

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25560426

研究課題名(和文)時差消失マウスを用いた時差環境下での生活習慣病の発症機構の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Alternation of organ function in mice of jet-lag model

研究代表者

岡村 均 (Okamura, Hitoshi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60158813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：経済活動のグローバル化に伴い増加しているシフトワークは、生活習慣病の高リスクファクターであり、大きな社会問題となっている。しかし、シフトワークが示す慢性時差は、未だその分子機構は全く解明されていない。今回我々は、バソプレッシンV1a、V1bの両受容体を欠損したマウスが完全に時差が消失することを発見し、中枢時計である視交叉上核におけるバソプレッシン-V1a、V1b受容体の神経連絡が時差に重要な役割を果たすことを明らかにした。つづいて、シフトワークのモデルにて、行動リズムを計測したところ、時差消失マウスは瞬時に再同調したが、通常のマウスは再同調できず常に明暗リズムとは乖離していた。

研究成果の概要(英文)：Timed activities such as eating and sleeping are crucial for a comfortable social life and healthy living. As the living environment changes rapidly, and the numbers of around-the-clock facilities and people staying awake all night increase the convenience of consumers and the productivity of industries, the biological system to regulate our internal rhythms is being compromised. From screening the knockout of a variety of genes expressed in the SCN, here we identified the mice which do not show jet-lag even when they exposed suddenly to the 8-hour phase advance. We identified that the local circuits of vasopressin/V1aV1b-receptors in the SCN are crucial for jet-lag formation. From the analysis of chronic jet-lag conditions, we want to clarify the mechanism of a life-style related disease evoked by chronic jet-lag.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：脳科学

キーワード：脳とリズム

1. 研究開始当初の背景

経済活動のグローバル化に伴い増加しているシフトワークは、生活習慣病（糖尿病、高血圧、発癌等）の高リスクファクターであり、大きな社会問題となっている。これは、シフトワーカーの就業時間が体内時計のリズムが大きくずれ慢性時差状態になっているため、時計システムが破綻したと考えられる。しかし、現在も未だその分子機構は全く解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、SCN-Gene Project のスクリーニングにより同定した時差消失マウス（non-jet-lag (NJ) マウス）であると野生型マウスを慢性時差環境下（シフトワークのマウスモデル）において比較することで、シフトワーカーで高率に発症する生活習慣病の新たな発症機構およびその治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

今回我々はまず、NJL マウスの分子神経機構を解明し、次に NJL マウスと野生型マウスを比較検討することにより、慢性時差条件下でどのような病態を示すかを検討した。慢性時差の条件としては、明暗リズムを5日毎に8時間前進させる条件を採用した。

4. 研究成果

時差がなぜ起こるのかと言えば、自身の体内で正確に時を刻み続ける時計が、瞬時には海外の現地時間にリセットされないためである。この機構を解明するため、我々は、体内時計を統括する視床下部にある視交叉上核（suprachiasmatic nucleus: SCN）に注目した。そこで、我々はまず、SCN の時計が時差のとき、どのようになっているのかから検索を始めた。

SCN はマウスでは最大径0.5mmのラグビーボール状の小神経核で、ヒトでも長径で2mmも無い。非常に重要なことに、生体時計では、時計遺伝子の刻む時刻が、SCNを一歩出るとその時間位相が逆転することである。従って、SCNの時間を知りたければ、きっちりSCNのみを取り出し、周囲の物を完全に排除して測定しなければならない。そこで、ヒトと同じく明暗条件を急速に変えれば時差を示すマウスを用い、時差前後で、我々は脳の凍結切片を、レーザーレーザーマイクロダイセクション装置を用いてSCN切り分け採取し、RTPCRにて、時計遺伝子の発現量を定量することにした。

時差実験は、日本から米国西海岸への移動

にあたる、飼育する明暗環境を8時間早める条件で行った。時差を起こす前は、1日半、時差の後は10日間にわたって、4時間毎にSCNをサンプリングし、定量的に時計遺伝子の量を測定した。哺乳類時計の中核振動体を構成するPer2時計遺伝子を見ると、時差を起こす前は明瞭な日周リズムを示していたが、時差を起こした直後はそのリズム性が消失した。これはPer2だけに限らず、他の時計遺伝子も同様であった。

SCNは、そのきわめて安定したリズム性が最大の特徴であるので、この時差後のリズム消失は想定外の驚きであった。その後、リズム性は日々少しずつ回復し、8日後には時差前と同様の明瞭な日周リズムが観察された。この時計遺伝子の結果は、行動レベルに反映され、マウスは、時差の後、新しい明暗環境に順応するのに10日程度を要した。

生体リズム発信装置は何もSCNにだけであるのではない。実は、生体リズムは全身の細胞で発現する。確かに、全身にある体内時計を統括するのはSCNであるが、全身の細胞も発振能力を持つ。だが、これも時差の時のようになるのかわからない。今回、SCNサンプリングに用いたと同じマウスの、肝臓、腎臓の時計の動態を調べた。その結果、末梢臓器の時計の時計遺伝子のリズムは、SCNのようなリズム振幅の減弱は伴わず、十分保たれていた。しかし、新しい明暗周期へのリズムの位相の同調はなかなか起こらず、10日もかかった。SCNの位相変位が末梢時計よりも常に先行すること、完全同調でも末梢臓器の同調はSCNの同調よりも1-2日長くかかること、肝臓と腎臓では位相変位の程度はほぼ同程度に進行することから、まずSCNが同調し、この情報が全身の臓器の時計の同調を誘導しているように思われる。昼夜の体温リズムも時差時に変位するが、これの新明暗周期への同調も、同様に10日かかる。すなわち、体機能の同調は、SCN発振の新周期への同調と振幅が回復した後に起こるのである。これは、SCNの強いリズムの回復が時差からの脱却に必要であることを示唆している。

以上の実験より、時差の病態の本丸はSCNにあることがわかる。その分子を同定するため、以前より進めていた、SCNに発現する遺伝子を網羅的にin situ hybridizationや免疫組織化学によりスクリーニングし、ノックアウトマウスを作成するプロジェクト（SCN-Gene Project）を用い、時差環境の行動実験パラダイムにて異常を検出するということである。このプロジェクトで作成した

NJL マウスは、バソプレッシン V1a と V1b 受容体を共に欠損したダブルノックアウトマウス (V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウス) であった。

これを始めるに当たり注目したのは、SCN にペプチド作動性ニューロンが豊富なことがある。なかでも、1975年にすでに SCN にバソプレッシン産生細胞の存在が報告されており、事実このニューロンは SCN 背内側部の最大のコンポーネントである。SCN のバソプレッシンニューロンは髄液中のバソプレッシンの主要な供給源として知られている。さらに、SCN には V1a および V1b 受容体が発現しているとされる。SCN では、バソプレッシンも V1a 受容体も両方ともリズム的に産生が制御されていることも注目される。

作成した V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスは瞬時に新しい明暗位相に変位した。野生型マウスでは、新しい明暗周期への変位が 10 日要するのに比べれば、明らかに早い。また、イギリスへの旅行時のように明暗環境を 8 時間遅らせる環境下でも、V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスは同様に素早く新しい明暗周期に変位した。

では、V1a と V1b のどちらの遺伝子が関与しているのだろうか？単独 V1a^{-/-}マウスや、単独 V1b^{-/-}マウスでは、時差同調時間は、野生型マウスと V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスの中間の値を示した。すなわち、V1a と V1b の両遺伝子とも時差形成に関与していたのである。

このマウスの時計機能はどうなっているのだろうか？興味深いことに、V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスにおける、恒常暗条件下での概日行動リズムの周期、SCN における時計遺伝子の発現リズム、および短時間光照射に対するリズム応答性は全て正常であった⁴⁾。すなわち、V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスは、慣例的な時間生物学的見地からは一見正常なマウスであるが、唯一、時差環境下におかれた時のみ、素早く同調するという特徴を持ったマウスである。

このマウスの時差環境下における SCN における時計遺伝子の動態を、前に記した LMD の手法で検索した。V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスにおいては、時計遺伝子はすべて、時差を起こしてから 3 日目という早い段階で、時差前と同様の明瞭な日周リズムを示した。これは、野生型が 8 日かかることからすると、大きく変わっている。末梢臓器でも同じで、V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスにおいては、時差後 5-6 日目に完全に同調したが、これも野生型マウス 9-10 日目の同調より明らかに早い。この結果は、行動リズムの即座の同期が、SCN の時計遺伝子の発振の変動によるものである

ことを示している。

SCN バソプレッシンニューロン系は、室傍核や視索上核に発し下垂体後葉から血流に入り、腎臓の集合管の V2 受容体に働く抗利尿ホルモンとしてのバソプレッシン系とは全く異なる。SCN バソプレッシンニューロンは髄液中に出て、V1a 受容体の発現する腹側線条体や中隔核では社会行動に、視床下部背内側核や弧束核で血圧調節に関与すると言われているが、SCN の V1a 受容体は脳内最大密度であるが、全くその機能は分っていなかった。

細胞レベルの検索より、SCN のほとんどのバソプレッシンニューロンに V1a 受容体が発現することが分った。電子顕微鏡ではまた、バソプレッシン終末とバソプレッシン樹状突起や細胞体への豊富なシナプスがあるが、これは、バソプレッシン神経細胞同士が SCN 内の局所神経ネットワークを形成していることを示している。このネットワークが、V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスでは機能消失していると考えられる。

この SCN の局所ネットワークが如何にして時差に結びつくのかを検証するため、我々は、リアルタイムで SCN 各細胞の各々のリズムが測定可能な SCN スライス培養系を用いることにした。Per1-luc レポーターマウスから作成した SCN スライスの生物発光をモニタリングすることにより、SCN に存在する何百というニューロンの概日リズムを同時に測定することができる。SCN の各細胞は安定した概日リズムを示すが、各細胞のリズムの位相は異なる。すなわち、まず最初に SCN の背内側の細胞がピークを迎え、その後波が伝播していくように、腹外側に向かって次々と細胞がピークを迎えていく。

この SCN スライスを用いた時計遺伝子のリアルタイムモニタリングの結果、SCN の細胞時計は、バソプレッシンによりその順番が規定されていることを明らかにした。

地球上に発生した生命は、地球の自転によって生ずる昼夜の正確な周期的変動を予知するシステムを備えるようになった。この約 24 時間のリズムを刻む生体リズムシステムは、現存生物の大部分の生物の細胞レベルで発振する時間システムである。長い進化の過程で、この時計システムは、ほとんどの細胞代謝システムとインターロックして、細胞機能の時間調節を行なっている。

脊椎動物のような多細胞生物になると細胞レベルだけの時間発振は、全身の細胞の時間を統合する必要が出てくる。多くの生物

は全身の時計の統合システムが十全で無くとも、太陽からの光が、全身の細胞にある受容体を通して、全身の時計の最大のシンクロナイザーとして働いていると考えられている。しかし、夜行性の哺乳類は以前の動物と大きく仕組みが異なる。SCN は、リズム発振機能と光同調機能が合体した、これまでに見られない自律発振能とリズム発信能力を持つ極めてユニークな神経核であり、哺乳類でしか見られない。

この神経核がなぜ生体リズムの最高位中枢となったのかを考えるのに、重要な点は3点有る。まず初めに、哺乳類では光受容が眼球の網膜に集約され、他の部位は光受容の能力を失ったことがある。すなわち、太陽光は最早、全身の時計の直接のシンクロナイザーとしての役割は無い。哺乳類では、SCN が太陽光に取って代わっている。それは、SCN の位置に秘密がある。SCN は視床下部の吻端にあり、近隣の全身の自律神経系と内分泌系の最高位中枢である視床下部諸核に直接神経出力をしている。すなわち、SCN は、既存の自律神経系と内分泌系を利用して、時間シグナルを全身に伝え、全身の時計のシンクロナイザーとなっているのである。

次に重要であるのは、外界の明暗シグナルの受容であるが、これは、この神経核が視交叉という網膜からの通過線維の直上にあり、直接シナプス入力を受けることで解決している。このシナプス入力のおかげで、外界の明暗シグナルが逐一 SCN に入力し、迅速な調整も可能である。

では、肝腎の振動機構はどのようにして出来たのであろうか。SCN は、地球上の生物では最強の振動システムで、この本体をなすのが、今回解明したバソプレッシンニューロンの局所回路で、これに光を受容する VIP 神経系が入力することで、安定した強力なリズム発振を生み出すと考えられる。この局所回路のおかげで、この神経核だけを取り出しても、数ヶ月もの間、正確に規則正しいリズムを刻む能力を持つ。

このオッシレーター、インプット、アウトプットの3拍子揃った、完璧な時間システムである SCN は、夜行性として種の存続を図った哺乳類には、極めて有用であったと思われる。この夜間に正確に動く時計に従って、夜間活動し、恐竜等の捕食者が活動しはじめる朝を正確に予測して、夜明け前に帰巢していたのであろう。SCN バソプレッシンニューロン系は、満月の光や火災などの外界からの光による攪乱刺激の下でも、ほとんど攪乱さ

れない時間を作り出すのに重要であったと考えられる。この進化上有用であった完璧なシステムが、現在必要とされる地球規模での交流の障害の一つである時差の原因になっているのは、逆説的である。

今回さらに、4 か月間にわたって、明暗周期を5日毎に8時間前進させるという慢性時差環境下(シフトワークのモデル)にマウスをおいて、行動リズムを計測した。野生型マウスでは、この条件下では、常時、体内時計と環境時計は脱同調していたのであるが、V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスでは、時差の都度、瞬時に再同調し、脱同調は見られなかった。この慢性時差条件下で、食事の影響を検索したところ、通常食を自由飲食下で与えたマウスの体重変動の率は、ジェノタイプ間に差は無く、また、高脂肪食を自由飲食化で与えても体重変動は無かった。しかし、体重変動は、食餌など種々の条件下で変動するので、その食餌摂取条件を変動させるのみで無く、脂肪量等の他の指標で計測する。

V1a^{-/-}V1b^{-/-}マウスという遺伝子改変マウスで得られた時差の消失は、野生型マウスにV1a および V1b の受容体アンタゴニストをSCN へ浸透圧ポンプで持続微量注入したときも認められた。すなわち、アンタゴニスト投与群では、非投与群に比して、用量依存的に時差後の同調日時が短縮した。この結果は、SCN の局所神経伝達が時差を規定することを示すのみならず、薬剤投与でも時差を制御できる可能性を示す所見として注目される。これが現実化すれば、特に、“慢性時差”とも言える交替制勤務による、生活習慣病の予防や治療に可能な、新しいタイプのリズム調整剤としての効用が期待される。

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2件)

Yamaguchi Y, Suzuki T, Mizoro Y, Kori H, Okada K, Chen Y, Fustin JM, Yamazaki F, Mizuguchi N, Zhang J, Dong X, Tsujimoto G, Okuno Y, Doi M, Okamura H*. Mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. **Science**, 査読有, 342: 85-90, 2013.

産経新聞(10月4日1面)、日刊工業新聞(10月4日17面)、日本経済新聞(10月4日42面)、毎日新聞(10

月 4 日 24 面) 京都新聞(10 月 4 日 25 面) 読売新聞(10 月 6 日 2 面) および科学新聞(11 月 1 日 4 面) に掲載。BBC News, Independent, CBC News, National Geographic など多数の海外メディアで紹介。掲載号の Science に紹介記事

Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hayashi H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Suimye-Morioka M, Kakeya H, Manabe I, Okamura H*. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. **Cell**, 査読有, 155:793-806, 2013.

〔学会発表〕(計 2 件)

Okamura H: (Invited Speaker) New inter- and intracellular regulation of the circadian pacemaker. SRBR 2014, Big Sky (Montana USA), June 14-18, 2014.

岡村均: 第 51 回日本臨床分子医学会(特別講演)2014 年 4 月 11 - 12 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 均 (OKAMURA HITOSHI)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 60158813

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし