

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16934

研究課題名（和文）口腔生理機能の日内変動を制御するサーカディアンリズム機構の統合的解明

研究課題名（英文）Circadian mechanisms regulating diurnal variability in oral function

研究代表者

織田 善晃（Oda, Yoshiaki）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・客員研究員

研究者番号：20735542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類におけるサーカディアンリズムは脳視交叉上核が中枢であり、ここから全身にリズム情報が発振されている。これまでに、視交叉上核神経細胞が階層的に異なる位相を示す位相波を形成することを報告している。本研究では、視交叉上核から発信されるサーカディアンリズム情報が、末梢脳部位や全身にどのように出力されているかを解明するために、マウスを用いて視交叉上核、下垂体、および口腔感覚中継領域である三叉神経節におけるサーカディアンリズム特性を解析した。視交叉上核をはじめとする各組織は、自律的なサーカディアンリズムを形成し、中枢-末梢階層機構により機能リズム位相が決定されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

時計遺伝子欠損マウスについて生体レベルでのサーカディアンリズム表出（輪回し行動の自由継続）及び、視交叉上核、下垂体、三叉神経節におけるサーカディアンリズムを評価した。これらの研究成果は、体内時計中枢・視交叉上核と末梢時計（下垂体および三叉神経節）との中枢-末梢連関を解明するための重要な知見となり、組織間リズム同調因子の特定と共に階層的なサーカディアンリズム同調機構の理解につながることを期待される。これらの研究成果をもとに、体内時計中枢である視交叉上核における生理機能の時間配分を解明し、生体レベルにおける生理機能の時間制御機構を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：The suprachiasmatic nucleus of the brain is the center of the circadian rhythm in mammals, from which rhythmic information is output to the whole body. We have previously reported that neurons in the suprachiasmatic nucleus form phase waves that show different phases in a hierarchical manner. In this study, we analyzed circadian rhythm characteristics in the suprachiasmatic nucleus, the pituitary gland, and the trigeminal ganglion, an oral sensory relay region, in mice to elucidate how circadian rhythm information originating from the suprachiasmatic nucleus is output to peripheral brain regions and to the whole body. The suprachiasmatic nucleus and other tissues form autonomous circadian rhythms, and the functional rhythm phase is determined by the central-peripheral hierarchical structure.

研究分野：神経科学

キーワード：概日リズム 視交叉上核 下垂体 三叉神経節

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎える現状の中、高齢者の生活の質を向上し充実した毎日を過ごすためには「昼間は澁刺と活動し、夜間はぐっすりと眠る」環境に調和した生理的タイミングの制御が重要である。加齢とともに発症頻度が漸増する、いわゆる「生活習慣病」を克服する最善策は予防であり、大部分の歯科疾患をはじめとする慢性疾患予防には「規則正しい生活」が推奨される。現在、サーカディアンリズムを制御する分子機構が詳細に解明され、哺乳類の細胞における概日リズム形成は時計遺伝子とその生成タンパク質による転写翻訳フィードバックループに基づいていると考えられている。さらに発光レポーターを用いた光計測により、視交叉上核における概日リズムの発現パターンを細胞ネットワークレベルで行われてきた (Wu, *et al.*, PNAS, 2018, Enoki, Oda, *et al.*, PNAS, 2017)。申請者もこれまで、蛍光プローブを用いた一細胞解像度の長期蛍光イメージングにより視交叉上核及び近傍における個々の細胞の性質を解析し、細胞ネットワークの形成機構を解明する試みを行ってきた。一方で、視交叉上核がどのように末梢時計を制御しているかについてはほとんど分かっておらず、「全身にリズムが発振されている」と表現するに留まっている。その中で、視交叉上核において観察される細胞の階層構造により形成される位相波と末梢部位が異なる位相時刻をもつことの意義を考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

視交叉上核における神経ネットワークについて近年の発光・蛍光イメージング計測により、この位相波はテトロドトキシンを投与すると階層構造が乖離することから、神経接続によるネットワーク形成が階層構造に重要であると考えられる。その一方で、この位相波を形成することの生理学的な意義は分かっていない。そこで本研究の核心をなす学術的「問い」は、視交叉上核から末梢部位へのリズム制御はどのような機能的神経ネットワーク形成により行われているか？である。本研究では視交叉上核の階層構造に着目し、各階層の細胞が視交叉上核外へどのような出力経路を形成し機能するかを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

時計遺伝子発現レポーターPER2::LUCマウスを用い、*Cry1^{+/-}*、*Cry1^{-/-}*、*Cry2^{+/-}*、*Cry2^{-/-}*のサーカディアンリズム表現型を解析した。対照群としてC57BL/6Jマウスを用いた。動物実験は長崎大学遺伝子組換え実験安全委員会および長崎大学動物実験委員会規則にしたがい、実験計画の承認を受けて実施した。

(2) 輪回し行動リズム測定

野生型、および実験群マウスを対象とし、運動用回転輪を備えた個別ケージにて飼育した。温度、光環境を厳密に制御する環境チャンパー内に安置して、1分当たりの輪回し回転数を連続的に記録した。1日当たりの輪回し行動量が安定した後、7日間は12時間明期/12時間暗期の明暗環境下で測定を行い、その後、恒常暗環境として15日間測定を継続した。合計22日間の時系列データをもとに、各遺伝型における輪回し行動の開始位相、終了位相、自由継続周期を評価した。

(3) 下垂体におけるPER2発現イメージング

時計遺伝子発現レポーターPER2::LUCマウスを用い、体内時計中枢である視床下部視交叉上核および、下垂体における生物発光イメージングを行った。遺伝子改変レポーターマウスより、脳組織および下垂体組織を摘出し、発光基質ルシフェリンを含む培養液中で期間培養を行った。レポーターマウスのルシフェラーゼ活性はPER2発現量を反映しており、生物発光イメージングにより時間的タンパク質発現変動とともに、空間的発現部位の特定を行った。

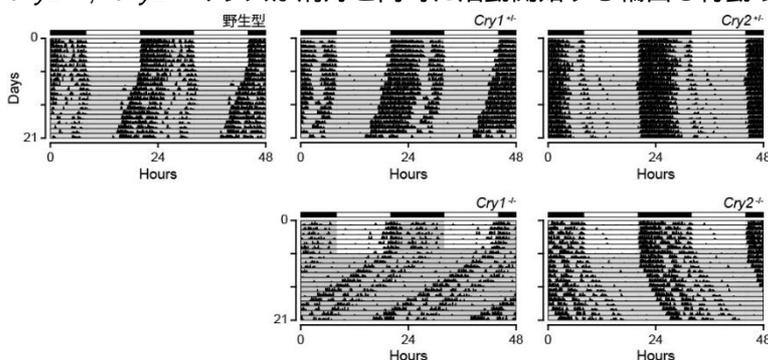
(4) 三叉神経節におけるPER2発現イメージング

三叉神経節 (Trigeminal ganglion) は、三叉神経の感覚神経細胞の集合体であり、口腔領域をはじめとする顔面の感覚を司る重要な構造である。三叉神経節は、口腔領域からの歯髄や歯根膜の感覚情報を受け取り、その情報を脳に伝達する中継地点として機能する。PER2::LUCマウスから摘出した三叉神経節について、生物発光イメージングを行い、野生型および*Cry1^{+/-}*、*Cry2^{-/-}*マウス各遺伝型組織レベルでの空間的発現部位を同定するとともにサーカディアンリズム特性を評価した。

4. 研究成果

(1) 時計遺伝子 KO マウス(ヘテロ接合体/ホモ接合体)の輪回し行動リズム

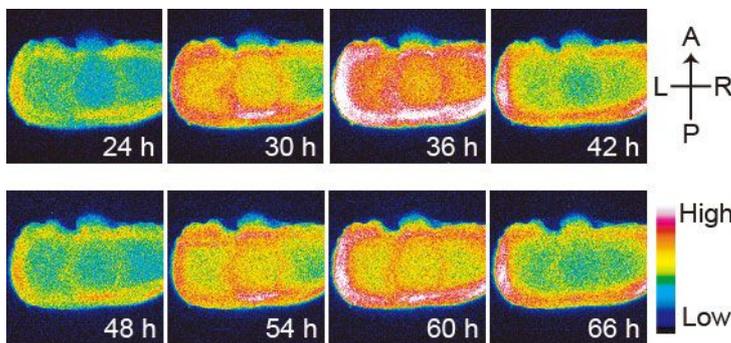
輪回し行動測定開始後7日間の12時間明期/12時間暗期明暗環境下において、野生型、*Cry1*^{-/-}、*Cry2*^{-/-}、*Cry2*^{-/-}マウスが消灯と同時に活動開始する輪回し行動リズムを示したのに対して、



Cry1^{-/-}マウスは行動開始、終了ともに約1時間の位相前進が認められた。行動位相の設定には環境光サイクルに対する位相反応性と、生体行動リズムの自由継続周期が影響するため、各遺伝型マウスの恒常暗環境における自由継続周期を計測した。結果として、野生型 (23.73 ± 0.05 時間)、*Cry1* ヘテロ接合体マウス (23.65 ± 0.07 時間)の遺伝

型間で自由継続周期に差がみられないのに対し、*Cry1* ホモ接合体マウスでは有意な周期の短縮 (22.17 ± 0.08 時間)がみとめられた。一方、*Cry2* 欠損マウスでは、*Cry2* ヘテロ接合体マウスの自由継続周期に有意な延長 (24.06 ± 0.05 時間)がみられ、*Cry2* ホモ接合体マウスでは更に延長 (24.53 ± 0.07 時間)がみとめられた。(Oda *et al.* Neurosci Lett 2022)

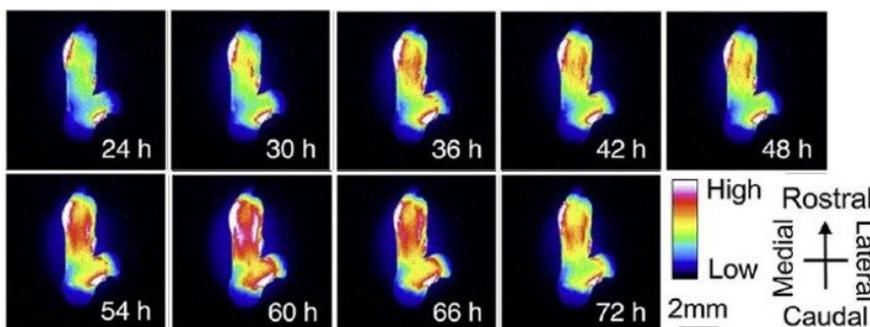
(2) 下垂体における PER2 発現イメージング



生体から摘出して器官培養を行った下垂体組織において、PER2::LUC発現は数週間継続する長期間安定したサーカディアンリズムを記録した。時計遺伝子レポーターである PER2::LUC の発現は下垂体全体にみとめられ、器官培養全域に及ぶ発現部位のタイムラプス観察において、特にげっ歯類に特徴的な構造である下垂体中葉および、下垂体前葉(腺下垂体)辺縁部に強い発現がみと

められた。下垂体の概日リズム周期は遺伝型に依存しており、輪回し行動リズムと同様に *Cry1* 欠損による周期の短縮と、*Cry2* 欠損による周期の延長をみとめた。(Oda *et al.* Neurosci Lett 2022)

(3) 三叉神経節における PER2 発現イメージング



生体から摘出して器官培養を行った三叉神経節において、PER2::LUC発現は最低1週間継続するサーカディアンリズムを記録した。器官培養全域に及ぶ発現部位のタイムラプス観察において、時計遺伝子レポーターPER2::LUCの発現は三叉神経節全体にみとめられた。免疫染色法によるPER2タンパク発現解析により、おもに三叉神経節を構成する神経細胞に発現していた。三叉神経節における概日リズム周期は遺伝型に依存しており、輪回し行動リズムと同様に *Cry1* 欠損による周期の短縮と、*Cry2* 欠損による周期の延長をみとめた。(Shirakawa *et al.* Front Neurosci 2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shirakawa Yukie, Ohno Sachi N., Yamagata Kanae A., Kuramoto Eriko, Oda Yoshiaki, Nakamura Takahiro J., Nakamura Wataru, Sugimura Mitsutaka	4. 巻 17
2. 論文標題 Circadian rhythm of PERIOD2::LUCIFERASE expression in the trigeminal ganglion of mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2023.1142785	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 Oda Yoshiaki, Takasu Nana N., Ohno Sachi N., Shirakawa Yukie, Sugimura Mitsutaka, Nakamura Takahiro J., Nakamura Wataru	4. 巻 772
2. 論文標題 Role of heterozygous and homozygous alleles in cryptochrome-deficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136415 ~ 136415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.136415	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0件

〔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
研究協力者	中村 渉 (Nakamura Wataru) (60372257)	長崎大学 (17301)	

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