

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19306

研究課題名(和文)リアルタイム生細胞発光モニタリングを用いた体内時計作動薬のテイラーメイド探索

研究課題名(英文)Tailor-made screening of circadian drugs with realtime bioluminescence monitoring.

研究代表者

田宮 寛之(Tamiya, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70770519

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)：概日リズム睡眠障害は近年社会問題になっています。この研究ではES細胞を用いて、概日リズム睡眠障害を世界で初めて試験管内で再現することに成功しました。また、昼夜逆転発症の分子メカニズムの一端の解明にもつなげることができました。さらに、本実験系は組織分化やヒトiPS細胞への応用も可能なことから、個々人にあった睡眠障害治療薬を探すのに有用と考えられます。また、薬剤探索では、臨床研究で時間調節作用が予想された4種類の漢方薬から、2つの化学物質を発見することができました。これらの薬剤の効能の個人差の評価には、先述のiPS細胞を用いた分化誘導系が有効と考えられます。

研究成果の概要(英文)：Many physiological functions have diurnal variation that follows an approximately 24-hour cycle and is regulated by an endogenous circadian clock. Recently, individual differences in circadian period length have been shown to be associated with circadian disorders. For example, familial advanced sleep phase syndrome (FASPS) is an autosomal dominant disease characterized by a natural tendency to go to sleep and wake up at times considered earlier than normal. In this study, we established a novel circadian disorder model using pluripotent stem cells, first in vitro that recapitulated the period shortening seen in FASPS. Moreover, we found 2 chemical compounds regulating circadian rhythm from Japanese herbal medicine. These systems would be applicable to real-time bioluminescence analysis using patient-derived iPS cells and may also contribute to Tailor-made screening of circadian drugs.

研究分野：老年医学

キーワード：概日リズム睡眠障害 体内時計 テイラーメイド探索 多能性幹細胞 漢方薬 釣藤散

### 1. 研究開始当初の背景

体内時計は、睡眠覚醒リズム、血圧変動、インスリン分泌やコルチゾール分泌といった、さまざまな生理機能の日内変動を支配している。体内時計の機序は細胞内の転写翻訳ループに由来し、我々の個々の細胞が時計を持っている。近年、ヒト皮膚線維芽細胞を培養した際の時計遺伝子発現の概日周期長は、行動リズムの個人差と相関している事が示された。老化との関連も示唆されるが、手術を伴うため、高齢者診療の日常的な検査項目として用いるのは困難である。特に、代表的な疾患として、家族性睡眠相前進症候群 (FASPS) では、体内時計の周期が短くなることで極端な朝型になる。本疾患は比較的容易にモデル化が可能と考えられるが、実際には時計遺伝子の遺伝子特性の影響で難易度が高く、本疾患の体内時計の周期短縮を *in vitro* で再現に成功した報告は存在しなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、ES/iPS 細胞への概日振動レポーターのリポフェクション法とリアルタイム生細胞発光測定を用い、一回の採血のみで非侵襲的かつ簡便に、高齢者個々の体内時計の周期長とその老化による変化を、測定可能な実験系の構築をめざす。このことは、将来的な体内時計作動薬のテイラーメイド探索へ向けた基盤技術となるものである。この第一歩として、ES 細胞を用いて代表的な体内時計疾患である FASPS の *in vitro* でのモデル化と、汎用的な実験系の構築を目指した。また、我々がおこなったビッグデータ研究の結果から概日リズム作用が示唆される薬剤のスクリーニングをおこなうことで、体内時計作動薬の候補薬を同定し、テイラーメイド探索への候補薬を同定することを目指した。

### 3. 研究の方法

先行文献で FASPS の周期変化を検出できていない理由として、Per2 タンパクの特徴、すなわち、発現量が振動していること、また 1 個 1 個の細胞に約 1000 分子という低濃度で入っていること、この 2 つのことが重要ではないかと考えた。正常な概日振動を持つことが確実な細胞へ、外来性の遺伝子を個々の細胞へ少量均一に発現させ、タンパク量を振動させるような実験系の構築が必要と考えられた。以上の困難を克服し、FASPS の試験管内モデル化を達成するため、次のような戦略をとった。

まず Per2 の無い ES 細胞を用意する。そして、全身での発現が担保されているゲノム領域 Rosa26 に Wild type もしくは FASPS の Per2 遺伝子と Luciferase 遺伝子をゲノム編集により 1 コピーだけ正確にノックインする。ES 細胞は時計を持っていないが、分化誘導することで、概日振動が

出現することが知られている (Yagita, PNAS 2010) ため、培養細胞レベルで FASPS の周期短縮を検出できると考えられた。

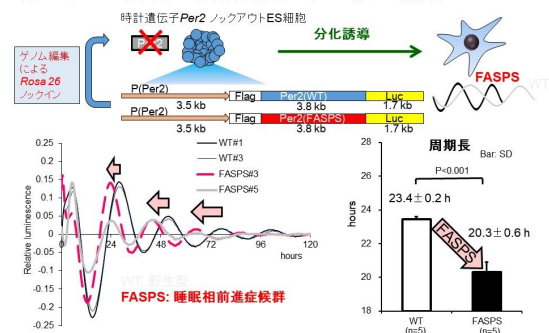
上記のような Per2 ノックアウトレスキュー系を達成するために、開発が必要となる要素技術としては、

- 1) 周期長を精密に検出できる ES 分化誘導系
- 2) Rosa26 に 1 コピーだけ正確に導入できるような Per2 ノックアウトレスキュー系の 2 つである。代表者これら 2 つの要素技術の開発に成功し、FASPS の *in vitro* モデル化を試みた。

### 4. 研究成果

本研究では、まずマウス ES 細胞のゲノム改変と分化誘導、そしてリアルタイム生細胞発光モニタリングを用いた実験系の開発に成功し、FASPS の周期短縮を世界で初めて細胞レベルで再現する事に成功した。

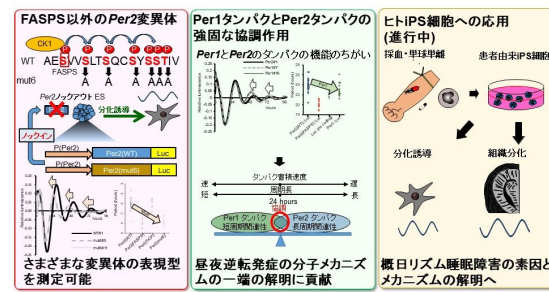
#### 概日リズム障害の試験管内モデル系の構築



(Tamiya H et al., Sci Rep 2016)  
FASPSの周期短縮を世界で初めて試験管内で再現することに成功

また、本実験系は汎用性が高いことが示され、昼夜逆転発症の分子メカニズムの一端の解明にもつなげることができた。さらに、本実験系は組織分化やヒト iPS 細胞への用も可能なことから、体内時計作動薬・睡眠障害治療薬のテイラーメイド探索への応用が期待される。(Tamiya Sci Rep 2016, Nature Japan おすすめのコンテンツ, ISSCR (国際幹細胞学会) Merit Award, Travel Award, 日本時間生物学会優秀ポスター賞)

#### 概日リズム睡眠障害 *in vitro* モデル系の汎用性



#### 概日リズム睡眠障害の全貌の解明へ向けた発展性の示唆

(Tamiya, Sci Rep 2016, Nature Japan おすすめのコンテンツ)

また、探索では、代表者らが行った臨床ビッグデータ研究 (Tamiya, PLoS ONE 2015) で時間調節作用が予想された 4 種類の漢方に

つき、ヒト培養細胞を用いて鈎藤散に時計作用があることを同定した。さらに構成9方剤の中から時計作用のある生薬を同定した。また、薬学部との共同研究において、この生薬の酢酸エチル分画に作用成分があることを同定し、さらにクロマトグラフィーを用いた Activity guided separation を繰り返すことにより、2種類のセスキテルペンを同定した。これらの成分の効能の個人差の評価には、先述の iPS 細胞を用いた分化誘導系が有効と考えられる。

以上のようにリアルタイム生細胞発光モニタリングを用いた体内時計作動薬のテイラーメイド探索の基盤技術の開発と、その候補薬の同定に成功した。

#### 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) Tamiya H, Ogawa S, Ouchi Y, Akishita M. Rigid Cooperation of Per1 and Per2 proteins. Sci Rep (Nature Publishing Group) 6, 32769 p1-15
- (2) 田宮寛之. (8)老年病疾患 老年疾患進展における概日リズム障害のモデル化. 冲中記念成人病研究所年報 43:85-86;2017 [学会発表](計 12 件)
  - (1) 田宮寛之, 小川純人, 大内尉義, 秋下雅弘. 時計遺伝子 Per1 と Per2 の協調性と概日リズム障害との関連性の検討. 第 58 回日本老年医学会学術集会 0-60 金沢: ANA クラウンプラザホテル金沢 2016-06-08
  - (2) 田宮寛之, 小川純人, 大内尉義, 秋下雅弘. 新規実験系による Per1 蛋白と Per2 蛋白の協調性の解明. 2017 (優秀ポスター賞) 第 23 回日本時間生物学会学術大会 P062 名古屋: 豊田講堂 2016-11-11 - 2016-11-13
  - (3) 田宮寛之. 多能性幹細胞を用いた概日リズム睡眠障害の新たなモデル系の構築 CiRA セミナー 京都: iPS 細胞研究所 2016-12-28
  - (4) 田宮寛之, 小川純人, 大内尉義, 秋下雅弘. 幹細胞を用いたヒト概日リズム障害の in vitro モデル化と新たな実験系の構築. 第 16 回日本再生医療学会総会 仙台: 国際センター 2017-03-09
  - (5) Tamiya H, Ogawa S, Ouchi Y, Akishita M. Establishment of a novel circadian disorder model using pluripotent stem cells. CDB Symposium 2017 "Towards Understanding Human Development, Heredity, and Evolution" 神戸: 理化学研究所多細胞システム研究センター 2017-03-27 - 2017-03-29
  - (6) Tamiya H, Ogawa S, Ouchi Y, Akishita M. Establishment of a novel circadian

disorder model using pluripotent stem cells. 多能性幹細胞を用いた概日リズム睡眠障害の新規モデル系の構築. 第 17 回東京大学生命科学シンポジウム(東京・安田講堂) P-116.

- (7) (Keystone Symposia E2 Scholarship) Tamiya H, Ogawa S, Ouchi Y, Akishita M. Novel circadian disorder model revealed the rigid cooperation of Per1 and Per2 proteins. Keystone Symposium on Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease, Poster 3035. May 2017 (Yokohama, Japan) 2017-5
- (8) Tamiya H, Ogawa S, Ouchi Y, Akishita M. Establishment of novel circadian rhythm sleep disorder model using pluripotent stem cells. P-39. 第 15 回幹細胞シンポジウム: (東京・伊藤国際学術センター) 2017 田宮寛之. 多能性幹細胞を用いた概日リズム睡眠障害の新規モデル系の構築. 演題 2. 第 6 回幹細胞若手の会(つくしの会)(東京・伊藤国際学術研究センター) 2017
- (9) 田宮寛之. 概日リズム睡眠障害の試験管内モデル系の構築~ES/iPS 細胞を用いた体内時計研究と老年疾患への応用~. 臨床研究者育成プログラム Geriatric/General Medicine Research Course 2017 年 6 月 9 日(東京・東大病院大会議室)
- (10) (ISSCR Abstract merit Award, Travel Award, 池田理化賞トラベルグラント) Tamiya H, Ogawa S, Ouchi Y, Akishita M. Novel circadian rhythm sleep disorder model using pluripotent stem cells. 2017 ISSCR (国際幹細胞学会) Annual Meeting, W-2106. (Boston, USA)
- (11) 田宮寛之. 認知症高齢者における眠剤別転倒・骨折リスクの検討 シンポジウム 9「睡眠障害と骨折リスク」第 19 回日本骨粗鬆症学会 2017 年 10 月 21 日(大阪国際会議場)(招待講演)
- (12) (Invited Seminar) Tamiya H. Establishment of novel circadian disorder model using pluripotent stem cells. Seminar, IMBA (オーストリアバイオテック研究所), Vienna, Austria (招待講演) 2017.

[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  
Per1 タンパク質と Per2 タンパク質の強固な協調作用 Nature Japan おすすめのコンテンツ

<http://www.natureasia.com/ja-jp/srep/abstracts/80670>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田宮 寛之 (TAMIYA, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号： 70770519