

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 5月30日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460313

研究課題名(和文) 発達期の概日時計システムに対する環境の影響

研究課題名(英文) Environmental effects on developing circadian system

研究代表者

仲村 朋子(吉川朋子)(NAKAMURA, Tomoko)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30451397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：親の生活リズムの乱れは、子供の新生～幼児期の生活リズムの乱れへとつながり、後に子供が概日リズム障害、さらには発達障害や精神疾患を発症するリスクを増大する。本研究では、マウスを用いた実験により、妊娠・授乳期における光環境や母親の概日リズムが、成長後における子供の概日時計の性質にどのような影響を与えるのかを解析した。時計遺伝子Clockに変異を持つマウスを概日リズムの乱れたモデルとし、野生型と比較した。光環境を変異マウスに最適化することにより、行動の概日リズムは改善することができた。一方、同じ条件では行動リズムを制御する視交叉上核のリズムは、改善することができなかった。

研究成果の概要(英文)：Parental daily rhythm has a great influence on that of child, especially during neonatal period. It can lead to a circadian rhythm dysfunction, developmental disorder or psychiatric disorder. In this study, we analyzed the effects of light environment and maternal circadian rhythm on offspring's circadian rhythm. Circadian clock gene mutant, Clock mouse, was used as a model for a dysfunctional circadian rhythm, and compared with wild type mouse. Light condition optimized for the mutant improve the behavioral rhythm. On the other hand, circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus, the central clock controlling behavioral rhythm, was not improved. Further investigation is needed to reveal a condition which is required to improve the suprachiasmatic circadian rhythm.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 サーカディアンリズム 視交叉上核 発達 光 周期 振幅

1. 研究開始当初の背景

概日時計は、昼夜の環境変化を予測して、生体環境を整えるために、地球上に生息する生物が進化させてきた非常に重要な生理機能である。しかし、現代社会では生活の24時間化が進み、外界の昼夜に合わせたサイクルで生活することができない人が増えている。その結果生じた概日リズム障害は、個人のQuality of Lifeを低下させるだけでなく、精神・神経疾患や生活習慣病へとつながり、そこに起因する社会損失は莫大なものである。また、親の生活リズムの乱れは、子供の新生～幼児期の生活リズムの乱れへとつながり、後に子供が概日リズム障害、さらには発達障害や精神疾患を発症するリスクを増大するのではないかと考えられる。近年、精神疾患や発達障害の増加が著しく、その発症メカニズムの解明に向けた解析が盛んに行われている。その中で、概日時計本体の発振に関わる時計遺伝子における変異や多型が報告されている (Albrecht 2013, Handb Exp Pharmacol)。実際に、精神疾患の多くが概日リズム障害を併発しており、生活リズムを整えることで疾患の症状改善が見られる。このように、概日時計と精神疾患の間には密接な関係があるが、その背後のメカニズムの全容は解明されていない。

2. 研究の目的

妊娠中～幼少期において、子供の概日リズムに作用する環境要因は、光と母親の生体内環境や哺育行動の概日リズムである。本研究では、マウスを用いた実験により、妊娠・授乳期における光環境や母親の概日リズムが、成長後における子供の概日時計の性質にどのようなインパクトを持つのかを明らかにする。本研究では、時計遺伝子 *Clock* の19番目のエクソンを欠損する変異を持つマウス (*Clock* マウス) を「夜更かし型」の行動を示すモデルとして使用し、「早起き型」の野生型 (WT) と比較する。この解析を通して、子供の発達期において、概日リズムを正しく保つ環境を維持することの重要性を示す。

3. 研究の方法

概日時計の挙動を発光によりモニターでき

る *PER2::LUC* ノックインマウスを *Clock* マウスと交配し、発光レポーターを持つ *Clock* マウスを作製した。このマウスを下記の A および B の条件を組み合わせた環境で飼育し、離乳後の仔の行動および *PER2::LUC* 発光の概日リズムを測定し、発達期における環境が概日時計の性質にどのような影響を与えるのかを調べた。

A: 光環境の影響。出生前、授乳期あるいは離乳後の光条件を 明:暗 = 12 時間:12 時間 (LD12:12、WT マウスの内在周期相当)、LD14:14 (*Clock* 変異マウスの内在周期相当)、または 恒暗条件とした。

B: 母親の遺伝型 (WT、*Clock*) の影響。ヘテロ交配 (WT/*Clock* × WT/*Clock*) あるいはホモ交配 (WT/WT × WT/WT あるいは *Clock*/*Clock* × *Clock*/*Clock*) により産出した WT および *Clock* マウスを使用した。

4. 研究成果

LD12:12 で繁殖 (ヘテロ交配)・飼育したマウスより視交叉上核スライスを作製し、培養条件での発光リズムを測定した (図 (上))。WT マウス由来のスライスは、終始、高振幅のリズムを示した。一方、*Clock* マウス由来のスライスは、培養開始から最初の数日間、振幅は小さい発光リズムを示したが、1週間程経過すると自然に振幅が増大した。低振幅の時の周期は、25 時間である。一方、振幅が増大した後の周期は、28 時間に延長しており、*Clock* マウスにおける行動リズムの内因性周期と同等である。この結果は、内因性周期が 28 時間である *Clock* 変異マウスが 24 時間周

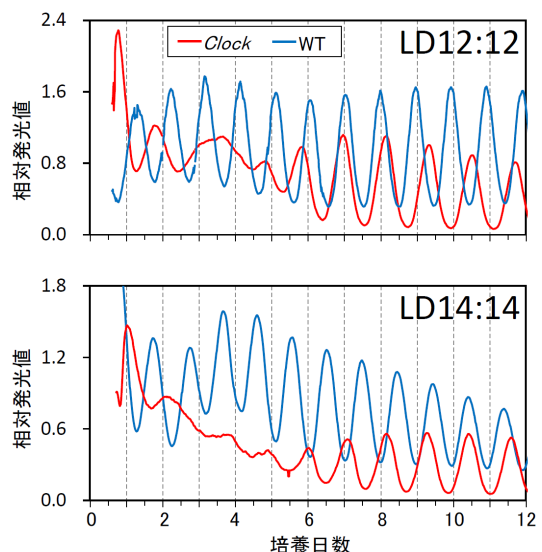


図 視交叉上核スライスからの発光リズム。

期の環境で飼育されていたことがストレスとして働き、生体内で概日時計の振幅が低下していたと解釈することができる。一方、培養条件への移行により内因性周期での振動が可能になったため、高振幅のリズムが回復したと考えられる。この仮説を証明するべく、離乳後の光周期を LD14:14 (*Clock* マウスの内在周期相当)あるいは恒暗(マウスは内在周期でフリーラン)として、同様の実験を行ったが、培養開始直後の低振幅は回避できなかった(図(下))。また、出生前から光周期を LD14:14 とした場合にも、同様の結果が得られた。一方、行動リズムにおいては、LD14:14 や恒暗条件で *Clock* マウスのリズムの振幅が上昇しており、仮説を支持する結果となった。

本研究で得られたスライス培養の結果は、検証した範囲内では、当初の仮説を支持するものではなかった。しかし、世代を超え得た影響が存在する可能性もあり、仮説を完全に否定(あるいは支持)するためには、さらなる検証が必要である。一方、低振幅からの自然な振幅の増大は、*Clock* マウスの視交叉上核内における概日時計ネットワークの状態変化を示唆している。概日時計ネットワークには、まだ未解明な部分が多く残されており、今後につながる有用な解析ツールを発見したと言える。

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 5 件)

1. Yoshikawa T., Inagaki N.F., Takagi S., Kuroda S., Yamasaki M., Watanabe M., Honma S., Honma K.-i. Localization of photoperiod responsive circadian oscillators in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Sci. Rep.* **7**:8210 (2017) 査読有
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08186-5>
2. Yoshikawa T., Honma S. Lithium lengthens circadian period of cultured brain slices in area specific manner. *Behav Brain Res.* **314**:30-37 (2016) 査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.045>

3. Yoshikawa T., Nakajima Y., Yamada Y., Enoki R., Watanabe K., Yamazaki M., Sakimura K., Honma S., Honma K.-i. Spatiotemporal profiles of arginine vasopressin transcription in cultured suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **42**:2678-2689 (2015) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1111/ejn.13061>
4. Kon N., Yoshikawa T., Honma S., Yamagata Y., Yoshitane H., Shimizu K., Sugiyama Y., Hara C., Kameshita I., Honma K.-i., Fukada Y. CaMKII is essential for the cellular clock and coupling between morning and evening behavioral rhythms. *Genes Dev.* **28**:1101-10 (2014) 査読有
<http://genesdev.cshlp.org/content/28/10/1101.abstract>
5. 吉川朋子・本間さと 時計遺伝子 日本臨床 72 増刊号 4:261-265 (2014) 査読無

[学会発表](計 12 件)

1. 吉川朋子・高木清二・黒田茂・山崎美和子・渡邊雅彦・本間さと・本間研一 Photoperiod responsive circadian oscillators in the mouse suprachiasmatic nucleus. 第 23 回 日本時間生物学会学術大会 (2016)
2. Tomoko Yoshikawa, Natsuko Inagaki, Seiji Takagi, Shigeru Kuroda, Sato Honma, Ken-ichi Honma. Localization of photoperiod sensitive circadian oscillators in mouse suprachiasmatic nucleus. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan (2016)
3. 吉川朋子・高木清二・黒田茂・山崎美和子・渡邊雅彦・本間さと・本間研一 Localization of photoperiod responsive circadian oscillators in

- the mouse suprachiasmatic nucleus. 第 22 回 日本時間生物学会学術大会 (2016)
4. Tomoko Yoshikawa, Natsuko Inagaki, Seiji Takagi, Shigeru Kuroda, Sato Honma, Ken-ichi Honma. Localization of photoperiod responsive circadian oscillators in the murine suprachiasmatic nucleus. Sapporo symposium on Biological Rhythm 2016 (2016)
 5. Tomoko Yoshikawa, Natsuko Inagaki, Seiji Takagi, Shigeru Kuroda, Sato Honma, Ken-ichi Honma. Regional Specificities of Circadian Photoperiodic Responses in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus. The 64th NIBB Conference "Evolution of Seasonal Timers" (2016)
 6. 吉川朋子・Michael T. Sellix・賈書生・本間さと・本間研一・Michael Menaker Phase control of the ovarian circadian clock and its function in timed ovulation. 第 93 回日本生理学会大会 (2016)
 7. 吉川朋子・中島芳浩・山田淑子・榎木亮介・渡辺和人・山崎麻耶・崎村健司・本間さと・本間研一 Circadian rhythm in arginine vasopressin expression monitored by a bioluminescence reporter. 第 22 回 日本時間生物学会学術大会 (2015)
 8. 吉川朋子・黒田茂・高木清二・上田哲男・本間さと・本間研一 マウス視交叉上核に存在する複概日振動体システムと光周期により変化する行動リズム 第 86 回日本動物学会大会 (2015)
 9. Tomoko Yoshikawa, Ken-ichi Honma, Sato Honma Analyses of bioluminescence rhythm from whole mouse brain slices by an *ex vivo* macro imaging system. Asian Forum on Chronobiology (2015)
 10. Tomoko Yoshikawa, Shigeru Kuroda, Seiji Takagi, Tetsuo Ueda, Sato Honma, Ken-ichi Honma. Bioluminescence imaging analyses revealed localization of evening and morning circadian oscillators in mouse suprachiasmatic nucleus. Asian Forum on Chronobiology (2015)
 11. 吉川朋子・中島芳浩・山田淑子・渡辺和人・山崎麻耶・崎村健二・本間さと・本間研一 Monitoring of circadian rhythm in arginine vasopressin expression by a bioluminescence reporter. 第 92 回日本生理学会大会 (2015)
 12. 吉川朋子・黒田茂・高木清二・上田哲男・本間さと・本間研一 Multi-oscillatory system that controls behavioral and sleep/wake rhythms in mammals. 第 21 回 日本時間生物学会学術大会 (2014)
- 〔図書〕(計 2 件)
1. Yoshikawa T., Inagaki N.F., Takagi S., Kuroda S., Honma S., Honma K.-i. Localization of photoperiod responsive circadian oscillators in the murine suprachiasmatic nucleus. In: *Biological Clocks: with reference to suprachiasmatic nucleus* (Honma K.-i., Honma S. Eds.) Hokkaido University Press pp.37-52 (2017)
 2. Honma S., Ono D, Enoki R., Yoshikawa T., Kuroda S., Honma K.-i. Oscillator networks in the suprachiasmatic nucleus: Analysis of circadian parameters using time-laps images. In: *Circadian Clocks* (Honma K.-i., Honma S. Eds.) Hokkaido University Press pp.33-41 (2015)
6. 研究組織
 (1)研究代表者
 仲村 朋子 (吉川 朋子) (NAKAMURA, Tomoko (YOSHIKAWA, Tomoko))
 近畿大学・医学部・助教
 研究者番号：3 0 4 5 1 3 9 7

(2)研究分担者

仲村 厚志 (NAKAMURA, Atsushi)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・
助教

研究者番号： 5 0 3 6 1 8 2 9