

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590107

研究課題名(和文)新規時計機能欠損マウスを用いた生物時計の階層性とリズム調整薬の探求

研究課題名(英文)An elucidation of hierarchy of a biological clock and a rhythm adjustment drug by generating a novel clock function-deficient mouse

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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：時差症状は、体内時計と外界時計の位相の乖離により生じる。私達は、バソプレッシン(AVP)受容体であるV1aおよびV1bを共に欠損したマウス(V1aV1bDKOマウス)では、時差環境下でも行動や時計遺伝子発現のリズムが即座に再同調し、時差症状を示さないことを見出した。視交叉上核(SCN)の切片培養を用いた検討から、V1aとV1bを介した神経細胞間結合は、外界からのリズム攪乱因子に対して抵抗性を持つと考えられた。野生型マウスのSCNにV1aおよびV1bの拮抗剤を投与すると時差症状が改善された。従って、AVPシグナルの阻害剤が時差やシフトワークに起因する病態に対する治療薬として期待される。

研究成果の概要(英文)：The endogenous circadian clock drives oscillations in physiology and behavior with a period of about 24 hours. When travelling rapidly across multiple time zones (jet lag), we become aware of the desynchrony between our internal clock and external light-dark cycle. Although jet lag is recognized as a chronobiological problem, its specific molecular and cellular mechanisms are poorly understood.

In this study, we show that circadian rhythms of locomotor activity, clock gene expression, and body temperature rapidly re-entrained to phase-shifted light-dark cycles in mice genetically deficient in V1a and V1b receptors (V1aV1bDKO). Real-time imaging of cellular rhythms in the suprachiasmatic nucleus (SCN) slices suggested that interneuronal communication mediated by V1a and V1b confers on the SCN an intrinsic resistance to external rhythm perturbation. Pharmacological blockade of V1a and V1b in the SCN of wild-type mice accelerated the speed of recovery from jet lag.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：視交叉上核 概日時計 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

46億年間、地球は自転し、昼と夜を生み出し続けた。その結果、生物は約24時間の概日リズム、生物時計を獲得した。この生物時計は、全身の個々の細胞が持つ時計遺伝子の転写・翻訳のリズムによって生み出されており、ホルモン分泌、血圧、体温、代謝のリズムを制御する。よって、生物時計機能の失調は、睡眠障害や代謝障害などの様々な疾病の原因となる。

1997年に初めて哺乳類の時計遺伝子が発見されて以来、世界中で次々に時計遺伝子がクローニングされ、24時間周期の転写発現リズムを生み出す細胞内分子メカニズムの解明はほぼ完了した。この個々の細胞時計を制御し、一単位としてのリズムを形成する生物時計機能の中核は、脳の視交叉上核(Suprachiasmatic Nucleus: SCN)である。SCNは、極めて安定したリズムを発振できる唯一の振動体である。しかし、近年、シフトワーカー(交替制勤務者)においては、慢性的な時差勤務・深夜業務のため、SCNの時計機能が破綻の危機に陥っていることがわかってきた。彼らは、ジェット機による海外旅行時に陥る時差症候群と同じく、体内時計と外界明暗時間(実生活の時間)の位相が乖離するため、睡眠障害や胃腸症状あるいは肥満や糖尿病、高血圧といった生活習慣病のリスクにさらされている。しかしながら、時差の分子神経メカニズムは不明であり、時差の責任分子をターゲットとした根本的な対処法が待ち望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

- (1) 時差を司る分子を同定すること、
 - (2) その分子の遺伝子改変マウスを作製し、時差の神経シグナルを解明すること、
 - (3) 時差環境下での概日行動リズム、時計遺伝子発現リズム、体温リズムを測定し、体内における時間階層性を解明すること、
 - (4) 時差の治療薬を開発すること、
- 以上の4点である。

3. 研究の方法

私達は、リズムセンターであるSCNに時差の本態があると考え、SCNをターゲットとしたリズム異常検索であるSCN Gene-Projectにより時差分子のスクリーニングを行った。具体的には、in situ hybridization法および免疫組織化学によりSCNでリズム的に発現している遺伝子を同定し、それら個々の遺伝子改変マウスを作製して、時差環境下での概日行動リズムを測定する、というものである。この結果、パンプレッシン(AVP)の受容体であるV1aとV1bを時差関連分子の候補として同定した。SCNの約半数の神経細胞はAVPを発現しているが、このAVP神経細胞はV1aおよびV1b受容体も発現し、SCN内のAVP神経細胞間で局所神経回路を形成する。私達

は、V1aとV1b受容体を共に欠損したダブルノックアウトマウス(V1aV1bDKODKOマウス)を作製し、これが時差消失マウスであることを見出した(後述)。

また、時差環境下でのSCN、肝臓、および腎臓における時計遺伝子の発現リズムを調べるために、時差前は1日半、時差後は、野生型(WT)マウスは10日間、V1aV1bDKODKOマウスにおいては6日間にわたって、4時間ごとに臓器・組織をサンプリングし、リアルタイムPCR法を用いて時計遺伝子の発現量を定量的に測定した。さらに、同様の時差環境下にて20分ごとに体温を測定し、体温リズムの変動も測定した。

最後に、SCNにおけるV1aおよびV1bのシグナルが時差治療薬のターゲットになりうるかを検討するために、それぞれの受容体拮抗薬の混合物を浸透圧ポンプによりSCNに持続的に投与し、時差後の行動の再同調に要する日数を測定した。

4. 研究成果

時差スクリーニングによって得た時差の候補遺伝子であるV1aおよびV1bを共に欠損したダブルノックアウトマウス(V1aV1bDKODKOマウス)を作製し、時差時の行動を測定したところ、この遺伝子改変マウスは時差を全く示さないことを見出した(図1)。時差環境下における

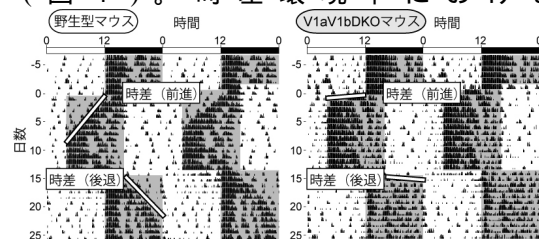


図1: V1aV1bDKODKOマウスは瞬時に時差に順応する

V1aV1bDKODKOマウスの行動が単に環境の明暗のみによって決定されるという可能性を排除するために、時差後に常時消灯した状態でマウスの行動を2週間程度測定し、どれだけ行動の位相が前進するかを測定した。明暗環境を1日だけ前進させてから消灯した場合でも、V1aV1bDKODKOマウスは野生型マウスと比べて、より大きく、行動リズムの位相が前進した。また、明暗環境を1日だけ後退させた場合でも、V1aV1bDKODKOマウスは野生型マウスと比べて、より大きな行動リズムの位相後退を示した。従って、V1aV1bDKODKOマウスが時差後に瞬時に再同調するのは、環境の明暗によるマスキングの効果ではなく、内在性の時計機能が瞬時に位相変動しているものと考えられる。

興味深いことに、V1aV1bDKODKOマウスの通常時の体内時計の状態を検証したところ、恒暗条件下での概日行動リズムの周期やSCNにおける時計遺伝子(代表的な時計遺伝子であるPer1、Per2、Bmal1、Dbpの4遺伝子)の発現リズム、主観的夜の光パルス刺激による行動の位相後退量やPer1の誘導量は、

V1aV1bDKODKO マウスにおいて全て正常であった。すなわち、時差時の V1aV1bDKODKO マウスの迅速な再同調は、体内時計に障害があるためではないことを示している。

続いて、時差に順応していく過程を検討するために、時差環境下の SCN における時計遺伝子 (Per1、Per2、Bmal1、および Dbp の 4 つ) の発現変動を測定した。時差を起こす前は、野生型マウスと V1aV1bDKO マウスの両方において、Per1、Per2 および Dbp は明期に、Bmal1 は暗期にピーク値をとる明瞭な日周リズムを示した。しかしながら、時差の後では、野生型マウスと V1aV1bDKO マウスで、時計遺伝子の振動パターンに大きな違いがあった。野生型マウスでは、Per1 と Per2 は、時差後、1-2 日の間はそのリズム性を消失し、3-7 日にかけて振動はするもその振幅は小さく、8 日目になってようやくもとの振動パターンにまで回復した。Bmal1 と Dbp も、時差後、1-5 日の間は、リズム性が著しく乱れており、完全に振動が回復するには、8-9 日を要した。一方で、V1aV1bDKO マウスにおいては、時差の後 1-2 日は、一部で振動の乱れは観察されたものの、4 つの時計遺伝子は全て、3 日目には振動のピーク時間や振幅が回復した。また、digoxigenin in situ hybridization 法により細胞レベルで検討したところ、野生型マウスの SCN では V1aV1bDKO マウスの SCN とは異なり、Per1 や Dbp の明瞭な概日振動は、時差後 3 日目では観察されなかった。

また、時差環境下における末梢臓器の時計遺伝子発現リズムを測定した。SCN において観察されたものとは異なり、肝臓における時計遺伝子のリズム的な振動は、時差後の再同調の期間においても維持されていた。しかしながら、ピークの時間はおおいに影響を受けていた。ピーク位相が回復するには、野生型マウスでは 9-10 日間を要したが、V1aV1bDKO マウスにおいては、5 日間のみであった。同様の結果は、腎臓の時計遺伝子を測定することでも得られた。また、時差環境下における体温の日周リズムも継時的に測定したところ、野生型マウスでは 10 日後に再同調したのに対し、V1aV1bDKO マウスでは 5 日後に再同調した。以上の結果をまとめると、明暗サイクル前進後の V1aV1bDKO マウスにおいて、検討した全ての時計遺伝子は、野生型マウスのもよりも迅速に再同調した。また、野生型マウスと V1aV1bDKO マウスのどちらにおいても、時差の後、まず中枢の SCN の時計遺伝子のリズムが回復し、1-2 日後に、末梢の時計や体温のリズムが回復したことから、各臓器間には階層性があり、SCN の時計機構が、時差後の全身の回復期間を決定していると考えられる。

ところで、先述の通り、AVP 発現細胞が、SCN において主要な細胞集団を形成することや、AVP の合成や SCN から脳脊髄液への放出には明瞭な日周リズムが見られる。AVP 神経細胞は、シナプス結合を介してお互い連

絡しあい、SCN 内で局所神経回路を形成している。V1a と V1b も SCN の神経細胞において発現することが知られていたが、私達は double in situ hybridization 法を用いて、SCN の背内側部において、AVP 神経細胞が、V1a をも発現することを見出した。また、AVP と V1a は、それぞれ逆位相で安定した概日振動を示したことから、この AVP 局所神経回路が、ダイナミックな概日機能を有しているものと考えられる。そこで、時差環境下の、野生型マウスの SCN において観察された時計遺伝子の振動の消失が、SCN における AVP を介した神経細胞間連絡の変化が原因ではないかとの仮説を立てた。Per1 プロモーターでルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスからとりだした SCN の切片培養を用いて、生物発光をリアルタイムモニタリングすることで、SCN の何百といった細胞のリズムを同時に測定することが可能である。この系を利用して、AVP シグナルがどのように SCN 神経細胞のリズムに影響を及ぼすかを検討した。野生型マウスも V1aV1bDKO マウスも共に、SCN の神経細胞は、背内側側から腹外側側へと、時空間的に組織された振動パターンを示した。このような全ての神経細胞からなる秩序だった位相の順序は、シクロヘキシミド (CHX) を投与することでリセットできる。CHX を除去すると、野生型マウスの SCN では、神経細胞間でもともとあった位相の順序の通りに、個々の細胞の振動は回復するが、V1aV1bDKO マウスの SCN では、その順序はひどく変化した。従って、野生型マウスのよりも、V1aV1bDKO マウスの SCN は、外界の攪乱因子の影響を受けやすいものと考えられる。この細胞間結合の脆弱性のため、V1aV1bDKO マウスは時差に瞬時に順応できるのであろう。

最後に、V1a アンタゴニストの OPC-21268 と V1b アンタゴニストの SSR 149415 の混合物を、野生型マウスの SCN に浸透圧ポンプを用いて持続的に投与し、時差環境下の行動を測定したところ、アンタゴニストの濃度依存的に、再同調が有意に速くなった。従って、SCN の V1a と V1b のシグナルが、時差後の再同調のスピードを決定する重要な役割を担っていることがわかった。

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 8 件)

1. Yamaguchi Y, Suzuki T, Mizoro Y, Kori H, Okada K, Chen Y, Fustin JM, Yamazaki F, Mizuguchi N, Zhang J, Dong X, Tsujimoto G, Okuno Y, Doi M, Okamura H: "Mice Genetically Deficient in Vasopressin V1a and V1b Receptors Are Resistant to Jet Lag." *Science* 342, 85-90, 2013. (DOI: 10.1126/science.1238599)、査読有

2. Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Morioka MS, Kakeya H, Manabe I, Okamura H: "RNA methylation-dependent RNA processing modulates the speed of the circadian clock." Cell 155, 793-806, 2013. (DOI: 10.1016/j.cell.2013.10.026) 、査読有

3. 山口賀章, 鈴木 暢, 岡村 均: "【ライフサイエンス新着論文レビュー FIRST AUTHOR'S】パソプレッシン受容体 V1a および V1b を欠損したマウスは時差症状を示さない" <http://first.lifesciencedb.jp/archives/7777>, 2013、査読有

4. 山口賀章, 岡村 均: "【脳科学辞典】視交叉上核" <http://bsd.neuroinf.jp/w/index.php?title=%E8%AB%A4%E5%8F%89%E4%B8%A8%E6%A0%B8&oldid=21150>, 2013、査読有

5. Doi M, Ishida A, Miyake A, Sato M, Komatsu R, Yamazaki F, Kimura I, Tsuchiya S, Kori H, Seo K, Yamaguchi Y, Matsuo M, Fustin JM, Tanaka R, Santo Y, Yamada H, Takahashi Y, Araki M, Nakao K, Aizawa S, Kobayashi M, Obrietan K, Tsujimoto G, Okamura H: "Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus." Nature communications 2, 327, 2011. (DOI: 10.1038/ncomms1316) 、査読有

6. Tanaka R, Tainaka M, Ota T, Mizuguchi N, Kato H, Urabe S, Chen Y, Fustin JM, Yamaguchi Y, Doi M, Hamada S, Okamura H: "Accurate Determination of S-Phase Fraction in Proliferative Cells by Dual Fluorescence and Peroxidase Immunohistochemistry with 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) and Ki67 Antibodies." J Histochem Cytochem 59, 791-798, 2011. (DOI: 10.1369/0022155411411090) 、査読有

7. Sato M, Mizoro Y, Atobe Y, Fujimoto Y, Yamaguchi Y, Fustin JM, Doi M, Okamura H: "Transportin 1 in the mouse brain: Appearance in regions of neurogenesis, cerebrospinal fluid production/sensing, and circadian clock." J Comp Neurol 519, 1770-1780, 2011. (DOI: 10.1002/cne.22600) 、査読有

8. Okamura H, Doi M, Yamaguchi Y, Fustin JM: "Hypertension due to loss of clock: novel insight from the molecular analysis of cry1/cry2-deleted mice." Current hypertension reports 13, 103-108, 2011. (DOI: 10.1007/s11906-011-0181-3) 、査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Yoshiaki Yamaguchi and Hitoshi Okamura: 「Molecular, cellular, and physiological dynamics under experimental jet lag」, XIII Congress of the European Biological Rhythms Society, Munich, Germany、ポスター、2013年8月19日

2. 山口賀章, 岡村均: 「急性概日リズム睡眠障害である時差症候群の分子機構」, 第36回日本神経科学大会、国立京都国際会館、シンポジウム、2013年6月20日

3. 山口賀章, 岡村均: 「時差消失マウスを用いた時差の分子機構の解明」, 第20回日本時間生物学会学術大会、近畿大学、シンポジウム、2013年11月9日

4. 山口賀章, 溝曾路 祥孝, 郡 宏, 鈴木 暢, 岡村 均: 「視交叉上核の外的攪乱因子に対する抵抗性と時差」, 第20回日本時間生物学会学術大会、近畿大学、ポスター、2013年11月9日

5. 山口賀章, 岡村均: 「時差モデルの分子解析」, 第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、シンポジウム、2012年9月21日

〔図書〕(計 4 件)

1. 山口賀章, 岡村 均: "【最新臨床睡眠学-睡眠障害の基礎と臨床-】神経インパルスからホルモンへの時間変換機構." 日本臨床 71, 705-710, 2013

2. 山口賀章, 岡村 均: "【代謝内分泌神経ネットワーク】生物時計と臓器ネットワーク: 時差の体内機構." BIO Clinica 28, 29-34, 2013

3. 山口賀章, 岡村 均: "【ナノバイオ技術と最新創薬応用研究】(第1章)ナノバイオ創薬に向けたターゲットの探索と構造解析 概日リズムの分子機構と創薬." 遺伝子医学 MOOK, 47-51, 2012.

4. 山口賀章, 岡村 均: "【睡眠と生活習慣病-基礎・臨床研究の最新知見-】時計遺伝子・概日リズム 概日リズム発振の遺伝子機構." 日本臨床 70, 1115-1120, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 概日リズム調整
発明者: 岡村均、山口賀章、辻本豪三
権利者: 京都大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-120083
出願年月日: 2012年05月25日
国内外の別: 国内

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：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-biology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 賀章 (YAMAGUCHI, Yoshiaki)

京都大学・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：