

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：24303
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：15K20012
研究課題名(和文) マウス大腿骨骨折モデルを用いた軟骨の体内時計の機能の解明

研究課題名(英文) The circadian clock in fractured mouse femur

研究代表者

南 陽一 (Minami, Yoichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40415310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、骨折部において治癒過程に形成される軟性仮骨(軟骨)における体内時計について検討した。この目的でマウス大腿骨骨折モデルを作成し、時計遺伝子の発光レポーターの活性を指標として、発光イメージングの手法で骨折治癒部に体内時計が存在することを示した。加えて、骨折治癒部の体内時計が副甲状腺ホルモン(PTH)投与により位相変位することを見出した。また、軟骨における体内時計の機能に迫る目的で、軟骨細胞のモデル細胞として知られるATDC5細胞株を用いた体内時計のアッセイ系を構築した。このモデル細胞においても、PTH投与で体内時計の位相変位が誘導できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The circadian clock in the cartilage formed in bone fracture healing site was studied. For this purpose, mouse femur fracture healing model was developed using PER2::Luc knock-in mouse which harbors circadian clock reporter gene. By real-time bioluminescence imaging with organ culture technique, circadian rhythm of bioluminescence in fracture healing sites were clearly detected. Noteworthy, this PER2::Luc activity rhythm was reset by parathyroid hormone (PTH). To understand cartilage clock in detail, in vitro assay system were established using ATDC5 cell line. By real-time bioluminescence monitoring, stably transfected molecular clock reporter, Bmal1-Luc, clearly show circadian rhythms. Furthermore, as same as cartilage clock in femur growth plate and in fracture healing sites, PTH can reset the circadian clock in ATDC5. These suggest that this assay system using ATDC5 contribute for understanding the cartilage circadian clock function.

研究分野：環境生理学

キーワード：概日リズム 体内時計 発光イメージング 軟骨 骨折モデル

1. 研究開始当初の背景

様々な生理機能に、一日周期のリズムが観察される。例えば、骨吸収のマーカーである NTX、骨形成のマーカーであるオステオカルシンには日内変動が知られる。体の中に「1日」周期の変化を作り出すメカニズムを体内時計と呼び、一群の時計遺伝子から構成されていることが知られる。時計遺伝子には、例えば、転写調節を負に制御する *Per1*、*Per2*、*Cry1*、*Cry2*、*RevErbAa*、*RevErbAb*、正に制御する *Bmal1*、*Clock* があり、転写・翻訳のフィードバックループを構成して、時計遺伝子の発現調節に概日リズム（約 24 時間周期のリズム）を与え、また様々な生理機能をもつ遺伝子（出力遺伝子）の発現に概日リズムを伝える。体内時計の中核は、視交叉上核という神経核に存在するが、分子レベルで概日振動を生み出す体内時計が、肝臓や心臓など、様々な臓器に存在することが明らかにされている。現在では、体内のほぼ全ての臓器に固有の体内時計が存在し、視交叉上核がそれら末梢時計を統御して、体内の時刻秩序が保持すると考えられている。

私たちは、時計遺伝子のレポーターマウス（PERIOD2::LUC ノックインマウス、以下 PER2::Luc マウスという）を用い、マウス大腿骨の器官培養系を構築し、骨組織における体内時計の存在を直接的に示すことに成功した。この研究では、培地を交換することで、器官培養下の大腿骨から 300 日以上にわたり発光リズムを継続できること、組織全体を視野に入れられる発光マクロイメージングシステムを用いることで、大腿骨成長軟骨板、大腿骨頭、関節軟骨に体内時計が存在することを示した。加えて、細胞内 cAMP レベルを上昇させる化合物であるフォルスコリンの投与で、体内時計の位相が変位する（時計の示す時刻が変わる）ことが分かった（Okubo et al., PLoS ONE, 2013）。さらに私たちは、大腿骨器官培養系を用い、カルシウム代謝に重要なホルモンである副甲状腺ホルモン（PTH）が、体内時計の位相を変位させることを明らかにした。PTH は PTH1 型受容体を介し細胞内の cAMP レベルを上げ、位相変位を引き起こしたものと考えられた（Okubo et al., ACTA Ortho Pedica, 2015）。

2. 研究の目的

骨折の治癒過程において、骨折部近傍では間隙を埋めるように軟骨（軟性仮骨）が形成され、内軟骨性骨化が生じる。本研究課題では、この軟骨に体内時計があることを明らかにすることを目的とした。さらに、体内時計の状態を外的に変化させられる可能性を検討するため PTH を用いて位相変位を誘導することを試みた。

また、骨折部の軟骨の体内時計の生理機能に迫るために、軟骨前駆細胞のモデル細胞である ATDC5 細胞を用いた in vitro アッセイ系の確立を試みた。

3. 研究の方法

（1）マウス大腿骨骨折モデルを用いた検討
大腿骨骨折治癒部の発光リズムを検討するために、米国 Joseph Takahashi のグループによって開発された体内時計の状態を発光で可視化できるレポーター遺伝子をもつ PER2::Luc マウスを用いた。

深麻酔下で PER2::Luc マウスの大腿骨骨幹部を骨切りし、創外固定器によって安定化させたマウス骨折モデルを作成した。このマウスを通常の明暗周期で、自由摂餌・摂水条件下に一定期間飼育した後に安楽死させ、創外固定器をつけたまま、無菌下到大腿骨等の骨組織を採取し、軟部組織を丁寧に剥離した。得られた組織を先行研究の通り（Okubo et al., PLoS ONE, 2013）、マクロ発光イメージング装置（ATTO 社、Olympus 社）にセットして器官培養した。形成された仮骨の体内時計の位相を変位させるために、PTH（human PTH(1-34)、ペプチド研究所）を用いた。

（2）細胞レベルでの軟骨の体内時計の評価系の構築

ATDC5 細胞に、体内時計の状態を外的にモニターできるように、時計遺伝子 *Bmal1* のプロモータに誘導されるホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーター遺伝子（*Bmal1::Luc*）を遺伝子導入した安定細胞を作成し、実験に用いた。発光リズムの観察には、温室中にセットした金属製のターンテーブルに光電子増倍管をセットした発光測定器を用いて行った。装置軟骨への分化は、培地中にインスリン、亜セレン化ナトリウム、ヒトトランスフェリンを加えて刺激することで行い、アルシアンブルー染色により軟骨への分化を確認した。ATDC5 細胞の体内時計の評価の1つとして、PTH を投与した場合の位相変位について検討した。このために、human PTH(1-34)（ペプチド研究所）を用いた。

4. 研究成果

（1）マウス大腿骨骨折モデルを用いた検討
マウス大腿骨に骨切りを加え、創外固定器を設置し、維持し、創傷治癒過程を単純 X 線像を撮影して確認したところ、術後 14 日で仮骨（軟骨）が形成されていることが確認できた。組織染色によってもこの知見は確認された。すなわち、術後 14 日で採取した大腿骨では、HE 染色、サフラニン O 染色によって、骨切り部に仮骨の形成が観察された。術後 21 日では仮骨は著明に減少して骨に置き換わり、術後 42 日では髄内腔の形成が確認できた。

術後 14 日の PER2::Luc マウスの大腿骨を採取し、発光を確認したところ、従来報告していた成長軟骨板、大腿骨頭、関節軟骨部に強いシグナルを観察した。これに加え、創傷治癒部にも著明なシグナルを観察した。術後 21 日、42 日の大腿骨では、経日的に骨切り

部（仮骨）に観察された発光シグナル強度は減少し、術後 84 日ではほぼ観察されなくなった。術後 14 日の大腿骨を CCD カメラを搭載した発光マクロイメージング装置により発光シグナルの変化を観察したところ、成長軟骨板、大腿骨頭、関節軟骨に、ほぼ 1 日の周期をもつリズムを観察した。

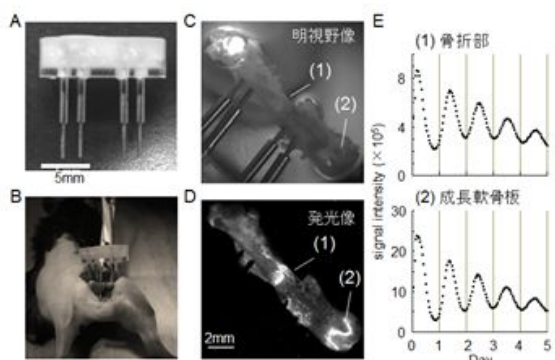


図 1 . 創外固定器を用いた骨折モデルおよび骨折部の発光リズム。用いた創外固定器 (A) をマウスに設置した様子 (B) 。PER2::Luc マウスを用いて骨折モデルを作出し、大腿骨を摘出して発光像を観察した。明視野像 (C) および発光像 (D) を示す。骨折部および成長軟骨板に見られたシグナルに、明瞭な概日リズムを認めた (E) (Kunimoto et al., Scientific Reports, 2016)

重要なことに、仮骨でも明瞭な概日リズムが観察された。時計遺伝子 *Bmal1* は欠損すると体内時計の分子機構が破たんし、概日リズムを呈さなくなることが知られている (Bunger et al., Cell, 2000) 。*Bmal1* をホモに欠損した PER2::Luc マウスを交配により作出し、骨切りを施して 14 日後に大腿骨を採取してマクロイメージング装置で観察した。その結果、発光シグナルは成長軟骨板、大腿骨頭、関節軟骨および骨切り部の仮骨に確認された。しかしながら野生型マウスとは異なり、経日的な観察により PER2::Luc 活性にはリズム性が観察されなかった。

私たちのこれまでの研究から、軟骨の体内時計が PTH で位相変位することが示されていた (Okubo et al., Acta Orthop, 2015) 。このことから、仮骨の体内時計が PTH により位相変位する可能性を考えた。器官培養下に仮骨に PER2::Luc 活性の概日リズムを観察したのち、PTH を培地中に滴下して大腿骨に作用させた。この結果、コントロールである蒸留水投与の場合には仮骨の発光リズムの位相は変化しなかったのに対し、PTH 投与の場合には、大きく位相変位することが観察された。重要なことに、免疫組織科学により仮骨に PTH の受容体 (PTH1R) の発現が確認されたことから、PTH は仮骨に直接作用して体内時計の位相を変位させたと考えられた。

以上の結果から、(1) この結果は、創外固定器を用いた骨折治癒モデルが機能する

こと、(2) 骨折治癒過程で形成される仮骨に *Bmal1* 遺伝子を必須とする体内時計が備わっていること、(3) この体内時計は PTH によって位相変位すること、が示された。(Kunimoto et al., Scientific Reports, 2016) 。

(2) 細胞レベルでの軟骨の体内時計の評価系の構築

ATDC5 細胞に、*Bmal1:Luc* レポーター遺伝子を導入し、安定発現株を作成した。この遺伝子導入細胞を用い、未分化の状態での ATDC5 細胞に体内時計の振動を惹起することが知られているデキサメタゾンで刺激した後、発光を継続的に観察したところ、発光に明瞭な概日リズムを認めた。次いで、ATDC5 細胞に化合物を加えて軟骨細胞に分化誘導した。分化が誘導されていることは、軟骨細胞の分化マーカーである *Co2a1* や *Col10a1*、アグリカンの遺伝子発現が、経日的に増加していたことが定量的 PCR 法によってわかったこと、また、分化 21 日目の細胞を軟骨が染色されるアルシアンブルーで処置した場合に、細胞の濃染を認めたことで確認された。分化誘導後 7 日目、14 日目、21 日目で発光リズム観察を行ったところ、いずれの場合でも、明瞭な概日リズムを観察することに成功した。以上の結果は、ATDC5 細胞を用いたレポーターアッセイ系が、軟骨細胞の体内時計研究の目的で有用であることを意味した。また、軟骨分化過程と体内時計の関連を検討するうえで重要な系足りうることを示唆した。

これまで大腿骨組織培養系での知見 (Okubo et al., Acta Orthop, 2015) や骨折モデルでの知見 (Kunimoto et al., 2016) から、PTH が軟骨の体内時計の位相を変位させることが示されていた。そこで大腿骨成長軟骨板等と同様に、PTH が ATDC5 細胞株の体内時計の位相を変位させる可能性について、検討した。この結果、 10^{-10}M から 10^{-8}M まで濃度依存的に位相変位することがわかった。加えて、PTH を加える時刻を変化させた場合に、概日振動を惹起した 41 時間後の刺激では位相後退 (体内時計の示す時刻が遅れる) が、50 時間後には位相前進 (体内時計の時刻が進む) が観察され、PTH の影響が投与時刻依存的であることが分かった。実際、概日振動を惹起した 38 時間後から 3 時間ごとに PTH 刺激を行ったところ、44 時間後の刺激では約 12 時間の位相変位が観察されたのに対し、56 時間後には位相変位は観察されなかった。この PTH による時刻依存的な位相変位のパターンは、Type 0 と呼ばれる位相応答曲線を描いていた。これらの結果もまた、軟骨細胞の体内時計を理解する目的で ATDC5 細胞を用いる妥当性を支持する結果であった。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Kunimoto T, Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Hosokawa T, Asada M, Oda R, Kubo T, Yagita K. "A PTH-responsive circadian clock operates in ex vivo mouse femur fracture healing site" Sci Rep. 2016 6:22409. (査読有)
2. Hosokawa T, Tsuchiya Y, Okubo N, Kunimoto T, Minami Y, Fujiwara H, Uemura Y, Koike N, Kubo T, Yagita K. "Robust Circadian Rhythm and Parathyroid Hormone-Induced Resetting during Hypertrophic Differentiation in ATDC5 Chondroprogenitor Cells." Acta Histochem Cytochem. 2015 48(6):165-71. (査読有)
3. Mizutani H, Tamagawa-Mineoka R, Minami Y, Yagita K, Katoh N. "Constant light exposure impairs immune tolerance development in mice." J Dermatol Sci. 2017 86(1):63-70. (査読有)

〔学会発表〕(計 8件)

1. Kunimoto T, Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Hosokawa T, Oda R, Kubo T, Yagita K. "Parathyroid hormone entrainable circadian clock functions in the mouse femur fracture healing site" ORS2016 Annual Meeting (ポスター、口頭発表), Disney's Coronado Springs Resort, Orlando, U.S.A. 2016年3月5日 6日
2. Hosokawa T, Tsuchiya Y, Okubo N, Kunimoto T, Minami Y, Fujiwara H, Oda R, Kubo T, Yagita K. "Parathyroid hormone-induced resetting of circadian clock in ATDC5" ORS2016 Annual Meeting (ポスター), Disney's Coronado Springs Resort, Orlando, U.S.A. 2016年3月7日
3. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Kunimoto T, Hosokawa T, Oda R, Kubo T, Yagita K "Temperature is a time cue to cartilages" ORS2016 Annual Meeting (ポスター), Disney's Coronado Springs Resort, Orlando, U.S.A. 2016年3月7日
4. Kunimoto T, Minami Y, Okubo N, Fujiwara H, Hosokawa T, Oda R, Kubo T, Yagita K. "Visualization of the circadian clock in skeletal bones obtained from neonatal Per2::Luc mice using bioluminescence macro-imaging device", ORS 2017 Annual Meeting (ポスター), San Diego Convention Center, San Diego, U.S.A. 2017年3月20日

5. Hosokawa T, Tsuchiya Y, Okubo N, Kunimoto T, Minami Y, Fujiwara H, Oda R, Kubo T, Yagita K. "Phase shift of the circadian clock by heat stimulation in MC3T3-E1", ORS 2017 Annual Meeting(ポスター), San Diego Convention Center, San Diego, U.S.A. 2017年3月20日
6. 南陽一, 國本達哉, 大久保直輝, 細川俊浩, 井之川仁, 久保俊一, 八木田和弘
「マウス大腿骨骨折治癒過程で観察される時計遺伝子の概日振動は PTH によって位相変位する」 第 23 回日本時間生物学会学術大会(ポスター), 名古屋市, 名古屋大学豊田講堂, 2016年11月12日-13日
7. 國本達哉, 大久保直輝, 南陽一, 藤原浩芳, 細川俊浩, 小田 良, 久保俊一, 八木田和弘
「マウス大腿骨器官培養系を用いた治癒過程の骨折部における体内時計の観察」 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会(ポスター), 福岡市, 福岡国際会議場, 2016年10月13日
8. 細川俊浩, 土谷佳樹, 國本達哉, 大久保直輝, 南陽一, 藤原浩芳, 小田 良, 久保俊一, 八木田和弘
「骨芽細胞における体内時計と温熱刺激の関係」 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会(ポスター), 福岡市, 福岡国際会議場, 2016年10月13日

〔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:
出願年月日:
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

南 陽一 (Yoichi Minami)

京都府立医科大学大学院医学研究科・運動
器時間制御学講座・助教

研究者番号：40415310