

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893265

研究課題名(和文) 交代勤務時の概日時計異常と疾患発症の相互作用解明

研究課題名(英文) Effect of night time shift work on the circadian clock system

研究代表者

田原 優 (TAHARA, Yu)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：80707399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：サービスの向上により、交代勤務者(シフトワーク)の割合は年々増加傾向にある(労働者全体の約20%)。しかし交代勤務が概日時計に与える影響、またその概日時計が末梢臓器に及ぼす影響についてはまだよく分かっていない。本研究では、明暗のシフトと共に強制覚醒を促す新規の交代勤務モデルマウスの概日時計変化を解析した。強制覚醒によるストレス応答が概日時計を強く変調させる事が分かった。さらに、アデノ随伴ウイルスによる生きたマウスの概日時計を発光で捉える新規のレポーターマウスの作成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Nighttime shift work-induced chronic jet lag caused increased cancer incidence and metabolic disorder. However, the effect of shift work on the circadian clock in the peripheral tissues was not well understood, because of the absence of the appropriate model of shift work. In the present study, we developed new model of shift work by changing light-dark cycle with forced awake to mice. We found decreased amplitude of circadian oscillation in the peripheral tissues in this model, and also forced awake caused stress accumulation and circadian resetting in the peripheral clocks. In addition, we developed liver specific circadian clock monitoring method in vivo using AAV.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 概日リズム 交代勤務

1. 研究開始当初の背景

サービスの向上により、交代勤務者(シフトワーク)の割合は年々増加傾向にある(労働者全体の約 20%)。一方、交代勤務による肥満、糖尿病、癌の発症リスクの上昇が多数報告されており、社会問題となっている。夜勤後の入眠障害・中途覚醒による交代勤務性睡眠障害は、慢性的な疲労感や消化器官障害を引き起こす。これらの不調は体内に備わる概日時計に逆らって夜勤を行うからだと考えられている。しかし交代勤務が概日時計に与える影響、またその概日時計が末梢臓器に及ぼす影響についてはまだよく分かっていない。本研究では、申請者が新たに考案した交代勤務モデルマウスとインビボ概日時計測定法を用いて、概日時計の変化、生理現象の変化をインビボで検証し、交代勤務における恒常性維持機構の破綻メカニズムを解明することにした。

哺乳類の概日時計は、体内のあらゆる細胞に発現する時計遺伝子群により、様々な生理現象の日内リズムを作り出すことで、生体の恒常性維持に寄与している。複雑に絡み合った転写・翻訳・修飾等の相互作用により作り出す約 24 時間のリズムは、*Per2* や *Bmal1* などの時計遺伝子群の他、エネルギー代謝における主要な転写因子 (*Ppara* など) にも制御が及んでいる。概日時計の乱れとして最も身近な例が時差ボケであり、特に交代勤務者は慢性的な時差ボケ状態と考えられる。疫学調査より、看護師の 2 型糖尿病への罹患率上昇が報告されている(Pan et al., *PLoS Med.*, 2011)。また、夜勤後の入眠困難・睡眠不足から、交代勤務性睡眠障害に陥るケースも多い。しかしこれらの発症メカニズムは分かっておらず、改善方法として、夜勤後に光を浴びないようにサングラスを着用して帰宅させる、または睡眠導入剤を処方する、程度しか実際に行われていない。一方、時差ボケ研究として、マウスを用いた明暗環境のシフト(6-8 時間前進)実験があり、2 日おき、または 1 週間おきの明暗シフトは、体重増加(Karatosoreos et al., *PNAS*, 2011)、癌増殖スピード上昇(Li et al., *Cancer Res.*, 2010) など臨床症状に近い表現形を示すが、これは単に明暗環境の変化に起因する可能性もある。つまり、明暗のシフトのみではマウスは暗期のズレにすぐに対応できず、強制的に働かせられる交代勤務の環境を再現できていなかった。そこで本研究では、自動的にマウスを眠らせない装置を自作し、シフトする暗期の時刻に活動させる新しい交代勤務モデルマウスを作製する事にした。

2. 研究の目的

新たに作成した交代勤務モデルマウスにおける末梢時計の変化、睡眠-覚醒リズムの変化について詳細に解析し、慢性的な時差ボケが概日時計に与える影響を調べた。その研究過程で、交代勤務によるストレス負荷が概

日時計に大きく影響している事が分かり、実験 2 ではストレス負荷そのものが概日時計に与える影響について検討した。さらに、インビボ概日時計測定法のさらなる改良として、アデノ随伴ウイルスを用いた発光レポーターの肝臓への導入方法を確立することを目指した。

3. 研究の方法

実験 1 「交代勤務モデルマウスの行動変化と概日時計変化の解析」

交代勤務モデルマウスは、ビー玉の入ったケージを振盪台に乗せる事で作製した。暗期 12 時間のうち 15 分おきに 30 秒間振盪台を揺らすことで、マウスを覚醒させる。20 時-8 時の暗期を 12 時-0 時に前進させる(逆循環)もしくは 0 時-12 時に後退させる(正循環)と共に、振盪の時刻も暗期に合わせてシフトさせる事で交代勤務を行わせた。シフト後はそのスケジュールで飼育し、1 週間おきの数回のシフト後(長期)に *PER2::LUC* 発光リズム(時計遺伝子発現リズム)をインビボ概日時計測定法により測定した。コントロール群は夜間交代勤務を行わないが、暗期の振盪は行った。

実験 2 「ストレス負荷に対する概日時計応答の解析」

上述の振盪台によるマウスの強制覚醒を明期の真ん中(2 時間)に 3 日間行い、その後末梢時計を測定した。さらに、金網で作成した狭い空間にマウスを閉じ込める、拘束ストレスを同様のタイミングで行い、末梢時計を測定した。拘束ストレスのタイミングを変え、日数も変えてさらに実験を行った。さらに、交感神経受容体の拮抗薬、グルココルチコイド受容体の拮抗薬によるストレス応答の変化も検討した。

実験 3 「アデノ随伴ウイルスを用いた発光レポーターの導入系確立」

時計遺伝子 *Bmal1* の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作成した。コントロールとして高発現を促す CAGS プロモーターの AAV ベクターも作成した。それぞれのベクターを用いて AAV を作成し、マウスへ尾静脈投与し、1 ヶ月後に肝臓における発光リズムを測定した。

4. 研究成果

実験 1

振盪による覚醒を促しながら、明暗サイクルを 8 時間前進させた結果、マウスの活動リズムは新しい明暗環境にすぐに同調した。しかし、5 日後に発光リズムを測定した後に、振盪を止めた結果、活動開始時刻の同調が暗期開始時刻より 2-3 時間遅れており、その後 5 日ほどで緩やかに前進していく事が分かった。つまり、見かけ上は新しい明暗環境に早く同調した様に見えたが、内的な概日時計は

同調が早まってはいない事が分かった。また、この際の末梢時計においても、振盪台の有無による違いは見られなかった。

次に、同じ振盪プロトコルにて3日おきに明暗環境をシフトし、47-48日目に概日時計を測定した。その結果、振盪をしないでシフトする群に比べて、振盪有りの群で末梢時計の振幅が大きく減弱した。この結果は、明暗環境の変化と共に、夜勤時に強制的に覚醒しなければいけないという環境が、末梢時計をさらに乱す結果であると考えた。(図1)

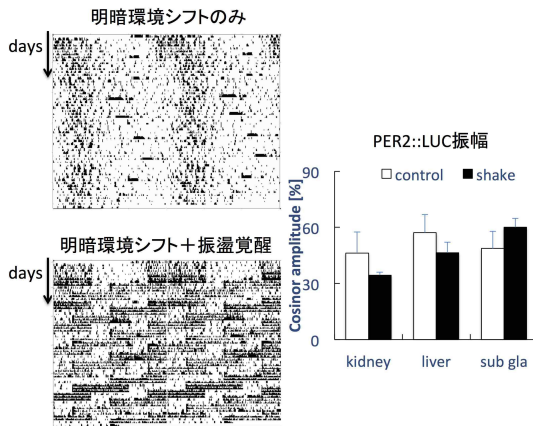


図1 交代勤務による活動リズム変化と末梢時計変化

次に、振盪による覚醒の短期間の影響について調べた。明期の真ん中(12時-14時)のみ3日間振盪させたのちに概日時計を測定した。その結果、末梢時計は有意に3-4時間時刻が早まった。そこで振盪+ケージ内のピー玉の動きが、ストレスになるのではと考え、次に拘束ストレスを同様のタイミングで行った。その結果、振盪と同様に末梢時計は有意に前進した。また、ケージを交換することでもマウスの覚醒を促す事ができるが、それでは末梢時計は変化しなかった。よって、交代勤務の際に、覚醒というよりもむしろストレスにより末梢時計は大きく変化する可能性がある事が分かった。

実験2

実験1より、ストレスが概日時計を乱す可能性が示されたので、さらなる解析を行った。先行研究として、ストレスホルモンであるグルココルチコイドやアドレナリンが、概日時計リセット効果を持つ事が分かっていたが、ストレス負荷そのものが個体レベルで概日時計リセットを促すかどうかについては研究がなされていなかった。そこで、拘束ストレス負荷の時刻依存性、回数依存性などを調べた。その結果、明期の真ん中のストレスは時刻前進、暗期の真ん中は時刻後退、暗期の始めは変化無しということが分かった。面白い事に、明期の始め、つまりマウスの寝始めの時刻のストレス負荷は、腎臓の時計振動を止め、さらに顎下腺の時刻を真反対にするという大きな変化を起こすことが分かった。さらに、毎日同じ時刻にストレス負荷を行うと、

腎臓、顎下腺の概日時計の時刻は、そのストレスのタイミングに同期することが分かった。これはストレスに概日時計が同調した結果を示す。また、この応答はグルココルチコイド受容体拮抗薬では阻害出来ず、交感神経受容体拮抗薬で阻害することが出来た。つまり、ストレス負荷による交感神経系の活性化が重要であることが分かった。(図2)

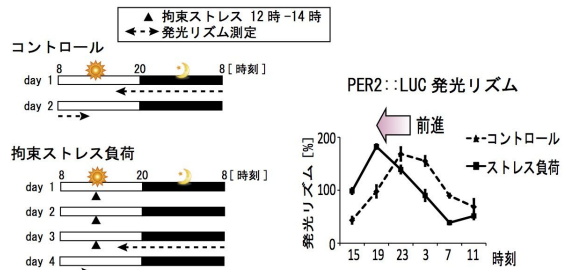


図2 拘束ストレスによる末梢時計の時刻変化

実験3

CAGS-SLR (赤色ルシフェラーゼ), Bmal1-SLG (緑色ルシフェラーゼ) が導入された AAV をマウスに尾静脈投与し、1ヶ月後に肝臓の発光リズムを測定した。その結果、CAGS-SLR では ZT11 付近に発光ピークが観測されたのに対し、Bmal1-SLG では ZT23 付近に発光ピークが観測された。Bmal1 の発現リズムは ZT23 付近にあるので、実際に Bmal1-SLG にて概日時計の測定は出来ていると考えられた。しかし、発光値は全体的に低く、実際に AAV を用いて実験を行っていくにはコスト面で問題があることが分かった。原因として、使用したルシフェラーゼの発光が元々弱いことにあるのではと考えている。(図3)

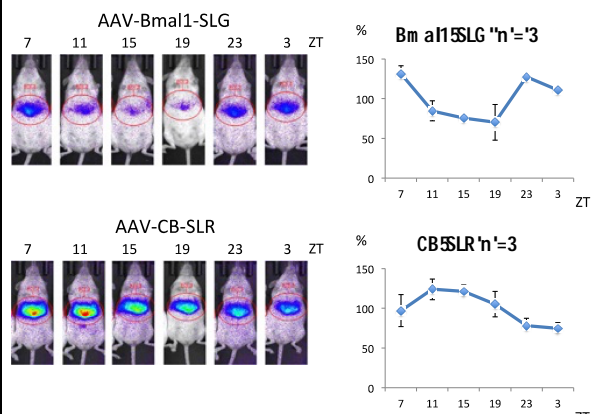


図3 AAVベクターによる肝臓へのルシフェラーゼ導入

そこで現在は、Loxp 配列にて STOP 配列をプロモーターとルシフェラーゼの間に導入したベクターを用いてトランスジェニックマウスを作成している。このマウスを臓器特異的に Cre が発現するマウスと掛け合わせる事で、臓器特異的な発光リズムモニタリングができるマウスができると考えている。

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- 1 Ikeda Y, Sasaki H, Ohtsu T, Shiraiishi T, Tahara Y, Shibata S, Feeding and adrenal entrainment stimuli are both necessary for normal circadian oscillation of peripheral clocks in mice housed under different photoperiods. *Chronobiology International*, 2015, 32:195-210. doi: 10.3109/07420528.2014.962655. 査読有り
- 2 Narishige S, Kuwahara M, Shinozaki A, Okada S, Ikeda Y, Kamagata M, Tahara Y, Shibata S. Effects of caffeine on circadian phase, amplitude, and period evaluated in cells in vitro and peripheral organs in vivo in PER2::LUCIFERASE mice. *British Journal of Pharmacology*, 2014, 171:5858-5869. doi: 10.1111/bph.12890. 査読有り
- 3 Aoki N, Yoshida D, Ishikawa R, Ando M, Nakamura K, Tahara Y, and Shibata S, A single daily meal at the beginning of the active or inactive period inhibits food deprivation-induced fatty liver in mice. *Nutr Res*, 2014, 34:613-622. doi: 10.1016/j.nutres.2014.06.004. 査読有り
- 4 Moriya S, Tahara Y, Sasaki H, Hamaguchi Y, Kuriki D, Ishikawa R, Ishigooka J, Shibata S, Effect of Quetiapine on Per1, Per2, and Bmal1 Clock Gene Expression in the Mouse Amygdala and Hippocampus. *J Pharmacol Sci*, 2014, 125:329-332. doi: http://doi.org/10.1254/jphs.14071SC 査読有り
- 5 Haraguchi A, Aoki N, Ohtsu T, Ikeda Y, Tahara Y, and Shibata S, Controlling access time to a high fat diet during the inactive period protects against obesity in mice, *Chronobiology International*, 2014, 31:935-944. doi: 10.3109/07420528.2014.931413. 査読有り
- 6 Ohnishi N*, Tahara Y*, Kuriki D, Haraguchi A, and Shibata S, Warm water bath stimulates phase-shifts of the peripheral circadian clocks in PER2::LUCIFERASE mouse, *PLoS ONE*, 2014, 9:e100272, (*These authors equally contributed this work.) doi: 10.1371/journal.pone.0100272. 査読有り
- 7 Nakamura Y*, Ishimaru K*, Tahara Y*, Shibata S, Nakao A, Disruption of the Suprachiasmatic Nucleus Blunts A Time of Day-Dependent Variation in Systemic Anaphylactic Reaction in Mice, *J Immunological Research*, 2014, 2014:ID474217. (*These authors equally

contributed this work.) doi: 10.1155/2014/474217. 査読有り

- 8 Nakamura Y, Nakano N, Ishimaru K, Hara M, Ikegami T, Tahara Y, Katoh R, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nishiyama C, Nakao A, Circadian Regulation of Allergic Reaction by the Mast Cell Clock. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133:568-575. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.040. 査読有り
- 9 Kudo T, Loh DH, Tahara Y, Truong D, Hernández-Echeagaray E, Colwell CS, Circadian dysfunction in response to the in vivo treatment with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *ASN Neuro*, 2014, 6:e00133. doi: 10.1042/AN20130042. 査読有り
- 10 Kudo T, Tahara Y, Gamble KL, McMahon DG, Block GD, Colwell CS, Vasoactive intestinal peptide produces long lasting changes in neural activity in the suprachiasmatic nucleus. *J of Neurophysiol*, 2013, 110: 1097-1106. doi:10.1152/jn.00114.2013. 査読有り
- 11 Tahara Y, Shibata S, Chrono-biology, chrono-pharmacology, and chrono-nutrition, *J pharm Sci.*, Review, 2014, 124:320-335. doi: ttp://doi.org/10.1254/jphs.13R06CR 査読有り
- 12 Tahara Y, Shibata S, Chronobiology and Nutrition. *Neuroscience*, Review, 2013, 253: 78-88. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.049. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 田原優、白石 卓也、菊池耀介、大西信明、原口敦嗣、栗城大輔、柴田重信、「ストレスによるマウス末梢組織の概日時計同調」、『第 9 回環境生理プレコンgres』、5-2、桜島(鹿児島) 2014 年 3 月
2. 田原優、白石 卓也、菊池耀介、大西信明、山田舜也、原口敦嗣、栗城大輔、柴田重信、「拘束ストレスは概日時計を激しく乱す」、『第 87 回日本薬理学会年会』、P2-15-4、東北大学、2014 年 3 月

〔図書〕(計 5 件)

1. Shibata S, Tahara Y, Circadian Rhythm & Exercise, *J Phys Fitness Sports Med.*, Review, 2014, 3:65-72. DOI: 10.7600/jpfsm.3.65
2. Tahara Y, Shibata S, Nutrition and diet as potent regulators of the liver clock. Circadian rhythms: Health and Disease, *Wiley*, in press
3. Tahara Y, Shibata S, Circadian rhythm and food/nutrition. Mechanisms of

Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance, *Springer*, 2014, 237-260.

4. 田原 優、柴田 重信、「時間栄養と心の健康～食品との関わりも含めて」『FOOD STYLE 21』、食品化学新聞社、2013年8月、p42-44.
5. 田原 優、柴田 重信、「時間栄養学」『食品機能性成分の吸収・代謝機構』、シーエムシー出版、2013年5月、p28-36.

〔その他〕

ホームページ

<http://yutahara.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 優 (TAHARA, Yu)

早稲田大学 先進理工学部 助教

研究者番号：25893265