

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04683

研究課題名(和文) 発生過程における概日リズム成立原理の解明

研究課題名(英文) Developmental mechanisms of circadian clock in mouse embryo

研究代表者

八木田 和弘 (YAGITA, Kazuhiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90324920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の概日リズムの中樞は視床下部にある視交叉上核(SCN)であるが、我々はこれまでに、線維芽細胞などの培養細胞でも視交叉上核と同様の概日時計が備わっていることを示し、個々の細胞レベルでの概日時計制御系が果たす役割について検討を進めてきた。その結果、多能性幹細胞であるES細胞などを用い「概日時計は細胞分化と密接に関連する」という新たな事象を発見した。さらに最近、ES細胞の系で見出した分子機構が、マウス個体発生においても共通して機能することを突き止め、これまであまり知られていなかった哺乳類における概日時計成立過程の理解を推し進めた。

研究成果の概要(英文)：Circadian clocks reside in each cell-level throughout the body in mammals. Intrinsic cellular circadian clocks develop cell-autonomously during the cellular differentiation process. However, mechanisms controlling the emergence of cellular circadian clock oscillation in vivo have not yet been fully understood. Here, we show that Dicer/Dgcr8-mediated post-transcriptional mechanisms control the CLOCK protein expression in both mouse fetal hearts and in vitro differentiating ESCs, which contributes to the emergence of circadian clock in mammalian cells. This event occurs after cell lineage determination into hearts or loss of pluripotent stem cell markers in differentiating ESCs, suggesting the cellular differentiation-coupled clock development may be conducted by a two-step program consisting of cellular differentiation and following establishment of circadian transcriptional / translational feedback loops.

研究分野：環境生理学、時間生物学、細胞分化

キーワード：環境生理学 生物時計 発生発達 概日リズム 体内時計

1. 研究開始当初の背景

概日リズム(サーカディアンリズム)はほとんどの生物に認められる普遍的な生命現象である。近年、概日リズム異常が様々な疾患と関連することが報告されている。特に、自閉症や認知症といった発生・発達期および老年期をそれぞれ代表する疾患において、概日リズム異常を合併するケースが非常に多い。しかも、両者とも「昼夜のメリハリの低下」という概日時計の「振幅低下」を想起させるような症状を示す。これは睡眠障害を引き起こし、患者本人のみならず介護する家族のQOLを大きく損なわせる症状であり、メカニズムの解明と治療法の確立が待たれる医学的および社会的要請の高い研究課題である。しかし、発生・発達期から老年期まで一生を通して変化する概日時計の性質については、現在まで体系的な研究は少なく、概日時計の質的变化を標的とした介入法は確立されていない。

哺乳類の概日リズムの中樞は視床下部にある視交叉上核である。一方で、末梢のほとんどの細胞に概日時計があることが分かっている。さらに、我々は線維芽細胞など培養細胞でも視交叉上核と基本的に同様の概日時計が備わっていることを明らかにしている(Yagitaら, *Science*, 2001)。この唯一の例外が精粗細胞といった「生殖細胞」であり、概日時計のリズムが見られない。生殖細胞にも時計遺伝子は発現しており、概日リズムが無い理由は現在でも分かっていない。さらに、受精卵や初期胚にリズムが見られないことが報告されている。これに加えて、我々は、ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞に概日時計の振動が見られないことを世界に先駆けて発見した(Yagitaら, *PNAS*, 2010)。ところが、ES/iPS細胞を*in vitro*で分化誘導すると、分化に伴って細胞自律性に約24時間周期の概日時計が形成されることを明らかにし、「概日時計は細胞分化と密接に関連する」という新たな事実を発見した(Yagitaら, *PNAS*, 2010; Umemuraら, *PLoS One*, 2013)。さらに、我々は最近、分化に伴う概日時計の発生には、DNAメチル化制御を介した転写ネットワーク形成が重要であることを発見し(Umemuraら, *PNAS*, 2014)、細胞分化過程におけるエピジェネティック・プログラミングが概日時計の発生過程において必須のイベントであることを明らかにした。

哺乳類概日時計の発生における最大の特徴は、発生過程において時計遺伝子振動が徐々に出現してくるときに、周期長にはほとんど変化が見られず「振幅」が増大してくることである。我々は、ES細胞の分化誘導系を用いた*in vitro*モデルやマウス胎仔細胞における概日時計の発生過程において、これが「単一細胞レベル」でも認められる現象であることを明らかにしている(Yagitaら, *PNAS*, 2010; Inadaら, *FEBS Lett*, 2014)。

我々はこのメカニズムとして発生・分化過

程におけるエピゲノム制御機構と転写ネットワーク構築が重要であると考えており、これを制御する一連の動作原理の解明と分子パラメータの同定により、概日リズム形成の体系的理解を目指す。

2. 研究の目的

哺乳類の概日時計は初期胚には振動が見られず、発生が進むにつれてリズムが出現してくる。本研究課題では、マウスES細胞の分化誘導過程およびマウス胚を用いた個体発生過程における概日時計の成立メカニズムの解析を通し、概日時計成立原理の体系的理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) ES細胞の分化誘導系を用いたリズム振幅制御因子の同定

これまで我々は、細胞分化に伴う概日時計の発生メカニズムについて解析を進めてきた。細胞分化の制御に関わるDNAメチル化酵素Dnmt1, 3a, 3bの欠損ES細胞などを用いた概日時計発生に関わる因子の網羅的探索により、現在484の遺伝子および約73の長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)を候補因子として同定している。

現在、これらの候補遺伝子の一つであるKPNA2の過剰発現が正常なES細胞の分化誘導過程を阻害し、細胞分化異常を引き起こすとともに概日時計の形成が障害されることを明らかにした。この時、分化異常細胞における必須の時計タンパク質であるPER1およびPER2の核内移行が阻害され、細胞質への異常蓄積が生ずることが概日時計の発生障害の原因の一つであることが分かった。しかし、現在でも、どのようなメカニズムでPERタンパク質の細胞質での蓄積と核移行阻害が生じているのか分かっておらず、これまでの知見では概日時計振動の抑制を説明できない。従って、我々は、概日時計の振幅を制御しながら発生させる新規因子が存在すると考えている。

そこで、本研究課題では、概日時計レポーターであるmPER2::LucをノックインしたマウスES細胞を用いて、これらの候補因子からリズム振幅抑制に関わる因子をスクリーニングする。

具体的には、CRISPR/Cas9法を用いた遺伝子破壊およびTet-Onシステムを用いた過剰発現系を利用して、我々が開発した*in vitro*分化誘導による概日時計形成評価を行う。ES細胞を用いた概日時計発生の遺伝学的探索法はすでに確立している(Umemuraら, *PLoS One*, 2013)。

(2) 発生に伴う*in vivo*での概日時計振幅制御因子の探索

これまで、我々を含むいくつかのグループ

から、発生早期には概日時計の振動が見られず、器官形成が完了した胎生後期になって初めてリズム発振が見られるようになることが明らかにされている。本研究課題では、これまでの知見を踏まえて、マウス胎仔の組織を用いて、*in vivo* で発生に伴う概日時計形成メカニズムを解析し、リズム振幅制御因子を同定する。

マウス胎仔の線維芽細胞を用いた解析では、E10.5 日齢の胚では概日時計のリズムが無く、E15.5 日齢の胎仔細胞では明瞭なリズムが見られる (Inada ら, *FEBS Lett*, 2014)。従って、本研究課題では、概日時計が形成される体細胞組織を材料にして発生段階を対比させながら、マウス胎仔組織における概日時計の細胞自律的発生を制御する因子を網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) によって探索する。さらに、上述の *in vitro* 実験での候補因子群と比較検討して哺乳類細胞に普遍的なリズム振幅制御原理を明らかにする。

4. 研究成果

概日時計は、生殖細胞や受精卵等の初期胚には概日リズムは見られず、発生過程を通して形成される。我々は、ES 細胞に、概日時計のリズムが観察されないこと、*in vitro* で分化誘導すると細胞自律的に概日リズムが形成されること、さらに、リプログラミングによって iPS 細胞を作製すると、概日リズムが再び消失することを明らかにし、「概日時計と細胞分化との密接な関係」を発見した (Yagita ら, *PNAS*, 2010)。さらに、細胞分化過程における DNA メチル化状態の攪乱といったエピジェネティック制御異常によって概日時計の形成が阻害されることから、正しく制御された細胞分化プログラムが概日時計形成に必須であることも示した (Umemura ら, *PNAS*, 2014)。これに加え、近年、ES 細胞を用いた *in vitro* 分化誘導系だけでなく、*in vivo* のマウスの個体発生においても共通の概日時計形成機構が存在していることを明らかにし (Umemura ら, *PNAS*, 2017) 哺乳類概日時計の発生メカニズムの理解が進んだ。細胞自律的な概日時計の発生は、上述のように、まず正常な細胞分化へのコミットが必須であり、これを基盤として必須の時計タンパク質 CLOCK の転写後制御による発現が誘導されるなど、時計遺伝子の転写翻訳フィードバックループが成立することで完成する (Umemura ら, *PNAS*, 2017)。しかも、この CLOCK タンパク質の分化に伴う発現が、Dicer 依存的に転写後制御機構によって調節されていることを明らかにした (Umemura ら, *PNAS*, 2017)。我々は、これらの分子機構のみならず、概日時計発生の生理的意義についても新たな知見を見出した。驚くべきことに、概日時計形成前のマウス胎児では、母体の概日リズムが胎児に伝播される母子同調がほとんど見られず、マウス胎児の概日時計の形成に

伴い母子同調も成立することがわかった (Umemura ら, *PNAS*, 2017)。これらの結果は、胎児の概日リズム制御系が、まず細胞自律的な概日時計形成を軸に構築され、自律発振の開始に伴って他の細胞機能制御系や環境周期にドライブされる代謝ネットワークとのカップリングが成立していくという、「概日リズム制御系の機能発生プログラム」が存在することを強く示唆するものである。

概日時計の発生については 1980 年代後半から生理学的研究が重ねられ、出生直前のげっ歯類胎児では概日リズムの母子同調があること、母親の概日時計が胎児の概日時計発生に必ずしも必要ではないこと、しかし母親の概日リズム障害が胎児の発育に影響があること、などが国内外の研究者によって報告されてきた。一方で、概日時計発生の分子メカニズムについては、我々がマウス ES 細胞の *in vitro* 分化誘導系を開発し解析を進めるまで全く未解明のままであった。我々のグループは、概日時計の発生が細胞分化とリンクすることを世界で初めて明らかにし、概日時計の発生研究に大きな展開をもたらした。近年は、我々の成果をもとに幹細胞と概日時計の関連等に注目した研究が増えてきているが、分子機構を基盤とした概日リズム制御系の機能発生学を目指した研究は世界的に見てもほとんどなく、本研究は我々の先駆者としてのアドバンテージを示したものである。

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 14 件)

(*Corresponding author)

1. Minami Y, Ohashi M, Hotta E, Hisatomi M, Okada N, Konishi E, Teramukai S, Inokawa H, Yagita K*. Chronic inflammation in mice exposed to the long-term un-entrainable light-dark cycles. *Sleep Biol. Rhythm*, 16, 63-68, 2018. 査読有 doi: 10.1007/s41105-017-0127-5
2. Ohashi M, Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, Inada Y, Watanabe H, Tanaka T, Minami Y, Ukimura O, Miki T, Tajiri T, Kondoh G, Yamada Y, Yagita K*. Disruption of circadian clockwork in *in vivo* reprogramming-induced mouse kidney tumors. *Genes Cells*, 23, 60-69, 2018. 査読有 doi: 10.1111/gtc.12552
3. Abitbol K, Debiesss S, Molino F, Mesirca P, Bidaud I, Minami Y, Mangoni ME, Yagita K, Mollard P, Bonnefont X. Clock-dependent and system-driven oscillators interact in the suprachiasmatic nuclei to pace

- mammalian circadian rhythms. *PLoS One*, 12, e0187001, 2017. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0187001
4. Yoo S-H, Kojima S, Shimomura K, Koike N, Buhr E, Furukawa T, Ko CH, Gloston G, Ayoub C, Nohara K, Reyes BA, Tsuchita T, Yoo O-J, Yagita K, Lee C, Chen Z, Yamazaki S, Green C, Takahashi JS. Period2 3'-UTR and microRNA-24 regulate circadian rhythms by repressing PERIOD2 protein accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, E8855-E8864, 2017. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1706611114
 5. Umemura Y, Koike N, Ohashi M, Tsuchiya Y, Meng QJ, Minami Y, Hara M, Inokawa H, Hisatomi M, Yagita K*. Involvement of post-transcriptional regulation of Clock in the emergence of circadian clock oscillation during mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, E7479-7488, 2017. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1703170114
 6. Hara M, Minami Y, Ohashi M, Tsuchiya Y, Kusaba T, Tamagaki K, Koike N, Umemura Y, Inokawa H, Yagita K*. Robust circadian clock oscillation and osmotic rhythms in inner medulla reflecting cortico-medullary osmotic gradient rhythm in rodent kidney. *Sci. Rep.*, 7, 7306, 2017. 査読有 doi: 10.1038/s41598-017-07767-8
 7. Koinuma S, Kori H, Tokuda IT, Yagita K, Shigeoshi Y. Transition of phase response properties and singularity in circadian limit cycle of culture cells. *PLoS One*, e0181223, 2017. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0181223
 8. Mizutani H, Tamagawa-Mineoka R, Minami Y, Yagita K, Katoh N. Constant light exposure impairs immune tolerance development in mice. *J. Dermatol. Sci.*, 86, 63-70, 2017. 査読有 doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.12.016
 9. Kunimoto T, Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Hosokawa T, Asada M, Oda R, Kubo T, Yagita K*. A PTH-responsive circadian clock operates in ex vivo mouse femur fracture healing site. *Sci. Rep.*, 6, 22409, 2016. 査読有 doi: 10.1038/srep22409
 10. Tsuchiya Y, Umemura Y, Minami Y, Koike N, Hosokawa T, Hara M, Ito H, Inokawa H, Yagita K*. Effect of Multiple Clock Gene Ablations on the Circadian Period-Length and Temperature Compensation in Mammalian Cells. *J. Biol. Rhythm*, 31, 48-56, 2016. 査読有 doi: 10.1177/0748730415613888
 11. Tsuchiya Y, Minami Y, Umemura Y, Watanabe H, Ono D, Nakamura W, Takahashi T, Honma S, Kondoh G, Matsuishi T, Yagita K*. Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mouse. *Genes Cells*, 20, 992-1005, 2015. 査読有 doi: 10.1111/gtc.12305
 12. Hosokawa T, Tsuchiya Y, Okubo N, Kunimoto T, Minami Y, Fujiwara Y, Umemura Y, Koike N, Kubo T, Yagita K*. Robust circadian rhythm and parathyroid hormone-induced resetting during hypertrophic differentiation in ATDC5 chondroprogenitor cells. *Acta Histochem. Cytochem.*, 48, 165-171, 2015. 査読有 doi: 10.1267/ahc.15025
 13. Oshima T, Yamanaka I, Kumar A, Yamaguchi J, Nishiwaki-Okawa T, Muto K, Kawamura R, Hirota T, Yagita K, Irie S, Kay SA, Yoshimura T, Itami K. C-H Activation Generates Period-Shortening Molecules That Target Cryptochrome in the Mammalian Circadian Clock. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 7193-7197, 2015. 査読有 doi: 10.1002/anie.201502942
 14. 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 Orthopædica*, 86, 627-631, 2015. 査読有 doi: 10.3109/17453674.2015.1029393
- [学会発表](計25件)
- 1) 国際学会
- [招待講演・シンポジウム・ワークショップ]
1. Yagita K. Disruption of Circadian Clockwork in Dysdifferentiation-mediated Cancers. *15th Congress of the European Biological Rhythm Society*, Amsterdam, 2017. (招待講演)
 2. Yagita K. Circadian Clock Ontogeny in Mammals. *JSSR International Forum on Somnology 2017*, Tokyo, 2017. (招待講演)
 3. Ohashi M, Umemura Y, Minami T, Watanabe H, Tanaka T, Miki T, Ukimura O, Tajiri T, Kondoh G, Yamada Y, Yagita K. Disruption of circadian clockwork in *in vivo* reprogramming induced mouse kidney cancer and human Wilms Tumor. *2017 AACR ANNUAL MEETING (Minisymposium)*, Washington DC, 2017. (Selected symposist)
 4. Yagita K. Suppression of circadian molecular clockwork in dysdifferentiation-mediated cancers. *The 29th Conference of the International Society for Chronobiology*, Suzhou, 2016. (招待講演)

5. **Yagita K.** Microscopic- and Macroscopic-Bioluminescence Imaging for Understanding the Integrative Circadian Physiology in Organ Level. *16th International Symposium of Bioluminescence and Chemiluminescence in 2016*, Tsukuba, 2016. (招待講演)
6. **Yagita K.** Molecular Mechanisms of Circadian Clock Development in Mammalian Cells. *Asian Forum on Chronobiology in 2015*, Sapporo, 2015. (招待講演)
7. **Yagita K.** Cellular Differentiation and Circadian Clock Development in mammals. *ICCPB 2015*, Krakow, 2015. (招待講演)

2) 国内学会

[招待講演・特別講演・シンポジウム・ワークショップ]

1. **八木田和弘**．概日リズム制御系障害のメカニズム：マウスコホートから見えてきたもの．第95回日本生理学会大会，高松，2018（シンポジスト・オーガナイザー）
2. **八木田和弘**．体内時計と概日リズムの形成．*小児睡眠医学セミナー*，明石，2018（招待講演）
3. **八木田和弘**．メタチューニング・システムとしての概日時計．第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会（*ConBio2017*），神戸，2017（シンポジスト・オーガナイザー）
4. **八木田和弘**．サーカディアンリズムと環境ストレス応答．第45回日本潰瘍学会，京都，2017（特別講演）
5. **八木田和弘**．固有振動数の視点から見た概日リズムの生理学的特性．第24回日本時間生物学会学術大会，京都，2017（シンポジスト）
6. **八木田和弘**．環境時間攪乱による概日リズム障害の病態生理．第19回日本骨粗鬆症学会，大阪，2017（シンポジスト）
7. **八木田和弘**．イメージング技術を用いた概日リズム研究のCutting Edge．第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会，愛媛，2017（ワークショップ講演）
8. **八木田和弘**．哺乳類の発生過程における24時間周期の形成機構．第55回日本生物物理学会年会，熊本，2017（シンポジスト）
9. **八木田和弘**．骨・軟骨組織と体内時計．第38回日本炎症・再生医学会総会，大阪，2017（シンポジスト）
10. **八木田和弘**．概日リズムの発生．*日本赤ちゃん学会第17回学術集会*．久留米，2017（メインシンポジウム・シンポジスト）
11. 原 将之*、南 陽一、**八木田和弘**．腎臓髄質における時計遺伝子と浸透圧の概日リズムが皮質髄質浸透圧勾配の日内変動

に影響する．第60回日本腎臓学会学術総会，仙台，2017（総会長奨励賞セッション，シンポジスト）(*発表者)

12. **八木田和弘**．サーカディアンリズムと心身医学～睡眠・自律神経からアトピー・炎症まで～．第7回日本皮膚科心身医学会，京都，2017（特別講演）
13. **八木田和弘**．概日時計の根本原理から紐解く疾患理解．第23回日本時間生物学会学術集会，名古屋，2016（シンポジスト）
14. **八木田和弘**．Circadian clock and cancer: molecular mechanism of circadian clock disruption in in vivo reprogramming induced mouse Wilms Tumor model. 第89回日本生化学会，仙台，2016（シンポジスト・オーガナイザー）
15. **八木田和弘**．体内時計と発達障害：動物モデルの研究から．*日本赤ちゃん学会第16回学術集会*，京都，2016（シンポジスト）
16. **八木田和弘**．Circadian clock development: From basic to translational. 第93回日本生理学会大会，札幌，2016（シンポジスト・オーガナイザー）
17. **八木田和弘**．"Time in the Cell" Why is the circadian clock suppressed in the pluripotent stem cells? *BMB2015*，神戸，2015（シンポジスト）
18. **八木田和弘**．Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mice. 第58回日本神経化学会，大宮，2015（理事会企画シンポジウム，シンポジスト）

[図書](計2件)

1. **八木田和弘**．概日リズム．*光と生命の辞典*（日本光生物協会/光と生命の辞典編集委員会編、朝倉書店：東京），196-197，2016．
2. **八木田和弘**．細胞から臓器、そして個体リズムへの統合メカニズム．*実践臨床 小児睡眠医学*（三池輝久、小西行郎、中井昭夫編、診断と治療社：東京），11-16，2016．

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：癌の予後及び/又は転移可能性を評価する方法及びマーカー

発明者：**八木田和弘**、梅村康浩

権利者：京都府公立大学法人

種類：特許

番号：PCT/JP2018/18788

出願年月日：2018年5月15日

国内外の別：国内、海外

取得状況(計0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木田 和弘 (YAGITA, Kazuhiro)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：90324920

(2) 連携研究者

小池 宣也 (KOIKE, Nobuya)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：00399685