

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670027

研究課題名(和文)時差消失マウスを用いた慢性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)Elucidation of the molecular and neural mechanisms of jet lag for the life style-related diseases under chronic jet lag using non-jet-lag mice

研究代表者

山口 賀章 (Yamaguchi, Yoshiaki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30467427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：グローバル経済を担う24時間体制の工場や物流・輸送サービスあるいは警察や消防、病院といった社会施設は、必須の生活基盤である。しかし、24時間社会を担うシフトワーカーが生活習慣病を高頻度で発症することがわかってきた。私はこれまでに、概日リズムの中核である視交叉上核(SCN)をターゲットとした研究を行い、神経ペプチド・バソプレッシン(AVP)の受容体であるV1aとV1bを共に全身で欠損したダブルノックアウトマウスが時差を全く示さないことを見出した。本研究は、この時差消失マウスを用いて、慢性時差による病態の発症機構とその治療薬の開発を試みたものである。

研究成果の概要(英文)：The endogenous circadian clock drives daily oscillations in physiology and behavior. We are not usually aware of this system because it is completely synchronized with environmental light-dark cycles, but travelling rapidly across multiple time zones suddenly makes us aware of the desynchrony, causing sleep disturbances. Repeated jet-lag exposure increases the risk of lifestyle-related diseases, such as cardiovascular complaints. Especially, shiftworkers, who chronically experience jet lag socially due to rotated work-time schedules, have been shown to have a high risk in not only mental diseases but also cancer, diabetes, and obesity. However, little is known about the molecular and neural mechanisms of jet lag. We have recently revealed that mice genetically deficient in vasopressin V1a and V1b receptors are resistant to jet lag. Thus, our aim is to elucidate the fundamental mechanisms about jet lag and develop a remedy for shiftwork-related problems using non-jet-lag mice.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 視交叉上核 時計遺伝子 時差 バソプレッシン 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

覚醒・活動・睡眠という生活リズムは、社会生活や個人の健康の基盤である。ところが、経済のグローバル化に伴い、交替制勤務や夜間労働に従事するシフトワーカーが、ついに27%を超えた。近年の大規模な疫学研究により、シフトワークが、その慢性的な時差勤務のために、肥満や糖尿病といった生活習慣病の高リスクファクターであることが判明した。しかし、なぜ、慢性時差が病態の原因となるのか、その分子メカニズムは不明であり、この社会問題に対する抜本的な方策はなんらとられてこなかった。

私達は、海外旅行時に時差ボケを体感する。「確かに、夜に眠れず、昼に眠くなるが、1-2日もすれば時差ボケは解消される」と大半の人は思う。しかし実際のところ、ホルモンや体温のリズムが時差から回復するには、7-10日程度を要することが知られている。特に概日リズム機能が減弱している高齢者は、回復により多くの日数が必要である。確かに、野生型マウスを時差環境下におくと、概日行動や時計遺伝子発現あるいは体温リズムは全て、明暗周期の急激な位相変化に応じて瞬時に再同調できるわけではなく、完全な再同調には10日間もの日数が必要であった。これは、シフトワーカーにおいても同じであり、いくらシフトワークの負担を軽減するような効率化(例えば、シフトの順序やスケジュールの最適化)をはかったところで、シフトワーカーの実際の体内時計は多いに乱れて破綻の危機に陥っているであろう。

これまでの時差研究といえば、野生型マウスでは新周期に再同調するのに10日程度を要するが、副腎皮質ホルモン量を増減することや時計遺伝子をノックアウトすることにより、再同調がやや短縮し7-8日程度になるというようなことが検討されていた。しかし、私達が見出した時差消失マウスのように時差が全くなくなるというマウスは他に例がない。また、私達は、この時差の抑制剤の投与によって、脳だけでなく末梢臓器を含む体全体を、新周期に応じた自然の眠りへと導くことを報告した。従って、私達の成果は、シフトワーカーの健康問題を改善するだけでなく、自然の昼夜サイクルとはズレのあるサイクルで生活する睡眠相前進あるいは後退症候群の患者も治療できると期待できる。また、本研究の進展によれば、シフトワーカーや睡眠リズム障害者の概日リズム異常の治療に加え、ヒューマンエラーによる、惨事を招きかねない深夜の事故を防止できる点で、非常に意義が深い。

2. 研究の目的

経済活動のグローバル化に伴い、交替制勤務による24時間連続の生産・サービス活動が導入されてきた。近年、シフ

トワークが、肥満や糖尿病といった生活習慣病の高リスクファクターであることが判明し、大きな社会問題となっている。これは、慢性的な時差勤務のため、シフトワーカーの概日時計システムが破綻したためとされる。

私は、時差の分子メカニズムを解明するために、概日リズムの中核である脳の視交叉上核(SCN)を対象としたスクリーニングを行った。その結果、SCNの主要な神経ペプチド、バソプレッシンの受容体であるV1aおよびV1bを共に欠損したダブルノックアウトマウス(V1aV1bDKOマウス)では、明暗環境の位相を変化させた時に生じる時差が完全に消失することを発見した(Yamaguchi et al. Science 342, 85-90, 2013, 図1)。本研究の目的は、この時差消失V1aV1bDKOマウスを用いて、慢性時差がもたらす病態のメカニズムを解明するのみならず、新規の時差改善薬をも開発することで、この病態を予防・治療することである。

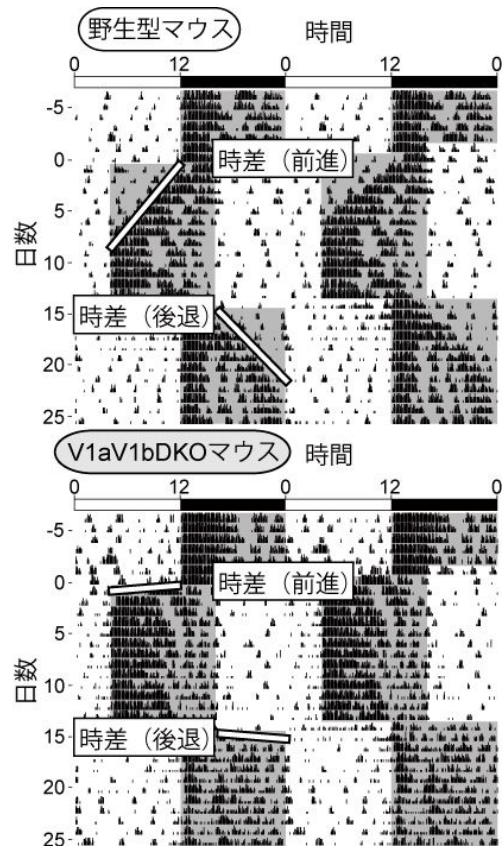


図1: V1aV1bDKOマウスは瞬時に時差に再同調する

3. 研究の方法

近年の大規模な疫学研究により、シフトワークが肥満や糖尿病といった生活習慣病の高リスクファクターであることが判明したが、原因は依然として不明のままである(PLoS Med, 8, e1001141, 2011)。ところで、一日の総カロリー摂取量が同じであっても、活動期ではなく睡眠期に多くのカロリーを摂取すると肥満になる(Cell Metab, 15, 848-860, 2012)。これは、体内時計により、各代謝経路の活動が日内リズムを持つよう

に制御されているため、摂取したグルコースやタンパク質は、活動期では熱やエネルギーへと代謝されるが、睡眠期では体脂肪として蓄積されるためとされている（図2）。そこ

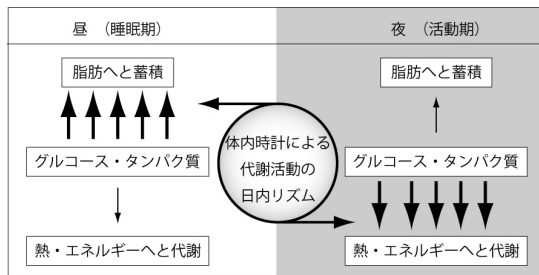


図2：マウス代謝経路活性の日周リズム

マウスは夜行性であり、暗期に活動する。睡眠期の栄養摂取過多が肥満・糖尿病の原因と考えられている。で、私は、シフトワーカーにおいては、たとえ活動期であったとしても、度重なる時差勤務のために体内時計と生活時刻の位相が同期しておらず、摂取した食餌が脂肪として蓄積されるため、肥満になるとの仮説を立てた。野生型マウスと V1aV1bDKO マウスを時差環境下におくため、飼育環境の明暗周期を 8 時間前進させるという、時差症候群の実験パラダイムを用いた。先述の通り、一回の明暗環境の前進の際は、野生型マウスでは、新しい明暗周期に再同調するのに 10 日程度を要したが、V1aV1bDKO マウスでは瞬時に再同調した。また、時差環境下における SCN や肝臓の時計遺伝子の発現プロファイルを Real-Time PCR 法により定量的に解析したところ、時計遺伝子の日周リズムが、V1aV1bDKO マウスにおいては野生型マウスよりもずっと早く回復することがわかった。

続いて、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）にマウスにおいて、行動リズムを計測した。V1aV1bDKO マウスでは、時差の都度、瞬時に再同調したが、

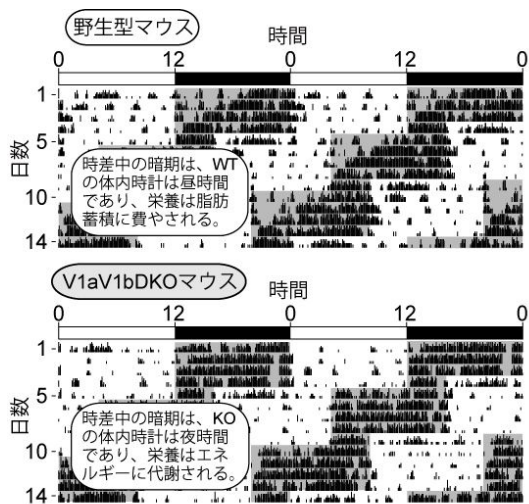


図3：慢性時差環境下における各マウス行動リズム  
野生型マウスは明暗環境の変化についていけず、昼夜逆転した行動を示すが、V1aV1bDKO マウスは、瞬時に新明暗環境に再同調する。

野生型マウスでは、常時、再同調が完了せず、体内時計と環境時刻の乖離が確認された（図3）。したがって、野生型マウスと V1aV1bDKO マウスをこの慢性時差環境下において、長期間飼育した。

#### 4. 研究成果

慢性時差環境下に 4 か月間おいたマウスの肝臓から切片を作製し、細胞周期に入っている細胞を染色した。肝臓は、基本的に細胞分裂を起こす細胞が少ないことで知られているが、確かに慢性時差環境下においていない野生型マウスの肝臓では細胞周期に入っている細胞はほとんど観察されなかった。ところが、慢性時差環境下においた野生型マウスの肝臓においては、非常に多くの細胞が細胞周期に入っている細胞であった。V1aV1bDKO の肝臓においては、慢性時差環境下におこうがおくまいが、細胞周期に入った細胞はほとんど観察されなかった。この結果から、野生型マウスを慢性時差環境下におくと、日々の体内時計と環境時刻の度重なるズレから、肝臓に負荷がかかって細胞分裂が活発になるが、V1aV1bDKO マウスでは、時差の都度、瞬時に再同調することで、時差のない環境と同様に、肝臓に負荷がかかっていないものと推察される。すなわち、野生型マウスと V1aV1bDKO マウスをこの慢性時差環境下におく実験は、シフトワーカーの生活環境だけでなく、生活習慣病の発症までを模倣するマウス実験モデルであるといえる。恐らく、この慢性時差環境下の暗期においては、V1aV1bDKO マウスの体内時計は活動期であるが、野生型マウスのは睡眠期なのであろう。従って、この慢性時差環境下においた各マウスに対して、暗期においてのみ、食餌を摂らせると、シフトワーカーの生活環境を模倣できると期待できる。というのも、これは交替制勤務者が、就業時間に縛られて、夜中に食事をすると同じことであるからである。V1aV1bDKO マウスでは、暗期に食べた食餌は、熱やエネルギーの生産に費やされるが、野生型マウスでは、脂肪蓄積に費やされるため、生活習慣病を発症すると期待できるだろう。食餌は通常食と高脂肪食の両者を用い、これによる生活習慣病リスクを、生理学、生化学、分子生物学、組織学的手法を用いての検討が多いに期待できる。具体的には、各マウスの体重、血糖値、レプチン・インスリン量、トリグリセリド量を測定し、慢性時差環境下の野生型マウスが、肥満や糖尿病の病態を示すかを調べることが可能である。以上の解析を慢性時差環境下で 4 か月続けた後に、SCN や肝臓、脂肪細胞、筋肉における、時計遺伝子の発現リズム（体内時計の位相を決定する）と代謝関連遺伝子のリズム（摂取した栄養がエネルギー代謝か脂肪蓄積のどちらに使用されるかを調べる）を Real-Time PCR 法を用いて、定量的に解析すればよい。また、膵臓や肝臓、脂肪細胞のパラフィン切片を作成し、

組織学的解析を行い、肥満や糖尿病に特徴的な、膵インスリン分泌の異常や、肝脂肪化・脂肪細胞の肥大化を検討することも可能である。

ところで、V1a/V1b 受容体のアンタゴニストを野生型マウスの SCN に投与し、明暗周期を前進させる時差実験を行ったところ、アンタゴニストは濃度依存的に、有意に再同調を早めた。従って、野生型マウスに持続的にアンタゴニストを投与することで、慢性時差環境下における生活習慣病発症を予防できるかが極めて重要である。アンタゴニストの投与は、独自に開発した SCN 特異的慢性薬物投与方法を用いることが可能である（実績：Science 342, 85-90, 2013、Nature Communications 2, 327, 2011 等）。

#### 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 1 件)

Suehiro, K., Nakamura, Y., Xu, S., Uda, Y., Matsumura, T., Yamaguchi, Y., Okamura, H., Yamashita, T., and Takei, Y. "Ecto-domain phosphorylation promotes functional recovery from spinal cord injury." Scientific reports 4, 4972, 2014. 査読有 DOI: 10.1038/srep04972

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 山口賀章、岡村均：「時差を担う分子神経機構 Molecular and neuronal mechanisms underlying jet lag」第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 22 日、神戸国際会議場・展示場（兵庫県・神戸市）

2. 山口賀章、岡村均：「概日リズム形成におけるバソプレッシン V1a, V1b 受容体の役割」第 41 回日本神経内分泌学会学術集会、2014 年 11 月 1 日、都道府県会館（東京都・千代田区）

3. 山口賀章、岡村均：「Intercellular communication by vasopressin-V1a/V1b signaling in the suprachiasmatic nucleus has a key role in jet lag」第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

4. 山口賀章、鈴木暢、岡村均：「時差消失マウスの開発による概日リズムの頑強性を担う分子神経機構の解明」第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学（京都府・京都市）

5. 山口賀章、岡村均：「視交叉上核のバソプレッシン神経結合と時差」第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日、パシフィコ横

浜（神奈川県・横浜市）

6. Yoshiaki Yamaguchi, Toru Suzuki, Yasutaka Mizoro, and Hitoshi Okamura: 「Rapid resetting of the circadian clock in vasopressin V1a and V1b receptors-deficient mice」, SRBR 2014 Society for Research on Biological Rhythms, 2014 年 6 月 17 日、Big Sky (Montana, USA)

〔図書〕(計 2 件)

1. 山口賀章、岡村均：「脳内バソプレッシンは時差ボケの原因か」、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ、250、1195-1196、2014

2. 山口賀章、岡村均：「時差をつかさどる視交叉上核のバソプレッシン神経回路」公益社団法人日本生化学会、生化学、86、687-692、2014

〔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

研究室のホームページ：  
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-biology/>

日本語の総説、ライフサイエンス 新着論文レビュー First author's:  
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/7777>

脳科学辞典（視交叉上核の項）：  
<http://bsd.neuroinf.jp/w/index.php?title=%E8%A6%96%E4%BA%A4%E5%8F%89%E4%B8%8A%E6%A0%B8&oldid=21150>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 賀章 (YAMAGUCHI, Yoshiaki)  
京都大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：30467427

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：