

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16607

研究課題名(和文)概日時計複合体は脳脊髄液分泌を操るのか？

研究課題名(英文) Does the circadian clock complex control cerebrospinal fluid secretion?

研究代表者

山口 剛史 (Yamaguchi, Takeshi)

国際医療福祉大学・保健医療学部・助教

研究者番号：50726510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：認知症をきたす疾患の一つである突発性正常圧水頭症では脳脊髄液の過剰な貯留がみられる。この過剰な貯留が脈絡叢での概日リズムの破綻からもたらされると仮定して、脈絡叢からの脳脊髄液の産出に関連する遺伝子の日内変動について検討した。脳脊髄液産生に概日リズムをもたらすと仮定した候補因子のうち、Glut1 mRNAの発現のみが日内変動を示した。他の因子では有意な日内変動は認められなかったが、いくつかの因子(AQP1、NKCC1、Claudin2)においては、約6時間周期での発現変動が認められた。一方で、AQP1タンパク質、Claudin2タンパク質の第4脳室脈絡叢での発現には有意な日内変動が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠障害の患者が認知症の最も多い原因疾患であるアルツハイマー病(AD)を発症しやすい点から、概日リズムの乱れがADと関連していると考えられる。近年、AD予防のメカニズムとして脳脊髄液の環流によるアミロイドの洗い流しが注目を集めている。休眠期に拡張される間質腔に脳脊髄液を押し流す力の変動が概日時計によって制御され、脳内でのアミロイドの排除が促進されると考えている。脳脊髄液環流に対する概日時計の制御機構の詳細を解明することは、脳内からの老廃物除去の障害をもたらす様々な疾患への予防に対する時間医学への応用に繋がることを期待している。

研究成果の概要(英文)：Excessive accumulation of cerebrospinal fluid is seen in the patients with sudden normal pressure hydrocephalus, which is one of the causes of dementia. This excessive accumulation is most likely attributed to a disruption of circadian rhythms in the choroid plexus. Thus, we investigated diurnal variation of expression of genes which are responsible for the production of cerebrospinal fluid. As a result, among the candidate genes that hypothetically control circadian rhythm in the cerebrospinal fluid production, only Glut1 mRNA expressed in a diurnal variation pattern. No significant diurnal variation was observed for other candidate genes, but some genes (AQP1, NKCC1, and Claudin2) expressed in a fluctuating manner with a cycle of about 6 hours. On the other hand, significant diurnal variation was shown in the expression of AQP1 and Claudin2 proteins in the fourth ventricular choroid plexus.

研究分野：神経科学

キーワード：脈絡叢 脳脊髄液 概日時計

1. 研究開始当初の背景

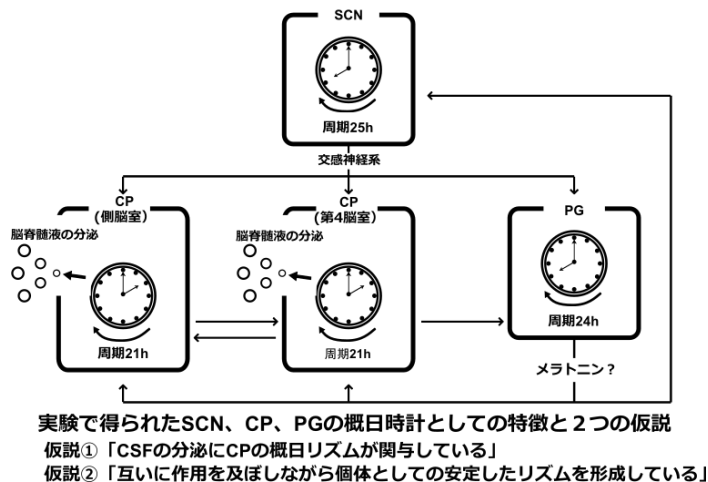
日本は本格的な高齢化社会に突入すると同時に認知症の高齢者も年々増加しており、その関心もますます高まっていた。水頭症は認知症をきたす疾患の一つである。突発性正常圧水頭症では、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF) の循環障害による過剰な貯留が脳室を拡大させ、頭蓋骨内面に大脳半球を押し付けることによって、認知症を含む数々の脳の障害を引き起こす。正常時、CSFは脈絡叢(choroid plexus: CP)から概日リズムにしたがって産出されることが報告されていた (Nilson *et al.* 1992)。概日リズムは体温、血圧、各種ホルモンの分泌や睡眠・覚醒など主要な生理現象を制御している。個々の細胞に概日時計が存在し、それぞれの細胞・組織を適切な時刻に機能するよう支配している。哺乳類では間脳視床下部に位置する視交叉上核(suprachiasmatic nucleus: SCN)が中枢時計として自律神経、ホルモンを介して体全体の概日時計に時刻を指示し統合している。しかしながら、近年CPが中枢時計であるSCNよりも堅固なリズムを刻み、CSFの循環を介してSCNに作用し概日リズムの操作をしている可能性が提唱された (Myung *et al.* 2018)。また、CPの上皮細胞には非選択性カチオンチャンネルTRPV4とクロライドチャンネル (アノクタミン I) が存在し、互いに作用し、CSFの分泌に関わることが報告されていた (Takayama *et al.* 2014)。一方で、TRPV4はマウス膀胱の内側上皮細胞にも存在し、時計遺伝子による概日リズム性の発現を示す (Ihara *et al.* 2017)。我々は、概日リズムの研究を進めるにあたりこれまで次のことを明らかにした (Yamaguchi *et al.* 2020)。①CPの上皮細胞で時計遺伝子 *rPer2* mRNAが概日リズム性の発現をする。②SCN、CP、松果体 (pineal gland: PG) 各組織がそれぞれ自律的なリズムを発振する。③脳内でSCN、CP、PGの概日リズムは24時間周期であるのに対して、SCN、CPの単独培養時は、各概日リズムが24時間と異なる。

以上のことから、申請者は以下の仮説を立てた。

仮説①「CSFの産出は概日リズムにより制御されている」。

仮説②「脳内では複数の時計が互いに作用を及ぼしながら個体としての安定した概日リズムを形成している」。

概日時計の相互作用に関しては、PGがSCNから上頸神経節を介してメラトニン分泌抑制の支配を受けることが報告されていた (Pevet *et al.* 2011)。メラトニンは体深部の熱を逃がして休眠に導くことが知られている。一方で、SCN、CPにはメラトニン受容体が発現しメラトニンの影響を受けると考えられる (Williams *et al.* 1999, Coge *et al.* 2009)。



2. 研究の目的

CPに備わる概日リズム制御機構、並びに、脳内の概日時計複合体の制御機構を解析することを端緒として、認知症の一因であるCSFの過剰な貯留とCPにおけるCSF分泌の概日リズム制御の破綻との関連性を解明することを大きな目的としている。まずはCPにおける関連因子の発現周期および異なる体内時計を持つ3つの組織 (CP、SCN、PG) 間の相互作用に関して

上記の仮説の検討を行った。

3. 研究の方法

- (1) CPにおいて概日時計はCSF分泌に関わることが想定される。3時間毎に摘出したラット脳から側脳室脈絡叢 (CP-LV)、第4脳室脈絡叢 (CP-4V) を採集し、1周期 (24時間) の内でCSF分泌関連遺伝子のmRNA量、タンパク質量の変化をRT-PCR、western blottingにより解析し、ラットCPにおいて関連遺伝子が概日リズム性の発現を示すかを検討した。
- (2) *Per2::luciferase*ラット (ト) と非トランスジェニックラット (非) からCP、SCN、PGを摘出し、組織ごとに共培養を行い、各組織の概日時計に沿った発光振動を測定した。時計組織 (ト) のみの培養をコントロールとして、時計組織 (非) から時計組織 (ト) への時計間の作用 (位相、周期への影響) を検討した。

4. 研究成果

- (1) 脳脊髄液産生に概日リズムをもたらすと仮定した候補因子のうち、*Glut1* mRNA の発現のみが日内変動を示した。他の因子では有意な日内変動は認められなかったが、いくつかの因子 (*AQP1*、*NKCC1*、*Claudin2*) においては、約6時間周期での発現変動が認められた (図1)。CPにおける *Glut1* mRNA の発現では日内変動が見られたのに対し *AQP1* や *NKCC1*、*Claudin2* mRNA では約6時間周期での発現変動が認められたことは、CPにおけるSCF分泌関連分子の発現には、circadian clock (24時間周期) と Ultradian clock (6時間周期) が連動して働いていることを示唆している。

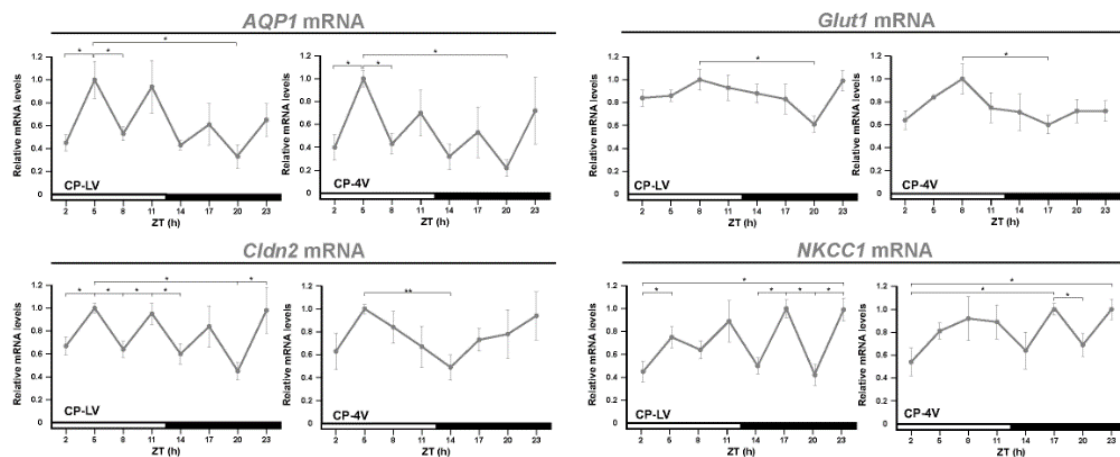


図1 RT-PCR

一方で、第4脳室脈絡叢におけるAQP1タンパク質、Claudin2タンパク質の発現は、mRNAの発現では見られなかった、有意な日内変動が見られた (図2)。この2つの因子に関しては、転写後の制御 (翻訳やmRNA分解など) により日内変動がもたらされたことが考えられる。

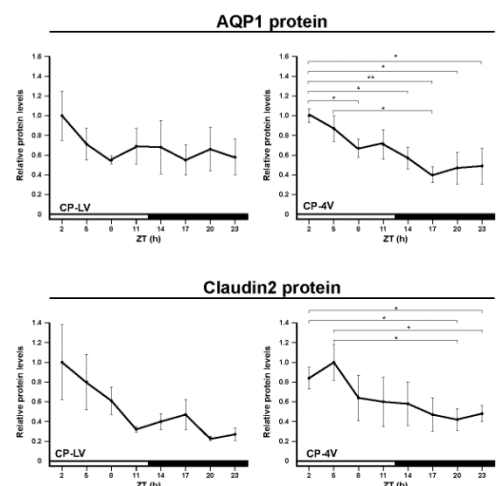


図2 Western blotting

(2) 互いに作用を及ぼしながら安定したリズムを形成する脳内の4つの組織としてCP-LV、CP-4V、SCN、PGに着目した。組織間の相互作用を検討するため、*per2:luc*トランスジェニックラットと非トランスジェニックラットから摘出した各組織をそれぞれ組み合わせ共培養下で時計遺伝子 *per2* mRNA の発現について調査した。しかしながら、どの組み合わせにおいても、異なる周期が概日リズム性の周期に修正されるというような変化は確認できなかった。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshi Yamaguchi, Toshiyuki Hamada, Norio Iijima	4. 巻 30
2. 論文標題 Differences in recovery processes of circadian oscillators in various tissues after sevoflurane treatment in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101258	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口剛史、浜田俊幸、飯島典夫
2. 発表標題 ラット脳内の時計群に対する麻酔薬の影響
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口剛史、浜田俊幸、飯島典夫
2. 発表標題 Inhalation anesthetic sevoflurane induces phase-shift of circadian clocks in the brain specifically at night
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口剛史、浜田俊幸、飯島典夫
2. 発表標題 ラット脳内の時計群に対する麻酔薬の影響
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口剛史、浜田俊幸、飯島典夫
2. 発表標題 Effects of sevoflurane on Per2 expression were corrected with or without related tissue
3. 学会等名 第127回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口剛史、大出浩子、松崎利行、浜田俊幸、飯島典夫
2. 発表標題 ラット脈絡叢からの脳脊髄分泌に関わる遺伝子発現に概日リズムはあるのか
3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口剛史、大出浩子、松崎利行、浜田俊幸、飯島典夫
2. 発表標題 ラット脈絡叢からの脳脊髄分泌に関わる遺伝子発現に概日リズムはあるのか
3. 学会等名 第30回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------	---------