

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861335

研究課題名(和文)骨の体内時計の同調機構の解明

研究課題名(英文)Self-sustained and entrainable circadian clock exists in the femur.

研究代表者

南 陽一(Minami, Yoichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40415310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、大腿骨の体内時計について、時計遺伝子の発光レポーター遺伝子を導入したマウスを用いて検討した。大腿骨を採取して器官培養下に発光計測したところ、明瞭な約1日周期のリズムを観察した。発光イメージングシステムを用いた観察から、特に著名なシグナルが軟骨部に認められることが分かった。大腿骨の体内時計は、糖質コルチコイド(デキサメタゾン)やフォルスコリン、副甲状腺ホルモンで位相変位した。これらの作用は投与時刻依存的であった。

研究成果の概要(英文)：We identified that the circadian clock exists in the femur using PER2::Luc knock-in mice. The bioluminescence obtained from organ cultured femur showed clear about 24-hr rhythms over 5days. In continuous culture, the circadian rhythm of the bioluminescence was observed over 9months. High- or low-magnification real-time bioluminescence microscopic imaging revealed that the robust circadian rhythms emanated from the articular cartilage and the epiphyseal cartilage within the growth plate. By adding forskolin or dexamethasone, the circadian clock was phase shifted in a stimulation time-dependent manner. These data strongly suggest that tissue-autonomous and entrainable circadian clock exists in the femur.

Parathyroid hormone (PTH) is a peptide hormone which plays important roles in bone metabolism. We found that PTH reset the circadian clock of the organ cultured femur. The PTH induced phase shift was occurred both dose-dependent and stimulation time-dependent manner.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 発光イメージング 軟骨 器官培養

1. 研究開始当初の背景

様々な生理機能に、一日周期のリズムが観察される。例えば、骨吸収のマーカである NTX や、骨形成のマーカであるオステオカルシンには日内変動が知られている。体の中に「1日」を作り出すメカニズムを体内時計と呼ぶが、近年、体内時計が一群の時計遺伝子から構成されていることが明らかにされてきた。時計遺伝子には、例えば、転写調節を負に制御する *Per1*、*Per2*、*Cry1*、*Cry2*、*RevErbAa*、*RevErbAb*、正に制御する *Bmal1*、*Clock* があり、複雑な転写・翻訳のフィードバックループを構成して、時計遺伝子の発現調節に概日リズム(約 24 時間周期のリズム)を与え、また様々な生理機能をもつ遺伝子(出力遺伝子)の発現に概日リズムを伝えている。体内時計の中核は、視床下部に第三脳室を挟んで一対存在する視交叉上核という神経核に存在する。しかし、時計遺伝子の発見以降、様々な研究者によって、分子レベルで概日振動を生み出す体内時計が、肝臓や心臓など、様々な臓器に存在することが明らかにされてきた。現在では、体内のほぼすべての臓器に体内時計が存在し、視交叉上核がそれら末梢時計を統御して、体内の時刻秩序が保たれていると考えられている。

体内時計は自律的であり、外界からの情報がなくとも、概日リズムを刻み続ける頑強なシステムである。一方で、体内時計は外界からの情報を受容し、状態を変化させることのできる柔軟なシステムでもあり、例えば、光情報が入力することで体内時計の時刻(位相)が変化することが知られる。末梢臓器の体内時計は、神経性・液性に時刻情報を受容して全身のリズムと協調しながら、局所の生理機能の時刻秩序を統御すると考えられる。これまで、NIH3T3 マウス繊維芽細胞、Rat-1 ラット繊維芽細胞、U-2 OS ヒト骨肉腫細胞などの株化細胞、肝臓や肺などの器官培養を用いた実験により、合成ステロイド薬であるデキサメタゾンや、アデニル酸シクラーゼを活性化させることで細胞内環状アデノシンモノリン酸(cAMP)レベルを上昇させるフォルスコリンを培地中に加えることで、体内時計の位相が変位することが報告されていた。

2. 研究の目的

大腿骨の器官培養系を構築し、骨組織における体内時計の存在を直接的に示すことを目的とした。さらに、大腿骨の体内時計を変化させることのできる物質を探索し、同調機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

体内時計の状態を発光で可視化できるレポーター遺伝子をもったマウスから大腿骨を採取し、器官培養を行った。用いた PERIOD2::Luc ノックインマウス(PER2::Luc マウス)は、米国の Joseph Takahashi 博士

らにより作出されたマウスで、PER2 タンパクのカルボキシル末端にホタルルシフェラーゼを融合させた発光レポーターを発現するマウスである。

PER2::Luc マウスから無菌下に大腿骨等の骨組織を採取し、軟部組織を丁寧に剥離した。得られたサンプルを直径 35 ミリの培養皿にセットし、先行文献(Yoo *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004)に倣い、培養した。発光リズム観察のため、器官培養下の骨組織を、恒温槽内に設置した発光リズム測定装置にセットした。また、大腿骨全体を視野に入れられるようなマクロ発光イメージングシステムを用い、PER2::Luc レポーターのシグナルの局在を検討した。

観察中のサンプルに対し、化合物を滴下し、発光リズムに与える影響を観察した。他の臓器で体内時計に対する同調能が知られていたフォルスコリン(Yamazaki *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002)、デキサメタゾン(Balsalobre *et al.*, *Science*, 2000)さらに大腿骨への投与で *Per1* や *Per2* の遺伝子発現が誘導されると報告(Hinoi *et al.*, *J Biol Chem*, 2006)されていた副甲状腺ホルモン(human PTH(1-34)、ペプチド研究所)を用いた。

4. 研究成果

PER2::Luc マウスから単離した大腿骨を器官培養し、発光量を継続的に観察したところ、5 日以上にわたって明瞭な発光量に概日リズムが観察された。他の組織と同様に、発光リズムは徐々に振幅が低くなっていった。培地を交換したところ、発光リズムの振幅が回復し、再び明瞭な概日リズムが観察されるようになった。培地交換を繰り返した結果、9 か月以上ものあいだ、生体外で発光の概日リズムを観察することに成功した。培養大腿骨に見られた発光リズムには、明瞭な性差は認められなかった。また、大腿骨以外の骨についても検討を進めたところ、頭蓋冠や肩甲骨、橈骨や脛骨でも、発光量に概日リズムを観察することができた。生体外で長期に維持された組織で、持続的に振動する概日リズムが観察されたことから、組織自律的な体内時計が存在していることが示唆された。

発光リズムの振幅が経日的に減弱し、培地交換によって振幅が回復したことは、他の臓器の器官培養系で見られる現象と同様であると考えられた。1 細胞レベルの発光イメージングから、個々の細胞の発光リズムは概日性を保っているものの、細胞間の位相のばらつきが経日的に増大し、結果として振幅が低下して全体でのリズム性が減じることが示されており、大腿骨器官培養系でも同様の現象が生じたものと考えられた。培地交換によって、多数の細胞が同じ位相に合ったり、全体で見えた場合の振幅が増加、強固なリズム性が回復したと考えられた。

発光シグナルの局在性を検討するために、京都府立医科大学 統合生理学 八木田和弘教授が開発を進めている、マクロ発光イメージングシステム(オリンパス社)を用いて、大腿骨全体を視野に入れた観察を行った。この結果、発光シグナルは、骨幹部では弱く、骨端部 成長軟骨板、大腿骨頭に強く認められ、このシグナルは3日以上にわたって明瞭な概日リズムを刻んだ。また、関節軟骨部にも発光シグナルが認められ、3日以上にわたり明瞭な概日リズムを刻んだ。以上の観察結果は、軟骨組織に体内時計が局在することを示していた。

今回の結果について、軟骨組織以外の体内時計の存在を否定するとは考えていない。実際、骨芽細胞や破骨細胞に、体内時計が存在するとする報告がある。器官培養下の大腿骨で、骨幹部に発光シグナルが認められなかった理由として、骨幹部では光の透過性が低下しているため、外部から発光を確認できなかったことが考えられた。

体内時計の特徴の一つは、外界からの時刻情報を受け入れ、状態を変化できること(同調能)である。器官培養下の大腿骨に対し、デキサメタゾンを滴下して発光リズムに与える影響を観察したところ、体内時計の位相は大きく変化した。位相変位量は、デキサメタゾンの投与時刻に依存し、発光リズムのピークで表わされる PER2::Luc 活性の頂点付近で投与した場合には位相前進が(ピークがそれまでより早く来る) 活性の底付近で投与した場合には、位相後退(ピークが遅く来る)が、それぞれ観察された。同様にフォルスコリン投与によっても、体内時計の位相は大きく変化した。コントロールとして、溶媒であるエタノールを投与した場合には、大きな位相変位は観察されず、エタノールの投与時刻に依存した変化は観察されなかった。以上の結果から、大腿骨に内在する体内時計に同調能が備わっていることが示された。

生体内において、糖質コルチコイドの濃度が明瞭な概日リズムを示すことが知られている。例えば夜行性動物であるマウスにおいて、血中のコルチコステロンの濃度は、活動期である暗期の開始時刻に最も高く、休息期である明期に低値を示す。今回、デキサメタゾンの投与によって大腿骨の体内時計の位相が変位したことから、生体内で、糖質コルチコイドが骨組織の時計に対して時刻情報として機能している可能性が考えられた。

フォルスコリンはアデニル酸シクラーゼを活性化して細胞内 cAMP 濃度を上昇させる。フォルスコリン投与により大腿骨の体内時計の位相が変位したことから、G タンパク質共役型受容体のうち Gs と共役する受容体を活性化する内因性リガンドが、骨に対する同調因子として機能することが考えられた。

副甲状腺ホルモンは骨代謝に重要なホル

モンの1つであり、骨吸収を促進するホルモンとして知られている。PTH1 型受容体は G タンパク共役型受容体であり、PTH が結合すると cAMP をセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系と、カルシウムをセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系とが活性化することが知られている。PTH の血中濃度には日内変動が知られ、また PTH を投与した場合に、細胞内 cAMP レベルの上昇を介して、軟骨の *Per1* や *Per2* の発現レベルが増加することが報告されていた(Hinoi *et al.*, *J Biol Chem*, 2006)。

発光リズムを観察しながら器官培養した大腿骨に対し PTH を投与したところ、位相変位を観察した。フォルスコリン投与にみられたと同様に、PTH 投与による位相変位は、投与タイミング依存的に、位相前進を示したり、位相後退を示したりした。また、位相変位量は、PTH の投与濃度に依存して大きくなった。マクロ発光イメージングシステムを用い、PTH を作用させた場合の発光シグナルの変化を観察したところ、成長軟骨における発光リズムの位相が大きく変位することが観察された。さらに免疫組織化学により、成長軟骨には PTH1R の発現が確認された。これらの結果から、PTH が軟骨の体内時計に対して同調因子として作用し、位相変位を導くことが示された。

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)

1. Okubo N, Fujiwara H, Minami Y, Kunimoto 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 Orthopaedica*. 2015 Mar 13;1-5 (査読有)
doi:10.3109/17453674.2015.1029393
2. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Umemura Y, Tsuchiya Y, Shirai T, 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*, 2013, 8(11): e78306 (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0078306.

[学会発表](計 7件)

1. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Kunimoto T, Hosokawa T, Oda R, Kubo T, Yagita K. "Parathyroid hormone, but not melatonin, resets the bone circadian

- clock.” 61th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2015/3/30-31, Las Vegas (米国)
2. Minami Y, Okubo N, Fujiwara H, Oda R, Kubo T, Yagita K. “Prolonged Bioluminescence Monitoring in Mouse ex vivo Bone Culture Revealed Persistent Circadian Rhythms in Articular and Epiphyseal Cartilages” The Orthopaedic Research Society 2014 annual meeting, 2014/3/17, New Orleans (米国)
 3. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Oda R, Arai Y, Shirai T, Kubo T, Yagita K, “Juvenile Mouse Femur Grows In Organ Culture Keeping Normal Circadian Clock; Establishment Of A New Ex Vivo Model System For Investigating The Cross-talk Mechanisms Between Bone Growth And Circadian Clock Within Femur” The Orthopaedic Research Society 2014 annual meeting, 2014/3/18, New Orleans (米国)
 4. 南陽一、大久保直輝、久保俊一、八木田和弘、「骨組織には自律振動し同調能を持つ体内時計が内在している」第91回日本生理学会大会、2014/3/16、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県 鹿児島市)
 5. 南陽一、「骨組織に自律振動し同調能を持つ体内時計が内在する」第19回「性と生殖」公開シンポジウム「人間科学における生命研究の最前線」、2013/12/21、早稲田大学国際会議場(東京都 新宿区)
 6. 南陽一、大久保直輝、久保俊一、八木田和弘、「骨組織には自律振動し同調能を持つ体内時計が内在している」第20回日本時間生物学会学術大会、2013/11/9、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府 東大阪市)
 7. 大久保直輝、南陽一、藤原浩芳、小田良、久保俊一、八木田和弘、「長期培養下における大腿骨の成長と概日リズム」第20回日本時間生物学会学術大会、2013/11/9、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府 東大阪市)

〔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 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 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

南陽一(Yoichi Minami)
 京都府立医科大学大学院医学研究科・運動器時間制御学講座・助教

研究者番号：40415310