

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24621001

研究課題名(和文) 動物追跡技術を用いた新規行動リズム解析および時計遺伝子発現解析法の開発

研究課題名(英文) Novel in vivo imaging with the real time tracking system

研究代表者

浜田 俊幸 (Hamada, Toshiyuki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：20360208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてEM-CCDカメラによる自由行動マウスの生体複数部位からの遺伝子発現追跡定量解析技術とテレメトリーによる体温、脳波リズムを融合させた測定系を完成させた。生体ターゲット部位の動きを1mm単位で測定することで行動解析するプログラムを装置に追加した。この装置を用いて生体内時差ボケ現象を可視化することに成功した。マウスの行動リズムの位相変化と同時に時計遺伝子発現リズムが変化する部位とそうでない部位の同定に成功した。以上のことから個体レベルで各組織の時計遺伝子発現リズムが行動および睡眠覚醒リズムとどのような関係を持ち、形成されているか明らかにする研究の基盤を築くことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed a new system recording the gene expression in multiple areas of the freely moving mice with analyzing the body temperature and sleep-awake rhythm. In addition, new program to analyze the sleep-awake by tracing technique of the target area in freely moving mice was added into the system. Using this system, I succeeded in visualizing the internal desynchronization in freely moving mice. There were two type of tissues to express the phase shifts of clock gene expression. One showed rapid phase shift with the same speed of that of locomotor activity rhythm, the others showed slow phase shifts. Present system is a powerful system for analyzing many areas of biomedical research, enabling simultaneous long term tracking of behavior and gene expression in multiple tissues.

研究分野：時間生物学

キーワード：時計遺伝子 行動リズム 光バイオイメージング ルシフェラーゼ ルシフェリン 体内時計

1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子は体全体に発現し、培養組織を用いた研究で各組織ごとに固有の発現リズムを持つことが報告されているが、個体レベルで各組織の時計遺伝子発現リズムが行動および睡眠覚醒リズムとどのような関係を持ち、形成されているか明らかにされていない。個体レベルにおいて各組織の時計遺伝子発現リズムの乱れは、様々な疾患の危険因子として作用すると推測され、体全体の時計遺伝子発現の役割を明らかにすることは重要である。脳内視床下部に位置する視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) が体内時計の主中枢であり、SCN の個々の細胞に振動体が存在し、時計遺伝子産物がネガティブフィードバック機構を形成することにより約 24 時間を周期とした振動現象を作り出し脳全体および体全体の活動リズムを形成する (Hamada et al., J.Neurosci.2001, 2003)。しかしながら時計遺伝子は全身に発現しており、各組織での時計遺伝子の発現リズムの乱れや発現量の変化、発現リズムの位相の変化は、生体に様々な影響を与え、睡眠障害、喘息、心疾患、精神疾患、癌、生活習慣病発症の危険因子として作用すると考えられる。そのため全身の時計遺伝子の発現リズムや行動などのリズム表現系を個体レベルで長期間同時に測定できる研究が求められてきたが、技術的な困難さから現在まで不可能であった。

2. 研究の目的

私は、この技術的な壁を超えるべく光イメージングの手法を用いて自由行動下の動物における特定遺伝子発現をリアルタイムでさまざまな部位の体表より長期間 (数週間から 1 年以上の期間) 追跡・定量・解析するリアルタイム in vivo イメージングシステムを開発し、Real time-genes expression tracing (RTGT) system と名付けた。本研究では申請者が新規に作製した体全体の時計遺伝子発現を解析するシステムを用いて、体全体の時計遺伝子発現リズムの形成および行動、睡眠覚醒リズムとの関係を明らかにすることを目的とし体内時計関連疾患の疾患解明および治療薬、睡眠覚醒障害治療薬の基盤を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

RTGTsystem は、臨床で癌治療などに使用されている動体追跡技術 Real time Tumor tracking Radiation Therapy (RTRT)system を改良し基礎研究に応用したものである。2 台の高感度 EM-CCD カメラでマウスのターゲット部位周辺に取り付けた 3 つの発光マーカーを手がかりとして、体の標的部位 (複数部位) における遺伝子発現を発光イメージングする。パターンマッチングを用いた精度の高い追跡及び 3 次元空間位置に応じた感度補正法を用いる本システムにより、従来では

認識できなかった蛍光発光位置情報を正確に把握し、生体各組織の時計遺伝子発現を長期間高精度で定量する。また長期的に 3 次元座標を計測できることから、従来装置では把握できなかった行動パターンなども計測する。さらに、上記技術を用いて体の各組織間において各部位の遺伝子発現リズムがどのような関係で成り立ち、行動リズム、睡眠覚醒リズムとどのような関係を持つか、明らかにする。以上のことで体内時計関連疾患の疾患解明および治療薬、睡眠覚醒障害治療薬の基盤を築くことが可能となる。

4. 研究成果

1). 3 次元動体追跡法を用いた行動およびマウス体表遺伝子発現に対する薬物刺激効果を行うため、マウス体表遺伝子発現およびテレメトリーを用いた脳波解析の同時測定ができる実験系を確立した。EM-CCD カメラを備えた飼育ボックス内にテレメトリー送信機からのシグナルを受信する受信ボードを設置し脳波、筋電シグナルが十分取得できる条件を決定し、自由行動マウスの皮膚の時計遺伝子の長期間の測定とテレメトリーによる体温リズム測定、そして脳波測定が同一動物で測定するシステムを完成させた。

2). 1) で完成させたシステムを用いて、ターゲット部位を長期間追跡することにより、マウスの行動を移動中、睡眠中、飲水行動中、摂食活動中の 4 つに分類する測定プログラム sleepdetect のプロトタイプを完成させた。動体追跡と同時に測定するテレメトリーを用いた睡眠測定の結果と比較して、sleepdetect による睡眠行動解析は 10 秒間隔の単位において 80% 以上の確立で一致した。1) 2) の結果により動体追跡法により自由行動マウスの全身の遺伝子発現解析と種々の行動解析がリアルタイムで連結して解析できるシステムおよび解析法が確立した。

3). 個体レベルにおいて各組織の時計遺伝子発現リズムの乱れを測定するために、恒暗条件下、8 時間の光刺激をマウスに照射し、行動リズムを約 5 時間遅らせた。この位相変化は光照射の翌日にはほぼ完了していた。この時に生体 6 部位 (嗅球、背中皮膚、左耳、右耳、左大脳皮質、右大脳皮質) の時計遺伝子発現がどのように変化するか調べ、光照射前は全ての部位で同じ位相で時計遺伝子発現にサーカディアンリズムが観察された。しかし光照射後の時計遺伝子発現の位相後退作用が、それぞれ異なることを発見した。行動リズムと同様に位相後退する部位と 1 日遅れて位相後退する部位があった。この現象は生体内脱同調であり、時差ボケ症状、糖尿病などの体内時計関連疾患で生じることが報告されている。

以上 1) 2) 3) の結果から長期間 生体各部位の遺伝子発現と種々の行動をリアルタイムで連結しながら測定するシステムが完成し、

個体レベルで各組織の時計遺伝子発現リズムが行動および睡眠覚醒リズムとどのような関係を持ち、形成されているか明らかにする研究の基盤を築くことができたと考えられる。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Hamada T, Miyakawa K, Kushige H, Shibata S, Kurachi S. Age-related expression analysis of mouse liver nuclear protein binding to 3'-untranslated region of Period2 gene. *J. Physiol. Sci.* (2015) (in press).

DOI: in press (査読有)

2. Hamada T, Niki T. and Ishida N. Role of p53 in the entrainment of mammalian circadian behavior rhythms. *Genes to Cells* (2014) 19, 441-448.

DOI: 10.1111 (査読有)

3. Hamada T, Niki T. and Ishida N. Role of p53 in the entrainment of mammalian circadian behavior rhythms. *Global Medical Discovery* (ISSN 1929-8536) (2014) Oct 11.

<http://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/role-p53-entrainment-mammalian-circadian-behavior-rhythms/>

(査読無)

[学会発表](計 10 件)

1. 浜田俊幸, 石川正純, Kenneth Sutherland, 宮本直樹, 白土博樹, 本間さと, 本間研一, 新規 4D imaging による自由行動マウスの全身の時計遺伝子発現制御機構の解析, 日本薬学会 第 135 年会, 抄録集 p134 (ポスター発表), 3月 27日, 2015 神戸サンポーホール (兵庫県、神戸市) .

2. (招待講演) 浜田俊幸, 体内時計ペースメーカー細胞による脳内および体全体の恒常性維持機構の解明, 公益財団法人 光科学技術研究振興財団 研究助成金贈呈・研究表彰の式典, 3月 3日 2015 浜松ホテルクランプレス (静岡県、浜松市)

3. 浜田俊幸, 石川正純, Kenneth Sutherland, 宮本直樹, 白土博樹, 本間さと, 本間研一, In vivo whole body 4D imaging による全身の時計遺伝子発現制御機構の解析, 抄録集 p101 (ポスター発表), 第 21 回日本時間生物学会学術大会, 11月 8日, 2014 九州大学 (福岡県、福岡市)

4. Hamada T, Ishikawa M, Sutherland K, Miyamoto N, Shirato H, Honma S, Ken-ichi Honma K. In vivo whole body 4D imaging by tracking clock gene expression in multi-regions of freely moving mice. The 12th international symposium for drug discovery and medical care. Abst. p46 (ポスター発表), 9月 5日 2014 年, 北海道大学 (北海道、札幌市)

5. Hamada T, Ishikawa M, Sutherland K, Miyamoto N, Shirato H, Honma S, Ken-ichi Honma K. In vivo whole body 4D imaging by tracking clock gene expression in multi-regions of freely moving mice. The 30th Anniversary Meeting Sapporo Symposium on Biological Rhythm. Abst. p98 (ポスター発表), 7月 26-27日 2014 年 北海道大学 (北海道、札幌市)

6. (招待講演) Hamada T., Novel noninvasive 4D-imaging of clock gene expression in freely moving mice, Kick-off Symposium 'Let's start collaboration' Hokkaido University Graduate School of Medicine & Dokuz Eylül University, Abst p13, 28 May 2013 北海道大学 (北海道、札幌市)

7. (招待講演) 浜田俊幸, 動体追跡技術による全身の時計遺伝子発現定量解析と行動解析, 第 155 回日本獣医学会大会, Abst p162, 3月 28日 2013 年 東京大学 (東京都、本郷)

8. (招待講演) 浜田俊幸, 石川正純, Kenneth Sutherland, 宮本直樹, 白土博樹, 本間さと, *本間研一, 覚醒マウスにおける時計遺伝子発現の 4D イメージング, 第 2 回睡眠研究会, 7月 5-6日 2012 年 名古屋大学 (愛知県、名古屋市)

9. 浜田俊幸, 石川正純, Kenneth Sutherland, 宮本直樹, 白土博樹, 本間さと, *本間研一, In vivo 4D イメージングによる覚醒マウスの時計遺伝子発現定量解析, *Journal of chronobiology*, Vol.18 No.2 p145, 第 19 回日本時間生物学術大会 9月 15日 2012 年 北海道大学 (北海道、札幌市)

10. 浜田俊幸, 石川正純, Kenneth Sutherland, 宮本直樹, 白土博樹, 本間さと, *本間研一, 覚醒マウス嗅球および皮膚における時計遺伝子発現の 4D イメージング, 北海道医学大会生理系分科会, Program of 92nd Hokkaido Medical Congress p17, 9月 11日 2012 年 北海道大学 (北海道、札幌市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浜田 俊幸 (Hamada, Toshiyuki)

北海道大学・大学院医学研究科・特任准

教授

研究者番号：20360208