

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02600

研究課題名（和文）概日リズム制御系の機能発生学

研究課題名（英文）Functional development of circadian regulation system

研究代表者

八木田 和弘（Yagita, Kazuhiro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90324920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまで我々は、概日時計が細胞分化と共役することを発見し、概日時計の発生に新たな概念を提供した（Yagita et al, PNAS, 2010; Umemura et al, PNAS, 2014）。さらに、概日時計と細胞分化の共役関係の生理的意義を明らかにするため、マウスの個体発生過程とES細胞の*in vitro*分化過程を対比させながら分子メカニズムの解明を進めたところ、概日時計の発生に伴う成立は、必須の時計タンパク質であるCLOCKの転写後メカニズムなどにより厳密に概日時計発生のタイミングがコントロールされている可能性を見出した（Umemura et al, PNAS, 2017）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、都市機能の24時間化（24時間社会）のみならず、急速なIoT化や超少子高齢化（2025年問題）など、社会構造の大きな変化に直面している。本研究開発課題である概日リズム障害による複合的脳病態は、単に交替制勤務者の健康問題のみならず、トラックやバス等の事故、病院・警察・消防などの社会インフラ維持などとも関連する。これらの諸課題は近未来の社会が直面するリアルな問題である。本研究課題では、日常生活に起因する健康課題として非常に社会的な要請が高まっている概日リズム障害の病態解明に必須である、概日リズムの成立原理とそのメカニズムの解明を進めた。

研究成果の概要（英文）：Previously, we found that ES cells and early embryo cells do not display discernible circadian oscillation, whereas circadian clock oscillation appears after *in vitro* differentiation culture. Moreover, we have revealed that the circadian clocks are re-disappeared when differentiated cells are reprogrammed to regain pluripotency, indicating that the emergence of circadian clock is programmed tightly linked with cellular differentiation. We showed that the development of the mammalian circadian clock requires two steps. The first is an epigenetic and transcriptional program-mediated cellular differentiation process (cell-lineage determination process), and the second is the establishment of the circadian feedback loops, in which the post-transcriptional regulation of Clock functions as a rate-modulating mechanism. These sequential mechanisms may explain, at least in part, the late emergence of mammalian circadian clock oscillation in the developmental process (Umemura et al, PNAS, 2017).

研究分野：環境生理学

キーワード：概日リズム 体内時計 発生学 細胞分化 母子同調 機能発生学

1. 研究開始当初の背景

約24時間周期のリズムを刻む概日時計は、地球上のほとんどの生物に備わる普遍的な生命機能である。哺乳類においても概日時計は、睡眠覚醒のみならず、エネルギー代謝や自律神経、さらには循環器や内分泌など多岐にわたる生理機能に概日リズムを生み出し、地球の自転に伴う環境変化に先んじて生理機能を適応させておくという能動的適応を可能にしている。概日時計は時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群によって制御されていることが知られているが、なぜ24時間周期なのか、どうやって環境周期に同調するのか、という謎に加え、様々な生命機能とカップリングし個体機能の恒常性維持を担う「概日リズム制御系の成立機構」は、哺乳類の発生学や幹細胞生物学とも関連する重要な未解決課題である。

2. 研究の目的

本研究は、その発見をさらに発展させ、個体発生において「概日時計の成立前後で何が変化し、それにどのような意味があるのか？」に着目し、「目に見えない機能の発生メカニズムとその意義」を紐解く「機能発生学」の構築を目指す。したがって、時間生物学のみならず、発生学や細胞生物学にも関わる普遍的な生命機能の理解につながる。さらに、本研究は波及効果においても重要な示唆を与えるものと考えている。例えば、発生過程における概日リズム障害に起因する疾患や機能不全の発症を未然に防ぐことにも将来的につながるような知見も本研究から得られると期待している。

哺乳類の概日リズムの中核は視床下部にある視交叉上核 (SCN) であるが、申請者らはこれまでに、線維芽細胞などの培養細胞でも視交叉上核と同様の概日時計が備わっていることを明らかにし (Yagita ら *Science*, 2001) 個々の細胞レベルでの概日時計制御系が果たす役割について検討を進めた結果、多能性幹細胞である ES 細胞などを用い「概日時計は細胞分化と密接に関連する」という新たな事象を発見した (Yagita ら *PNAS*, 2010)。さらに、マウス ES 細胞からの概日時計発生機序は個体発生に伴う概日時計発生機構と基本的に共通であることを検証し、マウス個体と ES 細胞の組み合わせによる体系的な概日時計発生の研究プラットフォームを確立した。さらに、ES 細胞の利点を活かし、すでに CRISPR 法と組み合わせることで全ての時計遺伝子の欠損 ES 細胞株を樹立しており (Tsuchiya ら, *J Biol Rhythm*, 2016) これらへの遺伝子レスキュー系も構築済みである。このような成果を基盤として、本研究では、発生過程を通し、「哺乳類個体発生における概日リズム制御系の成立プログラム」を解析し、その分子機構を解明する。

本研究では、このようなこれまでの申請者らの独創的研究成果を基盤として、概日リズム制御系の成立機序解明という「機能発生学」に挑む。

3. 研究の方法

【 】 個体発生に伴う概日リズム制御系成立機構の解明

本研究では、個体発生における概日リズム制御系の成立が種々の生命機能にもたらす意義を解明する。概日時計と細胞分化の共役関係の生理的意義を明らかにするため、マウスの個体発生過程と ES 細胞の *in vitro* 分化過程を対比させながら分子メカニズムの解明を進める。また、概日時計の発生に伴う成立は、必須の時計タンパク質である CLOCK の転写後メカニズムなどにより厳密に概日時計発生のタイミングがコントロールされている可能性について、マウス胎児および ES 細胞のみならず、発現抑制メカニズムが human iPS 細胞においても共通した機構であることを検討する。さらに、概日リズム制御系の成立メカニズムの解明のため、細胞内の代謝制御系などとの概日リズム制御ネットワーク構築について、マウス ES 細胞の分化誘導系を用いて解析する。

【 】 発生発達期を通じた環境周期攪乱による概日リズム制御系への長期的影響

4 . 研究成果

(1) 個体発生に伴う概日リズム制御系成立機構の解明

これまで全身の個々の細胞レベルに概日時計が存在する意義について研究を進めてきた (Yagita et al, Science, 2001)。そのなかで、我々は、概日時計が細胞分化と共役することを発見し、概日時計の発生に新たな概念を提供した (Yagita et al, PNAS, 2010; Umemura et al, PNAS, 2014)。さらに、分化した細胞のリプログラミングによる脱分化で体内時計のリズム消失が生じ (Yagita ら, PNAS, 2010; Ohashi ら, Genes Cells, 2018) 細胞分化異常によってもたれない時計の形成不全が生じることを明らかにした (Umemura ら, PNAS, 2014)。これらの一連の研究により、発生過程における体内時計の形成は個体発生制御と密接に関連したイベントであることが強く示唆された。

しかしながら、体内時計は本来、地球の自転周期に伴う環境変化に生体機能を適応させるための「環境適応機構」であり、なぜこのような発生制御と共役する形で体内時計の形成が厳密に制御されているのか、全く分かっていなかった。これまでの我々の解析により、哺乳類における体内時計の形成が非常に遅く、発生の早い段階では体内時計の基本骨格をなす時計遺伝子による転写振動のコアフィードバックループがサイクルできないよう、複数のメカニズムで強く抑制されていることが示唆されていた (Umemura ら, PNAS, 2014)。さらに、マウスの個体発生過程と ES 細胞の *in vitro* 分化過程を対比させながら分子メカニズムの解明を進めたところ、概日時計の発生に伴う成立は、必須の時計タンパク質である CLOCK の転写後メカニズムなどにより厳密に概日時計発生のタイミングがコントロールされている可能性を見出した (Umemura et al, PNAS, 2017)。これまでに、CLOCK の転写後制御による発現抑制メカニズムが human iPS 細胞においても共通した機構であることを明らかにし、哺乳類の概日時計発生における普遍的制御機構であることを解明した (Umemura et al, J. Biol. Rhythm, 2019)。

さらに、我々は、概日リズム制御ネットワークの成立メカニズムを明らかにするため、代謝リズム制御などに重要な働きを担う時計遺伝子 *Rev-erba,b* 二重欠損 ES 細胞の分化に伴う概日リズム形成を継時的 RNA-seq にて解析したところ、概日時計コアループの下流で支配される時計関連遺伝子のパターンが大きく変化することを明らかにした (Ikeda et al, Sci. Rep, 2019)。さらに、申請者らは、哺乳類個体発生における概日時計の形成タイミング制御が生物学的にどのような意義を持つのかについて検討を進めた結果、体節形成における分節時計との関係性が重要である可能性を見出し、個体発生学における時間秩序の生物学的意義という新たな学問領域の開拓につながる成果をあげた。

(2) 発生発達期を通じた環境周期攪乱による概日リズム制御系への影響

また、マウス個体発生においては、受精卵や初期胚では概日転写時計の振動が見られず、胎生後期になって初めてリズム発振が観察される。申請者らによる胎児心臓を用いた実験でも、発生前期には母体の概日リズム情報も伝わらない「環境周期によるリズムからシールドされている」状態であることを突き止めた (Umemura ら, PNAS 2017)。この成果は、単に発生過程における概日時計の細胞自律的な形成メカニズムの解明というテーマのみならず、発生過程における母体のリズムへの同調適応といった外界の環境周期に適応する仕組みの成立も同時に生じていることを示唆する。そもそも、概日時計

及び概日リズム制御系という生理機能は、地球の自転に伴う環境周期への適応機構を起源とすると考えられている。この概日時計本来の意義と「細胞分化と概日時計との共役関係」という我々が発見した新たな特性の関係性を考えたとき、概日時計の発生とともに成立する外界の環境周期への適応は非常に大きな意味を持つ可能性があると考えている。

このような観点から、我々は、これまで成体マウスを対象として概日リズム攪乱の「マウスコホートモデル系」の構築を進めてきた。我々は、マウスを通常の光条件（LD 条件、12 時間明期：12 時間暗期）、delay 条件（7 日ごとに暗期の開始を 8 時間遅らせる）、advance 条件（4 日ごとに明期の開始を 8 時間早める）の 3 つの条件で飼育した。各条件での行動リズムの解析から、LD 条件および delay 条件では明暗周期に同調できるが、advance 条件では明期の 8 時間前進シフトに行動が追従できないことが分かった。すなわち、本研究における delay 条件は同調可能な光環境シフト条件であり、advance 条件は同調不可能なシフト条件であると言える。この条件において 20 カ月以上の継続観察を行いマウスの生存率を調べたところ、advance 条件で飼育したマウスは LD 条件で飼育したマウスに比べ顕著に短い寿命を示した。また、advance 条件のマウスは delay 条件で飼育したマウスと比較しても有意に短寿命であった。これらの結果から、長期間の同調不可能な光環境攪乱がマウスの寿命を短縮させることが示された。さらに重要なことに、LD 条件と delay 条件との間では有意な寿命の差は観察されなかった(Inokawa ら, Sci Rep, 2020)。本研究成果のヒトへの外挿を考えると、光環境シフトの条件によって生存率への影響が異なるということは、健康への影響を最小限に抑えるようにシフトワーク条件を最適化できる可能性があることを示唆している。これらの成果に基づき、本研究では、申請者らが構築してきた概日リズム攪乱の「マウスコホートモデル系」を発生発達期に応用する予備的検討を進め、発生発達期における環境周期攪乱の影響を解析する「発生発達期のマウスコホート研究系」を構築することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Inokawa Hitoshi, Umemura Yasuhiro, Shimba Akihiro, Kawakami Eiryō, Koike Nobuya, Tsuchiya Yoshiki, Ohashi Munehiro, Minami Yoichi, Cui Guangwei, Asahi Takuma, Ono Ryutaro, Sasawaki Yuh, Konishi Eiichi, Yoo Seung-Hee, Chen Zheng, Teramukai Satoshi, Ikuta Koichi, Yagita Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Chronic circadian misalignment accelerates immune senescence and abbreviates lifespan in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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
1. 著者名 Ono Ryutaro, Koike Nobuya, Inokawa Hitoshi, Tsuchiya Yoshiki, Umemura Yasuhiro, Yamamoto Toshiro, Kanamura Narisato, Yagita Kazuhiro	4. 巻 52
2. 論文標題 Incremental Growth Lines in Mouse Molar Dentin Represent 8-hr Ultradian Rhythm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 93-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.19017	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 Inoue Maho, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Umemura Yasuhiro, Inokawa Hitoshi, Togashi Yuichi, Maniwa Junnosuke, Higashi Mayumi, Fumino Shigehisa, Tajiri Tatsuo, Yagita Kazuhiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Enhanced metastatic growth after local tumor resection in the presence of synchronous metastasis in a mouse allograft model of neuroblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1403-1411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-019-04568-0	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 Umemura Yasuhiro, Maki Izumi, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Yagita Kazuhiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Human Circadian Molecular Oscillation Development Using Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 525-532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0748730419865436	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 Ikeda Ryosuke, Tsuchiya Yoshiki, Koike Nobuya, Umemura Yasuhiro, Inokawa Hitoshi, Ono Ryutaro, Inoue Maho, Sasawaki Yuh, Grieten Tess, Okubo Naoki, Ikoma Kazuya, Fujiwara Hiroyoshi, Kubo Toshikazu, Yagita Kazuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 REV-ERB and REV-ERB function as key factors regulating Mammalian Circadian Output	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46656-0	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

1. 著者名 Doi Masao, Shimatani Hiroyuki, Atobe Yuta, Murai Iori, Hayashi Hida, Takahashi Yukari, Fustin Jean-Michel, Yamaguchi Yoshiaki, Kiyonari Hiroshi, Koike Nobuya, Yagita Kazuhiro, Lee Choogon, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Okamura Hitoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Non-coding cis-element of Period2 is essential for maintaining organismal circadian behaviour and body temperature rhythmicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10532-2	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

1. 著者名 Tsuchiya Yoshiki, Umemura Yasuhiro, Yagita Kazuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Circadian clock and cancer: From a viewpoint of cellular differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14231	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 Umemura Yasuhiro, Yagita Kazuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of the Circadian Core Machinery in Mammals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2019.11.026	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 Oshima T, Niwa Y, Kuwata K, Srivastava A, Hyoda T, Tsuchiya Y, Kumagai M, Tsuyuguchi M, Tamaru T, Sugiyama A, Ono N, Zolboot N, Aikawa Y, Oishi S, Nonami A, Arai F, Hagihara S, Yamaguchi J, Tama F, Kunisaki Y, Yagita K, Ikeda M, Kinoshita T, Kay SA, Itami K, Hirota T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 eaau9060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aau9060	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 Tamai TK, Nakane Y, Ota W, Kobayashi A, Ishiguro M, Kadofusa N, Ikegami K, Yagita K, Shigeyoshi Y, Sudo M, Nishiwaki-Ohkawa T, Sato A, Yoshimura T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of circadian clock modulators from existing drugs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO Mol Med	6. 最初と最後の頁 e8724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/emmm.201708724	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 八木田和弘	4. 巻 37
2. 論文標題 概論：リアルワールドと向き合う体内時計・概日リズム研究の未来	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学 (実験医学「特集：時間生物学からサーカディアン・メディシンへ」の企画を担当)	6. 最初と最後の頁 352-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 井之川仁, 梅村康浩, 八木田和弘	4. 巻 37
2. 論文標題 リバーストランスレショナル研究としてのマウスコホート	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 372-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 13件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yagita Kazuhiro
2. 発表標題 Developmental Program and Environmental Reprogram of Mammalian Circadian Regulation System
3. 学会等名 European Biological Rhythms Society Congress 2019 (Lyon) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 子どもの体内時計と生活リズム
3. 学会等名 第40回京都保育問題研究会（京都）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 体内時計はいつ形成されるか？
3. 学会等名 第7回新胎児学研究会（高松）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 概日リズムと老化
3. 学会等名 第34回老化促進モデルマウス(SAM)学会学術集会（高松）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 長期にわたる概日リズム攪乱による免疫恒常性破綻
3. 学会等名 第44回日本睡眠学会学術集会（名古屋）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 哺乳類細胞の概日制御系成立プログラム
3. 学会等名 細胞自在操作のための分子科学技術の開発拠点形成2018年度成果報告会（京田辺）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yagita K.
2. 発表標題 Developmental Program and Environmental Reprogramming of the Mammalian Circadian System.
3. 学会等名 Advance in Sleep and Circadian Science（Clearwater Beach Florida）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yagita K.
2. 発表標題 Regulation and mis-regulation of cellular differentiation-coupled circadian clock functionality in mammals.
3. 学会等名 Matrix Biology Europe 2018（Manchester）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yagita K.
2. 発表標題 Plasticity of Mammalian Circadian Clock: from cellular to organismal levels.
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2018 (Sapporo) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yagita K.
2. 発表標題 Developmental Program and Environmental Reprogramming of the Mammalian Circadian System.
3. 学会等名 Biochemistry & Molecular Biology Seminar Series: UT medical Science Center at Houston (Houston) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yagita K.
2. 発表標題 Circadian Clock and ES cell System: Differentiation, Development and Cancer.
3. 学会等名 Manchester Regenerative Medicine Network Seminar 2018 (Manchester) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 概日リズムと生涯健康医学
3. 学会等名 第46回臨床神経病理懇話会・第18回日本神経病理学会近畿地方会 (京都) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八木田和弘
2. 発表標題 哺乳類における概日時間秩序の創出機構
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会（長崎）（招待講演）
4. 発表年 2018年

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------