

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05642

研究課題名(和文)概日時計システムの頑強性と時差の分子神経機構の体系的理解と時差病態治療への応用

研究課題名(英文)Molecular and neural mechanisms underlying the robustness of the circadian clock and an approach to jet-lag-related diseases.

研究代表者

山口 賀章 (YAMAGUCHI, Yoshiaki)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：30467427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの多くの生理現象はおよそ24時間周期の概日リズムを示す。この概日リズムの中枢は、脳の視交叉上核(SCN)である。私たちは、SCNの多くの細胞が用いるバソプレッシン(AVP)に着目し、AVPのV1a受容体とV1b受容体のダブルノックアウト(V1aV1bDKO)マウスが時差症状を示さないことを報告した。また、自由行動下のラットSCNにおける時計遺伝子の発現振動をリアルタイムモニタリングすることに成功した。さらに、SCNの数値モデルを構築し、V1aとV1bが時差に抵抗性を示すことを見出した。他にも、SCNのV1aとV1bを抑制することにより、慢性時差による死亡率増加を低減することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のリズム研究では、例えば「時計遺伝子を欠損させると概日リズムが消失する」という結果より、この時計遺伝子がリズム形成を担うというものであった。ところが、AVP異常のBrattleboroラットは概日リズム異常を示さなかったため、AVPのリズム機能は長らく不明なままであった。私たちは、AVP-V1シグナルは外乱に対する概日リズムの安定化を担うことを見出したが、これは従来のリズム研究では示されなかった極めてユニークな発見である。

さらに本研究は、V1aV1bDKOの時差症状を示さないという特質を利用して、これまでに対策なかったシフトワーカーの病態改善に迫るものであり、社会的意義も大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：Almost all organisms on Earth have an internal biological clock, the circadian clock. This clock drives stable oscillations in metabolism, physiology, and behavior with a period of approximately 24 h. In mammals, circadian rhythms are generated by a timing system comprised of a master pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the anterior hypothalamus. We previously reported that arginine vasopressin receptor V1a and V1b regulate the speed of re-entrainment after abrupt light/dark advance. Here, we succeeded in real-time monitoring of Per1 and Per2 transcription separately by detecting the bioluminescence of luciferase reporters using a plastic optical fiber inserted into the SCN of freely moving rats. We also presented a new theoretical concept to understand circadian clock disruption and slow recovery from jet lag based on the mathematical model. Finally, we found that rapidly entrainable V1aV1b double knockout mice showed lower mortality under a chronic jet lag.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム 体内時計 時計遺伝子 時差 バソプレッシン 視交叉上核

## 1. 研究開始当初の背景

私たちに内在する概日時計システムは、進化上高度に保存された形質である。リズム異常のマウスは高血圧や肥満といった病態を示すことから、概日時計システムは私たちの健康に必須であることがわかる。組織破壊や移植実験から、概日時計の中樞は脳の視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus, SCN) であることが示された。しかしながら、個々の SCN 神経細胞や SCN 切片では、個体で観察されるような安定した固有周期を示さないことから、個体全身に張り巡らされた時刻制御ネットワークにより、概日時計の恒常性が形成されると考えられている。ところが、この分子・神経ネットワークの実態はこれまでほとんど手付かずであった。

そこで、私は時差実験を利用して、このシグナル伝達網を解明するという発想に至った。時差により明暗位相が急激に変動すると、SCN はそれまでの安定振動を一旦破棄し、その後新明暗位相に応じた概日振動を再構築する。私は SCN をターゲットとした時差責任分子のスクリーニングを行い、時差後の新しい明暗環境に再同調するのに野生型マウスでは 10 日程度を要するところ、バソプレッシン (AVP) の受容体である V1a と V1b を共に欠損したダブルノックアウトマウス (V1aV1bDKO マウス) では瞬時に再同調することを見出した。また、野生型マウスの SCN に V1a と V1b のアンタゴニストを投与することで、時差期間を半減させることに成功した (Yamaguchi Y. et al., Science 2013)。

しかしながら、(1) SCN が時々刻々と変化する外界環境のもとでも、いかにしてその頑強性を発揮しているのか、(2) SCN の V1a や V1b はどのような機能により時差を制御するのか、(3) 時差症状を示さない V1aV1bDKO を利用して時差病態を改善できるのか、といった課題が未解明であった。

## 2. 研究の目的

### (1) SCN 神経細胞の in vivo リアルタイムイメージング概日振動解析

個体の概日行動周期は SCN の周期と一致するため、全身の時刻情報は SCN に収斂するとされるがそのメカニズムは全くわかっていない。そこで、末梢から SCN への時刻制御フィードバック機構を同定するために、新たに開発した自由行動下動物の SCN リアルタイムイメージングにより、時差時の概日振動を長期間にわたって測定することで、末梢シグナルがいつどのようにしてどの SCN 領域にフィードバックしてくるかを解明する研究を開始した。

### (2) 時差を制御する SCN 神経回路の数理モデル構築とその応用

V1aV1bDKO マウスは、時差環境下で瞬時に再同調する。これは、V1aV1bDKO マウスが概日リズム機能を有しておらず、その行動リズムが外界の明暗に従属的に支配されているに過ぎないとも考えられる。しかしながら、基本的な概日リズム機能である恒暗条件下での行動リズムや短時間光パルスによる行動位相変動、時計遺伝子の発現リズムを測定したところ、V1aV1bDKO マウスは全て異常を示さないことがわかった。すなわち、V1aV1bDKO マウスは正常に機能する概日時計機能を保有しながらも、唯一時差環境下においてのみ、素早い再同調を示すという極めてユニークな性質を示すマウスであることがわかった。

ところがこの発見は新たな疑問を生み出した。それは、V1aV1bDKO マウスは、時差のない通常の明暗や恒暗条件下では概日リズム機能に一切異常を示さないにもかかわらず、なぜ時差後の新明暗周期に瞬時に再同調できるのか？ということである。この問いに対し、私たちは、SCN の数理モデルを構築することで V1a と V1b の神経機能の解明を試みた。

### (3) 時差症状を示さない V1aV1bDKO マウスを利用した時差病態の改善

21 世紀に入り、利便性を求める 24 時間社会は世界中で急激に進行し、それを支えるシフトワーカー (交代制勤務者) も急増している。しかし、困ったことに、疫学研究により、シフトワーカーは高血圧、肥満、心血管障害といった生活習慣病やガンのリスク要因となることが判明してきた。また、シフトワーカーの動物モデルとして、行動リズムと環境の明暗リズムを常に乖離させる慢性時差環境下での飼育研究があり、肥満といったヒトの時差病態を再現することが多数報告されている。中でも特に興味深いことに、高齢マウスを慢性時差環境下におくと、死亡率が増加するという報告がなされた。これは若年マウスでは起こらないため、老化に伴う現象であることは明らかである。しかし、この死亡率増加の原因として、内因性リズムと環境の明暗リズムの恒常的な乖離が示唆されたものの、これまでこの仮説を検証する適切な動物モデルがなく、研究は進められていなかった。そこで私たちは、時差に瞬時に再同調する V1aV1bDKO マウスでは、慢性時差環境下でも内因性リズムと環境の明暗リズムが乖離せず、死亡率の増加を改善できるのではないかと考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) SCN 神経細胞の in vivo リアルタイムイメージング概日振動解析

概日リズムを形成する基盤となる分子メカニズムは、時計遺伝子 Per1 や Per2 などによる転写・翻訳を介したネガティブフィードバックループ機構である。転写活性化因子である CLOCK

と BMAL1 は、Per1 や Per2 遺伝子のプロモーター上にある E (E') -box に作用し、Per1 や Per2 の転写を促進する。その後、タンパク質へと翻訳された PER1 と PER2 は、同じく抑制因子である CRY と共に、CLOCK と BMAL1 の転写活性化因子を阻害する。この結果、Per1 と Per2 の転写は減弱される。このようなサイクルを一日単位で繰り返すことで、Per1 や Per2 は、概日振動を示す。興味深いことに、これらの発現振動は、概日行動リズムにまで反映される。したがって、私たちは、無麻酔・無拘束下の動物の SCN から Per1 と Per2 の転写発現をリアルタイムでモニターすることを試みた。

Per1 あるいは Per2 のプロモーターでルシフェラーゼ ( luc ) を発現する 2 種類のトランスジェニックラット ( Per1-luc ラットおよび Per2-luc ラット ) を用いた。自由行動下のこれらのラット SCN に光ファイバーを挿入し、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを浸透圧ポンプにより直接 SCN に持続投与した。ラットが自由に行動できるように、光ファイバーをシーベルで連結した。また、生体発光の計測は、恒暗条件下で行った。

#### (2) 時差を制御する SCN 神経回路の数理モデル構築とその応用

私たちは、SCN の組織形態学に基づいた数理モデルを作成した。具体的には、明暗シグナルを受容する VIP 細胞と VIP 細胞から投射する AVP 細胞 ( SCN では AVP 細胞同士で神経回路を形成するが、この結合を評価するため AVP 細胞を 2 つの集団に分けた ) の 3 つの振動体により SCN を構成する数理モデルということになる。V1aV1bDKO マウスの SCN の場合ではこの AVP 細胞間の神経結合が減弱しているとして、時差環境下での各 SCN 細胞の概日振動位相をシミュレーションした。

#### (3) 時差症状を示さない V1aV1bDKO マウスを利用した時差病態の改善

5 日毎に 8 時間明暗リズムが前進する慢性時差環境下にて、老齢 ( 27 ヶ月齢 ) の野生型 ( WT ) マウスおよび V1aV1bDKO マウスを飼育した。赤外線センサーにより常時行動を測定し、マウスの生死をモニターした。マウスの死亡は、目視により確認した。

薬理学実験においては、19 ヶ月齢の WT マウスの SCN に、V1a アンタゴニストである OPC-21268 と V1b アンタゴニストである SSR 149415 ( それぞれ 2.5 mM ) の混合物を持続投与した。対照群としては、vehicle を投与し、これらの慢性時差環境下における死亡率を測定した。

### 4 . 研究成果

#### (1) SCN 神経細胞の in vivo リアルタイムイメージング概日振動解析

Per1-luc ラットおよび Per2-luc ラットのどちらを用いた場合でも、長期間にわたって明瞭な概日リズムを示す生体発光を計測することに成功した。ピーク時刻は Per1-luc ラットおよび Per2-luc ラットの SCN において異なっており、Per1-luc の発光ピークは主観的明期中頃に、Per2-luc の発光ピークはそれより 3 時間程度遅れていた。これらのピーク時間の違いは、Per1-luc ラットおよび Per2-luc ラットの SCN サンプルを用いたリアルタイム PCR 法による定量によっても示された。

#### (2) 時差を制御する SCN 神経回路の数理モデル構築とその応用

私たちが新規に構築した数理モデルでは、時差環境下における WT マウスの SCN での概日振動の変遷パターンを忠実に再現した。特に、数理モデルでは、時差直後に 2 つの AVP 細胞が特異な振動位相を形成し、お互いのその後の位相変動を停止ないし著しく減弱するという結果になった。このアイデアは、現時点では動物実験では得ることが非常に困難であり、数理モデルの有用性を示す一例と考えられる。また、数理モデルにおいて AVP-V1a/V1b に基づく AVP 細胞間の結合をゼロと設定することで、V1aV1bDKO の SCN としてシミュレーションしたところ、概日振動の位相と振幅は時差直後に即座に回復した。さらに、数理モデルを解析したところ、8 時間の明暗前進を一度に行うよりも、4 時間前進を 2 回行う方が、その後の再同調が早くなると予想された。これをマウス行動実験により検定したところ、4 時間 2 回の方が 8 時間 1 回よりも行動リズムの再同調は有意に早かった。これらの結果は、薬剤等の使用ではなく、生活リズムの調整で時差ボケやシフトワーカーの睡眠障害を軽減させうることを多に示唆している。

#### (3) 時差症状を示さない V1aV1bDKO マウスを利用した時差病態の改善

慢性時差環境下において、WT マウスは本来夜行性であるにも関わらず日中での行動も観察され、次々と死亡した。一方で、V1aV1bDKO マウスは慢性時差環境下でも、環境の明暗前進の都度行動リズムを前進させ、行動と明暗リズムの脱同期は観察されず、その生存率は WT マウスと比べて有意に上昇した。また、老齢の WT マウスにおいても、SCN に V1a と V1b 受容体のアンタゴニストを継続的に投与することで、慢性時差環境下での生存率が有意に増加することを私たちは示した。

### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 9 件 )

山口 賀章, 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、  
薬学雑誌、135 巻、1265-1272、2015。 査読有  
DOI: 10.1248/yakushi.15-00206

Yamaguchi Y., Okada K., Mizuno T., Ota T., Yamada H., Doi M., Kobayashi M., Tei H.,  
Shigeyoshi Y., Okamura H.: "Real-Time Recording of Circadian Per1 and Per2 Expression  
in the Suprachiasmatic Nucleus of Freely Moving Rats." J Biol Rhythms 31, 108-111, 2016.  
査読有  
DOI: 10.1177/0748730415621412

Kori H., Yamaguchi Y., Okamura H.: "Accelerating recovery from jet lag: prediction  
from a multi-oscillator model and its experimental confirmation in model animals."  
Scientific reports 7, 46702, 2017. 査読有  
DOI: 10.1038/srep46702.

Dojo K., Yamaguchi Y., Fustin J. M., Doi M., Kobayashi M., Okamura H.: "Carbachol  
Induces Phase-dependent Phase Shifts of Per1 Transcription Rhythms in Cultured  
Suprachiasmatic Nucleus Slices." J Biol Rhythms 32, 101-108, 2017. 査読有  
DOI: 10.1177/0748730417691205

Chao H. W., Doi M., Fustin J. M., Chen H., Murase K., Maeda Y., Hayashi H., Tanaka  
R., Sugawa M., Mizukuchi N., Yamaguchi Y., Yasunaga J. I., Matsuoka M., Sakai M., Matsumoto  
M., Hamada S., Okamura H.: "Circadian clock regulates hepatic polyploidy by modulating  
Mkp1-Erk1/2 signaling pathway." Nature communications 8, 2238, 2017. 査読有  
DOI: 10.1038/s41467-017-02207-7

Yamaguchi Y., Okamura H.: "Vasopressin Signal Inhibition in Aged Mice Decreases  
Mortality under Chronic Jet Lag." iScience 5, 118-122, 2018. 査読有  
DOI: 10.1016/j.isci.2018.06.008

Yamaguchi Y.: "Arginine vasopressin signaling in the suprachiasmatic nucleus on the  
resilience of circadian clock to jet lag." Neurosci Res 129, 57-61, 2018. 査読有  
DOI: 10.1016/j.neures.2017.10.007

Chen Y., Yamaguchi Y., Suzuki T., Doi M., Okamura H.: "Effect of Daily Light on c-Fos  
Expression in the Suprachiasmatic Nucleus under Jet Lag Conditions." Acta Histochem  
Cytochem 51, 73-80, 2018. 査読有  
DOI: 10.1267/ahc.18001

Ito K., Yasuda M., Maeda Y., Fustin J. M., Yamaguchi Y., Kono Y., Negoro H., Kanematsu  
A., Ogawa O., Doi M., Okamura H.: "Circadian rhythms of micturition during jet lag."  
Biomedical research (Tokyo, Japan) 39, 57-63, 2018. 査読有  
DOI: 10.2220/biomedres.39.57

〔学会発表〕(計 24 件)

(1) 国際学会での発表

Yoshiaki Yamaguchi, Yasutaka Mizoro, Hitoshi Okamura. 「The role of arginine  
vasopressin V1a and V1b receptors in the cellular circadian oscillations of the  
suprachiasmatic nucleus.」 Gordon Research Conference, Chronobiology, Melia Golf Vichy  
Catalan Business and Convention Center, Girona, Spain. 2015 年 7 月 1 日

Yoshiaki Yamaguchi, Hitoshi Okamura.  
「Mortality rate of aged wild-type and V1a-/-V1b-/- mice under a chronic jet lag  
condition.」 SRBR 2018 Society for Research on Biological Rhythms, Amelia Island, Florida,  
USA. 2018 年 5 月 13 日

Yoshiaki Yamaguchi, Hitoshi Okamura. 「Inhibition of Vasopressin Signaling in the SCN  
of Aged Mice Increases Survival Rate under Chronic Jet Lag.」 International Symposium on  
Biological Rhythms "20 Years since Discovery of mammalian Clock Genes", Nagasaki, Japan.  
2018 年 10 月 19 日

(2) 国内学会での発表（口頭発表）

山口 賀章、岡村 均「概日リズムの頑強性を担う視交叉上核バソプレッシン神経結合」第 62 回 日本生化学会近畿支部例会 立命館大学びわこ・くさつキャンパス（滋賀県・草津市）2015 年 5 月 16 日

山口 賀章、水野 貴暢、鈴木 暢、溝曾路 祥孝、岡村 均「行動・摂食リズムの時差再同調における視交叉上核バソプレッシン受容体の役割」第 38 回日本神経科学大会 神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）2015 年 7 月 30 日

山口 賀章、岡村 均「バソプレッシン V1a/V1b 受容体による概日リズム形成」第 42 回日本神経内分泌学会 第 23 回日本行動神経内分泌研究会 合同学術集会プログラム 仙台市戦災復興記念館（宮城県・仙台市）2015 年 9 月 18 日

山口 賀章「概日リズムの頑強性を担う視交叉上核の分子神経機構 バソプレッシン V1a/V1b 受容体欠損マウスは時差症状を示さない」第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 大阪大谷大学（大阪府・富田林市）2015 年 10 月 17 日

山口 賀章、溝曾路 祥孝、郡 宏、岡村 均「視交叉上核バソプレッシン受容体の細胞概日振動における役割」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）2015 年 12 月 1 日

山口 賀章、岡田 和樹、水野 貴暢、程 肇、重吉 康史、小林 正樹、岡村 均「ラット視交叉上核における時計遺伝子概日振動の in vivo リアルタイム計測」第 63 回 日本生化学会 近畿支部例会 神戸薬科大学 2016 年 5 月 21 日

山口 賀章「時差を担う視交叉上核バソプレッシン V1a, V1b 受容体」第 16 回日本抗加齢医学会総会 パシフィコ横浜 2016 年 6 月 10 日

山口 賀章「概日時計の頑強性を担う視交叉上核の分子神経シグナル」第 64 回 日本生化学会 近畿支部例会 大阪大学豊中キャンパス 2017 年 5 月 27 日

山口 賀章「視交叉上核バソプレッシン受容体による概日リズム機能 - 概日リズム調整の創薬に向けて -」医療薬学フォーラム 2017 第 25 回クリニカルファーマシーシンポジウム 鹿児島市民文化ホール 2017 年 7 月 1 日

山口 賀章、岡村 均、郡 宏「数理モデルによる視交叉上核バソプレッシン細胞の時差再同調解析とその応用」第 44 回 日本神経内分泌学会学術集会 北里大学 2017 年 10 月 22 日

山口 賀章、岡村 均「バソプレッシンシグナルの抑制は、慢性時差環境下での老齢マウスの死亡率を減少させる」第 45 回 日本神経内分泌学会学術集会 日本医科大学 千駄木キャンパス 教育棟 2018 年 10 月 27 日

(3) 国内学会での発表（ポスター発表）

山口 賀章、岡田 和樹、水野 貴暢、程 肇、重吉 康史、小林 正樹、岡村 均「自由行動下ラットの視交叉上核における時計遺伝子概日リズム変動のリアルタイム計測」第 22 回 日本時間生物学会学術大会 東京大学情報学環・福武ホール（東京都・文京区）2015 年 11 月 21-22 日

山口 賀章、溝曾路 祥孝、郡 宏、岡村 均「視交叉上核バソプレッシン受容体の細胞概日振動における役割」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸国際会議場神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）2015 年 12 月 1 日

山口 賀章、岡田 和樹、水野 貴暢、程 肇、重吉 康史、小林 正樹、岡村 均「自由行動中ラットの視交叉上核における時計遺伝子 Per1 および Per2 変動のリアルタイムモニタリング」第 39 回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 2016 年 7 月 20 日

山口 賀章、陳 宇林、鈴木 暢、岡村 均「時差環境下における視交叉上核神経細胞の光応答性」第 23 回 日本時間生物学会学術大会 名古屋大学 豊田講堂 2016 年 11 月 12-13 日

山口 賀章、岡田 和樹、水野 貴暢、程 肇、重吉 康史、小林 正樹、岡村 均「ラット視交叉上核における時計遺伝子 Per1 および Per2 概日振動のインビボリアルタイム計測」第 39 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2016 年 11 月 30 日

山口 賀章、岡村 均、郡 宏「時差再同調の視交叉上核数理モデル」第 40 回日本神経科学大会 幕張メッセ 2017 年 7 月 20 日

山口 賀章、岡村 均、郡 宏「数理モデルを用いた視交叉上核の時差再同調解析とその応用」第 24 回 日本時間生物学会学術大会 京都大学吉田キャンパス 2017 年 10 月 28 日

山口 賀章、岡村 均「慢性時差環境下における老齢マウスの生存率」第 41 回日本神経科学大会 神戸コンベンションセンター（神戸国際会議場・展示場） 2018 年 7 月 26 日

山口 賀章、岡村 均「慢性時差環境下における老齢 V1aV1b ノックアウトマウスの生存率」第 91 回 日本生化学会大会 国立京都国際会館 2018 年 9 月 24 日

山口 賀章、岡村 均「バソプレッシンシグナルの抑制は、慢性時差環境下での老齢マウスの生存率を増加させる」第 25 回 日本時間生物学会学術大会 長崎大学医学部(坂本キャンパス) 記念講堂・良順会館・ポンペ会館 2018 年 10 月 20-21 日

〔図書〕(計 4 件)

岡村 均、山口 賀章：「内分泌 基礎分野での進歩 脳内バソプレッシンと時差」、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌、中外医学社、143-151, 2015

山口 賀章：「アルギニンバソプレッシン V1a, V1b 受容体」、脳内環境辞典、高橋 良輔、山中 宏二、樋口 真人、漆谷 真 (編)、メディカルドゥ、26-27, 2017

山口 賀章：「生物系薬学 家族性睡眠相後退障害におけるヒト概日時計遺伝子 CRY1 の変異同定」、ファルマシア、公益社団法人日本薬学会、54, 255, 2018

山口 賀章：「時差環境下における概日リズム障害の分子メカニズムと治療標的」、医薬ジャーナル、医薬ジャーナル社、54, 97-102, 2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

京都大学大学院薬学研究科  
医薬創成情報科学専攻  
システムバイオロジー分野  
ホームページ  
<http://systems-biology.pharm.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

該当なし

### (2) 研究協力者

岡村 均 (OKAMURA, Hitoshi)  
京都大学大学院薬学研究科 教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。