

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18249

研究課題名（和文）特定臓器の分子時計を標的かつ遠隔に操作する技術の開発と応用

研究課題名（英文）Development of remote control device for the circadian machinery of specific organ.

研究代表者

大戸 茂弘（Ohdo, Shigehiro）

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：00223884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,500,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、光に代えて、点眼による局所作用を介して全身リズムを調整する画期的な技術を開発した。しかし、薬による体内時計の操作は作用が数時間に及ぶことや標的臓器に特異性がない。微弱電流は、医療応用され、ミトコンドリア、ATPなどが作用点として知られている。薬や栄養素に加えて、微弱電流が分子時計の核移行を制御し、体内時計を調節することに成功した。また炎症臓器以外の臓器機能を改善させることで、炎症臓器の炎症を治療する画期的な治療法を考案した。これらの技術を駆使して、「特定臓器の分子時計を標的かつ遠隔に操作する技術の開発」を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを始めとする多くの哺乳動物の生理機能には、約24時間周期の概日リズムが認められ多くの病気の発症とも関連する。体内時計を調整する方法として、高照度光療法、食事、薬などがある。微弱電流は、医療応用され、ミトコンドリア、ATPなどが作用点として知られている。薬や栄養素に加えて、微弱電流が分子時計の核移行を制御し、体内時計を調節することに成功した。また炎症臓器以外の臓器機能を改善させることで、炎症臓器の炎症を治療する画期的な治療法を考案した。これらの技術を駆使して、「特定臓器の分子時計を標的かつ遠隔に操作する技術の開発」を目指し、特定臓器のリズムを標的に操作することで健康保持増進に貢献する。

研究成果の概要（英文）：The circadian rhythm is transcriptionally controlled by a series of clock gene clusters and regulates various body functions. The clock genes are related to the pathology of various kinds of diseases. Therefore, a simple method for the synchronization of clock genes in the body is required. In this study, the influence of microcurrent stimulation (MCS) on the circadian rhythm in cells or mice was investigated. MCS induced Per1 mRNA expression in cultured mouse astrocytes. Furthermore, MCS caused the phase advance of the locomotor activity rhythm in mice. The results of this study indicate that the remote control device was developed for the circadian rhythm of specific organ. Finally, the device may lead to the recovery of the pathology of various kinds of diseases related to clock gene such as aging, sleep disorders and disruption of the circadian rhythm and ocular vision, appetite, weakens the synchronization of clock genes by light and food.

研究分野：時間薬剤学

キーワード：分子時計 微弱電流刺激 遠隔操作 標的臓器

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトを始めとする多くの哺乳動物の生理機能には、約 24 時間を周期とする概日リズムが認められ多くの病気の発症とも関連する。体内時計を調整する方法として、高照度光療法、食事、薬などがある。研究代表者は、光に代えて、点眼による局所作用を介して全身リズムを調整する画期的な技術を開発した。一方、薬による体内時計の操作は作用が数時間に及ぶことや標的臓器に特異性がない。微弱電流は、医療応用され、ミトコンドリア、ATP などが作用点として知られている。研究代表者は薬や栄養素に加えて、微弱電流が分子時計の核移行を制御し、体内時計を調節することに世界で初めて成功した。また炎症臓器以外の臓器機能を改善させることで、炎症臓器の炎症を治療する画期的な治療法を考案した。これらの技術を駆使して、本研究では、「特定臓器の分子時計を標的かつ遠隔に操作する技術の開発」を目指し、特定臓器のリズムを標的に操作することで健康保持増進に貢献する。

### 2. 研究の目的

最初に、*in vitro* における MCS によるリズムを操作する手法を開発する。培養細胞として、マウスの脳由来アストロサイトに微弱電流刺激 (microcurrent stimulation; MCS) 装置を用いて一定時間電気刺激を実施し、時計遺伝子の発現量に及ぼす MCS の影響について検討する。MCS 後の時計遺伝子と各種オルガネラの時空間動態の関連を解析することで、各種オルガネラにおける時計遺伝子の新規機能と生理学的意義を探索する。

次に、*in vivo* における MCS によるリズムを操作する手法を開発する。ICR 雄性野生型マウス及び Clock 遺伝子改変 (Clk/Clk) 雄性マウスを対象に、MCS 後、行動リズムおよび各種臓器の時計遺伝子の発現量に及ぼす影響について検討する。Clock 改変マウスは、CLOCK/BMAL1 複合体の応答配列である E-box を介した転写活性が消失している。概日リズム障害モデルとして Clk/Clk マウスを対象に MCS が Per1 遺伝子の発現リズムを正常時と同程度まで回復させるか否かを検討する。

さらに、臓器障害マウスに対する MCS の効果について検討し、社会実装を目指す。

以上の研究から、「特定臓器の分子時計を標的かつ遠隔に操作する技術の開発」を目指し、特定臓器の分子時計リズムを標的に操作することで健康保持増進を目指す。

### 3. 研究の方法

最初に、*in vitro* における MCS によるリズム操作を試みた。培養細胞として、C57BL/6J 雄性野生型マウスの脳由来アストロサイトを、常法に従って継代培養し、各試験に用いた。微弱電流刺激装置の金電極を用いて一定時間電気刺激を行った (電流値 300  $\mu$ A、周波数 400Hz、15 分間)。時計遺伝子の発現量に及ぼす MCS の影響について、各遺伝子の mRNA 発現量およびタンパク質量を測定した。Per1 遺伝子のプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクター (Per1::luc) をアストロサイトに、トランスフェクションし、概日リズム同調刺激後 (高血清、ステロイド)、ルシフェラーゼ活性をリアルタイムモニタリングシステム Lumicycle で経時的に測定した。事前に、MCS 後の Per1 誘導を確認し、Per1 プロモーター領域の配列に、カルシウムイオンや cAMP 等の刺激により活性化する CREB 応答配列 (cAMP 応答配列結合タンパク質) が存在することを確認した。MCS による Per1 遺伝子の転写活性化の機構を解明するために Per1::luc アストロサイトに、MCS 後、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、CREB 応答配列を含む Per1 遺伝子 (Per1 CRE (-1800)) と CREB 応答配列を含まない Per1 遺伝子 (Per1 (-1400)) を対象に、Per1::luc アストロサイトを作製した。MCS は Per1 遺伝子のプロモーター領域に存在する CREB 応答配列を介して、Per1 遺伝子を発現誘導するか否かを検討した。

事前に、MCS 後の時計遺伝子 (Per1) の細胞内局在が、時刻と生理的刺激でリズムカルに変化することを確認していた。しかし、時計遺伝子がどのような機構で時刻依存的にリズムカルにオルガネラ間を移動するのか、また時計遺伝子は各種オルガネラで同様の機能を発揮するのか、全く不明であった。そこで、野生型と時計遺伝子 (Per1) ノックアウト (時計遺伝子 KO) 細胞を対象に MCS を施し、以下の実験を実施した。

時計遺伝子 (Per1) -蛍光タンパク質融合タンパク質を安定発現する野生型細胞 (時計遺伝子 (Per1) WT-GFP 細胞) を対象に細胞内オルガネラ標識ベクター (各オルガネラ特異的タンパク質 FlagRed ベクター) をトランスフェクションした時計遺伝子 (Per1) WT-GFP-Org-Flagred 細胞の安定発現系を作製した。時計遺伝子 (Per1) WT-GFP-Org-Flagred 細胞をガラスプレートデッシュに播種し、概日リズム同調刺激後に、経時的 (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 時間目 (2 周期分)) に共焦点レーザー顕微鏡下でタイムラプス機能を用いリアルタイム計測することで、時計遺伝子の細胞内オルガネラの局在変化を観察した。すなわち、培養細胞を適度に刺激し、生体内のリズム発振機構を再構築する系を用いた。なお無処置または MCS、LPS の刺激下で実施した。

次に、*in vivo* における MCS によるリズム操作を試みた。実験動物として、ICR 雄性野生型

マウス及び ICR をバックグラウンドとする Clock 遺伝子改変 (Clk/Clk) 雄性マウスを、明暗周期 (明期:7:00~19:00)、自由摂食摂水の条件下で 1 週間飼育した後、各試験に用いた。行動解析は、明暗周期又は恒暗条件下で行動解析装置を用い測定した。肝臓の時計遺伝子に及ぼす MCS の影響について、吸入麻酔下で腹部及び背部のそれぞれに電極を貼付し、微弱電流刺激装置を用いて、一定時間電気刺激を行った (電流値 300  $\mu$ A、周波数 400Hz、15 分間)。肝臓から Total RNA を抽出し、各遺伝子の mRNA 発現量を測定した。Per1 遺伝子の mRNA 発現に及ぼす MCS の処理開始時刻の影響を明らかにする目的で、6 時点に野生型マウスに MCS を行い、MCS 直後の肝臓中の Per1 遺伝子の mRNA 発現量を測定した。Clock 改変マウスは、CLOCK/BMAL1 複合体の応答配列である E-box を介した転写活性が消失している。概日リズム障害モデルとして Clk/Clk マウスを対象に MCS が Per1 遺伝子の発現リズムを正常時と同程度まで回復させるか否かを検討した。また野生型マウス及び Clock 改変マウスの行動リズムに及ぼす MCS の影響を検討した。明暗条件下で 1 週間飼育後、恒暗 (DD) 条件下で 1 週間飼育したマウスを対象に麻酔下で ZT0 (7:00) に MCS を行った。

さらに、臓器障害マウスに対する MCS の効果を検証した。薬や栄養素に加えて、微弱電流が分子時計の核移行を制御し、体内時計を調節することに成功している。そこで、時計遺伝子に焦点をあて未病から炎症の発症・維持・回復過程を経日的・経時的に解析し、炎症時の時計遺伝子の役割、炎症の発症タイミング、炎症リズムマーカーを探索し体内時計の調節技術の開発を目指した。マウスを対象に、がん移植臓器障害モデルを作成し、各種臓器を採取し、各種病態マーカーを指標に評価した。発症の過程で時計遺伝子発現に顕著な変化が認められる時期の 6 時点に各臓器を採取し、時計遺伝子の発現リズムを評価した。各種病態時の網羅的遺伝子発現解析および網羅的タンパク発現解析により時計遺伝子発現リズム変容に係る臓器間シグナル分子を抽出した。各種病態マウスを対象に、発症の過程で時計遺伝子発現を指標に顕著な変化が認められる時期の 6 時点に微弱電流を適用し、分子時計、病態マーカーに及ぼす影響を評価し、至適タイミングを設定した。

#### 4. 研究成果

培養細胞として、C57BL/6J 雄性野生型マウスの脳由来アストロサイトを、常法に従って継代培養し、各試験に用いた。微弱電流刺激装置の電極を用いて一定時間電気刺激を行った。時計遺伝子の発現量に及ぼす MCS の影響について、各遺伝子の mRNA 発現量およびタンパク質量を測定した。その結果 MCS により Per1 の転写活性が促進した。そこで Per1 プロモーター領域を解析した結果、カルシウムイオンや cAMP 等の刺激により活性化する転写因子 cAMP response element binding protein (CREB) の応答配列 CRE が存在することを確認した。次に、MCS による Per1 遺伝子の転写活性化の機構を解明するために Per1 遺伝子の CRE 応答配列を含むプロモーター配列と CRE 応答配列を含まないプロモーター配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターをアストロサイトにトランスフェクションし、MCS 後のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、MCS は Per1 遺伝子のプロモーター領域に存在する CRE 応答配列を介して転写を促進することを明らかにした。

CREB による転写活性には、CREB タンパク質のリン酸化が重要である。そこで、MCS 後の CREB タンパク質のリン酸化を測定した。その結果、MCS の刺激により CREB タンパク質のリン酸化が促進した。次に、CREB のリン酸化酵素 Protein kinase A (PKA) の阻害剤 H89 を用いた。その結果、MCS による CREB タンパク質のリン酸化と Per1 遺伝子の増加は抑制された。以上の結果より MCS は CREB タンパク質のリン酸化の活性化を介して、Per1 遺伝子の発現を増加することを明らかにした。

以上の実験より、MCS 後の時計遺伝子と各種オルガネラの時空間動態の関連を解析することで、各種オルガネラにおける時計遺伝子の新規機能と生理学的意義を明らかにした。

ICR 雄性野生型マウス及び Clock 遺伝子改変 (Clk/Clk) 雄性マウスを対象に、MCS 後、行動リズムおよび各種臓器の時計遺伝子の発現量に及ぼす影響について検討した。Clock 改変マウスは、CLOCK/BMAL1 複合体の応答配列である E-box を介した転写活性が消失している。Clk/Clk 雄性マウスを対象に、MCS 後、行動リズムおよび各種臓器の時計遺伝子の発現量に及ぼす影響について検討し、概日リズム障害モデルとして Clk/Clk マウスを対象に MCS が Per1 遺伝子の発現リズムを正常時と同程度まで回復させるか否かを検討した。具体的には、実験動物として、ICR 雄性野生型マウス及び Clk/Clk マウスを、明暗周期、自由摂食摂水の条件下で 1 週間飼育した後、各試験に用いた。行動解析は、明暗周期又は恒暗条件下で行動解析装置を用い測定した。肝臓の時計遺伝子に及ぼす MCS の影響について、吸入麻酔下で腹部及び背部のそれぞれに電極を貼付し、MCS 装置を用いて、一定時間 MCS を行った。肝臓から Total RNA を抽出し、各遺伝子の mRNA 発現量を測定した。その結果、Clk/Clk マウスの

Per1 遺伝子の発現量は野生型のレベルに増加した。また野生型マウス及び Clock 改変マウスの行動リズムに及ぼす MCS の影響を検討した。明暗条件下で1週間飼育後、恒暗 (DD) 条件下で1週間飼育したマウスを対象に麻酔下で ZTO に MCS 行った。その結果、Clk/Clk マウスの行動が野生型に近づいた。in vitro 系と同様に、in vivo 系において、MCS は Per1 遺伝子の発現を誘導し、体内時計の同調に影響を及ぼすことも明らかにした。

臓器障害マウスに対する微弱電流 (MCS) の効果を検証した。薬や栄養素に加えて、微弱電流が分子時計の核移行を制御し、体内時計を調節することに成功している。そこで、時計遺伝子に焦点をあて未病から炎症の発症・維持・回復過程を経日的・経時的に解析し、炎症時の時計遺伝子の役割、炎症の発症タイミング、炎症リズムマーカーを探索し、クロノ・フィジカル・バイオロジーの視点から体内時計の調節技術の開発を目指した。マウスを対象に、がん移植臓器障害モデルを作成し、各種臓器を採取し、各種病態マーカーを指標に評価した。発症の過程で時計遺伝子発現を指標に顕著な変化が認められる時期の6時点に MCS を適用し、分子時計、病態マーカーに及ぼす影響を評価し、至適タイミングを設定した。時計遺伝子は、時計遺伝子同士のみでなく、他の遺伝子の発現にも影響を及ぼすことで、肝臓、腎臓等の各末梢組織固有の様々な生理現象に概日リズムを生じさせる。上記病態モデルにおいて、病態における時計遺伝子の役割を明らかにした。また MCS 刺激により種々の腫瘍の生着および増殖を抑制できることを明らかにした。その機序として、MCS 刺激により免疫系細胞などの活性化が関与していることを明らかにした。これまでの in vitro、in vivo の結果に加えて、病態モデルにおいても、MCS 刺激は有効であることが明らかとなった。

現在、大動物へのスケールアップを実施している。炎症臓器および非炎症臓器に MCS 刺激を行い、臓器連関機構における時計遺伝子の役割を解明し、MCS 治療による社会実装を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N	4. 巻 71(4)
2. 論文標題 Chronopharmacology of immune-related diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 437-447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2022.06.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuruta A, Shiiba Y, Matsunaga N, Fujimoto M, Yoshida Y, Koyanagi S, Ohdo S.	4. 巻 MCR-21-0786-E
2. 論文標題 Diurnal expression of PD-1 on tumor-associated macrophages underlies the dosing time-dependent anti-tumor effects of the PD-1/PD-L1 inhibitor BMS-1 in B16/BL6 melanoma-bearing mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 MCR-21-0786-E
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.mcr-21-0786	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuruta A, Kanetani D, Shiiba Y, Inoki T, Yoshida Y, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S.	4. 巻 215
2. 論文標題 Modulation of cell physiology by bispecific nanobodies enabling changes in the intracellular localization of organelle proteins.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 115708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2023.115708.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuoka K, Yoshida Y, Sotono K, Nishikawa N, Hamamura K, Oyama K, Tsuruta A, Mayanagi K, Koyanagi S, Matsunaga N, Ohdo S.	4. 巻 675
2. 論文標題 Oral administration of vancomycin alleviates heart failure triggered by chronic kidney disease.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 92-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.07.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Y, Fukuda T, Fukuoka K, Nagayama T, Tanihara T, Nishikawa N, Otsuki K, Terada Y, Hamamura K, Oyama K, Tsuruta A, Mayanagi K, Koyanagi S, Matsunaga N, Ohdo S.	4. 巻 388(1)
2. 論文標題 Time-dependent differences in vancomycin sensitivity of macrophages underlie vancomycin-induced acute kidney injury.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Pharmacol Exp Ther	6. 最初と最後の頁 218-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.123.001864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松永 直哉  (Matsunaga Naoya)		
研究協力者	小柳 悟  (Koyanagi Satoru)		

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関