

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0129

研究課題名（和文）体内時計の乱れと母体胎盤炎症反応の関係

研究課題名（英文）Investigation of the relationship between circadian clock disorders and inflammation

研究代表者

梅村 康浩（Yasuhiro, Umemura）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：40612734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：マウスの飼育環境の光条件を頻繁に変更して、マウスの活動時間を変える条件での飼育を行った。各条件での飼育を長期間飼育した結果、光同調ができないような光条件では、早期死亡個体が多く、寿命の短縮傾向が見られた以前の研究室で得られた結果と一致した。これらのマウスでは、体内時計のリズム障害が顕著に起こっていることを確認することができた。これらのマウスの肝臓と腎臓において、老化促進や慢性炎症を示す所見が得られた。これらはシフトワーカーの健康問題としてあげられる様々な疾患と相関があることが知られているおり、全身性の病態を引き起こす病因として成立するのか今後さらに検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内時計は、生命維持に必須の生理機能である。その体内時計と社会リズムとの間の齟齬が、様々な健康問題を引き起こしている。本研究では、マウスの飼育環境の光条件を頻繁に変更して、マウスの活動時間を変える条件での飼育を行った。各条件での飼育を長期間飼育した結果、光同調ができないような光条件では、早期死亡個体が多く、寿命の短縮傾向が見られた。これらのマウスの肝臓と腎臓において、老化促進や慢性炎症を示す所見が得られた。これらはシフトワーカーの健康問題としてあげられる様々な疾患と相関があることが知られているおり、全身性の病態を引き起こす病因として成立するのか今後さらに検討する。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we subjected adult wild-type mice to distinct chronic jet-lag paradigms, 8-hour phase advance every 4 days or 8-hour phase delay every 7 days, to induce non-adjustive and adjustive phase shifts in the behavior. The non-adjustive for the circadian clock cause long-term circadian misalignment in the mice and the mice had significant early mortality, which is consistent with our previous study. These non-adjustive mice exhibited the disrupted circadian rhythm. The RNA sequencing analysis showed the activation of immune system and immune disease related signaling pathways in the liver and kidney. Our results underscore immune homeostasis as a pivotal intervention target against clock-related disorders in a lot of shift workers.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大気汚染、肥満、タバコ、ストレス、母体アレルギー・炎症性疾患（喘息、アトピー性皮膚炎、リウマチなど）、母体感染サイトメガロウイルス、風疹、インフルエンザなどを起因とする妊娠初期における胎盤の炎症が、胎児の脳発達を障害して、自閉症スペクトラム（ASD）や統合失調症を引き起こす可能性があることが繰り返し報告されてきた（Angelidou et al., 2012）。

これらに共通してみられるものとしてあげられるのは、妊娠初期における胎盤の炎症である（Angelidou et al., 2012）。母体胎盤の炎症が、胎児脳形成に影響しうる可能性が指摘されている。また、アカゲザル（Rhesus Monkey）を使った実験で、妊娠中期よりも妊娠初期における炎症が、自閉症様の症状を引き起こしやすいことも報告されている（Bauman et al., 2014）。最近では、炎症により、免疫系の異常が起こり、胎児脳形成異常へと繋がるメカニズムとして、胎盤内の Th17 細胞の IL-17 分泌の活性化が誘導され、胎盤を通過して胎児脳内に入った IL-17 が胎児脳の発達を阻害することが報告された（Choi et al., *Science* 2016）。これらの精神神経疾患には、共通して、睡眠覚醒の異常も観察されているが、その因果関係は不明である。睡眠覚醒異常は、体内時計の乱れに起因する可能性が高い。

これらの精神神経疾患には、同時に、体内時計の異常（睡眠覚醒の異常）も観察されているが、その因果関係は不明である。ヒトを含む多くの生物は、体内に「1日」を刻む内因性の時計（体内時計）を持つ。1細胞・組織・生体レベルと、階層縦断的な制御システムである体内時計は、遺伝子の複雑なネットワークを俯瞰的に制御する仕組みといえる。しかも、このような生体制御の仕組みは、他に例がない。これまでに、申請者らは、精神神経疾患における睡眠障害と体内時計の関係についても注目し研究してきている（Tsuchiya et al., 2014）。睡眠障害が合併する確率が高いことが臨床的に知られている、自閉症の一種である Rett 症候群は、*MeCP2* 遺伝子の変異が原因の多くを占めていることがわかっている。申請者らは、*MeCP2* 遺伝子をゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法で欠失させた Rett 症候群モデルマウスで、体内時計の中核である視交叉上核（SCN）で体内時計のリズム出力が低下していることを報告し、Rett 症候群患者の睡眠障害は体内時計の異常による可能性を示した（Tsuchiya et al., 2014）。

一方で、炎症作用によって、体内時計が乱されるとということが複数の研究グループによって報告されている。例えば、胎児期炎症が、成獣の体内時計に持続的な影響を与えるといった報告や、遺伝子レベルでは、炎症が一過性に時計遺伝子の発現を抑制すること（Okada et al., 2008）などである。成獣への炎症暴露が、体内時計の精確な振動機構をつかさどる時計遺伝子 *Per* の発現を大きく抑制し、炎症曝露のみで、体内時計が乱されるという報告もある（Okada et al., 2008）。しかしながら、逆に、体内時計の乱れから、免疫系の異常が起こるといった報告は、数多く存在する（Mendez-Ferrer et al., *Nature* 2008; Yu et al., *Science* 2013）。特に、上述した、炎症が胎児脳形成異常へと繋がるメカニズムとして、胎盤内の Th17 細胞の IL-17 分泌が胎児脳の発達を阻害するという報告に対して（Choi et al., *Science* 2016）、時計遺伝子が免疫細胞 Th17 細胞の分化や機能発現をコントロールするという報告もあり（Yu et al., *Science* 2013）、密接な関連が予想される。

2. 研究の目的

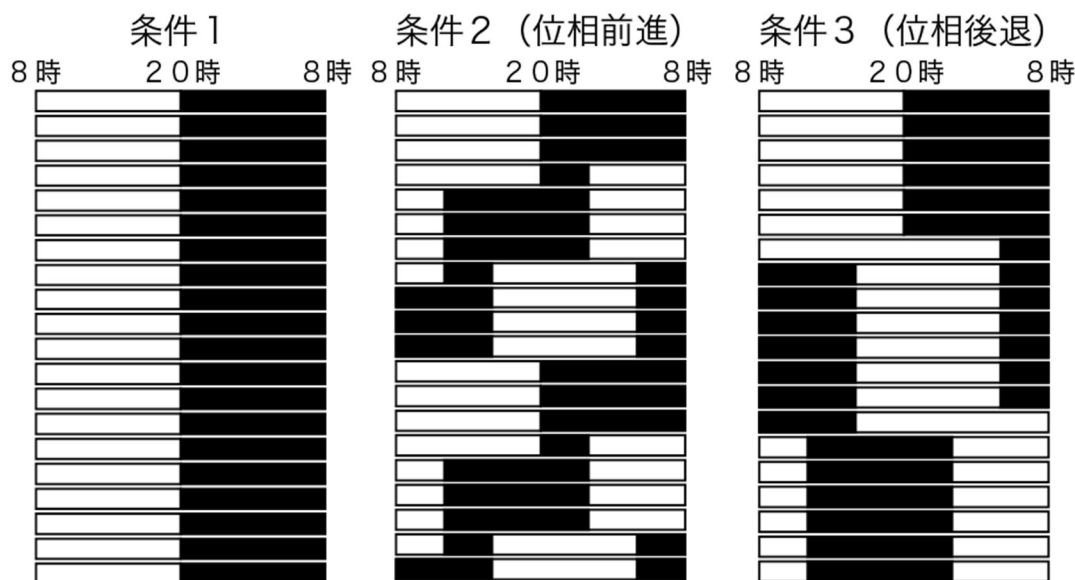
上述したように、多くの研究報告が徐々に蓄積されてきてはいるものの、単発的なものであり、体内時計の乱れと炎症反応に関して、統合的な理解には至っていないと考えられる。本研究では、これらの研究報告を統合し、そこから浮かび上がるシステムに、複雑系としての疾患を説明しうる主要要因を見つけ出そうとする試みである。本研究では、当初、胎児の精神神経疾患の起因となりうる母体胎盤の炎症が、体内時計の乱れによって増幅されうるかを検証することを目的としていたが、まとまった数を用意しやすい成獣マウスにおいても行い、飼育環境の構築と光環境条件の検討した。

3. 研究の方法

飼育環境の光条件を頻繁に変更して、妊娠マウスの活動時間を変える条件（CJL 条件）での飼育を行い、母体の胎盤にみられる炎症、母親及び新生児の体内時計を観察する予定であったが、まずは、纏った数を用意しやすい成獣マウスを用いて、実験設備の構築、実験条件の検討を行った。倫理的見地から、急激な体重変化が見られた場合等のエンドポイントを設定した。その個体の解剖・組織学的検討、遺伝子発現解析を実施する。体内時計のレポーターマウスである PER2::Luc ノックインマウスを用いて、体内時計の乱れを発光イメージングにて観察した。

具体的には、マウスを準備し、次に示す 3 条件で飼育を開始する。各条件は、条件 1：通常の明暗条件（12 時間明期、12 時間暗期）条件 2（位相前進）：CJL 条件（4 日に一度 8 時間ずつ明暗周期が早く始まる）条件 3（位相後退）：CJL 条件（7 日に一度 8 時間ずつ明暗周期が遅く始まる）とした。マウスは明暗周期が早く始まるほうが、遅く始まるよりも新たな光環境に同調するのに時間が必要である。言い換えれば、条件 2 は、条件 3 よりもシビアな CJL 条件である。CJL 条件は、活動時間が自然界での昼夜のリズムと乖離してしまうシフトワークにも相当するため、妊婦のシフトワークが流産率を高めるといった研究報告と合わせて考えると、本研究課題の重要性が増すと考えられる。体重変化を計測するとともに、一部のマウスについては輪回し行動を指標とした観察を行い、体内時計の状態を確認する。

体内時計は、時計遺伝子から構成されており、体内のほぼ全ての細胞に存在しているので、時計遺伝子 PER2 にホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーター遺伝子をもつ PER2::LUC ノックインマウスを用いることで、CJL 条件下で飼育したマウスの標的組織における体内時計の状態を組織レベルで検討することが可能である。したがって、各条件で飼育した PER2::LUC ノックインマウスから、体内時計中枢である視交叉上核をサンプリングして器官培養下にて、組織全体の発光イメージングを行い、体内時計の状態を比較・検討した。CJL 条件により引き起こされる変化を網羅的な遺伝子発現解析により、検討した。



各実験条件の模式図。白四角が点灯時間帯、黒四角が消灯時間帯を示す。白と黒のブロックを合わせた一列（8時-8時）が1日を意味する。マウスは暗期に活動するため、黒四角で示した時間帯でマウスを活動させる条件である。

4. 研究成果

「体内時計の乱れ」から「炎症反応」への関係を調べた。マウスの飼育環境の光条件を頻繁に変更して、マウスの活動時間を変える条件(CJL 条件)での飼育を行った。炎症反応にターゲットを絞っていたが、ノンバイアスな解析をまず行うこととした。倫理的見地から、急激な体重変化が見られた場合等のエンドポイントを設定し、その個体の解剖・組織学的検討を実施した。各条件での飼育を長期間飼育した。条件1：通常の明暗条件（12時間明期、12時間暗期）条件2（位相前進）：CJL 条件（4日に一度8時間ずつ明暗周期が早く始まる）条件3（位相後退）：CJL 条件（7日に一度8時間ずつ明暗周期が遅く始まる）とした。

条件2（位相前進）においては、行動リズムが大きく乱れ、マウスが適応できないことが確認できた。一方で、条件3（位相後退）においては、7日間のうちに行動リズムは適応できる条件であることが確認できた。

さらに、広く体内時計研究領域で使用されている、体内時計のレポーターマウスである PER2::LUC ノックインマウスを用いて、体内時計の中枢として考えられている視交叉上核(SCN)における体内時計の発光リズムを観察した。その結果、条件2（位相前進）においては、SCN の発光リズムが大きく乱れ、体内時計に障害が起きていることを確認することができた。一方で、条件3（位相後退）においては、行動リズムの結果から予想されるように、SCN の発光リズムは大きく乱れておらず、条件1の通常の明暗条件で飼育したマウスと同程度に振動していた。

このような3条件で長期間マウスを飼育した結果、条件2においてのみ、早期死亡個体が多く、寿命の短縮傾向が見られた。この結果は、以前、本研究室で得られた結果と一致した。体重変化を計測するとともに、一部のマウスについては輪回し行動を指標とした観察を行い、体内時計の状態を確認している。

これら光の ON と OFF のタイミングの違いだけで引き起こされる生理機能の変化、個体を死に至らしめるほどの変化は、どのようなものであるのか、さらに詳細な解析を行っているところであるが、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析の結果、これらのマウスの肝臓と腎臓において、老化促進や慢性炎症を示す所見が得られた。また肝臓においては、組織学的な解析も進め、慢性炎症を示す所見を得ることができ、これらの結果と一致した (Inokawa et al., *Scientific Reports* 2020, Co-first author)。このような体内時計の乱れによる遺伝子レベルの変化が、全身性の病態を引き起こす病因として成立するのか、また、妊娠マウスで同様のことが当てはまるのか、明らかにすることによって、シフトワーカーの健康問題としてあげられる様々な疾患を説明するのか検討していきたい。

引用文献：

- 1: Angelidou A, Asadi S, Alysandratos KD, Karagkouni A, Kourembanas S, Theoharides TC. Perinatal stress, brain inflammation and risk of autism-review and proposal. *BMC Pediatr.* 2012 Jul 2;12:89. doi: 10.1186/1471-2431-12-89. PMID: 22747567; PMCID: PMC3496584.
- 2: Okada K, Yano M, Doki Y, Azama T, Iwanaga H, Miki H, Nakayama M, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Ishida N, Monden M. Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats. *J Surg Res.* 2008 Mar;145(1):5-12. doi: 10.1016/j.jss.2007.01.010. PMID: 18279697.
- 3: Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature.* 2008 Mar 27;452(7186):442-7. doi: 10.1038/nature06685. Epub 2008 Feb 6. PMID: 18256599.
- 4: Yu X, Rollins D, Ruhn KA, Stubblefield JJ, Green CB, Kashiwada M, Rothman PB, Takahashi JS, Hooper LV. TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science.* 2013 Nov 8;342(6159):727-30. doi: 10.1126/science.1243884. PMID: 24202171; PMCID: PMC4165400.
- 5: Bauman MD, Iosif AM, Smith SE, Bregere C, Amaral DG, Patterson PH. Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biol Psychiatry.* 2014 Feb 15;75(4):332-41. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.06.025. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24011823; PMCID: PMC6782053.
- 6: Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, Hoeffler CA, Littman DR, Huh JR. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science.* 2016 Feb 26;351(6276):933-9. doi: 10.1126/science.aad0314. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26822608; PMCID: PMC4782964.
- 7: Tsuchiya Y#, Minami Y#, Umemura Y#, Watanabe H, Ono D, Nakamura W, Takahashi T, Honma S, Kondoh G, Matsuishi T, Yagita K. Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mouse. *Genes Cells.* 2015 Dec;20(12):992-1005. doi: 10.1111/gtc.12305. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26456390.#Equal contribution.
- 8: Inokawa H#, Umemura Y#, Shimba A#, Kawakami E, Koike N, Tsuchiya Y, Ohashi M, Minami Y, Cui G, Asahi T, Ono R, Sasawaki Y, Konishi E, Yoo SH, Chen Z, Teramukai S, Ikuta K, Yagita K. Chronic circadian misalignment accelerates immune senescence and abbreviates lifespan in mice. *Sci Rep.* 2020 Feb 13;10(1):2569. doi: 10.1038/s41598-020-59541-y. PMID: 32054990; PMCID: PMC7018741. #Equal contribution.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Inokawa H, Umemura Y, Shimba A, Kawakami E, Koike N, Tsuchiya Y, Ohashi M, Minami Y, Cui G, Asahi T, Ono R, Sasawaki Y, Konishi E, Yoo SH, Chen Z, Teramukai S, Ikuta K, Yagita K	4. 巻 13
2. 論文標題 Acceleration of immune senescence-mediated ageing process by long-term circadian misalignment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59541-y	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 該当する

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