

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390051

研究課題名(和文)概日時計の発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanistic analysis of the circadian clock development 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) 15,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の概日時計は発生過程を通して形成されることが知られている。しかし、その分子メカニズムは全く分かっていなかった。最近我々は、マウス胚性幹細胞(ES細胞)を用いて、ES細胞には概日時計のリズムが見られないこと、*in vitro*分化誘導によって細胞自律性に概日時計が形成されること、リプログラミングによって再消失すること、を発見した。さらに、このメカニズムを様々な遺伝子変異ES細胞を用いて解析したところ、細胞分化に伴うエピジェネティック・プログラムと転写ネットワーク構築が概日時計発生に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In mammals, the emergence of circadian clock oscillation gradually occurs during the developmental process. However, developmental mechanisms of circadian clock have not been well understood.

We have shown that the circadian clock oscillation is not detected in the mouse embryonic stem (ES) cells. We also showed that the apparent circadian clock oscillation is induced during the differentiation culture of mouse ES cells without maternal entraining factors. These results demonstrate that the intrinsic program controls the circadian oscillator formation during the differentiation process of ES cells in cultural condition.

To understand the circadian clock development in mammals, we performed ES cell-based screening to find out factors contributing to the clock formation mechanisms, and found Dnmt1 as an essential factor for circadian clock development. Epigenetic programming and following organization of transcriptional network may be essential for circadian clock development in mammals.

研究分野：環境生理学、時間生物学、細胞分化

キーワード：体内時計 細胞分化 ES細胞 発生

## 1. 研究開始当初の背景

未解明の重要テーマ：概日時計の発生

概日リズム（サーカディアンリズム）はほとんどの生物に認められる普遍的な生命現象であり、内在性のリズム発振機構である概日時計によって生み出されている。概日時計は、一連の時計遺伝子群が構成する「転写-翻訳フィードバックループ」と呼ばれる転写ネットワークが発生させる分子レベルの「振動」によって成立すると考えられている。

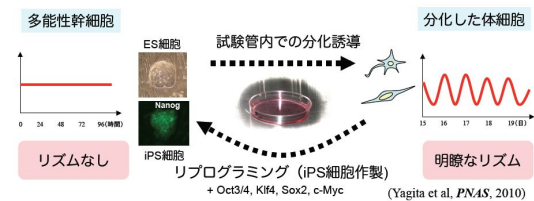
概日リズムは、ヒトでも外部環境への生理機能の適応など重要な役割を担っている。うつ病を代表とする気分障害に概日リズム障害が密接に関連している事実（Hader ら、*Ann.Med.*,2005 など）や、交代制勤務の人々に見られる種々の健康障害が概日リズムの乱れに起因するものが少なくないこと（Straif ら、*Lancet Oncol.*, 2007 など）は、概日リズムを制御している概日時計（体内時計）の破綻が、多くの疾患や症状の誘因のひとつとなることを示している。

また一方、環境ストレスによる概日リズム障害やそれに伴う健康障害の発症には個人差があることが知られている。その原因の一つに、発生発達期における概日時計の形成過程が関係するのではないかという可能性が想定されている。しかし、現在、概日時計の発生過程の詳細や具体的なメカニズムは、胚や胎子を用いた解析の困難さもあり、ほとんど解明されていない。つまり、概日時計の発生は、生後の心身の恒常性維持に影響する可能性がある。このような、重要なテーマであるにも関わらず、概日時計の振動開始機構や周期長決定機構など、実体はほとんど未解明のままであった。

## 2. 研究の目的

概日時計は受精卵や初期胚には見られず、胎児期に形成されることが示唆されている。研究代表者は、ES 細胞をモデル系として用い、

ES 細胞には概日時計がみられないこと、しかし、in vitro で分化誘導することにより概日時計が形成されてくることを見だし、さらに、分化した細胞をリプログラミングして iPS 細胞にすると再び概日時計が消失することを、世界で初めて明らかにした( 図 1 :Yagita et al, *PNAS*, 2010 )



( 図 1 ) 細胞分化と関連した概日時計の発生

本研究計画では、これまで概日時計研究には無縁であった幹細胞・発生工学や遺伝子発現イメージングの最先端技術を積極的に取り入れ、概日時計のリズム発生メカニズムを、胎児期における概日時計の形成過程に焦点を絞り、培養細胞から個体組織まで一貫して解析する。さらに、環境ストレスを想定したリズム攪乱要因の影響について、細胞レベルおよび個体レベルで明らかにし、心身の恒常性維持における発生期の役割について概日時計の視点から迫る。

## 3. 研究の方法

哺乳類の概日時計は、ほぼ全身の細胞に自律振動体が存在し個々の細胞内で概日リズムを生み出しており、それらを中枢時計である視交叉上核が調律している。本研究計画では、概日時計の形成過程を、マウス胚の末梢細胞および臓器と、視交叉上核の両面から包括的にアプローチする。

全身の細胞で普遍的に起こる概日時計の発生現象と対象として、主として単一細胞レベルでの時計遺伝子発現イメージング法や分子生物学的手法を用いて、1) 概日時計イメージングによる振動開始の鍵因子探索と2) ES 細胞を用いた概日時計形成における

周期決定メカニズム解析について、細胞レベルから解き起こす。

#### 4. 研究成果

##### 1) 概日時計イメージングによる振動開始の鍵因子探索

まず、概日時計のレポーターマウス (mPER2::Luciferase ノックインマウス) の胎仔組織を用いて、細胞レベルで概日時計振動がいつ頃どのように形成されるのかを解析した。

マウス胚末梢組織から取得した細胞 (主に線維芽細胞) の概日時計を細胞集団として解析した結果、E10.5 の胎仔から取得した細胞集団には概日リズムがみられず、E15.5 の胎仔から取得した細胞集団では明瞭な概日リズムが観察された。しかも、概日リズムがみられない E10.5 細胞を 5 日間 *in vitro* で培養したところ、E15.5 細胞と同様の明瞭な概日リズムが出現した。

このデータをもとに、単一細胞レベルでの概日時計イメージングを行い、単一細胞レベルでの概日時計の振動がいつどのように形成されていくのかを解析したところ、このマウス胚の概日時計は個々の細胞レベルで、細胞自律性に徐々に形成されることが分かった (Inada et al, *FEBS Lett.*, 2014)。

続いて、ES 細胞の *in vitro* 概日時計形成解析法を活用し、概日時計形成を司る鍵因子の探索を行った。まず、遺伝子変異 ES 細胞株をスクリーニングし、概日時計形成異常が起こる変異 ES 細胞を探索した。その結果、Dnmt1 欠損 ES 細胞において細胞分化に伴う概日時計形成が完全に破綻することを発見した。さらに、c-Myc のドキシサイクリン依存性過剰発現 ES 細胞でも、細胞分化過程で持続的に過剰発現によって概日時計形成が阻害されることを発見した。これらの概日時計形成阻害のメカニズムを解明するために、正常に分化して概日時計形成が起こる

細胞を対照として、RNA-seq にて網羅的に遺伝子発現解析を行った。その結果、484 遺伝子が概日時計形成の鍵因子の候補として同定された。さらに解析を進めてこの中から Kpna2 の発現制御が ES 細胞の分化に伴う概日時計形成に重要な役割を担っていることを明らかにした (Umemura et al, *PNAS*, 2014)。

##### 2) ES 細胞を用いた概日時計形成における周期決定メカニズム解析

研究代表者とこれまで共同研究を行ってきた奈良県立医科大学の堀江恭二教授は、効率的に両アリル遺伝子変異が導入できる方法を開発し、変異 ES 細胞ライブラリーを構築している。まず、我々が確立した ES 細胞を用いた *in vitro* 概日時計形成法を応用し、変異 ES 細胞ライブラリーを用いた概日時計周期解析スクリーニングを行った結果、周期延長が認められる ES 細胞の系統を同定した。ひとつは Casein Kinase I delta (CKId) 欠損 ES 細胞株で、もうひとつは Casein Kinase 2a (CK2a) 欠損 ES 細胞株であった。これらの変異 ES 細胞を用いて野生型とのキメラマウス胚を作製し、ここから採取したマウス胎仔性線維芽細胞 (MEF) の概日時計リズムを解析した。その結果、ES 細胞の *in vitro* 概日時計形成法で確認された周期異常が個体発生過程でも再現されていることを確認した。このことから、我々の確立した ES 細胞の分化誘導法による概日時計発生過程の再現系は、概日時計の様々なメカニズム解明の強力なアッセイ系となることが示された (Umemura et al, *PLoS One*, 2013)。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Okubo N, Fujiwara H, Minami Y, Kunitomo T, Hosokawa T, Umemura Y, Inokawa H, Asada M, Oda R, Kubo T,

Yagita K\*., Parathyroid hormone resets the cartilage circadian clock of the organ-cultured murine femur., *Acta Orthopædica*, 査読有, 13, 1-5, 2015. (\*Corresponding author)  
DOI: 10.3109/17453674.2015.1029393  
Umemura Y, Koike N, Matsumoto T, Yoo S-H, Zhen C, Yasuhara N, Takahashi JS, Yagita K\*., Transcriptional Program of Kpna2 /Importin- $\alpha$ 2 Regulates Cellular Differentiation-Coupled Circadian Clock Development in Mammalian Cell., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 111, E5039-5048, 2014. (\*Corresponding author)  
DOI: 10.1073/pnas.1419272111  
Inada Y, Uchida H, Umemura Y, Nakamura W, Sakai T, Koike N, Yagita K\*., Cell and Tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos., *FEBS Lett.*, 査読有, 588, 459-465, 2014. (\*Corresponding author)  
DOI:10.1016/j.febslet.2013.12.007  
Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Umemura Y, Tsuchiya Y, Shirai Y, Oda R, Inokawa H, Kubo T, Yagita K\*., Prolonged Bioluminescence Monitoring in Mouse ex vivo Bone Culture Revealed Persistent Circadian Rhythms in Articular Cartilages and Growth Plates., *PLoS One*, 査読有, 8, e78306, 2013. (\*Corresponding author)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0078306  
Koinuma S, Asakawa T, Nagano M, Furukawa K, Sujino M, Masumoto KH, Nakajima Y, Hashimoto S, Yagita K, Shigeyoshi Y., Regional circadian period difference in the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center., *Eur. J.*

*Neurosci.*, 査読有, 38, 2832-2841, 2013.

DOI: 10.1111/ejn.12308

Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, Takeda J, Inokawa H, Horie K, Yagita K\*., An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2 $\alpha$  as an endogenous clock regulator., *PLoS One*, 査読有, 8, e67241, 2013. (\*Corresponding author)

DOI: 10.1371/journal.pone.0067241

[学会発表](計29件)

1) 国際学会

[招待講演・シンポジウム・ワークショップ]

Yagita K., Epigenetic and Molecular mechanisms suppressing circadian clock in pluripotent stem cells., 4<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Clock 2015, Kyoto, Mar. 27. 2015.

Yagita K., Cellular Differentiation and Circadian Clock in Mammalian Cells., Fujihara Seminar 2014, Izu, Sept. 25. 2014.

Yagita K., Molecular Mechanisms of Circadian clock development in mammalian cells., The 30<sup>th</sup> Anniversary of Sapporo Symposium on Biological Rhythms, Sapporo, July. 26. 2014.

Yagita K., Circadian Clock: A cell-autonomous time-keeping system in our body., 6<sup>th</sup> Asia Oceania Conference of Photobiology, Sydney, 2013.

(Invited speaker)

Yagita K., ES cell-based approach elucidating the integrated physiology of mammalian circadian systems., 4<sup>th</sup> International Symposium on Photic

Bioimaging 2012, Sapporo, 2012.

(Invited speaker)

Yagita K., Cell-autonomous development of mammalian circadian clock during the differentiation culture of ES cells., International Conference for Histochemistry and Cytochemistry 2012, Kyoto, 2012. (Invited speaker)

Yagita K., Chronogenesis and cellular differentiation., Gordon Research Conferences: Chronobiology, Lucca, 2011. (Invited speaker)

[ 一般演題 ] \* : 発表者

Yagita K., Epigenetic and transcriptional program regulates differentiation-coupled circadian clock development in mammalian cells., 14<sup>th</sup> Society for Research on Biological Rhythms, 2014, BigSky Montana, June. 18. 2014. (口演)

Yagita K\*, Umemura Y, Yoshida J, Tsuchiya Y, Wada M, Watanabe H, Kondoh G, Takeda J, Horie K., ES cell-based evaluation system of circadian phenotypes in mammals., 13<sup>th</sup> Society for Research on Biological Rhythms, Destin, Florida, 2012. (口演)

2) 国内学会

[ 特別講演・シンポジウム・ワークショップ ]

八木田和弘:「概日時計の発生から細胞を考える」, 生理学研究所 セルセンサー研究会, 岡崎, Dec. 4. 2014.

八木田和弘:「革新的技術による哺乳類概日時計の統合的理解」, 第21回日本時間生物学会 シンポジウム, 福岡, Nov. 8. 2014.

八木田和弘:「生殖と発生の時間生物学」, 第67回日本自律神経学会総会 シンポ

ジウム, さいたま, Oct. 30. 2014.

八木田和弘:「生殖の時間生物学」, 第17回日本 IVF 学会学術集会 特別講演, 大阪, Sept. 13. 2014.

八木田和弘:「Effect of MeCP2 on Molecular Clock Development in the SCN」, 第37回日本神経科学学会大会 シンポジウム, 横浜, Sept. 12. 2014.

八木田和弘:「生殖と概日リズム」, 第43回日本女性心身医学会学術集会, 京都, Aug. 10. 2014.

八木田和弘:「体内時計の分子機構」, 第14回日本抗加齢医学会 シンポジウム, 大阪, Jun. 6. 2014.

八木田和弘:「細胞分化に伴う体内時計発生メカニズム」, 京都大学再生医科学研究公開シンポジウム, 京都, May. 13. 2014.

八木田和弘:「Misregulation of transcriptional program controlling the cellular differentiation resulted in disruption of the circadian clock development.」, 日本生理学会大会, 鹿児島, Mar. 16. 2014. (シンポジスト・オーガナイザー)

八木田和弘:「イメージング技術を用いた生体機能のCutting Edge」, 関西実験動物研究会 30周年記念大会, 京都, Dec. 6. 2013. (シンポジスト)

八木田和弘:「ES細胞を用いた概日時計の in vitro 再現と分化制御機構との関連」, 第36回日本分子生物学会, 神戸, Dec. 5. 2013. (ワークショップ講演・オーガナイザー)

八木田和弘:「MYC induced disruption of circadian clock development」, 第86回日本生化学会, 横浜, Sep. 11. 2013. (シンポジスト・オーガナイザー)

八木田和弘:「体内時計はいつ動き出すか」, 第14回日本抗加齢医学会, 横浜,

June. 30. 2013. (シンポジスト・オーガナイザー)

八木田和弘:「ES cell-based in vitro evaluation system of circadian clock phenotypes in mammals」, 第90回日本生理学会大会, 東京, 2013. (シンポジスト・オーガナイザー)

八木田和弘:「体内時計の発生・発達」, 第1回日本発達神経科学会, 明石, 2012. (特別講演)

八木田和弘:「発生発達期における概日リズムの階層的形成」, 第17回日本行動神経内分泌研究会, 京都, 2012. (教育講演)

八木田和弘:「時間軸生物学:細胞分化と概日時計の接点」, 第12回日本抗加齢医学会総会, 横浜, 2012. (シンポジスト・オーガナイザー)

八木田和弘:「Circadian clock and Cellular Differentiation」, 第89回日本生理学会, 松本, 2012. (シンポジスト・オーガナイザー)

八木田和弘:「Circadian clock and Cellular Differentiation: Development, Regeneration and Cancer」, 第34回日本分子生物学会, 神戸, 2011. (ワークショップ講演・オーガナイザー)

八木田和弘:「細胞分化と概日時計の発生」, 第64回日本自律神経学会, 秋田, 2011. (シンポジスト・オーガナイザー)

[図書](計1件)

八木田和弘. 細胞分化と体内時計の発生. 時間生物学(海老原史樹文 / 吉村崇 編、化学同人:京都), 2013; 66.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

八木田 和弘 (YAGITA, Kazuhiro)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 90324920

### (2)研究分担者

井之川 仁 (INOKAWA, Hitoshi)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 40285250

(平成23年度~平成25年度まで参画)