

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08221

研究課題名(和文)末梢体内時計の人為的操作と概日リズム機構の回復の試み

研究課題名(英文)An approach to restoring attenuated circadian physiological rhythms using artificial time cue.

研究代表者

筋野 貢(SUJINO, Mitsugu)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30460843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスを用いて実験を行い、食事と運動のタイミングを人為的に調節することで、遺伝子変異により損なわれた、活動および遺伝子発現における日内リズムを補強することができた。この結果は、適切な時間帯に食事や運動負荷を与えることで、疾病や老化によって減弱した体内時計を回復できる可能性を示す。また、時計遺伝子CLOCK変異マウスの中枢体内時計では、遺伝子発現リズムのパターンが変化していることを発見し、細胞レベルでのリズム減衰がその原因であることが示唆された。CLOCK変異マウスは夜間の光暴露などの刺激によって体内時計が大きくずれることが知られており、今回の発見が、その一因である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this research, the circadian activity rhythms and gene expression rhythms of mice with clock or clock-related gene mutation were restored by adjusting the timing of a meal and an exercise artificially. This result showed a possibility that the meal and exercise given in the suitable time zone remedies an attenuated biological clock. Moreover, we found the abnormal pattern of a gene expression rhythm in the central biological clock of the CLOCK mutant mice, and it was suggested that attenuation of rhythms on each cell caused that phenomenon. The biological clock of CLOCK mutant mice shifts greatly by light exposure at night. Our findings advance understanding of this abnormal characteristics of biological clock in the CLOCK mutant mice.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 概日リズム 視交叉上核

### 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む地球上の多くの生物は、その体内に一日の時刻を知るための機構、いわゆる「体内時計」を持っている。体内時計はほとんどの細胞に備わっており、時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群が、その発現を相互に調節しあうフィードバックループ機構によって、ほぼ 24 時間の正確なリズムをつくり出すと考えられている。

近年、時計遺伝子変異マウスが様々な生理機能の異常を引き起こす例が報告されている。哺乳類では、視交叉上核(視床下部の神経核)が概日リズムをつかさどる中枢体内時計であるが、それが損なわれると、睡眠覚醒、摂食、体温、血中ホルモン濃度など、様々な生理的リズムが減衰してしまう。また、臓器にも末梢体内時計と呼ばれる時計機構が存在し、多くの遺伝子発現を調節して、生理機能に日内リズムを与えている。通常、末梢体内時計は中枢体内時計に同期しているが、中枢体内時計からの同調因子(摂食、体温、糖質コルチコイド等のリズム)が失われると、十分なリズムを維持できず、様々な生理機能のリズムが失われてしまう。さらに、視交叉上核からのリズム情報は加齢によって衰えるため、老化による概日リズムの減衰が知られている。

一方、申請者の研究結果や他の報告から、外部から同調因子となりうる刺激を与えることで、末梢体内時計に介入できることがわかっている。この事は、中枢体内時計からの出力が衰えている時計遺伝子変異動物や高齢動物において、同調因子の人為的な補充の可能性を示唆するが、それを検証した報告はほとんどない。ヒトにおいても、体内時計の異常は様々な疾病の原因となりうるため、こうした体内時計の人為的操作の試みと、その基盤となる知見を得ることが求められている。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、末梢組織・臓器の体内時計を人為的に操作することで、時計遺伝子の変異や疾病、加齢によって損なわれた生理機能の概日リズム機能を回復することにある。そのために、末梢体内時計のリズム同調機構にかかわる複数の因子が、動物個体内でどのように協調あるいは拮抗して働くのか、その機構を明らかにする。また、リズム同調にかかわる因子は、その日内変動パターンが中枢体内時計(視交叉上核)に支配されている。そこで、視交叉上核内での遺伝子発現の日内変動パターンを調査し、生理機能の日内変動との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究は、動物(マウス)個体を用いた実験と、培養組織を用いた実験に大別される。それぞれの実験方法は、以下のとおりである。

#### (1) 動物個体を用いた実験

C57bl/6 および ICR 系統の野生型、CLOCK 19 mutant、VPAC2 knockout を使用し、8-12 週齢のオス及びメス成体マウスで実験を行った。気温 23 度、明暗 7:00 点灯/19:00 消灯の環境下で、マウスは個別に、プラスチックケージで飼育された。各ケージには赤外線モーションセンサーが備えられており、動物の自発的運動量を実験期間中に連続して計測した。ケージには、必要に応じて回転輪と食餌量の測定機器を装備した。回転輪にはロック機構、給餌装置にはゲートを付けて、タイマーによる制御を可能とした。

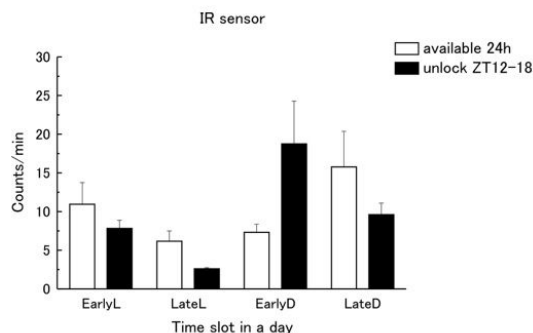
#### (2) 培養組織を用いた実験

時計遺伝子 *Period2* に *Luciferase* を融合した遺伝子改変マウス(PER2::LUC)と、CLOCK 19 mutant を交配し、新生仔の組織を使用した。光電子増倍管または超高感度 CCD を用いて、培養組織の生物発光を経時的に測定し、その組織が持つ時計機構のリズムを評価した。

### 4. 研究成果

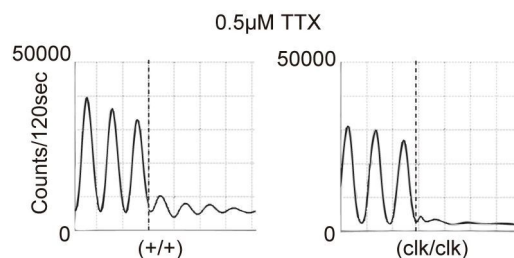
本研究は、当初の計画に従い、主に動物個体を用いて、体内時計の人為的な操作を試みた。一方で、期間中に、体内時計の異常を示す CLOCK 19 変異マウスの中核時計が、野生型マウスとは異なった特徴を示し、それが日内リズムに影響していることが示唆されたため、CLOCK 19 中核時計の培養組織を用いた解析を並行して進めた。

(1) CLOCK 19 変異マウスは、時計遺伝子 CLOCK に変異を持つため、日内リズムの減弱と活動相の後退を示す。このマウスの行動量と摂食量を測定すると、本来の休息期である明期にも、野生型マウスと比較して、輪回し運動、摂食量が多いことが判明した。そこで、輪回し運動と摂食時間を暗期に限定して、日内リズムに与える影響を観察した。その結果、活動相(図 1)と体温リズムの位相が前進し、末梢組織の遺伝子発現日内リズムを増強することができた。また、CLOCK 変異マウスと同様に、日内リズムの減弱化と活動相の前進を示す VPAC2 ノックアウトマウスを用いて、時刻特異的運動負荷による生理機能の日内リズムの回復を試みた。時刻特異的に回し車を使用させ、日内リズムへの影響を測定した。その結果、暗期にのみ回し車へのアクセスを可能にした場合に、明期の後半に見られていた活動が抑制され、暗期の活動が増加する効果が確認された。本研究結果は、適切な時間帯に食事や運動負荷を与えることで、減弱した体内時計と生理機能の日内リズムを回復できる可能性を示している。

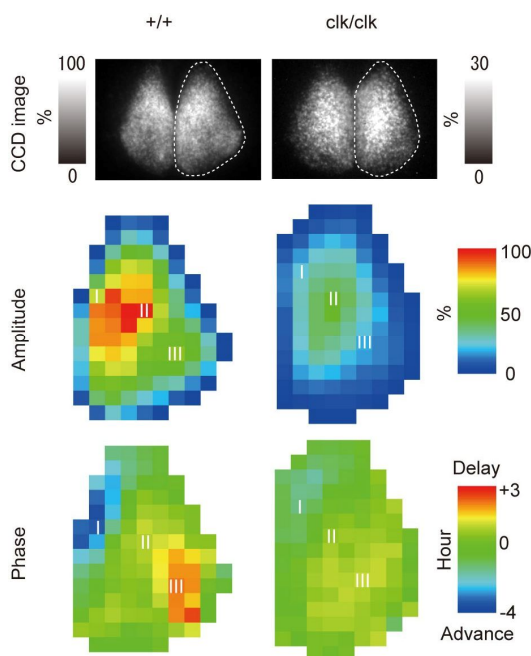


(図 1) 赤外線モーションセンサーで計測した CLOCK 変異体マウスの自発的活動量。Early L は明期の前半、Late L は明期の後半、Early D は暗期の前半、Late D は暗期の後半の活動量を示す。一日を通して回し車にアクセスできる条件(available 24h)に比べて、暗期の前半にのみアクセスできる条件(unlock ZT12-18)では、暗期前半の活動量が増加し、暗期後半と明期の活動量が減少した。

(2) CLOCK 変異マウスの中枢時計である視交叉上核を組織培養し、時計遺伝子の発現パターンを調査したところ、これまでの報告では安定した日内リズムが確認されていなかったが、今回、長期にわたって安定した明瞭なリズムが観察された。このリズムは細胞間情報伝達を阻害すると著しく減弱したことから、弱いリズムを持つ細胞同士が互いを励起することで、視交叉上核全体で強いリズムを維持していることが明らかとなった(図 2)。また、野生型マウスの視交叉上核のリズムは一様ではなく、領域によって位相にずれがあるが、CLOCK 変異マウスではそのずれが減少していた(図 3)。視交叉上核内の領域による位相差は体内時計の安定化に必要なと考えられている。CLOCK 変異マウスは環境因子によって容易に体内時計の位相が動くことが知られており、その原因として体内時計の減弱が挙げられているが、位相差の喪失も影響している可能性が示唆された。次に、CLOCK 変異マウスは野生型よりも長周期の概日リズムを示すため、周期が視交叉上核の領域的位相差に及ぼす影響を調査した。周期を延長させる SP600125 および重水の存在下では、領域的位相差は失われず、周期を短縮させるピクロトキシン存在下でも同様であった。この結果から、周期に関係なく領域的位相差が形成されることが示された。



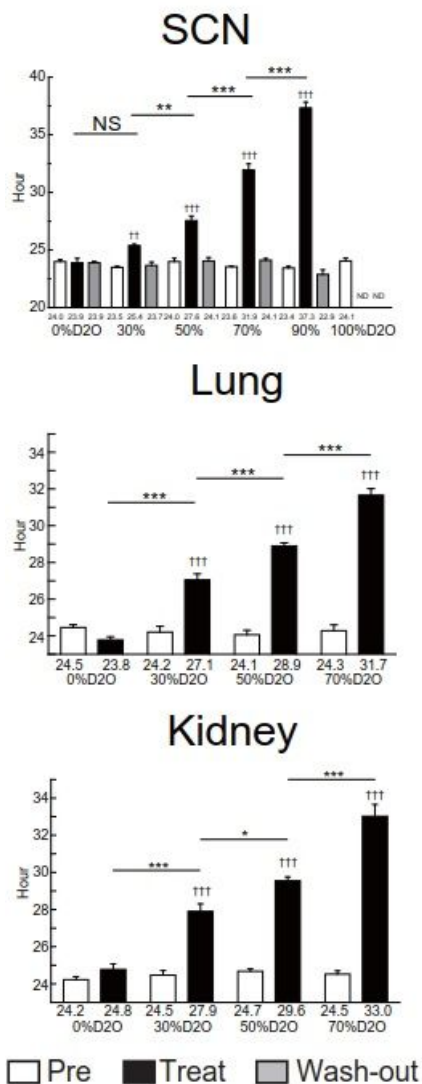
(図 2) 野生型 (+/+) と CLOCK 変異体 (clk/clk) の培養視交叉上核における PER2::LUC 生物発光リズム。破線の時点で 0.5 $\mu$ M テトロドトキシンを加えて神経インパルスを抑制し、細胞間リズム同期を阻害した。(引用: Sujino et al. 2018 8(1):854. Scientific Reports. Figure 3 より)



(図 3) 野生型 (+/+) と CLOCK 変異体 (clk/clk) の培養視交叉上核における時空間的時計遺伝子発現パターン。位相(Phase)地図を見ると、変異体の視交叉上核では、野生型と比較して位相差が減少していた。(引用: Sujino et al. 2018 8(1):854. Scientific Reports. Figure 2 より)

(3) 重水は動物個体の体内時計の周期を延長することが知られているが、組織レベルでの分子時計への影響は、十分に検討されていない。末梢時計の人為的操作への応用をふまえて、重水が体内時計に及ぼす周期延長効果の解析を行った。組織培養系では、培養液中の重水濃度が 70% を超える場合でも、視交叉上核、肺、腎臓の概日リズムが維持された。この時、リズムの周期は重水の濃度依存的に延長し、濃度 70% では 30 時間を超えて長周期化することが判明した(図 4)。また、時計遺伝

子の発現リズムの波形を、周期が延長する遺伝子変異マウスや他の薬物と比較したところ、異なった特徴を示した。このことは、重水による周期延長の作用機序が、今までに知られていないものである可能性を示す。



(図 4)培養視交叉上核組織(SCN)、肺(Lung)、腎臓(Kidney)に対する重水の周期延長効果。周期の測定はPER2::LUC生物発光にて行った。

## 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 2 件)

1. Mitsugu Sujino, Takeshi Asakawa, Mamoru Nagano, Satoshi Koinuma, Koh-hei Masumoto, Yasufumi Shigeyoshi  
CLOCK 19 mutation modifies the manner of synchrony among oscillation neurons in the suprachiasmatic nucleus. Scientific Reports. 査読あり  
2018 8(1):854. doi:

10.1038/s41598-018-19224-1.

2. 重吉康史、長野護、筋野貢 体内時計中枢に内在する同期機構 生体の科学 査読無し 67:527-531 2016

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 筋野貢、重吉康史 重水による培養マウス視交叉上核の周期延長と位相波への影響 第24回日本時間生物学会学術大会 京都 2017年10月28日-29日
2. 筋野貢、鯉沼聡、重吉康史 マウス培養SCNにおける領域特異的周期差の探索 第22回日本時間生物学会学術大会 東京 2015年11月21日-22日

〔その他〕

ホームページ等

近畿大学解剖学講座

<http://www.med.kindai.ac.jp/anato2/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

筋野 貢 (SUJINO, Mitsugu)

近畿大学・医学部解剖学・助教

研究者番号：30460843