

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10394

研究課題名（和文）蛍光イメージングを利用した小児の歯髄炎の概日リズム判定

研究課題名（英文）Circadian rhythm determination of oral inflammation using fluorescence imaging

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：歯髄の炎症反応にみられる概日リズムの測定を将来的な目的として、本研究では哺乳類培養細胞株を用いて炎症マーカーMAPK活性をFRETで測定した。本研究ではMAPK分子群のうちERKおよびJNKを選びバイオセンサーを作成し、培養細胞に遺伝子導入した。細胞に様々な時間帯において炎症惹起物質を投与したところ、MAPKの反応は時刻依存的に変化することが示された。また、バイオセンサーを動物に導入し、動物の概日リズムと炎症反応の関連を解析する系を立ち上げることを目的として、マウスの行動リズムを24時間測定するシステムを構築し、概日リズムを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体温やホルモン分泌、唾液分泌など体の機能の多くには約24時間周期の概日リズムがある。夜型や不規則な生活習慣は概日リズムを乱し、肥満や生活習慣病の原因となることが過去の研究で明らかになっている。本研究は概日リズムの乱れが虫歯など口腔内の炎症性疾患の症状に影響するかどうかを検討するために行った。本研究において細胞内で炎症時にはたらく分子の挙動を蛍光タンパク質で観察することができるシステムを構築することができ、口腔内の炎症はもとより全身の様々な炎症性疾患の一日の中の変動を分析することが可能になった。

研究成果の概要（英文）：For the future purpose of measuring the circadian rhythm observed in the inflammatory response of the dental pulp, in this study, the inflammatory marker MAPK activity was measured by FRET using mammalian cultured cell lines. In this study, we selected ERK and JNK from the MAPK molecule group, created biosensors, and transfected them into cultured cells. When cells were treated with proinflammatory substances at various times, MAPK responses were shown to change in a time-dependent manner. In addition, with the aim of introducing biosensors into animals and setting up a system to analyze the relationship between circadian rhythms and inflammatory responses in animals, we constructed a system to measure the behavioral rhythms of mice 24 hours a day, and measured the circadian rhythms.

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生リスクが高いこと、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。

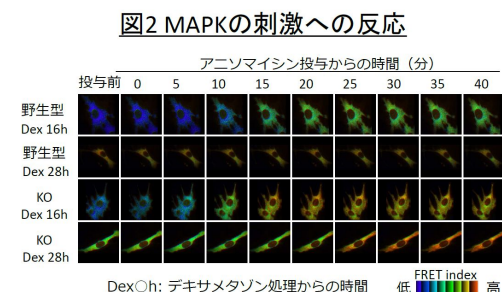
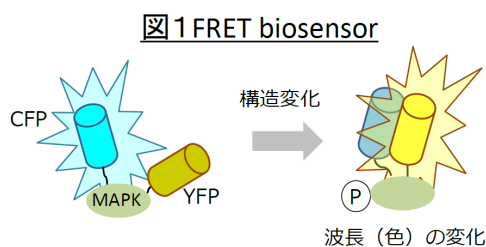
時計遺伝子 Rev-erb 発現を蛍光タンパク質でモニターするバイオセンサー(University of Geneva, Prof. U. Schiblerより供与)を用いて細胞の概日リズムを確認した。Rev-erb は生体内で昼に発現が上昇する遺伝子であるため、このセンサーは細胞内の時刻情報を得る「時計の針」として利用することができる。

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ノ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が変化したのに対し、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た。

また、バイオセンサーを動物に導入し、動物の概日リズムと炎症反応の関連を解析する系を立ち上げることを目的として、まずマウスの概日リズムを赤外線センサーおよび回転輪活動によって 24 時間行動測定するシステムを構築した。マウスをケージごとに個別に照明条件を変えられる箱に入れ、タイマー制御で照明のオン・オフをすることができる。上記の箱の中で、ADInstruments 社の PowerLab を Actimetrics 社の ClockLab ソフトウェアを用いて制御することによりマウスの行動を連続測定した。

図3 MAPK反応の時刻依存性

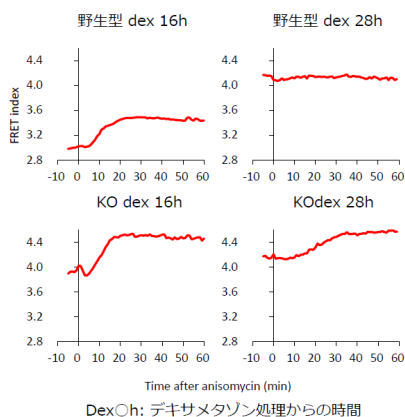


図4 時計遺伝子によるMAPK反応の制御

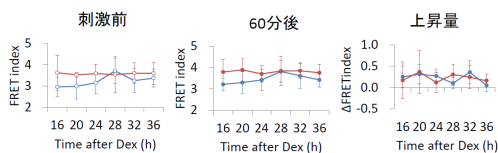
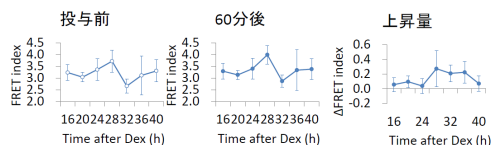


図5 LPSに対するMAPK反応の時刻依存性



本研究により開発されたバイオセンサーはウィルスベクターなどを用いて動物組織に導入することも可能であり、今後はマウス組織に導入し生体内において炎症反応に概日リズムがみられるか検証する。不規則な生活習慣を本研究で構築した行動リズム計測システムを用いてマウスに再現し、MAPK バイオセンサーを歯髄組織などに導入、炎症性物質への反応に時刻依存性があるか検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 Nishide Shinya, Suzuki Yohko, Ono Daisuke, Honma Sato, Honma Ken-ichi	4. 巻 36
2. 論文標題 The Food-entrainable Oscillator Is a Complex of Non-SCN Activity Bout Oscillators Uncoupled From the SCN Circadian Pacemaker	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 575 ~ 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/07487304211047937	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 Nishide Shinya, Yoshihara Toshihiro, Hongou Hirohisa, Kanehira Takashi, Yawaka Yasutaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Daily life habits associated with eveningness lead to a higher prevalence of dental caries in children	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 302 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2019.01.015	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 Fujioka Yoichiro, Satoh Aya O., Horiuchi Kosui, Fujioka Mari, Tsutsumi Kaori, Sasaki Junko, Nepal Prabha, Kashiwagi Sayaka, Paudel Sarad, Nishide Shinya, Nanbo Asuka, Sasaki Takehiko, Ohba Yusuke	4. 巻 44
2. 論文標題 A Peptide Derived from Phosphoinositide 3-kinase Inhibits Endocytosis and Influenza Virus Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 61 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19001	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishide Shinya, Yawaka Yasutaka
2. 発表標題 Correlations between prevalence of dental caries and circadian rhythms in children
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishide S, Honma K, Honma S.
2. 発表標題 Two coupled molecular loops in the mouse circadian system: Implication in entrainment.
3. 学会等名 XVI Congress of the European biological rhythms society, (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------