

令和元年6月28日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08518

研究課題名(和文) プロエイジング因子 2ミクログロブリンを介した体内時計機能の加齢変化の解明研究

研究課題名(英文) The mechanism of the aging-associated alternation of the circadian clock via a systemic pro-aging factor, beta2-microglobulin

研究代表者

守屋 孝洋 (Moriya, Takahiro)

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：80298207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢は体内時計の働きに影響を与え、睡眠の断片化などをもたらすことが知られている。本研究では、主要組織適合遺伝子複合体MHC 1の構成因子であるbeta 2ミクログロブリンが体内時計の加齢変化に関与している可能性を検討した。beta 2ミクログロブリンを外来的に投与すると、加齢に伴う変化と同様に体内時計のリズム周期が延長し、その背景には中枢時計の視交叉上核におけるアルギニンバソプレシン神経細胞やアストロサイトの存在密度の低下があることが明らかになった。本研究により体内時計の加齢変化が末梢由来のプロエイジング因子によってもたらされていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢は様々な生理機能を同時多発的に変化させる性質をもつこともあり、加齢に伴う生理機能の変化を現象論的に解析せざるを得ない状況にあった。体内時計研究においても、加齢に伴う行動リズムの異常や、視交叉上核の神経ネットワーク障害など、大変意義深い研究成果が報告されているにも関わらず、その誘発因子の同定には至っていない。本研究では、すでに加齢血漿中で増加することが知られているbeta2-ミクログロブリンに着目し、体内時計機能の加齢変化の誘発因子としての可能性を検証し、これを明らかにした。さらに研究が進展すれば、加齢に伴う生体リズム障害の新しい診断方法や治療薬の開発にも貢献できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is well known that the function of the mammalian circadian clock is altered by aging. In this study, we investigated whether a systemic pro-aging factor, beta2-microglobulin is involved in aging-associated alternation of the circadian clock function in mice. We found that the administration of beta2-microglobulin induced the elongation of the period in the free-running rhythm of clock gene expression in the cultured suprachiasmatic nucleus. It also reduced the density of arginin-positive neurons and astrocytes in the suprachiasmatic nucleus. These results suggest that a systemic pro-aging factor, beta2-microglobulin is involved in aging-associated alternation of the circadian clock function in mice.

研究分野：薬理学

キーワード：老化 体内時計 視交叉上核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 睡眠覚醒やホルモン分泌リズム等、生体の多くの生理機能には 24 時間周期の日内リズムが観察され、これらは体内時計によって制御される。哺乳類では、視床下部の視交叉上核が中枢時計として働き、時刻シグナルを全身に伝達して、その他の組織に存在する末梢時計の位相を制御することによって内的に同調された生体リズムを生みだしている。一方、加齢は認知機能や空間学習能力等の脳機能の低下をもたらすだけでなく、日内リズムを司る体内時計の働きを変化させることが知られている (Arellanes-Licea et al., Aging Dis. 2014, PMID 25489492)。ヒトにおいて、加齢は、深部体温やメラトニン・コルチゾール等のホルモン分泌のリズム振幅の低下や、起床時刻の前進をもたらす、さらに睡眠の断片化や夜間せん妄を引き起こして睡眠の質や量を低下させるだけでなく、睡眠覚醒リズムに異常をもたらす (Kondratova et al., Nat Rev Neurosci. 2012, PMID 22395806)。また、マウスやラット等のモデル動物を用いた研究により、加齢は深部体温リズム等の生理リズムの振幅低下だけでなく、恒常暗条件下における自発行動リズムの周期を変化させたり、外界の明暗環境に対する光同調の程度を低下させることが明らかにされている (Asai et al., J Neurosci Res. 2001, PMID11746446)。さらに最近、時計遺伝子発現レポーター活性のイメージング技術を用いた研究により、加齢は恒常暗条件下における視交叉上核ニューロン間のリズム位相協調を低下させることが報告され、加齢の作用点は視交叉上核のニューロン間の神経連絡にあることが明らかにされた (Nakamura et al., eNeuro. 2015, PMID26464)。また、時計遺伝子の転写翻訳の 24 時間ループの形成に重要な NAD⁺依存性タンパク質脱アセチル化酵素 SIRT1 の視交叉上核内レベルが加齢に伴い低下し、これが視交叉上核リズムや行動リズムの加齢変化の起因因子であることが明らかにされている (Chang & Guarente, Cell. 2013, PMID23791176)。このように時計遺伝子発現レポーターの開発とそれを利用したレポーター活性のイメージング技術の発展により、加齢に伴う体内時計の機能変化における分子機序はその詳細が明らかにされつつあるが、しかしながら未だに、視交叉上核の時計機能の加齢変化をもたらす誘発因子が何なのかという根本的な課題については全く解決されていない。

(2) 前述したように加齢は体内時計の機能変化だけでなく、認知機能等の高次脳機能の低下をもたらすことが知られているが、最近、Smith らは、加齢に伴い末梢循環血液中に上昇する液性因子のスクリーニングを行い、主要組織適合遺伝子複合体 MHC I の構成タンパク質である β 2 ミクログロブリンが加齢マウス血中で上昇し、海馬依存性認知機能や海馬歯状回ニューロン新生の加齢に伴う低下の原因物質であることを遺伝子欠損マウスを用いて明らかにした (Smith et al., Nature Medicine. 2015, PMID26147761)。 β 2 ミクログロブリンは分子量 11,800 の単鎖ポリペプチドであり、末梢循環血液中から脳に移行することが知られているため、我々は加齢に伴い増加した β 2 ミクログロブリンが視交叉上核にも作用し、時計遺伝子の発現振動に影響を及ぼして体内時計の加齢変化をもたらす原因物質なのではないかと考えるに至った。すなわち、海馬機能のプロエイジング因子として見出された β 2 ミクログロブリンが視交叉上核の時計機能の加齢変化をもたらす誘発因子である可能性が示唆された。この仮説を証明するためには、視交叉上核の時計遺伝子の発現振動に対する β 2 ミクログロブリンの作用をより詳細に解析することに加え、個体レベルでの β 2 ミクログロブリンの作用を検討し、さらに β 2 ミクログロブリンがどのような機序で体内時計の機能変化をもたらすのかを明らかにする必要があると考えるに至った。

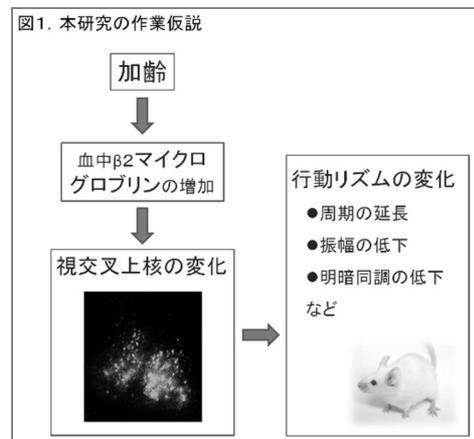
2. 研究の目的

本研究の目的は、 β 2 ミクログロブリンが視床下部・視交叉上核に存在する中枢時計の機能を変化させる機序を明らかにし、体内時計の働きにおける加齢変化に寄与している可能性を検討することである (図 1)。この目的を達成するために次の項目について検討を行う。

- (1) β 2 ミクログロブリン投与が若齢マウス視交叉上核の体内時計の機能に与える影響を解析する。
- (2) β 2 ミクログロブリンの発現レベルに対する加齢および時計遺伝子変異の影響を解析する。
- (3) β 2 ミクログロブリンによる体内時計機能変化の分子機序を解明する。
- (4) β 2 ミクログロブリン遺伝子欠損マウスを用い、末梢循環血液中の β 2 ミクログロブリンが本当に加齢に伴う体内時計の機能変化の誘発因子であるかどうかを直接的に証明する。

3. 研究の方法

(1) β 2 ミクログロブリン投与が若齢マウス視交叉上核の体内時計の機能に与える影響の解析:すでに予備的実験により観察されている β 2 ミクログロブリンによる若齢マウス視交叉上核スライス培養の時計遺伝子-ルシフェラーゼ発光リズムのリズム周期の延長作用や減衰係数増加



作用について濃度依存性などの詳細を発光センサーPMT を用いて解析するとともに、高感度 CCD カメラを用いた発光イメージングにより視交叉上核ニューロンレベルでの 2 ミクログロブリンの作用を明らかにする。また、マウス個体レベルの評価として、2 ミクログロブリンの脳室内持続投与が若齢マウス輪回し行動リズムにおけるリズム周期や明暗再同調などのリズムパラメーターに対する作用を解析し、加齢マウスとの類似性を検討する。

(2) 2 ミクログロブリンの発現レベルに対する加齢および時計遺伝子変異の影響の解析：加齢に伴う視交叉上核の 2 ミクログロブリン発現の増加について、3 および 24 ヶ月齢に加え、6、12、18 ヶ月齢も解析する。また、この発現増加が末梢血液由来なのか、それとも視交叉上核自身の遺伝子発現変化に起因するのかを明らかにするために 2 ミクログロブリンの mRNA 発現に対する加齢の影響を検討する。また、時計遺伝子の変異は加齢を促進することが報告されているため、Clock 変異マウスや Bmal1 ノックアウトマウスを用い、血漿中および視交叉上核における 2 ミクログロブリンの発現レベルを野生型マウスと比較検討する。

(3) 2 ミクログロブリンによる体内時計機能変化の分子機序の解明：2 ミクログロブリンは主要組織適合遺伝子複合体 MHC I の構成因子であるため、体内時計に対する作用に MHC I が必要なかどうかを Tap1 ノックダウン法を用いて検討する。さらに、既に報告されている視交叉上核の加齢変化 (AVP 陽性細胞密度など) に与える 2 ミクログロブリンの作用を検討する。

(4) 2 ミクログロブリン遺伝子欠損マウスを用いた検討：末梢循環血液中の 2 ミクログロブリンが本当に加齢に伴う体内時計の機能変化の誘発因子であるかどうかを直接的に証明するためには、2 ミクログロブリン遺伝子欠損マウスにおいて加齢に伴う体内時計機能の諸変化が見られなくなることを検討しなければならない。そこで、2 ミクログロブリン遺伝子欠損マウスの加齢マウスを準備し、輪回し行動リズムや視交叉上核における時計遺伝子の発現リズム (in situ hybridization) を野生型マウスと比較検討する。

4. 研究成果

まず、2 ミクログロブリン投与が若齢マウス視交叉上核の時計遺伝子発現リズムおよび若齢マウス輪回し行動リズムに与える影響の解析と、2 ミクログロブリンの発現レベルに対する加齢および時計遺伝子変異の影響の解析を行った。その結果、2 ミクログロブリン添加 (3-10 $\mu\text{g/mL}$) は濃度依存的に若齢 (3 ヶ月齢) PER2::LUC ノックインマウスより培養した視交叉上核スライスの発光リズム周期を長くすることが明らかになった。一方、高感度 CCD カメラを用いた発光イメージング解析では、2 ミクログロブリン添加 (3-10 $\mu\text{g/mL}$) は濃度依存的に細胞間の発光リズム位相の同期を低下させることが観察された。したがって、2 ミクログロブリンは視交叉上核の細胞時計間の同期性を低下させることによってリズム周期に影響をもたらしていることが明確になった。一方、視交叉上核の内因性 2 ミクログロブリンのタンパク質レベルは加齢に伴う血中濃度の増加の二次的影響であることが明らかになった。また、マウス個体を用いた研究により、比較的高用量の 2 ミクログロブリンの脳室内投与が若齢マウスの行動リズムの周期長を延長させるとともに、行動の断片化を引き起こすなど、加齢マウスの類似パターンを示すことを明らかにした。このように外来的に投与した 2 ミクログロブリンは in vitro および in vivo の両実験系において体内時計機能の加齢変化と類似した変化をもたらすことが明らかになった。次に加齢変化に本当に 2 ミクログロブリンが寄与しているかどうかを明らかにするために MHC I の構成因子である Tap1 のノックダウンの影響を検討したところ、2 ミクログロブリンによるリズム周期の延長作用を抑制することが観察され、2 ミクログロブリンが細胞内に取りこまれた後に MHC I と会合し、Tap1 依存的に細胞膜表面に輸送されることが、リズム周期延長作用に必要なことが明らかになった。最後に、2 ミクログロブリン慢性投与後の若齢マウスの視交叉上核を免疫染色によって検討したところ、先に観察されたアルギニンバソプレシン陽性細胞の密度低下のほかに時計ニューロン間のリズム位相同期作用を担うアストロサイトの細胞密度の低下が観察された。このモデル細胞での Tap1 ノックダウンの実験条件の検討に時間を要したため、2 ミクログロブリン遺伝子欠損マウスの解析は当該年度中に解析を終了できなかった。

<引用文献> Kondratova AA, Kondratov RV. The circadian clock and pathology of the ageing brain, Nat Rev Neurosci, 13 巻, 2012, 325 - 335

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Segawa Ryosuke, Shiraki Mika, Sudo Shiori, Shigeeda Kenichi, Saito Taiji, Mizuno Natsumi, Moriya Takahiro, Yonezawa Takayuki, Woo Je-Tae, Hiratsuka Masahiro, Hirasawa Noriyasu, A chalcone derivative suppresses the induction of TSLP in mice and human keratinocytes and attenuates OVA-induced antibody production in mice, Eur J Pharmacol, 査読有, 851 巻, 2019, 52 - 62
doi: 10.1016/j.ejphar.2019.02.007.

Weng Yan, Wang Jingwen, Yang Zhifu, Xi Miaomiao, Duan Jialin, Guo Chao, Yin Ying, Segawa Ryosuke, Moriya Takahiro, Yonezawa Takayuki, Cha Byung Yoon, Woo Je-Tae, Wen

Aidong, Hirasawa Noriyasu, A steroid alkaloid derivative O2F04 upregulates thymic stromal lymphopoietin expression slowly and continuously through a novel Gq/11-ROCK-ERK1/2 signaling pathway in mouse keratinocytes, *Cellular Signalling*, 査読有、57 巻、2019、58 - 64

DOI : 10.1016/j.cellsig.2019.01.005

Asakawa S, Onodera R, Kasai K, Kishimoto Y, Sato T, Segawa R, Mizuno N, Ogasawara K, Moriya T, Hiratsuka M, Hirasawa N, Nickel ions bind to HSP90 and enhance HIF-1 mediated IL-8 expression, *Toxicology*, 査読有、395 巻、2018、45 - 53

DOI: 10.1016/j.tox.2018.01.006.

Segawa R, Shigeeda K, Hatayama T, Dong J, Mizuno N, Moriya T, Hiratsuka M, Hirasawa N, EGFR transactivation is involved in TNF- α -induced expression of thymic stromal lymphopoietin in human keratinocyte cell line, *J Dermatol Sci*, 査読有、89 巻、2018、290 - 298

doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.12.008.

Weng Y, Mizuno N, Dong J, Segawa R, Yonezawa T, Cha BY, Woo JT, Moriya T, Hiratsuka M, Hirasawa N, Induction of thymic stromal lymphopoietin by a steroid alkaloid derivative in mouse keratinocytes, *Int Immunopharmacol*, 査読有、55 巻、2018、28 - 37

10.1016/j.intimp.2017.11.045

Mogi A, Yomoda R, Kimura S, Tsushima C, Takouda J, Sawauchi M, Maekawa T, Ohta H, Nishino S, Kurita M, Mano N, Osumi N, Moriya T, Entrainment of the circadian clock in neural stem cells by epidermal growth factor is closely associated with ERK1/2-mediated induction of multiple clock-related genes, *Neuroscience*, 査読有、379 巻、2018、45 - 66

10.1016/j.neuroscience.2018.02.045.

Mizuno N, Abe K, Morishita Y, Yamashita S, Segawa R, Dong J, Moriya T, Hiratsuka M, Hirasawa N, Pentanoic acid induces thymic stromal lymphopoietin production through Gq/11 and Rho-associated protein kinase signaling pathway in keratinocyte, *Int Immunopharmacol*, 査読有、50 巻、2017、216 - 223

10.1016/j.intimp.2017.06.024.

Okuda-Tanino A, Sugawara D, Tashiro T, Iwashita M, Obara Y, Moriya T, Tsushima C, Saigusa D, Tomioka Y, Ishii K, Nakahata N, Licochalcones extracted from *Glycyrrhiza inflata* inhibit platelet aggregation accompanied by inhibition of COX-1 activity, *PLoS One*, 査読有、12 巻、2017、e0173628

DOI: 10.1371

Kurita M, Moriya T, Nishino S, Hirata E, Hirasawa N, Okubo Y, Sato T, Non-24-hour sleep-wake syndrome improved by low-dose valproic acid: a case report, *Neuropsychiatr Dis Treat*, 査読有、12 巻、2016、3199 - 3203

DOI: 10.2147

[学会発表](計 10 件)

守屋孝洋、ランチョンセミナー「早起きは三文の徳」は本当か？～体内時計と健康、そしてラクトフェリン～、日本ラクトフェリン学会第 8 回学術集会、2018

守屋孝洋、四方田 亮、蓮岡健太郎、及川茉莉子、高橋信行、平澤典保、中畑則道、ヒハツに高含有されるピペリン類縁物質の 内皮依存性血管弛緩機序の解明、日本薬理学会第 69 回北部会、2018

T. Moriya, T. Kobayashi, H. Kuwata, C. Tsushima, M. Sawauchi, N. Hirasawa, E. Harada, The potentiating action of lactoferrin on the photic entrainment of the circadian clock in mice, 日本薬理学会第 90 回年会、2017

守屋孝洋、がん治療における時間薬物療法の現状と課題、第 11 回東北大学病院がんセミナー(招待講演) 2017

守屋孝洋、マウス体内時計の光リセッティングに対する牛由来ラクトフェリンによる促進作用機序の解析、ifia/HFE2017 セミナー講演・第 5 回日本ラクトフェリン学会セミナー(招待講演) 2017

守屋孝洋、沢内美穂、小林拓美、對馬千沙都、平澤典保、桑田英文、原田悦守、多機能性タンパク質ラクトフェリンによる マウス体内時計の光リセット増強作用機序の解析、日本薬理学会第 68 回北部会、2017

Takahiro Moriya, Miho Sawauchi, Takumi Kobayashi, Chisato Tsushima, Hidefumi Kuwata, Noriyasu Hirasawa, Etsu-mori Harada, The potentiating action of bovine lactoferrin on the light entrainment of the circadian clock in mice, XIIIth International Conference on Lactoferrin (国際学会) 2017

守屋孝洋、佐々木崇志、對馬千沙都、松岡 功、中畑則道、細胞外 ATP レベルの概日リズム形成機序とプリン受容体を介した細胞時計シンクロ機構、Japan Purine Club2016、2016

守屋孝洋、小林拓美、桑田英文、井上莉香、對馬千沙都、沢内美穂、太田英伸、程 肇、平澤典保、原田悦守、マウス体内時計の光同調に対する牛由来ラクトフェリンによる促進作用

機序の解析、日本ラクトフェリン学会第7回学術集会、2016
守屋孝洋、体内時計が生み出す薬物作用の概日リズム、第71回医薬品相互作用研究会シンポジウム(招待講演)、2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seikatsu/mysite1/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 正樹

ローマ字氏名：KOBAYASHI Masaki

所属研究機関名：東北工業大学

部局名：工学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：90332981

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小林 拓美

ローマ字氏名：KOBAYASHI Takumi

(3)研究協力者

研究協力者氏名：茂木 明日香

ローマ字氏名：MOGI Asuka

(4)研究協力者

研究協力者氏名：竹生田 淳

ローマ字氏名：TAKODA Jun

(5)研究協力者

研究協力者氏名：吉田 寛伸

ローマ字氏名：YOSHIDA Nobuhiro

(6)研究協力者

研究協力者氏名：井上 莉香

ローマ字氏名：INOUE Rika

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。