

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590234

研究課題名 (和文) 概日リズムと細胞周期の関連性

研究課題名 (英文) Relationship of circadian rhythm with cycle control

研究代表者

磯部 芳明 (ISOBE YOSHIAKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70094357

研究成果の概要 (和文)：

脊椎動物は概日リズムと細胞周期の2つの自己振動体システムがある。胎生期 14 日のネズミ胎児脳の preoptic neuroepithelium からの分散細胞培養から得た neurosphere 法で増殖させた。2 回目の passage 後に、培養細胞を 6 時間間隔の 9:00、15:00、21:00、および 3:00 サンプルングした。9:00 での G1 stage の細胞の割合は 21:00 のそれより少なかった。Per2 と p27 mRNAs は同様のサーカディアンリズムを示した。胎児脳の pallial neuroepithelium から得られた細胞から得たデータとは様相を異にした。結果は、細胞周期と概日リズムが密接に関連しているものと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

Two self-oscillating systems are running in vertebrate organ that are circadian rhythm and cell cycle. Proliferating neurosphere was prepared from the dispersed cell culture of preoptic neuroepithelium in E14 rat fetus brain. After the second passage, the cells were collected 6 hr intervals at 9:00, 15:00, 21:00 and 03:00. Proportion of G1 cells at 9:00 was smaller than that at 21:00. Per2 and p27 mRNAs showed similar circadian rhythms, which peaked at 21:00. From the results, cell cycle is tightly controlled by the component of circadian rhythm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：概日リズム、細胞周期、ES 細胞、分化、時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 概日リズムと細胞周期の関連に関して
① マウスの再生肝細胞では、肝臓の摘出時刻依存性に細胞分裂のピークが出現する事が報告されている(松尾 等, 2003)。この事は、細胞周期は時刻を認識している事を意味

し、実際、細胞周期の G2/M の調節をつかさどる Cyclin B、cdc2 の mRNA の発現時刻と時計遺伝子の Per2 のピークとが一致していた。また G2→M の check point 蛋白である Wee1 のリズム (CT8 に peak) も報告されている。② Bjarnason et al. (2001) は 1

細胞周期を概日リズムの1日に当てはめて Subjective day (主観的昼)の真ん中に S 期と G2 期が、その後半に M 期が、そして G1 期は Subjective night (主観的夜)と Subjective day の前半までに相当する事をヒトの口腔粘膜から採取して得た組織の hPer, hCry1, Bmal1 mRNA 発現のピーク出現時刻から推定している。③ Lee グループの Fu 等は Per2 が細胞周期を抑制する効果があり抗腫瘍作用を示す事を報告した(2002-2007)。これらの事は、あたかも、Per2 が Bmal1:Clock のヘテロダイマー形成を抑制する仕組みと近似する。以上、①②③は細胞周期と概日リズムは時計関連遺伝子産物を介して密接に関連している事を示唆している。

(2) 発ガンとの関連で

Cell cycle 制御の異常は発ガンを引き起こし、概日リズムの異常は発ガンのリスクが増し、ガン患者において時計遺伝子のリズムが消失する事が報告されている (Stevens, 2005)、長期にわたる昼夜交替勤務の女性に乳ガンの発生率が高くなることも報告されている (Davis et al., 2001)。この事は、とりも直さず、cell cycle と circadian rhythm がチェックポイントを介してカップルしている事を示している。

2. 研究の目的

生物は内因性の時計を持ち、概日 (約 24 時間) リズムを形成している。哺乳動物では主たる時計は視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus, SCN) にある。種を超えて代謝や電気活動は明期の方が暗期より (明暗周期の無い場合、非活動期の方が活動期より) 高い。リズム発現に必要で十分な要素が既に出生前に発現する可能性が個体レベルや個々の細胞で報告されている (Isobe et al., 1997; 2005)。時計を構成しているニューロンの概日リズム形成のメカニズムを解明するには、その前駆細胞である神経幹細胞 (Neural stem cell, NSC) と神経前駆細胞 (Neuroprogenitor Cell) のリズムを解明する必要がある。一方、細胞周期において Wee1 遺伝子は 5' 上流に E-box をもち他の時計遺伝子と同様 Bmal1/Clock のヘテロダイマーで活性化され Per 蛋白で抑制される。Wee1 は G2/M チェックポイントの Cdk 1 (=cdc 2) をリン酸化し細胞周期を止めている。従って 時計遺伝子 Per により M 期進行が調節されている。時計遺伝子 Per1 蛋白量と細胞周期調節の Wee1, Cdk1 タンパク量とは自由継続リズムの位相がカップルしている (Gery et al. 2006)。さらに、増殖する培養肝臓細胞に Per2 の概日リズムが認められている。そこで、セルラインを用いた実験では、生体外物質や本来の時計機構に備わっていない性質が現われる

可能性は除去できない。よって、野生株のラット胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来の NSC (神経幹細胞) での概日リズムと細胞周期の関連性の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞 (NSC) の調製とリズム発現

① 胎仔ラット (E14) から生後に視交叉上核 (SCN) となる部分を含む脳部位を摘出した。この胚細胞 (EC) でプライマリーカルチャーを無血清 DMEM/F12 培養液で始めた。1 日後にプレートに付着しない細胞 (Neurosphere 形成) を選別し DMEM/F12/N2 で培養すると 2 日目には neurosphere が多い colony が増殖しピペッティングの後継代培養をした。2 回目の passage 後。6 時間毎 (03:00, 09:00, 15:00, 21:00) にディッシュに細胞を採取し (mRNA 測定用の細胞と細胞分画用の試料を調整した。RNA 用のサンプルからは TRIzol で RNA を抽出し、逆転写後、時計遺伝子を指標として Per 2, Bmal1 に加え SCN からの出力に関与する Arg-vasopressin の mRNA を定量してリズムを判定した。細胞周期の各期特異性の G2/M チェックポイントの指標として Wee1, p21, p27 の mRNA の RT-PCR を行った。

② 細胞分画用 FACS を用いて細胞周期の stage を求めた。実際には、分取した細胞を PBS で洗浄後、培養細胞を 70% EtOH 固定し、測定時まで -20°C で保存した。分画測定に際し、Propidium iodide (PI) で蛍光染色し FACS ソーターで解析した。

③ 幹細胞の出所由来の違いによるリズム発現の差異を確かめるために、Atlas of prenatal rat brain development (J Atman & S.A. Bayer CRC press) を参考として 胎生期 (E14) 脳の、生後に淡蒼球や線条体になる部位 (腹側脳室周囲層, subparaventricular zone, SVZ) を採取し比較の対象とした。

(2) ELISA

タンパクとしての Rev-erb α と Bmal1 の定量には ELISA を採用した。Rev-erb α は (Nuclear Receptor Subfamily1, GroupD, member2, NR1D2) (# E93946Ra, Uscn Life Science Inc., Seattle, WA, USA)、Bmal1 は (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like protein, Ant1) (# E93468Ra, Uscn Life Science Inc., WA, USA)。Wee1 は cdc 2 の Try15 のリン酸化活性を利用する方法で Wee1 kinase assay Kit (Cyclex, Cat #CY-1172) を用い Wee1

protein positive control (Cyclex、Cat #CY-E1172) を標準として定量した。

(3) Microarray data

Real time PCR 得る mRNA と同様に 2 回の passage の後に 03:00, 09:00, 15:00 と 21:00 に分取した ES 細胞から TRIzol kit (Invitrogen) で mRNA を抽出した。抽出した 4 サンプルは OD 測定後 Filgen に Rat Whole genome Microarray (Cat. #F-300031-1-4, CodeLink™, 33,849 (転写産物数 32,590)) の実行を依頼した。蛍光強度測定した plate data は Microarray data analysis Tool Ver. 3.2 を用いて解析しクラスター及びそのツリー解析には Cluster and TreeView (Michael Eisen, Stanford University) で行った。

4. 研究成果

総数 32,590 種の遺伝子について Microarray 解析を行った。その中で、注目される知見を RT-PCR の結果及びタンパクへの翻訳後の ELISA の結果とともに紹介する。尚、Microarray の結果解析は今も進行中である。

(1) 細胞周期の制御の面からみた場合:

Cyclin D binding protein と発現量のごくわずかではあるが cyclin E1 とが mirror image で既に stepwise に細胞周期を形成していることが想像できた。しかし、Cyclin D binding protein 群の中には日内変動の pattern が必ずしも一致しないものも認められた。

p21 群の日内変動は p21 の activator 群とは日内変動において、負の相関性が伺えた。RT-PCR の結果では p21 と p27 の発現量は他の mRNA 発現量と同程度であることが Microarray の結果でも認められ日内変動もほぼ同様なパターンを示した。

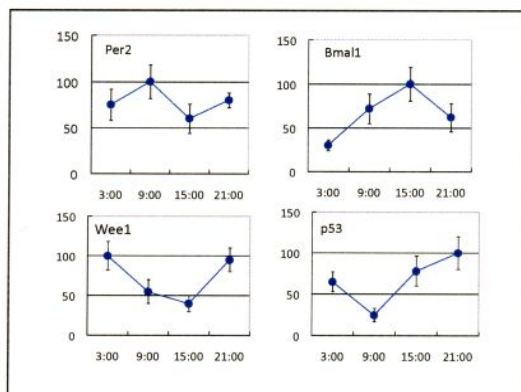


Fig. 1 神経幹細胞、培養 8 日目の細胞周期抑制因子 per2 mRNA、Bmal1 mRNA、Wee1 mRNA、p53 mRNA の日内リズム。 β -Actin で normalize 後 24 時間での最高値を 100% としてあらわす。

c-Myc は発ガンに深く関わり、多くの cyclin 群を増加させ細胞周期を positive にコントロールすることが知られている。c-Myc を含めて n-Myc、v-Myc 共に U-shape (3 又は 21 に 9、15 より 2 倍以上の発現が認められる) をしめし、下流の myc-regulated gene の発現パターンと一致していた。c-Myc の増加に伴う p27 の減少は RT-PCR の結果からも認められ、さらに Wee1 活性のリズムとも時間帯を一致させていた (Fig. 1 参照)。

(2) 時計関連遺伝子の面から観た場合: Per 群 (Per1, Per2, Per3) と Bmal1 のリズムは生後逆位相をとるが神経幹細胞の場合同期している場合が多く観られ、これは、未だ十分には時計機能が完成していないことを示す結果かもしれない。同様に、Bmal1 (Arnt1) と circadian clock の sub-routine を構成している Rev-erb α mRNA (強発現) は完成した時計の場合約 6 時間の差があるが今回は完全に位相が逆転していた。

Real time PCR の cycle 数で比較すると β -actin mRNA を基準とし 1.0 としたとき、Per2、Bmal1、Wee1、p53 の発現量はそれぞれ、1/7、1/230、1/40、1/50 程度であり特に Bmal1 は極度に発現が遅れているようであった。

SCN 内で概日リズムの構成に不可欠な Arg-vasopressin (AVP, 10979) とそのレセプターの 1 つである AVPR2 は共に 2 峰性を示したがその位相は 180° ずれていた。このことは 2 回の passage 後に既に AVP は機能していることを示唆している。但しそのレセプターの AVPr1b は発現量が少なく解析の対象から外した。AVP 及びその mRNA の振動は生後 5 日目で明白であることを我々も報告しているが (Isobe et al., 2005a; Isobe et al., 2005b) その位相角 (時刻) の決定は胎生期 14 日迄に決定されることを予想している、これは今回の AVP 振動現象と意味を同じくするものと考えられる。ヒトで SCN 中の AVP 含量の急激な上昇が生後 2 日迄のあいだに起こり、これに伴って日内リズムの急速な完成がみられることと符合する (Swaab et al, 1990)

代表的な時計遺伝子である Bmal1 の mRNA は 9:00 と 15:00 時に高くなる傾向であった (Fig. 1)。しかし、生体で機能するのは翻訳後のタンパクであり、この BMAL1 タンパクはリズム性を示さなかった (Fig. 2)。この点につき Microarray の結果を参照すると Arnt 2 (今回用いた RT-PCR で検出できる cDNA と同一) は同様に Bell-shape を示したが Arnt1 は U-shape を示した。このことが、Bmal1 に関して転写後にタンパクレベルの調節を受

けるのか、それとも Bmal1 タンパク発現に Arntl も関与するのか、さらには Bmal1 タンパク発現には特別経路[Bae 2005]が関与することの可能性も伺えた。

尚、参考迄に視床下部と大脳皮質に由来する遺伝子を比較するとその発現量は後者の方が約2倍以上多く、発現パターンは視床下部由来の場合 U-shape、大脳皮質に由来の場合 Bell-shape となる遺伝子群が多かった。また、幼ラット脳に特有な遺伝子群の多くは2峰性を示した。この2峰性が単一 peak を示すリズムになるのか、もしくは持続するのかの判定は今後の課題だと考える。

当初に計画していたことで、神経幹細胞に概日リズムが検出できないことが危惧され、その際、エントレーナーとして dexamethasone などを添加することを考えたがその必要は無かった。

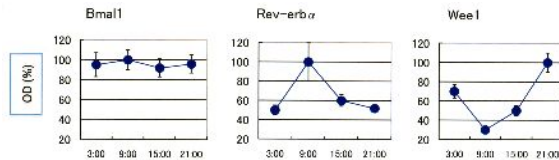


Fig. 2. Bmal1、Rev-erbβ のタンパク量および Wee1 の活性。威連れも最高値を 100% としてあらわす。

(3) ELISA での結果と FACS データ: Bmal1 は mRNA レベルでは明らかなリズム (RT-PCR の結果と Micro-array の結果) を示したが、タンパクレベルでは殆どリズム性が認められなかったし、その発現量も僅かであった。一方 Rev-erbα は 09:00 に高値を示し、この時間帯に Wee1 活性は最低値を示した (Fig. 1 と Fig. 2)。

FACS の結果は 03:00 と 15:00 の方が 09:00 と 21:00 よりも S 期の細胞が多く、その分 G1 期の細胞が少なくなっていた。細胞周期を抑制する Wee1 と p53 は 9:00 と 15:00 に低くなり、逆に Bmal1 はこの時間帯に高値を示した。Bmal1 は subjective day と subjective night の移行期に高くなるので、03:00 と 9:00 は subjective day に相当し一般的には G1 期の多い時間帯に有るといえるが、S 期が 09:00 に多いのはやはり、2 峰性の要素を含んでいるのかも知れない。

Microarray の結果では Wee1 mRNA と Wee1 family 中の Thex1 (*S. pombe*) とが逆位相を示した。これは RT-PCR での Wee1 mRNA の結果と、また ELISA 法出得た Wee1 activity の結果とも一致する。タンパクレベルで比較したところ 09:00 頃最も多く増殖する傾向であった

(4) 細胞周期と時計関連遺伝子群との関係
細胞周期と時計に関する遺伝子群を 3-9, 3-15; 3-21 で調べたところすくなくとも 4 種か検出され Bmal1 (2 種類)、cyclin B1、cyclin B2 で、一つの Bmal1 は 03:00 が 09:00 より高値を示し発現量も少なかったもう一つの Bmal1 は RT-PCR の結果と同様な結果となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Isobe, Y., Hida, H., Nishino, H. (2011) Circadian rhythm of enolase in suprachiasmatic nucleus depends on the mitochondrial function. *J. Neurosci. Res.* 89: 936-944. (査読あり)
- ② Isobe, Y., Hida, H., Nishino, H. (2011) Circadian rhythm of metabolic oscillation in suprachiasmatic nucleus depends on the mitochondrial oxidation state, reflected by cytochrome C oxidase and LDH. *J. Neurosci. Res.* 89: 929-935. (査読あり)
- ③ Isobe, Y., Fukamachi, K., Hida, H., Tsuda, H., Nishino, H. (2008) Diethylnitrosamine-induced hepatic lesions are greater in rats maintained under a light-dark cycle than under constant light, related to the locomotor activity rhythm. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 9: 619-624. (査読あり)
- ④ Misumi, S., Kim, TS., Jung, CG., Masuda, T., Urakawa, S., Isobe, Y., Furuyama, F., Nishino, H., Hida, H. (2008) Enhanced neurogenesis from neural progenitor cells with G1/S-phase cell cycle arrest is mediated by transforming growth factor beta1. *Eur J Neurosci.* 28: 1049-1059. (査読あり)
- ⑤ Kim, TS., Misumi, S., Jung, CG., Masuda, T., Isobe, Y., Furuyama, F., Nishino, H., Hida, H. (2008) Increase in dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cell-derived neural progenitor/stem cells is mediated by hypoxia inducible factor-1alpha. *J*

[学会発表] (計 4 件)

- ① 磯部芳明 ES 細胞のサーカディアンリズムと細胞周期との関係. 第 33 日本神経科学大会 2010 年 9 月 2 日 神戸コンベンションセンター
- ② 磯部芳明、津田洋幸 Diethylnitrosamine の明暗周期下投与時の肝毒性は 24 時間に 2 峰性をしめす。第 87 回日本生理学会大会 2010 年 5 月 19 日 盛岡市民文化ホール
- ③ Isobe, Y., Tsuda, Y.
Diethylnitrosamine induced hepatic carcinogenicity was cruel kept under the light-dark cycle than constant dim light and different by an injection-time of day in rats. 18th International Congress of Biometeorology (ICB2008) Sep. 22-26 2008 Tokyo Tower Hall Funabori
- ④ 磯部芳明、津田洋幸
Diethylnitrosamine の明暗周期下での投与時刻による、自発活動リズムと肝ガン発生の差異 (1P-G-116) 第 85 回日本生理学会大会 2008 年 3 月 25 日 京王プラザホテル東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 芳明 (ISOBE YOSHIAKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70094357

(2) 研究分担者

中西 真 (NAKANISHI MAKOTO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40217774

飛田 秀樹 (HIDA HIDEKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00305525