

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350808

研究課題名(和文)新規ペプチドダイアリシス法を応用した身体運動による生物時計調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Novel peptide-dialysis system to assess the effect of physical exercise on the circadian clock

研究代表者

山仲 勇二郎 (Yamanaka, Yujiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20528343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高分子神経ペプチドを回収可能なペプチドダイアリシス法を用いて、生物時計中枢である視床下部視交叉上核(SCN)の液性出力因子であるAVPの概日リズムを測定し、in vivo条件下でAVPの機能解析を試みた。雄性野生型マウスを用い、12時間明・12時間暗の明暗周期、恒常暗下で2-4日間飼育し、ダイアリシスサンプルを回収した。プローブがSCN先端に接していた一部のマウスでは、明期前半にAVP濃度が上昇する概日リズムが観察されたが、多くのマウスではプローブの挿入位置に関わらずAVP濃度に明瞭なリズムは検出されなかった。今後、技術面でのさらなる改良が必要と思われる。

研究成果の概要(英文)：Brain microdialysis is a powerful technique for measuring a neurotransmitter in extracellular fluid from free moving animals. By using this technique with some modification for measuring a large molecule (neuropeptide), we examined circadian rhythm of neuropeptide released from a central circadian pacemaker of suprachiasmatic nucleus in free moving mice. The mice were placed under a normal light-dark cycle and constant darkness conditions for 2-4 days. During this period, artificial cerebrospinal fluid was perfused at a flow rate of 1 μ l/min and the dialysate were collected every 1 h. As a result, circadian rhythm of AVP in dialysate was detected in some mice that the dialysis probe was inserted close to the SCN. The highest value was observed in early subjective day (ZT4). However, in other mice, circadian rhythms of AVP in dialysate were not detected. Technical improvement would be needed in future studies.

研究分野：時間生物学

キーワード：マイクロダイアリシス マウス 視交叉上核 アルギニバゾプレッシン

1. 研究開始当初の背景

我々の行動や内分泌活動等の生理機能にみられる 24 時間の周期性は、生体内に存在するリズム発振機構(生物時計)により制御されている。哺乳類における生物時計の中核は、視床下部視交叉上核に存在する。恒常環境下で測定された視交叉上核の内因性周期は、地球の自転周期である 24 時間とはわずかに異なる。昼夜変化の存在する環境下では、網膜で受容した外界の光情報を同調因子として内因性周期を補正して 24 時間の環境周期に同調すると同時に、その活動を行動や内分泌活動などの生理機能のリズムとして表現する。視交叉上核の自律振動メカニズムは、複数の時計遺伝子の転写と翻訳を介する分子フィードバックループによると考えられている。しかし、視交叉上核からのリズム出力系には、神経あるいは視交叉上核内で生成され、時計遺伝子により転写調節を受ける複数の液性因子(神経ペプチド)を介する経路が想定されているが、その実態は不明であり今後の一層の研究の進展が必要である。

生物時計の周期および位相を調節する最も強力な同調因子は、光(昼夜変化)である。一方、身体運動の生物時計に対する影響については、恒常暗条件下で行動リズムがフリーランしている動物に周期的に回転輪運動を負荷すると行動リズムが同調することが報告されている(Edgar et al. *Am J Physiol* 1991; Yamanaka et al. *Sleep Biological Rhythms* 2006)。申請者は、マウスを使用し、明暗周期を 8 時間位相前進させた際に、位相前進した暗期開始時刻から回転輪運動を負荷すると行動リズムの再同調に要する期間が劇的に短縮し、回転輪運動後に採取した培養視交叉上核、骨格筋、肺といった末梢臓器の時計遺伝子発現リズムも対照群に比べ有意に位相前進し、回転輪運動により概日リズムの再同調が促進されることを報告している(Yamanaka et al. *Genes Cells* 2008)。これ

らの先行研究から、身体運動は、位相依存的に視交叉上核に作用し、時計遺伝子発現リズムの調節を受ける出力系リズムを変化させることにより生理機能の時間的統合を達成することが推測されるが、そのメカニズムは不明である。また、今までの先行研究では生体から取り出した培養条件下で視交叉上核の活動リズムを測定しているため、視交叉上核からのリズム出力系が変化する過程や培養組織レベルでの時計遺伝子発現リズムの変化と個体レベルでの行動リズムの変化の因果関係を追究することは困難であった。脳マイクロダイアリス法は、脳内局所の神経伝達物質遊離の変動をリアルタイムでモニタリングする画期的なシステムであり、主に神経薬理学領域で用いられてきた。近年、従来のマイクロダイアリス法では測定することが困難であった高分子ペプチドを測定可能なペプチドダイアリス法が新たに開発され、幅広い研究分野への応用が期待されている。

視交叉上核には、複数の神経ペプチド産生ニューロンが部位特異的に存在することが知られており、網膜視床下部路の神経終末が inputs する背内側部には血管作動性腸管ペプチド VIP、腹外側部にはアルギニンバソプレッシン AVP が存在する。明暗条件下では、VIP は暗期に、AVP は明期にピークをもつ 24 時間リズムを示す。恒常暗下では VIP はリズムが消失するが AVP はリズムが継続する(Shinohara et al. *J Neurosci* 1993)。VIP は、視交叉上核内の光情報伝達、AVP は時計遺伝子による転写調節を受ける視交叉上核のリズム出力因子と考えられている。しかし、各神経ペプチドの個体レベルにおける生理機能は不明である。最近では、AVP と同様に時計遺伝子により転写調節を受け、行動リズムの制御に関わる神経ペプチドとしてプロキネチシン 2(PK2)が同定されている(Cheng et al. *Nature* 2002)。ペプチドダイア

リシス法を応用することで、AVP、PK2 の放出リズムを視交叉上核からのリズム出力マーカーとして用いることができ、さらに各神経ペプチドの生理機能を個体レベルで明らかにすることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、視交叉上核内で合成され細胞外へ放出される複数の神経ペプチドをペプチドダイアリシス法により行動リズムと同時に測定するシステムを確立し、身体運動が視交叉上核に作用する機序を個体レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、実験開始時の月齢が4月齢の雄性野生型マウス(C57BL6J)を使用した。マウスは、12時間明期、12時間暗期の明暗周期下で飼育した。マウスは、イソフルラン麻酔下で脳定位固定装置に固定し、ガイドカニューレを視交叉上核の1mm上方に挿入、歯科用セメントで固定し、ダミーカニューレを挿入した。挿入位置は、ダイアリシスプローブ先端がガイドカニューレより1mm露出することを考慮し、AP: -0.4mm from Bregma、L: +0.2mm from middle、H: +4.6mm from duraとした。ダミーカニューレ挿入から10日間以上の回復期間をおいたのち、再びイソフルラン麻酔下でダミーカニューレをはずし、ダイアリシスプローブを挿入した。ダイアリシスプローブはガイドカニューレ先端が1mm露出するように設計されており、視交叉上核内にプローブを挿入した。ダイアリシスプローブ挿入後、24時間の明暗周期条件下および恒常暗条件下で48~96時間飼育した。ダイアリシスサンプルは、フラクションコレクタを用いて1時間間隔で回収した。本研究では、視交叉上核の産生する神経ペプチドのうちAVP濃度を測定した。回収したダイアリシスサンプル中のAVP濃度は、ラジオイムノアッ

セイにより定量した。実験終了後、プローブ挿入位置を確認するため還流固定を行ったうえ脱脳し、後日クリオスタットで50 μ mごとに冠状断スライスを作成し、クレシルバイオレット染色によりプローブ位置を確認した。

マウスの行動リズムとダイアリシスサンプルを同時に測定・回収できるシステムを作成するため現有していたペプチドダイアリシスシステム(Atmos-LMシリーズ、エイコム社製)と自発活動量を測定するための赤外線センサーを組み合わせて作成したシステムに輪回し運動を計測するためのケージを独自に開発した。なお、この回転ケージは有限会社メルクエストにより製品化された(RWC-15FM 実用新案取得済)。

4. 研究成果

ダイアリシスプローブ(直径0.7mm)先端がSCN付近に接していたマウスのうち一部のマウスでAVP濃度が主観的明期の前半に高くなる明瞭な概日リズムが観察された。しかし、SCN付近にプローブが挿入していたにも関わらずAVP濃度が安定せず、濃度の急な上昇(低下)がみられ、リズムを検出することができない個体もいた。この結果について、プローブが大きいためにSCNそのものへの損傷やACSF還流時のプッシュ側とプル側が常に均一化されていないために脳内に灌流液が漏れ出し脳内の浸透圧が変化したことがAVPに影響する可能性が浮上した。そこで、プローブ膜サイズが小さくプッシュのみで回収が可能なマイクロダイアリシス用プローブ(直径0.4mm)に変更し、現在AVPリズムの検出が可能か検討している。当初の計画に対し、研究を十分に進めることができなかったが、今後、測定条件を最適化することによりin vivo条件下での行動、摂食、代謝リズムと脳内に複数存在する神経ペプチドとの関連性を検証していくことが可能になると期待してい

る。

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2件)

Yamanaka Y, Hashimoto S, Takasu N, Tanahashi Y, Nishide S, Honma S, Honma K. Morning and evening physical exercise differentially regulate the autonomic nervous system during nocturnal sleep in humans. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2015; 309(9):R1112-R1121. doi: 10.1111/gtc.12336. 査読有

Yamanaka Y, Honma S, Honma K. Mistimed wheel-running interferes with re-entrainment of circadian Per1 rhythms in the mouse skeletal muscle and lung. *Genes to Cells*. 2016; 21(3):264-274. doi: 10.1152/ajpregu.00127.2015. 査読有

[学会発表](計5件)

山仲勇二郎、橋本聡子、高須奈々、本間さと、本間研一. 日常生活下でのヒト概日リズムの調節機序. 第22回日本時間生物学会が学術大会. 2015年11月21日. 東京大学伊藤国際学術センター・福武ホール(東京都・文京区)

Yamanaka Y, Honma S, Honma K. Differential regulation of circadian rhythms in behavior and peripheral clock in mice by physical exercise. *Asian Forum on Chronobiology in 2015* (招待講演)(国際学会), 2015年9月7日~9日, 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

山仲勇二郎、北市雄士、北川寛、井上猛、本間さと、本間研一. 双極性障害における概日リズム異常の経時的評価. 日本生理学会北

海道地方会. 2015年9月5日. 旭川医科大学(北海道・旭川市)

山仲勇二郎、橋本聡子、高須奈々、増淵悟、夏堀晃世、棚橋祐典、西出真也、本間さと、本間研一. 光と運動による生物時計の調節メカニズム. 日本睡眠学会第40回定期学術集会(招待講演)、2015年7月2日、宇都宮東武ホテルグランデ(栃木県・宇都宮市)

山仲勇二郎、橋本聡子、増淵悟、夏堀晃世、西出真也、本間さと、本間研一. 高照度光下での運動が生体リズムに与える影響. 第17回日本体力医学会北海道地方会学術集会、2015年4月25日. 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

[図書](計1件)

(1)山仲勇二郎. ヒトの生物時計制御と光環境. 光と生命の事典. 朝倉書店. 日本光生物学協会 光と生命の事典編集委員編著. 2016.pp.224-225. 査読無

6. 研究組織

(1)研究代表者

山仲 勇二郎 (YAMANAKA YUJIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 20528343