

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06262

研究課題名（和文）目を起点とした分子－細胞－個体リズムの統合解析による環境と生体の調和技術の開発

研究課題名（英文）Development of biological rhythm adjustment system through eyes for environmental adaptation by integrated analysis of molecule-cell-whole body focused on eye

研究代表者

大戸 茂弘（Shigehiro, Ohdo）

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：00223884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,500,000円

研究成果の概要（和文）：体内時計は、脳の視交叉上核（suprachiasmatic nucleus；SCN）に存在し、光により24時間周期のリズムが制御されている。近年の24時間化した社会生活により、体内時計が障害され、生体の恒常性維持に支障をきたしている。Drug Aの点眼で、Drug A 受容体を介し、SCNや肝臓の時計遺伝子リズムと行動リズムを制御することに成功した。また、体内時計の同調因子である光に対して、Drug A 受容体は重要な働きを示した。Drug A 受容体を作用点とするDrug A は、中枢のみならず末梢の時計遺伝子発現に影響を及ぼすことから、光の代替として体内時計を操作する手法の開発につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Drug A はDrug A 受容体を介し、時計中枢の時計遺伝子と行動のリズムを制御できた。また、体内時計の同調因子として最も強力とされる光に対して、Drug A 受容体は重要な働きを示した。Drug A 受容体を作用点とするDrug A は、中枢のみならず末梢の時計遺伝子発現に影響を及ぼすことから、Drug A 点眼により生体リズムの位相を操作できる。Drug A 点眼治療を行っている患者は、多く存在しており、Drug A 点眼により体内時計が変化していることが想定される。Drug A 点眼は、社会の多様化により乱れた体内時計を調整し、健康増進に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The SCN (suprachiasmatic nucleus) neurons receive information about light intensity in the environment via direct synaptic connections with the retina, which adapts the phase of SCN oscillator to the photoperiod. The SCN clock then synchronizes overt rhythms in physiology and behavior. Per1 and Per2 transcription is rapidly induced by light in a time-of-day-dependent manner. The responsiveness of Per1 mRNA to light is closely related to behavioral phase delays induced by light. It is well known that not only photic but also nonphotic stimuli can entrain the SCN clock, and Drug A acting on Drug A receptor in retina have been investigated to modulate the circadian rhythm by causing a phase shift in the rhythm in the peripheral or central nervous system. The acute and circadian time-dependent reduction in Per1 and/or Per2 mRNA in SCN and liver by Drug A receptor agonist strongly correlated with phase resetting in response to the drug.

研究分野：薬学およびその関連分野

キーワード：生体リズム 体内時計 時計遺伝子 環境応答 システムバイオロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体の中には体内時計が存在し、睡眠・覚醒のサイクルなど多くの体の機能の24時間サイクルを調整している。また体の環境変化に対する調節を可能にしている。一方で、不規則な睡眠パターンなど生体リズムの乱れは、がん、メタボリックシンドロームなどとも関連して、寿命にも影響を及ぼしている。ヒト社会の24時間化に伴い、スマートデバイスは一人1台の時代で、自宅内でも光を浴びる機会が多くなった。コンビニエンスストア、レストランなどの飲食産業、輸送・流通業務、工場での生産業務、医療従事者、時差を超えたフライト、世界的ネットワーク従事者などのシフトワーカー（準夜勤務、深夜勤務）など、この数十年の間に、夜間の光に暴露される環境が常態化している。近年、これらの夜間の光刺激は睡眠障害の原因として取り上げられ、睡眠難民の言葉も定着しつつある。睡眠障害は、生体リズムの乱れとも関連して、がん、メタボリックシンドロームなどのリスクが上昇し、寿命にも影響を及ぼしている。

近年の高齢化社会を背景に、眼科領域の疾患は急増している。点眼剤の効果や副作用も点眼時刻により異なることが知られている。しかしながら、これらの現象をサポートする機序は明らかにされていない。その一方で人の社会活動の多様化により光は一日中溢れ、生活リズムは乱れている。近年の基礎また臨床研究の結果では、多岐にわたる疾患の発症と体内時計が関連していることが示唆されている。

今後さらに進む高齢化社会において、眼科領域の疾患は一層の増加が予想されている。本研究により、目と疾患の関連が明らかになれば、「目の健康を介した身体の健康増進」も可能となり、社会的波及効果は大きいと考えている。そこで本研究ではBRASTE技術を用い、「目を起点とした分子—細胞—個体リズムを統合的に解析し、環境と生体の調和技術を開発し、種々の疾患を、目から治療・予防する方法を開発する」という挑戦的な研究の構想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、Drug A と Drug A 受容体に着目し、これらの分子と体内時計との関係について検討した。また光刺激による体内時計の同調機構に及ぼす Drug A 点眼の影響について検討した。さらに Drug A 点眼により体内時計を調節する新たな体内時計調整方法の開発を試みた。

3. 研究の方法

実験動物として、明暗周期（明期 7:00-19:00）条件下で飼育した7週齢 C57BL/6j 雄性マウス、時計遺伝子 Per2 遺伝子の下流にルシフェラーゼをノックインした C57BL/6j 雄性マウス (Per2 Luc Knockin mice) および Drug A 受容体欠損した Per2 Luc Knockin C57BL/6j 雄性マウス (Per2 Luc Drug A 受容体欠損 mice) を各実験に用いた。細胞実験には、時計遺伝子 Per2 遺伝子の下流にルシフェラーゼをノックインしたマウス (Per2 Luc Knockin mice) から単離したマウスアストロサイト細胞を用いた。薬物としては、Drug A を原液または希釈して使用した。行動解析は Clock lab を用いて測定した。リアルタイム Bioluminescent 法として、培養細胞は LumiCycle-32/96 を用い経時的に細胞中に発現するルシフェラーゼ活性を測定した。動物は IVIS Spectrum を用い臓器に発現するルシフェラーゼ活性を経時的に測定した。mRNA 発現量はリアルタイム RT-PCR 法により測定した。統計解析としては、分散分析法 (ANOVA)、Tukey-Kramer test また Student's t-test を用い、有意水準 5%以下を有意な差とした。

4. 研究成果

明暗周期サイクルの位相操作時におけるマウスの行動リズムに及ぼす Drug A 受容体の影響：

明暗周期に対応した行動リズムは、哺乳動物では目からの光刺激が脳の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus ; SCN) へ到達し光により時計遺伝子がリセットされることで明暗サイクルに同調した行動リズムが形成される。マウスを行動解析装置に7日間飼育した後に照明を8時間早く ON にして明期を8時間前進させ明暗周期サイクルの変化に対する行動のシフトに及ぼす Drug A 受容体欠損の影響を検討した。その結果、野生型 Wild-type マウス (WT) は新たな明暗周期に同調するまでに約5日間要したが、Drug A 受容体欠損マウスは約10日間要した。

恒暗条件下飼育マウスの行動リズムに及ぼす Drug A 受容体の影響：

恒暗条件下では、生体が本来有する体内の自律的な行動リズムを解析する手法として古くから使用されている。自律的な行動リズムは、哺乳動物では脳の SCN に発現する時計遺伝子の転写翻訳の24時間サイクルにより制御されている。マウスを行動解析装置に7日間飼育した後に照明を8時間早く ON にして明期を8時間前進させた。その後、常に照明を OFF にした恒暗条件下で飼育した際の行動の変化に及ぼす Drug A 受容体欠損の影響を検証した。解析の結果、WT の自律的な行動リズムの周期は平均 23.58 時間であったが、Drug A 受容体欠損マウスは平均 24.04 時間であった。

恒暗条件下飼育マウスの行動リズムに及ぼす Drug A 点眼時刻の影響：

WT マウスを行動解析装置に7日間飼育した後に、常に照明を OFF にした恒暗条件下で飼育した自律的な行動リズムの位相と周期に及ぼす Drug A 点眼時刻の影響を検証した。恒暗条件下飼育 WT マウスに、CT6、CT14、CT22 の時刻に Drug A を点眼し、その後の行動リズムの位相の変化

を測定した結果、CT14、CT22 において行動リズムの位相が後退し、その影響は CT14 において最も強いことが明らかになった。また、各時刻に点眼後の行動リズムの周期を測定した結果、行動リズムの周期には影響を及ぼさないことが明らかになった。

恒暗条件下飼育 Drug A 受容体欠損マウスの行動リズムに及ぼす Drug A 点眼の影響：

CT14 の点眼が最も、行動リズムの位相に影響を及ぼすことが明らかになった。そこで、これらの作用が Drug A 受容体を介して生じているか否かを検討した。上記と同条件で飼育した WT マウスおよび Drug A 受容体欠損マウスに Drug A を CT14 に点眼し、自立的な行動リズムに及ぼす影響を確認した結果、WT マウス行動リズムは Drug A の CT14 点眼により位相が後退したが、Drug A 受容体欠損マウスにおいてはその効果は認められなかった。

Per2 Luc ノックインマウス眼球の Per2 転写リズムに及ぼす Drug A の影響：

Per2 Luc マウスから眼球を摘出し、シャーレに培養し Bioluminescent 法を用いルミサイクルを用いて計測した。Per2 ノックインマウス眼球の Per2 転写リズムに及ぼす Drug A の影響を検討した結果、Per2 遺伝子発現ピーク時およびトラフ時両時刻において、Drug A は Per2 発現リズムを変容させた。

恒暗条件下飼育マウス眼球における時計遺伝子発現リズムに及ぼす Drug A 受容体の影響：

WT または Drug A 受容体欠損マウス眼球の時計遺伝子は、リアルタイム PCR 法を用い測定した。その結果、時計遺伝子 Per2、Cry1 の発現リズムが Drug A 受容体欠損により変化することを明らかにした。Per2、Cry1 は、時計機構の重要な因子であり、その発現量の変化は多様なリズムの変化をもたらす。

恒暗条件下飼育マウス SCN における時計遺伝子発現リズムに及ぼす Drug A 受容体の影響：

WT または Drug A 受容体欠損マウス SCN の時計遺伝子を In situ hybridization 法を用い測定した。その結果、時計遺伝子の Cry1 の発現リズムが変容していることを明らかにした。Cry1 は、時計機構の重要な因子であり、その発現量の変化は多様なリズムの変化をもたらす。

恒暗条件下飼育マウス SCN の時計遺伝子発現に及ぼす Drug A 点眼の影響：

恒暗条件下の行動リズムに及ぼす Drug A 点眼により行動リズムの周期が変容したことから、時計中枢 SCN の時計遺伝子 Per1、Per2 発現量に及ぼす Drug A の影響を検討した。その結果、野生型に Drug A 点眼した結果、SCN の Per1、Per2 の発現量が変容した。その一方で、Drug A 受容体欠損マウスでは Drug A 点眼による影響は認められなかった。Per2、Cry1 は、時計機構の重要な因子であり、その発現量の変化は多様なリズムの変化をもたらす。

恒暗条件下飼育マウス SCN の時計遺伝子発現に及ぼす光刺激および光刺激と Drug A 点眼併用の影響：

光の位相操作に対する行動リズムの変化に Drug A 受容体に影響を及ぼすことが示唆されている。そこで、恒暗条件下飼育マウスに光を照射する条件または Drug A 点眼後に光照射を併用する条件を検討時の時計中枢 SCN の時計遺伝子 Per1、Per2、cfos 発現量に及ぼす Drug A 受容体欠損の影響を検討した。その結果、野生型に光照射した後 1 時間後の SCN における Per1、Per2、cfos の発現量は有意に増加した。その一方で、Drug A 受容体欠損マウスではこれらの遺伝子の発現量の変化は軽微であった。また、Drug A 点眼後に光刺激を行った野生型マウスの SCN の各種遺伝子発現量には有意な変化が認められなかった。また、Drug A 受容体欠損マウスに関しても同様な結果が認められた。光の刺激により SCN の時計遺伝子が発現し体内の時計がリセットされる。野生型マウスでは光刺激で SCN の時計遺伝子の発現量が変化していたことから、過去の報告と同様な光による同調機構が働いていることが示唆された。その一方で、Drug A 受容体欠損マウスでは光刺激後の SCN の時計遺伝子発現量の変化は顕著でなかった。

恒暗条件下飼育マウス肝臓の時計遺伝子 PER2 タンパク質発現量に及ぼす Drug A 受容体の影響：

野生型または Drug A 受容体欠損マウス肝臓の時計遺伝子 PER2 のタンパク質は IN VIVO イメージング装置を用い bioluminescent 法で測定した。その結果、時計遺伝子の PER2 タンパク質の発現リズムに Drug A 受容体は影響を及ぼさないことが明らかとなった。

恒暗条件下飼育マウス肝臓の時計遺伝子発現リズムに及ぼす Drug A 点眼の影響：

恒暗条件下の行動リズムに及ぼす Drug A 点眼により行動リズムの周期、時計中枢 SCN の時計遺伝子 Per1、Per2 発現量の変化が認められた。そこで末梢臓器肝臓を対象に、Drug A 点眼による肝臓の Per1、Per2 の発現量に及ぼす影響を検討した。その結果、野生型に Drug A 点眼した結果、肝臓の Per1、Per2 の発現量が変容した。その一方で、Drug A 受容体欠損マウスでは Drug A 点眼により肝臓の Per1、Per2 発現に変容は認められなかった。

恒暗条件下飼育マウス肝臓の時計遺伝子 PER2 タンパク質発現に及ぼす Drug A 点眼の影響：
恒暗条件下の Drug A 点眼により肝臓の Per2 遺伝子発現量に変容したことから、肝臓の PER2 タンパク質発現に及ぼす Drug A 点眼の影響を In VIVO イメージングを用い測定した。その結果、野生型に Drug A を点眼した結果、肝臓の時計遺伝子 PER2 タンパク質の発現変容が認められた。その一方で、Drug A 受容体欠損マウスにおいてはこれらの変化は認められなかった。

本研究結果より、Drug A は Drug A 受容体を介し、時計中枢の時計遺伝子の発現量および行動に影響を及ぼすことが明らかになった。また、体内時計の同調因子として最も強力とされる光に対して、Drug A 受容体は重要な働きを示すことが示唆された。Drug A 受容体を作用点とする Drug A は、中枢のみならず末梢の時計遺伝子発現に影響を及ぼすことから、Drug A 点眼により生体リズムの位相を操作できるものと思われる。Drug A 点眼治療を行っている患者は、多く存在しており、Drug A 点眼により体内時計が変化していることが想定される。Drug A 点眼は、社会の多様化により乱れた体内時計を調整し、健康増進に貢献できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katamune C, Koyanagi S, Hashikawa KI, Kusunose N, Akamine T, Matsunaga N, Ohdo S	4. 巻 294(2)
2. 論文標題 Mutation of the gene encoding the circadian clock component PERIOD2 in oncogenic cells confers chemoresistance by up-regulating the Aldh3a1 gene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 547-558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.004942. Epub 2018 Nov 14.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura H, Matsunaga N, Kakimoto K, Watanabe M, Tsuruta A, Kusunose N, Shiromizu S, Koyanagi S, Ohdo S	4. 巻 503(2)
2. 論文標題 Epithelial cell adhesion molecule expression in hepatic stem/progenitor cells is controlled by the molecular clock system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1063-1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.06.117. Epub 2018 Jun 30.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsurudome Y, Koyanagi S, Kanemitsu T, Katamune C, Oda M, Kanado Y, Kato M, Morita A, Tahara Y, Matsunaga N, Shibata S, Ohdo S	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Circadian clock component PERIOD2 regulates diurnal expression of Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor-1 and its scaffolding function.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 9072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27280-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akamine T, Kusunose N, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S	4. 巻 503(1)
2. 論文標題 Accumulation of sorbitol in the sciatic nerve modulates circadian properties of diabetes-induced neuropathic pain hypersensitivity in a diabetic mouse model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 181-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.209. Epub 2018 Jun 8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsunaga N, Ogino T, Hara Y, Tanaka T, Koyanagi S, Ohdo S.	4. 巻 78(13)
2. 論文標題 Optimized dosing schedule based on circadian dynamics of mouse breast cancer stem cells improves the antitumor effects of aldehyde dehydrogenase inhibitor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 3698-3708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-4034. Epub 2018 May 7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanemitsu T, Tsurudome Y, Kusunose N, Oda M, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S.	4. 巻 292(52)
2. 論文標題 Periodic variation in bile acids controls circadian changes in uric acid via regulation of xanthine oxidase by the orphan nuclear receptor PPAR .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 21397-21406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1074/jbc.M117.791285.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanado Y, Tsurudome Y, Omata Y, Yasukochi S, Kusunose N, Akamine T, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S.	4. 巻 519
2. 論文標題 Estradiol regulation of P-glycoprotein expression in mouse kidney and human tubular epithelial cells, implication for renal clearance of drugs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 613-619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiromizu S, Yamauchi T, Kusunose N, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S.	4. 巻 42
2. 論文標題 Dosing Time-Dependent Changes in the Anti-tumor Effect of xCT Inhibitor Erastin in Human Breast Cancer Xenograft Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1921-1925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1248/bpb.b19-00546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsunaga N, Yoshida Y, Kitajou N, Shiraishi A, Kusunose N, Koyanagi S, Ohdo S.	4. 巻 513
2. 論文標題 Microcurrent stimulation activates the circadian machinery in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 292-299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松永 直哉 (Matsunaga Naoya) (10432915)	九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授 (17102)	
研究協力者	小柳 悟 (Koyanagi Satoru) (60330932)	九州大学・薬学研究科(研究院)・教授 (17102)	