

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02664

研究課題名（和文）哺乳類発生発達過程における概日時間秩序の生成機構

研究課題名（英文）Establishment of Circadian ordering system during the developmental process in mammals

研究代表者

八木田 和弘（Yagita, Kazuhiro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90324920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000 円

研究成果の概要（和文）：概日時計は生涯にわたって生理機能の概日リズムを制御するが、興味深いことに発生初期から器官形成期まで概日時計が存在しないことが示唆されていた。これまで我々は、多能性幹細胞を用い、*in vitro*で概日時計の発生を再現することに世界で初めて成功した。本研究では、哺乳類発生過程における体内時計の形成に伴う概日時間秩序の生成機構に着目し、特に器官形成期まで概日時計の発生が抑制される意義について検討した。マウスES細胞の分化誘導系および胚オルガノイドであるGastruloid系の確立により、概日時計が体節形成リズムに干渉する可能性を明らかにし、概日時計抑制の生理的意義に関する新知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児期の前半までは脊椎動物としての基本的な体のパターンを形成する体節形成などが見られる。この時期、機能せず抑制されている体内時計の鍵因子を体節形成期に強制的に発現することで、体節時計に干渉し体節形成を阻害することが明らかになった。本研究によって、発生過程において体節形成の完了まで母体の概日リズムの伝達阻止も含め厳密に体内時計を抑制することは、正常な発生プロセスにおいて極めて重要な生理学的意義がある可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been revealed that circadian clocks do not exist during early developmental stages. To date, we have succeeded in recapitulating the development of the circadian clock *in vitro* using pluripotent stem cells, a significant achievement. In this study, we concentrated on the mechanism of the generation of circadian time order during mammalian development, which is associated with the formation of an internal clock. In particular, we focused on the significance of the suppression of circadian clock development until organogenesis. The establishment of a mouse embryonic stem cell differentiation induction system and an embryonic organoid, designated the Gastruloid system, has permitted the clarification of the possibility that the circadian clock may interfere with the rhythm of somitogenesis. Furthermore, the study has yielded new insights into the physiological significance of circadian clock suppression during the early developmental stage.

研究分野：環境生理学、時間生物学

キーワード：概日リズム 生物時計 概日時計 発生 多能性幹細胞 細胞分化 体節時計 リズム干渉

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体内時計は発生期に形成される細胞自律的プログラムであり、発達期から老年期まで一生にわたって地球の自転に伴う周期的環境変化への適応を通して個体機能の動的恒常性を担う。近年、体内時計は多岐にわたる生理機能の恒常性制御を通し、生涯にわたる健康にとって必要不可欠な生命機能であることが明らかとなってきた。しかし、体内時計の分子メカニズムの理解が進んだ現在においても、体内時計が関与する健康問題には未解明の点が多く、特に発生発達期のリズム攪乱の影響などは社会的にも注目されているがブラックボックスのままほとんど研究が進んでいない。本研究では、哺乳類発生過程における体内時計の形成に伴う概日時間秩序の生成機構に着目し、日常生活の中で生じる健康問題まで貫く体内時計による動的恒常性制御の生物学的ロジックを理解することを目指す。

申請者はこれまでに培養細胞であっても遺伝的に規定された体内時計が存在することを示し (Yagita ら, Science, 2001) 「細胞時計」という概念の確立に貢献した。さらに、体内時計は発生過程において細胞分化と共役する細胞自律的プログラムに従って形成されることを明らかにした (Yagita ら, PNAS, 2010; Umemura ら, PNAS, 2014; Umemura ら, PNAS, 2017)。これらの一連の研究により、発生過程における体内時計の形成は個体発生制御と密接に関連したイベントであることが強く示唆された。しかしながら、体内時計は本来、地球の自転周期に伴う環境変化に生体機能を適応させるための「環境適応機構」であり、なぜこのような発生制御と共役する形で体内時計の形成が厳密に制御されているのか、全く分かっていなかった。ただ、これまでの申請者らの解析により、哺乳類における体内時計の形成が非常に遅く、発生の早い段階では体内時計の基本骨格をなす時計遺伝子による転写振動のコアフィードバックループがサイクルできないよう、複数のメカニズムで強く抑制されていることが示唆されていた (Umemura ら, PNAS, 2014; Umemura ら, PNAS, 2017)。

2. 研究の目的

体内時計は発生期に細胞自律的に形成され (Yagita ら, PNAS, 2010)、これに伴って多岐にわたる生体機能において約 2-4 時間周期の概日時間秩序が成立していく (Umemura ら, PNAS, 2017)。さらに、この体内時計の形成と相まって日周変動する環境サイクルへの同調適応も認められるようになる (Umemura ら, PNAS, 2017)。つまり、体内時計そのものだけでなく環境周期への同調適応機構も発生発達期に形成されていく。哺乳類では体内時計の発生は非常に遅く、胎生後期にようやく時計遺伝子の発現振動が開始される。それ以前の胚組織においては 2-4 時間ではなく、体節形成リズム等の異なる周期を示すメカニズムが存在することが知られている。しかし、発生過程における「時間秩序制御」に着目した研究は非常に少なく、特に体内時計形成に伴う生体の時間秩序コンバージョンのメカニズムやその生物学的・生理学的意義については全く分かっておらず、生物の恒常性維持に必須である環境適応の制御原理と合わせ未解明の問いとなっている。

本研究では、これまで我々が独自に積み重ねた独創的な研究成果に基づき、本質的な「問い」である、発生過程における体内時計形成に伴う時間秩序のコンバージョンとその生物学的・生理学的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

個体発生過程における体内時計形成に伴う生体の概日時間秩序の生成機構については、マウス ES 細胞の分化誘導系および Gastruloid オルガノイドによる発生プロセスの *in vitro* 再現系を活用した体内時計と分節時計の相互排他的制御原理解析、体内時計形成に伴う概日リズム制御ネットワーク成立プロセス解析、の 2 つの具体的なサブテーマに沿って進める。

まず、*in vitro* 再現系である induced presomitic mesoderm (iPSM) および gastruloid embryonic organoid を用いる。申請者らは既に、iPSM および gastruloid オルガノイドによる分節時計リズム再現系の構築に成功しており、本研究ではこの系を用いて体内時計コンポーネントによる分節時計への干渉について検討する。特に、概日時計遺伝子 *Per1* と分節時計遺伝子 *Hes7* がゲノム上で隣接していることに着目し、リップル効果の関与と CLOCK/BMAL1 による転写ネットワークを解する干渉の実態について解析する。においては、発生過程における体内時計の形成前後を通して、遺伝子発現ネットワーク成立プロセスを解析し、時系列に沿った状態遷移過程を定量的に記述する。

4. 研究成果

本研究では細胞分化と共役する概日時計の組織形成における意義について、特に、発生プロセスに焦点を当て概日時計の形成と発生制御との関連について解析した。

体節形成は脊椎動物の正常な発生に不可欠な現象であり、脊椎動物のボディープランを決める発生過程のイベントとして極めて重要である。この体節形成を制御する機構が「分節時計(体節時計)」と呼ばれるもう一つの生物時計である。分節時計は体内時計と異なり、生物種によってその周期が異なる。マウスの場合は約2時間周期のリズムであり、ヒトの場合は4～5時間周期のリズムを刻む。

一方で、上述の通り、地球の自転周期に生体機能を適応させる体内時計は、時計遺伝子によって細胞レベルで約24時間周期のリズムを生み出している。体内時計を構成する時計遺伝子のうち、Clock や Bmal1 と並んで重要な Per1 遺伝子は必須の分節時計遺伝子 Hes7 と、ゲノム上で隣接していることがわかった。

今回、我々は、Hes7 遺伝子のリズムを指標にして、体内時計の鍵因子である転写因子複合体 CLOCK/BMAL1 が分節時計のリズムに及ぼす影響について、ES細胞から *in vitro* で分化誘導した胚オルガノイド系を用いて検討した。誘導未分節中胚葉(induced PSM, iPSM) および、体節形成が再現できる胚オルガノイドである gastruloid(ガストロイド:人工擬似胚)を用い、体内時計の鍵転写因子 CLOCK/BMAL1 の発現誘導による Hes7 リズムおよび体節形成への影響を解析した。その結果、CLOCK/BMAL1 の発現誘導により Hes7 のリズム消失とともに分節構造の形成も消失することが確認された。

以上の結果から、胎児期の前半までは機能せず抑制されている体内時計の鍵因子 CLOCK/BMAL1 を体節形成期に強制的に発現することで、分節時計に干渉し2時間周期のリズム制御を破綻させ体節形成を阻害することが明らかになった。本研究によって、発生過程において体節形成の完了まで体内時計を厳密に抑制することは、正常な発生プロセスにおいて極めて重要な生理学的意義がある可能性が示唆された(Umemura et al, PNAS, 2022)。

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 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sasawaki Yuh, Inokawa Hitoshi, Obata Yukiko, Nagao Suzune, Yagita Kazuhiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Association of social jetlag and eating patterns with sleep quality and daytime sleepiness in Japanese high school students	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Sleep Research	6. 最初と最後の頁 e13661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jsr.13661	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 Nakai Hiroko, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Asano Taiki, Ueno Morio, Umemura Yasuhiro, Sasawaki Yuh, Ono Ryutaro, Hamuro Junji, Sotozono Chie, Yagita Kazuhiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Comprehensive Analysis Identified the Circadian Clock and Global Circadian Gene Expression in Human Corneal Endothelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 16～16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.63.5.16	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 Umemura Yasuhiro, Koike Nobuya, Tsuchiya Yoshiki, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Kageyama Ryoichiro, Yagita Kazuhiro	4. 巻 119
2. 論文標題 Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2114083119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2114083119	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 該当する
1. 著者名 八木田和弘, 土谷佳樹	4. 巻 19
2. 論文標題 概日リズム障害と未病制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アンチエイジング医学	6. 最初と最後の頁 017-021
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 1.Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, Watanabe H, Kondoh G, Kageyama R, Yagita K	4. 巻 119
2. 論文標題 Circadian key components CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 e2114083119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114083119.	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 Wiroanto M, Wang C-Y, Kim E, Koike N, Gomez-Gutierrez R, Nohara K, Escobedo Jr G, Choi JM, Han C, Yagita K, Jung SY, Soto C, Lee HK, Morales R, Yoo S-H, Chen Z	4. 巻 36
2. 論文標題 The clock modulator Nobletin mitigates astroglial-associated neuroinflammation and disease hallmarks in an Alzheimer's disease model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 e22186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101633R	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 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yagita K.
2. 発表標題 Circadian Time Order: Emergence and Homeostasis.
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yagita K
2. 発表標題 Clocks and Temporal Orders in Physiology.
3. 学会等名 17th European Biological Rhythms Society (EBRS) Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土谷佳樹, 中井浩子, 八木田和弘
2. 発表標題 概日リズムと角膜内皮機能
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 小池宣也, 梅村康浩, 八木田和弘
2. 発表標題 Recapitulation of pre-symptomatic pathophysiology in chronic jet-lag mouse cohort model
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 八木田和弘
2. 発表標題 概日時計の発生と時計タンパク質動態
3. 学会等名 東京都医学研シンポジウム2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 シフトワーカーのCircadian Physiologyと予防的介入
3. 学会等名 第47回日本睡眠学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 概日リズム障害の未病制御と予防的アプローチ
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 光刺激によるサーカディアンリズムへの影響
3. 学会等名 第48回日本生体電気・物理刺激研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yagita K.
2. 発表標題 Circadian Rhythm Disorders: Chronic circadian misalignment-induced pathophysiology.
3. 学会等名 5th Asian Forum on Chronobiology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1.Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, Watanabe H, Kondoh G, Kageyama R, Yagita K.
2. 発表標題 Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids
3. 学会等名 85th Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Quantitative Biology, Biological Time Keeping（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1.八木田和弘
2. 発表標題 光刺激によるサーカディアンリズムへの影響
3. 学会等名 第48回日本整体電気・物理刺激研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 2.八木田和弘
2. 発表標題 腎臓の機能と体内時計
3. 学会等名 第4回京都腎臓医学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 3.八木田和弘
2. 発表標題 概日リズム障害の病態生理：概日リズム攪乱と免疫老化
3. 学会等名 第21回 日本坑加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tuchiya Y, Yagita K.	4. 発行年 2024年
2. 出版社 The Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 716
3. 書名 Growth: Emergence of the circadian clock., Chronobiology and Chronomedicine	

〔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	梅村 康浩 (Umemura Yasuhiro)		
研究協力者	小池 宣也 (Koike Nobuya)		
研究協力者	土谷 佳樹 (Tuchiya Yoshiki)		
研究協力者	笹脇 ゆふ (Sasawaki Yuh)		

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		
米国	University of Texas		