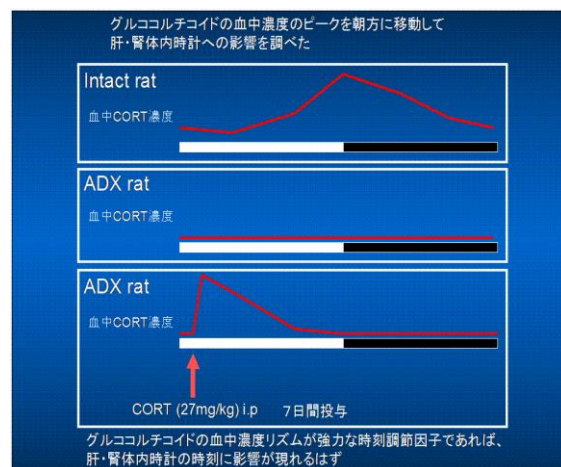
子発現の日内変動を定量した。

肝臓、腎臓は RNA later にて固定後、Trizol 試薬を用いて total RNA を抽出した。逆転写酵素で cDNA を作成し、定量的 PCR を行って末梢臓器での時計遺伝子発現を定量した。PCR には、時計遺伝子 *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* のプライマーを用いて、各遺伝子 mRNA 量を測定した。また、内部標準として GAPDH を使用した。

(2) グルココルチコイド投与による末梢時計の同調

グルココルチコイド刺激に対して、ラット末梢臓器の時計機構が同調するかどうかを調べるために実験を行った。

内因性グルココルチコイドの影響を排除するために、実験には ADX ラットを用いた。明期 12 時間、暗期 12 時間の条件化で飼育したラットに、7 日間にわたって 3mg/kg または 27mg/kg コルチコステロン、DMSO (コントロール群) のいずれかを投与した。投与時刻は、ラットの内因性コルチコステロンが本来ピークを迎える時刻 (ZT12) の逆位相である点灯直後 (ZT0.5) に行った。ZT は Zeitgeber Time の略で、点灯時刻を ZT0、消灯時刻を ZT12 と定義する。日内活動パターンをセンサーにて測定し、投与 7 日目に一日を通してラットを径時的にサンプリングした (下図参照)。



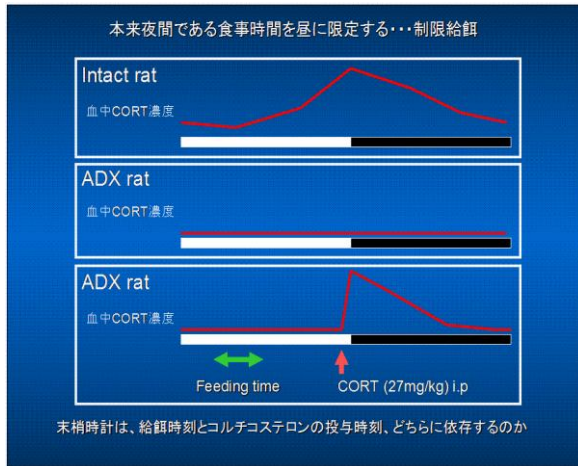
脳から SCN を含む切片を作成して、SCN 内での時計遺伝子発現を測定した。また、肝臓、腎臓から mRNA を抽出し、時計遺伝子発現の日内変動パターンを定量した。

(3) 制限給餌条件下でのグルココルチコイド投与

グルココルチコイド刺激と摂食刺激は共に強力な時刻同調因子として知られている。この両者が逆の位相関係で与えられた場合に、末梢時計がどのような挙動を示すのかを調べるために、実験を行った。

ADX ラットを明期 12 時間、暗期 12 時間の

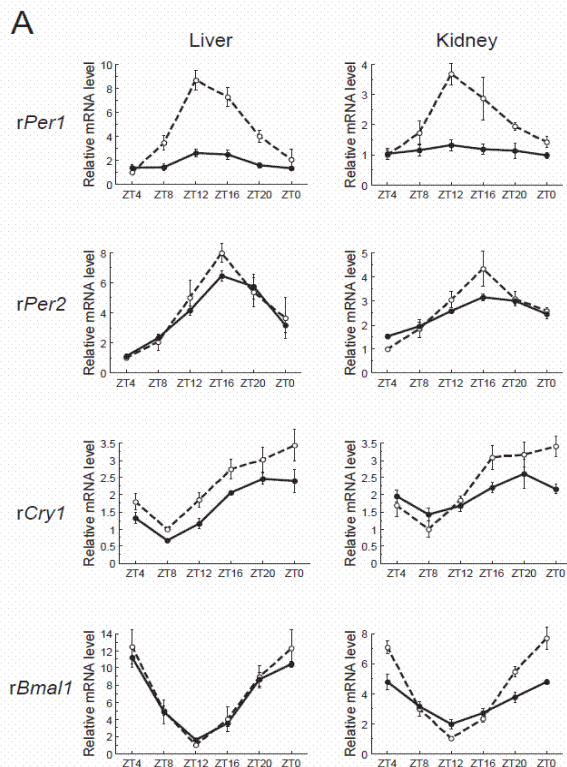
条件化で飼育し、食餌ができる時刻を ZT4-7 の 3 時間に限定した。ラットは夜行性なので、本来寝ているはずの昼の時刻に餌を食べることになる。この状態で、7 日間にわたり、ラットに 27mg/kg コルチコステロンまたは DMSO (コントロール) を ZT11.5 に投与した (下図参照)。



投与 7 日目に一日を通してラットを径時的にサンプリングし、脳から SCN を含む切片を作成して、SCN 内での時計遺伝子発現を測定した。また、肝臓、腎臓から mRNA を抽出し、時計遺伝子発現の日内変動パターンを定量した。

4. 研究成果

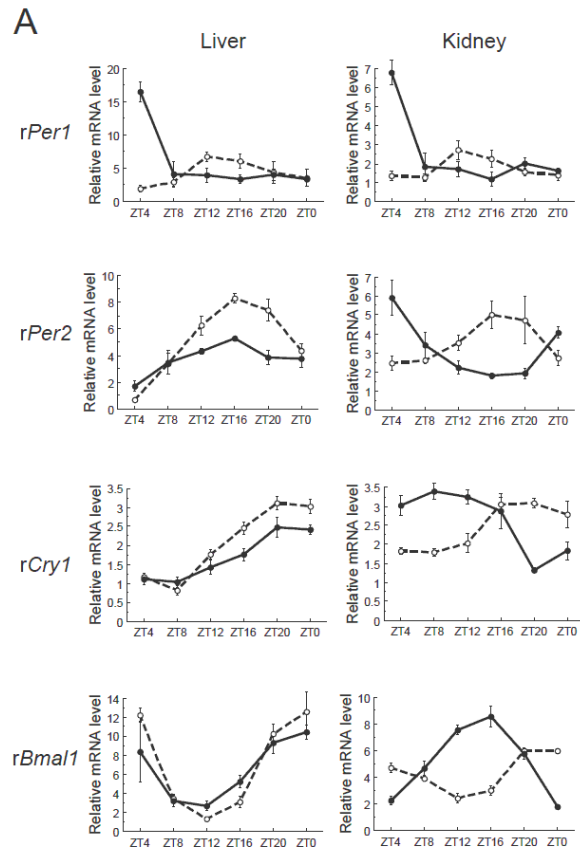
(1) ADX ラットの末梢時計における時計遺伝子の日内変動パターンを測定したところ、下図の結果を得た。



グラフの実線は ADX ラット、破線は Sham operation (コントロール) ラットである。ADX によってグルココルチコイドの日内変動が失われても、肝臓、腎臓共に時計遺伝子発現リズムの位相には変化がなかった。しかし、*Per1* の発現リズムには劇的な減衰が観察された。このことから、末梢時計での時計遺伝子 *Per1* 発現リズムは、副腎からのシグナル (グルココルチコイド) に大きく依存することが明らかとなった。また、*Per1* ほどではないが、腎臓での *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* 発現リズムの振幅が低下しており、腎臓の末梢時計は副腎からのシグナルが失われると減衰することが示唆された。

SCN での時計遺伝子発現パターンおよび活動パターンには変化がなかった。

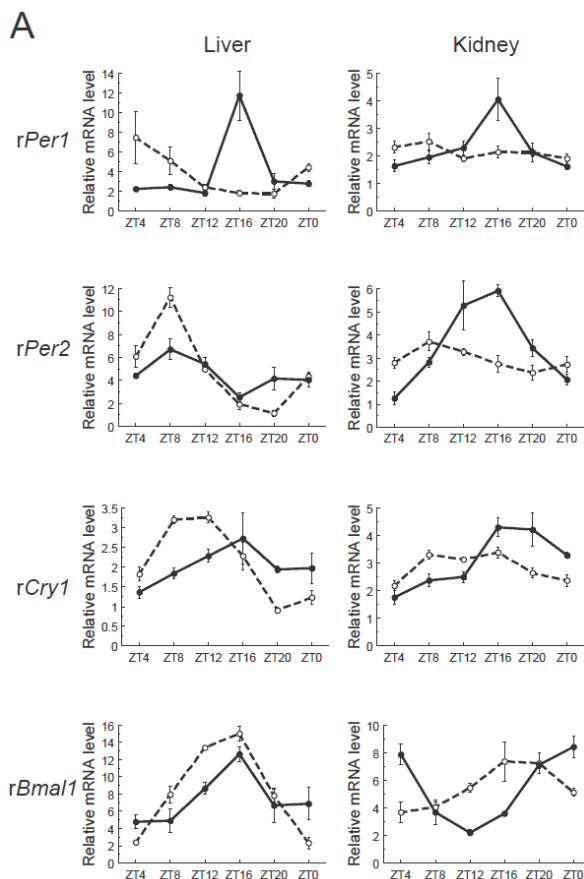
(2) ADX ラットに、ZT0.5 でのコルチコステロン投与を 7 日間にわたっておこなうと、肝臓、腎臓における時計遺伝子発現パターンが下図のように変化した。



実線はコルチコステロン 27mg/kg 投与群、破線は DMSO (コントロール) 投与群である。*Per1* は、肝臓、腎臓共に ZT0.5 でのコルチコステロン投与に反応し、ZT4 での急激な上昇が見られた。一方、*Per2*, *Cry1*, *Bmal1* の発現パターンには、肝臓と腎臓で大きな違いが現れた。肝臓では、3 遺伝子とも発現リズムの位相に、コルチコステロン投与による大きな変化は見られなかった。しかし、腎臓では

3 遺伝子すべてで発現パターンがコントロール群とは逆位相に変化していた。また、加えて肺における時計遺伝子発現を測定したところ、腎臓と同様に逆位相のパターンが得られた。SCN での時計遺伝子発現パターンおよび活動パターンには有意な変化が無かった。この結果から、ラットの生体内において、グルココルチコイドのパルスは中枢時計の位相や活動パターンにかかわらず、腎臓と肺の末梢時計を同調させることが明らかとなった。また、肝臓の末梢時計はコルチコステロンパルスに同調しなかったが、*Per1* 遺伝子の発現誘導は観察された。これは、肝臓の末梢時計はコルチコステロンに応答はするが、より強力な何らかの同調因子によって支配されていることを示唆した。

(3) 上記の実験結果から、我々は肝臓の末梢時計が、別の強力な同調因子である摂食刺激に支配されているのではないかと考えた。そこで、次に制限給餌条件下でのコルチコステロン投与実験を行ない、肝臓、腎臓の末梢時計が摂食刺激とグルココルチコイド刺激のどちらに同調するのかを調べた (下図)。



ADX ラットに昼間 (ZT4-7) の制限給餌をおこない、ZT11.5 にコルチコステロン 27mg/kg または DMSO (コントロール) を 7 日間投与した。グラフの破線はコントロール群、実線は

コルチコステロン投与群である。コントロール群では制限給餌による摂食刺激が昼間に加わったことによって、肝臓、腎臓の末梢時計は位相シフトを生じ、摂食時刻に同期した。しかし、暗期の始まる時刻にコルチコステロンを投与すると、腎臓の末梢時計はその投与時刻に同調した。さらに、肺における時計遺伝子発現を定量したところ、腎臓と同様、コルチコステロン投与に同調していた。一方、肝臓の末梢時計は、*Cry1* 発現リズムに位相シフトが見られたものの、*Per2*, *Bmal1* の位相は給餌時刻に同期しており、コルチコステロン刺激よりも摂食刺激に強く支配されることが示唆された。

以上の結果から、時刻同調因子に対する末梢時計の同調性には臓器特異性があることが明らかとなった。グルココルチコイドは強力な時刻同調因子であり、これまでの研究報告では、肝臓末梢時計にも大きな影響を与えると考えられていた。しかし、今回の我々の研究結果は、肝臓の末梢時計が摂食刺激によって強力に支配されており、グルココルチコイドによる位相への影響はわずかであることを示した。また、正常なグルココルチコイドの日内リズムが慢性ストレスなどによって乱れた場合に、腎臓と肺の末梢時計は影響を受けやすい可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① 筋野貢、古河恵一、鯉沼聡、藤岡厚子、長野護、飯郷雅之、重吉康史
グルココルチコイド刺激による肝腎末梢時計の位相変化の違い
第 17 回日本時間生物学会学術大会
東京・早稲田大学国際会議場
2010 年 11 月 20-21 日

② 筋野貢、古河恵一、鯉沼聡、藤岡厚子、長野護、飯郷雅之、重吉康史
腎臓の時計遺伝子発現にたいするグルココルチコイドの影響
第 16 回日本時間生物学会学術大会
大阪・大阪国際会議場
2009 年 10 月 24-28 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筋野 貢 (SUJINO MITSUGU)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：30460843