

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17797

研究課題名(和文)概日リズムを調節する天然化合物の探索

研究課題名(英文) Screening for natural compounds modulating circadian rhythm

研究代表者

中根 右介(Nakane, Yusuke)

名古屋大学・生命農学研究科(WPI)・特任講師

研究者番号：40792023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムの乱れは睡眠障害、動物の季節繁殖制御などにも深く関わるため、概日リズム調節化合物創出は疾患治療や動物生産への応用が期待できる。概日リズムを駆動する時計遺伝子の振る舞いを効率よく観察できる試験によって600以上の食品関連化合物からリズム周期を延長するferulic acidを見出し、当該化合物はマウス睡眠覚醒リズムも制御可能であった。一方マウスへ当該化合物を投与は、シフトワークを模した明暗環境下での新シフトへの同調日数に対する短縮効果を示さなかった。また時計遺伝子変異マウスが示す行動異常に対して、躁様行動を一部改善する効果が見られたものの、不安様行動での明確な改善効果は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

普段我々が口にする食品に豊富に含まれる天然化合物は安全性が比較的高く日常摂取が可能である。この中から概日リズム調節化合物を新規に見出すことができれば、概日リズムの攪乱に対する日常的な予防効果が期待できる。培養細胞を用いた実験を通して発見した当該化合物は、マウスの睡眠覚醒リズムにも影響を与えることがわかった。種々の疾患モデル動物では当該化合物の明確な症状改善効果は見られなかったが、今後当該化合物の作用機序を明らかにすることは、どの疾患に有効かを理解するための重要な知見となる。また見出された作用機序が新規であった場合、従来とは異なる新規な概日リズム発振機構を発見できるため学術的な展開も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Drug discovery of compounds modulating the circadian rhythm could be a potential application for medical treatments, animal productivity etc. because the circadian rhythm is deeply associated with phenomena such as sleep disorders and seasonal reproduction in animals. We found ferulic acid that lengthened the circadian period out of more than 600 food-related compounds with an experiment that we can monitor the expression of a clock gene that drives circadian rhythms. It was also found that this compound could lengthen the sleep-wake cycle in mice. However, administration of this compound to mice did not show a reduction of days to entrain to the new shift under a light/dark cycle that mimics a shift-style work. The administration to Clock¹⁹ mice partially ameliorated the manic-like behavior that this clock mutant mice indicate, but didn't show the improvement of anxiety-like behaviors.

研究分野：動物統合生理学

キーワード：概日リズム ケミカルスクリーニング 食品関連化合物 天然化合物 時計遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの睡眠覚醒リズムのように約 24 時間周期で変動する生理現象を「概日リズム」と呼ぶ。この現象はがん、肥満や糖尿病などの生活習慣病、術後せん妄、うつ病、種々の認知症、疾患の発症時刻などに深く関与することが知られている¹。また動物の多くは日長、すなわち光周期の変化を手掛かりに季節変化を感知し特定の時期に繁殖を行うが、日長測定機構は概日リズムが深く関与することが報告されている²。したがって、概日リズムを調節可能な化合物の創製は医・薬学的な貢献のみならず、動物の生産性を向上させるための解決策と糸口となり得る。

これまで、既存薬ライブラリ (約 1000 化合物) のスクリーニングによってマウスの時差ボケ様行動を改善し得る既存薬を報告した例がある³。元来、薬の多くは天然化合物を起源にもち、それは香料や調味料、漢方薬を例とする天然化合物も同じである。したがって、食品に含まれる天然化合物の中から新たに概日リズム調節作用を持つ化合物を同定できれば、食品は比較的安全性の高いものが多いためにヒトの健康や畜産現場において、日常的な摂取により、現代社会に特異的な概日リズムの乱れやそれにつづく様々な疾患の発症を予防あるいは動物の季節繁殖を制御できる可能性が期待できる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、食品関連化合物や漢方薬を含む天然化合物のライブラリ (計 640 化合物) の中から、培養細胞を用いたハイスクリーンスクリーニングによって、時計遺伝子発現リズム調節作用を示す化合物を選抜する。選抜された化合物は最終的にマウスへ投与し、マウスの回転輪活動を元にした行動リズムに及ぼす影響を評価することで、哺乳類個体レベルにおいて概日リズム調節作用を示す天然化合物の同定を目的とする。

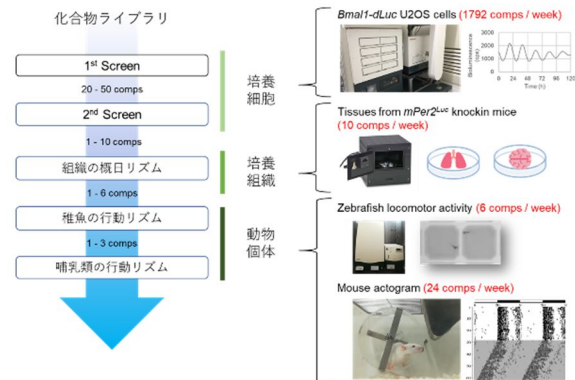


図 1. 概日リズム調節化合物同定までの主の流れ

3. 研究の方法

(1) 概日リズムの中核機構を構成する時計遺伝子 *Bmal1* の転写活性を生物発光としてモニターできる *Bmal1-dLuc* U2OS cells を用いた時計遺伝子転写活性発光測定システムを基盤技術とし、384-well plate を用いて化合物投与後の発光リズムを測定する。1 次スクリーニングでは 2 濃度 (1 μ M, 10 μ M) の条件で実施し、そこで選抜された化合物は 8 濃度の条件で各化合物が示す効果の濃度依存性を評価する。

(2) 選抜化合物について、概日リズム中核機構を構成する時計遺伝子 *Per2* の転写活性をモニターできる *mPer2^{LacZ}* knockin マウス由来の組織培養系によって、臓器・組織レベルでの評価を実施する。末梢組織として肺組織を用い、そこで効果を示した化合物は中枢神経系への作用を評価するために、概日リズムのペースメーカーを担う脳領域、視交叉上核 (SCN) を含む脳スライスで同様の評価を実施する。

(3) 効率よく動物個体行動レベルを評価できるアッセイ系として、96 匹のゼブラフィッシュ稚魚の自発活動量を同時に測定できるシステムを用いて、化合物の行動リズムに及ぼす影響を評価する。時刻の手がかりがない恒暗条件下において化合物投与中の自発活動量から行動リズムを評価し、行動の概日リズムに対して調節作用を示す化合物を選抜する。

(4) マウスの回転輪活動を指標とした哺乳類個体の行動リズムに与える影響を評価するために、先と同様時刻の手がかりのない恒暗条件下で化合物を混餌投与し、回転輪活動を記録する。

(5) マウスの行動リズムで概日リズム調節作用を示した化合物の混餌投与条件下において、化合物がヒト社会におけるシフトワークを模した明暗サイクル環境下で新規明暗サイクルへの同調に必要な日数を短縮しうるかどうか、一部、ヒト双極性障害における躁状態と似た行動を示す時計遺伝子変異マウス (*Clock^{Al9}* マウス) において、躁様行動に係る行動を改善しうるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 1 次スクリーニングを実施した結果、全 640 化合物のうち、約 6.5% で周期延長効果、約 2% で周期短縮効果、約 1.3% で位相後退効果がみられた。ここで効果がみられた化合物のうち、効果の大きさ・新規性・食品としての利用可能性の観点から選ばれた 31 化合物について効果の濃度依存性を検討した。その結果、その約半数で効果の濃度依存性を確認できた。その中には周期延長作用を示した ferulic acid (FA) が含まれていた (図 2)。

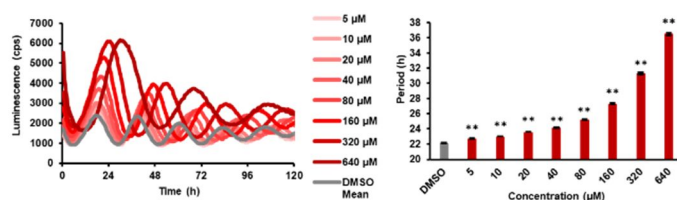


図 2. Ferulic acid は U2OS cell において濃度依存的な概日リズム周期延長作用を示す

(2) 濃度依存性が確認できた化合物について、*mPer2^{Luc}* knockin マウス由来の肺組織を用いて、組織レベルで観察される時計遺伝子の概日リズムに与える影響を検討した。その結果、当該化合物は肺組織の他(図3上段)、脳の視交叉上核(SCN)を含んだ脳スライスにおいても有意な周期延長作用を示した(図3下段)。

(3) この化合物について、恒暗条件下で観察されるゼブラフィッシュ稚魚の行動の概日リズムに与える影響を検討したところ、当該化合物は稚魚が示す行動リズムの周期に対して有意な周期延長作用を示すことが確認された(図4上段)。

(4) 次に、1%および2%の当該化合物含有餌をマウスに各濃度1週間継続して与えたところ、2%で有意な周期延長作用が確認された。以上より、培養細胞をハイスループットスクリーニングによって食品関連化合物群の中から、マウスの行動リズムに対して、混餌投与下で行動の概日リズム周期を延長する化合物を同定した(図4下段)。

(5) マウスの行動リズムで有意な周期延長作用を示した当該化合物4%(w/w)の混餌投与条件下において、当該化合物がヒト社会におけるシフトワークを模した明暗サイクル環境下で新規明暗サイクルへの同調に必要な日数を短縮しうるかどうか、一部ヒトの双極性障害における躁状態と似た行動を示す時計遺伝子変異マウス(*Clock^{Δ19}* マウス)において、躁様行動を改善しうるかどうかを検討した。シフトワーク実験においては、明確な同調日数短縮効果を観察することができなかった(図5)。躁様行動を評価するために、マウスの不安様行動を評価する明暗箱試験、高架式十字迷路試験、マウスのうつ・躁状態を評価する強制水泳試験を実施した結果、強制水泳試験において、*Clock^{Δ19}* マウスが示す短い不動時間(躁様行動)を長くする傾向が見られた一方、明暗箱試験や高架式十字迷路試験においては、当該マウスは野生型マウスと比べて明確な不安様行動の亢進が見られなかったため、化合物の効果を評価することができなかった。

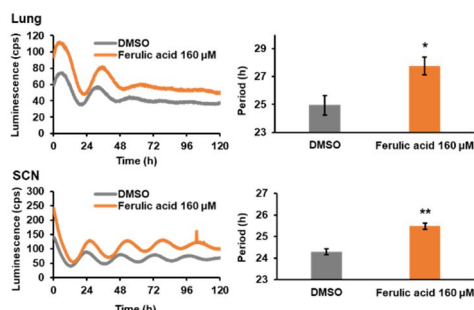


図3. Ferulic acidは肺組織、SCN含有脳組織において概日リズム周期延長作用を示す

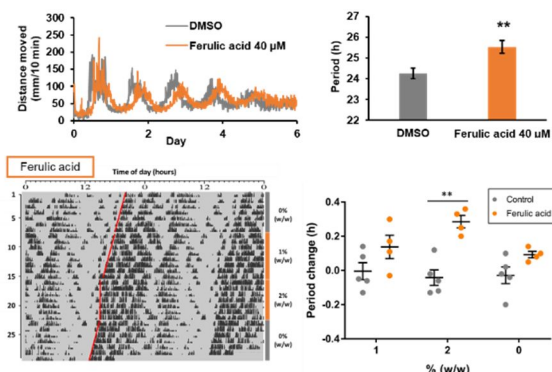


図4. FAは恒暗条件下でゼブラフィッシュやマウスの行動リズムの周期を延長させる

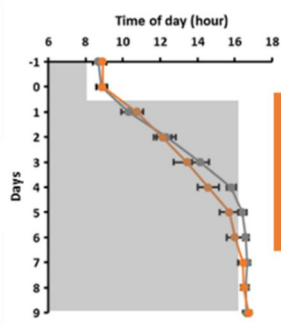


図5. FAは位相を8時間後退させた新規明暗サイクルへの同調能力を亢進させなかった

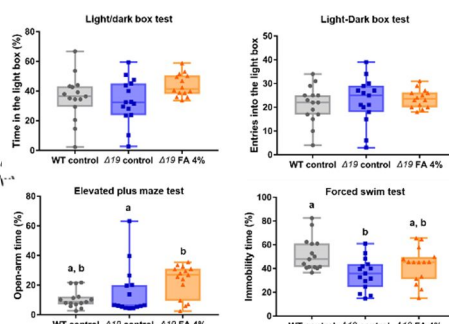


図6. FAは時計遺伝子変異マウスが示す躁様行動を部分的に改善する効果を示した

<引用文献>

1. Sulli G, Manoogian ENC, Taub PR, Panda S. Training the Circadian Clock, Clocking the Drugs, and Drugging the Clock to Prevent, Manage, and Treat Chronic Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2018;39(9):812-827. doi:10.1016/j.tips.2018.07.003
2. Wood S, Loudon A. Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *Journal of Endocrinology*. 2014;222(2):R39-R59. doi:10.1530/JOE-14-0141
3. Tamai TK, Nakane Y, Ota W, et al. Identification of circadian clock modulators from existing drugs. *EMBO Molecular Medicine*. 2018;10(5):e8724. doi:10.15252/emmm.201708724

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakane Yusuke, Shinomiya Ai, Ota Wataru, Ikegami Keisuke, Shimmura Tsuyoshi, Higashi Sho-Ichi, Kamei Yasuhiro, Yoshimura Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Action spectrum for photoperiodic control of thyroid-stimulating hormone in Japanese quail (Coturnix japonica)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 NAKAYAMA Tomoya, NAKANE Yusuke, YOSHIMURA Takashi	4. 巻 57
2. 論文標題 脊椎動物の季節感知機構の解明とその応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 121 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.57.121	査読の有無 無
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 Nakane Yusuke, Yoshimura Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Photoperiodic Regulation of Reproduction in Vertebrates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annual Review of Animal Biosciences	6. 最初と最後の頁 173 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-animal-020518-115216	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8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中根右介、中山友哉、太田航、沖村光祐、四宮愛、新村毅、吉村崇
2. 発表標題 季節情報を感知する光受容メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中根右介, T Katherine Tamai、渥美晴貴、岩田聖士、角房直哉、佐藤綾人、大川妙子、吉村崇
2. 発表標題 概日リズム障害と概日リズム調節化合物の探索
3. 学会等名 2019年度(第29回)日本数理生物学会大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中根右介
2. 発表標題 概日リズムを調節する食品関連天然化合物の探索
3. 学会等名 第三回名古屋リズム研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渥美晴貴・中根右介・角房直哉・佐藤綾人・大川妙子・吉村崇
2. 発表標題 概日リズムを調節するファイトケミカルの探索
3. 学会等名 2018 東海畜産学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渥美晴貴・中根右介・角房直哉・佐藤綾人・大川妙子・吉村崇
2. 発表標題 概日リズムに作用する海洋天然物質の探索
3. 学会等名 平成29年度 東海畜産学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武田紗輔・中根右介・角房直哉・佐藤綾人・大川妙子・吉村崇
2. 発表標題 概日リズムに影響を与える食品機能性成分の探索
3. 学会等名 平成29年度 東海畜産学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中根右介
2. 発表標題 海洋生物由来天然化合物による 概日リズムの制御
3. 学会等名 第7回超異分野学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田紗輔・中根右介・角房直哉・佐藤綾人・大川妙子・吉村崇
2. 発表標題 概日リズムに影響を与える食品機能性成分の探索
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 公益社団法人日本動物学会	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 800
3. 書名 動物学の百科事典	

1. 著者名 Michael Skinner	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 3868
3. 書名 Encyclopedia of Reproduction 2nd Edition	

1. 著者名 一般社団法人日本魚類学会	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 756
3. 書名 魚類学の百科事典	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----