

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20627

研究課題名(和文) FRETイメージングで見る炎症の時刻依存性とその制御

研究課題名(英文) Time-dependent change of cellular inflammation-related response

研究代表者

西出 真也(Nishide, Shinya)

北海道医療大学・リハビリテーション科学部・講師

研究者番号：40451398

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)：夜型の生活習慣など生活リズムの乱れが炎症に及ぼす影響を検討することを将来的な目標とし、炎症マーカー分子の活性をFRETバイオセンサーにて定量した。FRETとは2種の蛍光タンパク質が近接した際に起こる分子間のエネルギー移動現象であり、炎症マーカーの活性化を検出できるように設計されたバイオセンサーを作製し細胞に発現させた。その結果、炎症マーカーの炎症惹起物質への反応には時刻依存性があることが示された。この時刻依存性は時計遺伝子を欠失した概日リズムを示さない細胞にはみられなかった。本研究結果より炎症反応は時刻依存的に変化し、時計遺伝子リズムが反応性リズムに影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythms are crucial factors in the regulation of a wide range of physiological processes including inflammation. Inflammatory responses to bacterial infection are higher during daytime in some organs in nocturnal rodents (nighttime in human), and such daily variations seem to be controlled by clock genes. However, the molecular link between clock genes and rhythms in inflammation remains to be elucidated. We analyzed intracellular activity of inflammatory markers using fluorescence microscopy with biosensors based on the principle of FRET. FRET is an energy transfer phenomenon between two different fluorescent proteins. We used biosensors which respond to inflammation and change their emitting wavelength. Reaction of biosensors to inflammatory agents displayed time dependency. Cells lacking a clock gene also responded to the drugs, but the response was not in a time independent manner. We hereby unveiled the clock gene-mediated circadian rhythms in inflammatory response.

研究分野：生理学

キーワード：概日リズム 蛍光イメージング 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

近年社会の24時間化が進み、コンビニエンスストアや飲食店等を昼夜を問わず利用できるようになった。これにより我々の生活は便利になったが、一方で睡眠障害等のリズム障害が増加している。生活習慣病発症と朝型・夜型傾向との相関が指摘されており (Roenneberg, *Curr Biol*, 2012 他)、時間医学の考え方が広まってきている。我々はこれまでに、夕食・就寝時刻が遅い子はう蝕発症リスクが高いこと、口腔内のミュータンスレンサ球菌数は時刻依存的に変動していることを示し、口腔疾患には発症・進行しやすい時間帯があると考えている。

多くの生理機能はサーカディアンリズムを示す。その中枢は視床下部に存在するが、細胞にリズムを作る時計遺伝子の振動は全身の組織において観察され (Nishide, *Am J Physiol*, 2014; Nishide, *Genes Cells*, 2006)、午後に最大になる唾液分泌量など、必要な時刻にその機能が発揮されるよう制御されている (Dawes, *J Physiol*, 1972; Furukawa, *J Dent Res*, 2005)。

炎症のリズムは、好中球のリズム等により形成され (Gibbs, *Nat Med*, 2014 他)、夜行性マウスの炎症反応は昼間 (ヒトでは夜間に相当) に大きい (Bellet, *PNAS*, 2013)。このことから申請者は歯髄炎や歯肉炎等の罹患・進行にも時刻依存性があり、サーカディアンリズムにより適切に炎症制御が行われているのではないかと着想した。

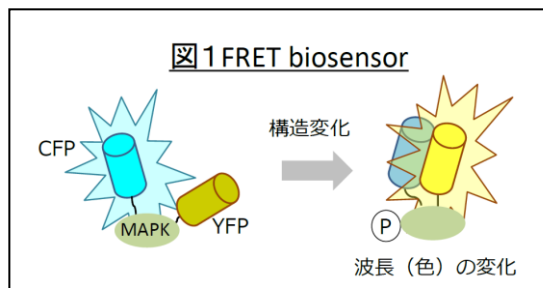
### 2. 研究の目的

上記の知見から歯髄炎にも一日のうち罹患・進行しやすい時間帯があると考えられる。生活歯髄切断や覆髄、充填後に歯髄炎を発症すると根管治療が必要になるが、昼行性であるヒトでは炎症反応は夜間に強いことが予想され、歯科治療はできるだけ昼間に行うべきではないかと研究代表者は考えた。本研究は夜間の歯科診療が生活の夜型化を招くのみならず、歯髄組織に直接的な為害作用をもたらす可能性を検討するために行った。

### 3. 研究の方法

まず生きた細胞の概日リズムを可視化するバイオセンサーを作製した。核内でヘテロ二量体形成し転写因子として働く時計遺伝子 Bmal1 および Clock にそれぞれ蛍光タンパク質 Venus および SECFP を融合させたバイオセンサーを作製した。このバイオセンサーにより生きた細胞内における局在を可視化でき、異なる2種の蛍光タンパク質が近接した際に起こるエネルギー移動、FRET (Förster resonance energy transfer, 図1) を利用して Bmal1 と Clock の二量体形成のタイミン

グを解析した。



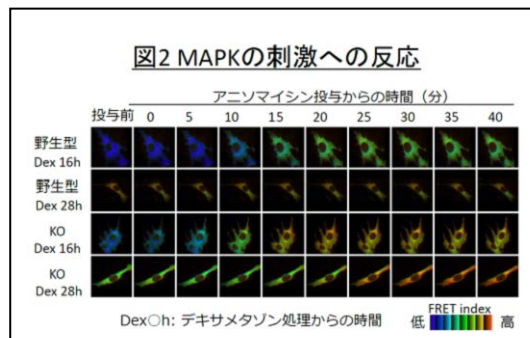
時計遺伝子 Rev-erb $\alpha$  発現を蛍光タンパク質でモニターするバイオセンサー (University of Geneva, Prof. U. Schibler より供与) を用いて細胞の概日リズムを確認した。Rev-erb $\alpha$  は生体内で昼に発現が上昇する遺伝子であるため、このセンサーは細胞内の時刻情報を得る「時計の針」として利用することができる。

MAPK ファミリー分子である ERK1, JNK1 の活性化ドメイン配列を改良型 FRET システム (京都大学・松田道行先生より供与) に組替えたバイオセンサーを作製した。このセンサーにより MAPK 活性を高感度で検出できる

次に細胞の炎症反応にリズムがあることを証明するため、作製した MAPK バイオセンサーをマウス線維芽細胞に電気穿孔法にて導入した。細胞を通常法に従いデキサメタゾンによりリズム同調させ、炎症刺激を模倣した刺激を時刻を変えて行った。

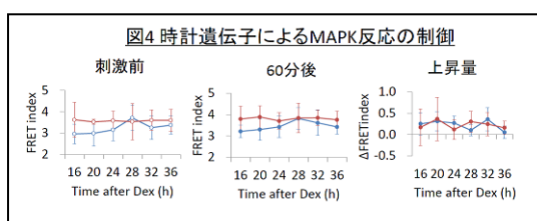
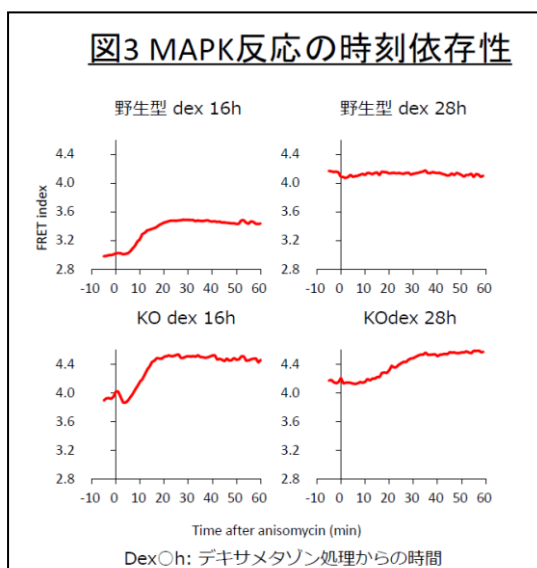
### 4. 研究成果

始めに MAPK の活性化を起こすことが知られているアニソマイシンを培地に投与し、MAPK バイオセンサーの評価を行うとともに反応の時刻依存性を調べた (図2)。MAPK バイオセンサーを野生型の細胞および時計遺伝子 Bmal1 のノックアウト細胞 (以下 KO 細胞) にそれぞれ導入し、時計遺伝子欠損の影響を合わせて検討した。この KO 細胞はサーカディアンリズムを示さないことを生物発光測定によるリズム計測実験で確認している。

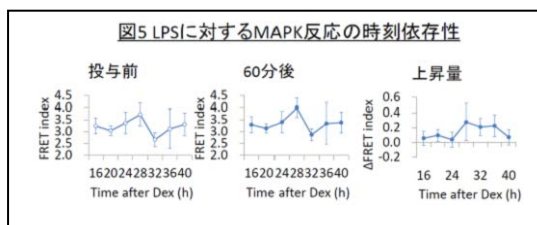


アニソマイシン投与により野生型、KO ともに細胞の MAPK 活性が上昇した (図3)。野生型が時刻依存的に活性上昇量に変化したのに対し、KO は時刻依存性を示さず、どの時刻に

投与しても上昇量は一定だった (図4)。



次に炎症刺激を模倣するため、細菌のない毒素 LPS を刺激薬剤として同様に培地に投与し、MAPK 反応およびその時刻依存性を検討した (図5)。その結果、MAPK は LPS に対しても時刻依存性の活性上昇を示した。



時計遺伝子発現を生物発光によりモニターできる細胞を用いて LPS 投与が細胞のサーカディアンリズムに対する影響を検討したところ、LPS は時刻依存的に時計遺伝子リズムを変位させた。

以上より細菌等が放出する起炎物質に対し MAPK は時刻依存的に反応し、引き続いて時刻依存的な炎症反応が起こることが示唆された。また、この起炎物質は細胞のサーカディアンリズム自体にも影響を与えることが示唆された。

本研究結果から、生体には炎症が起こりやすい時間帯と起こりにくい時間帯があることが裏付けられ、時刻依存性には MAPK の反応性リズムが関与していることが考えられた。このことから研究代表者は炎症を誘発する歯科治療、例えば根管治療や小児の断髄処置を行う際は治療の時間帯も考慮すべきであ

ると考える。

## 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3件)

1. Fujioka Y, Nishide S, Ose T, Suzuki T, Kato I, Fukuhara H, Fujioka M, Horiuchi K, Satoh AO, Nepal P, Kashiwagi S, Wang J, Horiguchi M, Sato Y, Paudel S, Nanbo A, Miyazaki T, Hasegawa H, Maenaka K, Ohba Y. A Sialylated Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Binds Hemagglutinin and Mediates Influenza A Virus Entry into Mammalian Cells. *Cell Host Microbe*, 2018, in press.
2. Nanbo A, Maruyama J, Imai M, Ujje M, Fujioka Y, Nishide S, Takada A, Ohba Y, Kawaoka Y. Ebola virus requires a host scramblase for externalization of phosphatidylserine on the surface of viral particles. *PLoS Pathog*, 14, e1006848, 2018.
3. Horiguchi M, Fujioka M, Kondo T, Fujioka Y, Li X, Horiuchi K, Satoh AO, Nepal P, Nishide S, Nanbo A, Teshima T, Ohba Y. Improved FRET biosensor for the measurement of BCR-ABL activity in chronic myeloid leukemia cells. *Cell Struct Funct*, 42, 15-26, 2017.

[学会発表] (計9件)

1. 西出真也. サーカディアンリズムを考慮した口腔疾患予防. 北海道医療大学歯学会特別講演会、9月21日、北海道医療大学、北海道当別町、2017。(招待講演)
2. Nishide S. Profiling of time-dependency of inflammation by FRET imaging. 第59回歯科基礎医学会学術大会 9月16~18日 松本歯科大学、長野県塩尻市、2017.
3. 西出真也、藤岡容一朗、堀内浩水、佐藤 綯、ネパール プラバ、柏木彩花、王婧、吉田藍子、パウデルサラド、南保明日香、大場雄介. FRET イメージングを利用した炎症反応の概日リズム解析. 第97回北海道医学大会生理系分科会 9月2日 北海道医療大学、北海道当別町、2017.
4. 西出真也. 蛍光イメージングを利用した炎症反応の時刻依存性解析. 第55回日本小児歯科学会大会 5月25~26日 西日本総合展示場、北九州市、2017.
5. Nishide S, Fujioka Y, Horiuchi K, Horiguchi M, Satoh AO, Nepal P, Wang J, Nanbo A, Ohba Y. Fluorescence bioimaging of intracellular dynamics between BMAL1 and CLOCK. 第22回日本時間生物学会 11月12~13日 名古屋大学、名古屋市、2016.
6. Nishide S, Honma S, Honma K. Circadian Bmal1 and Per2 rhythms driven by different

oscillators in the suprachiasmatic nucleus.  
Sapporo Symposium on Biological Rhythm  
2016, Hokkaido University, Sapporo,  
Nov9-10, 2016. (招待講演)

7. Nishide S. Fluorescence bioimaging of intracellular dynamics of the clock proteins. 第58回歯科基礎医学会学術大会 8月25～26日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)、2016.
8. 西出真也. ライブセルイメージングの口腔疾患予防への応用. 第58回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム「若手の口腔生理学研究最前線」 8月24日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)、2016. (招待講演)
9. 西出真也、藤岡容一朗、堀内浩水、堀口美香、佐藤絢、ネパール プラバ、王婧、南保明日香、大場雄介. 蛍光バイオセンサーを用いた時計タンパク質 BMAL1-CLOCKの細胞内動態の解析. 第68回日本細胞生物学会大会 6月15～17日 京都テルサ (京都府・京都市)、2016.

[図書] (計2件)

1. Nishide S, Honma S, Honma K. Circadian Bmal1 and Per2 rhythms driven by different oscillators in the suprachiasmatic nucleus. Honma K and Honma S eds. "Biological Clocks" Hokkaido Univ Press, Sapporo, pp189-194, 2017. (全 201page, ISBN 978-4-8329-0372-2)
2. 西出真也. 光応答と視交叉上核. 日本光生物学協会、光と生命の事典編集委員会 (編)「光と生命の事典」朝倉書店、東京, pp216-217, 2016. (全 422page, ISBN 978-4-254-17161-7)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西出 真也 (NISHIDE, Shinya)

北海道医療大学・リハビリテーション科学部・講師

研究者番号：40451398