

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670655

研究課題名(和文) 軟骨におけるストレス応答機構と概日リズムとのクロストークの解明

研究課題名(英文) crosstalk between stress response and the circadian rhythm in cartilage

研究代表者

久保 俊一 (KUBO, TOSHIKAZU)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20178031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：体内時計のレポーターマウスを用いて、軟骨部の概日リズムを観察し、薬剤投与や物理刺激に対する概日リズムの変化を観察した。その結果、体内時計は器官培養下においても長期間にわたって維持されることを明らかにした。さらに、発光イメージング装置による観察から、成長軟骨板や関節軟骨で強い発光が観察された。このことから、軟骨部に体内時計が存在することが明らかになった。さらに、この軟骨部の体内時計は、デキサメタゾンやフォルスコリンに対して投与時刻依存的に位相変位を示すことが明らかになった。また、副甲状腺ホルモン(PTH)の投与では、PTH受容体を介して投与時刻依存的および投与量依存的に体内時計の時刻を変化させた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that ‘tissue-autonomous’ circadian rhythm in the articular cartilage and the growth plate. We revealed a robust and extremely long-lasting circadian rhythm in ex vivo culture maintained for over six months from the femoral bone of a *Period2::Luciferase* mouse. Furthermore, real-time bioluminescence microscopic imaging revealed that the robust circadian rhythms emanated from the articular cartilage and the epiphyseal cartilage within the growth plate of juvenile animals. Stimulation by forskolin or dexamethasone treatment caused type 0 phase resetting, indicating canonical entraining properties of the cartilage circadian clock. We also showed that *Per2::Luc* activity in the growth plate and the articular cartilage were phase-shifted by Parathyroid hormone via PTH type1 receptor.

研究分野：軟骨

キーワード：軟骨 概日リズム

1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまな疾患において病態と時計遺伝子の関連が注目されている。軟骨においては、hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) が時計遺伝子 differentiated embryo chondrocyte (DEC)を誘導することからストレス刺激などが概日リズムの異常を引き起こす可能性がある。

2. 研究の目的

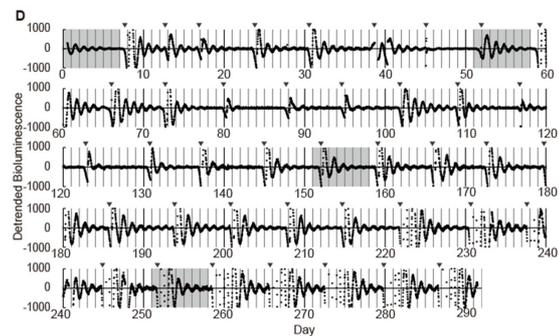
- (1) 軟骨疾患と概日リズムの異常との関連を明らかにするため、まず初めの目的として、概日リズムをもたらす機構である体内時計の存在を明らかにすることとした。
- (2) 軟骨部に存在する体内時計が、ストレス刺激やホルモンの投与でどのように変化するかを調べることで、軟骨部体内時計がどのような性質をもつのかを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

- (1) 軟骨組織に体内時計が存在することを明らかにするため、体内時計レポーターマウスを用いて、大腿骨を器官培養下に観察した。観察には、光電子増倍管を用いて発光量を継続的に計測するとともに、発光イメージング装置を用いて、大腿骨の発光局在を詳細に検討した。
- (2) 大腿骨に薬剤を投与した。用いた薬剤は、合成糖質コルチコイドであるデキサメタゾンと細胞内 cAMP 濃度を上昇させる化合物であるフォルスコリンと投与した。
- (3) 骨粗鬆症治療や骨折修復促進薬として効果が示されている副甲状腺ホルモン (PTH)を投与して、軟骨部の体内時計がどのように変化するかを観察した。観察には光電子増倍管と発光イメージング装置ともを用いて詳細に観察した。さらにそのシグナルを検討するために、PTH 受容体 (PTH1R) に対して免疫組織化学法による検討を行った。

4. 研究成果

- (1) 軟骨部に体内時計が存在することを明らかにした。
光電子増倍管による観察から、大腿骨器官培養系で、極めて長期間にわたって、生物発光の 24 時間周期のリズムが維持されることが明らかになった。さらに、発光イメージング装置を用いた観察から、成長軟骨板および関節軟骨で強い発光が観察されることが明らかになった。これらから、軟骨部に体内時計が存在することが分かった。

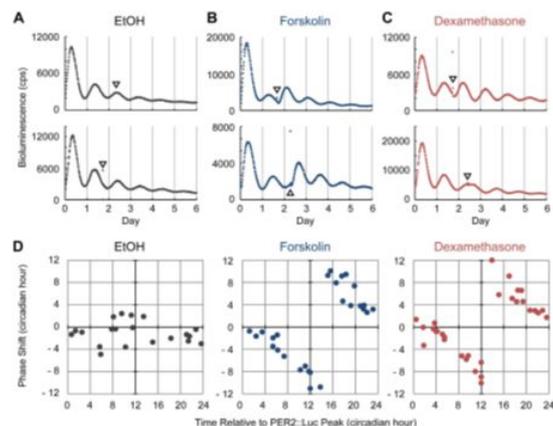


(図) 長期間にわたり観察された大腿骨器官培養での発光リズム



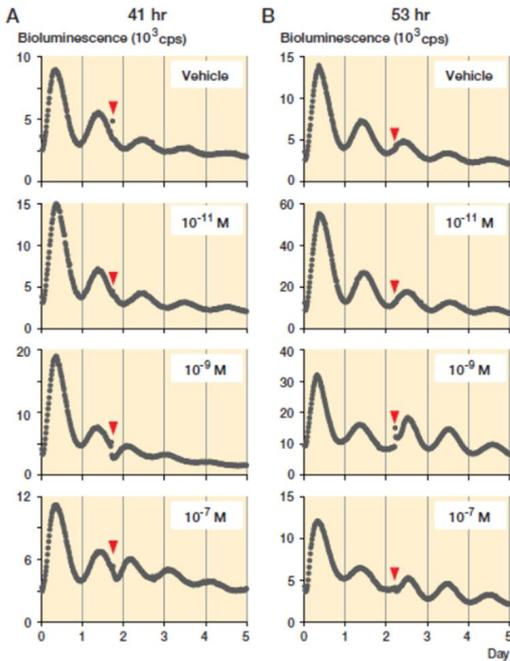
(図) 発光イメージング装置を用いた大腿骨の発光像。強い発光を関節軟骨および成長軟骨板に認める。

- (2) デキサメタゾンやフォルスコリンの投与では、発光のピーク後に投与すると位相が前進し、発光のピーク前に投与すると位相が後退した。一方、溶媒であるエタノールの投与では体内時計の時刻変化はほとんど見られなかった。これらのことから、軟骨部の体内時計はデキサメタゾンやフォルスコリンに対して投与時刻依存的な変化を示すことが明らかになった。

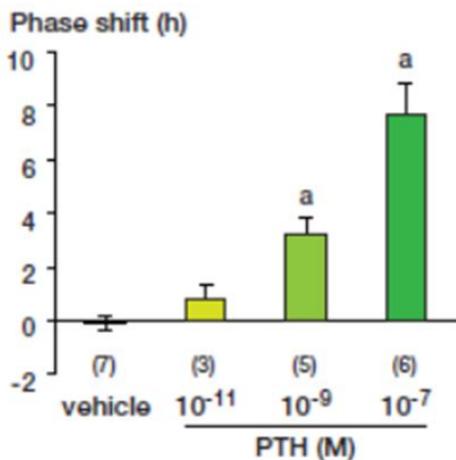


(図) デキサメタゾンおよびフォルスコリンの投与における位相変位。

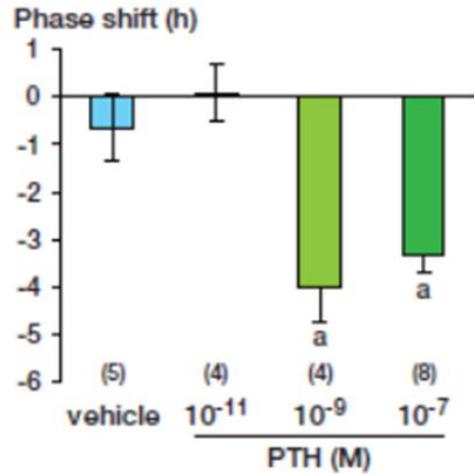
(3) 大腿骨器官培養系は、PTH の投与に対して、時刻依存性的および濃度依存性的に位相変位を示した。発光イメージング装置での位相変位を確認したところ、成長軟骨板や関節軟骨などの軟骨組織で位相変位を示した。
 さらに、PTH1R の発現を免疫組織化学法で検討したところ、成長軟骨板の軟骨細胞で PTH1R の発現を認めた。
 これらのことから、PTH の投与は PTH1R を介して軟骨部体内時計の時刻を変化させることが示唆された。



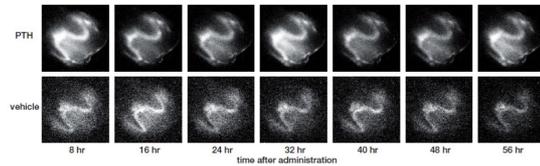
(図) PTH 投与による位相変位。発光観察から 41 時間後 (A) および 53 時間後 (B) における PTH の投与で投与時刻依存的な位相を示した。



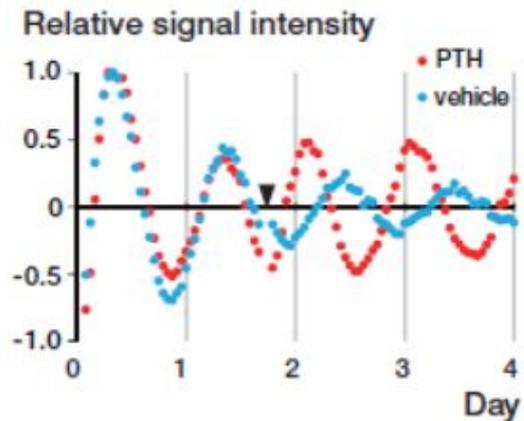
(図) 発光観察から 41 時間後に PTH を投与した際に観察された位相変位。濃度依存性の位相前進を示した。



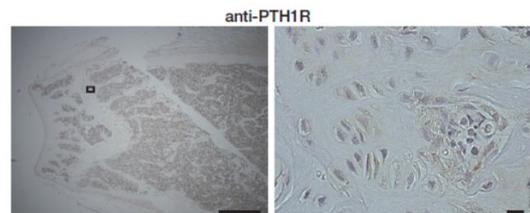
(図) 発光観察から 53 時間後に PTH を投与した際に観察された位相変位。濃度依存性の位相後退を示した。

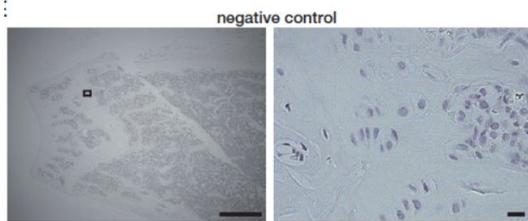


(図) 発光イメージング装置で観察した大腿骨遠位部での PTH および溶媒投与後の位相変位。



(図) 上図での定量的データ。PTH 投与による位相変位が示された。





(図) 免疫組織化学法。成長軟骨板における PTH1R の発現。

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)

Okubo N, Fujiwara H, Minami Y, Umemura Y, Tsuchiya Y, Shirai T, Oda R, Inokawa H, Kubo T, Yagita K. Parathyroid hormone resets the cartilage circadian clock of the organ-cultured murine femur. *Acta Orthopaedica*. 査読有, 2015 Mar 13:1-5.

DOI 10.3109/17453674.2015.1029393

Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Kunimoto T, Hosokawa T, Asada M, Oda R, Kubo T, Yagita K et al. Prolonged Bioluminescence Monitoring in Mouse Ex Vivo Bone Culture Revealed Persistent Circadian Rhythms in Articular Cartilages and Growth Plates. *PLoS ONE* 査読有 8(11):e78306.

doi:10.1371/journal.pone.0078306

〔学会発表〕(計 10 件)

Kunimoto T, Kubo T, Yagita K et al. Organ culture based real-time luminescence imaging revealed the circadian clock exists in a fracture healing site of a mouse femur. 2015.3.28-31.61th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society.ラスベガス, アメリカ

Okubo N, Kubo T, Yagita K et al. Parathyroid hormone, but not melatonin, resets the bone circadian clock. 2015.3.30-31.61th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society.ラスベガス, アメリカ

大久保直輝、久保俊一、八木田和弘、他。長期培養下における大腿骨の成長と概日リズム、2014.10.9-10.第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、鹿児島
 國本達哉、久保俊一、八木田和弘、他。創外固定器によるマウス骨折モデルを用いた骨折治癒過程における時計遺伝子の観察、2014.10.9.第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、鹿児島
 國本達哉、久保俊一、八木田和弘、他。

創外固定器によるマウス骨折モデルを用いた骨折治癒過程における時計遺伝子の観察、2014.7.23-25.第 32 回日本骨代謝学会、大阪国際会議場

Okubo N, Arai Y, Kubo T, Yagita K et al. Juvenile mouse femur grows in organ culture keeping normal circadian clock; Establishment of a new model system for investigating of the circadian clock function within growth plate.2014.3.17-18. 61th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society.ニューオーリンズ、アメリカ

大久保直輝、久保俊一、八木田和弘、他。長期間培養下の大腿骨の成長と概日リズム、2013.11.9-10.第 20 回時間生物学学会、大阪

大久保直輝、久保俊一、八木田和弘、他。PTH(1-34)による骨の体内時計の位相変位、2013.10.18.第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、千葉

Okubo N, Kubo T, Yagita K et al. Bone has endogenous and cell-autonomous circadian clock. 2013.9.8-11. ANZBMS 23rd annual scientific meetin,メルボルン、オーストラリア

大久保直輝、久保俊一、八木田和弘、他。骨組織には自律振動し同調能をもつ体内時計が内在している、2013.5.28-6.1.第 31 回日本骨代謝学会学術集会、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 俊一 (KUBO TOSHIKAZU)

京都府立医科大学・医学研究科・教授
 研究者番号：20178031

(2) 研究分担者

新井 祐志 (ARAI Yuji)

京都府立医科大学・医学研究科・講師
 研究者番号：50347449

中川 周二 (NAKAGAWA SHUJI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：30643382

(3) 連携研究者

八木田和弘 (YAGITA KAZUHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授
 研究者番号：90324920