

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15040

研究課題名(和文) 骨髄を介した摂食及び食餌同調リズム制御の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for regulation of feeding and food-entrained rhythms via brain-bone marrow network

研究代表者

早坂 直人 (Hayasaka, Naoto)

名古屋大学・環境医学研究所・特任准教授

研究者番号：80368290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、絶食・制限給餌下で骨髄と視床下部における時計遺伝子の発現に有意な変化を見出した。また、制限給餌によって時計遺伝子の発現位相が変位することも明らかにした。骨髄破壊マウスでは、絶食下において制限給餌性リズム異常、即ち給餌予知行動(FAA)の低下が認められた。更に、絶食時に発現が有意に上昇する遺伝子のKOマウスで制限給餌を実施したところ、FAAの有意な減少を観察した。以上から、FEOは骨髄、視床下部を含むネットワークから構成されており、骨髄から脳への特定のシグナルがFAAを誘導していることが示唆された。本研究は、行動が脳以外の制御を受けるという新たな仕組みの一端を明らかにしたといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found a significant change in the expression of clock genes in the bone marrow and hypothalamus under restricted feeding and fasting. In parallel, it was also indicated that changes in the phase of clock gene expression were observed under restricted feeding. In the case of myeloablative destruction, abnormality of restricted feeding rhythm, that is, a significant reduction in feeding action (FAA) was observed under fasting. Furthermore, when we examined KO mice in which a gene with elevated expression under fasting is ablated, we observed a significant decrease in FAA. Collectively, our data suggest that food-entrainable oscillator (FEO) may constitute a network including bone marrow and hypothalamus. It was also suggested that a certain signaling from the bone marrow to the brain is involved in FAA induction under the control of FEO. Overall, our study suggest a novel mechanism in which not only brain but other regions play a role in the regulation of behavior.

研究分野：概日時計

キーワード：骨髄 摂食リズム 制限給餌

1. 研究開始当初の背景

24時間周期の環境変化に適応する仕組みとして広く認知されている概日時計(光同調時計、LEO)とは独立して、食餌時間に行動を同調させる時計(食餌同調性時計、FEO)の存在が示唆されている。LEOの中樞は脳視床下部視交叉上核(SCN)に同定されているが、FEOは報告から数十年を経て、未だに制御中枢の局在の証明には至っていない。FEOは絶食下で食餌時間を毎日一定時間に限定する制限給餌(RF)で、給餌開始時間前から見られる探索行動(給餌予知行動、FAA)を誘導するが、夜行性のげっ歯類に昼間RFを実施すると、FEOが優先的に機能し、昼行性へと移行する。FEOはLEOを破壊した個体でも機能が維持され、至適な摂餌時間を記憶し、探索、摂食行動を惹起して飢餓を回避するという、生存に重要な役目を果たすと考えられるが、その実態の多くは不明である。我々は、マウスの絶食時に、骨髄由来のミクログリアが脳視床下部の室傍核(PVN)に増加(集積)し、再給餌で減少することを見出した。そして、それらの細胞は神経栄養因子で食欲調節に關与する Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)を産生していることを明らかにし、摂食の制御に關与することを示唆した。更には、正常マウスに BDNF 欠損マウスの骨髄を移植すると摂食量、体重、血糖値等が有意に増加することから、骨髄由来細胞が産生する BDNF が食欲や摂食の調節を介して代謝制御に寄与する可能性が示された。以上の結果から、我々は、絶食時に食欲や摂食・探索行動を増進させる FEO が、「脳と骨髄を含むネットワークで構成され、飢餓状態から回避するための時刻依存的な行動を制御している」という仮説が成り立つと考えた

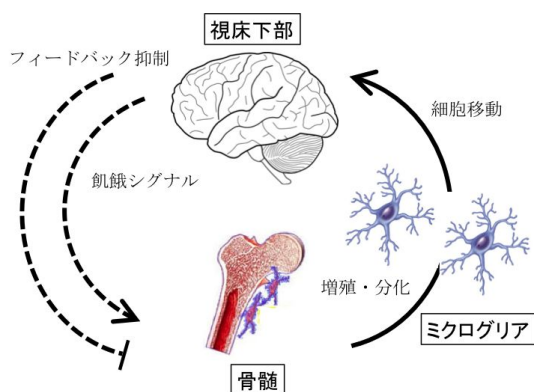


図1 脳-骨髄ネットワークモデル

(図1参照)

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、局在や駆動機序が未解明である FEO を題材とし、「FEO は骨髄 - 脳ネットワークで構成され、飢餓時

に細胞移動と調節因子の分泌を介して、食欲、摂食行動をフィードバック制御する」との仮説を検証する。そして、「2つの時計」の摂食リズム制御を介した代謝恒常性維持の仕組みに迫る。

3. 研究の方法

本研究では、まず第1に、自由摂食条件下で光同調時計(LEO)にドライブされる時計遺伝子の概日リズムについて、骨髄、ミクログリア、および室傍核で確認する。並行して、絶食や制限給餌負荷条件下で、それぞれの組織や細胞で FEO が關与する概日リズムの変化(リズム位相のシフト)が觀察されるかどうかについて解析する。以上の実験で、絶食下や制限給餌時のリズム動態に変異が見られれば、制限給餌性リズムに關与する可能性が出てくる。第2に、骨髄破壊マウスを作製して同様の食餌条件下で概日リズムを検討し、制限給餌性リズム(FAA)に対する影響の有無も解析する。また、骨髄破壊マウスに、FAAが消失するとの報告がある Per2 時計遺伝子 KO マウスの骨髄を移植し、骨髄の時計が破綻した場合、FAAに影響が出るかどうかを確認する。更に、絶食時に室傍核に移行するミクログリアが食欲を調節することが示唆されたので、骨髄特異的 BDNF KO マウス由来の骨髄移植も実施し、BDNF が FAA 惹起に關与するかどうかを確かめる。以上の実験から、骨髄の時計や骨髄由来細胞が分泌する食欲調節因子が、FEO 機能に關与するかが明らかになる。第3に、室傍核の FEO 駆動や FAA 制御における寄与を明らかにするために、絶食時に室傍核で発現が亢進し、細胞遊走に關与することが示唆される遺伝子 KO マウスで、絶食ならびに制限給餌実験を実施する。室傍核神経細胞が、飢餓シグナルや給餌時刻の記憶と情報伝達に關与するならば、この KO マウスでは FAA に影響が出ることが予想される。本研究の計画を項目別に整理すると以下ようになる(図2参照)。

骨髄、骨髄由来ミクログリア及び室傍核の概日(光同調)リズム、食餌同調リズム解析
自由摂食、絶食、ならびに制限給餌負荷時のマウスにおける骨髄、ミクログリア、室傍核の時計遺伝子等の発現リズムを比較解析し、給餌条件によりリズムに影響が出るか否か検討する。

骨髄破壊マウス、骨髄移植マウスを用いた制限給餌性リズムの検討

骨髄破壊マウス、時計欠損マウスの骨髄を移植したマウス、骨髄特異的 BDNF 欠損マウス、時計欠損マウスに正常骨髄を移植したマウスで、制限給餌性リズムへの影響を比較解析する。

食餌性時計駆動における室傍核の關与の

解析

絶食時に室傍核で発現が亢進し、ミクログリア移動への関与が示唆される遺伝子ノックアウト(KO)マウスで制限給餌負荷実験を行い、ミクログリア遊走や制限給餌性リズムへの影響を評価する。

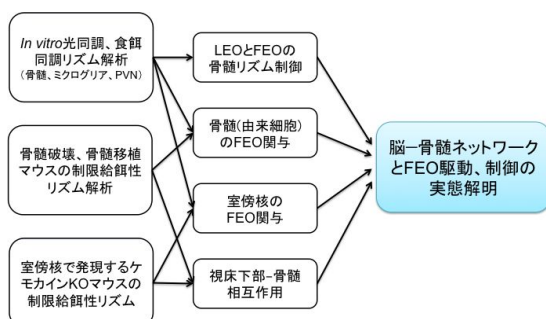


図2 本研究のロードマップ

4. 研究成果

骨髄、骨髄由来ミクログリア及び室傍核の概日(光同調)リズム、食餌同調リズム解析

これまでに、絶食および制限給餌下で骨髄、室傍核ミクログリア、室傍核を採取し、qRT-PCRを実施した。室傍核のミクログリアのサンプリングは、以下の方法で実施した。骨髄破壊マウスに GFP リポーター発現マウスの骨髄を移植し、室傍核に移行したミクログリア (GFP+) をマイクロダイセクションで採取する。骨髄は細胞全体でリズム計測を行ったが、必要に応じて分化マーカーを標識し、細胞毎にソーティングした。以上の実験の結果、骨髄ならびに視床下部で一連の時計遺伝子群の発現に有意な変化を見出した。並行して、制限給餌負荷によって一部の時計遺伝子の発現位相に変位が見られることも明らかにした。更に、絶食時に発現が有意に上昇する遺伝子の KO マウスで制限給餌を実施したところ、FAA の有意な減少を認めた。以上の結果から、FEO は、少なくとも骨髄、視床下部を含むネットワークから構成されている可能性が示唆された。また、骨髄から脳への特定のシグナルが FEO の制御下で FAA を誘導している可能性が示唆された。以上の結果は、行動が脳以外の制御を受けるという新たな仕組みの一端を明らかにしたとも言える。

骨髄破壊マウス、骨髄移植マウスを用いた制限給餌性リズムの検討

骨髄破壊マウス (放射線照射) では、絶食下において制限給餌性リズムの異常、すなわち給餌予知行動 (FAA) の有意な低下が認められた。また、時計遺伝子の発現にも有意な低下を観察した。骨髄の時計破壊マウス (骨髄

破壊マウスに時計遺伝子 KO マウスの骨髄を移植したマウス) でも、室傍核で同様のリズム解析を行った結果、変化は認められず、FAA の回復も見られなかった。一方、骨髄破壊マウスに正常骨髄を移植した結果、FAA の出現がレスキューされた。また、骨髄由来ミクログリアが産生する BDNF が FAA に影響するかを検討するため、骨髄特異的 BDNF KO マウスでも同様に制限給餌を行った。その結果、FAA は正常マウスと比較して有意に減弱することが明らかになった。以上の結果から、骨髄における概日時計の正常な駆動や、骨髄由来のミクログリアにおける BDNF の発現が、FAA の出現に関与していること、更には、骨髄が視床下部に作用して、絶食時や制限給餌下で必要な行動を惹起していることが示唆された。

食餌性時計駆動における室傍核の関与の解析

室傍核は、視床下部で弓状核からの促進性、抑制性の神経投射や弧束核への投射などが知られており、食欲と摂食行動制御への関与が示唆される。また、食欲調節に関わる BDNF 受容体 TrkB が発現することが知られているが、室傍核に作用する BDNF の由来は明らかではなかった。絶食時に骨髄からミクログリアが室傍核に移動し、BDNF の産生を介して食欲や摂食行動を調節するという我々の結果には合理性があるが、室傍核が FEO の時間記憶や時刻依存的な食欲、行動の制御に関与するかどうかについては報告がない。そこで、骨髄由来細胞で受容体発現の報告があり、かつ絶食時に発現の劇的な亢進を見出した遺伝子に注目した。絶食時に室傍核でこの遺伝子の発現が誘導され、受容体の発現が報告されている骨髄由来細胞が室傍核内に移動 (浸潤) する可能性が考えられた。また、絶食下で制限給餌を実施した際に、給餌時刻前から FAA を出現させる時計機能が、室傍核にあると仮定した場合、この遺伝子発現のタイミングを支配し、BDNF 産生ミクログリアの時間特異的な移動を介して食欲、摂食行動を調節しているかどうかを解析する必要がある。そこで、この遺伝子の KO マウスを用いて制限給餌負荷実験を行い、FAA の消失、減弱といった異常が認められるかどうか、その場合に室傍核/ミクログリアの遺伝子発現 (リズム、位相) が変化するか、ミクログリアの局在変化に影響するか、などについて解析を行っている。以上の実験と上記の結果から、骨髄-視床下部ネットワークにおいて、FEO に関する時計機能の局在を特定できる可能性があると考えている。また、絶食や制限給餌の情報がこのネットワーク上のどこに最初に入力し、その結果 FEO が駆動し行動に至るまでにどの経路を通るのか、というメカニズムの一部が解明されることも期待される。現在、以上の成果の一部を

投稿済みであり、引き続き得られた知見についても順次論文文化している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hayasaka N.*, Hirano A., Miyoshi Y., Tokuda I.T., Matsuda J., Fukada Y. Salt-inducible kinase 3 regulates the circadian clock by destabilizing PER2 protein. eLIFE, e24779, 2017. DOI: 10.7554/eLife.24779 査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

Naoto Hayasaka, A Homeostasis Regulator SIK3 Directs Circadian Rhythms and Sleep Through Multiple Downstream Substrates, 2018 Society for Research on Biological Rhythms (SRBR) Meeting, Florida USA 2018

早坂 直人、リン酸化酵素 SIK3 を介した概日リズム、睡眠、そして代謝の制御、第 95 回日本生理学会大会シンポジウム、2018

早坂 直人、代謝・睡眠・概日リズムを共に制御するリン酸化シグナル、第 3 回群馬大学生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム(招待講演) 2017

Naoto Hayasaka, Astrocyte as a regulator of the central circadian clock and its input/output pathway, Neuroscience 2016, Yokohama, 2016

Naoto Hayasaka, Involvement of astrocytes in the circadian clock machinery, Gordon Research Conference Chronobiology, Girona, Spain, 2015

Naoto Hayasaka, Glia makes the clock tick: a role for astrocytes in the circadian rhythm regulation, Neuroscience 2015, Kobe 2015

Naoto Hayasaka, A new understanding of the mammalian circadian clock as neuroglial networks, XIV European Biological Rhythms Society Congress, Manchester, UK 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂 直人 (HAYASAKA, Naoto)

名古屋大学・環境医学研究所・特任准教授
研究者番号: 80368290

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()